

# 沙冬青脱水素基因的分子克隆与序列分析

许洋<sup>1</sup>, 雷晨<sup>1</sup>, 余露露<sup>1</sup>, 王瑾瑜<sup>2</sup>, 杨佳慧<sup>1</sup>, 陆雅宁<sup>1</sup>, 卢存福<sup>1</sup>, 陈玉珍<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>北京林业大学生物科学与技术学院/林木育种国家工程实验室/教育部林木花卉遗传育种重点实验室, 北京 100083;

<sup>2</sup>清华大学分析测试中心, 北京 100084)

**摘要:** 脱水素 (Dehydrin) 是晚期胚胎发生蛋白 (LEA) 家族中最具特色的一组蛋白, 对植物抵抗非生物逆境胁迫起到非常重要的作用。本研究从抗逆性较强的常绿阔叶灌木沙冬青中克隆出 4 个含有完整 ORF 的脱水素基因, 命名为 *AmDHN3.2F*、*AmDHN5.1F*、*AmDHN6.2F* 和 *AmDHN7.2*, 并进行了相关生物信息学分析。使用 DNAMAN 软件预测结果显示, 4 个蛋白都含有一个 K 片段和 S 片段。理化性质分析表明, 4 种脱水素蛋白均为亲水性蛋白, 其中 *AmDHN3.2F* 为碱性蛋白, *AmDHN5.1F*、*AmDHN6.2F* 和 *AmDHN7.2* 为酸性蛋白; 理论相对分子质量最大的是 *AmDHN7.2* (21.42kD), 最小的是 *AmDHN3.2F* (10.69kD); 理论等电点最大的是 *AmDHN3.2F* (9.01), 最小的是 *AmDHN6.2F* (6.21)。蛋白二级和三级结构预测结果发现, 4 种蛋白均由 3 种结构组成:  $\alpha$ -螺旋 (7.50%~32.63%)、无规则卷曲 (55.79%~73.00%) 和延伸链 (11.58%~19.50%)。采用邻接法构建系统进化树, 并结合同源相似性分析发现, 4 种脱水素蛋白均与蕨蓼苜蓿 *MtDHN3* 和拟南芥 *AtDHN10* 亲缘关系较近。利用 XSTREAM 软件分析结果显示, *AmDHN5.1F*、*AmDHN6.2F* 和 *AmDHN7.2* 第 3 个蛋白序列具有串联重复单元, 且主要集中在脱水素的中间部分。通过 DOTTER 软件生成点阵图发现, 在中间区域存在大量的短片段重复, 说明脱水素序列的收缩或扩张主要发生在中间部分。这些研究结果为进一步开展沙冬青 *DHN* 基因家族的功能分析奠定了基础。

**关键词:** 脱水素; 沙冬青; 基因家族克隆; 生物信息学; 串联重复

## Molecular Cloning and Sequence Analysis of the Dehydrin Genes in *Ammopiptanthus mongolicus*

XU Yang<sup>1</sup>, LEI Chen<sup>1</sup>, SHE Lu-lu<sup>1</sup>, WANG Jin-yu<sup>2</sup>, YANG Jia-hui<sup>1</sup>, LU Ya-ning<sup>1</sup>,  
LU Cun-fu<sup>1</sup>, CHEN Yu-zhen<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University/ National Engineering Laboratory for Tree Breeding/ Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Tree and Ornamental Plants of Education Ministry, Beijing 100083; <sup>2</sup>Analysis and Testing Center, Tsinghua University, Beijing 100084)

**Abstract:** Dehydrin is the most distinctive group of proteins in the late embryogenesis protein (LEA) family, which plays an important role in plant resistance to abiotic stress. In this paper, we isolated the complete coding sequences of four dehydrin genes, designated *AmDHN3.2F*, *AmDHN5.1F*, *AmDHN6.2F* and *AmDHN7.2*, in stress-resistant evergreen broad-leaved shrub *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) S.H. Cheng. The bioinformatics analysis using DNAMAN software suggested that all four genes carried one K and one S domain. The analysis of physicochemical properties showed that all four proteins belonged to hydrophilic proteins. *AmDHN3.2F* was alkaline protein, while *AmDHN5.1F*, *AmDHN6.2F* and *AmDHN7.2* were acidic proteins. *AmDHN7.2* exhibited the largest theoretical relative molecular weight (21.42 kD), and *AmDHN3.2F* showed

收稿日期: 2019-01-29 修回日期: 2019-02-21 网络出版日期: 2019-03-13

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190129002>

第一作者研究方向为植物分子生物学, E-mail: 15210617899@163.com; 雷晨、余露露为共同第一作者

通信作者: 卢存福, 研究方向为植物分子生物学, E-mail: lucunfu@bjfu.edu.cn

陈玉珍, 研究方向为植物分子生物学, E-mail: chenyzhen@bjfu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31270737); 北京市自然科学基金 (6112016)

**Foundation project:** National Natural Science Foundation of China (31270737), Beijing Municipal Natural Science Foundation (6112016)

the smallest weight ( 10.69 kD ).AmDHN3.2F exhibited the highest theoretical isoelectric point ( PI = 9.01 ), and AmDHN6.2F showed the smallest isoelectric point ( 6.21 ).By *in silico* prediction of secondary and tertiary structure, the four dehydrin proteins composed of three types of motifs: alpha helix ( 7.50%-32.63% ), irregular curl ( 55.79%-73.00% ) and elongation chain ( 11.58%-19.50% ).The phylogenetic tree constructed by Neighbor-joining method suggested that the putative proteins of four dehydrin genes were related to MtDHN3 and AtDHN10.By XSTREAM software, it was found that the protein sequences of AmDHN5.1F, AmDHN6.2F and AmDHN7.2 contained tandem repeat units, which were enriched in the middle part of dehydrin.According to the dot maps generated by DOTTER software, a large number of short repeats were found in the middle part, implying the location where the shrinkage or expansion of dehydration sequence mainly occurred.This findings lay a foundation for further functional analysis of *DHN* gene family in *Ammopiptanthus mongolicus* ( Maxim.ex Kom. ) S.H.Cheng.

**Key words:** dehydrin; *Ammopiptanthus mongolicus* ( Maxim.ex Kom. ) S.H.Cheng; gene family cloning; bioinformatics; tandem repeat

脱水素 ( Dehydrin ) ( 简称 DHN ) 属于晚期胚胎发生蛋白 ( LEA ) 家族中的 D-II 家族, 是 LEA 家族最具特色的一组, 几乎存在于所有种子植物、藻类植物、苔藓类植物、酵母和蓝细菌等生物中<sup>[1-2]</sup>。脱水素一般被分为 5 种类型: Kn、SKn、KnS、YnKn 和 YnSKn, 具有 K、S、Y 3 类高度保守区域, 其中在所有的脱水素中都存在 K- 片段 ( EKKGIMDKIKEKLP 或类似的序列 ), 是一段高度保守且富集赖氨酸的序列, 可形成  $\alpha$ -螺旋的二级结构, 这种结构具有亲水性和疏水性的双重特征; 许多脱水素还含有由成串的 5~7 个丝氨酸构成的 S 片段, S 片段磷酸化可以使脱水素在信号肽的引导下进入细胞核; 还有一些脱水素在 N 端含有另一类序列 ( V/T ) DEYGNP, 即 Y 片段, 富含酪氨酸, Y 片段与一些细菌及植物分子伴侣的核酸结合位点上的氨基酸序列具有同源性<sup>[3]</sup>。脱水素具有较强的亲水性, 在非生物逆境胁迫如低温、干旱、高盐等条件下, 能维持植物细胞正常代谢以及细胞膜结构稳定性, 具有重要的保护功能<sup>[4-5]</sup>。据报道, 低温胁迫后 10 个大麦品种中 DHN5 的积累量与其抗冻能力呈正相关<sup>[6]</sup>; 在拟南芥中同时过量表达几个拟南芥脱水素基因后, 转基因植株中积累了大量的脱水素, 抗寒性增强<sup>[7]</sup>。植物脱水素的表达与积累和植物抗逆性之间存在正相关的关系<sup>[5,8]</sup>。

沙冬青 (*Ammopiptanthus mongolicus* ( Maxim. ex Kom. ) S.H.Cheng) 是古老的第 3 纪残遗物种, 主要分布于内蒙古西部荒漠及沙漠地带, 是亚洲中部荒漠地区特有的具有极强抗逆境能力的常绿阔叶灌木<sup>[4,9-10]</sup>。本实验室前期用优化的固相扣除杂交策略从沙冬青幼苗中克隆了 *AmLEA5* 基因<sup>[4]</sup>, 发现 *AmLEA5* 基因的相对表达量受低温诱导, 升高最明

显, 且持续时间最长, 推测沙冬青 *AmLEA5* 基因除了在抗旱、耐盐、耐热方面发挥作用外, 可能主要参与低温伤害的防御机制。

在课题组前期研究的基础上, 本研究对沙冬青脱水素 *AmDHNs* 基因进行克隆, 采用生物信息学方法对 *AmDHNs* 进行分析, 揭示沙冬青脱水素 *AmDHNs* 基因编码蛋白质性质以及各个成员间的亲缘关系, 为进一步开展强抗逆植物沙冬青脱水素 *AmDHNs* 基因参与逆境胁迫响应的生物学功能研究提供新的基因资源。

## 1 材料与方法

**1.1 试验材料** 沙冬青种子采自内蒙古阿拉善荒漠地区。沙冬青育苗采用基质为珍珠岩, 高压灭菌后, 分装在 6 cm × 6 cm 营养钵中, 用自来水吸水饱和, 种子距表层 2~3 cm。在 25 °C、16 h 光照、70% 相对湿度环境条件下培养, 每隔 3 d 浇 1 次水。沙冬青生长 14 d 后, 取幼苗真叶为试验材料, 液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱中。

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* ( L. ) Heynh. )、大豆 (*Glycine max* ( L. ) Merr. )、百脉根 (*Lotus japonicus* ( Regel ) K.Larsen ) 和蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula* Gaertn. ) 脱水素基因相应的蛋白质序列来源于 *Phytozome* 数据库 ( <http://www.phytozome.net/> )。

### 1.2 基因克隆

**1.2.1 提取基因组 DNA** 本试验采用购自北京全式金生物技术有限公司的植物基因组提取试剂盒提取沙冬青总 DNA。取 -80 °C 冰箱中保存的沙冬青幼苗真叶组织 100 mg, 加入液氮充分研磨, 将粉末收集到 2 mL 离心管中; 加入 250  $\mu$ L 溶液 RB1 ( Resuspension Buffer 1 ), 15  $\mu$ L RAase A 充分混

匀, 55 °C 水浴孵育 15 min, 12000 r/min 离心 5 min; 取上清加入 100  $\mu$ L 溶液 PB1 (Precipitation Buffer 1), 冰浴 5 min, 12000 r/min 离心 5 min; 取上清加入 375  $\mu$ L 溶液 BB1 (Binding Buffer 1); 吸取全部的混合液加入离心柱中, 12000 r/min 离心 30 s, 弃去流出液; 加入 500  $\mu$ L 溶液 CB1 (Clean Buffer 1), 12000 r/min 离心 30 s, 弃去流出液; 加入 500  $\mu$ L 溶液 WB1 (Wash Buffer 1), 12000 r/min 离心 30 s, 弃去流出液; 将离心柱置于灭菌的 1.5 mL 离心管中, 在柱中央加入 100  $\mu$ L 预热的 EB (Elution Buffer) (60 °C 水浴预热), 静置 1 min, 12000 r/min 离心 1 min, 洗脱 DNA。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 完整性, 用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计检测 DNA 浓度。

**1.2.2 PCR 扩增** 本研究在实验室前期工作基础上<sup>[9]</sup>, 设计出特异性引物序列: AmF: 5'-ATGGCAGGTATCATCAACAAGATTG-3'; AmR: 5'-CTAGTCACTGTCACTGCTGCTGCTG-3'。

引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。TransStart Top Taq DNA polymerase、琼脂糖凝胶回收试剂盒和 pEASY-T1 Simple Cloning Vector 以及 Trans-T1 Phage Resistant 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。

以 AmF/AmR 为引物, 沙冬青幼苗叶片提取的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增沙冬青脱水素基因。反应体系为 50  $\mu$ L: 沙冬青基因组 DNA 模板 1  $\mu$ L、上游引物 AmF (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L、下游引物 AmR (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L、10  $\times$  TransStart Top Taq Buffer 5  $\mu$ L、2.5 mmol/L dNTPs 4  $\mu$ L、TransStart Top Taq DNA polymerase 0.5  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 37.5  $\mu$ L。

PCR 循环参数设置: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保温。

PCR 产物采用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析, 回收 PCR 产物和 pEASY-T1 Simple Cloning Vector 连接, 转化 Trans-T1 Phage Resistant 感受态细胞, 涂在含 Kanamycin 的 LB 琼脂培养基上倒置培养 12 h, 挑取单菌落, 进行 PCR 检测, 测序验证。测序由北京华大生物科技有限公司完成。

### 1.3 生物信息学分析

利用 DNAMAN 软件比对 4 个蛋白的序列, 分析蛋白中保守氨基酸片段, 推测克隆的基因是否为脱水素相关基因。

利用 ExPASy 数据库的在线软件 ProtParam

(<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测分析待测蛋白的等电点、分子量、氨基酸数、酸碱性、带电性以及平均亲水系数等。

利用 GOR4 ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_gor4.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)) 预测分析脱水素蛋白的二级结构。利用 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 在线分析蛋白质三级结构。

利用 Muscle 软件分析克隆的 4 个沙冬青脱水素与拟南芥、大豆、百脉根和蒺藜苜蓿脱水素之间的同源性。系统进化树采用邻接法, 使用 MEGA 4.0 软件, Bootstrap 值设为 1000。

使用公共软件 DOTTER<sup>[11]</sup> 在默认值下运行, 生成克隆的 4 个沙冬青脱水素之间的点阵图。使用 XSTREAM 软件<sup>[12]</sup> 研究克隆的 4 个沙冬青脱水素序列之间的串联重复序列模式。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因克隆

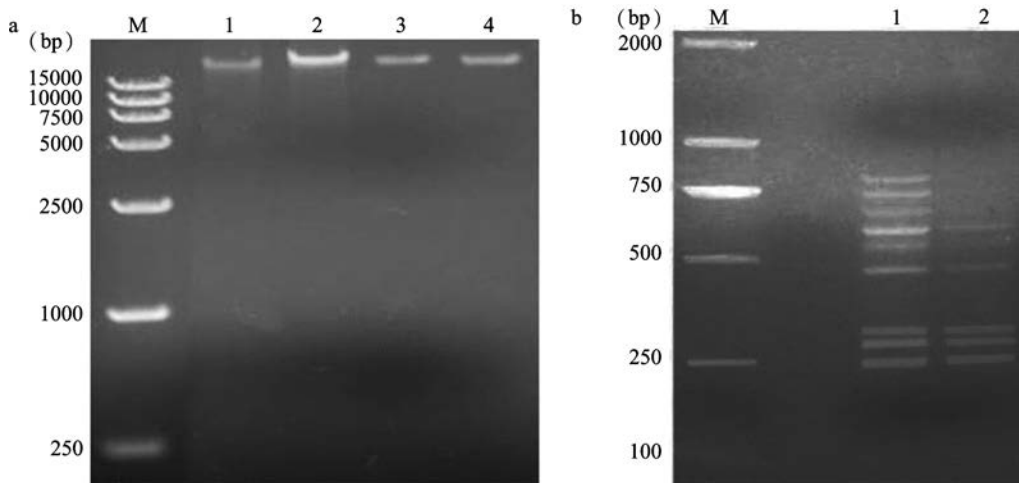
提取基因组 DNA: 沙冬青叶片含脂类、酚类、多糖等物质较多, 所以用植物基因组提取试剂盒提取基因组 DNA。从沙冬青幼苗真叶中提取总 DNA, 经 NanoDrop 2000 超微量分光光度计检测其 A260/A280=1.85~1.87, 浓度为 987~995 ng/ $\mu$ L, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 条带单一, 提取效果较好 (图 1a), 说明所提取的 DNA 质量和浓度均符合试验的要求, 可用于后续试验。

PCR 扩增: 以 AmF/AmR 为引物, 沙冬青幼苗叶片提取的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增沙冬青脱水素基因, PCR 产物采用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示 (图 1b), 泳道中有清晰的 9 条条带, 由下至上 PCR 产物依次编号为 1~9 号。

单克隆分子鉴定: 回收 PCR 产物、连接、转化, 挑取阳性单菌落, 进行 PCR 鉴定, 序列大小分别为 288 bp、399 bp、549 bp 和 603 bp (图 2)。

再选取经 PCR 鉴定为阳性的克隆进行测序, 测序结果经过 NCBI blast 比对、clustalX 多序列比对和 Genscan 软件拼接序列, 最终得出 4 个含有完整 ORF 的基因, 分别命名为 *AmDHN3.2F*、*AmDHN5.1F*、*AmDHN6.2F* 和 *AmDHN7.2*。

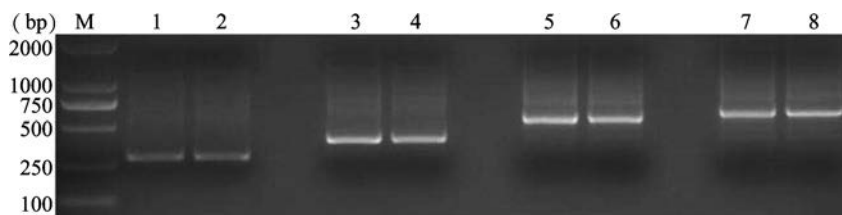
进一步分析发现, 4 个基因 *AmDHN3.2F*、*AmDHN5.1F*、*AmDHN6.2F* 和 *AmDHN7.2* 没有内含子, 编码氨基酸的个数分别是 95 个、132 个、182 个和 200 个。



a: 沙冬青幼苗叶片的基因组 DNA, 1~4: 基因组 DNA; b: 沙冬青脱水素基因的 PCR 扩增产物, 1~2: PCR 扩增产物; M: DNA marker  
 a: Genomic DNA of leaves of *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim.ex Kom.) S.H.Cheng seedlings, 1-4: Genomic DNA, b: Amplification products of dehydration gene of *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim.ex Kom.) S.H.Cheng by PCR, 1-2: PCR amplification products, M: DNA marker

图 1 沙冬青基因组 DNA 及脱水素基因 PCR 扩增结果

Fig.1 Genomic DNA of *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim.ex Kom.) S.H.Cheng and the amplification results of *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim.ex Kom.) S.H.Cheng dehydrin genes



M: DNA marker DL2000, 1-2: *AmDHN3.2F*, 3-4: *AmDHN5.1F*, 5-6: *AmDHN6.2F*, 7-8: *AmDHN7.2* ORF

图 2 PCR 扩增沙冬青脱水素 *AmDHNs* 基因

Fig.2 PCR amplification of *AmDHN* genes

2.2 结构分析

2.2.1 保守片段分析 利用 DNAMAN 分析显示 (图 3), *AmDHN3.2F*、*AmDHN5.1F*、*AmDHN6.2F*

和 *AmDHN7.2* 这 4 个蛋白均含有 1 个 K 片段和一个 S 片段, 其中 *AmDHN3.2F* 含有 1 个类似的 K 片段序列, 说明克隆的 4 个基因为 KS 型脱水素。

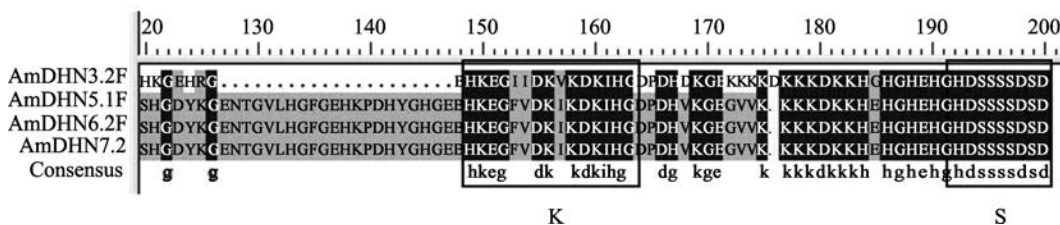


图 3 沙冬青 4 个脱水素蛋白序列的 K 和 S 结构域

Fig.3 Graphic presentation of K and S fragments in four dehydration protein sequences of *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim.ex Kom.) S.H.Cheng

2.2.2 理化性质及二、三级结构分析 从表 1 可以看出, 4 个脱水素蛋白 *AmDHN3.2F*、*AmDHN5.1F*、*AmDHN6.2F*、*AmDHN7.2* 的理论相对分子质量为 10.69~21.42 kD, *AmDHN3.2F* 分子量为 10.69 kD, 在 4 个脱水素中最小, 而 *AmDHN7.2* 分子量为 21.42 kD, 在 4 个脱水素中最大; 4 个脱水素理论等电点 (pI)

为 6.21~9.01, 其中 *AmDHN3.2F* 的 pI 为 9.01, 属于碱性蛋白质, 而 *AmDHN5.1F*、*AmDHN6.2F* 和 *AmDHN7.2* 等电点较为相近, 均为酸性蛋白质; 亲水性平均系数显示, 4 个脱水素都属于亲水性蛋白质。

表 1 沙冬青脱水素理化性质及二级结构组成

Table 1 Physicochemical properties and secondary structure composition of *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim.ex Kom.) S.H.Cheng dehydrating element

蛋白名称 Protein name	蛋白大小 (aa) Protein length	分子量 (kD) MW	等电点 pI	酸碱性 Acid-base property	带电性 Static dissipative	亲水性平均系数 Grand average of hydropathicity	二级结构		
							H(%)	RC(%)	ES(%)
AmDHN3.2F	95	10.69	9.01	碱性	正电荷	-1.95	32.63	55.79	11.58
AmDHN5.1F	132	14.52	6.33	酸性	负电荷	-1.51	11.36	72.73	15.91
AmDHN6.2F	182	19.79	6.21	酸性	负电荷	-1.50	11.54	72.53	15.93
AmDHN7.2	200	21.42	6.37	酸性	负电荷	-1.40	7.50	73.00	19.50

H:  $\alpha$  螺旋; RC: 无规则卷曲; ES: 延伸链

H:  $\alpha$  helix, RC: Random coil, ES: Extended strand

由表 1 可见, 4 个脱水素蛋白质的二级结构均由  $\alpha$ -螺旋、无规则卷曲(RC)和延伸链(ES)组成, 且总体以无规则卷曲为主。4 个脱水素的二级结构各构成元件所占比例不同:  $\alpha$ -螺旋所占比例 7.50%~32.63%, 差异较大, 其中 AmDHN3.2F 所占比例最高为 32.63%, 而 AmDHN7.2 仅为 7.50%; 无规则卷曲所占比例 55.79%~73.00%, 延伸链所占比例 11.58%~19.50%, 均以 AmDHN7.2 所占比例较高, 而 AmDHN3.2F 所占比例较低; AmDHN7.2  $\alpha$ -螺旋比例最低, 而无规则卷曲所占比例最高, 无规则卷曲+延伸链的比例高达 92.50%,

AmDHN5.1F 和 AmDHN6.2F 2 个脱水素二级结构各构成元件介于 AmDHN7.2 和 AmDHN3.2F 之间。

脱水素蛋白的三级结构如图 4, 由于组成 4 个脱水素二级结构各构成元件的比例不同, 导致其三级结构也有所不同。由于 AmDHN3.2F  $\alpha$ -螺旋比例相对较高, 而无规则卷曲+延伸链的比例低于其他 3 种蛋白, 说明 AmDHN3.2F 三级结构灵活性相对较低。而 AmDHN7.2  $\alpha$ -螺旋比例最低, 无规则卷曲+延伸链的比例高达 92.50%, 说明 AmDHN7.2 三级结构灵活性相对较高。

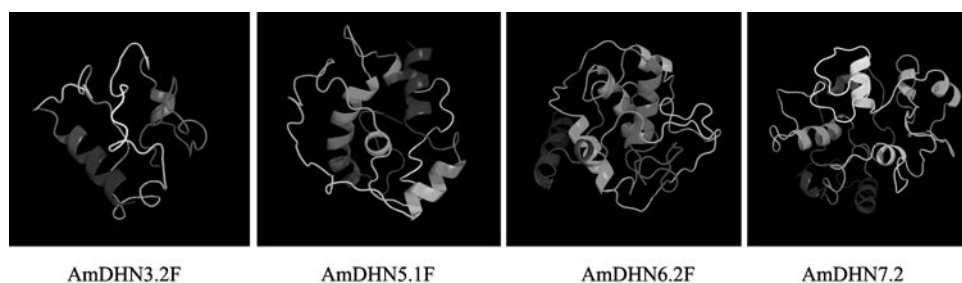


图 4 沙冬青脱水素基因家族编码蛋白质的三级结构

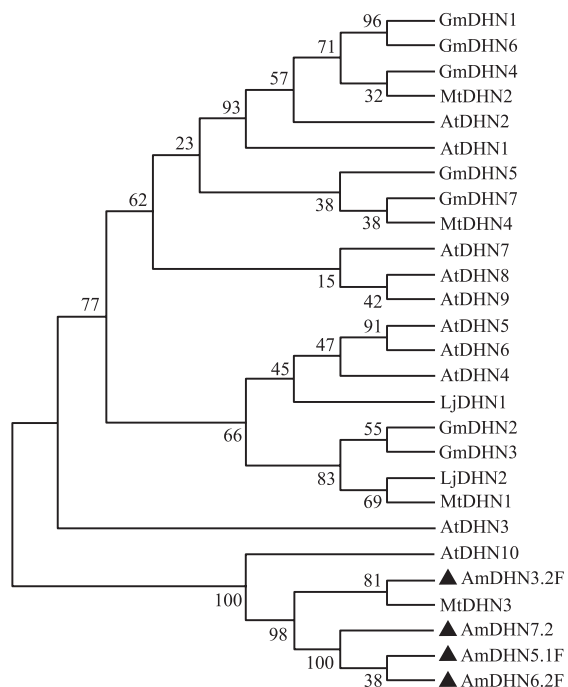
Fig.4 Tertiary structure of proteins encoded in *AmDHNs* gene family of *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim.ex Kom.) S.H.Cheng

### 2.3 同源序列及系统进化分析

通过试验克隆得到沙冬青 4 个脱水素 (AmDHN3.2F、AmDHN5.1F、AmDHN6.2F 和 AmDHN7.2) 与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)、大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.)、百脉根 (*Lotus japonicus* (Regel) K.Larsen) 以及蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula* Gaertn.) 脱水素之间的相似度分析, 4 个沙冬青脱水素成员与上述物种的脱水素相似度都较低, 其中 AmDHN5.1F、AmDHN6.2F 和 AmDHN7.2 与蒺藜苜蓿 MtDHN3 的相似度较高, 分别为 61.65%、47.80% 和 44.00%; 而 AmDHN3.2F 与蒺藜苜蓿 MtDHN3、拟南芥

AtDHN10 的相似度比较相近, 分别为 57.26% 和 50.00%; AmDHN5.1F、AmDHN6.2F 和 AmDHN7.2 则与 AtDHN10 的相似度降低, 依次为 40.00%、28.95% 和 26.92%。

通过沙冬青 4 个脱水素 (AmDHN3.2F、AmDHN5.1F、AmDHN6.2F 和 AmDHN7.2) 与拟南芥、大豆、百脉根以及蒺藜苜蓿的脱水素之间构建系统进化树 (图 5), 结果显示: AmDHN5.1F、AmDHN6.2F 聚在一个小分支, 又与 AmDHN7.2 聚在一个分支, 而 AmDHN3.2F 与蒺藜苜蓿 MtDHN3 聚在一个小的分支, 而后与 AmDHN5.1F、AmDHN6.2F 和 AmDHN7.2 聚在一个较大分支, 这 5 个脱水素



三角形代表沙冬青脱水素; At: 拟南芥; Gm: 大豆; Lj: 百脉根; Mt: 蒺藜苜蓿

The triangle represents the dehydrin of *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim.ex Kom.) S.H.Cheng, At: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., Gm: *Glycine max* (L.) Merr., Lj: *Lotus japonicus* (Regel) K.Larsen, Mt: *Medicago truncatula* Gaertn.

图5 沙冬青4个脱水素与拟南芥、大豆、百脉根和蒺藜苜蓿脱水素之间的系统进化分析

Fig.5 Phylogenetic analysis of the cloned four *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim.ex Kom.) S.H.Cheng dehydrins with *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., *Glycine max* (L.) Merr., *Lotus japonicus* (Regel) K.Larsen, *Medicago truncatula* Gaertn. dehydrins

蛋白又与拟南芥 AtDHN10 聚在一个更大分支上, 表明 AmDHN5.1F、AmDHN6.2F、AmDHN7.2 亲缘关系最近, 而 AmDHN3.2F 与蒺藜苜蓿 MtDHN3 亲

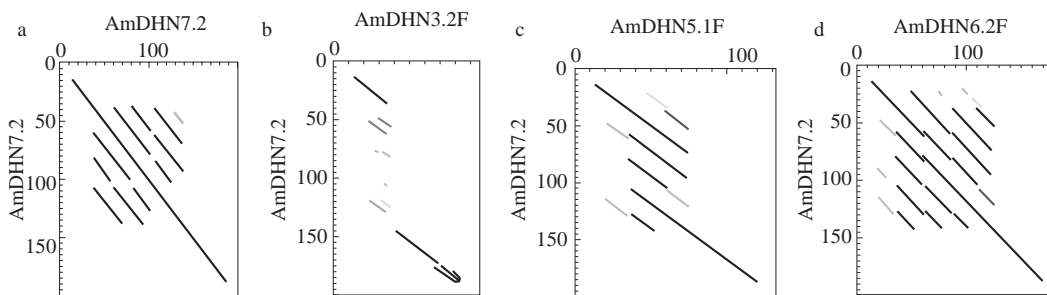


图7 AmDHN7.2 和其他沙冬青脱水素之间的点阵图

Fig.7 Dotplot of AmDHN genes analog AmDHN7.2 against all other AmDHN genes

### 3 讨论

植物固着生长会遭受自然环境的各种生物和非

缘关系最近。其次沙冬青4个脱水素 AmDHN5.1F、AmDHN6.2F、AmDHN7.2、AmDHN3.2F 与蒺藜苜蓿 MtDHN3 和拟南芥 AtDHN10 亲缘关系较近, 而与拟南芥和蒺藜苜蓿的其他脱水素成员、大豆与百脉根的所有成员亲缘关系较远, 这与之前同源相似性比较的结果较一致。

通过鉴定沙冬青4个脱水素蛋白质序列的串联重复 (TR) 模式 (图6), 显示串联重复序列主要集中在脱水素蛋白质的中间部分, 每条序列的深色部分代表相似的重复序列, 串联重复单元个数最少的是2, 最多的是4.27, 而 AmDHN3.2F 没有重复序列。



AmDHN6.2F、AmDHN7.2 和 AmDHN5.1F 是克隆的沙冬青脱水素基因名

AmDHN6.2F, AmDHN7.2 and AmDHN5.1F are the names of cloned dehydrin gene from *Ammopiptanthus mongolicus*

图6 克隆的沙冬青脱水素 AmDHNs 中的串联重复 (TR) 模式  
Fig.6 The Tandem Repeat (TR) patterns in the cloned *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim.ex Kom.) S.H.Cheng dehydrin AmDHNs

脱水素结构域序列分析可揭示被子植物的进化规律。以沙冬青脱水素蛋白 AmDHN7.2 序列中间部分 (从 80~180 氨基酸残基) 和 4 个沙冬青脱水素蛋白比较发现 (图7), 短的重复序列主要集中在中间部分, 表明蛋白质序列的收缩或扩张主要发生在中间部分, 相对而言, 蛋白质 5' - 和 3' - 末端的结构相对保守, 显示出 AmDHNs 蛋白质序列的中间部分可能存在大量的复制和转换事件。

生物逆境胁迫, 为了生存繁衍则进化出非常复杂的适应机制, 对环境刺激做出最佳的响应, 脱水素的表达能增加植物对低温、脱水、干旱、盐和渗透等胁迫

的忍耐性<sup>[3]</sup>。

### 3.1 沙冬青脱水素基因存在多个家族成员

脱水素广泛存在于高等植物中<sup>[2]</sup>,并以多家族成员的形式存在,在大麦<sup>[13]</sup>、拟南芥<sup>[14]</sup>和水稻<sup>[15]</sup>中分别鉴定了 13 个、10 个和 8 个 DHNs 成员。本研究以沙冬青基因组 DNA 为模板,克隆得到 4 个含有完整 ORF 且为 KS 型的基因(*AmDHN3.2F*、*AmDHN5.1F*、*AmDHN6.2F*、*AmDHN7.2*) (图 1~3),同时符合脱水素保守序列特点<sup>[3]</sup>,说明沙冬青脱水素基因家族含有多个成员。

真核生物的基因大部分含有 2 个或 2 个以上的内含子,内含子有利于物种进化,增加了基因的长度,还可提高基因间的重组频率,同时具有调控作用等<sup>[16]</sup>。陆地棉脱水素基因 *GhDHN1* 全长 726 bp,含有 1 个 90 bp 的内含子<sup>[5]</sup>;拟南芥脱水素基因 *AtCOR47* (也是低温响应基因) DNA 序列为 943 bp,含有 1 个 145 bp 的内含子<sup>[17]</sup>。而原核生物中由于具有大量无内含子基因,能够连续编码蛋白质,因此可以大大提高转录效率。之前有研究表明,在逆境胁迫作用下快速应答的基因更趋向于没有内含子的基因,无内含子基因可以延缓调节反应,快速调节整个生长发育过程<sup>[18-19]</sup>。本研究中通过克隆得到 4 个沙冬青脱水素基因,经生物信息学检测,发现均没有内含子,根据这个结果推测强抗逆植物沙冬青脱水素家族对快速响应并抵抗多种逆境胁迫起到了非常重要作用。

### 3.2 沙冬青脱水素基因家族的进化分析

脱水素具有较强的亲水性,在非生物逆境胁迫下能维持植物细胞正常代谢以及细胞膜结构稳定性<sup>[4,5]</sup>,分子量 9~200 kD 不等<sup>[1-2]</sup>。研究报道,棉花 *GhDHN1* 和拟南芥 *AtCOR47* 蛋白属于亲水性蛋白质,均为酸性,带负电荷<sup>[5]</sup>。本研究克隆得到的 4 个脱水素蛋白都属于亲水性蛋白质(表 1),理论相对分子质量为 10.69~21.42 kD,理论等电点(pI)为 6.21~9.01,说明沙冬青脱水素家族成员从分子量大小、酸碱性及带电性质已经出现了较大的分化。

研究发现,葡萄 Actin 基因家族 16 个基因编码的蛋白质在二、三级结构上存在一定差异<sup>[20]</sup>。本研究结果显示,沙冬青 4 个脱水素蛋白质的二级结构构成元件所占比例不同(表 1): $\alpha$ -螺旋所占比例 7.50%~32.63%、无规则卷曲所占比例 55.79%~73.00%,延伸链所占比例 11.58%~19.50%,说明组成 4 个脱水素二级结构的构成元件比例差异较大,这可能导致其三级结构也有所不同(图

4): *AmDHN3.2F*  $\alpha$ -螺旋比例相对较高(32.63%),推测 *AmDHN3.2F* 三级结构灵活性相对较低,而 *AmDHN7.2*  $\alpha$ -螺旋比例最低,无规则卷曲+延伸链的比例则高达 92.50%,推测 *AmDHN7.2* 三级结构灵活性相对较高,而 *AmDHN5.1F* 和 *AmDHN6.2F* 二个脱水素的二级结构构成元件介于 *AmDHN7.2* 和 *AmDHN3.2F* 之间。因此,本研究克隆的沙冬青脱水素基因家族编码的蛋白质已经发生高级结构的分化。

通过沙冬青 4 个脱水素蛋白与拟南芥、大豆、百脉根以及蒺藜苜蓿脱水素的系统进化树结果显示(图 5), *AmDHN5.1F*、*AmDHN6.2F*、*AmDHN7.2* 亲缘关系较近,而 *AmDHN3.2F* 与蒺藜苜蓿 *MtDHN3* 亲缘关系较近,沙冬青 4 个脱水素蛋白既与蒺藜苜蓿 *MtDHN3* 又与拟南芥 *AtDHN10* 亲缘关系较近,而与拟南芥和蒺藜苜蓿的其他脱水素成员、大豆和百脉根的所有成员亲缘关系较远,这与本实验室前期研究沙冬青 *AmLEA5* 和豆科蒺藜苜蓿 *ACJ84182.1* 的亲缘关系较近的结果较一致<sup>[4]</sup>。

植物基因组的重复序列一般占 80% 左右,重复序列不是所谓的“垃圾 DNA”,而是具有重要的生物学功能,特别是在遗传重组、基因重复序列类型方面具有物种及分布的差异性,可能与基因组进化变异有关<sup>[21]</sup>。通过鉴定沙冬青 4 个脱水素显示(图 6),串联重复序列主要集中在 3 个脱水素蛋白质的中间部分,串联重复单元个数最少的是 2,最多的是 4.27,而 *AmDHN3.2F* 没有重复序列。点阵作图法是揭示蛋白质同源性的敏感而直观的方法<sup>[22-23]</sup>。以沙冬青脱水素蛋白 *AmDHN7.2* 序列中间部分和 4 个沙冬青脱水素蛋白比较发现(图 7),短的重复序列主要集中在中间部分,表明蛋白质序列的收缩或者扩张主要发生在中间部分,显示出 *AmDHNs* 蛋白质序列的中间部分可能存在大量的复制和转换事件。

因此,综合分析本研究克隆的沙冬青脱水素基因家族 4 个成员的蛋白质序列,推测脱水素 *AmDHN3.2F* 在沙冬青的进化过程中相对保守,而 *AmDHN5.1F*、*AmDHN6.2F*、*AmDHN7.2* 进化较快,不同成员对沙冬青在极端恶劣的环境条件下可能起到了非常重要的作用,脱水素不同成员生物学功能验证还有待于进一步通过试验验证。

### 参考文献

- [1] Browne J, Tunnacliffe A, Burnell A. Anhydrobiosis: Plant

- desiccation gene found in a nematode. *Nature*, 2002, 416 ( 6876 ): 38
- [ 2 ] Saavedra L, Svensson J, Carballo V, Izmendi D, Welin B, Vidal S. A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. *The Plant Journal*, 2006, 45: 237-249
- [ 3 ] Liu Y, Song Q P, Li D X, Yang X H, Li D Q. Multifunctional roles of plant dehydrins in response to environmental stresses. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1018
- [ 4 ] 赵晓鑫, 刘美芹, 师静, 智冠华, 刘胜利, 张俊琦, 陈玉珍, 卢存福. 沙冬青 *AmLEA5* 基因的生物信息学分析及非生物胁迫下的表达模式. *植物遗传资源学报*, 2013, 14 ( 3 ): 492-500  
Zhao X X, Liu M Q, Shi J, Zhi G H, Liu S L, Zhang J Q, Chen Y Z, Lu C F. Bioinformatic analysis and expression patterns under abiotic stresses of *AmLEA5* from *Ammopiptanthus mongolicus*. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013, 14 ( 3 ): 492-500
- [ 5 ] 王俊娟, 穆敏, 王帅, 陆许可, 陈修贵, 王德龙, 樊伟丽, 阴祖军, 郭丽雪, 叶武威, 喻树迅. 棉花脱水素 *GhDHN1* 的克隆及其表达. *中国农业科学*, 2016, 49 ( 15 ): 2867-2878  
Wang J J, Mu M, Wang S, Lu X K, Chen X G, Wang D L, Fan W L, Yin Z J, Guo L X, Ye W W, Yu S X. Molecular clone and expression of *GhDHN1* gene in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49 ( 15 ): 2867-2878
- [ 6 ] Kosova K, Holkova L, Prasil I T, Prasilova P, Bradacova M, Vitamvas P, Capkova V. Expression of dehydrin 5 during the development of frost tolerance in barley (*Hordeum vulgare*). *Journal of Plant Physiology*, 2008, 165 ( 11 ): 1142-1151
- [ 7 ] Puhakainen T, Hess M W, Makela P, Svensson J, Heino P, Palva E T. Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 2004, 54 ( 5 ): 743-753
- [ 8 ] 万永青, 张杰, 侯向阳, 王照兰, 马玉宝, 万其号, 万东莉. 羊草 *DHN3* 基因的克隆及其逆境响应的表达分析. *西北植物学报*, 2018, 38 ( 9 ): 1598-1604  
Wan Y Q, Zhang J, Hou X Y, Wang Z L, Ma Y B, Wan Q H, Wan D L. Cloning of *LcDHN3* in *Leymus chinensis* and its expression under abiotic stresses. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2018, 38 ( 9 ): 1598-1604
- [ 9 ] Shi J, Liu M Q, Chen Y Z, Wang J Y, Lu C F. Heterologous expression of the dehydrin-like protein gene *AmCIP* from *Ammopiptanthus mongolicus* enhances viability of *Escherichia coli* and tobacco under cold stress. *Plant Growth Regulation*, 2016, 79 ( 1 ): 71-80
- [ 10 ] 王红蕾, 王艳萍, 于婷乔, 刘胜利, 陈玉珍, 卢存福. 沙冬青 *AmCSDP* 基因特性及转基因烟草的抗寒性分析. *园艺学报*, 2017 ( 4 ): 712-722  
Wang H L, Wang Y P, Yu T Q, Liu S L, Chen Y Z, Lu C F. Characterization of *AmCSDP* gene from *Ammopiptanthus mongolicus* and the analysis of cold resistance in transgenic tobacco plants. *Acta Horticulturae Sinica*, 2017 ( 4 ): 712-722
- [ 11 ] Sonnhammer E L L, Durbin R. A dot-matrix program with dynamic threshold control suited for genomic DNA and protein sequence analysis. *Gene*, 1995, 167 ( 1 ): 1-10
- [ 12 ] Newman A M, Cooper J B. XSTREAM: a practical algorithm for identification and architecture modeling of tandem repeats in protein sequences. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8 ( 1 ): 382
- [ 13 ] Abedini R, Ghanegolmohammadi F, Pishkamrad R, Pourabed E, Jafarnejhad A, Shobbar Z, Shahbazi M. Plant dehydrins: shedding light on structure and expression patterns of dehydrin gene family in barley. *Journal of Plant Research*, 2017, 130 ( 4 ): 747-763
- [ 14 ] Hundertmark M, Hinch D K. LEA ( late embryogenesis abundant ) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *Bmc Genomics*, 2008, 9 ( 1 ): 118
- [ 15 ] Wang X S, Zhu H B, Jin G L, Liu H L, Wu W R, Zhu J. Genome-scale identification and analysis of LEA genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*, 2007, 172 ( 2 ): 414-420
- [ 16 ] Shabalina S A, Ogurtsov A Y, Spiridonov A N, Novichkov P S, Spiridonov N A, Koonin E V. Distinct patterns of expression and evolution of intronless and intron-containing mammalian genes. *Molecular Biology and Evolution*, 2010, 27 ( 8 ): 1745-1749
- [ 17 ] Welin B V, Olson A, Palva E T. Structure and organization of two closely related low-temperature-induced *dhn/lea/rab*-like genes in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. *Plant Molecular Biology*, 1995, 29 ( 2 ): 391-395
- [ 18 ] Sang Y M, Liu Q, Lee J H, Ma W J, McVey D S, Blecha F. Expansion of amphibian intronless interferons revises the paradigm for interferon evolution and functional diversity. *Scientific Reports*, 2016, 6: 29072
- [ 19 ] Jain M, Khurana P, Tyagi A K, Khurana J P. Genome-wide analysis of intronless genes in rice and *Arabidopsis*. *Functional and Integrative Genomics*, 2008, 8 ( 1 ): 69-78
- [ 20 ] 崔力文, 郑婷, 张克坤, 张川, 上官凌飞, 房经贵. 葡萄 *Actin* 基因家族的鉴定及进化和表达分析. *植物资源与环境学报*, 2017, 26 ( 3 ): 1-10  
Cui L W, Zheng T, Zhang K K, Zhang C, Shangguan L F, Fang J G. Identification, evolution and expression analyses of *Actin* gene family of *Vitis vinifera*. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2017, 26 ( 3 ): 1-10
- [ 21 ] Zhao Z X, Guo C, Sutharzan S, Li P, Echt C S, Zhang J, Liang C. Genome-wide analysis of tandem repeats in plants and green algae. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2014, 4 ( 1 ): 67-78
- [ 22 ] Kobe B, Deisenhofer J. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends in Biochemical Sciences*, 1994, 19: 415-421
- [ 23 ] Kobe B, Deisenhofer J. A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature*, 1995, 374: 183-186