

薰衣草非特异性脂质转移蛋白基因 *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 的克隆与功能分析

张夏夏, 陈凌娜, 杨 扬, 赵旌汝, 陈永坤

(新疆师范大学生命科学学院/新疆特殊环境物种保护与调控生物学实验室/干旱区植物逆境生物学实验室, 乌鲁木齐 830054)

摘要: 非特异性脂质转移蛋白 (nsLTP, non-specific lipid transfer proteins) 在植物脂质转运和分泌中发挥重要作用。本研究从薰衣草 (*Lavandula angustifolia*) 中克隆到 2 个 II 型 nsLTP 基因, 命名为 *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2*, 并对其进行了功能分析。生信分析表明, *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 分别编码 119 个和 117 个氨基酸, 具有脂质转移蛋白 (LTP, lipid transfer proteins) 保守结构域和 8 个高度保守的半胱氨酸残基; 系统进化分析显示它们处于两个分支, 与同科的紫苏 (*Perilla frutescens*) 相似性最高。基因表达分析显示 2 个基因均在花蕾中高表达, 在叶片、茎和花瓣中几乎不表达, 在花萼中的表达存在差异, *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 分别在成熟花萼和幼嫩花萼中表达量更高; 2 个基因在花蕾和叶片中的表达均受到强光诱导, 且在花蕾中的表达均受脱落酸诱导, 而叶片中 *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 的表达分别受茉莉酸甲酯和乙烯诱导。亚细胞定位显示 2 个 nsLTPs 均定位在细胞膜和细胞壁上, 可能与次生代谢物的转运有关。过表达 *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 烟草叶片经尼罗红染色后, 经 485~543 nm 激发光激发, 叶片腺毛头部的荧光显示多于野生型, 说明本研究中的 nsLTPs 可能在脂类的合成和转运中起重要作用。这些结果为明确薰衣草脂质转移蛋白在脂类及萜类转运中的功能研究提供了参考。

关键词: 薰衣草; 非特异性脂质转移蛋白; 激素处理; 非生物胁迫; 基因表达; 亚细胞定位; 尼罗红染色

Cloning and Functional Analysis of Nonspecific Lipid Transfer Protein Genes *nsLTP2-1* and *nsLTP2-2* in Lavender

ZHANG Xiaxia, CHEN Lingna, YANG Yang, ZHAO Jingru, CHEN Yongkun

(School of Life Sciences, Xinjiang Normal University /Xinjiang Key Laboratory of Special Species Conservation and Regulatory Biology/ Laboratory of Plant Stress Biology in Arid Land, Urumqi 830054)

Abstract: Non-specific lipid transfer proteins (nsLTPs) play a crucial role in the transport and secretion of lipids in plants. In this study, two type II nsLTPs were cloned, namely *nsLTP2-1* and *nsLTP2-2*, and analyzed with functional analysis from *Lavandula angustifolia*. The analysis of sequence characteristics revealed that the *nsLTP2-1* and *nsLTP2-2* genes putatively encode 119 and 117 amino acids, respectively, which exhibit conserved lipid transfer proteins (LTP) domains and 8 highly conserved cysteine residues. The phylogenetic analysis revealed that these genes are located in separate branches and share the closest genetic relationship with *Perilla frutescens*, a member of the Labiatae family. The analysis of gene expression showed that both genes exhibit high expression levels in flower buds, with minimal expression observed in leaves, stems, and petals. However, notable disparities in expression were observed in the calyx, with *nsLTP2-1* and *nsLTP2-2* demonstrating higher expression levels in mature and young calyxes, respectively. The expression of these genes in flower buds and leaves was found to be stimulated by heavy light, while their expression in flower buds was

收稿日期: 2023-12-20 网络出版日期: 2024-03-02

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20231220007>

第一作者研究方向为植物次生代谢研究, E-mail: zhang46081108@163.com

通信作者: 陈永坤, 研究方向为植物逆境生物学, E-mail: chenylk@xjnu.edu.cn

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (2022D01A216, 2022D01A215); 新疆师范大学博士科研启动基金 (XJNUBS2109)

Foundation projects: Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2022D01A216, 2022D01A215); Doctoral Research Initiation Fund of Xinjiang Normal University (XJNUBS2109)

also induced by abscisic acid. Additionally, the expression of *nsLTP2-1* and *nsLTP2-2* in leaves was found to be triggered by methyl jasmonate and ethylene, respectively. The subcellular localization of the yellow fluorescent protein (EYFP) fusion protein demonstrated that both *nsLTPs* were localized on the cell membrane and cell wall, indicating they may be related to the transport of secondary metabolites. Following the overexpression of *nsLTP2-1* and *nsLTP2-2*, tobacco leaves were subjected to Nile red staining, after 485-543 nm excitation light excitation, the fluorescence of leaf glandular hair was more than that of wild type. This observation suggests a potential significance of the *nsLTPs* investigated in this study with regards to lipid synthesis and transport. These findings provide a fundamental basis for elucidating the role of lavender lipid transfer protein in lipid and terpenoid transportation.

Key words: *Lavandula angustifolia*; non-specific lipid transfer proteins; hormone treatment; abiotic stress; gene expression; subcellular localization; Nile red staining

非特异性脂质转移蛋白(*nsLTP*, non-specific lipid transfer proteins)是一类介导膜之间磷脂转移的碱性蛋白,能够结合和转运各种脂质。自1975年首次从马铃薯块茎中分离得到非特异性脂质转移蛋白^[1],目前已从玉米^[2]、小麦^[3]、拟南芥^[4]、黄花蒿^[5]等多种植物中分离,其功能研究最初集中在生物膜之间脂类物质转运和角质的合成^[6-7],随着研究的不断深入,发现*nsLTP*在植物抗逆^[8]、角质和蜡代谢^[9]、种子发育和发芽^[10]、细胞壁生长^[11]等方面也具有重要作用。近年来,有研究表明,烟草(*Nicotiana tabacum*)和青蒿(*Artemisia annua*)腺毛中*nsLTP*具有转运单萜和倍半萜的功能^[5]。

薰衣草(*Lavandula angustifolia*)是唇形科(Lamiaceae)的一种芳香植物,其精油富含多种萜烯类化合物,因此薰衣草体内合成、储存的挥发性萜类的转运和分泌活动十分重要^[12]。但在薰衣草中萜类转运机制尚不清楚,*nsLTP*是否在其中发挥功能尚待研究。前期从薰衣草基因组序列信息^[13]中鉴定了*nsLTP*基因家族164个成员,选择了2个在薰衣草各个组织中表达量较高的*nsLTP*基因进行克隆,根据序列特征将它们分别命名为*nsLTP2-1*和*nsLTP2-2*,经过序列特征、组织特异表达、亚细胞定位和尼罗红染色分析,可为阐明薰衣草*nsLTP*在萜类物质转运中的功能和提高薰衣草精油品质的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

薰衣草京薰2号株型美观,观赏性强,既可用于作环境建设品种,也可用于生产高品质薰衣草精油,为中国科学院植物研究所惠赠;异源表达所用烟草云烟87为北京市农林科学院蔬菜研究中心惠赠;洋

葱为市售的新鲜鳞茎;试验所用菌株为本实验室保存,pSAT6-EYFP-N1和PEZR-K-LN载体为北京市农林科学院惠赠,引物合成及基因测序由北京擎科生物科技有限公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 植物总RNA提取及cDNA的合成 京薰2号种植在新疆生产建设兵团第四师六十九团基地,种植株距为0.5 m×1 m,常规管理,在盛花期(2021年7月份)从大约1000株薰衣草中选择10株两年生且长势相同的健壮植株作为取样材料。分别取薰衣草的花蕾、幼嫩和成熟的花萼、花瓣、叶片(花序下5片大小相近的叶片)和茎各约0.1 g为材料。参照RNAprep Pure多糖多酚植物总RNA提取试剂盒(北京天根)提取各组织总RNA,由分光光度法(上海元析仪器B-500)和琼脂糖电泳检测浓度和RNA完整性,使用EasyScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix(Takara)反转录获得cDNA。

1.2.2 薰衣草 *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 基因的克隆 根据薰衣草基因组信息(GenBank索引号PRJNA642976, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/all/PRJNA642976>)^[13]中*nsLTP2-1*、*nsLTP2-2*基因cDNA全长序列, Snapgene软件设计特异性引物为*nsLTP2-1*和*nsLTP2-2*(表1),并扩增目的片段,PCR反应体系50 μL:PCR Mix混合液25 μL,模板DNA1 μL(100 ng/μL),上下游引物各2 μL(10 μM/μL),ddH₂O 20 μL。反应程序为94℃预变性3 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,运行35个循环;72℃延伸7 min。PCR产物用DNA凝胶回收试剂盒(上海生工)纯化,使用2×Seamless Cloning Mix(上海生工)无缝克隆到表达载体,方法见说明书,阳性克隆进行测序鉴定。

表1 引物序列信息

Table 1 Information of primer sequences

引物名称 Primer name	正向序列 Forward sequence(5'-3')	反向序列 Reverse sequence(5'-3')
nsLTP2-1	ATGGAGAAGGCAATGTGGTTGG	GCGAACCGTGGAGCAGTCA
nsLTP2-2	ATGTCGAACTCAGTTAAGGTTGTT	TGTACACTGCTGCAGTTAACATT
<i>Actin</i>	TCCCCATCTACGAAGTTACGCACT	AGCTTCTCTTTGATGTCCCTCACGAT
qnsLTP2-1	CCGTCGTTCAACTGCTGCCAAGC	GCAGTCAGTGGAGGGGCTGATCT
qnsLTP2-2	CTGTGTGCGTCTTGATGGTG	CTTCAGCTTCGTTACGCCCT
<i>NiGAPDH</i>	TGGGTGTCAACGAGAAGGAA	TCTGGGTGGCAGTAAGGGA

1.2.3 nsLTP2-1和nsLTP2-2生物信息学分析 利用在线工具 SignalP (<https://services.healthtech.dtu.dk/SignalP>)、TMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/TMHMM>)、Plant-mploc (<https://www.expasy.org/ProtScale>)、InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/>) 分别对 nsLTP2-1 和 nsLTP2-2 的蛋白结构、跨膜结构域、亚细胞定位及保守结构域等进行预测;在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的 BLAST 程序进行氨基酸保守结构域检索, nsLTP2-1 和 nsLTP2-2 与紫苏 (*Perilla frutescens*)、丹参 (*Salvia miltiorrhiza*)、泡桐 (*Paulownia fortunei*) 和互叶醉鱼草 (*Buddleja alternifolia*) 的相似性较高, 分别下载 nsLTP2-1 和 nsLTP2-2 同源的氨基酸序列: 紫苏 (PEK6769357、PEK6769360)、丹参 (SA57804313、SA57804433)、泡桐 (PAK3473096、PAK3474776) 和互叶醉鱼草 (BUKA836308、BUKA366618), 使用 DNAMAN 和 MEGA11 软件分别进行基因和氨基酸同源序列比对, 采用邻接法 (NJ, neighbor-joining method), 构建系统进化树, Bootstrap 值设置为 1000。

1.2.4 薰衣草 nsLTP2-1 和 nsLTP2-2 的表达量分析 从转录组数据库 (GenBank 索引号为 PRJNA892961) 中获取 nsLTP2-1 和 nsLTP2-2 基因在薰衣草 6 种不同组织部位 (花蕾、幼嫩和成熟的花萼、花瓣、叶片和茎) 的基因表达量, 使用 Praphpad Pism9.5 软件 (<https://www.graphpad.com/>) 采用单因素方差分析对基因间的表达量进行差异显著性分析。为了确定候选基因对不同激素和非生物胁迫的响应特征, 选取两年生成株春季移栽至花盆, 于培养室内培养 (22~28℃, 光照时间 16 h, 光强 10000 lx), 选取发芽后正常生长的植株培养至开花期, 分别进行 100 μM 赤霉素 (GA, gibberellin)、脱落酸 (ABA, abscisic acid)、茉莉酸甲酯 (MeJA, methyl jasmonate)^[14]、乙烯利 (Eth, ethephon) 以及 40000 lx 强光、暗培养、4℃ 低温、干旱胁迫处理, 每个处理 3 株, 以无菌水喷施花蕾和叶片作为对照; 处

理 12 h 后采集对应的花蕾和叶片材料各 0.1 g, 在液氮中快速冷冻后在 -80℃ 下保存。RNA 提取及反转录方法同 1.2.1, 利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR, quantitative real-time PCR), 以薰衣草 *Actin* (*La13G00013*) 为内参基因, 引物分别为 qnsLTP2-1 和 qnsLTP2-2 (表 1), 分析花蕾和叶片中 nsLTP2-1 和 nsLTP2-2 基因的表达量。反应体系和条件参照 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒 (TaKaRa) 说明书进行, qRT-PCR 反应体系 10 μL: qRT-PCR Mix 混合液 5.0 μL, 模板 DNA 1.0 μL (100 ng/μL), 上下游引物各 0.4 μL (10 μM/μL), ddH₂O 3.2 μL。反应程序为 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 变性 3 s, 60℃ 退火 30 s, 运行 40 个循环。各组织表达量均为 3 次生物学重复, qRT-PCR 基因的相对定量使用 2^{-ΔΔCT} 法^[15] 进行, 利用 T-tests 多重比较 ($P < 0.05$) 分析薰衣草不同处理样品的基因表达量差异。

1.2.5 nsLTP2-1 和 nsLTP2-2 亚细胞定位 将 nsLTP2-1 和 nsLTP2-2 分别连接到植物瞬时表达载体 pSAT6-EYFP-N1 上, 载体携带增强型黄绿色荧光蛋白 (EYFP), 重组载体命名为 pSAT6-EYFP-nsLTP, 转化至农杆菌获得重组菌株。洋葱鳞叶内部用解剖刀轻画 1 cm² 的十字方块并撕下洋葱内表皮, 用携带目标基因的农杆菌菌液 (OD₆₀₀=0.3) 侵染洋葱表皮进行细胞瞬时表达^[16], 侵染后将洋葱表皮靠近叶肉的一侧朝下放置在培养基上, 20±2℃ 全光照培养 24 h 后, 使用荧光显微镜 (Nexcope, Image View) 在 514 nm 的激发光下观察确定基因的表达部位。

1.2.6 nsLTP2-1 和 nsLTP2-2 的功能研究 将 nsLTP2-1 和 nsLTP2-2 分别连接到植物表达载体 PEZR-K-LN 上, 重组载体命名为 PEZR-nsLTP, 转化至农杆菌 EHA105 获得重组菌株, 采用农杆菌介导的叶盘法异源转化烟草云烟 87, 经卡那霉素 (Kanamycin) 抗生素筛选后, 通过 qRT-PCR 分析 nsLTP2-1 和 nsLTP2-2 基因相对表达量鉴定转基因

植株^[17]。qRT-PCR 分析及基因的相对定量方法同 1.2.4, 内参基因选用烟草的 *GAPDH* 基因 (*NiGAPDH*) (表 1)。转基因烟草叶片使用 0.1 mg/mL 的尼罗红(上海源叶)染液避光染色 10 min, 检测腺毛中脂类物质的结合^[18], 经荧光显微镜在 485~543 nm 激发光下观察, 分别在明场、荧光场和叠加场下观察, 根据尼罗红与脂类物质结合呈现的红色或橘红色观察烟草叶片腺毛的状态。

2 结果与分析

2.1 *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 基因克隆及序列分析

利用基因组数据设计引物, 从薰衣草基因组中扩增出了 350 bp 左右的 *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 基因片段, 与目标序列大小匹配(图 1)。经测序后验证, *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 基因 ORF 全长分别为 360 bp 和 354 bp; 使用 InterProScan 软件预测, *nsLTP2-1* 编码 119 个氨基酸, 蛋白相对分子质量为 12.33 KDa; *nsLTP2-2* 编码 117 个氨基酸, 蛋白相对分子质量为 12.47 KDa。通过 DNAMAN 对 *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 基因序列进行比对, 两个基因的相似性为 49.31%, 具有 179 个相同碱基, 仅有 15 个相同氨基酸。

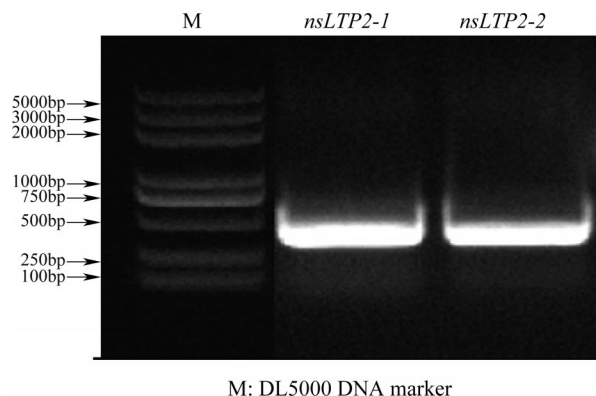


图 1 薰衣草 *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of *nsLTP2-1* and *nsLTP2-2* in lavender

2.2 *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 蛋白的序列结构分析

利用 Plant-mplc 软件预测 *nsLTP2-1*、*nsLTP2-2* 蛋白定位在细胞壁, 存在信号肽, 属于亲水性的碱性蛋白质, 无跨膜结构域, *nsLTP2-1* 的稳定性比 *nsLTP2-2* 稍强。氨基酸序列分析显示 2 个蛋白均属于 II 型 nsLTP 蛋白, 含有 8 个高度保守的半胱氨酸残基, 具有 3 个保守结构域, 分别是 α -淀粉酶抑制剂 (AAI, alpha-amylase inhibiting units)、种子储藏蛋白 (SSP, seed storage proteins) 以及脂转移蛋白 (LTP, lipid transfer protein)。2 个蛋白的磷酸化位点也存在差异, 特别是苏氨酸 (Thr) 磷酸化位点的数量,

nsLTP2-1 蛋白有 12 个苏氨酸的磷酸化位点, *nsLTP2-2* 仅有 6 个。蛋白二级和三级结构预测的结果都表明, *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 主要的结构元件是 α -螺旋和无规则卷曲, 并包含少量的 β -转角。

2.3 *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 蛋白的多重序列比对和系统进化分析

利用 NCBI 对 *nsLTP2-1*、*nsLTP2-2* 的氨基酸序列进行 BLAST 检索与比对, 发现与紫苏、丹参、泡桐和互叶醉鱼草的 nsLTP 相似性较高。使用 MEGA11 对氨基酸序列进行比对, 结果显示 *nsLTP2-1*、*nsLTP2-2* 均含有 8 个高度保守的半胱氨酸残基骨架(图 2), 已有报道显示这些骨架能够通过促进蛋白质-蛋白质以及蛋白质-脂质相互作用参与信号传导^[19]。系统进化结果显示, *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 分处于两个分支, 包含薰衣草在内的 4 个物种的 2 个 nsLTP 都分处于两个分支中, 只有 SA57804313 独立于一个分支。*nsLTP2-1* (La07G01538) 与 PAK3473096、BUKA836308、PEK6769357 聚在同一分支上; *nsLTP2-2* (La07G01539) 蛋白则与 PEK6769360、SA57804433、BUKA366618、PAK3474776 蛋白聚在另一分支上, 说明本研究的 2 个 nsLTP2 基因具有差异。以上结果表明, 薰衣草 nsLTPs 与同为唇形科的紫苏相似性最高(图 3)。

2.4 *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 基因在薰衣草不同组织中的表达分析

nsLTP2-1 和 *nsLTP2-2* 基因在薰衣草不同组织中的表达量差异较大(图 4), *nsLTP2-1* 主要在花蕾和成熟花萼中表达(图 4A), *nsLTP2-2* 主要在花蕾和幼嫩花萼中表达(图 4B), 它们在叶片、花瓣和茎中几乎不表达。在花蕾和成熟花萼中, *nsLTP2-1* 的表达量明显高于 *nsLTP2-2*; 而在幼嫩花萼中, *nsLTP2-1* 的表达量则较低。

利用不同激素和非生物胁迫处理花蕾和叶片, 2 个基因对各处理的响应存在显著差异(图 5)。在花蕾中, 2 个基因的表达受多种条件抑制, 但脱落酸和强光都诱导它们的表达; 2 个基因对干旱的响应是相反的, *nsLTP2-1* 受干旱显著诱导(图 5A), 而 *nsLTP2-2* 的表达被抑制(图 5C)。在叶片中, 2 个基因的表达也不同, *nsLTP2-1* 被茉莉酸甲酯和强光显著诱导(图 5B), *nsLTP2-2* 被乙烯和强光显著诱导(图 5D), 其他条件对 *nsLTP2-2* 基因的表达均具有抑制作用。这些结果表明虽然 2 个基因都属于 II 型 nsLTP, 但它们参与薰衣草相同组织生理功能调控的方式存在较大差异。

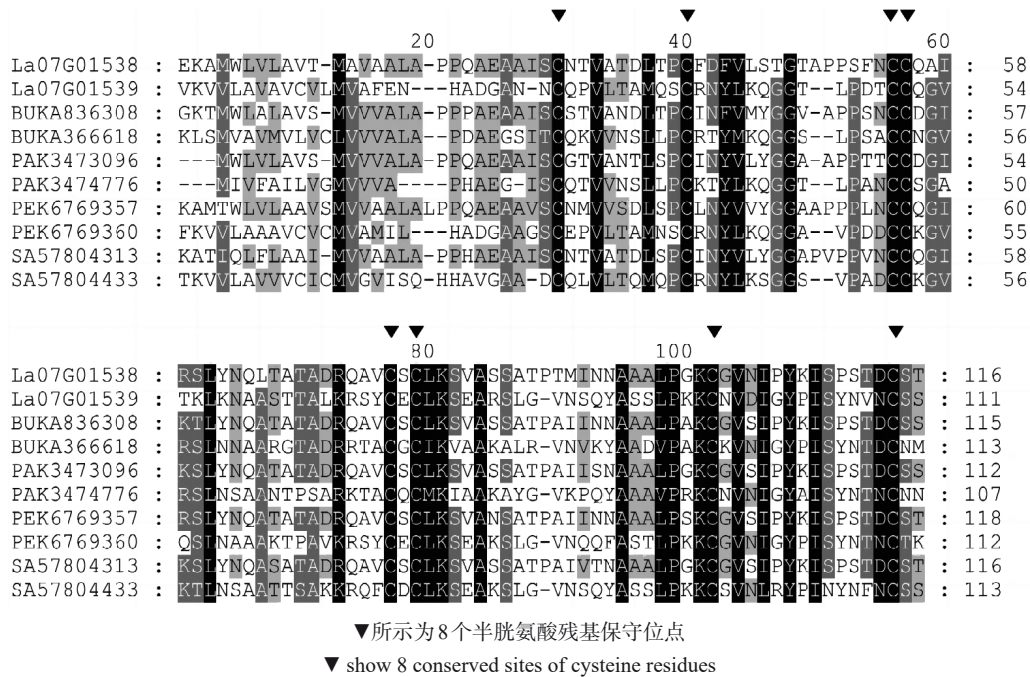


图2 nsLTP2-1和nsLTP2-2蛋白的多重序列比对

Fig. 2 Multiple sequence alignment of nsLTP2-1 and nsLTP2-2 proteins

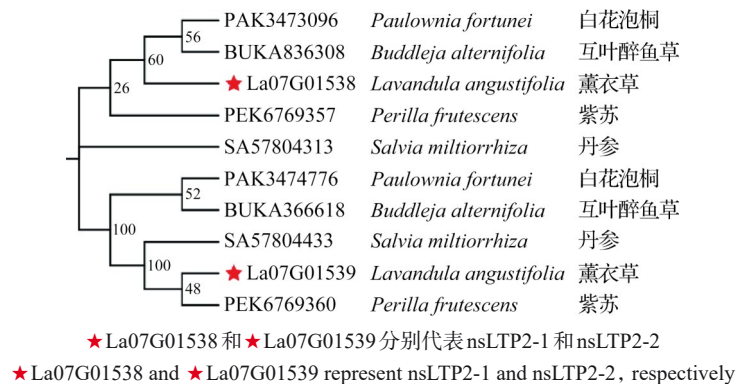


图3 nsLTP2-1和nsLTP2-2蛋白系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of nsLTP2-1 and nsLTP2-2 proteins

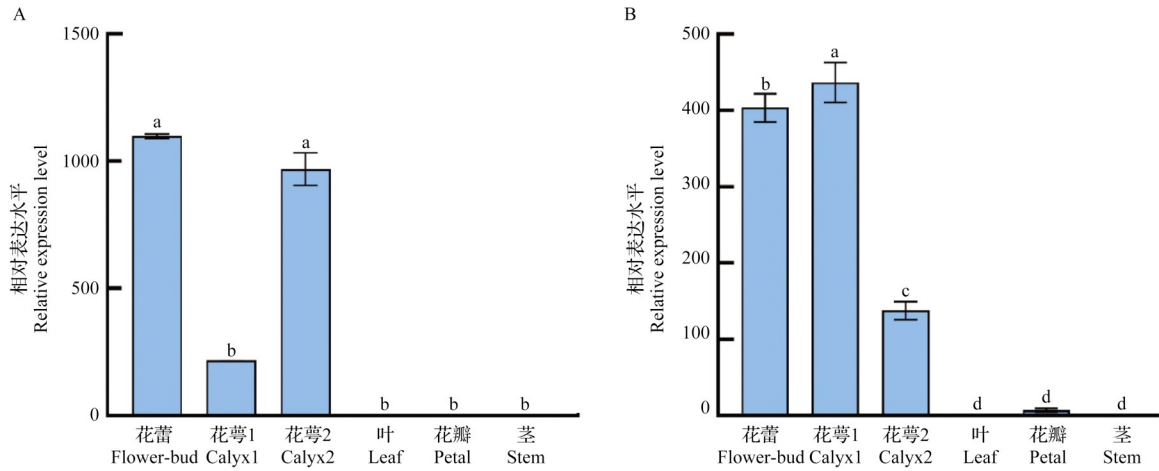
2.5 nsLTP2-1和nsLTP2-2基因的亚细胞定位

黄绿色荧光蛋白融合表达的 *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 在洋葱表皮细胞中瞬时表达的结果显示, EYFP-*nsLTP2-1* 和 EYFP-*nsLTP2-2* 主要分布在细胞膜和细胞壁(图6), 而未融合 *nsLTP* 的基因荧光信号在细胞核、细胞膜和细胞壁中均有分布, 表明 *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 基因主要在细胞壁和细胞膜上发挥作用, 可能与次生代谢物的转运有关。

2.6 nsLTP2-1和nsLTP2-2基因的功能分析

通过抗生素筛选转基因再生植株, 分别选取 *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 转基因植株各5株, 经 qRT-

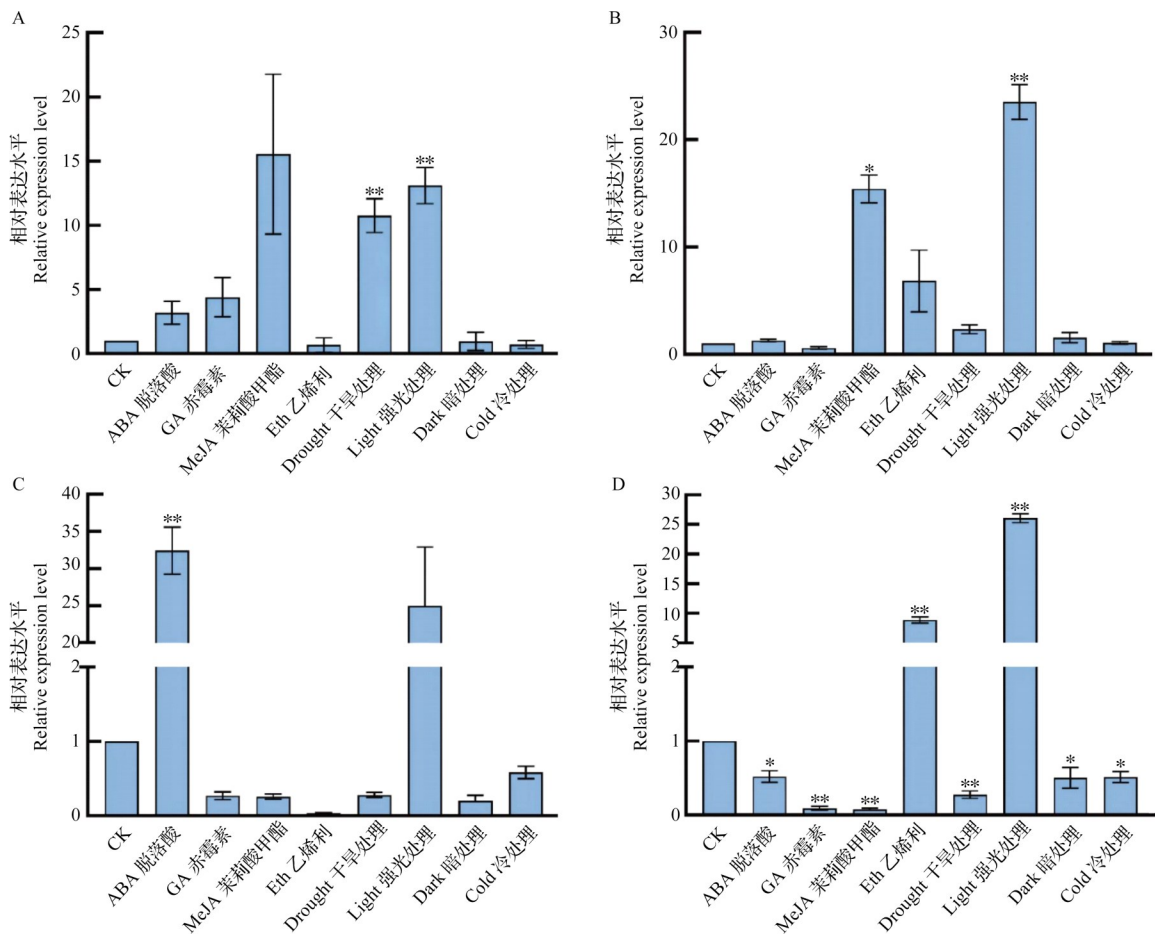
PCR 分析显示转基因植株的表达量远超过野生型(图7), 表明成功获得了 *nsLTP2-1*(图7A)和 *nsLTP2-2*(图7B)过表达烟草。为了观察烟草腺毛分泌的脂类化合物, 对烟草叶片进行尼罗红染色, 经 485~543 nm 激发光激发后, 可见野生型(WT)和2个转基因株系叶片的腺毛均有橘红色区域(图8), 说明烟草腺毛分泌的脂类化合物被亲脂的尼罗红结合并显色。与野生型相比, *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 过表达的烟草有更多的腺毛头部显示荧光, 特别是 *nsLTP2-2* 转基因烟草腺毛的荧光在叶片表面密集分布, 说明 *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 在转基因烟草的脂类合成和分泌中发挥功能。



图A和图B分别代表 *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 基因的相对表达水平;花萼1代表幼嫩的花萼,花萼2代表成熟的花萼;不同字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著
 Figure A and figure B represent the relative expression levels of *nsLTP2-1* and *nsLTP2-2* genes, respectively; Calyx 1 represents the young calyx and calyx 2 represents the mature calyx; Different letters indicate significant difference at $P < 0.05$ level

图4 *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 基因在薰衣草中不同组织部位的表达分析

Fig. 4 Expression analysis of *nsLTP2-1* and *nsLTP2-2* in different tissues of lavender

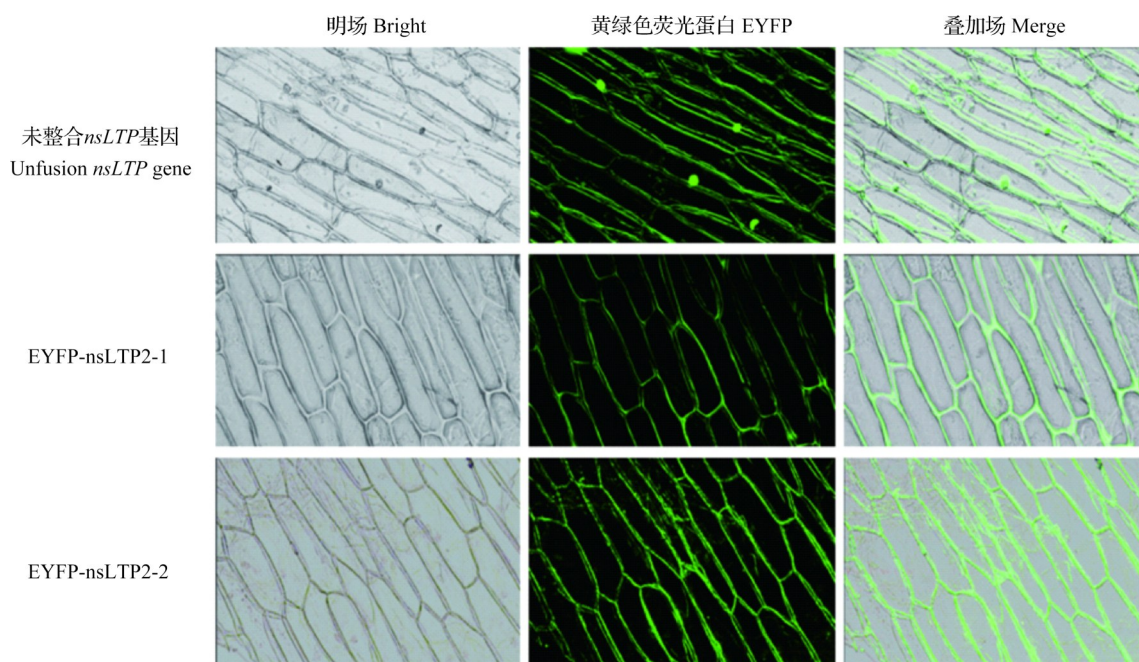


A和B分别为花蕾和叶片在不同激素和非生物胁迫处理条件下 *nsLTP2-1* 的表达水平;C和D分别为花蕾和叶片在不同激素和非生物胁迫处理条件下 *nsLTP2-2* 的表达水平;*和**分别代表在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平上差异显著

A and B refer to the expression of *nsLTP2-1* in flower buds and leaves under different hormonal and abiotic stress treatments, respectively; C and D refer to the expression of *nsLTP2-2* in flower buds and leaves under different hormonal and abiotic stress treatments, respectively; * and ** represent significant differences at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ levels, respectively

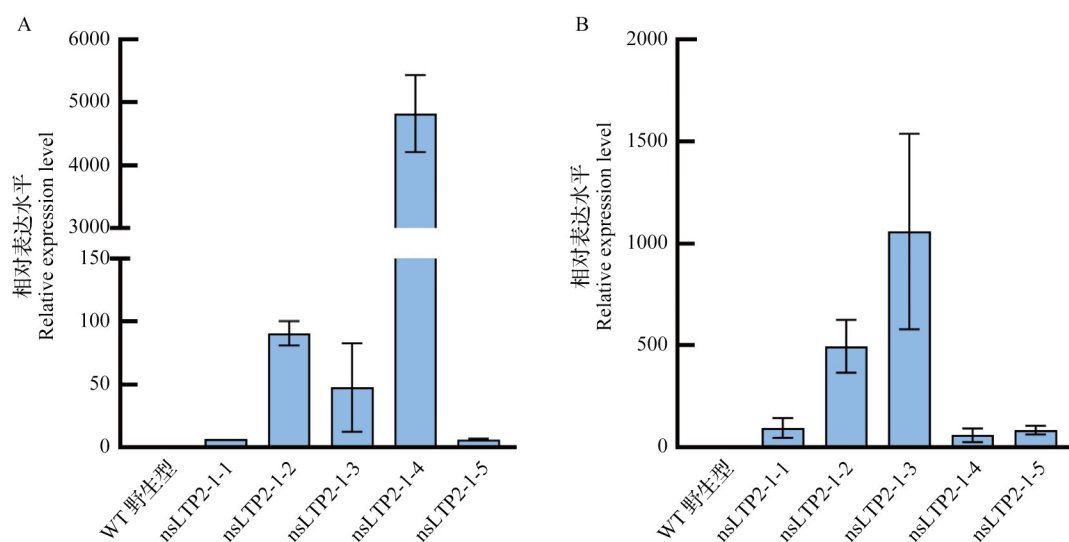
图5 *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 基因在不同处理胁迫下的表达模式

Fig. 5 Expression patterns of *nsLTP2-1* and *nsLTP2-2* genes after different stress treatments



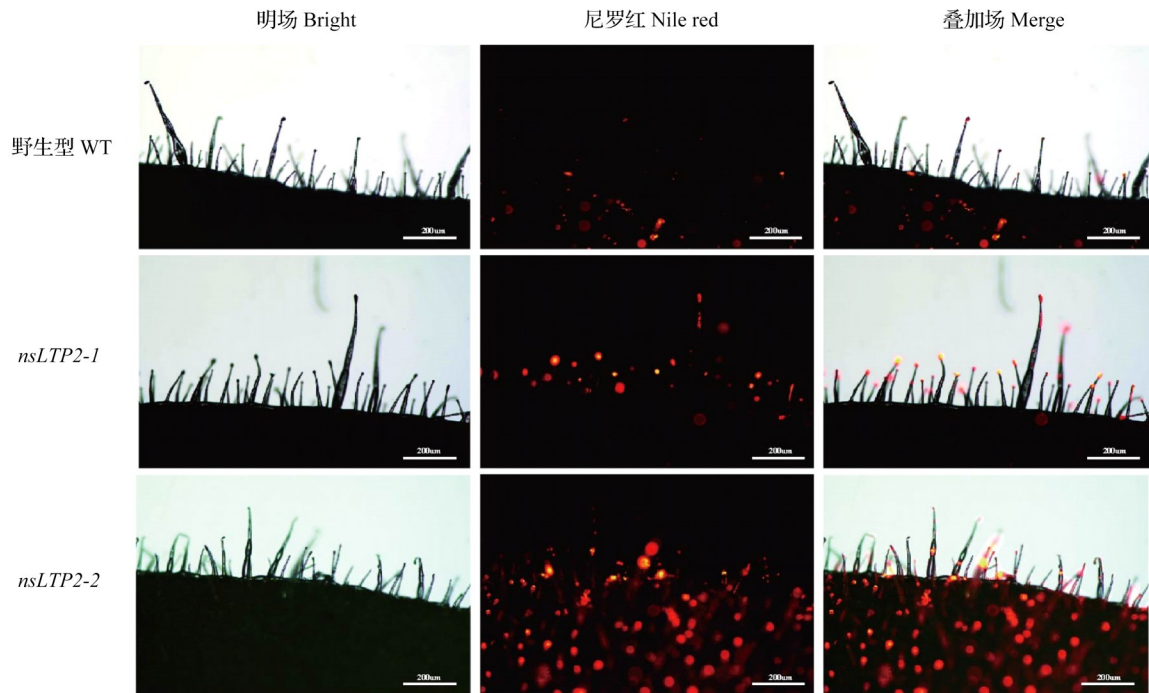
明场是在普通光源下观察；叠加场是明场和荧光场一起叠加的结果；下同
Bright field is observed under ordinary light source; Superposition field is the result of superposition of bright field and fluorescence field;
The same as below; EYFP: Yellow-green fluorescent protein

图6 pSAT6-EYFP-nsLTP融合蛋白亚细胞定位
Fig. 6 Subcellular localization of pSAT6-EYFP-nsLTP fusion protein



nsLTP2-1-1~nsLTP2-1-5代表nsLTP2-1的5株转基因植株；nsLTP2-2-1~nsLTP2-2-5代表nsLTP2-2的5株转基因植株
nsLTP2-1-1~nsLTP2-1-5 represented 5 transgenic plants of nsLTP2-1; nsLTP2-2-1~nsLTP2-2-5 represents 5 transgenic plants of nsLTP2-2;
WT: Wild type

图7 qRT-PCR检测野生型烟草(WT)和转基因烟草中nsLTP的表达量
Fig. 7 qRT-PCR detection of nsLTP expression levels in wild-type tobacco (WT) and transgenic tobacco



尼罗红是指在荧光场下的结果

Nile red refers to the result under the fluorescence field

图8 转基因烟草叶片腺毛尼罗红染色结果

Fig. 8 Nile red fluorescent staining of transgenic tobacco leaf glandular hairs

3 讨论

非特异性脂质转移蛋白在植物界广泛分布,目前从玉米^[2]、小麦^[3]、黄花蒿^[5]、鼠尾草^[20]、腊梅^[21]等多种植物中均分离出 *nsLTP* 基因,功能研究显示它们在包括萜类在内的多种防御物质转运和分泌中起重要作用^[5, 22]。本研究从薰衣草中克隆了2个非特异性脂转移蛋白基因,生物信息学分析表明它们定位于细胞壁,亚细胞定位的结果显示它们定位于细胞膜和细胞壁;且这2个蛋白具有8个高度保守的半胱氨酸残基,可促进蛋白质与蛋白质及蛋白质与脂质相互作用参与信号转导^[19],推测蛋白中有信号肽存在,结果表明它们可能作为分泌蛋白或作为膜蛋白在细胞内物质转运中发挥作用^[23],但根据生物信息学分析显示它们不具有跨膜结构域,可见它们更可能在细胞壁上发挥作用。

以往的研究已证实, *nsLTPs* 在细胞壁的形成^[24-25],细胞角质、蜡质和栓质的积累中起重要作用^[26],还发现它可以促进花器官释放的挥发性有机化合物穿过细胞壁,并从角质层释放^[8]。在青蒿中,已证实腺毛中特异表达的 *AnLTP3* 和 *AnLTP4* 基因参与倍半萜内酯的分泌,在亲脂性化合物的分泌中起作用^[5]。在唇形科的薄荷 (*Mentha piperita*) 中过表达烟草 *nsLTP1* 也显示挥发性单萜的转运增强^[27]。

本研究中的2个薰衣草 *nsLTP* 主要在不同发育时期的花萼中高表达,在叶片、茎和花瓣中它们几乎不表达,而薰衣草花萼器官作为挥发性萜类物质积累的主要场所,推测2个 *nsLTP* 在薰衣草花萼所合成萜类挥发油的分泌转运中发挥作用。在烟草中,长毛状体分泌亲脂物质^[28],而短毛状体分泌萜类化合物^[29]。本研究中,转 *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 基因烟草经尼罗红染色后,2个转基因烟草株系叶片的腺毛头部相较野生型具有更多的荧光分布,特别是 *nsLTP2-2* 转基因烟草短腺毛密集分布在叶片表面,推测 *nsLTP2-1* 和 *nsLTP2-2* 可能在脂类和萜类化合物的合成和分泌中发挥作用。作为亲脂性分泌蛋白, *nsLTP* 可以调控脂类物质的积累,部分脂类具有调控植物激素合成的作用,例如植物极长链脂肪酸 (VLCFA, very long chain fatty acid) 通过激活乙烯的合成而促进棉花纤维和拟南芥细胞的伸长^[30]; *GhLTP4* 通过运输鞘脂类神经酰胺来提高生长素含量从而促进棉花纤维的伸长^[31]; *nsLTP* 还能够与茉莉酸结合^[8],而茉莉酸是调控植物萜类合成重要的诱导激素^[32]。本研究中2个 *nsLTP* 在薰衣草中可能参与了对萜类的直接转运,以及通过对脂类调控物质的转运继而调控萜类物质的合成和转运,研究结果为薰衣草萜类物质合成调控提供了理论基础, *nsLTP* 确切的作用机制仍需深入研究。

参考文献

- [1] Kader J C. Protein and intracellular exchange of lipids. I. Stimulation of phospholipid exchange between mitochondrial and microsomal fractions by protein isolated from potato tuber. *Biochimica Biophysica Acta*, 1975, 380: 31-44
- [2] Sossountzov L, Ruiz-Avila L, Vignols F, Jolliot A, Arondel V, Tehang F, Grosbois M, Guerbette F, Miginiac E, Delseny M, Puigdomènèch P, Kader J C. Spatial and temporal expression of a maize lipid transfer protein gene. *Plant and Cell Physiology*, 1991, 3:923-933
- [3] Boutrot F, Guirao A, Alary R, Joudrier P, Gautier M F. Wheat non-specific lipid transfer protein genes display a complex pattern of expression in developing seeds. *Biochemical Biophysica Acta*, 2005, 1730: 114-125
- [4] Boutrot F, Chantret N, Gautier M F. Genome-wide analysis of the rice and arabidopsis *non-specific lipid transfer protein (nsLTP)* gene families and identification of wheat *nsLTP* genes by EST data mining. *BMC Genomics*, 2008, 9: 86
- [5] Adhikari P B, Han J Y, Ahn C H, Choi Y E. Lipid Transfer Proteins (AaLTP3 and AaLTP4) are involved in sesquiterpene lactone secretion from glandular trichomes in *Artemisia annua*. *Plant and Cell Physiology*, 2019, 60(12): 2826-2836
- [6] Gincel E, Simorre J P, Caille A, Marion D, Ptak M, Vovelle F. Three-dimensional structure in solution of a wheat lipid-transfer protein from multidimensional H-NMR data. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 226: 413-422
- [7] Gomar J, Petit M C, Sodano P, Sy D, Marion D, Kader J C, Vovelle F, Ptak M. Solution structure and lipid binding of a nonspecific lipid transfer protein extracted from maize seeds. *Protein Science*, 1996, 5(4): 565-577
- [8] Missaoui K, Gonzalez-Klein Z, Pazos-Castro D, Hernandez-Ramirez G, Garrido-Arandia M, Brini F, Diaz-Perales A, Tome-Amat, J. Plant non-specific lipid transfer proteins: An overview. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2022, 171(15): 115-127
- [9] Hairat S, Baranwal V K, Khurana P. Identification of *Triticum aestivum* nsLTPs and functional validation of two members in development and stress mitigation roles. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 130: 418-430
- [10] Liu F, Zhang X, Lu C, Zeng X, Li Y, Fu D, Wu G. Non-specific lipid transfer proteins in plants: presenting new advances and an integrated functional analysis. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(19): 5663-5681
- [11] Nieuwland J, Feron R, Huisman B A H, Fasolino A, Hilbers C W, Derksen J, Mariani C. Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco. *The Plant Cell*, 2005, 17(7): 2009-2019
- [12] Zhang Y, Wang D, Li H, Bai H, Sun M, Shi L. Formation mechanism of glandular trichomes involved in the synthesis and storage of terpenoids in lavender. *BMC Plant Biology*, 2023, 23: 307
- [13] Li J, Wang Y, Dong Y, Zhang W, Wang D, Bai H. The chromosome-based lavender genome provides new insights into Lamiaceae evolution and terpenoid biosynthesis. *Horticulture Research*, 2021, 8: 53
- [14] Sun W J, Zhan J Y, Zheng T R, Sun R, Wang T, Tang Z Z, Bu T L, Li C L, Wu Q, Chen H. The jasmonate-responsive transcription factor *CbWRKY24* regulates terpenoid biosynthetic genes to promote saponin biosynthesis in *Conyza blinii* H Lév. *Journal of Genetics and Genomics*, 2018, 97(5): 1379-1388
- [15] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [16] 吴超, 戴梦怡, 张超, 石从广, 任明杰, 马晶晶, 申亚梅. *FLS* 基因调控玉兰与紫玉兰花色形成的机制研究. *核农学报*, 2023, 37(10): 1947-1956
- Wu C, Dai M Y, Zhang C, Shi C G, Ren M J, Ma J J, Shen Y M. Study on the mechanism of *FLS* gene regulating flower color formation in *Yulania denudata* and *Y. liliiflora*. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2023, 37(10): 1947-1956
- [17] Chen L N, Dou P T, Chen Y K, Yang H Q. Mutant *IAA21* genes from *Dendrocalamus sinicus* Chia et JL Sun inhibit stem and root growth in transgenic tobacco by interacting with ARF5. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2023, 201: 107827
- [18] 石健, 张雯婕, 冯汛, 胡雨婷, 瑶池. 尼罗红荧光染色法的优化及应用. *工业安全与环保*, 2016, 42(4): 61-64
- Shi J, Zhang W J, Feng X, Hu Y T, Yao C. The optimization and application of Nile red fluorescent determination. *Industrial Safety and Environmental Protection*, 2016, 42(4): 61-64
- [19] Shin H R, Citron Y R, Wang L, Tribouillard L, Goul C S, Stipp R, Sugawara Y, Jain A, Samson N, Lim C Y, Davis O B, David C C, Nomura M Q D K, Park R P E, Covey D, Evers M L A, Zoncu R. Lysosomal GPCR-like protein LYCHOS signals cholesterol sufficiency to TORC1. *Science*, 2022, 377(6612): 1290-1298
- [20] Li F, Fan K, Guo X, Liu J, Zhang K, Lu P. Genome-wide identification, molecular evolution and expression analysis of the non-specific lipid transfer protein (nsLTP) family in *Setaria italica*. *BMC Plant Biology*, 2022, 22: 547
- [21] 马婧, 刘群, 李名扬, 王晓斌, 眭顺照. 2个蜡梅 *nsLTP* 基因启动子的克隆及其在烟草中的瞬时表达分析. *植物遗传资源学报*, 2012, 13(4): 601-608
- Ma J, Liu Q, Li M Y, Wang X B, Sui S Z. Cloning and transient expression assay of two *nsLTP* gene promoters from *Chimonanthus praecox* in tobacco. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2012, 13(4): 601-608
- [22] 王露, 赵天祯, 蔡明. 植物腺毛中防御物质的合成与调控及转运研究进展. *西北植物学报*, 2021, 41(2): 338-347
- Wang L, Zhao T Y, Cai M. Advances in synthesis, regulation and transportation of defensive substances produced in plant glandular trichomes. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021, 41(2): 338-347

- [23] 王艺颖, 袁军, 谭晓风, 卢梦琪, 周奥, 周俊琴. 油茶SOD基因克隆及不同授粉处理下的表达分析. 植物遗传资源学报, 2023, 24(1): 226-236
Wang Y Y, Yuan J, Tan X F, Lu M Q, Zhou A, Zhou J Q. Cloning and expression analysis of SOD genes under different pollination treatments in *Camellia oleifera* Abel. Journal of Plant Genetic Resources, 2023, 24(1): 226-236
- [24] Edqvist J, Blomqvist K, Nieuwland J, Salminen T A. Plant lipid transfer proteins: Are we finally closing in on the roles of these enigmatic proteins? Journal of Lipid Research, 2018, 59(8): 1374-1382
- [25] Almagro Armenteros J J, Sønderby C K, Sønderby S K, Nielsen H, Winther O. DeepLoc: Prediction of protein subcellular localization using deep learning. Bioinformatics, 2017, 33(21): 3387-3395
- [26] Pagnussat L A, Lombardo C, Regente M, Pinedo M, Martin M, de la Canal L. Unexpected localization of a lipid transfer protein in germinating sunflower seeds. Journal of Plant Physiology, 2009, 166(8): 797-806
- [27] Hwang H S, Adhikari P B, Jo H J, Han J Y, Choi Y E. Enhanced monoterpene emission in transgenic orange mint (*Mentha × piperita* f. *citrata*) overexpressing a tobacco lipid transfer protein (*NtLTP1*). Planta, 2020, 252: 44
- [28] Choi Y E, Lim S, Kim H J, Han J Y, Lee M H, Yang Y, Kim J A, Kim Y S. Tobacco *NtLTP1*, a glandular-specific lipid transfer protein, is required for lipid secretion from glandular trichomes. The Plant Journal, 2012, 70(3): 480-491
- [29] Hallahan D L. Monoterpenoid biosynthesis in glandular trichomes of labiate plants. Advances in Botanical Research, 2000, 31: 77-120
- [30] Qin Y M, Hu C Y, Pang Y, Kastaniotis A J, Hiltunen J K, Zhu Y X. Saturated very-long-chain fatty acids promote cotton fiber and *Arabidopsis* cell elongation by activating ethylene biosynthesis. The Plant Cell, 2007, 19(11): 3692-3704
- [31] Duan Y, Shang X, He Q, Zhu L, Li W, Song X, Guo W. LIPID TRANSFER PROTEIN4 regulates cotton ceramide content and activates fiber cell elongation. Plant Physiology, 2023, 193(3): 1816-1833
- [32] 张婵, 吴友根, 于靖, 杨东梅, 姚广龙, 杨华庚, 张军锋, 陈萍. 光与茉莉酸信号介导的萜类化合物合成分子机制. 生物技术通报, 2022, 38(8): 32-40
Zhang C, Wu Y G, Yu J, Yang D M, Yao G L, Yang H G, Zhang J F, Chen P. Molecular mechanism of terpenoids synthesis intermediated by light and jasmonates signals. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(8): 32-40