

二色补血草

耐盐机理及耐盐基因功能分析

高彩球 王玉成 著



科学出版社

二色补血草耐盐机理 及耐盐基因功能分析

高彩球 王玉成 著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书在总结了植物抗逆基因的克隆及抗逆机理方面的理论和发展趋势基础上,以盐生植物二色补血草为研究对象,详细介绍了二色补血草的抗逆分子机理和一些抗逆相关基因的克隆及功能研究。根据内容分为5章,第1章介绍了植物抗逆机理的研究进展;第2章介绍了利用EST技术结合cDNA微阵列对二色补血草在分子水平上耐盐机理的研究结果;后3章分别介绍了二色补血草重要抗逆基因的克隆及抗逆功能分析:包括转录因子DREB(第3章)、富含甘氨酸RNA结合蛋白GRP(第4章)、液泡膜 H^+ -ATPase c亚基基因(第5章)。

本书可供高等学校和科研机构从事植物抗逆生理和抗逆基因克隆方面研究的人员参考阅读。

图书在版编目(CIP)数据

二色补血草耐盐机理及耐盐基因功能分析/高彩球,王玉成著. —北京:科学出版社,2013.8

ISBN 978-7-03-038535-2

I. ①二… II. ①高…②王… III. ①白花丹科-耐盐性-研究
IV. ①Q949.774.208

中国版本图书馆CIP数据核字(2013)第210512号

责任编辑:张会格 / 责任校对:宣 慧

责任印制:赵德静 / 封面设计:耕者设计工作室

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

中国科学院印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013年8月第 一 版 开本:B5(720×1000)

2013年8月第一次印刷 印张:9 1/4

字数:210 000

定价:78.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

植物在生长发育过程中经常会受到各种不良环境的影响,如干旱、高盐、低温和重金属(化学)胁迫等。据统计,世界干旱、半干旱地区占地球陆地面积的三分之一,我国干旱、半干旱地区占全国陆地面积的二分之一。全世界盐碱地面积约 10 亿 hm^2 , 约占可耕地面积的 10%, 我国约有 1 亿 hm^2 。随着工业污染加剧、灌溉农业的发展和化肥使用不当等,次生盐碱化土地面积在不断扩大。这些非生物胁迫严重影响植物的生长和发育,甚至导致植物死亡。为了适应环境生存,植物长期进化过程中在生理、生化及分子细胞水平都有相应的反映,形成了一系列对不良环境胁迫的抵抗或忍耐能力,即植物的抗逆性。因此,了解植物的抗逆机制,克隆优良抗逆相关基因,利用基因工程对植物进行遗传改良提高其抗逆性、培育抗逆新品种具有广阔的应用前景。

二色补血草(*Limonium bicolor*)又名付氏矾松、草原干枝梅,属蓝雪科补血草属,二年生草本植物,是我国北方的一种重要牧草资源。多生于滩地、湖盆、戈壁、石质山坡、流动沙丘等干旱荒漠生境下,能在 pH8.5~9 的碱性土壤中正常生长,是碱化较严重地区的理想绿化植物。二色补血草优良的耐盐碱特性使之成为研究植物耐盐机理和进行耐盐碱基因克隆的理想材料。因此,有必要对其抗逆机理进行分析,对重要抗逆基因进行全长序列克隆和进一步的功能验证,从而获得抗逆能力优良的基因用于抗逆基因工程育种研究。

以往对二色补血草耐盐碱机理的研究多集中在它的生理生态学特征方面,而对其抗盐碱分子机制的研究则鲜有报道。二色补血草作为一种具有突出耐盐能力的盐生植物,本书以其为试材介绍了利用 EST(expressed sequence tag)技术结合 cDNA 微阵列(cDNA microarray)进行分子水平上的耐盐机理研究情况,并进一步对二色补血草中一些重要抗逆基因,如液泡膜 H^+ -ATPase c 亚基、转录因子 DREB、富含甘氨酸 RNA 结合蛋白 GRP 等的基因进行克隆,研究它们在不同逆境胁迫后的表达模式,探讨它们在植物中的抗逆功能,以期全面了解它们的抗逆能力,为植物抗逆基因工程育种奠定良好的理论基础,并提供优良的抗逆基因资源。

本书由高彩球和王玉成撰写,在撰写过程中得到了多方面的关心与帮助。感谢东北林业大学林木遗传育种学科杨传平教授和刘桂丰教授对本书的最终出版所做的贡献,感谢东北林业大学林木遗传育种学科硕士研究生巧英、张大伟、马辉为

本书内容所付出的辛勤劳动,感谢东北林业大学林木遗传育种学科硕士研究生张凤娇在书稿整理中做的协助校对工作。

由于作者水平有限,书中不足之处在所难免,希望读者及各位同行提出宝贵意见。

著 者

2013年3月10日

目 录

前言

1 绪论	1
1.1 引言	1
1.2 植物抗逆机理	1
1.3 基因组学方法在植物耐盐机理研究中的应用	6
1.4 耐盐相关基因的克隆	10
1.5 二色补血草简介	14
1.6 本研究的目的和意义	14
2 盐碱胁迫下二色补血草基因表达的研究	15
2.1 NaHCO ₃ 胁迫二色补血草 cDNA 文库的构建	15
2.2 cDNA 文库 EST 分析	17
2.3 cDNA 芯片分析	25
2.4 讨论	35
3 <i>LbDREB</i> 基因的克隆与功能分析	41
3.1 <i>LbDREB</i> 基因的克隆及特性分析	42
3.2 <i>LbDREB</i> 基因的酵母转化及抗性分析	50
3.3 <i>LbDREB</i> 基因的烟草转化及抗性分析	54
3.4 讨论	72
4 <i>LbGRP</i> 基因的克隆与抗逆性分析	76
4.1 <i>LbGRP</i> 基因的克隆及序列分析	77
4.2 <i>LbGRP</i> 基因的逆境胁迫表达模式分析	79
4.3 <i>LbGRP</i> 基因抗逆功能的酵母快速验证	82
4.4 <i>LbGRP</i> 基因对下游基因表达的调控	88
4.5 过表达 <i>LbGRP</i> 基因提高了植物的抗逆性	97
4.6 讨论	105
5 <i>LbVHAc</i> 基因的克隆及功能分析	109
5.1 <i>LbVHAc</i> 基因的克隆与分析	109
5.2 <i>LbVHAc</i> 基因的表达模式分析	113
5.3 <i>LbVHAc</i> 基因增强了植物抗逆性	115
5.4 讨论	123
主要参考文献	127

1 绪 论

1.1 引 言

植物在生长发育过程中经常会受到各种不良环境的影响,如干旱、高盐、低温和重金属(化学)胁迫等。据统计,世界干旱、半干旱地区占地球陆地面积的三分之一,我国干旱、半干旱地区占全国陆地面积的二分之一。全世界盐碱地面积约 10 亿 hm^2 ,约占可耕地面积的 10%,我国约有 1 亿 hm^2 。随着工业污染的加剧、灌溉农业的发展和化肥使用不当等,次生盐碱化土地面积在不断扩大(李晓燕等,2004)。这些非生物胁迫严重影响植物的生长和发育,甚至导致植物死亡。因此,了解植物的抗逆机制,克隆优良抗逆相关基因,利用基因工程对植物进行遗传改良,提高其抗逆性,对培育抗逆新品种具有广阔的应用前景。

为了适应环境生存,植物在长期进化过程中其生理、生化及分子细胞水平都有相应的反映,形成了一系列对不良环境胁迫的抵抗或忍耐能力,即植物的抗逆性。植物的抗逆性是一个十分复杂的过程,随着分子生物学的发展,人们在植物逆境胁迫的信号转导途径、转录调控、应答基因等方面进行了深入研究,初步在分子水平上认识了植物对逆境胁迫的应答机制(杨献光等,2006),分离和鉴定了大量植物抗逆功能基因,为利用基因工程遗传改良植物品种提供了大量的目的基因。

1.2 植物抗逆机理

干旱、盐、极端温度、氧化胁迫等不同的非生物胁迫之间经常互相关联,并且可以造成相似的细胞损伤。例如,干旱和盐浓度主要表现为渗透胁迫,破坏细胞的正常离子分布和动态平衡;而伴随着高温、高盐或干旱胁迫而来的氧化胁迫,可以使功能蛋白和结构蛋白变性。在长期的进化过程中,植物形成了一系列的耐性机制,如通过合成某些渗透调节及活性氧清除物质使细胞恢复渗透平衡并解除氧化物质带来的毒害作用,同时还可以合成功能蛋白以保护各种生物大分子,从而使植物提高对非生物胁迫的抵抗能力。

1.2.1 渗透调节

干旱、盐渍和低温等都能造成渗透胁迫,植物在受到渗透胁迫时,细胞内主动

积累一些小分子有机化合物和蛋白质类保护剂以维持较高的溶质渗透压,促进浓度梯度的形成,便于水的吸收和防止水的渗出。这些小分子有机化合物和蛋白质类保护剂也可以清除自由基或作为化学分子伴侣,直接稳定质膜或蛋白质(Hare et al., 1998; McNeil et al., 1999; Bohnert et al., 2001; Diamant et al., 2001)。小分子有机化合物有如下几类:①氨基酸及其衍生物,如脯氨酸、甘氨酸甜菜碱等;②糖类,如蔗糖、海藻糖等;③多元醇类,如甘油、山梨醇、甘露醇等。它们能够维持细胞膨压,稳定细胞质中酶活性构象,保护其不受渗透胁迫的伤害。

(1) 脯氨酸

脯氨酸(proline)是一种小分子的渗透物质,是水溶性最大的氨基酸(162.3 g/100 g 水, 25℃)。在植物生长发育中具有多种生理功能,可作为一种迅速利用的氮源和碳源,是沟通 C/N 代谢和渗透胁迫的桥梁(Hellmann et al., 2000);同时,脯氨酸代谢的中间产物可以诱导基因表达,降低渗透胁迫造成的氧损伤(Hong et al., 2000)。植物体内脯氨酸合成途径有谷氨酸和鸟氨酸两种途径。 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸合成酶(Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, P5CS)是脯氨酸合成中的限制酶,P5CS 的反馈调节在控制植物处于正常和胁迫条件下脯氨酸的水平中起着重要作用,是脯氨酸合成的关键酶(Zhao et al., 2003)。P5CS 和脯氨酸脱氢酶基因间的相互调节是控制脯氨酸含量的关键。Konstantinova 等(2002)报道,P5CS 在烟草中过量表达可提高脯氨酸含量,从而提高转基因植株抗胁迫的能力。

但关于脯氨酸含量与渗透胁迫之间的关系迄今仍有争议。有人认为,脯氨酸和植物抗渗透胁迫的能力密切相关,其含量直接或间接影响植株耐受渗透胁迫的能力。脯氨酸合成能力的增加、降解能力的降低和特异性的转移均可以改变脯氨酸含量,影响植株耐受胁迫的能力。但也有实验报道,脯氨酸积累与耐盐程度没有相关性(Ain-Lhout et al., 2001; Trinchant et al., 2004),甚至呈负相关(Petrusa and Winicol, 1997),因而认为脯氨酸积累可能是植物受到盐害的结果(Soussi et al., 1998)。然而,更多的研究者认为,脯氨酸积累是植物为了对渗透胁迫而采取的一种保护性措施(Santa-cruz et al., 1999)。

(2) 甜菜碱

甜菜碱(betaine)的积累有利于提高植物耐性。渗透胁迫条件下某些植物体内会积累大量甜菜碱,外源甜菜碱的施加也能够缓解盐对植物的伤害。它能够作为渗透调节剂、酶的构型保护剂,有利于稳定 Rubisco[核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase)]的构象并保持酶处于有功能的状态,保护质膜的完整性,是无毒的细胞质调渗物质。很低浓度的外源甜菜碱具有良好的渗透调节保护作用。甜菜碱的生物合成途径为:胆碱→甜菜碱醛→甘氨酸甜菜碱。在高等植物中,第一步由胆碱单加氧酶(choline monooxygenase, CMO)催化完成,第二步由甜菜碱醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase,

BADH)催化完成。

胆碱单加氧酶(CMO)是一种非常特殊的酶,是植物所特有的,是加氧酶(oxygenase),而已知的其他生物中的胆碱氧化酶类是氧化酶(oxidase)或脱氢酶(dehydrogenase)。由于CMO活性测定较为困难,直到1995年,Burnet等才从菠菜叶片纯化出此酶。CMO的基因工程研究报道也较少。1998年,Nuccio等将菠菜CMO基因在烟草中表达。沈义国等(2001)的实验证明,转山菠菜CMO基因的烟草植株普遍提高了耐盐性和耐旱性。2003年,Li等将辽宁碱蓬CMO基因转入烟草,转基因烟草的膜结构所受损伤小于对照,表明转基因烟草具有一定的耐盐性。

对BADH已进行了广泛的研究,在渗透胁迫下,BADH增加,酶活力也成倍增加。有研究表明NaCl诱导BADH活性增加的水平和诱导甜菜碱积累程度相当(McCue and Hanson,1992)。目前已从菠菜、甜菜、山菠菜、玉米、大麦、高粱、红树等植物中克隆了BADH基因,这些基因均具活性表达能力,其中几个已导入烟草、草莓、水稻、小麦、豆瓣菜中,提高了转基因植株的耐渗透能力(梁峥等,1997;刘凤华等,1997;李银心等,2000;陈传芳等,2004;林秀峰等,2005;付光明等,2006;杨晓玲等,2006)。

(3) 糖类

糖类(glucide)物质也是植物受到渗透胁迫时常常积累的小分子有机物,如海藻糖、果聚糖、蔗糖等。它们既是一种贮藏性碳水化合物,又能作为渗透调节剂保护生物细胞和生物活性物质在不良环境条件下免遭破坏。其中,海藻糖(trehalose)是一种国际上新近开发的主要低聚糖之一,广泛存在于海藻、昆虫及复苏植物体内,保护生物细胞在脱水、干旱、高温、冷冻、高渗透压等环境下免遭破坏;海藻糖还能在干燥状态下保持细胞组织的脂类、蛋白质、碳水化合物和核酸等不受破坏。但是在大多数植物中较难检测到海藻糖的存在,因此,期望通过导入与海藻糖合成相关的基因,提高植物体内海藻糖含量,从而增强对非生物胁迫的抵抗能力。

戴秀玉等(2000)克隆了大肠杆菌海藻糖合成酶 $otsBA$ 基因,将该基因转化大肠杆菌 $otsBA$ 基因缺失株,转化株恢复在0.5 mol/L NaCl培养基上生长的功能。2001年,又将编码大肠杆菌海藻糖合成酶的 $otsBA$ 基因引入野生型烟草植株中,转基因烟草能够合成海藻糖,合成量达14 $\mu\text{g/g}$ 叶片湿重,表现为耐盐性生长、干燥失重缓慢等抗逆表型。

(4) 多元醇

多元醇(polyol)含有多个羟基、亲水性强,在渗透调节及平衡液泡水势中也具有重要作用。各种有机体如细菌、真菌藻类和高等植物中高水平糖醇的存在与渗透胁迫耐性有关。

Tarczynski等(1993)从大肠杆菌中克隆到 $mtlD$ 基因(1-磷酸甘露醇脱氢酶基

因),该基因只在盐胁迫或低温下才被诱导表达。随后将该基因转入烟草中,在高浓度盐分下,导入 *mtlD* 的转基因植株检测到了甘露醇的积累,与对照组相比有较高的盐耐受性(郝贵霞,2000)。随后,刘俊君等(1995)又克隆了大肠杆菌的 *mtlD* 基因和 *gutD*(6-磷酸山梨醇脱氢酶)基因,在表达这两种基因的转基因烟草中其耐盐性均有不同程度提高,而且证明不同糖醇在转基因烟草中的积累可能具有累加效应,有望更大程度提高植物耐盐性。

(5) 晚期胚胎发生富集蛋白(LEA 蛋白)

除小分子渗透保护物质外,植物体在受盐胁迫后,还会积累一些大分子蛋白质类保护物质。晚期胚胎发生富集蛋白(late embryogenesis abundant, LEA)广泛存在于高等植物中,是一种重要的胁迫诱导蛋白,可在水分、盐、极端温度胁迫下产生,具有很强的亲水性及热稳定性。在多种植物中,LEA 基因表达或 LEA 蛋白积累对于植物抵抗非生物胁迫具有重要作用。

Xu 等(1996)首次将 LEA 蛋白基因(*HVA1*)通过基因枪法转入水稻悬浮细胞系,得到大量的转基因水稻植株。第二代转基因水稻增强了对水分和盐胁迫的耐受性。并且转基因水稻抗胁迫的能力与 *HVA1* 蛋白积累的水平呈正相关。直接证明了 LEA 蛋白对提高植物对非生物胁迫的耐受性有重要作用。小麦叶绿体 LEA 蛋白基因 *WCS19* 在拟南芥中的过量表达也可显著提高植株抗寒能力(Ndong et al., 2002)。Sivamani 等(2000)又将泛素(ubiquitin)启动子驱动的 *HVA1* 基因通过基因枪法导入春小麦(*Triticum aestivum* L.)中。缺水条件下,第三代转基因小麦在干物质含量、水利用效率、根的鲜重和干重方面都比非转基因对照高。此外,转 LEA 基因的烟草、玉米、草莓、番茄、燕麦等的抗旱耐盐性也明显提高(冀俊丽等,2002;王俊丽等,2003;陈火英等,2004;刘祥久等,2005;刘甜甜等,2006;Wang et al., 2006a)。

由此可见,LEA 基因在水分胁迫时可保护生物体,是一种抗胁迫遗传工程的潜在的分子工具。

1.2.2 重建细胞内的离子平衡

植物受到胁迫后能够保持和重建细胞的离子平衡,特别是 Na^+ 的区域化、外排对于植株的生存和生长至关重要。离子平衡使植物在外界环境刺激下有效地降低细胞内 Na^+ 的浓度,增加 K^+ 的吸收,恢复 Na^+/K^+ 比例,使细胞获得耐盐性。

在高盐环境下, Na^+ 的胞质隔离进入液泡主要依赖液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白及液泡型 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 的基因表达上调或活性提高(Zhang, et al., 1999; Gaxiola et al., 2001; Golldack and Dietz, 2001; Shi and Zhu, 2002; Vera-Estrella et al., 2005)。而胞质内过多的 Na^+ 排出胞外主要利用质膜型 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 产生的质子电化学梯度,由质膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白完

成的。在盐胁迫下,盐地碱蓬 $V\text{-H}^+\text{-ATPase}$ 各亚基在转录、翻译水平的协同表达,增加了 $V\text{-H}^+\text{-ATPase}$ 全酶的数量,进而增大了 $V\text{-H}^+\text{-ATPase}$ 的活性。过量表达盐地碱蓬 $V\text{-H}^+\text{-ATPase}$ H 亚基基因的转基因拟南芥植株比野生型具有较好的抗盐能力(李艳艳等,2006)。

对植物耐盐机制,被普遍接受的观点是植物耐盐性是一个复杂性状,是多个基因相互作用的结果,盐胁迫诱导许多基因的表达似乎也支持上述观点。Zhang 和 Blumward(2001)指出,一个基因型的品种只有积累了多个耐盐基因才能具有耐盐性,单一的基因不能提高作物的耐盐性。然而最近有研究表明,单一的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因能够明显提高作物的耐盐性,其原因可能是 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因导入植物细胞后激活了一系列与耐盐相关的基因,从而明显提高植物耐盐性(马丽,2005)。过量表达 *AtNHX1* 基因(拟南芥 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因)的拟南芥和番茄植株在 200 mmol/L NaCl 中能正常生长发育(Apse et al., 1999; Zhang and Blumward, 2001)。因此, $V\text{-H}^+\text{-ATPase}$ 及 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因等 Na^+ 区域化与外排基因能明显提高植物的耐盐性。

1.2.3 活性氧清除

高盐或干旱胁迫条件下,植物细胞由于代谢受阻产生大量的活性氧(reactive oxygen species, ROS),例如,超氧化物阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)、羟基自由基($\cdot\text{OH}$)等,这些活性氧浓度的提高造成对细胞膜脂过氧化作用加强,使活性氧产生与清除之间的动态平衡被破坏,使叶绿体和线粒体膨胀、类囊体基粒松散或崩裂,使功能蛋白(酶)、结构蛋白和核酸等大分子变性,还能引起 DNA 断裂和蛋白质水解,造成植物生长受阻甚至死亡(Sreenivasulu et al., 2000)。

植物本身具有清除活性氧的抗氧化系统,在胁迫后,植物更会主动或被动地调动一些抗氧化酶类和抗氧化物质来清除这些活性氧和氧自由基,减缓和抵御细胞伤害。这些抗氧化物包括:超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)、谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)等一些酶类;另外还有一些非酶分子,如抗坏血酸、谷胱甘肽、类胡萝卜素、花色苷等。另外,一些渗透调节剂、蛋白质(过氧化物还原酶)和两性分子(生育酚)等也可以清除活性氧。

植物清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的酶主要是 SOD, SOD 是生物体内普遍存在的抗氧化系统中一种极为重要的金属酶,植物体内的 SOD 活性与植物抗氧化胁迫能力呈正相关。过量表达 *Cu/Zn SOD* 和 *APX* 基因可提高植物对非生物胁迫的耐受性(Lee et al., 2007)。在甘薯中,过量表达 *Cu/Zn SOD* 和 *APX* 基因的植株也表现为:具有生理代谢上的优势,可以在受旱情况下保持较高的净光合速率,对于旱表现出较

强的耐性。过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽转移酶(glutathione S-transferase, GST)在植物的活性氧代谢中也起着重要作用,与控制活性氧的浓度和信号转导密切相关(Shigeoka et al., 2002)。CAT 是植物生命活动特别是抗逆不可缺少的抗氧化酶,在氧化胁迫下对维持细胞内的氧化还原平衡至关重要。转 CAT 基因植物增强了对光、干旱和除草剂等诱导的氧化胁迫抗性(Miyagawa et al., 2000; Polidoros et al., 2001)。GST 在植物生长发育的各个阶段都存在,在 GSH(还原型谷胱甘肽 reduced glutathione)的协同作用下通过猝灭活性分子(如氢过氧化物)的活性保护细胞免受氧化损伤(McGonigle et al., 2000)。携带棉花 GST 的转基因烟草增强了对氧化胁迫的抗性(Yu et al., 2002)。同时转入谷胱甘肽转移酶和过氧化氢酶基因的水稻幼苗对低温胁迫的抗性也增强。

由此可见,植物对于干旱、盐浓度、冷害、高温和机械损伤等非生物胁迫的应答非常复杂,且常常互相关联,非生物胁迫可以造成细胞的损伤并引起二次胁迫,如渗透胁迫和氧化胁迫。研究植物的抗逆机理、提高植物抗逆性已经成为了研究的热点,分离、克隆了大量的基因,并转入到植物中,转基因植物的抗逆性都有不同程度的提高。植物的抗逆性是一个数量性状,是由多基因参与和相互作用的。因此,要提高植物的抗逆性,就必须进一步了解植物的抗逆机理,找到关键的抗逆表达调控基因。

1.3 基因组学方法在植物耐盐机理研究中的应用

随着功能基因组学的发展,可以对大量的植物基因进行全面系统的分析,包括基因表达系统分析(serial analysis of gene expression, SAGE)、cDNA 微阵列(cDNA microarray)、蛋白质组技术及基于转座子标签和 T-DNA 标签的反向遗传学技术等,将为寻找及验证耐盐基因的功能提供技术保证。用来大量检测不同植物组织之间差异表达基因的主要方法有:蛋白质双向电泳、cDNA 消减杂交(Diatchenko et al., 1996)、mRNA 差异显示反转录 PCR(differential mRNA display reverse transcription PCR, DDRT-PCR)(吴乃虎, 1998)、基因表达系统分析(SAGE)(Lee et al., 1991)、表达序列标签(expressed sequence tag, EST)数据库比较(John and Davis, 1979)和 cDNA 芯片技术(Schena et al., 1995)等。在各种技术中,随近年来 EST 和 cDNA 芯片技术研究的广泛开展,已成为揭示植物抗逆机理的重要途径(徐梅和张峰, 2002)。自然界中存在一些盐生植物,它们可以在高盐环境下正常生长,许多学者相信盐生植物中蕴含有可用于基因工程改良农作物的耐盐基因。植物的功能基因组学为寻找耐盐基因、阐明植物耐盐机理提供了技术基础,为植物在耐盐性方面的改良创造了有利条件。

1.3.1 EST 分析技术及应用

表达序列标签(EST)概念由 Adams 等于 1991 年首次提出,是长度为 150~500 bp 的基因表达序列片段,由 mRNA 反转录成 cDNA 并克隆到载体中构建成 cDNA 文库后,大规模随机挑选 cDNA 克隆,对其 5' 或 3' 端进行一步法测序而获得的,所获得的序列与 GenBank、EMBL、DDBJ 数据库中的已知序列比对,获得对生物体生长发育、繁殖分化、遗传变异、衰老死亡及生物防御等一系列生命过程的认识。EST 已被广泛应用于新基因的发现、大规模基因鉴定、基因克隆、图谱构建、多态性分析和基因表达差异分析等方面。

一个 EST 代表生物体某种组织在某一时期的一个表达基因,EST 的数目可以提示它所代表的基因表达的拷贝数,一个基因在组织中表达的次数越多其相应的 EST 也就越多。通过对大量 EST 序列的测定,当针对某种组织或个体的 EST 数量达到一定的理论极限时,就可以通过数据拼接与分析得到全部的表达基因,构建出特定时空条件下的该组织或个体的比较完整的基因表达谱,寻找到所需要的目的基因,为研究该组织或个体在特定阶段的分子作用机制提供理论支持。GenBank、EMBL-EBI、DDBJ 等数据库是常用的 EST 或包括 EST 的 DNA 数据库,专门收集和记录已有的 EST 数据资源,到 2012 年 7 月 1 日为止,GenBank 在其 dbEST 中已收集 73 360 923 条 EST(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html)。

其中,植物 EST 序列的来源覆盖了几乎所有重要的粮食作物、经济作物和多种树木,包括水稻、小麦、大麦、大豆、玉米、马铃薯、棉花、甜菜、番茄、葡萄、高粱、苜蓿、水芹、向日葵、番薯、甘蓝、薄荷、碱蓬、雪松、火炬松、杨树等。这些 EST 不仅为植物基因组遗传图谱的构建提供了大量的分子标记,而且来自不同组织和器官的 EST 也为基因的功能研究提供了有价值的信息。

在整个基因组 DNA 中,表达基因(即编码蛋白质和 RNA 序列)仅占 2%,所以要进行功能基因组的研究,从 mRNA/cDNA 着手分析哪些基因表达及何时何地表达被认为是一种相对快速易行的方法。EST 在功能基因组学研究中主要用于以下几个方面。

(1) 制作 DNA 芯片

DNA 芯片是一种固定于固相载体上的 DNA 阵列,通过杂交反应来采集感兴趣的基因信息。EST 是用于制备 DNA 芯片很好的资源(Carulli et al., 1998),而芯片技术同样也是目前高通量筛选 EST 的有效方法。利用不同组织和发育时期的实验材料进行基因表达研究,成为鉴定新基因和功能的初始材料。利用 EST 序列,采用 PCR 技术可以方便地扩增代表不同基因的 cDNA 片段,用于制备基因芯片。在植物中,很多模式植物和农作物的 EST 都已用于芯片研究,如拟南芥

(*Arabidopsis thaliana*) (Motoaki et al., 2001)、水稻(*Oryza sativa*) (王丽华等, 2003; Rabbani et al., 2003; Guimil et al., 2005)、大麦(*Hordeum vulgare*) (Negishi et al., 2002; 张银红等, 2006)、玉米(*Zea mays*) (唐万虎等, 2005)、草棉(*Gossypium herbaceum*) (徐瑜等, 2004)等, 近年来也开展了一些木本植物的研究, 如火炬松(*Pinus taeda*) (Johnson et al., 2002)、杂交杨(*Populus tremula* × *P. tremuloides*) (Hertzberg et al., 2001) 和毛果杨(*Populus trichocarpa*) (Wullschlegel et al., 2002)等其他林木。随着更多基因组计划的开展和更多已知功能基因的累积, 将来无需测序只通过 DNA 芯片就可研究基因功能(邱咏梅和夏庆友, 2002)。EST 计划的实施, 不仅获得了关于表达基因的信息资源, 同时也获得了大量已鉴定的 cDNA 克隆资源, 而这些资源都是功能基因组学研究不可缺少的。

(2) 为基因表达系统分析(SAGE)提供前提

SAGE 技术是同时定量分析大量转录本的一种方法。该技术主要基于两条原则: 首先, 来自转录物内特定位置的 9~10 bp 短核苷酸序列(SAGE 标签)所含信息足以代表其相应的转录物; 其次, SAGE 标签经随机连接、扩增并集中在一个克隆中测序, 标签重复出现的次数代表该转录物的拷贝数。自 Velculescu 等(1995)首次报道了该研究方法以来, 该方法得到广泛应用, 目前在人类疾病尤其是各类癌症疾病(Croix et al., 2000)、生物代谢途径(He et al., 1998)、植物和模式生物(Lorenz and Dean, 2002)及基因转录组(Patankar et al., 2001)等诸多领域的基因表达研究中, 已成功应用了 SAGE 技术。但应用 SAGE 技术的一个前提条件是 GenBank 中必须有足够的某一物种的 DNA 序列资料, 尤其是 EST 序列资料。它通过快速和详细分析 EST 数据来寻找出表达丰度不同的 SAGE 标签序列, 从而接近完整地获得基因组表达信息。

(3) 基因差异表达的研究

一般认为某一时期的基因表达数量通常占全部基因的 15%, 细胞的分化由基因特异性的时空表达决定。由于用 EST 技术研究基因的表达稳定性高且分析规模大, 使其成为研究基因差异表达的热点。对 cDNA 文库随机挑选克隆进行大规模测序, 可直接回答特定组织细胞在某一时期哪些基因表达了、丰度如何等问题, 从而能在基因整体水平研究相关的功能及代谢。目前基因差异表达研究是植物 EST 研究的主流, 基因表达谱的研究更是其中的热点(Ohlrogge and Benning, 2003)。已应用 EST 技术对植物不同组织, 或同一组织在生物和非生物胁迫前后基因表达谱进行了比较研究。如杨树和松树木质形成中的基因表达(Allona et al., 1998; Sterky et al., 1998; Hertzberg et al., 2001)、拟南芥防御系统基因表达(White et al., 2000)、忽地笑叶片野生型和突变型 EST 序列同源性比较(崔永兰, 2004)、盐胁迫后冰叶日中花(*Mesembryanthemum crystallinum*)基因表达差异

(Kore-eda et al., 2004)等,涉及的植物种类多,研究内容广泛。

1.3.2 cDNA 微阵列技术在植物抗逆研究中的应用

cDNA 芯片是随着分子生物学技术的发展和人类基因组计划的实施应运而生的一项崭新技术,是分子生物学、半导体微电子、激光等学科技术高度交叉、高度综合的前沿科学与研究热点。用于研究基因表达特征的 cDNA 芯片也称 cDNA 表达谱芯片,利用 cDNA 表达谱芯片技术结合 EST 技术能在大量组织的基因表达水平上,进行快速、有效地检测植物不同组织间基因表达的差异,从而达到高效筛选差异表达基因的目的(Brazma and Vilo, 2000; Holter et al., 2000; Hughes et al., 2000)。cDNA 微阵列技术是 Schena 等(1995)发展起来的,其灵敏度极高,mRNA 丰度低至十万分之一仍能被检测出。可使用几种不同颜色的荧光染料标记探针,即在同一张阵列膜上进行一次杂交实验就可以同时分析不同细胞间或不同环境胁迫下基因表达的差异(Schena et al., 1995; Lee PS and Lee KH, 2000)。

随着 cDNA 表达谱芯片在植物学领域的广泛应用,它在植物耐盐分子生物学研究中也发挥出越来越重要的作用。植物逆境胁迫抗性研究的技术策略有以下几个方面:①利用差异表达分析获得与植物逆境胁迫抗性相关的基因信息;②通过大规模测序建立基因表达序列位点数据库;③利用 cDNA 基因芯片分析和基因表达序列分析建立逆境胁迫抗性基因的序列表达谱;④利用基因敲除和突变体筛选方法对基因的功能进一步分析(樊金娟等, 2004; 胡银岗等, 2004)。研究发现植物能通过其基因表达模式的显著改变响应温度、水分、有害离子水平等环境的变化,因此将这种响应下的表达谱定义为耐受型和敏感型两种。有的植物在自身基因转录水平发生变化时能成功地适应环境胁迫并增强对逆境的耐受力,即耐受型植物,而环境敏感型植物则不能适应这种环境变化。植物对极端环境的响应特征谱对于旨在提高耐胁迫能力的生物技术手段来说非常有用,也是研究植物遗传调节系统的新工具,从植物转录谱的改变过程中进行数据挖掘能使人们进一步认识逆境胁迫对植物生理的影响机理(Rabbani et al., 2003; Miyama and Hanagata, 2007)。因此,cDNA 表达谱芯片为研究植物在盐胁迫条件下的基因开关及表达程度提供了强有力的工具,利用它可获取植物细胞生长各期与盐诱导相关基因的表达模式,为进一步研究抗逆基因功能及如何提高植物的抗逆性奠定了基础。

目前,功能基因组研究的技术和方法日益成熟,可以从整体上对作物的抗逆性机理进行研究,为充分发挥分子标记辅助选育和转基因改良植物的抗逆性提供了新的理论基础和技术。

1.4 耐盐相关基因的克隆

盐胁迫可以诱导许多植物基因的表达(Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1996),根据这些基因产物的作用,可以分为效应因子和调控因子两大类(Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1996; Zhu, 2002)。

1) 基因的产物为效应分子,包括:渗透保护剂(如甜菜碱、甘露醇、海藻糖及脯氨酸等)的合成酶;维持离子平衡的蛋白质(如 Na^+/H^+ 反向转运蛋白等);参与氧化胁迫保护、清除活性氧的酶(如超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽还原酶和促分裂原活化蛋白激酶等);直接保护细胞免受盐胁迫伤害的功能蛋白(如胚胎发生晚期丰富蛋白、伴侣蛋白和水通道蛋白等)。

2) 基因的产物为调控分子,包括调控基因表达的转录因子,如 DREB (dehydration responsive element binding protein) 转录因子、MYB 转录因子、MYC 转录因子和 bZIP (basic leucine zipper) 转录因子等;以及感受和传导胁迫信号的路径、钙信号 (CaN) 途径、蛋白激酶等。

1.4.1 植物液泡膜 H^+ -ATPase 基因

植物液泡膜 H^+ -ATPase (V-ATPase; EC3. 6.1. 34), 属于 ATPase 家族,是质子跨膜转运蛋白泵,为 Na^+ 区隔化提供能量,参与植物细胞内离子平衡的调节。在植物抵抗逆境胁迫,如盐胁迫和干旱胁迫中起重要作用。

V-ATPase 是一种多亚基的蛋白质复合体。全酶由两个功能区组成:突出膜外的亲水头部和柄部,合称为 V_1 , 主要功能是催化 ATP 水解,由 8 种亚基组成 (A、B、C、D、E、F、G、H)。膜内部分则称为 V_0 , 主要的功能是跨内膜形成质子通道,由 5 或 6 种亚基组成 (a、d、c、c'、c''、e) (Michael et al., 2000; Sze et al., 2002)。 V_0 区的 3 个亚基 c、c'、c'' 为高度疏水的多肽,彼此间具有高度的同源性,统称为 proteolipid (Sze et al., 2002)。其中分子质量为 16~17 kDa 的亚基 c 在全酶中存在 6 个拷贝,是目前所知最保守的膜蛋白之一,被认为是参与质子跨膜转运的主要亚基 (Nelson and Harvey, 1999),存在 4 个跨膜区;生化及突变研究证明, c 亚基第 4 跨膜区谷氨酸残基是 V-ATPase 行使质子转运功能所必需的功能残基,也是脂溶性的质子通道抑制剂 DCCD 的结合位点 (Fillingame, 1996), DCCD 的结合会引起 V-ATPase 质子泵活性和水解活性的丧失 (Sze et al., 1992)。 c 亚基是 V-ATPase 的一个关键亚基,在 V-ATPase 的组装中起中心作用,缺少 c 亚基的酵母突变体,虽然可以合成 V_1 部分,但却不能被组装到膜上 (Kane et al., 1992)。同时有实验表明,缺失 *Vma3* 基因的酵母,其 V-ATPase 活性完全丧失 (Umemoto et al., 1990)。

在研究 V-ATPase 对逆境的响应中,发现 c 亚基更为敏感,且其 mRNA 水平显著增加(Tsiantis et al.,1996)。对冰叶日中花响应胁迫的研究中也发现,c 亚基的数量明显增加,且 c 亚基的 mRNA 水平在胁迫发生后几乎立即产生应答,数量迅速增加(夏朝晖等,2000;狄廷均等,2007)。Chen 等(2002)对更苏植物念珠藻(*Tortula ruralis*)c 亚基的研究发现,在盐胁迫及盐激条件下 c 亚基的表达量增加。Löw 等(1996)研究发现,用 400 mmol/L NaCl 胁迫处理 8 h 后,叶中 c 亚基的表达明显上调。用 NaCl 处理后,冰草根和幼叶中 V-ATPase 的 A、B、c 亚基的 mRNA 的量比对照大约增加了 2 倍,而成熟的叶片中却只有 c 亚基 mRNA 的量有所提高。由于盐胁迫可以改变 V-ATPase 的偶联率,因此,盐胁迫下向日葵(*Helianthus annuus*)的 V-ATPase 的 H⁺ 转运活性提高而水解活性有所降低,推测偶联率的变化是由 c 亚基的数量变化或不同表型 c 亚基的表达差异引起的(Ratajczak,2000)。这说明,c 亚基在植物响应胁迫过程中具有极为重要的作用。

1.4.2 DREB 转录因子的研究概况

基因的表达调控是在多级水平上参加的复杂事件。基因的结构活化、转录起始、转录后加工及转运、mRNA 降解、翻译及翻译后加工和蛋白质降解等均为基因表达调控的控制点。其中转录起始是基因表达的最有效调节环节,翻译及翻译后加工是基因表达的基本控制点。对这些关键过程基因的克隆和功能验证是进行基因工程改良林木抗性的一个前提。

转录起始调控主要是通过转录因子与基因启动子区域中的顺式元件发生特异性相互作用来调控基因的表达。因此,转录因子得到人们的广泛关注。转录因子(transcription factor),又称反式作用因子,是指那些专一性地结合于 DNA 特定序列上的、能激活或抑制其他基因转录的蛋白质。植物基因组中包含着许多转录因子基因,如拟南芥基因组中大约有 5.9% 的序列编码至少 1533 种转录因子(Riechmann et al.,2000)。大多数转录因子属于几个大的基因家族(如 MYB、AP2/EREBP、bZIPDREB 和 WRKY 等)。植物转录因子中有相当部分与胁迫应答有关,如 DREB 家族;同一家族的不同成员往往应答不同的胁迫刺激,同时某些不同的胁迫应答基因也可能由相同的转录因子激活,不同胁迫诱导的转录因子可能有许多功能的交叠(Thomashow,2001)。

操纵一个转录因子就可通过它促使多个功能基因发挥作用,与导入或改良个别功能基因来提高某种抗性的方法相比,导入一个转录因子是提高作物抗逆性更为有效的方法和途径。研究发现,在拟南芥、油菜、番茄和其他植物中过量表达单一的转录因子就可以提高转基因植株的胁迫耐受能力(Jaglo-Ottosen et al.,1998; Hsieh et al.,2002)。Kasuga 等(1999)和 Haake 等(2002)发现,转录因子在植物获得胁迫耐受能力过程中起重要作用。