

枇杷果实 *DHN* 基因克隆及其在低温胁迫下的表达分析

徐红霞¹, 陈俊伟^{1,*}, 杨 勇², 孙骏威³, 严成其²

(¹浙江省农业科学院园艺研究所, 杭州 310021; ²浙江省农业科学院病毒学与生物技术研究所, 杭州 310021; ³中国计量学院生命科学学院, 杭州 310018)

摘要: 以白沙枇杷 (*Eriobotrya japonica* Lindl.) ‘宁海白’ 幼果为试材, 通过 RT-PCR 与 RACE 扩增, 获得两个具有脱水素基因典型结构域特征的 cDNA 序列。其中 *DHN1* (GenBank 登录号: FJ472835) 全长 639 bp, 编码 188 个氨基酸, 属于 Y₂SK₃ 类型; *DHN2* (GenBank 登录号: FJ472836) 全长 858 bp, 编码 273 个氨基酸, 属于 SK₃ 类型。用低温胁迫处理枇杷幼果, -3 °C 处理 24 h 后电导率明显升高, 表明细胞膜开始受到破坏, -6 °C 处理 24 h 后电导率显著高于 -3 °C 处理。半定量 RT-PCR 和 Western-blotting 分析结果表明这两个 *DHN* 基因在低温胁迫下的枇杷幼果中都上调表达, 表明其与枇杷抗低温胁迫有一定关系。

关键词: 枇杷; *DHN*; 基因克隆; 低温胁迫; 表达分析

中图分类号: S 667.3

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 06-1071-10

Isolation and Expression Analysis of *DHN* Gene in Loquat Fruit Under Cold Stress

XU Hong-xia¹, CHEN Jun-wei^{1,*}, YANG Yong², SUN Jun-wei³, and YAN Cheng-qi²

(¹Institute of Horticulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; ²Institute of Virology and Biotechnology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; ³College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: The full length of two dehydrin (*DHN*) genes from the young fruit of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl. ‘Ninghaibai’) were obtained using RT-PCR and RACE-PCR approach. The deduced amino acid sequences of the *DHN1* and *DHN2* possessed the typical characters of DHN family. However, they differ from each other significantly in the structure characteristics. *DHN1* cDNA sequence length is 639 bp, which contains an open reading frame that would encode 188 amino acid residues, and it is Y₂SK₃ type dehydrin; *DHN2* cDNA sequence length is 858 bp, which contains an open reading frame that would encode 273 amino acid residues, and it is SK₃ type dehydrin. The relative electric conduction was significantly increased in the loquat fruit treated with -3 °C for 24 h, which suggested that the cell membrane was injured, and it was more serious in the loquat fruit treated with -6 °C for 24 h. Semi-quantitative RT-PCR and Western-blotting analysis showed that the expression of both *DHN1* and *DHN2* were induced by cold stress. The results suggested that both *DHN1* and *DHN2* involved in cold resistant in loquat young fruit.

收稿日期: 2010-11-26; 修回日期: 2011-04-26

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (Y307577); 浙江省农业科学院创新提升工程项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: chenjunwe@tom.com)

Key words: loquat; *DHN*; gene clone; cold stress; expression

枇杷 (*Eriobotrya japonica* Lindl.) 因其在秋冬季开花坐果, 花和幼果往往受到冬季冻害的威胁, 导致产量不稳定。脱水素是植物抗脱水胁迫的重要组成部分之一, 是植物体内的一类胚胎发育后期蛋白 (late embryogenesis abundant proteins, LEA 蛋白), 具有多种保护作用, 主要表现为对生物膜和蛋白质结构的稳定作用, 从而减小逆境和脱水过程对细胞的伤害。

脱水素基因低温响应的研究在草本植物中已有大量的报道, 如在小麦、大麦、拟南芥等植物中都克隆得到多条与植物抗冻能力相关的基因 (徐红霞 等, 2009)。近年关于脱水素对果树等木本植物抗寒作用的研究也取得了一定进展, 已从桃树 (Artlip et al., 1997; Wisniewski et al., 1999, 2006)、柑橘 (Hara et al., 1999, 2001, 2003)、柚子 (Porat et al., 2002, 2004)、蓝莓 (Levi et al., 1999; Dhanaraj et al., 2005)、杏 (Yamane et al., 2006)、苹果 (Garcia-Bañuelos et al., 2009) 等果树中分离出一些与低温相关的脱水素基因和蛋白。但迄今为止, 尚未从枇杷中克隆到脱水素基因, 其在低温胁迫下的表达特性等也不清楚。此外, 对脱水素在多年生木本植物中的抗逆作用研究主要集中在叶片、茎干等营养组织, 而在果实中的保护作用研究未见报道。

本研究中以白沙枇杷‘宁海白’为研究对象, 从幼果中克隆脱水素基因, 分析其表达与枇杷抗低温能力之间的关系, 以期对枇杷的抗冻性调控提供理论指导。

1 材料与方 法

1.1 试验材料与试剂

试验材料为 6 年生‘宁海白’枇杷。2009 年 12 月于浙江省农业科学院园艺研究所试验基地采集花后 5 周左右未经冻害的带果穗枝条, 分别置于 0, -3 和 -6 °C 低温光照培养箱 (未打开光照, 相对湿度 60%) 中低温胁迫处理 24 h, 以室温放置 24 h 为对照。采集不同处理的幼果样品经液氮冷冻后于 -70 °C 保存备用。

研究所用的大肠杆菌 DH5 α 由浙江省农业科学院病毒学与生物技术研究所植物病毒研究室保存; 反转录试剂盒、T₄ DNA 连接酶、DL 2000 marker、DNA 凝胶回收试剂盒、克隆载体 pMD18-T Vector 购自大连宝生物工程有限公司。SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒为美国 Clontech 公司产品。所有的化学试剂都从 Sigma 化学公司和华东医药公司购买。

1.2 方 法

1.2.1 基因片段的克隆

PCR 和测序引物均由上海生工生物工程技术公司合成, 引物序列见表 1。文章中字母表示的碱基为: N (A/C/G/T), K (G/T), R (A/G), M (A, C), W (A/T), S (C/G), Y (C/T), V (A/C/G), H (A/C/T), D (A/G/T) 和 B (C/G/T)。序列测定在南京金斯瑞生物科技有限公司进行。

枇杷幼果总 RNA 提取按照 TIANDZ 公司的 Column Plant RNAout 试剂盒说明书进行。所提取的 RNA 用 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara) 反转录成 cDNA。

根据 GenBank 中登录的植物脱水素基因序列, 设计简并引物 (表 1), 以第一链 cDNA 为模板, 利用 RT-PCR 技术扩增 *DHN1* (引物为 DHN1 PF 和 DHN1 PR)、*DHN2* (引物为 DHN2 PF 和 DHN2 PR) 和 *ACTIN* (引物为 ACTIN PF 和 ACTIN PR) 基因片段。扩增片段采用购自大连宝生物工程有限公司的 DNA 凝胶回收试剂盒回收后克隆到 pMD18-T 载体上进行克隆鉴定和序列测定。

表 1 PCR 引物序列
Table 1 PCR primer sequence employed

引物 Primer	引物序列 Primer sequence	引物 Primer	引物序列 Primer sequence
DHN1 PF	ACYGATGAGTAYGGGAACC	DHN2 GPS1-1	ACGAAGCAGCAGCAACTGGAACCT
DHN1 PR	ACCTGGCAGCTTSTCYTTGA	DHN2 GPS1-2	GTGGTGGACAACCCGGAGCTGGAGC
DHN2 PF	GARAARAAGAAGRAGAAGAAGRA	DHN1 FF	TTGAAAATGTCGCATCTG
DHN2 PR	TCTTDGGGTGRTAVCCAGGDA	DHN1 FA	CAACAACACTAAACAACACTG
ACTIN PF	ATGTTTGARACYTTAATGTNCCTG	DHN2 FF	AAGTAGTAAGTCGTGATTTG
ACTIN PR	ATCNACATRCAYTTCATDATDGAR	DHN2 FA	CCTTAATAGGAAGGAGTATC
DHN1 GPS2	GGGCACCAACAGGAAAAGGGGATG	D1 F	CCACTGGGCGGTGCTACTACA
DHN2 GPS2	GGAGGTCCAGTTGCTGCTGCTTCG	D1 R	CCCTTCTTCTTCTCTCCCA
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGT- GGTATCAACGCAGAGT	D2 F	GGCTATCACAAAGAGGACACG
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	D2 R	GAAGCAGCAGCAACTGGAACC
DHN1 GPS1-1	TCCCCTTTTCTCTGTTGGTGCCCTC	A F	CCACTACTGCTGAACGGGAAA
DHN1 GPS1-2	GAGCGGTGAGCAGCCAGTGACA	A R	GAGAGATGGTTGGAAGAGGAC

1.2.2 RACE 方法获得 *DHN1* 和 *DHN2* 的 cDNA 序列

按照 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒 (Clontech) 说明书, 将获得的 RNA 分别进行反转录, 得到 3'-RACE-Ready cDNA 和 5'-RACE-Ready cDNA。根据克隆得到 *DHN1* 和 *DHN2* 中间片段设计特异引物, 利用 RACE-PCR 技术, 对已获得的两条脱水素基因片段进行 3'端和 5'端扩增。

3'RACE 扩增 PCR 反应体系: 10 × PCR buffer 2 μL; dNTPs (各 2.5 mmol · L⁻¹) 1.6 μL; 3'-RACE-Ready cDNA 模板 0.5 μL; 引物 GPS2 (*DHN1* 为 DHN1 GPS2; *DHN2* 为 DHN2 GPS2) 0.5 μL; UPM 0.5 μL; Pfyrobect DNA 聚合酶 0.2 μL; 无菌水至 20 μL, PCR 反应程序按说明书操作。

5'RACE 采用巢式 PCR 扩增: (1) 第 1 轮 5'RACE 扩增 PCR 反应体系包括 10 × PCR buffer 2 μL; dNTPs (各 2.5 mmol · L⁻¹) 1.6 μL, 5'-RACE-Ready cDNA 模板 0.5 μL, 引物 GPS1 (*DHN1* 为 DHN1 GPS1-1; *DHN2* 为 DHN2 GPS1-1) 0.5 μL, UPM 0.5 μL, Pfyrobect DNA 聚合酶 0.2 μL, 加无菌水至 20 μL。PCR 反应程序按说明书操作。(2) 第 2 轮巢式 PCR 扩增反应体系包括 10 × PCR buffer 2 μL, dNTPs (各 2.5 mmol · L⁻¹) 1.6 μL, 第 1 轮 PCR 产物 (稀释 10 ×) 1 μL, 引物 GPS1 (*DHN1* 为 DHN1 GPS1-2, *DHN2* 为 DHN2 GPS1-2) 0.5 μL, NUP 0.5 μL, Pfyrobect DNA 聚合酶 0.2 μL, 加无菌水至 20 μL。PCR 反应程序: 94 °C 3 min; 94 °C 1 min; 58 °C 40 s; 72 °C 1 min; 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增片段采用购自大连宝生物工程有限公司的 DNA 凝胶回收试剂盒回收后克隆到 pMD18-T 载体上进行克隆鉴定和序列测定。

1.2.3 *DHN1* 和 *DHN2* 全长序列的获得

根据所得的 RACE 拼接结果, 设计特异引物进行扩增 *DHN1* (引物为 DHN1 FF 和 DHN1 FA) 和 *DHN2* (引物为 DHN2 FF 和 DHN2 FA) 全长, 扩增片段采用购自大连宝生物工程有限公司的 DNA 凝胶回收试剂盒回收后克隆到 pMD18-T 载体上进行克隆鉴定和序列测定。

1.2.4 基因序列分析及同源性分析

把获得的脱水素全长 *DHN1* 和 *DHN2* 基因在 NCBI 网站上 BLAST 比对, 用 ORF Finder 寻找开放阅读框, 并对 F-box 区域进行分析。用 ProtParam 分析 SFB 编码蛋白的氨基酸序列组成、相对分子质量、等电点等理化性质 (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>); 利用 DNASTAR 软件预测枇杷脱水素蛋白 *DHN1* 和 *DHN2* 二级结构和亲水性情况; 氨基酸序列比对用 DNAMAN 软件完成, 系统进化树用 MEGA 4.0 等软件生成, 所用的氨基酸序列来自 NCBI 网站。

1.2.5 基因表达的半定量 RT-PCR 分析

提取所采果实样品总 RNA, 经 DNase 于 37 °C 处理 30 min 后, 每样品取 1 μg 用 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara) 进行反转录成单链 cDNA。反转录产物作为半定量 RT-PCR 的反

应模板。用 *ACTIN* 作为内参校正上样量。所用引物见表 1。为避免同源基因之间相互干扰, 根据测序结果, 在同源性较低序列区分别设计特异引物, 扩增条件为: 94 °C 2 min 预变性后, 94 °C 40 s, 58 °C 40 s, 72 °C 40 s, 28 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。反应结束后吸取 10 μ L 在含 EB 的 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

1.2.6 相对电导率的测定

取各处理幼果用自来水洗净, 切成 0.1 cm \times 0.1 cm \times 0.1 cm 的小方块, 参照张昭其等 (1997) 的方法测定电导率, 每个处理重复 3 次。

1.2.7 脱水素抗体的制备和 Western-blotting

将克隆所得的 *DHN1* 和 *DHN2* 两条脱水素基因委托上海生工生物工程技术有限公司抗体部进行多克隆抗体制备和纯化。枇杷果实蛋白提取及 Western-blotting 杂交参照 Claudia 等 (2006) 的方法。每孔上样的蛋白量为 50 μ g。

2 结果与分析

2.1 枇杷 *DHN* 基因的序列分析与比较

脱水素在结构上有 3 类非常保守的区域, 即 K、S 和 Y 片段 (Close, 1997)。这 3 部分保守区合称为 YSK, 这些 K 片段、S 片段和 Y 片段不同数量和组合方式决定了脱水素蛋白不同的结构和分子大小 (从 82 到 575 个氨基酸残基不等) (Close, 1996, 1997)。本试验中利用 RT-PCR 技术和简并引物, 从枇杷幼果中克隆到两个脱水素基因, 分别命名为 *DHN1* (GenBank 登录号: FJ472835) 和 *DHN2* (GenBank 登录号: FJ472836)。

DHN1 基因全长 639 bp, 编码 188 个氨基酸, 具有 2 个 Y 片段, 1 个 S 片段, 以及 3 个 K 片段, 属于 Y₂SK₃ 类型; *DHN2* 基因全长 858 bp, 编码 273 个氨基酸, 具有 1 个 S 片段, 以及 3 个 K 片段, 属于 SK₃ 类型 (图 1)。

用 ProtParam 预测枇杷两条脱水素蛋白的理化性质, 结果表明这两条蛋白的理化特性存在很大的差异, 推测 *DHN1* 蛋白的分子式为 C₈₄₂H₁₃₂₃N₂₆₁O₂₉₃S₄, 相对分子量 19 918.5, 等电点 (pI) 为 7.98; 理论推导半衰期大约为 30 h, 不稳定参数为 25.44, 属于稳定蛋白 (标准: 40 以下为稳定蛋白)。该蛋白中相对含量比较多的氨基酸是甘氨酸 Gly (30 个, 16.0%), 苏氨酸 Thr (30 个, 16%) 和赖氨酸 Lys (18 个, 9.6%)。总的带负电荷的残基 (Asp + Glu) 为 22; 总的带正电荷的残基 (Arg + Lys) 为 23。亲水性平均数为 -1.269, 预测该蛋白为亲水性蛋白, 其脂肪指数为 33.30。推测 *DHN2* 蛋白的分子式为 C₁₃₇₂H₂₁₃₁N₃₈₃O₄₇₁S₂, 相对分子量 31 591.4, 等电点 (pI) 为 5.32; 理论推导半衰期大约为 30 h, 不稳定参数为 54.87, 属于不稳定蛋白。该蛋白中相对含量比较多的氨基酸是谷氨酸 Glu (53 个, 19.4%), 赖氨酸 Lys (46 个, 16.8%) 和天冬氨酸 Asp (21 个, 7.7%), 总的带负电荷的残基 (Asp + Glu) 为 74; 总的带正电荷的残基 (Arg + Lys) 为 51。亲水性平均数为 -1.706, 预测该蛋白为亲水性蛋白, 其脂肪指数为 41.43。

利用 DNASTAR 的 Garnier-Robson 和 Chou-Fasman 方法预测枇杷两条脱水素蛋白 *DHN* 的二级结构, 结果如图 2 所示。

DHN1 蛋白 α 螺旋, β 折叠, 扭转结构以及无规则卷曲结构分布比较均匀, 绝大部分为柔韧性区域, Kyte-Doolittle 法亲水性分析和 Emini 法膜表面分析结果显示, 此蛋白为亲水性蛋白, 并且主要在膜的表面。*DHN2* 蛋白的二级结构与 *DHN1* 蛋白有很大区别, 该蛋白主要是 α 螺旋, 而 β 折叠, 扭转结构以及无规则卷曲结构都比较缺乏, 该蛋白绝大部分也是柔韧性区域, Kyte-Doolittle 法亲水

性分析和 Emini 法膜表面分析结果显示, 此蛋白的亲水性要比 DHN1 高, 并且主要在膜的表面的可能性也要高于 DHN1。

DHN1 1 TTGAAAAATGTCGCATCTGCATAATCAACACGGGGCACAGCCAACCGACGCCTACGACAA
 1 M S H L H N Q H G A Q P T D A Y D N
 61 CCCGATCCAGAGAACTGATGAGTATGGGAACCCACTGGGCGGTGCTACTACAGGTGCCAC
 19 P I Q R T D E Y G N P L G G A T T G A T
 121 CACCGGAGGATACGGTGCATGACACAGCCGCTGCGACCACTGGTACGATTACGGCAG
 39 T G G Y G A H D T A A A T T G H D Y G R
 181 GAAAGAGCACCATGGTGTCACTGGCGTCTCCACCCTCTGGCAGCTCAAGCTCTAGCTC
 59 K E H H G V T G V L H R S G S S S S S S
 241 TTCCGAGGATGATGGGCTAGGTGGGAGGAGGAAGAAGAAGGGGTTGAAACAGAAGATAAA
 79 S E D D G L G G R R K K K G L K Q K I K
 301 GGAGAAGCCCCGGGATCAACCAGACTGATACAACACTACGGCACCGCTGGCACCACCTA
 99 E K P P G S T T D T T Y G T A G T T Y
 361 CCCAGGAGGGCACCAACAGGAAAAAGGGATGATGGACAAGATCAAGACAAGCTGCCAGG
 119 P G G H Q Q E K G M M D K I K D K L P G
 421 TACTGGCCACAAGGATACCCCACTACTCAACCACAACATACTACTACGACCACAAC
 139 T G H K D D P H Y S T T T H T T T T T
 481 TCCCTCCGGCGGTGCCACCTACACGGAGGACCACGAAAAGAAGGGGATCATGGAAAA
 159 P S G A T Y T E E H H E K K G I M E K
 541 GATCAAAGAGAAGCTTCCCGCGGAAACCCTAGTGAATATAATCATTCCCTGTATTAAT
 179 I K E K L P G G N H *
 601 AAAAGCCTACAGTATGTATACAGTGTGTTAGTGTGTTG

DHN2 1 AAGTAGTAAGTCGTGATTTGATATTAAGAAAAGAA TGCGGAGGAGTACAACAAGAAGAG
 1 M A E E Y N K K R
 61 GGATGAACACGAGTACGAGAGGAAGACTGGGGATTACGAGGAGGGATCGGGTGCAGGCCA
 10 D E H E Y E R K T G D Y E E G S G A G E
 121 GACCAAGGATCGTGGGTTGTTGATTTCTTGGGAAGAAAGAGGAGGAGAAGCCAACTCC
 30 T K D R G L F D F L G K K E E E K P T P
 181 TTATCAGCAAGGGGATCAGGTGAACGTCGCTGAGT TTGATGAGAAAGTCAAGATCTCCGA
 50 Y Q Q G D Q V N V A E F D E K V K I S D
 241 TCATCAGTACGATCATCATCATAACAAGTAGAGGAGGAGGAGGACAAGGAGAA
 70 H H D Q H A S S Y N K V E E E D K E K
 301 GAAGCACGAGACTCTCCTGCAGAAGCTTACCGATCTGACAGCGGCTCTAGCTCTTCAAG
 90 K H E T L L Q K L H R S D S G S S S S S
 361 CGATGAGGAGGAAGATGAAGAGAAGAAGAAGAGGAAAGAAAAGAAGGGATTGAAGGA
 110 D E E E D E E K K K K R K E K K G L K D
 421 TAAGATCAAGGAGAAGGTCTCCGGTGTATGATCACAAGGAAGAAGGCTATCACAAAGAGGA
 130 K I K E K V S G D D H K E E G Y H K E D
 481 CACGGTGTCCCGTGGAGAAAGTGTACGAGGAGGAACATCATCATCAAGTCCAGCTCC
 150 T A V P V E K V Y E E E H H H Q A P A P
 541 GGTGTCCACCACGAAGAGCCCACTGACTACCCAACTGAGGAAAAGAAGGGTTTCCCTCGA
 170 V V H H E E P T D Y P T E E K K G F L E
 601 GAAGATCAAGGAAAAGCTTCTCGCCACAAGAAGACTGAGGAGGTTCCAGTTGCTGCTGC
 190 K I K E K L P G H K K T E E V P V A A A
 661 TTCGTACGAACAGCAGAGTACGACCATCATGCCGCGGAGCCACCGTAGTAGCCTTA
 210 S Y E Q S H D H H A A E P P V V A S Y
 721 TGAAGCCGGCGAAGAGCCCAAGGAAAAGAAGGGTATTATGGAGAAGATCAAGGAAAAGCT
 230 E A G E E P K E K K G I M E K I K E K L
 781 ACCTGGCTACCACCCCAAGACCGAGGAAGATCACAAGGACATCAAGGAGAAAGAGAAGGA
 250 P G Y H P K T E E D H K D I K E K E K D
 841 TACTCCTTCCTATTAAGG
 270 T P S Y *

图 1 枇杷 *DHN* 基因的 cDNA 序列及其编码的氨基酸

—Y 片段; —S 片段; □ K 片段。

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Eriobotrya japonica* Lindl. *DHN*

—Y segmnt; —S segment; □ K segment.

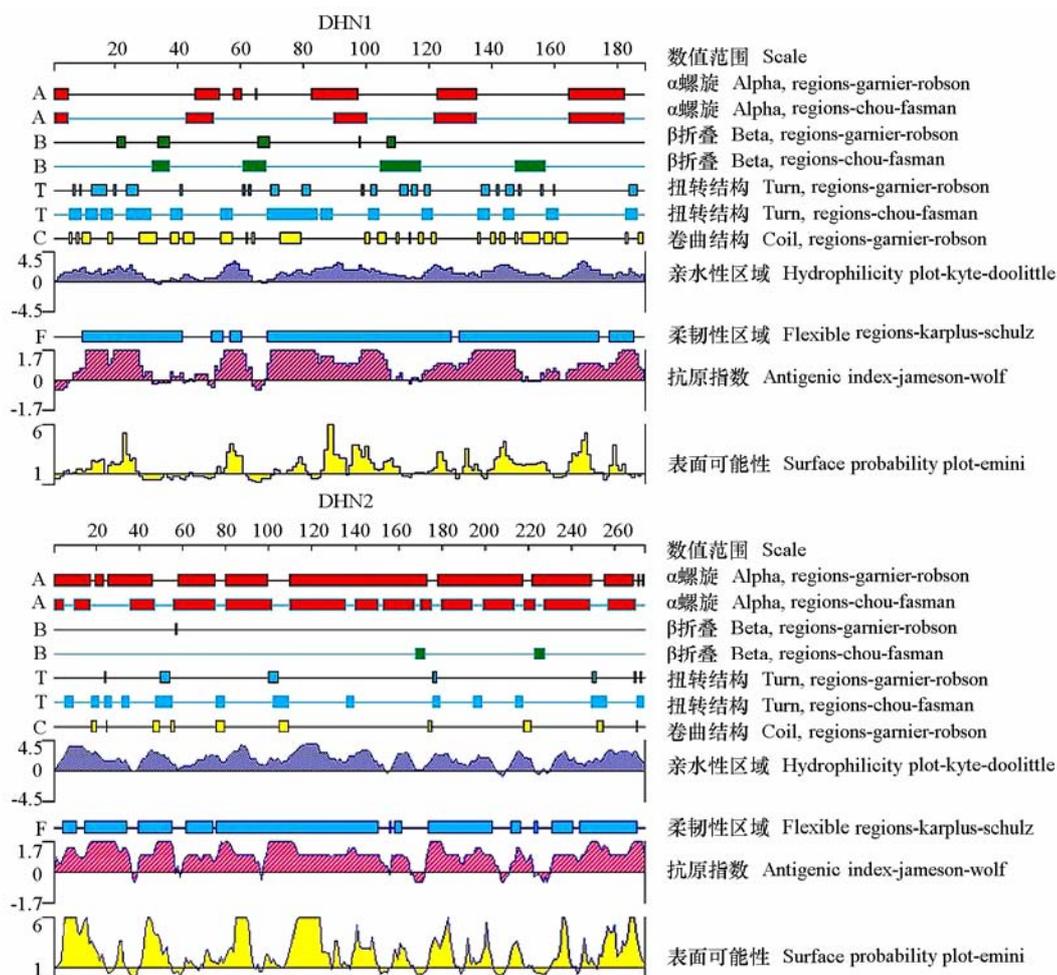


图 2 DNASSTAR 预测 DHN 蛋白结果
Fig. 2 Result of predicting DHN protein with DNASSTAR

2.2 枇杷 DHN 的同源性及进化分析

利用 DNAMAN 软件进行多重比对 (Multiple alignment) 的结果见图 3, 从比对结果可以看出, 不同的脱水素蛋白氨基酸序列差异很大, 只有在脱水素蛋白特有的片段, 如 Y 片段、S 片段和 K 片段区域的氨基酸比较保守。

对克隆得到的两条 DHN 蛋白分别与已知的在 GenBank 上登陆的木本植物的蛋白进行进化树分析, 可以看出与蔷薇科植物的脱水素蛋白亲缘关系较近, 其中 DHN1 蛋白与砂梨 (*Pyrus pyrifolia*) 的 DHN 蛋白 (FJ468294) 的亲缘关系最近, 其次是桃 (*Prunus persica*) 的 DHN2 (AY465376) 和扁桃 (*Prunus dulcis*) 的 RAB21 (AF172263) 蛋白; 枇杷的 DHN2 蛋白与桃 (*Prunus persica*) 的 DHN3 (DQ111949) 和扁桃 (*Prunus dulcis*) 的 DHN 蛋白 (AF209908) 的亲缘关系最近 (图 4)。

2.3 枇杷 DHN 基因在低温胁迫下的表达分析

由图 5 可以看出, 枇杷幼果在 0 °C 处理 24 h 后相对电导率与对照相比没有显著变化, 但 -3 °C 处理 24 h 后电导率开始显著升高, 比对照增加 29.6%, 表明细胞膜开始受到破坏, 并且 -6 °C 处理 24 h 后电导率显著高于 -3 °C 处理, 比对照增加 69.1%, 说明处理温度越低, 对枇杷幼果的伤害越严重。

通过半定量 PCR 法研究两脱水素基因在转录水平上表达与枇杷幼果低温胁迫之间的关系发现,

0 °C 处理后两脱水素基因表达均没有明显变化, *DHN1* 在 -3 °C 处理后开始明显上调表达, 且 -6 °C 处理表达量显著高于 -3 °C 处理, 而 *DHN2* 只有在温度下 -6 °C 处理才明显表达上调 (图 6)。

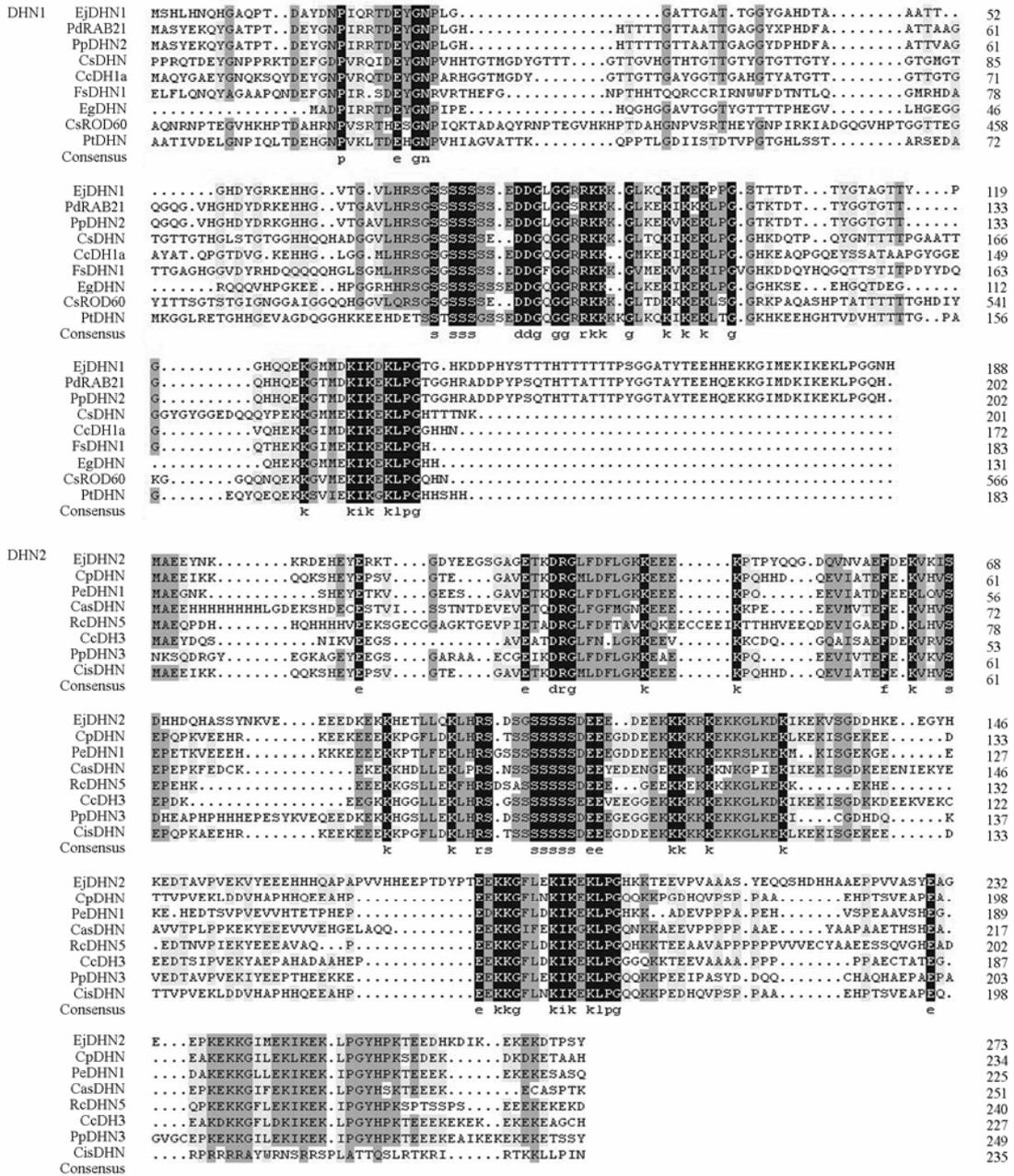


图 3 枇杷 *DHN* 基因推导的氨基酸序列与其它植物脱水素基因推导的氨基酸序列的多重比对分析

EjDHN1 (枇杷, FJ472835); PdRAB21 (扁桃, AF172263); PpDHN2 (桃, AY465376); CsDHN (茶, FJ436978); CcDH1a (咖啡, DQ323987); FsDHN1 (欧洲山毛榉, AJ606474); EgDHN (棕榈, AF236067); CsROD60 (黄瑞木 AF345988); PtDHN (毛果杨, XM_002313741); EjDHN2 (枇杷, FJ472836); CpDHN (葡萄柚, AY160772); PeDHN1 (杨树, AJ300524); CasDHN (茶, GQ228834); RcDHN5 (杜鹃, EU549866); CcDH3 (咖啡, DQ333960); PpDHN3 (桃, DQ111949); CisDHN (甜橙, AY297793)。

Fig 3 Alignment of the predicted amino acids of *DHN* genes in *Eriobotrya japonica* and those of several other plant

EjDHN1 (*Eriobotrya japonica*, FJ472835); PdRAB21 (*Prunus dulcis*, AF172263); PpDHN2 (*Prunus persica*, AY465376); CsDHN (*Camellia sinensis*, FJ436978); CcDH1a (*Coffea canephora*, DQ323987); FsDHN1 (*Fagus sylvatica*, AJ606474); EgDHN (*Elaeis guineensis*, AF236067); CsROD60 (*Cornus sericea*, AF345988); PtDHN (*Populus trichocarpa*, XM_002313741); EjDHN2 (*Eriobotrya japonica*, FJ472836); CpDHN (*Citrus X paradisi*, AY160772); PeDHN1 (*Populus euramericana*, AJ300524); CasDHN (*Camellia sinensis*, GQ228834); RcDHN5 (*Rhododendron catawbiense*, EU549866); CcDH3 (*Coffea canephora*, DQ333960); PpDHN3 (*Prunus persica*, DQ111949); CisDHN (*Citrus sinensis*, AY297793) .

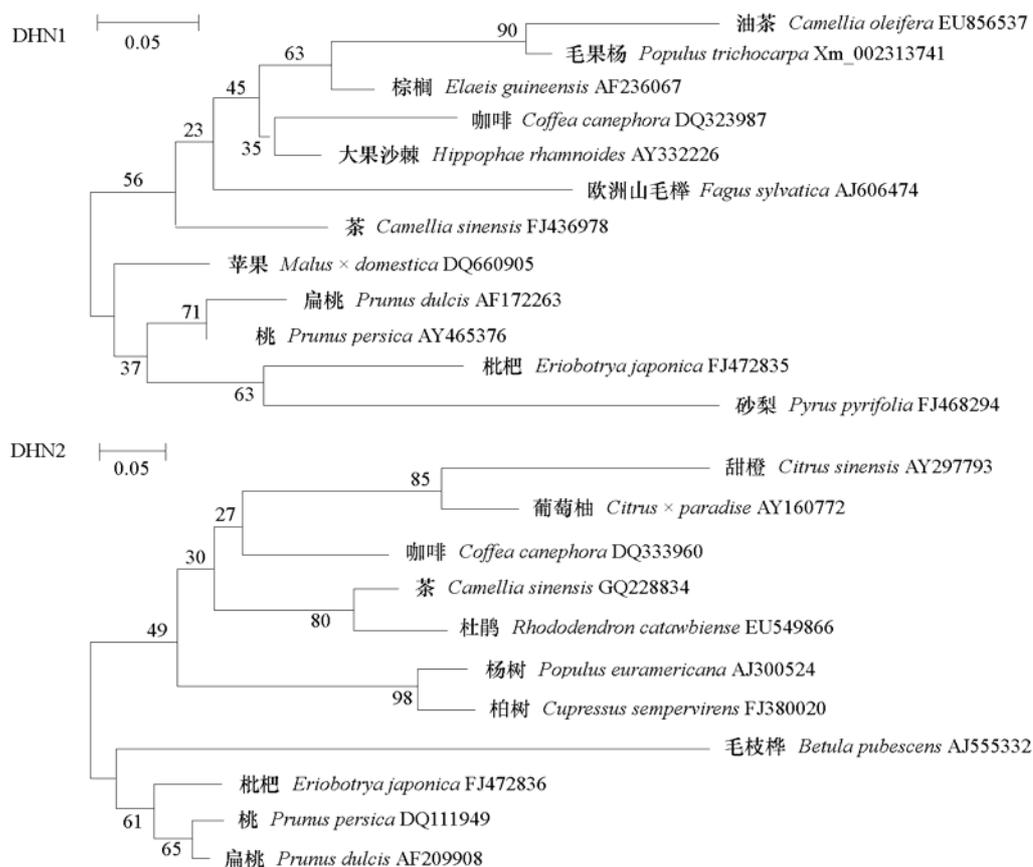


图 4 枇杷 DHN 氨基酸序列与不同来源木本植物脱水素氨基酸序列的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of dehydrin from various woody species including DHN of *Eriobotrya japonica*

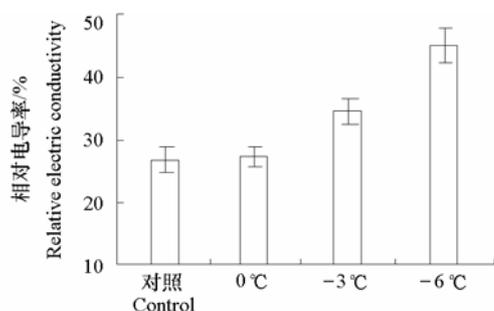


图 5 低温处理对枇杷幼果相对电导率的影响

Fig. 5 Effects of cold stress on relative electric conductivity of loquat young fruit

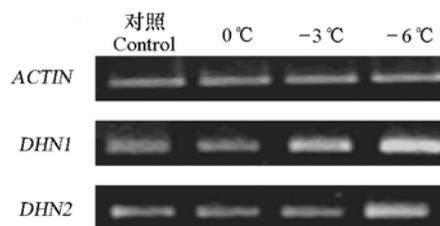


图 6 枇杷幼果 DHN 基因在低温胁迫下表达的半定量 RT-PCR 分析

Fig. 6 Semiquantitative RT-PCR analysis of DHN expression in loquat young fruit under cold stress

用 DHN1 和 DHN2 抗体分别进行 Western-blotting 分析, 结果显示, 在 20 kD (DHN1) 和 30 kD (DHN2) 附近分别出现特异条带, 与 DHN1 (19.9 kD) 和 DHN2 (31.6 kD) 蛋白的推测相对分子量相符。通过 Western-blotting 分析两个脱水素基因在蛋白水平上与枇杷幼果低温胁迫之间的关系, 所得的结果与半定量 PCR 结果基本一致 (图 7), 0 °C 处理后 DHN1 和 DHN2 两条脱水素蛋白含量均没有明显变化, -3 °C 处理后两条脱水素蛋白含量都比对照有所增加, 且 -6 °C 处理后脱水素蛋白积累量显著高于 -3 °C 处理。这表明 DHN 基因的表达与低温胁迫之间可能存在较为紧密的关系。

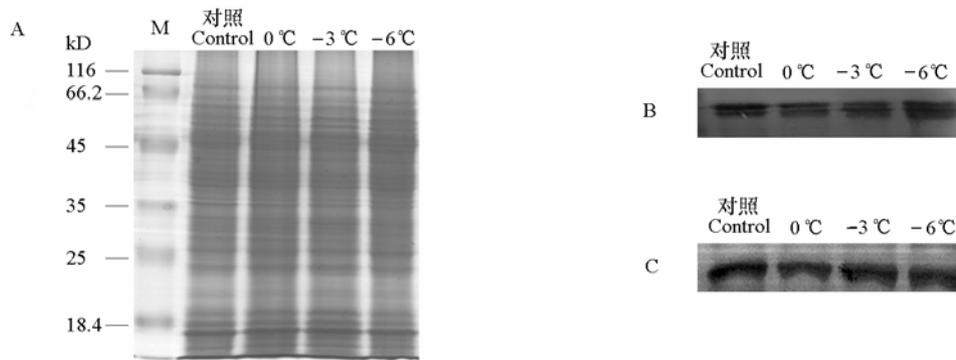


图 7 低温处理后枇杷幼果内脱水素蛋白 (DHN) 的 Western-blotting 检测

A: 果实总蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱; B: DHN1 的 Western-blotting 检测; C: DHN2 的 Western-blotting 检测。M: Marker。

Fig. 7 Western-blotting analysis of DHN in loquat young fruit under cold stress

A: The proteins bands of SDS-PAGE; B: Western-blotting analysis of DHN1; C: Western-blotting analysis of DHN2. M: Marker.

3 讨论

脱水素在 C 端含有高度保守、富含赖氨酸的 K 片段 (K segment), 其共有序列为 (E)EKKGIMDK IKEKLP, 其中也可能存在某些单核苷酸的置换或结构上的修饰, 目前所有分子中至少含有一个 K 片段的蛋白都被认为是脱水素。从本试验中所获得的两条 *DHN* 基因的序列上看 (图 1), 这两条 *DHN* 基因具备典型的脱水素基因的特性, 每条脱水素基因编码的氨基酸序列中都包含 3 个 K 片段, 但各个 K 片段的氨基酸与理论上的 K 片段共有序列存在 1~4 个氨基酸的差异, 这可能是不同物种进化的结果。据推测脱水素 K 片段可形成双亲水的 α -螺旋, 这是其亲水性的重要结构基础 (Baker et al., 1988; Ismail et al., 1999)。由于脱水素具有高度的水合能力, 它与膜脂结合能够阻止细胞内水分的过多流失, 维持膜结构的水合保护体系, 防止膜脂双分子层间距的减小, 进而阻止膜融合以及生物膜结构的破坏 (Danyluk et al., 1998; Allagulova et al., 2003)。脱水素还能对蛋白质起到保护, K 片段形成的双亲性 α -螺旋能使脱水素与部分变性蛋白质的疏水位点相结合, 起到了类似于分子伴侣的作用, 阻止蛋白质进一步变性 (Close, 1996)。从二级结构预测图上可以看出, α -螺旋是 *DHN1* 和 *DHN2* 蛋白的主要结构, 这也决定了它们高度的亲水性; 它们高比例的柔韧性区域、亲水性和主要分布区域 (细胞膜表面), 决定了其主要功能即保护细胞生物膜的结构和功能。

结合半定量 RT-PCR 和 Western-blotting 数据可以看出, 这两条脱水素基因在枇杷幼果中在低温胁迫条件下都上调表达, 随着低温胁迫的增强, 脱水素蛋白积累水平也增强, 这与一些果树上的研究结果相似。Muthalif 和 Rowland (1994) 以及 Panta 等 (2001) 研究发现, 蓝莓的花芽、叶片、茎干和根部的脱水素基因都能被低温胁迫所诱导。在不同的蓝莓品种中还发现, 脱水素蛋白的积累水平与其对冷害的耐力水平显著相关 (Muthalif & Rowland, 1994; Arora et al., 1997; Dhanaraj et al., 2005)。Cai 等 (1995) 从柑橘中分离出两条编码脱水素蛋白的 cDNA 片段, 发现它们只在低温诱导下表达。Hara 等 (1999) 从柑橘中克隆得到 *CuCOR19* 基因, 在离体叶片中该基因相应 mRNA 水平只在低温胁迫条件下显著增加。另外, Garcia-Banuelos 等 (2009) 发现苹果中的 *mdhn* 基因在冬季的树皮和休眠花芽中表达量很高, 但到了早春冻害解除花芽开始生长时就不再表达。在上述这些研究中脱水素被认为对植物抵抗低温胁迫有着重要作用。在本研究中两条脱水素基因的表达增强与枇杷幼果抵抗低温胁迫有一定的关系, 但其抗低温胁迫的机制仍需进一步深入研究。另外, 两条脱水素基因属于两种不同类型的脱水素, 其结构和理化性质有着显著差异, 并且 *DHN1* 对低温的敏感性高于 *DHN2*, 这两条基因在低温胁迫中的作用差异也待进一步研究阐明。

References

- Allagulova C R, Gimalov F R, Shakirova F M, Vakhitov V A. 2003. The plant dehydrins: Structure and putative functions. *Biochemistry*, 68: 945 - 951.
- Arora R, Rowland L J, Panta G R. 1997. Chill-responsive dehydrins in blueberry: Are they associated with cold hardiness or dormancy transitions? *Physiol Plant*, 101: 8 - 16.
- Artlip T S, Callahan A M, Basset C L, Wisniewski M E. 1997. Seasonal expression of a dehydrin gene in sibling deciduous and evergreen genotypes of peach (*Prunus persica* L. Batsch) . *Plant Mol Biol*, 33: 61 - 70.
- Baker J, Steele C, Dure L III. 1988. Sequence and characterization of 6 LEA proteins and their genes from cotton. *Plant Mol Biol*, 11: 277 - 291.
- Cai Q, Moore G A, Guy C L. 1995. An unusual group 2 LEA gene family in citrus responsive to low temperature. *Plant Mol Biol*, 29: 11 - 23.
- Claudia A B, Hernán G R, María C A, Pedro M C, Gustavo A M. 2006. β -Xylosidase in strawberry fruit: Isolation of a full-length gene and analysis of its expression and enzymatic activity in cultivars with contrasting firmness. *Plant Sci*, 171: 497 - 504.
- Close T J. 1996. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol Plant*, 97: 795 - 803.
- Close T J. 1997. Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant*, 100: 291 - 296.
- Danyluk J, Perron A, Houde M, Limin A, Fowler B, Benhamou N, Sarhan F. 1998. Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell*, 10: 623 - 638.
- Dhanaraj A L, Slovin J P, Rowland L J. 2005. Isolation of a cDNA clone and characterization of expression of the highly abundant, cold acclimation-associated 14 kDa dehydrin of blueberry. *Plant Sci*, 168: 949 - 957.
- Garcia-Bañuelos M L, Gardea A A, Winzerling J J, Vazquez-Moreno L. 2009. Characterization of a midwinter-expressed dehydrin (DHN) gene from apple trees (*Malus domestica*) . *Plant Mol Biol Rep*, 27: 476 - 487.
- Hara M, Terashima S, Fukaya T, Kuboi T. 2003. Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta*, 217: 290 - 298.
- Hara M, Terashima S, Kuboi T. 2001. Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu*. *J Plant Physiol*, 158: 1333 - 1339.
- Hara M, Wakasugi Y, Ikoma Y, Yano M, Ogawa K, Kuboi T. 1999. cDNA sequence and expression of a cold-responsive gene in *Citrus unshiu*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 63: 433 - 437.
- Ismail A, Hall A E, Close T J. 1999. Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea. *Plant Physiol*, 120: 237 - 244.
- Levi A, Panta G R, Parmentier C M, Muthalif M M, Arora R, Shanker S, Rowland L J. 1999. Complementary DNA cloning sequencing and expression of an unusual dehydrin from blueberry floral buds. *Physiol Plant*, 107: 98 - 109.
- Muthalif M M, Rowland L J. 1994. Identification of dehydrin-like proteins responsive to chilling in floral buds of blueberry (*Vaccinium*, section *Cyanococcus*) . *Plant Physiol*, 104: 1439 - 1447.
- Panta G R, Rieger M W, Rowland L J. 2001. Effect of cold and drought stress on blueberry dehydrin accumulation. *J Hort Sci Biotech*, 76: 549 - 556.
- Porat R, Pasentsis K, Rozentzvieg D, Gerasopoulos D, Falara V, Samach A, Lurie S, Kanellis A K. 2004. Isolation of a dehydrin cDNA from orange and grapefruit citrus fruit that is specifically induced by the combination of heat followed by chilling temperatures. *Physiol Plant*, 120: 256 - 264.
- Porat R, Pavoncello D, Lurie S, McCollum T G. 2002. Identification of a grapefruit cDNA belonging to a unique class of citrus dehydrins and characterization of its expression patterns under temperature stress conditions. *Physiol Plant*, 115: 598 - 603.
- Wisniewski M, Bassett C L, Renaut J, Farrell R, Tworkoski T, Artlip T S. 2006. Differential regulation of two dehydrin genes from peach (*Prunus persica*) by photoperiod, low temperature and water deficit. *Tree Physiol*, 26: 575 - 584.
- Wisniewski M, Webb R, Balsamo R, Close T J, Yu X M, Griffith M. 1999. Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: A dehydrin from peach (*Prunus persica*) . *Physiol Plant*, 105: 600 - 608.
- Xu Hong-xia, Chen Jun-wei, Xie Ming. 2009. The role of dehydrin in plant response to cold stress. *Acta Bot Boreal Occident Sin*, 29 (1): 199 - 206. (in Chinese)
- 徐红霞, 陈俊伟, 谢 鸣. 2009. 脱水素在植物低温胁迫响应中的作用. *西北植物学报*, 29 (1): 199 - 206.
- Yamane H, Kashiwa Y, Kakehi E, Yonemori K, Mori H, Hayashi K, Iwamoto K, Tao R, Kataoka I. 2006. Differential expression of dehydrin in flower buds of two Japanese apricot cultivars requiring different chilling requirements for bud break. *Tree Physiol*, 26: 1559 - 1563.
- Zhang Zhao-qi, Hong Han-jun, Li Xue-ping, Ji Zuo-liang. 1997. Effects of intermittent warming on chilling injury and physiological and biochemical responses of mango fruits. *Acta Horticulturae Sinica*, 24 (4): 329 - 332. (in Chinese)
- 张昭其, 洪汉君, 李雪萍, 季作梁. 1997. 间歇升温对芒果冷害及生理生化反应的影响. *园艺学报*, 24 (4): 329 - 332.