

小麦耐逆基因-*TaLEA3* 的克隆及在酵母中的功能分析

俞嘉宁^{1,2} 张林生¹ 张劲松² 山 仑^{1*} 陈受宜^{2*}

¹(西北农林科技大学生命科学院,陕西杨陵 712100)

²(中国科学院遗传与发育研究所植物生物技术重点实验室,北京 100101)

摘 要 LEA 蛋白(late-embryogenesis-abundant protein),是指胚胎发生后种子中大量积累的一类蛋白质,它广泛存在于高等植物中,且受发育阶段、脱落酸(ABA)和脱水信号的调节,其中第 3 组 LEA 蛋白与作物耐逆性密切相关。通过 RT-PCR 从小麦中克隆了一个新的第 3 组 LEA 蛋白基因, *TaLEA3*。该蛋白主要定位于细胞质。*TaLEA3* 的表达受高盐、低温和外源激素 ABA 的诱导,根中表达量一般高于叶中,且在不同胁迫下该基因表达模式存在差异。在所检测的一对同核异质小麦品种中,该基因的表达与耐旱性呈正相关。*TaLEA3* 在酵母中过量表达,改善了酵母在离子和渗透胁迫下的生长状态或提高了存活率。

关键词 LEA 蛋白, 耐逆性, 小麦, 酵母

中图分类号 Q945.8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0832-07

干旱胁迫是严重影响植物生长发育的主要环境因素,常常造成作物产量下降甚至引起植物死亡。在长期的进化中,植物逐步形成一定的耐旱机制来抵御环境胁迫,以减轻干旱对植物的损伤,植物这种耐旱机制是与胁迫下植物体内的一系列调控分子的变化密切相关。近年来,一些与逆境胁迫相关的调控分子,如:CBF/DREB 已被发现^[1],一些效应分子,如:脯氨酸合成酶,甜菜碱合成酶, RDs/CORs (responsive to dehydration/ cold responsive) 已被克隆^[2, 3, 4], 其中 LEA (late-embryogenesis-abundant protein) 蛋白属于一类重要的效应分子。

正常情况下,LEA 蛋白产生于种子成熟后期干燥脱水时,主要功能是保护种子中的酶类、细胞膜、线粒体等细胞器免受脱水损伤,后发现该蛋白在营养组织中受到干旱胁迫时也可大量表达。该类蛋白依其结构特征至少可分为 6 个组,每组在耐逆应答中的作用不同。其中第 3 组 lea 蛋白通常含有多拷贝的 11 个氨基酸组成的基序(TAQAAKEKAGE),可形成兼性 α -螺旋结构,螺旋的疏水面可形成同型二聚体,亲水面的带电基团可在细胞脱水过程中起到束缚离子的作用^[5]。研究表明这些基因的表达或蛋白累积与植物的渗透胁迫抗性呈正相关。如,在严

重干旱的小麦幼苗中,第 3 组 LEA 蛋白累积量的大小与组织的耐旱性相关^[6]。对大麦的第 3 组 LEA 蛋白 HVA1 的研究表明其编码基因可被干旱等环境胁迫和 ABA 诱导表达。将 HVA1 的 cDNA 导入水稻,燕麦和小麦获得了耐旱、耐盐的转基因水稻^[7]、燕麦^[8]、以及生物量,水分利用效率均增加的转基因小麦^[9],上述结果表明第 3 组 *Lea* 基因可能具有干旱保护功能。此外一些研究发现,LEA 蛋白在植物耐寒、耐盐性方面也发挥重要作用。*Lea* 基因与耐渗透胁迫的密切联系已引起人们普遍关注。但 *LEA* 基因在小麦中的研究尚少,与小麦抗旱性关系的系统研究还未见报道。本文以耐旱小麦为材料,克隆了一个新的第 3 组 *lea* 基因,并对该基因与小麦耐旱性的关系做了分析,对其它非生物胁迫的应答及亚细胞定位做了研究,并利用酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 模式系统对其功能进行了验证。

1 材料和方法

1.1 植物材料及处理

用做实验材料的 3 个小麦品种,由西北农林科技大学生命科学院提供,其中陕合 6 号(SH6),同核异质高抗 86211(HD),为抗旱品种;同核异质低抗 7532(LD)为不抗旱品种。

收稿日期:2004-04-16, 修回日期:2004-08-13。

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(No. G1999011708)和(No. G1999011703)。

* 通讯作者。 Tel: 86-29-7018325; Fax: 86-29-7012210; E-mail: shanlun@public.xa.sn.cn。

Tel: 86-10-64886859; Fax: 86-10-64873428; E-mail: sychen@genetics.ac.cn

上述3个小麦品种经消毒处理后在22℃,暗中萌发1d,选露白一致的种子置于纱布上水培,22℃,每日2500Lx光照16h。

陕合6号(SH6)生长到第5天时,停止浇水,自然干燥处理48h采样,提取总RNA,进行RT-PCR扩增第3组 *Lea* 基因。

同核异质高抗86211(HD),同核异质低抗7532(LD)生长到7d苗龄,用26.2%PEG6000处理,0h,1.5h,3h,6h,12h,18h,24h,36h,48h根苗分开取样,提取RNA进行Northern杂交分析。

同核异质高抗86211(HD)7d苗龄,用100μmol/LABA,250mmol/LNaCl根部胁迫处理,同时一部分苗进行4℃低温处理,0h,1.5h,3h,6h,12h,18h,24h,48h取根苗,液态氮速冻后存-70℃,以备RNA提取。

1.2 小麦总RNA提取

参考Zhang等的方法^[10]。

1.3 RT-PCR克隆第3组 *lea* 基因

根据第3组 *Lea* 基因的同源区(经<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>中Blastn比较)设计一对引物:

5'引物 ATGGCCTCCAACCAGAACCAG

3'引物 CGAGGAGTACATCAAATCGAAG

反应体系:2μL cDNA;1μL 10μmol/L 5'引物;1μL 10μmol/L 3'引物;2.5μL 10×PCR buffer;0.5μL 10mmol/LdNTPs;0.5μL Pfu polymerase (5u/μL),加水补至25μL。

PCR反应:94℃ 2min;94℃ 20s,57℃ 30s,72℃ 1min(30循环);72℃ 10min。

PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳,玻璃奶回收相应条带,连接到pGEM®-Teasy克隆载体上,测序验证阳性克隆。

1.4 Northern杂交

约30μg总RNA经1.2%琼脂糖变性胶电泳后转到Hybond-N'尼龙膜用于Northern杂交分析。全长*TaLEA3* cDNA用α-³²P-dCTP标记后做探针进行杂交。杂交膜第1次在含2×SSC,0.1%SDS洗膜液中45℃,漂洗15min;然后转入1×SSC,0.1%SDS的洗膜液45℃漂洗5min。杂交膜上残液用滤纸吸干后,用保鲜膜包裹。将膜置于磷屏中进行放射自显影(Amersham Pharmacia)。

1.5 *TaLEA3* 蛋白的细胞定位

1.5.1 *TaLEA3*-GFP融合表达载体的构建:将35S启动子与GFP基因连到pUC18载体中,形成了GFP报告基因载体,该载体在35S启动下能够启动报告

基因GFP(绿色荧光蛋白)的表达,作为对照。以Teasy-*TaLEA3*质粒为模板,PCR扩增得到具有BamHI和SalI酶切位点的*TaLEA3*开放读码框。回收PCR产物,BamHI和SalI双酶切,将其定向连入经BamHI和SalI双酶切的GFP报告基因载体,形成了融合表达构件*TaLEA3-GFP*。

1.5.2 PDS-1000高压氮气基因枪法将 *TaLEA3-GFP* 构件导入洋葱表皮细胞:具体操作过程按PDS-1000高压氮气基因枪法进行。转化后细胞在培养基(1×MS,180mgKH₂PO₄,2.5mg/L链霉素,5%~6%Agar)上28℃培养2d,置于共聚焦显微镜下观察(Olympus FV500)。

1.6 酵母菌株、质粒及酵母表达载体构建

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)W303(ura3-1,can-1-100,leu2-3,112trp1-1,his3-11,15)用作宿主菌,带GAL1启动子的适于酵母中高效表达的质粒pYES2被用来表达*TaLEA3*。构建过程及转化酵母参考Ginger^[11]。

野生酵母W303的培养,继代用YPD培养基(1%酵母浸提液,2%蛋白胨,2%葡萄糖,pH5.8)。

转化了pYES2-*TaLEA3*及空载pYES2的W303的培养,继代用SD-ura培养基(Difco,尿嘧啶缺陷型培养基)。

各种胁迫处理时的培养基用YPGAL(1%酵母浸提液,2%蛋白胨,2%半乳糖,pH5.8)加相应的胁迫剂。

1.7 酵母RNA提取及Northern杂交分析

W303-pYES2-*TaLEA3*在SD-ura培养基中培养直到OD₆₀₀达到0.7,然后部分培养物转到YPD或YPGAL培养基中培养。24h后,OD₆₀₀达到2.0,8000r/min离心5min,用热酚法提取RNA,参考Schmitt^[12]。Northern杂交分析同1.4中所述,所用探针为³²P-标记的全长*TaLEA3*。

1.8 NaCl、KCl、山梨醇处理及酵母生长量测定

W303-pYES2、W303-pYES2-*TaLEA3*在SD-ura培养基中培养生长1d,OD₆₀₀达到0.2,20μL培养物接种到2mLYPGAL+NaCl(0~1.4mol/L)系列浓度,YPGAL+KCl(0~1.4mol/L)系列浓度,YPGAL+山梨醇(0~2.2mol/L)系列浓度培养基中,30℃,250r/min,培养48h后测定600nm吸光值。每项实验都设3个重复。参考Nass^[13]。

1.9 酵母冰冻耐受性实验

转化了各种质粒的酵母在SD-ura培养基上生

长到 OD_{600} 达到 0.6 ~ 0.7, 1mL 培养物 8000r/min, 4min 收集菌体, 然后重悬于 1mL 灭菌的超纯水中。每 100 μ L 为 1 份, 涂于 YPGAL 培养基上 (同时设 3 个重复), 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 2d, 统计形成的克隆数。另 100 μ L 冻于 -20 $^{\circ}$ C, 72h 后, 取出 30 $^{\circ}$ C 温育 5 ~ 10min, 涂于 YPGAL 培养基上, 30 $^{\circ}$ C 倒培养, 2d 后统计克隆数。参考 Imai^[14]。

2 结果

2.1 *TaLEA3* 基因的克隆、序列分析和鉴定

小麦耐旱品种陕合 6 号, 萌发 5d 后, 经自然干旱处理 2d, 提取 RNA, 经逆转录合成 cDNA。以小麦第 3 组 LEA 基因的保守序列设计一对引物 (见材料和方法), 经 RT-PCR 方法, 从 cDNA 中扩增出一条 800bp 的带, 将其回收后克隆到 pGEM⁺-Teasy 载体上, 进行序列测定, 经与 GenBank 数据库中同源 Lea 基因比较后确定为新基因, 命名为 *TaLEA3* (注册号: AY148492)。

TaLEA3 基因全长 776bp, 含有一个 636bp 的 ORF 和 140bp 3'-UTR, 编码一个由 212 氨基酸组成的亲水性蛋白质, 分子量 21.8kD, PI = 8.86, 具有 9 个重复的由 11 个氨基酸组成的基序 (图 1A), 预测的二级结构有 50% 以上的 α -螺旋及 2 个 PFAM LeA 结构 (图 1B)。同小麦、大麦中来源的其它第 3 组 LEA 蛋白 (pMA2005, HVA1) 相比, 分别有 78.2%, 73.5% 的同源性。

2.2 *TaLEA3* 在不同抗性的小麦品种中表达模式分析

为了分析 *TaLEA3* 与小麦抗旱性的关系, 我们用一对同核异质的高抗, 抵抗小麦品种为材料分析了 *TaLEA3* 在干旱胁迫下的表达模式。萌发 7 天的幼苗经 26.6% PEG6000 胁迫处理, 在不同胁迫时间点根苗分开取样, 提取 RNA, 以 *TaLEA3* 为探针进行

Northern 杂交分析。结果如图 2, 在正常培养条件下 (0h), 2 个小麦品种均检测不到 *TaLEA3* 的表达, 干旱胁迫处理可诱导该基因表达, 表达趋势在 2 种小麦的根和叶中基本一致, 一般在根、叶中 6h 可达到最大值。在各胁迫时间点, *TaLEA3* 的表达量在根中明显高于叶中; 在抗旱品种中 *TaLEA3* 在根、叶中表达量均高于不抗旱品种, 说明 *TaLEA3* 基因受水分胁迫诱导表达, 根对水分胁迫的响应更明显, 而且 *TaLEA3* 基因的表达量与作物的抗旱性呈正相关。

```

A ATGCGCTCCACAGAACCGCCAGCTACCCAGCCGCGGAGACCAAGGCGCGCACCGAGGAGAAAGACCG666CA8
  M A S N Q N Q A S Y H A G E T K A R T E E K T G Q
  GTGATGGGCGGACCAAGGACCAAGGCGCGGCGGAGCCAGCCAGCGAGGCGCAACGCA GAAGGCGCGGACAGAC CACCG8A8
  V M G A T E D K A G Q T T E A T K Q K A G Q T T E
  GCACCGAGCAGAGGCGCGGCGGAGCGGCGGAGCCAGCAAGCCAGAGGCGCGG TCGAGCGCCAGGAG G C C A C G8A8
  A T K Q K A G E T A E A T K Q K A G Q A T E A T K
  CAGAGCGCGGAGAGCGCGGAGGCGCCAGCAGCAGAGGCGCGGAGGCGCA GGACCGAGCTCC G C A G C G8C8
  Q K A G E T A E A T K Q K A A R A K D K T A Q T A
  CAGGCGCGCAGAGGCGCGGCGCGGAGGAGCCAGGAGCCAGCGGCGGCGGCTACTCT CCGGAGAGAGAC A G A G A T G8C8
  Q A A K E R A A E T K D Q T G S Y L G E K T E M A
  AAGCAGAGCGCGGCGGAGCAGCCAGCGGCTGCGCAGCAGAGGCGCGTGGAGAC GCGCGAGTACG C A A G G A T G8C8
  K Q K A A E T T E A A K Q K A S E T A Q Y T K E S
  GTGCGCGCAGGAGCAGAGCGCGGAGGCGGCTCCAGCAGGCGCGGAGAGCGGT GGTGACCGCGT G G A T G G C8C8
  V A G K D E T G S V L Q Q A G E T V V M A V D G A
  AAGGAGCGCGTGGCCAGCAGCGCTGGGCGATGGCGCGGAGAGCCAGCCAGGAGCA CAGCTCCAGCGCG C C C A C C8C8
  K D A V A N T L G W G P D N A T K D T S T G A T T
  AAGGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGGAACTACTAGAGCGCATGCTGCTGCGCTT GATTGCTTCTCTT A G T T A8T8
  K D T T T T T T R W H *
  TTTGTGTGTGGCGGCTTGGACAGATTTGTATGTTTCCACTCTTTGCGGATTTTCAGCTCATTAGTGT77AA8T
  TTGCTTTCGATTTGATGTACTCTCTCG
  
```

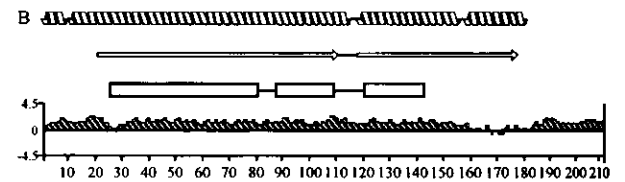


图 1 *TaLEA3* 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列
 Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *TaLEA3*.
 The motif of 11-amino acid is marked by thin line
 A: nucleotide and deduced amino acid sequence of *TaLEA3*, AY148492;
 B: The Characteristics of *TaLEA3* Protein. α -helix (Gamier-Robson analysis); PFMA LEA domain (SMART analysis); the repeat 11-amino acid motif and hydrophilic of proteins are displayed from up to down.

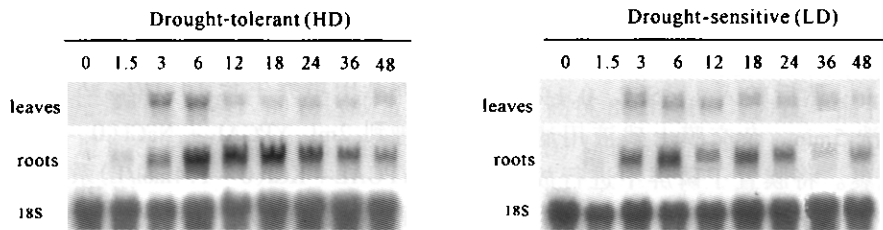


图 2 26.6% PEG6000 处理不同抗旱品种小麦幼苗 Northern blotting 分析

Fig. 2 Expression of group 3 LEA mRNAs in 7-days-seedlings of different wheat lines treated with 26.6% PEG6000 from 0 ~ 48h Hybridized with 32p-labeled probes of *TaLEA3*. 18S ribosomal RNA as a reference of the amount of RNA loaded.

2.3 ABA、NaCl、冷处理对 *TaLEA3* 基因表达模式的影响

以7d的HD为材料,我们分析了ABA、NaCl、4℃冷胁迫对*TaLEA3*基因表达模式的影响。以*TaLEA3*为探针,从图3A中可看出,20mmol/L ABA诱导*TaLEA3*的表达主要在根中,6h可达到最大,并且可维持到48h,叶中几乎检测不到*TaLEA3*的表达。250mmol/L NaCl处理1.5h,根中*TaLEA3*就可

被诱导表达,3h达到较高表达量,并可维持到24h,叶中在NaCl处理1.5h时可检测出微量表达,此后表达量缓慢增加,至48h达到最大值(图3B)。4℃冷处理也可诱导*TaLEA3*的表达,但在根、叶中处理6h才可检测到*TaLEA3*杂交信号,48h达到最大值,叶中*TaLEA3*在各时间点的表达量均低于根中(图3C)。上述结果说明*TaLEA3*基因对各种非生物胁迫均有响应。

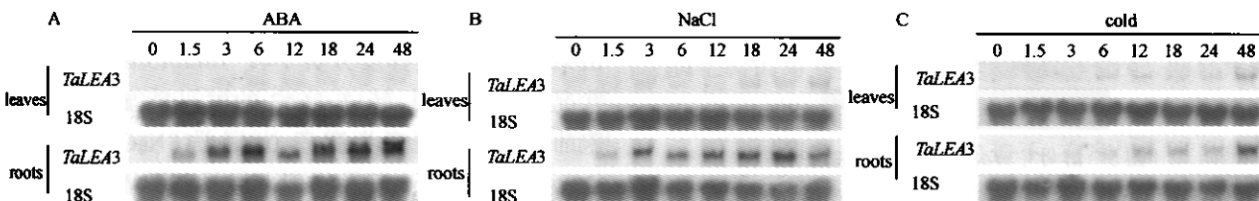


图3 NaCl, ABA, 冷(4℃)对小麦幼苗中 *TaLEA3* 基因表达的影响

Fig. 3 Northern analysis time course of *TaLEA3* mRNA induced by ABA, NaCl, Cold in leaves and roots of 7-day-old HD wheat seedlings

18S ribosomal RNA used as a reference of the amount of RAN loaded. A:20μmol/L ABA treatment from 0 to 48h; B:250 mmol/L NaCl treatment from 0 to 48h; C:4℃ cold treatment from 0 to 48h

2.4 *TaLEA3* 蛋白的亚细胞定位

根据推测的氨基酸序列分析,*TaLEA3*基因具有显著的亲水性,相关资料也推测LEA蛋白可能存在于细胞质中。为了验证*TaLEA3*蛋白在细胞中的定位,将*TaLEA3*插入35S启动子和GFP(绿色荧光蛋白基因)之间形成*TaLEA3*-GFP融合基因,以GFP表

达载体为对照,将上述两种载体经基因枪法分别转入洋葱表皮细胞。经2天培养后,在共聚焦显微镜下观察。图4B显示*TaLEA3*-GFP融合蛋白定位于细胞质和细胞膜上,而对照GFP蛋白分布在整个细胞内(图4A)。证实了*TaLEA3*确实定位于细胞质,同时细胞膜上也吸附或结合有该蛋白。

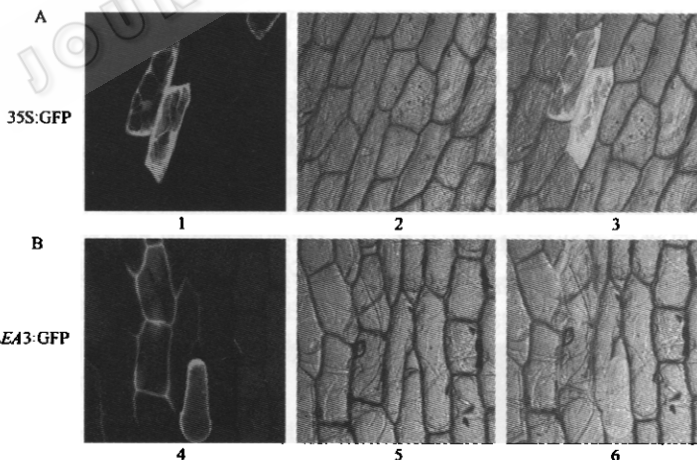


图4 *TaLEA3* 在洋葱表皮细胞中定位

Fig.4 localization of *TaLea3* protein in onion epidermis

TaLea3-GFP fusion and the GFP protein were expressed transiently under the control of CaMV 35s promoter in onion epidermis cells and observed under confocal microscope. The GFP stained cells were photographed in the dark field (part 1, 4). The outlook of the cell (2,5) and the combined photograph (3, 6) were photographed under the light field.

A: Expression of GFP control protein B: Expression of *TaLea3*-GFP fusion protein

2.5 酵母细胞中 *TaLEA3* 表达载体构建及 Northern 验证

为了进一步研究 *TaLEA3* 在细胞内的功能,我

们构建了酵母 pYES2-*TaLEA3* 表达载体。pYES₂ 是一种高拷贝的适合酵母中同源基因表达的载体,含有半乳糖诱导型启动子(GAL1)及酵母 CYC1 终止

子。TaLEA3经双酶切后,插入pYES2的GAL1与CYC1间(图5A)。

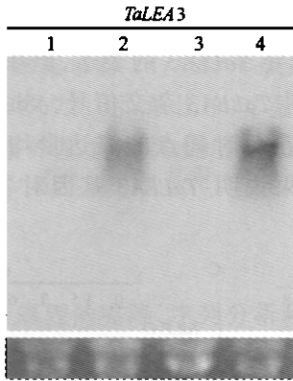


图5 酵母中TaLEA3基因表达分析

Fig.5 Analysis of TaLEA3 expression in *S. cerevisiae*

1:pYES2X in YPD; 3:pYES2X in YPGAL;
2,4:pYES2-TaLEA3 in YPD and YPGAL

Northern杂交表明TaLEA3在酵母中可被诱导表达。含半乳糖的YPGal培养基诱导TaLEA3蛋白的表达量比不含半乳糖的YPD培养基诱导表达量高,而野生转空载pYES2的酵母则在两种培养基中均检测不到杂交信号(图5B),表明构建的pYES2-TaLEA3表达载体可在酵母中很好表达TaLEA3蛋白,且不会有酵母自身的LEA类似蛋白的干扰。

2.6 转TaLEA3基因的酵母耐逆性分析

以转空载pYES2的酵母为对照,用NaCl、KCl、山梨醇系列浓度梯度分析了转TaLEA3酵母的生长状况。结果表明,转TaLEA3的酵母能显著改进细胞的耐逆性,表现为高于0.8mol/L NaCl,0.8mol/L KCl,1.4mol/L山梨醇胁迫时,转TaLEA3酵母生长量的下降程度明显滞后于对照(转空载pYES2)(图6A、B、C)。

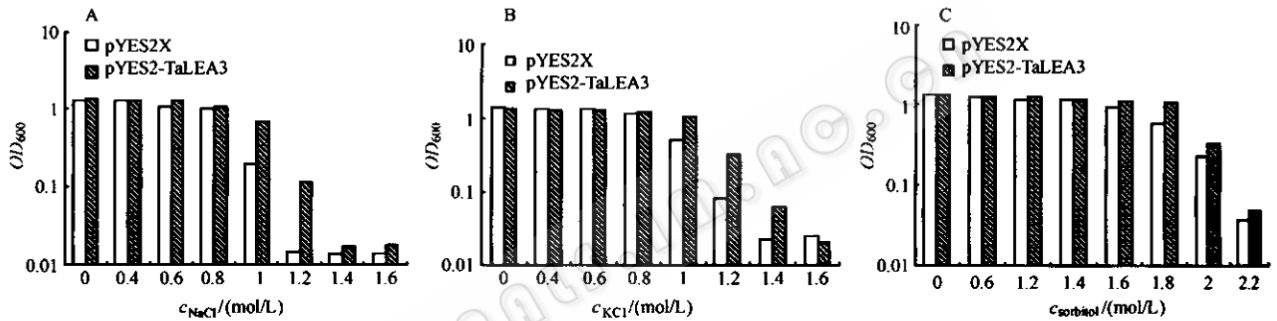


图6 过表达TaLEA3酵母在离子胁迫及渗透胁迫下生长状况分析

Fig. 6 Growth of *S. cerevisiae* cells expressing TaLEA3 and the control cell in the medium of various osmotic potentials

A: NaCl gradient from 0 to 1.4mol/L; B: KCl gradient from 0 to 1.4mol/L; C: Sorbitol gradient from 0 to 2.0mol/L

2.7 转TaLEA3的酵母冰冻耐受性分析

冰冻胁迫能使细胞含水量下降并死亡。许多资料表明低温胁迫可诱导LEA蛋白的累积^[15],因此我们对转TaLEA3基因的酵母进行了冰冻耐受性分析。将生长一致的对照(转空载pYES2)和转TaLEA3的酵

母在-20℃处理72h后,涂板,统计克隆数,以处理前的克隆数(100%)做参照,计算存活率。结果如图7A、B,对照细胞的存活率为0%±0.1%,转TaLEA3的酵母细胞存活率72.4%±7.2%,表明TaLEA3可提高酵母细胞在低温下的存活率。

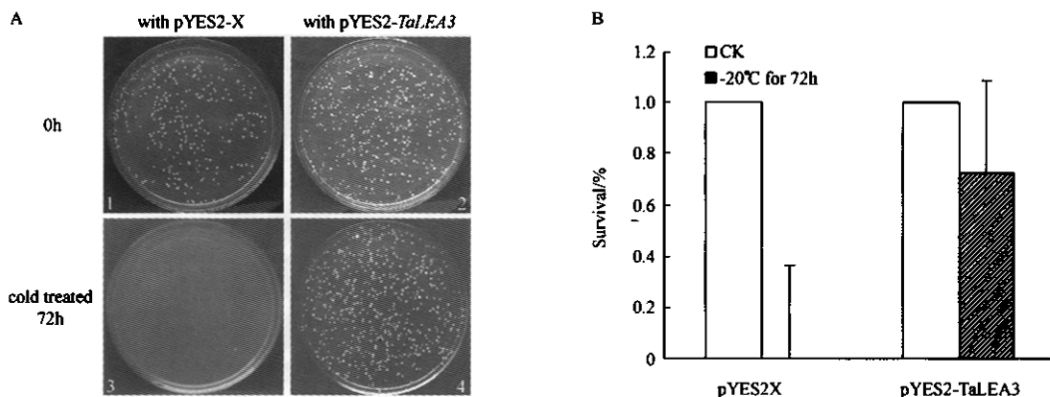


图7 过量表达TaLEA3酵母冰冻耐受性分析

Fig. 7 Freezing tolerance of *S. cerevisiae* overexpressing TaLEA3. The pictures shown yeast colonies cold treated 72h

1,3 were colonies of yeast cells with pYES2X. 2,4 were colonies of yeast cells with pYES2-TaLEA3

3 讨论

在干旱胁迫下,植物体内会发生许多生理、生化反应,包括一些基因的诱导、表达。其中 *lea* 基因是种子成熟后期干燥脱水时大量表达的一类基因,也是一个典型的受缺水胁迫诱导表达的基因,其产物 LEA 蛋白具有极强的亲水性,推测在缺水胁迫下具有保护细胞免受脱水伤害的功能^[16]。我们利用同源序列扩增从小麦中获得了一个新的第 3 组 *lea* 基因, *TaLEA3*。

TaLEA3 有 9 个重复的 11 个氨基酸组成的基序。用 *TaLEA3* 做探针,我们对渗透胁迫下不同耐旱性的一对同核异质小麦幼苗进行了 Northern 杂交分析。结果表明,在 26.2% PEG6000 胁迫处理 1.5h 就可诱导 *TaLEA3* 表达,6~12h 达到最高表达量,而且根中 *TaLEA3* mRNA 的表达量比叶中高。这与 Ried, 1993 的结论略有不同, Ried 采用自然干旱处理, 48h 根叶中第 3 组 *lea* 基因(PMA2005)表达量达到最高。其原因可能在于一方面所检测的基因不同(*TaLEA3* 与 PMA2005 的核苷酸同源性只有 71.1%);另一方面干旱处理的方式不同,我们采用的是 PEG 根部胁迫处理,可能使植物在短时间遭受较强的渗透胁迫,因此表现出 *TaLEA3* 基因的表达会在短时间内达到较高水平。另外实验中还发现耐旱品种中 *TaLEA3* 表达量高于不耐旱品种, *TaLEA3* 基因的表达与所测品种的耐旱性呈正相关,推测可能由于 LEA 蛋白具有对细胞脱水保护的作用,因此在干旱条件下,该蛋白在细胞中的积累可提高整株植物的抗旱性。从转基因实验也可得到证实,如转 HVA1 的水稻能有效提高作物的抗旱、抗盐性^[7], 转 HVA1 的小麦在干旱胁迫下可提高转基因植株水分利用效率,增加产量^[9],表明第 3 组 LEA 蛋白在水分亏缺时对细胞具有保护作用,可有效提高作物的抗旱性。

通过 Northern 杂交,我们分析了 *TaLEA3* 与其他非生物胁迫的关系,表明 ABA, NaCl, 冷处理均可诱导该基因表达,但表达模式不同。目前已发现植物中渗透胁迫应答基因的转录至少有 4 条独立的信号转导途径,其中两条是 ABA 依赖途径,两条是非 ABA 依赖途径^[17]。一些研究显示,在逆境胁迫下,激酶及转录因子在参与传递胁迫信号时,并不是独立进行,或平行或交错。同一个效应基因的转录起始前面可能含有多个不同的 DNA 结合区,能被多个转录因子调控,从而参与不同胁迫应答^[17]。推测

TaLEA3 在不同胁迫下可能通过不同的信号传递途径作用于不同的转录因子来调控该基因的表达。

酵母是一个简单的真核细胞,已被广泛用于研究同类外源基因的功能。通过在酵母中过表达 *TaLEA3* 基因,检测酵母在胁迫条件下的生长状况,有助于深入了解 *TaLEA3* 的功能。我们的结果表明, *TaLEA3* 能显著提高转基因酵母在盐胁迫下的生长状况。Dure 认为 11 个氨基酸重复的基序能形成亲水的 α -螺旋二聚体,而这种结构适合束缚带正、负电荷的离子^[16]。本实验支持这一结论,同样结果在 Zhang 的实验中得到了证实^[18]。

一些研究表明,干旱胁迫下,有些 LeA 蛋白能代替或结合水分子,可以有效保护细胞内的酶或稳定膜结构^[15];此外,组成该蛋白的大多数氨基酸残基为碱性、亲水性氨基酸、无半胱氨酸和色氨酸,这些高电荷的氨基酸残基可以重新定向细胞内水分子,束缚盐离子,从而避免干旱胁迫时细胞内高浓度离子的累积所引起的损伤,同时也可防止组织过度脱水^[16]。从我们的实验结果看 *TaLEA3* 能有效改善转基因酵母在山梨醇胁迫下的生长状况,提高转基因酵母在冰冻胁迫时的存活率,表明 *TaLEA3* 可能具有束缚水分子,防止细胞过度脱水的作用。亚细胞定位也发现 *TaLEA3* 蛋白除了分布在细胞质中,细胞膜上也显示出明显的荧光,可能与 LEA 蛋白能同一些膜蛋白结合或作用有关,对此有待进一步的深入研究。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y *et al.* Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1998, 10: 1391 - 1406
- [2] Li ZY(李子银), Chen SY(陈受宜). Differential accumulation of the S-adenosylmethionine decarboxylase transcript in rice seedlings in response to salt and drought stresses. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 782 - 788
- [3] Shen YG(沈义国), Yan DQ(阎冬青), Zhang WK(张万科) *et al.* Novel halophyte EREBP/AP2 type DNA binding proteins improves salt tolerance in Transgenic tobacco. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 2003, 45(1): 82 - 87
- [4] Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl Acad Sci*. 1997, 94: 1035 - 1040

- [5] Ingram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47: 377 - 403
- [6] Ried JL, Walker-Simmons MK. Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation-tolerant seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol*, 1993, 102: 125 - 131
- [7] Xu D, Duan X, Wang B *et al.* Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol*, 1996, 110: 249 - 257
- [8] Maqbool B, Zhong H, El-Maghraby Y *et al.* Competence of oat (*Avena sativa* L.) shoot apical meristems for integrative transformation, inherited expression, and osmotic tolerance of transgenic lines containing hva1. *Theor Appl Genet*, 2002, 105: 201 - 208
- [9] Sivamani E, Bahieldin A, Wraith JM *et al.* Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Science*, 2000, 155(1): 1 - 9
- [10] Zhang JS, Gu J, Liu FH *et al.* A gene encoding a truncated large subunit of Rubisco is transcribed and salt-inducible in rice. *Theor Appl Genet*, 1995, 91: 361 - 366
- [11] Ginger A, Swire-Clark, William R *et al.* The wheat LEA protein Em functions as osmoprotective molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Mol Biol*, 1999, 39: 117 - 128
- [12] Schmitt ME, Brown TA, Trumppower BL. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 3091 - 3092
- [13] Nass R, Cunningham KW, Rao R. Intracellular sequestration of sodium by a novel Na⁺/H⁺ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H⁺-ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance. *J Biol Chem*, 1997, 17: 26145 - 26152
- [14] Imai R, Chang L, Ohta A *et al.* A lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 1996, 170: 243 - 248
- [15] Honjoh KI, Matsumoto H, Shimizu H *et al.* Cryoprotective activities of group 3 late embryogenesis abundant proteins from *Chlorella vulgaris* C-27. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(8): 1656 - 1663
- [16] Yu JN(俞嘉宁), Shan L(山仑). The Relationship of LEA Protein to Drought Tolerance in Plants. *Journal of Chinese Biotechnology* (中国生物工程杂志), 2002, 22(2): 10 - 15
- [17] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, 3: 217 - 223
- [18] Zhang L, Ohta A, Takagi M *et al.* Expression of plant group 2 and group 3 lea genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed functional divergence among LEA proteins. *J Biochem*, 2000, 127: 611 - 616

Cloning of a Novel Stress-tolerant Gene-*TaLEA3* from Wheat and the Functional Analysis in Yeast

YU Jia-Ning^{1,2} ZHANG Lin-Sheng¹ ZHANG Jin-Song² SHAN Lun^{1*} CHEN Shou-Yi^{2*}

¹(The Department of Life Science, North-west Sci-tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shanxi 712100, China)

²(Plant Biotechnology Laboratory, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Expression of the genes encoding group 3 LEA proteins is thought to be relating with desiccation tolerance in young seedling. A novel gene in the group 3 *Lea* genes, named as *TaLEA3*, was cloned from wheat in the present study. *TaLEA3* was mainly located in cytoplasm as revealed by the green fluorescent protein (GFP) fused to it. The gene was induced by high salt, low temperature and exogenous ABA treatments. The mRNA level of *TaLEA3* was positively related to the drought tolerance of cultivars when its expression was compared in a pair of near isogenic lines of wheat. Substantially, the expression of *TaLEA3* was higher in roots than that in leaves and their expression patterns were different under different stresses. Overexpression of *TaLEA3* improved stress tolerance in transgenic yeast cells when cultured in medium containing sorbitol, or salt and under -20°C freezing treatment.

Key words LEA proteins, stress tolerance, wheat, yeast

Received: 04-16-2004

This work was supported by Grant from National Basic Research Project (No. G1999011708 and G1999011703).

* Corresponding author. Tel: 86-29-7018325; Fax: 86-29-7012210; E-mail: shanlun@public.xa.sn.cn;

Tel: 86-10-64886859; Fax: 86-10-64873428; E-mail: sychen@genetics.ac.cn