

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2018.30402

张会, 郑洁旋, 简曙光, 夏快飞, 张美. 厚藤 ASR 基因克隆及功能初步分析[J]. 植物科学学报, 2018, 36(3): 402~410

Zhang H, Zheng JX, Jian SG, Xia KF, Zhang M. Isolation and functional characterization of the ASR gene from *Ipomoea pes-caprae*[J].

Plant Science Journal, 2018, 36(3): 402~410

## 厚藤 ASR 基因克隆及功能初步分析

张会<sup>1,2</sup>, 郑洁旋<sup>1,2</sup>, 简曙光<sup>1</sup>, 夏快飞<sup>1</sup>, 张美<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院华南植物园, 广东省应用植物学重点实验室, 广州 510650; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 通过对厚藤(*Ipomoea pes-caprae* (Linn.) Sweet.) cDNA 文库的筛选, 获得了一个编码厚藤 ASR (ABA-stress-ripening) 基因的全长 cDNA, 命名为 *IpASR*。研究结果显示, *IpASR* 编码区全长 648 bp, 共编码 215 个氨基酸; 蛋白质等电点为 5.42, 分子量为 24.57 kD。通过在酵母中表达, 发现 *IpASR* 能够提高转基因酵母的耐盐性及抗氧化能力。进一步以厚藤成年植株及幼苗为材料进行实时荧光定量 PCR 分析, 结果表明, *IpASR* 基因在厚藤成年植株各组织中广泛表达; 高盐、甘露醇胁迫和 ABA 处理可诱导该基因在厚藤幼苗中的表达。结合 GFP 融合蛋白的亚细胞定位和生物信息学分析, 发现 *IpASR* 蛋白为核蛋白, 推测 *IpASR* 基因参与了厚藤生长发育的调控, 并可响应 ABA 和非生物胁迫的诱导。

**关键词:** 厚藤; ASR 基因; 逆境胁迫; 亚细胞定位

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2018)03-0402-09

## Isolation and functional characterization of the ASR gene from *Ipomoea pes-caprae*

Zhang Hui<sup>1,2</sup>, Zheng Jie-Xuan<sup>1,2</sup>, Jian Shu-Guang<sup>1</sup>, Xia Kuai-Fei<sup>1</sup>, Zhang Mei<sup>1\*</sup>

(1. Provincial Key Laboratory of Applied Botany, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** We focused on the full-length cDNA encoding ASR protein isolated from a *Ipomoea pes-caprae* (Linn.) Sweet. cDNA library. Results showed the coding region of *IpASR* cDNA was 648 bp, encoding a 215 amino acid protein with a molecular weight of 24.57 kD and isoelectric point of 5.42. By ectopic expression of *IpASR* in yeast, we found that *IpASR* improved the salt and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance of transgenic yeast strains. Using adult plants and seedlings of *I. pes-caprae* with or without abiotic stress and ABA treatment, real-time RT-PCR analysis showed that *IpASR* was widely expressed in different adult organs in *I. pes-caprae*. The *IpASR* transcript was induced under abiotic stress and ABA treatment. The subcellular localization assay combining bioinformatics analysis showed that *IpASR* was a nucleoprotein. These results suggest that *IpASR* might play an important role in the regulation of *I. pes-caprae* growth and development, and therefore respond to environmental abiotic stress and the ABA signal pathway.

**Key words:** *Ipomoea pes-caprae*; ASR; Abiotic stress; Subcellular localization

收稿日期: 2017-10-24, 退修日期: 2017-11-22。

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFC1403002); 中国科学院 A 类战略性先导科技专项(XDA13020500); “十二五”农村领域国家科技计划项目(2015BAL04B04)。

This work was supported by grants from the National Key Research and Development Program of China (2016YFC1403002), ‘Strategic Priority Research Program’ of the Chinese Academy of Sciences (XDA13020500), and “Twelfth Five-Year” National S &amp; T Projects for Rural Areas (2015BAL04B04).

作者简介: 张会(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物逆境生理(E-mail: 1522011738@qq.com)。

\* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: zhangmei@scbg.ac.cn)。

植物在生长发育过程中, 通常会受到多种逆境胁迫的干扰, 对其生长发育产生重要影响。植物对逆境胁迫的响应主要包括以下几个步骤: 对胁迫信号的感知与转导; 诱导胁迫相关基因的表达和蛋白质的合成; 生理生化指标的变化和代谢物的合成; 最终降低胁迫所导致的伤害<sup>[1]</sup>。其中, 胁迫应答基因的表达调控是研究植物应答逆境分子机制的关键, 相关功能基因的克隆和鉴定可为植物(作物)抗逆性的遗传改良奠定基础<sup>[2]</sup>。ASR(ABA-stress-ripening)基因是目前仅在植物中发现并广泛参与非生物逆境胁迫响应的功能基因<sup>[3]</sup>。

ASR 蛋白是植物中特有的一类蛋白, 具有转录因子和 LEA 蛋白(Late embryogenesis abundant protein)的基本特征, 在调控植物应答非生物逆境胁迫方面发挥重要作用<sup>[4]</sup>。植物中首次发现的 ASR 基因是通过筛选抑制差减杂交文库, 从番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)成熟果实中获得, 命名为 *Asr1*<sup>[5]</sup>。*Asr1* 可在番茄成熟果实中大量转录, 受到胁迫的番茄叶片中该基因转录可被强烈诱导。随后, 在番茄基因组中又依次克隆获得了基因 *Asr2* ~ *Asr5*<sup>[6-9]</sup>。番茄 ASR 基因的研究是植物 ASR 基因家族功能鉴定的基础<sup>[10]</sup>。目前, 已在多种植物中鉴定获得了 50 多个 ASR 基因家族成员<sup>[10]</sup>, 但包括拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)在内的十字花科植物基因组中并没有发现 ASR 基因<sup>[3]</sup>。由于 ASR 蛋白与植物 LEA 蛋白(胚胎发育晚期丰富蛋白, Late embryogenesis abundant protein)在植物体内的积累模式和蛋白理化性质高度一致, 即都在胚胎发育后期的种子中大量积累; 在营养组织中的表达受到脱水胁迫的诱导; 均为高度亲水性和热稳定性的小分子无序蛋白。因此, Battaglia 等<sup>[11]</sup>将 ASR 蛋白归类为 LEA 超家族中的第七个亚家族。

高盐和干旱是植物生长过程中最为常见的逆境胁迫, 严重影响农作物的产量和品质<sup>[12]</sup>。已有报道发现, 植物 ASR 基因的过量表达能够提高对植株对高盐和干旱胁迫的耐受性。例如, 香蕉(*Musa nana* Lour.) *MpAsr* 基因在大肠杆菌和拟南芥中超量表达可提高对渗透压胁迫的耐受性<sup>[13]</sup>。海蓬子(*Salicornia europaea* L.)是一种可以适应极端环境的盐土植物, 其 *SbASR* 基因在烟草(*Nicotiana tabacum* L.)中超量表达提高了转基因烟草的耐盐

性<sup>[14]</sup>。研究发现, 盐土植物辽宁碱蓬(*Suaeda liaotungensis* K.)<sup>[15]</sup>和小米(*Setaria italica* (L.) Beauv.)<sup>[16]</sup>ASR 相关基因在拟南芥中超表达提高了转基因植株的耐盐和耐旱性。短柄草(*Brachypodium sylvaticum* (Huds.) Beauv.) *BdASR1* 基因在烟草中的超表达能够提高转基因植株的耐旱和抗氧化性<sup>[4]</sup>。

厚藤(*Ipomoea pes-caprae* (Linn) Sweet.)是旋花科番薯属多年生藤本植物, 主要分布于热带、亚热带地区的海滨沙滩及岛屿, 具有良好的定沙能力和耐海水冲刷能力, 抗逆性极强, 在滨海地区海滩固沙、绿化及生态恢复等方面发挥重要作用<sup>[17]</sup>。厚藤属于盐土植物(Halophyte), 具有极强的耐盐性和耐旱性。本文通过对厚藤 ASR 基因 *IpASR* 的克隆和序列分析, 明确该基因的生物学功能, 以期为作物的抗逆分子育种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与胁迫处理

本实验以栽培于华南植物园温室(23°18'75.91"N, 113°37'02.38"E)中的厚藤成年植株以及于珠海海滩(22°16'25.37"N, 113°34'18.00"E)收集的厚藤种子为实验材料。厚藤组织取材后, 置于-80°C冰箱保存、备用。厚藤种子经清洗、消毒后, 置于 10% 的硫酸溶液中浸泡 12 h, 洗净后用砂纸打磨种皮至露白, 种植于湿润的蛭石中, 培养 1 个月后生长成厚藤幼苗。将厚藤幼苗根系分别浸泡在 300 mmol/L 的 NaCl 溶液和甘露醇中 24 h, 模拟高盐胁迫和干旱胁迫; 将根系浸泡 0.1 mmol/L 的 ABA 溶液中 24 h(同时叶表面喷施), 模拟激素处理。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 序列分析

厚藤 ASR 基因 *IpASR* cDNA 全长采用 NCBI ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 软件查找最长阅读框, 并采用 SmartBlast 数据库 ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/smartblast/?LINK\\_LOC=BlastHomeLink](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/smartblast/?LINK_LOC=BlastHomeLink)) 查找 ASR 蛋白同源序列(表 1)。采用 MEGA 6 软件中的 Clustal W 软件进行序列比对并构建进化树。

采用 ExPASy 数据库中的 ProtParam 程序 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 计算 *IpASR* 蛋白的氨基酸含量、稳定性和亲水性。采用 PHYRE<sup>2</sup> 程

表1 参与构建ASR进化树的其他19种植物  
Table 1 Sequence information of ASRs from other plant species cited in this paper

ASR蛋白 ASR proteins	序列号 Accession No.	物种名称 Species name
InASR	BAF46301.1	牵牛花 <i>Pharbitis nil</i> (Linn.) Choisy
CsoASR	BAB19963.1	肾叶打碗花 <i>Calystegia soldanella</i> (Linn.) R. Br.
SIASR	AGZ20206.1	辽宁碱蓬 <i>Suaeda liaotungensis</i> Kitag.
CqASR	XP_021771569.1	藜麦 <i>Chenopodium quinoa</i> willd
SbASR	ACI15208.1	海蓬子 <i>Salicornia brachiata</i> L.
AcASR	XP_020111424.1	凤梨 <i>Ananas comosus</i> (Linn.) Merr.
GbASR	AAR23420.1	银杏 <i>Ginkgo biloba</i> L.
TuASR	EMS47440.1	乌拉尔图小麦 <i>Triticum urartu</i> Thum. ex Gandil
CsiASR	AHJ09608.1	野茶树 <i>Camellia sinensis</i> (L.) O. Ktze.
SIASR	NP_001269248.1	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.
SpASR	CBY05512.1	秘鲁番茄 <i>Solanum peruvianum</i> L.
PtASR	AAB07493.1	火炬松 <i>Pinus taeda</i> L.
PaASR	AAB97140.1	杏 <i>Prunus armeniaca</i> Lam.
VpASR	ABC86744.1	华东葡萄 <i>Vitis pseudoreticulata</i> W. T. Wang
ScASR	AAA86052.1	野生型马铃薯 <i>Solanum chacoense</i> Bitter
ZmASR	AFE89428.1	滇刺枣 <i>Ziziphus mauritiana</i> Lam.
PmASR	NP_001306732.1	梅花 <i>Prunus mume</i> Sieb.
PpASR	XP_007201299.1	水蜜桃 <i>Prunus persica</i> L.
PaASR	XP_021820409.1	甜樱桃 <i>Prunus avium</i> L.

序 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 分析 *IpASR* 蛋白的无序度及 3D 结构。

### 1.2.2 酵母转化及耐盐和抗氧化性分析

将构建的重组质粒 *IpASR*-pYES-DEST 52 浓度调整至 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ L, 采用乙酸锂法分别转化酵母对盐敏感的突变株 *AXT3* 和对应的野生型酵母株系 *W303*<sup>[18,19]</sup>; 转化酵母对  $H_2O_2$  敏感的突变株 *yap1* $\Delta$  (*Y00569*, *BY4741*; *MATa*; *ura3* $\Delta$ *0*; *leu2* $\Delta$ *0*; *his3* $\Delta$ *1*; *met15* $\Delta$ *0*; *YML007w* $\Delta$ : *kanMX4*), *skn7* $\Delta$  (*Y02900*, *BY4741*; *MATa*; *ura3* $\Delta$ *0*; *leu2* $\Delta$ *0*; *his3* $\Delta$ *1*; *met15* $\Delta$ *0*; *YHR206w* $\Delta$ : *kanMX4*) 和对应的野生型酵母株系 *BY4741* (*Y00000*, *MATa*; *his3* $\Delta$ *1*; *leu2* $\Delta$ *0*; *met15* $\Delta$ *0*; *ura3* $\Delta$ *0*)。

分别挑取 *AXT3*、*W303*、*yap1* $\Delta$ 、*skn7* $\Delta$  转化 pYES2 和 *IpASR*-pYES-DEST 52 的单克隆, 以野生型酵母 *WT* 转化空载体 pYES2 的单克隆作为对照, 接种于 2 mL 添加了半乳糖的酵母液体培养基 (SDG 培养基) 中, 30°C 恒温摇床 (200 r/min) 培养至菌液 OD<sub>600</sub> 值达 2。按照 1:1、1:10、1:100、1:1000 将菌液进行逐级稀释, 分别吸取 2  $\mu$ L 逐级稀释的菌液分别滴至添加有 50 mmol/L、75 mmol/L、200 mmol/L NaCl 以及添加 0.75 mmol/L

$L H_2O_2$  溶液的酵母固体培养基平板上, 30°C 培养 7 d, 观察酵母生长情况。

### 1.2.3 总 RNA 提取

采用 HiPure Plant RNA Kits (R4151) 试剂盒提取厚藤植物叶片总 RNA, 并检测 RNA 浓度。

### 1.2.4 Real-time RT-PCR

采用两步法以总 RNA 为模板进行逆转录反应获取 cDNA 第一链。通过 NCBI 的 Primer-Blast 软件设计 *IpASR* 基因的 real-time RT-PCR 引物。引物为 *IpASRRTF*: 5'-AAGATAGCAGAAGAGGT-GGCG-3' 和 *IpASRRTR*: 5'-ACGC ATAAGCCCA-AACCCAT-3'。内参基因为厚藤泛素蛋白基因 *IpUBQ* (GenBank 登录号: MF502417), 引物为 *IpUBQRTF*: 5'-TCGACAATGTGAAGGCAAAG-3' 和 *IpUBQRTR*: 5'-CTTGATCTTCTCGGCTTGG-3'。参考 iTaq<sup>TM</sup> Universal SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (BIO-RAD) 配制 Real-time RT-PCR 反应体系。采用罗氏荧光定量 PCR LightCycler480 仪器进行检测, 样本的 Ct 值取 3 次重复的平均值。

### 1.2.5 GFP 融合蛋白瞬时表达载体的构建及洋葱表皮瞬时表达定位

以含有厚藤 ASR 蛋白基因 cDNA 的酵母表达载体 pYES-DEST 52 重组质粒为模板, 以 *IpASR*

RGF: 5'-CTTGCTCCGTGGATCCATGTCTGAGA-TGAAACAC CAC-3' 和 *IpASR*GR: 5'-TGCTCAC-CATGGATCCAAAGAAGTGATGCTTCTTC-3' 为引物进行扩增、回收。pUC18 EGFP 质粒经 *Bam* HI 单酶切处理, 并回收质粒。采用 In-Fusion 技术进行 DNA 片段和载体同源重组连接。将反应产物转化大肠杆菌 JM109 感受态菌株。测序鉴定正确的阳性克隆后, 保存 *IpASR*-pUC18 EGFP 重组质粒。空载体 pUC18 EGFP 作为对照。

将新鲜的洋葱鳞茎小块, 置于含 3% 蔗糖的固体 MS 培养基平板上。按照基因枪 (BIO-RAD, PDS-1000/He) 的说明书制备质粒和金粉, 采用 1100 psi 的裂片轰击洋葱表皮。培养 20 h 后于 LSM 510 Meta (Zeiss) 荧光显微镜下观察、拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 *IpASR* 基因编码亲水性固有无序蛋白

本研究通过对厚藤 cDNA 文库的筛选, 获得

编码 ASR 蛋白的全长 cDNA, 命名为 *IpASR*。*IpASR* 长 962 bp, 其中 5' 非翻译区 68 bp, 3' 非翻译区 246 bp, 编码区长度 648 bp, 编码含有 215 个氨基酸的蛋白 *IpASR* (图 1)。*IpASR* 含有 ASR 蛋白共有的 ABA 和水分胁迫结构域 (ABA/WDS domain); N 端含有富含组氨酸的结构 (His-rich motif), 可能与金属离子的结合有关; 而 C 端含有一个核定位序列 NLS (Nuclear localization signal), 推测 *IpASR* 为核定位蛋白。

氨基酸稳定性和亲水性分析结果表明, *IpASR* 蛋白的理论分子量为 24.57 kD, 理论等电点为 5.42, 是一个稳定的蛋白分子。*IpASR* 的总平均亲水指数 (GRAVY) 为 -1.637, 属于高度亲水性蛋白。*IpASR* 富含亲水性氨基酸 Glu、His 和 Lys, 而疏水性氨基酸 Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp 和 Val 含量较低。

### 2.2 同源性及系统进化分析

研究结果发现, *IpASR* 蛋白的氨基酸序列分别

	AACATATT	8 bp
	TTAGCTTAGCATTATTCGTCACCTACCAGAACCATCCAAAAACTAAAATAATC	68 bp
Start codon	ATGCTGAGATGAAACACCACCACTTGGTCAACCACAAAGACAATGAGGAAGAGAGG	128 bp
His-rich motif	M--S--E--M--K--H--H--H--H--F--G--H--H--K--D--N--E--E--E--R--	
	CAGTCTTCTGTGGTGAAACACTTATGGCACTGATGAGAACCTTATGCCAACAGGC	188 bp
	Q--S--S--C--G--E--N--T--Y--G--T--D--E--K--P--Y--G--Q--T--G--	
	TATGGGAAGAGTCTTATGAGAGGAAAAACACTTATGGTATGACTCTTATGAGAGGAAA	248 bp
	Y--G--E--E--S--Y--E--R--K--N--T--Y--G--D--D--S--Y--E--R--K--	
	AACACCTATGGAGATGACTCTTCTGTGAGAGGAAAAACACTTATGGAGATGACTCTCT	308 bp
	N--T--Y--G--D--D--S--S--C--E--R--K--N--T--Y--G--D--D--S--S--	
	TATGAGAGGAAAAACACTTATGGAGATGACTCTTATTATGAGAGGAAAAACACTTATGGA	368 bp
	Y--E--R--K--N--T--Y--G--D--D--S--Y--E--R--K--N--T--Y--G--	
	GATGACTCTTACGGCCAATCGACAAGTATGGAGTGAAGGCGTGAACCGGGCATAGAA	428 bp
	D--D--S--Y--G--Q--I--D--K--Y--G--S--E--G--V--T--G--G--I--E--	
	CCGGAAGGGAAAACATCGAGGATTACGAAAAGGAGAAAAACACCAAGCATCTCGAG	488 bp
	P--E--G--K--T--H--E--D--Y--E--K--E--K--K--H--H--K--H--L--E--	
	CAGCTGGCGGGCTTGGCACCGTCGCCGCGTGCCTATGCGCTTGACGAGAACGACGAG	548 bp
	Q--L--G--G--L--G--T--V--A--A--G--A--Y--A--L--Y--E--K--H--E--	
ABA/WDS domain	GCAAAGAAAGACCCAGAGAACATGGCACAAGCATAAGATAGCAGAAAGGGTGGCGGCAGTG	608 bp
	A--K--K--D--P--E--N--A--H--K--H--K--I--A--E--E--V--A--A--V--	
	GCTGCCGTTGGATCAGGTGCATTGCACTGAGCATCATGAGAAGAAGGAGCTAAG	668 bp
	A--A--V--G--S--G--A--F--A--F--H--E--H--H--E--K--K--E--A--K--	
Termination codon	GAGGAAGAAGAGAGGCTGAGGGAAAAGAAGAACATCACTCTTTAATTACATACTATA	728 bp
NLS	E--E--E--E--A--E--G--K--K--H--H--F--F	
	TATGTGTTTTATTATTAAGATCAAACATAATCGATCCTTAGCTTGACGTGT	788 bp
	GTGAAATAATGGGTTGGCTTATGCGTGTGAGGTACGAGGAGGGTTCTTGTACCTAG	848 bp
	CTAACGCTACCTATCTACTCTATTGTGTCGACTGAGATGTTTATTACTCTAGTGAT	908 bp
	GTGGATTGTAATAACTAATACTGATATAAGTTATTAAAAAA	962 bp

ATG: 翻译起始密码子; TAA: 终止密码子; His-rich motif: 组氨酸富含结构; ABA/WDS domain: ABA 和水分胁迫结构域; NLS: 细胞核定位信号。

ATG: Start codon of translation for *IpASR*; TAA: Termination codon of translation for *IpASR*; His-rich motif: Histidine rich structure; ABA/WDS domain: Abscisic acid/water deficit stress; NLS: Nuclear localization sequence.

图 1 *IpASR* cDNA 和编码蛋白的氨基酸序列

Fig. 1 cDNA and encoded protein sequences of *IpASR*

与旋花科的牵牛花和肾叶打碗花中的 ASR 蛋白高度同源。与牵牛花 *InASR* 氨基酸序列一致性达到 79%，与肾叶打碗花达到 69%。构建 *IpASR* 与其它 19 种植物 ASR 氨基酸序列的系统进化树(图 2)，结果显示，厚藤与滨海植物海蓬子和辽宁碱蓬，以及耐旱作物藜麦具有较高的同源性。

### 2.3 *IpASR* 基因在酵母中的表达提高了酵母菌对盐胁迫和 $H_2O_2$ 的耐受性

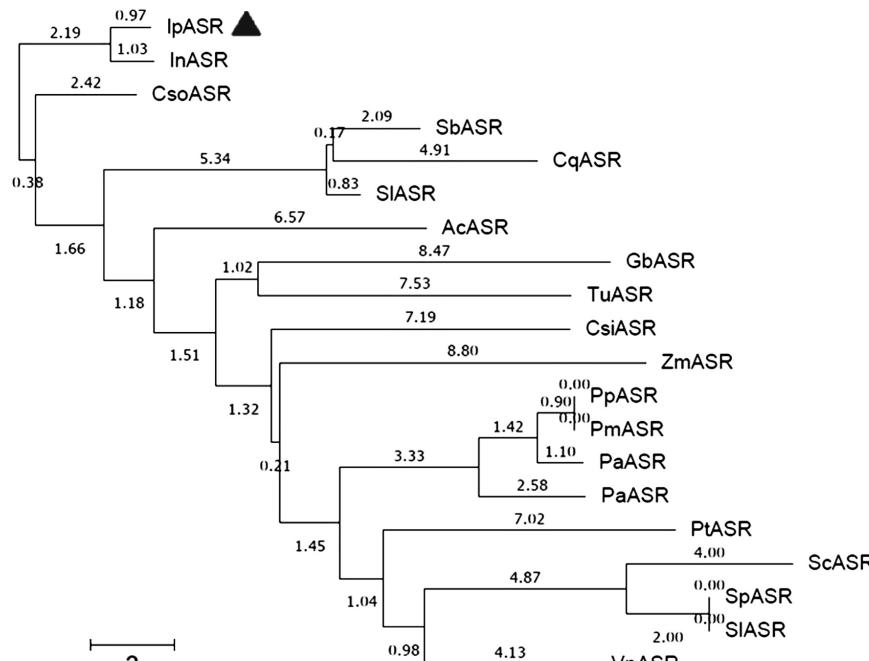
研究结果显示，超表达 *IpASR* 基因的转基因酵母与转化空载体 pYES2 的 *AXT3* 酵母突变株相比，能够在添加 50 mmol/L 和 75 mmol/L NaCl 溶液的 SDG(酵母培养基)平板上生长，而在添加 200 mmol/L NaCl 溶液的培养基平板上也可以少量生长；而未表达 *IpASR* 的酵母(转化空载体 pYES2)则不能生长，表明 *IpASR* 基因在酵母中的表达能够提高酵母盐敏感突变株 *AXT3* 对盐胁迫的耐受性(图 3)。同时，超表达 *IpASR* 基因的转基因酵母与转化空载体 pYES2 的 W303 野生型酵母相比，能够在添加 0.85 mol/L NaCl 溶液和 1.28 mol/L NaCl 溶液的培养基平板上生长，且生长状况良好，而在添加 1.5 mol/L NaCl 溶液的培养基平板上也可以少量生长；而未表达 *IpASR* 的酵母(转化空载体 pYES2)则不能生长，表明

*IpASR* 基因在酵母中的表达能够提高野生型酵母株系 W303 对盐胁迫的耐受性(图 4)。

*IpASR* 蛋白对氧化胁迫的耐受性研究结果表明，*yap1Δ* 和 *skn7Δ* 是对  $H_2O_2$  敏感的酵母突变株，在含有 0.75 mmol/L 的  $H_2O_2$  培养基上不能生长，而野生型酵母野生型(WT)则能够正常生长。超表达 *IpASR* 基因的转基因酵母与转化空载体 pYES2 的 *yap1Δ* 酵母突变株相比，能够在添加 0.75 mmol/L  $H_2O_2$  的培养基平板上生长；而未表达 *IpASR* 的酵母 *yap1Δ*(转化空载体 pYES2)则几乎不能生长(图 5: A)。同样，超表达 *IpASR* 基因的转基因酵母 *skn7Δ* 也能够在添加 0.75 mmol/L  $H_2O_2$  的培养基平板上生长；而未表达 *IpASR* 的酵母 *skn7Δ*(转化空载体 pYES2)则几乎不能生长(图 5: B)。这些结果表明，*IpASR* 基因在酵母突变株 *yap1Δ* 和 *skn7Δ* 中的表达能够提高酵母对氧化胁迫的耐受性。

### 2.4 *IpASR* 基因在厚藤组织的泛表达

为阐明 *IpASR* 基因的表达与厚藤植株发育的关系，本研究对厚藤不同器官或组织中 *IpASR* 基因的表达进行 RT-PCR 分析。结果表明，*IpASR* 基因在厚藤幼苗的根、叶片及花冠中具有较高的表达量。而在厚藤的叶芽、花芽及成年植株的根、藤、叶和幼嫩的种子中表达量较低(图 6: A)。

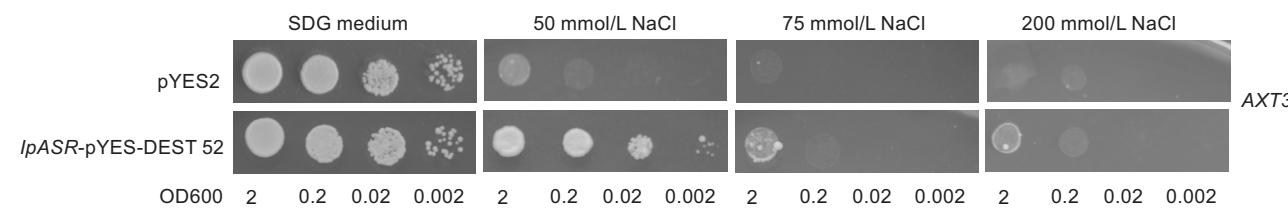
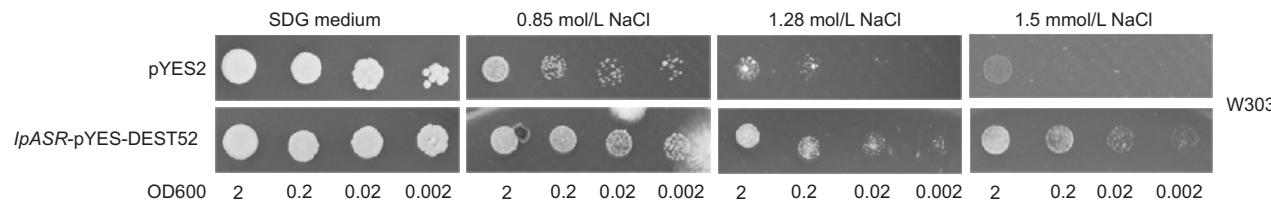
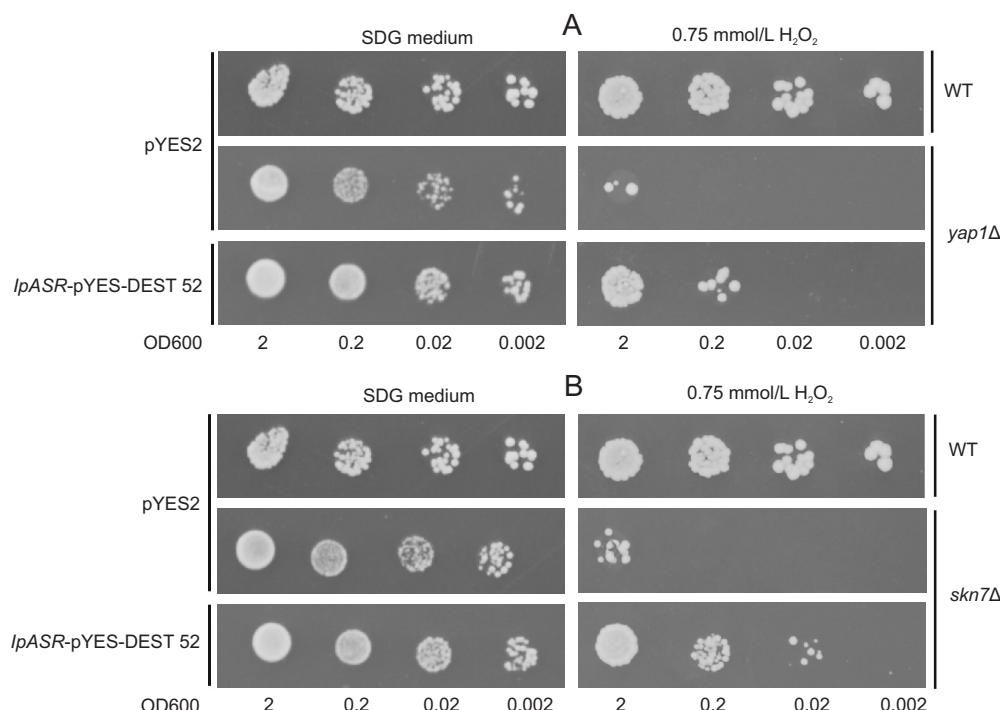


系统进化树分支点处的数字代表系统进化树的自展值(1000 次重复)。

Numbers beside the branches indicate bootstrap values (with 1000 replicates).

图 2 *IpASR* 蛋白与其它植物同源 ASR 蛋白的系统进化树

Fig. 2 Neighbor-joining phylogenetic tree of *IpASR* and homologous ASR proteins from other plants

图 3 *IpASR* 提高酵母盐敏感突变株对 NaCl 溶液的耐受性Fig. 3 Improved salinity-tolerance confirmation in the yeast salt-sensitive mutant *AXT3* of *IpASR*图 4 *IpASR* 提高酵母野生型株系 W303 对 NaCl 溶液的耐受性Fig. 4 Improved salinity-tolerance confirmation in the yeast wild-type strain W303 of *IpASR*图 5 *IpASR* 提高酵母 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 敏感突变株 *yap1Δ* (A) 和 *skn7Δ* (B) 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的耐受性Fig. 5 Oxidative resistance test of *IpASR* overexpressed in the yeast H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensitive mutants *yap1Δ* (A) and *skn7Δ* (B)

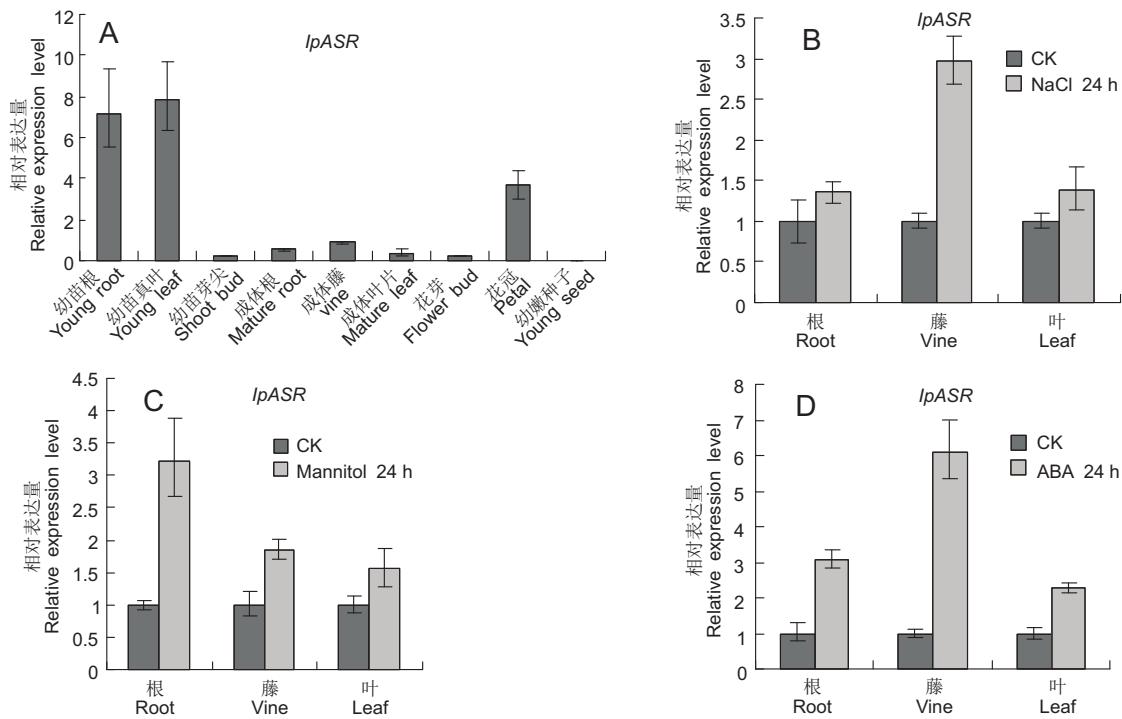
## 2.5 *IpASR* 基因的表达受到高盐渗透胁迫和 ABA 的诱导

研究结果显示, 厚藤幼苗的根、藤或叶中, *IpASR* 基因的表达在受到盐胁迫 24 h 后都有明显诱导, 最大诱导量可达到 3 倍左右(图 6: B)。渗透(甘露醇处理能够造成植物脱水)胁迫处理下, 无论在厚藤幼苗的根、藤或叶中, *IpASR* 基因的表达均被强烈诱导, 最大诱导量也可达到 3 倍以上(图 6: C)。同

样, ABA 处理厚藤幼苗也能够强烈诱导 *IpASR* 基因的表达, 且最大诱导量可达到 6 倍以上(图 6: D)。

## 2.6 *IpASR* 蛋白定位于细胞核内

将基因枪轰击过的洋葱表皮置于荧光显微镜下观察, 结果发现, 与单独的 EGFP 在洋葱表皮内的弥散状分布不同, *IpASR*-EGFP 融合蛋白集中定位于洋葱细胞核内, 表明 *IpASR* 是一个细胞核定位蛋白(图 7)。

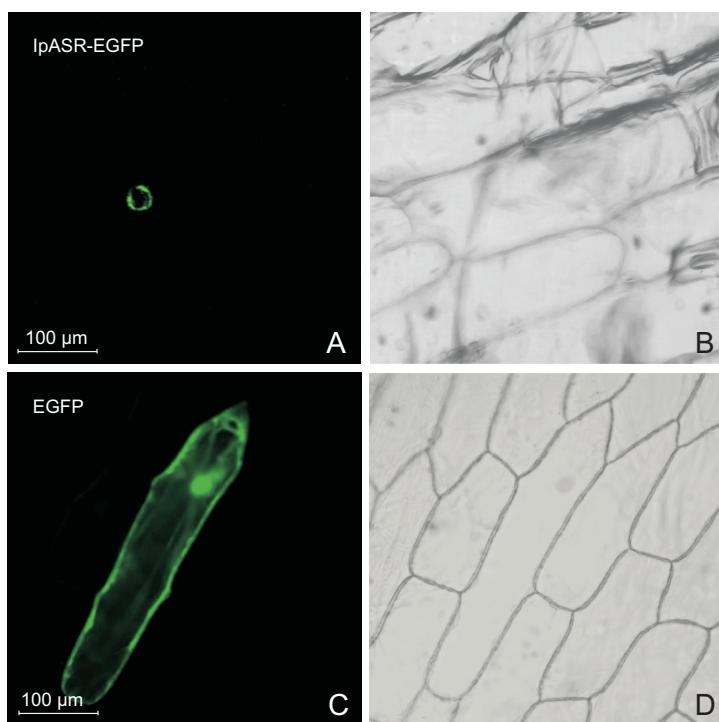


A: *IpASR* 在厚藤不同组织和器官中的表达特异性分析; B: *IpASR* 在厚藤幼苗中的表达受高盐胁迫的诱导; C: *IpASR* 在厚藤幼苗中的表达受甘露醇胁迫的诱导; D: *IpASR* 在厚藤幼苗中的表达受ABA处理的诱导。

A: Transcripts analyses of *IpASR* in different tissues and organs of *I. pes-caprae*; B: Induced expression pattern of *IpASR* in salt-treated seedlings of *I. pes-caprae*; C: Induced expression pattern of *IpASR* in mannitol-treated seedlings of *I. pes-caprae*; D: Induced expression pattern of *IpASR* in ABA-treated seedlings of *I. pes-caprae*.

图 6 *IpASR* 在厚藤中表达的 RT-PCR 分析

Fig. 6 Real-time PCR analysis of *IpASR* transcripts in *I. pes-caprae*



A、B: 表达 *IpASR-EGFP* 融合蛋白的质粒轰击后的洋葱表皮; C、D: *pUC18-EGFP* 空载体对照。A、B: *IpASR-EGFP* fusion protein and its bright field; C、D: EGFP control and its bright field.

图 7 *IpASR-EGFP* 融合蛋白在洋葱表皮中的亚细胞定位分析

Fig. 7 Subcellular localization of *IpASR* in onion epidermis cells

### 3 讨论

厚藤主要分布于热带和亚热带地区海边沙滩及向阳的路边, 是一种滨海极端逆境适生野生植物, 也是一种典型的盐土植物<sup>[20]</sup>。盐土植物是发掘耐盐基因及启动子的重要资源库<sup>[21]</sup>。ASR 基因是植物中广泛存在的一类主要参与渗透胁迫调节的抗逆基因, 当植物遭遇逆境时(如干旱、低温、盐胁迫、ABA 协迫等), ASR 基因会被诱导表达, 从而减轻逆境胁迫对细胞引起的伤害。胁迫环境中 ASR 蛋白在细胞中的富集不仅可以作为分子伴侣稳定细胞结构, 结合过多的金属离子及抗氧化, 同时还可以作为转录因子调控下游抗逆基因的表达, 因此 ASR 蛋白是在胁迫过程中对植物起保护作用的关键活性分子<sup>[10]</sup>。

本研究通过文库筛选获得一个编码厚藤 ASR 蛋白的 *IpASR* 的全长 cDNA, *IpASR* 蛋白具有 ASR 家族蛋白共有的 ABA 和水分胁迫结构域, 表明它属于厚藤中 ASR 家族。蛋白的氨基酸序列分析表明, *IpASR* 蛋白富含亲水性氨基酸, 而疏水性氨基酸含量较低, 具有高度的稳定性。*IpASR* 蛋白与植物 LEA 蛋白具有相似的理化特征, 并具备高度的亲水性, 均为植物中固有无序蛋白的一种<sup>[22]</sup>。进一步氨基酸序列相似性分析发现, *IpASR* 蛋白与牵牛花的 *InASR* 序列高度同源。*InASR* 在牵牛花的花冠衰老过程中诱导表达<sup>[23]</sup>, 而 *IpASR* 在厚藤的花冠中也有较高的表达量, 表明 *IpASR* 可能参与调控厚藤花的发育和衰老过程。此外, *IpASR* 还与其他 2 种盐土植物海蓬子和辽宁碱蓬具有较近的进化关系。海蓬子 *SbASR* 在烟草中超量表达能够提高转基因烟草的耐盐性<sup>[14]</sup>, 而辽宁碱蓬 *SiASR* 在拟南芥中超量表达能够提高转基因拟南芥对高盐、干旱和冷冻胁迫的耐受性<sup>[15]</sup>。上述 ASR 蛋白均与调控植物应答缺水胁迫密切相关。由于序列的同源性往往与功能的相似性一致, 上述生物信息学分析结果预示 *IpASR* 可能在调控厚藤适应滨海高盐干旱的环境中发挥重要作用。

ASR 蛋白具有胚胎晚期富集蛋白的特征, 也具有较高的亲水性与热稳定性, 干旱、盐渍及 ABA 等均可以诱导 ASR 蛋白的富集, ASR 蛋白的积累与植物抗旱耐盐存在一定的相关性, 进而维持

植物的正常代谢活动<sup>[11]</sup>。研究表明, 水稻(*Oryza sativa* L.)的 ASR1 蛋白能够作为分子伴侣, 具有清除活性氧(ROS)的功能<sup>[24]</sup>, 并且能够调控水稻对铝胁迫的耐受性<sup>[25]</sup>。*IpASR* 在酵母中超量表达, 不仅能够提高酿酒酵母对 NaCl 的耐受性, 还可以提高对氧化胁迫的耐受性。这进一步提示 *IpASR* 蛋白不仅可以通过其高度亲水性提高酵母应对渗透压胁迫的能力, 同时还可以其他未知的途径缓解活性氧对酵母细胞的伤害, 从而提高酵母的抗氧化能力。

基因的转录模式密切地反应了基因的生物学功能。本研究表明, *IpASR* 的表达均受到高盐胁迫、模拟干旱(甘露醇)和 ABA 处理的诱导, 表明 *IpASR* 基因是厚藤体内的主要胁迫应答基因。此外, *IpASR* 蛋白定位于细胞核内, 暗示该蛋白在细胞核内可能作为分子伴侣或转录因子减缓逆境胁迫对植物细胞的伤害。

总之, 本研究对厚藤 *IpASR* 生物信息学分析、酵母异源表达功能分析、基因表达分析和亚细胞定位观察的结果, 为进一步阐释 *IpASR* 的生物学功能提供了依据。后续将构建厚藤 *IpASR* 基因的转基因超表达载体, 由农杆菌介导对拟南芥进行转基因, 获得转基因阳性植株再进行表型分析, 进一步明确厚藤 *IpASR* 对提高植物耐盐耐旱性等逆境胁迫的调控机制。

### 参考文献:

- [1] Wang HY, Wang HL, Shao HB, Tang XL. Recent advances in utilizing transcription factors to improve plant abiotic stress tolerance by transgenic technology [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 67.
- [2] Ahanger MA, Akram NA, Ashraf M, Alyemeni MN, Wijaya L, Ahmad P. Plant responses to environmental stresses—from gene to biotechnology [J]. *AoB Plants*, 2017, 9: 25.
- [3] Carrari F, Fernie AR, Iusem ND. Heard it through the grape vine? ABA and sugar cross-talk: the ASR story [J]. *Trends Plant Sci*, 2004, 9: 57–59.
- [4] Wang LZ, Hu W, Feng JL, Yang XY, Huang QJ, et al. Identification of the ASR gene family from *Brachypodium distachyon* and functional characterization of *BdASR1* in response to drought stress [J]. *Plant Cell Rep*, 2016, 35: 1221–1234.
- [5] Iusem ND, Bartholomew DM, Hitz WD, Scolnik PA. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) transcript induced by water deficit and ripening [J]. *Plant Physiol*, 1993, 102: 1353–

- 1354.
- [ 6 ] Rossi M, Iusem ND. Sequence of *Asr2*, a member of a gene family from *Lycopersicon esculentum* encoding chromosomal proteins: Homology to an intron of the polygalacturonase gene[J]. *DNA Seq*, 1995, 5: 225–227.
- [ 7 ] Rossi M, Lijavetzky D, Bernacchi D, Hopp HE, Iusem N. *Asr* genes belong to a gene family comprising at least three closely linked loci on chromosome 4 in tomato[J]. *Mol Gen Genet*, 1996, 252: 489–492.
- [ 8 ] Frankel N, Carrari F, Hasson E, Iusem ND. Evolutionary history of the *Asr* gene family[J]. *Gene*, 2006, 378: 74–83.
- [ 9 ] Fischer I, Camus-Kulandaivelu L, Allal F, Stephan W. Adaptation to drought in two wild tomato species: the evolution of the *Asr* gene family[J]. *New Phytol*, 2011, 190: 1032–1044.
- [ 10 ] González RM, Iusem ND. Twenty years of research on *Asr* (ABA-stress-ripening) genes and proteins[J]. *Planta*, 2014, 239: 941–949.
- [ 11 ] Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcíarrubio A, Campos F, Covarrubias AA. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins[J]. *Plant Physiol*, 2008, 148: 6–24.
- [ 12 ] Tardieu F, Parent B, Caldeira CF, Welcker C. Genetic and physiological controls of growth under water deficit[J]. *Plant Physiol*, 2014, 164: 1628–1635.
- [ 13 ] Dai JR, Liu B, Feng DR, Liu HY, He YM, et al. *MpAsr* encodes an intrinsically unstructured protein and enhances osmotic tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell Rep*, 2011, 30: 1219–1230.
- [ 14 ] Jha B, Lal S, Tiwari V, Yadav SK, Agarwal PK. The *SbASR-1* gene cloned from an extreme halophyte *Salicornia brachiata* enhances salt tolerance in transgenic tobacco[J]. *Mar Biotechnol*, 2012, 14: 782–792.
- [ 15 ] Hu YX, Yang X, Li XL, Yu XD, Li QL. The *SiASR* gene cloned from the extreme halophyte *Suaeda liaotungensis* K. enhances abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*[J]. *Gene*, 2014, 549: 243–251.
- [ 16 ] Li JR, Dong Y, Li C, Pan YL, Yu JJ. *SiASR4*, the target gene of *SiARDP* from *Setaria italica*, improves abiotic stress adaption in plants[J]. *Front Plant Sci*, 2017, 7: 2053.
- [ 17 ] 欧阳蒲月, 刘楠, 张伟伟, 王俊, 简曙光. 海滩植物厚藤(*Ipomoea pescaprae*)的生物学及生理生态特性[J]. 湖南科技大学学报(自然科学版), 2011, 26(4): 117–121.
- Ouyang PY, Liu N, Zhang WW, Wang J, Jian SG. Biological and eco-physiological characteristics of a beach plant *Ipomoea pescaprae*[J]. *Journal of Hunan University of Science and Technology: Natural Science Edition*, 2011, 26(4): 117–121.
- [ 18 ] Zhou Y, Yin XC, Duan RJ, Hao GP, Guo JC, Jiang XY. *SpAHA1* and *SpSOS1* coordinate in transgenic yeast to improve salt tolerance [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0137447.
- [ 19 ] Quintero FJ, Blatt MR, Pardo JM. Functional conservation between yeast and plant endosomal  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters[J]. *FEBS Lett*, 2000, 471: 224–228.
- [ 20 ] Miryeganeh M, Takayama K, Tateishi Y, Kajita T. Long-distance dispersal by sea-drifted seeds has maintained the global distribution of *Ipomoea pes-caprae* subsp. *brasilensis* (Convolvulaceae)[J]. *PLoS One*, 2014, 9: e91836.
- [ 21 ] Mishra A, Tanna B. Halophytes: potential resources for salt stress tolerance genes and promoters[J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 829.
- [ 22 ] Hincha DK, Thalhammer A. LEA proteins: IDPs with versatile functions in cellular dehydration tolerance[J]. *Biochem Soc Trans*, 2012, 40: 1000–1003.
- [ 23 ] Yamada T, Ichimura K, Kanekatsu M, van Doorn WG. Gene expression in opening and senescing petals of morning glory (*Ipomoea nil*) flowers[J]. *Plant Cell Rep*, 2007, 26: 823–835.
- [ 24 ] Kim IS, Kim YS, Yoon HS. Rice ASR1 protein with reactive oxygen species scavenging and chaperone-like activities enhances acquired tolerance to abiotic stresses in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Mol Cells*, 2012, 33: 285–293.
- [ 25 ] Arenhart RA, Schunemann M, Bucker Neto L, Margis R, Wang ZY, Margis-Pinheiro M. Rice ASR1 and ASR5 are complementary transcription factors regulating aluminium responsive genes[J]. *Plant Cell Environ*, 2016, 39: 645–651.

(责任编辑: 周媛)