

中华补血草 *LsRab7* 基因的克隆及盐、 干旱胁迫下表达分析

艾丽花 姜夕雷 贾冰晨 王 宇 陈世华 尹海波 郭善利

(烟台大学生命科学学院 植物发育与分子生物学实验室 山东 烟台 264005)

摘要: 利用 RT-PCR 技术从中华补血草中获得了 *LsRab7* 基因的 cDNA 序列,利用 NCBI ORF finder 分析表明,该基因包含 1 个 618 bp 的开放阅读框,编码含 205 个氨基酸残基的蛋白质,利用 ExPASy 服务器预测其相对分子质量为 22 849.95,理论等电点为 5.67. qRT-PCR 分析结果表明,在盐处理或干旱处理条件下,在一定时间内 *LsRab7* 基因的表达水平均有升高,说明 *LsRab7* 可能参与中华补血草的抗逆反应过程,为探究中华补血草的抗逆分子机制奠定了一定的基础.

关键词: *Rab7*; 中华补血草; 胁迫处理; 定量表达分析

中图分类号: Q781

文献标志码: A

小 GTP 结合蛋白是一类单体 GTP 结合蛋白,相对分子质量为 20~40,具有 GTPase 活性,简称小 G 蛋白^[1]. 小 G 蛋白可以分为 Rho/Rac、Ras、Rab/Ypt5、Ran/TC4 和 Arf/Sar 5 个亚家族,其中 Rab/Ypt5 亚家族蛋白包含最多的小 GTP 酶^[2]. Rab 蛋白大多数可在真核细胞中广谱表达,只有极少数特异表达于其他组织或细胞,Rab 蛋白被认为既是重要的识别元件,又是研究最多的细胞器标志分子之一^[3]. 该蛋白可通过 GTP-GDP 循环参与细胞内小泡的融合,调节大部分胞内转运事件,在细胞的生物合成和胞吞胞吐等囊泡转运的一系列环节中起到重要的调控作用^[4]. 目前在基因水平的研究表明,Rab 蛋白在真核生物上的进化高度保守,但在不同物种上表现出数量的差异性和功能的多样性^[5]. 研究发现 Rab 家族可能参与了非生物胁迫信号的传导及植物的抗逆应答^[6]. 如在水稻中,*OsRab7* 的过量表达就被证明提高了幼苗的生长,增加了脯氨酸含量,

增强了其在盐胁迫下的耐受性,这表明该基因在植物中对盐的耐受性起到重要作用^[7-8]. 又如在拟南芥中的相关实验表明,盐离子胁迫下 *AtRab7* 转基因拟南芥比野生型拟南芥表现出更高的盐胁迫耐受性^[9]. 盐胁迫主要有两类,渗透胁迫和离子胁迫,前者引起土壤水势下降,使植物吸水困难,迫使细胞脱水,后者干扰植物代谢过程,抑制植物生长发育,甚至导致植物死亡^[10]. 中华补血草(*Limonium sinense* Kuntze)属于白花丹科(*Plumbagenaceae*)补血草属(*Limonium*)多年生泌盐盐生植物^[11]. 在高盐环境中,中华补血草可通过盐腺结构排出其体内过多的盐分,从而应对高盐胁迫,适应高盐生长环境^[12]. 而干旱胁迫则是对植物外部形态、内源激素、光合作用等方面产生影响,短期或轻度干旱会使叶片水势降低、气孔关闭,长期严重干旱则会抑制植株生长,甚至导致植物死亡^[13]. 但目前有关盐生植物的应答盐胁迫和干旱胁迫的机理了解较少,盐生植物中参与

收稿日期: 2018-03-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31370296),山东省泰山学者种业人才团队资助项目(Ntszy01).

作者简介: 艾丽花(1991-),女,河南三门峡人,硕士研究生.

通信作者: 陈世华(csh-yantai@163.com)副教授,博士,研究方向:植物发育与分子生物学;郭善利(gsl@ytu.edu.cn),教授,博士,研究方向:植物发育与分子生物学.

泌盐、抗旱相关基因在参与盐胁迫和离子胁迫中的作用研究相对较少. 笔者成功从中华补血草中克隆出了 *LsRab7* 的 cDNA 序列, 并对该基因在不同时间内的盐处理 (200 mmol/L NaCl) 和模拟干旱 (20% PEG-6000) 处理下的相对表达量进行了分析. 为研究该基因在中华补血草中的功能及中华补血草的耐逆分子机制奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 试剂

RNAprep pure 植物总 RNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; Fruit-mate for RNA Purification、克隆载体 pMD19-T、SYBR Premix Ex Taq(Tli RNaseH Plus) 购自宝生物工程(大连)有限公司; Reverse Transcriptase 试剂盒购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司; Taq DNA 聚合酶、dNTPs、 Mg^{2+} 购自上海生工生物工程公司; 大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存; 氯化钠、聚乙二醇-6000(PEG-6000) 等均为国产分析纯.

1.2 材料

中华补血草为本实验室温室栽培的生长 2 个月左右的幼苗. 实验所用材料选取长势一致的幼苗, 随机分为 2 组, 每组设 5 个处理(每个处理设置 3 盆重复). 第一组用 50 mL 的 1/2 Hoagland 营养液配成的 200 mmol/L NaCl 溶液浇灌处理, 分别处理 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h; 第二组用 50 mL 的 1/2 Hoagland 营养液配成的 20% PEG-6000 溶液浇灌处理, 分别处理 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h; 实验时保证在同一时间取材进行下一步实验.

1.3 方法

1.3.1 引物设计 利用 Primer premier 5.0 设计引物序列, 引物序列如下:

基因克隆引物:

LsRab7 - F CCAGGAAAGTAGAGAAAAGGAGA

LsRab7 - R AGGATTACGAAAACAATGGACAG

Q - PCR 引物:

内标基因引物:

LsEF - rt - F TGAGGAGGACAAGAAAGC

LsEF - rt - R TTGATGCCATACCCGACA

LsRab7 基因引物:

LsRab7 - rt - F TTCAGTCAACAGTATAAGGCC

LsRab7 - rt - R CATAAACCAAAACACAGCAAT

引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成.

1.3.2 中华补血草总 RNA 的提取及目的基因的克

隆 中华补血草 RNA 的提取参照 Fruit-mate RNA 提取试剂和 RNAprep pure 植物总 RNA 提取试剂盒操作说明. 取 1 μ g 中华补血草总 RNA 用于 cDNA 第一链合成, 作为 RT-PCR 模板, 方法参照 Reverse Transcriptase 试剂盒说明.

目的基因 PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min.

PCR 扩增得到的目的条带经切胶回收纯化后, 连接到 pMD19-T 载体, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 操作参见分子克隆实验指南^[14] 转化产物均匀涂布于含有 20 μ g/mL 的氨苄青霉素的固体 LB 平板培养过夜, 挑取单菌落经菌落 PCR 挑选阳性克隆, 提取独立克隆获得的 4 份质粒送至北京六合华大基因科技股份有限公司测序.

1.3.3 盐处理、模拟干旱处理下中华补血草总 RNA 提取及 qRT-PCR 分析 用 1.3.2 提取的总 RNA 反转录获取的 cDNA 为模板(方法参照 1.3.2) 模板稀释 20 倍后使用, 对引物进行优化, 选择最佳退火温度为 54 $^{\circ}$ C, 以中华补血草 *LsEF* 基因作为内标, 反应体系: 2 \times SYBR Green 7.5 μ L; 引物 F/R 0.75 μ L; 灭菌水 5.25 μ L; 模板 20 \times cDNA, 0.75 μ L. 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 10 s, 54 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 40 个循环. 每个样品做 3 个重复, 计算方法用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法.

2 结果与分析

2.1 *LsRab7* 基因的克隆

用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的中华补血草总 RNA, 结果如图 1, 电泳检测结果表明实验中得到的 RNA 质量及完整性较好. 以反转录后的 cDNA 为模板, 对 *LsRab7* 基因的序列进行 PCR 扩增, 对扩增的产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 2, 扩增出了大小在 750 bp 左右的目的条带.

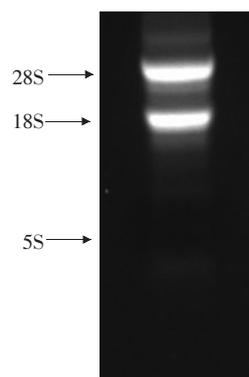
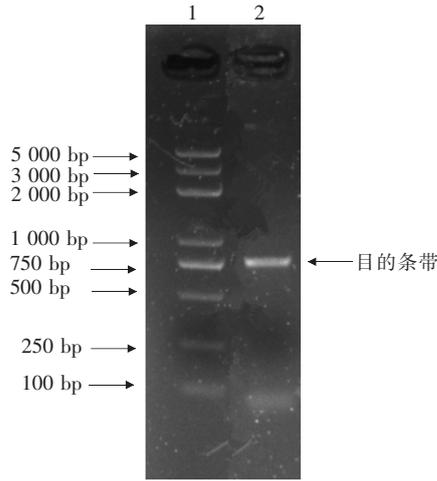


图 1 中华补血草总 RNA 琼脂糖电泳

Fig. 1 Total RNA of *Limonium sinense* in agarose electrophoresis



1. DNA marker2000plus; 2. *LsRab7* 基因

图 2 *LsRab7* PCR 产物电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis result of *LsRab7* PCR production

2.2 *LsRab7* 的氨基酸序列同源性分析及进化树分析

将 *LsRab7* 基因 PCR 扩增产物连接 pMD19 - T 后获得的阳性克隆质粒测序,得到的核苷酸片段为 757 bp 结果如图 3; 利用 NCBI ORF founder 分析表明 *LsRab7* 基因 ORF 为 618 bp,共编码 205 个氨基酸; 通过 ExPASy 服务器预测其理论等电点和相对分子质量分别为 5.67 和 22849.95.

将 *LsRab7* 氨基酸序列与 NCBI 网站上已知物种 (物种名与登录号见表 1) *Rab7* 基因编码的氨基酸序列用 DNAMAN 软件进行同源比对分析 结果如图 4 表明该类蛋白具有结合 GTP/GDP 所需的 5 个保守结构域: I 结合磷酸基的结构域; II 协调 GTP 的 β 和 γ - 磷酸基的序列; III Rab 家族共有的结构域; IV 强化鸟嘌呤结合的蛋白序列; V 协助鸟嘌呤结合和解离的序列.

```

1 GCAGGTCGACGATTCCAGGAAAGTAGAGAAAAGGAGAAAGCGGTTCTCCATCAAAGTCTTTCTTGAATCTTGTAGTTGATACCTCGAAGTTTGCAATTTTCATG
1 M
106 GCGACACGTAACCGAACGTTGCTTAAAGTCATTGTTCTTGGCGACAGTGGGGTGGGGAAGACCTCGTTGATGAACCAATATGTACATAAGAAATTCAGTCAACAG
2 A T R K R T L L K V I V L G D S G V G K T S L M N Q Y V H K K F S Q Q
211 TATAAGCCACAATAGGAGCAGATTTGTGACCAAGGAGCTCCAAATGATGACAACTGGTCACTTTACAAATATGGGATACCGCTGGTCAAGAGAGATTTCAA
37 Y K A T I G A D F V T K E L Q I D D K L V T L Q I W D T A G Q E R F Q
316 AGCCTTGGTGTTGCATTTTATAGAGGGGCGAGATTGCTGTGTTTTGGTTTTATGATATCAATGTCATGAAATCATTGATACGCTGAACAATTGGCATGAGGATTT
72 S L G V A F Y R G A D C C V L V Y D I N V M K S F D T L N N W H E E F
421 CTCAAACAGGCAATCCTCCAGACCCTAAGGCATTCCCATTCATCTTACTGGGAAATAAGGTTGATGTGGATGGTGAAGTAGCCGTGTGGTTTCTGAAAAGAAA
107 L K Q A N P P D P K A F P F I L L G N K V D V D G G S S R V V S E K K
526 GCAAAGGATTGGTGTGCTTCCAAAGGGAATATACCTTATTATGAGACATCAGCAAAAGAGGATATCAATGTGGATTCTGCATTTTCTGCATAGCCAAGGCTGCT
142 A K D W C A S K G N I P Y Y E T S A K E D I N V D S A F F C I A K A A
631 CTAGCGAATGAGCATGAGCAAGACATATATTTCCAAGGCATTCTGAAAGCTGTTTCTGAGGCCGAGCAGAGAAGTGGCTGTCCCTGCTAAGATTGTCCAACCTCAC
177 L A N E H E Q D I Y F Q G I P E A V S E A E Q R S G C A C *
736 ACCTACTGTCCATTGTTTTCT
    
```

图 3 中华补血草 *LsRab7* 基因序列及推导氨基酸序列

Fig. 3 The nucleotide acids sequence and induced amino acids sequence of *LsRab7* from *L. sinense* Kuntze

表 1 NCBI 网站各物种 *Rab7* 基因对应的物种名及序列登录号

Tab. 1 Species name and sequence accession number of *Rab7* gene corresponding to each species on NCBI website

物种名	序列登录号
<i>Spinacia oleracea</i>	XP_021859456.1
<i>Chenopodium quinoa</i>	XP_021737660.1
<i>Phaseolus vulgaris</i>	XP_007143599.1
<i>L. japonicus</i>	CAA98168.1
<i>Cajanus cajan</i>	XP_020231656.1
<i>Glycine max</i>	ACU24093.1
<i>Sesamum indicum</i>	XP_011074118.1
<i>Lupinus angustifolius</i>	XP_019449783.1
<i>Vigna aconitifolia</i>	XP_017415452.1
<i>Oryza sativa</i>	AAO67728.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_175355.1

	I	II	III	
Limonium_sinense_Rab7	MATRKRLLLKV I VLGDSGVGK I TSLMNOYVHKHKSQQYKATI GADFVTKELQI DDKLVTLQI	WDTAGQERFQSLGVAHYRGA	CCVLVYDI NVMKSFDTLNNWHEE	105
Spinacia_oleracea_Rab7	MATRRRLLLKVI VLGDSGVGK I TSLMNOYVHKHKSQQYKATI GADFVTKELQI DDRLVTLQI	WDTAGQERFQSLGVAHYRGA	CCVLVYDYNVMKSFDTLNDWHEE	105
Chenopodium_quinoa_Rab7	MSTRRLLLKVI VLGDSGVGK I TSLMNOYVHKHKSQQYKATI GADFVTKELQI DDRLVTLQI	WDTAGQERFQSLGVAHYRGA	CCVLVYDYNVMKSFDTLNDWHEE	105
Phaseolus_vulgaris_Rab7	MSLRRRLLLKVI VLGDSGVGK I TSLMNOYVHKHKSQQYKATI GADFVTKELQI DDRLVTLQI	WDTAGQERFQSLGVAHYRGA	CCVLVYDYNVMKSFDTLNDWHEE	105
L.japonicus_Rab7	MSLRRRLLLKVI VLGDSGVGK I TSLMNOYVHKHKSQQYKATI GADFVTKELQI DDRLVTLQI	WDTAGQERFQSLGVAHYRGA	CCVLVYDYNVMKSFDTLNDWHEE	105
Cajanus_cajan_Rab7	MSLRRRLLLKVI VLGDSGVGK I TSLMNOYVHKHKSQQYKATI GADFVTKELQI DDRLVTLQI	WDTAGQERFQSLGVAHYRGA	CCVLVYDYNVMKSFDTLNDWHEE	105
Glycine_max_Rab7	MSLRRRLLLKVI VLGDSGVGK I TSLMNOYVHKHKSQQYKATI GADFVTKELQI DDRLVTLQI	WDTAGQERFQSLGVAHYRGA	CCVLVYDYNVMKSFDTLNDWHEE	105
Sesamum_indicum_Rab7	MSLRRRLLLKVI VLGDSGVGK I TSLMNOYVHKHKSQQYKATI GADFVTKELQI DDRLVTLQI	WDTAGQERFQSLGVAHYRGA	CCVLVYDYNVMKSFDTLNDWHEE	105
Lupinus_angustifolius_Rab7	MSLRRRLLLKVI VLGDSGVGK I TSLMNOYVHKHKSQQYKATI GADFVTKELQI DDRLVTLQI	WDTAGQERFQSLGVAHYRGA	CCVLVYDYNVMKSFDTLNDWHEE	105
Vigna_aronitifolia_Rab7	MSLRRRLLLKVI VLGDSGVGK I TSLMNOYVHKHKSQQYKATI GADFVTKELQI DDRLVTLQI	WDTAGQERFQSLGVAHYRGA	CCVLVYDYNVMKSFDTLNDWHEE	105
Oryza_sativa_Rab7	MASRRRLLLKVI I LGDTGVGK I TSLMNOYVHKHKSQQYKATI GADFLTKVQVQEDRLFTLQI	WDTAGQERFQSLGVAHYRGA	CCVLVYDYNVMKSFDTLNDWHEE	105
Arabidopsis_thaliana_Rab7	MPSRRRLLLKVI I LGDSGVGK I TSLMNOYVHKHKSQQYKATI GADFLTKVQVQEDRLFTLQI	WDTAGQERFQSLGVAHYRGA	CCVLVYDYNVMKSFDTLNDWHEE	105
Consensus	m r r t l l k v i l g d s g v g k t s l m n o y v h k h k s q q y k a t i g a d f l t k e l q i d d r l v t l q i w d t a g q e r f q s l g v a h y r g a c c v l v y d i n v m k s f d t l n n w h e e			
	IV	V		
Limonium_sinense_Rab7	FLKQANPPDPKAFPFI LLGNKVDI	DGGNSRVVSEKKAQDWCASKGNI PYYETS AKEDI NVDS AFFCI	AKAALANEHQDI YFQGI PEA VSEAEQRS GCA	204
Spinacia_oleracea_Rab7	FLKQANPPDPKAFPFI LLGNKDI	DGGNSRVVSEKKAQDWCASKGNI PYYETS AKEDI NVDA AFLCI	AKAALANEREQDI YFQGI PEA VPETEQRG GCA	203
Chenopodium_quinoa_Rab7	FLKQANPPDPKAFPFI LLGNKDI	DGGNSRVVSEKKAQDWCASKGNI PYYETS AKEDI NVDA AFLCI	AKAALANEREQDI YFQGI PEA APETEQRG GCA	203
Phaseolus_vulgaris_Rab7	FLKQANPPDPRTFPFI LLGNKDI	DGGNSRVVSEKKAQDWCASKGNI PYYETS AKEDF NVDA AFLCI	AKAALANEHQDI YFQGI PEA AAVPEQRG GCA	205
L.japonicus_Rab7	FLKQANPPDPRTFPFI LLGNKDI	DGGNSRVVSEKKAQDWCASKGNI PYYETS AKEDY NVDA AFLCI	AKTALANEHQDI YFQAI PEA APENEQKG GCQ	204
Cajanus_cajan_Rab7	FLKQANPPDPRTFPFI LLGNKDI	DGGNSRVVSEKKAQDWCASKGNI PYYETS AKEDY NVDA AFLCI	AKAALANEREQDI YFQGI PEA AAVPEQRG GCS	205
Glycine_max_Rab7	FLKQANPPDPRTFPFI LLGNKDI	DGGNSRVVSEKKAQDWCASKGNI PYYETS AKEDY NVDA AFLCI	AKAALANEHQDI YFQGI PEA AAVPEQRG GCA	205
Sesamum_indicum_Rab7	FLKQANPPDPRTFPFI LLGNKDI	DGGNSRVVSEKKAQDWCASKGNI PYYETS AKEDY NVDA AFLSI	AKTALANEHQDI YFQGMPEA VSETEQGG GCA	204
Lupinus_angustifolius_Rab7	FLKQANPPDPRTFPFI LLGNKDI	DGGNSRVVSEKKAQDWCASKGNI PYYETS AKEDY NVDA AFLSI	AKTALANEHQDI YFQVPEP VPEPEQRG GCA	204
Vigna_aronitifolia_Rab7	FLKQANPPDPRTFPFI LLGNKDI	DGGNSRVVSEKKAQDWCASKGNI PYYETS AKEDF NVDA AFLCI	AKAALANEHQDI YFQGI PEA AAVPEQRG GCA	205
Oryza_sativa_Rab7	FLI QASPSDPDNFPFVLLGNKVDI	DGGNSRVVSEKKAQDWCASKGNI PYYETS AKDGT NVEEAFQCI	VKNALKNPEEELVYPTDVTVDVGGNRAPRSGCC	206
Arabidopsis_thaliana_Rab7	FLI QASPSDPDNFPFVLLGNKVDI	DGGNSRVVSEKKAQDWCASKGNI PYYETS AKDGT NVEEAFQCI	VKNALKNPEEELVYPTDVTVDVGGNRAPRSGCC	206
Consensus	f l i q a p d p f p f g n k d d g r s r v v s e k k a q d w c a s k g n i p y y e t s a k e d i n v d s a f f c i a k a a l a n e h q d i y f q g i p e a v s e a e q r s g c a			

图 4 中华补血草 *LsRab7* 基因与其他植物 *Rab7* 基因的氨基酸序列多重比对

Fig. 4 Amino acid sequence alignment multi-alignment of *LsRab7* with *LsRab7* homologs in plant

利用 Clustalx、Bioedit 和 MEGA6 软件相结合对 *LsRab7* 与表 1 各个物种 *Rab7* 氨基酸序列建立系统发育邻接树(Neighbor Joining tree ,NJ tree) ,经过 bootstrp 1 000 次检验 ,结果如图 5 ,中华补血草

LsRab7 基因与双子叶植物藜科的菠菜(*Spinacia oleracea*) *Rab7* 基因和藜麦(*Chenopodium quinoa Willd*) *Rab7* 基因同源性最高 ,亲缘关系最近.

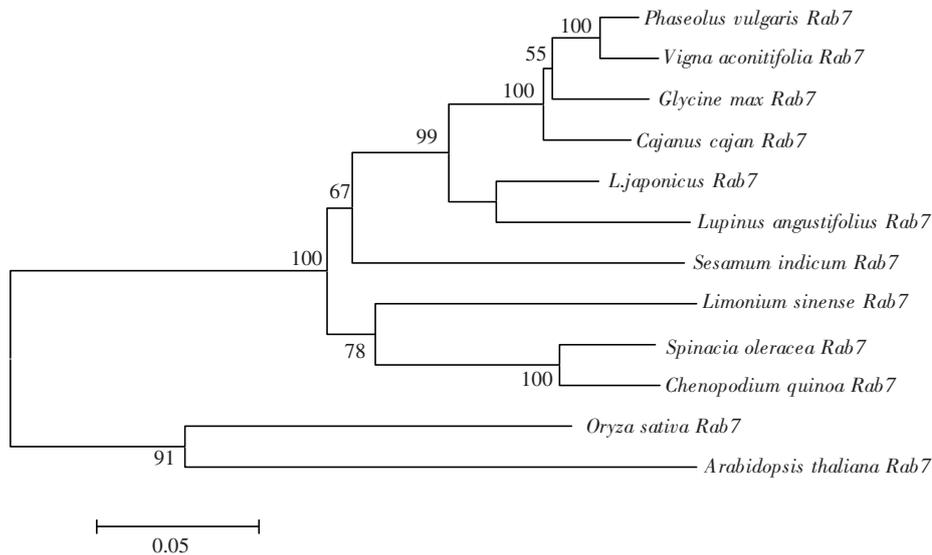


图 5 中华补血草 *LsRab7* 基因的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of *LsRab7* and its orthologues in other species

2. 3 200 mmol/L NaCl 盐胁迫在不同处理时间条件下 *LsRab7* 基因的相对表达量分析

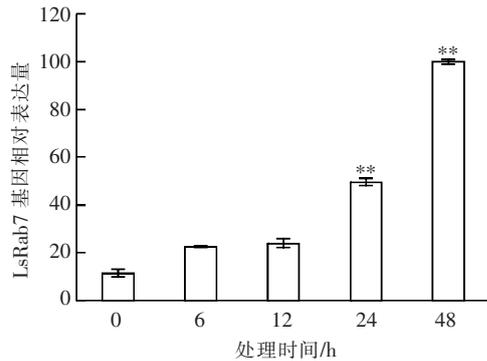
利用 qRT - PCR 技术分析 200 mmol/L NaCl 盐胁迫处理 0 , 6 , 12 , 24 , 48 h 的中华补血草 *LsRab7* 基因的相对表达量 ,实验选取中华补血草 *LsEF* 基因作为内标基因 ,实验数据利用 SPSS19. 0 软件进行显著性检验 ,结果如图 6 所示. 盐胁迫处理下 ,*LsRab7* 基因的表达水平随处理时间的增加呈逐渐上升的趋

势 ,在处理 48 h 时其表达量达到最高.

2. 4 20% PEG - 6000 模拟干旱处理条件下不同时间内基因的相对表达量分析

利用 qRT - PCR 技术分析 20% PEG - 6000 模拟干旱胁迫处理 0 , 6 , 12 , 24 , 48 h 的中华补血草 *LsRab7* 基因的相对表达量 ,内标基因同 2. 3 ,实验数据利用 SPSS19. 0 软件进行显著性检验 ,结果如图 7 所示. 在模拟干旱胁迫处理下 *LsRab7* 基因的表达呈

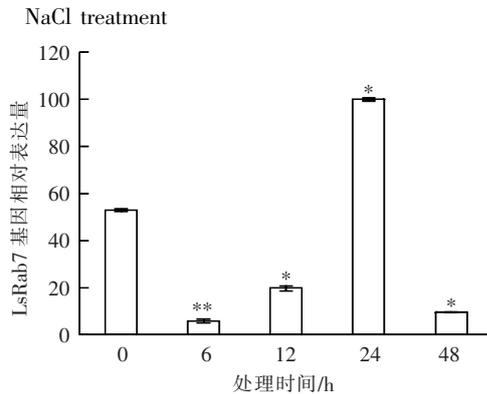
先下降后升高再下降的趋势, 20% PEG-6000 处理 24 h 时其表达量达到最高。



图中数据为 3 次重复实验的平均值 \pm SD, * 和 ** 分别代表了各处理时间与处理 0 h 相比基因相对表达量呈显著水平 ($P \leq 0.05$) 和极显著水平 ($P \leq 0.01$)

图 6 200 mmol/L NaCl 处理下 *LsRab7* 基因表达分析

Fig. 6 The expression analysis of *LsRab7* gene at 200 mmol/L



图中数据为 3 次重复实验的平均值 \pm SD, * 和 ** 分别代表了各处理时间与处理 0 h 相比基因相对表达量呈显著水平 ($P \leq 0.05$) 和极显著水平 ($P \leq 0.01$)

图 7 20% PEG-6000 处理下 *LsRab7* 基因表达分析

Fig. 7 The expression analysis of *LsRab7* gene at 20% PEG-6000 treatment

3 讨论

Rab7 作为一个小 GTP 结合蛋白, 广泛分布于真核生物中, 与真核生物细胞的信号传导、细胞增殖、囊泡运输和细胞支架的结构建成密切相关^[15]。Rab 蛋白在进化上的保守性及该基因的突变体引发的囊泡运输产生缺陷的特性引起普遍关注^[16]。目前国内外研究主要集中在对水稻和人体中 Rab 基因的克隆、蛋白表达及功能上^[15, 17-18], 但目前有关补血草属中泌盐盐生植物 Rab 蛋白的研究还鲜有报道。本实验成功克隆获得了中华补血草 Rab7 基因, 通过对其 cDNA 序列及推导的氨基酸序列进行多序列比对, 表明该蛋白具有结合 GTP/GDP 所需的 5 个保守

结构域: 结合磷酸基的结构域; 协调 GTP 的 β 和 γ -磷酸基的序列; Rab 家族共有的结构域; 强化鸟嘌呤结合的蛋白序列; 协助鸟嘌呤结合和解离的序列。将其氨基酸序列与其他植物进行系统进化树分析发现, 本实验克隆得到的中华补血草 *LsRab7* 基因与双子叶植物藜科的菠菜 (*Spinacia oleacea*) Rab7 基因和藜麦 (*Chenopodium quinoa Willd*) Rab7 基因具有较高的同源性和亲缘关系。

土壤盐渍化、干旱已成为限制世界范围内农业生产、危及全球粮食安全的重要问题^[8, 19]。土壤中高浓度的盐分会使离子失衡、水分缺失、氧化伤害、营养缺乏、使生物大分子遭到破坏、植株生长缓慢, 严重时甚至导致死亡^[20]。而干旱则会造成组织和细胞脱水, 直接影响细胞内膜结构、膜透性, 进而破坏细胞的酶分室, 造成细胞内酶系统紊乱, 影响植物正常的物质和能量代谢, 从而导致植物细胞死亡^[19]。近年来, 随着分子生物学技术的快速发展, 大量与耐盐、抗旱相关的基因已经被定位、克隆以及功能分析, 这都有力促进了人们对植物应答盐胁迫、干旱胁迫分子机理研究的深入和人们对植物耐逆分子机制的了解^[21-22]。研究表明, 高盐和干旱胁迫不仅会引起水分和离子胁迫, 又会对细胞产生二级胁迫, 在细胞内积累过量活性氧类物质, 破坏细胞膜以及一些大分子从而对植物造成损伤, 比如过氧化氢等。高盐和干旱胁迫下, 植物体内的活性氧明显增多, 过多的活性氧会攻击蛋白质的氨基酸残基使酶类失活, 产生 OH^- , 导致碱基突变、DNA 链断裂、膜脂过氧化以及蛋白质的降解或损伤^[23-25]。本实验通过对中华补血草在盐处理和模拟干旱处理下 *LsRab7* 基因的表达量进行分析, 发现中华补血草 *LsRab7* 基因的表达量在 200 mmol/L NaCl 盐胁迫处理下表达量呈现不断上升的趋势, 表明 *LsRab7* 基因表达受盐胁迫诱导, 可能通过 *LsRab7* 相关的膜泡运输过程参与了中华补血草的盐胁迫应答; 在 20% PEG-6000 模拟干旱胁迫处理下, 中华补血草 *LsRab7* 基因的表达量呈现先下降后升高的趋势, 在处理 24 h 时其表达量达到最高, 表明该基因可能与中华补血草的抗旱性也存在一定的关系。但目前对 *LsRab7* 基因在中华补血草应答盐胁迫、干旱胁迫的机制还不清楚, 本实验中, 该基因的克隆和应答盐胁迫、干旱胁迫的基本特性分析对深入研究该基因的功能及膜泡运输在参与泌盐盐生植物盐胁迫和干旱胁迫应答中的作用奠定了基础。

参考文献:

[1] 李媛媛, 安艳秋, 王凤涛, 等. 小麦中小 GTP 结合蛋

- 白基因 *TaRop2* 克隆及其表达分析[J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(2): 315-322.
- [2] 吴珣. 甘蓝型油菜抗旱耐盐相关基因 *BnSDIR1* 和 *Bn-Rab7* 的克隆及功能鉴定[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- [3] MARTINEZ O, GOUD B. Rab proteins[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1998, 1404(1-2): 101.
- [4] OLKKONEN V M, STENMARK H. Role of Rab GTPase in membrane traffic [J]. *International Review of Cytology*, 1997, 176: 1-85.
- [5] 崔亮. 凡纳滨对虾 *Rab5B*、*Rab6A* 和 *Rab7* 基因的克隆及序列分析[D]. 南宁: 广西大学, 2012.
- [6] 曾欣. 囊泡运输相关基因 *OsRab7* 在水稻抗盐中的功能[D]. 南昌: 南昌大学, 2012.
- [7] 杨晓华, 彭晓珏, 杨国华, 等. 水稻 *OsRab7* 耐盐功能的初步鉴定及其表达载体的构建[J]. 植物科学学报, 2008, 26(1): 1-6.
- [8] PENG X, DING X, CHANG T, et al. Overexpression of a vesicle trafficking gene, *OsRab7*, enhances salt tolerance in rice[J]. *The Scientific World Journal* 2014 (2014-2-12), 2014, 2014(2): 483526.
- [9] MAZEI A, LESHEM Y, TIWARI B S, et al. Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein *AtRab7* (*AtRabG3e*) [J]. *Plant Physiology*, 2004, 134(1): 118-128.
- [10] 丁烽. NaCl 和 KCl 处理对中华补血草叶片盐腺发育及其泌盐速率的影响[D]. 济南: 山东师范大学, 2007.
- [11] 刘瑜, 陈世华, 尹海波, 等. 中华补血草金属硫蛋白基因的克隆及高盐处理下的表达模式分析[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2011, 24(2): 121-125.
- [12] 张莹, 陈世华, 韩会玲, 等. 中华补血草 *Syntaxin* 基因的克隆[J]. 安徽农业科学, 2012(6): 261-264.
- [13] 张金政, 张起源, 孙国峰, 等. 干旱胁迫及复水对玉簪生长和光合作用的影响[J]. 草业学报, 2014, 23(1): 167-176.
- [14] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔, 萨姆布鲁克, 等. 分子克隆实验指南[M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [15] NAHM M Y, KIM S W, YUN D, et al. Molecular and biochemical analyses of *OsRab7*, a rice *Rab7* homolog[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2003, 44(12): 1341-1349.
- [16] 向小华, 宋琳, 裴玉贺, 等. 花生 *AhRab7* 基因的克隆及其原核表达研究[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(4): 686-693.
- [17] 吴冰艳, 肖惠, 吴文林. 人 *Rab7* 基因的原核表达与多克隆抗体制备[J]. 泉州师范学院学报, 2014(2): 23-26.
- [18] 何冬花. *Rab7b* 在白血病 K562 细胞向巨核细胞分化过程中的作用及机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2009.
- [19] 俞嘉宁. 小麦耐旱、耐盐相关基因的克隆、分析与功能研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2003.
- [20] 罗秋香, 管清杰, 金淑梅, 等. 植物耐盐性分子生物学研究进展[J]. 分子植物育种, 2006, 4(s2): 57-64.
- [21] 王玉军. 植物耐逆相关基因的克隆与功能研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2003.
- [22] 柴宝峰, 刘利民. 植物抗旱性的分子生物学研究进展[J]. 山西大学学报(自然科学版), 1999(4): 400-405.
- [23] 刘昀, 邓银霞, 郑易之. 植物耐盐的分子机理研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(12): 6087-6089.
- [24] 苏金, 朱汝财. 渗透胁迫调节的转基因表达对植物抗旱耐盐性的影响[J]. 植物学报, 2001, 18(2): 129-136.
- [25] 唐益苗, 赵昌平, 高世庆, 等. 植物抗旱相关基因研究进展[J]. 麦类作物学报, 2009, 29(1): 166-173.

Cloning of *LsRab7* Gene from *Limonium sinense* and Expression Analysis Under Salt and Drought Stress

AI Li-hua, JIANG Xi-lei, JIA Bing-chen, WANG Yu, CHEN Shi-hua, YIN Hai-bo, GUO Shan-li

(School of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005, China)

Abstract: The cDNA sequence of *LsRab7* gene is obtained from *Limonium sinense* Kuntze using RT-PCR. The NCBI ORF founder analysis show that this gene contains one open reading frame of 618 bp, and encodes a protein with 205 amino acid residues. Using the ExPASy server, we predict the molecular weight is 22 849.95 and the theoretical isoelectric point is 5.67. qRT-PCR analysis results show that the expression of *LsRab7* gene is increased in a certain period of time under the condition of salt or drought treatment, indicating that *LsRab7* may be involved in the anti-retrogradation reaction of *Limonium sinense* Kuntze, laying a foundation for exploring the molecular mechanisms of stress resistance of *Limonium sinense* Kuntze.

Key words: *Rab7*; *Limonium sinense* Kuntze; stress treatment; quantitative expression analysis

(责任编辑 周雪莹)