河南农业科学,2014,43(9):18-23
Journal of Henan Agricultural Sciences

水稻 *OsLEA5c* 基因的克隆、表达和抗逆性分析

胡廷章,杨俊年,周大祥,黄小云,陈再刚
(重庆三峡学院 生命科学与工程学院,重庆 404000)

摘要:为了研究水稻胚胎发育后期丰富蛋白基因 *OsLEA5c* 的抗逆性,利用 RT-PCR 技术从水稻中克隆到 *OsLEA5c* 的 cDNA。序列分析表明,*OsLEA5c* 基因的读码框为 456 bp,编码 1 个由 151 个氨基酸残基组成的蛋白。蛋白分子量为 16.55 kD,等电点为 5.07。OsLEA5c 蛋白的平均亲水系数(GRAVY)为 0.020,为疏水蛋白。OsLEA5c 蛋白的 44－140 位氨基酸残基形成 LEA_2 结构域。进化树分析表明,OsLEA5c 属于第 5 组 LEA 蛋白的 C 亚组。OsLEA5c 与 5C 亚组 LEA 蛋白的氨基酸一致性为 45.14%～61.59%。利用基因重组技术构建的原核表达载体 pET32a-OsLEA5c,转化到 *E. coli* BL21 pLysS 菌株中,诱导得到 34 kD 的融合蛋白。OsLEA5c 在大肠杆菌中的表达增加了大肠杆菌对高温、高盐、高渗透压和反复冻融的抗性。*OsLEA5c* 基因在水稻抗逆和种子成熟脱水过程中发挥重要作用。

关键词:水稻;胚胎发育后期丰富蛋白;*OsLEA5c* 基因;表达;抗逆性
中图分类号:S511　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1004-3268(2014)09-0018-06

Cloning, Expression and Resistance Analysis of *OsLEA5c* in Rice(*Oryza sativa* L.)

HU Ting-zhang, YANG Jun-nian, ZHOU Da-xiang, HUANG Xiao-yun, CHEN Zai-gang
(School of Life Science and Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404000, China)

Abstract: To study the resistance of the late embryogenesis abundant protein gene *OsLEA5c*, the cDNA sequence of *OsLEA5c* from rice was cloned by RT-PCR. Sequence analysis showed that *OsLEA5c* consisted of 456 bp open reading frame(ORF) that encoded 151 amino acids with a calculated molecular mass of 16.55 kD and a theoretical pI of 5.07. The deduced OsLEA5c protein was a strongly hydrophobic protein with the grand average of hydropathy(GRAVY) value of 0.020 and had a Pfam:LEA_2 domain architecture at position 44－140. The OsLEA5c protein shared 45.14% － 61.59% identity with other members of subgroup 5C LEA proteins from plants. The phylogenetic relationship between related group 5 LEA proteins from different plants was analyzed, indicating that OsLEA5c belonged to subgroup 5C. Recombinant expression plasmid pET32a-OsLEA5c was constructed, and then was transformed into *E. coli* BL21(DE3) pLysS to obtain the recombinant strains. A fusion protein with a molecular weight of about 34 kD was expressed in the recombinant strains. The results of stress tolerance assay demonstrated that the recombinant strains producing OsLEA5c fusion protein improved the resistance against diverse abiotic stresses, such as heat, high salinity, hyperosmosis and freeze-thaw. The findings illustrated that *OsLEA5c* plays an important role in resistance against diverse abiotic stresses during the maturation and desiccation phases of rice seed development.

Key words: *Oryza sativa* L.; late embryogenesis abundant protein; *OsLEA5c* gene; expression; resistance

收稿日期:2014-03-30
基金项目:重庆市自然科学基金项目(CSTC,2012jjA80009);重庆市教委科学技术研究项目(KJ131101)
作者简介:胡廷章(1965-),男,四川简阳人,教授,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:tzhu2002@foxmail.com

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

我国是世界最大的水稻生产国和消费国，水稻是我国第一大粮食作物。水稻生产不仅担负确保我国粮食安全的重任，而且肩负实现种粮增效、稻农增收和全面推进新农村建设的重大使命。但是，在水稻生产过程中，高温、干旱、低温、洪涝、病虫害等生物和非生物逆境因子都会引起水稻减产、降低稻米品质，从而造成巨大的经济损失。采用分子生物学手段，从水稻中克隆抗逆关键基因，在分析基因功能的基础上，将其转化到目标水稻品种中，是改良水稻品种的一种有效手段，对于提高人们生活水平和增加农民经济收入都有着重要意义。

胚胎发育后期丰富蛋白(late embryogenesis abundant protein，LEA)广泛存在于高等植物中，自 1981 年从棉花胚胎发育后期的子叶中发现 LEA 蛋白[1]以来，在近 20 种高等植物发育种子中均检测到 LEA 蛋白，在细菌、真菌和动物中也发现 LEA 蛋白基因的存在[2-4]。不同类型 LEA 蛋白的功能存在差异，但其主要在植物抵抗干旱、高盐、高渗透压、低温、损伤等方面发挥作用[5-8]。LEA 蛋白家族基因的表达受植物的发育阶段控制，许多 LEA 蛋白家族基因伴随着种子或胚胎的成熟大量表达，而在种子萌发时很快消失，这是 LEA 蛋白基因在植物种子发育过程中呈现的特定表达模式[9]，因此，LEA 蛋白是水稻、玉米、小麦等重要粮食作物种子的重要成分。利用 LEA 家族基因改良作物，不仅可以提高作物的抗逆性，而且可以提高稻米、面粉的蛋白含量，改善其品质。

在研究水稻抗逆机制的过程中，根据 GenBank 中查找到的基因候选序列，克隆到了 1 个 LEA 蛋白基因 *OsLEA5c*，对其编码蛋白特征进行了分析，并在大肠杆菌中表达了 OsLEA5c 蛋白，检测 *OsLEA5c* 转化大肠杆菌抵抗高温、高盐、高渗透和冻融的能力，以期为该基因在生产上的应用奠定基础。

1　材料和方法

1.1　植物材料及主要试剂

将中花 11 号水稻(*Oryza sativa* cv. Zhonghua 11)种子用蒸馏水洗涤多次后，28 ℃培养箱中浸种 2～3 d，待水稻萌发露白后播种到装有营养土的小桶中，在自然条件下生长。取水稻幼苗的叶片，用于水稻 RNA 的提取。

大肠杆菌 TOP 10 菌株、BL21 (DE3) pLysS 菌株和表达质粒 pET-32a(＋)均为重庆三峡学院生命科学与工程学院实验室保存。TRIzol 试剂、反转录试剂盒、PMD18-T 载体、DNA 胶回收试剂盒、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、SYBR Premix Ex TaqTM(Perfect Real Time)试剂盒等购于 TaKaRa 公司。引物由上海英俊生物技术有限公司合成，其他常规药品均为分析纯。

1.2　RNA 提取和 *OsLEA5c* 基因 cDNA 的克隆

参照 TRIzol 使用说明书，采用 TRIzol 试剂一步法提取水稻总 RNA。变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性，紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度。取 1 μg RNA 为反转录模板，RNA 反转录参见 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0 试剂盒说明书进行。

根据 GenBank 中查找到的 *OsLEA5c* 基因候选序列(NP_001056449)，用序列处理在线工具包(SMS)生物软件网 http://www.bio-soft.net/sms 查找其最大开放阅读框序列，采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 OsLEA5c f (5′-GATAATTTCACTCCAGCGTGC-3′)和 OsLEA5c r(5′-CGGAGTTGGTTGATGAGATTA-3′)。以水稻幼苗的 cDNA 为模板，利用引物 OsLEA5c f 和 OsLEA5c r 扩增 *OsLEA5c* 基因的读码框序列。序列扩增条件为 94 ℃变性 2 min；94 ℃ 30 s、56 ℃ 30 s、72 ℃ 1 min，循环 35 次；72 ℃延伸 10 min。电泳回收扩增产物，与 pMD18-T 载体连接，转化 *E. coli* TOP 10，在 PCR 初步鉴定的基础上，提取质粒酶切鉴定，阳性克隆送交上海英俊生物技术有限公司进一步测序鉴定。

1.3　OsLEA5c 蛋白的生物信息学分析

用序列处理在线工具包(SMS)生物软件网 http://www.bio-soft.net/sms 将 *OsLEA5c* 基因核苷酸序列翻译为蛋白序列，在线分析(http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam)蛋白的氨基酸组成、分子量、等电点、不稳定系数和亲水系数，采用 Pfam 程序(http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/)进行结构域在线分析，使用在线网站(http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale)构建蛋白亲水性图谱，采用 iPOSORT(http://ipsort.hgc.jp/)预测蛋白的信号肽和亚细胞定位，采用 DNAMAN 软件计算蛋白序列的一致性、构建进化树，采用 ClustalW2.0(http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)进行多序列比对。

1.4　构建表达载体与融合蛋白的诱导表达

根据 *OsLEA5c* 基因序列，设计正向引物 OsLEA5c-b f(5′-CATGCCATGGGCATGTCGAGCTTGATGGAC -3′)和反向引物 OsLEA5c-b r(5′-CCCAAGCTTCGGAGTTGGTTGATGAGA-3′)，在引物中分别引入 *Nco* Ⅰ和 *Hin*d Ⅲ 酶切位点，以

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

OsLEA5c 为模板，扩增 *OsLEA5c* 的读码框序列。将扩增序列克隆到 pET32a 载体的 *Nco* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ酶切位点之间，转化 *E. coli* TOP10，经菌落 PCR 初步鉴定、*Nco* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切鉴定和测序鉴定，得到正确的表达载体 pET32a-OsLEA5c。用 pET32a-OsLEA5c 质粒转化的 *E. coli* BL21(DE3) pLysS，命名为 BL/OsLEA5c。pET32a 转化的 *E. coli* BL21(DE3) pLysS 命名为 BL/pET32a。

分别挑取 BL/OsLEA5c 和 BL/pET32a 单菌落，接种到含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中，振荡培养 16 h 后，以 1∶100 转接到含 1 000 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中，37 ℃振荡培养 2～3 h，当 OD_{600} 为 0.6～0.8，加入 IPTG 至其终浓度为 0.8 mmol/L，37 ℃培养 4 h，诱导表达。收集诱导前和诱导表达后的菌液，进行 SDS-PAGE 电泳、考马斯亮蓝染色。

1.5 重组大肠杆菌的抗逆性分析

将 BL/OsLEA5c 和 BL/pET32a 用 IPTG 诱导培养 4 h 后，将菌液调节至 OD_{600} 为 1.0。为了测试重组菌的抗盐能力和抗渗透压能力，在含 100 μg/mL 氨苄青霉素和 0.8 mmol/L IPTG 的 LB 培养基中分别加入 0、100、200、300、400、500、600 mmol/L NaCl 和 600、800、1 000、1 200、1 400、1 600 mmol/L 的山梨醇，取 100 μL 稀释 10 倍的菌液，分别涂布于上述培养基制成的平板中。为了测试重组菌的抗高温能力，取 1 mL 菌液进行高温(50 ℃)处理，分别于处理 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h 时取出 100 μL 样品，将样品稀释 10 倍后取 100 μL 涂于含 100 μg/mL 氨苄青霉素和 0.8 mmol/L IPTG 的 LB 平板。为了测试重组菌的抗冻融能力，取 1 mL 菌液在－80 ℃冷冻 30 min，置于室温解冻 30 min，分别冻融循环 0、2、4、6、8、10、12 次，各取出 100 μL 样品，将样品稀释 10 倍后取 100 μL 涂于含 100 μg/mL 氨苄青霉素和 0.8 mmol/L IPTG 的 LB 平板。将涂布的平板于 37 ℃培养，菌落计数。

2 结果与分析

2.1 *OsLEA5c* 基因的分离

采用 RT-PCR 技术，从中花 11 号水稻幼苗中分离到 1 个约 520 bp 的特异片段。利用 TA 克隆策略将该 cDNA 片段直接克隆到 PMD18-T 载体中，连接转化大肠杆菌 TOP 10，经 PCR 和酶切鉴定，进一步测序确证分离到的片段与 *OsLEA5c* 基因候选序列一致。

2.2 *OsLEA5c* 基因编码蛋白

OsLEA5c 含有 456 bp ORF(open reading frame)，起始密码子是 ATG，终止密码子是 TAA，编码的蛋白由 151 个氨基酸残基组成，该蛋白富含亮氨酸(9.93%)、丝氨酸(8.61%)和天冬氨酸(8.61%)，色氨酸和谷氨酰胺含量低，分别为 1.32%和 0.66%。蛋白分子量为 16.55 kD，等电点为 5.07，是一种酸性蛋白；不稳定参数为 23.54，属于稳定蛋白。在 44－140 位氨基酸处含有 LEA 家族第 5 组 C 亚组的特征结构域 LEA_2(PF03168，1e-20)，说明该蛋白属于 LEA 家族第 5 组 C 亚组。由于 OsLEA5c 蛋白没有 N-端信号肽，也没有跨膜区，推测 OsLEA5c 蛋白定位于细胞质中。

2.3 OsLEA5c 蛋白的疏水性/亲水性分析

疏水性/亲水性分析显示，OsLEA5c 蛋白是疏水蛋白，平均亲水系数(GRAVY)为 0.020，3 个主要的疏水区分布在蛋白序列 C-端的结构域 LEA_2 中(图 1)。

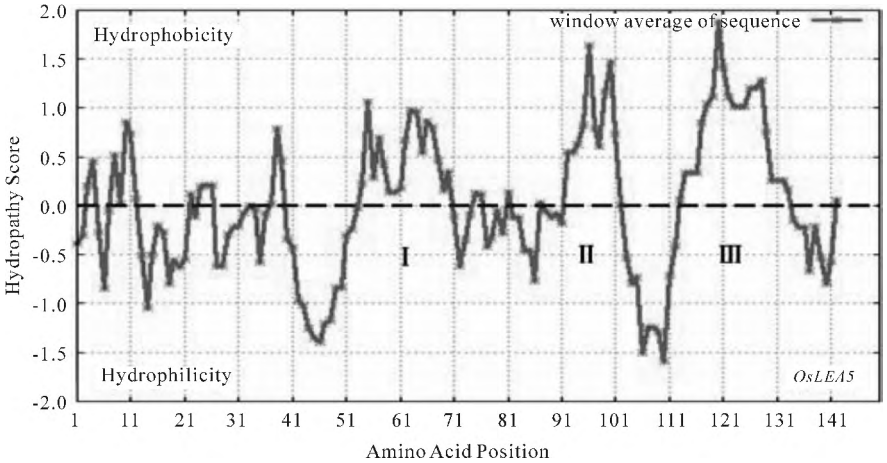
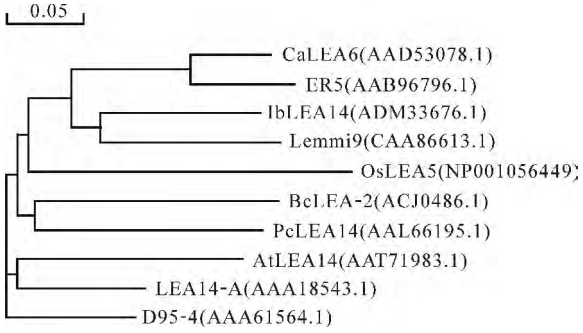


图 1 OsLEA5c 蛋白的疏水性和亲水性分析

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.4　OsLEA5c 蛋白的系统进化树和同源性分析

为了解植物的胚胎发育后期蛋白 5C 亚组蛋白间的亲缘关系，分析来自不同植物的 5C 亚组 LEA 蛋白的系统发生和同源性。5C 亚组 LEA 蛋白进化分析结果见图 2。水稻 OsLEA5c(NP_001056449)蛋白和其他 5C 亚组 LEA 蛋白都具有特征结构域 LEA_2 (PF03168，1e-20)(图 3)。同源性分析表明，OsLEA5c 与 5C 亚组 LEA 蛋白的一致性为 45.14%～61.59%，与陆地棉 Lea14-A(AAA18543.1)、大豆 D95-4 (AAA61564.1)、拟南芥 AtLEA14 (AAT71983.1)、西洋梨 PcLEA14(AAL66195.1)、甘薯 IbLEA14 (ADM33676.1)、辣椒 CaLEA6 (AAD53078.1)、北柴胡 BcLEA-2(ACJ04786.1)、番茄 ER5(AAB96796.1)、番茄 Lemmi9(CAA86613.1) 蛋白的一致性分别为 61.59%、60.53%、52.98%、50.98%、50.93%、49.39%、49.02%、48.47%、45.14%(图 3)。



括号中为蛋白在 GenBank 上的登录号

图 2　5C 亚组 LEA 蛋白进化分析

```
Lea14-A     --MSQLLEKAKDFVVDKVANIKKPEASVSDVDLKHVSRECVEYGAKVSVSNPYSHSIPIC  58
AtLEA14     --MASLLDKAKDFVADKLTAIPKPEGSVTDVDLKDVNRDSVEYLAKVSVTNPYSHSIPIC  58
D95-4       --MSQLLDKAKNYVAEKVTNMPKPEASVTDVDFKRVSRDSVEYLAKVSVSNPYSTPIPIC  58
PcLEA14     MAEQGFMDKAKNFVTDKISNVAKPEAEVTDVDFKKMGLSHVEYLSKVSVTNPYSHSIPIC  60
BcLEA-2     --MSSLLGKAKDYVSEKIADMKKPEAEVLDVDLKDVSRSCIIYDAKVSVTNPYSTSVPIC  58
IbLEA14     ---MDLVDKAKNFVGEKLAEMEKPEASIADVDIKGVGFDGFSFLAKVDVKNPYSVPIPIC  57
Lemmi9      ---MDLIDKAKNFVSEKIANMEKPEATITDVDLKGIGFDGLAFHAKVSVKNPYSVPIPIM  57
ER5         --MADFMEKAMDFVSDKV---EKPEADITDFDLKKVSMDSISYHAKVAVKNPYSVPVPIM  55
CaLEA6      --MADLMEKAKNYVVEKVGNMEKPEAEITDVDMKKVSMDSISYHANVAVKNPYSVPVPIM  58
OsLEA5      --MSSLMDKAKGFVAEKIAHIPKPEASLDSLSFKGMSRECITVHSNVNVSNPYDHRLPIC  58
                ::  **  .:* :*:    ***. : ...:* :. . .   ::* *.***.  :**

Lea14-A     EISYNFRSAGRGIASGTIPDPGSLKASDTTMLDVPVKVPYNILVSLVKDIGADWDIDYEL  118
AtLEA14     EISFTFHSAGREIGKGKIPDPGSLKAKDMTALDIPVVVPYSILFNLARDVGVDWDIDYEL  118
D95-4       EIKYSLKSAGKEIASGTIPDPGSLKASDTTMLDVPVKVPHSILLSLAKDIGADWDIDYQL  118
PcLEA14     DIKYTLKSVNREIASGTIPDPGSLKASDITVLEVLLKVPHSILVTLAKDLGADWDFDYEL  120
BcLEA-2     DITYCLKSNSREIASGTVPDPGSLKGKDITMLDVALKVPHNVLMSLAKDIGADWDIDYEL  118
IbLEA14     EIKYELKSAGRVIASGTIPDPGSIKGKDTTALDVAVKVPHSVVVNLARDIGGDWDIDYQL  117
Lemmi9      EIDYVLKSATRVIASGRIPDPGSIKANDSTMLDVPVKVPHSVLVSLVRDIGGDWDVDYTL  117
ER5         QISYTLKCSGRVIVSGTIPDPGNIKANDTTILDVPVKVPHSMLVSLGKDIGKDWDIDYKL  115
CaLEA6      QISYALKCSGRIIVSGTIPDPGNIKANDTTMLDVPVKVPHSVLVSLAKDIGKDWDIDYTL  118
OsLEA5      ELTYTLKCAGNVVASGTMPDPGWIAASDTTKLEIPAKIPYDFLISLVKDVGRDWDIDYQL  118
            :: : ::.  . : .* :**** : ..* * *::   :*:..:..* :*:* ***.** *

Lea14-A     ELGLTIDLPIVGNFTIPLSQKGEIKLPTLSDIF---------------------------  151
AtLEA14     QIGLTIDLPVVGEFTIPISSKGEIKLPTFKDFF---------------------------  151
D95-4       DLGLVIDLPVIGNFTIPLSQKGEIKLPTLSDMFA--------------------------  152
PcLEA14     DIGLTIDLPVIGNFTTPLNKKGEFKLPTLF------------------------------  150
BcLEA-2     EIILIVDLPIFGNIRIPINSKGEIKLPTMSDLWTK-------------------------  153
IbLEA14     DIGLIIDLPVVGNFTIPLSQSGEIKLPTFSDFWK------KPEAEAEAA----------  160
Lemmi9      ELGLIIDIPVIGNITIPLSYSGEYKLPTLSDLWKGGKEEEKKEDEEEKEDPSKVVEI  174
ER5         ELGLAIDLPVIGDFTIPLSHSGEIKLPSLSDLWNGD-----KQEDTEKEI---------  160
CaLEA6      ELGLTIDLPVIGNFTIPLSHSGEIKLPSISDLWKGDN----EEEETEKET---------  164
OsLEA5      DVGLTIDLPIVGNFTIPLSTSGEMKLPTLKDMF---------------------------  151
            :: * :*:*:.*::  *:. .** ***::
```

星号表示完全相同的氨基酸残基，冒号表示高度保守的氨基酸残基，圆点表示不太保守的氨基酸残基，阴影肽链区域是“LEA_2”结构域

图 3　OsLEA5c 与其他第 5C 亚组 LEA 蛋白的氨基酸序列对比

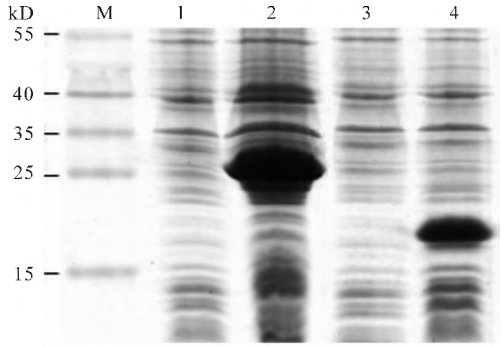
2.5　表达载体的构建和融合蛋白的诱导表达

将 *OsLEA5c* 基因与 pET32a 连接，转化 *E. coli* TOP 10，菌落初步 PCR 鉴定后，再提取质粒，用 *Nco* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切鉴定，发现在接近 500 bp 处有与 *OsLEA5c* 基因大小一致的条带，说明 *OsLEA5c* 基因已经连接到 pET32a 载体上。进一步测序表明，构建的表达载体正确。

将 BL/pET32a 和 BL/OsLEA5c 在氨苄青霉素 LB 平板上划线培养，挑取单菌落于 37 ℃、200 r/min 培养 16 h 后，按 1∶100 扩大培养，然后 IPTG 诱导培

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

养 4 h 后，取样分析。SDS-PAGE 分析表明，BL/pET32a和 BL/OsLEA5c 分别在相对分子质量 21 kD和 34 kD 位置有特异的蛋白条带，蛋白条带的位置与推测的融合蛋白的分子量大小一致，说明构建的表达载体能正确表达 OsLEA5c 融合蛋白(图 4)。

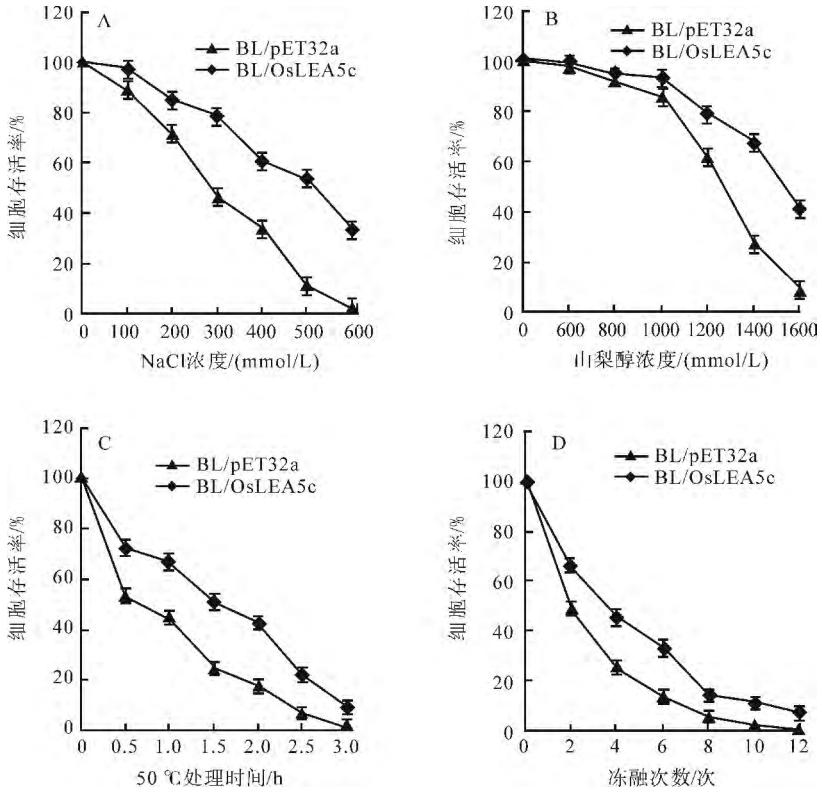


M. 标准蛋白；1. 未诱导的 BL/OsLEA5c；2. IPTG 诱导 4 h 的 BL/OsLEA5c；3. 未诱导的 BL/pET32a；4. IPTG 诱导 4 h 的 BL/pET32a

图 4 OsLEA5c 在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 分析

2.6 表达 OsLEA5c 大肠杆菌的抗逆性分析

细菌的生长动力学分析表明，在正常条件下，重组细菌 BL/OsLEA5c 和 BL/pET32a 的生长无明显差异，说明 OsLEA5c 的表达不影响大肠杆菌的生长。但在含不同浓度 NaCl 的培养基中，随着盐浓度的增加，BL/OsLEA5c 和 BL/pET32a 细胞的存活率均降低，但 BL/OsLEA5c 细胞的存活率明显高于 BL/pET32a 细胞(图 5A)。在含 600、800 mmol/L 山梨醇的 LB 培养基中，BL/OsLEA5c 和 BL/pET32a 细胞的存活率都无明显下降，但当山梨醇浓度提高到 1 000 mmol/L以上时，BL/OsLEA5c 和 BL/pET32a 细胞的存活率均明显下降，并且山梨醇的浓度越高，BL/OsLEA5c 和 BL/pET32a 细胞的存活率越低。在不同浓度山梨醇存在的情况下，BL/OsLEA5c 细胞的存活率均高于 BL/pET32a 细胞(图 5B)。对细胞进行 50 ℃高温处理发现，BL/OsLEA5c 和 BL/pET32a 细胞的存活率降低，并且随着处理时间的延长，BL/OsLEA5c 和 BL/pET32a 细胞的存活率降低更明显，但 BL/OsLEA5c 细胞的存活率降低速度明显低于 BL/pET32a 细胞(图 5C)。冻融处理表明，随着冻融次数的增加，BL/OsLEA5c 和 BL/pET32a 细胞的存活率也明显下降，但 BL/OsLEA5c 细胞的存活率较 BL/pET32a 细胞高(图 5D)。以上结果说明，OsLEA5c 在大肠杆菌中的表达增加了大肠杆菌对高盐、高渗透压、高温和冻融等胁迫的抗性。



A. NaCl；B. 山梨醇；C. 50 ℃；D. 反复冻融；细胞存活率是 3 次独立试验测得的平均值±SD

图 5 OsLEA5c 对转化大肠杆菌的保护作用

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

LEA 蛋白是一个大家族，在 LEA 蛋白亚家族分类方法的发展过程中，生物信息学的研究占有重要地位。最常见的分类方法是根据蛋白的化学特征进行分类，有关 LEA 蛋白的命名及分类未形成一个统一的标准，在不同的文献中，LEA 蛋白家族的分类并不一致[3,5,10-12]。根据氨基酸序列的同源性，Dure 等[11] 将 LEA 蛋白分为至少 6 个亚家族。Battaglia 等[3] 将 LEA 蛋白划分为 7 个不同的组或亚家族，各组具有其特异的结构域。其中，第 1、2、3、4、6、7 组都含较多的亲水性残基，是亲水蛋白，属于典型的 LEA 蛋白；而第 5 组缺乏典型的结构域和一致的序列，是一类非典型的 LEA 蛋白，较典型 LEA 蛋白分子有更多的疏水残基。第 5 组 LEA 蛋白成员之间缺乏共同一致的特征结构域，被分为 5A、5B、5C 3 个亚组[3]。陆地棉的 gD34，大豆的 GmPM25，牧豆树的 LEA3，白云杉的 EMB11，番茄的 ER5 和 Lemmi9，拟南芥的 PAP140、ATDI21、SAG21 等都是第 5 组 LEA 蛋白。本研究中结构域和进化树分析表明，OsLEA5c 蛋白具有 5C 亚组的结构域 LEA_2。因此，属于 LEA 蛋白的 5C 亚组。

虽然第 5 组 LEA 蛋白的研究报道还不多，但其可能在种子成熟过程中起着重要作用。不同的环境条件调节这类蛋白基因在植物中的表达[2,13-16]。5C 亚组 LEA 蛋白基因包含 *ABRE*(ABA responsive element)或 *DRE/CRT/LTRE*(drought responsive/C-repeat/low temperature response)原件，这些基因的表达受不同非生物胁迫的诱导[13-14]。已有研究表明，在种子发育后期和在干旱、高盐、低温、紫外光、损伤和氧化胁迫下，该亚组基因的转录增加[15-16]。说明 5C 亚组 LEA 蛋白基因参与植物的抗逆过程。在研究 *OsLEA5c* 的过程中，构建了 *OsLEA5c* 基因的大肠杆菌表达载体 pET32a-OsLEA5c，并在大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3) pLysS 中成功表达了 OsLEA5c 蛋白。比较重组载体转化的大肠杆菌和空载体转化的大肠杆菌发现，在不同浓度的高盐、高渗透培养基中，BL/OsLEA5c 的存活率明显高于 BL/pET32a，在 50 ℃高温下处理不同时间和多次反复冻融处理后，BL/OsLEA5c 较 BL/pET32a 也具有更高的存活率。说明 OsLEA5c 蛋白在大肠杆菌中的表达提高了重组大肠杆菌对高盐、高渗、高温和低温胁迫的抗性，使其具有更强的生存能力。

无论是在高盐或高渗透压培养基中，还是在高温或低温的情况下，细胞都容易出现脱水，导至细胞受损伤。*OsLEA5c* 的表达提高了重组大肠杆菌对高盐、高渗透压、高温和低温等胁迫的抗性，说明 *OsLEA5c* 可能参与蛋白的保护，防止在失水过程中蛋白的聚集、变性，从而增加细胞的抗逆能力。该研究为进一步利用 *OsLEA5c* 基因提高作物抗逆性奠定了基础。

参考文献：

[1] Dure L, Greenway S C, Calau C A. Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis, and termination: Changing messenger ribonucleic and populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis[J]. Biochemistry, 1981, 20(14): 4162-4168.

[2] Tunnacliffe A, Wise M J. The continuing conundrum of LEA proteins[J]. Naturwissenschaften, 2007, 94(10): 791-812.

[3] Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garciarrubio A, *et al*. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins [J]. Plant Physiol, 2008, 148(1): 6-24.

[4] Shih M D, Hoekstra F A, Hsing Y I C. Late embryogenesis abundant proteins[J]. Adv Bot Res, 2008, 48: 211-255.

[5] Bies-Ethève N, Gaubier-Comella P, Debures A, *et al*. Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA(late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Mol Biol, 2008, 67(1-2): 107-124.

[6] Dalal M, Tayal D, Chinnusamy V, *et al*. Abiotic stress and ABA-inducible Group 4 LEA from *Brassica napus* plays a key role in salt and drought tolerance[J]. J Biotechnol, 2009, 139(2): 137-145.

[7] Liu Y, Zheng Y, Zhang Y, *et al*. Soybean PM2 protein (LEA3) confers the tolerance of *Escherichia coli* and stabilization of enzyme activity under diverse stresses [J]. Curr Microbiol, 2010, 60(5): 373-378.

[8] Olvera-Carrillo Y, Campos F, Reyes J L, *et al*. Functional analysis of the group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiol, 2010, 154(1): 373-390.

[9] 胡廷章，陈再刚，杨俊年，等. 高等植物的胚胎发育后期丰富蛋白研究进展[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(9): 1745-1747.

[10] 李业，陈银华，吴家和，等. *OsRboh* 基因家族在水稻免疫应答中的表达及功能分析[J]. 生物工程学报, 2011, 27(11): 1574-1585.

[11] Dure L, Crouch M, Harada J, *et al*. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants[J]. Plant Mol Biol, 1989, 12(5): 475-486.

[12] Bray E A. Molecular responses to water deficit[J]. Plant Physiol, 1993, 103(4): 1035-1040.

[13] Hundertmark M, Hincha D K. LEA(late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*[J]. BMC Genomics, 2008, 9: 118.

[14] Park S C, Kim Y H, Jeong J C, *et al*. Sweet potato late embryogenesis abundant 14(IbLEA14) gene influences lignification and increases osmotic-and salt stress-tolerance of transgenic calli[J]. Planta, 2011, 233(3): 621-634.

[15] George S, Usha B, Parida A. Isolation and characterization of an atypical LEA protein coding cDNA and its promoter from drought-tolerant plant *Prosopis juliflora*[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2009, 157(2): 244-253.

[16] Su L, Zhao C Z, Bi Y P, *et al*. Isolation and expression analysis of LEA genes in peanut(*Arachis hypogaea* L.)[J]. J Biosci, 2011, 36(2): 223-228.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net