

大豆 PM2 蛋白(LEA3)表达可提高酵母重组子的耐盐性

李冉辉,刘昀,郑易之

(深圳大学生命科学学院,深圳 518060)

摘要 大豆 PM2 蛋白属 LEA3(late embryogenesis abundant group3)蛋白。本实验以含大豆 PM2 基因的重组载体 pET28a/PM2 为模板,PCR 法构建酵母表达载体 pYES2/PM2,并转化酵母细胞得到重组菌 INV/PM2。SDS-PAGE 电泳结果表明,INV/PM2 重组菌可被诱导表达分子量约为 50 kDa 的蛋白条带,与目的蛋白的理论分子量(50 kDa)接近。利用液相色谱-电喷雾质谱对酵母重组子表达的重组蛋白进行分析鉴定。分别测定未转基因重组菌 INV/pYES2 和转 PM2 基因的重组菌 INV/PM2 在无胁迫、和含 1.8 mol/L NaCl、2 mol/L 山梨糖培养基中的生长曲线。结果表明大豆 PM2 蛋白的表达对酵母正常生长没有影响。在含高盐的培养基里,转 PM2 基因酵母 INV/PM2 的延滞期短于对照菌。这表明 PM2 蛋白的表达可以提高酵母细胞的耐盐能力。但是在含山梨糖的高渗培养基里,两种菌的生长情况无明显差异。

关键词 大豆;LEA3 蛋白;PM2 蛋白;耐盐性;酵母

中图分类号 S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)04-0467-06

EXPRESSION OF SOYBEAN MP2 PROTEIN(LEA3)CONFERS SALT TOLERANCE IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE

LI Ran-hui,LIU Yun,ZHENG Yi-zhi

(College of Life Sciences, Shenzhen University, Shenzhen 518060)

Abstract Soybean PM2 protein belongs to the family of group 3 LEA(late embryogenesis abundant)proteins. Nucleotide acid fragment of PM2 gene was amplified by PCR reaction using the plasmid pET28a/PM2 as the template. The yeast expression plasmid of pYES2/PM2 was constructed and then transformed into yeast to create recombinant INV/PM2. The results of SDS-PAGE analysis showed that a specific protein band of 50 kDa was expressed in the recombinant yeast of INV/PM2. The protein was close to the theoretic molecular weight of PM2 protein and was identified as PM2 protein by LC-ESI-MS assay. The growth curves of recombinant INV/PM2 and INV/pYES2 with an empty vector were generated under the non-stress, high salinity (1.8mol/L NaCl) or osmotic (2mol/L sorbitol) conditions, respectively. The growth rates of the recombinants with PM2 protein under the non-stress condition indicated that the expression of PM2 protein is not deleterious to the growth of yeast. The yeast cells expressing PM2 protein

收稿日期:2007-02-26

基金项目:国家自然科学基金(30670180 和 30470107)资助

作者简介:李冉辉(1981-),男,硕士,研究方向为植物抗逆分子生物学。E-mail:ranhui81@yahoo.com.cn

通讯作者:郑易之,教授,博士生导师。E-mail:yzzheng@szu.edu.cn

showed shorter lag period when transferred to a medium containing high salinity as compared to the control. This suggests that the expression of PM2 protein could confer salt tolerance in yeast. But no obvious growth improvement was observed in a high sorbitol medium between the recombinant INV/PM2 and INV/pYES2.

Key words Soybean; LEA3 protein; PM2 protein; Salt tolerance; Yeast

LEA 蛋白是与植物抗逆反应相关的一类重要蛋白质。它可在发育的植物种子、花粉粒和失水的营养组织内大量表达积累,并可受干旱、高盐、冷冻和外源 ABA 的诱导表达^[1]。此外,在某些藻类^[2]、原核生物^[3]、线虫^[4]和摇蚊^[5]中也发现有 LEA 类似蛋白。

根据 LEA 蛋白的序列特点,可将其分为 5~7 组。其中 LEA3 蛋白具有高保守的 11-氨基酸重复序列(TAQAAKEKAGE)。LEA3 蛋白具有良好的热稳定性和可溶性^[6,7]。关于 LEA3 蛋白对细胞的抗逆保护作用已取得一些研究进展^[7]。如, Xu 等和 Sivamani 等证明了将大麦 *HVA1* 基因(*lea3*)转化水稻和小麦,转基因水稻和小麦的耐盐性得到了提高^[8,9]。Zhang 等和俞嘉宁等利用酵母表达体系,证明了大麦 *HVA1* 基因和小麦 *TaLEA2* 和 *TaLEA3* 基因(*lea3*)的表达可以提高重组酵母的耐 NaCl 和 KCl 能力^[10,11]。本课题组的兰英等和刘昫等证明大豆 PM30 和 PM2 蛋白(均为 LEA3 蛋白)的表达在提高大肠杆菌对高 NaCl 和 KCl 耐受性的直接贡献^[12,13]。在离体条件下, Honjoh 等和 Goyal 等证明小球藻(*Chlorella vulgaris*) HIC6、HIC12 蛋白和线虫 *AavLEA1* 蛋白对 LDH 酶具有保护作用^[14,15]。上述研究结果为前人提出的“LEA3 蛋白在高等生物、单细胞真核生物和原核细胞中可能有着类似的耐盐保护机制”假说提供了实验证据^[16,17]。但 LEA3 蛋白参与细胞抗盐和抗胁迫机制并不清楚。

大豆 PM2 (Accession No: M80664) 蛋白为 LEA3 蛋白。其序列中不仅有保守的 6 拷贝 11-氨基酸基元序列(第 304~398 氨基酸),也有着 22-氨基酸基元序列(第 129~260 氨基酸, VNK-MGEYKDYAAEKAKEGKDAT^[18])。刘昫等首次报告了大豆 PM2 蛋白及 6 拷贝的 22-氨基酸序列可提高大肠杆菌重组菌^[13]和转基因烟草对高盐的耐受性^[19]。但大豆 PM2 蛋白表达是否可提高酵母细胞的耐盐性还不清楚。

本文构建了酵母表达载体 pYES2/PM2, 转化酵母细胞。通过比较转空载体和转大豆 PM2 基因重组酵母子在 1.8 mol/L NaCl 和 2 mol/L 山梨糖培养基中的生长曲线。确定了大豆 PM2 蛋白的表

达可赋予酵母重组子对高盐的耐受性。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料为大豆白农 6 号。由吉林省白城市农业科学研究所提供。

从开花 30~45 d 的未成熟大豆种子中提取总 RNA, 反转录得到 cDNA。利用 PCR 扩增法获得大豆 PM2 基因的 cDNA。以此构建重组质粒 pET28a/PM2^[13]。大肠杆菌 TOP10 菌株为本实验室保存。穿梭载体 pYES2 及其宿主酵母菌 INVSC1 购于 Invitrogen 公司。

Taq 酶、DNA 快速回收试剂盒、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等购自大连 TaKaRa 生物公司。十二烷基硫酸钠(SDS)、蜜三糖、半乳糖等化学试剂均为分析纯, 购自 Sigma 公司或上海生工生物公司。

1.2 酵母表达载体 pYES2/PM2 的构建

本实验室构建并保存的重组质粒 pET28a/PM2 为带 6* His 标签的融合蛋白。该融合蛋白可在大肠杆菌中过量的表达^[13]。为研究天然大豆 PM2 蛋白在酵母细胞中的保护作用, 根据基因数据库的大豆 PM2 基因序列(Accession No: M80664)设计一对引物(1F 和 1R)。其扩增的产物可编码为不含 6* His 标签的天然的大豆 PM2 蛋白。引物由上海生工生物工程公司合成。引物序列如下:

1F: 5'-ATCGGATCCATGGCGTCCAAGAAA-CAAG-3' (划线部分为 *Bam*HI 酶切位点)

1R: 5'-ATCGAATTC TCATTTCTTGCGGCGC TCCA-3' (划线部分为 *Eco*RI 酶切位点)

以重组载体 pET28a/PM2 为模板, 利用一对引物(1F 和 1R), 进行 PCR 反应。PCR 反应条件为 94℃, 30 s; 58℃, 30 s; 72℃, 1 min; 经 30 个循环后 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳。按照回收试剂盒说明书(TaKaRa 公司)从凝胶中回收 PCR 产物。

将回收后的 PM2 基因片段插入到穿梭载体

pYES2 的 *Bam*H I 和 *Eco*R I 位点,得到重组质粒 pYES2/PM2。利用热激法,将获得的载体转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞。在含氨苄霉素的平板上挑取阳性单克隆,培养。采用碱裂解法提取重组质粒。测序(上海生工生物公司)。

1.3 酿酒酵母的转化

用电转法,将穿梭载体 pYES2/PM2 转化酵母 INVSC1。利用组氨酸营养缺陷型培养基(SCR)筛选出阳性克隆 INV/PM2。保存菌种。以此作为进一步研究的材料。

将空载体 pYES2 转化酵母得到对照菌 INV/pYES2。

1.4 大豆 PM2 蛋白在酵母重组子中的表达

将重组酵母接种于 SCR 液体培养基中,30℃,200 r/min,培养 2~3 d。将重组菌接种于诱导培养基(YP-Gal,含 1%酵母粉,2%蛋白胨,1%半乳糖,pH5.8)中培养 12 h。将酵母细胞置于沸水浴热处理 20 min。离心。取上清液进行 SDS-PAGE 电泳。

1.5 酵母重组子表达目的蛋白的质谱鉴定

为鉴定目的蛋白,将从 SDS-PAGE 电泳板上切下的蛋白条带做质谱鉴定(上海中科新生命生物科技有限公司)。步骤如下:将 PM2 蛋白在胶内酶解(Trypsin,20 h),抽提酶解肽段,经 Zip Tip 脱盐。进行液相色谱-电喷雾质谱分析。检测仪器型号为 LCQ Deca XP plus(FINNIGAN)。进样方式为 Microspray。毛细管温度为 170℃。Column 为 0.15MM*150MM(RP-C18)。检测方式为正离子。利用软件分析数据。搜索使用的数据库为 NCBI Papilionoideae 蛋白库。SEQUEST 结果过滤参数为:当 Charge +1, Xcorr \geq 1.9;当 Charge +2, Xcorr \geq 2.2;当 Charge +3, Xcorr \geq 3.75;其中 DelCN \geq 0。

1.6 酵母生长曲线的测定

挑取对照菌 INV/pYES2 和重组菌 INV/PM2 单克隆,在 SCR 液体培养基中培养,将菌液接入诱导培养基 YPGal 中培养 8 h 后,分别接入 YPGal 和含 1.5 mol/L NaCl 和 2 mol/L 山梨糖的 YPGal 的培养基中培养。间隔时间取样。测样品的 OD₆₀₀ 值。绘制生长曲线。实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 酵母表达载体的构建及其向酵母细胞的转化

根据 LEA 蛋白分布的广泛性, Garay - Ar-

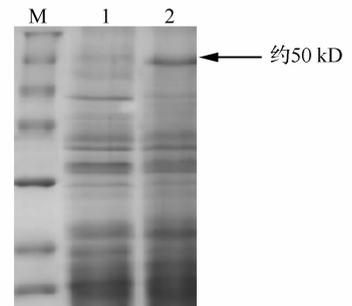
roy. A 和 D. Bartels 等曾提出“LEA 蛋白可能以类似的机制参与原核和真核生物抗逆保护作用”的假设^[16,17]。本课题组已报告了大豆 PM2 融合蛋白(LEA3)可提高大肠杆菌重组菌的存活率^[13],将天然大豆 PM2 基因转化烟草,转基因烟草植株的耐盐性也得到了提高^[19]。然而,天然的大豆 PM2 蛋白是否可赋予酵母细胞耐盐功能还不清楚。

构建可表达天然大豆 PM2 蛋白的表达载体,利用酵母表达结合功能筛选法,研究了表达的大豆 PM2 蛋白对酵母细胞的保护作用。以本实验室保存的重组载体 pET28a/PM2^[13]为模板,以 1F 和 1R 为引物,构建重组质粒 pYES2/PM2。测序结果显示,重组质粒 pYES2/PM2 基因序列在 244 位和 531 位发生了点突变,但其变化并不影响编码的氨基酸的极性。因此推测该基因表达产物的高级结构将不会发生明显改变。

利用电转法,将重组质粒 pYES2/PM2 转化酵母 INVSC1。经营养缺陷型培养基筛选,获得酵母重组子 INV/PM2。将空载体 pYES2 转化酵母 INVSC1 获得对照菌 INV/pYES2。

2.2 重组酵母子表达天然 PM2 蛋白的质谱鉴定

前人多采用 Northern blotting 和 Western blotting 技术检测外源 LEA3 基因产物的表达^[10,11]。本实验利用了 LEA3 蛋白具有热稳定性这一特性^[13],将重组菌体进行沸水处理,去除酵母细胞中大量的可溶性蛋白,富集了 PM2 蛋白。经沸



M:标准蛋白 Marker;1:对照菌 INV/pYES2 热稳定蛋白;2:转大豆 PM2 基因菌 INV/PM2 热稳定蛋白

M: Standard protein Marker; 1: The heat stable protein from yeast INV/pYES2; 2: The heat stable protein from yeast INV/PM2

图 1 重组酵母的热稳定性蛋白质的 SDS-PAGE 电泳

Fig.1 SDS-PAGE analysis of heat stable proteins from the recombinant yeasts

水处理的重组菌上清液进行 SDS-PAGE 电泳。从凝胶板可见一分子量为 50 kD 的特异条带 (图 1)。将该特异条带切下, 并利用胰酶消化。产物经液相色谱-电喷雾质谱分析。其液相色谱离子流图如图 2 所示。经 NCBI Papilionoideae 蛋白库进行

查询, 检索到的多肽覆盖率为 53.35%。证明了目的条带确为酵母细胞表达的大豆 PM2 蛋白 (图 3)。与刘昉等^[13]的研究结果相比较, 可知酵母中表达的大豆 PM2 蛋白的量比在大肠杆菌中表达要少得多。

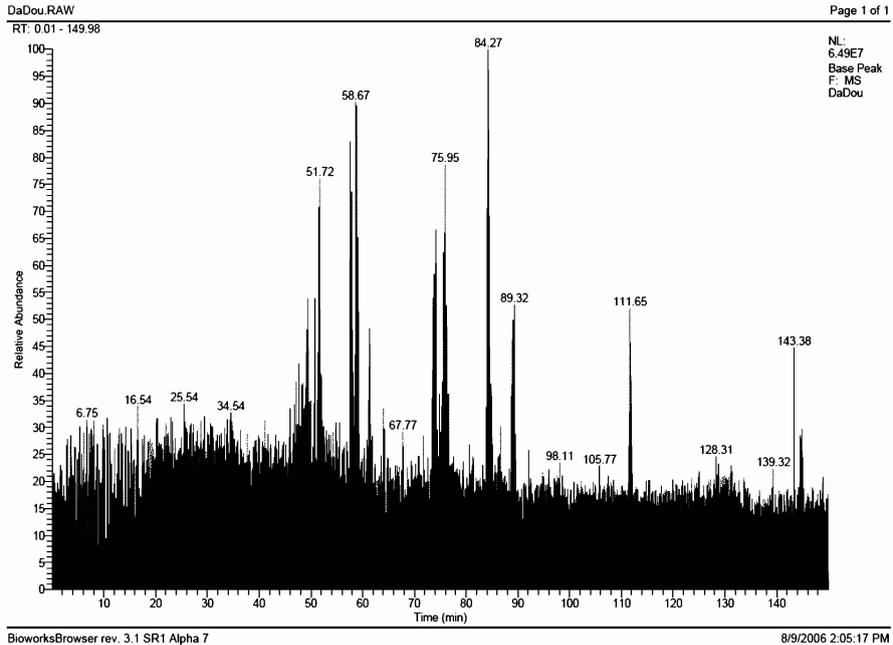


图 2 液相色谱总离子流图

Fig. 2 Total ion current ion of liquid chromatography

MASKKQEERAEAAAKVAAKELEQVNRERRDRDFGVVAEQOOQHHQEDQQ
KRGVIGSMFKAVQDTYENAKEAVVGKKEATNNAYSNTTEVIHDVNIQPDDV
SATGEVRDISATKTHDIYDSATDNNNNKTGSKVGEYADYASQKAKETKDAT
 MEKAGEYTDYASQKAKEAKKTTMEKGGYKDYSAEKAKERKDATVNK
MGEYKDYAAEKAKEGKDATVNKMGEYKDYAAEKTKEGKDATVNKMGE
YKDYTAEKAKEGKDTTLGKLGELKDTASDAAKRAVGYLSGKKEETKEMASE
 TAEATANKAGEMKEATKKKTAETAEAANKKAGEIKDRAAETAEAANKTAET
 AEVTKNALEMKDAAKDRTAETDAAKQKTAQAKENTKENVSGAGETARR
 KMEEPQLQGKEGYGRRGDKVVVKVEESRPGAIATLKAADQIAGOTFND
VGRFDEEGVNVERRKK

图为大豆 PM2 蛋白氨基酸序列, 其中划线部分是利用液相色谱-电喷雾质谱检测到的多肽片段

The whole amino acid sequence of soybean PM2 protein and the underlined peptides were identified by LC-ESI-MS

图 3 大豆 PM2 蛋白质谱鉴定结果

Fig. 3 The soybean PM2 protein was identified by the MS

2.3 大豆 PM2 蛋白的表达对酵母重组子生长无抑制作用

Liu 等^[13]验证了由 6 个 His 标签 (36 个氨基酸) 与大豆 PM2 蛋白组成的融合蛋白的过表达可提高大肠杆菌的耐盐能力。经查询, 融合蛋白序列中的 His 标签序列与抗逆相关蛋白没有同源性。Goyal 等^[22]指出融合蛋白末端的 His 标签不会影响

LEA 蛋白质的折叠。然而, 天然 LEA 蛋白的保护功能还不清楚。实验构建可编码大豆 PM2 天然蛋白的表达载体。转化酵母细胞。挑取对照菌 INV/pYES2 和重组菌 INV/PM2 单克隆入 SCR 液体培养基中培养, 将菌液接入无胁迫诱导培养基 YPGal 中培养。间接时间取样, 根据 OD₆₀₀ 值绘制生长曲线 (图 4)。从图 4 的生长曲线可知, 对照菌 INV/

pYES2 和重组菌 INV/PM2 在无胁迫培养基里的生长速率十分相似。表明天然大豆 PM2 蛋白的表达对酵母细胞生长无抑制作用。

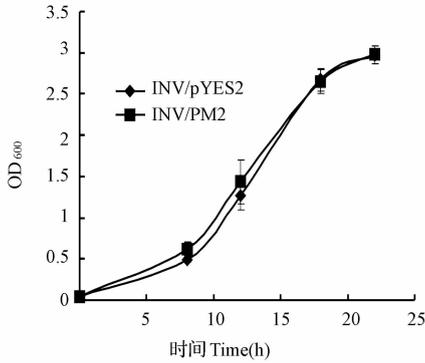


图4 在无胁迫条件下对照菌 INV/pYES2 和重组菌 INV/PM2 的生长曲线

Fig. 4 The growth curves of INV/pYES2 and INV/PM2 under normal condition

2.4 天然大豆 PM2 蛋白的表达可提高酵母重组子的耐盐性

为了研究大豆 PM2 天然蛋白的表达对酵母重组子的耐盐保护作用,挑取对照菌 INV/pYES2 和重组菌 INV/PM2 培养,诱导目的蛋白表达后接入到含高盐(1.8 mol/L NaCl)和高渗(2 mol/L 山梨糖)培养基中培养。间隔时间取样测定 OD₆₀₀ 值。根据 OD₆₀₀ 值绘制生长曲线(图 5 和图 6)。由图 5 可知,酵母重组子 INV/PM2 在高盐中经过约 100 h 开始进入对数生长期,在 150 h 左右到达生长平台期。而转空载体的酵母 INV/pYES2 约经 125 h 后才进入对数生长期。可见,酵母重组子在获得了大豆 PM2 基因后,获得了对高 NaCl 的耐受性。其生长速率明显好于对照菌 INV/pYES2。显然,大豆 PM2 蛋白的表达对提高酵母重组子抗 NaCl 胁迫能力有着直接的贡献。

上述结果不同,重组子酵母和对照菌在含 2 mol/L 山梨糖培养基中的生长速率一致(图 6)。表明大豆 PM2 蛋白的表达不能提高酵母重组子的抗渗透能力。

3 讨论

关于 LEA3 蛋白表达与植物抗逆能力的关系已有较多的研究。Ried 等研究表明小麦耐旱能力与植株内 LEA3 蛋白的表达量呈正相关^[20]。也有实验证明导入大麦 HVA1(*lea3*)基因的转基因植物

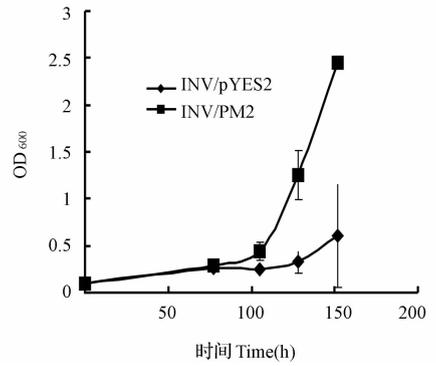


图5 1.8 mol/L NaCl 培养基中对照菌 INV/pYES2 和重组菌 INV/PM2 的生长曲线

Fig. 5 The growth curves of INV/pYES2 and INV/PM2 in media plus 1.8 mol/L NaCl

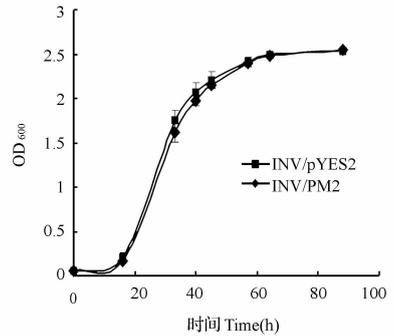


图6 2 mol/L 山梨糖培养基中,对照菌 INV/pYES2 和重组菌 INV/PM2 的生长曲线

Fig. 6 The growth curves of INV/pYES2 and INV/PM2 in media plus 2 mol/L sorbitol

和酵母重组子的耐旱性得到提高^[8,10]。然而,并未见将同一基因转化大肠杆菌的研究报告。最近,刘响等证实了大豆 PM2 基因的表达可提高烟草和大肠杆菌的耐盐性^[13,19]。结果表明大豆 PM2 蛋白还可以提高转基因酵母对高盐的耐受性。可见,大豆 PM2 蛋白的表达可以提高大肠杆菌,酵母和植物的抗盐能力。这一结果为“LEA 蛋白可能以类似机制参与原核和真核生物耐盐保护作用”的假说提供实验证据^[16,17]。可以说,大肠杆菌表达体系是进行 LEA 蛋白耐盐功能研究的简单、快捷和有效的体系。

高盐和高渗胁迫可引发一个共同反应——即细胞的失水。有报告指出,转大麦 HVA1 基因的水稻和烟草的耐盐和耐旱性得到了提高^[8,9]。获得 LEA3 基因的重组酵母和大肠杆菌获得了对高盐耐受性,对渗透胁迫未显示耐受性^[10,12,13]。由此推测,LEA3 蛋白可直接参与细胞耐盐保护作用,而对抗渗透保护可

能有间接贡献,即可能是 LEA3 蛋白与其他物质(如非还原糖,海藻糖,蔗糖等)共同作用的结果。

高盐胁迫除引起渗透胁迫外,还将导致离子毒害效应^[21]。对细胞产生毒性的主要是 Na^+ 。细胞内过多的 Na^+ 可影响蛋白质构象,抑制酶活性,破坏细胞膜结构,造成细胞伤害甚至细胞死亡^[17]。此时,细胞则通过生理生化反应改变减轻离子的毒害。Dure 等推测,LEA3 蛋白可通过兼性 α -螺旋的亲水表面“螯合”胞质中过多的 Na^+ ,减轻离子毒害作用^[6]。Goyal 等报告脱水胁迫可诱导线虫 LEA3 蛋白呈现出 α -螺旋结构^[22]。利用 Chou 和 Fasman 模型预测大豆 PM2 蛋白可形成 79% 的兼性 α -螺旋。因此推测,大豆 PM2 蛋白可先形成兼性 α -螺旋,以其极性氨基酸与胞质中过量的 Na^+ “螯合”,维持胞内的离子平衡,保持酶的构象及活性。另一方面,螺旋的疏水基团可与膜的磷脂部分结合,保持膜结构的稳定。关于大豆 PM2 蛋白的结构与功能的关系,正在进行研究。

参 考 文 献

- [1] Wang W, Vinocur B, Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance [J]. *Planta*, 2003, 218: 1-14.
- [2] John T, Honjoh K, Yoshimoto M, et al. Molecular cloning and expression of hardening-induced genes in *Chlorella vulgaris* C-27; the most abundant clone encodes a late embryogenesis abundant protein [J]. *Plant and Cell Physiology*, 1995, 36(1): 85-93.
- [3] Stacy R, Aalen R. Identification of sequence homology between the internal hydrophilic repeated motifs of group 1 late-embryogenesis-abundant proteins in plants and hydrophilic repeats of the general stress protein GsiB of *Bacillus subtilis* [J]. *Planta*, 1998, 206(3): 476-484.
- [4] Browne J, Tunnacliffe A, Burnell A, et al. Anhydrobiosis: plant desiccation gene found in a nematode [J]. *Nature*, 2002, 416: 38.
- [5] Kikawada T, Nakahara Y, Kanamori Y, et al. Dehydration-induced expression of LEA proteins in an anhydrobiotic chironomid [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 331: 56-61.
- [6] Dure L. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation [J]. *The Plant Journal*, 1993, 3: 363-369.
- [7] Wise M J, Tunnacliffe A. POPP the question: what do LEA proteins do? [J]. *Trends in Plant Science*, 2004, 9: 13-17.
- [8] Xu D P, Duan X L, Wang B Y, et al. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice [J]. *Plant Physiology*, 1996, 110: 249-257.
- [9] Sivamani E, Ahmed B, Wraith JM, et al. Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene [J]. *Plant Science*, 2000, 155: 1-9.
- [10] 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]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 127: 611-616.
- [11] Yu J N, Zhang J S, Shan L, et al. Two new group LEA3 genes of wheat and their functional analysis in yeast [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2005, 47 (11): 1372-1381.
- [12] Lan Y, Cai D, Zheng Y Z. Expression of three different group soybean lea genes enhanced stress tolerance in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2005, 47 (5): 613-621.
- [13] Liu Y, Zheng Y Z. PM2, a group 3 LEA protein from soybean, and its 22-mer repeating region confer salt tolerance in *Escherichia coli* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 331: 325-332.
- [14] Honjoh K I, Matsumoto H, Shimizu H, et al. Cryoprotective activities of group 3 late embryogenesis abundant proteins from *Chlorella vulgaris* C-27 [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2000, 64(8): 1656-1663.
- [15] Kshamata G, Laura J W, Tunnacliffe A. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress [J]. *Biochemistry Journal*, 2005, 388: 151-157.
- [16] Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garciarribio A, et al. Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 5668-5674.
- [17] Bartels D, Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants [J]. *Critical Reviews in Plant sciences*, 2005, 24: 23-58.
- [18] Hsing Y C, Chen Z Y, Chow T Y. Nucleotide sequences of a soybean complementary DNA encoding a 50-Kilodalton late embryogenesis abundant protein [J]. *Plant Physiology*, 1992, 99(1): 354-355.
- [19] 刘昀, 李冉辉, 郑易之, 等. 大豆 PM2 蛋白及 22 氨基酸结构域可提高烟草植株耐盐性 [J]. *深圳大学学报理工版*, 2007, 24: 95-101.
- [20] Ried J L, Walker-Simmons MK. Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation-tolerant seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Plant Physiology*, 1993, 102: 125-131.
- [21] Imai R, Chang L, Ohta A, et al. A class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Gene*, 1996, 170: 243-248.
- [22] Goyal K, Tisi L, Basran A, Browne J, et al. Transition from natively unfolded to folded state induced by desiccation in an anhydrobiotic Nematode protein [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 12977-12984.