

沈继朵,王 聪,张 莉,等. 重组猪 α 干扰素工程菌的诱导表达及产物纯化[J]. 江苏农业科学,2019,47(9):214–218.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2019.09.050

重组猪 α 干扰素工程菌的诱导表达及产物纯化

沈继朵¹, 王 聪¹, 张 莉¹, 栗俞程^{2,3}

(1. 河南中医药大学药学院, 河南郑州 450046; 2. 河南中医药大学科研实验中心, 河南郑州 450046;

3. 河南省仲景方药现代研究重点实验室, 河南郑州 450046)

摘要:为获得大量猪 α 干扰素的重组蛋白,研究了其发酵条件,并对目的蛋白进行分离纯化。考察了不同 IPTG 诱导浓度(0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.5 mmol/L)、不同诱导温度(17、27、32、37 ℃)、不同诱导时间(0、2、3、4、5、6、7、8 h)对目的蛋白表达的影响;同时对包涵体进行提取、溶解变性进行研究,最后采用 Ni 柱亲和层析纯化目的蛋白。采用 SDS-PAGE 电泳及 Image Pro Plus 6.0 软件分析电泳结果,结果显示,IPTG 诱导浓度为 1.0 mmol/L、诱导温度为 27 ℃、诱导时间为 6 h 时,目的蛋白表达量最多;超声波破碎细菌的最优时长循环为 10 s/10 s;8 mol/L 尿素溶解包涵体过夜可得到大量可溶性目的蛋白含量,Ni 柱亲和层析后可去除大量杂蛋白,获得较纯的目的蛋白。可见本试验通过优化重组猪 α 干扰素诱导表达条件及纯化方法,获得了高表达、高纯度的重组猪 α 干扰素蛋白,为今后研究其生物活性奠定了初步基础。

关键词:猪 α 干扰素;工程菌;诱导表达;包涵体;纯化

中图分类号:S188 **文献标志码:**A **文章编号:**1002–1302(2019)09–0214–04

干扰素(interferon, IFN)是动物细胞在受到某些病毒感染后,分泌的一种具有抗病毒功能的宿主特异性糖蛋白。通常根据产生干扰素的细胞不同将其分为 I、II 型干扰素, I 型干扰素主要包括 α 、 β 等 6 种,是由微生物、病毒等诱导产生,而 II 型干扰素主要包括 γ 干扰素^[1]。猪 α 干扰素是一种广谱抗病毒药,对猪的轮状病毒腹泻、流行性腹泻、传染性胃肠炎等病毒有较好的疗效,可用于防治猪病毒性疾病^[2]。传统猪 α 干扰素表达量低、时间长,无法满足防治疾病的要求,因而采用基因工程体外表达生产 IFN- α ,重组猪 α 干扰素是将猪 α 干扰素基因重组质粒导入大肠埃希菌原核表达系统中^[3]。目前,含有猪 α 干扰素基因的重组质粒在大肠杆菌中如何高表达,如何获得纯度较高的 α 干扰素一直是研究领域的急需解决的一个问题。因此,本研究以表达猪 α 干扰素的基因工程重组大肠埃希菌 BL21(DE3)为试验对象,主要考察了不同 IPTG 浓度、不同诱导温度、不同诱导时间对目的蛋白含量的影响,并进一步地研究如何将目的蛋白以包涵体形式存在的目的蛋白溶解,最后通过 Ni 柱亲和层析纯化了目的蛋白,旨在为后续研究重组猪 α 干扰素的生物活性及产业化开发奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

重组大肠埃希工程菌 BL21(DE3)/pET-32a-IFN α ,购自天根生化科技(北京)有限公司。

收稿日期:2019–01–03

基金项目:河南中医药大学科研苗圃工程项目(编号:MP2017–12)。
作者简介:沈继朵(1983—),女,江苏宿迁人,硕士,实验师,主要从事生化与分子生物学教学与研究工作。E-mail:lycdd1219@163.com。
通信作者:栗俞程,博士,副教授,从事天然活性化合物药理机制研究。E-mail:liyucheng@hactcm.edu.cn。

1.2 试剂

彩虹 245 广谱蛋白 Marker、双色预染 Marker、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、IPTG、氨苄青霉素(Amp)、尿素、盐酸胍购自北京索莱宝科技有限公司;His 标签蛋白纯化试剂盒(包涵体蛋白)购自康为世纪生物科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 重组猪 α 干扰素工程菌的诱导表达

1.3.1 不同浓度 IPTG 对目的蛋白表达量的影响 用接种环从 -80 ℃ 保藏的工程菌甘油管中蘸取菌液 1 环,在含有 Amp 的 LB 固体平板上采用分三区划线的方法进行划线接种,37 ℃ 过夜恒温培养 16 h。无菌操作挑取工程菌的单菌落,放入含 5 μ L Amp(终浓度为 100 μ g/mL)的 5 mL 液体培养基 LB 中,37 ℃、150 r/min 过夜振荡培养 15 h。按 1% 的接种量分别接入 7 瓶含 5 μ L Amp(终浓度为 100 μ g/mL)的 5 mL 液体培养基 LB 中,另外 1 瓶按 1% 的接种量接入含 6 μ L Amp(终浓度为 100 μ g/mL)的 6 mL 液体培养基 LB 中,均于 37 ℃、150 r/min 恒温振荡培养至 $D_{600\text{nm}}$ 约 0.6 时。从 6 mL 的 LB 液体培养基中,取出 1 mL 菌液作为未诱导对照。然后在 8 瓶都含有 5 mL LB 液体培养基中,加入诱导剂 IPTG,使 IPTG 终浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.5 mmol/L,37 ℃、150 r/min 振荡培养 6 h。6 h 后每瓶分别取出 1 mL 菌液,4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,留菌体沉淀。沉淀用 80 μ L 双蒸水吹散,加入 20 μ L 5 \times Loading Buffer,使样品缓冲液和蛋白样品充分混匀,然后将其置于沸水浴中煮沸 10 min。取上清 10 μ L 进行 12% SDS-PAGE 检测表达量与 IPTG 浓度之间的关系。

1.3.2 不同浓度 IPTG 对目的蛋白表达量的影响 按“2.1.1”节的方法活化工程菌,挑取活化后的单菌落,放入含 5 μ L Amp(终浓度为 100 μ g/mL)的 5 mL 液体培养基 LB 中,37 ℃、150 r/min 过夜振荡培养 15 h。按 1% 的接种量分别接

入 4 瓶含 5 μL Amp(终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 5 mL 液体培养基 LB 中;于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 恒温振荡培养至 $D_{600\text{nm}}$ 约 0.6 时,每瓶培养液中分别加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG,然后将 4 瓶菌液分别放入 17、27、32、37 $^{\circ}\text{C}$ 4 个不同温度的恒温摇床中,150 r/min 振荡培养 6 h。然后各取 1 mL 菌液,菌液离心,样品处理方法同“1.3.1”节中步骤,取上清 10 μL 进行 12% SDS-PAGE 检测表达量与诱导温度之间的关系。

1.3.3 不同诱导温度对目的蛋白表达量的影响 按“1.3.1”节的方法活化工程菌,挑取活化后的单菌落,放入含 5 μL Amp(终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 5 mL 液体培养基 LB 中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 过夜振荡培养 15 h。按 1% 的接种量分别接入含 10 μL Amp(终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 10 mL 液体培养基 LB 中;于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 恒温振荡培养至 $D_{600\text{nm}}$ 约 0.6 时,在培养液中加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG,取出 1 mL 作为未诱导对照。然后将菌液于 27 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 条件下振荡培养,分别于 2、3、4、5、6、7、8 h 各取 1 mL 菌液,菌液离心,样品处理方法同“1.3.1”节中步骤,取上清 10 μL 进行 12% SDS-PAGE 检测表达量与诱导时间之间的关系。

1.4 重组猪 α 干扰素蛋白的分离纯化

1.4.1 不同超声时间间隔对菌体破碎的影响 按“1.3.1”节的方法活化工程菌,挑取活化后的单菌落将放入含 5 μL Amp(终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 5 mL 液体培养基 LB 中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 过夜振荡培养 15 h。按 1% 的接种量分别接入含 150 μL Amp(终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 150 mL 液体培养基 LB 中;于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 恒温振荡培养至 $D_{600\text{nm}}$ 约 0.6 时,加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG,于 27 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养 6 h。取 50 mL 菌液,共 3 管,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 20 min,弃上清,得到菌体。称取菌体细胞的湿质量,按每 100 mg 菌体加入 2 mL 细菌蛋白萃取剂(含 20 μL 蛋白酶抑制剂),混合均匀,平均分到 3 管中,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、功率 30%,超声波破碎时间间隔分别设置为 5 s/5 s、3 s/3 s、10 s/10 s,破碎细胞 20 min,然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 20 min,分离上清和

沉淀,收集上清和沉淀,处理样品后进行 SDS-PAGE 电泳,确定最佳超声破碎菌体的时间。

1.4.2 不同条件溶解包涵体 按“1.3.1”节步骤得到的包涵体沉淀用 5 mL 0.01 mmol/L 的 PBS 磷酸盐缓冲液吹散沉淀,洗涤菌体,采用 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 15 min,弃上清,留沉淀,重复此步骤 2 次。包涵体沉淀分别采用以下 3 种方式处理:(1)5 mL 的 Binding Buffer 缓冲液(48 g 尿素,0.5 mL Imidazole,16.7 mL NaCl,2 mL Tris-HCl,pH 值 7.9)重悬沉淀;(2)5 mL 的 6 mol/L 盐酸胍溶液重悬沉淀;(3)用 5 mL 的 8 mol/L 尿素溶液重悬沉淀;3 种方法均采用超声破碎 10 min 使其充分混匀,分别 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,然后 8 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,分离收集上清和沉淀,处理样品后进行 SDS-PAGE 电泳,确定最佳溶解包涵体的条件。

1.4.3 Ni 柱亲和层析纯化目的蛋白 取诱导表达后的菌液离心收集菌体,采用 10 s/10 s 超声条件超声,采用 8 mol/L 尿素溶液过夜重悬包涵体沉淀使至溶解,然后溶解后的目的蛋白进行 Ni 柱亲和层析纯化,按照 His 标签蛋白纯化试剂盒(包涵体蛋白)说明书进行操作。用 1.5 mL EP 管分别收集 Binding Buffer 缓冲液冲洗层析柱的液体,Elution Buffer 缓冲液洗脱层析柱的液体,每管约 1 mL 左右。挑取收集的样品,处理样品后进行 SDS-PAGE 电泳,方法同“1.3.1”节。

2 结果与分析

2.1 重组猪 α 干扰素工程菌的诱导表达

2.1.1 不同 IPTG 浓度对目的蛋白表达的影响 构建的重组 α 干扰素的分子量约为 19 ku,从图 1 左图可以看出,在 19 ku 处,泳道 10 无目的蛋白,其余不同浓度 IPTG 均能诱导出目的蛋白,然后采用 Image Pro Plus 6.0 分析软件对不同诱导浓度下的目的蛋白浓度进行分析,结果如图 1 柱状图所示,IPTG 浓度为 1.0 mmol/L 时,目的蛋白含量最高,因此,在后续试验中选择 1.0 mmol/L 作为最佳诱导浓度。

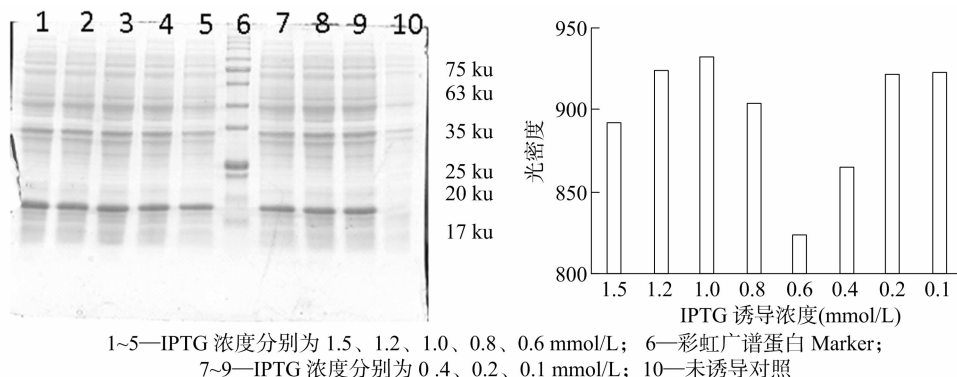


图1 不同 IPTG 浓度对目的蛋白表达的影响

2.1.2 不同诱导温度对目的蛋白表达的影响 根据不同 IPTG 浓度对目的蛋白表达的影响试验中结果,采用 1.0 mmol/L IPTG 诱导目的蛋白表达,重组 α 干扰素的分子量约为 19 ku,从图 2 左图可以看出,在 17、27、32、37 $^{\circ}\text{C}$ 不同温度下有诱导出目的蛋白,然后采用 Image Pro Plus 6.0 分析软件对不同诱导温度下的目的蛋白浓度进行分析,结果如图 2 右图所示,诱导温度为 27 $^{\circ}\text{C}$ 时,目的蛋白含量最高,因此,

在后续试验中选择 27 $^{\circ}\text{C}$ 作为最佳诱导温度。

2.1.3 不同诱导时间对目的蛋白表达的影响 根据不同 IPTG 浓度和不同温度对目的蛋白表达的影响试验中结果,采用 1.0 mmol/L IPTG,诱导温度 27 $^{\circ}\text{C}$,诱导目的蛋白表达,重组 α 干扰素的分子量约为 19 ku,从图 3 左图可以看出,在 2、3、4、5、6、7、8 h 有诱导出目的蛋白,然后采用 Image Pro Plus 6.0 分析软件对不同诱导时间下的目的蛋白浓度进行分析,

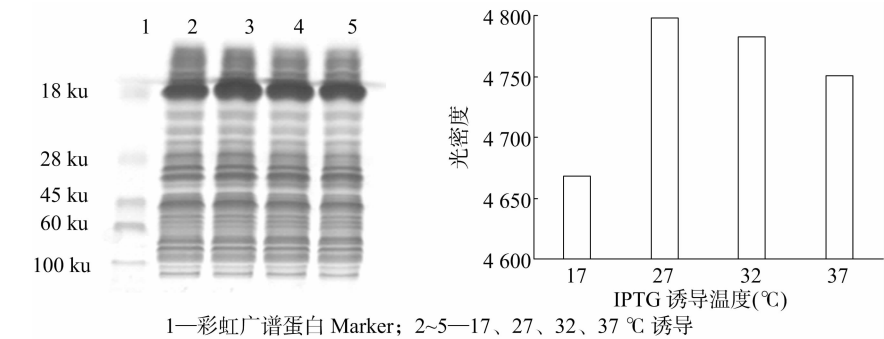


图2 不同诱导温度对目的蛋白表达的影响

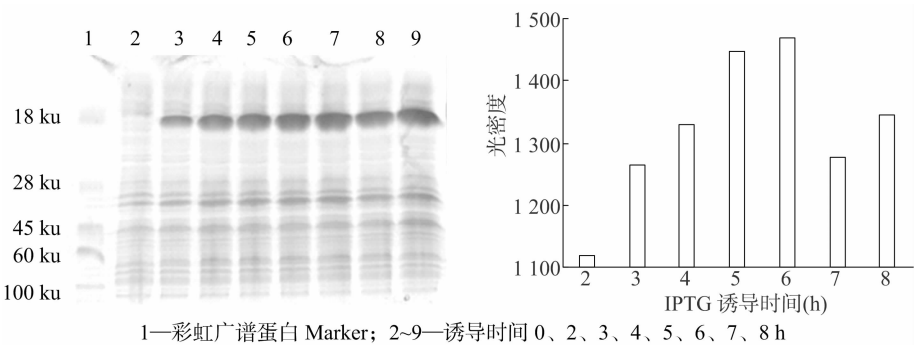


图3 不同诱导时间对目的蛋白表达的影响

结果如图 3 右图所示,诱导时间为 6 h 时,目的蛋白含量最高,因此,在后续试验中我们选择 6 h 作为最佳诱导时间。

2.2 重组猪 α 干扰素蛋白的分离纯化

2.2.1 不同的超声时间间隔对菌体破碎的影响 采用不同的超声条件裂解菌体,获得更多的目的蛋白,如图 4 所示,菌体经超声裂解后,目的蛋白主要以包涵体形式存在沉淀中,上清中可溶行目的蛋白含量很少,在 3 种条件下,得到包涵体含量差异不明显,所以为了能更多地裂解菌体得到包涵体,后续试验采用 10 s/10 s 超声条件。

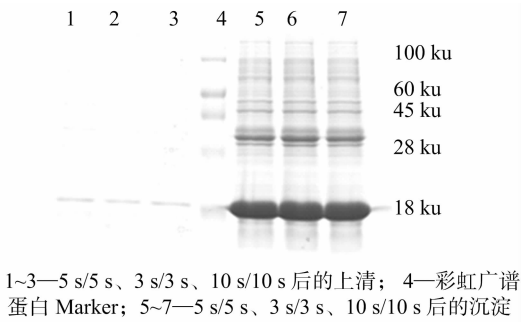


图4 不同的超声时间间隔对菌体破碎的影响

2.2.2 不同条件溶解包涵体 为了使目的蛋白以可溶性形式存在,采用 3 种不同条件溶解包涵体,溶解后取上清 SDS - PAGE 电泳。从图 5、图 6 中可见,溶解后上清中蛋白含量较少,用盐酸胍溶解包涵体后,目的蛋白仍主要以包涵体的形式存在;而采用 8 mol/L 尿素溶液过夜溶解包涵体,上清中可溶性的目的蛋白较多,包涵体基本被溶解变性,以可溶性的形式存在于溶液中(图 7),可用于后面的分离纯化。

2.2.3 Ni 柱亲和和层析纯化目的蛋白 重组猪 α 干扰素工程菌在 IPTG 浓度为 1.0 mmol/L,诱导温度 27 $^{\circ}$ C,诱导 6 h 后,

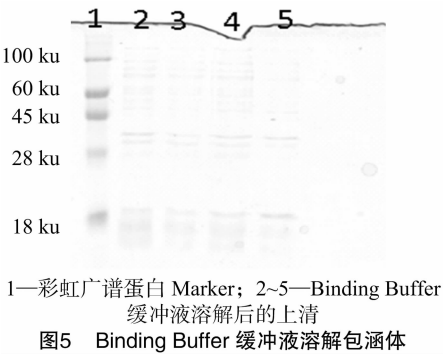


图5 Binding Buffer 缓冲液溶解包涵体

目的蛋白含量最高,菌体经采用 10 s/10 s 超声裂解,用 8 mol/L 尿素溶液溶解包涵体,目的蛋白以可溶性的形式存在于溶液中,猪 α 干扰素重组质粒带有 His 标签,采用 His 标签蛋白纯化试剂盒(包涵体蛋白)对可溶性的目的蛋白进行纯化,去除杂蛋白,分别取样品流出液、清洗液以及洗脱液电泳。从图 8 可以看出,经过 Ni 柱纯化,大部分杂蛋白可以去除,得到较纯的可溶性的目的蛋白。

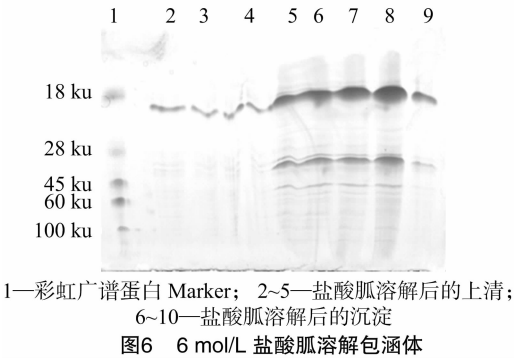


图6 6 mol/L 盐酸胍溶解包涵体

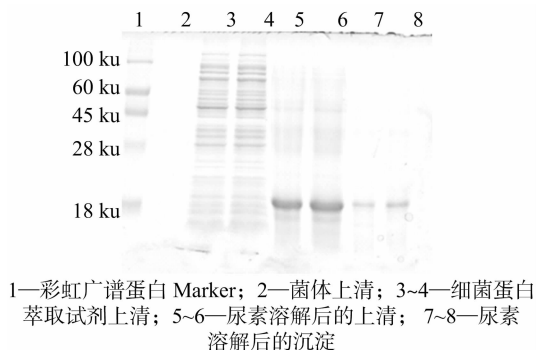


图7 8 mol/L 尿素溶液溶解包涵体

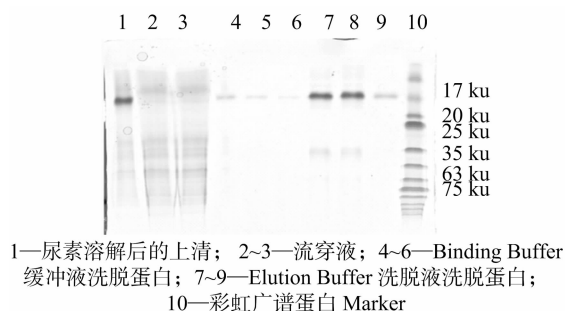


图8 Ni 柱亲和和层析纯化目的蛋白

3 讨论

干扰素是细胞受到病毒或其他诱生剂的诱导分泌的糖蛋白,是细胞内的一种重要细胞因子,具有抗病毒、抗肿瘤、免疫调节等多种生物学活性。由于传统干扰素表达量低、时间长,无法满足防治疾病的要求,因而采用基因工程方法制备重组的干扰素,目前所知的重组干扰素表达系统主要有大肠杆菌表达系统、酵母表达系统、动物细胞表达系统等^[4-6]。其中研究较为深入的是大肠杆菌表达系统,该系统具有培养条件简单、易操作、培养周期较短、成本相对低、产量高、易于规模化等优点,但也存在其不足之处——表达的蛋白常以包涵体的形式存在,需要对其进行变性、复性处理。外界表达许多条件对重组蛋白的表达具有重要的影响。大肠杆菌是利用乳糖操纵子作为启动子表达下游基因,需要乳糖作为诱导物进行诱导,但是因为大肠杆菌可利用乳糖,所以,目的基因表达不能够被持续诱导。而 IPTG 结构上与乳糖相似,可以代替乳糖且不会被大肠杆菌利用,外源基因也可以持续表达,但是不同诱导浓度对目的蛋白表达量有影响。另外诱导温度对目的蛋白表达也有重要影响,高温不利于蛋白结构的形成,温度太低不利于菌体生长,影响外源蛋白表达量;诱导时间的长度对目的蛋白的表达也具有至关重要的作用,随着时间的推迟,目的蛋白也可能被酶降解^[7]。本研究首先对不同 IPTG 浓度、诱导温度、诱导时间进行摸索,以期找到最佳的目的蛋白表达条件。通过 SDS-PAGE 的凝胶电泳最终确定使目的蛋白表达最高的最适 IPTG 浓度为 1.0 mmol/L,最适温度为 27 ℃,最适诱导时间为 6 h。

为了使目的蛋白充分从菌体中释放出来,本研究采用超声波破碎法提取目的蛋白,超声波破碎法利用声波在液体介质中形成很多小气泡,当小气泡炸裂,会产生很强的能量以及

热量,从而起到破碎细胞等物质的作用^[8]。本研究对比了不同的超声时间间隔(5 s/5 s,3 s/3 s,10 s/10 s)对菌体破碎的影响试验,试验结果显示上清比沉淀的条带颜色浅得多,目的蛋白主要以不溶性包涵体形式存在于沉淀中,在 3 种条件下得到包涵体沉淀量无明显差异,最终为了让菌体裂解充分,选择在 10 s/10 s 条件下裂解菌体。

包涵体是一种不溶性的蛋白质颗粒,一般是由于表达的蛋白合成速度太快,进行错误折叠,形成错配二硫键,彼此之间非特异性结合,没有达到足够的溶解度,从而形成沉淀。需要对沉淀中的包涵体作出变性处理,使之溶解在上清中,才能进行最后的纯化试验^[8]。首先采用包涵体提取试剂盒中的 Binding Buffer 缓冲液溶解包涵体,可以看出上清中条带的颜色非常浅,说明包涵体未充分溶解;采用盐酸胍溶解包涵体,可以看出,整个图片的条带都是扭曲的,这是由于盐酸胍电泳时与 SDS 结合形成沉淀,造成蛋白无法进行 SDS-PAGE 电泳以及亲和层析,否则会损坏层析柱,且蛋白上的盐酸胍无法有效除去。故采用 8 mol/L 尿素过夜溶解包涵体,试验结果可以很明显地看出,尿素溶解后的上清目的蛋白条带颜色很深,说明尿素处理后可溶性的目的蛋白含量较多,而沉淀中的蛋白含量却很少,因此,最终采用 8 mol/L 尿素过夜溶解包涵体,为后续纯化奠定基础。

重组大肠埃希工程菌[BL21(DE3)/pET-32a-IFN α] His(组氨酸)标签,采用了 Ni 柱亲和和层析纯化目的蛋白^[9]。在试验过程中,当尿素和 Binding Buffer 混合液通过层析柱时,带有 His 标签的目的蛋白就会与镍离子吸附而滞留在层析柱中。而杂蛋白不会被吸附,直接流出,就可以与目的蛋白分开,然后用含有较低咪唑浓度的 Binding Buffer 缓冲液(His 标签与镍离子的结合力没有咪唑与镍离子的结合力强)将与柱子结合不紧密的杂蛋白洗脱下来,再用含有较高咪唑浓度的 Elution Buffer 洗脱液将结合紧密的目的蛋白洗脱下来,采用此种方法蛋白纯度可以达到相对较高的程度。试验结果显示,泳道 2、3 是尿素和 Binding Buffer 缓冲液混合后过柱子流出的,目的蛋白结合在柱子上,杂蛋白没结合上去,因此洗掉很多杂蛋白。泳道 4、5、6 是 Binding Buffer 缓冲液洗脱柱子后流出的,而杂蛋白在前面已经被洗掉,因此此处的杂蛋白含量少(有部分杂蛋白也结合在柱子上,但连接不紧密),条带颜色有些淡。又因为用于过柱子的蛋白比较多,所以此处有些未结合在柱子上的目的蛋白被洗脱下来。泳道 7、8、9 是 Elution Buffer 洗脱液洗脱下来的蛋白,可以看出目的蛋白很多,杂蛋白很少,蛋白纯度相对较高,实现纯化目的蛋白的目的。

综上,本研究使目的蛋白表达量最多的 IPTG 诱导浓度为 1.0 mmol/L、诱导温度为 27 ℃、诱导时间为 6 h;超声波破碎细菌的最优时长循环为 10 s/10 s;8 mol/L 尿素溶解包涵体过夜可得到大量可溶性目的蛋白含量,Ni 柱亲和和层析后可去除大量杂蛋白,为后续研究重组猪 α 干扰素的生物活性及产业化开发奠定了基础。

参考文献:

- [1] 刘树成. 干扰素的分类与合理应用[J]. 北方药学, 2016, 13(11): 152-153.

雷雪峰,马爱生,李海翠,等. 8种禾本科牧草低温胁迫的生理响应及抗寒性比较[J]. 江苏农业科学,2019,47(9):218-222.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.09.051

8种禾本科牧草低温胁迫的生理响应及抗寒性比较

雷雪峰,马爱生,李海翠,王彩艳,刘红媛

(内蒙古农业大学,内蒙古呼和浩特 010019)

摘要:以来自内蒙古、宁夏、甘肃、新疆、四川、西藏等不同地区的8种禾本科牧草幼苗为材料,分别在15、5、0、-5℃下对其进行低温胁迫处理,研究其叶片细胞膜透性、丙二醛(MDA)含量、过氧化物酶(POD)活性、游离脯氨酸(Pro)及可溶性蛋白含量等生理生化指标对低温胁迫的响应。结果表明,随着低温胁迫加剧,8种禾本科牧草细胞膜透性、MDA含量总体呈现逐渐上升的趋势,不同物种上升幅度存在差异;而在POD活性、Pro及可溶性蛋白含量方面,不同物种间变化幅度差异较大。通过隶属函数法综合评价得出8种牧草抗寒性表现为细茎冰草>老芒麦>沙生冰草>蒙古冰草>多变鹅观草>冰草>黑药鹅观草>大芒鹅观草。

关键词:禾本科牧草;低温胁迫;生理响应;抗寒性

中图分类号: Q945.78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)09-0218-05

我国拥有近4亿 hm^2 的天然草地^[1-2],但由于全球气候变化及人类对草地不合理的开发利用,已普遍造成不同程度的草地退化,生产力严重下降^[3-4]。再加上近年来草地超载过牧严重,草畜矛盾日益加剧,严重地制约着当地畜牧业快速发展^[5]。只靠利用天然草地的养殖方式,已经不适应现代畜牧业生产快速发展的要求^[6]。辅助人工草地建设是解决草畜矛盾、改善生态环境的重要手段。在我国北方草原地区,能否正常越冬是制约人工草地建植的关键问题,因此亟需筛选抗寒性较强的牧草品种用于人工草地建植^[7]。

禾本科牧草具备产量高、品质好、适口性强、适应性广等特点,在草地畜牧业中发挥重要作用^[8]。目前虽然对禾本科牧草抗逆性研究报道较多^[9-12],但对其跨区域的种间抗寒性评价研究报道则相对较少。因此,本研究拟对来自内蒙古、宁夏、甘肃、新疆、四川、西藏等不同地区的8种禾本科牧草幼苗进行不同强度的低温胁迫,分析其各相关生理指标的变化情况,通过综合分析,进一步对其进行抗寒性评价,旨在为在我国范围内跨区域挖掘禾本科牧草抗寒材料,以及为寒区人工草地建植适宜品种筛选提供理论依据。

收稿日期:2018-01-14

基金项目:中国博士后科学基金面上项目(编号:2014M562496XB);

博士启动基金(编号:202-206057)。

作者简介:雷雪峰(1980—),男,内蒙古呼和浩特人,博士,讲师,主要从事植物生理生态及资源评价等教学及研究。E-mail: leixuefeng80@163.com。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料来自于6个地区,包括禾本科3个属8个种,材料具体情况见表1。

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计 试验于2016年9月至2017年1月在内蒙古农业大学农学院进行。试验采用盆栽育苗法,苗盆直径为12cm、高为15cm,栽培基质为农田土和蛭石,两者体积比为2:1,苗盆内装入等体积的混合栽培基质,播种量为50粒/盆,盆栽材料全部置于25℃(白天)/20℃(晚上)的人工气候箱内培养。待苗高达10cm时进行低温胁迫,胁迫设置4个水平(15、5、0、-5℃),并以室温(25℃)作对照,每个处理3次重复,各温度胁迫时间为3d。处理结束后,立刻剪取叶片称质量,并用液氮迅速冷冻,放入-70℃低温冰箱中保存备用。

1.2.2 试验测定指标 细胞膜透性测定采用电导仪法;丙二醛(MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸显色法;游离脯氨酸(Pro)含量测定采用茚三酮显色法;过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚氧化比色法;可溶性蛋白含量测定采用考马斯亮蓝G-250染色法。

1.3 抗寒性综合评价

抗寒性评价采用Fuzzy数学中隶属函数法进行综合分析,其计算公式如下:

与抗寒性呈正相关的参数(POD活性、可溶性蛋白含量

[2]尹训强,张冰,郑洁.猪重组干扰素 α 治疗哺乳仔猪腹泻的临床试验报告[J].今日养猪业,2018(6):80-81.

[3]王荣谈,郭佳宏,彭丽英,等.重组猪 γ -干扰素的表达与纯化[J].上海农业学报,2014,30(2):10-14.

[4]付加雷,宋长征,张更林.重组干扰素-tau在大肠杆菌中的高效表达[J].食品与药品,2006,8(11):35-38.

[5]钟颖,牛婷,代洪波,等.重组猪干扰素 α 6在毕赤酵母中表达及其活性研究[J].湖北畜牧兽医,2018,39(8):5-7.

[6]王海春,贾红,袁维峰,等.悬浮培养SI21细胞高效表达牛 γ -干扰素及其特性鉴定[J].中国畜牧兽医,2012,39(11):1-6.

[7]吴三桥,赵冠杰,万健,等.抗菌肽SMAP-29在大肠杆菌中表达条件的优化及纯化研究[J].江苏农业科学,2018,46(9):44-47.

[8]杨欣,曾献武,严君喜,等.重组人干扰素 α 2b包涵体纯化方法的研究[J].中国生化药物杂志,2001,22(6):295-297.

[9]邵菁,于瑞嵩,董世娟,等.重组猪 α 干扰素的亲和层析[J].上海农业学报,2007,23(4):31-33.