

小麦热胁迫相关蛋白 Hsa32 基因的克隆

李国良, 张红梅, 周人纲

(河北省农林科学院 遗传生理研究所, 河北省植物转基因中心, 河北 石家庄 050051)

摘要: 热胁迫相关蛋白 Hsa32 主要存在于陆生植物中, Hsa32 参与植物获得性耐热性的维持。本研究以 37 ℃ 热胁迫 1 h 的小麦幼苗叶子为材料, 提取总 RNA, 结合 RT-PCR 和 RACE 的方法克隆获得小麦 Hsa32 基因, 该基因完整的开放阅读框全长 885 bp, 编码 294 个氨基酸。编码的氨基酸与水稻中 Hsa32 (OsHsa32) 同一性最高, 达 83 %, 与拟南芥中 Hsa32 (AtHsa32) 有 66 % 的同一性, 与番茄中 Hsa32 (LeHsa32) 有 63 % 的同一性, 由此将其命名为 TaHsa32。Northern 杂交结果表明, TaHsa32 是一个诱导型热激蛋白。

关键词: 小麦; 热激蛋白; Hsa32; 克隆

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 - 7091 (2008) 06 - 0001 - 05

Cloning of a Heat-stress-associated Protein Hsa32 Gene from Wheat

LI Guo-liang, ZHANG Hong-mei, ZHOU Ren-gang

(Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: Hsa32 (heat-stress-associated 32-kDa protein) is mainly found in land plants and takes part in acquired thermotolerance in plants. A novel Hsa32 protein gene was cloned from wheat (*Triticum aestivum* L.) after heat stress 1 h at 37 ℃ using RT-PCR and RACE (rapid amplification of cDNA ends) technology, and named as TaHsa32. The complete open reading frame (ORF) of the TaHsa32 cDNA was 885 bp and encoding a protein of 294 amino acid residues. The comparison of the deduced amino acid sequences of the TaHsa32 with OsHsa32 (from rice), AtHsa32 (from *Arabidopsis*) and LeHsa32 (from tomato) showed that this was a highly conserved protein and the identity was 83 %, 66 %, 63 %, respectively. Using Northern blot analysis it was found that the expression of TaHsa32 gene was induced by heat stress.

Key words: Wheat; Heat shock protein; Hsa32; Cloning

当生物体或细胞受到非致死高温时, 就会迅速产生热激蛋白 (Heat shock protein, Hsp)。热激蛋白在生物体中普遍存在, 从原核生物到真核生物, 几乎每个细胞和多细胞组织都发现热激蛋白的存在^[1]。一些热激蛋白在生物体中高度保守, 如 Hsp70 和 Hsp90; 一些热激蛋白在生物体间的差异很大。热激蛋白具有分子伴侣功能, 可以阻止蛋白质发生错误折叠和凝集, 从而保护细胞免受热激伤害^[2-4]。

植物主要营固着生长, 尤其是陆生植物, 不能主动躲避环境胁迫 (如热胁迫、干旱胁迫等) 带来的危害。植物克服热胁迫的生理机制相对于动物而言更具复杂性, 有其特有的特征。例如, 高等植物相对于其他真核生物有更多种类的小分子量的热激蛋白和热激因子 (Heat shock transcription factor, Hsf) 家族成

员^[5,6]。模式植物拟南芥中热激因子和热激蛋白参与植物耐热性的研究比较深入。研究表明, 拟南芥 HsfA1a、HsfA1b 和 HsfA3 参与了植物耐热性的获得^[7-10], HsfA2 和 Hsp101 在植物获得性耐热性方面发挥重要作用^[11,12], Hsp70、小分子量热激蛋白也参与植物耐热性^[13,14], 我们的工作证明了拟南芥 J 蛋白 (atDjA2 和 atDjA3) 参与植物耐热性的获得^[15]。热胁迫相关蛋白 Hsa32 是主要发现于陆生植物中的一类热激蛋白, 在植物体遭受非致死热激后的恢复期间耐热性获得过程中具有重要作用。水稻、番茄、拟南芥中 Hsa32 基因在转录水平上明显受热激诱导表达; 拟南芥 Hsa32 对植物体正常的生长和发育是不需要的, 利用其突变体研究表明它参与植物的获得性耐热性^[16,17]。

收稿日期: 2008 - 10 - 28

基金项目: 河北省自然科学基金 (C2004000726); 河北省农林科学院青年基金 (A06060102)

作者简介: 李国良 (1979 -), 男, 河北丰润人, 助理研究员, 主要从事植物抗逆生理研究。

本研究结合 RACE 与 RT-PCR 方法从小麦中克隆了 *TaHsa32* 基因,为进一步研究该基因的功能以及深入探索小麦耐热机理奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 小麦材料与培养条件

小麦 (*Triticum aestivum* L.) 品种 90-80 为河北省农科院遗传生理所分子细胞实验室保存,将小麦种子播种在装满蛭石的花盆中,在 16 h 光照/8 h 黑暗的条件下培养,温室的昼夜温度控制在 22~18℃。待小麦长到两叶一心期时,对小麦幼苗进行 37℃ 热胁迫处理后收取第 2 叶,立即放入液氮中速冻,备用。

1.2 酶和化学试剂

总 RNA 分离试剂购自华舜(上海)生物工程有限公司;胶回收试剂购自华美(北京)生物工程有限公司;T-vector 购自生工(上海)生物工程技术服务有限公司;Goldview 核酸染料购自北京赛百胜基因技术有限公司。其他化学试剂均购自宝(大连)生物工程有限公司。

1.3 小麦叶片总 RNA 的提取与 cDNA 第一链的合成

利用华舜生物工程有限公司的 RNArose Reagent Systems 方法提取小麦叶片总 RNA。提取 RNA 所用的塑料制品用 0.1% 的 DEPC 水浸泡过夜后,高压灭菌。以 Oligo dT 作为反转录引物(5'-TTTTTTTTT-3')进行反转录合成 cDNA 第一链,反应体系:10×RNA PCR Buffer 1 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μL, dNTP Mixture (各 10 mmol/L) 1 μL, AMV Reverse Transcriptase 0.5 μL, RNase Inhibitor 0.25 μL, Oligo dT (2.5 μmol/L) 0.5 μL, RNase Free H₂O 4.75 μL。反应程序:30℃ 10 min, 50℃ 25 min, 95℃ 5 min, 5℃ 5 min。

1.4 小麦 Hsa32 基因 cDNA 的克隆

将水稻 *Hsa32* 基因 cDNA 与小麦 EST 库进行比对,通过生物信息学方法分析获得与水稻 *Hsa32* 基因 cDNA 同源性比较高的 2 个 ESTs (CJ674683 和 BJ290222),表明小麦中存在与水稻 *Hsa32* 基因同源的 *Hsa32* 基因。并且这 2 个 ESTs 有部分序列重叠,根据非重叠序列设计引物(正向引物:5'-CGACGACCGCCCGG-3';反向引物:5'-CGGAGCGCTCCTTC-3'),以 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增。按照宝生物工程有限公司的 PCR 扩增试剂盒说明指导配制反应体系,反应程序为:94℃ 45 s, 50℃ 45 s, 72℃ 2 min; 30 个循环。根据获得的 EST 测序结果分析其确为小麦 *Hsa32* 同源基因的部分序列,据此设计正向引物(5'-GCCAGGTGCAGATATG-3'),又依据 mR-

NA 带有 PolyA 尾巴的特点设计反向引物(5'-TTTTTTTTT-3'),以 cDNA 第一链为模板利用 3'-RACE(快速扩增 cDNA 末端)技术进行扩增。按照 3'-RACE 试剂盒(宝生物工程有限公司)说明书配制反应体系,反应程序为:94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 2 min; 30 个循环。根据测序结果并综合 EST 分析信息设计特异引物(正向引物:5'-ATGAGGGGGTGGAGAGAGGAGGTG-3';反向引物:5'-TCACATCAGGAAGAACGCCGAAGGGAG-3'),以总 RNA 为模板利用 RT-PCR 技术一步法扩增小麦 *Hsa32* 基因 cDNA 开放阅读框。按一步法试剂盒(宝生物工程有限公司)说明指导配制反应体系,反应程序为:48℃ 25 min; 88℃ 45 s, 50℃ 45 s, 72℃ 3 min (30 个循环)。

1.5 PCR 产物克隆

将 PCR 产物经胶回收纯化后连接到 T-vector 上,转化大肠杆菌 DH5 感受态细胞,在 LB 固体培养基上过夜培养进行蓝/白斑筛选,连接上的一般为白斑。挑取白斑单菌落进行 LB 液体培养基过夜培养后抽提质粒,经 PCR 鉴定并电泳分析正确后由生工(上海)生物工程技术服务有限公司进行测序。

1.6 基因测序与分析

基因序列分析和同源性比较通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 网站上的 BLAST 程序完成;氨基酸序列比较和系统树分析通过 DNAMAN 软件完成。

1.7 探针标记与 Northern 杂交分析

用 PCR 方法获得小麦 *Hsa32* 基因编码区的核苷酸序列作为 Northern 杂交的探针,探针的标记用宝生物工程有限公司随机引物 DNA 标记试剂盒与 [³²P]-dCTP,按试剂盒试验指导进行。在含有甲醛的凝胶上进行变性电泳和 Northern 杂交的方法按照 Sambrook 等^[18]的方法进行。用 Goldview 染色的 rRNA 作为对照。

2 结果与分析

2.1 生物信息的分析

将水稻 *Hsa32* 基因 cDNA 与小麦 EST 库进行比对,发现与水稻 *Hsa32* 基因 cDNA 同源性比较高的有 2 个 ESTs 序列 (CJ674683 和 BJ290222),这 2 个 ESTs 序列有部分重叠,表明小麦中可能也存在与水稻 *Hsa32* 基因同源的基因。

2.2 小麦叶片总 RNA 的提取以及 Hsa32 同源基因 EST 大片段的扩增

当小麦幼苗长到两叶一心期时,对其进行 37℃ 热胁迫 1 h 后收取第 2 叶,立即放入液氮中速冻。

按照 RNArose Reagent Systems 方法提取小麦叶片总 RNA ,用 DEPC 处理过的灭菌水溶解后,测得 A_{260}/A_{280} 大于 1.8 ,质量较好 ,可以用于后续试验。

以提取的总 RNA 为模板 ,Oligo dT 为引物进行 cDNA 第一链的反转录反应 ;根据 2.1 获得的 2 个 ESTs 序列中的非重叠序列设计引物 ,以 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增 ,电泳结果显示得到一分子量约为 750 bp 的特异条带 (图 1) ,胶回收后连接到 T-vector 上 ,PCR 法鉴定正确后进行测序。该 EST 序列与 OsHsa32 比对显示两者有很高的同一性 ,表明该 EST 大片段为小麦 *Hsa32* 同源基因的部分序列。

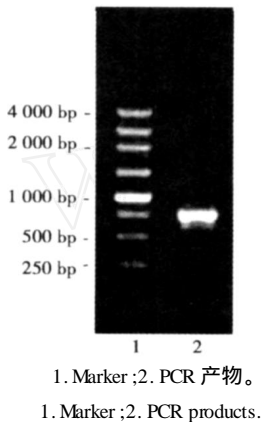


图 1 小麦 *Hsa32* 基因 EST 大片段扩增产物的电泳图谱
Fig.1 1 % agarose gel analysis of PCR products

2.3 小麦 *Hsa32* 基因 cDNA 的克隆

为了获得小麦 *Hsa32* 同源基因的全长 cDNA ,依据 mRNA 带有 PolyA 尾巴的特点设计 Oligo dT 引物 ,结合 EST 大片段设计正向引物 ,以 cDNA 第一链为模板利用 3 -RACE 的方法扩增基因的 3 端序列 ,电泳结果显示为一特异条带 (图 2) ,胶回收后连接到 T-vector 上 ,鉴定正确后进行测序。

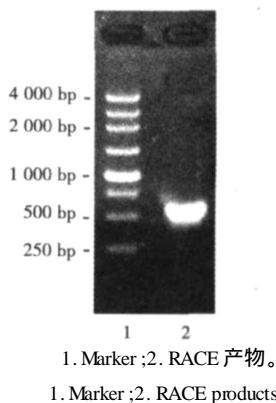


图 2 RACE 产物的电泳图谱

Fig.2 1 % agarose gel analysis of RACE products

综合以上所有信息设计扩增小麦 *Hsa32* 同源基因开放阅读框的特异性引物对 ,以总 RNA 为模板利用一步法 RT-PCR 方法扩增该基因的开放阅读框全序列。扩增产物经 1 %琼脂糖凝胶电泳分析为一特异条带 (图 3) 。将 PCR 产物经胶回收纯化后连接到 T-vector 上 ,转化 DH5 大肠杆菌感受态细胞 ,经 PCR 鉴定并电泳分析正确后 ,用于进一步测序。

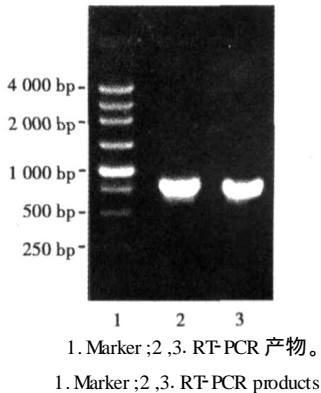


图 3 小麦 *Hsa32* 的 cDNA 开放阅读框 RT-PCR 扩增产物电泳图谱

Fig.3 1 % agarose gel analysis of RT-PCR products

```
1 atgaggggggtggagagagggtgggtggcgctgctgagggcgacggccccggcgacgacggcgccggagaa
M R G W R E E V V A L S L E A H G P G D D R P E K
76 ccgcgcgcgtacgggtcacggagatgaggagccctgctactccttccgccccccaccacggcctccaggaa
P R R Y G V T E M R S P C Y S F R P A H H A L Q E
151 atattggataacatcgcccttttggtagcgtctgaagtgttccggcggaatcctagttttagtggggaaggaa
I L D N I G P F V D G L K F S G G S H S L M G K E
226 ctgatcagagagatcactaatttggcgacacagcatgacatgtatgtgagcactggtagtggcgagagatctc
L I R E I T N L A H K H D M Y V S T G D W A E H L
301 ctgcgcaggagacccctcttcttcaagcaatattgtagaggaatgcaaggagttgggattcgacaccattgagctc
L R Q G P S S F K Q Y V E E C K E L G F D T I E L
376 aacgcgggattctcgaagctccctgaagggtatctctgagactagtcgcctcataaagaacactggcttgcga
N A G S L K L P E E A I L R L V R L I K N T G L R
451 gccaaagccctgttttcagtcgaagttcgacagctctgatatccctgcagctgggtgataggcgcttggggcttac
A K P L F S V K F D S S D I P A A G D R A F G A Y
526 atagctccagtgaaagcagagctcagaagagtcgaagacattgacctgttatcaggaggcgagagatgctg
I A P V K Q S S E R V E D I D L L I R R A E R C L
601 gaggcagggtcggtatgatcatgatcgatgcgacgacgtgtgccagcgcgaggactcgtcaggcgggacatc
E A G A D M I M I D A D D V C Q R A D S L R A D I
676 atcgcaagatcgctggcgccgtcggtcgagagagaaccatgttcgagacgtccgggtcccaacacctctgagtg
I A K I V G R L G L E R T M F E T S G A N T S E W
751 ttctgtaaacgatacggccccaggggtgaacctcttctgtgaccactccgaggtgatgaacctggagcgctccgg
F V K R Y G P R V N L F V D H S E V M N L E R L R
826 ggcttggacgtgcgcaggagcgtccggccccctgctcccttcccggttcttctgatgtga
G L D V R R S V R P L L P S P F F L M *
```

图 4 Ta *Hsa32* 的 cDNA 开放阅读框的核苷酸序列及由此推导的氨基酸序列
Fig.4 The nucleotide and deduced amino acid sequences of Ta *Hsa32*

2.4 基因序列分析

测序结果显示,小麦 *Hsa32* 同源基因开放阅读框大小为 885 bp,编码 294 个氨基酸(图 4)。利用 BLAST 软件分析表明,该基因编码的氨基酸与水稻中 *Hsa32* (OsHsa32, O06g46900) 同一性最高,达 83 %,与拟南芥中 *Hsa32* (AtHsa32, At4g21320) 有 66 %

的同一性,与番茄中 *Hsa32* (LeHsa32, AY623906) 有 63 % 的同一性,由此将其命名为 TaHsa32。由 DNA-MAN 软件分析它们的同源性比较结果如图 5 所示。系统进化分析表明 TaHsa32 与 OsHsa32(图 6)在进化上最近。

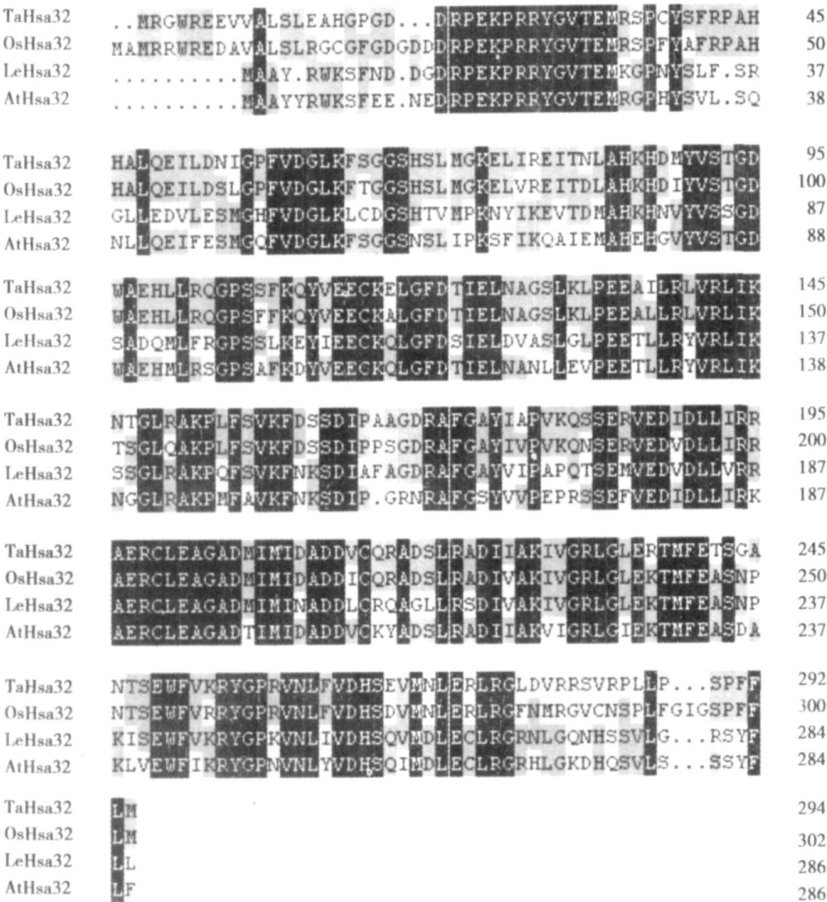


图 5 小麦 *Hsa32* 与水稻、番茄、拟南芥 *Hsa32* 氨基酸序列比较

Fig. 5 Alignment of the deduced amino acid sequences of *Hsa32* homologs from plants

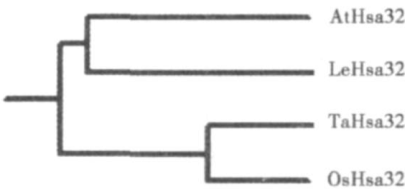


图 6 小麦、水稻、番茄、拟南芥 *Hsa32* 的进化关系

Fig. 6 Phylogenetic relationship of plant *Hsa32* proteins

2.5 热激对 TaHsa32 基因表达的影响

当小麦幼苗长到两叶一心时期,对其进行 37 热激处理不同时间(10 ~ 120 min)后取第 2 叶提取总 RNA,进行 Northern 杂交分析。以 22 生长条件下的小麦叶片作对照,Northern 杂交的结果(图 7)表明 *TaHsa32* 基因是诱导型表达的。在正常生长条件下,在小麦叶片中几乎检测不到 *TaHsa32* 基因的表达,热激 10 min 后就开始有微弱的表达,随着热激时间的延长,表达量快速增加,到 60 min 时达最大

值,其后表达量有所下降。说明 TaHsa32 具有热激蛋白的特点,是典型的诱导型热激蛋白。

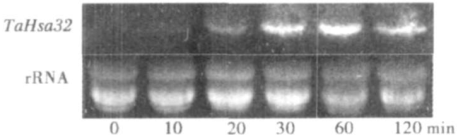


图 7 小麦叶在 37 热激过程中 TaHsa32

基因的表达变化

Fig. 7 The expression kinetics of *TaHsa32* gene during heat shock at 37

3 讨论

植物不能主动逃避环境胁迫带来的危害,为了繁衍生息,它们必须忍受生长环境发生的各种各样的胁迫。对于陆生植物而言,温度的大幅波动是很常见的事情。陆生植物在抵御热胁迫获得耐热性方面有其特有的基因在发挥作用^[8]。Charnig 等^[17]分

别从水稻、番茄、拟南芥中克隆出 Hsa32 基因, Hsa32 基因在转录水平上明显受热激诱导表达。暗示该基因在植物热激反应中发挥普遍作用。非致死热激处理可以诱导 AtHsa32 蛋白的合成,尤其是在热激恢复过程中。Hsa32 对拟南芥正常的生长和发育是不需要的,转录和翻译水平的研究表明它参与植物的耐热性。AtHsa32 突变体的研究表明,AtHsa32 在植物体遭受非致死热胁迫后的恢复期间耐热性获得过程中起重要作用。这都证明了 Hsa32 参与植物获得性耐热性,暗示该蛋白具有植物在面对环境胁迫获得更好保护的重要特性^[16,17]。

小麦是重要的粮食作物,关于小麦中热激蛋白以及耐热机理的研究很少。我们从热激处理的小麦叶片中克隆获得一热胁迫相关蛋白基因(TaHsa32)。该基因的获得为深入研究其功能以及小麦耐热机理奠定了基础。

Hsa32 蛋白氨基酸序列比对结果显示,TaHsa32 与 OsHsa32 的同一性最高,达 83%,与 LeHsa32 和 AtHsa32 的同一性也分别高达 66%和 63%,表明 Hsa32 蛋白在植物中高度保守。在系统进化分析上显示 TaHsa32 与 OsHsa32 在进化上最近,说明两者在进化过程中较番茄和拟南芥分化晚。

Northern 杂交的结果表明,正常的生长条件下,TaHsa32 基因在小麦叶片中几乎不表达;37℃热激在很短的时间(10 min)就能诱导 TaHsa32 基因的表达,20 min 大幅度提高小麦叶片中 TaHsa32 的 mRNA 水平,1 h 达到最大值,其后表达量稍有下降。TaHsa32 基因对热激的反应说明,TaHsa32 是一种热激蛋白,而且是受热激诱导表达,是诱导型热激蛋白。

我们对 TaHsa32 的了解还是初步的,关于其在植物耐热乃至抗逆性中的功能还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Lindquist S. The heat-shock response[J]. Ann Rev Biochem, 1986,55:1151 - 1191.
- [2] Georgopoulos C, Welch W J. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones[J]. Annu Rev Cell Biol, 1993,9:601 - 634.
- [3] Lee G J, Vierling E. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein[J]. Plant Physiol, 2000,122:189 - 198.
- [4] Hartl F U, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein[J]. Science, 2002, 295:1852 - 1858.
- [5] Waters E R, Lee G J, Vierling E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants[J]. J Biol Chem, 1996, 271:325 - 338.
- [6] Nover L, Bharti K, Doring P, et al. Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need[J]. Cell Stress Chaperones, 2001, 6:177 - 189.
- [7] Lohmann C, Eggers-Schumacher G, Wunderlich M, et al. Two different heat shock transcription factors regulate immediate early expression of stress genes in Arabidopsis[J]. Mol Gen Genomics, 2004, 271:11 - 21.
- [8] Busch W, Wunderlich M, Schoffl F. Identification of novel heat shock factor-dependent genes and biochemical pathways in Arabidopsis thaliana[J]. Plant J, 2008, 41:1 - 14.
- [9] Schramm F, Larkindale J, Kiehlmann E, et al. A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of Arabidopsis[J]. Plant J, 2008, 53:264 - 274.
- [10] Yoshida T, Sakuma Y, Todaka D, et al. Functional analysis of an Arabidopsis heat-shock transcription factor HsfA3 in the transcriptional cascade downstream of the DREB2A stress regulatory system[J]. Biochemical and Biophysical Res Communications, 2008, 368:515 - 521.
- [11] Charny Y Y, Liu H C, Liu N Y, et al. A heat-inducible transcription factor, HsfA2, is required for extension of acquired thermotolerance in Arabidopsis[J]. Plant Physiol, 2007, 143: 251 - 262.
- [12] Queitsch C, Hong S W, Vierling E, et al. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis[J]. Plant Cell, 2000, 12:479 - 492.
- [13] Su P H, Li H M. Arabidopsis stromal 70-kDa heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds[J]. Plant Physiol, 2008, 146:1231 - 1241.
- [14] Dafny-Yelin M, Tzfira T, Vainstein A, et al. Non-redundant functions of sHSP-Clis in acquired thermotolerance and their role in early seed development in Arabidopsis[J]. Plant Mol Biol, 2008, 67:363 - 373.
- [15] Li G L, Chang H, Li B, et al. The roles of the atDjA2 and atDjA3 molecular chaperone proteins in improving thermotolerance of Arabidopsis thaliana seedlings[J]. Plant Science, 2007, 173:408 - 416.
- [16] Liu N Y, Ko S S, Yeh K C, et al. Isolation and characterization of tomato Hsa32 encoding a novel heat-shock protein[J]. Plant Sci, 2006, 170:976 - 985.
- [17] Charny Y Y, Liu H C, Liu N Y, et al. Arabidopsis Hsa32, a novel heat shock protein, is essential for acquired thermotolerance during long recovery after acclimation[J]. Plant Physiol, 2006, 140:1297 - 1350.
- [18] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001:150 - 153.