

拟南芥热激转录因子 *HSFA2* 基因克隆与原核表达

王瑾瑜, 任亚萍

(河南城建学院 城市规划与建筑系, 河南 平顶 460440)

摘要: 为了进一步阐明 *HSFA2* 功能, 现采用 Trizol 法分离拟南芥叶片总 RNA, 用 RT-PCR 方法得到拟南芥 *HSFA2* 基因, 经过连接、转化和蛋白诱导对其进行了原核表达研究。结果表明: 从拟南芥叶片中分离到了高质量的总 RNA, 进而扩增到了目的基因, 将其连入表达载体 *PGEX-KG*, 且转入大肠杆菌 *BL21* 中。不同温度条件下的诱导结果表明, 16℃下蛋白诱导效果较好。采用这套系统, 可以使 At*HSFA2* 得以较好的表达。

关键词: 热激转录因子; 基因克隆; 原核表达

中图分类号: S 637.903.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)08-0157-03

当受到热和一些化学因子胁迫的时候, 细胞会产生一系列的反应来维持自身的正常功能。在这一系列反应中, 热激蛋白(Heat shock protein, HSP)的大量积累就

是细胞自我保护机制一个非常重要的方面。热激蛋白在抵抗胁迫造成的伤害、蛋白的胞间分布与降解, 甚至在信号转导中起着非常重要的作用, 使细胞能够在胁迫情况下继续生存^[1-3]。

作为信号转导途径的末端组分, 热激转录因子(Heat shock transcription factor, HSF)可以识别存在于热激蛋白启动子中的一段非常保守的序列(5' - *nGA AnnTTCnnGAAn* - 3'), 从而调控热激蛋白的表达^[3]。HSF 基因首先从酵母中克隆得到^[4-5], 之后在果

第一作者简介: 王瑾瑜(1982), 女, 河南平顶山人, 硕士, 助教, 现主要从事园林规划与设计的研究工作。E-mail: jinyu7615816@126.com。

通讯作者: 任亚萍(1983), 女, 河南平顶山人, 硕士, 助教, 现主要从事园林规划与设计的研究工作。

收稿日期: 2009-12-09

即 MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 为最适宜生根培养基。

已有研究表明, 丁香属 8 种植物均能诱导出愈伤组织^[2], 除白丁香愈伤组织的分化率较高外^[4], 大部分丁香属植物愈伤组织的分化率很低, 甚至没有分化^[2]。该试验从近 20 种培养基中筛选出来的紫丁香最佳分化培养基配方与王兴安的白丁香试验分化培养基配方相同, 但该试验的分化率比较低, 说明同属植物的再生条件相似, 不同种再生条件有差异, 紫丁香分化培养基的最佳激素种类和浓度配比仍需要继续探索, 对紫丁香的再生

体系条件进行再优化, 以建立起紫丁香高效再生体系, 为紫丁香和其它木樨科木本植物转基因工作奠定基础。

参考文献

- [1] 崔波, 李服, 马杰. 郑州植物志(上册)[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2008: 739-740.
- [2] 郭辉. 丁香属植物组织培养的研究进展[J]. 青海大学学报(自然科学版), 2009(2): 44-47.
- [3] 刘建斌, 赵祥云, 王俊娟, 等. 紫丁香的组织培养[J]. 北京农学院学报, 2001(4): 40-43.
- [4] 王兴安. 白丁香的器官克隆和快速繁殖[J]. 国土与自然资源研究, 2006(3): 96.

Isolated Culture and Establishment of Regeneration System of *Syringa oblata*

ZHANG Xian-yun, YUAN Xi-rui, CUI Bo, MA Jie

(Institute of Biology Technology, Zhengzhou Teacher's College, Zhengzhou, Henan 450044)

Abstract: The paper studied the isolated culture and regeneration system of *Syringa oblata* using its stem, and discussed the effects of different hormone combination on induction of aseptis bud, callus, differentiation, generation and rooting. The results showed that MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L was optimum medium for induction of aseptis bud, callus from explants, differentiation and generation; MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L is optimum medium for rooting.

Key words: *Syringa oblata*; callus; differentiation; rooting

蝇^[9]、哺乳动物^[7,8]和番茄^[9]中也相继克隆得到。试验数据表明,番茄 *HSFA2* 是一个严格受热诱导的 HSF,它在热胁迫和恢复循环中具有较高的激活潜力,且能连续积累,因此,*HSFA2* 被认为是耐热性细胞中的一个统治性的 HSF^[10]。拟南芥中 *HSFA2* 可调节 HSP101、HSP70、sHSP 和 APX 的表达,同时严格地受热诱导表达,其 knock out 突变体热敏感性提高,表达过 *HSFA2* 的植株则表现出了较强的耐热和渗透胁迫的能力^[11-13]。

HSFA2 通过调节 HSP 表达,对于细胞在胁迫情况下的生存至关重要。最近有试验证据表明,HSF 除在转录水平上调 HSP 的表达外,*HSFA1* 和 *HSFA2* 还在蛋白水平上相互作用,通过形成复合体,共同来行使基因的激活功能^[13]。因此,可以推断,HSF 在细胞内功能的实施很可能参与到一个复杂的蛋白质网络中。该试验拟纯化拟南芥 *HSFA2* 蛋白,为蛋白体外功能的研究、植物总蛋白的 Western blot 以及通过免疫共沉降方面寻找与其相互作用的蛋白奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用材料为拟南芥 *Columbia* 生态型,培养条件为 22℃,16 h 光照,8 h 黑暗。

1.2 试验方法

1.2.1 RNA 的分离、cDNA 的合成及 PCR 方法 采用 invitrogen 公司 trizol 试剂盒进行总 RNA 的分离,cDNA 的合成采用 invitrogen superscriptIII,具体操作按说明书进行;PCR 反应用 Takara 公司的 *extaq* 聚合酶,采用 20 μL 体系,引物序列见表 1。

1.2.2 原核表达载体构建 原核表达载体采用 PGEXKG,将 PCR 产物和载体用 *Sma*I 和 *Sal*I 双酶切,用 Takara T4 连接酶,将其基因片段连接到载体上。通过酶切鉴定后,将阳性克隆送测序公司进行测序。

1.2.3 目的基因原核表达 测序后,将与拟南芥网站公布的 *HSFA2* 序列完全相同的克隆转入大肠杆菌 BL21 中。取阳性菌斑,先用 3~5 mL 的菌液小摇过夜,然后按 1:200 的比例接到 1 L LB 液体培养基中,37℃条件下摇至 OD 值约为 0.5,加 500 μM IPTG,分别用 200 r/min 于 16、28、37℃摇 10 h。

1.2.4 凝胶电泳检测 离心收集菌体,弃上清液,加入 PBS 重新悬浮菌体。用超声波将其破碎,使总蛋白释放到 PBS 缓冲液中。用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行总蛋白电泳。

表 1 PCR 引物	
引物	序列
For	ACTCCCGGAATGGAAGAAGTGAAG
Rev	GTGCTCGACTTAAGGTTCCGAACCAAG

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的分离结果

将拟南芥在 37℃条件处理 1 h,取 1 片叶子进行 RNA 的提取。经过凝胶电泳检测 RNA 的完整性及纯度(见图 1)。28S 和 18S 条带边缘清晰,没有明显的降解,可以用于反转录。

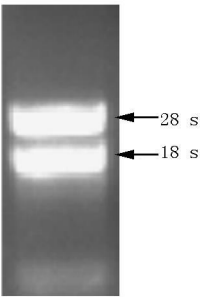


图 1 拟南芥叶片总 RNA

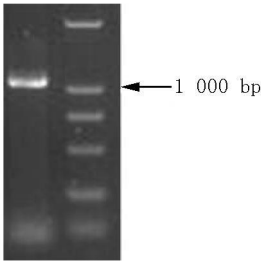


图 2 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测

2.2 PCR 反应

取 1 μL 反转录好的 cDNA 作为模板,进行 PCR 反应,将 PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测(见图 2),将符合大小的条带切胶回收。

2.3 重组质粒的酶切鉴定

将酶切后回收纯化的 PCR 产物和载体经连接酶切反应,将目的基因连在大肠杆菌蛋白表达载体 PGEX-KG 上,经过转化,选出阳性克隆,进行进一步酶切鉴定(见图 3)。从图 3 所示,分别检测到了约 5 KB 的载体和约 1 KB 的基因条带,说明目的基因已经连入 PGEX-KG,可以将其转入表达菌株 BL21 中,进行蛋白表达的诱导。

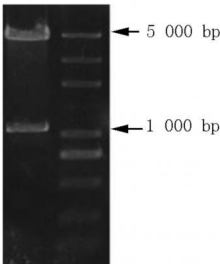


图 3 重组质粒双酶切鉴定

2.4 总蛋白电泳检测

取超声波破碎的总蛋白,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。按拟南芥网站公布的 *HSFA2* 分子量为 39 KD,因为 PGEX-KG 上在该蛋白前面加入了一段 26 KD 大小的 GST 标签形成融合蛋白,因此其分子量应该为 66 KD 左右。如图 4 所示,在 66 KD 附近检测到了其表达,随着温度的升高,蛋白的表达量呈递减趋势。

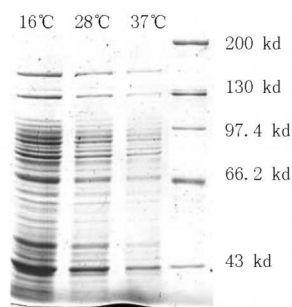


图4 不同温度条件下总蛋白电泳图

3 结论与讨论

与酵母(1个)、果蝇(1个)、和脊椎动物(4个)相比,植物拥有数量众多的 HSF^[15-16]。据目前所知,拟南芥有 21 个,番茄至少有 18 个,大豆中至少有 34 个。数量众多的 HSF 不但可以激活其下游基因表达,还可以通过蛋白质之间的互作来行使功能。因此,纯化拟南芥 HsFA2 蛋白,必将为其蛋白体外功能、蛋白质相互作用以及 Western blot 检测蛋白水平的表达等研究奠定良好的基础。

该试验采用 PGEX-KG 载体,将其转入大肠杆菌 BL21 株系中,在适当的温度下对其进行诱导表达,采用聚丙烯酰胺电泳检测到总蛋白中有明显的目的蛋白条带。应该注意的是,在引物设计中,要考虑到读码框的完整性,确保其不被破坏。

考虑到蛋白表达的常用温度,试验设置了 3 个温度梯度。从总蛋白电泳检测图来看,在 16℃ 表达情况较好,因此,试验将蛋白表达的温度确定为 16℃。

参考文献

- [1] Hartl F U, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein[J]. Science, 2002, 295: 1852-1858.
- [2] Young J G, Barra J M, Ulrich H F. More than folding: localized functions of cytosolic chaperons[J]. Trends Biochem Sci, 2003, 28: 541-547.
- [3] Bienz M, Pelham H R. Mechanisms of heat-shock gene activation in

higher eukaryotes[J]. Adv. Genet, 1987(24): 31-72.

- [4] Wiedenrecht G, Seto D, Parker C S. Isolation of the gene encoding the *S. cerevisiae* heat shock transcription factor[J]. Cell, 1988, 54: 841-853.
- [5] Sorger P K, Pelham H R. Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation[J]. Cell, 1988, 54: 855-864.
- [6] Clos J, Westwood J T, Becker P B et al. Molecular cloning and expression of a hexameric *Drosophila* heat shock factor subject to negative regulation[J]. Cell, 1990, 63: 1085-1097.
- [7] Rabindran S K, Giorgi T, Wu C. Molecular cloning and expression of a human heat shock factor HSF1[J]. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1997, 88: 6906-6910.
- [8] Sarge K D, Zimarino V, Holm K et al. Cloning and characterization of two mouse heat shock factors with distinct inducible and constitutive DNA-binding ability[J]. Genes Dev, 1991(5): 1902-1911.
- [9] Scarf K D, Rose S, Zott W, et al. Three tomato genes code for heat shock transcription factors with a region of remarkable homology to the DNA-binding domain of the yeast HSF[J]. EMBO J, 1990(9): 4495-4501.
- [10] Scharf K D, Heider H, Hohfeld I et al. The tomato hsf system: hsfA2 needs interaction with hsfA1 for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules[J]. Mol. Cell Biol, 1998(18): 2240-2251.
- [11] Charrn Y, Liu H, Liu N, 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] Li C, Chen Q, Gao X et al. AtHsfA2 modulates expression of stress responsive genes and enhances tolerance to heat and oxidative stress in Arabidopsis[J]. Sci China C Life Sci., 2005, 48: 540-550.
- [13] Ogawa D, Yamaguchi K, Nishitani T. High-level overexpression of the Arabidopsis HsFA2 gene confers not only increased thermotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth[J]. Exp. Bot, 2007 (12): 3373-3383.
- [14] Charr-Schaminet K Y, Baniwal S K, Bublak D et al. Specific interaction between tomato HsfA1 and HsfA2 creates hetero-oligomeric superactivator complexes for synergistic activation of heat stress gene expression[J]. Biol. Chem, 2009, 31: 48-57.
- [15] Nover L, Scharf K D, Gagliardi D V, et al. The Hsf world: classification and properties of plant heat stress transcription factor[J]. Cell Stress Chaperones, 1996(1): 215-223.
- [16] Miller G, Mittler R. Could Heat Shock Transcription Factors function as hydrogen peroxide sensors in plant[J]. Annals of Botany, 2006, 98: 279-288.

Gene Cloning and Prokaryotic Expression of Heat Shock Transcription

Factors HsFA₂ from *Arabidopsis thaliana*

WANG Jin-yu, REN Ya-ping

(Urban Planning and Architecture Department, Henan Institute of Urban Construction, Pingdingshan, Henan 460440)

Abstract: For further illustration of HsFA2 function, prokaryotic expression of AtHsFA2 was studied. We used Trizol reagent to extract total RNA from *Arabidopsis* leaves, and cloned AtHsFA2 by RT-PCR. Through ligation, transformation and protein-induced system, we expressed this protein in *Escherichia coli* BL21. The result showed that we had got AtHsFA2 by RT-PCR based on total RNA with high quantity, sub-cloned this gene into PGEX-KG and transformed the recombinant vectors into *Escherichia coli* BL21. At various temperatures, it was different for protein expression and better at 16℃. As above mentioned, the system was suitable for AtHsFA2 expression.

Key words: heat shock transcription factors; gene cloning; prokaryotic expression