

甜椒叶绿体小分子量热激蛋白 *CaHSP26* 增强拟南芥响应高温胁迫

贺立龙, 高娜娜, 单忠英, 郭尚敬

(聊城大学 生命科学院, 山东 聊城 250059)

摘要: 为了探讨小分子量热激蛋白(*CaHSP26*)与植物抗热逆境的相互关系,以转 *CaHSP26* 的拟南芥植株为研究材料,热激后测定野生型植物和转基因植物中电导率(REC)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)以及脯氨酸和可溶性糖的含量。结果表明:热激后转基因拟南芥的 REC、MDA 只相当于野生型的 73.78%、61.14%;CAT、APX 比野生型高 115.10%、125.77%;脯氨酸和可溶性糖的含量比野生型高 106.12%、53.31%。*HSP26* 蛋白增强了拟南芥抗高温的能力。

关键词: *CaHSP26*; 拟南芥; 高温胁迫

中图分类号: S 641.303.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)06-0140-04

逆境条件下植物体内产生大量热激蛋白(HSP),其中小分子量热激蛋白(sHSP)含量最丰富。不管机体处于应激状态还是处于正常生理状态,HSP 都参与复杂和重要的生物学过程,它有分子伴侣的作用,能结合部分折叠和变形的蛋白质防止它们聚集,帮助变性蛋白重新折叠,也能促进正确的蛋白构象的折叠^[1-2]。它参与目的蛋白的活性和功能的调节,却不是目的蛋白的组成部分。HSP 诱导生物体耐热性,稳定细胞骨架^[3],参与细胞的损伤与修复,在生物体的生长、发育及进化过程中,在维持机体的生理状态以及某些疾病的病理生理过程中均发挥重要作用。HSPs 中分子量较低的那部分(大约 15~30 KDa)叫做小分子量热激蛋白^[4]。Guo 等^[5]的研究表明,弱光下低温处理 *CaHSP26* 转基因烟草, *CaHSP26* 过量表达,并且能够减弱光系统II和光系统I的光抑制。许多直接的证据表明 HSPs 与植物的耐热有关。Sanmiya 等^[6]将番茄的 MT-sHSP 基因导入烟草能增加转基因植物的耐热性。Murakami 等^[7]的研究证实了 sHSP 17.7 在水稻中过量表达,与正常的野生型相比,过量表达该基因的水稻耐热性有着明显的提高。Miersch 和 Montero-Barrientos 等^[8-9]在真菌中对热激蛋

白 HSP 70 的功能研究表明,热激蛋白 HSP 70 能抵抗热胁迫,并且对其它的一些非生物逆境有一定的耐受性。因此,高温胁迫下热激蛋白与植物耐热性的关系有待进一步证明。该试验以野生型拟南芥为材料,将甜椒叶绿体小分子量热激蛋白基因 *CaHSP26* 转入拟南芥中获得转基因植物,并分析高温胁迫下野生型植株与转基因植株的各项生理指标的变化。

1 材料与方法

1.1 试验材料

野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)采用 Columbia (Col)生态型,大肠杆菌转化的受体为 *E. coli* DH5 α ,根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)为 GV3101。克隆质粒载体为 pMD18-T,植物转化的真核表达载体质粒为 pBI121。

拟南芥种子用 1:13 的次氯酸钠消毒 2 次共 8 min,再用无菌水洗 6 次共 6 min,种于 MS 培养基。含有种子的 MS 培养基放入 4℃冰箱春化 3 d 然后置于光照培养箱中以 20℃ 16 h、18℃ 8 h 为 1 个光周期培养。培养 10 d 后将幼苗移至营养土:蛭石=1:1 的塑料盒中定期浇水培养。培养含有质粒 *PMD18-T-CaHSP26* 的大肠杆菌,提取质粒 *PMD18-T-CaHSP26*。*PMD18-T-CaHSP26* 重组质粒和 pBI121 空载体经过 XbaI 和 SalI 限制性内切酶酶切,然后回收 *CaHSP26* 基因和 pBI121 载体,在 T4 连接酶的作用下连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,PCR 检测,挑选阳性菌落,培养提取质粒。运用电转法将带有 *CaHSP26* 基因的表达载体 pBI121 导入根癌农杆菌 GV3101 中,筛选抗利福平和卡那霉素的农杆菌。用浸花法浸染拟南芥^[10],在含 50 μ g/mL 卡那霉素的

第一作者简介: 贺立龙(1984),男,山东济南人,硕士,现主要从事植物分子生物学研究工作。

通讯作者: 郭尚敬(1970),男,副教授,现主要从事植物分子遗传学研究工作。E-mail: guoshangjing@163.com。

基金项目: 山东省优秀中青年专家基金资助项目(2008BS07008);国家自然科学基金资助项目(30671242)。

收稿日期: 2010-12-17

MS 培养基上筛选 T₁ 代, 取 T₁ 代和野生型植株的叶片提取 DNA, 以野生型为阴性对照进行 PCR 鉴定, 选取阳性株。提取阳性植株和野生型植株的 RNA, 以野生型为阴性对照进行 RT-PCR 鉴定, 将 RT-PCR 鉴定的阳性植株的 T₂ 代种子做为试验材料。

将 MS 中生长到第 7 天的拟南芥幼苗放入培养箱中 37℃ 热激 3 h, 随即用于各项测定。

1.2 反转录 PCR 的分析

提取植物总 RNA, 用 DNase I 除去总 RNA 中的 DNA, 测量 RNA 的 OD₂₆₀ 值。用 5 μg 总 RNA 为模板, 20 μL 反应体系反转录 cDNA。反转录试剂盒购自 TAKALA 公司。为了证明反转录的稳定性, 该试验用拟南芥基因 *AtAc2* 为内标 (accession number NM112764), 并设计内标引物 (AtAc2Z1: 5'-GCA CCC TGT TCT TCT TAC CGA G-3' and AtAc2F1: 5'-AGT AAG GTC ACG TCC AGC AAG G-3')。以 cDNA 为模板, 用内标引物和外源基因的特异性引物分别进行 PCR 反应, 2% 的琼脂糖电泳检测。

1.3 转基因植物电导率(REC)、丙二醛(MDA)的测量

转基因的拟南芥幼苗和对照野生型幼苗分别分为相等 2 组。第 1 组浸泡在 5 mL 双蒸水中以 170 r/min 25℃ 摇 2 h, 第 2 组煮沸 30 min。电导率的测量参照 Tang^[11] 所述。第 1 组测量后的数据设为 *R_c*, 第 2 组测量后的数据设为 *R_c'*。相对电导率的计算公式为 $REC = R_c / R_c' \times 100\%$ 。丙二醛是植物体内多不饱和脂肪酸的氧化产物, 它能反映植物体内脂类的过氧化程度。丙二醛的测量参照 Havaux^[12]。

1.4 转基因植物 CAT、APX 的测量

母液的配制: 取 71.46 g Na₂HPO₄ · 12H₂O 蒸馏水加热溶解至 1 L 备用, 此为母液 1; 取 31.21 g NaH₂PO₄ · 12H₂O 蒸馏水加热溶解至 1 L 备用, 此为母液 2。

提取液的配制: 取 305 mL 母液 1, 195 mL 母液 2, 1.5 mL Triton, 0.208 g EDTA, 10 g PVP 混合, 定容至 500 mL, 调 pH 7.0 备用。

CAT 反应液的配制: 取 122 mL 母液 1, 78 mL 母液 2, 227.2 μL H₂O₂ 混匀, 调 pH 7.0 备用。

APX 反应液的配制: 取 122 mL 母液 1, 78 mL 母液 2, 56.8 μL H₂O₂, 0.0352 g 抗坏血酸, 调 pH 7.0 备用。

0.3 g 材料, 加 3 mL 提取液研磨成匀浆, 匀浆在 4℃ 下, 12 000 r/min 离心 6 min, 取上清液进行酶活性测定。取约 80 μL 酶液, 加入 3 mL 不同的反应液, 分别在 APX 290 nm, CAT 240 nm 处比色。

1.5 转基因植物脯氨酸和可溶性糖的测量

以标准脯氨酸制作标准曲线, 参照文献 [13] 进行脯氨酸的提取、反应、萃取和比色, 根据标准曲线求出植株中脯氨酸的含量。以标准蔗糖制作标准曲线, 参照文献

[14] 进行可溶性糖的提取、反应、萃取和比色, 根据标准曲线求出植株中可溶性糖的含量。

2 结果与分析

2.1 转基因植物的获得

转基因拟南芥基因组的 PCR 鉴定: MS 培养基上筛选转基因种子的 T₁ 代。待幼苗长大后提取叶片的基因组 DNA, 以野生型拟南芥的基因组为阴性对照, 进行 PCR 鉴定, 如图 1 所示。外源基因的插入片段的大小为 780 bp, 图中泳道 1、2、7、8 所对应的植株 1、2、7、8 应为转基因植株。

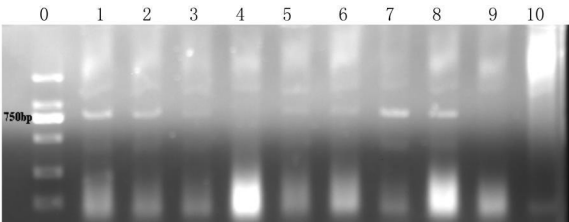


图 1 转基因拟南芥基因组的 PCR 鉴定
注: 泳道 0 为 DNA 2 000 bp 的 marker (Takara), 泳道 1~8 为 kan^r 筛选的正义转基因植株, 泳道 9 10 为野生型拟南芥。泳道 3、4、5、6 应为假阳性。

2.2 转基因植物的 RT-PCR 鉴定

提取基因组 PCR 鉴定呈阳性的植株做 RT-PCR 检测, 如图 2 所示。其中植株 2 中 HSP26 表达明显, 为转基因植株。

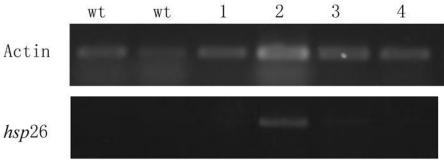


图 2 转基因拟南芥基因组的 RT-PCR 鉴定
注: Wt 为野生型, 1、2、3、4 为基因组鉴定的阳性植株。

2.3 转基因拟南芥的表型分析

热激后 Columbia (Col) 生态型的生长发育较转基因植株明显受到抑制, 表现出叶片枯萎发紫, 根的伸长也受到明显的抑制; 而转基因的拟南芥生长较正常, 这说明小分子量热激蛋白 HSP26 在植物的生长发育中可能起到增强植物耐热性的作用。

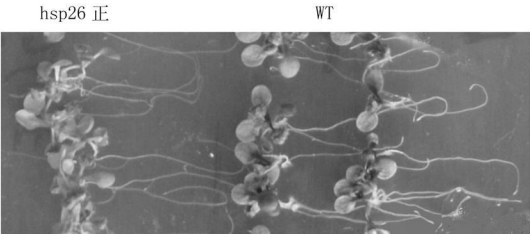


图 3 37℃ 3 h 热激后第 5 天的野生型拟南芥和正义转基因拟南芥

2.4 转基因拟南芥相对电导率(REC)、丙二醛(MDA)的变化

热激后转基因植株的相对电导率明显低于野生型(图3),正义转基因植物的电导率只相当于野生型的73.78%,表明转基因植物的细胞膜受损伤程度小于野生型。MDA是细胞膜脂过氧化的主要产物,热激后转基因植物与野生型植物的MDA含量也有明显的不同(图3),正义转基因植物的MDA只相当于野生型的61.14%,表明转基因植物细胞膜脂的过氧化程度明显小于野生型的。

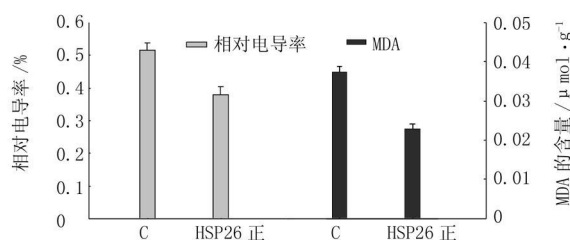


图4 37℃ 3 h热激后野生型和转基因拟南芥相对电导率和MDA的变化

2.5 转基因拟南芥CAT、APX的变化

热激后转基因植物CAT、APX活性均高于野生型(图4),正义转基因植物的CAT比野生型高115.10%,APX比野生型高125.77%,表明转基因植物清除H₂O₂等因胁迫所产生的物质的能力高于野生型。

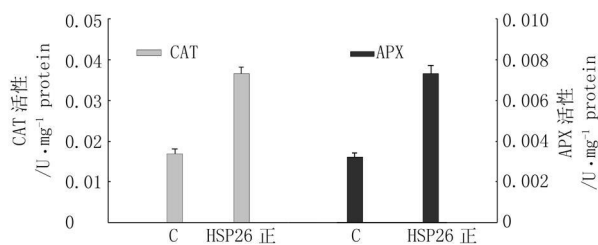


图5 37℃ 3 h热激后野生型和转基因拟南芥CAT活性和APX活性的变化

2.6 转基因拟南芥脯氨酸和可溶性糖的测量

热激后转基因植物脯氨酸含量和可溶性糖的含量均高于野生型(图5),正义转基因植物的脯氨酸比野生型高106.12%,可溶性糖比野生型高53.31%。

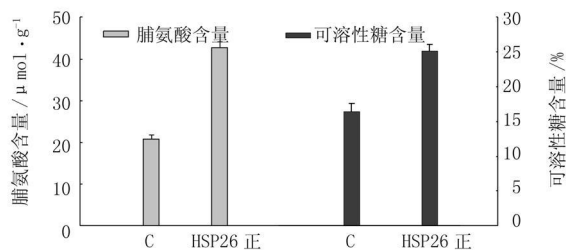


图6 37℃ 3 h热激后野生型和转基因拟南芥脯氨酸含量和可溶性糖含量的变化

3 讨论与结论

MDA的积累反应了植物体内脂类的过氧化^[19]。拟南芥受到热激后体内的清除机制受到损伤,导致体内膜脂的大量过氧化,MDA的含量随之增多,对细胞内主要成分的伤害也随之增大^[19]。作为膜损伤的2个指标,热激后转基因拟南芥的REC和MDA均低于野生型。这表明转基因拟南芥细胞膜所受的损伤比野生型的小,由此可以推断出Hsp26蛋白在热胁迫下可能起到保护膜完整性的作用。但是热激蛋白对膜的作用机制还有待进一步研究。

植物在遭受逆境胁迫时,其生理代谢受阻并产生大量活性氧如O₂[·]、H₂O₂等^[17],而活性氧浓度的提高势必造成细胞膜脂过氧化作用的加强,使活性氧产生与清除之间的动态平衡遭受破坏,导致膜系统损伤和细胞伤害。在此过程中植物主动或被动地调动抗氧化酶类(CAT和APX等)来清除这些活性氧和氧自由基,减缓和抵御细胞伤害^[18-19]。热激后转基因拟南芥CAT和APX的活性均高于野生型,这表明HSP26蛋白可能通过某种机制增强细胞清除系统中酶的活性。

脯氨酸是植物蛋白质的组分之一,并可以游离状态广泛存在于植物体中。在干旱等胁迫条件下,许多植物体内脯氨酸大量积累。积累的脯氨酸能够起到调节植物细胞质内的渗透物质,稳定生物大分子结构,解除氨毒等作用。在转基因的烟草中,脯氨酸过量的表达可以增强植株对非生物胁迫的耐受性^[20]。据报道,可溶性糖在增强膜的稳定性方面有着特殊的作用^[21]。该试验数据表明,热激后转基因拟南芥中脯氨酸和可溶性糖的含量高于野生型。这说明HSP26蛋白的过量表达与脯氨酸和可溶性糖之间有着密切的关系,并通过它们的过量生成增强植物的抗逆性。

总之,该研究表明,拟南芥中过量表达HSP26蛋白可以促使许多酶类和防卫因子发生变化,如CAT、APX、脯氨酸和可溶性糖等,使他们倾向有利于增强拟南芥抗胁迫的方向发展。但是,热激蛋白与这些酶类和防卫因子之间的相互联系、作用机制还不是很清楚,HSP26蛋白功能的研究还不是很深入。在各种胁迫中,它是怎样调控各种酶类和防卫因子,从而起到保护植物自身的作用,还需要更深入的研究。

参考文献

- [1] Sun Y, MacRae T H. The Small Heat Shock Proteins and Their Role in Human Disease[J]. FEBS, 2005, 272(11): 2613-2627.
- [2] Haslbeck M. Recombinant Expression and *in vitro* Refolding of the Yeast Small Heat Shock Protein Hsp42[J]. Int. Biol. Macromol. 2006, 38(2): 107-114.
- [3] Quinlan R. Cytoskeletal competence requires protein chaperones[J]. Prog. Mol. Subcell. Biol., 2002, 28: 219-233.
- [4] Sugiyama Y, Suzuki A, Kishikawa M, et al. Muscle develops a specific

form of small heat shock protein complex composed of MKBP/ HSPB2 and HSPB3 during myogenic differentiation[J]. Biol.Chem 2000 275:1095-1004.

[5] Guo S J, Zhou H Y, Zhang X S et al. Overexpression of *CaHSP26* in transgenic tobacco alleviates photoinhibition of PSII and PSI during chilling stress under low irradiance[J]. Plant Physiology, 2007, 164: 126-136.

[6] Sanmiya K, Suzuki K, Egawa Y, et al. Mitochondrial small heat-shock protein enhances thermotolerance in tobacco plant[J]. FEBS Lett 2004 557: 265-268.

[7] Murakami T, Matusuba S, Funatsuki H, et al. Over-expression of a small heat shock protein, sHSP 17.7, confers both heat tolerance and UV-B resistance of rice Plant[J]. Mol Breed, 2004, 13: 165-175.

[8] Miersch J, Grancharov K. Cadmium and heat response of the fungus *Heliscus lugdunensis* isolated from highly polluted and unpolluted areas[J]. Amino. Acids., 2008 34: 271-277.

[9] Montero-Barrientos M, Hemosa R, Nicola's G, Cardoza RE, Gutie' rrez S, Monte E. Overexpression of a *Trichoderma* HSP70 Gene Increases Fungal Resistance To heat and other Abiotic Stresses[J]. Fun. Genet. Biol., 2008, 45: 1506-1513.

[10] Clough S J, Bent A F. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant J., 1998, 16 (6): 735-743.

[11] Tang Z C. Modern Experiment Procotols in Plant Physiology[M]. Beijing: Science Press 1999: 302-308.

[12] Havaux M, Lutz C, Grimm B. Chloroplast Membrane Photostability in chlP Transgenic Tobacco Plants Deficient in Tocopherols[J]. Plant Physiol., 2003, 132: 300-310.

[13] Farrar J F. Carbon partitioning. In: Hall DO, Scurlockm JMO,

Bolha' r-Nordenkampf HR, Leegood RC, Long SP, editors. Photosynthesis and Production in a Changing Environment[M]. A Field and Laboratory Manual. London: Chapman and Hall, 1993 232-246.

[14] Lea P J, Blackwell R D. Ammonia assimilation, photorespiration and amino acid biosynthesis. In: Hall DO, Scurlockm JMO, Bolha' r-Nordenkampf H R, Leegood R C, Long S P, Editors. Photosynthesis and Production in a Changing Environment[M]. London: Chapman and Hall, 1993, 313-336.

[15] Smirnoff N. Antioxidant systems and plant response to the environment. In: Smirnoff N, editor. Environment and plant metabolism: flexibility and acclimation[M]. UK: Bios. Scientific Publishers, Oxford, 1995, 217-243.

[16] Monk L S, Fagerstedt K V, Crawford R M M. Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress[J]. Plant Physiol, 1989 76: 456-459.

[17] Sreenivasulu N, Grimm B, Wobus U, Weschke W. Differential response of antioxidants to Salinity stress in salt tolerant and salt sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*) [J]. Physiol. Plant, 2000 109: 435-442.

[18] Dixit V, Pandey V, Shyam R. Differential antioxidative responses cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) [J]. Exp Bot, 2001, 52: 1101-1109.

[19] He Z Q, He C X, Zhang Z B et al. Changes of antioxidative enzymes and cell membrane osmosis in tomato colonized by arbuscularmycorrhizae under NaCl stress[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2007, 59: 128-133.

[20] Kavi P B, Hong Z, Miao G H. Over-expression of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increase proline production and confers osmotolerance in transgenic plant[J]. Plant Physiol 1995 108: 1387-1394.

[21] Leslie A W, Olavi J. Cold-induced freezing tolerance in arabidopsis[J]. Plant Physiol 1999, 120: 391-399.

Pepper Chloroplast Small Heat Shock Proteins *CaHSP26* Enhanced The Ability of Anti-high Temperature Stress in *Arabidopsis*

HE Li-long, GAO Na-na, SHAN Zhong-ying, GUO Shang-jing
(College of Life Science, Liaocheng University, Liaocheng Shandong 250029)

Abstract: In order to investigate the relationship between small heat shock protein *CaHSP26* and heat stress on plant, *Arabidopsis thaliana*(Columbia) transformed with *CaHSP26* were used to analyze Conductivity(REC), malondialdehyde(MDA), Catalase(CAT), Ascorbate peroxidase(APX) and content of Proline and Soluble sugar in wild-type plants and transgenic plants after high temperature stress. The results suggested that REC, MDA content of transgenic *Arabidopsis* plant were only equivalent to wild-type at 73.78%, 61.14%; CAT, APX were higher than wild-type to 115.10%, 125.77%; content of Proline and soluble sugar were higher than the wild-type to 106.12%, 53.31%. *HSP26* protein in *Arabidopsis* enhanced the ability of anti-high temperature stress.

Key words: small heat shock protein; arabidopsis; heat stress