麦类作物学报 2008,28(5):719-723
Journal of Triticeae Crops

小麦 16.9 kD 热激蛋白 cDNA 克隆及其表达分析

牛洪斌[1],陈小霞[1],白润娥[2],邓德芝[1],李巧云[1],
任江萍[1],李永春[1],尹 钧[1]
(1.河南农业大学,国家小麦工程技术研究中心,河南郑州 450002;2. 河南农业大学,植物保护学院,河南郑州 450002)

摘 要:为进一步了解小分子量热激蛋白在小麦耐热能力中的作用,根据玉米 16.9 kD 小分子热激蛋白的氨基酸序列,采用同源序列法进行序列拼接和引物设计,用 RT-PCR 扩增获得了 1 个源自小麦叶片的热激蛋白基因 cDNA 片段,即 *TaHSP*16.9-1(GenBank 登录号为 EU649679)。*TaHSP*16.9-1 全长 770 bp,5′非翻译区 81 bp,3′非翻译区 233 bp,开放阅读框编码 151 个氨基酸。序列分析结果表明,此蛋白与已知单子叶植物来源的同类基因高度同源,相似性介于 78.3%～96.7%之间。定量 RT-PCR 表达谱分析显示,*TaHSP*16.9-1在小麦抽穗期的茎和旗叶以及幼苗期叶片中均能表达,其在小麦幼苗叶片中的表达受高温胁迫的诱导。

关键词:小麦;HSP16.9;基因克隆;基因表达
中图分类号:S512.1;S336 **文献标识码**:A **文章编号**:1009-1041(2008)05-0719-05

Cloning and Expression of *TaHSP*16.9-1 cDNA in Wheat

NIU Hong-bin[1], CHEN Xiao-xia[1], BAI Run-e[2], DENG De-zhi[1],
LI Qiao-yun[1], REN Jiang-ping[1], LI Yong-chun[1], YIN Jun[1]
(1. National Engineering Research Center for Wheat, College of Agronomy Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China; 2. Plant Protection College of Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: Using maize low molecular weight heat shock protein (GenBank accession No. CAA46641) amino acid sequence as a querying probe, many highly homologous EST sequences were obtained from GenBank and a putative cDNA sequence of wheat (*Triticum aestivum* L.) was assembled. Futhermore, a wheat 16.9 kD HSP gene cDNA, named as *TaHSP*16.9-1 (GenBank accession number EU649679) was cloned. *TaHSP*16.9-1 was 756 bp in full length, including 5′ untranslated region of 82 bp, 3′ untranslated region of 218 bp, and an open reading frame (ORF) encoding 151 amino acids. Homology analysis showed that the deduced amino acid sequence of *TaHSP*16.9-1 shared 78.3%～96.7% identity with 16.9 kD HSP from other monocotyledon. Quantity RT-PCR analysis showed that the *TaHSP*16.9-1 was expressed in mature wheat stems, immature spikes and immature leaves. The expression profiling also showed that *TaHSP*16.9-1 expression was up-regulated by heat shock in wheat seedlings.

Key words: Wheat; Hsp16.9; Gene doning; Gene expression

小麦属于喜凉作物,生长期经常遭遇高温逆境,尤其是籽粒灌浆期高温胁迫将严重影响小麦产量和品质[1,2]。研究表明,在夜间温度为 21～28 ℃、白天温度为 27～34 ℃范围内,环境温度每上升 1 ℃将使小麦减产 7%～8%以上。近年来,随着全球工业化程度的提高,温室气体排放量增加等因素引起的全球气温持续上升日渐严峻,据 IPCC(Intergovernmental Panel Climatic Change)

收稿日期:2008-04-28 **修回日期**:2008-06-25
基金项目:国家自然科学基金项目(30370877);河南省科技成果转化项目(0636000005)。
作者简介:牛洪斌(1970-),男,博士,主要从事麦类作物品质与抗逆分子改良研究。E-mail:newhobbyzz@yahoo.com.cn
通讯作者:尹 钧(1957-),男,教授,博士生导师,主要从事麦类作物品质与抗逆分子改良研究。

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

预测,至本世纪末全球温度将平均上升幅度在1.4～5.8 ℃之间[3],这势必影响小麦的高产、稳产,并影响全球的粮食安全。

为应对高温胁迫对植物个体的伤害,植物细胞通过启动特定基因的表达应对高温胁迫的危害[4]。其中,热激蛋白(Heat shock proteins, HSPs)是目前已知最重要的胁迫应答产物[5]。植物源热激蛋白种类众多,分子量各异(10～200 kD),多数具有类似分子伴侣的功能,参与植物遭受热胁迫期间发挥信号转导作用[6]。这些热激蛋白通过提高植物的光合效率、改变同化物的分配、提高水分和营养成分的利用效率、增强细胞膜稳定性等生理作用来提高植物体应对高温胁迫的能力[7～9]。

根据分子量差异,植物热激蛋白分为HSP90、HSP70和分子量介于12～43 kD之间的小分子热激蛋白三个亚家族。其中,12～43 kD小分子量热激蛋白种类最为丰富,存在于多种亚细胞结构中,如细胞质、叶绿体、内质网、线粒体和细胞膜等,此类蛋白在遭遇高温胁迫条件下表达量异常增高(可高达对照的200倍以上),因而是研究植物耐高温胁迫的关键[10]。现已发现的所有小热激蛋白都是由6个核编码基因组成的小基因家族[11],这类热激蛋白虽然在物种间同源性较低[12],但都具有α晶体功能域。α晶体类型热激蛋白具有ATP依赖的分子伴侣功能,能够与其他热激蛋白互作阻止靶蛋白的聚合,并且在靶蛋白的重折叠过程中发挥重要作用[13,14]。笔者根据已知玉米来源16.9 kD热激蛋白的氨基酸序列,借助生物信息学技术拼接和RT-PCR扩增克隆获得了1个源自小麦的小分子量热激蛋白基因cDNA序列,并对该基因的结构特点、组织表达特性以及高温应答模式进行了研究,旨在为进一步研究小分子量热激蛋白在小麦耐热能力中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试小麦品种"豫麦49-198"(*Solanum tuberosum* L.)为河南省主栽优质高产小麦品种,具有较强的耐高温特性。菌种DH5α为本实验室保存;pGM-T载体由TIANGENE(北京)公司提供;各种酶、试剂盒购自TaKaRa(大连)公司;所用引物自行设计并由Invitrogen(北京)公司合成。

选取籽粒饱满的小麦种子,以0.1% $HgCl_2$表面消毒10 min,无菌水充分冲洗后于25 ℃培养箱中暗发芽,发芽后选择芽长一致的种子,用Hoagland营养液置于光照培养箱中水培,温度设置为25/22 ℃,每天光照12 h,光照强度为300 μmol·m^{-2}·s^{-1},相对湿度为60%。幼苗长至两叶一心时将部分幼苗分别置于25、30、35和40 ℃温度的光照培养箱内进行胁迫处理2 h、取样,另取部分幼苗置于40 ℃下连续高温胁迫,并于处理0、1、2、4、6和8 h时取样。此外,将完全抽穗期盆栽小麦样品置于40 ℃培养箱中胁迫2 h,并以室温处理样品为对照。上述处理均重复3次,取样后立即于液氮中速冻,-80 ℃超低温冰箱保存备用。

1.2 RNA的提取和cDNA第一链的合成

总RNA的抽提采用上海宝生生物公司的Trizol试剂,2 μg的总RNA用于cDNA第一链的合成,并用RNase消化cDNA产物。

1.3 16.9 kD热激蛋白基因cDNA克隆与序列测定

以玉米来源16.9 kD热激蛋白(GenBank录用号:CAA46641)的氨基酸序列为信息探针,运行tblastn程序搜索GenBank(www.ncbi.nlm.nih.gov) EST数据库,获得许多与之高度同源的小麦EST序列,利用软件DNAMAN对上述EST序列进行模拟拼接获得小麦16.9 kD热激蛋白基因的完整cDNA序列,根据拼接序列设计PCR引物 *TaHSP*16.9f1:5′-CGTCAAGCAAAAAGCAGACAGCA-3′, *TaHSP*16.9-1r1:5′-GTGTATGCAAAGTCTGCACTGCA-3′。PCR扩增条件为94 ℃3 min预变性后,94 ℃30 s,66 ℃30 s,72 ℃1.5 min,35个循环,最后72 ℃延伸10 min。PCR扩增产物经1.2%琼脂糖凝胶检测、回收目的条带,与pGM-T载体(TIANGENE)连接,16 ℃过夜。连接产物转化到大肠杆菌DH5α,在Xgal/IPTG琼脂糖平板上挑选白色克隆,由大连宝生公司完成序列测定,以Megalign和Clustal ×1.83软件包对包括 *TaHSP*16.9-1在内的已报道热激蛋白基因进行氨基酸序列联配和聚类分析。

1.4 小麦16.9 kD热激蛋白基因mRNA表达谱分析

采用定量RT-PCR法对 *TaHSP*16.9-1的

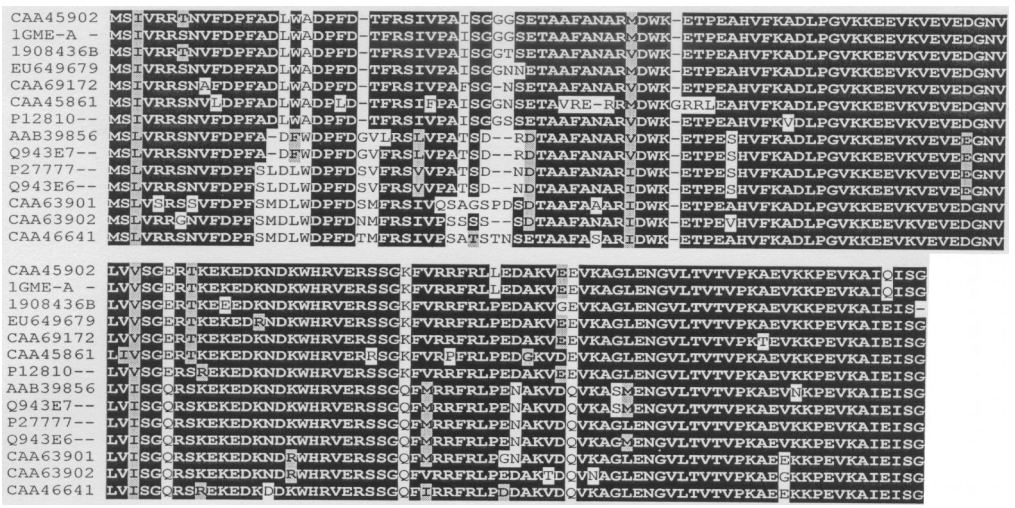
© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

转录表达水平进行检测,所用引物和 PCR 反应条件同上述基因克隆,循环次数降为 30。以 actin 作为内部参照,actin PCR 引物为: A1: 5′-GGAACTGGTATGGTCAAGGC-3′, A2: 5′-AGTCTCATGGATAACCGCAG-3′; PCR 扩增程序如下: 94 ℃5 min 预变性后,94 ℃30 s, 56 ℃40 s, 72 ℃50 s 共 28 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min。

```
1    CGTCAAGCAAAAAGCAGACAGCATCCTACCTGCGGTCCGATACAGATTTTCCCCCGAGCTACAACCCAAAGCAACATCGACAATGTCGAT
                                                                                  M  S  I
91   CGTGAGGCGGAGCAATGTGTTCGACCCCTTCGCCGACCTCTGGGCCGACCCCTTCGACACCTTCCGCTCCATCGTCCCGGCGATCTTAGG
4      V  R  R  S  N  V  F  D  P  F  A  D  L  W  A  D  P  F  D  T  F  R  S  I  V  P  A  I  L  G
181  CGGCAACAATGAGACAGCTGCGTTCGCGAACGCCCGGATGGACTGGAAGGAGACGCCTGAGGCACACGTCTTCAAGGCCGACCTCCCCGG
34     G  N  N  E  T  A  A  F  A  N  A  R  M  D  W  K  E  T  P  E  A  H  V  F  K  A  D  L  P  G
271  CGTGAAGAAGGAGGAGGTCAAGGTGGAGGTGGAGGACGGCAACGTGCTCGTCGTCAGCGGCGAGCGCACAAAGGAGAAGGAGGACAAGAA
64     V  K  K  E  E  V  K  V  E  V  E  D  G  N  V  L  V  V  S  G  E  R  T  K  E  K  E  D  K  N
361  CGACAAGTGGCACCGCGTGGAGCGCAGCAGCGGCAAGTTTGTCGGGCGGTTCCGGCTGCCGGAGGACGCCAAGGTGGAGGAGGTGAAGGC
94     D  K  W  H  R  V  E  R  S  S  G  K  F  V  G  R  F  R  L  P  E  D  A  K  V  E  E  V  K  A
451  CGGGCTGGAGAACGGCGTGCTCACCGTCACCGTGCCCAAGGCCGAGGTCAAGAAGCCCGAGGTCAAGGCCATCGAGATATCCGGCTGAGT
124    G  L  E  N  G  V  L  T  V  T  V  P  K  A  E  V  K  K  P  E  V  K  A  I  E  I  S  G  *
541  ATTTGGGTCAGAGCCAGTCTGGTTCATGTGTGTGCAAGTTCTGCAGCCTAAAAGTATGCTACAGTTGTGTCTTTGTTCTCGCCGAGTCTG
631  GTGAGGCATTTGGTCCTTGTATTGCGTTTCTTCTCCCTGTTGTGAATCGTCAAACAGATTTGGCGATGAATAAATGAGAAATAAATTGTT
721  CTGATTTTGAGTGTGCAGTGCAGACTTTGCATACAC
```

图 1　小麦热激蛋白基因 TaHSP16.9-1 的 cDNA 的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1　cDNA and deduced protein sequence of wheat TaHSP16.9-1



CAA45902、1GME-A、1908436B、EU649679、CAA69172、CAA45861、P12810、AAB39856、Q943E7、P27777、Q943E6、CAA63901、CAA63902 和 CAA46641 分别来源于小麦、小麦、小麦、小麦、大麦、大麦、小麦、水稻、水稻、水稻、水稻、狼尾草、狼尾草和玉米。

CAA45902, 1GME-A, 1908436B, EU649679, CAA69172, CAA45861, P12810, AAB39856, Q943E7, P27777, Q943E6, CAA63901, CAA63902 and CAA46641 come from *Triticum aestivum*, *Triticum aestivum*, *Triticum aestivum*, *Triticum aestivum*, Hordeum vulgare, Hordeum vulgare, *Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Oryza sativa*, *Oryza sativa*, *Oryza sativa*, *Pennisetum glaucum*, *Pennisetum glaucum*, *Zea mays*.

图 2　小麦 TaHSP1 与部分已知禾本科植物 16.9 kD 热激蛋白基因氨基酸序列相似性的比较

Fig. 2　Alignment of full amino acid sequences from TaHSP16.9-1 and other plant 16.9 kD heat shock proteins

2　结果与分析

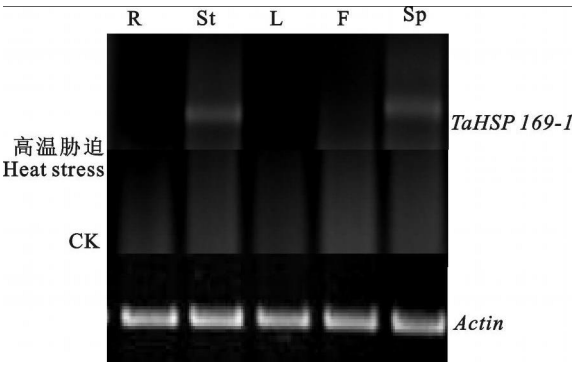
2.1　小麦 TaHSP16.9-1 基因的 cDNA 克隆及序列分析

以玉米 16.9 kD 热激蛋白的氨基酸序列为信息探针搜索 GenBank 数据库,获得许多与之相匹配的小麦 EST,采用软件对高度同源的 EST 序列模拟拼接,获得 1 个含有完整编码框的小麦 16.9 kD 热激蛋白基因的 cDNA 序列,定名为 *TaHSP*16.9-1。根据拼接序列设计引物,其中正向引物序列产生于序列 CD909515,反向引物产生于序列 CJ620380,PCR 产物测序结果证实所得

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

序列为目的片断。序列分析显示 *TaHSP*16.9-1 全长 756 bp,5′非翻译区 82 bp,3′非翻译区 218 bp,包含 2 个典型的加尾信号 AATAAA(图 1),开放阅读框编码 151 个氨基酸,分子量约为16.85 kD。此序列已提交到 GenBank,登录号为 EU649679。利用生物信息学软件(http://www.expasy.org/cgi-bin/prosite/)对推导的氨基酸序列分析结果显示,*TaHSP*16.9-1 蛋白含有 hsp20 热激蛋白家族的保守序列(47～136),表明该蛋白隶属于小分子量热激蛋白家族。此外,该蛋白还存在 2 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(23～25,103～105),2 个 N-豆蔻酰化位点(34～39,124～129)和 1 个 N-糖基化位点(36～39),表明在 *TaHSP*16.9-1 的生物合成过程中需要多种翻译后加工修饰作用才能成为具有天然功能的成熟多肽。

聚类分析(图 2)显示,*TaHSP*16.9-1 与其他已知单子叶植物来源 16.9 kD 热激蛋白高度同源,氨基酸序列相似性介于 78.3%～96.7%之间,并与小麦 1GME-A (*Triticum aestivum*)同源性最高(96.7%),与狗尾草属(Pennisetum glaucum)植物 CAA63901 同源性最低(78.3%),表明 16.9 kD 小分子热激蛋白基因在遗传进化过程中具有较高的保守性。



R:根;St:茎;L:倒二叶;F:旗叶;Sp:未成熟穗子

R: root; St: stem; L: backward 2 leaf; F: flag leaf; Sp: noraped spike

图 3 小麦 TaHSP16.9-1 基因不同组织转录表达的定量 RT-PCR 分析结果

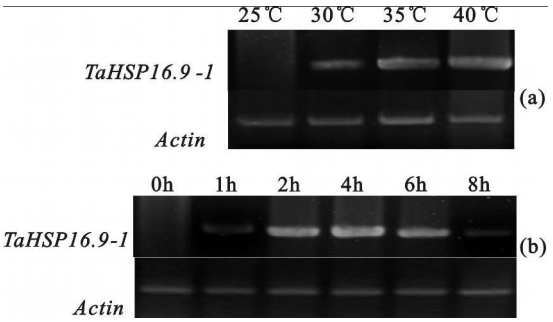
Fig. 3 Quantitative RT-PCR expression analysis of TaHSP16.9-1gene in different tissues of wheat

2.2 TaHSP16.9-1 基因的组织特异性表达

为探索 *TaHSP*16.9-1 基因在各小麦组织中的表达特性,选完全抽穗期盆栽小麦进行 40 ℃高温 2 h 胁迫处理,提取各组织来源的总 RNA 进行定量 RT-PCR 分析,同时设置 25 ℃室温处理 2 h 为对照。结果(图 3)显示,在抽穗期小麦植株的茎和未成熟穗子中均能检测到相应的目的条带,并且未成熟穗子中该基因的表达量显著高于茎,而在成熟叶、根和旗叶中未监测到相应的转录本,表明 *TaHSP*16.9-1 的表达具有较强的组织特异性。相比之下,对照处理均检测到相应的目的条带。

2.3 高温胁迫对 TaHSP16.9-1 基因表达的诱导

小麦 *TaHSP*16.9-1 基因的转录表达受高温胁迫的强烈诱导(_图 4)。图 4 A 显示,在 30、35 和 40 ℃高温胁迫 2 h 的小麦幼苗叶片中均能检测到目的条带,并且随着胁迫温度的提升,表达量迅速增加。例如,在 30 ℃高温胁迫下仅能见到淡淡的目的条带,而在 40 ℃胁迫条件下目的条带强度显著增强。相比之下,在正常生长条件(25 ℃)下的叶片中未见相应的转录本。对 40 ℃高温不同胁迫时间段叶片中 *TaHSP*16.9-1 的表达谱进一步跟踪检测,结果显示该基因的表达水平受胁迫时间的调控(图 4 B)。在 40 ℃高温条件下胁迫 1 h 就可以检测到清晰的目的条带,随着胁迫时间的延长表达水平迅速上升,至胁迫 2 h 时已达到表达高峰,并一直持续到 4 h;此后,该基因表达水平虽略有下降,但一直维持在较高的水平,直至胁迫 8 h 时试验结束。小分子热激蛋白基因作为高温应答基因已在多种作物中得到验证。上述结果同样表明 *TaHSP*16.9-1 基因具有典型的热胁迫应答模式,并且表达强度同时受温度梯度诱导和胁迫时间长度的控制。



(a) 不同温度梯度胁迫 2 h 时的转录表达水平检测;
(b) 40 ℃高温不同胁迫时间段的转录表达水平检测。

(a) mRNAs of different temperature stress for 2 h;
(b) mRNAs of different stress times under 40 ℃.

图 4 高温胁迫下小麦幼苗期叶片中 TaHSP16.9-1 转录表达的定量 RT-PCR 分析结果

Fig. 4 RT-PCR assay of TaHSP16.9-1 mRNA in wheat seedlings under high temperature stress

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 讨 论

当生物体受到骤然高温或持续升温胁迫时,细胞体内将迅速合成大量的热激蛋白[10,15],这种应激反应是所有生物体共有的,这是因为从低等的微生物到高等生物的人类在受到热胁迫时均能迅速诱导热激蛋白的大量表达[11]。现有研究表明,小分子热激蛋白在物种间,尤其是单、双子叶植物间的保守性较低,然而本文研究结果表明源自小麦的 *TaHSP*16.9-1 与单子叶植物来源的同类蛋白高度同源,其氨基酸相似性高达 78.3%～96.7%,这说明 16.9 kD 热激蛋白处于单、双子叶植物遗传分化的早期阶段。

热激蛋白有助于保持细胞热稳定性的主要证据在于:热激蛋白的合成与生物体胁迫同时发生;合成速率快、表达量高;在多种类型细胞和组织中均能诱导表达,充分说明热激蛋白与细胞的热稳定性直接相关[10,12,15]。本研究发现高温胁迫可以迅速诱导小麦幼苗中 *TaHSP*16.9-1 的表达,并且随胁迫温度的提高和胁迫时间的延长表达水平逐步递增,充分体现了热激蛋白的上述特点(图 4)。然而,在抽穗期的小麦成熟小麦叶片中却未监测到该基因的表达,表明该基因在小麦叶片中的表达具有较强的时间特异性,也可能是随着小麦叶片的逐渐成熟、衰老,对热胁迫的应激反应敏感性下降所致。在小麦发育后期高温胁迫下,成熟小麦的茎和未成熟穗子中 *TaHSP*16.9-1 的高丰度表达暗示出该基因表达产物将有助于缓解灌浆期小麦经常遭遇的高温逆境胁迫,具体机制有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Ferris R, Ellis R H, Wheeeler T R, *et al*. Effect of high temperature stress at anthesis on grain yield and biomass of field grown crops of wheat [J]. Plant Cell Environment, 1998, 34: 67 - 78.

[2] Perrotta C, Treglia A S, Mita G, *et al*. Analysis of mRNAs from ripening wheat seeds: the effect of high temperature [J]. Journal of Cereal Science, 1998, 27: 127 - 132.

[3] Houghton, J T, Ding, Y, Griggs, D J, *et al*. Climate Change 2001: Scientific Basis [M]. Cambridge University Press, New York, USA, 2001:537

[4] Koh Iba. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance [J]. Annual Review of Plant Biology, 2002, 53: 225 - 245.

[5] Feder M E, Hoffman G E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology [J]. Annual Review of Physiology, 1999: 61: 243 - 282.

[6] Schöffl, Prandl R, Reindl A. Molecular responses to heat stress[C]// K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki, Editors. Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants. R. G. Landes Co., Austin, Texas, 1999,:81 ⅋98.

[7] Camejo D, Rodríguez P, Morales M A, *et al*. High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility [J]. Journal of Plant Physiology, 2005, 162: 281 - 289.

[8] Ahn Y J, Zimmerman J L. Introduction of the carrot HSP17.7 into potato (*Solanum tuberosum* L.) enhances cellular membrane stability and tuberization in vitro [J]. Plant Cell Environment, 2006, 29: 95 - 104.

[9] Momcilovic I, Ristic Z. Expression of chloroplast protein synthesis elongation factor, EF-Tu, in two lines of maize with contrasting tolerance to heat stress during early stages of plant development [J]. Journal of Plant Physiology, 2007, 164: 90 - 99.

[10] Wahid A, Gelani S, Ashraf M, *et al*. Heat tolerance in plants [J]. Environmental and Experimental Botany, 2007, 61: 199 - 223.

[11] Waters E R, Lee GJ, Vierling E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants[J]. Journal of Experimental Botany, 1996, 47: 325 - 338.

[12] Vierling E. The role of heat shock proteins in plants[J]. Plant Molecular Biology, 1991, 42: 579 - 620.

[13] Narberhaus F. Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66(1): 64 - 93.

[14] Kim KK, Kim R, Kim SH. Crystal structure of a small heat-shock protein [J]. Nature, 1998, 394: 595 - 599.

[15] Nakamoto H, HiyamaT. Heat-shock proteins and temperature stress [C]// Pessarakli, M. (Ed.). Handbook of plant and crop stress. Marcel Dekker, New York, 1999:399 - 416.

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net