

拟南芥热激转录因子 *AtHsfA6a* 的克隆 与细胞定位分析

晁旭¹, 巩振辉¹, 逯明辉¹, 马超¹, 李大伟¹, 赵军², 孟长军¹

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中国农业科学院 生物技术研究所, 北京 100081)

[摘要] **【目的】**研究拟南芥热激转录因子 *AtHsfA6a* 在植物细胞中的定位及其作用机制。**【方法】**用 RT-PCR 方法从野生型拟南芥总 RNA 中, 扩增获得了 849 bp 的拟南芥热激转录因子 *AtHsfA6a* cDNA 片段, 经过测序, 结果与公布的序列完全相同。将该片段与绿色荧光蛋白(GFP)基因的 cDNA 重组, 并克隆到表达载体 pCHF3 上, 经 PCR 与酶切检测表明构建的表达载体正确。按照 Clough 等的方法转化拟南芥, 经 Kanamycin 筛选和 PCR 检测, 得到转基因植株; 用激光共聚焦扫描荧光显微镜观察转基因植株幼苗的根部。**【结果】**在正常条件下, 融合蛋白存在于细胞质中。**【结论】**在正常条件下拟南芥热激转录因子 *AtHsfA6a* 在细胞质中表达。

[关键词] 拟南芥; 热激转录因子; 绿色荧光蛋白; 细胞定位分析

[中图分类号] Q785

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)04-0094-05

Cloning and analysis of cellular location of the *Arabidopsis* heat transcriptional factor *AtHsfA6a*

CHAO Xu¹, GONG Zhen-hui¹, LU Ming-hui¹, MA Chao¹,

LI Da-wei¹, ZHAO Jun², MENG Chang-jun¹

(1 College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: **【Objective】**The research studied the location of the *Arabidopsis* heat shock transcriptional factor *AtHsfA6a* in the plant cell and its mechanism. **【Method】**The cDNA fragment of the *Arabidopsis* heat shock transcriptional factor *AtHsfA6a*, whose length was 849 bp, was cloned by one-tube RT-PCR reaction with specific primers from *Arabidopsis* Columbia. Its sequence was the same as the published sequence. After the cDNA fragment was confirmed by the sequence test, it was subsequently combined with green fluorescent protein (GFP) gene, then cloned to expression vector pCHF3 transgenic *Arabidopsis* lines containing pCHF3-*AtHsfA6a*-GFP construct were generated through agrobacterium-mediated genetic transformation and obtained transgenic *Arabidopsis* plant through kanamycin selection and PCR test. Then the roots of transgenic *Arabidopsis* plant were observed through laser scanning confocal fluorescence microscope. **【Result】**The fusion protein lies in the cytoplasm under the ordinary condition. **【Conclusion】**Under the ordinary condition, the *Arabidopsis* heat transcriptional factor *AtHsfA6a* expresses in cytoplasm of cell.

Key words: *Arabidopsis*; heat shock transcriptional factor; green fluorescent protein(GFP); analysis of cellular location

* [收稿日期] 2007-04-25

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划项目(2004CB117200)

[作者简介] 晁旭(1974—), 男, 陕西周至人, 硕士, 主要从事植物生物技术研究。E-mail: chaoxu2004@126.com

植物受到自然界中干旱、高温、盐渍、氧化等非生物胁迫的侵袭时,会积极调动体内的防卫系统来对抗外来逆境。在高温胁迫下,植物会发生热激反应(Heat shock response, HSR)^[1]。热激反应是一种高度保守的反应,能诱导植物产生热激蛋白(Heat shock proteins, Hsps),而热激蛋白可以作为分子伴侣维持其他蛋白质在高温下正常的功能^[2],这类热激蛋白能提高植物的耐热性^[3]。热激蛋白基因的转录受热激转录因子(Heat shock transcriptional factors, Hsfs)的调控^[4]。Hsfs在热激反应中的主要功能是在热休克基因表达过程中与相应启动子结合,启动热休克基因的转录,最终促使 Hsps 表达^[5]。Hsfs在细胞质中为单体,处于非活化状态,受到胁迫时形成三聚体,并转入核内结合到相应的热激蛋白启动子区的目的序列(HSE),从而激活热激蛋白基因的表达^[6]。综上所述,Hsfs在联系热胁迫信号转导和耐热基因表达方面具有重要作用。目前,有关植物热激转录因子的研究主要集中于番茄 HsfA1a、HsfA2 和 HsfB1^[3],而在拟南芥中对 Hsfs 的研究还很少^[7]。李春光等^[8]研究发现,拟南芥热激转录因子 *AtHsfA2* 调节胁迫反应基因的表达并参与抗热和抗氧化胁迫,为抗热研究提供了理论依据。但有关拟南芥热激转录因子 *AtHsfA6a* 的具体功能和作用机制尚未见报道。本试验克隆了拟南芥热激转录因子的 cDNA *AtHsfA6a*,构建了 *AtHsfA6a* 和 GFP 融合基因的表达载体并转化拟南芥,旨在分析拟南芥热激转录因子 *AtHsfA6a* 在细胞中的表达,探讨其在热激反应中的功能及其可能的作用机理,为抗逆分子育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试野生型拟南芥(*Columbia*型)种子,由中国农业科学院生物技术研究所提供。

1.1.2 菌株和质粒 大肠杆菌 DH5 α 、农杆菌 GV3101、质粒载体 pCHF3,均为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 野生型拟南芥总 RNA 的提取 将供试野生型拟南芥种子经表面灭菌后,播种于含有 15 g/L 蔗糖的 1/2MS 培养基中,4.0 °C 处理 2 d 后,置于 22 °C 下光照 16 h,20 °C 下黑暗 8 h,相对湿度 70% 的光照培养箱中培养。苗龄 3 周时,将其在 37 °C $\pm$ 0.3 °C 下热激处理 1 h 后,立即用 TRIzol reagent (Invitrogen 公司)提取试材的总 RNA。

1.2.2 RT-PCR 及测序 cDNA 第一链的反转录反应用 ReverTra Ace- α -(TOYOBO 公司)试剂盒完成。PCR 反应所用的 *AtHsfA6a* 基因特异性引物为:正向引物 5'-ATGGATTATAACCTTC-CAAT-3';反向引物 5'-TTATATAAAAATGTTC CACTA-3'。

PCR 反应总体积为 20 μ L,其中含 1 $\times$ 反应缓冲液,0.2 mmol/L dNTPs,0.25 μ mol/L 正向引物和 0.25 μ mol/L 反向引物,1.0 U *Taq* DNA 聚合酶,模板 cDNA 1.0 μ L。反应条件为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 40 s,45 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 50 s,35 个循环;最后 72 °C 延伸 5 min。

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,然后按 TIANGEN 公司的琼脂糖凝胶 DNA 回收 Kit 说明书进行 PCR 扩增产物的回收与纯化。回收的 PCR 扩增片段与克隆载体 pGEM[®]-T Easy Vector 在 T4 DNA 连接酶的作用下,于 4 °C 连接过夜。连接产物转化感受态 *E. coli* DH5 α ,涂在含有 x-gal+IPTG+ Amp 的 LB 平板上,37 °C 过夜,挑取白色克隆,在含 Amp 的 LB 培养液中摇菌,然后由北京奥科生物技术公司测序。

1.2.3 野生型拟南芥表达载体的构建 分别设计含 *Bam*H I 和 *Xba* I 限制性内切酶位点的 *AtHsfA6a* 的 PCR 引物,及含 *Xba* I、*Sal* I 限制性内切酶位点的 *GFP* 的 PCR 引物。*AtHsfA6a* 正向引物:5'-CGC GGA TCA TGG ATT ATA ACC TTC CAA TT-3';反向引物:5'-CGG TCT AGA TAT AAA ATG TTC CAC TAA ATC-3';*GFP* 正向引物:5'-CGC TCT AGA ATG AGT AAA GGA GAA GAA CT-3';反向引物:5'-CCG GTC GAC TTA TTT GTA TAG TTC ATC CA-3'。分别以 pGEM[®]-T Easy-*AtHsfA6a* 和 pGEM[®]-T Easy-*GFP* 质粒为模板进行 PCR 扩增。按 TIANGEN 公司的琼脂糖凝胶 DNA 回收 Kit 说明书进行 PCR 扩增产物的回收与纯化,回收的 PCR 扩增片段分别连接到克隆载体 pGEM[®]-T Easy Vector 上。转化感受态 *E. coli* DH5 α ,涂在含有 Amp 的 LB 平板上,37 °C 过夜,挑取阳性克隆,在含 Amp 的 LB 培养液中摇菌,按照碱裂解法^[9]进行质粒的小量提取。提取的 T-Easy-*AtHsfA6a* 质粒用 *Bam*H I 和 *Xba* I 酶切,回收大片段。T-Easy-*GFP* 质粒用 *Xba* I 和 *Sal* I 酶切,回收小片段。然后将回收的小片段与大片段在 T4 DNA 连接酶的作用下 4 °C 连接过夜,连接产物转化感受态 *E. coli* DH5 α ,涂在含有 Amp 的

LB 平板上,37 ℃ 过夜,挑取阳性克隆,在含 Amp 的 LB 培养液中摇菌,进行质粒的小量提取。提取的质粒用 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切,回收小片段;同时用 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切质粒载体 pCHF3,回收大片段。然后将回收的小片段与大片段在 T4 DNA 连接酶的作用下 4 ℃ 连接过夜,连接产物转化感受态 *E. coli* DH5 α ,涂在含有 Amp 的 LB 平板上,37 ℃ 过夜,挑取阳性克隆,在含 Amp 的 LB 培养液中摇菌,提取质粒,然后进行 PCR 和酶切检测。

1.2.4 农杆菌转化与野生型拟南芥的转化 将经过鉴定的 *pCHF3-AtHsfA6a-GFP* 质粒用热激法转化农杆菌 GV3101,涂布于含壮观霉素(100 mg/mL)的 YEP 平板上,挑取阳性克隆,在含壮观霉素的 YEP 培养液中 28 ℃ 摇菌,然后提取质粒进行 PCR 和酶切检测。按照 Clough 等^[10]的方法转化拟南芥。

1.2.5 转基因拟南芥的 PCR 检测 以转基因拟南芥叶片为材料,采用 SDS 法提取基因组 DNA。检测转基因拟南芥所用的 PCR 引物为:5'-TAA GGA AGT TCA TTT CAT TTG GA-3'和 5'-GTC GAC TTA ATT TGT ATA GTT CAT CCA-3'。反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s, 50 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 100 s,35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 5 min。

1.2.6 融合蛋白的观察 转化当代植株(T_0 代)收获的种子用 1/2MS+ 50 mg/L Kanamycin 平板筛选,10 d 后挑选 T_1 代阳性植株转移到穴盘中,PCR 鉴定并收获种子。收获的种子用 1/2MS+50 mg/L

Kanamycin 平板筛选,6 d 后挑选 T_1 代阳性植株,用超纯水冲洗根部后用荧光共聚焦显微镜观察。

2 结果与分析

2.1 拟南芥热激转录因子 *AtHsfA6a* cDNA 的克隆 以拟南芥的 RNA 为模板通过一步法 RT-PCR 扩增得到 849 bp 的片断,条带单一、清晰(图 1)。

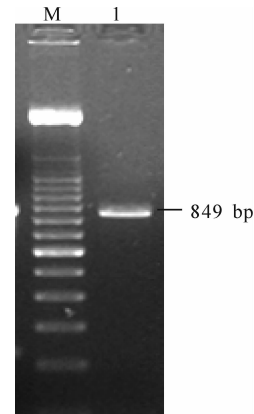


图 1 RT-PCR 扩增的 *AtHsfA6a* cDNA 片断

M. 100 bp DNA Marker; 1. *AtHsfA6a* 的 cDNA 片断

Fig. 1 cDNA fragment of *AtHsfA6a* amplified by RT-PCR

M. 100 bp DNA Marker; 1. The cDNA fragment of *AtHsfA6a*

2.2 野生型拟南芥表达载体的 PCR 与酶切检测

用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切重组大肠杆菌的质粒载体(图 2A),得到约 1 570 bp 的片断,符合酶切图谱;同时以重组大肠杆菌的质粒为模板,进行 PCR 检测,结果扩增出约 1 600 bp 的片断,与预期片段大小相同(图 2B),表明构建的表达载体正确。

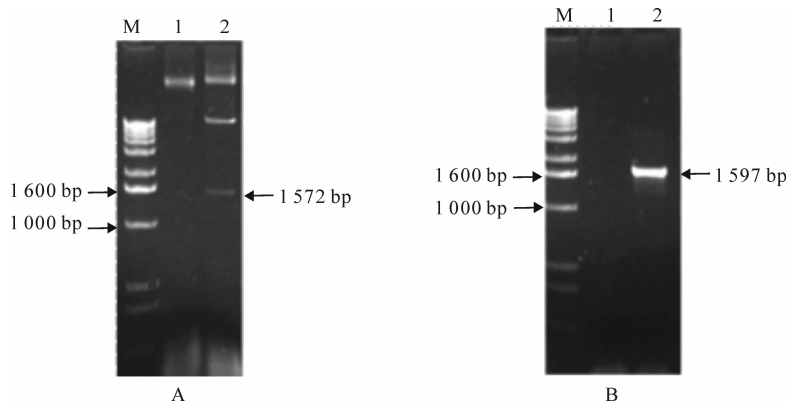


图 2 野生型拟南芥表达载体的酶切(A)与 PCR 检测(B)结果

A: M. 100 bp DNA Marker; 1. 未酶切的表达载体; 2. *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切的表达载体;

B: M. 100 bp DNA Marker; 1. 对照; 2. PCR 扩增出的片断

Fig. 2 Identification of expression vector of *AtHsfA6a* by restriction enzyme digestion (A) and PCR (B)

A: M. 100 bp DNA Marker; 1. Undigested recombinant plasmid; 2. Expression vector digested by *Bam*H I and *Sal* I ;

B: M. 100 bp DNA Marker; 1. Control; 2. PCR product

2.3 转基因拟南芥的 PCR 检测结果

图 3 表明,转基因拟南芥的 PCR 产物片段大小均与预期相符,表明获得了转基因株系,可用于进一步分析。

2.4 拟南芥热激转录因子 *AtHsfA6a* 的细胞定位分析

在荧光共聚焦显微镜下可以观察到绿色荧光蛋白(呈绿色)。由于 *AtHsfA6a* 和 *GFP* 形成的融合基因在 35S 强启动子的作用下共表达,所以观察到的绿色部分为 *AtHsfA6a* 和 *GFP* 形成的融合蛋白(图 4)。从图 4 可以看到,拟南芥热激转录因子 *AtHsfA6a* 和 *GFP* 形成的融合蛋白存在于细胞质中,从而证明拟南芥热激转录因子 *AtHsfA6a* 在细胞质中表达。

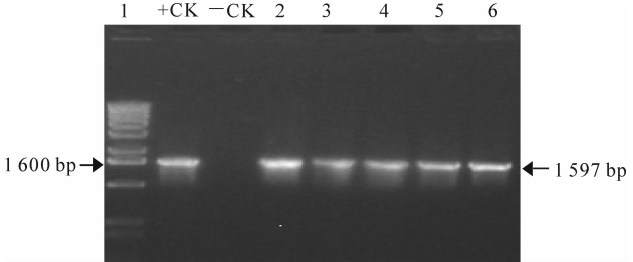


图 3 转基因拟南芥的 PCR 检测

1. 1 000 bp DNA Marker; +CK. 重组质粒的 PCR 产物 ;
-CK. 野生型; 2~6. 转基因拟南芥的 PCR 产物

Fig. 3 Identification of transgenic plant by PCR

1. 1 000 bp DNA Marker; +CK. PCR product of recombinant plasmid;
-CK. wild type plant; 2-6. PCR product of transgenic plants

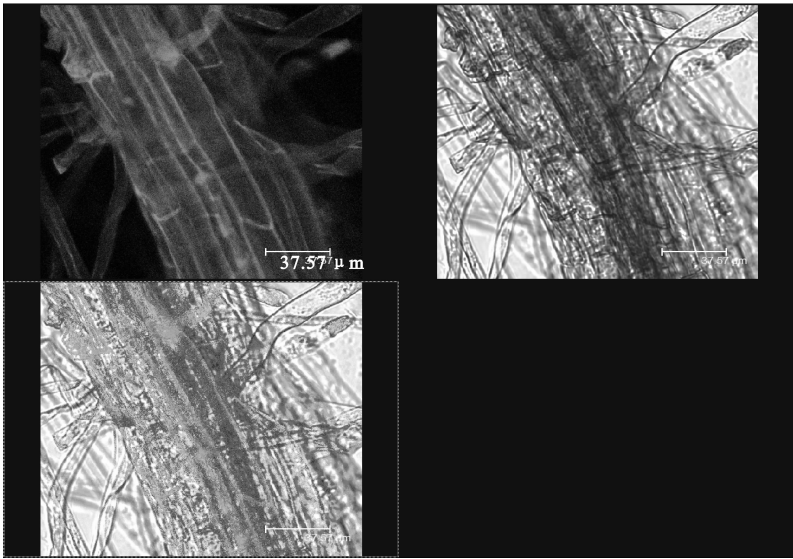


图 4 正常条件下拟南芥热激转录因子 *AtHsfA6a* 在细胞质中的表达

Fig. 4 Expression of the *Arabidopsis* heat shock transcriptional factor *AtHsfA6a* in cytoplasm

3 讨 论

真核细胞 *Hsp* 基因的转录调节过程包括热激转录因子(Hsfs)的激活、Hsfs 与热激元件(Heat stress element, HSEs)的结合及 *Hsp* 基因的转录 3 个步骤^[11]。热激转录因子(Hsfs)结合于热激蛋白基因启动子的热激元(HSE),以募集其他转录因子而形成转录复合体,促进转录的起始^[12]。常温下, Hsfs 以单体形式与阻遏蛋白结合而没有结合 DNA 的能力, Hsp70 可能参与了 Hsfs 单体的形成^[13]。许多 Hsfs 不仅含有核定位信号(NLS),而且含有核输出信号(NES)^[14]。在番茄中, *AtHsfA2* 是一个主要定位于胞质中的穿梭蛋白^[15]。转录因子在细胞

中的定位对于其功能至关重要。因为在真核生物中,转录因子只有进入细胞核才能够与其调节基因的启动子区结合,从而进一步募集其他转录因子或蛋白形成转录复合体,启动基因的表达。李春光等^[8]通过插入突变和瞬时表达研究发现,拟南芥热激转录因子 *AtHsfA2* 于正常条件下在细胞质中表达,但是是一种间接的证明方法。本研究通过 RT-PCR 方法从拟南芥总 RNA 中克隆了热激转录因子 *AtHsfA6a* 基因,并通过构建融合基因和转化拟南芥,观察到在正常条件下热激转录因子 *AtHsfA6a* 与 *AtHsfA2* 一样定位于细胞质中,结果更为直接。

在正常条件下,热激转录因子 *AtHsfA6a* 定位于细胞质中,并且含量很低。受到逆境信号的刺激

后,AtHsfA6a 含量是否增加及它是否由细胞质转入细胞核中,对于其在逆境信号转导中是否发挥作用至关重要。这些问题还有待进一步研究。

本研究中采用构建融合基因的方法研究了 AtHsfA6a 在细胞中的定位,得到了一些结果;但用该方法能否进一步研究受到胁迫时 AtHsfA6a 含量和定位的变化,从而更加直接地验证其功能还需进一步试验。

〔参考文献〕

- [1] Ballinger D G. The control of protein synthesis during heat shock in *Drosophila* cells involves altered polypeptide elongation rates [J]. *Cell*,1983,33:103-114.
- [2] Gad M,Ron M. Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants [J]. *Annals of Botany*, 2006,98:279-288.
- [3] Howarth C J,Ougham H J. Gene expression under temperature stress [J]. *New Phytol*,1993,125:1-2.
- [4] 翁锦周,洪月云. 植物热激转录因子在非生物逆境中的作用 [J]. *分子植物育种*,2006,4(1):88-94.
- Weng J Z,Hong Y Y. The roles of plant shock transcription factors in abiotic stress [J]. *Molecular Plant Breeding*,2006,4 (1):88-94. (in Chinese)
- [5] 张 伟. 热休克基因转录的调节:热休克转录因子(HSF)的结构与功能 [J]. *第三军医大学学报*,2000,22(2):198-200.
- Zhang W. Regulation of heat shock gene transcription; the structure and function of heat shock transcription factor [J]. *Acta Academiae Medicinae Militari Tertiae*,2000,22(2):198-200. (in Chinese)
- [6] Baniwal S K,Bharti K,Chan K Y,et al. Heat stress response in plants;a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors[J]. *J Biosci*,2004,29:471-487.
- [7] Lohmann C,Eggers-Schumacher G,Wunderlich M,et al. Two

different heat shock factors regulate immediate early expression of stress genes in *Arabidopsis* [J]. *Mol Gen Genomics*, 2004,271:11-21.

- [8] 李春光,陈其军,高新起,等. 拟南芥热激转录因子 AtHsfA2 调节胁迫反应基因的表达并提高热和氧化胁迫耐性[J]. *中国科学:C辑 生命科学*,2005,35(5):398-407.
- Li C G,Chen Q J,Gao X Q,et al. AtHsfA2 modulates expression of stress responsive genes and enhances tolerance to heat and oxidative stress in *Arabidopsis* [J]. *Science in China:Ser. C Life Sciences*,2005,35(5):398-407. (in Chinese)
- [9] Sambrook J,Russell D W. *Molecular cloning;a laboratory manual* [M]. 3th ed. New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001:36-99.
- [10] Clough S J,Bent A F. Floral dip; a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*,1998,16:735-743.
- [11] Hong S W,Lee U,Vierling E. *Arabidopsis* hot mutants define multiple functions required for acclimation to high temperatures [J]. *Plant Physiol*,2003,132:757-767.
- [12] Nover L,Scharf K D,Gagliardi D,et al. The Hsf world;classification and properties of plant heat transcription factors [J]. *Cell Stress Chaperones*,1996,1(4):215-223.
- [13] 朱玉贤,李 毅. *现代分子生物学* [M]. 2 版. 北京:高等教育出版社,2002:281.
- Zhu Y X,Li Y. *Modern molecular biology* [M]. 2nd ed. Beijing:Higher Education Press,2002:281. (in Chinese)
- [14] Heerklotz D,Döring P,Bonzelius F,et al. The balance of nuclear import and export determines the intracellular distribution of tomato heat stress transcription factor HsfA2 [J]. *Mol Cell Biol*,2001,21:1759-1768.
- [15] Scharf K-D,Heider H. 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.