

白木香 2 个小分子热激蛋白基因的克隆及表达分析

董先娟^{1,2}, 刘 晓², 张钟秀^{1,2}, 张 乐^{1,2}, 王 娟^{1,2}, 屠鹏飞², 王晓晖^{2*}, 史社坡^{2*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029

2. 北京中医药大学 中药现代研究中心, 北京 100029

摘要: **目的** 从白木香 *Aquilaria sinensis* 中克隆 sHSP1 和 sHSP2 基因, 并对它们的生物信息学及表达模式进行分析。**方法** 根据本课题组白木香转录组数据库进行分析获得 2 条具有小分子热激蛋白 (sHSPs) 保守结构域的 sHSPs 基因序列, 利用 RT-PCR 技术克隆 sHSP1 和 sHSP2 基因的全长 cDNA 序列, 并对其生物信息学分析; 利用实时荧光定量 PCR 检测 sHSP1 和 sHSP2 基因在不同组织和高盐及外源 ABA、SA、MJ 处理下不同时间的表达差异。**结果** 克隆得到的白木香 sHSP1 和 sHSP2 基因开放阅读框都为 474 bp, 编码 157 个氨基酸。组织表达分析的结果显示, sHSP1 和 sHSP2 基因主要在根中表达, 在茎和叶中的表达量较少; 白木香愈伤组织在高盐处理下, sHSP1 和 sHSP2 基因分别在 36 h 和 24 h 达到最高表达水平, 而愈伤组织在外源 ABA、MJ 处理下, sHSP1 和 sHSP2 基因都在 12 h 达到最高表达水平, 在 SA 处理下, sHSP1 和 sHSP2 基因分别在 12、24 h 达到最高表达水平。**结论** 获得了 sHSP1 和 sHSP2 2 基因全长 cDNA 序列, 且 2 个基因在不同组织根、茎、叶中的表达存在差异性, 在受到高盐和外源 ABA、SA、MJ 处理时, 在不同时间的愈伤组织中的表达及积累情况也不同, 该研究为后续深入研究白木香防御反应奠定了基础。

关键词: 白木香; sHSP1 基因; sHSP2 基因; 表达分析; 热激蛋白; 生物信息学

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)22-4054-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.22.021

Cloning and expression analysis of two small heat shock proteins genes from *Aquilaria sinensis*

DONG Xian-juan^{1,2}, LIU Xiao², ZHANG Zhong-xiu^{1,2}, ZHANG Le^{1,2}, WANG Juan^{1,2}, TU Peng-fei²,
WANG Xiao-hui², SHI She-po²

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To aim at cloning the open reading frame (ORF) of sHSP1 and sHSP2 genes from *Aquilaria sinensis* and analyzing the bioinformatics and expression of the two genes. **Methods** Two unique sequences containing sHSPs domain were discovered in transcriptome dataset of *A. sinensis*. The full-length cDNAs of sHSP1 and sHSP2 were cloned by RT-PCR strategy with the specific primers. Subcellular localization, transmembrane domain, three-dimensional structure, and phylogenetic analysis were predicted by different softwares to analyze the bioinformatics of sHSPs protein. The expression different levels of sHSP1 and sHSP2 isoforms in different tissues and in responds to salt and ABA, SA, MJ treatment were measured by real-time quantitative PCR. **Results** The sHSP1 and sHSP2 cDNA sequence consisted of 474 bp ORF, encoding 157 amino acids. Tissue expression analysis indicated that sHSP1 and sHSP2 were primarily expressed in roots, followed by stems and leaves. Salt treatment experiments indicated that salt treatment caused a rapid increase in sHSP1 and sHSP2 expression within 36 and 24 h, respectively. Exogenous ABA and MJ treatment experiments indicated that sHSP1 and sHSP2 genes were induced by exogenous ABA and MJ, and all reached the highest expression

收稿日期: 2016-04-13

基金项目: 北京市自然科学基金青年项目 (7154216)

作者简介: 董先娟 (1991—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药植物分子生物学与生物合成研究。Tel: 18811790112 E-mail: dongxianjuan91@163.com

*通信作者 王晓晖 (1981—), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向为中药植物分子生物学及生物合成。

Tel: (010)64286180 E-mail: wangxhui2014@163.com

史社坡 (1976—), 男, 硕士生导师, 副研究员, 研究方向为中药活性成分发现与生物合成研究。

Tel: (010)64286350 E-mail: shishepo@163.com

level at 12 h. Simultaneously, the SA treatment experiments indicated that exogenous SA treatment caused a rapid increase in sHSP1 and sHSP2 expression within 12 and 24 h, respectively. **Conclusion** The full-length cDNA sequence of sHSP1 and sHSP2 genes from *A. sinensis* is obtained. sHSP1 and sHSP2 have the different expression level in different tissues. When subjected to high salt, ABA, SA, and MJ treatment, sHSP1 and sHSP2 show the different expression levels in different time. Cloning and analyzing sHSP1 and sHSP2 genes from *A. sinensis* will play an important role for further study on plant defense response.

Key words: *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg; small heat shock proteins gene 1; small heat shock proteins gene 2; expression analysis; sHSPs; bioinformatics

植物在生长发育过程中会受到各种生物胁迫和非生物胁迫的影响,植物通过调节生理生化、表达胁迫响应基因等方式适应生存环境,而热激蛋白是其中最重要的胁迫响应蛋白家族之一^[1-2]。植物中的热激蛋白根据相对分子质量可以分为 5 个家族: HSP110、HSP90、HSP70、HSP60, 小分子 HSPs ($1.5 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^4$), 它们分布在细胞的各个部分,在植物胁迫如高温、低温、高盐中起到重要作用,其中量最丰富的是小分子热激蛋白 (small heat shock proteins, sHSPs)^[1,3]。sHSPs 是生物体内广泛存在的一类蛋白,在结构上高度保守,具有分子伴侣、保护 mRNA、耐热性、耐冷性、降低细胞内的活性氧等功能,是植物响应生物胁迫和非生物胁迫的重要蛋白,因此对 sHSPs 的研究有利于培育抗逆、抗病品种和丰富植物防御反应机制,但是目前关于 sHSPs 的研究相对较少^[4-6]。盐胁迫影响植物产量、蛋白质合成和光合作用及能量代谢^[7]; 而脱落酸 (abscisic acid, ABA) 是调控植物生长发育 (如种子休眠与萌发、幼苗生长、侧根发育、果实成熟与衰老等) 和响应生物或非生物胁迫 (如病原菌、干旱、高盐等) 的重要激素之一^[8], 外源水杨酸 (salicylic acid, SA) 处理可诱导植物对多种病病毒、细菌、真菌的抗性,能对植物生长产生抑制作用; 茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MJ) 是高等植物体内的内源生长调节物质,具有广泛的生理功能。因此研究 sHSPs 在盐胁迫和经过外源 ABA、SA、MJ 处理的表达差异,有利于阐明 sHSPs 的功能和植物防御反应机制。

白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg 是我国生产名贵芳香类药材沉香唯一正品植物来源,现已被列为国家二级濒危保护植物^[9]。沉香是白木香含树脂的木材,作为我国传统中药,沉香具有行气止痛、温中止呕、纳气平喘等功效,用于治疗胸腹胀闷疼痛、胃寒呕吐呃逆、肾虚气逆喘急^[10]。沉香临床应用广泛,具有消化系统和中枢神经系统保护等药理作用。沉香是独有龙涎香与檀香混合物香味的一种香料,融合动物界与植物界的精华,至今仍旧无法

复制这种香味,因而极其珍贵,我国的药用沉香主要依赖进口,价格昂贵^[11]。健康的白木香植物并不产生沉香,只有受到物理伤害和化学伤害时,沉香才会在白木香植物中逐渐形成,但是物理伤害和化学伤害诱导沉香形成的分子机制一直没有清晰揭示,严重制约了高效结香技术的建立^[12]。当植物受到伤害时,植物自身产生防御反应,而 sHSPs 蛋白是植物防御反应中最重要的蛋白家族之一^[4-6],因此通过研究 sHSPs 的结构、表达方式有助于阐明白木香中沉香形成机制。本研究通过高通量测序获得 2 个 sHSP18.1 基因的 cDNA 全长序列,并对其序列特征进行了生物信息学分析,通过荧光定量 PCR 技术分析其在不同组织中的表达差异,并研究其在受到高盐和外源 ABA、SA、MJ 处理不同时间的愈伤组织中的表达及积累情况,为进一步研究沉香结香机制及丰富植物的防御反应机制奠定基础。

1 材料

样品由广州移植,现种植于北京中医药大学中药现代研究中心 2 年的白木香,经北京中医药大学中药现代研究中心屠鹏飞教授鉴定为瑞香科 (Thymelaeaceae) 植物白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg。采集冬季 12 月份白木香的根、茎、叶提取总 RNA,检测 sHSP18.1 基因在不同组织中的特异性表达。将白木香叶诱导产生的愈伤组织进行 200 mmol/L NaCl 处理以及 100 μ mol/L ABA、SA、MJ 处理,于处理后的 0、12、24、36、48 h 取样,提取总 RNA,检测白木香在不同胁迫下的特异性表达量。

2 方法

2.1 白木香总 RNA 的提取和 cDNA 合成

按照 EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒 (Aidlab, 中国) 实验操作步骤进行植物总 RNA 提取,利用 NanoDrop 2000C 检测 RNA 浓度,同时利用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性和质量。利用 Sigma 公司的反转录酶 M-MLV 将白木香的总 RNA 反转录为第一链 (cDNA),反转录的条件按照说明书进行。

2.2 白木香 sHSP1 和 sHSP2 基因序列全长克隆

从白木香转录组高通量测序结果中获得 2 个由表达序列标签拼接而成的序列,经注释分析发现为具有完整开放阅读框的 sHSP 基因,2 个基因的开放阅读框为 474 bp,基因序列相似性为 90.08%,定名为 sHSP1 和 sHSP2。依据 2 端序列利用 Primer 软件设计两对引物,序列见表 1。以白木香总 RNA 的反转录产物为模板,按照下列体系对白木香中 sHSP1 和 sHSP2 基因进行扩增: cDNA 1 μL, 10×LA-Taq buffer 5 μL, dNTP Mix (2.5 mmol/L) 4 μL, LA-Taq (2.5 U/μL) 0.5 μL, 10 μmol 引物各 1 μL, 终体积为 50 μL。反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 然后进行 30 个循环, 94 °C、1 min, 47 °C、30 s, 72 °C、1 min, 循环结束后 72 °C 延伸反应 10 min, 4 °C 保存。1%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,凝胶成像分析系统检测,目的片段回收和纯化按照胶回收试剂盒说明书进行。将回收后的 PCR 产物与 pMD19-T 连接,转化到 DH5α 菌株,在氨苄抗性的平板上进行筛选,并经过菌落 PCR 检测后送上海英潍捷基公司测序。

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequences

引物作用	引物名称	引物序列
序列扩增	sHSP1-1	ATGTCTCTCATCCAAGCTTC
	sHSP1-2	TCAACCGGAGATTGAACGG
	sHSP2-1	ATGTCTCTCATCCAAGCTTC
	sHSP2-2	TCAGCCGGCGATCTCAATGG
qRT-PCR	sHSP1-3	GTCTGTCCAATCCCAGAAAC
	sHSP1-4	CCTCCTTCTCTATCTTCCTCTC
	sHSP2-3	AACCTCTGCCTTCGTC AAC
	sHSP2-4	CGTTCTTGTCCTCCTTCTCG
	Actin-1	AGGCTAAGATTCAAGACAAGG
	Actin-2	TTGGTCGCAGCTGATTGCTGTG

2.3 白木香 sHSP1 和 sHSP2 基因生物信息学分析

通过在线软件 ProtParam 预测蛋白结构,分析目的基因编码蛋白质的氨基酸组成、蛋白质相对分子质量、理论等电点及稳定性等参数;采用 SignalP 4.1 Server 进行细胞定位预测;通过 ExPASy 中的 SOPMA 工具分析蛋白质序列的二级结构;利用 SWISS-MODEL Workspace 在线分析软件构建蛋白质三级结构模型;利用软件 TMHMM 2.0 进行蛋白质跨膜结构分析;将所获得的 sHSP1 和 sHSP2 基因

编码的氨基酸序列在 GenBank 数据库中进行 Blast P 对比分析,利用 DNAMAN 对其他物种的 sHSPs 基因编码的氨基酸序列进行同源性分析;通过 MEGA 6.05 软件构建 Neighbor-joining 系统进化树,进化距离的计算采用泊松校正法,Bootstrap 重复次数为 1 000 次。

2.4 白木香 sHSP1 和 sHSP2 基因在不同组织及盐胁迫和外源 ABA、SA、MJ 处理不同时间的表达分析

利用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 的方法检测白木香不同组织中 sHSP1 和 sHSP2 的表达情况及盐胁迫和外源 ABA、SA、MJ 处理不同时间的表达情况。分析使用 SYBR Green I 荧光染料法,在 qRT-PCR 仪上进行。选取白木香 Actin 基因作为目标基因定量表达的内参基因,引物序列见表 1。每个样品设 3 个重复。反应体系中含有 5 μL STBR Premix Ex Taq 酶,上、下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL,模板 0.5 μL (50 mg/L),总体积为 10 μL。反应程序: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火/延伸 30 s (每次循环后采集荧光), 40 个循环后, 95 °C 变性 10 s, 65~95 °C 做熔解曲线分析,每个温度以每步 0.5 °C 上升,每个温度停留 5 s。实验进行 9 次重复,结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法来计算基因相对表达量。实验数据通过 Excel 进行分析,获得 sHSP1 和 sHSP2 基因的相对表达量。

3 结果与分析

3.1 白木香总 RNA 的提取与检测

从白木香诱导的愈伤组织中提取总 RNA,经 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示 28 S rRNA 和 18 S rRNA 条带清晰,结果见图 1,前者亮度约是后者的 2 倍,说明所提取的 RNA 完整性较好;经 NanoDrop 2000C 测得 $A_{260}/A_{280}=1.92$, $A_{260}/A_{230}=2.13$,表明 RNA 纯度较高,可用于 RT-PCR 扩增。

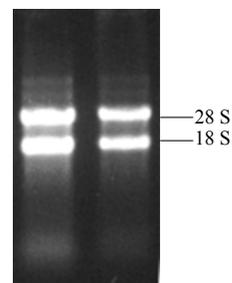


图 1 白木香总 RNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of total RNA from *A. sinensis*

3.2 白木香 sHSP1 和 sHSP2 基因全长 cDNA 的克隆

根据白木香愈伤组织转录组测序结果,以白木香愈伤组织的 cDNA 为模板进行扩增,利用 PCR 方法扩增后的 2 个 474 bp 的基因序列,编码 157 个氨基酸,白木香愈伤组织 sHSP1 和 sHSP2 基因的扩增结果见图 2,将其连接到 pMD19-T 载体转化大肠杆菌 DH5 α ,测序结果经过 NCBI 的 BLAST 比对,确定 2 个扩增产物是白木香 sHSPs 基因 cDNA 的片段,同时 BLAST 结果显示,sHSP1 和 sHSP2 基因与 sHSPs 家族具有很高的同源性,sHSP1 与川桑 *Morus notabilis* Schneid、桉树 *Eucalyptus grandis* Hill、草莓 *Fragaria vesca* subsp. *Vesca* 中的 sHSP18.1 基因的相似性分别为 78%、76%、74%,sHSP2 与番木瓜 *Carica papaya* Linn.、桉树、川桑中的 sHSP18.1 基因的相似性分别为 80%、77%、76%。

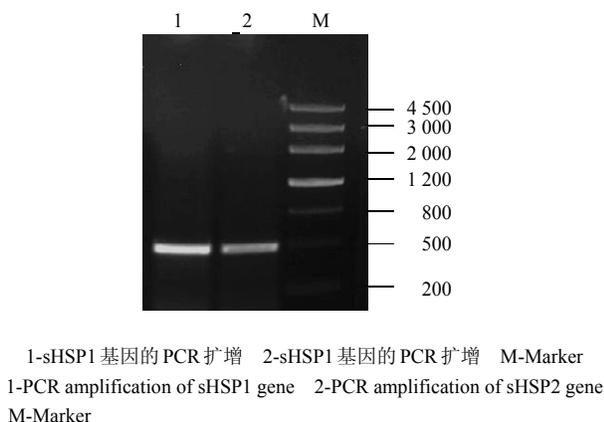


图 2 白木香 sHSP1、sHSP2 基因的克隆
Fig. 2 Cloning of sHSP1 and sHSP2 from *A. sinensis*

3.3 sHSP1 和 sHSP2 的生物学信息分析

3.3.1 sHSP1 和 sHSP2 蛋白结构、亚细胞定位、跨膜区域分析

通过 ProtParam 软件预测 sHSP1 和 sHSP2 基因编码的蛋白的理化性质。推测 sHSP1 编码的蛋白分子式为 C₈₀₃H₁₂₄₈N₂₁₈O₂₄₂S₄, 相对分子质量为 17 975.3, 理论等电点为 6.34, 不稳定系数 II 为 48, 属于不稳定蛋白, 总平均亲水性 GRAVY 为 -0.655, 为亲水性蛋白; sHSP2 编码的蛋白分子式为 C₇₉₈H₁₂₆₁N₂₂₃O₂₄₀S₃, 相对分子质量为 17 896.2, 理论等电点为 5.48, 不稳定系数 II 为 54.99, 属于不稳定蛋白, 总平均亲水性 GRAVY 为 -0.569, 为亲水性蛋白。通过蛋白质亚细胞定位软件 SignalP 4.1 Server 预测结构表明,白木香 sHSP1 和 sHSP2 蛋白主要定位于细胞质。利用 TMHMM 2.0 预测白木香 sHSP1 和 sHSP2 的跨膜区域, 预测结果表明 sHSP1 和 sHSP2 均没有跨膜区域。

3.3.2 sHSP1 和 sHSP2 蛋白的二级结构分析及三维结构预测

运用 ExPASy 中的 SOPMA 工具预测 sHSP1 和 sHSP2 基因编码蛋白的二级结构, 结果显示 sHSP1 蛋白的二级结构由 50.96% 的随机卷曲 (random coil)、17.20% 的 α -螺旋 (α -helices)、24.20% 的延伸链 (extended strand) 和 7.64% 的 β -折叠 (β -turn) 组成 (图 3-A), 推测随机卷曲是其最大量的二级结构元件, 而 α -螺旋、延伸链和 β -折叠散布于整个蛋白中。而 sHSP2 蛋白的二级结构由 50.32% 的随机卷曲、12.74% 的 α -螺旋、26.75% 的延伸链和 10.19% 的 β -折叠 (β -turn) 组成 (图 3-B), 推测随机卷曲是其最大量的二级结构元件, 而 α -螺旋、延伸链和 β -折叠散布于整个蛋白中。

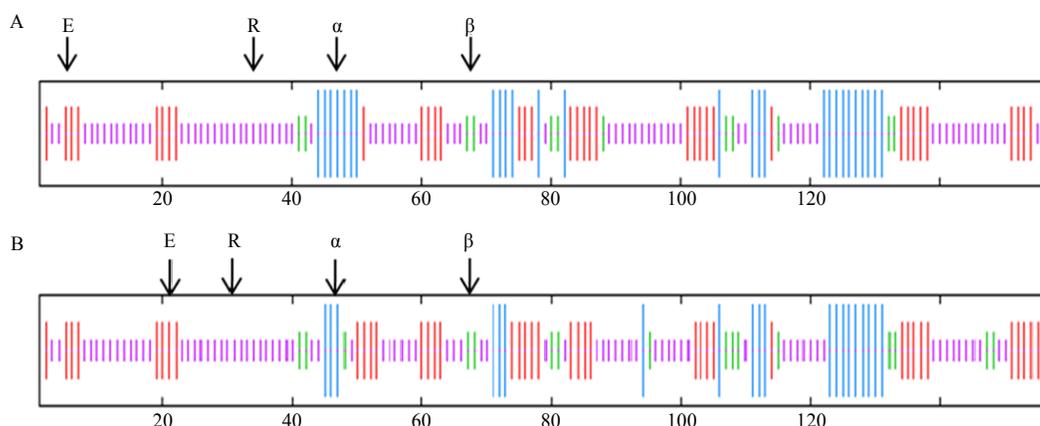


图 3 sHSP1 (A) 和 sHSP2 (B) 编码蛋白的二级结构
Fig. 3 Predicted secondary structure of sHSP1 (A) and sHSP2 (B) protein

将白木香的 sHSP1 和 sHSP2 的氨基酸序列通过 SWISS-MODEL Workspace 在线分析软件建立了 sHSP1 (图 4-A) 和 sHSP2 (图 4-B) 的三维结构模型, 选择小麦 sHSP 的结构模型为模板, 进行白木香 sHSP1、sHSP2 的结构预测, 预测结果表明, 白木香 sHSP1 与模板小麦 sHSP 一致性为 70.67%, 白木香 sHSP2 与模板小麦 sHSP 一致性为 69.33%, 具有参考价值, 预测的 sHSP1 与 sHSP2 的三维结构类

似, 具体三维结构如图 4 所示。

3.3.3 白木香 sHSP1 和 sHSP2 氨基酸序列分子系统进化分析 将白木香 sHSP1 和 sHSP2 氨基酸序列与 GenBank 中其他植物中的不同 sHSPs 氨基酸序列进行比对, 通过 DNAMAN 软件与多种植物进行比对分析 (图 5), 比对结果表明 sHSP1 氨基酸序列与可可 *Theobroma cacao* Linn.、雷蒙德氏棉 *Gossypium raimondii* Linn.、桉树的同源性分别为 80%、78%、77%; 而 sHSP2 氨基酸序列与可可、番木瓜、苜蓿 *Medicago truncatula* Linn. 的同源性分别为 81%、80%、80%, 说明 sHSPs 在进化过程中较为保守。与其他植物多序列比对后发现各相似蛋白序列在 N 端保守性较低, 在中部和 C 端相对保守, 在白木香 sHSP1 和 sHSP2 的 53~156 氨基酸区是 sHSPs20 亚家族 sHSP2 典型的 (α -crystallin domain, ACD) 结构域。 α -晶体域的氨基酸序列为该类蛋白的保守序列区。同时 sHSP1、sHSP2 与其他参与比对的植物一致, 都含有丰富的脯氨酸残基活性位点。

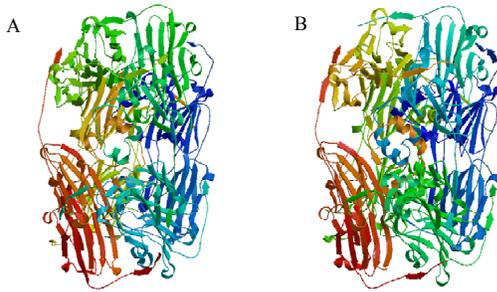


图 4 sHSP1 (A) 和 sHSP2 (B) 蛋白质的三维结构
Fig. 4 3D structure of sHSP1 (A) and sHSP2 (B) protein

白木香 sHSP1	MSLI PSFFGNRQSSIFDPFSLDVWDPFREFNFP.SSSLGLL	39
白木香 sHSP2	MSLI PSFFGNRQSSIFDPFSLDVWDPFGEENFP.SSSLSL	39
番木瓜	MSLI PSFFGNRQSSIFDPFSLDVWDPFKDFPFP.SSSISR	39
可可	MAMI PSFFGNRQSSVDFPFSLDVWDPFKDFPFP.SSLTRH	39
雷蒙德氏棉	MAMI PSFFGNRQSSVDFPFALDVWDPFKDFPFP.SSLTTG	39
苜蓿	MSLI PSFFGRRSNVDFPFSLDVWDPFKDFPFP.SSLSALSAS	40
桉树	MSLI PSFFGRRSDALDPFSLDFWDSIEDSPFPSSSLPAS	40
Consensus	m i p s f g r s d p l d w d f p s	
白木香 sHSP1	SNP.ETSAAFNARIDWRETPEAHVFKADLPLGLKKEEVKVE	39
白木香 sHSP2	SNP.ETSAAFNTRIDWRETPEAHVFKADLPLGLKKEEVKVE	39
番木瓜	...ENSAAFNNTSVDEETPEAHVFRADLPLGLKKEEVKVE	39
可可	A.P.ETSAAFNTRIDWKETPEAHVFKADLPLGLKKEEVKVE	39
雷蒙德氏棉	S.P.ETSAAFNARMDWKETPEAHVFKADLPLGLKKEEVKVD	39
苜蓿	SFQENSAFVSTRIDWKETPEAHVFKADLPLGLKKEEVKVE	40
桉树	TFR.ENSAAFNTRIDWRETPEAHVFEADLPLGLKKEEVKVE	40
Consensus	e s a d w e t p a h v f a d l p g l k k e e v k v	
白木香 sHSP1	LEDHRLVQISGERKIEKEDKNDTWHRRVERS S G K F L R R F R L	39
白木香 sHSP2	VEDDRV LQISGERQIEKEDKND SWHRRVERS S G K F M R R F R L	39
番木瓜	LEDDRV LQISGERHVEKEDKNDTWHRRVERS S G K F S R R F R L	39
可可	IEDDRV LQISGERKIEKEDKNDTWHRRVERS S G M F S R R F R L	39
雷蒙德氏棉	VEDDRV LQISGERKIEKEDKNDTWHRRVERS S G K F S R R F R L	39
苜蓿	IEDDRV LQISGERNVEKEDKNDQWHRRVERS S G K F M R R F R L	40
桉树	IEDDRV LQISGERKVEKEDKNDKWHRRVERS S G K F M R S F R L	40
Consensus	e d r v l a i s a e r e k e d k w h r v e r s a f r f r l	
白木香 sHSP1	PEDAKMEEIKAGMENGVLTVTPKVEAKKPNLKSQVQISG	39
白木香 sHSP2	PEDVKMHEIKAAAMENGVLTVTPKAAVKKPDIKSIEIAG	39
番木瓜	PENVKMDQVKASMENGVLTVTPKAEAKKPDVKAIEISG	39
可可	PENVKMDQVKASMENGVLTVTPKVEVKKPDVKAIDISG	39
雷蒙德氏棉	PENVKMDQVKASMENGVLTVTPKVEVKKPDVKAIEISG	39
苜蓿	PENAKMDQVKAAMENGVLTVTPKVEVKKPDVKSIEISG	40
桉树	PEDAKMDQVKASMENGVLTVTPKVEEKKPEVKAIQISG	40
Consensus	e d k m k a m e n g v l t v t p k k k p k i g	

图 5 白木香 sHSP1、sHSP2 与其他植物 sHSPs 氨基酸序列同源性比对

Fig. 5 Homologous comparison on amino acid sequence of sHSPs in *A. sinensis* and other plants

通过进化树构建软件 MEGA 6.05, 采用相邻连接法构建 sHSPs 进化树, 进行 sHSPs 的聚类分析。通过软件构建的进化树如图 6 所示, 结果表明 sHSP1 和 sHSP2 蛋白氨基酸序列相似性较高, 与柑橘 sHSP18.5、本生烟 sHSP17.4 的相似性比较高。

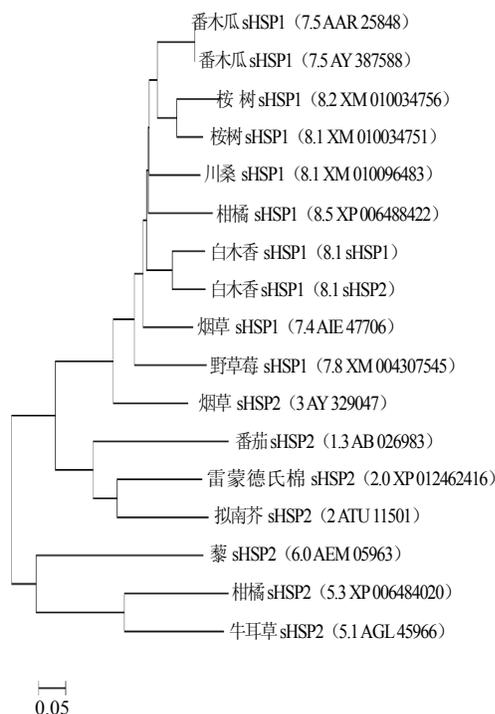


图 6 植物中 sHSPs 蛋白氨基酸序列的聚类分析

Fig. 6 Phylogenetic analysis of sHSPs proteins from plants

3.4 sHSP1、sHSP2 基因的组织表达特异性分析

利用实时荧光定量 PCR 检测 sHSP1、sHSP2 基因的表达特异性, 研究结果表明 sHSP1、sHSP2 基因在根中的表达量最多, 其次是茎和叶 (图 7), 说明 sHSP1、sHSP2 基因可能主要在根中发挥生物学功能, 推测 sHSP1、sHSP2 在白木香根受到胁迫响应时起到重要的作用。

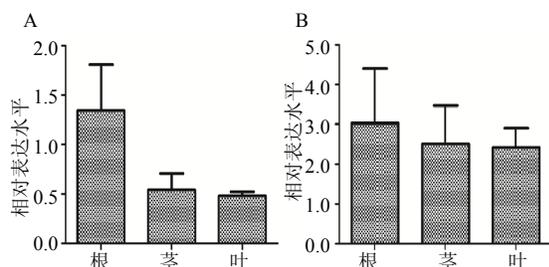


图 7 sHSP1 (A) 和 sHSP2 (B) 在不同组织中的表达分析

Fig. 7 Expression levels of sHSP1 (A) and sHSP2 (B) in different tissues

3.5 sHSP1、sHSP2 基因响应盐胁迫的表达分析

sHSPs 是参与植物防御反应的重要蛋白家族, 而研究表明小分子热激蛋白 sHSPs 除了能够响应高温、低温胁迫外, 部分 sHSPs 还能够参与植物盐胁迫响应^[13], 为研究白木香愈伤组织中扩增的 sHSP1 和 sHSP2 基因是否参与盐胁迫响应, 采用实时荧光定量 PCR 的方法对愈伤组织在 200 mmol/L NaCl 处理下不同时间 sHSP1 和 sHSP2 的表达量进行分析。结果表明 sHSP1 基因在受到 200 mmol/L NaCl 处理后的 36 h 持续升高, 36 h 时达到最高水平, 之后随时间的增加而表达量下降 (图 8-A); sHSP2 基因在愈伤组织受到 200 mmol/L NaCl 处理后 24 h 持续升高, 24 h 达到最高表达水平, 然后随时间的增加而表达量下降 (图 8-B)。这些结果表明白木香 sHSP1 和 sHSP2 基因参与盐胁迫响应, 与植物的抗盐性密切相关。

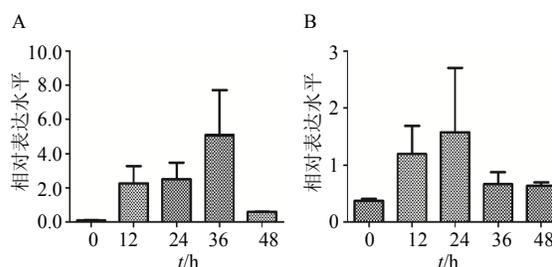
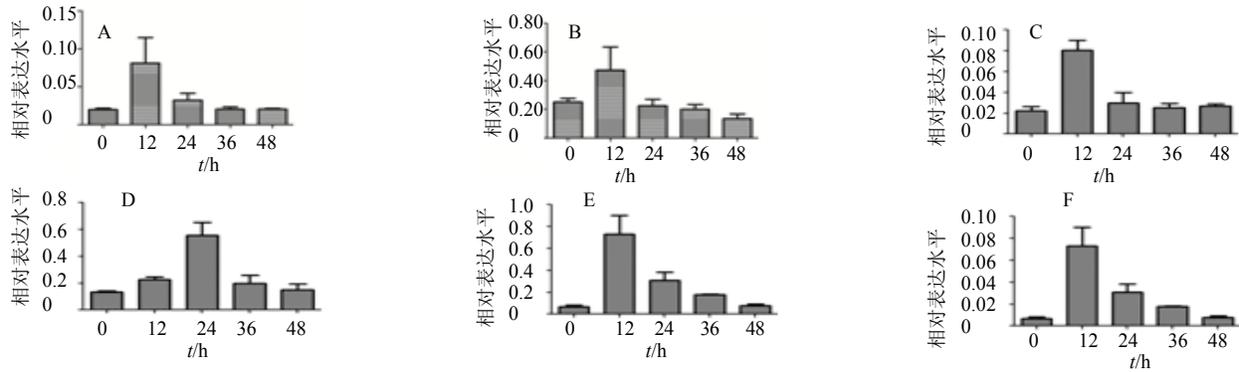


图 8 sHSP1 (A) 和 sHSP2 (B) 在 NaCl 处理后不同时间的表达分析

Fig. 8 Expression analysis of sHSP1 (A) and sHSP2 (B) in different NaCl treatment time

3.6 sHSP1、sHSP2 在外源 ABA、SA、MJ 处理后不同时间的表达分析

为研究白木香扩增 sHSP1 和 sHSP2 基因是否受到 ABA 信号通路调控以及 SA 和 MJ 的诱导, 同样采用实时荧光定量 PCR 检测白木香愈伤组织 sHSP1 和 sHSP2 基因在外源 100 $\mu\text{mol/L}$ ABA^[14]、100 $\mu\text{mol/L}$ SA^[15]和 100 $\mu\text{mol/L}$ MJ^[16]处理下不同时间的表达量。实验结果表明, sHSP1 基因和 sHSP2 基因在受到 3 种外源激素 ABA、SA 和 MJ 处理后的表达量趋势都是先增加后降低。sHSP1 基因和 sHSP2 基因在受到外源 100 $\mu\text{mol/L}$ ABA 和 100 $\mu\text{mol/L}$ MJ 处理后的 12 h 表达量达到最高峰, 然后随时间的增加而表达量逐渐降低。sHSP1 基因在受到外源 100 $\mu\text{mol/L}$ SA 处理后的 12 h 达到最高表达量, 之后随时间的增加表达量下降 (图 9-C); 而 sHSP2 基因在外源 SA 处理后的 24 h 达到最高表达量, 之后随时间表达量降低 (图 9-D)。这



A、C、E-sHSP1 基因在外源 ABA、SA、MJ 处理后不同时间的表达分析；B、D、F-sHSP2 基因在外源 ABA、SA、MJ 处理后不同时间的表达分析

A, C, and E-expression analysis of sHSP1 in different ABA, SA, and MJ treatment time; B, D, and F-expression analysis of sHSP2 in different ABA, SA, and MJ treatment time

图 9 sHSP1、sHSP2 在外源 ABA、SA、MJ 处理后不同时间的表达分析

Fig. 9 Expression analysis of sHSP1 and sHSP2 in different ABA, SA, and MJ treatment time

些实验结果表明，白木香 sHSP1 和 sHSP2 基因能够受到 ABA 信号通路调控以及 SA 和 MJ 的诱导，在植物防御反应中起到重要的作用。

4 讨论

植物 sHSPs 是植物中最重要的一类热激蛋白，其广泛分布于细胞质、线粒体、叶绿体等组织中，研究表明 sHSPs 在植物响应逆境胁迫中起到重要作用^[6]。白木香是名贵药材沉香的主要来源，但是健康的白木香中不产生沉香，只有在白木香受到物理或化学伤害时才能够产生沉香^[11]，因此沉香的产生机制与白木香的防御反应密切相关，而 sHSPs 又与植物防御反应密切相关，因此研究小分子热激蛋白生物信息学和表达分析有利于揭示白木香的结香机制。本研究根据首次从白木香的愈伤组织中扩增得到 sHSP1 和 sHSP2 基因全长，并对 2 个基因进行生物信息学分析，结果表明从白木香愈伤组织扩增的 sHSP1 与已经鉴定川桑、桉树、草莓中的细胞质 sHSP18.1 相似性较高，sHSP2 与已经鉴定的番木瓜、桉树、川桑中的 sHSP18.1 基因的相似性较高；sHSP1 和 sHSP2 基因编码蛋白质的氨基酸组成、蛋白质相对分子质量、理论等电点及稳定性等很接近，两者的理化性质相似；而细胞定位预测结果表明，白木香 sHSP1 和 sHSP2 定位于细胞质中；蛋白二级结构分析表明 sHSP1 和 sHSP2 基因编码的蛋白二级结构相似性很高；三维结构预测结果表明 sHSP1 和 sHSP2 三维结构相似性较高，两者与小麦中 HSP18.1 的三维结构相似；通过聚类分析结果表明白木香 sHSP1 和 sHSP2 相似性较高，两者与柑橘

sHSP18.5、烟草 sHSP17.4 的相似性较高。

sHSPs 已经被证明与高温、低温、高盐等环境胁迫相关，并且 sHSPs 的表达具有组织特异性^[17]。白木香 sHSP1 和 sHSP2 基因组织特异性表达分析结果显示，两基因在茎和叶中表达比较少，但是在根中表达较多，说明两基因表达具有组织特异性。高盐是目前影响植物生长发育的最重要非生物胁迫，部分 sHSPs 与植物的盐胁迫响应有关^[13]，本研究表明通过高盐处理的愈伤组织中 sHSP1 基因 36 h 之前持续升高，36 h 时达到最高表达水平；sHSP2 基因在 24 h 之前持续升高，24 h 达到最高表达水平；这些结果表明 sHSP1 和 sHSP2 基因参与了植物的抗盐胁迫。ABA 和 SA 是非常重要的激素，是植物体内普遍存在的重要的内源信号分子，可以提高植物抗逆性，能够调控植物种子发芽、根系发育、种子枯萎等生理活动。在植物的抗病、抗低温、抗旱、抗盐等抗逆活动中具有重要的生理作用。而 MJ 是许多植物体产生的天然化合物，在植物代谢过程中发挥着与 ABA、SA 等激素相类似的作用。MJ 除了是高等植物体内的内源生长调节物质，具有广泛的生理功能外，它本身也是病原物、诱导子及创伤植物防卫基因表达的信号分子，并且其本身也可作为诱导子^[18]。有研究表明，植物受到胁迫启动 ABA 信号通路时会启动部分 sHSPs 表达^[19]，SA 在植物诱导性防卫反应中起系统信号分子的作用^[20]，它同 ABA 一样在逆境胁迫下能做出应答，调控多种蛋白表达。而 MJ 能够作为诱导子会直接引发白木香细胞逆境条件下的次生代谢反应，诱导次生代谢产物色酮类化合

物的产生^[21]。ABA 信号通路是植物的重要激素,与植物的生长发育和植物胁迫响应密切相关,因此能够在植物受到胁迫时,调控植物防御反应基因的表达^[15],本研究表明外源 ABA 处理的白木香愈伤组织 sHSP1 和 sHSP2 基因在 12 h 达到最高表达水平,之后随时间增加而降低,这些结果表明 ABA 在胁迫条件下调控着 sHSP1 和 sHSP2 基因的表达;SA^[16]和 MJ^[22]在植物诱导性防卫反应中起系统信号分子的作用,能诱导白木香次生代谢产物色酮化合物的产生,亦会调控多种蛋白的表达,本研究表明外源 SA 处理的白木香愈伤组织 sHSP1 和 sHSP2 基因分别在 12、24 h 达到最高表达水平,之后随时间增加而降低;MJ 处理的白木香愈伤组织 sHSP1 和 sHSP2 基因都在 12 h 达到最高表达量,说明 SA、MJ 能够在逆境下调控 sHSP1 和 sHSP2 基因的表达。因此本研究为进一步研究白木香的结香机制和防御反应机制奠定了基础。

参考文献

- [1] Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, *et al.* Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response [J]. *Trends Plant Sci*, 2004, 9(5): 244-252.
- [2] Montfort R L, Basha E, Friedrich K L, *et al.* Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein [J]. *Nat Struct Biol*, 2001, 8(12): 1025-1030.
- [3] Kampinga H H, Hageman J, Vos M J, *et al.* Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2009, 14(1): 105-111.
- [4] Palakolanu S R, Polavarapu B K K, Christiane S, *et al.* Unraveling regulation of the small heat shock proteins by the heat shock factor HvHsfB2c in barley: Its implications in drought stress response and seed development [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e89125.
- [5] Cecilia R, Alexandra C, Valentina C, *et al.* Recovery from heat, salt and osmotic stress in *Physcomitrella patens* requires a functional small heat shock protein PpHsp16.4 [J]. *BMC Plant Biol*, 2013, 13(5): 1471-2229.
- [6] 李春子, 成善汉. 植物小分子热激蛋白的进化及表达调控研究进展 [J]. *热带生物学报*, 2010, 1(2): 193-196.
- [7] Priyanka D, Kamlesh K M, Singla P, *et al.* Understanding salinity responses and adopting 'omics-based' approaches to generate salinity tolerant cultivars of rice [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6(9): 712-727.
- [8] Klára K, Ilja T P, Pavel V. Protein contribution to plant salinity response and tolerance acquisition [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(4): 6757-6789.
- [9] 中国珍稀濒危保护植物名录 (第一册) [M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [10] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [11] 李戈, 段立胜, 杨春勇, 等. 白木香结香技术研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(25): 12012-12013.
- [12] 张争, 杨云, 魏建和, 等. 白木香结香机制研究进展及其防御反应诱导结香假说 [J]. *中草药*, 2010, 41(1): 156-159.
- [13] Silvia S M, Gracia G A, Pablo D S, *et al.* The *Opuntia streptacantha* OpsHSP18 gene confers salt and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(8): 10154-10175.
- [14] Hu X, Liu R, Li Y, *et al.* Heat shock protein 70 regulates the abscisic acid-induced antioxidant response of maize to combined drought and heat stress [J]. *Plant Growth Regul*, 2010, 60(3): 225-235.
- [15] Kumar M, Busch W, Birke H, *et al.* Heat shock factors HsfB1 and HsfB2b are involved in the regulation of Pdf1.2 expression and pathogen resistance in *Arabidopsis* [J]. *Mol Plant*, 2009, 2(1): 152-165.
- [16] Dat J F, Lopez-Delgado H, Foyer C H, *et al.* Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings [J]. *Plant Physiol*, 1998, 116(4): 1351-1357.
- [17] Mu C G, Zhang S J, Yu G Z, *et al.* Over expression of small heat shock protein LimHSP16.45 in *Arabidopsis* enhances tolerance to abiotic stresses [J]. *PLoS One*, 2013, 8(13): e82264.
- [18] Creelman R A, Mullet J E. Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(10): 4114-4119.
- [19] Wu X L, Gong F P, Yang L, *et al.* Proteomic analysis reveals differential accumulation of small heat shock proteins and late embryogenesis abundant proteins between ABA-deficient mutant vp5 seeds and wild-type Vp5 seeds in maize [J]. *Front Plant Sci*, 2014, 5(1): 801-819.
- [20] 刘林德, 姚敦义. 植物激素的概念及其新成员 [J]. *生物学通报*, 2002, 37(8): 18-20.
- [21] 何梦玲, 何芳, 孟京兰, 等. 3 种诱导子对白木香根悬浮培养细胞中 2-(2-苯乙基) 色酮化合物形成的影响 [J]. *中成药*, 2013, 35(7): 1397-1371.
- [22] Thorpe M R, Ferrieri A P, Herth M M, *et al.* ¹¹C-imaging: methyl jasmonate moves in both phloem and xylem, promotes transport of jasmonate, and of photoassimilate even after proton transport is decoupled [J]. *Planta*, 2007, 226(2): 541-551.