

* 学术论文 *

利用大麦寡核苷酸芯片进行小麦苗期 叶片热胁迫基因表达谱分析*

彭丹辉** 彭惠茹** 倪中福 聂秀玲
姚颖垠 秦丹丹 贺可香 孙其信***

中国农业大学植物遗传育种系, 农业生物技术国家重点实验室, 教育部作物杂种优势研究与利用重点实验室,
北京市作物遗传改良重点实验室, 农业部作物基因组与遗传改良重点实验室, 北京 100094

摘要 植物感受热胁迫时基因表达发生变化, 而这些差异表达的基因对植物耐热性起着至关重要的作用. 为揭示小麦热胁迫响应的分子机理, 以 38℃ 热胁迫的小麦幼苗为处理组(HS), 同期未经处理的小麦幼苗为对照组(CK), 分别提取叶片 RNA 与 Affymetrix Barley1 基因芯片杂交. 杂交结果显示, 在总共 22840 个探针中, 对照组(CK)和热胁迫组(HS)共检测到 8486 个阳性探针, 占总探针数的 37.15%. 利用半定量 RT-PCR 技术对 11 个差异表达基因的表达模式进行验证, 发现 10 个基因与芯片的表达类型完全一致. 利用 Gene Ontology 的 GO information 对差异表达的基因进行了分类, 表明差异表达的基因涉及逆境胁迫、信号转导、物质运输、光合作用、蛋白代谢、脂肪代谢、碳水化合物代谢等多个方面. 其中有大量热激蛋白和分子伴侣相关基因上调表达. 上调表达的热激蛋白包含热激蛋白各个家族, 且上调表达的平均倍数明显高于其他基因的上调倍数. 另外泛素—蛋白酶体通路中的多个关键酶的基因也发生了差异表达, 预示着负责蛋白质选择性降解的泛素—蛋白酶体通路也参与了植物对热胁迫的应答机制.

关键词 小麦 热胁迫 大麦芯片 基因表达谱

作物在生长发育的整个时期均会受到各种逆境胁迫的危害, 在各种胁迫因子中, 温度对作物的生长发育有着十分重要的影响. 特别是近年来, 随着温室效应的加剧, 高温天气在全球的发生频率不断增加, 对作物生产造成了巨大的损失^[1]. 小麦 (*Triticum aestivum* L.) 是一种喜凉的 C3 作物, 对高温的生理适应能力较差, 高温胁迫严重影响小麦的产量和品质^[2, 3]. 如何提高作物的耐热性一直是遗传学、育种学、植物生理学和分子生物学研究的

重要课题.

传统遗传学证明植物耐热性是受多基因控制的数量性状. March 等^[4]利用细胞膜热稳定法对菜豆 (*Phaseolus vulgaris* L.) 的耐热性遗传进行了研究, 发现细胞膜热稳定性的遗传变异是由少数几个基因控制的. Porter 等^[5]用 TTC(triphenyl tetrazolium chloride)还原法对控制小麦耐热性的基因效应进行了研究, 发现耐热性受加性和显性效应共同控制, 并存在着显著的反交效应. Sun^[6]和徐如强^[7]利用

2006-03-02 收稿, 2006-04-26 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 30000106)

** 同等贡献作者

*** 通讯作者, E-mail: qxsun62@public.bta.net.cn

膜稳定性的方法, 分别对四倍体小麦和六倍体小麦的耐热性基因进行了染色体定位, 鉴定出了与耐热性有关的染色体; Ottaviano 等^[8]利用细胞膜热稳定法(CMS)对玉米的 1 个包含 44 个系的重组近交系群体进行了数量基因定位, 检测到了 6 个数量性状位点(QTLs), 共解释 53% 的耐热性变异. 利用同一组重组近交系, Frova 定位了热胁迫下控制花粉活力的 5 个 QTLs 和控制花粉管伸长能力的 6 个 QTLs^[9,10]. 孙其信等^[11]对异源细胞质对耐热性的影响进行了研究, 发现近缘种属的细胞质对耐热性有显著的影响, 并且存在明显的核质互作.

由此可见, 热胁迫响应可能受到多个基因的调控. 在 mRNA 水平上的实验证据也表明, 植物热胁迫后大量的基因表达发生了变化, 而这些基因对植物耐热性的获得可能起着至关重要的作用^[12,13].

本研究利用 Affymetrix 公司研制的大麦芯片, 以 38°C 热胁迫的小麦幼苗为处理组(HS), 同期未经处理的小麦幼苗为对照组(CK), 对热胁迫前后叶片的基因表达谱变化进行系统分析, 为进一步认识小麦耐热性的分子机制, 以及小麦耐热性遗传改良提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 实验材料

以小麦耐热品种 TAM107 的苗期叶片为实验材料, 将吸涨的小麦种子均匀播在无菌水浸湿的培养皿中, 在光照培养箱中光照培养, 光周期 12 h/12 h (昼/夜). 15°C 培养 15 d 后剪取对照材料(CK)叶片放入液氮中速冻, -70°C 保存; 热处理组材料(HS)移入 38°C 光照培养箱, 处理 1 h 后迅速剪取叶片放入液氮中速冻, -70°C 保存.

1.2 大麦芯片杂交

(1) 大麦寡核苷酸芯片: 本实验所用芯片为 Affymetrix 公司的大麦基因芯片(22k, Barley1), 在设计上采用 25 bp 寡核苷酸探针, 保证了最高特异性. 芯片上的 22840 个探针来源于已公开的 84 个 cDNA 文库中 350000 条高质量的 ESTs 以及 NCBI/GenBank 非冗余数据库中的 1145 个大麦基因序列.

(2) RNA 的提取和表达探针制备: RNA 提取采用 RNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN), 反转录按

照 SuperScript II 试剂盒(Invitrogen)说明书进行, 体外转录按照 RNA Transcript Labeling Kit (Affymetrix)说明书进行, 同时进行生物素标记合成 cRNA 探针.

(3) 芯片杂交、洗脱、染色及检测: 合成的 cRNA 探针经片段化处理用于与芯片杂交. 利用 Affymetrix 公司生产的专用设备“基因芯片检测工作站”进行芯片的杂交、洗脱、染色及检测.

(4) 基因芯片检测数据的处理: 利用 Affymetrix “Microarray Suite Version 5.0” 等软件对芯片扫描所得数据进行计算和处理. 其过程是: 先对每张芯片的数据进行标准化(Normalization), 然后分别对 CK 组和 HS 组进行比较分析, 找出在两个材料中至少有一个材料表达且两者之间存在差异的表达基因.

1.3 cDNA 合成

cDNA 合成反应总体积为 20 μ L, 反应条件为: 总 RNA 2 μ g, 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.3), 75 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L DTT, 50 μ mol/L dNTPs, 锚定引物 50 pmol, RNase 抑制剂 20 U, MMLV 反转录酶 200 U, 37°C 温育 2 h. 同时各取 2 μ L 反应产物用于两次显示 PCR 扩增, 以降低 PCR 过程中的假阳性干扰.

1.4 半定量 RT-PCR 分析

针对 11 个大麦芯片上的 EST 片段, 利用 BLASTN 对 dbEST 进行同源性搜索, 选取与其核苷酸相似性最高的小麦 EST, 根据其序列利用 DNAMAN 设计特异引物, 进行 PCR 扩增. RT-PCR 反应总体积为 20 μ L, 包括反转录产物 2 μ L, 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.5), 0.001% gelatin, 200 mmol/L dNTPs, 基因特异引物 10 pmol, Taq DNA 聚合酶 1 U. PCR 扩增程序: 94°C, 5 min; 38 个循环的程序为 94°C, 1 min; 退火温度(根据引物的 T_m 值而定), 1 min; 72°C 1 min; 最后 72°C 10 min. 为防止 PCR 扩增到达平台期, 分别检测 25, 28, 30 个循环时基因的表达情况, 每个样品重复 3 次, 对照选用小麦 β -Actin 基因, 引物序列为: actin-L: 5'-CAGCAACTGGGATGATATGG-3'; actin-R: 5'-ATTTTCGCTTTCAGCAGTGGT-3'.

2 结果

2.1 芯片检测质量判断

以耐热品种 TAM107 的 CK 组和 HS 组的叶片 RNA 与大麦芯片(22k, Barley1)进行杂交, 质量控制有关的数据见表 1。无论是 CK 组还是 HS 组其整

张芯片的背景值和噪音值都表现均匀, 外加的阳性对照 BIOC, BIOB, BIOD 均能检测到。以上结果说明, 本组基因芯片的质量和样品 RNA 的提纯质量均良好, 杂交、检测体系亦无问题, 芯片检测的结果是可靠的。

表 1 小麦 CK 组和 HS 组与大麦芯片杂交的质量检测报告

	CK 组				HS 组			
	平均值	标准差	最小值	最大值	平均值	标准差	最小值	最大值
背景值	55.03	1.08	52.00	58.10	52.65	1.11	49.40	55.50
噪音值	2.86	0.14	2.60	3.30	2.89	0.20	2.30	3.40

外标:

探针 ^{a)}	信号值(5')	表达检测(5')	信号值(中)	表达检测(中)	信号值(3')	表达检测(3')	信号值(全长)	信号值(3'/5')
CK-AFFX-BIOB	120.9	表达	83.6	表达	69.6	表达	91.35	0.58
CK-AFFX-BIOC	255.9	表达			154.2	表达	205.07	0.60
CK-AFFX-BIOD	215.3	表达			1276.3	表达	745.78	5.93
CK-AFFX-CRE	2087.0	表达			4022.6	表达	3054.84	1.93
HS-AFFX-BIOB	129.2	表达	73.9	表达	56.2	表达	86.44	0.43
HS-AFFX-BIOC	243.5	表达			149.5	表达	196.49	0.61
HS-AFFX-BIOD	249.2	表达			1321.8	表达	785.52	5.30
HS-AFFX-CRE	2465.3	表达			4340.5	表达	3402.91	1.76

a) BIOB, BIOC 和 BIOD 是体外转录途径中, 参与生物素合成的外标基因, CRE 是来源于 P1 抗生素的重组基因, 用于芯片杂交中评估样品的杂交效率

2.2 大麦芯片的检测结果

利用 Affymetrix 公司提供的分析软件 Data Mining Tool (Version 2.0) 对 TAM107 的 CK 组和 HS 组与大麦芯片杂交检测结果进行分析。结果显示, 在总共 22840 个探针中, 对照组与处理组共有 8486 个非重复的探针被检测到, 占总探针数的 37.2%。其中对照组(CK)7613 个, 占总探针数的 33.3%, 处理组(HS)6637 个, 占总数的 29.1%(表 2)。

表 2 小麦 CK 组和 HS 组与大麦芯片杂交结果

	CK 组		HS 组	
	数目	百分率/%	数目	百分率/%
有杂交信号的探针	7613	33.3	6637	29.1
无杂交信号的探针	14653	64.2	15680	68.6
杂交信号不确定的探针	574	2.5	523	2.3
总计	22840	100	22840	100

进一步分析发现, 共有 892 个探针在热胁迫后表达发生了变化, 占表达探针总数的 10.5%。其中 469 个表现为热胁迫后上调, 423 个表现为热胁迫

后下调(以 2 倍为临界值, p -value < 0.05)。在上调表达的 469 个探针中, 有 172 个属于热胁迫后新诱导的基因, 另外 297 个为热胁迫后上调的基因。下调的 423 个探针有 186 个属于热胁迫后沉默, 237 个热胁迫后下调(表 3)。

表 3 小麦苗期叶片热胁迫前后差异表达模式分布

	上调		下调	
	新诱导基因	上调基因	沉默基因	下调基因
探针数目	172	297	186	237
百分率/%	36.7	63.3	44.0	56.0

2.3 小麦热胁迫前后差异表达的基因的功能分类

根据 Barley1 芯片的探针注释, 将 892 个表达差异的基因片段进行 BLASTX 搜索, 在总共 892 个差异表达的探针中, 有 82 个基因在 GenBank 中搜索不到同源序列(截止到 2005 年 10 月), 占 9.2%, 可能代表新的基因, 也可能位于基因的 3' 可变区或者片段太短无法找到同源序列; 287 个比对结果为未知功能的蛋白, 占 32.2%; 523 个基因(271 个上调基因,

252个下调基因)与已知功能的基因具有较高的氨基酸相似性($E\text{ Value} < e^{-10}$),占58.5%。

按照 Gene Ontology (<http://geneontology.org/>)的GO information对523个有功能信息的差异表达的基因进行了功能分类并根据实际情况作了必要调整.热胁迫前后差异表达的基因分为14类(图1),涉及逆境胁迫、信号转导、物质运输、光合作用、蛋白代谢、脂类代谢、碳水化合物代谢、转录因子、细胞膜、细胞骨架等多个途径。

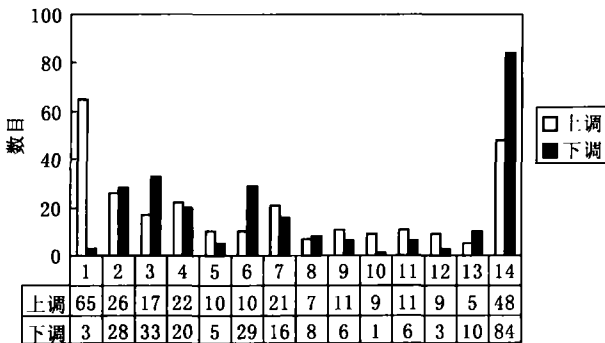


图1 小麦苗期叶片热胁迫前后差异表达基因的功能分类

1. 热激蛋白与分子伴侣; 2. 逆境; 3. 激酶与磷酸化酶(信号转导); 4. 转录因子; 5. 转录后加工; 6. 物质运输; 7. 蛋白质代谢; 8. 脂类代谢; 9. 碳水化合物代谢; 10. 叶绿体和光合作用; 11. 电子传递链; 12. 细胞骨架; 13. 细胞膜; 14. 其他

这些差异表达的基因中,数目最多的一类是热激蛋白和分子伴侣相关基因(68个),且热胁迫后上调表达基因的数目(65个)远多于下调表达的同类基因(3个)。除高温诱导的基因外,与其他逆境相关的基因(54个)表达量也在热胁迫前后发生了明显变化。另外,有大量激酶和磷酸化酶的基因表达量统一下调(33个),而同期上调的激酶和磷酸化酶基因则较少(17个)。此外,物质运输相关基因下调表达的数目(29个)也多于上调表达的数目(10个)。参与蛋白质代谢的基因(37个)以及转录因子(43个)也在热胁迫前后发生了差异表达。

2.4 热激蛋白与分子伴侣相关基因热胁迫前后的表达变化

在众多热胁迫后差异表达的基因中,最为引人注目的是热激蛋白和分子伴侣相关基因。这类基因包括热激蛋白以及其他参与蛋白质折叠的分子伴侣蛋白等。

在上调表达的基因中,热激蛋白和分子伴侣相关基因的数目众多,有65个,占上调表达基因种类总数的24.1%。而且此类基因表达量上调的倍数通常都很大。如Contig2007_s_at和Contig44_s_at两探针所代表的基因的信号值在热胁迫后分别增强了238.9倍和73.5倍。

上调表达的热激蛋白几乎涵盖了热激蛋白的所有家族,包括:HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100, smHSPs(表4)。在所有上调的热激蛋白基因中,上调10倍以上的共有22个,其中8个为smHSPs;上调5—10倍的有16个;上调2—5倍的18个。上调的平均水平远远高于其他家族基因。

表4 上调表达热激蛋白的家族分布

家族	数目	百分率/%
HSP100	3	6.1
HSP90	6	12.2
HSP70	12	24.5
HSP40	7	14.3
HSP60	3	6.1
smHSPs	12	24.5
其他	13	26.5

除一般意义上的分子伴侣和热激蛋白外,两种直接参与蛋白质折叠的折叠酶基因:蛋白质二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)和肽基脯氨酸顺反异构酶(peptidyl prolyl cis/trans isomerase, PPI)的基因也在热胁迫后大幅上调表达。其中,蛋白质二硫键异构酶基因(PDI)2个:Contig2442_at和Contig725_s_at,分别上调表达了18.4倍和4.6倍;肽基脯氨酸顺反异构酶基因(PPI)5个:Contig1690_s_at, Contig2717_s_at, Contig2718_s_at, Contig2720_at和HVS-MEg0015J04f_s_at,上调倍数依次为5.3, 90.5, 4.6, 128和6.5倍。

2.5 其他逆境相关蛋白基因热胁迫前后的表达变化

除热激蛋白和分子伴侣外,大量的与其他逆境相关的基因其表达量也在热胁迫前后发生了明显变化。虽然此类基因的上调和下调数目上没有明显差异(上调25个;下调28个),但其组成却有不同。上调表达的25个基因涉及抗氧化、抗病和细胞调

亡等多个方面。其中有4个谷胱甘肽转移酶基因上调了2—8倍。下调表达的探针中包括抗氧化、抗病、抗干旱脱水、抗低温胁迫等多种抗性基因，其中8个为低温胁迫响应基因。

2.6 信号转导途径中蛋白激酶与磷酸化酶基因热胁迫前后的表达变化

本研究中许多信号传导类基因在热胁迫前后表达量变化明显(表5)，其中与钙信号有关的钙调蛋白、钙依赖而钙调素不依赖的蛋白激酶(CDPK)同源的基因占较大比例(10个)；在信号感受和传递中起作用的受体激酶(RPK)也有6个探针热胁迫前后表达发生变化；4个丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)基因受热胁迫信号调控，表达模式均为下调。

表5 小麦苗期叶片热胁迫诱导的信号转导途径相关基因的功能分类

种类	上调		下调	
	数目	百分率/%	数目	百分率/%
钙调蛋白	4	23.5	2	6.1
CDPK	3	17.6	1	3.0
MAPK			4	12.1
受体激酶	2	11.8	4	12.1
组氨酸激酶			2	6.1
其他蛋白激酶	1	5.9	8	24.2
蛋白磷酸化酶	3	17.6	5	15.1
脂信号	2	11.8	2	6.1
响应调控子			2	6.1
其他	2	11.8	3	9.1
总计	17	100.0	33	100.0

2.7 转录因子相关基因热胁迫前后的表达变化

转录因子在植物逆境响应中起重要作用。本研究发现有42个转录因子基因热胁迫后发生表达变化(表6)，其中两个分别编号为Contig18148_at和Contig23893_at的热激因子(HSF)基因热胁迫后表达水平分别上调了27.9和3.2倍。其他转录因子热胁迫后上调倍数在2.1—3.2之间、下调倍数在2.1—9.8间变化。

2.8 物质运输相关基因热胁迫前后的表达变化

对差异表达探针的分类分析显示，有大量涉及物质运输的基因表现为热胁迫后下调(29个)，而热胁迫上调的基因数目则较少(10个)。下调的相关基因涉及离子运输(9个)、质子运输(2个)、磷转运

表6 小麦苗期叶片热胁迫诱导的转录因子的功能分类

种类	上调		下调	
	数目	百分率/%	数目	百分率/%
HSF	2	9.1	1	5.0
Trihelix	3	13.6		
AP2	2	9.1		
Myb	2	9.1	4	20.0
bHLH			2	10.0
bZIP	2	9.1		
NAC	1	4.5	1	5.0
Dof			1	5.0
Zn	6	27.3	6	30.0
其他	4	18.2	5	25.0
总计	22	100.0	20	100.0

(3个)、糖转运(2个)、氨基酸和蛋白质转运(5个)、胞内转运(2个)和其他类型(6个)多个方面。上调表达的基因则包含离子运输(2个)、跨膜运输(ABC transporter, 2个)、蛋白质转运(2个)和其他转运蛋白(4个)几类基因。

2.9 蛋白代谢相关基因热胁迫前后的表达变化

热胁迫下许多蛋白质合成、降解相关的基因(37个)出现明显的差异表达，说明小麦在热胁迫下可能通过增强蛋白质合成与降解能力的途径来抵抗胁迫。其中热胁迫前后共有13个泛素—蛋白酶体通路相关基因表达发生了变化。上调基因包括3个F-BOX家族蛋白基因，1个泛素基因，1个泛素结合酶基因(ubiquitin-conjugating enzyme, E2)和1个泛素专一性蛋白酶基因(ubiquitin-specific proteases, UBP)。下调基因包括3个泛素结合酶基因(E2)，2个蛋白酶体亚基基因(proteasome subunit)，1个泛素连接酶基因(ubiquitin-ligase enzymes, E3)和1个泛素专一性蛋白酶基因(UBP)。

2.10 差异表达基因的半定量RT-PCR分析

为了验证不同物种间采用芯片进行基因差异表达分析的可行性，利用BLASTN对11个差异表达基因进行同源性搜索，选取与其同源性最高的小麦EST设计引物通过半定量RT-PCR方法进一步验证了小麦热胁迫前后基因的差异表达。在选取的11个基因中，除探针号为Contig5841的EST表达模式与芯片结果不符外(热胁迫后无明显变化)，其他探针的表达模式均与芯片结果一致(表7，图2)。

表7 半定量 RT-PCR 结果与芯片杂交结果的比较

探针号	RT 验证表达模式 (HS/CK)	芯片信号变化 (HS/CK)	芯片 p -value 值
Contig1690	上调	+5.3	0.000438
Contig2442	上调	+18.4	0.000030
Contig5841	无变化	+2.1	0.000865
Contig8305	上调	+2.1	0.002490
Contig9077	上调	+2.8	0.000167
Contig12356	上调	+2.1	0.000027
Contig15148	上调	+2.5	0.000130
Contig16042	上调	+3.0	0.000020
Contig18148	上调	+27.9	0.000438
Contig18218	上调	+2.6	0.000068
Contig23893	上调	+3.2	0.000030

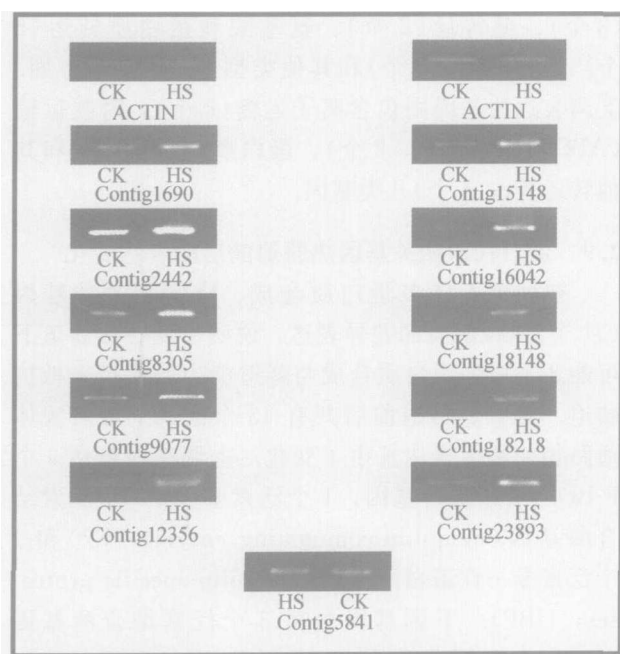


图2 半定量 RT-PCR 电泳扫描图

3 讨论

3.1 利用大麦芯片进行小麦热胁迫前后基因表达谱分析的可行性

近年来,随着分子生物学技术不断发展与完善,出现了众多研究基因差异表达的技术,如 mRNA 差异显示技术(DDRT-PCR)、cDNA 扩增片段长度多态性技术(cDNA-AFLP)等.这些方法都已得到广泛应用,并成功分离了许多差异表达的基因.但是,由于逆境胁迫反应在遗传上与生理上的

复杂性,有必要开展全基因组水平的基因表达分析,而基因芯片可以同时分析多组不同来源 mRNA 的差异表达情况,快速地获得大量基因在 mRNA 水平的表达信息^[14].目前,Affymetrix 公司生产的寡聚核苷酸芯片采用独特的设计,具有可重复,灵敏度高以及准确性好的特点,并已大量用于基因差异表达的研究. Close 等^[15]利用 Affymetrix 大麦基因芯片(Barley1),分别与同一时期、同一生长条件的大麦(*Hordeum vulgare* L.)、小麦(*Triticum aestivum* L.)、燕麦(*Avena sativa* L.)、水稻(*Oryza sativa* L.)、高粱(*Sorghum bicolor* L. Moench)和玉米(*Zea mays* L.)共6种禾本科作物杂交.结果显示,在总共22840个探针中有9972(43.66%)个在大麦中检测到信号,而在其他5种作物中分别检测到5392(23.61%),2645(11.58%),1911(8.37%),1709(7.48%),1281(5.61%)个信号.本研究中利用小麦样品杂交 Barley1 基因芯片,对照组(CK)和热胁迫组(HS)中共有8486个非重复的探针被检测到,占总探针数的37.15%,比 Close 等^[15]的研究结果高出13.54%.而且,本研究中利用大麦芯片进行小麦热胁迫前后基因表达谱分析的结果也与热激反应的特征基本吻合.因此,在小麦基因组信息了解较少的情况下,可以利用大麦芯片分析小麦热胁迫前后的基因差异表达情况,为小麦耐热性的研究提供有价值的信息.

3.2 热激蛋白与热胁迫响应

在分子水平上,热激反应的特点是部分蛋白质的合成受到抑制,瞬时合成热激蛋白(HSP).热激蛋白大多具有分子伴侣的功能,在常温下参与新生肽链的折叠,寡聚蛋白质的组装、解聚以及蛋白质的跨膜运输等代谢过程.热激蛋白在热胁迫下大量合成,并与高温胁迫下变性、失去正常的生理功能的蛋白质结合,促进异常蛋白的降解,并可在胁迫后帮助变性聚集的蛋白恢复有活性的状态,是热胁迫响应最主要的效应因子^[16,17].本实验获得的热胁迫后上调表达热激蛋白几乎涵盖了热激蛋白的各个家族,而且上调表达倍数都很大,其中以小分子热激蛋白的平均上调倍数最大.除分子伴侣类热激蛋白大幅度上调表达外,两类被证实直接参与到蛋白质折叠过程中的热激蛋白——蛋白质二硫键异构酶

(PDI)和肽基脯氨酰顺反异构酶(PPI)的基因也都有很大程度的上调. 蛋白质二硫键异构酶可以通过催化巯基与二硫键的交换反应, 从而催化蛋白质二硫键的形成、还原(断裂)或重排(异构化)^[18], 肽基脯氨酰顺反异构酶负责催化蛋白质分子中某些稳定的反式肽基脯氨酰键, 异构成功能蛋白所必需的顺式构型^[19]. 这两类折叠酶的上调表达可能说明植物细胞在适应热胁迫的过程中不但调动了大量的分子伴侣对蛋白质进行被动的保护, 而且还利用折叠酶对损伤蛋白进行着主动修复, 或者仅仅是由于在热胁迫环境下新生蛋白的正确折叠需要比正常温度下更为大量的折叠酶. 这些发现还有待进一步研究证实.

3.3 泛素—蛋白酶体通路相关基因与热胁迫响应

泛素—蛋白酶体通路(ubiquitin-proteasome pathway)是真核生物细胞蛋白质选择性降解的重要方式之一, 在细胞的生长、发育和对各种逆境的响应、对环境的适应等过程中起着重要的作用^[20,21]. 在泛素—蛋白酶体通路中, 泛素作为一种可重复利用的标签以聚合泛素(polyubiquitin)的形式结合在需要降解的蛋白质上, 标记上泛素的蛋白质被蛋白酶体识别并降解成短肽或氨基酸, 而泛素被释放出来重新利用. 泛素与待降解蛋白的结合是在三类酶分子——E1, E2, E3依次催化下通过一系列依赖ATP的反应完成的. 本实验共有4个E2酶的表达发生了变化, 其中热胁迫后1个上调3个下调. 另外还有1个E3酶下调, 3个F-BOX家族蛋白上调. F-BOX家族蛋白是一类被称作SCF复合体的E3酶的重要组分, 通常介导蛋白质—蛋白质之间的相互作用^[20,22]. 在泛素—蛋白酶体通路中E2酶和E3酶是两类重要的具有底物特异性的酶, 每个E2或E3酶都调控着一种或多种蛋白质的降解. 热胁迫前后多个E2酶和E3酶差异表达预示着植物体可能通过控制具有底物特异性的E2酶和E3酶来调节特定类型蛋白的降解, 从而调整植物的各种代谢途径, 以便适应高温胁迫的环境.

最近的研究表明, 泛素的循环利用机制也对蛋白质的选择性降解起着重要的调控作用^[23,24]. 催化泛素循环利用的关键酶是去泛素化酶(DUB). DUB在泛素—蛋白酶体通路中主要有3个作用: 一是将

新生的聚合泛素切成有活性的单体形式; 二是释放已降解蛋白上的泛素, 使其能够重复利用; 三是释放已经结合了泛素的待降解蛋白, 对泛素介导的蛋白质降解起负调控作用. DUB可分为两类, 一类是UCH(ubiquitin c-terminal hydrolase), 另一类是UBP(ubiquitin-specific protease). 在本实验中热胁迫后有2个UBP基因的表达发生了变化, 一个上调表达另一个下调表达. 相对于UCH, UBP是一个比较大的家族, 在酵母中只有1个UCH而却有16个不同的UBP^[23]. UCH的底物通常为小分子物质, UBP的底物则多为大分子的蛋白质, 因此UBP可能更多的是参与对泛素介导的蛋白质降解的负调控.

由于E2, E3酶和UBP都具有一定的底物特异性, 因此研究热胁迫后差异表达的E2, E3酶和UBP所作用的底物对揭示泛素—蛋白酶体通路在植物应对热胁迫中的作用具有重要意义. 此外, 前人的研究证实, 泛素是一类可以被热胁迫诱导的基因, 且为生物体应对高温等逆境下所必需^[25]. 本实验的结果也证实小麦苗期叶片的泛素基因也是热胁迫后上调表达的. 另外, 对热胁迫前后的基因表达谱分析发现, 蛋白酶体中调节颗粒(RP)的Rpt亚基和催化颗粒(CP)的 β 亚基热胁迫后下调表达. 关于这两个亚基热胁迫后下调可能的原因和具体的机理还不是很清楚, 有待进一步研究.

3.4 参与热胁迫信号转导的蛋白激酶

大量研究表明, 蛋白质的磷酸化与去磷酸化过程在细胞的信号识别与转导中起重要作用, 它是生物体中普遍存在的一种调节机制, 几乎涉及所有的生理和病理过程. 与逆境信号传递关系密切的主要有钙依赖而钙调素不依赖的蛋白激酶(CDPK)途径、丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)级联途径以及受体蛋白激酶(RPK)、核糖体蛋白激酶(ribosomal protein kinase)、转录调控蛋白激酶(transcription regulation protein kinase)等途径^[26,27]. CDPK蛋白是一种钙调控的蛋白激酶, 参与植物对多种逆境的应答反应, 如干旱、高盐胁迫及冷胁迫等^[28-30]. 最近在紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)中发现了一种热胁迫诱导的CDPK基因^[31]. 还有研究表明, CDPK可能直接参与了植物对高温信号的传导^[32]. 孙大业

等^[33]提出植物高温信号传导的模型:高温导致植物细胞膜系统流动性加强和细胞骨架的重组,造成胞外钙离子的涌入,而钙离子的变化激活CDPK蛋白的激酶活性,进一步诱导了MAPK蛋白的表达,MAPK再通过某种未知的步骤将信号传递到细胞核,诱导热激基因的表达。可以看出,CDPK蛋白在细胞高温信号的传导中处于十分关键的位置。本研究中也发现了4个热胁迫前后差异表达的MAPK基因和4个CDPK基因,选取其中两个热胁迫后上调表达的CDPK探针,利用电子克隆方法,获得了它们具有完整ORF的序列,分别命名为*TaCDPK*和*TaPK*。这是小麦中首次发现的热胁迫诱导的CDPK基因,因此,对该基因的进一步研究将具有十分重要的意义。

位于细胞膜上的RPK受体蛋白激酶在信号感受及传递中起作用。它们通过配体结合区感应干旱、高盐、低温、脱落酸以及生长发育等信号,经跨膜区传递给胞质激酶区,再由胞质激酶区通过磷酸化作用将信号向胞内传递^[34]。本研究中有6个受体激酶基因热胁迫前后表达量发生明显变化,其中上调7倍以上的一个受体蛋白激酶(Contig12779_at)富含亮氨酸重复序列(LRR),该序列参与蛋白质-蛋白质间的相互作用,与感受发育和环境胁迫信号有关。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[35,36]中相关基因可被干旱、高盐及低温等胁迫所诱导,本研究发现该激酶可能在高温信号感受和传递中也起作用。至于接受高温信号后是激活有MAP激酶级联反应参与的信号传递途径,还是直接作用于信号传递途径的下游传递体,尚待进一步实验确定。

3.5 热胁迫响应与其他非生物逆境应答机制的关系

植物在受到高温胁迫时产生的应答与在其他逆境条件下的应答有内在的相关性,尤其是居于下游的一些抗逆生理反应可能是相同的。许多研究证据^[37-39]支持这一观点。在本实验中除了热激蛋白相关基因大量上调表达外,各种其他逆境相关蛋白的基因也发生了差异表达。自然界中的不同逆境对植物造成的伤害不尽相同,但某些逆境有时候会对同一代谢途径造成类似的损伤。热胁迫后各种逆境相关蛋白基因的差异表达可能正是这一现象的集中体

现。在这类差异表达的基因中,有4个谷胱甘肽转移酶基因表现为热胁迫后上调。谷胱甘肽转移酶被认为与植物的抗除草剂、抗氧化与耐盐相关^[40,41]。谷胱甘肽转移酶在热胁迫后的上调表达可能与热胁迫对植物造成的氧化损伤有关。因此,参照植物对其他逆境的应答机制,将有助于加快解析耐热性的分子机制。

参 考 文 献

- 1 金之庆,方娟,葛道阔,等. 全球气候变化影响我国冬小麦生产之前瞻. 作物学报, 1994, 20(2): 186-197
- 2 He Z H, Rajalam S. Differential responses of bread wheat characters to high temperature. Euphytica, 1994, 72: 197-203
- 3 Peterson A W. Genotype and environment effects on quality characteristics of hard red winter wheat. Crop Sci, 1992, 32: 98-103
- 4 March L E, Davis D W, Li P H. Selection and inheritance of heat tolerance in the common bean by use of conductivity. Hort Sci, 1985, 110: 680-683
- 5 Porter D R, Nguyen H T. Genetic control of acquired cellular thermotolerance in wheat. Agron Abstracts, ASA, Madison WI. 1989, 95
- 6 Sun Q X, Quick J S. Chromosomal location of genes for heat tolerance in tetraploid wheat. Cereal Res Commu, 1991, 19(4): 443-437
- 7 徐如强,孙其信,张树榛. 普通小麦 Hope 细胞膜热稳定性基因的染色体定位. 遗传, 1996, 18(4): 1-3
- 8 Ottaviano E, Sari-Gorla M, Pé E, et al. Molecular markers (RFLPs and HSPs) for the genetic dissection of thermotolerance in maize. Theor Appl Genet, 1991, 81: 713-719
- 9 Frova C, Sari-Gorla M. Quantitative expression of maize HSPs: Genetic dissection and association with thermotolerance. Theor Appl Genet, 1993, 86: 213-220
- 10 Frova C, Sari-Gorla M. Quantitative trait loci (QTLs) for pollen thermotolerance detected in maize. Mol Genet Genom, 1994, 245: 424-430
- 11 孙其信,高立峰,徐如强. 异源细胞质对小麦耐热性的遗传影响. 北京农业大学学报, 1994, 20(4): 361-367
- 12 Zhang Y, Rouf M A M, Chekhovskiy K, et al. Differential gene expression in *Festuca* under heat stress conditions. J Exp Bot, 2005, 56(413): 897-907
- 13 Lee J H, Schöfl F. An Hsp70 antisense gene affects the expression of HSP70/HSC70, the regulation of HSF, and the acquisition of thermotolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. Mol Genet Genom, 1996, 252: 11-19
- 14 Lockhart D J, Dong H, Byrne M C, et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. Na-

- ture Biotech, 1996, 14(13): 1675—1680
- 15 Close T J, Wanamaker S I, Caldo R A, et al. A new resource for cereal genomics: 22k barley GeneChip comes of age. *Plant Physiol*, 2004, 134: 960—968
 - 16 Karlin S, Brocchieri L. Heat shock protein 70 family: Multiple sequence comparisons, function, and evolution. *J Mol Evol*, 1998, 47: 565—577
 - 17 Key J L, Lin C Y, Ceglaz E, et al. The heat shock response in soybean seedlings. In: Ciferri O, Dure L, eds. *Structure and Function of Plant Genomes*. A 63. NATO ASI ser, 1983, 25—36
 - 18 Freedman R B, Hirst T R, Tuite M F. Protein disulphide isomerase: Building bridges in protein folding. *Trends Biochem Sci*, 1994, 19(8): 331—336
 - 19 Pliyev B K, Gurvits B Y. Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases: Structure and functions. *Biochemistry (Mosc)*, 1999, 64 (7): 738—751
 - 20 Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67(1): 425—479
 - 21 Callis J, Vierstra R D. Protein degradation in signaling. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, 3 (5): 381—386
 - 22 Bai C, Sen P, Hofmann K. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell*, 1996, 86 (2): 263—274
 - 23 Wilkinson K D. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J*, 1997, 11 (14): 1245—1256
 - 24 Chung C H, Baek S H. Deubiquitinating enzymes: Their diversity and emerging roles. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 266(3): 633—640
 - 25 Finley D, Ozkaynak E, Varshavsky A. The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation and other stresses. *Cell*, 1987, 37: 1035—1046
 - 26 刘 强, 张 勇, 陈受宜. 干旱、高盐及低温诱导的植物蛋白激酶基因. *科学通报*, 2000, 45(6): 561—566
 - 27 Bentema S F, Roitingerb E, Anrather D, et al. Phosphoproteomics as a tool to unravel plant regulatory mechanisms. *Physiologia Plantarum*, 2006, 126(1): 110—119
 - 28 Sheen J. Ca²⁺-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science*, 1996, 274: 1900—1902
 - 29 Saijo Y, Hata S, Kyozuka J, et al. Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J*, 2000, 23(3): 319—327
 - 30 Mahajan S, Sopory S K, Tuteja N, et al. Cloning and characterization of CBL-CIPK signaling components from a legume (*Pisum sativum*). *FEBS J*, 2006, 273(5): 907—925
 - 31 Davletova S, Mészáros T, Miskolczi P, et al. Auxin and heat shock activation of a novel member of the calmodulin like domain protein kinase gene family in cultured alfalfa cells. *J Exp Bot*, 2001, 52(355): 215—221
 - 32 Sangwan V, Orvar B, Beyerly J, et al. Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *Plant J*, 2002, 31(5): 628—629
 - 33 Sun D Y, Kaplan F, Lee K J, et al. Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends in Plant Sci*, 2003, 8(4): 179—187
 - 34 Walker J C. Structure and function of the receptor-like kinases of higher plants. *Plant Mol Biology*, 1994, 26: 1599—1609
 - 35 Hong S W, Jon J H, Kwak J M, et al. Identification of a receptor-like kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration high salt and cold treatments in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1997, 113: 1203—1212
 - 36 Tarutani Y, Morimoto T, Sasaki A, et al. Molecular characterization of two highly homologous receptor-like kinase genes, RLK902 and RKL1, in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68: 1935—1941
 - 37 Seki M, Narusaka M, Ishida J, et al. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J*, 2002, 31(3): 279—292
 - 38 Rizhsky L, Liang H, Mittler R. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol*, 2002, 130: 1143—1151
 - 39 Rizhsky L, Liang H, Shuman J, et al. When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol*, 2004, 134: 1683—1696
 - 40 戚元成, 张 慧, 赵彦修. 植物谷胱甘肽转移酶和盐胁迫. *山东师范大学学报*, 2002, 17 (2), 71—75
 - 41 戚元成, 张世敏, 王丽萍, 等. 谷胱甘肽转移酶基因过量表达能加速盐胁迫下转基因拟南芥的生长. *植物生理与分子生物学学报*, 2004, 30(5): 517—522