

doi: 103969/j.issn.0490-6756.2017.03.029

拟南芥 RING finger 结构域 AtHHR1 基因的功能初步研究

赵白芬, 齐辉辉, 李旭锋, 刘志斌

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘要: 为了研究拟南芥基因 *AtHHR1* (编码一个含有 RING finger 结构域的 E3 连接酶) 是否参与热胁迫响应, 构建了 *athhr1/AtHHR1* 互补转基因株系. 对突变体、互补株系及野生型进行热胁迫处理, 发现突变体的萌发率、叶绿素及脯氨酸含量高于野生型, 而互补株系均低于野生型. 通过 real-time PCR 定量检测发现, 热诱导后拟南芥热信号通路中相关热激蛋白基因在突变体中表达比野生型中高. 研究结果初步表明 *AtHHR1* 基因在拟南芥的热胁迫响应中起负调控作用.

关键词: 拟南芥; 热胁迫; *AtHHR1*; 锌指 E3 连接酶

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)02-0393-06

Primary analysis of the function of arabidopsis thaliana RING finger *AtHHR1*

ZHAO Bai-Fen, QI Hui-Hui, LI Xu-Feng, LIU Zhi-Bin

(College of Life Sciences, Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment of MOE, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: *AtHHR1* encodes a RING finger E3 ligase. According to available microarray data, *AtHHR1* is involved in the heat stress response of *Arabidopsis thaliana*. To investigate the role that *AtHHR1* plays during heat stress, three homozygous complementary transgenic lines were constructed. Under the treatment of heat stress, the germination rate, relative chlorophyll and proline contents in mutant plants were higher than those in wild-type, while they were lower in the complementary transgenic plants. The expression levels of several heat-related genes were detected through real-time PCR and the results suggested that those genes were higher in the mutant plants than those in the wild-type. Therefore, the preliminary results indicated that *AtHHR1* acted as a negative regulator of thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*; Heat stress; *AtHHR1*; RING finger E3 ligase

1 引言

植物在生长过程中会受到很多非生物因子的胁迫, 胁迫对植物产生的不利影响会影响植物的生长状况和地域分布以及经济作物的产量^[1]. 其中温

度是影响植物生长发育的主要环境因子. 随着全球气温不断升高, 高温胁迫对植物产量和品质的影响日益显著. 高温胁迫通过热信号通路传递到细胞内, 使得植物体内酶活性发生变化, 进而影响重要的生理生化反应及热激基因的表达和调控. 高温对

收稿日期: 2016-01-20

基金项目: 国家自然科学基金(31300996); 973 计划(2015CB755702)

作者简介: 赵白芬(1992-), 女, 湖南娄底人, 硕士研究生, 研究方向为植物遗传与分子生物学. E-mail: zbf92425@163.com

通讯作者: 刘志斌. E-mail: liuzhibin@scu.edu.cn

植物生长造成的影响以及植物对高温产生的反应是植物抗逆性研究的重要课题。

高温会导致所合成的蛋白质错折叠以及现有的蛋白变性^[2],从而被细胞内泛素-蛋白酶体途径识别并降解.该途径是最先发现也是较普遍的一种内源蛋白降解方式,需要降解的蛋白先被泛素化修饰,然后被蛋白酶体降解.其中泛素化修饰涉及泛素激活酶 E1、泛素结合酶 E2 和泛素连接酶 E3 的一系列反应.在这个过程中 E3 连接酶发挥着至关重要的作用,对泛素系统的大量研究集中在 E3 酶上.泛素连接酶 3 分为 HECT (homologous to E6APC terminus) 家族和 RING-finger 家族.

Ring finger 蛋白是锌指蛋白类中较为庞大的一个蛋白家族,成为了拟南芥第三大蛋白家族,主要通过泛素化途径来参与到植物细胞的生理生化过程中. Ring finger 蛋白在所有真核生物中普遍存在,但是其具体功能还不是很清楚,最典型的结构特点是序列内包含有环指结构域(RING finger domain).该结构参与到多种信号转导途径和调控途径中^[3]. Ring finger 蛋白分为 RING-H2 (C3H2C3) 和 RING-HC (C3HC4) 两个亚类^[4]. 两者区别在于共有序列中第 5 配位是 His 或 Cys. 目前在植物中分离得到了很多 Ring finger 蛋白^[5].

本实验室先前的工作已证实 AtHHR1 是 C3HC4 型 RING Finger 家族蛋白,具有 1 个 RING 结构和体外 E3 连接酶活性,并且在热胁迫条件下该基因表达量有所升高^[6]. 推测该基因可能在热胁迫相关过程中起作用. 本研究中以拟南芥突变体 *athhr1* 为材料,对其 3 个独立的 *AtHHR1* 互补株系 C-1, C-2 和 C-3 进行了鉴定,同时检测了热胁迫下突变体、互补株系与野生型的萌发率情况和两个生理指标的变化,并对热胁迫下野生型和突变体中部分热激蛋白基因的表达情况进行了分析,初步探索了 *AtHHR1* 基因在热胁迫响应中的作用,为进一步研究该基因的功能提供了理论依据.

2 材料与方法

2.1 材料

野生型拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 哥伦比亚生态型 (Columbia) 植株由本实验室保存, HHR1 基因 T-DNA 插入突变体 SALK_150860 种子购于 ABRC, 突变体的背景为 Columbia 生态型. 植物总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒和 qPCR 试剂盒购自 TIANGEN 公司.

2.2 方法

2.2.1 蛋白进化树构建 在 NCBI 中查找不同物种中与 AtHHR1 同源性较高的蛋白氨基酸序列,并分析它们的相似性,在 MEGA6 软件中使用 Clustal W 对所选的氨基酸序列进行比对,采用邻接法 (Neighbor-Joining) 构建蛋白系统进化树.

2.2.2 互补株系的鉴定 按照 TIANGEN RNA 提取试剂盒说明提取植物材料 RNA, 所提的 RNA 按照 TAKARA Prime Script™ RT reagent Kit-with gDNA Eraser 反转录试剂盒说明反转录为 cDNA, 用野生型 cDNA 作为负对照, 用内参基因 Actin2 作为对照基因, 进行 PCR 反应, 反应程序为: 94℃ 4min; 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 35s, 30 个循环; 72℃ 10min.

2.2.3 热处理下萌发率表型实验 将突变体、野生型, 及互补株系拟南芥种子经 NaClO 溶液消毒后置于 1/2MS 培养基中, 每个株系点种约 50 颗, 置于 4℃ 冰箱春化 2d 打破种子休眠, 移入 22℃ 长日照条件的组培室, 6d 后转入 38℃ 电烘箱进行热诱导 2h, 随后移到 22℃ 组培室 2h, 再转入 45℃ 电烘箱进行热胁迫处理 2h, 最后移到 22℃ 组培室生长, 4d 后对其萌发率进行统计, 检测热胁迫对以上株系种子萌发的影响, 重复实验 3 次.

2.2.4 热处理下叶绿素与脯氨酸含量的测定 将突变体、野生型及互补株系的种子播于土中培养 10 天测定其叶绿素和脯氨酸含量. 叶绿素含量测定采用 95% 乙醇提取法, 脯氨酸含量测定采用茚三酮法. 每个株系取 10 株来进行测定, 每项测定重复 3 次, 取结果平均值.

2.2.5 野生型和突变体中相关热激蛋白基因的表达 将生长 7d 的野生型和突变体幼苗进行高温处理, 即依次 38℃ 2h, 22℃ 2h, 45℃ 2h 进行获得性耐热实验, 提取野生型和突变体的幼苗 mRNA 并反转为 cDNA, Real-time PCR 分析相关热激蛋白基因在野生型和突变体中表达量的差异, 重复实验 3 次.

3 结果分析

3.1 AtHHR1 蛋白系统进化分析

AtHHR1 基因位于拟南芥第 2 号染色体上, 利用 OR Finder 分析, 该基因包含一个完整的阅读框, 编码 198 个氨基酸, 相对分子质量为 22.593kD. 根据先前的研究, *AtHHR1* 是 C3H2C3 型 RING Finger 家族蛋白, 含有 1 个 RING finger 结构. 本研究将该基因所编码的氨基酸序列与其它物种中同源性较

高的 7 个蛋白进行了比对, 并建立了系统进化树。如图 1 所示, AtHHR1 在亚麻荠、玉山筷子芥、荠菜、诸

葛菜、欧洲油菜等植物中也存在同源性较高的蛋白, 为后续分析该蛋白的功能提供了一些参考依据。

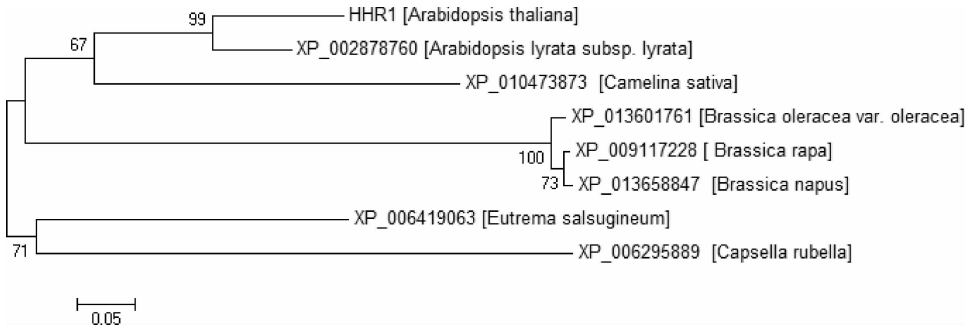


图 1 AtHHR1 同源蛋白进化树

Fig. 1 Phylogenetic Analysis of ATHHR1 homologs

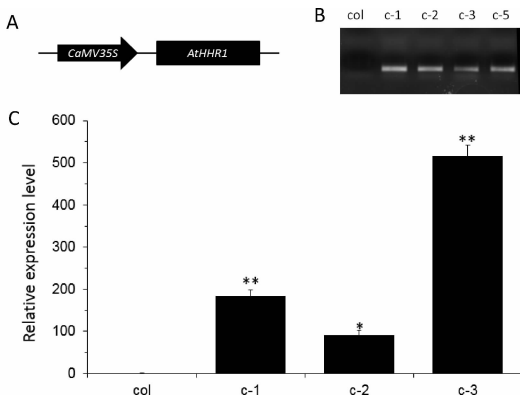


图 2 互补转基因株系的鉴定

A. 互补株系载体示意图, AtHHR1 由 35S 启动子驱动。B. DNA 水平上 PCR 检测 AtHHR1 在野生型和互补株系中的表达。C. Real-time PCR 检测 AtHHR1 在野生型和互补株系中的相对表达水平。柱形图上的 * 号表示差异显著 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)。

Fig. 2 Identification of the athhr1/ATHHR1 complementary lines.

A. Schematic structure of the complementary vector, AtHHR1 was drove by 35S promoter. B. PCR analysis of AtHHR1 in wild-type and complementary plants. C. Real-time PCR analysis of AtHHR1 in wild-type and complementary plants. Asterisks above each bar indicate significant differences (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$) according to Student's t-test compared with the wild-type plants.

3.2 athhr1/AtHHR1 互补株系鉴定

用 35S 启动子构建表达载体, 如图 2A 所示。用农杆菌侵染 *athhr1* 突变体植株的花序, 利用潮霉素抗性筛选出阳性苗。提取野生型和互补株系的基因组 DNA, 用 PCR 进行扩增, 扩增条带如图 2B, 四个互补株系都扩增出了大小为 597bp 的单一一条带, 而野生型没有明显条带, 电泳结果表明 *AtHHR1* 基因成功整合进野生型基因组中。以野生型植株为对照, Actin2 为内参基因, 对互补株系进行 Real-time PCR, 结果如图 2C 显示筛选出的三个 T_3 代互补株系 C-1, C-2, C-3, 其 *AtHHR1* 基因的表达

量与野生型相比分别提高至 184, 92 和 517 倍。Real-time PCR 的结果均说明所获得的互补株系中该基因能够表达, 且在一定程度上过量表达。

3.3 热处理下的萌发率表型

将野生型, 突变体及三个互补转基因株系的种子播于 1/2 MS 培养基上, 生长一周后进行热处理, 之后对萌发率进行了统计, 观察热胁迫下各个株系之间萌发率的差异(如图 3A, B)。没有经过热处理的种子, 各株系萌发率几乎相同, 均为 98% 以上。热处理后, 种子的萌发受到明显的抑制, 野生型萌发率为 60%, 突变体的萌发率高达 88%, 互补株系 C-1, C-2, C-3 的萌发率则分别为 41%, 38%, 45%。可以看出相对于野生型, 突变体增强了对热的耐受性, 而互补株系对热的敏感性最高。

3.4 热处理下叶绿素与脯氨酸含量的变化

植物响应热胁迫的过程中, 叶绿素是植物生长代谢所必需的, 而脯氨酸则是重要的调节物质。为探究热胁迫处理下 *AtHHR1* 的突变体及互补株系是否发生渗透物质累积的变化, 本文检测了热处理下野生型, 突变体 *athhr1* 及互补株系 C-1, C-2, C-3 的叶绿素与脯氨酸含量, 如图所示。由图可知, 叶绿素含量在不同株系中的变化趋势是类似的, 与未处理之前相比, 野生型叶绿素含量降低 37.0%, 突变体降低了 32.7%, 3 个互补株系分别降低了 48.6%, 53.7%, 52.1%。在正常条件下, 突变体, 野生型和互补株系的脯氨酸含量都比较低, 且无明显差异。在热胁迫处理下, 突变体, 野生型和互补株系的脯氨酸含量均升高, 且突变体增加量较高, 而互补株系的增加较少, 野生型居中。野生型脯氨酸含量升高了 3.37 倍, 突变体升高了 4.49 倍, 而三个互补株系分别升高了 2.51, 2.47, 2.62 倍。

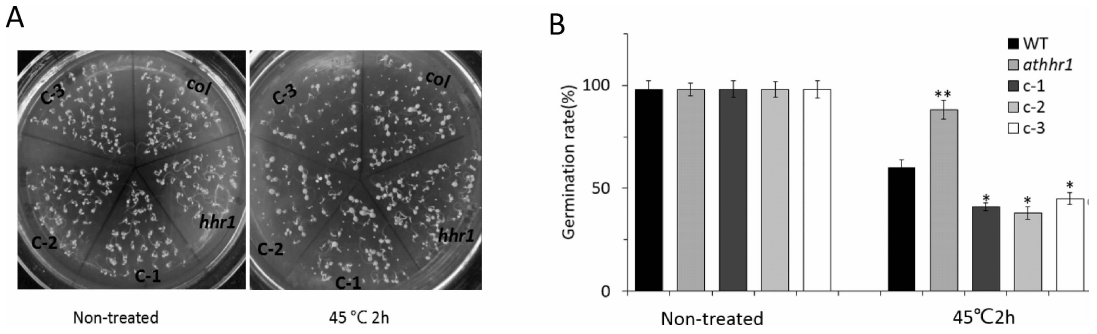


图 3 野生型、突变体及互补株系在热处理下种子萌发表型

A. 野生型、突变体及三个互补转基因株系在萌发期对热的敏感表现。B. 各株系种子在未处理和 45 ° 热处理下在 1/2 MS 培养基上的萌发率统计。柱形图上的 * 号表示差异显著 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)。

Fig. 3 Phenotypes of wild-type, mutant and 3 transgenic lines in response to heat during seed germination.

1. Heat Sensitivity of the wild-type (WT), athhr1 and athhr1/ATHHR1 during the germination stage. B. Percentage of germinating seeds grown on 1/2 MS medium after heat-treated or not. Asterisks above each bar indicate significant differences (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$) according to Student's t-test compared with the wild-type plants.

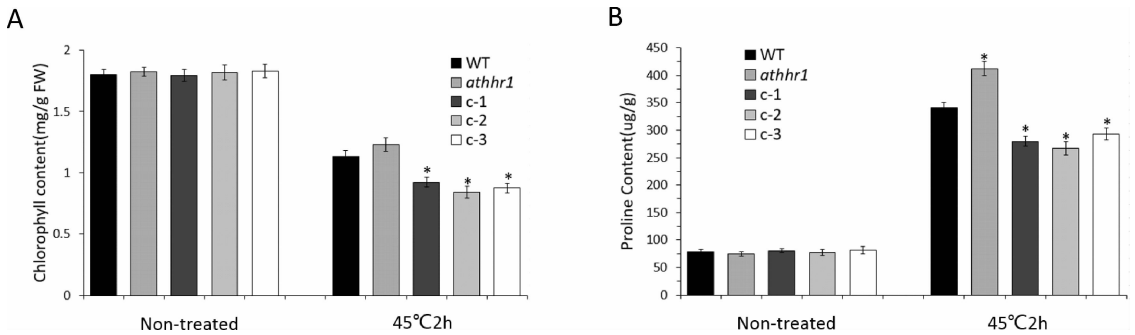


图 4 野生型、突变体及互补株系在热处理下叶绿素和脯氨酸的含量

A. 在热处理和无处理对照下野生型、突变体及互补转基因幼苗的叶绿素含量。

B. 在热处理和无处理对照下野生型、突变体及互补转基因幼苗的脯氨酸含量。柱形图上的 * 号表示差异显著 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)。

Fig. 4 Chlorophyll and Proline contents of seedlings of wild-type, mutant and 3 transgenic lines under heat treatments.

A. Chlorophyll contents of seedlings of wild-type, athhr1 and three complementary plants with or without heat treatment.

B. Proline contents of seedlings of wild-type, athhr1 and three complementary plants with or without heat treatment. Asterisks above each bar indicate significant differences (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$) according to Student's t-test compared with the wild-type plants.

3.5 拟南芥热信号通路相关热激蛋白基因的定量分析结果

为探究热胁迫处理下野生型和 *AtHHR1* 的突变体中热激蛋白基因的表达情况,将生长 7d 的野生型和突变体幼苗进行高温处理,对热信号通路中 *Hsp 15.7*, *Hsp 23.6*, *Hsp 70*, *Hsp 101* 等基因的表达情况进行了检测。结果表明,热处理之前,这些基因中野生型和突变体株系中的表达量无明显差异。而热处理之后,这些基因的表达量中野生型和突变体之间存在较明显的差异, *Hsp 15.7*, *Hsp 23.6*, *Hsp 70*, *Hsp 101* 表达量分别升高了 5.69、32.13、11.89、19.09 倍,而野生型分别只升高了 4.23、18.33、10.12、7.14 倍。

4 讨论

本研究为探索 E3 连接酶基因 *HHR1* 在耐热胁迫

迫应答中所起的作用,在实验室先前研究的基础上,构建了表达载体(图 2A),用农杆菌侵染 *athhr1* 突变体植株的花序,利用抗性筛选到阳性植株,并对 *athhr1/ATHHR1* 互补株系进行了分子水平的鉴定(图 2B)。Real-time PCR 结果显示,互补株系 *HHR1* 基因的表达量远高于野生型(图 2C),从而证明目的基因被成功转入了互补株系中,并且其表达量超过野生型的表达水平。在热处理下,野生型、突变体和互补株系种子的萌发率表现出较大的差异,与野生型相比,突变体的萌发率更高,而互补株系的萌发率较低,表现出对热高度敏感的表现(图 3)。

同时,本文进行了 *athhr1* 突变体和 *athhr1/ATHHR1* 互补株系的生理指标测定。叶绿素含量是植物耐热性的一项指标,在外界温度较高时,细胞内色素系统遭到破坏,叶绿素含量下降^[7]。在对

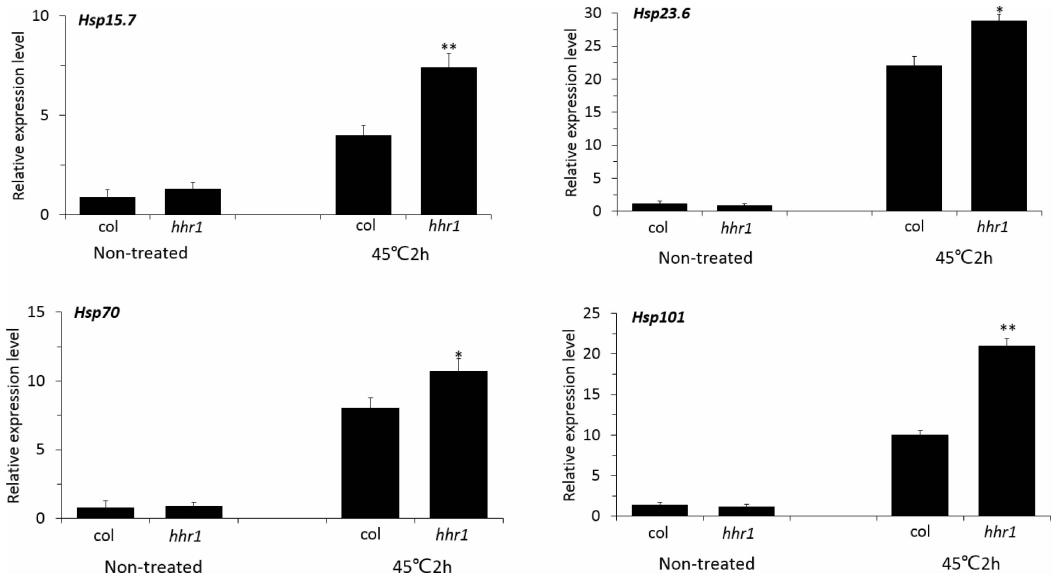


图 5 热处理下, 相关热激蛋白基因表达量的变化

柱形图上的 * 号表示差异显著 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)

Fig. 5 qRT-PCR analysis of HSPs between wild type and athhr1 plants under heat stress. Asterisks above each bar indicate significant differences (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$) according to Student's t-test compared with the wild-type plants.

热处理后叶绿素含量的测定结果显示, 与野生型相比, 突变体的叶绿素含量更高, 而 3 个互补株系的叶绿素含量较低(图 4A). 在逆境胁迫下, 脯氨酸含量的升高对植物抗逆和维持自身的稳态具有重要的作用^[8]. 在热处理下, 野生型, 突变体和互补株系的脯氨酸含量和未处理相比均有上升, 并且在热处理后突变体的脯氨酸含量高于野生型, 互补株系的脯氨酸含量则低于野生型(图 4B). 检测结果说明突变体抵抗逆境的能力更强, 而 *athhr1*/*AtHHR1* 互补株系对热胁迫则更为敏感, 从而暗示了该基因的功能缺失增强了植物对热的耐受性, 而互补株系经过恢复该基因的表达水平后, 使得植物表现出对热的敏感性, 因此推断 *AtHHR1* 是参与到植物耐热胁迫响应过程中的负调控基因.

许多研究结果表明, 在热处理下, 与热胁迫应答相关的基因的表达量通常会上升, 实验室先前的研究表明 *AtHHR1* 在热胁迫条件下表达量有所升高, 和这是一致的, 猜想拟南芥受到热胁迫之后, 作为 E3 连接酶的 *AtHHR1* 基因表达量升高, 继而促进了相关的正调控因子的降解, 从而起到负调控作用. 在很多研究中有相似的现象, 例如 Ring 型 E3 连接酶 *DRIP1* 和 *DRIP2* 通过泛素化降解 DREB2A 蛋白从而负调控拟南芥的干旱胁迫应答^[9]. 编码 Ring 型蛋白的 *HOS1* 基因在拟南芥受到冷胁迫的时候表达量升高, 并且负调控 CBF 的转录水平, 在冷胁迫信号转导中发挥了负调控作用^[10]. 编码 NAC 蛋白的 *ATAF1* 基因在拟南芥受

到干旱胁迫时表达升高, 作为转录调节子负调控拟南芥干旱胁迫应答中的基因表达^[11].

此外, 本文测定了野生型和突变体在热处理后, 热信号通路中部分热激蛋白基因的表达量, 发现热处理后, 相对于野生型, 所测热激蛋白的表达量均有所提高(图 5). 表明 *HHR1* 基因可能在热信号通路中通过对热激蛋白产生影响从而发挥作用. 对模式植物拟南芥的研究, 发现植物中存在大量响应热胁迫的基因, 并且大多数编码热激蛋白(HSPs)^[12], 高温胁迫下, 热激基因迅速地高水平表达, 使得 HSPs 合成迅速增加^[13]. HSPs 通过两方面来减少热胁迫对细胞造成的损害, 一方面是抵制蛋白变性和聚集, 来保证高温胁迫下许多分子蛋白质的正确功能; 另一方面包括泛蛋白和某些蛋白酶在内的 HSPs 诱导非天然蛋白的降解^[14]. 所以热激蛋白表达升高会增加植物对热的耐受力, 从而更好地适应高温环境^[15].

目前已有研究证实 Ring-finger 型 E3 连接酶参与到植物温度胁迫应答^[16]. 如将 Ring-finger 型 E3 连接酶 *OsHCI1* 在拟南芥中异源过表达发现, 能通过增强获得性耐热性而提高拟南芥的生存率^[17]. *AtHHR3* 的过量表达降低了植株对温度的耐受, 但是具有 E3 连接酶活性的 Ring finger 蛋白和底物蛋白是通过何种机制在热胁迫中发挥作用仍不清楚^[19]. 本文对该基因的底物蛋白以及其响应热胁迫的具体机制还有待后续深入的研究.

参考文献:

- [1] Porter J R. Rising temperatures are likely to reduce crop yields[J]. *Nature*, 2005, 436(7048): 174.
- [2] Youngt E, Ling J, Geisler-Lee C J, *et al* . Developmental and thermal regulation of the maize heat shock protein, HSP101[J]. *Plant Physiology*, 2001, 127: 777.
- [3] Zeba N, Isbat M, Kwon N J, *et al* . Heat-inducible C3HC4 type RING zinc finger protein gene from *Capsicum annuum* enhances growth of transgenic tobacco[J]. *Planta*, 2009, 229(4): 861.
- [4] Kam J, Gresshoff P, Shorter R, *et al* . Expression analysis of RING zinc finger genes from *Triticum aestivum* and identification of TaRZF70 that contains four RING-H2 domains and differentially responds to water deficit between leaf and root[J]. *Plant Sci*, 2007, 173(6): 650.
- [5] Ryu M Y, Cho S K, Kim W T. The Arabidopsis C3H2C3-Type RING E3 ubiquitin ligase AtAIRP1 is a positive regulator of an ABA-dependent response to drought stress [J]. *Plant Physiol*, 2010, 154: 1983.
- [6] 杨虹伟, 翟先芝, 刘志斌, 等. 两个高度同源的 RING 结构域蛋白功能初步研究[J]. *中国农业科技导报*, 2013, 15: 101.
- [7] Hoshida H, Tanaka Y, Hibino T, *et al* . Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that over express chloroplast glutaminesynthetase[J]. *Plant Mol*, 2000, 43 (1): 103.
- [8] Liu K, Wang L, Xu Y, *et al* . Overexpression of OsCOIN, a putative cold inducible zinc finger protein, increased tolerance to chilling, salt and drought, and enhanced proline level in rice [J]. *Planta*, 2007, 226(4): 1008.
- [9] Qin F, Sakuma Y, Tran L S P, *et al* . Arabidopsis DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression [J]. *The Plant Cell*, 2008, 20: 1693.
- [10] Lee H, Xiong L, Gong Z, *et al* . The Arabidopsis HOS1 gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning [J]. *Genes Development*, 2001, 15: 912.
- [11] Lu P L, Chen N Z, An R, *et al* . A novel drought-inducible gene, ATAF1, encodes a NAC family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive genes in Arabidopsis [J]. *Plant Molecu Biology*, 2007, 63, (2): 289.
- [12] Busch W, Wunderlich M, Schöfl F. Identification of novel heat shock factor-dependent genes and biochemical pathways in *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 2005, 41(1): 1.
- [13] Yoshida T, Sakuma Y, Todaka D. Functional analysis of an Arabidopsis heat-shock transcription factor HsfA3 in the transcriptional cascade downstream of the DREB2A stress-regulatory system [J]. *Biophys Res Commun*, 2008, 368(3): 515.
- [14] Ikeda M, Mitsuda N, Ohme-Takagi M. Arabidopsis HsfB1 and HsfB2b Act as Repressors of the Expression of Heat-Inducible Hsfs But Positively [J]. *Plant Physiology*, 2011, 157: 1243.
- [15] Vierling E. The roles of heat shock proteins in plants [J]. *Annu Rev Plant Mol Biol*, 1991, 42: 579.
- [16] Lyzenga W J, Stone S I. Abiotic stress tolerance mediated by protein ubiquitination [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(2): 599.
- [17] Lim SD, Cho HY, Park YC, *et al* . The rice RING finger E3 ligase, OsHCI1, drives nuclear export of multiple substrate proteins and its heterogeneous overexpression enhances acquired thermotolerance [J]. *J Exp Bot*, 2013, 64(10): 2899.
- [18] 齐辉辉, 蔡潇潇, 杨虹伟, 等. 拟南芥 AtHHR3 响应热胁迫应答的初步分析 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2016, 53: 1140.
- [19] Lee J H, Kim W T. Regulation of abiotic stress signal transduction by E3 ubiquitin ligases in Arabidopsis [J]. *Mol Cell*, 2011, 31: 202.