

## 玉米热激转录因子基因(*ZmHsf06*)的克隆、表达和定位分析

李慧聪 李国良 郭秀林\*

河北省农林科学院 遗传生理研究所/河北省植物转基因中心重点实验室, 石家庄 050051

\*通讯作者, myhf2002@163.com

**摘要** 热激转录因子(heat shock transcription factors, Hsfs)在植物抵御热胁迫及其他抗逆反应过程中起重要调控作用, 之前的研究主要来自模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和番茄(*Lycopersicon esculentum*), 在玉米(*Zea mays*)中研究尚少。本研究通过同源基因克隆的方法, 从42 °C热胁迫1 h的玉米幼叶中克隆了玉米热激转录因子基因 *ZmHsf06*(GenBank 登录号: GRMZM2G115456\_T01), 并对其在玉米不同器官中的表达水平及亚细胞定位进行了分析。结果显示, *ZmHsf06* 编码序列全长1 584 bp, 编码527个氨基酸, 包含典型的Hsf家族DNA结合结构域。序列分析表明, 该蛋白含有核定位信号序列KKRR, 核输出信号序列IGDLTEQM和序列为DSFWEQFL的AHA(aromatic, large hydrophobic and acidic amino residues)激活结构域。正常生长条件下, *ZmHsf06*在玉米幼苗的根系、茎和叶片以及开花期的功能叶、幼穗、幼胚和花粉中均有不同程度的表达。幼苗期根中的表达量相对较高; 开花期在花粉中表达最高, 功能叶中最低。42 °C热胁迫、外源脱落酸(abscisic acid, ABA)和盐胁迫处理均能上调*ZmHsf06*的表达。通过在洋葱(*Allium cepa* L.)内表皮瞬时表达融合蛋白发现, 正常条件下*ZmHsf06*定位在细胞核, 37 °C热激后也只在细胞核中观察到GFP荧光。推测玉米*ZmHsf06*可能在转录水平上介导玉米花粉发育, 参与了对多种逆境胁迫的调控过程, 并且在细胞核内行使上述功能。本研究为全面克隆和了解玉米热激转录因子家族基因, 并进一步阐述其生物学功能提供理论依据。

**关键词** 玉米, *ZmHsf06*, 热激转录因子, 逆境胁迫, 花粉发育

## Cloning, Expression Characteristics and Subcellular Location of Heat Shock Transcription Factor Gene (*ZmHsf06*) in *Zea mays*

LI Hui-Cong LI Guo-Liang GUO Xiu-Lin\*

Plant Genetic Engineering Center of Hebei Province, Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China

\* Corresponding author, myhf2002@163.com

**Abstract** Heat shock transcription factors (Hsfs) widely exist in plants and play a key role under extreme environmental conditions, especially under heat shock stress. Most researches focused on model plants such as *Arabidopsis* and tomato (*Lycopersicon esculentum*). There were few reports about maize Hsfs so far. In this study, a *Hsf* gene, named *ZmHsf06* (GenBank accession: GRMZM2G115456\_T01), was cloned from maize (*Zea mays*) young leaves treated by heat shock at 42 °C for 1 h using homologous cloning methods. The patterns of *ZmHsf06* expression level in different organs and its subcellular location were analyzed. Sequence analysis showed that the coding sequences (CDS) of *ZmHsf06* was 1 584 bp encoding a protein of 527 amino acids. *ZmHsf06* contained not only the most conserved and typical DNA-binding domain (DBD) of Hsf

family, but also other functional domains such as a nuclear localization signal (NLS) KKRR peptide, a nuclear export signal (NES) IGDLTEQM peptide and an aromatic, large hydrophobic and acidic amino residues (AHA) DSFWEQFL peptide. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) analysis showed that under normal growth conditions, *ZmHsf06* expressed in roots, stems and leaves of maize seedlings with the highest expression level in roots, and also in functional leaves, ears, immature embryo and pollen at anther period with the highest expression level in pollen and the lowest in leaves. The expression level of *ZmHsf06* was up-regulated by 42 °C heat shock, abscisic acid(ABA) and salt stress, respectively. In details, under heat shock of 42 °C, the highest expression level of *ZmHsf06* in roots was 16 folds of that in leaves, and it appeared later than in leaves. While treated with ABA, the highest expression level in leaves was 2 folds of that in roots, and it appeared later than in roots. Under salt stress, the expression levels of *ZmHsf06* in leaves and roots were increased significantly and shared the similar patterns. Based on transient expression assay using onion (*Allium cepa* L.) epidermis, it was found that the *ZmHsf06* was located in nucleus specifically both under normal condition and heat shock at 37 °C within 1 h. It suggested that *ZmHsf06* probably participates in signal transduction process of pollen development and responses to abiotic stresses at transcription level, and functions in nucleus. The results of this work provide basic data for isolating and characterizing more *Hsfs* in maize, as well as exploring their biological functions in abiotic stresses.

**Keywords** Maize, *ZmHsf06*, Heat shock transcription factor, Abiotic stress, Pollen development

热激反应是真核生物应对温度升高的一种普遍生物学反应,通过热激蛋白的表达得以实现。热激转录因子(heat shock transcription factor, Hsf)是调控热激蛋白基因表达的中心环节(Agashe, Hartl, 2000; Ellis et al., 2000; Jolly, Morimoto, 2000)。热激转录因子通过结合热激蛋白基因启动子区的热激元件(heat shock elements, HSE)实现对热激蛋白基因的表达调控(Nover et al., 1996; Schöffl et al., 1998; Nover et al., 2001; Lee et al., 1995),因此在传递逆境信号以及提高植物抗逆性方面起重要作用(Mishra et al., 2002; Nishizawa et al., 2006; Charng et al., 2007; Yokotani et al., 2008)。

热激转录因子在植物中普遍存在。首个植物热激转录因子基因从番茄(*Lycopersicon esculentum*)中被克隆(Scharf et al., 1990),随后在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、大豆(*Glycine max*)、玉米(*Zea mays*)、豌豆(*Pisum sativum* L.)、向日葵(*Helianthus annuus* L.)、水稻(*Oryza sativa*)及小麦(*Triticum aestivum* L.)等作物中都发现 *Hsf*成员(Hübel, Schöffl, 1994; Czarnecka-Verner et al., 1995; Gagliardi et al., 1995; Aranda et al., 1999; Almoguera et al., 2002; Yamanouchi et al., 2002; Shim et al., 2009; Chauhan et al., 2013)。与其他生物相比,植物 *Hsf*属于多基因家族,模式植物 *Hsf*的研究较为深入。研究表明,组成型表达的番茄热激转录因子基因 *LpHsfA1*在植

物体应对热胁迫过程中起主要调控作用,并调节其他热激转录因子基因如 *LpHsfA2*和 *LpHsfB1*的表达(Mishra et al., 2002)。*LpHsfA2*是强诱导型Hsf,虽然含有核定位信号域,但是只有在和 *LpHsfA1*结合形成异源寡聚体后才从细胞质进入到细胞核(Scharf et al., 1998; Heerklotz et al., 2001)。利用突变体研究发现,拟南芥热激转录因子 *AtHsfA1a*和 *AtHsfA1b*参与调控热激反应早期热激基因的表达(Lohmann et al., 2004), *AtHsfA1a*、*AtHsfA1b*和 *AtHsfA1d*在热激反应中起主要调控作用(Liu et al., 2011)。*AtHsfA2*是受热激诱导表达最强的热激转录因子(Busch et al., 2005),与 *AtHsfA1*在热激反应中起重要调控作用(Schramm et al., 2006; Liu, Charng, 2013)。*AtHsfA1d*和 *AtHsfA1e*参与 *AtHsfA2*转录水平上的调控,在应对环境胁迫过程中作为热激转录因子信号网络的关键调控因子发挥作用(Nishizawa-Yoko et al., 2011)。

全基因组分析表明,拟南芥中含有22个 *Hsf*基因,水稻中有25个(Guo et al., 2008)。Xue等(2014)通过生物信息学和系统发育学分析发现小麦中有56个 *Hsf*基因。早在1995年, Gagliardi等(1995)报道玉米花粉发育的不同时期至少有3个 *Hsf*基因表达,其中1个组成型表达,另外2个在营养器官中表达受热胁迫诱导,而在发育后期花粉中的表达不受热诱导,说明 *Hsf*基因在体细胞和配子体中的调控

途径存在着差异。Lin等(2011)通过对玉米全序列电子表达谱的分析发现,玉米中至少有25个Hsf基因,这些基因在玉米的不同组织器官中呈现不同表达模式,但是对这些基因的序列及其生物学特性和功能没有进一步报道,仅限于通过同源比对和电子克隆等方法在全基因组水平上进行基因家族的扫描,尚需要更多的实验证据来验证其所得的结果。

本实验室在前期获得玉米*ZmHsf-like*片段的基础上(Li et al., 2014),通过同源克隆方法从玉米幼叶中克隆到一个Hsf基因,通过分析该序列的结构特性并与Lin等(2011)预测的25个玉米热激转录因子比对,发现该基因与*ZmHsf06*(GenBank登录号:GRMZM2G115456\_T01)相同。为此,本研究在首次获得*ZmHsf06*完整开放阅读框的基础上,从转录水平对玉米不同发育期各器官中*ZmHsf06*的表达水平进行了定量分析,同时研究了多种逆境胁迫因子对该基因表达的影响,并对正常及热激条件下该基因编码的蛋白质进行了亚细胞定位。本研究为进一步克隆玉米热激转录因子家族其他基因并全面阐述其生物学功能提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料培养

**幼苗培养:**选取玉米(*Zea mays*)自交系H21种子(河北省农林科学院遗传生理研究所提供),表面消毒后用自来水反复冲洗干净,浸泡12 h后播种至Hoagland营养液中,置于28 °C培养箱中暗培养。待玉米长到两叶一心期,进行胁迫处理。

**田间种植:**选取玉米自交系H21种子,于2013年5月上旬大田穴播,常规种植。于8月上旬开花盛期,剪取功能叶、雌穗和幼胚,并收集花粉,液氮速冻后提取总RNA。

### 1.2 幼苗胁迫处理

选取生长一致的两叶一心期玉米幼苗,分别进行如下处理:(1)将幼苗连同营养液一起移入42 °C培养箱中进行热胁迫,处理时间分别为10、20、30、40、50、60、80、120和240 min;(2)将幼苗移入含200 μmol/L ABA(Sigma公司,美国)的Hoagland溶液中,处理时间分别为2、4、6、12、24、30和36 h;(3)将幼苗移入含250 mmol/L NaCl的Hoagland溶液中进行盐胁迫,处理时间分别为2、4、6、12、24、30和36

h。分别于处理后不同时间点剪取第二展开叶、茎和根系,液氮速冻后提取总RNA。以28 °C正常生长的幼苗为对照。

### 1.3 基因克隆

采用RNArose Reagent Systems(上海华舜生物工程公司)提取总RNA,用DNase I (TaKaRa, 大连)处理总RNA以除去残留的基因组DNA。取1 μg纯化的总RNA,利用反转录试剂盒(Invitrogen, 美国)合成cDNA第一链。通过NanoDrop ND-2000分光光度计(Thermo Scientific, 美国)检测RNA质量。

通过NCBI网站(www.ncbi.nlm.nih.gov)分析可能的玉米Hsf基因序列发现,功能未知序列(GenBank登录号:NM001147526)编码的氨基酸序列包含Hsf家族结构特征,即DNA结合结构域。依该序列设计特异性引物:

正向引物:5'-CGTGAGGCAAGTGCTTAGTGG-3';

反向引物:5'-CTACAGCCCATTCCCTGAGTCGCG-3'。

利用高保真酶pyrobest(TaKaRa, 大连)进行PCR扩增。PCR反应体系(25 μL):10×pyrobest buffer 2.5 μL、dNTP mixture (2.5 mmol/L) 2 μL、1st strand cDNA 2 μL、20 μmol/L forward primer 0.25 μL、20 μmol/L reverse primer 0.25 μL、pyrobest DNA polymerase 0.25 μL和ddH<sub>2</sub>O 17.75 μL。反应程序:98 °C 10 s, 55 °C 5 s, 72 °C 2 min, 30个循环。扩增产物连接T载体(pEasy-blunt simple cloning kit, TransGen Biotech, 北京)后送上海生工生物工程技术有限公司测序。基因结构通过NCBI网站分析,蛋白质核定位和核输出信号分别采用NucPred(Brameier et al., 2007)和NetNES(La Cour et al., 2004)软件进行分析。

### 1.4 实时荧光定量PCR(Real-time quantitative PCR, qRT-PCR)分析

根据基因序列设计特异性引物:

正向引物:5'-CTCTCAATCGCATAACCAGC-3';

反向引物:5'-ATCCACTAAGCACTTGCCTCA-3'。

根据玉米β-actin设计内参基因特异性引物:

正向引物:5'-TGTCCATCACTTGTGAAGCCTCCT-3';

反向引物:5'-ACGACCTTAGCCAATATCGCACCA-3'。

PCR反应体系(20 μL):SYBR Premix EX Taq II 10 μL、10 μmol/L forward primer 0.8 μL、10 μmol/L reverse primer 0.8 μL、1st strand cDNA 1 μL和ddH<sub>2</sub>O 7.4 μL。反应在7500 Real-time PCR System(Ap-

plied Biosystems, USA) 上进行, 反应程序: 预变性 95 °C 10 min; 变性 95 °C 15 s; 退火/延伸 60 °C 1 min, 45 个循环。用微软公司 Excel 分析数据, 每组数据设 3 次重复, 计算标准误差。显著性分析采用 SPSS 统计方法。

### 1.5 ZmHsf06 的亚细胞定位

参照 1.3 的扩增体系和扩增条件, 利用引物:

正向引物: 5'-CCCAAGCTTCAGCTGATGAAGACCTAC-GAG-3';

反向引物: 5'-CGGGATCCCAGCCATTCCCTGA-3'。

扩增 *ZmHsf06* 的编码区, 将扩增的 PCR 产物用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam*H I 消化, 与表达载体 pJIT163-*hGFP* 连接, 构建融合表达载体 pJIT163-*ZmHsf06-hGFP*。吸取 50  $\mu$ L 金粉颗粒混合液于 1.5 mL 离心管中, 涡旋, 依次加入 8  $\mu$ L 融合表达载体、50  $\mu$ L 2.5 mol/L  $\text{CaCl}_2$  及 20  $\mu$ L 0.1 mol/L 现配的亚精胺, 每次加入均涡旋 2~3 s 混匀。然后涡旋 3 min, 于冰上静置 10 min, 10 000 r/min 离心 10~20 s, 弃上清, 加入 200  $\mu$ L 乙醇重悬, 重复离心及洗涤 3 次。将沉淀重新悬浮于 30  $\mu$ L 乙醇中, 取 10  $\mu$ L 金粉颗粒悬浮物(Bio-Rad 公司, 美国)置于 micro carrier 上。

撕取自洋葱(*Allium cepa* L.)中心向外第 6 层内表皮, 细胞层光面向下, 铺在 MS 培养基(含 100 mg/L Amp) 上, 预培养 4 h 备用。待 micro carrier 上的颗粒干后, 将其装载于基因枪的载盘上, 颗粒面朝下, 以便发射至铺有洋葱表皮的 MS 平板上(可裂膜 1 100~1 300 Pa)。利用 PDS-1000 基因枪(Bio-Rad 公司, 美国)将附有质粒的金粉颗粒轰击进入洋葱表皮。基因枪操作步骤参照 Bio-Rad 公司仪器说明书。

经基因枪转化的洋葱表皮于 22 °C 暗培养 36 h, 然后放入浓度为 10  $\mu$ g/mL 的 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色液中染色, 染色时间 3~5 min, 生理盐水冲洗 3 次, 每次 5 min。通过激光共聚焦显微镜(Zeiss Confocal META510)观察荧光。热激处理组置于 37 °C 培养箱中, 处理时间分别为 5、10、15、30 和 60 min, 于激光共聚焦显微镜下观察 GFP 荧光。

### 1.6 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量测定

参照刘俊等(2000)的方法测定 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 玉米 *ZmHsf06* 基因克隆

以 42 °C 热胁迫处理 1 h 玉米叶片提取的总 RNA 为模板, 利用特异性引物, 扩增基因的编码序列(coding sequences, CDS)。序列分析结果表明(图 1), CDS 全长 1 584 bp, 编码 527 个氨基酸残基, 与 Lin 等(2011)预测的玉米 *ZmHsf06* 相同(GenBank 登录号: GRMZM2G115456\_T01)。*ZmHsf06* 蛋白序列包含植物 Hsf 家族 DNA 结合结构域(DNA-binding domain, DBD, NCBI 网站分析), 以及 A 类热激转录因子所具有的核定位信号序列(nuclear localization signal, NLS, NucPred 软件分析)、核输出信号(nuclear export signal, NES, NetNES 软件分析)序列和 AHA(aromatic, large hydrophobic and acidic amino residues)激活结构域。

### 2.2 *ZmHsf06* 基因在玉米不同器官中的表达

分别提取两叶一心期玉米的根、茎和叶片, 以及开花期功能叶、雌穗、花粉和幼胚的总 RNA, 以玉米  $\beta$ -*actin* 为内参基因, 通过 qRT-PCR 分析 *ZmHsf06* 在不同发育期不同器官中的表达。结果显示, 正常生长条件下, *ZmHsf06* 在玉米多个器官中均有不同程度的表达, 幼苗期叶片和根中表达量较高, 茎中最低(图 2A); 开花期功能叶中 *ZmHsf06* 表达量最低, 花粉中表达量最高, 其他器官中的表达量介于二者之间(图 2B)。

### 2.3 42 °C 热激诱导 *ZmHsf06* 的表达

qRT-PCR 分析发现, 42 °C 热激能显著上调两叶一心期玉米幼苗叶片(图 3A)和根系中 *ZmHsf06*(图 3B)的表达, 最高值分别达起始值的 2.5 倍(叶片, 热激 30 min)和 40 倍(根系, 热激 80 min); 随着胁迫时间的延长, 表达量逐渐下降。叶片受胁迫 40 min 后基因的表达量接近对照, 50 min 时稍低于对照。而根系受胁迫 240 min 时 *ZmHsf06* 仍保持较高的表达水平, 数值约为起始值的 10 倍。热胁迫下 *ZmHsf06* 在叶片和根系中呈现不同的表达变化规律。

### 2.4 外源 ABA 处理诱导 *ZmHsf06* 的表达

将两叶一心期玉米幼苗置于含 200  $\mu$ mol/L ABA 的 Hoagland 营养液中处理不同时间, 定量分析 *ZmHsf06* 的表达。结果表明, ABA 能显著诱导叶

1	ATGCAGGGCGGTGCATGGCCATGCCCGCCGCCGGCGGGCGCGTGCACGGTGACCACGGCGGTGGCGCCCCAGTCACGGCGCAC	90
1	M Q G G V M A H A A A A A A A S T V T T A V A P P V T A H	30
91	GCGGTGGCGGTGGCGCCCCGGTACGGCGCACGCTGCGGGCGGGCGGGCAACGGCAGCGCCACCGCGCGCCGCCACCGTTCTCTC	180
31	A V A V A P P V T A H A A A A A G N G S A T A A P P P P F L	60
181	ATGAAGACCTACGAGGTGGTGGACGACCCGGCCACGGACGACGTCATATCCTGGGGCCCCGGAAACAACAGCTTCATCGTCTGGAACACG	270
91	M K T Y E V V D D P A T D D V I S W G P G N N S F I V W N T	90
271	CCCAGTTCGCCCCGGACCTCTGCCAAGTACTTCAAGCACAGCAACTTCTCTCTTCGTGAGGCAGCTCAACACCTACGGGTTTAGA	360
81	P E F A R D L L P K Y F K H S N F S S F V R Q L N T Y G F R	120
361	AAGTTGATCCAGACAGATGGGAATTTGCAATGAGGGTTTTCTGAGAGGACAGAAGCATCTGCTGAAGACTATCAACAGAAGGAAACCA	450
121	K V D P D R W E F A N E G F L R G Q K H L L K T I N R R K P	150
451	TCCTTGACGGGAACAGCCAACACAGCAACCTCAGTCGAGAACGCTCCTGTGCCCTTCTGTGTAGAGTTGGTAAGTTTGGTTGGAG	540
151	S L Q G N S Q P Q Q P Q S Q N A P V P S C V E V G K F G L E	180
541	GAAGAGATTGAACGGCTGAAGAGGATAAGAATGTTCTTATGCAAGAGCTTGTGAGGCTGAGACAGCAACAGCAAACACTGACCATCAG	630
181	E E I E R L K R D K N V L M Q E L V R L R Q Q Q Q T T D H Q	210
631	CTGCAACTTTGGCAAGCGTCTTCAAGGATGGAGTACGGCAGCAACAGATGATGCTTCTTCTGGCTAAAGCAATGCAAGTCTCTGGT	720
211	L Q T L G K R L Q G M E S R Q Q Q M M S F L A K A M Q S P G	240
721	TTCCTAGCACAGTTTGTACAGCAAATGAGAAGAGCAGAAGAAGATAGTAGCGGCAACAAGAAAAGCGGCTGCCAGGCAAGATGGT	810
241	F L A Q F V Q Q N E K S R R R I V A A N K K R R L P R Q D G	270
811	GGCCTAGACTCCGAAAGTGTCTGCTCTTGGTGGACGGTCAAATATCAAGTATCAGCCTCTGATCAACGAAGCAGCAAGGCAATGCTA	900
271	G L D S E S A A A S L D G Q I I K Y Q P L I N E A A K A M L	300
901	AGGAAGATACTAAAGCTAGATTCTTCGCATAGGTTGGAATCTATGGCAATTCAGAGAATGGTAATTTTCTGCTGGAGAATTATATGCCA	990
301	R K I L K L D S S H R L E S M G N S E N G N F L L E N Y M P	330
991	GGCGCTCAAGCCTTTGAGAGCTCTTCGTCAACAAGAACTCTGGGGTCAACCCTTTCAGAGTTTCAGCTAACCCAGGTTTCCGCTATGGC	1080
331	G A Q A F E S S S S T R N S G V T L S E V S A N P G L P Y G	360
1081	GGCGGGCGTGGCACGAGCTCTGGGCTGTACGCCATCTGCCCTCTGAAATCCAGTGCCAGTTGTGATGGACAACATGTCGTCTAACCAA	1170
361	G G G G T S S G L S A I C P P E I Q C P V V M D N M S S N Q	390
1171	GTGCCAGCATGAGTGTGTGCCCTCTGTTTCGAAGGCTACAATTGACATGGGTATTCTGAATTCAGCTCTGGCAGACTTGGTGAAT	1260
391	V P S M S A V P P V S K A T I D M G I P E F S A L A D L V N	420
1261	GAAGGCTCCGTCGATATCCCTGGAGGGCCTTTGAGATGCCTGGTCTGAGTTCCCTGCCAGAAGGCGATGACAGTGTCCCATCGAG	1350
421	E G S V D I P G G A F E M P G P E F P L P E G D D S V P I E	450
1351	ACCGATGAGACCATGTACAACAACAACGACGAGACTCAGAGCCTCCAGGCATCATGACTCCTTCTGGGAGCAGTTCTGGTAGGCAGC	1440
451	T D E T M Y N N N D E T Q S L P G I I D S F W E Q F L V G S	480
1441	CCTCTCTGCCGATAACGATGAAGTTGATTCGGGGTCCGCACAGGAGAACGGATGGAGCAAAGTGGGGAACATCGGTGATCTTACAGAA	1530
481	P L S A D N D E V D S G S P Q E N G W S K V G N I G D L T E	510
1531	CAGATGGGCTTCTGTATCAACAATCACCGGACTCAGGAATGGGCTGTAG	1584
511	Q M G L L S S T N H R D S G N G L * 527	

图1 玉米 *ZmHsf06* 的 CDS 及推导的蛋白质序列Figure 1 The CDS and protein sequences of maize *ZmHsf06*

下划线: Hsf 家族保守的 DNA 结合结构域; 灰色区域: 核定位信号序列(NLS, KKRR)、AHA 激活结构域(DSFWEQFL)和核输出信号序列(NES, IGDLTEQM)

Underline: The conserved DNA binding domain of Hsf family; The grey colour: Nuclear localization signal (NLS, KKRR), AHA activating domain (DSFWEQFL) and nuclear export signal (NES, IGDLTEQM)

片(图4A)和根系(图4B)*ZmHsf06* 表达。叶片和根系中 *ZmHsf06* 基因表达峰值分别出现在胁迫后的 36 和 12 h, 数值分别为对照的 16 倍和 9 倍。处理 48 h 时, 叶片中 *ZmHsf06* 仍有较高表达量, 而在根系几乎检测不到。与热处理类似, ABA 处理后 *ZmHsf06* 在叶片和根系中也呈现不同的表达变化

规律。

## 2.5 盐胁迫诱导 *ZmHsf06* 的表达

250 mmol/L NaCl 处理幼苗根部不同时间, 检测 *ZmHsf06* 的表达情况。叶片(图5A)和根系(图5B)中基因表达高峰均出现在处理后 24 h, 但根系

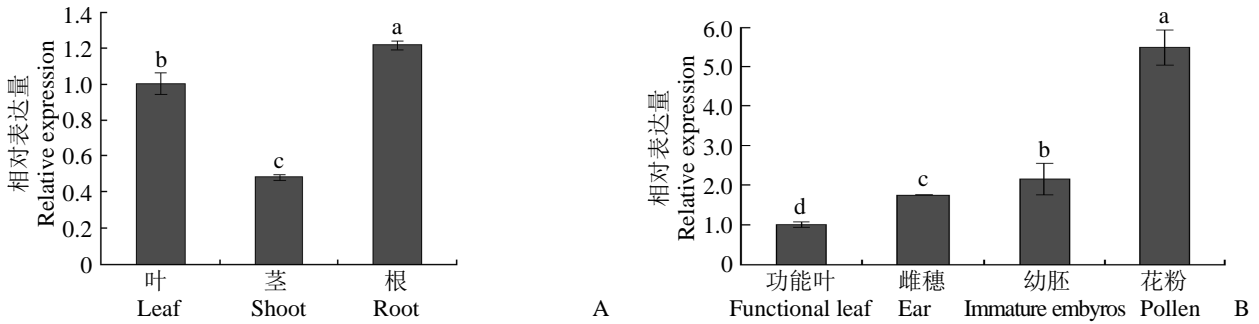


图2 正常生长条件下幼苗期(A)及开花期(B)不同器官中 *ZmHsf06* 的相对表达量

Figure 2 Expression levels of *ZmHsf06* in different organs at seedling (A) and flowering (B) stages under normal conditions

不同字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ ); 内参基因:  $\beta$ -actin,  $n=3$ ; 下同

Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ); Reference gene:  $\beta$ -actin,  $n=3$ ; The same below

中的表达量略高于叶片,之后基因表达量逐渐降低,36 h 时基因仍保持较高表达水平。不同于热激和 ABA 处理,盐胁迫下叶片和根系中 *ZmHsf06* 的表达变化规律相似。

## 2.6 正常及 42 °C 热激条件下 *ZmHsf06* 蛋白的亚细胞定位

构建融合表达载体 pJIT163-*ZmHsf06*-hGFP, 利用基因枪瞬时转化技术转化洋葱表皮细胞,采用特异性细胞核染料 DAPI 进行染色。在波长 UV 330~380 nm 激发光下,通过激光共聚焦显微镜观察实验结果。正常条件下(图 6),只在细胞核中观察到 GFP 绿色荧光,且与核特异染料 DAPI 荧光能很好地重合,说明正常生长条件下 *ZmHsf06* 定位在细胞核。将洋葱转化体在 37 °C 热处理不同时间后发现(图 7),除细胞核外,其他细胞器中未能观察到 GFP 荧光,说明热激处理后 *ZmHsf06* 蛋白不转移出核。

## 2.7 42 °C 热激条件下玉米叶片和根系 $H_2O_2$ 含量的变化

将两叶一心期玉米幼苗连同营养液一起移入 42 °C 培养箱中进行热胁迫处理,测定叶片和根系  $H_2O_2$  含量。结果表明,叶片(图 8A)和根系(图 8B)中  $H_2O_2$  含量均呈现先升后降的趋势,叶片累积  $H_2O_2$  量高于根系。其中,叶片受热处理 20 min 时  $H_2O_2$  含量迅速上升,30 min 达到峰值,而根系在热胁迫处理的前 50 min 内呈缓慢升高趋势,60 min 时达到峰值,80 min 稍有降低,之后随处理时间延长  $H_2O_2$  含量急剧下降。

## 3 讨论

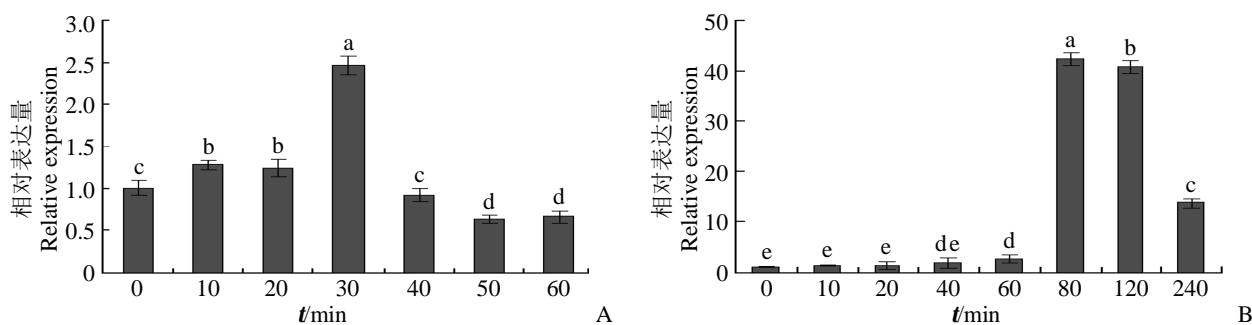
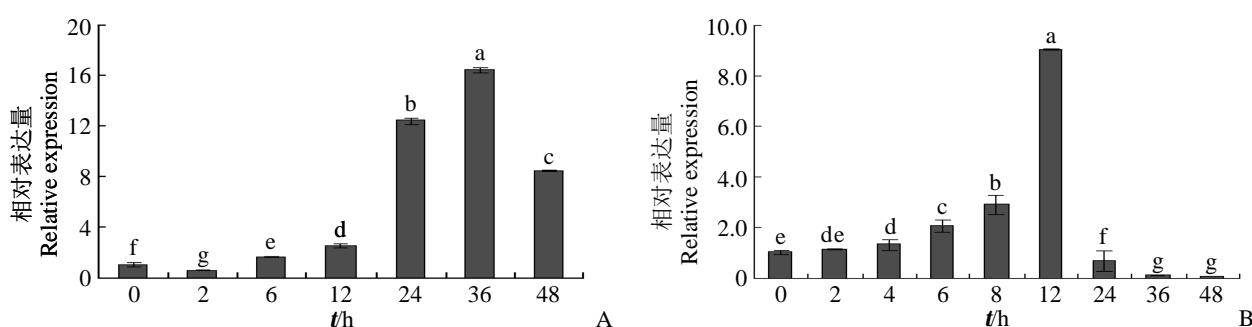
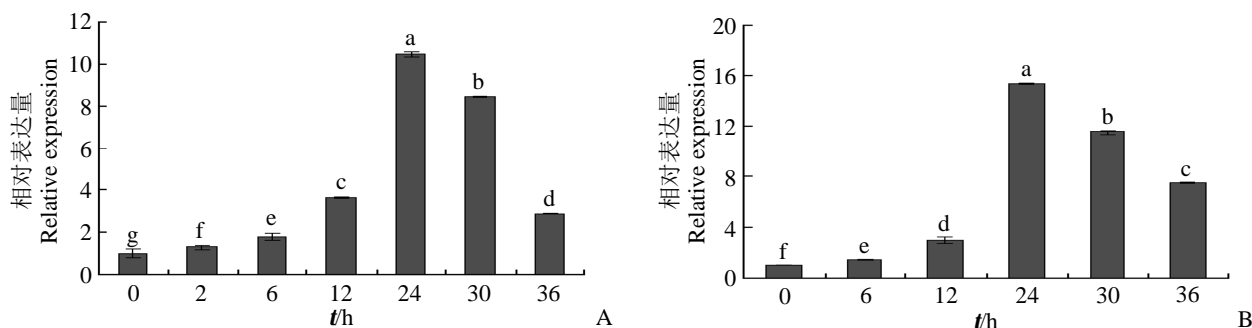
### 3.1 玉米 *ZmHsf06* 及其转录表达特性

在前期获得玉米热激转录因子基因片段的基础上(Li et al., 2014),本研究进一步从玉米幼叶中克隆到一个热激转录因子基因,经过对编码序列结构分析发现,该基因片段与 Lin 等(2011)通过电子表达谱推测的 25 个玉米热激转录因子基因中的 *ZmHsf06* 相同,属于 A 家族,含有 DBD、NLS、NES 及 AHA 激活结构域。目前关于该基因的序列结构特征及功能方面的研究尚未见其他报道,本研究首次克隆该基因完整的编码序列,并对其生物学特性进行研究。

通过比较玉米全基因组测序结果,本研究设计了特异性定量 PCR 引物,定量 PCR 表现为单一溶解曲线,确保了实验中定量引物的高度特异性。在此基础上,对 *ZmHsf06* 进行了转录表达分析和亚细胞定位。

本研究关于 *ZmHsf06* 在不同生育期不同器官中的表达结果表明, *ZmHsf06* 在幼苗根、茎和叶片以及开花期功能叶、幼穗、幼胚和花粉中均有表达,但程度不同。而 Lin 等(2011)对该基因表达谱的预测结果显示,该基因在茎尖、雌穗和雄花中均没有表达,这和本研究测定的结果存在差异。究其原因,可能是玉米材料和取样时期不同造成的。

关于 42 °C 热激对 *ZmHsf06* 表达的影响,由于实验材料和热胁迫处理方式不同,本研究与 Lin 等(2011)的研究结果也存在差异。Lin 等(2011)以玉米自交系 B73 为材料,选取正常和 42 °C 热激 1 h 样

图3 42 °C热胁迫下玉米幼苗叶片(A)和根系(B)中*ZmHsf06*的相对表达量Figure 3 Expression levels of *ZmHsf06* in leaves (A) and roots (B) of the maize seedlings treated at 42 °C图4 200 μmol/L ABA胁迫下玉米幼苗叶片(A)和根系(B)中*ZmHsf06*的相对表达量Figure 4 Expression levels of *ZmHsf06* in leaves (A) and roots (B) of the maize seedlings treated with 200 μmol/L ABA图5 250 mmol/L NaCl胁迫下玉米幼苗叶片(A)和根系(B)中*ZmHsf06*的相对表达量Figure 5 Expression levels of *ZmHsf06* in leaves (A) and roots (B) of the maize seedlings treated with 250 mmol/L NaCl

本,结果发现热胁迫1 h基因表达量显著降低,认为*ZmHsf06*受热胁迫显著下调。本研究以玉米自交系H21两叶一心期幼苗为实验材料,42 °C热激1 h内,每隔10 min取一次样本,结果发现,42 °C热激30 min能显著上调叶片*ZmHsf06*基因的表达,最大表达量达起始值的2.5倍,之后随胁迫时间延长基因表达逐渐恢复,50 min时基因表达略低于正常对照。42 °C热激后根系中基因表达明显上调,80 min达到高峰,之后也随胁迫时间延长而恢复。上述结果充分证明基因*ZmHsf06*受42 °C热胁迫上调,且对热反应非常敏感。同时,热胁迫下根系中*ZmHsf06*

表达峰值滞后于叶片,这可能与受热后根系累积H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>晚于叶片有关,本实验室前期通过抑制剂研究也证明,玉米热激转录因子基因受热诱导表达依赖于H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的存在(Li et al., 2014)。

### 3.2 玉米*ZmHsf06*对其他逆境胁迫的响应

越来越多的研究发现,植物*Hsf*不仅应对热胁迫,还对其他环境胁迫起作用。过表达*AtHsfA2*的拟南芥植株显著提高了对高光和热激联合胁迫(Nover et al., 2001)的耐受性;外源H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理能诱导过表达植株中*AtHsfA2*和其调控的靶基因的表达。



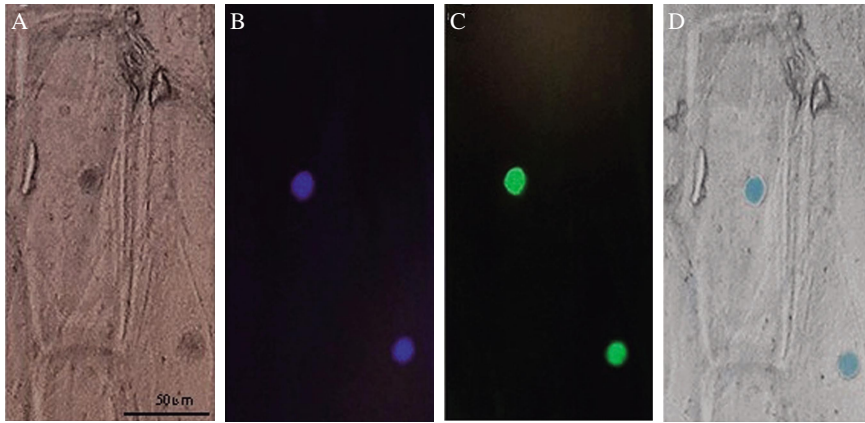


图6 正常培养条件下ZmHsf06蛋白在洋葱表皮细胞中的亚细胞定位

Figure 6 The subcellular location of the ZmHsf06 protein in onion epidermis cells under normal condition

A: 明场; B: 细胞核 DAPI 染色; C: GFP 绿色荧光; D: 叠加图像

A: Bright field; B: Blue fluorescence of nuclei stained by DAPI; C: Green fluorescence of GFP ; D: Merged images

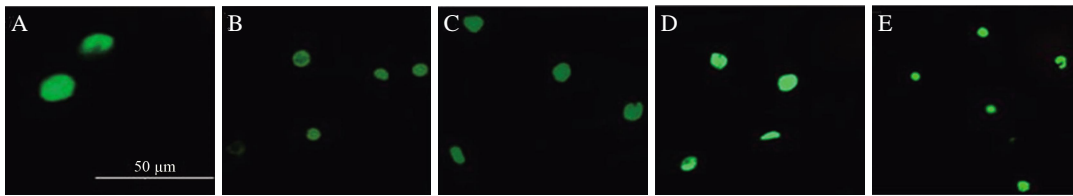


图7 热激条件下ZmHsf06蛋白在洋葱表皮细胞中的亚细胞定位

Figure 7 The subcellular location of the ZmHsf06 protein in onion epidermis cells under heat shock at 37 °C

A~E: 37 °C 分别热激 5、10、15、30、60 min, 仅在细胞核中观察到 GFP 荧光

A~E: Heat shock at 37 °C for 5, 10, 15, 30 and 60 min, respectively, GFP fluorescence was observed only in nuclei

利用突变体研究发现, AtHsfA1d 和 AtHsfA1e 不仅参与 *AtHsfA2* 的转录调控, 还与 AtHsfA2 一起作为 Hsfs 信号网络的关键调节因子(regulators)应对环境胁迫 (Nover et al., 2001)。AtHsfA1a、AtHsfA1b、AtHsfd 和 AtHsfA1e 作为热激反应中主要的调节因子, 参与包括热在内的多种非生物胁迫反应 (Scharf et al., 1998)。本研究结果表明, *ZmHsf06* 表达不仅受 42 °C 热激快速诱导(图 3), 外源 ABA 和

NaCl 处理根系, 均能不同程度地上调 *ZmHsf06* 表达 (图 4 和图 5), 只是峰值滞后于热激处理, 提示 *ZmHsf06* 在转录水平上受多种逆境胁迫诱导, 很可能参与调控多种非生物胁迫信号转导过程。ABA 和 NaCl 处理后根系中 *ZmHsf06* 的表达峰值均早于叶片, 展现了外源逆境首先由根系感受, 然后向叶片传递信号进而诱发基因表达的过程。Lin 等 (2011) 结果也显示, 预测的 25 个基因在玉米不同组

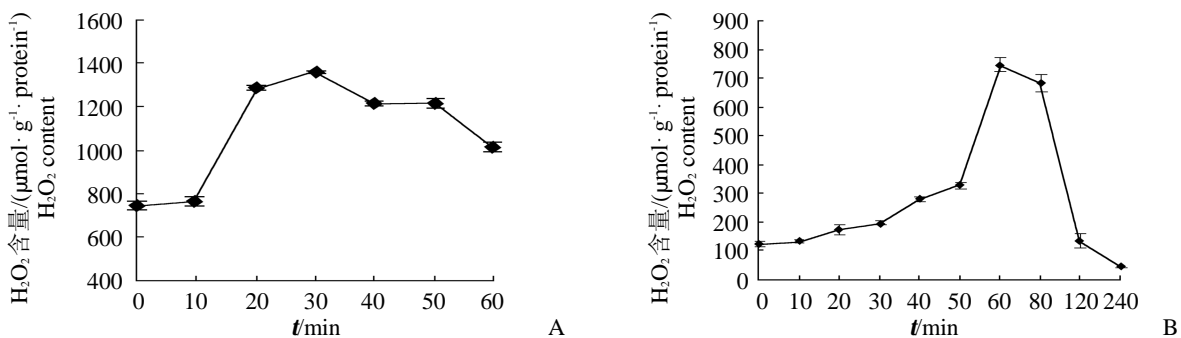


图8 42 °C热胁迫处理玉米幼苗叶片(A)和根系(B)中的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量

Figure 8 The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in leaves (A) and roots (B) of the maize seedlings at 42 °C



织器官中呈现不同的表达模式,这都暗示该家族成员功能的复杂性和多样性(Schramm et al., 2006)。

### 3.3 *ZmHsf06* 蛋白在玉米中的亚细胞定位

研究表明,尽管 Hsf 在调控逆境胁迫方面起着重要的作用,但因结构、亚细胞定位、寡聚化及与其他蛋白的相互作用等多方面不同而表现出其独特的功能(Bharti et al., 2000)。多数 A 类 Hsfs 因功能结构完整,在耐热性调控方面处于正调控的优势地位。Hsfs 通常以单体形式存在于细胞质,一旦被诱导激活,便以三聚体形式进入核内,与特异启动子区域热激元件结合并启动相关基因的转录。但并非所有热激转录因子都遵循这一规律。番茄 HsfA2 是热诱导蛋白,但因其 C 端拥有一个极强的核输出信号而自身不能进入核内,其表达和核输入依赖于 HsfA1(Scharf et al., 1998),在正常温度下, HsfA1 分布于细胞核和细胞质中。最新研究表明,麝香 LHsfA1 同时定位在细胞核和细胞质(宫本贺等, 2014),而小麦 TaHSF3 定位在细胞核(Zhang et al., 2013)。

本研究发现,正常条件下 *ZmHsf06* 蛋白定位在细胞核中,37 °C 热激处理后也只在细胞核观察到 GFP 荧光,说明受热胁迫后 *ZmHsf06* 蛋白并不转移出核。究其原因,可能是 *ZmHsf06* 分子量较大(56.7 kD),或是核定位信号太强,使得 *ZmHsf06* 只能依赖其他亚类 Hsf 协助接收核外信号。*ZmHsf06* 属于 A1 类,其他作物中研究表明 A1 类 Hsfs 在激活热激基因的转录方面起关键调控作用,但 A1 类 Hsf 往往需要借助 A2 类 Hsf 形成异源寡聚体而实现(Heerklotz et al., 2001; Liu et al., 2013)。许多研究也证实,多数 B 类 Hsf 由于缺乏 AHA 不能与转录元件结合而失去转录活性,但可作为辅因子与 A 类 Hsf 协同调控热激基因的转录(Bharti et al., 2004)。相关推测尚需通过进一步研究来证实。

## 4 结论

玉米热激转录因子基因 *ZmHsf06* 编码序列全长 1 584 bp,编码 527 个氨基酸残基,该序列包含典型的 Hsf 家族 DNA 结合结构域(DBD)、核定位信号(NLS)、核输出信号(NES)和 AHA 激活结构域。正常生长条件下,*ZmHsf06* 在玉米不同发育时期多个器官中均有表达;热、ABA 和盐胁迫均能上调 *ZmHsf06* 的表达。正常生长条件下 *ZmHsf06*

蛋白定位在细胞核,热处理后未转移出核。*ZmHsf06* 可能在转录水平上介导玉米花粉发育及对多种逆境胁迫响应的信号转导过程,且在细胞核内行使上述功能。本研究为全面认识玉米热激转录因子家族基因并进一步阐述其生物学功能提供理论依据。

## 参考文献

- 宫本贺, 易瑾, 隋娟娟, 等. 2014. 麝香百合热激转录因子基因 *LHsfA1* 的克隆与表达分析[J]. 园艺学报, 41(7): 1400-1408. (Gong B H, Yi J, Sui J J, et al. 2014. Cloning and expression analysis of *LHsfA1* from *Lilium longiflorum*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 41(7): 1400-1408.)
- 刘俊, 吕波, 徐朗莱. 2000. 植物叶片中过氧化氢含量测定方法的改进[J]. 生物化学与生物物理进展, 27(5): 548-551. (Liu J, Lv B, Xu L L. 2000. An improved method for determination of hydrogen peroxide in leaves[J]. Progress of Biochemistry and Biophysiology, 27(5): 548-551.)
- Agashe V R, Hartl F U. 2008. Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 11(1): 15-25.
- Aranda M A, Escaler M, Thomas C L, et al. 1999. A heat shock transcription factor in pea is differentially controlled by heat and virus replication[J]. The Plant Journal, 20(2): 153-161.
- Almoguera C, Rojas A, Díaz-Martín J, et al. 2002. A seed-specific heat-shock transcription factor involved in developmental regulation during embryogenesis in sunflower [J]. The Journal of Biological Chemistry, 277(46): 43866-43872.
- Bharti K, Schmidt E, Lyck R, et al. 2000. Isolation and characterization of HsfA3, a new heat stress transcription factor of *Lycopersicon peruvianum*[J]. The Plant Journal, 22 (4): 355-365.
- Bharti K, von Koskull-Döring P, Bharti S, et al. 2004. Tomato heat stress transcription factor HsfB1 represents a novel type of general transcription coactivator with a histone-like motif interacting with HAC1/CBP[J]. Plant Cell, 16 (6): 1521-1535.
- Busch W, Wunderlich M, Schöffl F. 2005. Identification of novel heat shock factor-dependent genes and biochemical pathways in *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Journal, 41(1): 1-14.
- Brameier M, Krings A, MacCallum R M. 2007. NucPred-Pre-

- dicting nuclear localization of proteins[J]. *Bioinformatics Applications Note*, 23(9): 1159-1160.
- Chang Y Y, Liu H C, Liu N Y, et al. 2007. A heat-inducible transcription factor, HsfA2, is required for extension of acquired thermotolerance in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 143(1): 251-262.
- Chauhan H, Khurana N, Agarwal P, et al. 2013. A seed preferential heat shock transcription factor from wheat provides abiotic stress tolerance and yield enhancement in transgenic *Arabidopsis* under heat stress environment[J]. *PLoS ONE*, 8(11): e79577.
- Czarnecka-Verner E, Yuan C X, For P C. 1995. Isolation and characterization of six heat shock transcription factor cDNA clones from soybean[J]. *Plant Molecular Biology*, 29(1): 37-51.
- Ellis R J. 2000. Chaperone substrates inside the cell[J]. *Trends in Biochemical Science*, 25(5): 210-212.
- Gagliardi D, Breton C, Chaboud A, et al. 1995. Expression of heat shock factor and heat shock protein 70 genes during maize pollen development[J]. *Plant Molecular Biology*, 29(4): 841-856.
- Guo J K, Wu J, Ji Q, et al. 2008. Genome-wide analysis of heat shock transcription factor families in rice and *Arabidopsis*[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 35(2): 105-118.
- Heerklotz D, Döring P, Bonzelius F. 2001. The balance of nuclear import and export determines the intracellular distribution and function of tomato heat stress transcription factor HsfA2[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 21(5): 1759-1768.
- Hübel A, Schöffl F. 1994. *Arabidopsis* heat shock factor: Isolation and characterization of the gene and the recombinant protein[J]. *Plant Molecular Biology*, 26(1): 353-362.
- Jolly C, Morimoto R I. 2000. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death [J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(19): 1564-1572.
- La Cour T, Kierner L, Molgaard A, et al. 2004. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals[J]. *Protein Engineering Design and Selection*, 17(6): 527-536.
- Lee J H, Hübel A, Schöffl F. 1995. Derepression of the activity of genetically engineered heat shock factor causes constitutive synthesis of heat shock proteins and increased thermotolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 8(4): 603-612.
- Li H C, Li G L, Liu Z H, et al. 2014. Cloning, localization and expression of *ZmHsf-Like* in *Zea mays*[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 13(6): 1230-1238.
- Lin Y X, Jiang H Y, Chu Z X, et al. 2011. Genome-wide identification, classification and analysis of heat shock transcription factor family in maize[J]. *BMC Genomics*, 12: 76-89.
- Liu H C, Chang Y Y. 2013. Common and distinct functions of *Arabidopsis* Class A1 and A2 heat shock factors in diverse abiotic stress responses and development[J]. *Plant Physiology*, 163(1): 276-290.
- Liu H C, Liao H T, Chang Y Y. 2011. The role of class A1 heat shock factors (HSFA1s) in response to heat and other stresses in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell and Environment*, 34(5): 738-751.
- Lohmann C, Eggers-Schumacher G, Wunderlich M, et al. 2004. Two different heat shock transcription factors regulate immediate early expression of stress genes in *Arabidopsis*[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 271(1): 11-21.
- Mishra S K, Tripp J, Winkelhaus S, et al. 2002. In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato[J]. *Genes Development*, 16(12): 1555-1567.
- Nishizawa A, Yabuta Y, Yoshida E, et al. 2006. *Arabidopsis* heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress[J]. *The Plant Journal*, 48(4): 535-547.
- Nishizawa-Yokoi A, Nosaka R, Hayashi H, et al. 2011. HsfA1d and HsfA1e involved in the transcriptional regulation of HsfA2 function as key regulators for the Hsf signaling network in response to environmental stress[J]. *Plant Cell and Physiology*, 52(5): 933-945.
- Nover L, Bharti K, Döring P, et al. 2001. *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: How many heat stress transcription factors do we need[J]. *Cell Stress Chaperones*, 6(3): 177-189.
- Nover L, Scharf K D, Gagliardi D, et al. 1996. The Hsf world: Classification and properties of plant heat stress transcription factors[J]. *Cell Stress Chaperones*, 1(4): 215-223.
- Scharf K D, Heider H, Höhfeld I, et al. 1998. The tomato Hsf system: HsfA2 needs interaction with HsfA1 for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 18(4): 2240-2251.
- Scharf K D, Rose S, Zott W, et al. 1990. Three tomato genes code for heat stress transcription factors with a region of

- remarkable homology to the DNA-binding domain of the yeast HSF[J]. EMBO Journal, 9(13): 4495-4501.
- Schöffl F, Prändl R, Reindl A. 1998. Regulation of the heat-shock response[J]. Plant Physiology, 117(4): 1135-1141.
- Schramm F, Ganguli A, Kiehlmann E, et al. 2006. The heat stress transcription factor HsfA2 serves as a regulatory amplifier of a subset of genes in the heat stress response in *Arabidopsis*[J]. Plant Molecular Biology, 60(5): 759-772.
- Shim D, Hwang J U, Lee J, et al. 2009. Orthologs of the class A4 heat shock transcription factor HsfA4a confer cadmium tolerance in wheat and rice[J]. Plant Cell, 21(12): 4031-4043.
- Yamanouchi U, Yano M, Lin H X, et al. 2002. A rice spotted leaf gene, *Spl7*, encodes a heat stress transcription factor protein[J]. Proceedings of National Academy of Science of the USA, 99(11): 7530-7535.
- Yokotani N, Ichikawa T, Kondou Y, et al. 2008. Expression of rice heat stress transcription factor *OsHsfA2e* enhances tolerance to environmental stresses in transgenic *Arabidopsis*[J]. Planta, 227(5): 957-967.
- Xue G P, Sadat S, Drenth J, et al. 2014. The heat shock factor family from *Triticum aestivum* in response to heat and other major abiotic stresses and their role in regulation of heat shock protein genes[J]. Journal of Experimental Botany, 65(2): 539-557.
- Zhang S X, Xu Z S, Li P S, et al. 2013. Overexpression of *TaHSF3* in transgenic *Arabidopsis* enhances tolerance to extreme temperatures[J]. Plant Molecular Biological Report, 31(3): 688-697.

(责任编辑 李建琴)