

引用格式:

于晓婧, 王萍, 武兆昕, 杨永升, 许珂, 尚鹏. 沙芥幼苗叶片小热激蛋白基因的克隆与表达[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2021, 47(6): 669–676.

YU X J, WANG P, WU Z X, YANG Y S, XU K, SHANG P. Cloning and expression of small heat shock protein genes in seedling leaves of *Pugionium cornutum* (L.) Gaertn.[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2021, 47(6): 669–676.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



沙芥幼苗叶片小热激蛋白基因的克隆与表达

于晓婧, 王萍*, 武兆昕, 杨永升, 许珂, 尚鹏

(内蒙古农业大学园艺与植物保护学院, 内蒙古 呼和浩特 010019)

摘要: 在对转录组和蛋白组数据联合分析的基础上, 通过 RT-PCR 方法克隆得到沙芥幼苗叶片 2 个小分子热激蛋白基因 *PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8*, 运用生物信息学软件分析它们的核苷酸和编码蛋白, 通过 Real-time PCR 分析其在高温、低温、NaCl、ABA 和干旱复水胁迫下的表达模式。*PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 开放阅读框分别为 699 bp 和 462 bp, 分别编码 282 和 153 个氨基酸, 其中 *PcHSP26.5* 包含 1 个内含子。*PcHSP26.5*、*PcHSP17.8* 的相对分子质量分别为 26 480、17 490, 理论等电点分别为 6.36、5.99; 均无跨膜结构与信号肽位点, 属于亲水蛋白。亚细胞定位预测和进化树分析表明, *PcHSP26.5* 主要定位于线粒体中, 属于 MII 亚族; *PcHSP17.8* 主要定位于细胞质中, 属于 CI 亚族。实时荧光定量 PCR 结果表明: 高温胁迫下, 沙芥 *PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 基因的相对表达量均在 1 h 达到顶峰, 之后下降; 低温胁迫下, 沙芥 *PcHSP26.5* 基因的相对表达量在 0.5 h 达到顶峰, 之后下降, 沙芥 *PcHSP17.8* 基因的相对表达量在 0.5~12 h 内低于对照, 24 h 时出现上升趋势; NaCl 胁迫下, 沙芥 *PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 基因的相对表达量分别在 1 h 和 3 h 达到顶峰, 之后下降; ABA 胁迫下, 沙芥 *PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 基因的相对表达量均在 2 h 达到顶峰, 之后下降; 干旱复水胁迫下, 沙芥 *PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 基因的相对表达量均在干旱 9 d 达到顶峰, 复水后下降。

关键词: 沙芥; 小热激蛋白基因; 克隆; 表达; 逆境胁迫

中图分类号: Q949.748.3; Q786

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2021)06-0669-08

Cloning and expression of small heat shock protein genes in seedling leaves of *Pugionium cornutum* (L.) Gaertn.

YU Xiaojing, WANG Ping*, WU Zhaoxin, YANG Yongsheng, XU Ke, SHANG Peng

(College of Horticulture and Plant Protection, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Neimenggu 010019, China)

Abstract: On the basis of the joint analysis of transcriptome and proteome data, two small heat shock protein genes, *PcHSP26.5* and *PcHSP17.8*, were cloned by RT-PCR using seedling leaves of *Pugionium cornutum* (L.) Gaertn., and analyzed by bioinformatics software. Nucleotides and encoded proteins were analyzed by Real-time PCR for the expression patterns of the 2 genes under high temperature, low temperature, NaCl stress, ABA stress and drought and rewatering stress. The open reading frames of *PcHSP26.5* and *PcHSP17.8* are 699 bp and 462 bp, respectively, encoding 282 and 153 amino acids, respectively, of which *PcHSP26.5* contains an intron. The relative molecular masses of *PcHSP26.5* and *PcHSP17.8* are 26 480 and 17 490, respectively, and their theoretical isoelectric points are 6.36 and 5.99, respectively. They are hydrophilic proteins without transmembrane structure and signal peptide sites. Subcellular location

收稿日期: 2021-04-27

修回日期: 2021-09-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(31860553、31260475)

作者简介: 于晓婧(1998—), 女, 内蒙古乌兰察布人, 硕士研究生, 主要从事沙生植物分子生物学研究, 1127068752@qq.com; *通信作者, 王萍, 博士, 教授, 主要从事蔬菜种质资源与种质创新研究, wangping@imau.edu.cn

prediction and phylogenetic tree analysis showed that PcHSP26.5 is mainly located in the mitochondria and belongs to the MII subfamily; while PcHSP17.8 is mainly located in the cytoplasm and belongs to the CI subfamily. The results of real-time fluorescent PCR showed that under high temperature stress, relative expression levels of *PcHSP26.5* and *PcHSP17.8* genes in *Pugionium cornutum* (L.) Gaertn. decreased after reaching the peak at 1 h; under low temperature stress, the relative expression level of *PcHSP26.5* gene decreased after reaching the peak at 0.5 h, and the relative expression level of *PcHSP17.8* gene was lower than the control within 0.5-12 h, and showed an upward trend at 24 h; under NaCl stress, relative expression levels of *PcHSP26.5* and *PcHSP17.8* genes decreased after reaching their peaks at 1 h and 3 h, respectively; under ABA stress, relative expression levels of the *PcHSP26.5* and *PcHSP17.8* decreased after reaching the peak at 2 h; under drought and rewatering stress, the relative expression levels of *PcHSP26.5* and *PcHSP17.8* genes reached their peak at 9 days of drought, and then declined after rewatering.

Keywords: *Pugionium cornutum*(L.) Gaertn; small heat shock proteins genes; cloning; expression; adversity coercion

植物响应逆境及发育信号合成相对分子质量(15 000~30 000)较低的小热激蛋白(smal heat shock proteins, sHSPs)^[1], 它们可以稳定蛋白质膜结合部分变性的蛋白质并防止不可逆的聚集^[2-3]。通过此过程维持细胞体内稳态并保护植物。小热激蛋白通常含有保守的由 β 折叠构成的ACD结构域^[4]。根据序列同源性以及亚细胞定位, 认为sHSPs基因家族至少可分为17个亚类, 分布于细胞质、叶绿体、内质网、线粒体和质膜上^[5-6]。有研究表明, 植物受到高温胁迫后, sHSPs的表达量显著上升, 耐热性提高; 另外寒冷、重金属、干旱、盐胁迫等也能诱导sHSPs的表达^[7], 且表达量可提高几十到几百倍, 但其表达强度与胁迫强度及时间相关。植物受胁迫后sHSPs的表达有半周期, 说明小热激蛋白可能对植物胁迫后的修复起重要作用^[8]。花椒树*SpHSP17.3*和*SpHSP23.8*在高温、NaCl及干旱胁迫下相对表达量均显著升高, 且存在组织特异性, 在茎中的相对表达量最高, 其次为果实和根, 而花中的相对表达量最低^[9-10]。匍匐剪股颖*AsHSP26.8a*在拟南芥中过表达后加强了转基因拟南芥对激素ABA的敏感性^[11]; 拟南芥*AtHSP17.4CI*会受热、冷、盐、干旱和强光的诱导, 且在胁迫早期就可以迅速表达^[12]; 辣椒*CaHSP16.4*的沉默会降低植株对热胁迫和干旱胁迫的耐受性^[13]; 灰岩皱叶报春*PfHSP17.2*在拟南芥中过表达后使其具有更强的抵御高温、寒冷与盐胁迫的能力^[14]。沙芥(*P. cornutum*(L.) Gaertn.)为十字花科沙芥属(*Pugionium* Gaertn.)二年生草本旱生植物, 是中国的特有种, 也是沙芥属植物的模式种, 具有宽翅短角果的特化形态特征, 是适应荒漠沙地严酷气候环境的进化类群^[15]。沙芥根系发达, 是沙地先锋植物, 极耐沙埋, 可有效阻止沙

丘前移, 因此也是一种很好的治理水土流失的沙生植物。沙芥属的栽培技术^[16]、植物学特征^[17]、生理生化^[18]、病虫害防治^[19]、加工利用^[20]等研究都取得了进展。笔者前期通过对干旱胁迫下沙芥转录组与蛋白组的联合分析, 共找到6639个差异表达基因和795个差异表达蛋白, 定量分析发现其中有109个基因/蛋白在这2个组学水平上均受到调节; 进一步对这109个基因/蛋白进行分析, 结果小热激蛋白的占比最多, 通过联合分析各小热激蛋白在两个组学中的差异倍数, 筛选出*PcHSP26.5*和*PcHSP17.8*进行克隆与分析; 对沙芥进行不同逆境胁迫, 分析这2个基因的表达情况, 旨在为后续的小热激蛋白基因功能验证及沙芥品种选育提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

采集内蒙古自治区鄂尔多斯市鄂托克前旗毛乌素沙地的沙芥果实, 挑选去除果皮后饱满的种子, 用2%次氯酸(HClO)消毒2 min, 于智能培养箱中催芽。将发芽种子分为2份: 其中1份均匀播种在花盆(内径18 cm、高15 cm)内, 置于温室中, 白天温度28℃、光照14 h、光照度30 000 lx, 夜晚15℃培养; 另外1份播种于规格为8 cm×8 cm的营养钵内, 置于光照培养箱内, 白天温度28℃、光照16 h、光照度18 000 lx, 夜晚23℃培养。

1.2 方法

1.2.1 试验设计

温室中沙芥幼苗长至六叶一心时, 通过自然干旱法进行干旱胁迫, 利用称重法控制土壤水分含量。以土壤相对含水量为田间持水量的70%~

75%为对照；以土壤相对含水量分别为田间持水量的 40%~45%和 30%~35%为中度胁迫和重度胁迫。干旱处理 10 d(重度干旱胁迫的沙芥叶片出现严重萎蔫)结束试验，取样进行液氮速冻，置于-80 °C 保存，备用。

对播种于光照培养箱中的沙芥幼苗进行高温、低温、NaCl、ABA 和干旱胁迫处理：①将沙芥幼苗分别放置于 42 °C 和 4 °C 的培养箱内处理 24 h；②将沙芥幼苗从培养钵中取出洗净，将根部浸泡于含有 200 mmol/L NaCl 的 1/2MS 培养基溶液中处理 24 h；③将沙芥幼苗从培养钵中取出洗净，将根部浸泡于含有 100 μmol/L ABA 的 1/2MS 培养基溶液中处理 24 h，分别于处理后 0.5、1、2、3、6、12 和 24 h 取叶片和茎段部分用于 RNA 提取，置于-80 °C 保存，备用；④考虑到外界环境中土壤水分流失过程缓慢，未选择通过 PEG 进行模拟干旱，而是在给沙芥幼苗充分浇水后采用自然干旱持续处理 9 d 后复水，复水后 3、6、9、12 d 取叶片和茎段部分用于 RNA 提取，置于-80 °C 保存，备用。

1.2.2 生物信息学分析

采用试剂盒提取沙芥幼苗叶片的基因组 DNA 与总 RNA，用微量分光光度计检测其浓度与质量，琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 与 RNA 的完整性与稳定性。利用 pEASY-Blunt Simple Cloning Kit 试剂盒(北京全式金生物)进行 cDNA 第 1 链的合成，用于基因克隆与荧光定量分析。

对沙芥进行干旱胁迫得到的转录组和蛋白组数据进行联合分析，筛选并获得差异显著表达的 2 个基因(序列号 c30518 和 c46759)的开放阅读框序列。运用 Primer Premier 5 设计各自特异性引物(表 1)，以沙芥叶片 gDNA 与 cDNA 为模板进行 PCR 扩增：98 °C 预变性 5 min；98 °C 变性 30 s，T_m 退火 30 s，72 °C 延伸 min，35 个循环；72 °C 再延伸 10 min。PCR 产物经凝胶电泳后回收目的条带，并与 pEASY-Blunt Simple Cloning Vector 载体连接，转化进 DH5α 感受态细胞，涂板、挑菌后送上海生工生物科技有限公司测序。

表 1 采用的引物及序列

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'-3')
c30518F	GCGTCGACCATGGCTTTAGCTCGTTTG
c30518R	CGAGCTCTTAGTCAACAGAAATCTCCTGA
c46759F	GCGTCGACATGTCGCTGATTCCAAGCTTATTC
c46759R	CGAGCTCTTAGCCAGAGATCTCAACAGACTTC
R2_Unigene_BMK.22570-rF	CATCCCTTGGAGGATCAAGTATT
R2_Unigene_BMK.22570-rR	CCTCTTGTGCTTTCGGTTTC
c30518F	TGTCGTTGCCTGATGATGCTAAGG
c30518R	GGCTTCTCCGTTTCGAGGAATCAC
c46759F	GTGGAGAGGTCAGCGGTCAATTC
c46759R	CACCTTAGGCACCGTCACAGTCAG

运用 NCBI 中的 Blast 工具对获得的基因及其编码蛋白进行同源比对和保守结构域分析；用 ExPASy ProtParam tool(<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>)预测蛋白质相对分子质量与理论等电点；运用 ProtScale(<http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl>)进行氨基酸亲/疏水性分析；利用 SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)预测蛋白二级结构；用 Netphos 3.0 Serve(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)预测蛋白质磷酸化位点；用 TMPRED(<http://www.ch.embnet.org/software/TMPREDform.html>)预测跨膜结构；用 SignalIP

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)在线网址预测信号肽；用 WoLF PSORT(<https://wolfpsort.org/>)进行亚细胞定位预测；用 SWISS-MODEL(<http://www.swissmodel.expasy.org/>)预测编码蛋白的三维结构；用 Clustal Omega 进行多序列氨基酸同源性比较并用 MEGA 7.0 构建系统发育树。

1.2.3 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析

根据克隆得到的基因序列设计定量引物，以 β-肌动蛋白(R2_Unigene_BMK.22570)基因用作为内参基因^[21]，按 SYBR® Premix Ex Taq I(ITA KaRa, 大连, 中国)使用说明进行 qRT-PCR 分析。使用

Roche480 进行荧光定量 PCR 反应: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s; 60 °C 退火 30 s, 循环 40 次; 95 °C 延伸 5 s, 60 °C 再延伸 1 min。每个样品均设置 3 次重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析结果。运用 SPSS 23.0 对数据进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 沙芥幼苗小热激蛋白基因 cDNA 和 gDNA 序列

根据沙芥转录组与蛋白组联合分析数据, 以沙芥 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 连接载体并进行测序。结果显示, 其开放阅读框长度分别为 699 和 462 bp, 分别编码 232 和 153 个氨基酸; 通过 Blast 比对, 发现该片段为沙芥小热激蛋白 20 家族基因, 根据预测蛋白相对分子质量的大小, 分别命名为 *PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8*。以沙芥 gDNA 为模板的 PCR 产物碱基序列与 *PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 基因 ORF 碱基序列进行比较, 发现 *PcHSP26.5* 基因 gDNA 序列共包含 851 个碱基, 在 281 至 433 位点插入 1 个长度为 152 bp 的内含子, *PcHSP17.8* 基因则不含内含子。

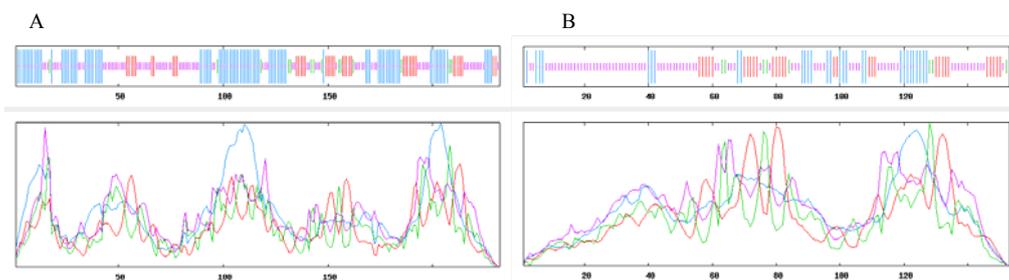
2.2 沙芥小热激蛋白基因的生物信息学

2.2.1 蛋白性质预测

NCBI Blast 对比结果表明: *PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 均含有小热激蛋白典型的 ACD 结构域; 利用 ExPASy Prot Param tool 分析 *PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 基因编码蛋白的基本理化性质, 可以得知 *PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 的分子式分别为

$C_{1153}H_{1842}N_{338}O_{364}S_7$ 、 $C_{776}H_{1239}N_{211}O_{238}S_5$, 相对分子质量分别为 26 480、17 490, 理论等电点分别为 6.36、5.99, 不稳定系数分别为 52.69、49.44, 说明皆为不稳定蛋白; 脂肪系数分别为 74.78、73.73, 平均亲水系数分别为 -0.812、-0.625, 说明都具有亲水性。利用 ProtScale 对 *PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 进行亲/疏水性分析, 可以得知, *PcHSP26.5* 中氨基酸含量较丰富的是 Glu(E), 有 20 个, 为所有氨基酸含量的 8.6%; Asn(N) 有 19 个, Leu(L) 有 19 个, 二者均为所有氨基酸含量的 8.2%; *PcHSP17.8* 中氨基酸含量较丰富的是 Glu(E), 有 17 个, Lys(K)、Ser(S)、Val(V) 也各有 17 个, 均为所有氨基酸含量的 11.1%。*PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 中带负电荷的氨基酸残基(Asp+Glu) 总个数分别为 36、29, 带正电荷的氨基酸残基(Arg+Lys) 总个数分别为 35、26。*PcHSP26.5* 多肽链第 213 位分值最高(1.522), 第 221 位分值最低(-3.067)。*PcHSP17.8* 多肽链第 135 位分值最高, 为 1.522; 第 96 位分值最低, 为 -3.067。根据负值越大, 亲水性越高; 正值越大, 疏水性越高的标准来判断, 二者皆为亲水蛋白。

利用 SOPMA 对 *PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 的二级结构进行预测, 结果(图 1)显示, *PcHSP26.5* 蛋白由 36.21% 的无规则卷曲、40.95% 的 α -螺旋、16.81% 的延伸链和 6.03% 的 β 转角构成; *PcHSP17.8* 蛋白则由 54.90% 的无规则卷曲、20.26% 的 α -螺旋、19.61% 的延伸链和 5.23% 的 β 转角构成。



A *PcHSP26.5*; B *PcHSP17.8*。蓝色代表 α -螺旋; 红色代表延伸链; 绿色代表 β 转角; 紫色代表无规则卷曲。

图 1 沙芥小热激蛋白二级结构预测

Fig.1 Prediction for secondary structures of small heat shock protein genes in *Pugionium cornutum* (L.) Gaertn.

利用 Netphos 3.0 Serve 预测 *PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 蛋白的磷酸化位点, 结果 *PcHSP26.5* 有 16 个丝氨酸、5 个苏氨酸、4 个酪氨酸磷酸化位点, *PcHSP17.8* 有 10 个丝氨酸和 5 个苏氨酸磷酸化位点, 没有酪氨酸磷酸化位点。

利用 TMPRED 对 *PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 的跨膜结构进行预测, 发现二者均不含跨膜结构; 利用 SignalIP 对 *PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 信号肽进行预测, 结果二者都不具有信号肽。用 SWISS-MODEL 对 *PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 进行三级结构

(*Arabidopsis thaliana*)AtHsp26.5 蛋白(登录号 Q9SSQ8.1)的相似性为 78.02%。PcHSP17.8 与芥菜 CrHSP17.8 蛋白(登录号 XP_006303386.1:1-156)的相似性最高,为 86.93%;与拟南芥 AtHsp17.6A 蛋白(登录号 Q9XIE3.1)和甘蓝型油菜 BnHSP17.6 蛋白(登录号 XP_013748895.1:1-156)的相似性分别为 86.58%和 85.62%。

2.3 非生物胁迫下沙芥小热激蛋白基因的表达

为了进一步了解沙芥 *PcHSP26.5*、*PcHSP17.8* 对逆境胁迫的响应情况,对沙芥幼苗进行 42 °C 高温、4 °C 低温、200 mmol/L NaCl、100 μmol/L ABA 胁迫和自然干旱再复水处理,利用实时荧光定量 PCR 技术对沙芥 *PcHSP26.5*、*PcHSP17.8* 的表达模式进行分析。结果(表 2)表明,高温处理下,*PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 相对表达量均在高温胁迫 1 h 后达到顶峰,分别为对照的 42 000 倍和 18 000

倍。4 °C 低温处理下,*PcHSP26.5* 相对表达量在 0.5 h 后达到对照的 15 倍,之后开始下降;至胁迫后 12 h,*PcHSP17.8* 的相对表达量均低于对照,24 h 时相对表达量升高,达到对照的 1.7 倍。NaCl 处理下,*PcHSP26.5* 相对表达量在 1 h 时达到顶峰,随后骤然下降,3 h 恢复至对照的 30 倍,6 h 下降,随后持续上升;*PcHSP17.8* 相对表达量在 3 h 达到顶峰,此后开始持续下降。ABA 处理下,*PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 相对表达量均在 2 h 时达到顶峰,随后开始下降,24 h 时有所回升,区别在于 *PcHSP26.5* 相对表达量在 1 h 时开始上升,而 *PcHSP17.8* 相对表达量 1 h 内下降。干旱胁迫 9 d 时,*PcHSP26.5* 相对表达量达到最高,复水 3 d 后,表达量下降至对照的 2.9 倍;*PcHSP17.8* 相对表达量在干旱 9 d 后达到对照的 111 倍,复水后下降至对照的 20 倍。

表 2 非生物胁迫下 *PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 的相对表达量

Table 2 Relative expression level of *PcHSP26.5* and *PcHSP17.8* under abiotic stress

处理	时间/h	基因相对表达量		处理	时间/h	基因相对表达量	
		<i>PcHSP17.8</i>	<i>PcHSP26.5</i>			<i>PcHSP17.8</i>	<i>PcHSP26.5</i>
高温 42°C	0.0	1.00	1.00	低温 4°C	0.0	1.00	1.00
	0.5	9296.56	15 720.00		0.5	0.89	15.55
	1.0	18 137.50	42 424.00		1.0	0.36	4.14
	2.0	769.18	301.28		2.0	0.39	4.40
	3.0	5611.02	7816.00		3.0	0.49	1.73
	6.0	2186.66	952.00		6.0	0.67	2.57
	12.0	14 499.84	15 704.00		12.0	0.48	2.40
	24.0	2113.09	9888.00		24.0	1.69	1.37
NaCl	0.0	1.00	1.00	ABA	0.0	1.00	1.00
	0.5	0.25	0.65		0.5	21.49	0.91
	1.0	8.86	194.86		1.0	5.72	5.46
	2.0	90.36	4.11		2.0	124.87	50.22
	3.0	513.12	30.63		3.0	709.13	19.75
	6.0	24.53	6.39		6.0	33.91	14.59
	12.0	10.45	12.87		12.0	3.31	5.06
	24.0	4.30	23.57		24.0	1.89	20.29
干旱复水	0	1.00	1.00				
	3	2.77	2.39				
	6	4.24	3.57				
	9	111.88	4.85				
	12	20.86	2.94				

3 结论与讨论

小热激蛋白是细胞应对外界高温、干旱、缺氧、重金属等胁迫的第一道防线,具有分子伴侣

功能^[22],能在不依赖 ATP 的情况下阻止逆境胁迫下变性蛋白的累积以及保护蛋白的正确折叠^[23]。基于前期沙芥转录组数据克隆得到的 2 个小热激蛋白基因 *PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8*,均含有 sHSPs

家族典型的 ACD 结构域,证实这 2 个基因属于沙芥小热激蛋白,同时也推测由于这一结构的存在,才使得 PcHSP26.5 和 PcHSP17.8 具有 sHSPs 分子伴侣的功能。系统进化树结果显示, PcHSP26.5 和 PcHSP17.8 分别属于小热激蛋白 MII 亚族和 CI 亚族。同源性比对结果显示, PcHSP26.5 和 PcHSP17.8 与芥菜、拟南芥、甘蓝型油菜的亲缘性较近,推测这主要缘于沙芥与拟南芥、甘蓝型油菜和芥菜均属于十字花科。PcHSP26.5 和 PcHSP17.8 分别包含 6.03%和 5.23%的 β 转角,有助于 PcHSP26.5 和 PcHSP17.8 蛋白形成反向平行结构,进而形成二聚体等发挥功能^[24]。蛋白质磷酸化是蛋白质翻译后修饰过程中较为重要和普遍的调节方式之一, PcHSP26.5 和 PcHSP17.8 分别包含 25 和 15 个磷酸化位点,表明逆境胁迫下, PcHSP26.5 和 PcHSP17.8 蛋白在翻译后可能通过磷酸化修饰发挥抗性作用^[25]。

大量研究表明,小热激蛋白在植物正常生长过程中几乎不表达,但在逆境胁迫后表达量发生成倍变化^[26]。沙芥 *PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 基因在不同胁迫下的表达量有所不同,推测这可能是由于二者分属于 sHSPs 不同亚族的缘故^[27]。已有研究发现,沙芥对高温胁迫有一定耐受力,本研究中,42 °C 高温胁迫 0.5 h 时, *PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 基因的相对表达量即出现显著性变化,胁迫 1 h 时, *PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 基因的相对表达量达到峰值,这与前人研究的结果^[10, 28]相似。在遭遇高温胁迫后,短时间内沙芥 *PcHSP26.5* 基因表达量的增加倍数均高于 *PcHSP17.8* 基因,这与 SANMIYA 等^[29]的研究结果相一致,当植物遭遇热胁迫时,相比于定位在其他细胞器中的小热激蛋白,线粒体的小热激蛋白作用更显著,会加快表达并发挥其功能。

低温胁迫下,沙芥 *PcHSP26.5* 表达量在 0.5 h 时达到顶峰,之后下降,而 *PcHSP17.8* 表达量在胁迫后的 24 h 内变化幅度微弱; NaCl 和 ABA 胁迫下, *PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 表达量均出现上调,表明沙芥 *PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 对低温胁迫响应较弱,但对高盐和脱落酸胁迫响应较强。*PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 的表达均受外源 ABA 诱导,表明二者均属于依赖于 ABA 的胁迫响应基因。干旱胁迫下, *PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 表达量

均呈现出干旱下逐渐上升、复水后下降的趋势,其中 *PcHSP17.8* 在干旱 9 d 后的表达量成百倍上升,表明 *PcHSP26.5* 和 *PcHSP17.8* 均可以响应干旱胁迫,但 *PcHSP17.8* 对干旱胁迫的响应程度更高。这表明生长在沙漠地带、经常同时遭受高温和干旱胁迫的沙芥总群在进化过程中可能已经产生了一定的抵御能力。

参考文献:

- [1] SATO Y, YOKOYA S. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7[J]. *Plant Cell Reports*, 2008, 27(2): 329–334.
- [2] 张翠梅. 不同抗旱性紫花苜蓿响应干旱的生理及分子机制研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2019.
ZHANG C M. Physiological and molecular mechanisms of responses to drought stress in different drought-resistant alfalfa(*Medicago sativa* L.)varieties[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2019.
- [3] 喻娟娟. 星星草(*Puccinellia tenuiflora*)应答 H₂O₂ 的生理与氧化还原蛋白质组学研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2018.
YU J J. Study on the physiology and redox proteomics of *Puccinellia tenuiflora* in response to H₂O₂ stress[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2018.
- [4] BASHA E, O'NEILL H, VIERLING E. Small heat shock proteins and α -crystallins: dynamic proteins with flexible functions[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2012, 37(3): 106–117.
- [5] LOW D, BRANDLE K, NOVER L, et al. Cytosolic heat-stress proteins Hsp17.7 class I and Hsp17.3 class II of tomato act as molecular chaperones in vivo[J]. *Planta*, 2000, 211(4): 575–582.
- [6] SIDDIQUE M, GERNHARD S, KOSKULL-DÖRING P, et al. The plant sHSP superfamily: five new members in *Arabidopsis thaliana* with unexpected properties[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2008, 13(2): 183–197.
- [7] OUYANG Y D, CHEN J, XIE W B, et al. Comprehensive sequence and expression profile analysis of Hsp20 gene family in rice[J]. *Plant Molecular Biology*, 2009, 70(3): 341–357.
- [8] YANG B, SUGIO A, WHITE F F. Avoidance of host recognition by alterations in the repetitive and C-terminal regions of AvrXa7, a type III effector of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18(2): 142–149.
- [9] 张泽, 裴鑫, 鲁仪增. 花椒树小热激蛋白 23.8 基因 (*SpHSP23.8*)克隆与表达分析[J]. *植物资源与环境学报*, 2020, 29(5): 9–20.
ZHANG Z, PEI X, LU Y Z. Cloning and expression analysis on small heat shock protein 23.8 gene (*SpHSP23.8*) in *Sorbus pohuashanensis*[J]. *Journal of*

- Plant Resources and Environment, 2020, 29(5): 9–20.
- [10] ZHANG Z, PEI X, ZHANG R L, et al. Molecular characterization and expression analysis of small heat shock protein 17.3 gene from *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl. in response to abiotic stress[J]. Molecular Biology Reports, 2020, 47(12): 9325–9335.
- [11] SUN X B, ZHU J F, LI X, et al. AsHSP26.8a, a creeping bentgrass small heat shock protein integrates different signaling pathways to modulate plant abiotic stress response[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 184.
- [12] SEWELAM N, KAZAN K, HÜDIG M, et al. The *AtHSP17.4C1* gene expression is mediated by diverse signals that link biotic and abiotic stress factors with ROS and can be a useful molecular marker for oxidative stress[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(13): 3201–3218.
- [13] HUANG L J, CHENG G X, KHAN A, et al. CaHSP16.4, a small heat shock protein gene in pepper, is involved in heat and drought tolerance[J]. Protoplasma, 2019, 256(1): 39–51.
- [14] ZHANG L, HU W J, GAO Y K, et al. A cytosolic class II small heat shock protein, PfHSP17.2, confers resistance to heat, cold, and salt stresses in transgenic *Arabidopsis*[J]. Genetics and Molecular Biology, 2018, 41(3): 649–660.
- [15] 郑清岭. 沙芥属植物干旱胁迫响应机制[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
ZHENG Q L. The response mechanism of drought stress in *Pugionium gaertn* plants[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018.
- [16] 李冬, 王永忠, 张力文. 沙芥荒漠地人工栽培技术[J]. 甘肃农业科技, 2011(8): 54–55.
LI D, WANG Y Z, ZHANG L W. Artificial cultivation technology of sand mustard desert[J]. Gansu Agricultural Science and Technology, 2011(8): 54–55.
- [17] 李丁仁, 袁海静, 刘兰英, 等. 沙芥花茎生长及开花结实习性的观察与研究[J]. 宁夏农林科技, 2008, 49(4): 5–6.
LI D R, YUAN H J, LIU L Y, et al. Observation and research on the growth and flowering and setting practice of *Pugionium cornutum*(L.) Gaertn. flower stalk[J]. Ningxia Agriculture and Forestry Science and Technology, 2008, 49(4): 5–6.
- [18] 袁学松. 肉桂酸处理对沙芥属幼苗生理生化基础的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.
YUAN X S. Effects of cinnamic acid treatment on the physiological and biochemical basis of *Pugionium cornutum*(L.) Gaertn. seedling[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019.
- [19] 张小飞. 榆林市榆阳区沙芥病虫害调查及其防治药剂筛选[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
ZHANG X F. Investigation on diseases and insect pests of *Arabidopsis thaliana* in Yuyang district, Yulin city and selection of its control[D]. Yangling, China: Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, 2018.
- [20] 薛焕焕. 沙芥营养成分和沙芥多酚的提取、纯化及其生物活性研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2018.
XUE H H. Study on the extraction, purification and biological activity of *Pugionium cornutum*(L.) Gaertn. nutrient components and *Pugionium cornutum*(L.) Gaertn. polyphenols[D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2018.
- [21] WANG P, WANG F F, YANG J. De novo assembly and analysis of the *Pugionium cornutum* (L.) Gaertn. transcriptome and identification of genes involved in the drought response[J]. Gene, 2017, 626: 290–297.
- [22] JAKOB U, GAESTEL M, ENGEL K, et al. Small heat shock proteins are molecular chaperones[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(3): 1517–1520.
- [23] BEISSINGER M, BUCHNER J. How chaperones fold proteins[J]. Biological Chemistry, 1998, 379(3): 245–259.
- [24] STAMLER R, KAPP É G, BOELEN W, et al. Wrapping the Cl-crystallin domain fold in a chaperone assembly[J]. Journal of Molecular Biology, 2005, 353(1): 68–79.
- [25] HASLBECK M, FRANZMANN T, WEINFURTNER D, et al. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins[J]. Nature Structural Molecular Biology, 2005, 12(10): 842–846.
- [26] 王明强, 张道远. 植物热激蛋白 70 基因家族及其生物学功能研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(2): 421–428.
WANG M Q, ZHANG D Y. Research advance of heat shock protein 70 gene family and its biological functions in plant[J]. Genomics and Applied Biology, 2015, 34(2): 421–428.
- [27] 俞佳虹. 番茄小热激蛋白 *SlHsp20* 基因家族的全基因组鉴定及表达分析[D]. 金华: 浙江师范大学, 2017.
YU J H. Genome-wide identification and expression profiling of the *SlHsp20* gene family in tomato[D]. Jinhua, China: Zhejiang Normal University, 2017.
- [28] 王明乐, 朱旭君, 王伟东, 等. 茶树小分子量热激蛋白基因 *CsHSP17.2* 的克隆与表达分析[J]. 南京农业大学学报, 2015, 38(3): 389–394.
WANG M L, ZHU X J, WANG W D, et al. Molecular cloning and expression analysis of low molecular weight heat shock protein gene *CsHSP17.2* from *Camellia sinensis*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2015, 38(3): 389–394.
- [29] SANMIYA K, SUZUKI K, EGAWA Y, et al. Mitochondrial small heat-shock protein enhances thermotolerance in tobacco plants[J]. FEBS Letters, 2004, 557(1/2/3): 265–268.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维