

杨青青, 杨 峰, 赵永强, 等. 大蒜热激转录因子基因 *AsHSFB1* 的克隆、亚细胞定位及其表达分析[J]. 江苏农业学报, 2023, 39( 1 ): 169-177.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.01.020

## 大蒜热激转录因子基因 *AsHSFB1* 的克隆、亚细胞定位及其表达分析

杨青青, 杨 峰, 赵永强, 陆信娟, 刘灿玉, 葛 洁, 张碧薇, 樊继德

(江苏徐淮地区徐州农业科学研究所, 江苏 徐州 221121)

**摘要:** 热激转录因子(HSF)基因是植物热胁迫响应的重要转录调节基因,在植物胁迫应答和其他抗逆反应过程中起着关键作用。为研究大蒜热激反应的分子机制,本研究基于大蒜转录组数据,以徐蒜6号为试验材料,采用同源克隆方法获得编码HSF的*AsHSFB1*基因。序列分析结果显示,*AsHSFB1*含有882 bp的开放阅读框,编码293个氨基酸,其蛋白质含有热激转录因子的特征结构域。在进化关系上,*AsHSFB1*与拟南芥AT4G11660(*AtHSFB2B*)同源性最高。亚细胞定位结果表明,*AsHSFB1*蛋白主要定位在细胞核和细胞质上。本研究采用同源重组技术成功构建pCambia1305-*AsHSFB1*过表达载体,为进一步研究该转录因子基因的功能,培育耐热大蒜品种奠定基础。RT-PCR分析结果表明,不同大蒜品种中,*AsHSFB1*基因在叶片中相对表达水平均最高,具有组织表达特异性;38℃高温胁迫处理下,徐蒜6号中的*AsHSFB1*基因相对表达水平在24 h时明显上调;4℃低温胁迫下,徐蒜815和徐蒜6号中*AsHSFB1*基因相对表达水平的变化趋势相似,均先上升后下降,在处理4 h时相对表达水平达到峰值。

**关键词:** 大蒜; *AsHSFB1* 基因; 同源重组技术; 亚细胞定位; 相对表达水平

中图分类号: S633.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2023)01-0169-09

## Cloning, subcellular localization and expression analysis of garlic heat shock transcription factor gene *AsHSFB1*

YANG Qing-qing, YANG Feng, ZHAO Yong-qiang, LU Xin-juan, LIU Can-yu, GE Jie, ZHANG Bi-wei, FAN Ji-de

(Xuzhou Institute of Agricultural Sciences in Jiangsu Xuhuai Area, Xuzhou 221121, China)

**Abstract:** Heat shock transcription factor (HSF) is an important transcription regulation gene and plays a key role in plant stress response and other stress tolerance processes. In order to investigate the molecular mechanism of heat stress response in garlic, based on the transcriptome data of garlic, the experiment was conducted to obtain *AsHSFB1* gene. This gene encoding HSF transcription factor was isolated by homologous cloning of Xusuan NO.6. Sequence analysis indicated that open reading frame (ORF) length of *AsHSFB1* was 882 bp, encoding 293 amino acids. Its protein contained characteristic domain of heat shock transcription factor. Phylogenetic tree analysis result showed that *AsHSFB1* was close to AT4G11660 (*AtHSFB2B*). Subcellular localization results showed that *AsHSFB1* was mainly localized in the nucleus and cytoplasm. In this study, overexpression vector pCambia1305-*AsHSFB1* was successfully constructed by homologous re-

combination technology, which provided a theoretical basis for the subsequent study on the function of *AsHSFB1* gene and the cultivation of heat-resistant garlic varieties. RT-PCR analysis showed that the relative expression level of *AsHSFB1* gene in garlic leaves was highest, indicating that it had tissue specificity. Compared with the control, the relative expression level of *AsHSFB1* gene in Xusuan No.6

收稿日期: 2022-04-28

基金项目: 徐州市基础 Research 计划面上项目(KC21032); 江苏省农业科学院探索性项目[ZX(21)1229]

作者简介: 杨青青(1994-), 女, 河南洛阳人, 硕士, 研究实习员, 主要从事大蒜分子生物学研究。(E-mail) 2521918664@qq.com

通讯作者: 樊继德, (E-mail) fanjide@163.com

increased significantly at 24 h under 38 °C high temperature stress. Under 4 °C low temperature stress, the relative expression level of *AsHSFBI* gene in Xusuan No.6 and Xusuan 815 showed a similar trend, which increased first and then decreased and reached the peak at 4 h.

**Key words:** garlic; *AsHSFBI* gene; homologous recombination technology; subcellular localization; relative expression level

随着全球气候的变化,热胁迫已成为限制植物代谢和作物生产力的主要环境胁迫之一<sup>[1-2]</sup>。热激反应是真核生物响应热胁迫广泛存在的保守进化反应,通常表现为停止正常的蛋白质合成和细胞活动以实现热激蛋白(HSP)的表达<sup>[3-4]</sup>。热激转录因子(HSF)可以通过直接或间接调控一些应答基因的表达来调节植物对高温胁迫的响应<sup>[5-6]</sup>。

*HSF* 基因在植物中普遍存在,其数量、结构和调控过程远比动物体内的 *HSF* 复杂。目前根据序列相似性和寡聚化结构域的结构特征,可以将植物 *HSF* 基因家族成员划分 Class A、Class B 和 Class C 3 类<sup>[7]</sup>。*HSF* 结构一般由识别并结合热激元件(HSE)的 N 端 DNA 结合域、调控 HSP 转录的寡聚化结构域、核定位信号和核输出信号组成<sup>[8]</sup>。Scharf 等<sup>[9]</sup>首次在番茄中克隆得到 *HSF* 基因。Mishra 等<sup>[10]</sup>对番茄植株进行高温处理,发现 *SlHsfA1* 基因的表达量显著增加。在拟南芥 *HSFA2* 基因的热胁迫研究中发现,该基因在高温胁迫下大量表达,可能主导了拟南芥的抗高温胁迫响应<sup>[11]</sup>。Li 等<sup>[12]</sup>发现,玉米 *ZmHsf06* 基因可能在提高过表达拟南芥植株的耐高温、抗旱能力中发挥主要作用。在 42 °C 高温处理下,不同时间段百合 *LHsf1* 基因均有响应,证实该基因与百合的耐热性相关<sup>[13]</sup>。此外,有研究发现,HSF 转录因子还参与调控植物配子形成和根发育等过程<sup>[14]</sup>。例如,在拟南芥和向日葵中,发现 *HsfA9* 与胚胎发育、种子形成有关<sup>[15-16]</sup>。因而挖掘植物 HSF 相关基因,对植物耐热性分子机制与育种途径、耐热性生理基础等研究具有重要意义。

大蒜(*Allium sativum* L.)是具有医药作用的蔬菜作物,在世界范围内广泛种植<sup>[17-18]</sup>。大蒜植株的耐寒能力较强,但不耐高温,是低温长日照作物,因此在栽培过程中,高温天气会严重影响大蒜的产量和品质<sup>[19-20]</sup>。但目前关于大蒜中 *AsHSFBI* 的表达是否响应高温、低温胁迫的研究却鲜有报道。本研究拟对大蒜中 *AsHSFBI* 基因进行克隆,并进行生物信息学分析,研究其在特定温度下的表达特性,以期

为进一步探索其功能提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料及其试验设计

以徐蒜 6 号、徐蒜 815(江苏徐淮地区徐州农业科学研究所园艺研究室保存)为试验材料,选取已经解除休眠、饱满、无伤的鳞茎,播种于基质中,14 d 之后将大蒜幼苗移栽到添加霍格兰氏(Hoagland)营养液的水培箱中。此外,选择生长一致、健壮的植株进行高温(38 °C)、低温(4 °C)胁迫处理。空气相对湿度设置为 30%,每个处理重复 3 次。在处理 0 h、4 h、8 h、24 h 和 48 h 时取大蒜植株上部叶片,用液氮冷冻,并在 -80 °C 条件下储存备用。

### 1.2 RNA 提取和 cDNA 反转录

利用 RNA 提取试剂盒提取大蒜的 RNA,并使用反转录试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix 将 RNA 反转录为 cDNA,并将该 cDNA 用去离子水稀释 15 倍用于基因克隆。

### 1.3 *AsHSFBI* 基因的扩增

根据课题组建立的大蒜转录组数据库,检索得到大蒜 *AsHSFBI* 基因序列。使用软件 Primer Premier 6 设计 *AsHSFBI* 基因全长引物,根据同源重组引物设计原则,选择 *Bam* H I、*Hind* III 2 个限制性内切酶,设计克隆正向引物:5'-CGGGATCCCCGATGACGC-CAGCGGTCGAT-3')和反向引物 5'-CGAAGCTTCGT-CACATTGCACTATGCTTTCTCCC-3'。程序设置为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,54 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 60 s,共 34 个循环;72 °C 延伸 10 min。回收 PCR 目的条带。本研究所有引物合成、测序工作均由生物工程(上海)股份有限公司完成。

### 1.4 利用同源重组法构建大蒜 *AsHSFBI* 基因表达载体

利用 *Bam* H I、*Hind* III 2 个内切酶对 pCAMBIA1305 载体进行双酶切,获得线性化的载体,将含有酶切位点的目的片段重组到 pCAMBIA1305 空载体上,转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,筛选阳性克隆测序。

### 1.5 大蒜 *AsHSFB1* 基因的生物信息学分析

不同植物的 *HSFB1* 氨基酸序列比对利用 DNA-MAN 6.0 软件完成;运用 ExPASy 蛋白质组分析工具中的 Prot-Param (<http://www.expasy.ch/tools/prot-param.html>) 分析蛋白质的基本性质;利用 CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) 预测大蒜 *AsHSFB1* 氨基酸保守域;用 SOPMA 软件对大蒜 *AsHSFB1* 蛋白进行二级结构预测及分析;利用 MEGA 5.0 软件以 Neighbor-Joining 算法构建系统发育树<sup>[21]</sup>;运用 plant-CARE 在线分析工具分析 *AsHSFB1* 启动子。

### 1.6 *AsHSFB1* 蛋白的亚细胞定位

利用基因和载体的序列设计、重组新的引物,对去掉终止密码子的 *AsHSFB1* 基因进行扩增。选取 *Bsa* I/*Eco*31 I 酶切位点,设计特异性引物(正向引物 5'-CAGTCGTCTCACAACATGACGCCAGCGGTCGATTAC-3', 反向引物 5'-CAGTCGTCTCATACACATTGCACTATGCTTCTCCCCAACGG-3')来扩增 *AsHSFB1* 基因,切胶回收 PCR 产物检测无误后与线性化载体 pBWA(V) HS-*GFP* 进行连接,连接产物转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,挑取阳性单克隆进行测序验证后,即获得重组质粒 pBWA(V) HS-*AsHSFB1-GFP*,利用电击法将其重组融合表达载体 pBWA(V) HS-*AsHSFB1-GFP* 导入农杆菌 GV3101。通过悬浮农杆菌、收集菌体,再经过重悬后,用 1 ml 注射器分别将含有绿色荧光蛋白(GFP)和 pBWA(V) HS-*AsHSFB1-GFP* 的缓冲液注射到 30 d 左右苗龄烟草的叶片背面,将侵染后的烟草弱光培养 48 h 后使用激光共聚焦显微镜观察亚细胞定位情况。

### 1.7 RT-qPCR 分析

使用 Primer Premier 6 软件设计 *AsHSFB1* 基因的 RT-qPCR 定量引物(正向引物:5'-CAGCAG-CAGTGACAGTAG-3', 反向引物:5'-CTTGACATA-AGCGAGTAGA-3')。选择 *SNAD* 基因作为大蒜内参基因(BD-SAND-F:5'-GCGTCAACGAATGTTCCAATTACCA-3', BD-SAND-R:5'-TCTCTTCAGTCTCAACTTCATCAGCAT-3')。通过 IQTM5 Real-time PCR System 完成 RT-qPCR 检测。基因相对表达水平的计算采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法<sup>[22]</sup>。

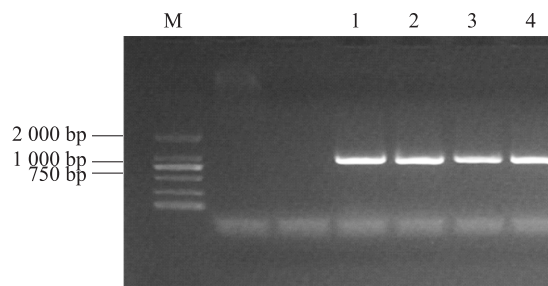
## 2 结果与分析

### 2.1 大蒜 *AsHSFB1* 基因的克隆及其编码的蛋白质理化性质的分析

以徐蒜 6 号未经胁迫处理叶片的 cDNA 为模板

进行扩增,得到 1 个长约 800 bp 的目的片段(图 1)。测序结果显示 *AsHSFB1* 基因含有 1 个长度为 882 bp 的开放阅读框,编码 293 个氨基酸。NCBI BlastP 结果显示,*AsHSFB1* 属于 HSF 家族成员。

通过 ExPASy-ProtParam 预测显示 *AsHSFB1* 蛋白的分子式为  $C_{1363}H_{2170}N_{388}O_{447}S_{11}$ , 相对分子质量为  $3.149 \times 10^4$ , 理论等电点(*pI*) 为 6.76, 带正电荷的残基总数[精氨酸(Arg)+赖氨酸(Lys)] 为 33 个, 带负电荷的残基总数[天冬氨酸(Asp)+谷氨酸(Glu)] 为 33 个;不稳定系数为 53.37, 说明 *AsHSFB1* 蛋白属于不稳定蛋白质;*AsHSFB1* 蛋白富含丝氨酸(Ser, 14.7%)、甘氨酸(Gly, 8.2%)、亮氨酸(Leu, 7.5%)(图 2)。*AsHSFB1* 蛋白的二级结构主要由螺旋(33.11%)、延伸结构(12.36%)、转角(4.1%)和无规则卷曲(50.17%)构成。



1~4: *AsHSFB1* 基因扩增产物;M: Marker DL5000。

图 1 *AsHSFB1* 基因的 PCR 扩增图谱

Fig.1 PCR amplification pattern of *AsHSFB1* gene

### 2.2 大蒜 *AsHSFB1* 基因相关生物信息学分析

2.2.1 保守域结构预测 通过 NCBI CDS 对徐蒜 6 号中 *AsHSFB1* 蛋白的保守域进行预测,结果(图 3)表明,*AsHSFB1* 的第 14 位至第 106 位氨基酸间含有 HSF-DNA 结构域,属于 HSF 家族。

2.2.2 同源性比对分析 将大蒜 *AsHSFB1* 与 NCBI 数据库中水仙(*Narcissus tazetta*, 登录号: QBC36000.1)、薯蓣(*Dioscorea cayenensis*, 登录号: QBC36000.1)、杨梅(*Morella rubra*, 登录号: KAB1210726.1)、金杜鹃(*Rhodamnia argentea*, 登录号: XP\_030536717.1)和猕猴桃(*Actinidia chinensis*, 登录号: PSR93425.1)5 种植物的 *HSFB1* 氨基酸序列通过 DNAMAN 6.0 进行序列比对,结果(图 4)表明,大蒜 *AsHSFB1* 氨基酸序列与水仙、金杜鹃的 *HSFB1* 氨基酸序列的一致性较高,说明 *HSFB1* 具有较高的保守性。

2.2.3 亲水性/疏水性分析 对大蒜的 *AsHSFB1* 蛋

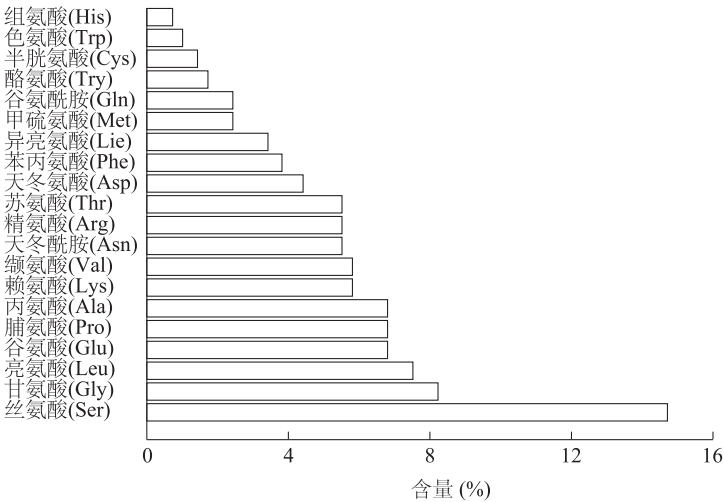


图 2 大蒜 AsHSFB1 中各氨基酸含量  
Fig.2 The content of amino acids of AsHSFB1 from garlic

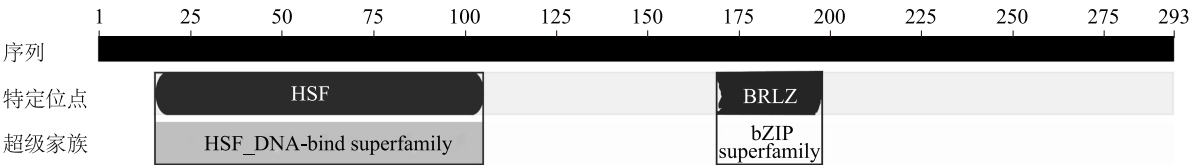


图 3 大蒜 AsHSFB1 氨基酸序列的保守域预测  
Fig.3 Prediction of conserved domain of the amino acid sequence of AsHSFB1 from garlic

AsHSFB1	.....MTPAVDSPLESLPTFFLLKTYQLVDDPASDDLIISWMDGSAFVWKEAEFARLLLPKMFKHNNFSS	67
NtHSFB1	MPTAAESTGESTSTAPAGAAEQRSLPTFFLLSKTYQLVDDSSVDDVISWMDGSAFVWKEAEFARLLLPKMFKHNNFSS	80
DcHSFB1	...MAPPTGDQTA.ATTAGDGRSLPTFFLLKTYQLVDDPAIDDVISWMDGSAFVWKEAEFARLLLPKMFKHNNFSS	75
MrHSFB1	...MAPP.VEQNG.ESTSGDGRSLPTFFLLKTYQLVDDHTIDDVISWMDGSAFVWKEAEFARLLLPKMFKHNNFSS	74
RaHSFB1	...MAPPPVEHSCDAAASGESORSLPTFFLLKTYQLVDDRAIDDVISWMDGSAFVWKEAEFARLLLPKMFKHNNFSS	76
AcHSFB1	...MAPPPGEQNGESAAGGRSLPTFFLLKTYQLVDDPSIDDVISWMDGSAFVWKEAEFARLLLPKMFKHNNFSS	76
AsHSFB1	FVRQLNTYGRKIVPDRWEESNESEFRKGEKRLRETCRRKISTPGT.PTTPTTAATVAAAAAVTVAIPANLSSSSNSGE	146
NtHSFB1	FVRQLNTYGRKIVPDRWEESNDAPRRGEKRLICDTCRRKISVGAS.PSPVTVAETIP..AATLVAVPEIHGGSPNSGE	157
DcHSFB1	FVRQLNTYGRKIVPDRWEESNDQFRKGEKRLICDTCRRKISPAAGATFVQAAVTVA.....PPNRTGSFTNSGD	147
MrHSFB1	FVRQLNTYGRKIVPDRWEESNECFRGEKRLIRETCRRKISSAV.TDPAPATVAIPL.....SAKPIVSPNSGE	145
RaHSFB1	FVRQLNTYGRKIVPDRWEESNDQFRGEKRLIRETCRRKISASPP.APTVAPASAVP.....VARPRASENSGD	146
AcHSFB1	FVRQLNTYGRKIVPDRWEESNECFRGEKRLIGDTCRRKITT.....PAAVSTLP.....AAQGTGSPNSGE	141
AsHSFB1	ECVSSNSPFP...SVTIAACSSDILBENERLRRENSRLSNEIGKMKNLGNTIYSLMSKYG.....GESPSAGA	215
NtHSFB1	ECGLSTSSPQ.....GLTPPP.TSSDLVBENERLSENKRLSNEIGKMKSLGNTIYSLMSNYG.....GSSGSSAA	223
DcHSFB1	ECVLSNSPFPQALASCPGSGASAAELMDENERLRRENSQLSHELSEMTLQDNLILLMSKYASARNGTSGLTGSS	227
MrHSFB1	ECVISANSPT.....AAPGLDLDENERLRRENSQLSKELAEVKSLLGNITFLMSNEA.....SNNPFEST	206
RaHSFB1	ECWISSPVCV.....QNCAAEIMDENERLRRENSQLSHELSEMTLQDNLILLMSKYASARNGTSGLTGSS	209
AcHSFB1	ECVISNTSPRE.....TSFGSTTEIVDENERLRRENSQLSHELSEMTLQDNLILLMSKYASARNGTSGLTGSS	206
AsHSFB1	G...VEINIMPGQMSEVTQE....CTKIFGVSTGSKGRPE.....VNSKVLEEFISGSGSG...S	267
NtHSFB1	VPRAEALDILP...ARTEEE....FTRIFGVSTGSKGRPEE...VQNPMSGSEAPDVKMEPVES	282
DcHSFB1	GP...PPFPQSTSPPEEAPGRVEET...SSPRLECVFICTKRADEDEEEP.....QRVKPEFL...SGSD...	284
MrHSFB1	G...KQLDILFVKRFAGETHHTETKTSARLEGVATIGCKRGESGLAADDTELRLQPPGAGVAKSEPL...CES...	275
RaHSFB1	AG...KKPLALFEGEMEAEE...ESPKLFGVETGAKRGDEAG.....TEIKLEPID...RPNR...	261
AcHSFB1	QA...VKPILMPPKRTDNKADGKFEDEARLEGISIYAKRLREGGEAAEQHEELQLQ.LGVGEVKSSEPL...HRN...	276
AsHSFB1	GSSGSGSGSNLDCMDKSPGRKHSAM.....	293
NtHSFB1	GSDPRDEGEWMHCYSHRNANDRRH.....	306
DcHSFB1	.PQDDPQDHQITWTYRFRFNRRVCNAFTDHV	314
MrHSFB1	.NGEDAKSPWLNRYRHWNNSVCVN.....	299
RaHSFB1	.NNQSRREEFWM..KQFHRSNQRFVN.....	283
AcHSFB1	.VGDEETFWL..KQCNRTNQLCN.....	298

NtHSFB1:水仙(*Narcissus tazetta*);DcHSFB1:薯蓣(*Dioscorea cayenensis*);MrHSFB1:杨梅(*Morella rubra*);RaHSFB1:金杜鹃(*Rhodamnia argentea*);AcHSFB1:猕猴桃(*Actinidia chinensis*)。

图 4 AsHSFB1 与其他物种同源蛋白质氨基酸序列比对  
Fig.4 Amino acid sequence alignment of AsHSFB1 with other homologous proteins



白进行疏水性/亲水性预测,结果(图5)表明,该蛋白质的亲水性平均系数(*GRAVY*)为-0.502,具有较强的亲水性,属于亲水性蛋白质。

**2.2.4 *AsHSFB1* 进化树的分析** 通过 MEGA 5.0 软件对大蒜 *AsHSFB1* 与拟南芥 HSF 家族进行同源性分析。图6显示,*AsHSFB1* 与 AT4G11660、AT5G62020.1、AT2G41690 进化距离最近,且属于同一分支。*AsHSFB1* 与 AT4G11660(*AtHSFB2B*)的同源性最高,其次与 AT5G62020.1(*AtHSFB2A*)类热激转录因子的同源性也比较高,因此,大蒜 *AsHSFB1* 属于 HSF 亚家族成员。

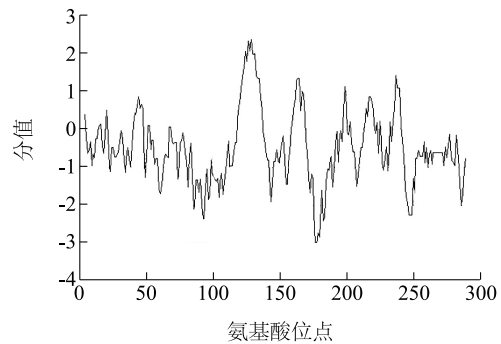


图5 *AsHSFB1* 蛋白亲水性/疏水性分析

Fig.5 Hydrophobicity and hydrophilicity of *AsHSFB1*

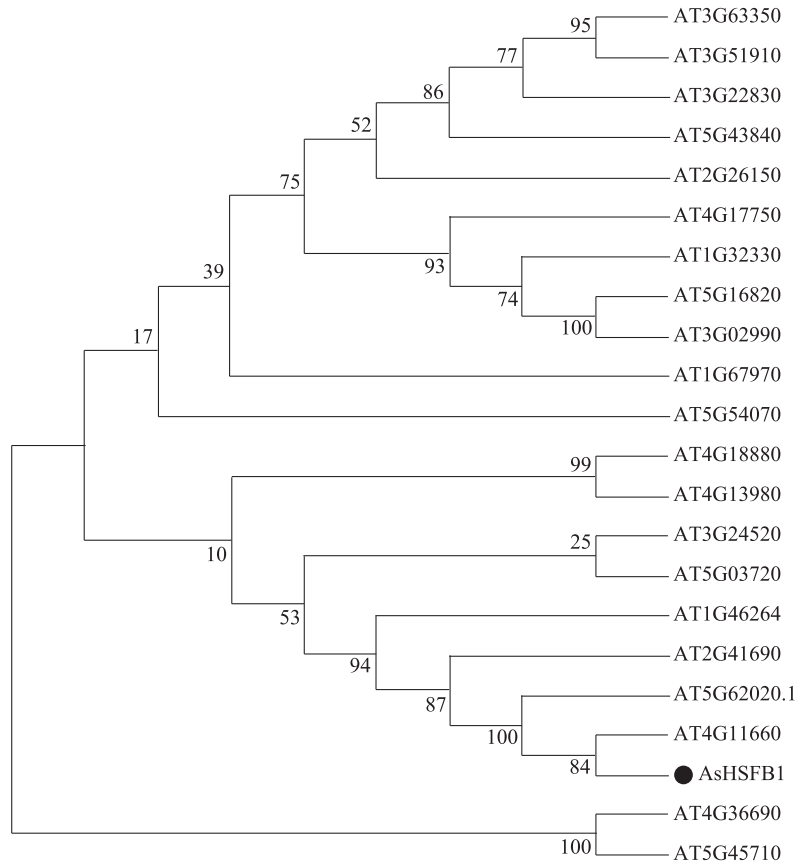


图6 大蒜、拟南芥 HSF 蛋白系统进化树

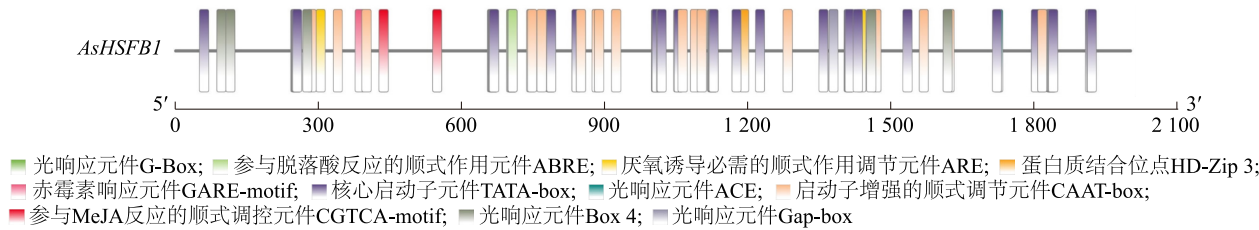
Fig.6 Phylogenetic tree analysis of HSF protein from garlic and *Arabidopsis thaliana*

**2.2.5 *AsHSFB1* 启动子的生物信息学分析** 利用 PlantCARE 启动子预测元件分析 *AsHSFB1* 启动子的顺式调节元件,并列出 11 种常见的元件(图7、表1),这些元件包括厌氧诱导必需的顺式作用调节元件 ARE,赤霉素响应元件 GARE-motif,参与 MeJA 反应的顺式调控元件 CGTCA-motif,参与脱落酸反应的顺式作用元件 ABRE,核心启动子元件 TATA-box,蛋白质结合位点 HD-Zip3,启动子增强的顺式

调节元件 CAAT-box 以及 4 个光响应元件( Box 4、G-Box、Gap-box 和 ACE)。

### 2.3 基于同源重组克隆技术构建大蒜 *AsHSFB1* 表达载体

将重组得到 pCambia1305-*AsHSFB1* 质粒进行酶切鉴定,能够切出大小为 800 bp 左右的片段(图8),说明成功构建了 pCambia1305-*AsHSFB1* 植物过表达载体(图9)。



不同颜色的片段是推定的元素序列。

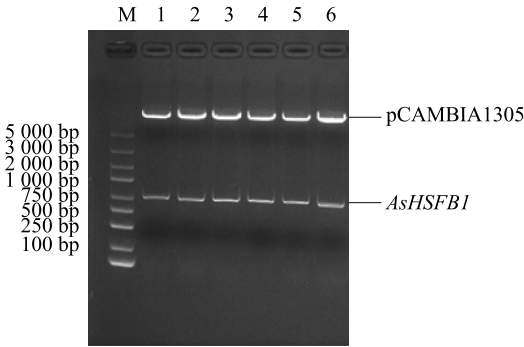
图 7 大蒜 *AsHSFB1* 启动子的顺式元件分析

Fig.7 Cis-elements analysis of *AsHSFB1* gene promoter in garlic

表 1 PlantCARE 预测大蒜 *AsHSFB1* 启动子结果

Table 1 Prediction results of *AsHSFB1* promoter in garlic by PlantCARE

顺式作用元件	序列	功能	数量
G-Box	ACACGTGGC	光响应元件	3
ARE	AAACCA	厌氧诱导必需的顺式作用元件	2
GARE-motif	TCTGTTC	赤霉素响应元件	1
ACE	CTAACGTATT	光响应元件	1
CGTCA-motif	CGTCA	参与 MeJA 反应的顺式调控元件	2
Gap-box	CAAATGAA(A/G)A	光响应元件	1
ABRE	ACGTG	参与脱落酸反应的顺式作用元件	3
HD-Zip3	GTAAT(G/C)ATTAC	蛋白质结合位点	1
TATA-box	TATA	核心启动子元件	45
CAAT-box	CAAT	启动子增强的顺式调节元件	18
Box 4	ATTAAT	光响应元件	5



M:5 000 marker;1~6:pCambia1305-*AsHSFB1* 重组质粒。

图 8 *Bam* H I、*Hind* III 双酶切 pCambia1305-*AsHSFB1* 质粒电泳结果

Fig.8 Electrophoresis results of pCambia1305-*AsHSFB1* digested by *Bam* H I and *Hind* III

2.4 大蒜 *AsHSFB1* 蛋白亚细胞定位

为明确 *AsHSFB1* 在细胞中的位置,以 *GFP* 空载体为阳性对照,在本氏烟草中进行亚细胞定位测定。图 10 显示,细胞核及细胞质上均有荧光信号,说明 *AsHSFB1* 蛋白主要定位在细胞核和细胞质中。

2.5 *AsHSFB1* 基因在不同组织中、不同温度处理下的表达

RT-qPCR 分析结果(图 11)表明,徐蒜 815、徐蒜 6 号 *AsHSFB1* 基因在叶片中的相对表达水平均表现为显著高于其在根和鳞茎中的相对表达水平,而根和鳞茎间 *AsHSFB1* 基因的相对表达水平差异不显著。

图 12 显示,38 ℃ 高温处理下,徐蒜 815 中 *AsHSFB1* 相对表达水平在高温处理 4 h、24 h 时与 0 h(对照)相比显著升高,在处理 24 h 时达到峰值,是

对照的 12.48 倍;徐蒜 6 号中 *AsHSFB1* 相对表达水平在高温处理 24 h 时达到最高,是对照的 17.82 倍。4 ℃ 低温处理下,随着处理时间的增长,徐蒜 815 和徐蒜 6 号中 *AsHSFB1* 基因的相对表达水平均呈现先升高后下降的趋势,并且均在处理 4 h 和 48 h 分别达到最高和最低。

3 讨论

在热激反应中 HSF 作为关键调控因子,主要通过调控下游热激蛋白基因以及耐热性相关基因的表达来发挥抗逆作用<sup>[23-24]</sup>。当植物遭受高温胁迫时,HSF 不再以单体的形式存在于细胞质中,而是形成特殊结构三聚体进入细胞核,通过特异性识别启动子区的热激元件来激活热激基因转录,进而生成 HSP 来抵抗高温胁迫<sup>[25-26]</sup>。本研究从大蒜品种徐蒜 6 号中克隆得到 *AsHSFB1* 基因,保守结构域分析结果表明 *AsHSFB1* 属于 HSF 家族,具有典型的 HSF-DNA 结构域。通过多重序列比对分析,发现大蒜 *AsHSFB1* 氨基酸序列与水仙、金杜鹃 HSF1 氨

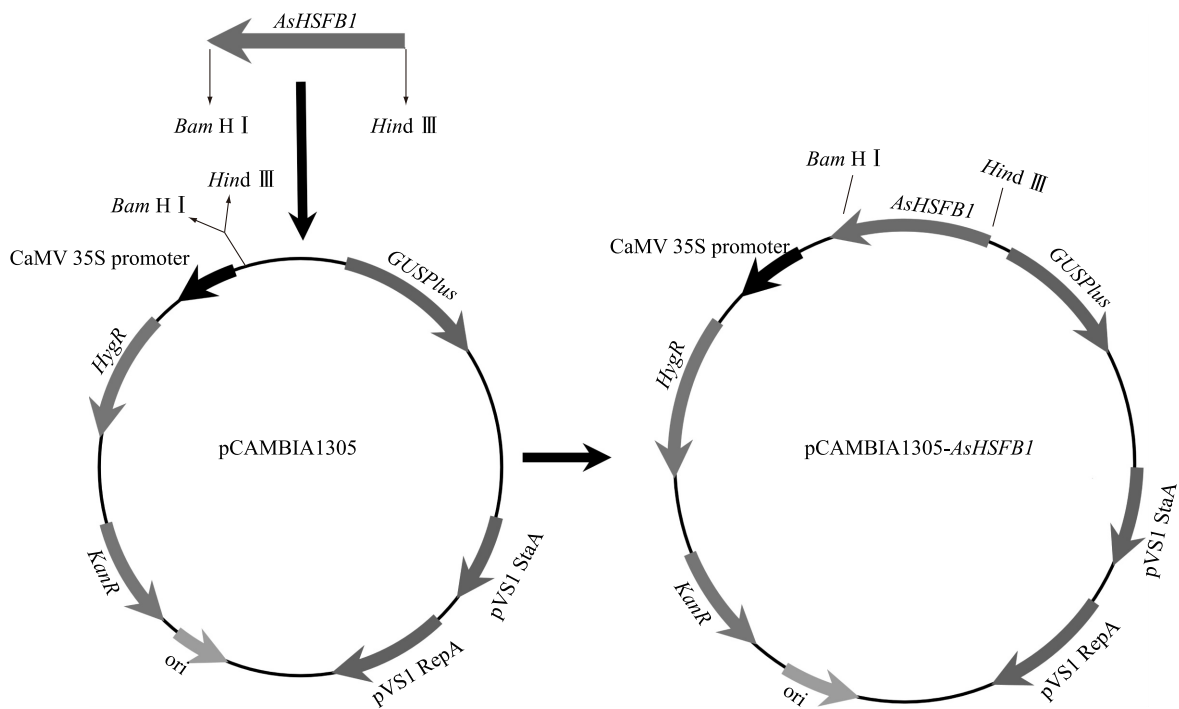


图 9 植物表达载体 pCambia1305-*AsHSFB1* 的构建

Fig.9 Construction of plant expression vector pCambia1305-*AsHSFB1*

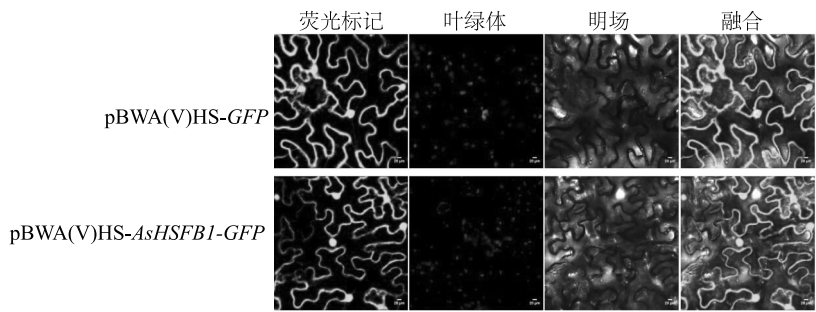
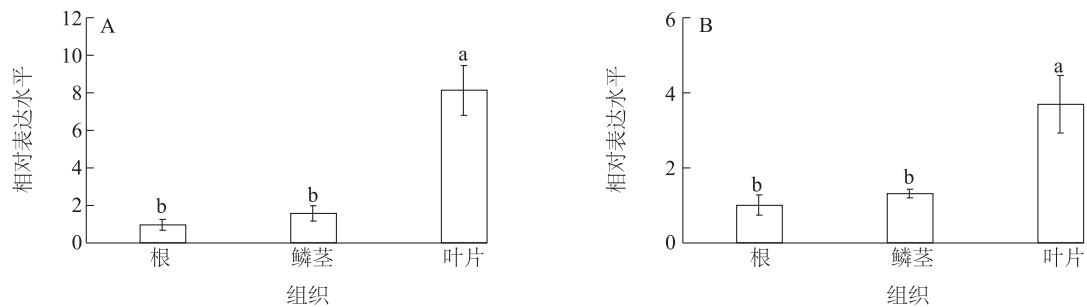


图 10 *AsHSFB1* 蛋白亚细胞定位结果

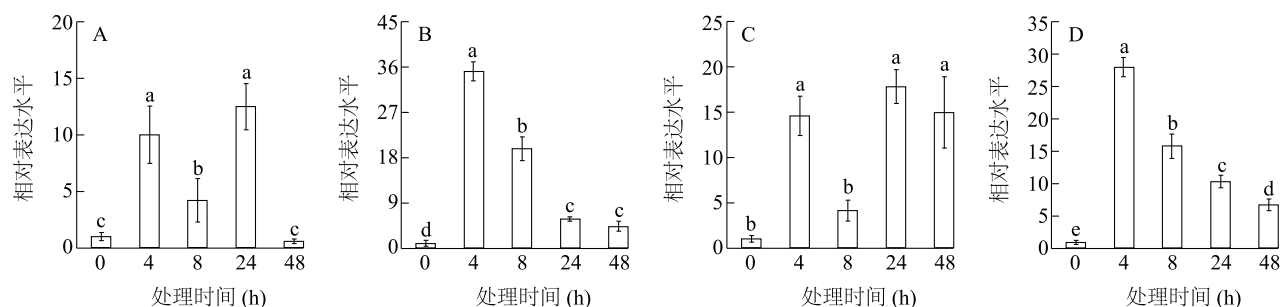
Fig.10 Subcellular localization of *AsHSFB1* protein



A:徐蒜 815;B:徐蒜 6 号。图中不同小写字母表示不同组织的 *AsHSFB1* 相对表达水平间差异显著 ( $P<0.05$ )。

图 11 *AsHSFB1* 基因在大蒜不同组织的相对表达水平

Fig.11 Relative expression level of *AsHSFB1* gene in different tissues of garlic



A: 徐蒜 815 号 38 °C 高温处理; B: 徐蒜 815 号 4 °C 低温处理; C: 徐蒜 6 号 38 °C 高温处理; D: 徐蒜 6 号 4 °C 低温处理。图中不同小写字母表示不同处理时间的 *AsHSFB1* 相对表达水平间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 12 在高温、低温处理下大蒜 *AsHSFB1* 基因的相对表达水平

Fig.12 Relative expression level of *AsHSFB1* gene in garlic under different temperature treatments

基酸序列的一致性较高,表明 HSFBL 具有较高的保守性。大蒜 *AsHSFB1* 与拟南芥 HSF 家族成员构建的进化树显示,大蒜 *AsHSFB1* 属于 HSF 亚家族成员。RT-qPCR 结果显示:不同大蒜品种中 *AsHSFB1* 基因对 38 °C 高温和 4 °C 低温 2 种逆境环境均有响应。对大蒜 *AsHSFB1* 基因表达特性进行深入研究,发现不同品种大蒜 *AsHSFB1* 基因在不同组织(根、鳞茎、叶片)中均有表达且具有组织表达特异性,在叶片中的相对表达水平最高。

目前,关于植物中 HSF 家族 B 亚族的研究并不多。在番茄中,HSFB1 作为协同激活因子,与 HSFA 家族成员共同参与对高温胁迫的调节<sup>[27]</sup>。拟南芥中过表达鹰嘴豆 *CarHSFB2* 基因增强了拟南芥的耐热性<sup>[28]</sup>。拟南芥中的 HSFB2a、HSFB2b 可以通过与 HSFA1a、HSFA1b 结合,从而提高拟南芥的耐热性,属于热诱导型转录因子<sup>[29]</sup>。由于大蒜 *AsHSFB1* 是 HSF 亚家族成员,而 B 亚家族成员不含芳香族-疏水-酸性氨基酸尾巴(AHA)序列,因此大蒜 *AsHSFB1* 基因可能是通过与 *HSFA* 类基因的协同作用来增强植株的抗热能力。在魔芋<sup>[30]</sup>和香石竹<sup>[31]</sup>中都成功克隆到 *HSFB1* 基因,发现魔芋 *AaHSFB1* 和香石竹 *DcHSFB1* 蛋白 N 端均有典型的 DBD 结构域,这一点与大蒜 *AsHSFB1* 蛋白 N 端也具有 DBD 结构域的结果一致,并且大蒜 *AsHSFB1* 与来源于其他物种的 *HSFB1* 均存在 HSF 保守结构域。*HSFB* 基因的表达存在物种、组织的差异,芹菜品种津南实芹中 *AgHSFB2* 基因在叶片和根中的相对表达水平明显高于茎<sup>[32]</sup>。魔芋 *AaHSFB1* 基因在球茎中的表达量低于根和叶片<sup>[30]</sup>。在本研究中,大蒜 *AsHSFB1* 基因在叶片中的相对表达水平显著高于根和鳞茎。

通过对大蒜幼苗进行高温、低温逆境胁迫处理,在不同的处理时间(0 h、4 h、8 h、24 h 和 48 h)进行取样,可以较为深入地研究温度对大蒜 *AsHSFB1* 表达模式的影响。结果表明:38 °C 高温胁迫处理下,徐蒜 815 和徐蒜 6 号中 *AsHSFB1* 基因均能响应热胁迫,并且都在处理 24 h 时相对表达水平达到最高;4 °C 低温处理时,在大蒜幼苗经历低温的 48 h 之内,徐蒜 815 和徐蒜 6 号中 *AsHSFB1* 基因相对表达水平总体呈现先升高后下降的趋势,均在低温胁迫 4 h 时达到峰值,随后开始下降。*AsHSFB1* 基因在相同温度处理下表现出品种的差异,38 °C 高温处理下,徐蒜 6 号中 *AsHSFB1* 基因的相对表达水平总体高于徐蒜 815。综上所述,大蒜热激转录因子基因 *AsHSFB1* 可能参与其对高温、低温逆境的响应过程,但作用机制还需要进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] HAIDER S, IQBAL J, NASEER S, et al. Unfolding molecular switches in plant heat stress resistance: a comprehensive review [J]. Plant Cell Reports, 2021, 41(3): 775-798.
- [2] RAZA A. Metabolomics: a systems biology approach for enhancing heat stress tolerance in plants [J]. Plant Cell Reports, 2020, 41(3): 741-763.
- [3] LIN Y X, JIANG H Y, CHU Z X, et al. Genome-wide identification, classification and analysis of heat shock transcription factor family in maize [J]. BMC Genomics, 2011, 12: 76.
- [4] EFEOLU B. Heat shock proteins and heat shock response in plants [J]. Gazi University Journal of Science, 2009, 22(2): 67-75.
- [5] NEUDEDER T, VERGHESE J, HAYER-HARTL M, et al. Structure of human heat-shock transcription factor 1 in complex with DNA [J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2016, 23(2): 140-146.



- [6] PANCHUK I, VOLKOV R A, SCHOFFL F. Heat stress-and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(2): 838-853.
- [7] 段硕楠,李国良,张园园,等. 植物热激转录因子家族的多样性和复杂性研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2018, 34(35): 36-43.
- [8] 黄小云,陶 鹏,李必元,等. 植物热激转录因子基因家族的研究进展 [J]. *浙江农业科学*, 2014(9): 1323-1332,1336.
- [9] SCHARF K D, ROSE S, ZOTT W, et al. 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]. *The EMBO Journal*, 1990, 9(13): 4495-4501.
- [10] MISHRA S K, TRIPP J, WINKELHAUS S, et al. In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato [J]. *Genes & Development*, 2002, 16(12): 1555-1567.
- [11] SCHRANN F, GANGULI A, KIEHMANN E, et al. 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*, 2006, 60(5): 759-772.
- [12] LI H C, ZHANG H N, LI G L, et al. Expression of maize heat shock transcription factor gene *ZmHsf06* enhances the thermotolerance and drought-stress tolerance of transgenic *Arabidopsis* [J]. *Functional Plant Biology*, 2015, 42: 1080-1091.
- [13] 易 瑾,罗 弦,曹 兴,等. 百合热激转录因子基因 *LHSHF1* 的克隆与表达分析 [J]. *园艺学报*, 2012, 39(11): 2199-2205.
- [14] 陆 伟,耿玉璐,郑宇茜,等. 热激转录因子在植物胁迫应答和生长发育中的作用 [J]. *分子植物育种*, 2020, 18(3): 905-914.
- [15] TEJEDOR-CANO J, PRIETO-DAPENA P, ALMOGUERA C, et al. Loss of function of the HSFA9 seed longevity program [J]. *Plant, Cell and Environment*, 2010, 33(8): 1408-1417.
- [16] ALMOGUERA C, ROJAS A, DIAZ-MARTIN J, et al. A seed-specific heat-shock transcription factor involved in developmental regulation during embryogenesis in sunflower [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(46): 43866-43872.
- [17] SHANG A, CAO S Y, XU X Y, et al. Bioactive compounds and biological functions of garlic (*Allium sativum* L.) [J]. *Foods*, 2019, 8(7): 246.
- [18] ASTANEH R K, BOLANDNAZAR S, NAHANDI F Z, et al. The effects of selenium on some physiological traits and K, Na concentration of garlic (*Allium sativum* L.) under NaCl stress [J]. *Information Processing In Agriculture*, 2018, 5(1): 156-161.
- [19] 刘宏久,温艳斌,刘晓雪,等. 大蒜分子生物学研究进展 [J]. *园艺学报*, 2018, 45(9): 1778-1790.
- [20] 卞诗村,陆雅妮,许吴俊,等. 大蒜生物钟基因 *AsRVE1* 和 *AsRVE2* 及其在渗透胁迫下的表达分析 [J]. *园艺学报*, 2021, 48(9): 1706-1716.
- [21] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [22] LIVAK K J, SCHMITTGEN T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [23] BANTI V, MAFESSONI F, LORETI E, et al. The heat-inducible transcription factor *HSFA2* enhances anoxia tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2010, 152(3): 1471-1483.
- [24] 赵立娜,段硕楠,张华宁,等. 玉米热激转录因子基因 *ZmHsf25* 的克隆、特性与耐热性功能分析 [J]. *作物学报*, 2017, 43(7): 1021-1029.
- [25] SCHARF K D, HEIDER H, HOHFELD I, et al. 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*, 1998, 18(4): 2240-2251.
- [26] 晁 旭,王东平,巩振辉,等. 拟南芥热激转录因子耐高温功能分析 [J]. *西北植物学报*, 2007, 27(7): 1305-1310.
- [27] BANIWAL S K, CHAN K Y, SCHARF K D, et al. Role of heat stress transcription factor HsfA5 as specific repressor of HsfA4 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(6): 3605-3613.
- [28] MA H, WANG C, YANG B, et al. *CarHSFB2*, a class B heat shock transcription factor, is involved in different developmental processes and various stress responses in chickpea (*Cicer arietinum* L.) [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2016, 34: 1-14.
- [29] ZHAO L, PAN H, SUNUN M, et al. Molecular cloning of *Arabidopsis thaliana* *HSFA2* gene and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Chrysanthemum morifolium* Ramat [J]. *Information Technology and Agricultural Engineering*, 2012, 134: 827-834.
- [30] 王映红,张 蓓,张 楠,等. 魔芋 *AaHSFB1* 基因及其启动子的克隆与功能分析 [J]. *生物工程学报*, 2021, 37(12): 4351-4362.
- [31] 冯 依,万雪丽,刘庆华,等. 香石竹热激转录因子基因 *DcHsfB1* 的克隆及其对不同非生物胁迫的表达响应 [J]. *植物生理学报*, 2019, 55(7): 975-982.
- [32] 李 岩,徐志胜,谭国飞,等. 芹菜热激转录因子基因 *AgHSFB2* 的克隆及不同温度处理下的表达响应 [J]. *南京农业大学学报*, 2015, 38(3): 360-368.

(责任编辑:王 妮)