

巴西橡胶树*sHSP23.8*基因的克隆、生物信息学及表达分析

李德军^{1,*}, 郭会娜^{2,3,*}, 邓治¹, 刘辉¹, 陈江淑^{1,2}, 姜达², 夏立琼², 夏志辉^{2,**}

¹中国热带农业科学院橡胶研究所, 农业部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室, 海南儋州571737; ²海南大学农学院, 海口570228; ³右江民族医学院, 广西百色533000

摘要: 本文采用RACE技术, 从巴西橡胶树中克隆到一个小热激蛋白基因。该基因全长cDNA为1 002 bp, 最长开放阅读框645 bp, 预测编码蛋白包含214个氨基酸残基, 与植物sHSP23.8蛋白具高度相似, 将该基因命名为*HbsHSP23.8*。生物信息学分析显示, *HbsHSP23.8*具有 α -晶体蛋白保守结构域, 可能定位在叶绿体, *HbsHSP23.8*蛋白中预测到19个磷酸化位点。二级结构预测结果显示*HbsHSP23.8*由 α 螺旋、 β 转角、延伸链和随机卷曲组成。实时定量RT-PCR分析结果表明, *HbsHSP23.8*在巴西橡胶树胶乳、叶片、树皮、雄花、雌花、花药中均有表达。在橡胶树叶片不同发育时期, *HbsHSP23.8*表达存在明显变化。此外, *HbsHSP23.8*表达受高盐、干旱、低温、乙烯和茉莉酸处理调控, 表明*HbsHSP23.8*可能在巴西橡胶树逆境胁迫应答、乙烯和茉莉酸信号途径中发挥作用。

关键词: 巴西橡胶树; 小热激蛋白23.8; 逆境反应; 基因克隆; 表达分析

Cloning, Bioinformatics and Expression Analysis of *sHSP23.8* Gene in *Hevea brasiliensis*

LI De-Jun^{1,*}, GUO Hui-Na^{2,3,*}, DENG Zhi¹, LIU Hui¹, CHEN Jiang-Shu^{1,2}, JIANG Da², XIA Li-Qiong², XIA Zhi-Hui^{2,**}

¹Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture, Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China; ²College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China; ³Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China

Abstract: In this study, a full-length cDNA sequence of a small heat shock protein (sHSP) gene was cloned from *Hevea brasiliensis* with the RACE method. The full-length cDNA of *HbsHSP23.8* was 1 002 bp in size with a 645 bp open reading frame, encoding a deduced polypeptide of 214 amino acids. The deduced protein showed high identity to plant sHSP23.8 proteins, therefore we named this genes as *HbsHSP23.8*. Bioinformatic analyses indicated that *HbsHSP23.8* contained a conserved alpha-crystallin domains (ACD) domain, and was likely located in chloroplast. 19 phosphorylation sites were predicted within *HbsHSP23.8*, and the secondary structure of *HbsHSP23.8* contained α -helix, β -turn, extended strand and random coil. Real time RT-PCR analysis indicated that *HbsHSP23.8* was expressed in latex, barks, leaves, barks, male flowers, female flowers and anthers. With the development of leaves, the *HbsHSP23.8* expression showed a significant change. In addition, the expression of *HbsHSP23.8* was regulated by NaCl, drought, low temperature, ET and JA treatments, suggesting that *HbsHSP23.8* might play important roles in stresses responses as well as ET and JA signals in rubber tree.

Key words: *Hevea brasiliensis*; small heat shock protein 23.8; stress response; gene cloning; expression analysis

热激蛋白(heat shock proteins, HSPs)是生物体遭受物理、化学、生物等胁迫时发生应激反应而合成的一种高度保守的蛋白(Lindquist和Craig 1988; Morimoto 1993), 其几乎存在于所有生物体中(Parsell和Lindquist 1993; Vierling 1991; Gupta等 2010)。热激蛋白分子量在10到200 kDa之间, 按其分子量分为: HSP100、HSP90、HSP70、HSP60和小热激蛋白(small heat shock proteins, sHSPs)。在高等植物中至少存在20多种sHSPs, 有些植物多达40多种。

sHSPs是一个庞大且古老的家族, 其分子量从12~45 kDa不等, 大多数集中在15~20 kDa之间, 因此也被称作HSP20家族。sHSPs氨基酸序列包括一

收稿 2015-07-18 修订 2015-09-30

资助 国家自然科学基金(31270651和31200514)和中国热带农业科学院橡胶研究所基本科研业务费专项(16300-22015003)。

* 同等贡献。

** 共同通讯作者(E-mail: zhxia-111@163.com, Tel: 0898-23301174; E-mail: dragonldj@163.com, Tel: 0898-66279271)。

个N末端区域、C末端区域及C端延伸区,高度保守的C末端区域约由90个氨基酸组成 α -晶状体蛋白域(α -crystallin domain, ACD)。植物与其他sHSPs的不同之处主要体现在其拥有更多的sHSPs,其数量因植物种类不同而异。拟南芥有19个sHSPs (Scharf等2001),水稻有23个sHSPs (Waters等2008),毛果杨有36个sHSPs (Waters等2008)。

正如小热激蛋白的名字所言,几乎所有植物的sHSPs都是受热诱导的。除热激外,研究表明许多sHSPs在特殊的发育阶段表达,比如胚胎发育、花粉发育期、种子成熟时期和果实成熟期(Almoguera和Jordano 1992; DeRocher和Vierling 1994; Lubaretz 2002)。黄杉胚胎从中晚期开始累积HSP17.4、HSP17.6和HSP17.7,到迟晚期胚胎和干种子中累积量达到高峰(Sun等2001; Wehmeyer等1996)。番茄sHSP21通过促进类胡萝卜素的积累参与果实的发育(Neta等2005)。在正常温度下,百合小热激蛋白基因*LimHSP16.5*在百合花药、根、叶和茎等各个组织中均有表达,其中在花药中表达量最高,推测*LimHSP16.5*可能参与花药发育过程(潘佳佳2010)。很多sHSPs在非生物胁迫(干旱、低温、重金属、臭氧、紫外线和渗透压等)条件下均有表达。向日葵中水压变化引起*HaHSP17.6*和*HaHSP17.9*基因表达,其表达水平与水分丧失程度呈正比例关系(Coca等1996)。甜椒*HSP18*基因在低温下被诱导,且其表达量与处理时间的长短相关,在6 h时最高;低温胁迫后,转基因植株能够维持相对较低的细胞膜透性和较高的放氧速率,而非转基因植株上则不存在上述现象(郭鹏等2008)。*PpHsp16.4*在苔藓热、盐和渗透胁迫恢复过程中发挥重要作用(Ruibal等2013)。在拟南芥中,过表达*LimHSP16.45*基因可提高转基因植株对非生物逆境的抗性(Mu等2013)。王明乐等(2015)研究发现*CsHSP17.2*在花中表达量最高,且响应高温、干旱、高盐和外源脱落酸胁迫。高温快速诱导*ZmHSP17.7*基因表达,超量表达*Zm-HSP17.7*的转基因拟南芥在种子萌发和植株生长过程中表现出更强的高温 and 干旱耐受性,说明该基因可以在植物防御高温、干旱及复合胁迫中发挥一定作用(孙爱清等2015)。sHSPs的许多功能是

建立在分子伴侣基础上的,它能够使错误折叠的蛋白质被降解,sHSPs通过结合部分变性蛋白或变性的蛋白质底物来阻止未折叠或错误蛋白的不可逆聚集。sHSPs具有使细胞内蛋白维持稳定状态的功能,从而保证信号转导、新陈代谢、转录、翻译等生命过程的顺利进行(Basha等2004; Friedrich等2004; Haslbeck等2004)。

巴西橡胶树原产于南美洲亚马逊河流域,属于典型的热带高大乔木。我国属非传统植胶区,巴西橡胶树主要种植在海南、云南、广东等地区,地理位置决定橡胶树在生长周期中不可避免地遭受低温、台风和干旱等非生物逆境胁迫的影响。橡胶树生存、生长发育、胶乳的形成与生长环境有密切关系,作为橡胶树生长环境中的重要因子,逆境胁迫必然会对橡胶树的生长、发育和胶乳代谢等造成影响。因此,如何提高橡胶树对逆境胁迫的耐受性,是橡胶树研究领域一项重要且有潜在应用价值的课题。鉴于sHSPs在进化和功能上的保守性,sHSPs可能在橡胶树对逆境胁迫耐受性中发挥重要作用。目前对植物sHSP的研究主要集中在拟南芥、水稻和烟草等物种,在木本植物橡胶树中至今仍无报道。本文研究了巴西橡胶树*sHSP23.8*基因克隆、生物信息学和表达,为深入研究*HbsHSP23.8*在橡胶树中的功能奠定基础。

材料与方法

1 实验材料与试剂

巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)品系热研7-33-97于1990年定植在中国热带农业科学院试验农场五队,采用S/2 d/4 (1/2螺旋割线,每4 d割一刀)割制,本研究中不同组织实验材料取自热研7-33-97健康树。

胶回收、质粒提取试剂盒购自OMEGA公司;RNA提取试剂盒购自百泰克;SMARTTM RACE cDNA扩增试剂盒购自Clontech公司;反转录试剂盒购于Fermnets公司;其余的试剂药品购自大连宝生物公司。大肠杆菌*Escherichia coli* BL21 (DE3)和原核表达载体pET-28a为本实验室保存。

2 实验方法

2.1 不同处理

乙烯(ethylene, ET)和茉莉酸(jasmonic acid,

JA)处理材料为2003年定植于中国热带农业科学院试验农场七队的未开割幼树。乙烯利和JA处理参考Hao和Wu (2000)提供的方法进行,处理浓度分别为1%和0.3%,以不作任何处理的幼树为对照,采集处理后0、4、8、24、48和72 h胶乳。

干旱、低温和NaCl胁迫处理选用橡胶树热研7-33-97组培苗为实验材料,洗净组培苗根部泥土后,将组培苗放入清水中,在30 °C、湿度80%、12 h光照(光照强度 $480 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$)和12 h黑暗静置培养2~3 d后进行逆境胁迫处理。低温(8 °C)处理具体参照安泽伟等(2010)方法进行;干旱和NaCl胁迫处理分别参照Zhang等(2012)和王瑞刚等(2005)方法进行,分别采用16% PEG8000和 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl分别模拟干旱和高盐胁迫条件,以不作任何处理的组培苗为对照,分别采集处理后0、3、24和48 h叶片用于RNA提取。

2.2 总RNA提取及cDNA第一链合成

参照Tang等(2007)和Kiefer等(2000)的方法提取橡胶树不同组织总RNA,利用DNase I (RNase free)去除RNA中少量的DNA,对总RNA进行定量和电泳检测。样品cDNA第一链合成按照RevertAid™第一链cDNA合成试剂盒说明书提供的方法进行。

2.3 *HbsHSP23.8*全长cDNA克隆、序列、生物信息学及进化分析

根据橡胶树*sHSP23.8*基因部分片段设计5'和3' RACE特异性引物(表1),之后按照Clontech公司SMART™ RACE扩增试剂盒说明书进行5'和3' RACE操作。5' RACE两轮扩增程序为94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 72 °C延伸2 min, 5个循环; 94 °C变性30 s, 70 °C退火30 s, 72 °C延伸1.5 min, 5个循环;之后是94 °C变性30 s, 68 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 25个循环; 72 °C延伸7 min。3' RACE第1轮扩增条件为94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 25个循环; 72 °C延伸7 min。用3' RACE第一轮扩增稀释产物为模板进行第二轮PCR扩增,扩增反应条件同第一轮,扩增产物经胶回收后连接到pMD18-T载体,挑取阳性克隆经PCR和酶切验证后送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

根据获得的*HbsHSP23.8* cDNA序列设计正反

向引物*HbsHSP23.8F*和*HbsHSP23.8R* (表1),用*Pyrobest*™ DNA酶进行PCR扩增以验证*HbsHSP23.8*全长序列。扩增程序为94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 58 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 35个循环; 72 °C延伸7 min。扩增产物回收后连接到pMD18-T载体,挑取阳性克隆送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

利用NCBI的ORF finder查找*HbsHSP23.8*最长开放阅读框。通过搜索NCBI中Conserved Domain Database预测蛋白结构域和特性;利用DNASTAR 7.0预测基因最长开放阅读框编码氨基酸、分子量和等电点。利用ExPASy中ProtScale分析蛋白亲水性和疏水性,用TMHMM软件预测蛋白跨膜区域。利用SignalP和TargetP预测蛋白信号肽和亚细胞定位。

2.4 *HbsHSP23.8*表达模式分析

采用罗氏LightCycler 2.0实时荧光定量RT-PCR系统对*HbsHSP23.8*基因表达模式进行分析。取不同实验材料RNA逆转录合成cDNA第一链,将逆转录产物稀释5倍后做为实时定量RT-PCR分析模板。反应体系为20 μL ,包括2 μL 模板、10 μL 2 \times SYBR Premix和10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的上、下游荧光定量特异引物各0.3 μL (终浓度为0.15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。PCR扩增程序如下:先是94 °C预变性30 s, 94 °C 5 s, 58 °C 30 s, 72 °C 20 s,共45个循环;接下来是72 °C延伸7 min。以18S RNA基因作为内参基因,序列见表1。每个样品重复3次,利用LightCycler 4.05软件自动进行基线和Cp值分析,计算出基因的相对表达量。

实验结果

1 *HbsHSP23.8*克隆及序列分析

在分析橡胶树树皮转录组深度测序数据发现3个TSA序列(JR361709、JR344839和JR352530)与植物sHSP序列高度相似。用CAP3组装3个TSA序列发现它们为同一个sHSP基因,将其命名为*HbsHSP23.8*。利用*HbsHSP23.8*基因部分已知序列进一步搜索课题组组装的热研7-33-97转录组数据库,最终获得*HbsHSP23.8*基因长741 bp,在此序列的基础上设计3'和5' RACE引物,3'和5' RACE按照试剂盒说明书进行操作,*HbsHSP23.8*基因3'和5' RACE

表1 *HbsHSP23.8*基因克隆和表达分析所用引物序列Table 1 The primers sequences used in gene cloning and expression analysis of *HbsHSP23.8*

引物名称	引物序列(5'→3')	用途
HbsHSP23.8-5R1	CTGGTCCATTAGGTTCCACAC	5' RACE
HbsHSP23.8-5R2	CGACCACATCTGGGAAGAAAC	
HbsHSP23.8-3R1	GCAAACAGGACGTCAAAGTG	3' RACE
HbsHSP23.8-3R2	GAGTGGAAGAAGGTACTCAAG	
HbsHSP23.8F	GATGTTCTTTCTTAATTGAACTC	验证cDNA全长
HbsHSP23.8R	GGCAACGTTTTGATAAATTACAG	
Hb18SF	GCTCGAAGACGATCAGATACC	扩增内参
Hb18SR	TTCAGCCTTGCGACCATAC	
HbsHSP23.8-RTF	CTCCAACGAGGACTCTGAG	检测 <i>HbsHSP23.8</i> 表达水平

第二轮扩增产物见图1-A。分别测序*HbsHSP23.8*基因5'和3' RACE扩增产物,得到*HbsHSP23.8*基因5'和3' RACE扩增产物大小为251和300 bp,分析测序结果表明基因的3' RACE产物包含polyA序列,说明已获得基因完整的3'末端序列。

拼接已知序列、3'和5' RACE扩增序列后得到*HbsHSP23.8*基因长为1 002 bp,根据基因拼接序列设计引物扩增并测序验证基因拼接序列。如图1-B所示,*HbsHSP23.8*基因扩增产物1 000 bp左右,回收扩增产物连接到pMD18-T载体,挑选阳性克隆进行测序。比对*HbsHSP23.8*基因测序结果与拼接序列发现两者一致,经验证后*HbsHSP23.8*基因和推测氨基酸序列如图2所示。*HbsHSP23.8*基因序列已提交NCBI数据库,登录号为KT376983。*HbsHSP23.8*除去polyA长为977 bp,5'和3'非编码区

(除去polyA)分别为202和130 bp,最长ORF含有645 bp,编码的蛋白质含214个氨基酸,预测分子量为23.85 kDa,等电点为7.88。

2 *HbsHSP23.8*蛋白的生物信息学分析

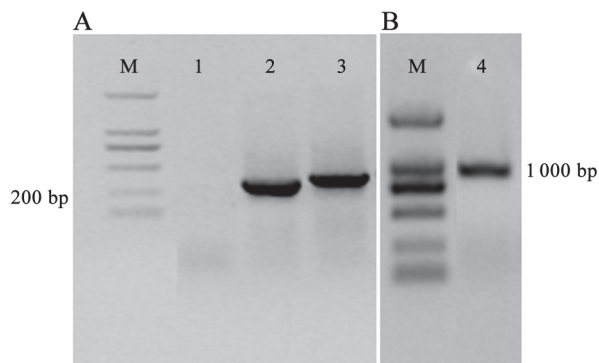
通过搜索NCBI中Conserved Domain Database发现*HbsHSP23.8*蛋白在序列C端有大小为74个氨基酸的 α -晶体蛋白保守区域(ACD),属于 α -晶体-热激蛋白23类超基因家族特有结构域,并且在ACD分别预测到10个多肽结合位点,以上两个特征对sHSP行使其功能至关重要(图2)。

利用软件对*HbsHSP23.8*进行生物信息学分析,主要包括蛋白疏水性、信号肽、亚细胞定位分析、磷酸化位点和二级结构预测。

*HbsHSP23.8*蛋白存在亲水和疏水区域,为不稳定蛋白,平均亲水性数值都为负值,预测为亲水性蛋白。与*HbsHSP23.8*为亲水性蛋白预测结果一致,在*HbsHSP23.8*蛋白中未预测到跨膜区域。*HbsHSP23.8*蛋白不含有信号肽,亚细胞定位预测结果显示*HbsHSP23.8*定位在叶绿体可能性最大。*HbsHSP23.8*蛋白中预测到17个丝氨酸、1个苏氨酸和1个酪氨酸位点,以上位点可能发生磷酸化。二级结构预测结果显示*HbsHSP23.8*由 α 螺旋、 β 转角、延伸链和大量的随机卷曲组成。

3 *HbsHSP23.8*基因的表达模式分析

用随机引物将提取的总RNA进行反转录,选取橡胶树18S rRNA作为内参,采用实时定量RT-PCR分析*HbsHSP23.8*在不同组织、叶片不同发育时期、逆境胁迫及乙烯和茉莉酸处理条件下的表达模式。

图1 *HbsHSP23.8*基因3'和5' RACE及全长PCR产物电泳图Fig.1 The electrophoresis of 3', 5' RACE and full-length PCR products of *HbsHSP23.8*

A和B分别为*HbsHSP23.8*基因RACE和全长PCR产物电泳图。M、1、2、3、4分别为DL2000 Marker、负对照、5' RACE第二轮、3' RACE第二轮和基因全长PCR产物。

3.1 *HbsHSP23.8*在不同组织和叶片发育时期的表达分析

实时定量RT-PCR分析结果表明, *HbsHSP23.8*在不同组织中均有表达, 其表达存在差异。 *HbsHSP23.8*在胶乳中表达最高, 接下来依次是雄花、树皮、雌花、叶片和花药(图3-A)。此外, *HbsHSP23.8*在橡胶树叶片不同发育时期表达存在显著变化, 在变色期表达最高, 在稳定期表达最低(图3-B)。

3.2 在不同胁迫下*HbsHSP23.8*的表达分析

实时定量RT-PCR分析结果表明干旱、低温

和高盐胁迫均能调控*HbsHSP23.8*表达(图4)。在低温处理下*HbsHSP23.8*表达先下降再升高后下降。在高盐胁迫下, *HbsHSP23.8*表达存在显著变化, 处理3 h开始升高, 24 h达到峰值, 之后开始下降。在干旱处理下, *HbsHSP23.8*表达整体下调, 呈下降-升高-下降模式, 最低表达量出现在48 h。综合以上分析结果, 推测*HbsHSP23.8*参与橡胶树多种逆境胁迫并在其中发挥重要作用。

3.3 在茉莉酸和乙烯处理下*HbsHSP23.8*的表达分析

实时定量RT-PCR分析结果表明乙烯和茉莉酸均能显著调控*HbsHSP23.8*表达。如图5所示, 乙

```

tcttaattgaactcagtttaaaaaaaaaaaaaaaatc tagaacccaagtcaccgctcctggaactttctgtcctcgttctcgacaccte
99
cttttctatgtgtgctttataaacaccccaaaaatttggactccttaaacctaacaggcgagtactgcateccaacgatacaagataactc
189
cctcactgaaaacATGGCATACTGATTGCTCTAAGGAAAGCAACCGCTTCTGCTCTCTCTCCAAGCTCCTCAATCTGTCCGCTCTGC
279
1 M A S L I A L R K A T A S A L F S K L L N P V R S A
CTCTGTGGCACCTTCTGTCTTCTCGTCTTCAGCACTGAAACCCAGGTCACCAACTTTGGCGCGACGATAGTGGCAACGTCGACGTAA
27 S V A P S V S R S F S T E T Q V T N F G G D D S G N V D V N
TAGGCGCTCCTCTGATCGCAGCGTCTCGCCGCCGAGATACTTCTCGCAGTTCCTCCAGATGTGGTGGACTATTCTCCAACGAG
57 R R S S D R S V S R R R D T S R S F F P D V V D S F S P T R
GACTCTGAGCCAGGTGTGGAACCTAATGGACCAGTTAATGGAGTACCCGTTGGGCGTGGGAGCCGAGGTGGCGTTGGTGGAGGCGAGG
87 T L S Q V W N L M D Q L M E Y P L G V G A G G G V G A R R G
GTGGACGTGAAGGAGGACGAGGAAAGCTCTGTATCTAAGGATGGACATGCCAGGCTAAGCAAACAGGACGTCAAAGTGGGCGTGGAGCA
117 W D V K E D E E A L Y L R M D M P G L S K Q D V K V G V E Q
# # # # # # # # #
GAACACACTGGTGATAAAAGGGAAAGGCCAAAAGAAAACGAAGAAGAAGAGAGTGGAGAAGGTACTCAAGCAGACTGGAGTTGCCTCG
147 N T L V I K G E G P K E N E E E E S G R R Y S S R L E L P R
AAATCTGTACAAGCTCGATGAGATTAAGGGTGAATGAAGAACGGTGTTTTGAAGGTGGTGTACCAAAGGTGAAAGAACAAGAGAGAAA
177 N L Y K L D E I K G E M K N G V L K V V V P K V K E Q E R K
#
GGATGCCATGAGGTTTCAGATTCAGTGAaggccgagtttgtgaaataataaactttgcttttgtacttagattagtagtaataataatgttt
207 D V H E V Q I Q *
ggttttgtactttgtctggttctcgtatattatcaaaaacgttgccggtgtattattattaataaagaagaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
999
aaa
1002
```

图2 *HbsHSP23.8*的核苷酸序列、推测氨基酸序列及蛋白特征
Fig.2 The nucleotide, deduced amino acid sequences and characterization of *HbsHSP23.8*
下划线部分为 α -晶体蛋白保守结构域(ACD), #表示多肽结合位点, 小写字母为3' UTR和5' UTR。

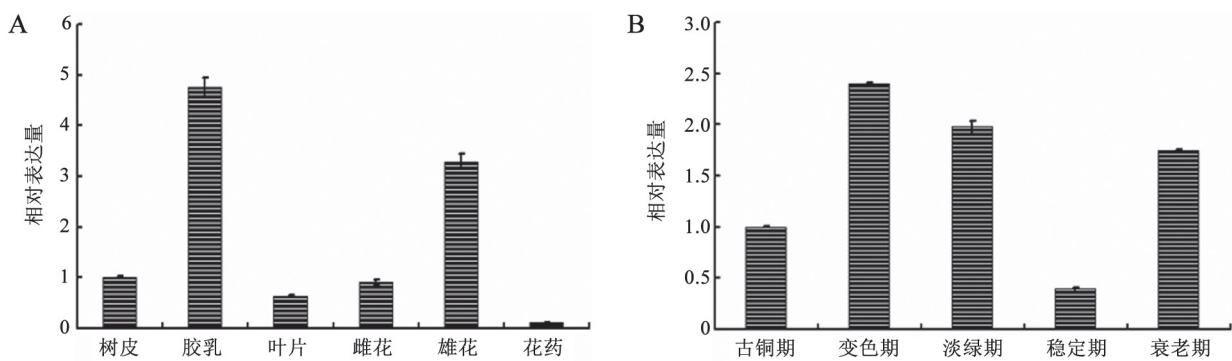
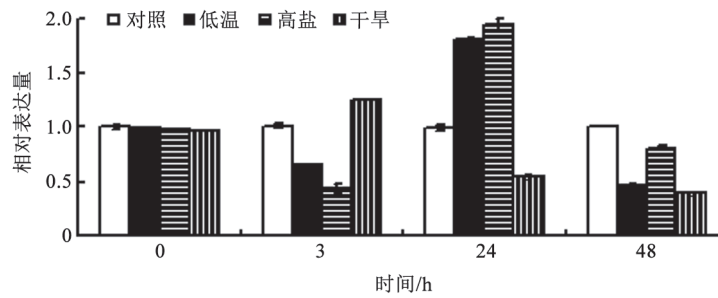
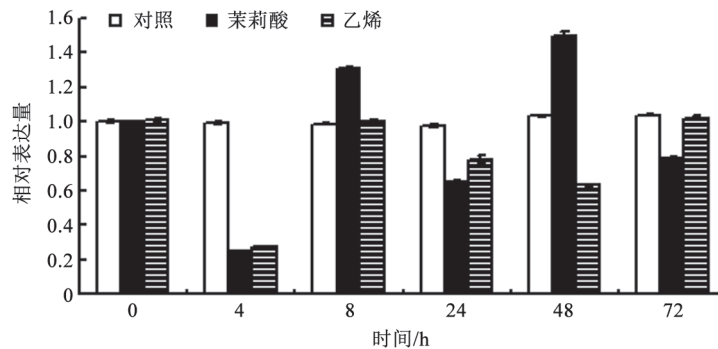


图3 在不同组织及叶片不同发育时期的*HbsHSP23.8*表达模式
Fig.3 Expression patterns of *HbsHSP23.8* in different tissues and different developmental stages of leaves

图4 在逆境条件下*HbsHSP23.8*的表达分析Fig.4 Expression profiles of *HbsHSP23.8* under stress treatments图5 乙烯和茉莉酸处理对*HbsHSP23.8*表达的影响Fig.5 Effects of ET and JA treatments on expression of *HbsHSP23.8*

烯和茉莉酸处理后*HbsHSP23.8*表达存在波动。茉莉酸处理下, *HbsHSP23.8*表达呈下降-升高-下降-升高-下降模式, 表达最低和最高值分别出现在处理后4和48 h。乙烯处理4 h后*HbsHSP23.8*表达显著下降, 并达到最低值, 之后呈上升-下降-上升趋势。以上结果说明*HbsHSP23.8*可能参与橡胶树乙烯和茉莉酸相关信号传导。

讨 论

不同植物的同种sHSPs在氨基酸组成上具有高度同源性, 所有sHSPs的C端都有一个保守的ACD结构域。本研究克隆了一个橡胶树sHSP蛋白基因*HbsHSP23.8*。在*HbsHSP23.8*蛋白中预测到ACD存在, 此外还预测到*HbsHSP23.8*中含有多肽结合位点。二级结构分析显示*HbsHSP23.8*蛋白二级结构同样具有sHSP蛋白的典型特征, 由 α 螺旋、 β 转角、延伸链和大量的随机卷曲组成。以上特征对sHSP蛋白行使功能至关重要, 推测Hb-sHSP23.8蛋白具有小热激蛋白活性。

由于sHSPs合成与逆境应答相关, 人们普遍认为sHSPs的作用在于保护逆境中的细胞, 使其免受不利环境带来的伤害。许多小热激蛋白能够提高植物的耐冷性, Soto等(2002)的研究结果表明, 低温处理可以诱导*CsHSP17.5*基因在栗子根、茎中的表达。刘箭和庄野真理子(2001)研究发现低温能够诱导线粒体sHSP在叶片中表达。Wang等(2005)认为过量表达*CPsHSP*可以提高番茄的抗寒性。王明乐等(2015)研究发现*CsHSP17.2*响应高温、干旱、高盐和外源脱落酸胁迫。*ZmHSP17.7*基因可以在植物防御高温、干旱及复合胁迫中发挥一定作用(孙爱清等2015)。此外, 很多sHSPs在非生物胁迫因素比如重金属、臭氧、紫外线和高渗透压等情况下也表达。与以上报道结果一致, 本研究结果表明*HbsHSP23.8*表达受干旱、低温和盐胁迫调控, 推测*HbsHSP23.8*参与橡胶逆境胁迫反应并在其中发挥重要作用。我国属非传统植胶区, 橡胶树生长周期内经常受到台风、低温和季节性干旱等逆境条件影响。鉴于*HbsHSP23.8*在逆境处理

的表达模式, 进一步揭示*HbsHSP23.8*功能对提高橡胶树逆境胁迫的耐受性具有重要意义。

在没有环境压力的情况下, 植物sHSPs的合成通常出现在某一特定的发育阶段, 如胚胎发生、种子萌发、花粉发育及果实成熟期。如棉花中的4个小热激蛋白基因至少能在根、茎、叶中的一个组织中有所表达; 水稻中存在着呈组成型表达的细胞质I类小热激蛋白基因, 紫茎泽兰中也有类似的发现(杨娟等2009; 朱勋路等2010; 贺亚军等2008)。与以上研究结果一致, *HbsHSP23.8*在橡胶树不同组织和叶片发育时期表达存在变化。*Hb-sHSP23.8*在胶乳中表达明显高于其他组织, 暗示其在胶乳中具有重要功能。乙烯和茉莉酸是在橡胶树中研究较为深入且应用较广的激素, 乙烯作为橡胶树增产刺激剂, 通过延长排胶时间提高橡胶产量; 茉莉酸能诱导橡胶树乳管分化, 乳管分化能力和数目多少是橡胶树是否高产的一个重要标志。sHSPs的许多功能是通过分子伴侣实现的, 其具有维持细胞内蛋白稳定状态的功能, 从而保证信号转导、新陈代谢、转录、翻译等生命过程的顺利进行(Basha等2004; Friedrich等2004; Haslbeck等2004)。此外, sHSPs能够与细胞骨架元件结合, 在细胞骨架形成和保护方面起着重要作用。在此过程中, sHSPs磷酸化是发挥生物学功能的前提(Fujit等2004)。割胶是收获橡胶树胶乳的必要环节, 该过程涉及大量蛋白合成和降解及乳管细胞骨架的重建。在*HbsHSP23.8*中预测到19个可能的磷酸化位点, 暗示*HbsHSP23.8*可能通过磷酸化参与橡胶树产排胶过程。

参考文献

- 安泽伟, 陈根辉, 程汉, 赵彦宏, 谢黎黎, 黄华孙(2010). 橡胶树冷应答转录组cDNA-AFLP分析. 林业科学, 46: 62~67
- 郭鹏, 隋娜, 于超, 郭尚静, 黄新纯, 孟庆伟(2008). 转入甜椒热激蛋白基因*CaHSP18*提高番茄的耐冷性. 植物生理学通讯, 44 (3): 409~412
- 贺亚军, 郭旺珍, 张天真(2008). 棉花6个小分子量热激蛋白基因的序列, 表达与定位. 作物学报, 34 (9): 1574~1580
- 刘箭, 庄野真理子(2010). 番茄线粒体和内质网小分子热激蛋白基因的分子克隆. 植物学报, 43 (2): 138~145
- 潘佳佳(2010). 百合小热激蛋白的克隆及初步分析[学位论文]. 兰州: 兰州大学
- 孙爱清, 葛淑娟, 董伟, 单晓笛, 董树亭, 张杰道(2015). 玉米小分子热激蛋白*ZmHSP17.7*基因的克隆与功能分析. 作物学报, 41 (3): 414~421
- 王明乐, 朱旭君, 王伟东, 王炫清, 林明露, 黎星辉(2015). 茶树小分子量热激蛋白基因*CsHSP17.2*的克隆与表达分析. 南京农业大学学报, 38 (3): 389~394
- 王瑞刚, 陈少良, 刘力源, 郝志勇, 翁海娇, 李鹤, 杨爽, 段杉(2005). 盐胁迫下3种杨树的抗氧化能力与耐盐性研究. 北京林业大学学报, 27: 46~52
- 杨娟, 戴伟民, 强胜(2009). 紫茎泽兰细胞质小热激蛋白*HSP17.7*基因的cDNA克隆与表达. 北京林业大学学报, 31 (1): 106~112
- 朱勋路, 朱习红, 辜小苹, 徐莺, 陈放(2010). 一个麻疯树胞质II类小热激蛋白基因*JcHSP17.5*的克隆和异源表达. 植物生理学通讯, 46 (5): 441~447
- Almoguera C, Jordano J (1992). Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed-stored low-molecular-weight heat-shock protein and *Lea* mRNAs. *Plant Mol Biol*, 19: 781~792
- Basha E, Lee GJ, Brei LA, Hausrath AC, Buan NR, Giese KC, Vierling E (2004). The identity of proteins associated with a small heat shock protein during heat stress *in vivo* indicates that these chaperones protect a wide range of cellular functions. *J Biol Chem*, 279 (9): 7566~7575
- Coca MA, Almoguera C, Thomas TL, Jordano J (1996). Differential regulation of small heat-shock genes in plants: analysis of a water-stress-inducible and developmentally activated sunflower promoter. *Plant Mol Biol*, 31 (4): 863~876
- DeRocher AE, Vierling E (1994). Developmental control of small heat shock protein expression during pea seed maturation. *Plant J*, 5: 93~102
- Friedrich KL, Giese KC, Buan NR, Vierling E (2004). Interactions between small heat shock protein subunits and substrate in small heat shock protein-substrate complexes. *J Biol Chem*, 279 (2): 1080~1089
- Fujita Y, Ohto E, Katayama E, Atomi Y (2004). α B-Crystallin-coated MAP microtubule resists nocodazole and calcium-induced disassembly. *J Cell Sci*, 117 (9): 1719~1726
- Gupta SC, Sharma A, Mishra M, Mishra RK, Chowdhuri DK (2010). Heat shock proteins in toxicology: how close and how far?. *Life Sci*, 86 (11): 377~384
- Hao BZ, Wu JL (2000). Laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis*: induction by exogenous jasmonic acid and linolenic acid. *Ann Bot*, 85 (1): 37~43
- Haslbeck M, Braun N, Stromer T, Richter B, Model N, Weinkauff S, Buchner J (2004). Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 23 (3): 638~649
- Kiefer E, Heller W, Ernst D (2000). A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites. *Plant Mol Biol Rep*, 18: 33~39
- Lindquist S, Craig EA (1988). The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*, 22 (1): 631~677
- Morimoto RI, Santoro MG (1998). Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nat biotechnol*, 16: 833~838
- Mu CJ, Zhang SJ, Yu GZ, Chen N, Li XF, Liu H (2013). Overexpression of small heat shock protein *LimHSP16.45* in *Arabidopsis*

- enhances tolerance to abiotic stresses. PLoS ONE, 8 (12): e82264
- Neta SI, Isaacson T, Lurie S, Veiss D (2005). Dual role for tomato HSP21: protecting photosystem II from oxidative stress and promoting color changes during fruit maturation. Plant Cell, 17: 1829~1838
- Parsell DA, Lindquist S (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. Annu Rev Genet, 27 (1): 437~496
- Ruibal C, Castro A, Carballo V, Szabados L, Vidal S (2013). Recovery from heat, salt and osmotic stress in *Physcomitrella patens* requires a functional small heat shock protein *PpHsp16.4*. BMC Plant Biol, 13: 174
- Scharf KD, Siddique M, Vierling E (2001). The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins containing α -crystallin domains (Acid proteins). Cell Stress Chaperones, 6 (3): 225~237
- Soto A, Allona I, Collada C, Guevara MA, Casado R, Rodriguez-Cerezo E, Aragoncillo C, Gomez L (1999). Heterologous expression of a plant small heat-shock protein enhances *Escherichia coli* viability under heat and cold stress. Plant Physiol, 120 (2): 521~528
- Sun W, Bernard C, van de Cotte B, Van Montagu M, Verbruggen N (2001). *At-HSP17.6A*, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon overexpression. Plant J, 27 (5): 407~415
- Tang CR, Huang DB, Yang JH, Liu SJ, Sakr S, Li HP, Zhou YH, Qin YX (2010). The sucrose transporter HbSUT3 plays an active role in sucrose loading to laticifer and rubber productivity in exploited trees of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). Plant Cell Environ, 33: 1708~1720
- Vierling E (1991). The roles of heat shock proteins in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 42: 579~620
- Wang L, Zhao CM, Wang YJ, Liu J (2005). Overexpression of chloroplast-localized small molecular heat-shock protein enhances chilling tolerance in tomato plant. J Plant Physiol Mol Biol, 31 (2): 167~174
- Waters ER, Aebermann BD, Sanders-Reed Z (2008). Comparative analysis of the small heat shock proteins in three angiosperm genomes identifies new subfamilies and reveals diverse evolutionary patterns. Cell Stress Chaperon, 13 (2): 127~142
- Wehmeyer N, Hernandez LD, Finkelstein RR, Vierling E (1996). Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. Plant Physiol, 112 (2): 747~757
- Zhang QQ, Zhu JH, Ni YM, Cai YB, Zhang ZL (2012). Expression profiling of *HbWRKY1*, an ethephon-induced *WRKY* gene in latex from *Hevea brasiliensis* in responding to wounding and drought. Trees, 26: 587~595