

## 拟南芥热激因子 AtHsfA1a 对渗透胁迫 中 Caspase-3 酶的调控

郭丽红<sup>1,2</sup>, 王乔红<sup>3</sup>, 张学兰<sup>3</sup>

(1. 昆明学院 云南省高校特色生物资源开发与利用重点实验室, 云南 昆明 650214;  
2. 昆明学院 农学院, 云南 昆明 650214; 3. 昆明学院 生命科学与技术系, 云南 昆明 650214)

**摘要:**以热激因子 *AtHsfA1a* 不同基因型(野生型、基因突变型)的拟南芥为材料, PEG 处理后采用分光光度法测定 Caspase-3 酶活性, 结果发现渗透胁迫处理后拟南芥 Caspase-3 酶活性明显增强, 而 *AtHsfA1a* 基因突变型拟南芥类 Caspase-3 酶活性比野生型拟南芥的高, 说明渗透胁迫下拟南芥 *AtHsfA1a* 能够抑制 Caspase-3 蛋白酶的活性. 为了从分子水平进一步鉴定 *AtHsfA1a* 与 Caspase-3 蛋白酶的关系, 采用染色质免疫沉淀技术和凝胶阻滞电泳体内分析 *AtHsfA1a* 与 Caspase-3 酶的关系, 结果显示 *AtHsfA1a* 在体内与 Caspase-3 蛋白酶的启动子片段均有结合. 研究结果初步表明, 渗透胁迫下拟南芥热激因子 *AtHsfA1a* 通过对 Caspase-3 蛋白酶表达的调控而对细胞程序性死亡有一定的抑制作用, 这对揭示植物耐逆境反应机理具有重要意义.

**关键词:**拟南芥; 热激因子 *AtHsfA1a*; 渗透胁迫; Caspase-3 酶

**中图分类号:**Q943.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1674-5639(2017)03-0067-04

**DOI:**10.14091/j.cnki.kmxyxb.2017.03.016

### Regulation of Heat Shock Factor AtHsfA1a on Caspase-3 Enzyme Activity under Osmotic Stress in *Arabidopsis Thaliana*

GUO Lihong<sup>1,2</sup>, WANG Qiaohong<sup>3</sup>, ZHANG Xuelan<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Special Biological Resource Development and Utilization of Universities in Yunnan Province, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214; 2. College of Agriculture, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214;  
3. Department of Life Science and Technology, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214)

**Abstract:** The different gene type of *Arabidopsis thaliana* heat shock factor AtHsfA1a (the wild type and *AtHsfA1a* gene mutant type) were used as materials. After PEG treatment, activity of Caspase-3 enzyme was determined by using spectrophotometric method. The results found that activity of Caspase-3 enzyme significantly enhanced after PEG treatment, and caspase-3 enzyme activity of *Arabidopsis thaliana* in gene mutant type was higher than that of the wild type *Arabidopsis* under osmotic stress, showing *Arabidopsis AtHsfA1a* can inhibit the activity of Caspase-3 under osmotic stress. In order to reveal regulatory effect of AtHsfA1a on Caspase-3 at molecular level, the binding of AtHsfA1a to the promoter region of Caspase-3 was investigated by using chromatin immunoprecipitation and electrophoretic mobility shift assay. The results showed that the binding of AtHsfA1a to the promoter regions of Caspase-3 at different degrees existed in vivo or in vitro. These indicated that AtHsfA1a inhibited programmed cell death by inhibiting the expression of Caspase-3, which was important and useful for revealing the mechanism of stress resistance in plant.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*; heat shock factor AtHsfA1a; osmotic stress; Caspase-3 enzyme

植物细胞在遭受各种逆境胁迫时会出现复杂的生理生化反应而形成相应的耐逆境能力. 研究<sup>[1-3]</sup>

表明, 植物耐多种逆境能力的形成与转录因子调控一系列防御基因的表达息息相关. 植物热激因子

收稿日期: 2017-04-25

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目“拟南芥热激因子 AtHsfA1a 对细胞程序性死亡的调控”(31260061); 国家自然科学基金资助项目“拟南芥热激因子 AtHsfA1a 对抗氧化酶的调控”(31060039); 云南省高校特色生物资源开发与利用重点实验室项目“拟南芥 AtHsfA1a 调控抗逆性的作用机制研究”(GXZD201601).

**作者简介:**郭丽红(1971—), 女, 云南大理人, 教授, 博士, 主要从事植物生理学与分子生物学研究.

(Heat shock transcription factor, HSF) 是真核生物中相对保守的一个转录因子家族, 其中拟南芥 *AtHsfA1a* 被证明是参与逆境调控的重要转录因子<sup>[4-6]</sup>. 研究也发现, 逆境胁迫可以诱导植物细胞程序性死亡 (Programmed cell death, PCD). 天冬氨酸蛋白酶 (Cysteiny aspartate specific proteinase, 简称 Caspase) 家族在介导 PCD 的过程中起着非常重要的作用, 其中 Caspase-3 是 PCD 信号通路中一个重要的蛋白酶, 也是 PCD 的关键执行分子<sup>[7-8]</sup>. 在正常环境条件下, Caspase-3 以无活性的酶原的形式存在于细胞质基质中, 在遭受逆境胁迫后, Caspase-3 被激活能水解相应的底物, 导致出现 PCD<sup>[9-10]</sup>. 在哺乳动物中研究<sup>[11-12]</sup> 发现, HSF1 诱导热激蛋白的表达可以保护细胞免受胁迫引起的 PCD. 由于目前在植物中 HSF 与 PCD 的直接关系研究相对较少. 因此, 为了研究拟南芥热激因子 *AtHsfA1a* 对逆境胁迫下 PCD 中 Caspase-3 酶的调控, 以热激因子 *AtHsfA1a* 不同基因型 (野生型、突变型) 的拟南芥为实验材料, 渗透胁迫处理后分析拟南芥热激因子 *AtHsfA1a* 对 PCD 中 Caspase-3 酶的调控. 本实验的目的是为了进一步鉴定拟南芥热激因子 *AtHsfA1a* 与渗透胁迫中 PCD 的关系, 对于揭示热激因子 *AtHsfA1a* 的作用机理和 PCD 的调控机制均具有重要意义.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

拟南芥哥仑比亚种 (*Arabidopsis thaliana*, ecotype Columbia); *AtHsfA1a* 基因突变植株 (简称 MT) 和野生型 (简称 WT). 实验材料来源于美国拟南芥生物资源中心 (*Arabidopsis biological resource centre*, ABRC).

### 1.2 方法

#### 1.2.1 拟南芥 *AtHsfA1a* 不同基因型幼苗栽培

用 0.1% 的  $\text{HgCl}_2$  和 70% (体积分数) 的乙醇进行种子灭菌处理后, 接种于 MS 固体培养基中, 置于 25 °C 光照下萌发. 待种子长出 3 或 4 片真叶, 把小苗移至土壤中, 用保鲜膜遮盖, 遮阴恒温培养 3 d 后去膜进行培养.

#### 1.2.2 拟南芥小苗的 PEG 渗透胁迫处理

摘取生长 4 周的拟南芥小苗进行 PEG 渗透胁迫处理, 将不同基因型 (野生型、突变型) 的拟南芥样品置于质量分数为 20% PEG 中, 真空处理 10 min; 对照组拟南芥不做任何处理. 然后用 1 × PBS 溶液清洗小苗, 用

滤纸吸干植株上的液体, 液氮快速冷冻后置于 - 80 °C 冰箱中保存以备后续使用. 以蒸馏水为对照.

#### 1.2.3 Caspase-3 酶活性测定

叶片在液氮中研磨后, 悬浮在裂解液 (50 mmol/L Tris/HCl, pH8.0, 15 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, and 100 mg/mL of phenylmethylsulfonyl fluoride) 中, 在冰上轻轻摇动培养 30 min 后, 在 42 °C 下 12 000 r/min 离心 5 min, 上清液备用. 蛋白浓度测定采用 Bradford 的方法<sup>[13]</sup>. Caspase-3 的活性测定通过测定荧光底物 Ac-DEVD-pNA 的断裂程度来衡量, 在 405 nm 处测定自由荧光 PNA 的吸光度<sup>[14]</sup>.

#### 1.2.4 染色质免疫沉淀技术 (CHIP)

根据 Guo 等<sup>[15]</sup> 的方法, 将上述逆境处理和未处理的小苗, 在室温下浸入 crossing buffer 中 (0.4 mmol/L sucrose, 10 mmol/L Tris-HCl (PH 8), 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF, 1% formaldehyde), 在真空下培养 15 min 后, 加入终浓度为 100 mmol/L 甘氨酸在真空下培养 5 min 以终止交联反应. 小苗用无菌去离子水冲洗后, 加入 3 倍体积的 Lysis buffer 1 (50 mmol/L HEPES-KOH, pH7.5, 140 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% TritonX-100, 0.1% 脱氧胆酸钠, 1 mmol/L PMSF) 在研钵中研磨 (在液氮中进行). 然后转移到 10 mL 的离心管中. 超声波切断拟南芥基因组 DNA, 使其 DNA 片段化为 100 ~ 600 bp. 12 000 r/min, 4 °C, 离心收集上清液后, 加 60  $\mu\text{L}$  抗  $\Delta\text{HsfA1a}$  的抗血清于 4 °C 共培养 4 h. 加 Protein-A-Agarose 进行沉淀, 洗涤沉淀后进行先脱, 洗脱液分离纯化后进行 PCR, 引物对如下: F: 5'-GTCAAATCGAAACAAAC-3', R: 5'-TGTTTTTCGTTTGTTTA-3'.

#### 1.2.5 凝胶阻滞分析 (EMSA)

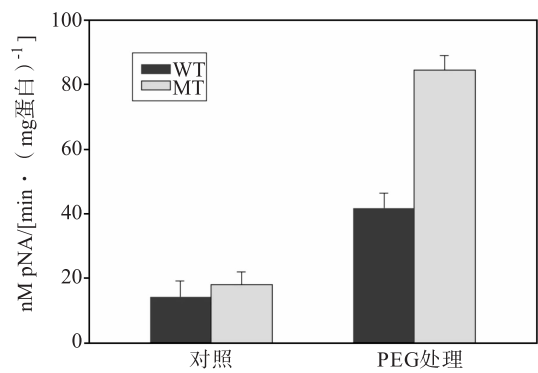
根据 Guo 等<sup>[15]</sup> 的方法, 采用化学发光法 EMSA 试剂盒 (Chemiluminescent EMSA Kit), 此试剂盒是一种根据化学发光检测生物素标记的探针试剂盒. 20 ng *AtHsfA1a* 与 20 fmol 生物标记的探针在 25 °C 下培育 20 min 后, 按照试剂盒程序进行凝胶阻滞分析.

## 2 结果与分析

### 2.1 拟南芥热激因子 *AtHsfA1a* 渗透胁迫后对 Caspase-3 酶活性的影响

Caspase-3 的活性测定通过测定荧光底物 Ac-DEVD-pNA 的断裂程度来衡量, 在 405 nm 处测定自由荧光 PNA 的吸光度. 从图 1 中可以看出, 与对照

相比,经过 PEG 处理 10 min 后,野生型拟南芥和突变型拟南芥 Caspase-3 酶活性均明显增强了,但基因突变型拟南芥 Caspase-3 酶活性高于野生型拟南芥 Caspase-3 酶活性,说明拟南芥热激因子 AtHsfA1a 在渗透胁迫下对 Caspase-3 酶活性有抑制作用.



1.WT代表野生型; 2.MT代表突变型.  
图1 拟南芥热激因子AtHsfA1a对渗透胁迫后Caspase-3酶活性的影响

2.2 应用染色质免疫沉淀技术体内验证 AtHsfA1a 与 Caspase-3 启动子片段的结合状况

染色质免疫沉淀技术(Chromatin immunoprecipitation assay,CHIP)是体内研究转录因子与靶 DNA 相互作用的理想方法<sup>[13]</sup>. 甲醛交联蛋白质-DNA 复合物,用特异性抗体免疫沉淀及富集靶 DNA,免疫沉淀的靶 DNA 用 PCR 扩增验证,AtHsfA1a 与 Caspase-3 启动子片段的结合状况具体如图 2.

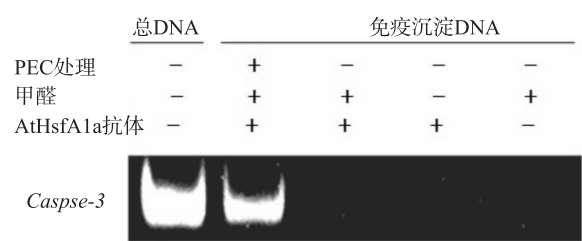


图2 AtHsfA1a与Caspase-3的基因启动子区的结合状况

从图 2 可以知道,在渗透胁迫下,以 Caspase-3 基因启动子区的片段为引物,有扩增产物,说明 AtHsfA1a 在体内直接与 Caspase-3 的基因启动子区的结合.

2.3 应用凝胶阻滞分析体外验证 AtHsfA1a 与 Caspase-3 启动子片段的结合状况

凝胶阻滞分析(EMSA)又称为电泳迁移率变动分析,它是一种在体外证实目的蛋白与靶 DNA 直接结合的方法<sup>[13]</sup>. 采用电泳迁移率变动分析(EMSA)分析 AtHsfA1a 与 Caspase-3 基因启动子区的特异性片段的结合情况如图 3. 从图 3 可以知道,在 EMSA 中与 AtHsfA1a 结合的 DNA 正好与染色质免疫沉淀

技术(CHIP)体内筛选 AtHsfA1a 的 Caspase-3 基因启动子区的片段一致,进一步验证 AtHsfA1a 直接与 Caspase-3 的基因启动子区的结合.

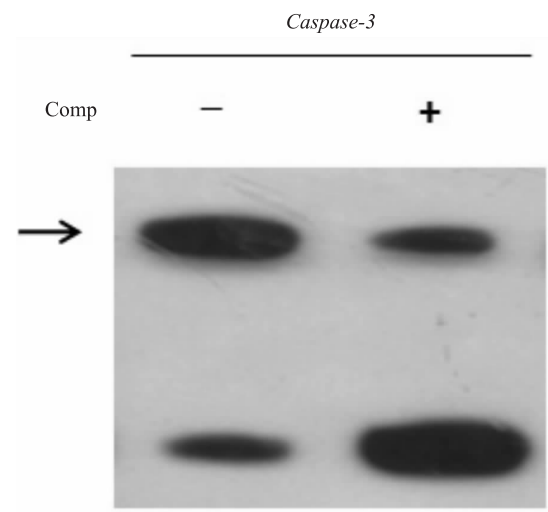


图3 EMSA验证AtHsfA1a与Caspase-3 启动子区的片段的结合情况

3 讨论

本实验采用 AtHsfA1a 基因突变植株为实验材料,该植株是利用 T-DNA 插入突变使 AtHsfA1a 不能有效的表达,这样就能从生理水平鉴定拟南芥热激因子 AtHsfA1a 与逆境中细胞程序性死亡中的 Caspase-3 的关系. 研究发现,植物在逆境中各种 Caspase 被活化后,对目的蛋白的特异 Asp 残基进行水解,从而造成细胞程序性死亡,其中 Caspase-3 是凋亡的关键酶<sup>[16]</sup>. 根据荧光底物 Ac-DEVD-pNA 的断裂程度,用分光光度法测定 Caspase-3 酶的活性,结果显示,经过渗透胁迫处理后的拟南芥类 Caspase-3 酶活性明显增强了,说明渗透可以诱导细胞程序性死亡. 同时结果还显示,基因突变型拟南芥类 Caspase-3 酶活性相对较高,野生型拟南芥类 Caspase-3 酶活性相对较低,说明渗透胁迫下热激因子 AtHsfA1a 抑制拟南芥 Caspase-3 蛋白酶的活性. 至于热激因子 AtHsfA1a 抑制 Caspase-3 蛋白酶活性是通过调控细胞程序性死亡其他基因的表达来调控 Caspase-3 蛋白酶活性大小,还是直接调控 Caspase-3 蛋白酶表达,还需要通过染色质免疫沉淀分析和凝胶阻滞电泳进一步的研究. 目前技术条件下,染色质免疫沉淀技术(Chromatin immunoprecipitation assay,CHIP)是一种在体内研究转录因子与靶 DNA 相互作用的理想的方法. 染色质免疫沉淀技术可以找出在生理条件下转录因子与靶 DNA 序列的结合位点,从而反映体内基因表达调控

的真实情况<sup>[15]</sup>. 本研究利用染色质免疫沉淀技术分析 AtHsfA1a 在体内与 *Caspase-3* 的基因启动子区的结合状况, 结果发现, AtHsfA1a 在体内能够直接与 *Caspase-3* 的基因启动子区的结合, 初步表明 AtHsfA1a 在体内可以调控 *Caspase-3* 基因的表达. 为了验证 AtHsfA1a 对 *Caspase-3* 基因表达的调控是直接的还是间接的, 采用凝胶阻滞分析(EMSA)在体外证实 AtHsfA1a 与 *Caspase-3* 基因启动子区的结合情况, 结果表明在体外 AtHsfA1a 与 *Caspase-3* 基因启动子区能够直接结合, 进一步证实了 AtHsfA1a 直接对 *Caspase-3* 基因的调控. 于是得出结论热激因子 AtHsfA1a 可能通过抑制类 *Caspase-3* 蛋白酶的表达而对细胞程序性死亡有一定的抑制作用, 从而保护植物免受逆境的伤害.

#### [参考文献]

- [1] KOTAK S, LARKINDALE J, LEE U, et al. Complexity of the heat stress response in plants[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10: 310 – 316.
- [2] IKEDA M, OHME-TAKAGI M. A novel group of transcriptional repressors in *Arabidopsis*[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2009, 50: 970 – 975.
- [3] TSANKO S, VAN BREUSEGEM G F, STONE J M, et al. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death[J]. *Bio Essays*, 2006, 28: 1091 – 1101.
- [4] SCHARF K, BERBERICH T, EBERSBERGER I, et al. The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1819: 104 – 119.
- [5] YOSHIDA T, OHAMA N, NAKAJIMA J, et al. *Arabidopsis* HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression[J]. *Mol Genet Genomics*, 2011, 286(56): 321 – 332.
- [6] GUO L H, ZHANG X L, LI N, et al. Effects of heat shock factor AtHsfA1a on *Caspase-3* activity in *Arabidopsis thaliana* under high temperature stress[J]. *Agricultural Biotechnology*, 2016, 4: 31 – 34, 377.
- [7] REAPE T J, MCCABE P F. Apoptotic-like regulation of programmed cell death in plants[J]. *Apoptosis*, 2010, 15: 249 – 256.
- [8] JONES A M. Programmed cell death in development and defense[J]. *Plant Physiol*, 2001, 125: 94 – 97.
- [9] PENNELL R I, LAMB C. Programmed cell death in plants[J]. *Plant Cell*, 1997, 9: 1157 – 1168.
- [10] GECHEV T S, HILLE J. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death[J]. *J Cell Biol*, 2005, 168: 17 – 20.
- [11] AHN S G, THIELE D J. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress[J]. *Genes and Development*, 2003, 17: 516 – 528.
- [12] BEERE H M. ‘The stress of dying’: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117: 2641 – 2651.
- [13] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding[J]. *Analyt Biochem*, 1976, 44: 276 – 287.
- [14] ZHANG L, JIANG H, GAO X, et al. Heat shock transcription factor 1 inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis via down-regulation of reactive oxygen species in cardiac myocytes[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 347: 21 – 28.
- [15] GUO L H, CHEN S N, LIU K H, et al. Isolation of heat shock factor HsfA1a-binding sites in vivo revealed variations of heat shock elements in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49: 1306 – 1315.
- [16] JACOBS A T, MARNETT L J. HSF1-mediated BAG3 expression attenuates apoptosis in 4-hydroxynonenal-treated colon cancer cells via stabilization of anti-apoptotic Bcl-2 proteins[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 9176 – 9183.

