

拟南芥热激因子 AtHsfA1a 对 细胞程序性死亡形态的影响

曾洁媛, 徐 娅, 李 念, 郅秋霞, 郭丽红*

(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)

摘要:实验以热激因子 AtHsfA1a 不同基因型(野生型 W 和沉默型 N)的拟南芥为材料,诱导其形成愈伤组织,将愈伤组织进行悬浮培养至单细胞,热激处理后,经过 DAPI 染色,在荧光显微镜下观察细胞涂片.结果表明,野生型拟南芥的单细胞均呈大小一致的完整圆形,且染色均匀,为正常的细胞形态.基因沉默型局部发生细胞质的浓缩,出现凋亡小体,说明拟南芥热激因子 AtHsfA1a 对细胞程序性死亡有一定的抑制作用.

关键词:拟南芥;热激因子 AtHsfA1a;细胞程序性死亡;显微观察

中图分类号:Q943.2 文献标识码:A 文章编号:1674-5639(2016)03-0070-04

DOI:10.14091/j.cnki.kmxyxb.2016.03.015

Effect of *Arabidopsis* Heat Shock Factor AtHsfA1a on Morphology of Programmed Cell Death

ZHENG Jie-yuan, XU Ya, LI Nian, XI Qiu-xia, GUO Li-hong*

(Key laboratory of Special Biological Resource Development and Utilization of
Universities in Yunnan Province, Kunming University, Yunnan Kunming 650214, China)

Abstract: In the test, *Arabidopsis* heat shock factor AtHsfA1a with different gene types (wild W and mute N) was used to induce forming the healing tissue. Single cell was then gained by suspension culture from the tissue. After heat shock treatment, the single cell was treated with DAPI staining, and observed by fluorescence microscope. The results show that the morphology of single cell of the wild type is normal with the full circle in same size, and uniform staining. In *AtHsfA1a* silencing type the cytoplasm concentrated in some part appearing with apoptotic body. These show that *Arabidopsis* heat shock factor *AtHsfA1a* has certain inhibitional effect on programmed cell death.

Key words: *Arabidopsis*; heat shock factor AtHsfA1a; programmed cell death; microscopic observation

植物在高温胁迫下会产生热激反应,热激转录因子(heat shock transcription factor, HSFs, 又称热激因子)作为真核生物热激反应中最主要的转录调控因子^[1],在热胁迫下会诱导热激蛋白(heat shock protein, HSP)表达^[2-4].拟南芥中存在 21 个 HSFs,分为 HSFA, HSFB, HSFC 这 3 类,有研究^[5-7]表明,AtHsfA1a 是 HSFA 类中参与逆境调控的重要转录因子.另外,有大量研究^[8-11]已证明逆境胁迫如热激、

低温、盐害、低氧、金属离子等会引起细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD).PCD 是一个由基因决定的自动结束生命的过程,它表现出特有的细胞学特征,具有复杂的生化基础.此外,大量研究^[12-14]表明,在逆境胁迫下植物会出现细胞程序性死亡的形态和生化特征.而关于植物中热激因子与细胞程序性死亡的关系研究相对较少,且尚不清楚热激因子 AtHsfA1a 是否调控 PCD.

收稿日期:2015-11-13

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31260061,31060039);校级课题资助项目(YJL11025);校级重点学科建设资助项目;大学生创新资助项目.

作者简介:曾洁媛(1994—),女,云南昆明人,2012 级生物技术 1 班学生,主要从事植物生理学研究.

* 通讯作者: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, E-mail: guoli-hong7122@163.com.

为了研究拟南芥热激因子 *AtHsfA1a* 对高温胁迫下细胞程序性死亡形态的影响,以热激因子 *AtHsfA1a* 不同基因型(野生型 W 和沉默型 N)的拟南芥为实验材料,诱导其形成愈伤组织,将愈伤组织进行悬浮培养至单细胞,在热激处理后,用 DAPI 进行染色,制成细胞涂片在荧光显微镜下观察,从而得出拟南芥热激因子 *AtHsfA1a* 对高温胁迫下 PCD 形态的影响. 本研究结果可为揭示拟南芥热激因子 *AtHsfA1a* 的调控机理奠定理论基础,并对研究植物耐逆境反应的机理有着显著的意义.

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料为拟南芥哥伦比亚种 (*Arabidopsis thaliana*, Ecotype Columbia); *AtHsfA1a* 基因沉默的转基因植株(简称 N)和野生型(简称 W),由昆明学院郭丽红老师实验室提供.

1.2 方法

1.2.1 拟南芥 *AtHsfA1a* 不同基因型幼苗栽培

用 0.1% 的 HgCl_2 和 70% 的乙醇进行种子灭菌处理后,接种于 MS 固体培养基^[15]中,置于 25 °C 光照下萌发(如下图 1 中 A). 待种子长出 3 或 4 片真叶,把小苗移至土壤中,用保鲜膜将盆口遮盖,再放入生长室(如下图 1 中 B 所示),遮阴培养 3 d 后将膜去掉,然后进行恒温培养,如图下 1 中 C ~ F 所示,4 周后选取生长一致的幼苗作为实验材料.

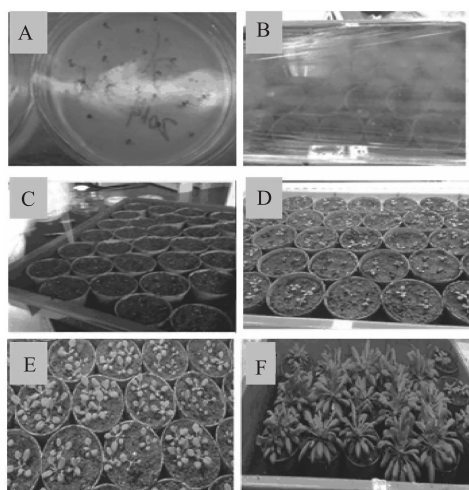


图1 拟南芥生长过程

1.2.2 拟南芥 *AtHsfA1a* 不同基因型愈伤组织的诱导

取野生型拟南芥和沉默型拟南芥叶片,用无菌水

冲洗干净后,再依次用 75% 乙醇和 0.1% 的 HgCl_2 灭菌. 将灭菌后的拟南芥叶片切成边长为 0.5 mm 的正方形叶片,将其置于愈伤组织诱导培养基(MS 培养基添加 2,4-D 0.003 g/L,6-BA 0.000 3 g/L)上,在 25 °C 温度条件下光照培养,观察愈伤组织状态.

1.2.3 拟南芥 *AtHsfA1a* 不同基因型悬浮细胞的获得

按愈伤组织与液体培养基(以 MS 培养基为基本培养基,添加 2,4-D 0.003 g/L,6-BA 0.000 3 g/L) 1:5 的比例(即 $V_1:V_2 = 1:5$),置于培养瓶中. 在 120 ~ 140 r/min, (26 ± 0.5) °C 的摇床中进行振荡悬浮培养,每周更换新鲜液体培养基两次,每次更换 1/3,直至获得分散的单个悬浮细胞.

1.2.4 荧光显微镜观察细胞程序性死亡的形态特征

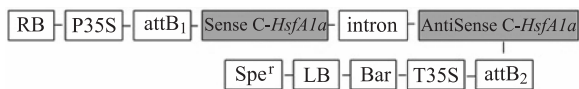
取两种类型拟南芥单细胞在 42 °C 下热激处理 30 min 后,涂在载玻片上,用 0.1% 的多聚甲醛固定 30 min,用 PBS 缓冲液洗 5 min. 将制备好的装片,用质量浓度为 0.005 mg/L 的 DAPI 染液染色 10 min,用盖玻片封片,避光条件下将制作好的装片放到载物台上,用荧光正置显微镜在 359 nm 激发光下观察拟南芥细胞形态学变化.

2 实验结果

2.1 拟南芥不同基因型愈伤组织的获得

本实验采用 *AtHsfA1a* 基因沉默的转基因植株为实验材料,拟南芥 *AtHsfA1a* 基因沉默的表达构造如下图 2 中 A 所示,具体过程为克隆 *AtHsfA1a* 的近 C-末端基因片段(*C-AtHsfA1a*),将两个反向重复的 *C-AtHsfA1a* 序列克隆进入植物发夹 RNA 表达载体,构建使拟南芥内源 *AtHsfA1a* 基因特异性沉默的发夹 RNA 表达载体. 采用农杆菌介导转基因方法,结合分子生物学方法,如 Southern 和 Western 等方法筛选出稳定、有效的内源 *AtHsfA1a* 基因沉默的转基因拟南芥植株. 将 *AtHsfA1a* 基因沉默的转基因植株(简称 N)和野生型(简称 W)进行培养,下图 2 中 B 所示栽培的沉默型拟南芥和野生型拟南芥在外部形态特征上并无较大的差别,表现形式也基本相同,可以用作后续的实验材料. 为了研究拟南芥热激因子 *AtHsfA1a* 对热胁迫下细胞程序性死亡影响,获得拟南芥单细胞是必要的. 因此,取拟南芥叶片

培养获得愈伤组织(如下图 2 中 C 所示),将培养好的不同基因型的拟南芥(野生型和沉默型)愈伤组织,放入液体 MS 培养基中,不断继代培养直至获得单细胞。



(A) 拟南芥 *AtHsfA1a* 基因沉默的表达构造



(B) 不同基因型拟南芥幼苗



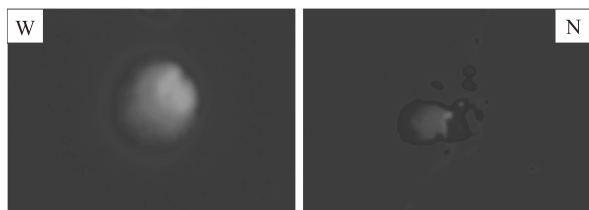
(C) 不同基因型拟南芥愈伤组织

W: 野生型植株; N: *AtHsfA1a* 基因沉默的转基因植株。

图2 拟南芥愈伤组织的获得

2.2 拟南芥热激因子 *AtHsfA1a* 对细胞程序性死亡形态的影响

不同基因型的拟南芥(野生型和沉默型)的单细胞,在 42 °C 下热激处理 30 min 后,通过 DAPI 染色后封片,在荧光显微镜下观察(如下图 3),结果如下。



W: 野生型拟南芥; N: *AtHsfA1a* 基因沉默的转基因拟南芥。

图3 拟南芥热激因子 *AtHsfA1a* 对 PCD 形态的影响

由图 3 可以看出,野生型拟南芥的单细胞均呈大小一致的完整圆形,且染色均匀,为正常的细胞形态;基因沉默型局部发生细胞质的浓缩,出现凋亡小体。初步说明热胁迫下拟南芥热激因子 *AtHsfA1a* 对细胞程序性死亡有一定的抑制作用。

3 讨论

研究结果表明,植物在高温中数小时会快速诱导一系列热激基因的表达,热激基因的产物热激蛋

白(heat shock proteins, HSP)可以使细胞的机体免受逆境的伤害。热激蛋白基因的表达是热激转录因子调控,它在 HSP 基因转录时可以与一段保守基因序列—启动子区的热激元件(heatshockdemen, HSE)特异性结合,从而起到调控热激蛋白基因的开启和关闭的作用,完成相应的生物学功能。

为了研究拟南芥热激因子 *AtHsfA1a* 对 PCD 形态的影响,本实验采用 *AtHsfA1a* 基因沉默的转基因植株和野生型植株为实验材料, *AtHsfA1a* 基因沉默的转基因植株由于 *AtHsfA1a* 基因的沉默,则在热激诱导下不会产生其调控蛋白,不会发生相应的调控反应。而野生型在热激下则会产生其调控蛋白,从而发生相应的调控反应。对不同基因型的拟南芥的单细胞热激后进行 DAPI 染色,在荧光显微镜下用 359 nm 激发光观察结果(结果如图 3 所示),发现野生型拟南芥的对照组单细胞均呈大小一致的完整圆形,且染色均匀,为正常的细胞形态;基因沉默型对照组局部发生细胞质的浓缩,出现凋亡小体。初步说明热胁迫下拟南芥热激因子 *AtHsfA1a* 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。关于 HSF 对 PCD 的调控,在动物中获得了一些有价值的研究成果。研究显示,HSF1 可以调控肠癌细胞的抗细胞凋亡基因 BAC3 和 XAF-1 的表达^[16-17],也可以调控干细胞中与 PCD 相关基因 FasL 的表达^[18]。但是对于植物中 HSF 与 PCD 的直接关系研究则相对较少,且尚不清楚热激因子 *AtHsfA1a* 是否调控 PCD 相关基因的表达,这还需要进一步研究。从分子水平鉴定拟南芥热激因子 *AtHsfA1a* 与逆境中 PCD 的关系,对于揭示热激因子 *AtHsfA1a* 的调控机理具有重要的意义。本研究将为进一步研究植物在逆境中的适应机理奠定理论基础,对改善植物耐逆性具有重要意义。

[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] AKERFELT M, MORIMOTO R I, SISTONEN L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2010, 11: 545-555.
- [3] VON KOSKULL-DÖRING P, SCHARF K, NOVER L. The diversity of plant heat stress transcription factors[J]. Trends

- Plant Sci,2007,12:452 – 457.
- [4] LI M, DOLL J, WECKERMAN K, et al. Detection of in vivo interactions between Arabidopsis class A-HSFs, using a novel BiFC fragment, and identification of novel class B-HSF interacting proteins[J]. Eur J Cell Biol,2010,89:126 – 132.
- [5] NOVER L, BHARTI K, DORING P, et al. Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? [J]. Cell Stress Chaperones,2001,6:177 – 189.
- [6] DORING P, TREUTER E, KISTNER C, et al. The role of AHA motifs in the activator function of tomato heat stress transcription factors HsfA1 and HsfA2[J]. Plant Cell,2000,12(2):265 – 278.
- [7] LIU H, LIAO H, CHARNG Y. The role of class A1 heat shock factors (HSFA1s) in response to heat and other stresses in Arabidopsis[J]. Plant Cell Environ,2011,34:738 – 751.
- [8] DANON A, GALLOIS P. UV-C induces apoptotic-like changes in Arabidopsis thaliana [J]. FEBS Letters,1998,437:131 – 136.
- [9] LIN J, WANG Y, WANG G. Salt stress-induced programmed cell death in tobacco protoplasts is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status[J]. J Plant Physiol,2006,163:731 – 739.
- [10] 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]. BioEssays,2006,28:1091 – 1101.
- [11] XU C J, CHEN KS, FERGUSON I B. Programmed cell death features in apple suspension cells under low oxygen culture[J]. Bioscience & Biotechnology,2004,5(2):137 – 143.
- [12] 夏晨燕,颜秉意,蔡应繁,等. 植物细胞程序性死亡的研究进展[J]. 生物技术通讯,2008,19(2):16 – 22.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 4 版. 北京:高教出版社,2010.
- [16] ZHANG L, JIANG H, GAO X, et al. Heat shock transcription factor 1 inhibits H₂O₂-induced apoptosis via down-regulation of reactive oxygen species in cardiac myocytes[J]. Mol Cell Biochem,2011,347:21 – 28.
- [17] 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.
- [18] THONEL A D, MEZGER V, GARRIDO C. Implication of heat shock factors in tumorigenesis:therapeutical potential [J]. Cancers,2011,3(1):1158 – 1181.

