

DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-3142. 2013. 05. 015

张健, 刘美艳, 申杰, 等. 外源亚精胺对淹涝胁迫下黄瓜根 *HSP70* 表达的影响 [J]. 广西植物, 2013, 33 (5): 669—673

Zhang J, Liu MY, Shen J, et al. Effects of exogenous spermidine on the expression of *HSP70* in cucumber roots under waterlogging stress [J]. *Guihaia*, 2013, 33 (5): 669—673

外源亚精胺对淹涝胁迫下黄瓜根 *HSP70* 表达的影响

张 健, 刘美艳, 申 杰, 刘 丹, 俞立璇, 李雪华

(江苏师范大学 生命科学院, 江苏 徐州 221116)

摘 要: 采用逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 及蛋白免疫印迹杂交 (Western Blot) 技术, 研究 0. 5 mmol/L 亚精胺浸种的黄瓜幼苗在淹水胁迫下, 根热激蛋白 70 基因 (*HSP70*) mRNA 和蛋白质的表达量的变化。结果表明: 淹水胁迫使黄瓜根 *HSP70* 的 mRNA 和蛋白的表达呈现先上升后下降的趋势, 在淹水 4 h 时, *HSP70* 的 mRNA 和蛋白表达量均极显著高于未淹水处理; 亚精胺浸种的黄瓜根 *HSP70* 的 mRNA 和蛋白的表达量在 24 h 内呈一直上升的趋势, 在淹水 24 h 时, *HSP70* 的 mRNA 和蛋白表达量均极显著高于未淹水处理。淹涝胁迫下, 亚精胺浸种的黄瓜根 *HSP70* 的 mRNA 和蛋白表达量在淹水 12 h 和 24 h 时极显著高于蒸馏水浸种。外源亚精胺能诱导淹涝胁迫下黄瓜幼苗根 *HSP70* mRNA 和蛋白质的表达量的增加, 缓解淹涝胁迫对黄瓜造成的伤害。

关键词: 黄瓜; 亚精胺; 淹涝; *HSP70*

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142 (2013) 05-0669-05

Effects of exogenous spermidine on the expression of *HSP70* in cucumber roots under waterlogging stress

ZHANG Jian, LIU Mei-Yan, SHEN Jie, LIU Dan,
YU Li-Xuan, LI Xue-Hua

(College of Life Sciences, Jiangsu Normal University, Xuzhou 211116, China)

Abstract: RT-PCR and Western Blot were adopted to study the effects of exogenous spermidine (0. 5 mmol/L) on *HSP70* in mRNA and protein expression of cucumber roots under waterlogging stress. The results showed that under waterlogging stress, the expression of *HSP70* in cucumber roots soaked with distilled water at mRNA and protein level increased and then decreased with the extension of waterlogging time, when the waterlogging time was up to 4 h, the expression quantity of *HSP70* mRNA and protein were extremely higher compared with no waterlogging treatment; the expression of *HSP70* in cucumber roots soaked with exogenous spermidine at mRNA and protein level increased within 24 h, when the waterlogging time was up to 24 h, the expression quantity of *HSP70* mRNA and protein were extremely significant different compared with no waterlogging treatment. Under waterlogging stress, the expression of *HSP70* mRNA and protein cucumber roots soaked with exogenous spermidine were extremely higher when the waterlogging time was up to 12 h and 24 h compared with soaked with distilled water. Exogenous spermidine could induce the expression of *HSP70* and protein in cucumber roots increased under waterlogging stress, and could relieve the harm caused by waterlogging stress.

收稿日期: 2012-11-23 修回日期: 2013-01-23

基金项目: 转基因生物新品种重大专项, 转基因生物分子特征识别技术 (2011ZX08012-002); 江苏高校优势学科建设工程资助项目; 徐州师范大学科研基金 (08XLA08)

作者简介: 张健 (1967-), 男, 江苏徐州人, 副教授, 主要从事植物生理学的教学与研究工作, (E-mail) zhangjian@jsnu.edu.cn.

Key words: cucumber; spermidine; waterlogging; HSP70

黄瓜 (*Cucumis sativus*) 属葫芦科黄瓜属, 是我国设施栽培的主要蔬菜作物之一。黄瓜属喜湿作物, 对土壤水分条件的要求较为严格, 生长期需要供给充足的水分, 但根系不耐缺氧, 2 d 左右的积涝, 就能使黄瓜生长受到严重的伤害, 严重影响幼苗的生长和发育。多胺 (polyamine, PA) 是一类低分子量脂肪族含氮碱化合物。包括二胺、三胺、四胺等。在高等植物中, 二胺主要是腐胺 (Put)、尸胺 (Cad), 三胺主要有亚精胺 (Spd), 四胺有精胺 (Spm) 等。多胺在植物抵抗非生物胁迫中发挥着重要的作用 (Sarvajeet *et al.*, 2010; Rubén *et al.*, 2010)。多胺能提高黄瓜对低氧胁迫 (李璟等, 2006)、低温胁迫 (Shen *et al.*, 2000)、盐伤害 (段九菊等, 2009) 等逆境的抵抗能力。相对于其它多胺而言, 亚精胺 (Spd) 对植物的生理功能影响更大 (Liu *et al.*, 2004)。热激蛋白 (heat shock proteins, HSPs) 是广泛存在于原核细胞和真核细胞中的一类在生物体受到高温等逆境刺激后大量表达的保守性蛋白质家族。应激条件下产生的热激蛋白能够发挥其分子伴侣的功能来提高生物体对逆境的抵抗能力 (Georgopoulos *et al.*, 1993; Luder *et al.*, 1998)。HSP70 家族 (68~74 kD) 是一个多基因家族, 可以作为蛋白成熟过程中的分子伴侣, 参与免疫反应、抗氧化功能、细胞周期调节、DNA 损伤修复及细胞凋亡, 提高细胞的应激耐受性。淹涝胁迫下亚精胺和 HSP70 表达之间关系的研究未见报道。本试验用 0.5 mmol/L 亚精胺溶液浸种, 研究外源亚精胺对淹涝胁迫下黄瓜根 HSP70 在 mRNA 和蛋白水平表达的影响, 探讨亚精胺和 HSP70 表达之间的规律, 为生产上应用亚精胺提高黄瓜幼苗的耐涝性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄瓜 (*Cucumis sativus*): 津研四号; 亚精胺, Sigma 公司产品; TRIzol 试剂, 上海奥宇生物科技有限公司产品; oligo (dT) 18 primer、M-MLV buffer、M-MLV Reverse Transcriptase, Fermentas 公司产品; dNTPS, Genview 公司产品; HSP70 一抗: 兔多克隆抗体, 购于 Agrisera

(AS08371); 二抗: 碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG, 购于中杉金桥 (ZB-2308) (进口分装); Actin 一抗: 鼠单克隆 IgG, 购于 Abcam (ab3280); 二抗: 碱性磷酸酶标记的马抗鼠多克隆 IgG, 购于中杉金桥 (ZB-2310) (进口分装)。其它试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 黄瓜幼苗的培养与处理 挑选大小均一且外形饱满的黄瓜种子, 分别用蒸馏水和 0.5 mmol/L 亚精胺溶液在 28 °C 下浸种 24 h, 然后播种于盛有蛭石的塑料钵里, 每钵 5 粒种子, 常规管理。当黄瓜幼苗长至两叶期时进行淹水处理, 淹水时保持水深 2 cm 左右, 每处理 10 钵, 3 次重复。在淹水后 0、2、4、8、12 和 24 h 时取黄瓜根, 洗净后放入 -80 °C 冰箱保存, 备用。

1.2.2 黄瓜幼根总 RNA 的提取 按照 TRIzol 试剂说明书操作方法提取黄瓜根总 RNA, 采用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 RNA 的含量和纯度。

1.2.3 RT-PCR 逆转录反应 (Reverse Transcription, RT), 按照 Reverse Transcriptase M-MLV 说明书操作, 10 μL 体系, 产物冻存于 -20 °C 备用。引物设计及合成: 根据 GenBank 中收录号为 X73961 的黄瓜 HSP70 基因序列, 利用 primer premier 5.0 软件设计 HSP70 上下游引物: Sense primer: 5' AAACCTCGGCAACTCTTCTG 3'; Anti-sense primer: 5' CACATTTCCATTCTCATCG 3', 扩增片段长度为 396 bp。根据收录号为 AB010922 黄瓜 Actin 基因序列, 设计 Actin 上下游引物: Sense primer: 5' TCCTCCGTTTGGACCTTGC 3'; Anti-sense primer: 5' GCTCCGATGGTGATGACTTG 3', 扩增片段长度为 232 bp。引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。HSP70 和 Actin 的退火温度分别为 48 °C 和 51 °C, 循环圈数均为 30, PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析。每个处理 3 次重复, 用超纯水和 RNA 样品代替 cDNA 作对照, 检测是否有外源性 DNA 和基因组 DNA 的污染。

1.2.4 黄瓜根总蛋白的提取和含量测定 总蛋白的提取按李玉花 (2011) 的方法进行, 按 Bradford (1976) 的方法测定蛋白质含量。

1.2.5 Western Blot 将黄瓜根总蛋白提取液等蛋白量上样, 经 SDS-PAGE 分离后利用湿转膜设备 (Mini Trans-blot, Bio-rad) 转到 PVDF 膜上,

转移条件为冰浴、100 V、2 h。蒸馏水清洗 PVDF 膜，用含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液（150 mmol/L NaCl，20 mmol/L Tris-HCl，pH7. 6，0. 05%吐温 20）封闭 3 h。随后用稀释 1 000 倍的一抗 37 °C 下温育 2 h，TBST 缓冲液冲洗 2 次。用稀释 100 倍的碱性磷酸酶标记的二抗 37 °C 下温育 1 h，TBST 缓冲液洗 2 次。加入 BCIP/NBT 避光显色 10~20 min 后，0. 5 mol/L EDTA（pH8. 0）和 0. 01 mol/L PBS（pH7. 4）洗膜，终止反应。

1. 2. 6 数据统计与分析 用 BIO-RAD 凝胶成像系统分析仪对电泳结果进行观察、拍摄，用 Quantity One 对电泳图和 Western Blot 结果进行光密度值分析，得出的值再除以对应的 *Actin* 的光密度值即是相对灰度值。用 SPSS17. 0 数据处理系统对试验数据进行分析。

2 结果与分析

2. 1 亚精胺对淹涝胁迫下黄瓜根 HSP70 mRNA 表达的影响

蒸馏水浸种和亚精胺浸种对淹涝胁迫下黄瓜根 HSP70 mRNA 表达量影响的电泳图谱见图 1 和图 2。从图 1 和图 2 可以看出，黄瓜根 HSP70 的 mRNA 有组成型表达（0 h）；淹水胁迫使黄瓜根 HSP70 的 mRNA 表达呈先上升后下降的趋势（图 1）。亚精胺浸种使淹涝胁迫下黄瓜根 HSP70 mRNA 表达量呈逐渐升高的趋势（图 2）。

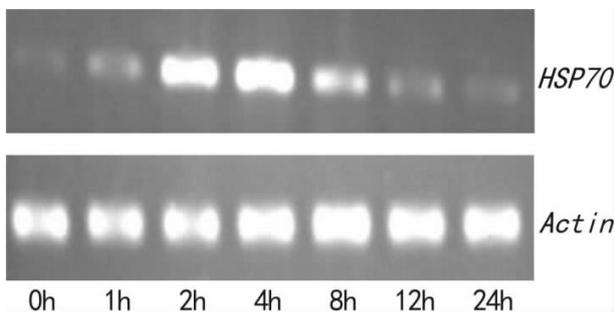


图 1 淹涝胁迫对黄瓜根 HSP70 mRNA 表达的影响
Fig. 1 Effects of waterlogging stress on HSP70 mRNA expression in cucumber roots

分析表明（图 3），蒸馏水浸种淹水 2、4 h 时，HSP70 mRNA 的表达量极显著高于未淹水处理（0 h）；淹水 8 h 时，HSP70 的 mRNA 表达量显著高于未淹水处理。亚精胺浸种淹水 1、2 h 时黄瓜根 HSP70 mRNA 的表达量与 0 h 相比差异不显

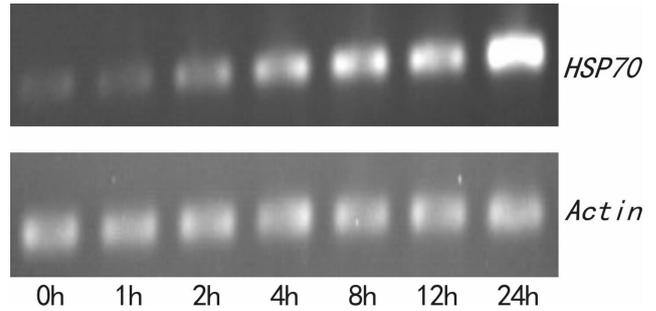


图 2 亚精胺对淹涝胁迫下黄瓜根 HSP70 mRNA 表达的影响

Fig. 2 Effects of exogenous spermidine on HSP70 mRNA expression in cucumber roots under waterlogging stress

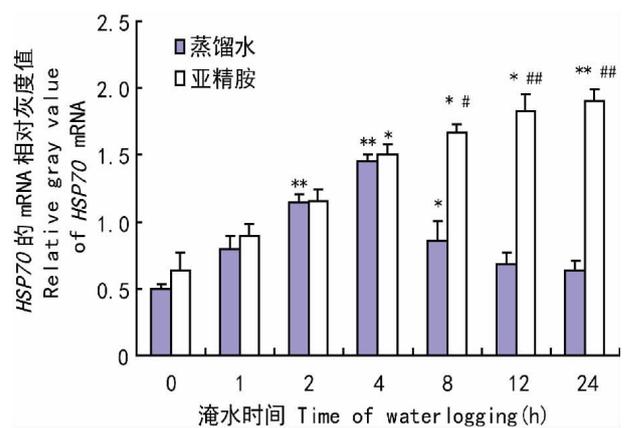


图 3 淹涝胁迫下蒸馏水浸种和亚精胺浸种的黄瓜根 HSP70 mRNA 表达量相对灰度值 *、** 分别表示与 0 h 相比达显著和极显著差异；#、## 分别表示与蒸馏水浸种相比达显著和极显著差异。下同。

Fig. 3 Relative gray value of HSP70 mRNA in cucumber roots soaking with distilled water and exogenous spermidine under waterlogging stress *、** represent significant and extremely significant difference respectively compared with 0 h；#、## represent significant and extremely significant difference respectively compared with the group soaking with distilled water. The same below.

著；淹水 4、8、12 h 时，HSP70 mRNA 的表达量显著高于 0 h；淹水 24 h 时，HSP70 mRNA 的表达量极显著高于 0 h。

从图 3 还可看出，在未淹水条件下，蒸馏水浸种与亚精胺浸种的黄瓜根 HSP70 mRNA 均有表达且差异不显著，说明在正常条件下亚精胺浸种对黄瓜 HSP70 mRNA 的表达无显著影响；淹涝 8 h 时，亚精胺浸种的黄瓜根 HSP70 mRNA 的表达量显著高于蒸馏水浸种处理，淹涝 12、24 h 时，HSP70 mRNA 表达量极显著高于蒸馏水浸种处理。说明亚精胺浸种可以诱导淹涝胁迫下黄瓜根 HSP70 mRNA 表达量的增加。

2.2 亚精胺对淹涝胁迫下黄瓜根 HSP70 蛋白表达的影响

淹涝胁迫使黄瓜根 HSP70 蛋白表达量呈先升高后下降的趋势 (图 4)。随着淹涝胁迫时间的延长, 亚精胺浸种的黄瓜根 HSP70 蛋白表达量呈逐渐升高的趋势 (图 5), 并与 HSP70 mRNA 水平上的结果一致。

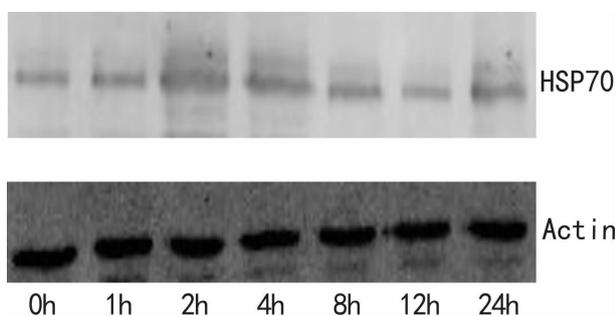


图 4 淹涝胁迫对黄瓜根 HSP70 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effects of waterlogging stress on expression of HSP70 protein in cucumber roots

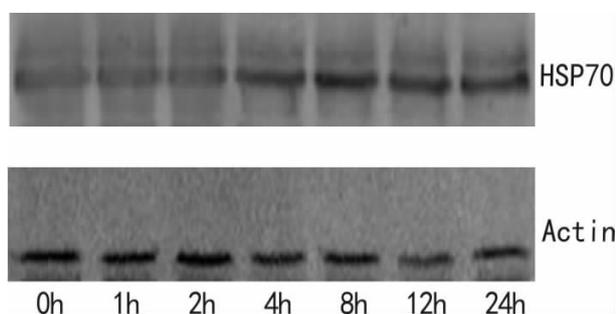


图 5 亚精胺对淹涝胁迫下黄瓜根 HSP70 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effects of exogenous spermidine on expression of HSP70 protein in cucumber roots under waterlogging stress

淹涝胁迫下, 蒸馏水浸种和亚精胺浸种的黄瓜在根 HSP70 蛋白表达相对灰度值比较见图 6。差异显著性分析表明, 蒸馏水浸种淹水 2、4 h 时, 黄瓜根 HSP70 蛋白的表达量显著高于未淹水处理; 而淹水 1、8、12 和 24 h 时, 黄瓜根 HSP70 蛋白表达量与未淹水处理相比差异不显著。亚精胺浸种淹水 4 h 时, 黄瓜根 HSP70 蛋白表达量显著高于未淹水处理; 淹水 8、12 和 24 h 时, HSP70 蛋白的表达量极显著高于未淹水处理。

淹水 0、1、2 和 4 h 时, 亚精胺浸种的黄瓜根 HSP70 蛋白表达量与蒸馏水浸种相比差异不显著; 淹水 8 h 时, 亚精胺浸种的黄瓜根 HSP70 蛋白表达量显著高于蒸馏水浸种; 淹水 12、24 h 时, 亚精胺浸种的黄瓜根 HSP70 蛋白表达量极显著高于

蒸馏水浸种。说明亚精胺浸种能诱导淹涝胁迫下黄瓜根 HSP70 蛋白表达量的增加。

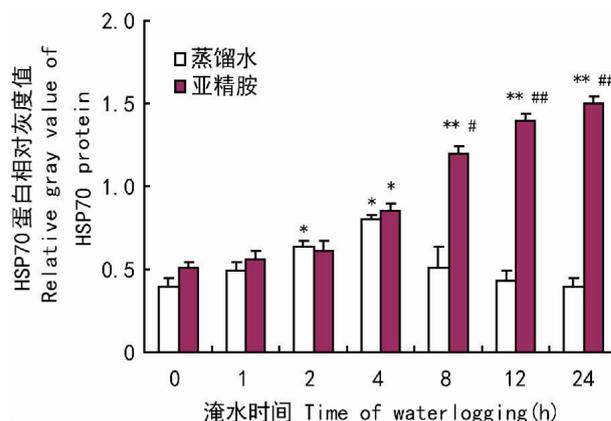


图 6 淹涝胁迫下蒸馏水浸种和亚精胺浸种的黄瓜根 HSP70 蛋白相对灰度值

Fig. 6 Relative gray value of HSP70 protein in cucumber roots soaking with distilled water and exogenous spermidine under waterlogging stress

3 结论与讨论

土壤中过多的水分使植物的根系因不能与空气间的气体进行交换而处于缺氧状态, 导致整个植株处于低氧胁迫状态。多胺可以提高植物对淹涝胁迫的抵抗能力。汪天等 (2005) 研究表明, 外源多胺能够促进黄瓜根系内源多胺含量的增加, 降低根系中过氧化氢的含量, 从而提高了黄瓜根系对低氧胁迫的抗性。Wang *et al.* (2005) 认为低氧胁迫下外施多胺, 显著提高了质膜 H^+ -ATP 酶活性, 从而缓解低氧胁迫造成的 H^+ 积累, 减轻根系低氧所造成的伤害。张健等 (2011) 研究表明, 外源亚精胺能维持芽涝逆境下玉米根细胞膜透性的稳定, 减少 $O_2 \cdot$ 产生速率和膜脂过氧化产物的积累, 从而减轻淹涝对玉米的伤害。

本试验结果表明, 亚精胺浸种能够诱导淹涝胁迫下黄瓜根细胞 HSP70 表达量在 24 h 内呈一直增加的趋势, 其 HSP70 表达量在淹水 8 h 后与蒸馏水浸种相比达显著和极显著差异。HSP70 在植物逆境胁迫中的保护作用主要体现在几个方面。首先, HSP70 和 ATP 结合具有微弱的 ATP 酶活性, 通过水解 ATP 来促使新合成、未折叠、错折叠或解折叠蛋白质的正确折叠和组装, 充分发挥分子伴侣的作用, 从而更好地维护细胞的功能与生存 (Wang *et al.*, 2004)。其次, 应激产生的 HSP70

能够提高细胞对应激原的耐受性, 细胞抵抗应激反应能力的提高可以通过 HSP70 基因转染或注射 HSP70 单克隆抗体技术获得 (韩传宝等, 2008)。再次, 防止细胞凋亡, 在应激条件下, 细胞内 HSP70 水平增高可以通过阻断信号通路, 抑制应激诱导的应激酶的激活 (Gabai *et al.*, 1997); HSP70 能减轻外部刺激引起的细胞膜蛋白的变性, 保护细胞蛋白质和核酸的合成途径免受损伤, 从而减少细胞凋亡 (秦佳等, 2007)。亚精胺浸种能够诱导淹涝胁迫下黄瓜根细胞 HSP70 表达量的增加, 因此能提高黄瓜幼苗对淹涝胁迫的抵抗能力。

本试验只研究了短时间淹水 (24 h) 情况下, 黄瓜根 HSP70 在 mRNA 和蛋白水平上的变化, 随着淹水时间的延长, 黄瓜根 HSP70 在 mRNA 和蛋白水平上的变化规律有待于进一步研究。

参考文献:

- 李玉花. 2011. 蛋白质分析实验技术指南 [M]. 北京: 高等教育出版社: 105
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, **72**: 248-254
- Duan JJ (段九菊), Guo SR (郭世荣), Kang YY (康云艳), *et al.* 2009. Effects of exogenous spermidine on active oxygen scavenging system and bound polyamine contents in chloroplasts of cucumber under salt stress (外源亚精胺对盐胁迫下黄瓜——*Cucumis sativus* L. 叶绿体活性氧清除系统和结合态多胺含量的影响) [J]. *Acta Ecol Sin* (生态学报), **29** (2): 653-661
- Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, *et al.* 1997. Hsp 70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance [J]. *J Biol Chem*, **272** (29): 18 027-18 033
- Georgopoulos C. 1993. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones [J]. *Ann Rev Cell Biol*, **9**: 601-634
- Han CB (韩传宝), Zhou QH (周钦海), Qian YN (钱燕宁). 2008. Regulation of heat shock protein 70 on the cell stress response (热休克蛋白 70 对细胞应激反应的调节) [J]. *J Clin Anesthesiol* (临床麻醉学杂志), **24** (8): 699-700
- Li J (李璟), Guo SR (郭世荣), Hu XH (胡晓辉). 2006. Effects of exogenous spermidine on polyamine contents and the activities of the enzymes relating to respiratory metabolism in cucumber roots suffering hypoxia (外源亚精胺对低氧胁迫下黄瓜根系多胺含量和呼吸代谢酶活性的影响) [J]. *Acta Bot Bor-Occ Sin* (西北植物学报), **26** (1): 92-97
- Liu HP, Dong BH, Zhang YY, *et al.* 2004. Relationship between osmotic stress and the levels of free conjugated and bound polyamines in leaves of wheat seedlings [J]. *Plant Sci*, **166** (5): 1 261-1 267
- Luder J. 1998. Cofactor-induced modulation of hsp70 is modified differentially by the hsp40 co-chaperones [J]. *Biol Chem*, **273**: 27 824-27 830
- Qin J (秦佳), Yang JY (杨金莹), Yi SY (伊淑莹), *et al.* 2007. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis (热激蛋白对细胞凋亡的调节作用) [J]. *Life Sci* (生命科学), **19** (2): 159-163
- Park YM, Han MY, Blackburn RV, *et al.* 1998. Overexpression of HSP25 reduces the level of TNF induced oxidative DNA damage biomarker, 8-hydroxy-2V-deoxyguanosine, in L929 cells [J]. *Cell Physiol*, **174** (1): 27-34
- Rubén Alcázar, Teresa Altabella, Francisco Marco. 2010. Polyamines; molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance [J]. *Planta*, **231**: 1 237-1 249
- Sarvajeet Singh Gill, Narendra Tuteja. 2010. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants [J]. *Plant Sign & Behav*, **5** (1): 26-33
- Schnaider T, Oikarinen J, Ishiwatari-Hayasaka H, *et al.* 1999. Interactions of Hsp90 with histones and related peptides [J]. *Life Sci*, **65** (22): 2 417-2 426
- Wang T, Li J, Guo SR, *et al.* 2005. Effects of exogenous polyamines on the growth and activities of H⁺-ATPase and H⁺-PPase in cucumber seedling roots under hypoxia stress [J]. *J Plant Physiol & Molecular Biol*, **31** (6): 637-642
- Wang T (汪天), Wang SP (王素平), Guo SR (郭世荣), *et al.* 2005. Changes of polyamines metabolism in roots of cucumber seedlings under root-zone hypoxia stress (低氧胁迫下黄瓜幼苗根系多胺代谢的变化) [J]. *Acta Horti Sin* (园艺学报), **32** (3): 433-437
- Wang WX, Vinocur B, Shoseyov O, *et al.* 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperons in the abiotic stress response [J]. *Trends Plant Sci*, **9**: 244-252
- Wenyun Shen, Kazuyoshi Nada, Shoji Tachibana. 2000. Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars [J]. *Plant Physiol*, **124**: 431-439
- Zhang J (张健), Wang KY (王考艳), Liu MY (刘美艳), *et al.* 2011. Study on enhancement of anti-water logging stress of maize seedlings by exogenous spermidine (外源亚精胺提高玉米抗涝的研究) [J]. *J Maize Sci* (玉米科学), **19** (3): 87-90