

CBF3 基因过量表达的拟南芥细胞质膜组分的变化

严海燕^{1,2}, STEPONKUS P L²

(1. 中国科学院武汉植物园, 武汉 430074; 2. Department of Crop and Soil Science, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA)

摘要: 通过提取过量表达 CBF3 基因和对照的拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* L. Heyn. (Columbia)] 茎叶的质膜, 分离并分析其脂类成分和蛋白质含量, 从中探讨 CBF3 对膜脂成分的影响及与抗冷适应的关系。研究结果表明, 过量表达 CBF3 植株的质膜膜脂总量和膜蛋白总量分别是对照的 227% 和 190%, 磷脂为 105%, 与冷适应诱导的效果相似。因此 CBF3 表达的变化可能对冷适应过程中质膜组成的改变起重要作用。

关键词: 拟南芥; 冷适应; 抗冻调控因子; CBF3; 质膜; 膜脂

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2004)06-0529-05

Changes of Components in Plasma Membrane of *Arabidopsis* Plants Overexpressed CBF3

YAN Hai-Yan^{1,2}, STEPONKUS P L²

(1. Wuhan Botanical Garden, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China;

2. Department of Crop and Soil Science, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA)

Abstract: The function of a cold response regulator gene CBF3 on membrane composition was studied. Plasma membrane from transgenic plant *Arabidopsis* Columbia constitutively expressing CBF3 gene and from control was extracted, membrane lipids and proteins were separated for further analysis. The results show that total lipids, total proteins and phospholipids of plasma membrane increased in constitutively expressing CBF3 transgenic plant by 227%, 190% for total lipids, and total proteins, by 105.05% for phospholipids. This effect is similar to that of cold acclimation, indicates that CBF3 induce the changes of the components in plasma membrane during cold acclimation, and play an important role in this process.

Key words: *Arabidopsis thaliana* L. Heyn. (Columbia); Cold acclimation; Cold response regulator; CBF3; Plasma membrane; Membrane lipids

植物对冻害的抵抗机制使它们能够渡过生存危机。对植物抗冻适应机制的研究, 将为农业生产提供减轻冻害损失的措施和方案。有多方面的因素影响植物抗冻性, 如膜的稳定性、细胞内渗透性物质的含量、抗冻蛋白含量等等。近年来, 在拟南芥中发现的 CBF/DREB (C-Repeat/Dehydration Response element Binding Factors) 是诱导一系列抗冻基因表达、引起多方面抗冻生理反应的一类调控因子。它们

通过作用于启动子的 CRT/DRE, 诱导 COR6.6、COR15a、COR47 等基因的表达^[1], 也引起植株中可溶性糖、脯氨酸含量的变化, 类似于抗冷适应中发生的变化^[2]。CBF/DREB 调控途径的成分在其它植物中也存在^[3]。CBF1、CBF3 基因的过量表达可诱导一系列抗冻反应, 大大提高植物的抗冻能力^[2,4]。其中 CBF3 的作用更强, 能诱导伴随冷适应过程中出现的多种反应^[2]。

收稿日期: 2004-05-31, 修回日期: 2004-06-22。

基金项目: Personal funding from Dr. Steponkus P L.

作者简介: 严海燕(1961—), 女, 研究员, 博士, 现从事植物生理生化、分子生物学方面的研究。本研究在 Cornell 大学农学院作物与土壤系低温生理实验室完成。

Uemura 等^[5]对经过冷适应的拟南芥叶质膜的脂成分进行了分析,经过冷适应的质膜中,PL (phospholipids) 含量上升(从 46.8%到 57.1%)同冬黑麦叶子冷适应过程中磷脂成分的变化不同,PC (phosphatidylcholine) 和 PE (phosphatidylethanoamine) 含量基本没有变化。CER (cerebroside) 含量略有下降(从 7.3%降至 4.3%),ASG (acylated sterylglucosides) 略有下降(从 3.4%降至 2.9%)。冷适应后的质膜没有发生 H II 相变。

尽管 Gilmour 等^[2]对 *CBF3* 过量表达的拟南芥进行了多方面的分析,但对质膜的成分未进行分析。我们对过量表达 *CBF3* 基因的拟南芥膜脂成分和膜蛋白含量进行了分析,研究了 *CBF3* 基因在控制质膜脂类的组成和含量,及其对质膜中蛋白含量的影响;比较了 *CBF3* 基因过量表达的冷适应和非冷适应植株与对照的异同。

1 材料和方法

1.1 拟南芥种植

采用由 CaMV35S 启动子控制的 *CBF3* 转基因拟南芥 F36,对照为拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* L. Heyn. (Columbia)]。F36 由日本的 Uemura Matsuo 实验室提供,在 Steponkus 实验室自交繁殖了多代,具有稳定的形态特征。作为对照材料、非冷适应的拟南芥种植于 25℃ 恒温培养箱中,8 h 光周期,土壤表面光强 $150 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。冷适应拟南芥在常温下萌发后转入 2℃ 冷室中生长,光周期同上,土壤表面光强 $125 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。分别取冷处理后第 7 d、14 d 的叶和对照温度下同时播种的拟南芥叶,用于提取膜蛋白和质膜脂。

1.2 细胞质膜的分离

根据 Uemura 等^[5]的方法,采用 PEG/dextran 两相分离系统分离。以每克鲜重叶片 4 mL 提取液 [0.5 mmol/L 山梨醇,50 mmol/L MOPS/KOH, pH 7.6, 5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L EGTA, 1.5% (w/v) PVP (MW 40 000), 0.5% (w/v) 脱脂 BSA, 1 mmol/L PMSF, 4 mmol/L 水杨羟肟酸 salicyl hydroxamic acid, 2.5 mmol/L 偏亚硫酸氢钾],在冰上用组织匀浆机 (Polytron, Brinkmann) 以中速研磨 30~45 s。匀浆液用 4 层纱布过滤,在 0℃, 10 000 g 离心 10 min,上清在 100 000 g 离心 1 h。沉淀在 0.25 mol/L 蔗糖, 10 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液 (pH 7.8) 中,溶解后与前一天制备好的两相分离系统 [6.0% w/w PEG 3 350

(Sigma), 6.0% (w/w) dextran T500 (Pharmacia), 0.25 mol/L 蔗糖, 30 mmol/L NaCl, 10 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液, pH 7.8] 充分混匀,然后在 0℃ 进行两相分离。将上相转移到新的系统再分离,共计 3 次。纯化的上相用含 0.25 mol/L 蔗糖和 10 mmol/L MOPS/KOH (pH 7.3) 缓冲液稀释后,在 156 000 g, 0℃ 离心 30 min,弃上清,沉淀即为细胞质膜。马上用于脂类的提取。质膜的纯度用质膜的 vanadate-敏感的 ATP 酶、液泡的硝酸盐敏感的 ATP 酶、高尔基体的 Triton X-100 刺激的 UDP 酶、线粒体的 Cyt c 氧化酶、内质网的 NADH Cyt c 还原酶标记酶活性鉴定。蛋白质含量测定用 Bradford^[6]的方法。

1.3 脂类分析

采用 Uemura 等^[5]的方法。总脂类用异丙醇抽提,干燥后用 Sep-Pak 硅胶柱 (Waters) 分离出中性脂、糖脂和磷脂。脂类抽提物溶解于氯仿:乙酸 (100:1, v/v) 中,转移到 Sep-Pak 硅胶柱上,用 20 mL 氯仿:乙酸 (100:1, v/v) 洗脱中性脂,10 mL 丙酮和 1 mL 丙酮:乙酸 (100:1) 洗脱糖脂,7.5 mL 甲醇:氯仿:水 (100:50:40, v/v/v) 洗脱磷脂,最后再用 2.25 mL 氯仿和 3 mL 水彻底洗脱磷脂。分离的各部分脂类经硅胶薄层层析 (TLC) 进一步分离。中性脂分离液为石油醚:乙基醚:乙酸 (80:35:1, v/v/v),糖脂用氯仿:甲醇:水 (65:25:4, v/v/v),磷脂用氯仿:甲醇:乙酸 (65:25:8, v/v/v)。硅胶板为 0.25 mm 厚 (Merck, Darmstadt, Germany)。甾醇的定量以胆固醇为标准品,采用 Zlatkis 和 Zak^[7]的方法。糖脂的分析以 Glc 为标准品,用 Dubois 等^[8]的方法测定。磷脂以 KH_2PO_4 为标准品,采用 Marinetti^[9]的方法测定。

2 结果

2.1 *CBF3* 基因过量表达对细胞质膜蛋白总含量和膜脂总含量的影响

在未经过冷适应的植株中,转有 *CBF3* 基因的 F36 植株细胞膜蛋白总含量、膜脂总含量、单位膜蛋白的膜脂含量均高于对照,分别提高了 90%、127% 和 18%。差异均为极显著,表明 *CBF3* 基因在细胞膜组成方面起关键作用 (表 1)。

在对照的拟南芥中,经过冷适应的植株单位鲜重膜蛋白含量变化不大,差异不显著。处理 14 d 后的结果没有再增加。而未经冷适应的 F36 的膜脂含量比经过对照冷适应 7 d 的膜脂含量还要高 43%。

表 1 质膜中蛋白质和脂类含量
Table 1 Protein and lipid content of plasma membrane

Treatments	Protein (mg/g FW)	Lipid(μmol/g FW)	Lipid(μmol/mg protein)
Columbia			
NA(3)	0.042 8±0.006	0.060 9±0.006	1.445 8±0.265
Acc7days(2)	0.041 8±0.014	0.096 7±0.030	2.580 6±1.580
Acc14days(3)	0.042 9±0.016	0.091 1±0.009	1.756 9±0.021
F36			
NA(4)	0.081 3±0.006	0.138 2±0.017	1.711 5±0.295
Acc7days(3)	0.061 3±0.014	0.102 6±0.013	1.719 1±0.344
Acc14days(2)	0.045 7±0.019	0.081 5±0.009	1.541 1±0.496

Notes: NA-non acclimated; Acc7days-acclimated 7 days; Acc14days-acclimated 14 days. *u*-statistic results for differences between cold treated samples and the sample of the same strain at one week before. *u* at F36 NA is the result between NA of F36 and NA of control Columbia. $|u|>2.58$, has significant difference at $\sigma=0.01$ level; $|u|>1.96$, has significant difference at $\sigma=0.05$ level; $|u|<1.96$, has no significant difference.

这个结果说明冷适应所造成的质膜蛋白和脂类成分的变化与 *CBF3* 基因过量表达引起的变化不同(表 1)。

在 F36 植株中,经过冷适应的植株细胞膜蛋白和膜脂含量反而减少,差异均为极显著。膜脂与膜蛋白的比例几乎没什么变化。没有转 *CBF3* 的植株在经过 7 d 的冷冻后的膜蛋白和膜脂含量不再有更明显的变化,膜脂与膜蛋白的比例反而下降。冷适应后 7 d 各项数据基本达到冷适应的最高值。结果表明,CaMV35S 启动子控制的 *CBF3* 的作用达到和

超出了冷适应引起的最高值(表 1)。

2.2 *CBF3* 基因过量表达对细胞质膜中不同类型脂类含量的影响

未经过冷适应的 F36 植株和对照脂膜脂类成分中,F36 植株的磷脂(PL)比例高于对照,提高了 5%。甾醇(SG+ASG)的比例低于对照(28%),差异均为极显著,变化趋势与 Uemura 等^[5]1995 年所得结果一致。说明 *CBF3* 基因在抗冷适应中磷脂和甾醇成分的改变中起重要作用。F36 和对照的质膜脑苷脂的成分差别不大(表 2)。

表 2 质膜总脂的脂类构成
Table 2 Lipids composition in total plasma membrane lipids

Treatments	mol% of total lipid			
	NL	PL	SG+ASG	CER
Columbia				
NA	29.54±0.85	55.36±1.19	8.09±1.17	7.01±0.75
Acc7days	26.14±1.63	58.27±0.37	7.38±0.96	8.22±1.05
Acc14days	28.63±1.40	60.17±1.59	5.48±0.92	5.72±1.03
F36				
NA	29.28±2.93	58.16±3.87	5.83±1.94	6.74±3.38
Acc7days	28.26±0.41	58.89±1.20	5.43±0.65	7.41±1.11
Acc14days	29.15±1.17	59.88±2.08	4.24±0.87	6.74±0.03

Notes: NL-neutral lipids; PL-phospholipids; SG-sterylglucoside(s); ASG-acylated sterylglucosides; CER-cerebro-sides. *u*-the same as in table 1.

在冷适应处理 7 d 后,对照中性脂降低 11.5%,甾醇降低 8.78%,磷脂增加 5.26%,显著性检验 *u* 值分析结果差异均为极显著。这与 Uemura 等的结果一致^[5]。在冷适应处理 7 d 后,脑苷脂增加 17%,在冷适应处理 14 d 后,相对于处理 7 d 的下降了 30%,差异极显著(表 2)。

2.3 *CBF3* 基因过量表达对细胞质膜磷脂各成分的影响

对未经冷适应的 F36 和对照质膜磷脂的成分进

行分析,结果表明,F36 的 PC、PI+PS 比例高于对照(9.2%和 3.2%),差异极显著和显著。PE 差异不显著。PG 和 PA 与对照比有所降低,差异极显著。这表明 *CBF3* 基因在磷脂成分的改变中起一定作用(表 3)。

经过冷适应 7 d 的对照和 F36 的 PC、PI+PS 均有下降,对照和 F36 的 PC 分别下降 11% 和 20%,PI+PS 分别下降 28% 和 10%。对照和 F36 的 PE 经过冷适应均有增加,分别为 7% 和 12%。上述各项差异均极显著(表 3)。

表 3 质膜磷脂的组成成分
Table 3 Phospholipids composition of plasma lipids

Treatments	mol% of total PL				
	PC	PI+PS	PE	PG	PA
Columbia					
NA	35.24±2.33	9.47±0.41	40.61±2.92	5.41±1.60	9.26±3.00
Acc7days	31.23±2.72	6.86±2.20	43.95±1.53	5.90±0.01	12.08±2.04
Acc14days	31.41±2.09	7.04±0.96	42.96±3.80	5.37±0.36	13.22±3.01
F36					
NA	38.49±1.45	9.77±1.40	40.52±3.60	4.34±0.91	6.88±1.54
Acc7days	30.96±2.04	8.83±1.45	45.47±1.03	5.12±0.37	9.60±1.27
Acc14days	33.60±4.36	8.16±1.17	44.53±0.49	5.63±0.08	8.10±5.93

Notes: PC-phosphatidylcholine; PI-phosphatidylinositol; PS-phosphatidylserine; PE-phosphatidylethanoamine; PG-phosphatidylglycerol; PA-phosphatidic acid. u-the same as in table 1. Avg. ±STD.

3 讨论

Gilmour 等^[2]的研究表明,CBF3在拟南芥中的过量表达,诱导脯氨酸、可溶性糖等大量合成,抗冻能力大大提高。我们的研究揭示了CBF3基因对细胞膜蛋白含量和膜脂含量的影响。由CaMV35S启动子控制的CBF3基因的过量表达在很大程度上提高了单位植物鲜重膜蛋白、膜脂总量的含量以及膜脂与膜蛋白之比(表1)。而对照冷适应诱导的植株单位鲜重膜蛋白含量、膜脂含量以及膜脂与膜蛋白之比的增加却远小于CaMV35S控制的CBF3表达造成的影响。经过冷适应的CaMV35S控制的表达CBF3基因的植株单位鲜重膜蛋白和膜脂总量反而减少,但膜脂与膜蛋白比例变化不稳定。这表明在天然冷适应过程中,CBF3基因表达调节膜蛋白和膜脂的合成。同时冷适应过程中,也有降低膜脂和膜蛋白成分的因素存在。Fowler和Thomashow^[10]最近的研究表明,在冷适应诱导表达的基因中,只有12%是CBF调控途径的成员,至少28%不属于CBF调控途径。306个冷诱导的基因中,218个基因是激活调控(up-regulation),88个基因是抑制调控(down-regulation)。而且,抑制调控多发生在冷处理的24h以后,这进一步说明了冷适应过程中,质膜成分变化的复杂性。

Uemura 等^[5]研究了冷适应过程对拟南芥质膜脂类组成的影响,结果表明,冷适应后中性脂下降17.2%,甾醇脂类下降了7.3mol%,磷脂增加了10.3mol%。恒定表达CBF3基因的植株相应变化的趋势与冷适应的变化一致,揭示CBF3基因在抗冷适应机制中对质膜磷脂和甾醇脂类的变化起重要作用。

CaMV35S控制的表达CBF3的拟南芥植株质

膜磷脂中磷脂酰胆碱比例略有增加(表3),与冷适应造成的变化不同,说明CBF3对磷脂成分比例的影响与冷适应的关系不大。

从上述结果来看,CBF3基因产物诱导膜总量的大量增加,同时诱导膜蛋白的大量合成。因为许多膜脂合成的酶类分布于膜上,所以这些膜蛋白中很可能有许多是膜脂合成有关的酶。由于经过冷适应的F36膜脂有所下降,表明有降解作用,而对照则没有这种作用。这表明CBF3也诱导有关的降解酶合成。CBF3的调控作用有可能是在脂类代谢的某个总开关处。

膜脂由中性脂、磷脂、甾醇、脑苷脂组成。CBF3在磷脂和甾醇含量变化的趋势方面与冷适应一致,表明在这两类脂的合成途径中起激活的作用。然而,在各种磷脂组分变化中,CBF3诱导的变化却与冷适应无关。这揭示了CBF3在磷脂合成方面的激活作用是间接的。

Gilmour 等^[2]的研究证明了CBF3诱导拟南芥中脯氨酸、可溶性糖含量及抗冻性的增加,我们的研究表明,CBF3诱导与抗冷适应一致的细胞膜膜脂含量的增加及相关组分磷脂、甾醇组成的变化。这个结果进一步证明了CBF3是一个冷适应过程中关键的调控因子,在植物抗冻、南方植物北移,换季节种植等基因改良品种方面具有重要应用价值。

参考文献:

[1] Stockinger E J, Gilmour S J, Thomashow M F. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, **94**: 1 035 - 1 040.

- [2] Gilmour S J, Sebolt A M, Salazar M P, Everard J D, Thomashow M F. Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation[J]. *Plant Physiology*, 2000, **124**: 1 854 – 1 865.
- [3] Jaglo K R, Kleff S, Amundsen K L, Zhang X, Haake V, Zhang J Z, Deits T, Thomashow M F. Components of the *Arabidopsis* C-Repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species [J]. *Plant Physiology*, 2001, **127**: 910 – 917.
- [4] Jaglo-Ottosen K R, Gilmour S J, Zarka D G, Schabenberger O, Thomashow M F. *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance[J]. *Science*, 1998, **280**: 104 – 106.
- [5] Uemura M, Joseph R A, Steponkus P L. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*-effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions[J]. *Plant Physiol*, 1995, **109**: 15 – 30.
- [6] Bradford M M. A rapid and sensitive method of total lipid extraction and purification[J]. *Can J Biochem Physiol*, 1976, **37**: 911 – 917.
- [7] Zlatkis A, Zak B. Study of a new cholesterol reagent [J]. *Anal Biochem*, 1969, **29**: 143 – 148.
- [8] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, Rebers P A, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Anal Chem*, 1956, **28**: 50 – 56.
- [9] Marinetti G V. Chromatographic separation, identification and analysis of phosphatides [J]. *J Lipid Res*, 1962, **3**: 1 – 12.
- [10] Fowler S, Thomashow M F. *Arabidopsis* transcriptome profiling Indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway[J]. *The Plant Cell*, 2002, **14**: 1 675 – 1 690.