

蜡梅热激蛋白基因 *CpHSP70-1* 的 克隆、亚细胞定位与表达分析^①

Tien V. Nguyen (阮文进)^{1,2}, 门维婷¹, 马 婧¹,
眭顺照¹, 李名扬¹

1. 西南大学 园艺园林学院/重庆市花卉工程技术研究中心/南方山地园艺学 教育部重点实验室, 重庆 400715;
2. 越南农业科学院 果树蔬菜研究所, 越南 河内

摘要: 在已构建的蜡梅花转录组数据库 EST 序列分析的基础上, 采用 RACE 技术克隆获得蜡梅热激蛋白 HSP70 的 cDNA 序列, 命名为 *CpHSP70-1* (GenBank 登录号: KR071130). 该序列全长 2 520 bp, 包括 1 962 bp 的完整开放阅读框, 编码 653 个氨基酸蛋白序列, 含有 3 个 HSP70 家族典型基序. *CpHSP70-1* 蛋白与其他真核生物的 HSP70 蛋白具有较高的同源性, 聚类分析显示其属于定位于细胞核/细胞质的蛋白. 亚细胞定位结果支持该蛋白分布于细胞核的预测. 利用实时荧光定量 PCR 对 *CpHSP70-1* 基因的表达特性进行分析, 其在各组织中均有不同程度的表达, 其中在成熟叶片中表达量最高; 在不同花发育阶段呈现持续稳定的表达模式; 该基因在低温和高温诱导下表达量提高, 而且对高温的响应更为敏感.

关键词: 蜡梅; 热激蛋白 70; RACE; 亚细胞定位; 表达分析

中图分类号: Q786; S685.17

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)01-0043-10

热激蛋白(Heat shock protein; HSP)是有机体受到高温及其他逆境胁迫时诱导合成的一类应激蛋白^[1]. 根据分子量的不同, 热激蛋白主要分为 HSP110、HSP90、HSP70、HSP60 和 smHSP(small HSPs)5 个家族^[2-4]. 其中, 热激蛋白 70(Heat shock protein 70, HSP70)结构最为保守、研究最广泛. HSP70 在原核生物和真核生物细胞中普遍存在, 是维持重要生命活动的功能蛋白. 热激蛋白 HSP70 包括 2 个功能区: N 末端的核酸结合区(Nucleotide binding domain, NBD)和 C 末端的多肽结合区(Peptide binding domain, PBD), 2 个区域之间由绞链相连^[5-6]. HSP70 有多种分类形式, 依据亚细胞定位, 可分为细胞质 HSP、内质网 HSP70、线粒体 HSP70 和叶绿体 HSP70 4 个亚族. 按照功能通常分为参与细胞结构的 HSC70(Heat shock cognate 70)、参与环境胁迫抵抗的 HSP70、参与葡萄糖调节的 GRP78/BIP(Binding immunoglobulin protien)和参与光合系统 II 的 HSP70B. 根据表达类型, 又可分为组成型 HSC70 和诱导型 HSP70 两大类^[7]. 研究表明大量 HSP70 作为分子伴侣, 通过参与多种细胞过程, 如新生肽链的折叠、组装、运输、变性蛋白的复性及错误折叠蛋白的降解等^[8], 在植物抵抗、适应逆境胁迫及生长发育过程中起着重要作用. 在拟南芥、水稻中表达 HSP70, 植物的耐热性都显著调高^[9-10]. 另外, HSP70 与植物的抗冷性、抗旱性、抗盐性、抗病性及抗重金属能力都密切相关^[11-14], Cazalé 等研究发现, HSP70 还引起了转基因拟南芥植株株型和叶形的改变, 降低了根分生组织的分裂活性^[14].

蜡梅[*Chimonanthus praecox* (L.) Link]是蜡梅科蜡梅属落叶丛生灌木, 是中国传统名花和特有经济

① 收稿日期: 2015-04-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31370698, 31070622).

作者简介: Tien V. Nguyen (阮文进) (1981-), 男, 越南人, 博士研究生, 主要从事生物技术与花卉育种研究.

通信作者: 李名扬, 教授, 博士生导师; 眭顺照, 教授, 硕士生导师.

树种, 冬季开花, 素有“三耐”(耐寒、耐旱和耐剪)与“三不”(冻不坏、旱不死和不缺枝)之美誉. 其高效的逆境防御机制涉及大量抗逆基因的协同作用, 目前仅胡雨晴等从分子角度探究了热激蛋白另一家族 smHSP 在蜡梅逆境胁迫下的表达特性^[15], 而热激蛋白 HSP70 是否在蜡梅的逆境防御机制中起作用, 还值得探讨. 本实验在对已构建的蜡梅花转录组数据库^[16]功能注释结果分析的基础上, 通过 RACE 技术分离获得 1 个蜡梅热激蛋白 HSP70 家族基因, 命名为 *CpHSP70-1*, 并对其生物信息学和转录水平的表达特性进行分析, 以期对蜡梅热激蛋白 HSP70 基因的功能研究提供参考.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

蜡梅花转录组数据库由重庆市花卉工程技术研究中心构建. 蜡梅四叶期幼苗由种子繁育而得, 培养条件为湿度 85%, 16 h 光照(2 000 Lx), 温度 25 °C, 8 h 黑暗, 温度 20 °C, 蜡梅种子由重庆市花卉工程技术研究中心保存. 蜡梅花朵及其他组织材料直接采于西南大学校园内的磬口蜡梅树, 常规养护管理.

1.1.2 菌株和载体

大肠杆菌(*Escherichia coli*)克隆菌株 TOP10, 由天根生化科技(北京)有限公司提供; pMD19-T 克隆载体, 由日本 TaKaRa(大连)公司提供; pCambia2301g 植物表达载体由重庆市花卉工程技术研究中心提供.

1.1.3 主要试剂

RNAprep Pure 植物总 RNA 提取、质粒提取、胶回收试剂盒和 Maker DL2000 购自天根生化科技(北京)有限公司; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司(美国); Taq DNA 聚合酶、PrimeScript® RT-PCR Kit 反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司; SsoFastTMEvaGreenSupermix 荧光定量试剂盒购自 Bio-Rad 美公司; 氨苄青霉素(Amp)和卡拉霉素(Kan)购自 Geneview 公司. 引物合成及测序均由华大基因有限公司完成.

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取和第一链 cDNA 的合成

利用 RNAprep Pure 植物总 RNA 提取试剂盒提取蜡梅花总 RNA, 然后以 1 μL 总 RNA 为模板, 按 PrimeScript® RT-PCR Kit 反转录试剂盒(TaKaRa)的方法合成 cDNA 第一链.

1.2.2 3'RACE 扩增

对蜡梅花转录组数据库中获得的 HSP70 家族基因的 EST 序列进行 Blast 比对, 发现其 5' 编码区完整, 但 3' 编码区缺失, 因此本实验利用 RACE 技术进行 3' 序列扩增, 以获得蜡梅热激蛋白基因 *CpHSP70-1* 的全长 cDNA 序列.

根据蜡梅花转录组数据库获得的 EST 序列设计合成两条巢式引物 HSP70-1-SP1 和 HSP70-1-SP2(表 1), 用于 RACE 反应扩增.

3'RACE 反应按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒说明书进行, 简述如下: 以 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒反转录加接头合成的 cDNA 第一链为模板, 以通用引物 UPM(表 1)和 HSP70-1-SP1 为上下游引物进行 PCR 扩增, 使用 EXTaqDNA 聚合酶进行扩增. 反应参数为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s; 60 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 2 min; 共 26 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min. 取 5 μL PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测.

以第一轮 PCR 产物稀释 10 倍作模板. 以 Nested Universal Primer A(NUP)(表 1)和 HSP70-1-SP2 为上下游引物同样用 EXTaqDNA 聚合酶进行 PCR 扩增. 反应参数同上. 将 PCR 产物以 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 胶回收试剂盒回收产物连接到 pMD19-T 克隆载体中, 转化 TOP10 感受态细胞, 挑取单菌落扩大培养后进行 PCR 鉴定, 反应参数为: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 26 个循环, 72 °C 延伸 10 min. 将 PCR 鉴定为阳性的菌液送华大基因公司进行测序.

1.2.3 cDNA 全长序列的获得及序列特征分析

利用 DNASTAR 的 Seqman 软件将 *CpHSP70-1* 基因的 EST 序列与 3'RACE 克隆所得序列进行拼接, 获得 *CpHSP70-1* 基因的 cDNA 电子全长. 根据该序列设计特异引物 HSP70-1-F 和 HSP70-1-R(表 1), 以

蜡梅花 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 回收产物并进行测序(PCR 反应参数和步骤参照 1. 2. 2).

生物信息学分析主要采用 DNAMAN 4. 0、Lasergene 7. 0 等软件包及相关在线分析软件进行.

1. 2. 4 *CpHSP70-1* 的亚细胞定位

1) 亚细胞定位载体的构建 以测序正确的 *CpHSP70-1* ORF 框为模板, HSP70-1-BamHI-F 和 HSP70-1-SalI-R 为上下游引物进行 PCR 扩增, 选取正确的克隆提取质粒, 与 pCAMBIA1300-GFP 分别经 BamHI 和 SalI 双酶切, 回收目的片段后用 T4 DNA 连接酶过夜连接, 构建 pCAMBIA1300/*CpHSP70-1* 融合表达载体, 转入大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 经 PCR、双酶切验证筛选阳性克隆, 并对阳性克隆进行测序验证.

2) 基因枪转化洋葱表皮细胞 微粒子子弹的制备及轰击受体材料参照徐娜^[17]的方法.

1. 2. 5 基因表达特性分析

选取长势一致的 3 株蜡梅幼苗, 在同一株上分别采集根、茎、子叶、幼叶; 选取 3 株无病虫害的蜡梅开花大树, 在同一植株上采取成熟叶、不同时期(萌动期、花蕾期、露瓣期、初开期、盛开期和初衰期)的花蕾或全花及盛开期的不同花器官(外瓣、中瓣、内瓣、雄蕊和雌蕊); 选取 20 株长势一致的蜡梅四叶期幼苗分别进行高温(42 ℃)、低温(4 ℃)胁迫处理, 在处理 0, 0. 25, 1, 6 和 12 h 时采取相同部位的叶片. 将上述材料按照 1. 2. 1 方法进行 RNA 的提取和第一链 cDNA 的合成.

用 SsoFast™ EvaGreen™ Supermix 试剂盒(Bio-Rad)分别对蜡梅不同组织, 花朵开放的不同阶段以及胁迫处理的嫩叶中目的基因 *CpHSP70-1* 的表达情况进行实时荧光定量 PCR 检测, 选取蜡梅 Actin-b 和 β-Tublin 基因为内参基因(表 1). 每个 cDNA 样本设置 3 个技术重复. 反应体系为: 2× Sso Fast Eva Green Supermix 5. 0 μL, 上下游引物 HSP70-1-F 和 HSP70-1-R(10 μmol/L)(表 1)各 0. 5 μL, cDNA 模板(50 ng/μL) 0. 5 μL, RNase Free dH₂O 3. 5 μL, 共 10 μL 体系. 反应程序为: 98 ℃预变性 30 s, 95 ℃变性 5 s, 60 ℃范围退火 5 s, 39 个循环(每个循环结束后采集荧光), 反应结束后从 65 ℃~95 ℃做熔解曲线分析. 试验数据通过 Bio-Rad Manager™ Software 软件进行分析, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[18]获得 *CpHSP70-1* 基因的相对表达量.

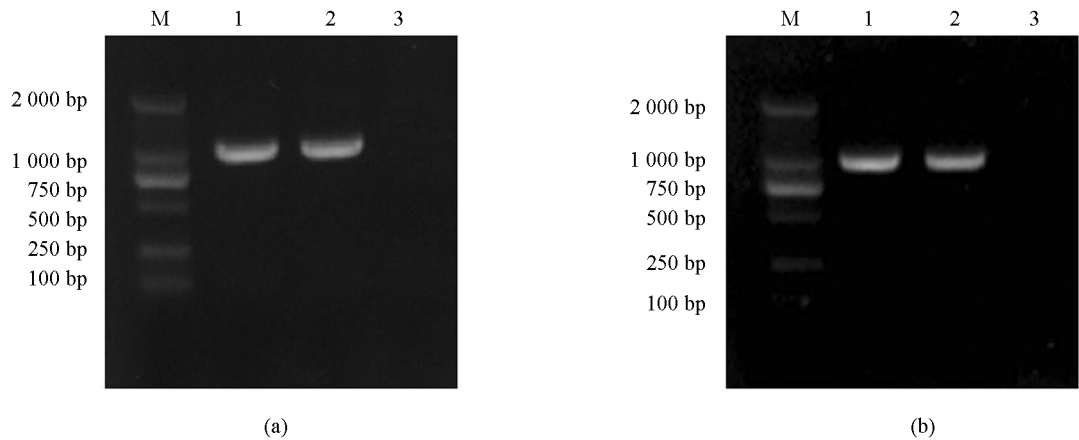
表 1 实验中所用引物

引物名称	引物序列
HSP70-1-SP1	TCTTGATGTTACCCCTCTTCCCT
HSP70-1-SP2	GGGTGAAAGAACCAGAACAAGGGAC
UPM-Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
UPM-Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
HSP70-1-F	AATTCAGATCCGATGGCAGGAAAGG
HSP70-1-R	ACTTGCCTTAAATTGATCAGTAGCTT
HSP70-1-BamHI-F	CGGGATCCCGATGGCAGGAAAGGGCG
HSP70-1-SalI-R	GCGTCGACGTCAACTTCCTCAATCTTAGGAC
Q-HSP70-1-F	CGGCTTTACTGATACCGAGCGTCT
Q-HSP70-1-R	GTATGACCTTAAATGGCCAGAGCTTC
Actin-b-F	AGGCTAAGATTCAAGACAAGG
Actin-b-R	TTGGTCGCAGCTGATTGCTGTG
β-Tubulin-F	GTGCATCTCTATCCACATCG
β-Tubulin-R	CAAGCTTCCTTATGCGATCC

2 结果与分析

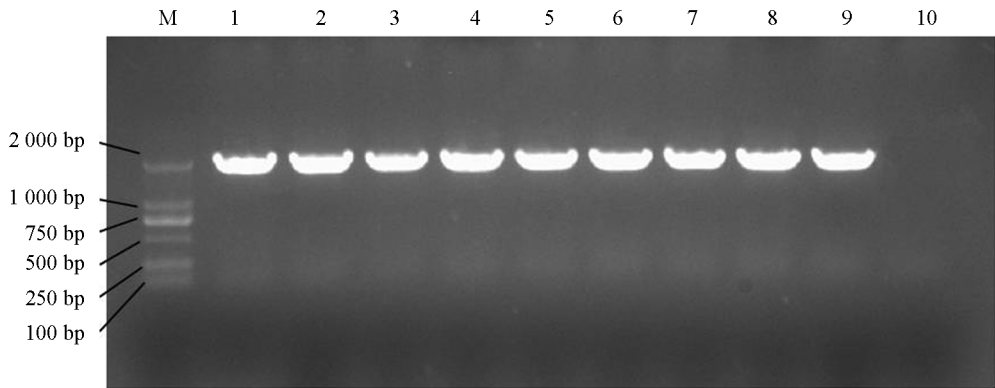
2. 1 蜡梅 *CpHSP70-1* 基因 cDNA 全长序列的获得及其序列特征

经 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RACE 扩增产物, 第一轮 PCR 获得约 1 100 bp 的特异条带(图 1-a). 巢式 PCR 扩增获得约 950 bp 的特异条带(图 1-b). 胶回收两条特异片段测序, 将测序结果拼接获得电子全长 1 983 bp. 再以蜡梅 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 最终获得蜡梅热激蛋白 HSP70 的全长 cDNA 序列(图 2), 命名为 *CpHSP70-1* (GenBank 登录号: KR071130).



M: DNA 分子量标准 DL2000; (a)和(b): 3'RACE PCR, a1-2: cDNA 模板, a3: ddH₂O 阴性对照; b1-2: cDNA 模板; b3: ddH₂O 阴性对照.

图 1 *CpHSP70-1* 基因 3'RACE PCR 琼脂糖凝胶电泳



M: DNA 分子量标准 DL2000; 1—9: cDNA 模板; 10: 阴性对照.

图 2 *CpHSP70-1* 基因的克隆

CpHSP70-1 基因全长 cDNA 序列为 2 520 bp, 包含 1 个 296 bp (1~296 bp) 的 5'-UTR 区 (5'untranslated region), 1 个 1 962 bp (296~2 258 bp) 的完整开放阅读框 (Opening Read Frame, ORF) 和 1 个 262 bp (2 259~2 520 bp) 的 3'-UTR 区 (3'untranslated region). 同时, 在 3'-UTR 区含有典型的加尾信号和 1 个长 27 bp 的 PolyA 结构.

2.2 蜡梅 *CpHSP70-1* 基因编码蛋白特征分析

2.2.1 *CpHSP70-1* 蛋白的结构特征

利用 ProtParam 在线软件预测 *CpHSP70-1* 蛋白编码 653 个氨基酸, 蛋白分子式为 C₃₁₂₇ H₅₀₃₅ N₈₆₃ O₉₉₉ S₂₅, 相对分子量为 71. 506kD. 该蛋白带负电荷的氨基酸残基 (Asp + Glu) 总数为 100 个, 带正电荷的氨基酸残基 (Arg + Lys) 总数为 82 个, 预测等电点 pi 值为 5. 10, 不稳定系数为 33. 85, 属于稳定的蛋白质. 该蛋白不含信号肽序列, 在第 405-427 氨基酸之间含有一个跨膜区域, 亚细胞定位预测显示其属于细胞核蛋白. 利用 SOPMA 进行在线预测, 结果表明: *CpHSP70-1* 蛋白的二级结构由 40. 43% 的 α 螺旋、7. 81% 的 β 折叠、31. 85% 的无规则卷曲及 19. 91% 延伸链组成. ProtScale 和 NetPhos 2. 0 软件预测结果表明: 其属于亲水性蛋白, 且具有 14 个丝氨酸磷酸化位点、13 个苏氨酸磷酸化位点和 5 个酪氨酸磷酸化位点, 这些磷酸化位点与蛋白的多样化修饰作用有关.

2.2.2 *CpHSP70-1* 蛋白的同源性比对

在 NCBI 数据库进行 BLASTP 比对, 结果显示: *CpHSP70-1* 蛋白与其他物种的 HSP70 蛋白同源性较高, 其中与小果野芭蕉 (XP_009409520. 1), 荷花 (XP_010253202. 1, XP_010253221. 1)、水稻 (NP_001068540. 1) 等的同源性都高达为 96%, 与其他物种的同源性也在 93%~95% 之间.

利用 DNAMAN 软件进行多重序列比对, 发现该 *CpHSP70-1* 蛋白的氨基酸序列含有 3 个 HSP70 家族的典型基序, 分别为 IDLGGTTYS (12~19)、IFDLGGGTFDVSLL (203~216) 和 VVLVGGSTRIPKVQQ (340~354 bp); 两个交叉螺旋氨基酸序列 INEPTAAIA (177-186) 和 AVAYGA AVQAA (374-384); 一个指纹序列 TVPAYFND (149-156) 及一个 C-末端典型的特征基序 EEVD (图 3).

	I							
Cp	MAGKGEPAIGIDLGTYSVGVWQHDRVEIIANDQGNRTTSPSYVF	FTD	ERLIGDAAKNQVAMNPNTVFDAKRLIGRRFSDSVQSDM 90					
Ca	MAGKGEPAIGIDLGTYSVGVWQHDRVEIIANDQGNRTTSPSYVF	FTD	ERLIGDAAKNQVAMNPNTVFDAKRLIGRRFSDSVQSDM 90					
Ma	MAGKGEPAIGIDLGTYSVGVWQHDRVEIIANDQGNRTTSPSYVF	FTD	ERLIGDAAKNQVAMNPNTVFDAKRLIGRRFSDSVQSDM 90					
Nt	MAGKGEPAIGIDLGTYSVGVWQHDRVEIIANDQGNRTTSPSYVF	FTD	ERLIGDAAKNQVAMNPNTVFDAKRLIGRRFSDSVQSDM 90					
Os	MAGKGEPAIGIDLGTYSVGVWQHDRVEIIANDQGNRTTSPSYVF	FTD	ERLIGDAAKNQVAMNPNTVFDAKRLIGRRFSDSVQSDM 90					
Rc	MAGKGEPAIGIDLGTYSVGVWQHDRVEIIANDQGNRTTSPSYVF	FTD	ERLIGDAAKNQVAMNPNTVFDAKRLIGRRFSDSVQSDM 90					
Vv	MAGKGEPAIGIDLGTYSVGVWQHDRVEIIANDQGNRTTSPSYVF	FTD	ERLIGDAAKNQVAMNPNTVFDAKRLIGRRFSDSVQSDM 90					
Consensus	magkgepaigidlgtysv	gvwqhdrveiiandqgnrttspsyv	ftd erligdaaknqvamnp ntvfdaakrligr d svq d					
	II		III-1					
Cp	KLWPFKVIIEGEGDKPMIVVYKGEQKFAAEEISSMVLKMR	IAEALG	STIKNAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVMRIINEP 180					
Ca	KLWPFKVIIEGEGDKPMIVVYKGEQKFAAEEISSMVLKMR	IAEALG	STIKNAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVMRIINEP 180					
Ma	KLWPFKVIIEGEGDKPMIVVYKGEQKFAAEEISSMVLKMR	IAEALG	STIKNAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVMRIINEP 180					
Nt	KLWPFKVIIEGEGDKPMIVVYKGEQKFAAEEISSMVLKMR	IAEALG	STIKNAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVMRIINEP 180					
Os	KLWPFKVIIEGEGDKPMIVVYKGEQKFAAEEISSMVLKMR	IAEALG	STIKNAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVMRIINEP 180					
Rc	KLWPFKVIIEGEGDKPMIVVYKGEQKFAAEEISSMVLKMR	IAEALG	STIKNAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVMRIINEP 180					
Vv	KLWPFKVIIEGEGDKPMIVVYKGEQKFAAEEISSMVLKMR	IAEALG	STIKNAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVMRIINEP 180					
Consensus	k lwpfkvi	gp dkpmi v ykge	kqfaaeiissmvl km elaea lg knavvtvpayfndsq					
	III-2		I					
Cp	TAAAIAYGLDKKATSVGEKNVLI	FDLGGGTFDVSLLT	IEEGIFEVKATAGDTHLGGEDF	DNRMVNHVQEFKRRKKKDISGNPRALRRLR 270				
Ca	TAAAIAYGLDKKATSVGEKNVLI	FDLGGGTFDVSLLT	IEEGIFEVKATAGDTHLGGEDF	DNRMVNHVQEFKRRKKKDISGNPRALRRLR 270				
Ma	TAAAIAYGLDKKATSVGEKNVLI	FDLGGGTFDVSLLT	IEEGIFEVKATAGDTHLGGEDF	DNRMVNHVQEFKRRKKKDISGNPRALRRLR 270				
Nt	TAAAIAYGLDKKATSVGEKNVLI	FDLGGGTFDVSLLT	IEEGIFEVKATAGDTHLGGEDF	DNRMVNHVQEFKRRKKKDISGNPRALRRLR 270				
Os	TAAAIAYGLDKKATSVGEKNVLI	FDLGGGTFDVSLLT	IEEGIFEVKATAGDTHLGGEDF	DNRMVNHVQEFKRRKKKDISGNPRALRRLR 270				
Rc	TAAAIAYGLDKKATSVGEKNVLI	FDLGGGTFDVSLLT	IEEGIFEVKATAGDTHLGGEDF	DNRMVNHVQEFKRRKKKDISGNPRALRRLR 270				
Vv	TAAAIAYGLDKKATSVGEKNVLI	FDLGGGTFDVSLLT	IEEGIFEVKATAGDTHLGGEDF	DNRMVNHVQEFKRRKKKDISGNPRALRRLR 270				
Consensus	taaaia	ygldkkatsvgeknvli	fdlgggtfdvsll	tieegifevkatagdthlgggedf				
	I							
Cp	TS	CERAKRTLSSTAQTITIEIDSLYEGIDFY	STITRARFEELNMDLFRKCM	EPVEKCLRDAKMDKSTVHDVVLVGGSTRIEFVQQLQDFF 360				
Ca	TS	CERAKRTLSSTAQTITIEIDSLYEGIDFY	STITRARFEELNMDLFRKCM	EPVEKCLRDAKMDKSTVHDVVLVGGSTRIEFVQQLQDFF 360				
Ma	TS	CERAKRTLSSTAQTITIEIDSLYEGIDFY	STITRARFEELNMDLFRKCM	EPVEKCLRDAKMDKSTVHDVVLVGGSTRIEFVQQLQDFF 360				
Nt	TS	CERAKRTLSSTAQTITIEIDSLYEGIDFY	STITRARFEELNMDLFRKCM	EPVEKCLRDAKMDKSTVHDVVLVGGSTRIEFVQQLQDFF 360				
Os	TS	CERAKRTLSSTAQTITIEIDSLYEGIDFY	STITRARFEELNMDLFRKCM	EPVEKCLRDAKMDKSTVHDVVLVGGSTRIEFVQQLQDFF 360				
Rc	TS	CERAKRTLSSTAQTITIEIDSLYEGIDFY	STITRARFEELNMDLFRKCM	EPVEKCLRDAKMDKSTVHDVVLVGGSTRIEFVQQLQDFF 360				
Vv	TS	CERAKRTLSSTAQTITIEIDSLYEGIDFY	STITRARFEELNMDLFRKCM	EPVEKCLRDAKMDKSTVHDVVLVGGSTRIEFVQQLQDFF 360				
Consensus	t	cerakrtlsstaqtitieidslweg	idfy titrarfeelnmdlfrkcmepveklrda	mdks hdvvlvggstrip vqqlldff				
	III							
Cp	NGKELCKS	INPDEAVAYGA	AAVQAAILSGEGNEKVQD	LLLLDVTPLSIGLETAGGVMTVLI	PRNTTIPTKKEQVFSTYSDNQPGVLIQVYE 450			
Ca	NGKELCKS	INPDEAVAYGA	AAVQAAILSGEGNEKVQD	LLLLDVTPLSIGLETAGGVMTVLI	PRNTTIPTKKEQVFSTYSDNQPGVLIQVYE 450			
Ma	NGKELCKS	INPDEAVAYGA	AAVQAAILSGEGNEKVQD	LLLLDVTPLSIGLETAGGVMTVLI	PRNTTIPTKKEQVFSTYSDNQPGVLIQVYE 450			
Nt	NGKELCKS	INPDEAVAYGA	AAVQAAILSGEGNEKVQD	LLLLDVTPLSIGLETAGGVMTVLI	PRNTTIPTKKEQVFSTYSDNQPGVLIQVYE 450			
Os	NGKELCKS	INPDEAVAYGA	AAVQAAILSGEGNEKVQD	LLLLDVTPLSIGLETAGGVMTVLI	PRNTTIPTKKEQVFSTYSDNQPGVLIQVYE 450			
Rc	NGKELCKS	INPDEAVAYGA	AAVQAAILSGEGNEKVQD	LLLLDVTPLSIGLETAGGVMTVLI	PRNTTIPTKKEQVFSTYSDNQPGVLIQVYE 450			
Vv	NGKELCKS	INPDEAVAYGA	AAVQAAILSGEGNEKVQD	LLLLDVTPLSIGLETAGGVMTVLI	PRNTTIPTKKEQVFSTYSDNQPGVLIQVYE 450			
Consensus	ngkelck	inpdeavaygaavqaa	ilsgegnekvqd	lllldvtpsl	gletaggvmtvli			
	IV							
Cp	GER	TRTDNNLLGKFELSGIP	PAPRGVPQITVCF	DI	DANGILNVSAEDKTTGQKNK	ITITNDKGRLSKEIEKVMQEA	EAYKSEDEEHKK 540	
Ca	GER	TRTDNNLLGKFELSGIP	PAPRGVPQITVCF	DI	DANGILNVSAEDKTTGQKNK	ITITNDKGRLSKEIEKVMQEA	EAYKSEDEEHKK 540	
Ma	GER	TRTDNNLLGKFELSGIP	PAPRGVPQITVCF	DI	DANGILNVSAEDKTTGQKNK	ITITNDKGRLSKEIEKVMQEA	EAYKSEDEEHKK 540	
Nt	GER	TRTDNNLLGKFELSGIP	PAPRGVPQITVCF	DI	DANGILNVSAEDKTTGQKNK	ITITNDKGRLSKEIEKVMQEA	EAYKSEDEEHKK 540	
Os	GER	TRTDNNLLGKFELSGIP	PAPRGVPQITVCF	DI	DANGILNVSAEDKTTGQKNK	ITITNDKGRLSKEIEKVMQEA	EAYKSEDEEHKK 540	
Rc	GER	TRTDNNLLGKFELSGIP	PAPRGVPQITVCF	DI	DANGILNVSAEDKTTGQKNK	ITITNDKGRLSKEIEKVMQEA	EAYKSEDEEHKK 540	
Vv	GER	TRTDNNLLGKFELSGIP	PAPRGVPQITVCF	DI	DANGILNVSAEDKTTGQKNK	ITITNDKGRLSKEIEKVMQEA	EAYKSEDEEHKK 540	
Consensus	ger	trtdnnllgkfels	gippaprgvpqitv	cf	didangilnvsaedk	ttgqknk	ititndkgrlsk	
	I							
Cp	KVES	KNALENYAYNMRNTIK	DKISAKLPD	DKKKIEDA	IEQAIQWLDSNQLA	EDDEFDKMKELES	CNPIIAKMYQ	GGAGDMAGGMDE 630
Ca	KVES	KNALENYAYNMRNTIK	DKISAKLPD	DKKKIEDA	IEQAIQWLDSNQLA	EDDEFDKMKELES	CNPIIAKMYQ	GGAGDMAGGMN 630
Ma	KVES	KNALENYAYNMRNTIK	DKISAKLPD	DKKKIEDA	IEQAIQWLDSNQLA	EDDEFDKMKELES	CNPIIAKMYQ	GGAGDMAGGMD 629
Nt	KVES	KNALENYAYNMRNTIK	DKISAKLPD	DKKKIEDA	IEQAIQWLDSNQLA	EDDEFDKMKELES	CNPIIAKMYQ	GGAGDMAGMD 630
Os	KVES	KNALENYAYNMRNTIK	DKISAKLPD	DKKKIEDA	IEQAIQWLDSNQLA	EDDEFDKMKELES	CNPIIAKMYQ	GGAGDMAGMD 630
Rc	KVES	KNALENYAYNMRNTIK	DKISAKLPD	DKKKIEDA	IEQAIQWLDSNQLA	EDDEFDKMKELES	CNPIIAKMYQ	GGAGDMAGMD 630
Vv	KVES	KNALENYAYNMRNTIK	DKISAKLPD	DKKKIEDA	IEQAIQWLDSNQLA	EDDEFDKMKELES	CNPIIAKMYQ	GGAGDMAGMD 630
Consensus	kv	kna	lenyaynmrnt	d ki kl	dkkki dai	iqwld nqlae	def dkmkele	cnpiiakmyqg g
	IV							
Cp	DGP	PVGGSSSGAG	GPKIEVD	653				
Ca	DDV	PPSGSS...	GAGPKIEVD	649				
Ma	DDA	PPAGGS...	GAGPKIEVD	648				
Nt	DAP	APSGGS...	GAGPKIEVD	649				
Os	DDA	PPAGGS...	GAGPKIEVD	649				
Rc	DAP	AGG.....	SAGPKIEVD	647				
Vv	DVPPASG.....	SAGPKIEVD	648					
Consensus	d	gagpkievd						

Cp: 蜡梅(KR071130); Ca: 鹰嘴豆(XP_004492118.1); Ma: 小果野芭蕉(XP_009409520.1); Nt: 烟草(AAR17080.1); Os: 水稻(NP_001068540.1); Rc: 蓖麻(XP_002527736.1); Vv: 葡萄(XP_002284008.1); 黑色部分表示相似性为 100%; *, 终止密码子; I: 典型基序; II: 指纹序列; III: 交叉螺旋氨基酸序列; IV: 细胞质 HSP70 C-末端特征基序。

图 3 *CpHSP70-1* 与同源基因编码区氨基酸序列比对

2.2.3 *CpHSP70-1* 蛋白的聚类分析

将蜡梅 *CpHSP70-1* 蛋白与其他物种定位于不同亚细胞结构的 HSP70 蛋白进行聚类分析(图 4), 结果表明: 18 个 HSP70 家族蛋白分处于 4 个大的分支, 而且 *CpHSP70-1* 蛋白与定位于细胞核/细胞质的热激蛋白聚为一支, 二者在细胞中可能具有相似的分布情况. 结合 BLAST 比对和 *CpHSP70-1* 基因序列特征分析结果, 推测蜡梅 *CpHSP70-1* 蛋白可能定位于细胞核或细胞质中.

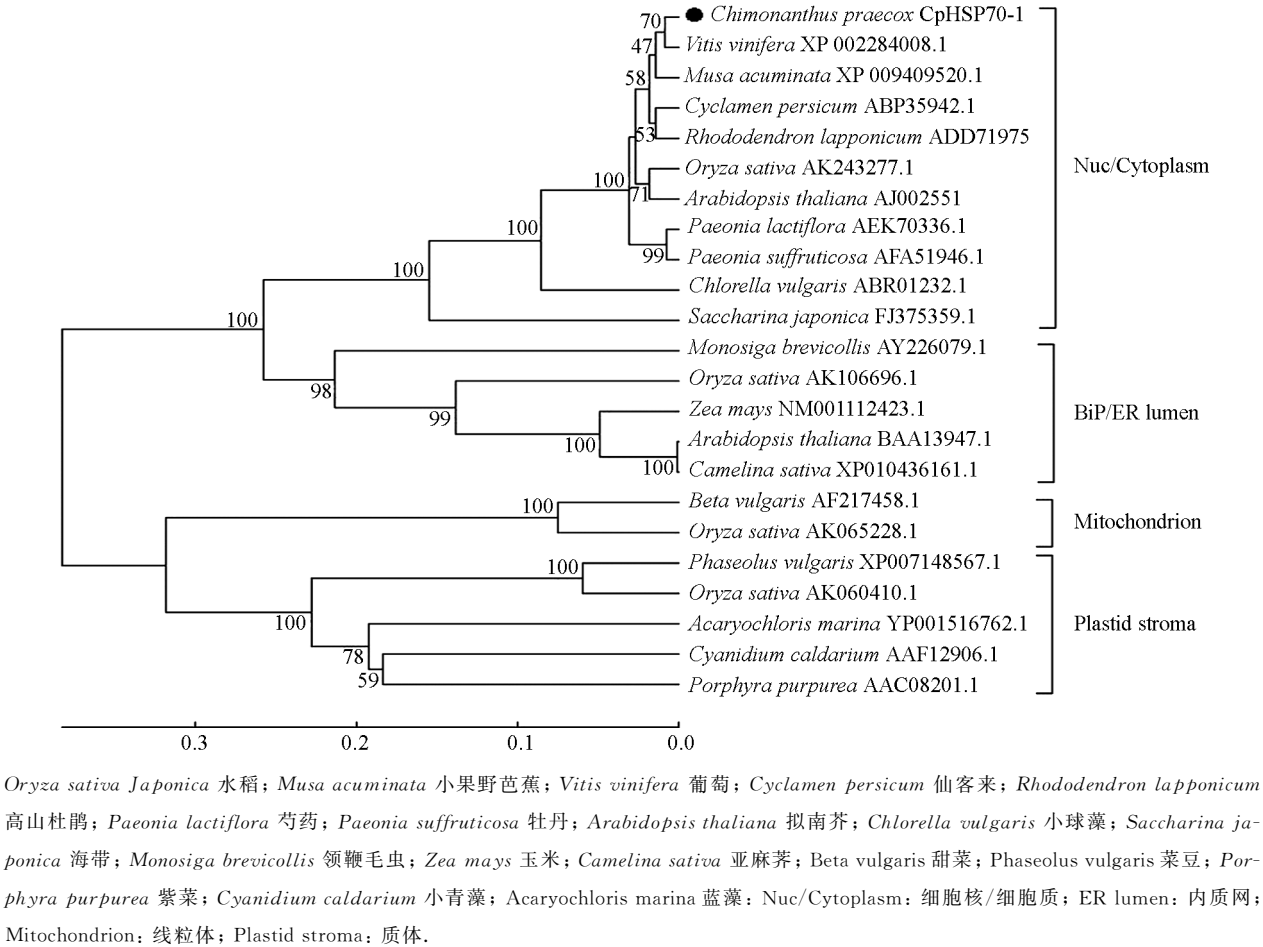


图 4 *CpHSP70-1* 蛋白与其他物种热激蛋白的聚类分析

2.3 *CpHSP70-1* 蛋白的亚细胞定位

2.3.1 *CpHSP70-1* 基因亚细胞表达载体的构建

对 *CpHSP70-1* 和 pCAMBIA1300 的重组质粒用特异性引物 HSP70-1-BamHI-F 和 HSP70-1-SalI-R 进行 PCR 鉴定(图 5-a), 初步鉴定为阳性的质粒进行双酶切验证(图 5-b), 经 1% 琼脂凝胶电泳检测表明: 成功构建亚细胞融合表达载体 pCAMBIA1300/*CpHSP70-1*.

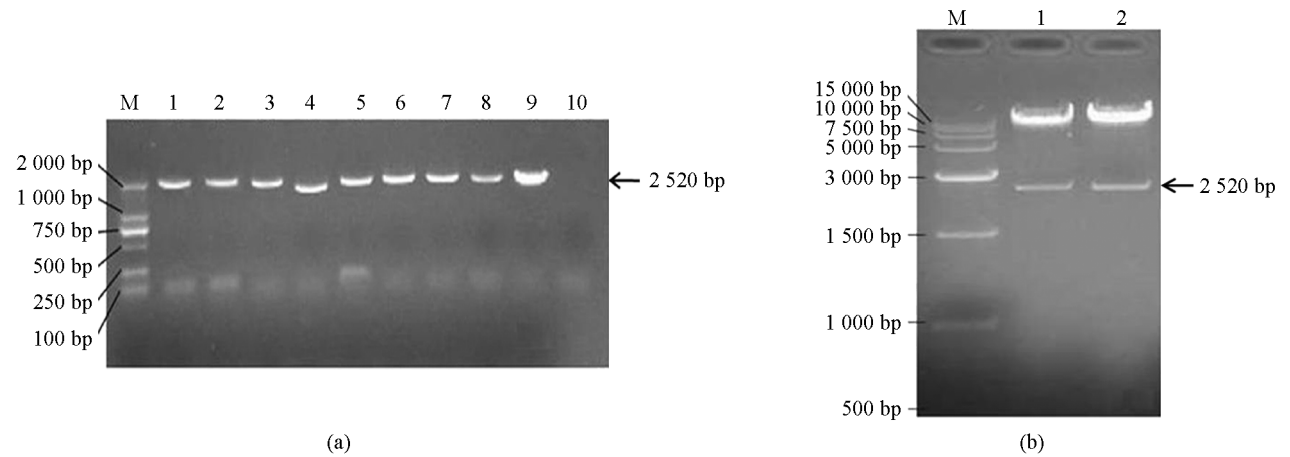
2.3.2 洋葱表皮亚细胞定位的瞬时表达

用基因枪法将 pCAMBIA1300/GFP 空载和 pCAMBIA1300/*CpHSP70-1* 重组质粒转化到洋葱表皮细胞中, 进行瞬时表达检测. 在荧光显微镜下观察洋葱表皮细胞, 发现在转化 pCAMBIA1300 空载的洋葱表皮细胞内, 绿色荧光在整个细胞膜、细胞核和细胞质中均有分布(图 6: D、E、F). 而 pCAMBIA1300/*CpHSP70-1* 重组质粒在细胞核上荧光信号最为强烈, 表明目的蛋白主要分布在细胞核中(图 6: A、B、C), 这与 *CpHSP70-1* 基因的序列特征和蛋白聚类结果均吻合.

2.4 蜡梅 *CpHSP70-1* 基因表达特性分析

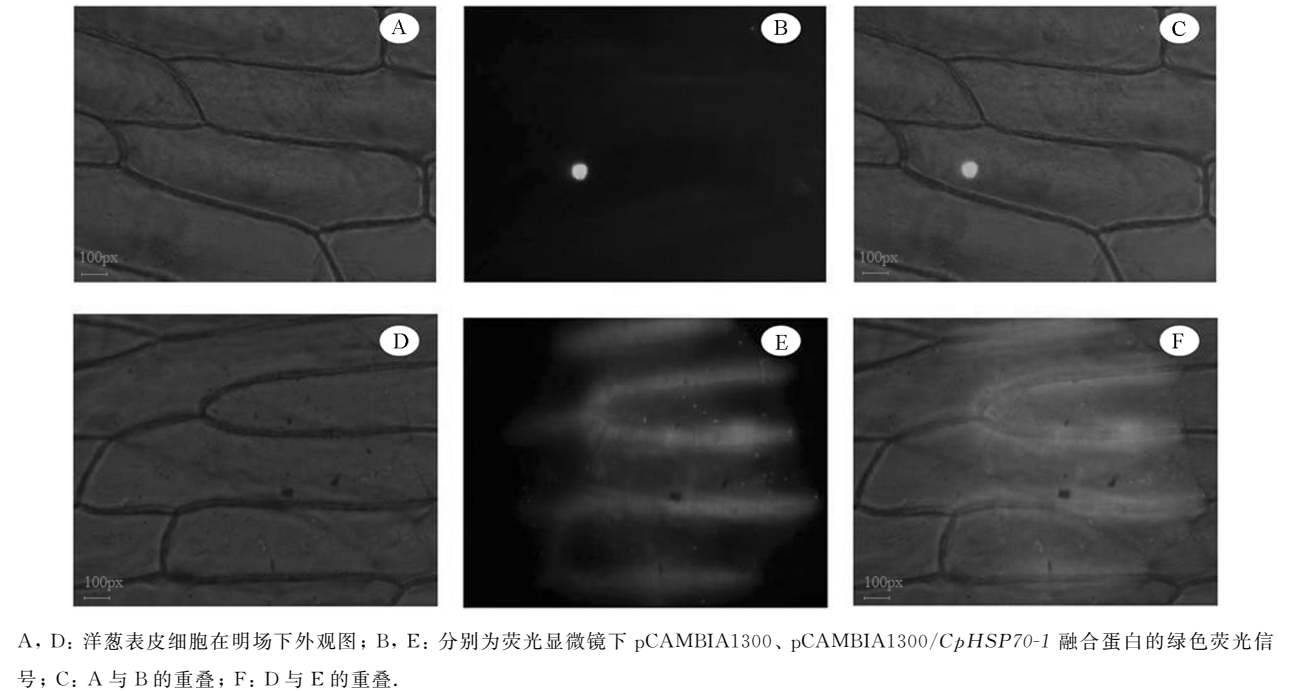
2.4.1 *CpHSP70-1* 在不同组织中的表达

对 *CpHSP70-1* 基因在蜡梅各个组织中的表达情况进行分析, 该基因在各个组织中有不同程度表达,



M: DNA 分子量标准 DL2000; a1-8: 含 pCambia1300/*CpHSP70-1* 表达载体质粒的大肠杆菌 TOP10 菌液 PCR 检测; a9: 阳性对照 (pCambia1300/*CpHSP70-1* 质粒); a10: 阴性对照(ddH₂O); b1-2: pCambia1300/*CpHSP70-1* 质粒双酶切.

图 5 pCambia1300/*CpHSP70-1* 质粒 PCR 检测(左)和双酶切鉴定(右)



A, D: 洋葱表皮细胞在明场下外观图; B, E: 分别为荧光显微镜下 pCambia1300、pCambia1300/*CpHSP70-1* 融合蛋白的绿色荧光信号; C: A 与 B 的重叠; F: D 与 E 的重叠.

图 6 *CpHSP70-1* 蛋白的亚细胞定位

其中在成熟叶片中的表达量最高(图 7). 另外, 该基因在花器官中均有较高丰度表达, 在三轮花瓣中的表达量又明显高于雄蕊和雌蕊.

2.4.2 *CpHSP70-1* 在不同花发育时期的表达

CpHSP70-1 基因在蜡梅花朵开放过程中呈现出持续稳定的表达模式(图 8). 从萌动期到初衰期, 该基因都有较高水平的表达.

2.4.3 *CpHSP70-1* 在不同温度胁迫下的表达

低温(4 ℃)和高温(42 ℃)胁迫均能诱导 *CpHSP70-1* 基因的表达(图 9), 这与 Montero-Barrientos 等^[13]的研究结果类似. 在低温和高温胁迫 0.25 h, *CpHSP70-1* 基因的表达量都有所上调, 且都在 1 h 达到峰值. 但 *CpHSP70-1* 基因受高温诱导更为明显, 在高温处理 0.25 h 后, 基因表达量上调幅度更大. 但在高温处理 6 h 后基因表达迅速下调至对照相近水平.

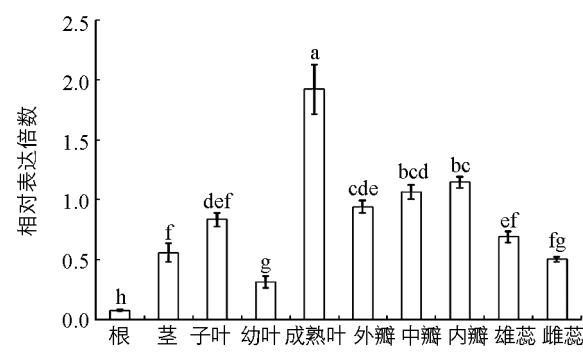


图 7 *CpHSP70-1* 在不同组织中的表达分析

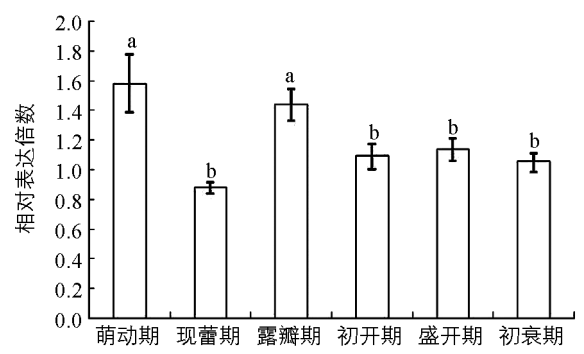


图 8 *CpHSP70-1* 在不同花发育阶段中的表达分析

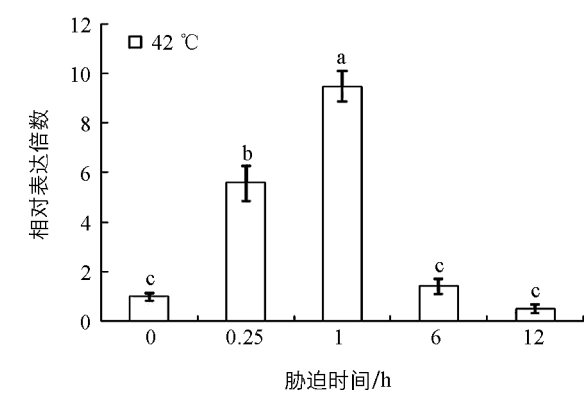
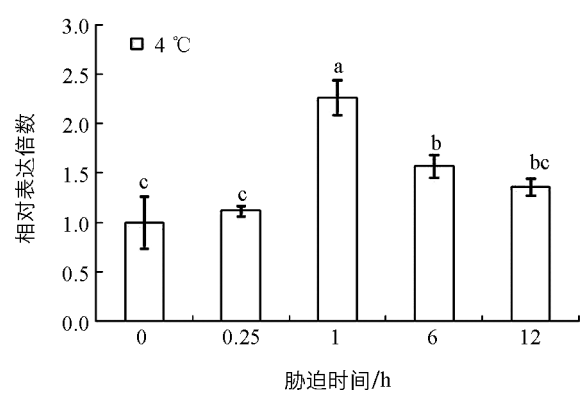


图 9 *CpHSP70-1* 在不同温度胁迫下的表达分析

3 讨 论

CpHSP70-1 基因编码蛋白 C-末端具有一个典型的特征基序 EEVD, 通常含有该基序的 HSP70 都定位于细胞质中^[19]. 聚类分析显示 *CpHSP70-1* 蛋白与定位于细胞核/细胞质的热激蛋白聚为一支, 推测该基因属于细胞核或细胞质蛋白. 而且 HSP70 家族蛋白分处于 4 个大的分支, 这与文献中描述的植物 HSP70 家族蛋白分为 4 类的结果一致^[20]. 亚细胞定位结果也支持该蛋白分布于细胞核的预测, 推测该基因可能主要在细胞核中发挥作用.

花器官与其他组织器官相比, 更易受冻. 蜡梅隆冬季节开花, 气温骤降, 可见其花器官具有较高的耐寒性. *CpHSP70-1* 基因在各个花器官中都有优势表达; 且该基因在蜡梅整个开花过程中也持续性地高水平表达; 另外, 低温诱导基因表达上调, 说明 *CpHSP70-1* 基因很可能参与了蜡梅的抗寒防御机制.

CpHSP70-1 基因同其他 HSP70 家族基因一样, 受高温诱导明显. 高温胁迫提高了豌豆幼苗 HSP70 的 mRNA 量^[21], 在烟草和拟南芥的研究中 HSP70 的表达量在高温胁迫后也显著增加^[9,22]. 说明 *CpHSP70-1* 与植物耐热性紧密相关. 但 *CpHSP70-1* 基因在高温处理 6 h 后表达迅速下调, 研究发现, 在受到环境胁迫时, 最初的胁迫信号触发抗逆机制中下游信号转导和基因调控, 在逆境胁迫中起主要作用的 HSP70 蛋白合成快速增加, 帮助恢复植物体内平衡, 保护和修复受损失的膜系统^[23]. 而当胁迫超过一定程度, HSP70 蛋白便因相关酶系统不再增加表达量, 较弱甚至失去保护作用^[24]. *CpHSP70-1* 基因在 6 h 下调明显, 推测持续高温可能对植株造成了不可逆的伤害, 植株内部生理代谢活动减弱甚至停止, 相关的酶系统受到抑制, 导致了 HSP70 蛋白合成受阻, 说明 *CpHSP70-1* 基因参与植物耐热性防御是一个暂时的过程, 这也与热激蛋白 HSP70 对热激反应短时性的特点相吻合.

通过对 *CpHSP70-1* 基因的生物信息学和表达特性分析, 发现该基因主要分布于细胞核, 而且可能参与调控蜡梅的抗寒性和耐热性防御机制, 这为进一步探明 *CpHSP70-1* 基因与耐热性的关系奠定了一定的理论基础.

参考文献:

- [1] PARSELL D A, LINDQUIST S. The Function of Heat-Shock Proteins in Stress Tolerance: Degradation and Reactivation of Proteins [J]. *Annu Rev Genet*, 1993, 27: 437—496.
- [2] WATERS E R, LEE G J, VIERLING E. Evolution, Structure and Function of the Small Heat Shock Proteins in Plants [J]. *J Exp Bot*, 1996, 47(3): 325—338.
- [3] WANG W, VINOCUR B, SHOSEYOV O, ALTMAN A. Role of Plant Heat-Shock Proteins and Molecular Chaperones in the Biotic Stress Response [J]. *Trends Plant Sci*, 2004, 9(5): 244—252.
- [4] BOB W G, BUCHANAN B. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* [M]. USA: ASPB, 2000: 983—987.
- [5] MAYER M P, BUKANNU B. Hsp70 Chaperones: Cellular Functions and Molecular Mechanism [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, 62(6): 670—684.
- [6] GENEVAUX P, GEORGOPOULOS C, KELLEY W L. The Hsp70 Chaperone Machines of *Escherichia coli*: a Paradigm for the Repartition of Chaperone Functions [J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 66(4): 840—857.
- [7] 王明强, 张道远. 棉植物热激蛋白 70 家族及其生物学功能研究进展 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(2): 421—428.
- [8] BALLINGER D G, PAR DUE M L. The Control of Protein-Synthesis During Heat-Shock in *Drosophila* Cells Involves Altered Polypeptide Elongation Rates [J]. *Cell*, 1983, 33(1): 103—113.
- [9] SUNG D Y, GUY C. Physiological and Molecular Assessment of Altered Expression of Hsc70-1 in *Arabidopsis*. Evidence for Pleiotropic Consequences [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132(2): 979—987.
- [10] QI Y C, WANG H J, ZOU Y, et al. Over-Expression of Mitochondrial Heat Shock Protein 70 Suppresses Programmed Cell Death in Rice [J]. *FEBS*, 2011, 585(1): 231—239.
- [11] 李慧聪, 郭秀林, 王冬梅, 等. 玉米热激蛋白 70 基因对温度胁迫的响应 [J]. *河北农业大学学报*, 2010, 33(6): 12—15.
- [12] 胡秀丽, 李艳辉, 杨海荣, 等. HSP70 可提高干旱高温复合胁迫诱导的玉米叶片抗氧化防护能力 [J]. *作物学报*, 2010, 36(4): 636—644.
- [13] MONTERO-BARRIENTOS M, HERMOSA R, CARDOZA R E, et al. Transgenic Expression of the *Trichoderma reesei* hsp70 Gene Increases *Arabidopsis* Resistance to Heat and Other Abiotic Stresses [J]. *Plant Physiol*, 2010, 167(8): 659—665.
- [14] CAZALÉ A C, CLÉMENT M, CHIARENZA S, et al. Altered Expression of Cytosolic/Nuclear HSC70-1 Molecular Chaperone Affects Development and Abiotic Stress Tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Exp Bot*, 2009, 60(9): 2653—2664.
- [15] 胡雨晴, 孙文婷, 马 婧, 等. 蜡梅热激蛋白基因 *CpHSP1* 的克隆与表达分析 [J]. *林业科学*, 2011, 47(5): 162—167.
- [16] LIU Dao-feng, SUI Shun-zhao, MA Jing, et al. Transcriptomic Analysis of Flower Development in Wintersweet (*Chimonanthus praecox*) [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86976.
- [17] 徐 娜. 番茄 SIMIP 基因的克隆与耐盐性分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- [18] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402—408.
- [19] GUY C L, LI Q B. The Organization and Evolution of the Spinach Stress 70 Molecular Chaperone Gene Family [J]. *Plant Cell*, 1998(10): 539—556.
- [20] 孟庆瑞, 徐秀英, 杨建民, 等. 杏花器官抗寒性初步研究 [J]. *河北农业大学学报*, 2006, 29(3): 22—25.
- [21] SRIKANTHBABU V, GANESHKUMAR, KRISHNAPRASAD B T, et al. Identification of Pea Genotypes with Enhanced Thermotolerance Using Temperature Induction Response Technique (TIR) [J]. *J Plant Physiol*, 2002, 159(5): 535—545.
- [22] VITALE A, BIELLI A, CERIOTTI A. The Binding Protein Associates with Monomeric Phaseolin [J]. *Plant Physiol*, 1995, 107(4): 1411—1418.

- [23] WANG W, VINOCUR B, ALTMAN A. Plant Responses to Drought, Salinity and Extreme Temperatures; Towards Genetic Engineering for Stress Tolerance [J]. *Planta*, 2003, 218(1): 1–14.
- [24] HUERTA C, FREIRE M, CARDEMIL L. Expression of Hsp70, Hsp100 and Ubiquitin in *Aloe barbadensis* Miller Under Direct Heat Stress and Under Temperature Acclimation Conditions [J]. *Plant Cell Report*, 2013, 32(2): 293–307.

Cloning, Subcellular Localization and Expression Analysis of Heat Shock Protein Gene *CpHSP70-1* from *Chimonanthus praecox* (L.)

Tien V. Nguyen^{1,2}, MEN Wei-ting¹, MA Jing¹,
SUI Shun-zhao¹, LI Ming-yang¹

1. Chongqing Engineering Research Center for Floriculture/Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions of Ministry of Education/School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China;
2. Fruit and Vegetable Research Institute, Vietnam Academy of Agricultural Science, Hanoi, Vietnam

Abstract: Based on the EST analysis of Winter sweet transcriptome database constructed from *Chimonanthus praecox* flowers, and using RACE technology, the full-length cDNA sequences of heat shock protein HSP70 was obtained by cloning, named as *CpHSP70-1* (GenBank accession number: KR071130). The full-length of *CpHSP70-1* cDNA sequence was 2 520 bp, with an open reading frame (ORF) of 1 962 bp, encoding a putative polypeptide of 653 amino acid residues and containing 3 signature motifs of the HSP70 family. *CpHSP70-1* protein was shown to have high homology with HSP70 proteins from other eukaryotes, and phylogenetic analysis revealed that it belongs to the subclasses located in the nucleus/cytoplasm. Subcellular localization result supported the prediction that this protein is located in the nucleus. Real-time fluorescence quantitative PCR was performed to analyze the expression characteristics of *CpHSP70-1* gene. It was expressed, at different levels, in various tissues, with the highest expression level found in mature leaves; and sustained and stable expression was detected at different flower developmental stages. *CpHSP70-1* gene expression increased under low or high temperature stresses, and it responded more sensitively to high temperature.

Key words: *Chimonanthus praecox*; heat shock protein70; RACE; subcellular localization; expression analysis

责任编辑 欧 宾

