

DOI:10.13759/j.cnki.dlxb.2014.07.025

大花三色堇热激蛋白 70 (HSP70) 基因片段的分离¹⁾

黄伶俐 杜晓华 穆金艳 陈宏志 刘会超

(河南科技学院 新乡 453003)

摘要 为了获得三色堇耐热性相关的基因 HSP70 基因 根据 GenBank 上登录的拟南芥、陆地棉等 HSP70 基因序列设计引物 用同源克隆法分离出大花三色堇 HAR 的 HSP70 基因片段 并进行测序与比对。结果表明:克隆得到基因片段 长度为 882 bp 其序列与已公布的几种植物 HSP70 的编码区相似率平均为 85.1% ,上游引物含于基因片段中。初步证明此基因片段为三色堇 HSP70 基因片段。

关键词 大花三色堇; HSP70 基因; 基因克隆; 序列分析

分类号 Q343.1+1

Cloning of Gene Fragment of HSP70 in *Viola × wittrockiana*/Huang Lingli, Du Xiaohua, Mu Jinyan, Chen Hongzhi, Liu Huichao (Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, P. R. China) // Journal of Northeast Forestry University. -2014 42(7). -105~107

In order to obtain the heat resistance gene HSP70 of *Viola × wittrockiana*, the primers were designed based on the sequence of the HSP70 gene sequences of *Arabidopsis thaliana*, *Gossypium hirsutum* and other plants in GenBank. The HSP70 gene fragment of pansy HAR were cloned by homology cloning and the fragment was sequenced. The length of gene fragment of HAR were 882 bp, the gene sequence shared 85.1% similar rate with the CDS of HSP70, and the forward primer was included in the fragment. The results provided evidence that the gene fragment were the HSP70 of pansy HAR.

Keywords *Viola × wittrockiana*; HSP70 gene; Gene cloning; Sequence similarity

大花三色堇 (*Viola × wittrockiana*) 又名蝴蝶花、猫脸花和鬼脸花等 其品种繁多且色彩鲜艳 花期长且耐寒 有“花坛皇后”的美誉 是我国重要的花坛和盆栽花卉 在我国广泛栽培^[1]。一般大花三色堇品种不耐高温 在华北地区超过 35℃ 植株生长不良并逐渐死亡。HAR 为近年本课题组发现的特有耐热三色堇种质。

虽然植物的抗热性是受多基因控制的复杂性状 但近年在植物体中发现的热激蛋白 (Heat Shock Proteins, HSPs) 被证明与植物的抗热性成正相关 在生物抵御热胁迫中发挥着重要作用^[2-4]。热激蛋白是生物体在外界温度突然升高 5~10℃ 时 (热激) 迅速合成的一种特有蛋白。根据对昆虫、鸟类、鱼类、哺乳类、植物以及细菌、酵母等多种生物的研究发现 热应激是生物体遭受胁迫时 正常蛋白的合成受阻 而一系列 HSP 合成的过程^[5]。其中 HSP70 作为分子伴侣能阻止热伤害的变性蛋白聚集 并帮助其恢复到正常构象。生物体自身耐受性获得的速度与 HSP 积累速率呈正相关; 耐受性的降低与 HSP 的降解同步^[2, 6-8]。热激蛋白的合成受控于特定的基因 目前已从拟南芥、陆地棉等植物分离到了编码

该蛋白的基因。三色堇耐热种质 HAR 是否含有 HSP70 基因 其 HSP70 基因有什么特点 是值得探索的问题。为此 本研究试图从耐热三色堇种质 HAR 中分离出 HSP70 基因 并进行序列分析 为揭示三色堇耐热分子机理积累资料。

1 材料与方法

大花三色堇品种 HAR 由河南科技学院三色堇育种实验室提供 该材料从荷兰 Buzzy 种选育所得 耐热性好能越夏 花期 4—6 月份 花色为紫红色。

主要试剂: PCR 引物合成 (上海生工生物工程有限公司), 柱式植物 RNAout Kit (北京天恩泽公司), Quantscript RT Kit (天根 Tiangen 公司), Taq DNA Polymerase (天根 Tiangen 公司), Gel Extraction Kit (Omega 公司)。

总 RNA 的提取及第一链 cDNA 的合成: 以育苗室培育 4 个月的 HAR 植株作为试验株 于生化培养箱内 40℃ 热激 20、35、50、60 min (恢复 10 min) 按照柱式植物 RNAout Kit 试剂盒说明书的步骤分别取幼叶提取总 RNA 用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的纯度。

按照 Quantscript RT Kit 试剂盒说明书的反转录程序进行第一链 cDNA 的合成 获得第一链 cDNA。

HSP70 基因片段的获得: 将拟南芥、陆地棉、蓖麻等几种植物中已公布的 HSP70 序列进行比对 以同源性最高的一段 CDS 编码区设计一对引物 上游引物: GTT ACA GTT CCT GCT TAT TTC, 下游引物: TAG ACC TGG ATC AGT ACA CC。此对引物的解

1) 河南省科技攻关项目 (132102110119)、河南省科学技术研究项目 (13B210009)。

第一作者简介: 黄伶俐, 女, 1987 年 9 月生, 河南科技学院园艺园林学院, 硕士研究生。

通信作者: 刘会超, 河南科技学院园艺园林学院, 教授。E-mail: huichaoliu2012@163.com。

收稿日期: 2013 年 11 月 25 日。

责任编辑: 任 俐。

链温度 T_m 值为 56 °C, 预计扩增产物为 905 bp。

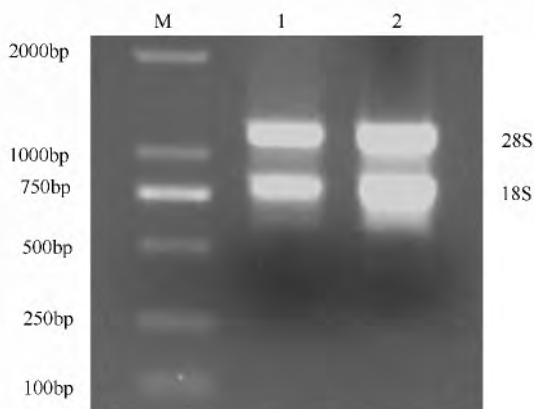
按照 Taqase 说明书设置 HSP70 基因片段的 PCR 扩增的反应条件, 由梯度 PCR 试验得出此对引物最佳退火温度为 50.3 °C。HSP70 基因片段的 PCR 产物进行电泳检测, 目标片段长度为 900 bp 左右, 认定为目的片段, 将 100 μ l PCR 扩增产物进行电泳, 按照 Gel Extraction Kit 说明书步骤进行胶回收, 获得 40 μ L 纯化产物, 纯化产物 5 μ l 用于电泳检测, 目的条带清晰。直接将回收产物送至上海生工进行测序。

大花三色堇 HSP70 基因片段的同源性: 利用 DNASTar 软件对所测序列进行比对分析, 将模板编码区序列在 Editseq 功能中保存为 seq 格式, 样本测序后本身为 seq 保存格式, 便于比对时插入比对框; 在序列比对软件中将 2 个需要比对的序列通过输入序列添加进比对框, 点击 Align 进行相似性比对。并将大花三色堇 HSP70 基因片段序列在 NCBI 数据库中 BLAST 比对功能区中与 GenBank 中已有的 HSP70 序列进行相似性比对, 输出结果要求为高度相似序列。一些相似性比较低而不在结果中显现的则在 DNASTar 的序列比对功能区进行比对操作。

2 结果与分析

2.1 HSP70 基因片段的获得

植物 RNAout Kit 提取 HAR 的总 RNA, 电泳检测 (图 1), RNA 18 s 和 28 s 两条带清晰明亮, 虽有少量 DNA 残留, 但不影响 PCR 扩增; 根据已登录的几种植物的 HSP70 基因序列, 用 DNASTar 软件比对出 100% 相似的一段编码区, 以此段序列设计引物, 并以 HAR 的总 RNA 为模板经过反转录获得 cDNA, 再以 cDNA 为模板通过 PCR 扩增获得长度约为 900bp 的 DNA 片段 (图 2)。



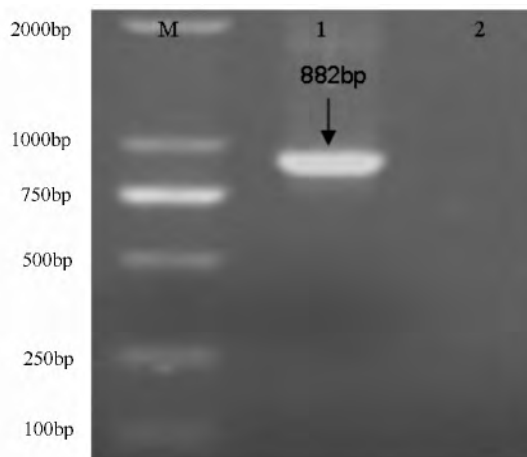
M. DL-2000 标记; 1、2. RNA 提取物。

图 1 RNA 电泳图

2.2 HSP70 基因片段序列分析

利用 DNASTar 分析软件对 HSP70 基因片段序

列进行分析可知, HSP70 基因片段总长 882 bp, 将其与设计引物所选取得编码区序列进行比对, 从 281—878 bp 处有 598 bp 碱基的相似率为 85.1%; 上游引物存在于一条链的 854—876 bp 处, 引物 21 bp 的相似率为 95.2%, 证明所获片段是由目的引物分离得到。由于三色堇与参考植物亲缘关系较远, 85.1% 的相似率基本确定为该基因片段为三色堇 HAR 的 HSP70 基因片段。



M. DL-2000 标记; 1. HSP70PCR 产物; 2. 空白对照。

图 2 PCR 产物电泳图

2.3 大花三色堇 HSP70 基因片段与不同物种的相似性

通过 NCBI 数据库中 BLAST 比对以及 DNASTar 中的序列比对软件所得的结果可知, 不同植物之间 HSP70 基因相似率很高: 三色堇 HSP70 基因与所比对的序列期望值 (E 值) 都为 0, 表明与所比较的基因序列完全匹配; 三色堇 HSP70 基因片段与烟草、陆地棉、南瓜、亚洲水稻、拟南芥和湖北海棠等达到 86% 以上的相似率, 且能达到 80% 以上相似率的全为植物 HSP70 基因, 而非植物类的常见物种如老鼠、果蝇、酵母菌和白色念珠菌的 HSP70 基因与三色堇 HSP70 基因相似率比较低 (表 1), 说明 HSP70 基因在不同物种的进化中根据环境和自身适应性而有所变化, 但总体而言, HSP70 基因在植物中相当保守。

表 1 三色堇 HAR HSP70 基因片段与不同物种 HSP70 基因编码区序列相似性

物种名称	类型	基因序列号	E 值	相似率/%
烟草 NtHsp70	mRNA	AB689673.1	0	89
陆地棉 SpotW20	mRNA	FJ415194.1	0	88
南瓜 Hsc70-3	mRNA	AF527796.1	0	88
亚洲水稻 hsp70	DNA	X67711.2	0	87
拟南芥 hsc70-1	DNA	X77199.1	0	87
湖北海棠 HSP70	mRNA	HQ876864.1	0	86
家鼠 Hspa1b	DNA	15511	0	71
白色念珠菌 HSP70	DNA	3636229	0	61
黑腹果蝇 Hsp70Aa	DNA	48581	0	50
树干毕赤酵母 HSP70.3	DNA	14541952	0	40

3 结论与讨论

HSP70 在生物体内分布极为广泛,存在于古生菌、真核细菌和真核生物等几乎所有的生物体中^[9],也是目前研究的最为深入的一种热激蛋白。起主要作用的 HSP 多由核基因编码成蛋白质,并分布在细胞的不同部位如细胞质、线粒体、叶绿体和内质网。基于各个亚细胞器的结构不同及其调控反应的不同,编码各个 HSP70 的基因就有所不同,各种 HSP70 蛋白之间存在着差异^[10]。拟南芥有 HSP70-4 和 hsp70T-2 两个变体,玉米有 hsp70-1 和 hsp70-4 两个变体,小麦有 hsp70 和 Tahsp70d 两个功能相似性伴侣。生物体内,HSP 的诱导极其快速和显著,其对生物体的保护作用是由多种分子伴侣蛋白网络式协同作用的结果。各种 HSP 在保护细胞免受外界胁迫的过程中相辅相成,有时甚至达到叠加效应。HSP70 与其他分子伴侣协同参与抗胁迫一系列机制中的膜及蛋白的修复与保护和自由基及有毒化合物的清除^[4]等反应。HSP70 基因在一种保守蛋白热激转录因子(Heat Shock Factor,HSF)的调控下,根据胁迫情况的差异编码相应功能的 HSP70,表达的 HSP70 帮助恢复和保持细胞内稳态,从而保护整个植株^[11]。

HSP70 基因已经从拟南芥、水稻、玉米和芍药等多种植物中分离出来并且加以分析,HSP70 基因一般 5' 端有 100 bp 左右的非翻译区,3' 端有 200 bp 的非翻译区,中间的开放阅读框(Open-Reading Frame,ORF)包含大约 2 000 bp 碱基用于编码 HSP70 蛋白^[12-14]。植物的 ORF 框分为两类,一类含有内含子,如玉米、牵牛花等的 ORF 框;而另一类则无内含子,如大豆、胡萝卜等的 ORF 框^[15]。在 HSP70 基因的 ORF 上游通常存在基因调控区,包含多个热激元件(Heat Shock Elements,HSEs),还有一些类似 HSE 的元件,其功能是与热激因子(HSF)结合调控热激蛋白基因的表达^[16]。目前,三色堇关于分子方面的研究比较少,只涉及一些小分子,HSP70 方面尚未有基因序列在 Genbank 中登陆,鉴于 HSP70 的高度保守性,本研究从拟南芥、陆地棉等植物的 HSP70 入手,利用同源序列克隆法,以植物同源 HSP70 基因保守区为模板,设计特异引物,通过 PCR 技术克隆出三色堇片段,其长度为 882 bp,序列分析显示其序列与作为模板的拟南芥 HSP70-4 的部分序列的相似率为 85.1%。NCBI 数据库中的 Blast 功能软件比对显示其与烟草的 NtHSP70mRNA

相似率为 89%,与陆地棉、南瓜的 mRNA 相似率为 88%,与家鼠的 DNA 相似率为 71%,与果蝇的 DNA 相似率为 50%。经过相似性比较可知不同物种之间 HSP70 基因有所差异,且亲缘关系越远差异越大。尽管在进化过程中存在着诸如亚细胞器调控过程的变化或者一个简单独立的生化反应发生变异导致 HSP70 基因有所变异,总体而言,植物中 HSP70 基因保持着高度的稳定性。根据 HSP70 基因序列的特点以及碱基的相似率等初步判定所得基因片段为三色堇 HSP70 基因片段,该基因片段的获得为后续的克隆三色堇 HSP70 的全长和分析其生物学功能的研究奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 张其生,包满珠,卢兴霞,等.大花三色堇育种研究进展[J].植物学报,2010,45(1):128-133.
- [2] Denlinger D L, Yocum G D. Physiology of heat sensitivity// [M] Hallman G J, Denlinger D L et al. Thermal sensitivity in insects and application in integrated pest management [M]. Colorado: Westview Press, Boulder, 1998:55-95.
- [3] Feder M E, Hofmann G E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology [J]. Annual Review of Physiology, 1999, 61(2):43-82.
- [4] Wang Wangxia, 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.
- [5] Roberts J K, Key J L. Isolation and characterization of a soybean hsp70 gene [J]. Plant Molecular Biology, 1991, 16(4):671-683.
- [6] Sørensen J G, Michalak P, Justesen J, et al. Expression of the heat-shock protein HSP70 in *Drosophila buzzatii* lines selected for thermal resistance [J]. Hereditas, 1999, 131(2):155-164.
- [7] Chen K Y, Chen Z C. Heat shock proteins of thermophilic and thermotolerant fungi from Taiwan [J]. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 2004, 45(3):247-257.
- [8] 李俊杰,桑润滋,田树军,等.热激蛋白在动物应激中的应用 [J]. 家畜生态, 2004, 25(3):44-46.
- [9] Boorstein W R, Craig E A. Molecular evolution of the HSP70 multigene family [J]. Mol Evol, 1994, 38(1):1-17.
- [10] Pegoraro C, Mertz L M, Maia L C, et al. Importance of heat shock proteins in maize [J]. Journal of Crop Science and Biotechnology, 2011, 14(2):85-95.
- [11] Zhu Yan, Wang Zhi, Jing Yanjun, et al. Ectopic over-expression of BhHsf1, a heat shock factor from the resurrection plant *Boea hygrometrica*, leads to increased thermotolerance and retarded growth in transgenic *Arabidopsis* and tobacco [J]. Plant Molecular Biology, 2009, 71(4-5):451-467.
- [12] Bates E M, Vergne P, Dumas C. Analysis of the cytosolic hsp70 gene family in *Zea mays* [J]. Plant Molecular Biology, 1994, 25(5):909-916.
- [13] Bettencourt B R, Feder M E. Rapid concerted evolution via gene conversion at the *Drosophila* hsp70 genes [J]. Journal of Molecular Evolution, 2002, 54(5):569-586.
- [14] Fu Wandong, Li Shuai, Yao Jianting, et al. Molecular cloning and analysis of a cytosolic Hsp70 gene from *Enteromorpha prolifera* (Ulvothycophyceae, Chlorophyta) [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2010, 28(3):430-437.
- [15] Lin Xiaoying, Chern Maw-sheng, Zimmerman J L. Cloning and characterization of a carrot hsp70 gene [J]. Plant Molecular Biology, 1991, 17(6):1245-1249.
- [16] Christians E E M, Renard J P. Developmental control of heat shock and chaperone gene expression [J]. CMLS Cell mol life sci, 1997, 53(2):168-178.