

菊花脑热激蛋白 70 基因的克隆及表达分析

张杨¹, 孙明^{1,2,3*}, 杨海燕¹, 张启翔^{1,2,3}

(1.北京林业大学园林学院, 北京 100083; 2.国家花卉工程技术研究中心, 北京 100083; 3.花卉种质创新与分子育种北京市重点实验室, 北京 100083)

摘 要: 采用同源克隆结合 RACE 技术从菊花脑叶片中克隆菊花脑(*Chrysanthemum nankingense*)热激蛋白 70 基因(*hsp70*)的 cDNA 序列, 并通过荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析菊花脑在 40 ℃ 高温下热激不同时间(0、0.5、1、2、3、6 h)后叶片中 *hsp70* 基因的表达差异。结果表明, 克隆的 cDNA 序列全长 2 224 bp, 与水母雪莲花、紫茎泽兰的 *hsp70* 基因在核苷酸和氨基酸水平的同源性分别为 88%、98%, 表明该序列为菊花脑的 *hsp70* 基因序列(GenBank 登录号, KJ561911), 命名为 *Cnhsp70*。*Cnhsp70* 基因的开放阅读框为 1 944 bp, 其编码的蛋白(647 个氨基酸)的相对分子质量约为 70 900, 含有 HSP70 家族序列标签。qRT-PCR 分析的结果表明, *Cnhsp70* 基因的表达在热激后短时间内迅速上调, 热激 3 h 达到最高, 热激 6 h 时表达量迅速下调。

关 键 词: 菊花脑; 热激蛋白 70; 基因克隆; 高温胁迫; 表达分析

中图分类号: S682.1⁺1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2014)02-0153-04

Cloning and expression analysis of heat shock protein 70 gene in *Chrysanthemum nankingense*

ZHANG Yang¹, SUN Ming^{1,2,3*}, YANG Hai-yan¹, ZHANG Qi-xiang^{1,2,3}

(1.College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2.National Engineering Research Center for Floriculture, Beijing 100083, China; 3.Beijing Key Laboratory of Ornamental Plants Germplasm Innovation and Molecular Breeding, Beijing 100083, China)

Abstract: Homology cloning combined with RACE techniques was applied to clone the cDNA of heat shock protein 70 gene (*hsp70*) from *Chrysanthemum nankingense* and real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was conducted to analyze the expression patterns of this gene under 40 ℃ for 0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h and 6 h. The results showed that the full cDNA sequence cloned is 2 224 bp, which is determined to be *hsp70* gene of *Chrysanthemum nankingense*, and subsequently named *Cnhsp70* as it shares 88% homology with *Saussurea medusa* at nucleotide level and 98% homology with *Ageratina adenophora* at amino acid level. *Cnhsp70* contains a 1 944 bp open reading frame (ORF), which encodes 647 amino acids containing the HSP70 family sequence tags with a predicted molecular mass of 70 900. Real-time quantitative PCR presented that the expression of *Cnhsp70* was up-regulated quickly in a short time after heat stress and get to the highest level 3 h after stress, which was rapidly down-regulated 6 h after stress.

Key words: *Chrysanthemum nankingense*; heat shock protein 70; gene cloning; heat stress; expression analysis

热激蛋白(heat shock protein, HSP)是生物体在应对高温或其他胁迫环境下所产生的应激蛋白,能在短时间内大量合成和累积,以提高生物体对高温

等不利环境的耐受性^[1]。不同物种 HSPs 的氨基酸序列与功能都很保守。Carper 等^[2]根据相对分子质量大小,将热激蛋白分为 HSP110、HSP90、HSP70、

收稿日期: 2013-12-09

基金项目: 国家“十二·五”科技支撑计划(2013BAD01B07); 中央高校基本科研业务费专项(YX2011-32)

作者简介: 张杨(1989—),女,湖南常德人,硕士研究生,主要从事园林植物遗传育种研究, zhangyang8144@163.com; *通信作者, sun.sm@163.com

HSP60、小分子 sHSP 和泛素等 6 个家族,其中, HSP70 最为保守和普遍^[3],也是研究得最为广泛的热激蛋白之一。目前,已从拟南芥^[4]、玉米^[5]、菠菜^[6]、紫茎泽兰^[7]等植物中克隆到 *hsp70* 基因,但有关菊花的 *hsp70* 基因还未见报道。

菊花(*Chrysanthemum morifolium*)是中国十大传统名花和世界四大切花之一,品种丰富,花型花色多样,观赏价值极高。菊花生长和发育的最适温度是 15~25 °C,超过 25 °C 即不利于菊花的生长。菊花脑(*Chrysanthemum nankingense*)为菊科菊属菊花的野生种,有较强的耐热能力^[8]。本研究运用同源克隆技术,拟从菊花脑中克隆出 *hsp70* 基因,并对其在高温下的表达情况进行分析,旨在为菊花耐热育种及种质发掘提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 供试菊花

从北京林业大学小汤山基地菊花资源圃选择无病虫害、长势一致的菊花脑脚芽进行扦插繁殖,所用基质为草炭和珍珠岩(质量比为 1:1),温室培养 2 个月,转移至人工气候箱中。于温度 20 °C/18 °C(白天/黑夜),相对湿度 75%,光周期 12 h/12 h(光照/黑暗)的条件下缓苗 1 d 后,将温度设成 40 °C,热激 6 h,收集热激前(热激 0 h)、热激后 0.5、1、2、3、6 h 的上部新鲜叶片置于液氮中冷冻后, -70 °C 保存、备用。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取

用 EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒(艾德莱)分别提取收集的叶片的总 RNA。用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计(Thermo Scientific)测定 RNA 的 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 值,判断质量,并用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.2.2 *hsp70* 基因的克隆

1) 中间保守序列的扩增。选取热激 3 h 的叶片的总 RNA,用 TIANscript cDNA 第一链合成试剂盒(天根生化科技有限公司)合成总 cDNA。根据 GenBank 蛋白数据库中紫茎泽兰(登录号为 ACM42161)、烟草(登录号为 AAR17080)、水母雪莲花(登录号为 AAV97978)、杜鹃(登录号为 ADD71975)、仙客来(登

录号为 ABP35942)等 *hsp70* 基因的序列,利用在线网站 Icodehop 设计简并引物 HSP1(5'-CTTATTCTTGTGTTGGAGTTTGGCARCAYGAYMG-3')和 HSP2(5'-ATCTCTCAGACACTTTTCAACAGGYTCCATRCAYT-3'),以扩增 *hsp70* 基因的中间保守序列。PCR 反应体系 (25 μL)为: cDNA 2 μL, 2×Taq PCR MasterMix(BIOMIGA)12.5 μL, 10 μmol/L HSP1 0.3 μL, 10 μmol/L HSP2 0.3 μL。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 4 min。将扩增得到的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收后经 T 载体克隆,测序。

2) 3'RACE 的扩增。选取热激 3 h 的叶片的总 RNA,用 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒(Clontech 公司)合成 cDNA。根据测序获得的中间保守序列设计特异引物 3GSP1(5'-GACATCAC TGGTAACCCAGAGCCC-3')和 3GSP2(5'-CCCTC TCATCAACTGCTCAAACCACC-3')按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 说明书进行两轮扩增,以获得 *hsp70* 基因 3'-端序列。将扩增得到的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收后经 T 载体克隆,测序。

3) 5'RACE 的扩增。根据测序获得的中间保守序列设计引物 GSP(5'-TCGC CTACCGATGAGA-3'),以热激 3 h 的叶片的总 RNA 为模板,用 5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends Version 2.0 试剂盒(Invitrogen 公司)合成扩增 *hsp70* 基因 5'-端序列所需的 cDNA,然后分别以根据中间保守序列设计的引物 5GSP1(5'-GTGTTGGTAGGGTTTCATGGC-3')和 5GSP2(5'-CTCAGAATCAGTAAAGGCAAC-3')进行第一轮和第二轮扩增。将扩增得到的 PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收后经 T 载体克隆,测序。

4) 全长 cDNA 的拼接与验证。使用 Contig-Express 序列拼接软件将扩增得到的 3 段目的基因片段进行拼接,获得 *hsp70* 基因全长 cDNA。根据拼接所得序列设计特异引物 70U1(5'-AAACATTA CACTCTCTCATCAC-3')和 70D1(5'-TTGTATTGTATCACAAGCAAC-3')以热激 3 h 的叶片的总 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。将扩增得到的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收后经 T 载体克

隆,测序。将测序结果与拼接序列用 DNAMAN 软件进行比对。

1.2.3 序列分析

用 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) BLASTn、BLASTp 软件及 DNAMAN 软件进行核苷酸序列、氨基酸序列的比对和保守域的预测。

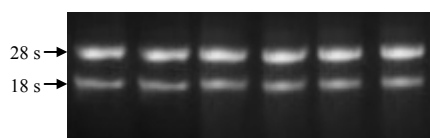
1.2.4 基因表达分析

用 TIANscript cDNA 第一链合成试剂盒,以热激后 0、0.5、1、2、3、6 h 的叶片的总 RNA 为模板合成 cDNA。根据获得的全长基因序列设计上游引物(5'-GAAGTAGGCTGGGA CTGTAAC-3')和下游引物(5'-TAACTACAAGGGTGAGGAGAA-3')。在 Piko[®] Thermal Cycler 96-well system (Thermo Scientific) 用 SYBR[®] Premix EX Taq[™] (Til RNaseH Plus) 试剂盒(TaKaRa 公司)进行定量 PCR 检测,PCR 扩增体系为 10 μ L (cDNA 模板 1 μ L, 10 μ mol/L 上、下游引物各 0.2 μ L, SYBR Premix Ex Taq 5 μ L, ddH₂O 3.6 μ L)。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 40 个循环后进行熔解曲线分析。每个样品重复 3 次,结果取平均值。选预试验中表达量较稳定的 *PP2Acs* 基因为相对定量的内参基因^[9],采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[10] 计算相对表达量,比较不同热激时间下目的基因的表达情况。

2 结果与分析

2.1 RNA 的质量检测

用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计对提取的 RNA 的 A 值进行测定,其 $A_{260\text{ nm}}/A_{268\text{ nm}}$ 略大于 2.0,表明 RNA 的纯度较高。凝胶电泳结果也显示,总 RNA 的条带清晰(图 1)。可见,所提取的 RNA 纯度高,完整性好,可以满足后续试验的要求。



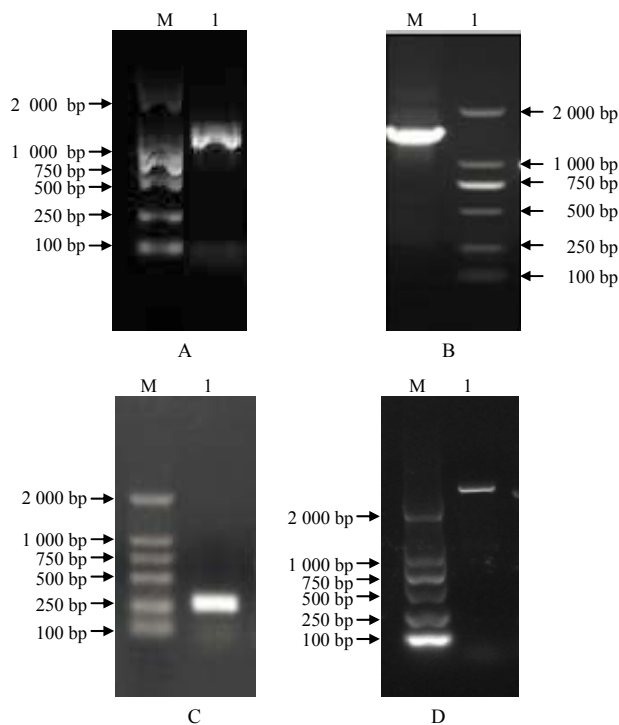
1~6 分别为热激处理 0、0.5、1、2、3、6 h 的菊花脑叶片的 RNA。

图 1 菊花脑叶片的总 RNA 电泳结果

Fig.1 Electrophoresis of RNA isolated from leaves of *Chrysanthemum nankingense*

2.2 菊花脑 *hsp70* 的 cDNA 克隆

以菊花脑叶片 cDNA 为模板,使用引物组合 HSP1、HSP2 扩增,获得大小为 831 bp 的 *hsp70* 基因的中间片段(图 2-A)。根据中间片段序列,进行 3'RACE、5'RACE 扩增,获得 1 323 bp 的 3'序列(图 2-B)和 252 bp 的 5'序列(图 2-C)的 cDNA 片段。将 3 个片段的序列拼接后得到大小为 2 224 bp 的基因全长序列。根据拼接的全长序列设计引物,扩增获得了 2 224 bp(图 2-D)的片段,验证了拼接序列的正确性。Blastn 分析发现,克隆的序列与水母雪莲花(GenBank 登录号为 AF509336)、紫茎泽兰(GenBank 登录号为 EU269069) *hsp70* 基因的同源性均为 88%,表明获得的基因为菊花脑 *hsp70* 基因,命名为 *Cnhsp70*,将序列登录 GenBank,获得的登录号为 KJ561911。



M 为 DNA 相对分子质量 DL 2000; A 中 1 为中间片段产物; B 中 1 为 3'RACE 产物; C 中 1 为 5'RACE 产物; D 中 1 为全长 cDNA 产物。

图 2 菊花脑 *hsp70* 的 PCR 扩增电泳结果

Fig.2 Electrophoresis of PCR products for *hsp70* of *Chrysanthemum nankingense*

2.3 菊花脑 *Cnhsp70* 序列分析

Cnhsp70 的 cDNA 含 1 944 bp 的完整开放性阅读框,编码 647 个氨基酸,与水母雪莲花(GenBank 登录号:AAV97978)、紫茎泽兰(GenBank 登录号为 ABX76301) *hsp70* 基因的编码氨基酸的同源性均高

达 98% ,并包含 HSP70 高度保守的 3 个家族标签序列 DLGTTYS(13–19)、IFDLGGGTFD VSL(203–216)和 VVLVGGSARIPKVQ(340–354); 1 个非细胞器保守基序 RARFEEL(305–311); 1 个糖基化位点 NVSA(493–496)和胞质 HSP70 的特征基序 EEVD(644–647)^[11]。

2.4 *Cnhsp70* 表达特性分析

定量 PCR 检测结果表明,当菊花脑受到高温胁迫时, *Cnhsp70* 的表达量呈现先升高再下降的趋势。高温胁迫 0.5 h 时, *Cnhsp70* 的表达量为对照的 3 倍多;之后其表达保持平缓的上升趋势,于高温胁迫 3 h 时达到最大,接近对照的 5 倍,但当热激 6 h 时, *Cnhsp70* 基因表达量急剧下降,甚至略低于对照水平。

3 讨 论

热激蛋白能提高植物的耐热性,减少高温对生物体的伤害^[12–13]。本试验利用同源克隆技术获得了菊花脑热激蛋白 70 基因(*Cnhsp70*),并对其表达进行了分析,得出 *Cnhsp70* 基因在常温下有少量表达,且表达量稳定,而在受到短暂高温刺激后表达量明显提高。可见, HSP70 能在短时间内对高温胁迫进行响应。然而, *Cnhsp70* 的表达量在热激处理 6 h 后出现显著性下降,这与同为热激蛋白家族的 *Lshsp90*^[14]及老鼠的 *hsp70* 基因^[15]表现一致,这可能是由于热激基因的长时间表达不利于生物体,生物体在适应了高温环境后其表达即下调^[16]。

本试验的结果表明,菊花脑的热激蛋白 70 主要在热胁迫初期起作用,以短时间内大量表达来帮助植物体应对不利环境,表明可根据 *hsp70* 短时表达量的多少来初步判断菊花脑的耐热情况。

参考文献:

- [1] Ballinger D G . The control of protein synthesis during heat shock in *Drosophila* cells involves altered polypeptide elongation rates[J] . Cell , 1983 , 33(1) : 103–114 .
- [2] Carper S W , Duffy J J , Gerner E W . Heat shock proteins in thermotolerance and other cellular processes[J] . Cancer Res , 1987 , 47(20) : 5249–5255 .
- [3] Wahid A , Gelani S , Ashraf M , et al . Heat tolerant in plants : An overview[J] . Environ Exp Bot , 2007 , 61(3) : 199–223 .
- [4] Wu C H , Caspar T , Browse J , et al . Characterization of an *hsp70* cognate gene family in *Arabidopsis*[J] . Plant Physiol , 1988 , 88(3) : 731–740 .
- [5] Rochester D E , Winer J A , Shah D N . The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein , *hsp70*[J] . EMBO J , 1986 , 5(3) : 451–458 .
- [6] Guy C L , Li Q B . The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family[J] . Plant Cell , 1988 , 10(4) : 539–556 .
- [7] Gong W N , Xie B Y , Wan F H , et al . Molecular cloning , characterization and heterologous expression analysis of heat shock protein genes (*hsp70* and *hsp90*) of invasive alien weed *Ageratina adenophorum* (Asteraceae)[J] . Weed Biol Management , 2010 , 10(2) : 91–101 .
- [8] 王亚 , 孔志新 , 孙明 , 等 . 湿热胁迫对地被菊及野生菊生理生化特性的影响[J] . 西北农业学报 , 2012 , 21(9) : 133–138 .
- [9] Gu C , Chen S , Liu Z , et al . Reference gene selection for quantitative real-time PCR in *Chrysanthemum* subjected to biotic and abiotic stress[J] . Mol Biotechnol , 2011 , 49(2) : 192–197 .
- [10] Livak K J , Schmittgen T D . Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(–Delta Delta C(T)) Method[J] . Methods , 2001 , 25(4) : 402–408 .
- [11] Sun S S , Chung M C , Lin T Y . The structure and expression of an *hsc70* gene from *Lycopersicon esculentum*[J] . Gene , 1996 , 170(2) : 237–241 .
- [12] Sung D Y , Guy C L . Physiological and molecular assessment of altered expression of *Hsc70*–1 in *Arabidopsis* : Evidence for pleiotropic consequences[J] . Plant Physiol , 2003 , 132(2) : 979–987 .
- [13] Srikanthbabu V , Ganeshkumar , Krishnaprasad B , et al . Identification of pea genotypes with enhanced thermotolerance using temperature induction response technique (TIR)[J] . J Plant Physiol , 2002 , 159(5) : 535–545 .
- [14] 任月 , 韩莹琰 , 李婷 , 等 . 叶用莴苣热激蛋白 90(LsHsp90) 基因的克隆及其在热激下的表达[J] . 中国农业科学 , 2013 , 46(16) : 3514–3522 .
- [15] 陆蓓玲 , 王兰芳 . 急性热应激后小鼠的抗氧化能力和 *Hsp70* 基因的表达[J] . 湖南农业大学学报 : 自然科学版 , 2011 , 37(6) : 650–653 .
- [16] Krebs R A , Holbrook S H . Reduced enzyme activity following *Hsp70* over expression in *Drosophila melanogaster* [J] . Biochemical Genetics , 2001 , 39(1/2) : 73–82 .

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维