

条斑紫菜 *HSP90* 基因的克隆与表达分析

周向红^{1,2}, 李信书^{1,2}, 王萍², 阎斌伦^{1*}, 滕亚娟², 易乐飞^{1,2}

(1. 淮海工学院江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005;

2. 淮海工学院海洋学院, 江苏 连云港 222005)

摘要: 为了研究 *HSP90* 在条斑紫菜胁迫耐受中的作用, 克隆了条斑紫菜 *HSP90* 基因(命名为 *PyHSP90*), 采用定量 RT-PCR 研究了其表达规律。*PyHSP90* 基因包含一个长 2 274 nt 的完整开放阅读框, 编码 757 个氨基酸。*PyHSP90* 蛋白定位于细胞质中, 具有 *HSP90* 蛋白家族的特征序列和保守结构域, 与多种生物的 *HSP90* 具有较高的序列一致性。在进化树上条斑紫菜等红藻的 *HSP90* 与隐藻的亲缘关系最近, 与绿藻和陆生植物亲缘关系较远。低温和高温胁迫都能显著性地诱导条斑紫菜叶状体 *PyHSP90* 基因的表达, 而且表达量与胁迫程度成正相关; 低盐胁迫下 *PyHSP90* 基因表达上调; 而失水胁迫下 *PyHSP90* 基因表达下调。

关键词: 条斑紫菜; 热应激蛋白 90; 克隆; 表达; 定量 PCR

中图分类号: S 917; Q 781; Q 786

文献标识码: A

热应激蛋白(heat shock protein, HSP)是一类广泛分布于各类生物细胞内且高度保守的蛋白^[1], 按其分子量大小可分为 5 大类: HSP110, HSP90, HSP70, HSP60 及小分子 HSP^[2]。HSP 在细胞正常代谢过程中负责蛋白的折叠、组装、转运和降解, 在胁迫状态下稳定蛋白和膜结构, 并协助蛋白再折叠, 最终维持细胞稳态^[2-3]。大量研究表明, HSP 参与了机体对温度、盐度、重金属、干旱和病害等多种胁迫的耐受, 起到了修复受损蛋白和提高机体抗逆性等保护作用^[4-6]。

HSP90 是一类高度保守的分子伴侣(molecular chaperone), 在细胞内含量较丰富, 占蛋白总量的 1% ~ 2%^[7]。在植物中, 已知 *HSP90* 分布于细胞质、内质网和叶绿体中, 也可能分布于线粒体中^[8-9]。*HSP90* 作用的大部分蛋白底物参与了细胞周期和信号传导, 因此 *HSP90* 对真核细胞的生存至关重要^[2, 10-11]。*HSP90* 还能作为形态进化和形态表型变异的缓冲器, 确保了表型稳定性^[12-13]。目前已从鱼类^[14]、贝类^[15]和虾蟹类^[16]等多种海洋生物中克隆了 *HSP90* 基因并研究了其在不同发育时期、不同组织或不同胁迫下

的表达差异与功能。但大型海藻 *HSP90* 基因的研究报道较少, 目前尚无条斑紫菜(*Porphyra yezoensis* Ueda) *HSP90* 基因(命名为 *PyHSP90*)克隆与表达的相关报道。

条斑紫菜是红藻门(Rhodophyta), 原红藻纲(Protofloridaeophyceae), 红毛菜目(Bangiiales), 红毛菜科(Bangiaceae), 紫菜属(*Porphyra*)的大型海藻, 其营养丰富, 味道鲜美, 已成为我国重要的海洋养殖种类及出口创汇商品。随着极端天气和环境恶化愈演愈烈, 由此产生的高温、低温、盐渍、干旱和重金属等逆境因子严重制约了植物生长, 影响了农产品品质和产量^[5, 17]。条斑紫菜生长于潮间带, 随着潮汐变化, 会周期性地经历干出与覆水过程, 其生长、品质和产量更容易受到上述胁迫影响。因此非常有必要研究条斑紫菜的胁迫耐受机制, 以及 *PyHSP90* 在这个机制中的作用。

本文报道了 *PyHSP90* 基因的克隆、序列特征及其在不同温度、盐度和失水胁迫下的 mRNA 表达变化。有助于进一步解释条斑紫菜的抗逆分子机理, 对遗传改良和抗逆品系培育等具有一定意义。

收稿日期:2010-07-11 修回日期:2010-09-24

资助项目:国家“十一五”科技支撑计划重大项目(2006BAD09A01);江苏省海洋生物技术重点实验室开放课题(2008HS004)

通讯作者:阎斌伦, E-mail: yanbinlun@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 条斑紫菜样品采集及胁迫处理

条斑紫菜叶状体的小藻体(6~10 cm)于2010年1-2月从连云港海区的紫菜养殖场采集,选取健康叶片暂养于改良的ES培养基^[18]中;模拟采集地区的海水环境,控制海水盐度为25、温度为5℃、光照为40 μmol photons/(m²·s)、光周期为12L:12D,每天更换海水和营养盐。

将5℃培养的叶状体分别转移到0,5,10,15,20,25和30℃的培养基中进行温度胁迫,处理2h后取样。将25盐度培养的叶状体分别转移到5,15,25,35和45盐度(对天然海水稀释获得低盐度,蒸发获得高盐度)的培养基中进行盐度胁迫,处理2h后取样。失水胁迫处理前先计算叶状体的含水率,然后将叶状体从海水中取出,暴露于空气中,不定时称重,最后获得失水率为20%,40%,60%和80%的样品。

1.2 总RNA分离纯化

总RNA抽提参照TRIzol试剂(Invitrogen)说明书进行。为了避免残留的微量基因组DNA影响定量PCR结果的准确性,抽提后的总RNA按DNase I(Fermentas)说明书进行处理。核酸蛋白定量仪(Bio-Rad)检测总RNA的纯度及浓度,电泳检测总RNA的完整性。

1.3 条斑紫菜 *HSP90* 基因克隆与测序

按RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis kit(Fermentas)说明书操作,合成第一链cDNA。参照文献^[19]中的方法对*PyHSP90*进行了计算机辅助克隆,并据此设计和合成一对克隆用引物,正向引物HSP90F:5' TCCCGCTGTGCTTCCTGT 3',反向引物HSP90R:5' ACGACGCCAAGCCTAAT 3'。PCR反应在25 μL体系中进行,体系中含有1×Dream Buffer(with 2 mmol/L MgCl₂),0.2 mmol/L dNTP,0.5 μmol/L引物,2 U Dream Taq酶(Fermentas),1 μL第一链cDNA。PCR循环为96℃预变性3 min;接着30个循环,每个循环中96℃变性30 s,52.5℃退火30 s,72℃延伸2 min 35 s;最后72℃充分延伸5 min。PCR产物直接进行正反双向测序。

1.4 条斑紫菜 *HSP90* 基因及其编码产物的序列分析

用ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)分析*PyHSP90*基因的开放阅读框,并获得编码蛋白(PyHSP90)的氨基酸序列。

PyHSP90的基本理化特性分析、多序列比对和系统进化树构建分别使用ProtParam^[20]、Clustal W^[21]和MEGA4^[22]。PyHSP90的功能结构域使用ScanProsite^[23]和CDD^[24]进行分析,亚细胞定位使用PSORT^[25]和TargetP^[26]进行分析。

1.5 条斑紫菜 *HSP90* 基因表达的定量 RT-PCR 检测

根据*PyHSP90*基因的测序结果设计并筛选出1对优化的定量PCR引物,正向引物HSP90QF:5'-GAGGAGTCGGAGGAGGAGAAG-3',反向引物HSP90QR:5'-CCAGGCGGTCAGACACAAC-3'。本文选用18S rRNA作内参进行上样误差校正和标准化。根据GenBank上条斑紫菜18S rRNA序列(DQ666486)设计并筛选出1对优化的定量PCR引物,正向引物:5'-TGCCAGCACTGCGTTCTTACC-3',反向引物:5'-AGCCTTCCGACCCAGGACTATC-3'。所有引物由上海生工合成。

按PrimeScript[®] RT reagent Kit(TaKaRa)说明书操作,以Oligo(dT)和Random 6 mers为引物进行反转录反应。实时荧光定量PCR反应在IQ5 PCR仪(Bio-Rad)上进行。25 μL的反应体系中包含12.5 μL 2×SYBR[®] Premix Ex TaqTM II(TaKaRa)、0.2 μmol/L引物和2 μL反转录产物。采用两步PCR法进行扩增,即首先95℃预变性1 min,然后进入40个循环,每个循环中95℃变性10 s,61.5℃延伸30 s,循环结束后,从55℃缓慢升温到95℃,绘制熔解曲线。

以10×系列稀释的cDNA为模板进行定量PCR,制作*PyHSP90*和内参的标准曲线。每次反应都设置阴性对照和无模板对照,每个反应设3个复孔。应用Pfaffl^[27]建立的数学模型进行相对定量分析,结果采用均数±标准差表示。统计分析采用SPSS进行,各组数据都通过了正态性和方差齐性检验,因此组间差异采用单因素方差分析,组间多重比较采用SNK(Student-Newman-Keuls)检验, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 条斑紫菜 *HSP90* 基因克隆

来自GenBank的105条条斑紫菜表达序列标签(expressed sequence tag, EST)参与了

PyHSP90 基因序列的组装,所有 EST 序列的长度范围介于 150 ~ 500 nt 之间,EST 拼接后得到了长 2 664 nt 的 contig。据此设计了一对克隆引物,预期扩增产物大小为 2 527 bp。PCR 产物经电泳检测,仅在稍大于 2 500 bp 的位置上有一特异性扩增条带(图1),与预期大小相符。将 PCR 产物

送上海生工进行正反双向测序,得到了 PyHSP90 基因的 cDNA 序列(GU301885)。

2.2 条斑紫菜 HSP90 基因与编码产物的序列分析

将 cDNA 序列与 contig 序列进行比对,结果显示两者序列一致性(identity)高达 99.8%,说明计算机辅助克隆技术适合同源基因的快速克隆与分析。PyHSP90 基因的 cDNA 序列包含一个长 2 274 nt 的开放阅读框。PyHSP90 分子量为 86 ku,长 757 个氨基酸,其碱性、酸性、疏水性和极性氨基酸数量分别为 106、153、244 和 168 个,含量最丰富的氨基酸是 Glu 和 Leu,含量最少的是 Trp、Cys 和 His,理论等电点(pI)为 4.81。

PSORT 和 TargetP 的分析结果都表明 PyHSP90 不存在跨膜结构和信号肽,在细胞质内合成后不进行蛋白转运,定位于细胞质中。结构域分析显示 PyHSP90 在 47 ~ 56 位氨基酸处具有 HSP90 蛋白家族的特征序列 YSNKEIFLRE,49 ~ 202 位氨基酸为 ATP 结合区,具有类 ATPase 活性,205 ~ 757 位氨基酸为 HSP90 家族序列。PyHSP90 的羧基最末端为 MEDVD(图2),与细

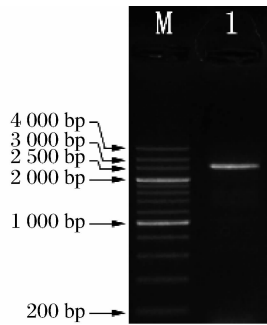


图1 条斑紫菜 HSP90 基因的 PCR 扩增结果
M:200 bp DNA Marker; 1:PyHSP90 的扩增产物。

Fig.1 PCR amplification of HSP90 gene from *Porphyra yezoensis*

M:200 bp DNA Marker; 1: PCR amplification product of PyHSP90.

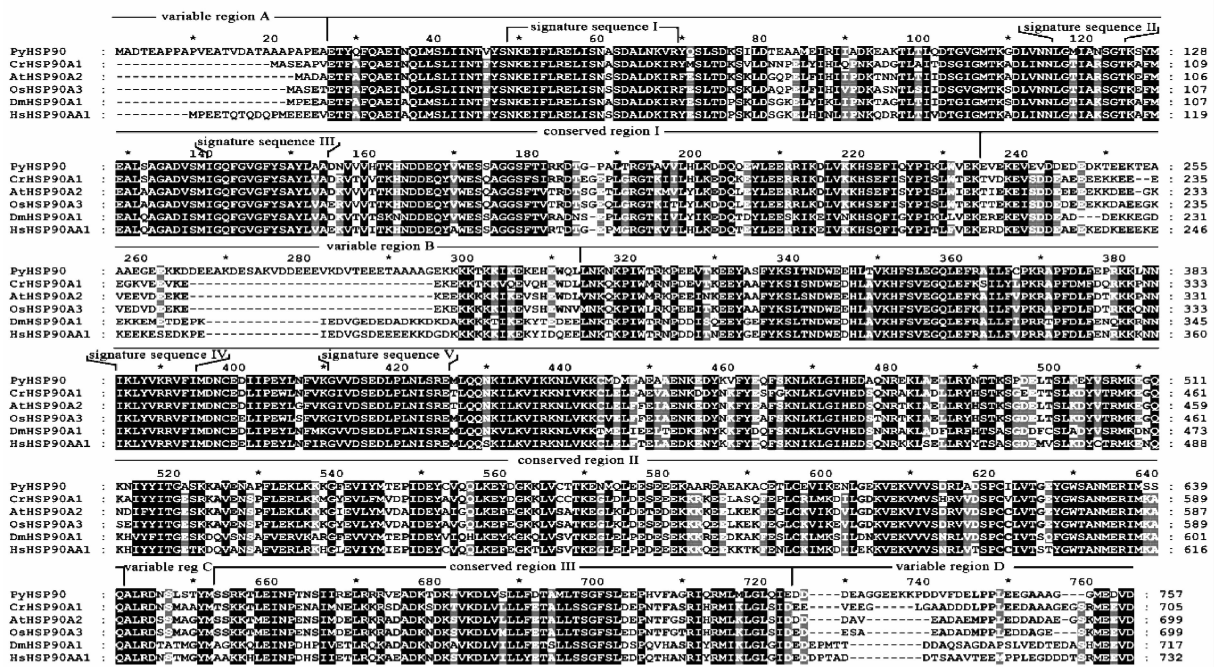


图2 HSP90 的多序列比对

来自条斑紫菜(PyHSP90)、莱茵衣藻(CrHSP90A1, XP_001695264)、拟南芥(AtHSP90A2, NP_200414)、水稻(OsHSP90A3, BAD33406)、果蝇(DmHSP90A1, NP_523899)和人(HsHSP90AA1, NP_005339)的细胞质 HSP90 用 Clustal W 构建了多序列比对。

Fig.2 Multiple sequence alignment of HSP90

The alignment of HSP90 was performed with the Clustal W method. The source organisms for cytoplasmic HSP90 sequences one as follows: *Porphyra yezoensis* (PyHSP90), *Chlamydomonas reinhardtii* (CrHSP90A1, XP_001695264), *Arabidopsis thaliana* (AtHSP90A2, NP_200414), *Oryza sativa* (OsHSP90A3, BAD33406), *Drosophila melanogaster* (DmHSP90A1, NP_523899) and *Homo sapiens* (HsHSP90AA1, NP_005339).

胞质 HSP90 的羧基最末端的保守基序 (MEEVD)^[28] 不同,存在着 E-D 的保守替换。MEEVD 是胞质 HSP90 区别于其他 HSP90 的特征序列,容易被认为是亚细胞定位信号,但其主要功能是通过与辅陪伴分子 (cochaperone) 的三十四肽重复序列 (tetratricopeptide repeat, TPR) 基序结合,参与 HSP90 的多聚化过程^[11]。多聚化还涉及到 HSP90 的其他序列,有些辅陪伴分子不需要 MEEVD 也能单独与 HSP90 结合^[29]。在线虫 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中已经发现这个基序并不是必需的^[10]。因此 PyHSP90 的羧基最末

端的保守替换不会影响其亚细胞定位和功能,反而反映出它在进化上的独特性。

按文献[8]的方法,可将 PyHSP90 分成 7 个区域,分别是 3 个保守区和 4 个可变区(图 2,分别标记为 conserved region I ~ III 和 variable region A ~ D)。保守区 I 和可变区 A 构成了 N 端结构域,在 HSP90 中保守性强,参与了 ATP 的结合和水解;保守区 II 构成了中间结构域,参与了结合 ATP、底物和辅陪伴分子;保守区 III 和可变区 D 构成了 C 端结构域,参与了多聚化过程^[11]。PyHSP90 氨基酸序列明显比其他胞质 HSP90

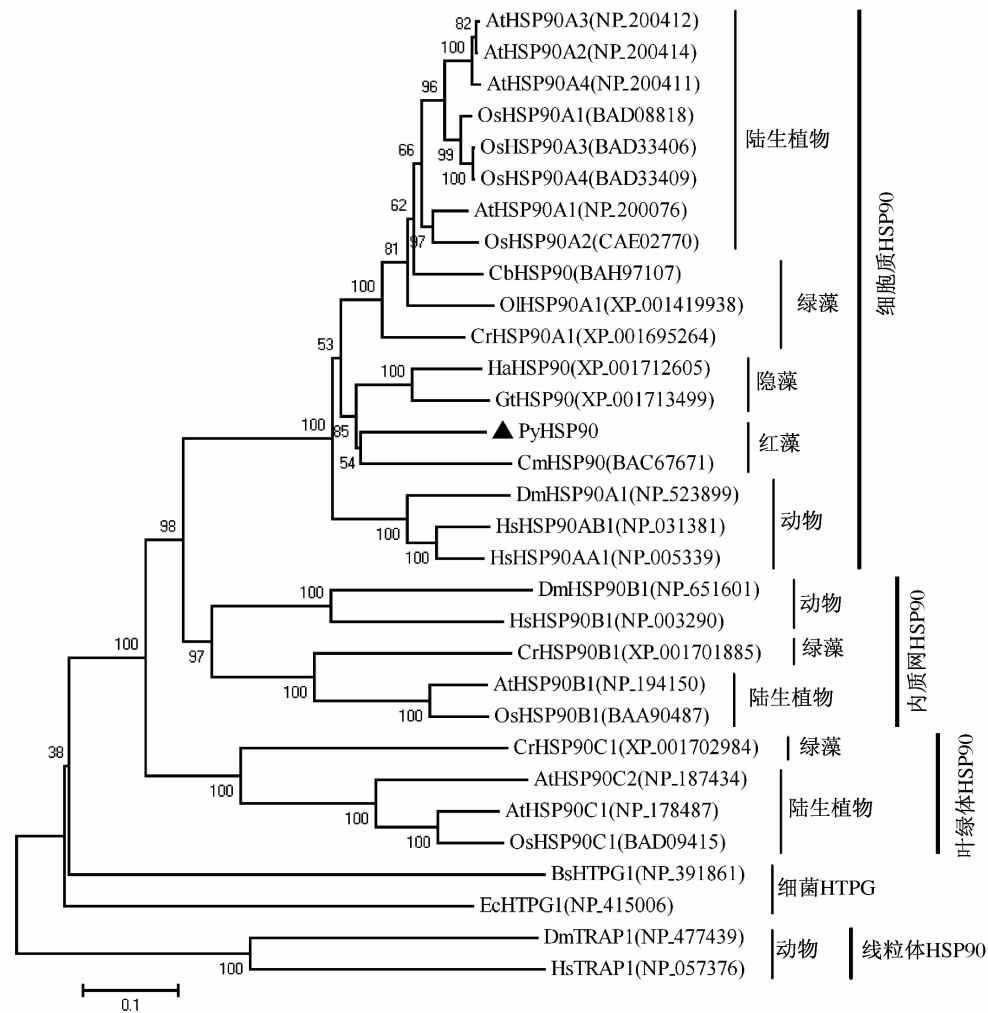


图 3 不同生物 HSP90 的系统进化树

用最小进化法构建进化树,节点前数字表示自举支持率,HSP90 的命名系统参考 Chen 等^[8]的方法,GenBank 索引号显示在括号中。HSP90A (包括 HSP90AA 和 HSP90AB)、HSP90B、HSP90C、TRAP 和 HTPG 分别表示胞质、内质网、叶绿体、线粒体和细菌 HSP90。

Fig. 3 Phylogenetic tree of HSP90 family members

The phylogenetic tree was constructed with minimum evolution method. Numbers at each branch indicate the percentage of times a node was supported in 1000 bootstrap pseudoreplications. Designated naming system of HSP90s referred to criteria of Chen *et al.*^[8]. Accession numbers are shown in parentheses. HSP90A (including HSP90AA and HSP90AB), HSP90B, HSP90C, TRAP and HTPG stand for cytoplasmic, endoplasmic reticulum, chloroplast, mitochondrial and bacterial HSP90 respectively.

要长,但这些长度差异主要位于可变区内,特别是可变区 B。可变区 B 除了连接 N 端结构域和中间结构域外,目前还未发现有何特殊功能^[11],因此在进化过程中容易发生变化。

多序列比对(图 2,仅显示与模式动植物的比对结果)显示 PyHSP90 与各种原核生物、植物和动物的 HSP90 具有较高的序列一致性,表明来自于不同物种的 HSP90 具有高度的保守性。PyHSP90 与大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和无类囊体蓝藻 (*Gloeobacter violaceus*) 等原核生物 HSP90 (即 HTPG) 的序列一致性为 26.0% ~ 39.4%,与莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 等真核藻类的细胞质 HSP90 的序列一致性为 66.5% ~ 71.8%,与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和水稻 (*Oryza sativa*) 的细胞质 HSP90 的序列一致性为 69.0% ~ 69.6%,与果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 和人 (*Homo sapiens*) 等动物的细胞质 HSP90 序列一致性为 61.4% ~ 65.0%。

根据已有文献^[8-9,30]的分析结果,选取多种细菌、植物和动物的已知亚细胞定位的各种 HSP90,采用 MEGA4 程序构建了 HSP90 的系统进化树(图 3)。在进化树上 HSP90 首先按不同的亚细胞定位进行聚类,不论动物还是植物,所有的细胞质 HSP90 聚为一簇,所有的内质网、叶绿体和线粒体 HSP90 也都各自聚为一簇,另外细菌的 HSP90 单独聚为一簇。PyHSP90 与细胞质 HSP90 聚类在一起,表明其属于细胞质 HSP90,这与亚细胞定位的预测结果一致。在进化树上,条斑紫菜与同属红藻门的 *Cyanidioschyzon merolae* 亲缘关系最近,首先聚类在一起,与隐藻的亲缘关系次之,接着与绿藻、陆生植物和动物聚成一簇。

2.3 条斑紫菜 HSP90 基因在胁迫下的表达变化

PyHSP90 和内参的扩增曲线基线平整、指数区明显、斜率大且固定,熔解曲线上显示扩增产物均为单一的特异峰,扩增效率为 $(100 \pm 1)\%$,阴性对照和无模板对照均无扩增,3 个复孔的重复性好。表明扩增体系和反应条件良好,无引物二聚体等非特异性扩增,定量准确。

定量 RT-PCR 结果显示温度、盐度和失水胁迫对 PyHSP90 基因的相对表达量具有显著影响(图 4)。温度胁迫下,PyHSP90 的表达量在 15 °C 时最低,25 °C 时最高,且 25 °C 时的表达量是 15 °C 下的 17.81 倍;从 15 °C 向低温方向,PyHSP90

的表达量增加,且与 15 °C 下的表达量差异显著,0 °C 时达到最大;从 15 °C 向高温方向,PyHSP90 的表达量迅速增加,且也差异显著,25 °C 时表达量迅速上升并达到最大,但 30 °C 时表达量急剧下降,与 15 °C 下的表达量无明显差异(图 4-A)。高盐(35 和 45)胁迫下,PyHSP90 表达量与 25 盐度的没有显著性差异;但 5 和 15 低盐胁迫下,PyHSP90 表达量上升,分别是 25 盐度表达量的 1.60 倍和 1.77 倍,且差异显著(图 4-B)。失水(20% ~ 80% 失水率)胁迫下,PyHSP90 的表达量不同程度的降低,是不失水时表达量的 0.39 ~ 0.52 倍,且与之差异显著,但不同失水率间的表达量无显著性差异(图 4-C)。

3 讨论

PyHSP90 在进化树上处于植物和动物之间,与动植物的氨基酸序列一致性为 61.4% ~ 69.6%,这种序列一致性明显低于植物间或动物间的序列一致性(76.6% ~ 90%),表明其与植物和动物的亲缘关系都较远,这种现象在条斑紫菜的泛素结合酶基因中也有发现^[19]。Gupta^[28]在比对了植物、动物和真菌的各种 HSP90 后,提出在 HSP90 家族中存在 5 条特征性序列(图 2,标记为 signature sequence I ~ IV),大多数生物在这 5 条序列上几乎完全相同^[15-16],仅有少数生物存在个别氨基酸差异^[31],但是条斑紫菜在这 5 条特征性序列上与动植物存在明显差异,没有一条特征性序列是完全匹配的。PyHSP90 的羧基最末端基序与绝大多数生物(包括绿藻)的不同,存在着 E-D 的保守替换,类似现象在条斑紫菜 RNA 聚合酶 II 大亚单位(largest subunit of RNA polymerase II, RPB1)上也有发现,其羧基端不具备动植物普遍具有的羧基末端结构域(carboxyl-terminal domain)^[32]。上述各种差异可能归咎于条斑紫菜在进化上的特殊起源,即红藻的演化早于植物、动物和真菌的共同祖先^[32-33],而且条斑紫菜是红藻门中较原始的一类。

每种生物都有各自适宜的生活环境,当环境条件超出适宜范围时,生物体就受到了来自环境的胁迫,为了生存于这种胁迫环境,生物体必然会产生相应的耐受机制。条斑紫菜生活在潮间带,每天周期性地经历干出与覆水过程,在干出时面临温度、盐度、失水、强光照和紫外线等多种非生

物胁迫。这些胁迫已经成为条斑紫菜生长过程中的一种常态,表明其具备多种胁迫耐受机制。因

此本研究应用定量 RT-PCR 技术分析了 *PyHSP90* 基因在温度、盐度和失水胁迫耐受过程中的作用。

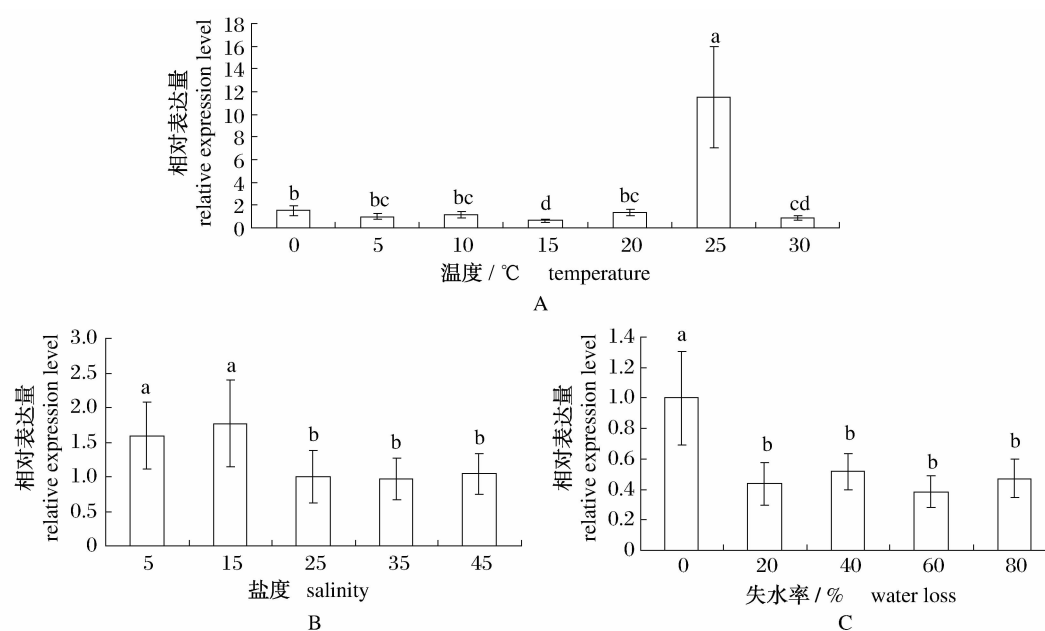


图4 条斑紫菜 *HSP90* 基因在胁迫下的相对表达量

采用实时定量 RT-PCR 技术分析了 *PyHSP90* 基因在温度(A)、盐度(B)和失水(C)胁迫下的相对表达量。*PyHSP90* 基因的表达量先用 18S rRNA 内参进行归一,再与对照样品(即图中表达量设定为 1 的样品)比较,最后得到相对表达量。图中数据表示为平均值 \pm 标准差 ($n=3$),柱形图上的不同字母表示差异的显著性 ($P < 0.05$)。

Fig. 4 The relative mRNA expression levels of *HSP90* gene in *Porphyra yezoensis* under different stresses

The relative expression levels of *PyHSP90* gene in response to temperature(A), salinity(B) and desiccation(C) stress were analyzed using real-time RT-PCR. The relative mRNA levels of the *PyHSP90* gene were normalized with the amount of 18S rRNA and given as relative fold abundance compared to sample whose relative expression level was set to 1. Error bars indicate the mean and standard deviation ($n = 3$). Different letters above each bar indicate statistical difference ($P < 0.05$).

HSP 的发现与命名已经反映出其主要功能之一是参与温度胁迫的耐受,即在热激环境下 HSP 表达上调,参与稳定蛋白和膜结构,并最终维持细胞稳态^[2-3]。本文的定量结果也表明 *PyHSP90* 基因表达受到温度胁迫的显著影响。*PyHSP90* 基因在 15 °C 时表达量最低,表明条斑紫菜叶状体的小藻体要求的生长温度相对较高。这一结果与前人研究结果一致,即不同大小的条斑紫菜叶状体具有不同的适宜生长温度,藻体越小要求的温度越高,反之越低^[34]。高温胁迫时, *PyHSP90* 基因的表达急剧上升,而且表达量与胁迫程度成正相关,即 *PyHSP90* 基因在 25 和 20 °C 的表达量分别是 15 °C 的 17.81 和 2.06 倍,且差异显著。但当环境温度到达 30 °C 时, *PyHSP90* 基因的表达量却急剧下降,可能是 30 °C 热激超出了机体的保护能力,导致 *PyHSP90* 基因无法继续转录。低温胁迫时, *PyHSP90* 基因表达也上调,

而且温度越低表达量越高,0 °C 时表达量最高,是 15 °C 的 2.33 倍。

相对于温度胁迫下的剧烈变化,在其它胁迫下 *PyHSP90* 基因表达变化相对温和。在 5 和 15 低盐度胁迫下, *PyHSP90* 基因表达上调,分别是 25 盐度下的 1.60 和 1.77 倍;在 45 高盐度胁迫下, *PyHSP90* 基因表达几乎没有变化,是 25 盐度下的 1.04 倍。在失水(失水 20% ~ 80%)胁迫下, *PyHSP90* 基因表达下调,是失水前的 0.39 ~ 0.52 倍。上述结果表明条斑紫菜可能存在其它的胁迫耐受机制,因而对 *PyHSP90* 的依赖性减弱。已有研究表明,潮间带海藻在短期盐度胁迫时,通过一个迅速且低能耗的过程,对盐离子进行选择吸收和排出或在液泡中积累起来,以缓解离子胁迫;在长期盐度胁迫时,通过一个缓慢且耗能的过程,在细胞内合成、积累或降解有机渗透物质,以缓解渗透胁迫^[35]。失水胁迫下,条斑

紫菜细胞膜上富含的红藻糖苷和多不饱和脂肪酸可以维持细胞膜的液态,细胞质内形成氢键框架(hydrogen bonding framework)以降低分子运动来抵御失水胁迫^[36]。

既然温度、盐度和失水都会对条斑紫菜产生胁迫,那么是什么原因使 *PyHSP90* 基因在温度胁迫下剧烈表达,而在盐度和失水胁迫下仅表现出少量上调或者无变化、甚至下调呢?乳糖操纵子(Lac operon)模型也许能给我们启示,当葡萄糖和乳糖同时出现在培养基时,大肠杆菌优先利用葡萄糖,因为代谢葡萄糖是最经济、最有效的,而代谢乳糖需要重新合成乳糖代谢的相关酶类,需要消耗额外能量^[37]。也就是说任何生物体都是一个经济的个体,不会有能量浪费。因此我们推测,条斑紫菜首先调用最经济、最具针对性的耐受机制来对抗胁迫,当胁迫强度超出这些机制的耐受范围时,藻体再调用 *PyHSP90* 等其它分子来稳定胁迫下的蛋白和膜结构,因为 *PyHSP90* 的转录和翻译是一个极耗能的过程。那么可以预测当条斑紫菜遭受更高盐度胁迫时,*PyHSP90* 基因的表达可能会出现上调。

PyHSP90 基因的克隆采用了计算机辅助克隆技术,与传统基因克隆方法相比,该技术更为快速、简便、精确且目的性强^[19]。基因的表达分析采用了实时荧光定量 PCR 技术,与 Northern 印迹、原位杂交、RNase 保护分析和半定量 RT-PCR 等定量技术相比,该技术将特异且灵敏的 PCR 技术与 PCR 产物荧光检测技术相结合,避免了凝胶电泳、转膜、放射性探针杂交和胶片显影等操作的局限性,是核酸检测和定量最准确和灵敏的方法^[38]。

参考文献:

- [1] Lindquist S, Craig E A. The heat-shock proteins[J]. *Annu Rev Genet*, 1988, 22: 631-677.
- [2] Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, et al. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response[J]. *Trends Plant Sci*, 2004, 9(5): 244-252.
- [3] Kregel K C. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance[J]. *J Appl Physiol*, 2002, 92(5): 2177-2186.
- [4] Timperio A M, Egidio M G, Zolla L. Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP) [J]. *J Proteomics*, 2008, 71(4): 391-411.
- [5] 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.
- [6] Hubert D A, Tornero P, Belkadir Y, et al. Cytosolic HSP90 associates with and modulates the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance protein[J]. *EMBO Journal*, 2003, 22(21): 5679-5689.
- [7] Csermely P, Schnaider T, Soti C, et al. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review[J]. *Pharmacol Ther*, 1998, 79(2): 129-168.
- [8] Chen B, Zhong D, Monteiro A. Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms[J]. *BMC Genomics*, 2006, 7: 156.
- [9] Krishna P, Gloor G. The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2001, 6(3): 238-246.
- [10] Picard D. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2002, 59(10): 1640-1648.
- [11] Zhao R, Houry W A. Hsp90: a chaperone for protein folding and gene regulation[J]. *Biochem Cell Biol*, 2005, 83(6): 703-710.
- [12] Rutherford S L, Lindquist S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution[J]. *Nature*, 1998, 396(6709): 336-342.
- [13] Queitsch C, Sangster T A, Lindquist S. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation[J]. *Nature*, 2002, 417(6889): 618-624.
- [14] Hori T S, Gamperl A K, Afonso L O, et al. Heat-shock responsive genes identified and validated in Atlantic cod (*Gadus morhua*) liver, head kidney and skeletal muscle using genomic techniques[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 72.
- [15] Farcy E, Serpentine A, Fiévet B, et al. Identification of cDNAs encoding HSP70 and HSP90 in the abalone *Haliotis tuberculata*: Transcriptional induction in response to thermal stress in hemocyte primary culture[J]. *Comp Biochem and Physiol Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 146(4): 540-550.
- [16] Li F, Luan W, Zhang C, et al. Cloning of cytoplasmic heat shock protein 90 (*FcHSP90*) from *Fenneropenaeus chinensis* and its expression response

- to heat shock and hypoxia [J]. *Cell Stress and Chaperones*,2009,14(2):161-172.
- [17] Peng S, Huang J, Sheehy J E, *et al.* Rice yields decline with higher night temperature from global warming[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2004,101(27):9971-9975.
- [18] West J A, McBride D L. Long-term and diurnal carpospore discharge patterns in the *Ceramiaceae*, *Rhodomelaceae* and *Delesseriaceae* (Rhodophyta) [J]. *Hydrobiologia*,1999,398-399(0):101-114.
- [19] 易乐飞,刘楚吾,王萍,等.条斑紫菜泛素结合酶基因的 cDNA 序列克隆与分析[J]. *水产学报*,2009,33(5):719-726.
- [20] Wilkins M R, Gasteiger E, Bairoch A, *et al.* Protein identification and analysis tools in the ExPASy server [J]. *Methods Mol Biol*,1999,112:531-552.
- [21] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994,22(22):4673-4680.
- [22] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Mol Biol Evol*,2007,24(8):1596-1599.
- [23] de Castro E, Sigrist C J, Gattiker A, *et al.* ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins [J]. *Nucleic Acids Res*,2006,34(Supl. 2):362-365.
- [24] Marchler-Bauer A, Anderson J B, Cherukuri P F, *et al.* CDD: a Conserved Domain Database for protein classification [J]. *Nucleic Acids Res*,2005,33(Database issue):192-196.
- [25] Nakai K, Horton P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization [J]. *Trends Biochem Sci*, 1999,24(1):34-36.
- [26] Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, *et al.* Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools [J]. *Nature Protocols*,2007,2(4):953-971.
- [27] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*,2001,29(9):2002-2007.
- [28] Gupta R S. Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species [J]. *Mol Biol Evol*,1995,12(6):1063-1073.
- [29] Onuoha S C, Coulstock E T, Grossmann J G, *et al.* Structural studies on the co-chaperone Hop and its complexes with Hsp90 [J]. *J Mol Biol*,2008,379(4):732-744.
- [30] Chen B, Piel W H, Gui L, *et al.* The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution [J]. *Genomics*,2005,86(6):627-637.
- [31] Brunt S A, Silver J C. Molecular cloning and characterization of two different cDNAs encoding the molecular chaperone Hsp90 in the oomycete *Achlya ambisexualis* [J]. *Fungal Genet Biol*,2004,41(2):239-252.
- [32] Stiller J W, Hall B D. Sequences of the largest subunit of RNA polymerase II from two red algae and their implications for *Rhodophyte* evolution [J]. *Journal of Phycology*,1998,34(5):857-864.
- [33] Stiller J W, Hall B D. The origin of red algae: implications for plastid evolution [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,1997,94(9):4520-4525.
- [34] 曾呈奎,王素娟,刘思俭,等.海藻栽培学 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1985:155.
- [35] Kirst G O. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae [J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*,1990,41(1):21-53.
- [36] Liu Y. Mechanism for differential desiccation tolerance in *Porphyra species* [D]. Boston: Northeastern University,2009.
- [37] Weaver R F. *Molecular biology*, second edition [M]. New York: McGraw-Hill Companies,2001:186-187.
- [38] Bustin S A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays [J]. *J Mol Endocrinol*,2000,25(2):169-193.

Molecular cloning and expression analysis of *HSP90* gene from *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta)

ZHOU Xiang-hong^{1,2}, LI Xin-shu^{1,2}, WANG Ping², YAN Bin-lun^{1*}, TENG Ya-juan², YI Le-fei^{1,2}

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China;

2. School of Marine Science & Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

Abstract: The 90-ku heat shock proteins (HSP90s) are a group of evolutionarily highly conservative molecular chaperones and essential for viability in eukaryotes. The basic functions of HSP90s are of assisting protein folding, protein degradation and protein trafficking, and they also play an important role in signal transduction networks, cell cycle control and morphological evolution. Although HSP90s are constitutively expressed in most organisms, their expression is up-regulated in response to stresses such as cold, heat, salt stress, heavy metals, phytohormones, light and dark transitions. *Porphyra yezoensis* Ueda, one of intertidal macroalgae, periodically experiences immersion and emersion due to the tidal cycles. When *P. yezoensis* thalli are exposed to air, they experience a variety of abiotic stresses such as nutrient limitation, high light, ultraviolet ray, high and low temperature, desiccation and osmotic stress. In order to investigate the contribution of HSP90 to abiotic stresses tolerance in *P. yezoensis* thalli, molecular cloning and expression analysis of *HSP90* gene (designated as *PyHSP90*) from *P. yezoensis* were performed. *PyHSP90* gene was obtained with computer assisted cloning, and characterized using multiple bioinformatic programs. The relative mRNA expression levels of *PyHSP90* gene under stresses were investigated in *P. yezoensis* thalli using real-time RT-PCR. The *PyHSP90* cDNA contained a 2 274 nt of continuous complete open reading frame encoding a polypeptide of 757 amino acids with a calculated molecular mass of 86 ku. Analytic results of PSORT, TargetP and phylogenetic tree showed that *PyHSP90* localized to cytoplasm. *PyHSP90* contained conserved signature motifs and domains of HSP90 family. *PyHSP90* shared high amino acid sequence identity with HSP90s from other organisms. Sequence comparison of *PyHSP90* revealed 26.0% – 39.4% and 61.4% – 71.8% identity with prokaryotic and eukaryotic HSP90s respectively. In the phylogenetic tree red algae HSP90s, including *PyHSP90*, clustered with Cryptophyta HSP90s firstly, and then clustered with HSP90s of green algae and land plants, and at last all cytoplasmic HSP90s of algae, plants and animals were clustered together. Low and high temperature stresses significantly induced the expression of *PyHSP90* gene in *P. yezoensis* thalli, and there was a clear dose-dependent expression pattern of *PyHSP90* gene after different temperature exposure. The expression of *PyHSP90* gene was up-regulated under low salinity stress, and down-regulated under desiccation stress. The results indicated that *PyHSP90* is essential to hold configuration of proteins under temperature and salinity stresses, and dispensable under desiccation stress. Investigation of *PyHSP90* gene can contribute to its molecular mechanism of tolerance to abiotic stresses, and lay a foundation for further enhancing resilience of *P. yezoensis* through genetic improvement.

Key words: *Porphyra yezoensis* Ueda; heat shock protein 90 (HSP90); cloning; expression; real-time PCR

Corresponding author: YAN Bin-lun. E-mail: yanbinlun@yahoo.com.cn