

坛紫菜两种 *Hsp90* 基因的克隆及表达特征分析

代真真, 李 兵, 徐 燕, 纪德华, 陈昌生, 谢潮添*

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 以坛紫菜转录组测序获得的 unigene 序列为基础, 采用 RACE (rapid amplification of cDNA ends) 技术克隆获得了坛紫菜的两条 *Hsp90* 基因序列: *PhHsp90-1* 和 *PhHsp90-2*。序列分析结果表明, *PhHsp90-1* 序列全长 2 572 bp, 包含一个 2 427 bp 的开放阅读框, 所编码的多肽包含 809 个氨基酸, 分子量为 90.2 ku, 等电点为 4.79, 属于 *Hsp90* 内质网亚家族 (登录号: KF732651); *PhHsp90-2* 序列全长 2 510 bp, 包含一个 2 280 bp 的开放阅读框, 所编码的多肽包含 760 个氨基酸, 分子量为 86.2 ku, 等电点为 4.81, 属于 *Hsp90* 细胞质亚家族 (登录号: KF732652)。基因表达水平的定量分析结果表明, 高温和失水胁迫对两条 *PhHsp90* 基因的表达水平均有显著影响, 但在表达模式上存在明显差异。高温胁迫不同时间水平下, 两条 *PhHsp90* 基因的表达均表现为先上调后下调的趋势; 而在失水胁迫下, 当失水率小于 60% 时, 两条基因的表达水平均没有发生显著变化, 但当失水率大于 60% 时, 两条基因的表达水平均显著上调, 说明两条 *PhHsp90* 基因均在应答高温胁迫和高度失水胁迫中发挥着重要作用。

关键词: 坛紫菜; 热激蛋白 90; RACE; 荧光定量 PCR

中图分类号: Q 785; S 917

文献标志码: A

热激蛋白 (heat shock protein, Hsp) 是一类广泛存在于各类生物细胞内且高度保守的蛋白, 它不仅受各类逆境胁迫条件的诱导, 也广泛参与细胞正常生理活动的调节, 在生物体的生长发育、应答逆境胁迫以及信号传导等方面发挥着重要作用^[1]。根据分子量、序列同源性以及生物学功能等的不同, 大致可将 Hsp 分为 5 个家族: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 及小分子 Hsp (smHsp, 分子量为 12~43 ku 的热激蛋白)^[2]。作为分子伴侣, Hsp 在细胞正常代谢过程中负责蛋白的折叠、组装、转运和降解等活动, 而在胁迫状态下则起着稳定蛋白和膜结构、参与蛋白质解聚再折叠、最终维持细胞稳态的作用^[3]。

Hsp90 通常以同源二聚体的形式存在, 主要定位于细胞质中, 但也有一些成员存在于内质网、线粒体和叶绿体等亚细胞器中, 具有包括应激响应和常规调节机制在内的多种生理学功能, 在所有真核细胞生物的胁迫响应、生长发育和信号传导中都发挥

着举足轻重的作用, 因此受到越来越多的关注^[4-5]。目前已从拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[5]、玉米 (*Zea mays*)^[6-7]、水稻 (*Oryza sativa*)^[8]、小麦 (*Aegilops tauschii*)^[9], 以及其他多种植物^[10-12] 中分离得到了 *Hsp90* 的全长基因, 其中, Krishna 等^[5] 从拟南芥基因组中分离得到的 *Hsp90* 家族 7 个成员中, AtHsp90-1/-2/-3/-4 定位于细胞质中, AtHsp90-1, AtHsp90-2 和 AtHsp90-3 则分别定位于叶绿体、线粒体和内质网中。在海洋水产生物中, 目前也已从皱纹盘鲍 (*Haliotis discus*)^[13]、近江牡蛎 (*Crassostrea hongkongensis*)^[14]、脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*)^[15]、条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*)^[16] 和列紫菜 (*Porphyra seriata*)^[17] 中克隆获得了 *Hsp90* 家族的基因, 但迄今未见坛紫菜 (*Pyropia haitanensis*) *Hsp90* 家族基因克隆的报导。

坛紫菜是闽、浙沿海传统大宗的水产养殖对象, 是我国特有的暖温带性种类, 其产量占全国紫

收稿日期: 2013-10-24 修回日期: 2013-12-10

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2012AA10A411); 国家自然科学基金项目 (41176151, 41276177); 海洋公益性行业科研专项 (201105008, 201105023); 福建省科技重大专项资助项目 (2011NZ0001)

通信作者: 谢潮添, E-mail: ctxie@jmu.edu.cn

菜总产量的 75% 以上,创造了可观的经济效益^[18-19]。此外,作为生长于潮间带中高潮区的一种大型海藻,由于受潮汐作用,在干出失水时,坛紫菜叶状体面临盐度、失水、强光照和紫外辐射等多种非生物胁迫的影响^[18],加之随着全球气候变暖,高水温已成为影响坛紫菜产量和品质的重要因素^[20-23],因此研究坛紫菜对逆境胁迫的应答机制,分离并克隆胁迫应答相关基因就具有十分重要的意义。本研究是在原有坛紫菜转录组学研究^[24]的基础上,对坛紫菜 *Hsp90* 家族的两条基因 (*PhHsp90-1* 和 *PhHsp90-2*) 进行全长克隆,并通过分析这两条基因在高温及失水胁迫下的表达水平变化,评价其在坛紫菜胁迫应答中的作用。

1 材料与方 法

1.1 坛紫菜样品及胁迫处理

供试材料为人工杂交选育获得的坛紫菜耐高温性型系 Z-61^[12],取自福建省坛紫菜种质资源库。将坛紫菜 Z-61 叶状体在正常温度下培养,培养条件为温度 21 °C,光照强度 50 ~ 60 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光照周期 12L:12D,(隔 2 天更换过滤新鲜海水一次),待叶状体生长至 (15 ± 2) cm 时,选取叶面平滑、色深有光泽、无斑点烂洞、处于旺盛生长期的健康藻体置于 (29 ± 0.5) °C 的恒

温光照培养箱中进行高温胁迫处理(其余培养条件同正常条件)3 h 后作为实验组,提取总 RNA,并逆转录成 cDNA 后用于 *Hsp90* 家族基因的全长克隆。

另取一组 (15 ± 2) cm 的完整藻体置于 (29 ± 0.5) °C 的恒温光照培养箱中分别进行高温胁迫处理(其余培养条件同正常条件)0、3、6、12、24 和 48 h 后,提取总 RNA,用于高温胁迫条件下基因表达水平的实时荧光定量 PCR (qPCR) 分析。

同时,再取一组藻体,用纱布轻压吸干藻体表面水分后,置于干燥纱布上,放于 21 °C,光照强度 50 ~ 60 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的干燥箱内干燥失水。根据预实验确定的干燥时间,分别取样失水率为 0、10%、40%、60%、90% 的样品和干燥失水至失水率为 90% 后再浸泡于新鲜海水中培养 30 min 后(复水)的样品进行总 RNA 的提取,用于失水胁迫条件下基因表达水平的 qPCR 分析。失水率计算公式:失水率 = (鲜重 - 失水后藻体重) / (鲜重 - 干重) × 100%

以上每个处理,设置 3 个平行。

1.2 引物及其序列

全长基因 RACE 扩增、阳性克隆筛选、全长验证、以及基因表达水平 qPCR 分析所采用的引物序列如表 1 所示,由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 实验中所用引物的名称和序列
Tab.1 Name and sequence of primer in this experiment

用途 usage	基因 gene	引物名称 primer name	引物序列(5'-3') sequence
全长扩增 RACE	<i>PhHsp90-1</i>	R901GSP-5'	GGACTTTTGTAGCATCTCGC
		R901NGSP-5'	TCGCGGATGGTAAAGGTCTG
		R901GSP-3'	GGCTTCTGCCACGCTATTTG
	<i>PhHsp90-2</i>	R901NGSP-3'	CCCGACTACCAGGGCTCCAA
		R902GSP-5'	CACCAACTTCTCCCATCATAC
		R902NGSP-5'	GGAGAAGTCTCGTAGAACACC
全长验证 head to toe	<i>PhHsp90-1</i>	R902GSP-3'	CCTCAACTTTGTGAAGGGTGT
		R902NGSP-3'	CACGAGGACTCGCAGAACCG
	<i>PhHsp90-2</i>	H901F	GACATCATCACTCGCTCTACTC
		H901R	CCTACAACATCATCGTGGTCTCA
		H902F	TCGTCATCCCGTCTGTAGTG
		H902R	ACACCCACCCGACTCTACAC
定量分析 qPCR	<i>PhHsp90-1</i>	Q901F	TGCTGAGGACCACGATGAG
		Q901R	CCACGCAGACGGAGAAATA
	<i>PhHsp90-2</i>	Q902F	CTGGTGACGGGTGAGTATGG
		Q902R	GATCGAGTTGGTCGGGTTG
内参 internal control	<i>UBC</i>	UBCF	TCACAACGAGGATTTACCACC
		UBCR	GAGGAGCACCTTGAAACG
阳性克隆筛选 validation of positive clone		RV-M	GAGCGGATAACAATTTACACAGG
		M13-20	CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT

1.3 总 RNA 的分离纯化

收集坛紫菜藻体 0.1 g,经滤纸吸干和液氮研磨后,采用 E. Z. N. A 植物 RNA 提取试剂盒 (OMEGA,德国)提取各样品的总 RNA。经凝胶电泳检查所提取总 RNA 的完整性,并在 Cary50 紫外分光光度计上分别测定 OD₂₆₀和 OD₂₈₀值,根据测定结果计算 RNA 的浓度,判断核酸和蛋白质的污染情况。

1.4 *PhHsp90* 基因的全长克隆

根据坛紫菜转录组数据库 unigene 的注释结果,筛选出与皱波角叉菜 (*Chondrus crispus*) *Hsp90* 基因序列相似性为 56% 的 unigene (CL846. Contig2) 作为 *PhHsp90-1* 基因全长克隆的核心序列,同时筛选出与条斑紫菜 *Hsp90* 基因序列相似性为 93% 的 unigene (CL80. Contig2) 作为 *PhHsp90-2* 基因全长克隆的核心序列。根据核心序列,分别设计 *PhHsp90-1* 和 *PhHsp90-2* 基因 5'-和 3'-RACE 扩增的特异性扩增引物 (GSP) 和巢式引物 (NGSP) (表 1),按照 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒的说明分别进行两个基因的 5'-和 3'-RACE 扩增。将 RACE 扩增的目的片段切胶回收、转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,经蓝白斑筛选和阳性克隆验证后送往大连宝生物有限公司进行测序。

1.5 *PhHsp90* 基因的全长验证

首先根据测序获得的各基因的 5'和 3'序列与核心序列的重叠区,采用 DNAMAN 5.2.2 (Lynnon BioSoft) 软件进行拼接,获得各基因的全长序列。然后根据拼接获得的全长序列,设计 Head to toe 引物,以 RACE 扩增时获得的 cDNA 为模板,进行普通 PCR 扩增,同样将扩增产物进行切胶回收、转化和测序,并将测序结果与拼接结果进行比对,以验证全长克隆的正确性。

1.6 *PhHsp90* 基因的生物信息学分析

对所获得的全长基因序列利用 NCBI 的 Blastn 程序进行序列同源性检测,并采用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 软件分析各基因的开放阅读框 (ORF) 和所编码氨基酸序列;使用在线软件 PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>), InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) 和 PrediSi

(<http://www.predisi.de>) 查找基因序列的保守位点和信号肽序列;采用 Clustal X^[25] 进行氨基酸多重序列比对,并采用 MEGA 5.10^[26] 软件构建了 *Hsp90* 蛋白的系统进化树。

1.7 *PhHsp90* 基因表达水平的 qPCR 分析

根据基因序列设计 qPCR 正反向引物,并以 UBC 基因作为内参,进行 *PhHsp90-1* 和 *PhHsp90-2* 基因在高温和失水胁迫条件下表达水平的 qPCR 分析。

提取的各样品总 RNA 按 PrimeScript[®] RT reagent kit (TaKaRa, 大连) 的说明书进行操作。25 μ L 的反应体系包含: 12.5 μ L 2 \times SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa), 0.2 μ mol/L 引物和 2 μ L 反转录产物。扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 62 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。循环结束后从 55 $^{\circ}$ C 缓慢升温至 95 $^{\circ}$ C, 绘制熔解曲线。荧光定量 PCR 扩增在 ABI7300 型定量 PCR 仪上进行。

以 10 \times 梯度稀释的 cDNA 为模板进行定量 PCR 扩增,制作 *PhHsp90-1*, *PhHsp90-2* 和内参基因的标准曲线。每次反应都设置阴性对照和无模板对照,每个反应设 3 个平行复孔。应用 Excel 和 SPSS 13.0 软件对实验数据进行统计分析,并采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和最小显著差异法 (LSD) 比较不同数据组间的差异, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示极显著差异。

2 结果

2.1 *PhHsp90* 基因的全长克隆

PhHsp90-1 以坛紫菜 CL846. Contig2 序列为核心,通过 RACE 扩增和测序,获得一条长度为 482 bp 的 5'-RACE (图 1-1) 和一条 820 bp 的 3'-RACE (图 1-2),根据两条末端序列和核心序列的重叠区,拼接获得了一条长度为 2 572 bp 的全长序列,经过全长序列验证 (图 1-3) 和比对,确认该基因为坛紫菜的 *Hsp90* 基因,命名为 *PhHsp90-1*。该基因已提交到 GenBank 数据库中,登录号为 KF732651。通过 ORF Finder 软件分析发现,该基因序列 34 ~ 2463 个碱基为完整的开放阅读框 (open reading frame, ORF),可编码包含 809 个氨基酸,分子量为 90.2 ku,等电点为 4.79 的蛋白质。

PhHsp90-2 以坛紫菜 CL80. Contig2 序列为核心,通过 RACE 扩增和测序,获得一条长度为 1 476 bp 的 5'-RACE(图 1-4)和一条 1 012 bp 的 3'-RACE(图 1-5),根据两条末端序列和核心序列的重叠区,拼接获得了一条长度为 2 510 bp 的全长序列,经过全长序列验证(图 1-6)和比对,

确认该基因为坛紫菜的 *Hsp90* 基因,命名为 *PhHsp90-2*。该基因已提交到 GenBank 数据库中,登录号为 KF732652。通过 ORF Finder 软件分析发现,该基因序列 73 ~ 2 355 个碱基为完整的开放阅读框,可编码包含 760 个氨基酸,分子量为 86.2 ku,等电点为 4.81 的蛋白质。

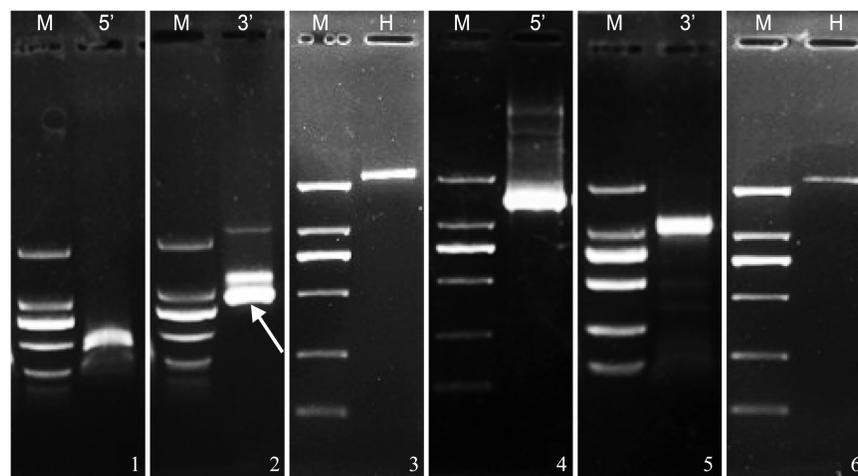


图 1 *PhHsp90* 基因克隆产物电泳图

1. *PhHsp90-1* 基因的 5'-RACE 扩增产物; 2. *PhHsp90-1* 基因的 3'-RACE 扩增产物(箭头); 3. *PhHsp90-1* 基因的全长扩增产物; 4. *PhHsp90-2* 基因的 5'-RACE 扩增产物; 5. *PhHsp90-2* 基因的 3'-RACE 扩增产物; 6. *PhHsp90-2* 基因的全长扩增产物

Fig. 1 Agarose electrophoresis of RACE or Head to toe products of *PhHsp90* genes

1. 5'-RACE products of *PhHsp90-1*; 2. 3'-RACE products of *PhHsp90-1* (arrow); 3. Head to toe products of *PhHsp90-1*; 4. 5'-RACE products of *PhHsp90-2*; 5. 3'-RACE products of *PhHsp90-2*; 6. Head to toe products of *PhHsp90-2*

2.2 *PhHsp90* 基因的多序列比对分析

序列同源性比对结果表明,所克隆的两条基因均属于 *Hsp90* 基因家族, *PhHsp90-1* 与 *PhHsp90-2* 的氨基酸序列相似性仅为 42%,但 *PhHsp90-1* 与皱波角叉菜 *Hsp90* 氨基酸序列相似性为 58%, *PhHsp90-2* 与条斑紫菜 *Hsp90* 氨基酸序列相似性为 97%。基于多序列比对,可将两条 *PhHsp90* 蛋白的氨基酸序列划分成 3 个保守区域(I、II、III)和 4 个可变区域(A、B、C、D),其中可变区 A 和保守区 I 构成了 N 端结构域,包含一个组氨酸蛋白激酶类 ATPase 结构域,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(cochaperone);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(图 2)。

使用 PROSITE 和 InterProScan 软件分析发

现,两个 *PhHsp90* 蛋白的氨基酸序列均含有 *Hsp90* 家族的 5 条特征性序列: NKEIFLRELISNSSDALDKIR、 LGTIARSGT、 MIGQFGVGFYSAYLVA、 IKLYVRRVFI 和 GIVDSEDLP LNISRE(图 2)。此外, *PhHsp90-1* 与皱波角叉菜内质网 *Hsp90* 蛋白氨基酸的羧基末端序列一致为 HDEL(图 2),这与内质网 *Hsp90* 亚家族的羧基末端保守序列 KDEL 类似,存在一个 K-H 的氨基酸保守替换,说明 *PhHsp90-1* 蛋白可能定位于内质网中; *PhHsp90-2* 与条斑紫菜细胞质 *Hsp90* 蛋白氨基酸的羧基末端序列一致为 MEDVD(图 2),这与细胞质 *Hsp90* 的羧基末端保守序列 MEEVD 类似,存在一个 E-D 的氨基酸保守替换,说明 *PhHsp90-2* 蛋白可能定位于细胞质中。但通过 PrediSi 软件,在两条 *PhHsp90* 蛋白的氨基酸序列中均没有找到信号肽序列。

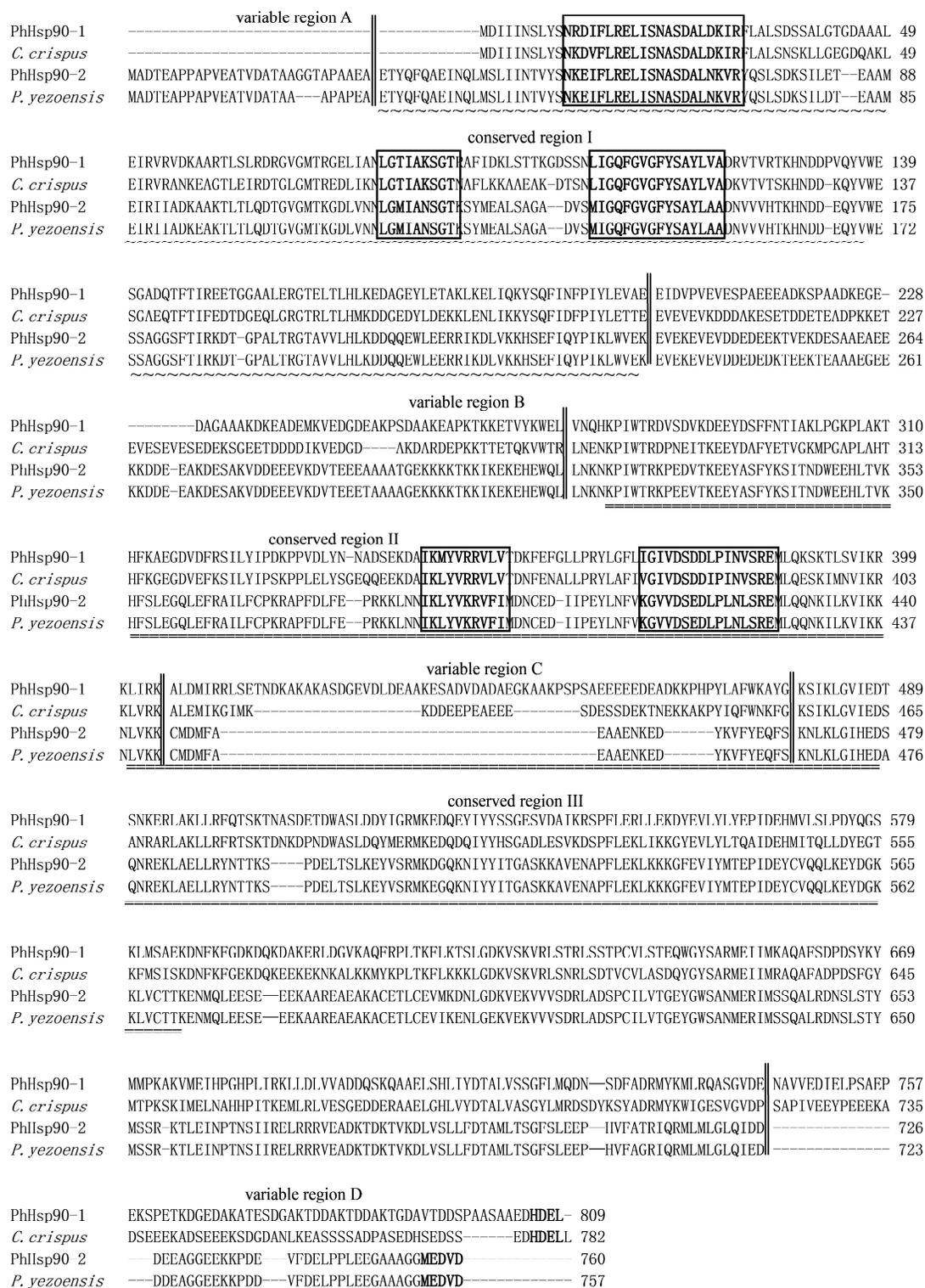


图2 Hsp90 蛋白氨基酸序列的多重序列比对

“|”分隔保守区和可变区,“方框”表示 Hsp90 蛋白家族的特征序列,“~”表示组氨酸蛋白激酶类 ATPase 结构域,“=”表示类核糖体蛋白 S5 结构域,羧基末端保守“HDEL”和“MEDVD”加粗字体表示

Fig. 2 Multi-alignment of amino acid sequence of Hsp90

The variable regions and conserved regions were spaced by “|”. The putative ATP-binding domain is underlined with “~”. The putative ribosomal protein S5 domain is underlined with “=”. The five conserved signature motifs of Hsp90 are boxed. The conserved amino acid motif, HDEL for the endoplasmic reticulum targeting sequence, is marked as bold in PhHsp90-1. The conserved amino acid motif, MEDVD for the cytoplasmic group, is marked as bold in PhHsp90-2

2.3 PhHsp90 蛋白的系统进化分析

为进一步分析 PhHsp90 蛋白的系统进化关系及亚细胞定位,根据 GenBank 数据库中公布的已知亚细胞定位的藻类、陆生植物和动物的 30 条 Hsp90 蛋白的氨基酸序列和两条 PhHsp90 蛋白序列,通过 MEGA 5.0 程序采用 Neighbor-Joining 法构建了 Hsp90 蛋白的系统进化树(图 3)。Hsp90 蛋白的系统进化树首先按不同的亚细胞定位分为 4 个分支,分别为细胞质 Hsp90、内质网 Hsp90、叶

绿体 Hsp90 和线粒体 Hsp90(图 3)。其中 PhHsp90-1 与内质网 Hsp90 聚类为一个分支,而 PhHsp90-2 与细胞质 Hsp90 聚类为一个分支,这与序列分析中的亚细胞定位的预测结果一致,由此可以确定 PhHsp90-1 蛋白定位于内质网中,PhHsp90-2 蛋白则定位于细胞质中。在系统关系进化上,两条 PhHsp90 蛋白均与同属红藻门的其他物种亲缘关系最近,与其他藻类的亲缘关系次之,最后才与陆生植物和动物聚类在一起。

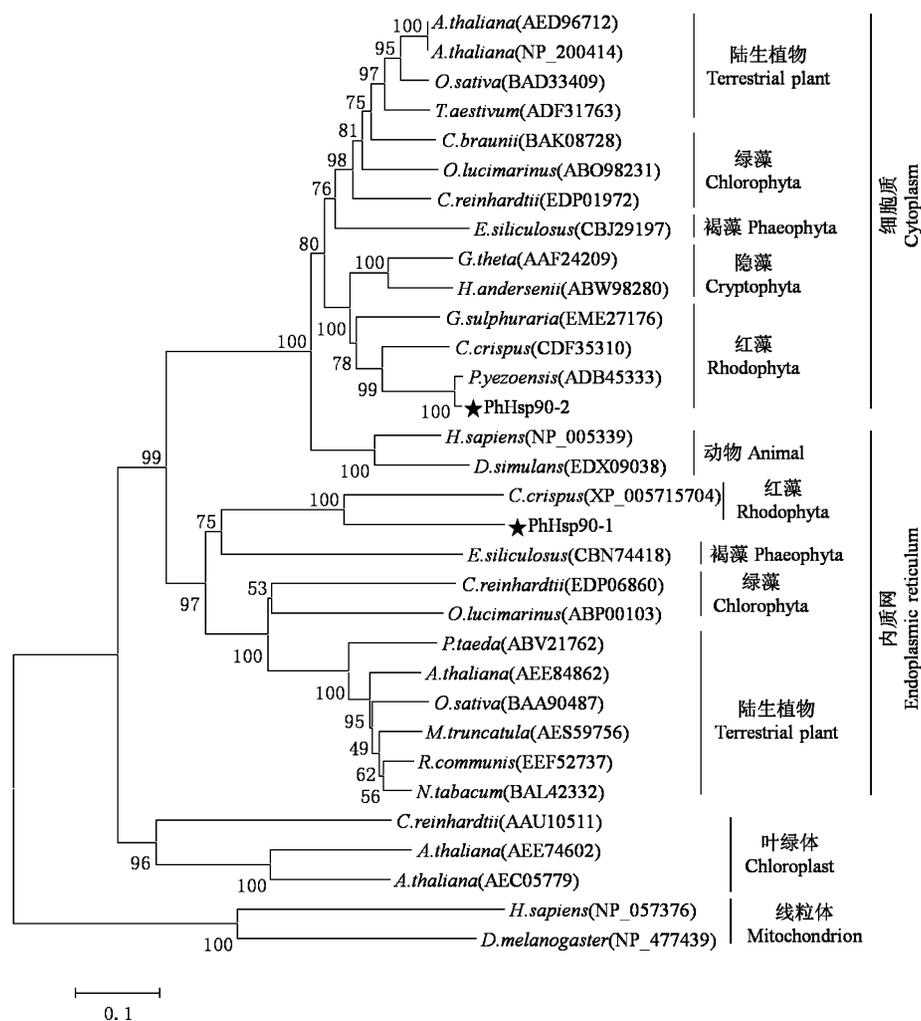


图 3 基于氨基酸序列构建的 Hsp90 的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed with Hsp90 amino acid sequences

2.4 PhHsp90 基因表达水平的 qPCR 分析

基因相对表达水平的定量分析有助于了解相关基因在特定条件下的功能。本研究 qPCR 分析结果显示,高温和失水胁迫对 PhHsp90 基因的相对表达水平均有显著影响(图 4)。在 29 °C 高温胁迫不同时间水平下,PhHsp90-1 和 PhHsp90-2

基因的表达水平均呈现为先上调后下调的趋势,但表达水平最高的时间点并不一致(图 4-a, b)。PhHsp90-1 在高温胁迫 3 h 时,即可检测到表达水平极显著上调至最高水平($P < 0.01$),为高温胁迫前表达水平的 15.7 倍,随后开始下调,至 12 h 时,表达水平即与高温胁迫前没有显著差异($P >$

0.05),在高温胁迫6 h至48 h之间,表达水平没有显著差异($P > 0.05$)(图4-a);而 *PhHsp90-2* 在高温胁迫3h时,也可检测到表达水平显著上调($P < 0.05$),至高温胁迫6 h时,表达水平最高,为高温胁迫前表达水平的8.3倍,随后开始逐渐回落,至48 h时,表达水平与高温胁迫前没有显著差异($P > 0.05$),在高温胁迫12 h至48 h之间,表达水平没有显著差异($P > 0.05$)(图4-b),说明两个基因在坛紫菜叶状体的高温胁迫应答中均发挥着重要的作用。

在不同失水胁迫条件下, *PhHsp90-1* 和

PhHsp90-2 的表达水平变化趋势表现一致,在失水率小于60%条件下,两个基因的表达水平均没有发生显著变化($P > 0.05$),但当失水率 $> 60\%$ 时,两个基因的表达水平均发生了显著上调($P < 0.05$),且在失水率达到90%后,将藻体重新浸泡于新鲜海水中培养30 min,两个基因的表达水平仍然表现为上调,但与失水率为90%时的表达水平相比,没有显著差异($P > 0.05$)(图4-c,d)。说明两个基因在轻度失水胁迫($< 60\%$)下,均没有发生明显作用,但参与了高度失水胁迫($> 60\%$)的应答响应过程。

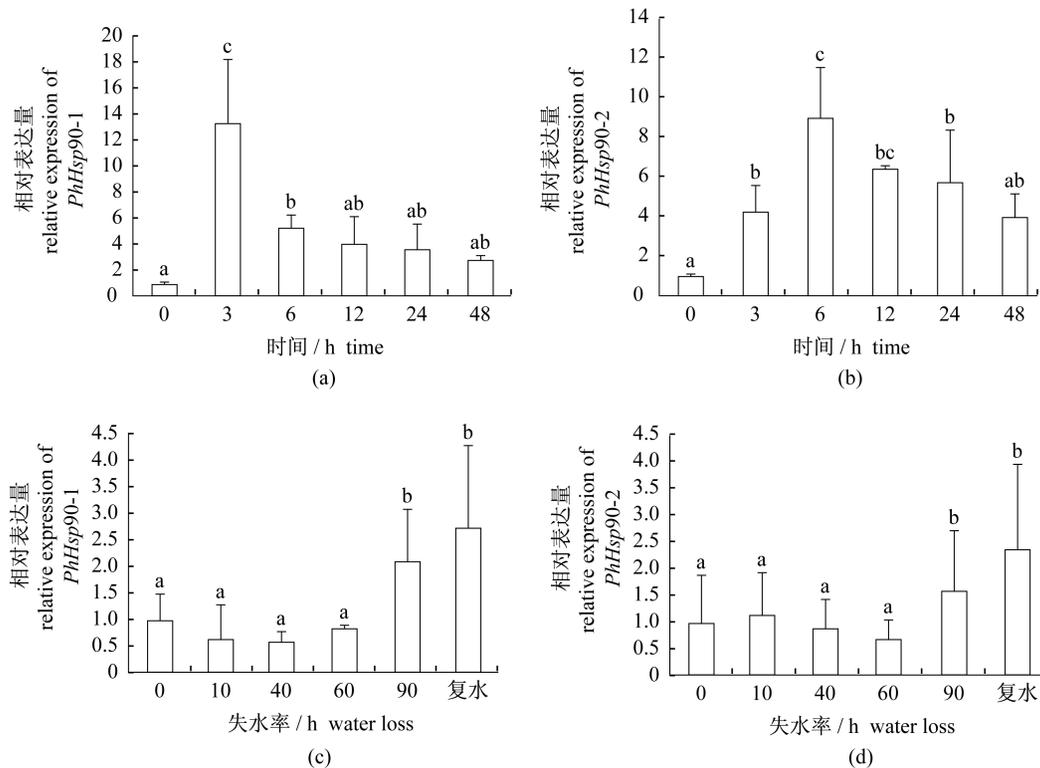


图4 不同胁迫条件下 *PhHsp90* 的相对表达水平

(a),(b). 高温胁迫;(c),(d). 失水胁迫。不具有相同字母上标的数据间差异显著($P < 0.05$)

Fig. 4 The relative expression levels of *PhHsp90* genes at different levels of stress

(a),(b). The relative expression levels of *PhHsp90* genes in different time of high temperature stress. (c),(d). The relative expression levels of *PhHsp90* genes in different level of desiccation and in rehydration for 30 min. Bar of each column with different small letters mean significant difference ($P < 0.05$)

3 讨论

植物为适应不断变化的环境条件,在长期演化过程中形成了应答各种生物或非生物逆境胁迫的复杂机制,而 Hsp 的表达和积累是其中关键的一环^[1]。作为 Hsp 家族重要成员的 Hsp90,已有的大量研究结果表明,其广泛参与了各类生物及非生物

的胁迫响应过程,在稳定和激活各种关键信号蛋白方面发挥着重要作用^[4]。目前已从各种陆生植物和藻类中分离得到了 Hsp90 的全长基因,并对其在逆境胁迫条件下的表达和功能进行了研究^[5-17]。本研究以转录组测序获得的 unigene 序列为基础,通过 RACE 扩增获得了坛紫菜两条 *Hsp90* 基因的全长 cDNAs 序列,并通过序列保守性和系统进化

树分析确认两条坛紫菜 *Hsp90* 基因分别属于内质网 *Hsp90* 亚家族 (*PhHsp90-1*) 和细胞质 *Hsp90* 亚家族 (*PhHsp90-2*)。

3.1 *PhHsp90* 蛋白氨基酸序列的保守性分析

Hsp90 是一类在所有真核生物中都高度保守的胁迫蛋白,通常每个单体的氨基酸序列都可分为 3 个主要的保守结构域^[27],同时具有 5 条特征性的标记序列^[28]: NKEIFLRELISNSSDALDKIR、LGTIARSGT、MIGQFGVGFYSAYLVA、IKLYVRRVFI 和 GIVDSEDLPLNISRE。本研究获得的两条基因所编码氨基酸序列中同样都可分为 3 个主要的结构域,即由可变区 A 和保守区 I 构成的参与 ATP 结合和水解的 N 端 ATPase 结构域,保守区 II 构成的参与结合 ATP 底物和辅陪伴分子的中间结构域,以及由保守区 III 和可变区 D 构成的参与多聚化过程的 C 端结构域;同时保守区 I 和保守区 II 也包含有 5 条特征性的标记序列;并且两个蛋白的羧基末端序列分别为内质网和细胞质的定位信号序列 HDEL 和 MEDVD (图 2)。尽管 *PhHsp90* 的特征性标记序列和定位信号序列与高等植物和动物的相应序列存在着个别氨基酸残基的差异,但这些序列与其他大型藻类相同亚家族的 *Hsp90* 相应序列完全一致,这可能与大型藻类在进化上的特殊起源有关^[29]。

一般认为,来自于不同物种相同亚家族的 *Hsp90* 序列间的同源性要高于同一物种不同亚家族 *Hsp90* 序列间的同源性^[28]。在本研究中同样存在这一现象,坛紫菜 *PhHsp90-1* 和 *PhHsp90-1* 的氨基酸序列同源性只有 42%,但 *PhHsp90-1* 与皱波角叉菜 *Hsp90* 氨基酸序列同源性为 58%,*PhHsp90-2* 与条斑紫菜 *Hsp90* 氨基酸序列同源性为 97%;系统进化树分析结果同样表明,不论动物还是植物,所有的 *Hsp90* 均首先按照亚细胞定位的不同分别聚类为一支 (图 3)。

3.2 *PhHsp90* 基因应答高温和失水胁迫的表达水平分析

紫菜作为分布于潮间带中高潮区的一类大型海藻,每天伴随着潮汐变化,周期性地干出与覆水,在干出时面临盐度、失水、强光照和紫外线等多种非生物条件的剧烈变化。为适应这一独特的生态条件,紫菜体内形成了一个庞大且复杂的调节系统,包括了无数的调节和反馈机制,涉及大量基因的差异表达与调控^[18]。王孟强^[30]利用基因

芯片技术研究了条斑紫菜在不同失水水平下的基因表达谱变化,结果发现在条斑紫菜配子体的失水过程中,大约有 8.74%~11.09% 的基因上调,而下调表达基因的数量则在各个阶段变化较大。坛紫菜藻体的自然生长期在每年的 9 月至次年的 2 月,生长的适宜温度为 16~24℃。随着全球气候变暖,养殖季节海区的持续高温也对坛紫菜藻体的正常生长造成了威胁,近年来已多次发生高温引起的烂苗或烂菜事件。因此,分析 *Hsp90* 在高温和失水胁迫条件下的表达水平变化对于解析 *Hsp90* 在应答逆境胁迫中的功能就具有十分重要的意义。

本研究结果表明,高温和失水胁迫对 *PhHsp90* 基因的表达水平均有显著影响,但在表达模式上存在明显差异。高温胁迫不同时间水平下,两条 *PhHsp90* 基因的表达水平均表现为先升高后下降的趋势 (图 4-a, b),说明 *PhHsp90* 基因的表达可能存在一个反馈调节机制:高温胁迫初期,由于受到不适温度的影响,各功能蛋白活性受到抑制,蛋白解聚增加,这一生理状态刺激了 *PhHsp90* 表达水平的上调,参与信号蛋白分子的激活和解聚蛋白的再折叠,从而稳定了各功能蛋白和膜结构,维持了细胞稳态,解聚蛋白含量下降,*PhHsp90* 的表达水平也随之下降。周向红等^[16]等的研究结果也表明,高温胁迫条件会引起条斑紫菜 *Hsp90* 基因表达水平的显著上升。由此说明,两个 *PhHsp90* 基因在坛紫菜藻体的高温胁迫应答中均发挥着重要的作用。但两条 *PhHsp90* 基因在应答失水胁迫时的表达模式却与高温胁迫条件下的不同:失水率小于 60% 时,两个基因的表达水平均没有发生显著变化,但当失水率大于 60% 时,两个基因的表达水平开始显著上调 (图 4-c, d)。由此说明 *PhHsp90* 基因在应答轻度失水时没有发挥明显作用,但在应答高度失水的过程中发挥着显著作用。出现这一现象的可能原因是,轻度失水已经成为坛紫菜日常生长所必须面对的常态化事件,坛紫菜细胞形成了另外一套更为经济的系统来维护轻度失水条件下的蛋白构象和细胞稳态,细胞中无法积累足够的解聚蛋白来刺激 *PhHsp90* 的表达和合成。如 Liu^[31] 在条斑紫菜中的研究结果就表明,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。但在高度失水条件下,已有的保护系统已不足以维持功能蛋白的构象,解聚蛋白增加,从而引起了*PhHsp90*基因的上调表达。

参考文献:

- [1] Al-Whaibi M H. Plant heat-shock proteins; A mini review[J]. Journal of King Saud University Science, 2011,23(2):139-150.
- [2] Gupta S C, Sharma A, Mishra M, et al. Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? [J]. Life Sciences, 2010,86(11):377-384.
- [3] Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, et al. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response [J]. Trends in Plant Science, 2004,9(5):244-252.
- [4] Zhao R, Houry W A. Hsp90: a chaperone for protein folding and gene regulation [J]. Biochemistry and Cell Biology, 2005,83(6):703-710.
- [5] Krishna P, Gloor G. The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana* [J]. Cell Stress & Chaperones, 2001,6(3):238.
- [6] Marrs K A, Casey E S, Capitani S A, et al. Characterization of two maize HSP90 heat shock protein genes: expression during heat shock, embryogenesis, and pollen development [J]. The Journal of Genetics and Development, 1993,14(1):27-41.
- [7] Liu L L, Liu S S, Weng J F, et al. Cloning and expression analysis of heat shock protein gene *zmhsp90-1* in maize [J]. Acta Agronomica Sinica, 2012,38(10):1839-1846. [刘玲玲,柳思思,翁建峰,等.玉米热激蛋白基因 *ZmHsp90-1* 的克隆及表达分析.作物学报,2012,38(10):1839-1846.]
- [8] Liu D L, Zhang X X, Cheng Y X, et al. Cloning and characterization of the *rHsp90* gene in Rice (*Oryza sativa*. L) under environmental stress [J]. Molecular Plant Breeding, 2006,4(3):317-322. [刘大丽,张欣欣,程玉祥,等.逆境下水稻 (*Oryza sativa* L.) *rHsp90* 基因的克隆及功能分析.分子植物育种,2006,4(3):317-322.]
- [9] Wang G F, Wei X, Fan R, et al. Molecular analysis of common wheat genes encoding three types of cytosolic heat shock protein 90 (Hsp90): functional involvement of cytosolic Hsp90s in the control of wheat seedling growth and disease resistance [J]. New Phytologist, 2011,191(2):418-431.
- [10] Ren Y, Han Y Y, Li T, et al. Molecular cloning and expression analysis of heat-shock-protein90 (*lshsp90*) gene from leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) under heat shock [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(16):3514-3522. [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.中国农业科学,2013,46(16):3514-3522.]
- [11] Ping J J, Zhang Z, Cai Z F, et al. Functional roles of heat shock proteins 90-3 (Hsp90-3) in senescence of *Senecio scandens* Buch.-Ham. ex D. Don based on its bioinformatics [J]. Plant Science Journal, 2012, 30(4):385-393. [平军娇,张珍,蔡振锋,等.千里光热激蛋白90-3 (Hsp90-3) 的生物信息学与功能分析.植物科学学报,2012,30(4):385-393.]
- [12] Lin S, Pan D R, Zhou Y F, et al. Electronic cloning and sequencing of *hsp90* gene from chewing cane (*Saccharum officinarum* L.) [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2009,30(12):1824-1830. [林生,潘大仁,周以飞,等.果蔗 *Hsp90* 基因的电子克隆及序列分析.热带作物学报,2009,30(12):1824-1830.]
- [13] Zhang W B, Wu C L, Mai K S, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of heat shock protein 90 from Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* Ino in response to dietary selenium [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(1):280-286.
- [14] Fu D K, Chen J H, Zhang Y, et al. Cloning and expression of a heat shock protein (HSP) 90 gene in the haemocytes of *Crassostrea hongkongensis* under osmotic stress and bacterial challenge [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011,31(1):118-125.
- [15] Li J T, Han J Y, Chen P, et al. Cloning of a heat shock protein 90 (HSP90) gene and expression analysis in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 32(6):1191-1197.
- [16] Zhou X H, Li X S, Wang P, et al. Molecular cloning and expression analysis of HSP90 gene from *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(12):1844-1852. [周向红,李信书,王萍,等.条斑紫菜 *HSP90* 基因的克隆与表达分析.水产学报,2010,34(12):1844-1852.]
- [17] Park H S, Jeong W J, Kim E, et al. Heat shock protein gene family of the *Porphyra seriata* and enhancement of heat stress tolerance by PsHSP70 in

- Chlamydomonas* [J]. *Marine biotechnology*, 2012, 14 (3): 332 – 342.
- [18] Blouin N A, Brodie J A, Grossman A C, *et al.* *Porphyra*: a marine crop shaped by stress [J]. *Trends in Plant Science*, 2011, 16(1): 29 – 37.
- [19] Wang T, Xu Y, Xie C T, *et al.* Construction of multiplex PCR in variety identification of *Porphyra haitanensis* “Z-26” based on SCAR markers [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(5): 688 – 695. [王婷, 徐燕, 谢潮添, 等. 基于 SCAR 标记的坛紫菜闽丰 1 号多重 PCR 鉴定技术的建立. *水产学报*, 2013, 37(5): 688 – 695.]
- [20] Chen C S, Ji D H, Xie C T, *et al.* Preliminary study on selecting the high temperature resistance strains and economic traits of *Porphyra haitanensis* [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2008, 30(5): 100 – 105. [陈昌生, 纪德华, 谢潮添, 等. 坛紫菜耐高温品系选育及经济性状的初步研究. *海洋学报*, 2008, 30(5): 100 – 105.]
- [21] Zhang Y, Xie C T, Chen C S, *et al.* Physiological responses of gametophytic blades of *Porphyra haitanensis* to rising temperature stresses [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(3): 379 – 386. [张元, 谢潮添, 陈昌生, 等. 高温胁迫下坛紫菜叶状体的生理响应. *水产学报*, 2011, 35(3): 379 – 386.]
- [22] Li B, Xu Y, Ji D H, *et al.* Effects of high temperature and non-aeration stress on the quality of *Porphyra haitanensis* [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(3): 104 – 110. [李兵, 徐燕, 纪德华, 等. 高温静水胁迫培养对坛紫菜品质的影响. *渔业科学进展*, 2013, 34(3): 104 – 110.]
- [23] Zhang B L, Yan X H, Huang L B. Evaluation of an improved strain of *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) with high-temperature tolerance [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2011, 23(5): 841 – 847.
- [24] Xie C T, Li B, Xu Y, *et al.* Characterization of the global transcriptome for *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) and development of cSSR markers [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 107.
- [25] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876 – 4882.
- [26] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731 – 2739.
- [27] 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(1): 156.
- [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]. *Molecular Biology and Evolution*, 1995, 12(6): 1063 – 1073.
- [29] Stiller J W, Hall B D. The origin of red algae: implications for plastid evolution [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94(9): 4520 – 4525.
- [30] Wang M Q. Analysis of the ESTs and Anti-desiccation Genes of *Porphyra yezoensis* Ueda [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2007. [王孟强. 条斑紫菜功能基因组特性与抗逆相关基因表达分析. 青岛: 中国海洋大学, 2007.]
- [31] Liu Y. Mechanism for differential desiccation tolerance in *Porphyra* species [D]. Boston: Northeastern University, 2009.

Cloning and expression pattern analysis of two heat shock protein(*Hsp90*) genes from *Pyropia haitanensis*

DAI Zhenzhen, LI Bing, XU Yan, JI Dehua, CHEN Changsheng, XIE Chaotian*

(College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Heat shock protein(*Hsp90*), representing an important molecular chaperone in eukaryotic cells, plays particularly important roles in a variety of stress responses, development and signal transduction of plants. In this study, based on unigene sequences which were obtained from whole transcriptome sequencing of *P. haitanensis*, two full-length *PhHsp90* genes were obtained by rapid amplification of cDNA ends (RACE), and named *PhHsp90-1* and *PhHsp90-2*. The full-length cDNA of the *PhHsp90-1* gene comprised 2 572 nucleotides and contained an open reading frame of 2 427 bp (GenBank accession: KF732652), encoding a protein of 809 amino acid residues with the predicted molecular weight of 90.2 kDa and theoretical isoelectric point of 4.79; and the full-length cDNA of the *PhHsp90-2* gene comprised 2 510 nucleotides and contained an open reading frame of 2280bp (GenBank accession: KF732651), encoding a protein of 760 amino acid residues with the predicted molecular weight of 86.2 kDa and theoretical isoelectric point of 4.81. On the basis of conserved motifs and phylogenetic tree analysis, *PhHsp90-1* belongs to the endoplasmic reticulum subfamily of *Hsp90* and *PhHsp90-2* belongs to the cytoplasmic subfamily of *Hsp90*. The expressions of the two *PhHsp90* genes, as measured by real-time quantitative PCR, were significantly induced by high-temperature stress and desiccation stress, but had different expression patterns. Under high-temperature stress, the expression levels of the two *PhHsp90* genes all significantly increased first and then decreased. However, during desiccation, the expression levels of *PhHsp90-1* and *PhHsp90-2* were significantly increased only when the water loss was >60%. These results suggested that the two *PhHsp90*s play important roles in the response to high-temperature stress and extreme desiccation stress.

Key words: *Pyropia haitanensis*; heat shock protein 90; RACE; real-time quantitative PCR

Corresponding author: XIE Chaotian. E-mail: ctxie@jmu.edu.cn