

## 坛紫菜两种小分子热激蛋白(sHSP)基因的 克隆及表达特征分析

陈玉婷, 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:** 小分子热激蛋白(sHSP)不仅在应激条件下高效表达,还在正常状态的细胞中广泛存在,参与一些重要细胞生理活动的调节。为研究坛紫菜应答高温和失水等逆境胁迫的分子机制,本研究以坛紫菜转录组测序获得的 unigene 序列为基础,采用 RACE 或直接 PCR 扩增,克隆获得了坛紫菜 2 种 sHSP 的全长基因:*PhHsp22* 和 *PhDnaJ*。序列分析结果表明,*PhHsp22* 序列全长 857 bp,包含一个 519 bp 的开放阅读框,所编码的多肽包含 172 个氨基酸,分子量为 19.1 ku,等电点为 5.24(收录号:KM102540);*PhDnaJ* 序列全长 1 616 bp,包含一个 1 290 bp 的开放阅读框,所编码的多肽包含 429 个氨基酸,分子量为 46.1 ku,等电点为 6.43,属于 Hsp40 亚家族(收录号:KM102541)。基因表达水平的定量分析结果表明,两个基因在高温胁迫不同时间水平和不同失水胁迫程度下的表达均呈现出一致的表达模式,即在胁迫初期表达水平显著上调,但随着胁迫的持续,这两个基因的表达水平开始逐渐下调。结果表明,这 2 个基因在逆境胁迫下的表达可能存在一个反馈调节机制。

**关键词:** 坛紫菜; 小分子热激蛋白; RACE; 荧光定量 PCR

**中图分类号:** Q 785; S 917.3

**文献标志码:** A

热激蛋白(heat shock proteins, HSP)是一类广泛分布于各类生物细胞内且高度保守的蛋白分子,主要行使分子伴侣、应激防御和稳定细胞结构等功能,不仅受环境胁迫的诱导,也参与细胞各项正常生理活动<sup>[1]</sup>。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 (sHSP)<sup>[2]</sup>。

植物中的 sHSP 均由核基因编码,是一组分子量为 12~43 ku,且含有保守结构域的蛋白质,它在生物体内广泛分布,是保守性最差的一类热激蛋白分子家族,与植物中其他家族的热激蛋白相比, sHSP 在结构和功能上都具有多样性<sup>[3-4]</sup>。sHSP 不仅可在应激条件下高效表达,增强细胞对逆境的耐受能力和恢复能力,充当分子伴侣还在正常细胞中广泛存在,参与一些重要的细胞生理

活动,包括维持细胞结构的稳定、参与细胞信号传导和发育调控等<sup>[4]</sup>。目前,已从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Dryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)<sup>[5]</sup>、莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)<sup>[6]</sup>和列紫菜(*Porphyra seriata*)<sup>[7]</sup>等植物中克隆获得了多个 sHSP 基因。但总体而言, sHSP 仍是目前研究相对较少的一类热激蛋白质分子。

坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)是分布于潮间带中高潮区的一类大型红藻,每天伴随着潮汐的涨落,需要经历反复的失水和复水过程,大潮时干露在空气中的时间长达 4 h 以上。在干出失水时,坛紫菜藻体需面对盐度、失水、强光照和紫外辐射等多种非生物胁迫的影响,因此其必须具备极强的逆境耐受性<sup>[8-9]</sup>。同时,随着全球气候变暖问题的日趋严重,近年来频繁出现的秋季高温

收稿日期:2014-08-07 修回日期:2014-11-15

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(41176151,41276177);福建省种业创新与产业化工程(2014S1477-10)

通信作者:谢潮添, E-mail:ctxie@jmu.edu.cn

回暖严重影响了坛紫菜栽培的开展,水温过高导致坛紫菜幼苗或成菜发生病烂,严重减产<sup>[10-12]</sup>。坛紫菜在逆境胁迫条件下基因<sup>[13-14]</sup>和蛋白<sup>[12,15]</sup>表达谱的分析结果均表明坛紫菜对失水和高温胁迫的抗性与 *sHSP* 的上调表达密切相关,因此为研究坛紫菜对失水和高温胁迫的应答机制,分离和克隆胁迫应答相关基因,并分析其在逆境胁迫下的表达水平变化是研究的重要环节。本研究是在坛紫菜转录组学研究<sup>[16]</sup>的基础上,对坛紫菜两条 *sHSP* 基因(*PhHsp22* 和 *PhDnaJ*)进行全长克隆,并通过实时荧光定量 PCR 技术(qPCR)测定基因在高温和失水胁迫下的表达水平变化,分析其在坛紫菜胁迫应答中的作用,以为坛紫菜逆境胁迫响应机制的研究提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 坛紫菜样品及胁迫处理

实验材料为人工杂交选育获得的坛紫菜耐高温型品系 Z-61<sup>[17]</sup>,取自福建省坛紫菜种质资源库。将坛紫菜 Z-61 叶状体在适宜温度下培养,培养 Z-61 叶状体的条件为:温度 21 °C,光照强度 50 ~ 60  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,光照周期 12L:12D,(隔 2 天更换 1 次过滤新鲜海水)。待叶状体生长至 (15 ± 2) cm 时,选取叶面平滑、色深有光泽、无斑点烂洞且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(光照强度 50 ~ 60  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,光照周期 12L:12D)3 h 后作为实验组,提取总 RNA,并反转录成 cDNA 后用于 *PhsHsp22* 和 *PhDnaJ* 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 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 5 060  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  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%、15%、30%、45%、60%、75% 和 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。失水率计算公式为: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、全长验证,阳性克隆筛选以及基因表达水平 qPCR 分析所采用的引物序列(表 1),由生工生物工程有限公司合成。

表 1 实验所用引物的名称和序列  
Tab. 1 Names and sequences of primers in this experiment

用途 usage	基因 gene	引物名称 primer name	引物序列(5'-3') sequences
全长扩增 RACE	<i>PhHsp22</i>	R225'	CGCCTTGATAGCCTCCACAT
		R223'	TTCCAGTCCTACCGCCTTCC
		H22F	ACATGGGGCACTTACCCATCCACA
		H22R	TGCCACAAAGCATTTCGAGAGTATCG
全长验证 head to toe	<i>PhDnaJ</i>	H40F	TTGGTTTTGGTCTGGTGGCA
		H40R	GCGGAATGAAGACAGCAACA
		Q22F	TTCCAGTCCTACCGCCTTCC
		Q22R	TCGCAATCGTCCGCTTCTCC
定量分析 qPCR	<i>PhHsp22</i>	Q40F	GATCCACCACATGCAGATTG
		Q40R	TGTGCACCTCCAGTACCTTG
	<i>PhDnaJ</i>	UBCF	TCACAACGAGGATTTACCACC
		UBCR	GAGGAGCACCTTGAAACG
内参 internal control	<i>PhUBC</i>	RV-M	GAGCGGATAACAATTTACACAGG
		M13-20	CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT
阳性克隆筛选 validate of positive clone			

### 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 OD<sub>260</sub> 和 OD<sub>280</sub> 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 *PhHsp22* 基因的全长克隆及验证

根据坛紫菜转录组 (NCBI BioProject ID: GADD00000000) unigene 的注释结果<sup>[16]</sup>, 筛选出一条注释结果为莱茵衣藻 Hsp22E 的 unigene (CL559. Contig1) 序列作为 *PhHsp22* 全长克隆的核心序列。根据核心序列, 分别设计 *PhHsp22* 的 5' 和 3'-RACE 扩增的特异性扩增引物 (表 1), 按照 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒 (Clontech, 美国) 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 $\alpha$  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。并根据测序获得的基因 5' 和 3' 片段序列重叠区, 采用 DNAMAN 5. 2. 2 (Lynnon BioSoft) 软件进行拼接, 获得 *PhHsp22* 的全长序列。根据拼接获得的全长序列, 设计全长验证引物 (表 1), 通过反转录获得的 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。

### 1.5 *PhDnaJ* 基因的全长克隆及验证

根据坛紫菜转录组 unigene 的注释结果, 筛选出一条注释结果为条斑紫菜 (*P. yezoensis*) DnaJ (HSP40) 的 unigene (Unigene3238), 经序列比对分析发现该 unigene 序列包含一个完整的编码区, 由此以该序列为基础, 设计全长验证引物, 通过反转录获得的 cDNA 为模板, 进行普通 PCR 扩增, 将扩增产物进行切胶回收、转化和测序, 并将测序结果与 Unigene3238 序列进行比对, 以确定 *PhDnaJ* 的全长序列。

### 1.6 *PhsHsp* 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 Blast 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<sup>[18]</sup> 进行氨基酸多重序列比对, 并采用 MEGA 5. 10<sup>[19]</sup> 软件分别构建了 *PhHsp22* 和 *PhDnaJ* 蛋白的系统进化树。

### 1.7 *PhsHsp* 基因表达水平的 qPCR 分析

分别根据各基因序列设计 qPCR 正反向引物, 并以 *PhUBC* 基因作为内参 (表 1), 进行 *PhHsp22* 和 *PhDnaJ* 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<sup>®</sup> RT reagent kit (TaKaRa, 大连) 的说明书进行操作。25  $\mu$ L 的反应体系包含: 12. 5  $\mu$ L 2  $\times$  SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (TaKaRa), 0. 2  $\mu$ mol/L 引物和 2  $\mu$ 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, 绘制溶解曲线。荧光定量 PCR 扩增在 ABI7300 型定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国) 上进行。

以 10  $\times$  梯度稀释的 cDNA 为模板进行定量 PCR 扩增, 制作 *PhHsp22*、*PhDnaJ* 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 软件对试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,  $P < 0. 05$  表示存在差异显著,  $P < 0. 01$  表示存在极显著差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 *PhsHsp* 的全长克隆

以坛紫菜 CL559. Contig1 序列为核心, 通过 RACE 扩增和测序, 获得一条长度约为 500 bp 的 5'-末端序列 (图 1-a) 和一条约为 400 bp 的 3'-末端序列 (图 1-b), 根据两条末端序列的重叠区, 拼接获得了一条长度为 857 bp 的全长序列, 经过全长序列验证 (图 1-c) 和 Blast 比对, 确认该基因为坛紫菜的 *HSP22* 基因, 命名为 *PhHsp22*。该基因已提交至 GenBank 数据库中 (收录号: KM102540)。通过 ORF Finder 软件分析发现, 该基因序列 136 ~ 654 个碱基为完整的开放阅读框 (open reading frame, ORF), 可编码包含 172 个氨基酸, 分子量为 19. 1 ku, 等电点为

5.24 的蛋白质。Predictprotein 程序预测 *PhHsp22* 所编码蛋白的二级结构中构成片层和环状的氨基酸残

基分别占总氨基酸残基的比例为 31.40% 和 68.60% (图 2)。

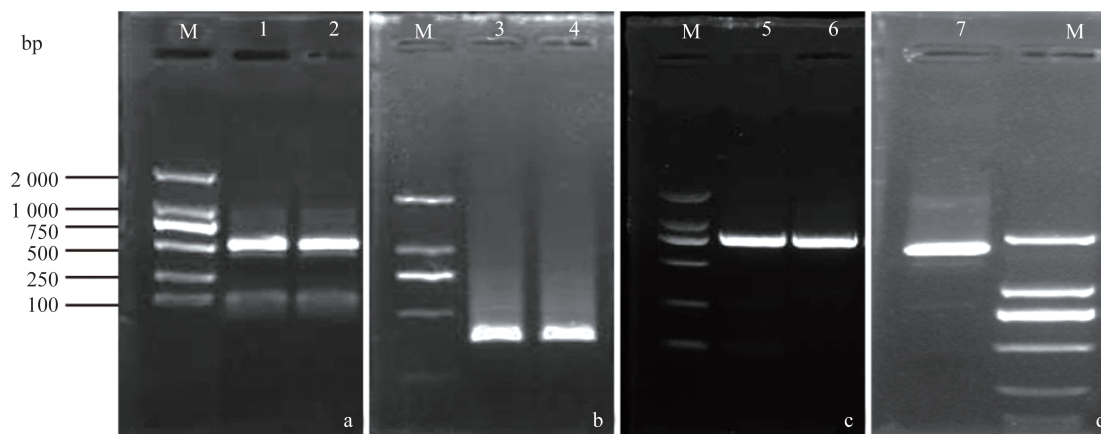


图 1 *PhHsp22* 扩增产物电泳图

(a) *PhHsp22* 的 5'-RACE 扩增产物, (b) *PhHsp22* 的 3'-RACE 扩增产物, (c) *PhHsp22* 的全长扩增产物, (d) *PhDnaJ* 的全长扩增产物。1 和 2, 3 和 4 以及 5 和 6 分别为实验重复

Fig. 1 Agarose electrophoresis of RACE or Head to toe products of *PhHsp22*

(a) 5'-RACE amplification products of *PhHsp22*, (b) 3'-RACE amplification products of *PhHsp22*, (c) Head to toe amplification products of *PhHsp22*, (d) Head to toe amplification products of *PhDnaJ*. 1 and 2, 3 and 4, 5 and 6 were biological replicates, respectively

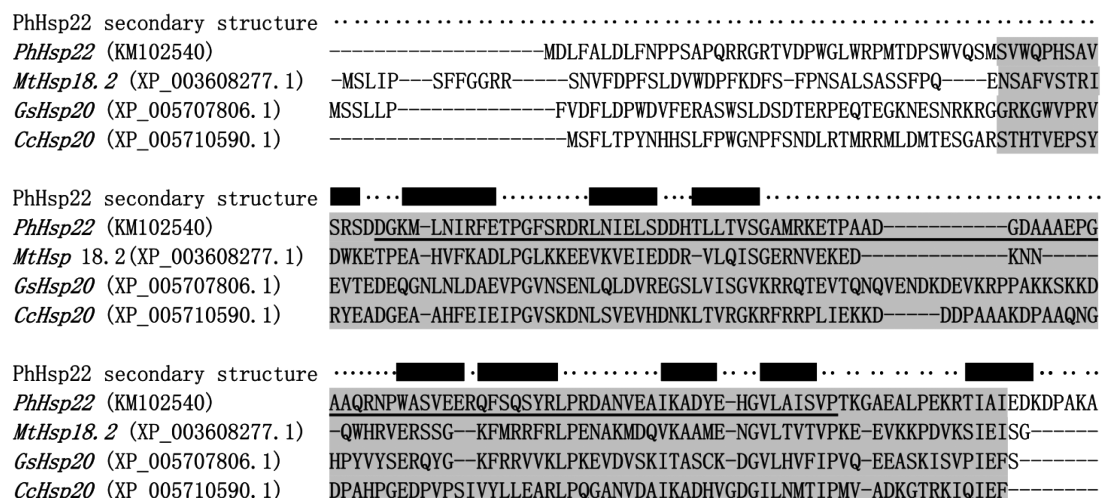


图 2 *PhHsp22* 蛋白氨基酸序列的多重序列比对

灰色阴影部分为 *PhHsp22* 蛋白的保守区, 下划线部分则为 *PhHsp22* 蛋白的  $\alpha$ -晶体结构域, *PhHsp22* 蛋白二级结构中的黑色带和小圆点分别表示片层和环状结构

Fig. 2 Multi-alignment of amino acid sequence of *PhHsp22*

The gray sections show the conserved regions of *PhHsp22*, and the  $\alpha$ -crystallin domain is underlined. The ribbons and dots in the secondary structure of *PhHsp22* denote strands and coils, respectively

以转录组 Unigene3238 序列为基础, 在基因序列两端设计特异性引物扩增得到了一条长度约为 1 600 bp 的基因片段 (图 1-d), 经克隆、转化和测序后比较发现其与转录组拼接获得的 Unigene3238 序列完全一致, 并经 Blast 比对, 确认该基因为坛紫菜的 *DnaJ* 基因, 命名为 *PhDnaJ*。该基因已提交到 GenBank 数据库中 (收录号: KM102541)。该基因序

列全长 1 616 bp, 通过 ORF Finder 软件分析发现, 该基因序列 263 ~ 1 552 个碱基为完整的 ORF, 可编码包含 429 个氨基酸, 分子量为 46.1 ku, 等电点为 6.43 的蛋白质。Predictprotein 程序预测 *PhDnaJ* 所编码蛋白的二级结构中构成螺旋、片层和环状的氨基酸残基分别占总氨基酸残基的比例为 11.19%、26.11% 和 62.70% (图 3)。

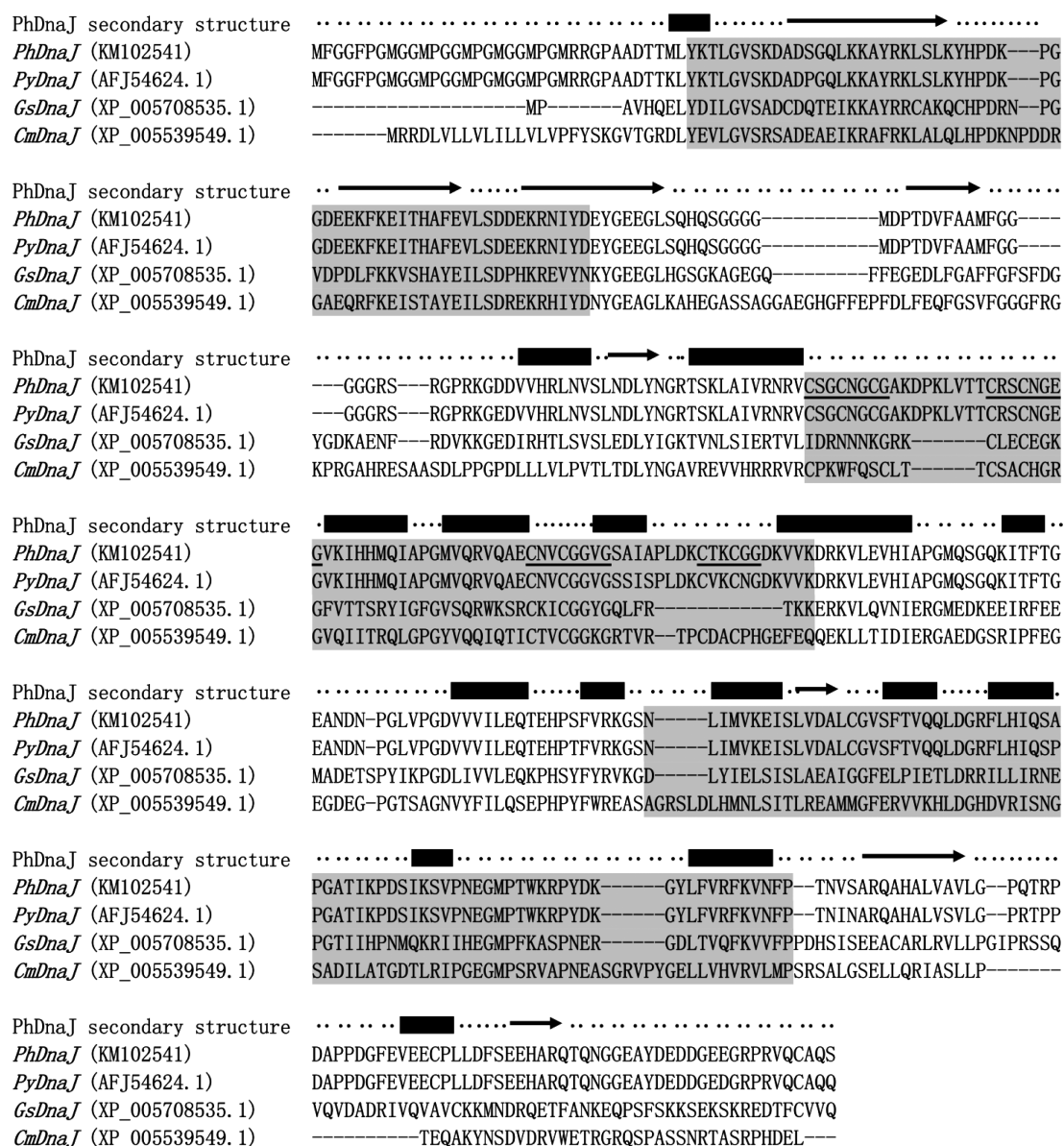


图3 PhDnaJ 蛋白氨基酸序列的多重序列比对

灰色阴影部分为 PhDnaJ 蛋白的 3 个保守的结构域,按顺序分别为 N 端的 DnaJ 结构域,中间的富含半胱氨酸结构域(CR)和 C 末端结构域(CTD),下划线部分为 CR 结构域的 4 个 CxxCxGxG 基序。PhDnaJ 蛋白二级结构中的箭头,黑色带和小圆点分别表示螺旋,片层和环状结构

Fig. 3 Multi-alignment of amino acid sequence of PhDnaJ

The gray sections show the three conserved domains of PhDnaJ, which was DnaJ domain of N terminal, CR domain and CTD domain, respectively, and the four repeats of CxxCxGxG motif of CR domain are underlined. The arrowheads, ribbons and dots in the secondary structure of PhDnaJ denote helices, strands and coils, respectively

## 2.2 PhsHsp22 的多序列比对及二级结构分析

PhHsp22 蛋白氨基酸序列的多重序列比对结果表明不同物种的 sHSP 氨基酸序列 N 端保守性交差,而 C 端则高度保守,包含一个 A-晶体结构域(A-crystallin domain, ACD),ACD 可分成 2 个区,这 2 个区可以形成 2 个反向平行的  $\beta$  折叠构

成  $\beta$ -三明治结构(图 2)。

PhDnaJ 蛋白氨基酸序列的多重序列比对结果表明其包含 3 个保守区,按顺序分别为 N 端的 DnaJ 结构域,中间的含有 4 个 CxxCxGxG 基序的富含半胱氨酸结构域(CR)和 C 末端结构域(C terminal domain,CTD)(图 3)。

### 2.3 PhsHsp 的系统进化分析

为进一步分析 PhHsp22 和 PhDnaJ 蛋白的系统进化关系,根据 GenBank 数据库中公布的已知藻类和陆生植物的相关蛋白的氨基酸序列,通过 MEGA 5.0 程序采用 Neighbor-Joining(NJ)法分别构建了 PhHsp22 和 PhDnaJ 蛋白的系统进化树(图 4,图 5)。分析结果显示,PhHsp22 的系统进化树分

为两支,其中 PhHsp22 和同属于红藻门的 *Galdieria sulphuraria* 的 sHSP 单独聚为一支,而属于蓝藻、褐藻和高等植物的 sHsp 聚成另外一支(图 4)。PhDnaJ 蛋白的系统进化树分为明显的两支,其中第一类和第二类 DnaJ 蛋白聚为一支,第三类 DnaJ 蛋白单独为一支,PhDnaJ 蛋白的系统进化关系介于第一类和第二类之间,偏向于第一类(图 5)。

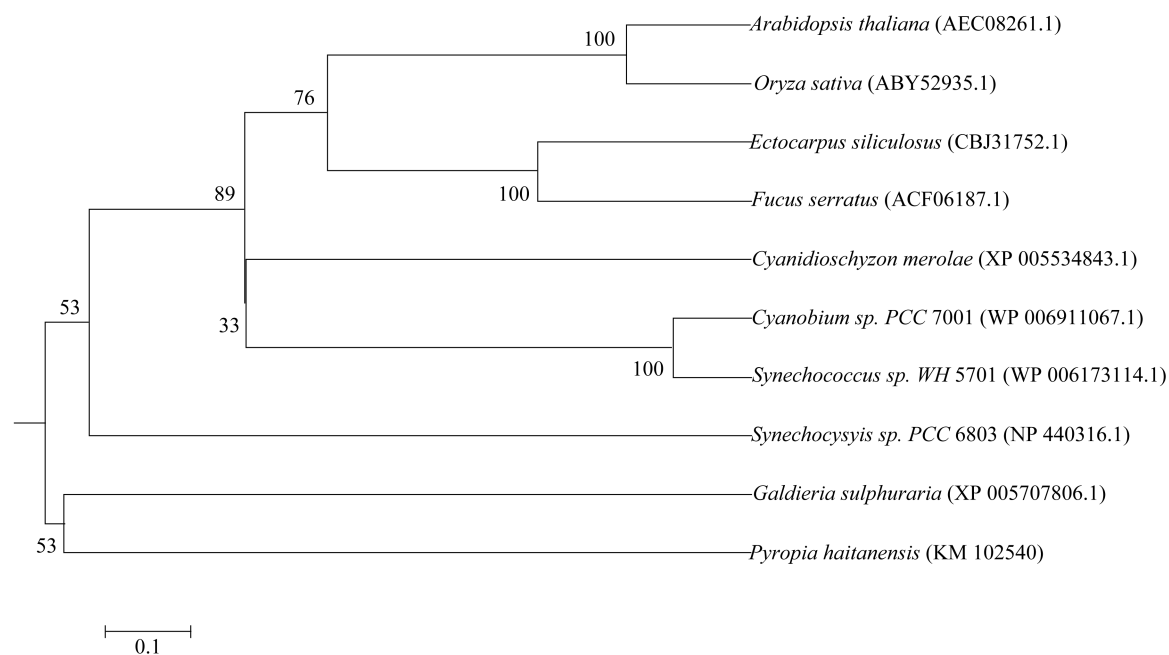


图 4 采用 NJ 法基于氨基酸序列构建的 PhHsp22 的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree constructed with PhHsp22 amino acid sequences by the NJ method

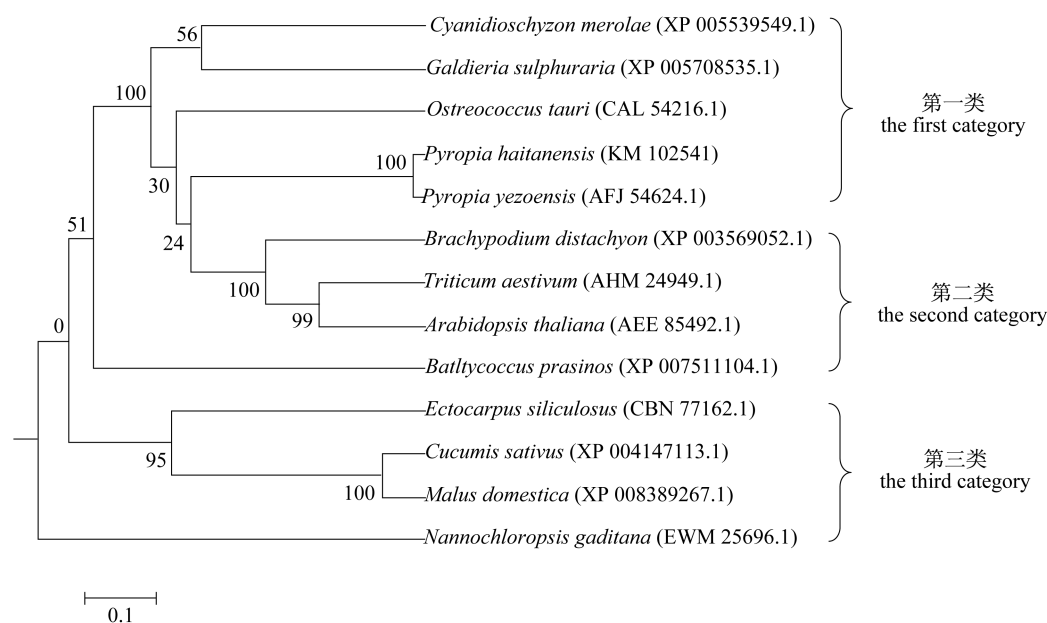


图 5 采用 NJ 法基于氨基酸序列构建的 PhDnaJ 的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree constructed with PhDnaJ amino acid sequences by the NJ method

#### 2.4 *PhHsp22* 表达水平的 qPCR 分析

一个基因功能的实现与其在特定条件下表达水平的变化密切相关,为探明 *PhHsp22* 和 *PhDnaJ* 对高温和失水胁迫的功能响应,本研究采用 qPCR 技术检测了这两个基因在 29 °C 高温胁迫

不同时间水平和不同失水程度胁迫下的基因相对表达水平变化,结果表明高温和失水胁迫对 *PhHsp22* 和 *PhDnaJ* 的相对表达水平均有显著影响(图 6,图 7)。

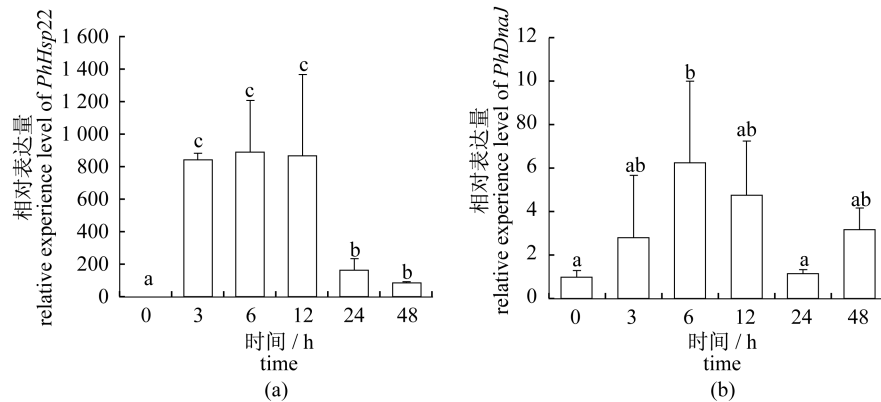


图 6 高温胁迫不同时间水平条件下 *PhHsp22* (a) 和 *PhDnaJ* (b) 的相对表达水平

不具有相同字母上标的数据间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )

Fig. 6 The relative expression levels of *PhHsp22* (a) and *PhDnaJ* (b) in different time of high temperature stress

Bar of each column with different small letters mean significant difference ( $P < 0.05$ )

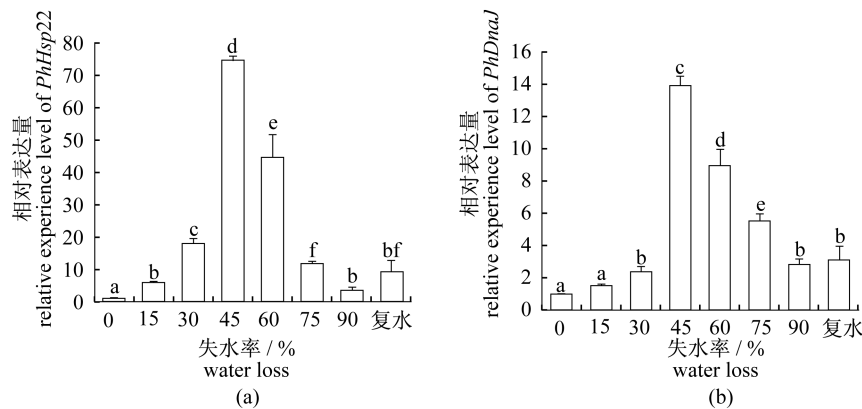


图 7 不同失水程度胁迫条件下 *PhHsp22* (a) 和 *PhDnaJ* (b) 的相对表达水平

不具有相同字母上标的数据间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )

Fig. 7 The relative expression levels of *PhHsp22* (a) and *PhDnaJ* (b) at different levels of desiccation and in rehydration for 30 min

Bar of each column with different small letters mean significant difference ( $P < 0.05$ )

在 29 °C 高温胁迫不同时间水平下, *PhHsp22* 和 *PhDnaJ* 的表达水平变化趋势基本一致,均呈现先上调后下调的趋势,但变化的幅度存在明显差异(图 6)。 *PhHsp22* 在高温胁迫 3 h 时,即可检测到表达水平极显著上调至较高水平 ( $P < 0.01$ ),达到高温胁迫前表达水平的 890 倍,并在高温胁迫 3 ~ 12 h 之间,表达水平没有显著性差异 ( $P > 0.05$ ),但当高温胁迫持续到 24 和 48 h

时, *PhHsp22* 的表达水平又呈现为极显著下调 ( $P < 0.01$ ),但仍然显著高于高温胁迫前的表达水平 ( $P < 0.01$ ) (图 6-a)。 *PhDnaJ* 在高温胁迫 3 h 时,可检测到表达水平上调,但差异不显著 ( $P > 0.05$ ),至高温胁迫 6 h 时,表达水平显著上调至最高水平 ( $P < 0.05$ ),为高温胁迫前表达水平的 6.23 倍,随后开始逐渐下调,至高温胁迫 24 和 48 h 时,表达水平与高温胁迫前没有显著差异

( $P > 0.05$ ) (图 6-b)。

在不同失水胁迫条件下,*PhHsp22* 和 *PhDnaJ* 的表达水平变化与不同胁迫时间条件下的变化趋势基本一致,随失水胁迫程度的逐渐升高,呈现先上调后下调的趋势,只在变化幅度上稍有差异(图 7)。当失水率为 15% 时,即可检测到 2 个基因的表达水平开始上调,但与胁迫前相比,其表达水平差异显著(图 7-a),而相同失水条件下 *PhDnaJ* 的表达水平则差异不显著( $P > 0.05$ ) (图 7-b);但当失水率  $> 30\%$  时,2 个基因的表达水平均显著上调( $P < 0.05$ ),并在失水率为 45% 时达到最高水平( $P < 0.05$ ),此时,*PhHsp22* 的表达水平为失水胁迫前表达水平的 74.90 倍,而 *PhDnaJ* 的表达水平则为失水胁迫前表达水平的 13.94 倍;随后两个基因的表达水平开始显著下调,但至失水率为 90% 时,两个基因的表达水平仍然显著高于失水胁迫前的表达水平( $P < 0.05$ ),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与失水率为 90% 时的表达水平差异不显著( $P > 0.05$ ),说明复水 30 min 无法使这两个基因的表达水平恢复正常。

### 3 讨论

非生物胁迫如高温、低温、干旱、盐分、水分和重金属污染等是影响植物生长发育,导致作物减产和质量下降的首要因素<sup>[20]</sup>。在长期的进化过程中,植物形成了一系列独特且复杂的生理机制,涉及信号传导、基因的表达调控和代谢途径的反馈与调节等,能够应对不同类型的环境胁迫作出应答,以避免或减少胁迫对自身的伤害。其中 HSP 是植物响应逆境胁迫的一个普遍且极为重要的媒介分子,已有的大量研究结果均表明植物对逆境胁迫的抗性与 HSP 表达量普遍呈正相关<sup>[1]</sup>。而 sHSP 是 HSP 家族中分子量较小(12 ~ 43 ku)、种类最多、保守性最差、功能也最为丰富多样的一类 HSP 分子,在植物逆境胁迫响应中同样发挥着重要的调控作用。目前已在坛紫菜中克隆获得了 5 条编码 HSP70<sup>[21]</sup> 和 2 条编码 HSP90<sup>[22]</sup> 的全长基因,但至今没有坛紫菜 sHSP 基因克隆的报导。为研究坛紫菜应答高温和失水等逆境胁迫的分子机制,本研究以转录组测序获得的 unigene 序列为基础<sup>[16]</sup>,通过 RACE 或直接 PCR 扩增获得了

坛紫菜 2 条 sHSP 基因的全长 cDNAs 序列,经序列保守性和系统进化树分析确认 2 条坛紫菜 sHSP 基因分别为 *PhHsp22* 和 *PhDnaJ*,并通过 qPCR 技术测定了这 2 条基因在高温和失水不同程度胁迫下的表达水平变化。

#### 3.1 sHSP 氨基酸序列的保守性分析

已有的 sHSP 氨基酸序列比较结果表明,不同植物的同种 sHSP 在氨基酸组成上 N 端保守性较差,序列存在较大差异,而 C 端则具有很强的保守型,一般都包含一个由 90 个左右氨基酸组成的 ACD 保守结构域<sup>[23]</sup>,本研究中 *PhHsp22* 的氨基酸序列特征与此相符。

DnaJ 属于 sHSP 中的 HSP40 亚家族(也称为 J 蛋白家族)的成员,具有与其他 sHSP 差异较大的氨基酸序列和结构<sup>[24]</sup>。在模式植物水稻和拟南芥中的研究结果均表明 DnaJ 蛋白是一个很大的蛋白家族,分别包含有 101 和 103 个编码该类蛋白的基因<sup>[25]</sup>。根据氨基酸序列保守性结构域的差异可将 DnaJ 分为三类<sup>[26]</sup>:第一类含有 4 种结构域:N 端大约由 70 个氨基酸组成,核心结构为组氨酸、脯氨酸和天冬氨酸(His/Pro/Asp)三肽的 J 结构域、富含甘氨酸和苯丙氨酸区域(G/F 结构域)、含有 4 个 Cys-X-X-Cys-XGly-X-Gly 基序的富含半胱氨酸(CR)结构域和 C 末端结构域(CTD);第二类只含 3 种结构域,即:J 结构域、G/F 结构域和 CTD 结构域;第三类只有 J 结构域具有同源性,此外可能还含有其他各种结构域。这些 DnaJ 蛋白的结构域中,位于 N 端的 J 结构域是 HSP40 亚家族的基本特征。本研究中 *PhDnaJ* 的氨基酸序列包含 3 个保守的结构域:N 端的 DnaJ 结构域,中间的 CR 结构域(CR)和 C 端的 CTD 结构域,与第一类 DnaJ 相比,缺少 G/F 结构域。系统进化树分析结果也表明 *PhDnaJ* 介于第一类和第二类之间,偏向于第一类。已有高等植物中的研究结果表明 DnaJ 中 G/F 结构域长度变化比较大,甚至可能缺失<sup>[27]</sup>。而本研究的多序列比对结果中,条斑紫菜 *PyDnaJ* 也同样缺失 G/F 结构域,这可能与紫菜在系统进化上的特殊起源有关。

#### 3.2 HSP 应答高温和失水胁迫的表达水平分析

分布于潮间带中高潮区的紫菜对于出失水具有很强的适应性,在失水率超过 90%,重新复水后仍然能很快恢复各项生命机能<sup>[8-9]</sup>,如 Zou 等<sup>[28]</sup>的研究结果表明在干出失水期间,当紫菜藻



体的失水率达 60% 时,藻体仍然能以最大速率进行光合作用,并且在失水率达 90% 时,净光合速率仍然为正值。因此紫菜一直被当作失水胁迫抗性研究的代表性物种开展了广泛的研究<sup>[9,29-30]</sup>。而近年来,随着全球气候变暖,高温成为了影响坛紫菜栽培的关键因素<sup>[31-32]</sup>,为避免高温烂菜的发生,国内多个课题组选育出了具有明显耐高温性状的坛紫菜新品系<sup>[17,33]</sup>,并已在生产上大面积推广应用,本研究所采用的坛紫菜 Z-61 品系正是其中之一。由此研究坛紫菜对高温和失水胁迫的抗性机制,对于坛紫菜逆境胁迫抗性分子机制的阐明具有十分重要的意义。

在坛紫菜应答高温<sup>[12]</sup>和失水胁迫<sup>[15]</sup>的蛋白质组学研究中均发现 HSP 的表达与坛紫菜高温和失水胁迫抗性的获得密切相关,而 *PhHsp70*<sup>[21]</sup>和 *PhHsp90*<sup>[22]</sup>在不同高温和失水程度下的表达变化研究也进一步证实了这一点。本研究中,*PhHsp22*和 *PhDnaJ*基因在 29 °C 高温胁迫不同时间水平和不同失水胁迫程度下的表达均呈现出基本一致的表达模式,即在胁迫初期表达水平显著上调,尤其是 *PhHsp22*在高温和失水胁迫下,表达水平极显著地增加了 890 倍和 74.90 倍,但随着胁迫的持续,这 2 个基因的表达水平开始逐渐下调。说明这两个基因在逆境胁迫下的表达可能存在一个反馈调节机制:逆境胁迫初期,由于受到不适条件的影响,各功能蛋白活性受到抑制,蛋白解聚增加,这种生理状态刺激了 *PhHsp22*和 *PhDnaJ*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,*PhHsp22*和 *PhDnaJ*的表达水平也随之下调。这种表达模式与 *PhHsp70*<sup>[21]</sup>和 *PhHsp90*<sup>[22]</sup>基因在高温胁迫不同时间水平下的表达模式完全一致,但与他们在不同失水程度下的表达模式则不同,*PhHsp70*和 *PhHsp90*的表达水平均只在高度失水(失水率 > 60%)条件下才开始上调。由此说明不同 Hsp 在失水胁迫下的作用模式并不完全一致。

#### 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] Yu Y, Xia Y X, Cai S X. The progress in small heat shock proteins [J]. China Biotechnology, 2003, 23(7): 38 - 41. [余瑛,夏玉先,蔡绍哲. 植物小分子热休克蛋白. 中国生物工程杂志, 2003, 23(7): 38 - 41.]
- [4] Basha E, O' Neill H, Vierling E. Small heat shock proteins and  $\alpha$ -crystallins: Dynamic proteins with flexible functions [J]. Trends In Biochemical Sciences, 2012, 37(3): 106 - 117.
- [5] Xia J Y, Zhang Y Z. Structure and function of small heat shock proteins [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 23(11): 911 - 915. [夏佳音,张耀洲. 小热休克蛋白的结构和功能. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23(11): 911 - 915.]
- [6] Schroda M. The *Chlamydomonas* genome reveals its secrets: Chaperone genes and the potential roles of their gene products in the chloroplast [J]. Photosynthesis Research, 2004, 82(3): 221 - 240.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Xia J, Xu Y, Ji D H, et al. Physiological response of the antioxidant system in *Pyropia haitanensis* to desiccation stress [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(2): 405 - 412. [谢佳,徐燕,纪德华,等. 坛紫菜叶状体对失水胁迫的抗氧化生理响应. 中国水产科学, 2014, 21(2): 405 - 412.]
- [10] 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.]
- [11] 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.]
- [12] Xu Y, Chen C S, Ji D H, et al. Proteomic profile

- analysis of *Pyropia haitanensis* in response to high-temperature stress [ J ]. Journal of Applied Phycology, 2014, 26(1) : 607 – 618.
- [ 13 ] Li B. The global transcriptome of *Pyropia haitanensis* and digital gene expression profile analysis under high-temperature stress [ D ]. Xiamen: Jimei University, 2013. [ 李兵. 坛紫菜转录组及应答高温胁迫的表达谱分析. 厦门: 集美大学, 2013. ]
- [ 14 ] Wang L. Analysis of transcriptome and expression profiles in response to desiccation stress in *Pyropia haitanensis* [ D ]. Qingdao: Ocean University of China, 2013. [ 王莉. 坛紫菜响应失水胁迫的转录组和表达谱特征分析. 青岛: 中国海洋大学, 2013. ]
- [ 15 ] Xie J. Preliminary study of proteomics of *Pyropia haitanensis* in response to desiccation stress [ D ]. Xiamen: Jimei University, 2014. [ 谢佳. 失水胁迫下坛紫菜差异蛋白质组的初步研究. 厦门: 集美大学, 2014. ]
- [ 16 ] 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.
- [ 17 ] 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 – 106. [ 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 – 106. ]
- [ 18 ] 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.
- [ 19 ] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [ J ]. Molecular Biology Evolution, 2011, 28(10) : 2731 – 2739.
- [ 20 ] Takashi H, Kazuo S. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: Past, present and future [ J ]. The Plant Journal, 2010, 61(6) : 1041 – 1052.
- [ 21 ] Ji D H, Li B, Xu Y, *et al.* Cloning and quantitative analysis of five heat shock protein 70 genes from *Pyropia haitanensis* [ J ]. Journal of Applied Phycology, 2014, DOI: 10.1007/s10811 – 014 – 0314 – 6.
- [ 22 ] Dai Z Z, Li B, Xu Y, *et al.* Cloning and expression pattern analysis of two heat shock protein (*Hsp90*) genes from *Pyropia haitanensis* [ J ]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(3) : 340 – 349. [ 代真真, 李兵, 徐燕, 等. 坛紫菜两种 Hsp90 基因的克隆及表达特征分析. 水产学报, 2014, 38(3) : 340 – 349. ]
- [ 23 ] Scharf K D, Siddique M, Vierling E, *et al.* The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins containing alpha-crystallin domains (ACD proteins) [ J ]. Cell Stress Chaperones, 2001, 6(3) : 225 – 237.
- [ 24 ] Garrido C, Paul C, Seigneuric R, *et al.* The small heat shock proteins family: The long forgotten chaperones [ J ]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2012, 44(10) : 1588 – 1592.
- [ 25 ] Zhao X, Liu X G, Wang A R. Bioinformation analysis of the DnaJ protein family in rice [ J ]. Subtropical Agriculture Research, 2011, 7(3) : 206 – 211. [ 赵旭, 刘向国, 王爱荣. 水稻 DnaJ 蛋白的生物信息学分析. 亚热带农业研究, 2011, 7(3) : 206 – 211. ]
- [ 26 ] Walsh P, Bursać D, Law Y C, *et al.* The J-protein family: Modulating protein assembly, disassembly and translocation [ J ]. EMBO Report, 2004, 5(6) : 567 – 571.
- [ 27 ] Qiu X B, Shao Y M, Miao S, *et al.* The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones [ J ]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2006, 63(22) : 2560 – 2570.
- [ 28 ] Zou D, Gao K. Effects of desiccation and CO<sub>2</sub> concentrations on emerged photosynthesis in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta), a species farmed in China [ J ]. European Journal of Phycology, 2002, 37(4) : 587 – 592.
- [ 29 ] 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. ]
- [ 30 ] Liu Y C. Mechanism for differential desiccation tolerance in *Porphyra* species [ D ]. Boston: Northeastern University, 2009.
- [ 31 ] Lai P Y. Investigation and counter measure of rot disease of *Porphyra haitanensis* in Fujian City in Autumn 2008 [ J ]. Modern Fisheries Information, <http://www.sexuebao.cn>

- 2009,24(7):6-9. [赖平玉. 2008年秋季福鼎市坛紫菜病烂情况调查与对策. 现代渔业信息, 2009, 24(7):6-9.]
- [32] Liu R T. Analysis and prevention measures on sprout rotting of farmed *Porphyra haitanensis* in Fujian Province[J]. Modern Fisheries Information, 2011, 26(4):18-19. [刘瑞棠. 福建坛紫菜养殖病烂原因分析及几项预防措施. 现代渔业信息, 2011, 26(4):18-19.]
- [33] Yan X H, Ma S Y. Selection of a high-temperature resistant strain of *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) [J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(1):112-119. [严兴洪, 马少玉. 坛紫菜抗高温品系的筛选. 水产学报, 2007, 31(1):112-119.]

## Cloning and expression analysis of two small heat shock protein(sHsp) genes from *Pyropia haitanensis*

CHEN Yuting, XU Yan, JI Dehua, CHEN Changsheng, XIE Chaotian\*

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

**Abstract:** Small heat shock proteins (sHsp), representing an important molecular chaperone in eukaryotic cells, play important roles not only in a variety of stress responses, but also in development and signal transduction of normal cell. In this study, based on unigene sequences which were obtained from whole transcriptome sequencing of *Pyropia haitanensis*, two full-length sHSP genes were obtained by rapid amplification of cDNA ends (RACE) or direct PCR, which named *PhHsp22* and *PhDnaJ*. The full-length cDNA of the *PhHsp22* gene comprised 857 nucleotides and contained an open reading frame of 519 bp (GenBank accession: KM102540), encoding a protein of 172 amino acid residues with the predicted molecular weight of 19.1 ku and theoretical isoelectric point of 5.24; the full-length cDNA of the *PhDnaJ* gene comprised 1 616 nucleotides and contained an open reading frame of 1 290 bp (GenBank accession: KM102541), encoding a protein of 429 amino acid residues with the predicted molecular weight of 46.1 ku and theoretical isoelectric point of 6.43. On the basis of conserved motifs and phylogenetic tree analysis, PhDnaJ belongs to the subfamily of Hsp40. The expressions of the two genes, as measured by real-time quantitative PCR, were significantly induced by high-temperature stress and desiccation stress, and had identical expression patterns: during high-temperature and desiccation stress, the expression levels of the two genes all significantly increased firstly and then decreased. These results suggested that the expressions of *PhHsp22* and *PhDnaJ* genes are feedback regulated by high-temperature and desiccation stresses.

**Key words:** *Pyropia haitanensis*; small heat shock proteins; RACE; real-time quantitative PCR

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