

中国莲小分子热激蛋白 *HSP17.5* 基因克隆及表达分析

齐麟¹,李军²,向志明³,余英才^{4*}

(1. 铁道警察学院,河南 郑州 450053; 2. 聊城大学 药学院,山东 聊城 252000;

3. 中国科学院 南海海洋研究所,广东 广州 510301; 4. 江西中医药大学 生物化学教研室,江西 南昌 330004)

摘要: 为了研究中国莲小分子热激蛋白的生理功能,通过 RACE 技术克隆得到小分子热激蛋白基因 *HSP17.5* 全长 cDNA。该基因开放阅读框全长 471 bp,编码 156 个氨基酸,推测其分子量为 17.5 kD,等电点 5.94。半定量 RT-PCR 试验结果显示,*HSP17.5* 在中国莲授粉后不同时期的胚轴中均有表达,表达量呈现先降低后恢复的特点。*HSP17.5* 在授粉后 10 d 的子叶中有低丰度表达,之后消失。表明 *HSP17.5* 蛋白在中国莲种子萌发和幼苗早期的形态建成中可能起着重要的调节作用。

关键词: 中国莲;热激蛋白 17.5;半定量 RT-PCR;基因克隆

中图分类号: S682.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)01-0102-05

Cloning and Expression Analysis of Small Heat Shock Protein Gene *HSP17.5* in Sacred Lotus

QI Lin¹,LI Jun²,XIANG Zhi-ming³,YU Ying-cai^{4*}

(1. Railway Police College,Zhengzhou 450053,China; 2. School of Pharmaceutical,Liaocheng University,Liaocheng 252000,China; 3. South China Sea Institute of Oceanology,Chinese Academy of Sciences,Guangzhou 510301,China; 4. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine,Nanchang 330004,China)

Abstract: A full length cDNA of small heat shock protein gene *HSP17.5* was isolated from sacred lotus by RACE method. The ORF of *HSP17.5* was 471 bp,encodes 156 amino acid residues. The deduced molecular weight and PI was 17.5 kD and 5.94,respectively. The semi-quantitative RT-PCR result indicated that *HSP17.5* was expressed in embryonal axis during all the development period after pollination, and the expression level was in "descent-recuperation" pattern. The *HSP17.5* was lowly expressed in cotyledon at 10 days after pollination,and then disappeared. *HSP17.5* may play an important role in seed germination and early seedling morphogenesis.

Key words: sacred lotus; *HSP17.5*; semi-quantitative RT-PCR; gene cloning

热激蛋白(heat shock proteins,HSPs)是生物体受到高温、缺氧、重金属离子等不良环境因素影响时诱导合成的一类应激蛋白,在增强细胞活性、提高对环境胁迫的耐受能力方面具有重要的生物学意义^[1-2]。热激蛋白均为糖蛋白^[3],根据其分子量不同,可以分为 HSP40、HSP60、HSP70、HSP90、HSP110 和小分子热激蛋白 6 个家族^[4-5]。相比于其他真核生物,植物小分子热激蛋白更加丰富^[6]。

植物小分子热激蛋白 N 端物种差异较大,C 端则高度保守,均含有一个大约由 90 个氨基酸残基组成的热激结构域(heat shock domain)^[7]。小分子热激蛋白一般是通过热激结构域结合分子量为 200~350 kD 的寡聚复合体发挥生物学功能的^[8]。本研究通过 RACE(rapid amplification of cDNA ends)技术获得中国莲 *HSP17.5* 基因开放阅读框(open reading frame,ORF)全长,并对其序列进行了生物

收稿日期:2013-07-20

基金项目:公安部科技创新项目(2012YYCXTDZG139);江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ13588)

作者简介:齐麟(1981-),男,河南开封人,副教授,博士,主要从事分子生物学研究。E-mail:qilin@tdjg.com.cn

*通讯作者:余英才(1981-),男,江西上饶人,讲师,博士,主要从事生物化学与分子生物学研究和教学工作。

E-mail:yingcaiyou@gmail.com

信息学分析。同时,通过半定量 RT-PCR(semi-quantitative RT-PCR)技术研究了中国莲小分子热激蛋白 HSP17.5 基因在种子发育过程中的表达谱,为其后续生理功能试验的开展奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料中国莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn.),品系为冬红花,采自佛山市三水荷花世界。pGEM-T vector 购自 Promega 公司。大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 由铁道警察学院生化快速鉴别实验室保存。RNA 提取试剂盒 Trizol Reagent(Cat. No. 15596-018)购自 Invitrogen 公司。反转录试剂盒(AMV RNA PCR Ver. 3.0)、Taq 酶(LA-Taq, 5 U/ μ L)和 DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司。PCR 产物凝胶回收试剂盒为 Omega 公司产品。dNTP 购自鼎国生物技术公司。其他试剂均为国产分析纯。本试验中引物的合成和序列的测定均由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.2 中国莲 HSP17.5 基因 ORF 的全长克隆

中国莲总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的反转录合成参照试剂盒说明书,合成的 cDNA 第一链加灭菌双蒸水稀释 6 倍做扩增模板备用。根据中山大学生命科学学院植物生理与分子生物学实验室构建的中国莲胚芽 cDNA 文库筛选获得的一个小分子热激蛋白 cDNA 片段序列设计 3'RACE 上游引物,引物序列:5'-TGGCTTCGACTCCGGCAGAC-3'。下游引物使用试剂盒自带引物 M13 Primer M4:5'-GTTTCCAGTCACGAC-3'。反应体系为:cDNA 模板 1 μ L、10 \times Buffer 2 μ L、dNTP(各 2.5 mmol/L)1 μ L、LA-Taq 酶 0.2 μ L、PCR 上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L,加灭菌双蒸水补至 20 μ L。反应程序经 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后进行循环:94 $^{\circ}$ C 20 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,共 30 个循环,之后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min 后结束。PCR 产物经凝胶回收后,与 T 载体连接,连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,通过菌落 PCR 挑选阳性克隆,并经上海英骏生物技术有限公司测序验证克隆结果后,将阳性菌株保存于 -70 $^{\circ}$ C。根据测序结果,使用软件 DNAMAN 4.0 完成全长序列拼接。根据拼接所得的全长序列扩增 ORF,设计上游引物:5'-ATCGCAGAAAAGTTAGACGAA-3' 和下游引物:5'-CGCGTAGACGACTACTACAGG-3' 进行扩增,扩增体系、程序及产物回收、测序等过程同上。

1.3 主要的生物信息学分析方法

中国莲 HSP17.5 蛋白序列的推导使用 expasy 网站 Translate 工具(<http://cn.expasy.org/tools/dna.html>),蛋白分子量与等电点预测使用 Computer pI/Mw 工具(http://cn.expasy.org/tools/pi_tool.html),蛋白结构预测分析使用 SMART 工具(<http://smart.embl-heidelberg.de/>),蛋白疏水性分析使用 ProtScale 工具(<http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl>)。

登陆 expasy 网站,通过 BLAST 工具搜索蛋白质数据库获得植物 HSP17.5 同源蛋白序列,使用 clustalx 1.81 进行多序列比对分析;利用 MEGA 5.2 NJ 法构建进化树。

1.4 中国莲 HSP17.5 基因表达谱研究

将授粉后 10 d、15 d、20 d、25 d、30 d 的中国莲种子胚轴和子叶剥离,按照 1.2 方法获得 cDNA 第一链。合成的 cDNA 第一链稀释 5 倍后作为半定量 RT-PCR 模板备用。内参基因为 18 S 核糖体基因,上、下游引物分别为:5'-CCATAAACGATGCGAC-3' 和 5'-CACCACCCATAGAATCAAGA-3'。HSP17.5 半定量 RT-PCR 上、下游引物分别为:5'-GCCTGGGCTTAAATCCGGAGAC-3' 和 5'-CCGGCGGAGGCAGCTTGTTAAC-3'。半定量 RT-PCR 反应配置如下:cDNA 模板 1 μ L、上下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L、dNTP(各 10 mmol/L)0.5 μ L、Taq 酶(5 U/ μ L)0.5 μ L,加灭菌双蒸水补至 20 μ L。半定量 RT-PCR 程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后进行循环:94 $^{\circ}$ C 20 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 15 s,共 29 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min 结束。PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,分析中国莲 HSP17.5 表达差异。

2 结果与分析

2.1 中国莲 HSP17.5 基因 cDNA 全长克隆及序列分析

经分析发现,筛选获得的小分子热激蛋白 cDNA 片段 5'端序列完整,因此只需扩增获取 3'端序列。经 3'RACE PCR 后,扩增出较为专一的条带(图 1A),将产物跑胶后进行割胶纯化,连接到 T 载体并测序获得 560 bp 的产物。利用 DNAMAN 4.0 软件拼接后获得全长为 821 个碱基的 cDNA 序列(图 2)。根据拼接结果,设计引物进行 ORF 的扩增,得到 745 bp 大小的条带(图 1B),并进行测序验证,与之前的拼接结果相符,说明该基因序列全长正确可靠。中国莲 HSP17.5 基因 cDNA 5'端有 102 bp 的非

编码序列(UTR),3'端有 248 bp 的 UTR 以及 28 bp 的 poly(A)尾巴,ORF 区共 471 bp,编码 156 个氨基酸组成的多肽,起始密码子 ATG 位于第 103—105 个碱基处,终止密码子(TAG)位于第 571—573 个碱基的位置。通过 SMART 工具分析:中国莲 HSP17.5 蛋白 39—51 氨基酸残基位点存在一个胞质 II 类小分子热激蛋白的特征基序,50—154 氨基酸残基位点为一个热激结构域(图 3)。使用 Computer pI/Mw 工具分析得出,中国莲 HSP17.5 cDNA 编码的多肽分子量为 17.5 kD,等电点为 5.94。ProtScale 工具分析证实,中国莲 HSP17.5 蛋白无跨膜结构域,全蛋白表现为强亲水性(图 4)。

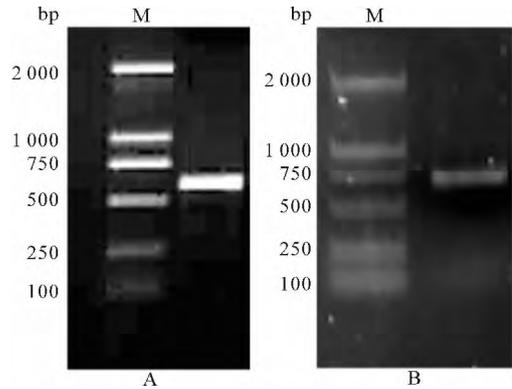


图 1 中国莲 HSP17.5 cDNA 3'RACE PCR 产物(A)及其 ORF 区扩增结果(B)

```

ccgccgagggcaacacatcgcagaaaagttagacgaaagetacctccaaatacctcccg -42
tttctgataaattctcccgtaataaagtagaagcaaggaaatggattlgaggattatg 18
                                     M D L R I M      6
gatttcgacagccctctgttttcgactctccagcacatgctcgacgtgtctgaggaggct 78
D F D S P L F S T L Q H M L D V S E E A 26
gacaagtcgttcaacgctcgcagcaggacctatgttcgcgacccaaggccatggcttcg 138
D K S F N A P T R T Y V R D A K A M A S 46
actccggcagacgtaaggaataccccaactctatgcttcatcgtcgacatgctctggg 198
T P A D V K E Y P N S Y A F I V D M P G 66
cttaaatccggagacatcaaggttcaggtggaggatggcaatgtctcctcatcagcgg 258
L K S G D I K V Q V E D G N V L L I S G 86
gaacgcaagagggaggaggagaagaaggggtcaagtatgtcaggatggagaggagggtc 318
E R K R E E E K E G V K Y V R M E R R V 106
ggcaaatcctatgaggaagtctgtattaccagaaaatgccaacaccgatgccatttctct 378
G K F M R K F V L P E N A N T D A I S A 126
gtctgtcaggacggcgtgctcactgtcaactgtaacaagctgcctccgcccggagccgaa 438
V C Q D G V L T V T V N K L P P P E P K 146
aagcccaagaccatcgaagttaaattgcctaggtgtgcgaatggaaggaagtcgtagtt 498
K P K T I E V K I A - 156
tcategtataagagtaatgttggccgaggtcgtgggattgagtatttggttcagtgttt 558
catggctglttcglttcttactatattgggtlgggtatattggctcgcattcggattgccacc 618
tagacgatgacaaccattgcctgtagttagtctacgcgtatfaagattgatatact 678
gtttatctaccctaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 719

```

灰色阴影区为胞质 II 类热激蛋白特征基序,下划线区为热激结构域

图 2 中国莲 HSP17.5 基因的核苷酸序列及编码氨基酸序列

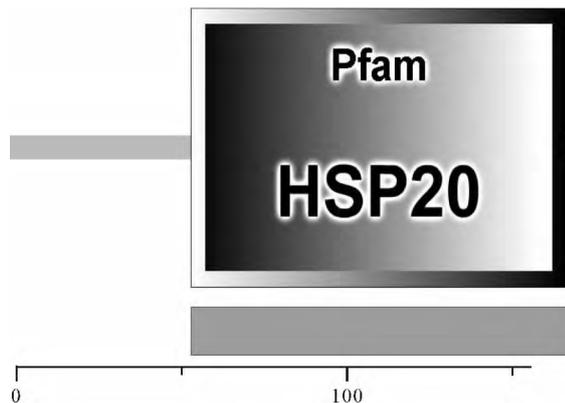


图 3 中国莲 HSP17.5 蛋白序列结构

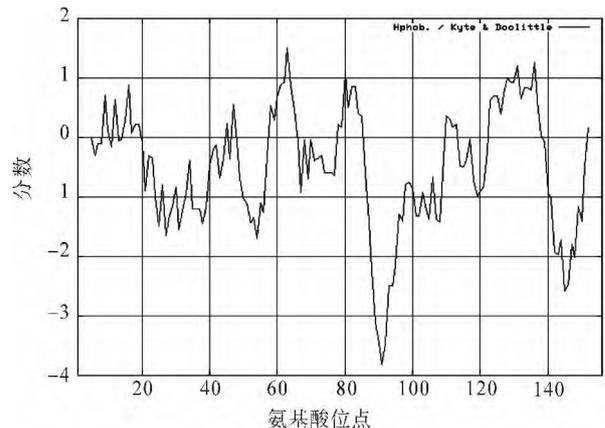
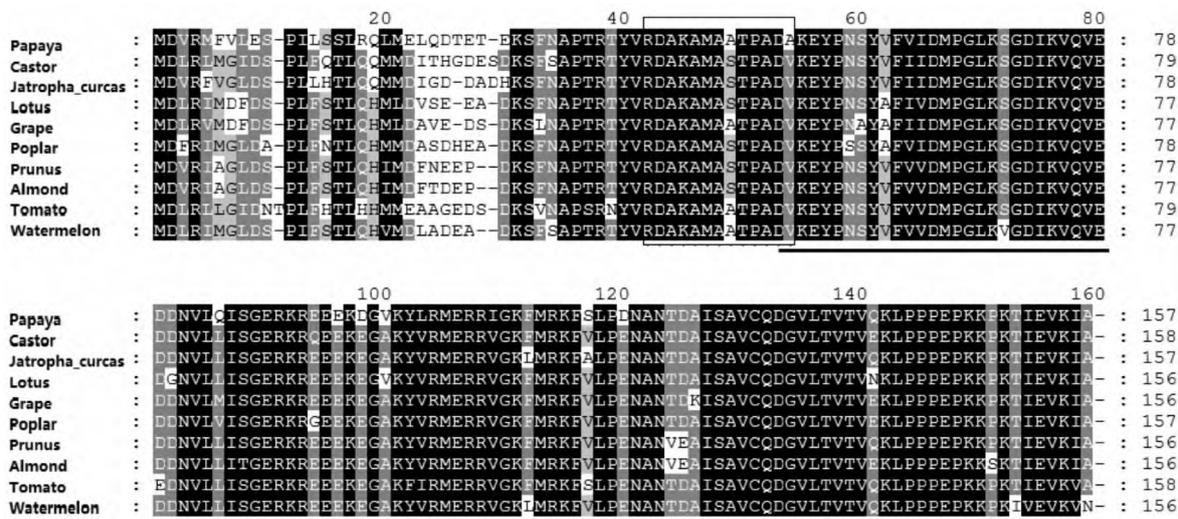


图 4 中国莲 HSP17.5 蛋白疏水性分析

2.2 中国莲 HSP17.5 同源蛋白的系统进化分析

通过选取具有代表性的植物 HSP17.5 同源蛋白序列,进行了多序列比较分析,发现中国莲 HSP17.5 蛋白具有较高的序列保守性,N 端具有一个胞质 II 类小分子热激蛋白的特征基序“RDAKAMASTPADV”(图 5),与白杨、蓖麻、葡萄等植物同源性均较高,热激

结构区域仅有个别几个氨基酸位点差异,序列的主要差异集中在该蛋白的 N 端区域,C 端高度保守。同时构建了一个系统进化树(图 6),从进化树上可以看出,中国莲 HSP17.5 与葡萄小分子热激蛋白最先聚类到一起,然后与白杨小分子热激蛋白共一支,推测其与 HSP17.5 蛋白可能来源于同一个祖先。



方框内为胞质 II 类热激蛋白特征基序,下划线区为热激结构域

图 5 植物 HSP17.5 同源蛋白的序列比对

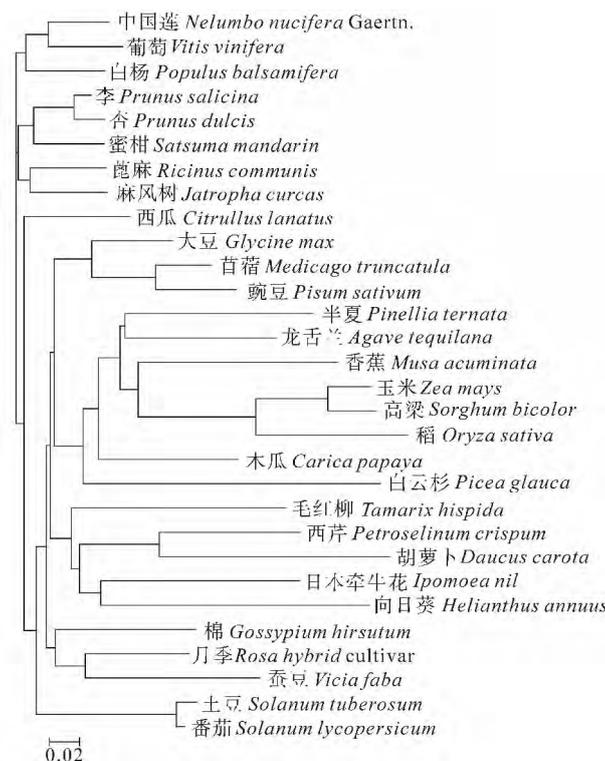


图 6 植物 HSP17.5 同源蛋白的系统进化分析(NJ 法)

2.3 中国莲 HSP17.5 基因表达分析

在中国莲授粉后 10~30 d 内的种子发育过程中,HSP17.5 的表达存在组织特异性。在中国莲种

子胚轴内始终存在稳定的 HSP17.5 表达,但表达强度有所不同,呈现出明显的先降后升的趋势。种子发育前期(10~15 d)中国莲胚轴内 HSP17.5 的

表达量最大,种子发育中期(20~25 d)中国莲胚轴内 *HSP17.5* 的表达量最小。到种子发育后期(30 d),*HSP17.5* 又恢复到种子发育前期的高表达水平。在中国莲种子子叶中,授粉后 15 d 发现存在 *HSP17.5* 基因,且表达丰度明显低于同时期胚轴内的表达,20 d 时表达丰度显著下降,25 d 后则几乎检测不到 *HSP17.5* 的表达(图 7)。

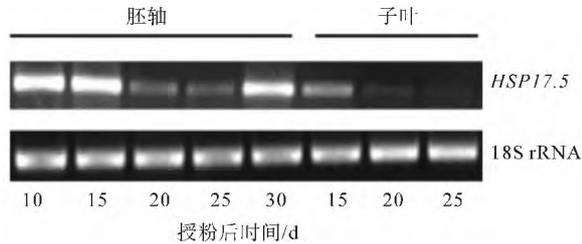


图 7 *HSP17.5* 在中国莲种子发育过程中的表达分析

3 结论与讨论

本研究通过 RACE 技术获得了中国莲 *HSP17.5* 全长 cDNA 序列,该基因序列为首次报道,将序列提交至美国国立生物技术信息中心(NCBI)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)的 GenBank 数据库,获得基因编号为 EF100453。生物信息学分析证明,中国莲 *HSP17.5* 蛋白 N 端具有一个胞质 II 类小分子热激蛋白的特征基序“RDAKA-MASTPADV”,因此 *HSP17.5* 属于胞质定位蛋白,这与蛋白疏水性分析得到的 *HSP17.5* 蛋白表现强亲水性、不具有跨膜结构域的特征相吻合。不同物种中 *HSP17.5* 的 C 端高度保守,都具有一个约由 90 个氨基酸残基组成的热激结构域。N 端除一个较短的特征基序外高度可变,可能与不同物种中 *HSP17.5* 功能多样性有一定的关系。

在 PCR 反应的前期,PCR 扩增产物的量随着 PCR 循环数的增大而成比例地增多,即在 PCR 反应的指数期两者之间存在一定的线性关系。在 PCR 反应的后期,随着 DNA 聚合酶活性的下降和反应溶液中底物的消耗,扩增产物将达到一个平台,在这一时期,循环数的增多对扩增产物的量影响不大。因此,半定量 RT-PCR 的循环数应确定在成比例的指数期内。但如果循环数过少,扩增产物的量不足,无法准确地显示基因表达的相对丰度。所以,循环数的选择应该为尚未进入平台期的指数后期。根据这一原理及前期试验结果,本研究确定循环数为 29 个。

中国莲 *HSP17.5* 蛋白与其他植物具有很高的同源性,且在发育过程中胚轴中始终能检测到,属于组成型表达,称为 HSC(heat shock cognate pro-

tein)。中国莲 *HSP17.5* 在种子发育的早期有较高表达,暗示其可能与种子早期发育密切相关,其作用除了对抗逆境胁迫^[9]外,推测同拟南芥小分子热激蛋白功能相似,参与植物正常生长时的生理过程^[10]。随着中国莲种子进一步的萌发,*HSP17.5* 的表达量开始迅速下降,这与其他物种中的小分子热激蛋白基因表达模式相似^[11],说明 *HSP17.5* 蛋白在种子萌发和幼苗早期的形态建成中起着重要的调节作用,但其具体的分子机制还需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] Carranco R, Almoguera C, Jordano J. A plant small heat shock protein gene expressed during zygotic embryogenesis but noninducible by heat stress[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(43): 27470-27475.
- [2] 苏岭,李绍戊,王荻,等. 半定量 RT-PCR 方法检测热应激对鲫鱼肝脏中 *HSP70* mRNA 含量的影响[J]. *华北农学报*, 2010, 25(S1): 100-104.
- [3] 张杰,田波. 热休克蛋白及其生物学功能[J]. *国外医学:外科学分册*, 2003, 30(5): 265-268.
- [4] Sugiyama Y, Suzuki A, Kishikawa M, et al. Muscle develops a specific form of small heat shock protein complex composed of MKBP/HSPB2 and HSPB3 during myogenic differentiation[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(2): 1095-1104.
- [5] 郭尚敬,冀芦沙. 叶绿体小分子量热激蛋白与植物光系统保护研究进展[J]. *河南农业科学*, 2012, 41(10): 10-13.
- [6] Haslbeck M, Franzmann T, Weinfurter D, et al. Some like it hot: The structure and function of small heat-shock proteins[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, 12(10): 842-846.
- [7] Sun W, Van Montagu M, Verbruggen N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1577(1): 1-9.
- [8] Waters E R, Lee G J, Vierling E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants[J]. *J Exp Bot*, 1996, 47(3): 325-338.
- [9] 周玉亮. 莲金属硫蛋白和热激蛋白基因在种子活力中的功能分析[D]. 广州: 中山大学, 2011.
- [10] Dafny-Yelin M, Tzfira T, Vainstein A, et al. Non-redundant functions of sHSP-CIs in acquired thermotolerance and their role in early seed development in *Arabidopsis*[J]. *Plant Mol Biol*, 2008, 67(4): 363-373.
- [11] Sun W, Bernard C, van de Cotte B, et al. *AtHSP17.6A*, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon overexpression[J]. *Plant J*, 2001, 27(5): 407-415.