

平邑甜茶 *MhHSP70* 的特征及其对镉和渗透胁迫的反应

沈 伟, 杨洪强*, 李 强, 冉 昆, 姜倩倩, 孙晓莉, 张玮玮, 隋 静

(山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 国家苹果工程技术研究中心, 山东泰安 271018)

摘 要: 以平邑甜茶为试材, 通过 RT-PCR 及 RACE 技术, 获得了一个热激蛋白基因 *HSP70* 的全长 cDNA 序列, 命名为 *MhHSP70*, GenBank 登录号为 HQ876864; 该基因全长 2 307 bp, 序列高度保守, 编码 650 个氨基酸, 与苹果、番茄和烟草亲缘关系最近。在根系和叶片中, 热激蛋白基因 *MhHSP70* 的表达均受镉和渗透胁迫 (非热胁迫) 诱导, 并且随着硫酸镉和氯化钠处理浓度的升高以及聚乙二醇 (PEG) 处理时间的延长, *MhHSP70* 的表达量逐渐增强。

关键词: 平邑甜茶; *MhHSP70*; 热激蛋白; 镉; 渗透; 胁迫

中图分类号: S 661

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 03-0417-08

The Character of *MhHSP70* from *Malus hupehensis* and Its Response to the Stress of Cadmium and Osmosis

SHEN Wei, YANG Hong-qiang*, LI Qiang, RAN Kun, JIANG Qian-qian, SUN Xiao-li, ZHANG Wei-wei, and SUI Jing

(College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Biology, National Research Center for Apple Engineering and Technology, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: The cDNA sequence of *HSP70* gene, designated as *MhHSP70* (GenBank number: HQ876864), was isolated from *Malus hupehensis* (Pamp) Rehd. var. *pinyiensis* Jiang by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid-amplification of cDNA ends (RACE). The full length cDNA sequence was 2 307 bp, encoding a protein of 650 amino acids, which have close relationship with *HSP70* from *Malus pumila* Mill., *Solanum lycopersicum* and *Nicotiana tabacum*. The expression of *MhHSP70* was induced by cadmium and osmotic stress in roots and leaves, the level of *MhHSP70* expression was enhanced with the increase of NaCl and cadmium concentration, as well as PEG treatment time.

Key words: *Malus hupehensis* (Pamp) Rehd.; *MhHSP70*; heat-shock protein; cadmium; osmosis; stress

植物经热激处理后, 不仅抗高温能力增强, 抗低温、干旱和盐胁迫的能力也普遍增强, 这种增

收稿日期: 2011-12-26; 修回日期: 2012-03-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31171923); 国家转基因生物新品种培育重大专项 (2008ZX08009-3); 高校博士学科点专项科研基金项目 (20103702110003); 山东省自然科学基金项目 (ZR2010CM020)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: hqyang@sdaa.edu.cn; labft@sdaa.edu.cn)

强与热激处理下热休克蛋白 (heat shock proteins, HSP) 的表达密切相关 (Banti et al., 2010)。HSP 是由热刺激诱导合成的一类高度保守的蛋白质 (Richter et al., 2010), 其不仅受高温热激诱导, 也受缺氧、铜胁迫和紫外线等多种胁迫的诱导 (Matuszewska et al., 2008; Timperio et al., 2008), 如超表达 HSP 转录因子 HsfA2 的拟南芥耐缺氧能力明显增强。

HSP70 是 HSP 超家族中最保守的成员之一, 主要功能是作为分子伴侣防止蛋白质错误折叠 (Boorstein et al., 1994), 维持细胞结构, 抵抗细胞凋亡 (Rérole et al., 2011) 以及保护叶绿体 ATPase (Latijnhouwers et al., 2010; Shi & Theg, 2010) 等。HSP70 的这些功能对于植物抵御环境胁迫有重要的意义, 但目前对果树 *HSP70* 的特性及其对非高温胁迫的反应还知之甚少。

平邑甜茶是苹果的优良砧木。本研究从平邑甜茶中克隆 *HSP70*, 分析其生物信息学特征, 并探讨该基因在硫酸镉、氯化钠和 PEG 胁迫下的反应, 以期深入揭示苹果砧木抗逆机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2010—2011 年在山东农业大学果树生物学重点实验室进行, 试材为具 4~6 片真叶的平邑甜茶 [*Malus hupehensis* (Pamp) Rehd. var. *pinyiensis* Jiang] 幼苗。

1.2 *MhHSP70* 的克隆

采用改进的快速 CTAB 法提取根系及叶片总 RNA (冉昆, 2009), 用 RNase-free 水溶解后 -80 °C 保存备用。

采用 PrimeScript RT-PCR Kit (TaKaRa 公司) 将提取的根系总 RNA 反转录为 cDNA, 根据 NCBI 中苹果和拟南芥的 EST 序列设计简并引物。上游引物 P1: 5'-CGGCTTACTTCAACGATT-3', 下游引物 P2: 5'-CAAACCAAGGGACAGAGGAGT-3'。

产物回收连入 pMD-18T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 后筛选阳性克隆送往北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

根据测序结果设计 3'-RACE 上游引物 P3 (5'-CTCCTCTGTCCCTTGGTT-3'), 下游引物为通用引物 B26 (5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT-3'), 扩增得到 3'端序列。根据所获得的中间片段和 3'端序列, 设计 5'-RACE 引物 P4 (5'-GCTGCTGCTGATGTCTCT-3'), 按照 5'-Full RACE Kit (TaKaRa Code: D315) 说明书操作, 扩增得到该基因的 5'端序列。然后根据所得的拼接序列设计全长引物 P5 (5'-ATGGCGGAAAGGGAGAGGGGCC-3') 和 P6 (5'-TTAATCAACTTCTTCAA TCTTG-3'), 进行 PCR 扩增, 得到平邑甜茶 *MhHSP70* 编码区序列。

1.3 生物信息学分析

利用 EditSeq 程序分析 *MhHSP70* 全长序列, 用 DNASTar 寻找最大开放阅读框; 在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上通过 Blastn 和 Blastp 分别进行核苷酸和蛋白质序列同源性分析; 用 Clustal 1.8.1 和 Mega4.1 软件构建系统进化树; 用 DNAMAN 6.0 软件进行多重序列比对; 用 Expasy-Prot Param (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) 进行氨基酸理化分析; 用 TMPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 进行跨膜区预测; 用 SignalP3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析信号肽; 用 CELLO (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) 和 WoLFPSORT (<http://wolfpsort.org/>) 进行亚细胞定位分析; 用 NUCLEO (<http://pprowler.itee.uq.edu.au/Nucleo-Release-1.0/>) 和 NucPred

(<http://www.sbc.su.se/~maccallr/nucp red/cgi-bin/single.cgi>) 分析细胞核定位信号, 分别采用 ProtScale (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.htm>)、NetPhos2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)、Net NGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetN Glyc/>)、NetOGlyc 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) 和 Expasy-SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat) 分析疏水性、磷酸化位点、N - 糖基化位点、O - 糖基化位点和二级结构。

1.4 半定量 RT-PCR 检测不同胁迫条件下基因的表达

硫酸镉 (CdSO_4) 处理: 将幼苗置于用 1/2 Hogland 完全营养液配置的 0、50、100、150、200 和 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CdSO_4 溶液中, 处理 6 h 时取样。

氯化钠 (NaCl) 处理: 将幼苗置于用 1/2 Hogland 完全营养液配置的 0、50、100、150 和 200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液中, 处理 6 h 时取样。

聚乙二醇 (PEG) 处理: 将幼苗置于用 1/2 Hogland 完全营养液配置的 20% 的 PEG6000 溶液中, 处理 0、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 和 5.0 h 时取样。均以 3~4 株幼苗为一个处理单位, 重复 3 次。

用引物 P1、P2 检测不同胁迫条件下 *MhHSP70* 的表达, 以 18S rRNA 为内参, 18SR-F: 5'-GG GTTCGATTCCGGAGAGG -3', 18SR-R: 5'-CCGTGTCAGGATTGGGTAAT-3'。PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s, 48 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s, 共 32 个循环。

2 结果与分析

2.1 平邑甜茶 *MhHSP70* cDNA 全长序列的克隆

根据已知的苹果和拟南芥 *HSP70* 序列, 设计简并引物 P1、P2, 扩增得到 777 bp 的碱基序列。此后, 通过 RACE 技术分别获得 923 bp 的 5'端 (图 1, A) 和 495bp 的 3'端 (图 1, B) 序列。

在拼接序列起始密码子和终止密码子附近设计引物 P5 和 P6 扩增得到 1 953 bp 的条带 (图 1, C), 测序结果与拼接的编码区序列吻合。将该基因命名为 *MhHSP70*, GenBank 登录号为 HQ876864。

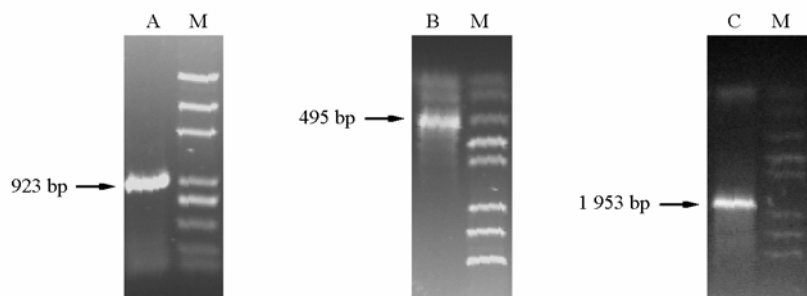


图 1 平邑甜茶 *MhHSP70* PCR 扩增

A: 5'端 cDNA 片段; B: 3'端 cDNA 片段; C: 编码区 cDNA 片段; M: DL2000 /plus DNA marker。

Fig. 1 Agarosegel electrophoresis for the cloning of *MhHSP70* from *Malus hupehensis*

A: 5' fragment; B: 3' fragment; C: Coding region sequence;

M: DL 2000/plus DNA marker.

平邑甜茶 HQ876864	MAGRGCGPAIGIDIGTTTSCVGVWQHDFVEILLANDCGNRTPPSYVAFTDTEPLIGDA&KNOVAMKPNVT	70
苹果 AAF34134.1	MAGRGCGPAIGIDIGTTTSCVGVWQHDFVEILLANDCGNRTPPSYVAFTDTEPLIGDA&KNOVAMKPNVT	70
高粱 XP002442353.1	MAGRGCGPAIGIDIGTTTSCVGVWQHDFVEILLANDCGNRTPPSYVAFTDTEPLIGDA&KNOVAMKPNVT	70
拟南芥 NP187864.1	MAGRGCGPAIGIDIGTTTSCVGVWQHDFVEILLANDCGNRTPPSYVAFTDTEPLIGDA&KNOVAMKPNVT	70
Consensus	magrgc gpaigidigttyscvgvwqhdrveillandcgnrtppsyaftd erligda&knqvamkp ntv	
平邑甜茶 HQ876864	FDARFLIGRRSDSVQGDKEUPFFRAIPGQDRKPTVVMNRCEERQF&EEISSMVLKMBEL&E&L	140
苹果 AAF34134.1	FDARFLIGRRSDSVQGDKEUPFFRAIPGQDRKPTVVMNRCEERQF&EEISSMVLKMBEL&E&L	140
高粱 XP002442353.1	FDARFLIGRRSDSVQGDKEUPFFRAIPGQDRKPTVVMNRCEERQF&EEISSMVLKMBEL&E&L	140
拟南芥 NP187864.1	FDARFLIGRRSDSVQGDKEUPFFRAIPGQDRKPTVVMNRCEERQF&EEISSMVLKMBEL&E&L	140
Consensus	fdakrligr sd svq d w p f k g p g k p m i v v k e e k q f e e i s s m v l k m e i s e a l g	
平邑甜茶 HQ876864	SSDKRAVVTVPAYFNDSPQCATKDA&GVIGLNWPIINEPT&A&A&L&YGL&EK&R&ATSV&G&EK&NVLI&F&L&GG&T	210
苹果 AAF34134.1	SSDKRAVVTVPAYFNDSPQCATKDA&GVIGLNWPIINEPT&A&A&L&YGL&EK&R&ATSV&G&EK&NVLI&F&L&GG&T	210
高粱 XP002442353.1	SSDKRAVVTVPAYFNDSPQCATKDA&GVIGLNWPIINEPT&A&A&L&YGL&EK&R&ATSV&G&EK&NVLI&F&L&GG&T	210
拟南芥 NP187864.1	SSDKRAVVTVPAYFNDSPQCATKDA&GVIGLNWPIINEPT&A&A&L&YGL&EK&R&ATSV&G&EK&NVLI&F&L&GG&T	210
Consensus	s s d k r a v v t v p a y f n d s p q c a t k d a g v i g l n w p i i n e p t a a a l a y g l e k r a t s v g e k n v l i f l g g g t	
平邑甜茶 HQ876864	FDVSILTI&EGIF&VR&AT&CDTHLGG&CF&DN&RW&NF&VQ&EF&R&EK&D&IG&SS&PR&AL&R&EL&RT&ACE&F&AR&TL	280
苹果 AAF34134.1	FDVSILTI&EGIF&VR&AT&CDTHLGG&CF&DN&RW&NF&VQ&EF&R&EK&D&IG&SS&PR&AL&R&EL&RT&ACE&F&AR&TL	280
高粱 XP002442353.1	FDVSILTI&EGIF&VR&AT&CDTHLGG&CF&DN&RW&NF&VQ&EF&R&EK&D&IG&SS&PR&AL&R&EL&RT&ACE&F&AR&TL	280
拟南芥 NP187864.1	FDVSILTI&EGIF&VR&AT&CDTHLGG&CF&DN&RW&NF&VQ&EF&R&EK&D&IG&SS&PR&AL&R&EL&RT&ACE&F&AR&TL	280
Consensus	fdv s i l t i e g i f v r k t a c d t h l g g c f d n r w n f v q e f r e k d i g s p r a l r l r t a c e f a r t l	
平邑甜茶 HQ876864	SSTA&CTTIE&DSL&EG&IDF&Y&TITRA&F&E&EL&NM&DL&F&R&C&M&E&P&V&E&R&C&L&D&A&K&M&D&R&S&V&H&D&V&V&L&G&G&S&T&R&I&P	350
苹果 AAF34134.1	SSTA&CTTIE&DSL&EG&IDF&Y&TITRA&F&E&EL&NM&DL&F&R&C&M&E&P&V&E&R&C&L&D&A&K&M&D&R&S&V&H&D&V&V&L&G&G&S&T&R&I&P	350
高粱 XP002442353.1	SSTA&CTTIE&DSL&EG&IDF&Y&TITRA&F&E&EL&NM&DL&F&R&C&M&E&P&V&E&R&C&L&D&A&K&M&D&R&S&V&H&D&V&V&L&G&G&S&T&R&I&P	350
拟南芥 NP187864.1	SSTA&CTTIE&DSL&EG&IDF&Y&TITRA&F&E&EL&NM&DL&F&R&C&M&E&P&V&E&R&C&L&D&A&K&M&D&R&S&V&H&D&V&V&L&G&G&S&T&R&I&P	350
Consensus	s s t a c t t i e i d s l e g i d f y t i t r a f e e l n m d l f r c m e p v e k l r d s k m d k s v h d v v l g g s t r i p	
平邑甜茶 HQ876864	FVQQLQDFF&NG&K&EL&C&R&IN&P&D&E&A&V&A&Y&C&A&V&Q&A&A&I&I&S&G&E&G&N&E&F&V&Q&D&L&L&L&D&V&T&P&L&S&L&C&L&E&T&A&G&G&M&T&V&L&I	420
苹果 AAF34134.1	FVQQLQDFF&NG&K&EL&C&R&IN&P&D&E&A&V&A&Y&C&A&V&Q&A&A&I&I&S&G&E&G&N&E&F&V&Q&D&L&L&L&D&V&T&P&L&S&L&C&L&E&T&A&G&G&M&T&V&L&I	420
高粱 XP002442353.1	FVQQLQDFF&NG&K&EL&C&R&IN&P&D&E&A&V&A&Y&C&A&V&Q&A&A&I&I&S&G&E&G&N&E&F&V&Q&D&L&L&L&D&V&T&P&L&S&L&C&L&E&T&A&G&G&M&T&V&L&I	420
拟南芥 NP187864.1	FVQQLQDFF&NG&K&EL&C&R&IN&P&D&E&A&V&A&Y&C&A&V&Q&A&A&I&I&S&G&E&G&N&E&F&V&Q&D&L&L&L&D&V&T&P&L&S&L&C&L&E&T&A&G&G&M&T&V&L&I	420
Consensus	v q q l l q d f f n g k e l c k i r p d e a v a y c a a v q a a i i s g e g n e f v q d l l l l d v t p l s l c l e t a g g m t v l i	
平邑甜茶 HQ876864	PRNTTPTK&R&EQ&F&ST&YS&D&N&Q&P&G&V&L&I&Q&V&Y&E&G&E&R&P&T&D&M&N&L&L&K&F&E&L&S&G&I&P&P&A&P&R&G&V&Q&I&T&V&C&F&I&D&A&N&G	490
苹果 AAF34134.1	PRNTTPTK&R&EQ&F&ST&YS&D&N&Q&P&G&V&L&I&Q&V&Y&E&G&E&R&P&T&D&M&N&L&L&K&F&E&L&S&G&I&P&P&A&P&R&G&V&Q&I&T&V&C&F&I&D&A&N&G	490
高粱 XP002442353.1	PRNTTPTK&R&EQ&F&ST&YS&D&N&Q&P&G&V&L&I&Q&V&Y&E&G&E&R&P&T&D&M&N&L&L&K&F&E&L&S&G&I&P&P&A&P&R&G&V&Q&I&T&V&C&F&I&D&A&N&G	490
拟南芥 NP187864.1	PRNTTPTK&R&EQ&F&ST&YS&D&N&Q&P&G&V&L&I&Q&V&Y&E&G&E&R&P&T&D&M&N&L&L&K&F&E&L&S&G&I&P&P&A&P&R&G&V&Q&I&T&V&C&F&I&D&A&N&G	490
Consensus	p r n t t p t k r e q f s t y s d n q p g v l i q v y e g e r t d m n l l k f e l s g i p p a p r g v q i t v c f i d a n g	
平邑甜茶 HQ876864	ILN&V&S&A&E&D&K&T&T&G&Q&N&K&I&T&I&N&D&R&G&L&S&F&E&I&E&K&M&V&C&A&E&K&Y&E&D&E&E&H&K&K&V&A&K&N&I&E&N&Y&A&Y&N&P&N&T&I&R	560
苹果 AAF34134.1	ILN&V&S&A&E&D&K&T&T&G&Q&N&K&I&T&I&N&D&R&G&L&S&F&E&I&E&K&M&V&C&A&E&K&Y&E&D&E&E&H&K&K&V&A&K&N&I&E&N&Y&A&Y&N&P&N&T&I&R	560
高粱 XP002442353.1	ILN&V&S&A&E&D&K&T&T&G&Q&N&K&I&T&I&N&D&R&G&L&S&F&E&I&E&K&M&V&C&A&E&K&Y&E&D&E&E&H&K&K&V&A&K&N&I&E&N&Y&A&Y&N&P&N&T&I&R	560
拟南芥 NP187864.1	ILN&V&S&A&E&D&K&T&T&G&Q&N&K&I&T&I&N&D&R&G&L&S&F&E&I&E&K&M&V&C&A&E&K&Y&E&D&E&E&H&K&K&V&A&K&N&I&E&N&Y&A&Y&N&P&N&T&I&R	560
Consensus	i l n v s a e d k t t g q n k i t i t n d r g l s f e e i e k m v c a e k y e d e e h k k v a k n i e n y a y n p n t i r	
平邑甜茶 HQ876864	DDRL&S&K&L&D&A&D&K&K&R&I&E&D&A&I&C&A&I&Q&W&L&D&N&Q&L&A&E&A&C&E&F&E&D&K&M&E&L&E&S&I&C&A&P&I&L&P&M&Y&C&G&A&G&G&P&V&G&G&M	630
苹果 AAF34134.1	DDRL&S&K&L&D&A&D&K&K&R&I&E&D&A&I&C&A&I&Q&W&L&D&N&Q&L&A&E&A&C&E&F&E&D&K&M&E&L&E&S&I&C&A&P&I&L&P&M&Y&C&G&A&G&G&P&V&G&G&M	630
高粱 XP002442353.1	DDRL&S&K&L&D&A&D&K&K&R&I&E&D&A&I&C&A&I&Q&W&L&D&N&Q&L&A&E&A&C&E&F&E&D&K&M&E&L&E&S&I&C&A&P&I&L&P&M&Y&C&G&A&G&G&P&V&G&G&M	630
拟南芥 NP187864.1	DDRL&S&K&L&D&A&D&K&K&R&I&E&D&A&I&C&A&I&Q&W&L&D&N&Q&L&A&E&A&C&E&F&E&D&K&M&E&L&E&S&I&C&A&P&I&L&P&M&Y&C&G&A&G&G&P&V&G&G&M	630
Consensus	d k i s s k l d k k r i e d a i a i c a i q w l d n q l a e a c e f e d k m e l e s i c a p i l p m y c g a g g p v g g m	
平邑甜茶 HQ876864	DD&V&P&A&G&G&S&A&G&H&R&I&E&V&D	650
苹果 AAF34134.1	DD&V&P&A&G&G&S&A&G&H&R&I&E&V&D	650
高粱 XP002442353.1	DD&V&P&A&G&G&S&A&G&H&R&I&E&V&D	650
拟南芥 NP187864.1	DD&V&P&A&G&G&S&A&G&H&R&I&E&V&D	650
Consensus	d d p g p k i e e v d	

图2 平邑甜茶 *MhHSP70* 与苹果、高粱和拟南芥 *HSP70* 所编码氨基酸的多序列比对

Fig. 2 Multiple alignment of amino acid sequence of the deduced *MhHSP70* (HQ876864) with well-known those of *Malus pumila* (AAF 34134.1), *Sorghum bicolor* (XP002442353.1) and *Arabidopsis thaliana* (NP187864.1)

2.2 平邑甜茶 *MhHSP70* 序列同源性比较

经 DNASTar 分析发现, *MhHSP70* 全长 2 307 bp, 含有 1 953bp 的完整编码区, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TAA, 包括 143 bp 的 5'非翻译区 (5'-UTR) 和 211 bp 的 3'非翻译区 (3'-UTR), 编码 650 个氨基酸; 将其核酸序列提交 NCBI 在线比对发现, 平邑甜茶 *MhHSP70* 与苹果 *HSP70* (AF161180.1) 同源性最高, 达到 71.86%, 与葡萄 (XM 002283480.1)、白杨 (XM 002312054.1) 和山茶 (EU714122.1) *HSP70* 的同源性分别达到 60.54%、60.39%和 60.13%。

使用 DNAMAN 进行氨基酸序列比对得到图 2, 可见平邑甜茶 *MhHSP70* 编码氨基酸进化高度保守, 序列中包含真核生物 HSP70 高度保守的 3 个家族标签: DLGTTYS (13-19aa), IFDLGGGTDFVSL (203-215aa), VVLVGGSTRIPKVAA (340-354aa) 及胞质 HSP70 特征序列 EEVD (647-650aa)。

2.3 平邑甜茶 *MhHSP70* 编码氨基酸的系统进化树分析

用 Mega 4.1 和 clustal 1.8.1 软件, 对 *MhHSP70* 编码蛋白与已知植物 HSP70 蛋白进行进化树分析, 由图 3 可以看出其与苹果 (AAF34134.1)、番茄 (P27322.1) 和烟草 (AAR17080.1) 具有最近的亲缘关系。

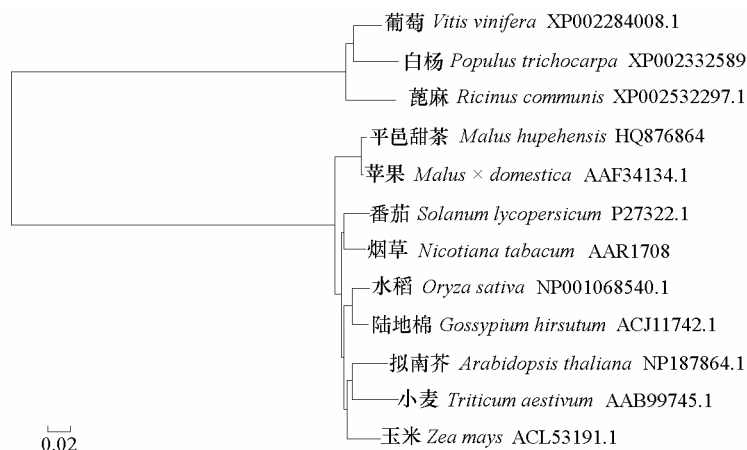


图 3 不同物种间 *HSP70* 编码氨基酸序列 MP 树分析

Fig. 3 Maximum parsimony tree of amino acid sequence of *HSP70* gene in different species

2.4 平邑甜茶 *MhHSP70* 编码氨基酸的性质及结构分析

ProtParam Tool 分析表明 *MhHSP70* 编码蛋白分子量为 71 205.6 D, 分子式为 $C_{3117}H_{5011}N_{861}O_{993}S_{24}$, 理论 pI 值为 5.17; 理论半衰期为 30 h, 属于稳定蛋白。

SAPS 在线分析显示, *MhHSP70* 编码蛋白中甘氨酸 (A)、谷氨酸 (E) 和赖氨酸 (K) 含量最高, 分别为 8.6%、8.3%和 8.2%。

SOPMA 在线分析表明, *MhHSP70* 编码蛋白中 α -螺旋的比例最高为 44.77%, 无规则卷曲、延伸链和 β -转角的比例分别为 28.52%、31.38%和 6.31%。

ProtScale、TMpred 和 SignalP 3.0 在线分析表明, 该蛋白属于可溶性蛋白, 无跨膜区, 是一种非分泌蛋白, 且没有信号肽。

亚细胞定位软件 CELLO 分析显示, *MhHSP70* 编码蛋白在细胞质中的分值极高, 为 2.892; Plant-mPLoc 及 WoLFPSORT 软件也预测 *MhHSP70* 编码蛋白定位于细胞质内; 细胞核定位信号专项预测软件 NUCLEO 和 NucPred 的 NLS 数值分别为 0.40 和 0.21, 进一步证明该蛋白位于细胞质内。

利用 NetPhos 2.0、NetNGlyc1.0 和 NetOGlyc 3.1 分析显示, *MhHSP70* 编码蛋白存在 16 个丝氨酸位点、12 个苏氨酸位点和 5 个酪氨酸位点, 在 38、155、423 及 493 位氨基酸处存在 4 个 N-糖基化位点, 没有 O-糖基化位点。

2.5 *MhHSP70* 对硫酸镉处理的反应

利用 *MhHSP70* 特异性片段引物 P1-P2 进行半定量 RT-PCR 分析表明, *MhHSP70* 在平邑甜茶根系与叶片中均有表达, 经 $50 \sim 300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸镉处理后, *MhHSP70* 表达增强; 在根系中, 随浓度的升高, 表达量逐渐升高; 在叶片中, *MhHSP70* 表达量在处理浓度为 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时最高(图 4)。

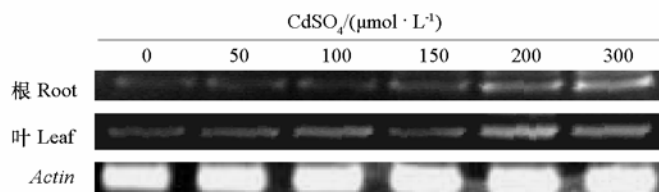


图 4 硫酸镉胁迫下 *MhHSP70* 的表达情况

Fig. 4 Expression of *MhHSP70* under cadmium stress

2.6 *MhHSP70* 对渗透胁迫的反应

2.6.1 氯化钠处理下 *MhHSP70* 的表达

图 5 显示, 平邑甜茶幼苗受到 $50 \sim 200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠处理后, 不论在叶片还是根系中, *MhHSP70* 表达均增强, 而且随氯化钠浓度的升高, 表达量逐渐升高。

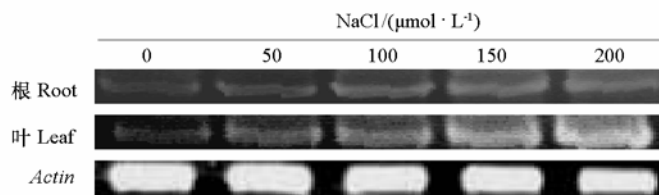


图 5 氯化钠胁迫下 *MhHSP70* 的表达情况

Fig. 5 Expression of *MhHSP70* under NaCl stress

2.6.2 PEG6000 处理下 *MhHSP70* 的表达

由图 6 可以看出, 用 20%PEG 处理后, 平邑甜茶幼苗叶片和根系 *MhHSP70* 表达明显增强; 在 $0.5 \sim 5 \text{ h}$ 内, *MhHSP70* 表达量随时间的延长而逐渐增加。

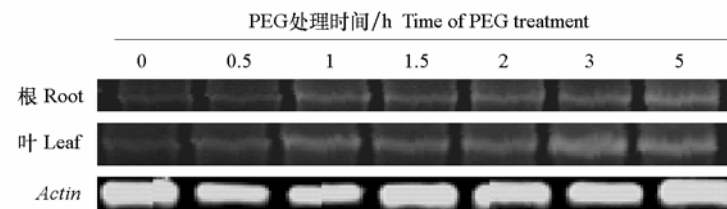


图 6 在干旱胁迫下 *MhHSP70* 的表达情况

Fig. 6 Expression of *MhHSP70* under drought stress

3 讨论

HSP70 是热休克蛋白超家族的一个成员, 应用生物学信息学软件分析表明平邑甜茶 *MhHSP70*

编码蛋白质具有真核生物 HSP70 高度保守的 3 个家族标签以及末尾基序 EEVD 等 HSP70 的典型序列 (Sun et al., 1996), 进化上高度保守, 定位于细胞质内, α -螺旋的比例最高, 具有疏水性和稳定性等特征, 和苹果、葡萄、水稻、小麦等植物的 HSP70 都有较高的同源性。

热休克蛋白是一类在生物进化中高度保守的蛋白, 其中 HSP70 为最保守和最重要的一族, 对高温胁迫非常敏感。本研究利用 *MhHSP70* 试验则发现, HSP70 还对镉、氯化钠与 PEG 带来的胁迫也非常敏感, 并且随着胁迫程度的加剧, *MhHSP70* 的表达水平逐渐升高, 这种反应与植物受热激后 HSP70 的表达规律基本一致 (Pierre & Paolo, 2007; Su & Li, 2008)。

HSP 能够维持蛋白和生物膜结构的稳定性 (Ahn & Zimmerman, 2006; Lee et al., 2007), 并可清除活性氧 (Gustacsson et al., 2002) 等, 因此, 通过相应的胁迫处理, 诱导 HSP70 基因大量表达, 将有助于 HSP70 蛋白参与到植物的保护当中, 当植物再次遭受逆境胁迫后, HSP70 蛋白会保护植物免受伤害 (Timperio et al., 2008)。事实上, 已有研究表明, 过量表达 HSP70 不仅能有效的提高植物耐热性 (Sung & Guy, 2003), 还能显著增强植物对干旱、低温等多种胁迫的抗性 (Sanmiya et al., 2004; Cho & Hong, 2005), 因此, *MhHSP70* 在镉和渗透胁迫下表达增强, 应当有利于提高平邑甜茶抵抗胁迫的能力。

References

- Ahn Y J, Zimmerman J L. 2006. Introduction of the carrot HSP17.7 into potato (*Solanum tuberosum* L.) enhances cellular membrane stability and tuberization *in vitro*. *Plant Cell and Environment*, 29 (1): 95 - 104.
- Banti V, Mafessoni F, Loreti E, Alpi A, Perata P. 2010. The heat-inducible transcription factor HsfA2 enhances anoxia tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 152 (3): 1471 - 1483.
- Boorstein W R, Ziegelhoffer T, Craigea. 1994. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *Journal of Molecular Evolution*, 38 (1): 1 - 17.
- Cho E K, Hong C B. 2005. Over-expression of tobacco NtHSP70-1 contributes to drought-stress tolerance in plants. *Plant Cell Report*, 25: 349 - 358.
- Gustacsson N, Kokke B P, Harrndahl U, Silow M, Bechtold U, Poghosyan Z, Murphy D, Boelens W, Sundby C. 2002. A peptide methionine sulfoxide reductase highly expressed in photosynthetic tissue in *Arabidopsis thaliana* can protect the chaperone-like activity of a chloroplast-localized small heat shock protein. *Plant J*, 29 (5): 543 - 553.
- Latijnhouwers M, Xu X M, Möller S G. 2010. *Arabidopsis* stromal 70-kDa heat shock proteins are essential for chloroplast development. *Planta*, 232 (3): 567 - 578.
- Lee U, Rioflorido I, Hong S W, Larkindale J, Waters E R, Vierling E. 2007. The *Arabidopsis* CipB/Hsp 100 family of proteins: Chaperones for stress and chloroplast development. *Plant J*, 49: 115 - 127.
- Matuszewska E, Kwiatkowska J, Kuczynska-Wisnik D, Laskowska E. 2008. *Escherichia coli* heat-shock proteins IbpA/B are involved in resistance to oxidative stress induced by copper. *Microbiology*, 154 (6): 1739 - 1747.
- Pierre Goloubinoff, Paolo De Los Rios. 2007. The mechanism of Hsp70 chaperones: (entropic) pulling the models together. *Trends in Biochemical Sciences*, 32 (8): 372 - 380.
- Ran Kun. 2009. Cloning of vacuolar processing enzyme gene, *MhVPE*, in *Malus hupehensis* (Pamp) Rehd. and its bioinformatics analysis [M. D. Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 冉 昆. 2009. 平邑甜茶 *MhVPE* 基因的克隆及其生物信息学分析 [硕士论文]. 泰安: 山东农业大学.
- Rérole A L, Jegou G, Garrido C. 2011. Hsp70: Anti-apoptotic and tumorigenic protein. *Methods in Molecular Biology*, 787: 205 - 230.
- Richter K, Haslbeck M, Buchner J. 2010. The heat shock response: Life on the verge of death. *Molecular Cell*, 40 (2): 253 - 266.
- Sanmiya K, Suzuki K, Egawa Y, Shono M. 2004. Mitochondrial small heat-shock protein enhances thermotolerance in tobacco plants. *FEBS Lett*, 557: 265 - 268.
- Shi L X, Theg S M. 2010. A stromal heat shock protein 70 system functions in protein import into chloroplasts in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell*, 22: 205 - 220.

