

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180510001

http://www.yykxjz.cn/

曾俊, 陈伟洲, 陈泽攀, 刘浩然. 广东紫菜 *Hsp70* 基因 cDNA 克隆与表达分析. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 131-139  
Zeng J, Chen WZ, Chen ZP, Liu HR. The cDNA cloning and expression analysis of the *Hsp70* gene from *Pyropia guangdongensis*.  
Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 131-139

## 广东紫菜 *Hsp70* 基因 cDNA 克隆与表达分析\*

曾俊 陈伟洲<sup>①</sup> 陈泽攀 刘浩然

(汕头大学 广东省海洋生物技术重点实验室 汕头 515063)

**摘要** 为探索广东紫菜(*Pyropia guangdongensis*)叶状体 *Hsp70* 基因在温度刺激下机体耐温相关分子机制, 为广东紫菜的栽培生产提供技术参考, 本研究利用 RACE 技术获得了广东紫菜 *Hsp70* 基因(*PgHsp70*)全长序列, 并在此基础上采用实时荧光定量 PCR 技术, 研究广东紫菜叶状体分别在不同温度(22℃、27℃和 31℃)条件下处理 0、1/6、1/2、1、6、12、24 和 36 h 后 *PgHsp70* 基因的差异表达。结果显示, *PgHsp70* 基因序列长 2004 bp, 包含一个 1866 bp 的开放阅读框, 可编码 621 个氨基酸, 预测分子量为 67.7 kDa, 理论等电点为 4.87。基因表达水平定量分析表明, 温度对 *PgHsp70* 基因表达水平有显著影响, *PgHsp70* 基因在不同温度的表达水平变化趋势基本一致, 均呈现先上调后下降的趋势, 且均于 1 h 表达量到达最高水平, 其中, 在 31℃ 1 h 表达量最高, 为未经高温处理组的 11 倍, 说明 *PgHsp70* 基因在应答高温胁迫中发挥着重要的作用。

**关键词** 广东紫菜; 高温胁迫; *Hsp70*; cDNA 末端快速扩增技术(RACE); qRT-PCR

**中图分类号** S917.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)04-0131-09

生物有机体受到外界有害因素刺激时, 很多基因表达会受到抑制, 而热休克基因在刺激下表达增强, 产生的蛋白称热休克蛋白或热激蛋白(Hsp)(王宇萍等, 2010)。Hsp 在果蝇(*Drosophila*)中首次发现(Ritossa, 1962)。Tisserers 等(1974)从果蝇幼体中分离出 6 种新的蛋白质, 命名为热激蛋白。至今, 大量研究证明, 主要的热激蛋白都有分子伴侣的功能。而 *Hsp70* 是 Hsp 家族中进化上最保守和研究最多的一类热激蛋白, 按表达情况可将 *Hsp70* 蛋白分为结构型热激蛋白 Hsc70 和诱导型热激蛋白 *Hsp70* 两大类; 按定位情况可将 *Hsp70* 蛋白分为定位于细胞质、内质网、线粒体和质体的 4 个亚家族(Guy *et al*, 1998)。*Hsp70* 蛋白的功能十分广泛, 具有多种生物学功能, 例如, *Hsp70* 是主要分子伴侣蛋白之一(Bukau *et al*, 2013; Mayer, 2013), 与肿瘤的发生相关, 具有调控细胞增殖的功

能(Zhang *et al*, 2002), 参与细胞保护、提高细胞应激耐受性(Mayer *et al*, 2005), 抗细胞凋亡(Snoeckx *et al*, 2001)等。目前, 对紫菜属海藻 *Hsp70* 基因的研究工作主要集中在栽培种类坛紫菜(*Pyropia haitanensis*) (赖晓娟等, 2014)和条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*) (周向红等, 2011)以及非传统栽培种长紫菜(*Pyropia dentata*)、皱紫菜(*Pyropia crispata*) (郑红妍, 2017)和列紫菜(*Pyropia seriata*) (San *et al*, 2015), 为深入研究紫菜 *Hsp70* 基因的功能奠定了基础, 而对广东紫菜(*Pyropia guangdongensis*)*Hsp70* 基因的研究尚未见相关报道。

广东紫菜属红藻门(Phodophyta)、红藻纲(Rhodophyceae)、红毛菜亚纲(Bangiophycidae)、红毛菜目(Bangiales)、红毛菜科(Bangiaceae)、紫菜属(*Pyropia*), 主要分布于广东等沿岸海区(郑宝福等, 2009; Tseng *et al*, 1978)。在自然环境中, 影响紫菜生长的环境因

\* 现代农业产业技术体系专项(CARS-50)资助 [This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-50)]. 曾俊, E-mail: 1207615382@qq.com

① 通讯作者: 陈伟洲, 教授, E-mail: wzchen@stu.edu.cn

收稿日期: 2018-05-10, 收修改稿日期: 2018-05-30

素很多,如高温、盐胁迫的、干出失水等(李晓蕾等,2017)。其中,温度是影响紫菜生长的最重要的环境因子,直接影响紫菜的生长状态以及品质(李兵等,2013)。广东紫菜有一定的高温适应性(王永川等,1978、1982),而大量证据表明,Hsp70 蛋白家族在藻类适应环境的过程中起重要的作用,例如,坛紫菜在 29℃ 高温胁迫 3 h 后,5 条 *Hsp70* 基因的表达水平都显著升高;在极度干燥的条件下,坛紫菜 *Hsp70* 基因表达水平显著上升,表现出适应高温胁迫和干燥胁迫的作用(Ji *et al.*, 2015)。Hsp70 蛋白家族与广东紫菜的高温适应性也直接相关,因此,研究广东紫菜 *Hsp70*(*PgHsp70*)基因具有重要意义。本研究开展 *PgHsp70* 基因的全长克隆,并在此基础上,研究分析其在不同温度胁迫过程中的差异表达,以期从 *Hsp70* 基因表达水平初步揭示广东紫菜对高温胁迫的响应特点,为广东紫菜的栽培生产提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料预培养与胁迫处理

广东紫菜于2016年11月采集于广东省汕头市南澳县深澳湾海区(23°28'52"N, 117°06'35"E)的人工栽培网帘,快速运回实验室,挑选健康、长度一致(约为

10~15 cm)的藻体进行灭菌海水清洗处理,在温度 20℃ 和光照强度约 90  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$  的条件下用砂滤后抽滤的自然海水(盐度 30)暂养 2 d。

取 1 组广东紫菜用滤纸吸干,液氮迅速预冷,保存至 -80℃ 冰箱,用于 *PgHsp70* 基因的全长克隆。另取一组广东紫菜在智能光照培养箱内进行高温胁迫实验,用于基因表达水平的实时荧光定量 PCR 分析。参照南澳岛海区广东紫菜自然生长的特性,以 22℃ 为对照组,海水盐度为 30,光照强度为 90  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ,设置 2 个高温组: 27℃ 和 31℃,在智能光照培养箱中进行高温胁迫处理 0、1/6、1/2、1、6、12、24 和 36 h 后分别取样,液氮迅速保存后至 -80℃ 冰箱,每个处理设置 3 个平行。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 引物及序列** 同源扩增、RACE 扩增、阳性克隆筛选以及荧光定量 PCR 分析所采用的引物用 Primer Premier 5 软件设计,由北京六合华大基因科技有限公司合成,引物序列见表 1。200  $\mu\text{l}$  UPM: Long UPM (10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 8  $\mu\text{l}$ , Short UPM (10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 40  $\mu\text{l}$ , ddH<sub>2</sub>O 152  $\mu\text{l}$ 。

**1.2.2 广东紫菜总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成** 用于全长克隆的总 RNA 提取按照 RNAiso Plus

表 1 实验中引物的名称和序列

Tab.1 Name and sequence of primers used in the experiment

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
PF	CCCGAAGAGATTCCGCTCAAGTA	同源扩增
PR	AACTTCAATTTGAGGAACGCCTCT	Homologous amplification
5'RACE1	CCATTCACAATTTGTTGGTCAAAGTCATC	5'RACE
5'RACE2	CATCTAAACCGGCTATTTTACCGGCATC	
5'RACE3	CAACAAGTTTTCTGAGTACTTGAGCGGA	
5'RACE4	GGTTTACCTCCTTCCATAACAGCAATCACA	
3'RACE1	CTGCTACACAAGATGGTCCCAAGCACTT	3'RACE
3'RACE2	ACCCAGATGAAGTTGTTGCTATTGGAGC	
3'RACE3	GGAGTAGAACTTTAGGTGGGGTAATGACG	
3'RACE4	AGATGGTATTATGCCTGCACCTAGAGGCGT	
3'RACE5	TATTGATACTAAGAATCAAGCAGAATCTTTATGT	
QF	CCCGAAGAGATTCCGCTCAAGTA	实时荧光定量 PCR
QR	CTAAACCGGCTATTTTACCGGCAT	qRT-PCR
UBCF	TCACAACGAGGATTTACCACC	内参基因
UBCR	GAGGAGCACCTTGGAACG	Reference gene
M13F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	阳性克隆筛选
M13R	AGCGGATAACAATTCACACAGGA	Positive clones screening
Long UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE
Short UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	

Total RNA(TaKaRa)提取试剂说明书(Raha *et al*, 1990)进行操作, 提取的 RNA 经琼脂糖凝胶电泳检查完整性, 并利用 NanoDrop2000 超微量分光光度计测定 RNA 浓度及纯度, 判断核酸和蛋白质的污染情况。选取质量良好的 RNA 按照 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa)和 SMARTer RACE 5'/3' cDNA Kit Components(TaKaRa)的操作说明书(Tian *et al*, 2013; Tang *et al*, 2013; Freeman, 2013)进行反转录, 分别得到 cDNA、5'RACE cDNA 及 3'RACE cDNA, 保存至-20℃冰箱, 分别用于 *PgHsp70* 基因中间片段的克隆以及 5'RACE 和 3'RACE 扩增。

用于荧光定量检测的总 RNA 提取按照 RNAfast200-总 RNA 极速抽提试剂盒(上海飞捷生物技术有限公司)的说明书(武荣等, 2011)进行操作, 利用 NanoDrop2000 超微量分光光度计测定 RNA 浓度及  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  值, 选取质量良好的 RNA 根据 PrimeScript<sup>®</sup> RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)(TaKaRa)的说明书(Zhang *et al*, 2013)进行反转录(以 RNA 900 ng 为基准), 所得的 cDNA 用 UBC 引物进行检验, 保存至-20℃冰箱备用。

**1.2.3 *PgHsp70* 基因的全长克隆** 从 NCBI 中搜索条斑紫菜(GenBank No.: DQ497595.1), 坛紫菜(GenBank No.: DQ480726)的 *Hsp70* 基因的核酸序列, 进行序列比对并找出保守区域, 设计引物 PF 和 PR (表 1)。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测, 并用凝胶回收试剂盒回收, 利用 T-A 克隆方法克隆到 pMD19-T 载体上, 转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 用含 Amp 的 LA 固体培养基进行 37℃ 过夜培养, 挑取单菌落于 1 ml LA 培养液中 37℃ 200 r/min 震荡培养 6 h, 进行菌液 PCR 检测, 挑取阳性克隆。将含有目的片段的阳性菌落交由北京六合华大基因科技有限公司进行测序。测序结果与 NCBI 上其他物种的 *Hsp70* 基因进行比对和同源性分析, 确定为 *PgHsp70* 基因中间片段。

根据克隆得到的 *PgHsp70* 基因片段序列, 分别设计 5'RACE 和 3'RACE 的特异性扩增引物(表 1)。分别以 5'cDNA 和 3'cDNA 模板进行 5'RACE 和 3'RACE 扩增, 将 RACE 扩增的目的片段切胶回收、连接、转化、阳性克隆筛选、送样测序。

根据基因测序获得的 *PgHsp70* 基因 5'和 3'及中间片段序列, 利用 DNAMAN V6.0 软件进行拼接, 获得 *PgHsp70* 基因全长序列。

**1.2.4 *PgHsp70* 基因的生物信息学分析** 采用 ORF Finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)分析获得的 *PgHsp70* 基因的开放阅读框和所编码氨基酸

序列; 利用在线工具([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))预测该基因氨基酸序列的分子量和等电点; 用在线软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测该基因氨基酸序列功能结构域; 利用 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)和 PROSITE (<https://prosite.expasy.org/>)在线软件分析该基因编码的氨基酸序列保守位点及特征序列; 利用 PrediSi (<http://www.Predisi.de>)预测所得蛋白是否含有信号肽; 利用 NCBI 网站上 BLAST 序列分析工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)搜索用于同源性比对分析与系统进化树构建的氨基酸序列; 采用 DNAMAN 6.0 进行氨基酸多重序列比对; 通过 MEGA 5.1 软件, 构建 NJ 系统进化树。

**1.2.5 高温胁迫下 *PgHsp70* 基因的表达分析** 根据 *PgHsp70* 基因全长序列设计 qRT-PCR 正反向引物 QF 和 QR, 并以 UBC 作为内参基因(表 1)。以广东紫菜叶状体在不同高温胁迫条件下各时间的 cDNA 为模板, 在 Roche light Cycler 480 II 仪器进行实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)。20  $\mu$ l 反应体系: Tip Green 10  $\mu$ l, Q<sub>1</sub>F 0.8  $\mu$ l, Q<sub>1</sub>R 0.8  $\mu$ l, cDNA 2  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 6.4  $\mu$ l。每次反应均设阴性对照和无模板对照, 每个反应设 3 个重复。扩增程序: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 20 s, 40 个循环; 循环结束后从 60℃ 缓慢升温至 95℃; 40℃ 冷却 30 s。所得实验数据采用相对 CT 法( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ )进行 *PgHsp70* 基因 mRNA 的表达量计算。

### 1.3 数据处理

应用 Excel 和 SPSS 13.0 软件对实验数据进行处理与统计分析, 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,  $P < 0.05$  表示有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 *PgHsp70* 基因的克隆及序列分析

以广东紫菜 cDNA 为模板, 用引物 PF/PR 进行普通 PCR 扩增, 1%的琼脂糖凝胶电泳扩增产物, 观察到 1 条扩增条带, 约为 1100 bp(图 1a), 将其切胶回收, 克隆并送去测序, 得到一段 1061 bp 的基因序列。进行 BLAST 比对发现, 其与 *P. haitanensis* (GenBank No.: DQ480726)的 *Hsp70* 基因核酸序列同源性达 99%, 与 *P. yezoensis* (GenBank No.: DQ497595.1)的 *Hsp70* 基因核酸序列同源性达到 90%, 进而推断该片段为 *PgHsp70* 的基因片段。

广东紫菜通过 RACE 技术扩增并测序, 分别获得长为 337 bp 的 5'序列和 606 bp 的 3'序列(图 1b、c)。

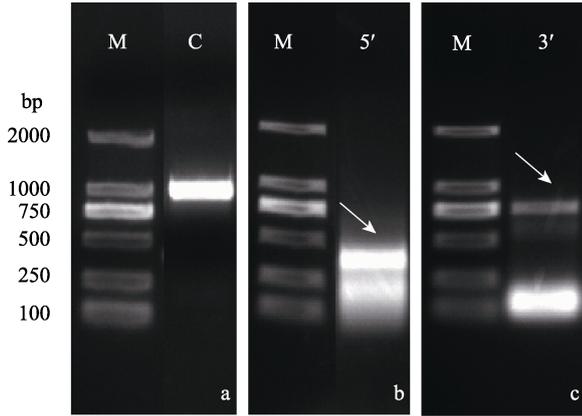


图1 *PgHsp70* 基因克隆产物凝胶电泳  
Fig.1 Agarose electrophoresis of RACE or PCR products of *PgHsp70* genes

a: *PgHsp70* 基因的中间片段扩增产物; b: *PgHsp70* 基因的5'RACE 扩增产物(箭头); c: *PgHsp70* 基因的3'RACE 扩增产物(箭头). M: DNA marker DL 2000; C: 对照  
a: Core fragment amplification product of *PgHsp70* genes;  
b: 5'RACE amplification products of *PgHsp70* (arrow);  
c: 3'RACE amplification products of *PgHsp70* (arrow);  
M: DNA marker DL 2000; C: Control

将2条序列与之前克隆得到的 *Hsp70* 基因部分序列进行拼接, 获得长为 2004 bp 的 *Hsp70* 基因全长序列。经过 Blast 比对, 确认其为广东紫菜的 *Hsp70* 基因, 命名为 *PgHsp70*。通过 ORF Finder 软件分析发现, 广东紫菜 *Hsp70* 基因开放阅读框为 1866 bp, 以 ATG 为起始密码子, TAA 为终止子, 可编码 621 个氨基酸, 预测分子量约为 67.7 kDa, 理论等电点为 4.87。5'非编码区(5' TR)7 bp, 3'非编码区(3' UTR)131 bp(图 2)。利用 InterProScan 软件分析克隆得到的 *PgHsp70* 基因氨基酸序列, 378~534 位点是多肽结合域(Peptide-binding domain), 527~595 位点是 C 末端结构域(C-terminal domain)(图 2)。使用 Prosite 在线软件分析发现, 该基因编码的氨基酸序列有 *HSP70* 家族的 3 条特征性序列: IDLGTTNS, VFDLGGGTFDVSVL, VVLVGGSTRIPAIQQ(图 2)。PrediSi 预测软件并未在该基因中发现信号肽序列。

2.2 *PgHsp70* 基因多序列比对及系统进化树分析

广东紫菜 *Hsp70* 基因编码的氨基酸序列经 BLAST 比对发现, 与其他物种的 *Hsp70* 基因有较高同源性。利

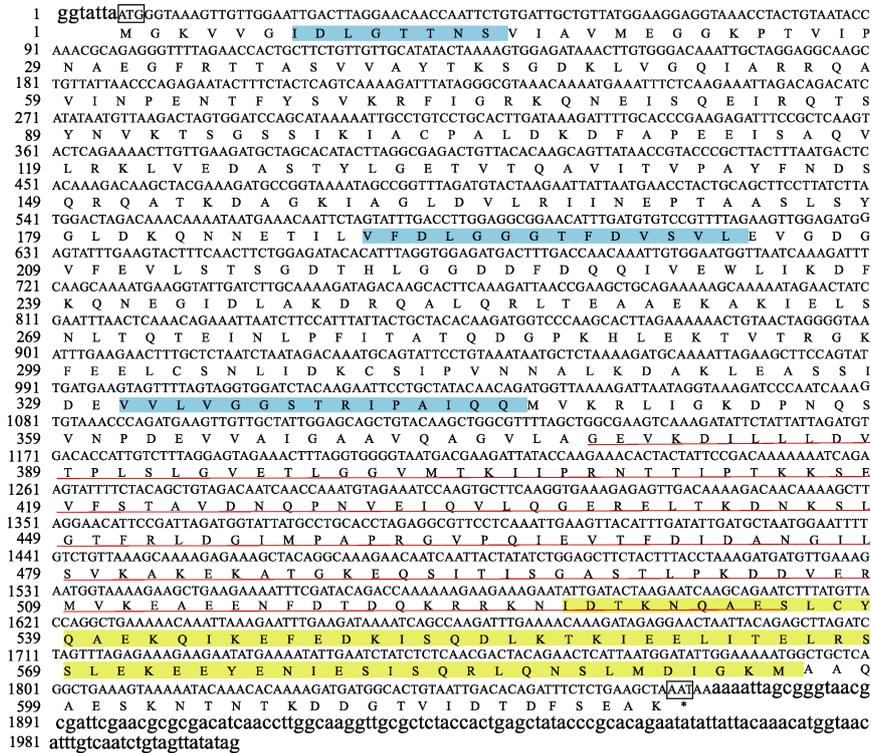


图2 广东紫菜 *Hsp70* 基因的核苷酸序列和氨基酸序列  
Fig.2 Nucleotide sequence and amino acid sequence of *PgHsp70*

蓝色方框区域表示 *Hsp70* 蛋白家族的序列特征; 黄色方框区域表示 C 末端结构域, 红色“—”表示多肽结合域; 方框所示为起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)

Blue boxes represent sequences of HSP70 protein family, Yellow boxes represent C-terminal domain, Polypeptide binding domain is underlined with red “—”, Start codon(ATG) and termination codon(TAA) are shown in the box

用 DNAMAN 6.0 进行氨基酸多重序列比对分析结果显示,不同物种间的 *Hsp70* 序列非常保守,其中, *PgHsp70* 氨基酸序列与坛紫菜 *Hsp70* 氨基酸序列相似性最高(99%), 其次分别与条斑紫菜 *Hsp70* 氨基酸序列相似性

达 98%, 与 *P. perforate* 的 *Hsp70* 氨基酸序列相似性达 97%, 与脐形紫菜(*P. umbilicalis*) *Hsp70* 氨基酸序列相似性达 94%, 与细基江蓠繁枝变种(*Gracilaria tenuistipitata* var. *liui*)*Hsp70* 氨基酸序列相似性达 78%(图 3)。

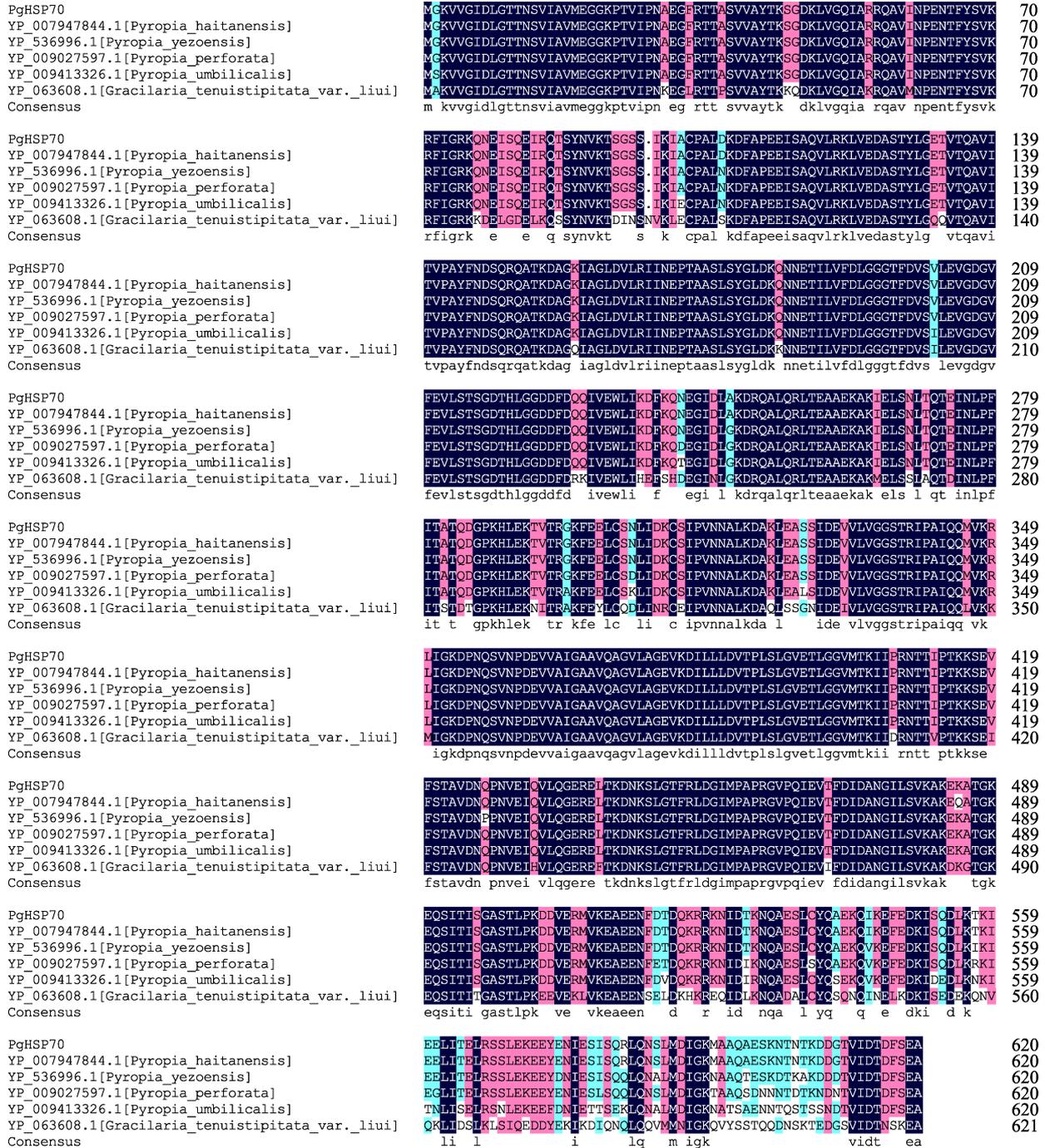


图 3 *Hsp70* 的氨基酸序列多重序列比对

Fig.3 Multiple alignment of amino acid sequences of *Hsp70*

黑色区域: 相似性 100%; 粉红区域: 相似性≥75%; 蓝色区域: ≥50%  
 Black area: Similarity is 100%; Pink area: Similarity is greater than or equal to 75%;  
 Blue area: Similarity is greater than or equal to 50%

为了确定 *PgHsp70* 的系统进化关系,通过 MEGA 5.1 软件,采用 Neighbor-Joining 法构建了 *PgHsp70* 及选取的 17 条代表性的 *Hsp70* 氨基酸序列系统进化树。进化树结果显示(图 4),红藻和蓝藻亲缘关系较近且聚类于叶绿体定位的 *Hsp70* 蛋白,绿藻、褐藻和

陆生植物则聚类于细胞质定位的 *Hsp70* 蛋白。其中, *PgHsp70* 蛋白聚类于叶绿体定位的 *Hsp70* 蛋白,与坛紫菜亲缘关系最近,与同属红藻门的其他物种亲缘关系较近,与蓝藻亲缘关系次之,而其他藻类及陆生植物则明显地被区分开来。

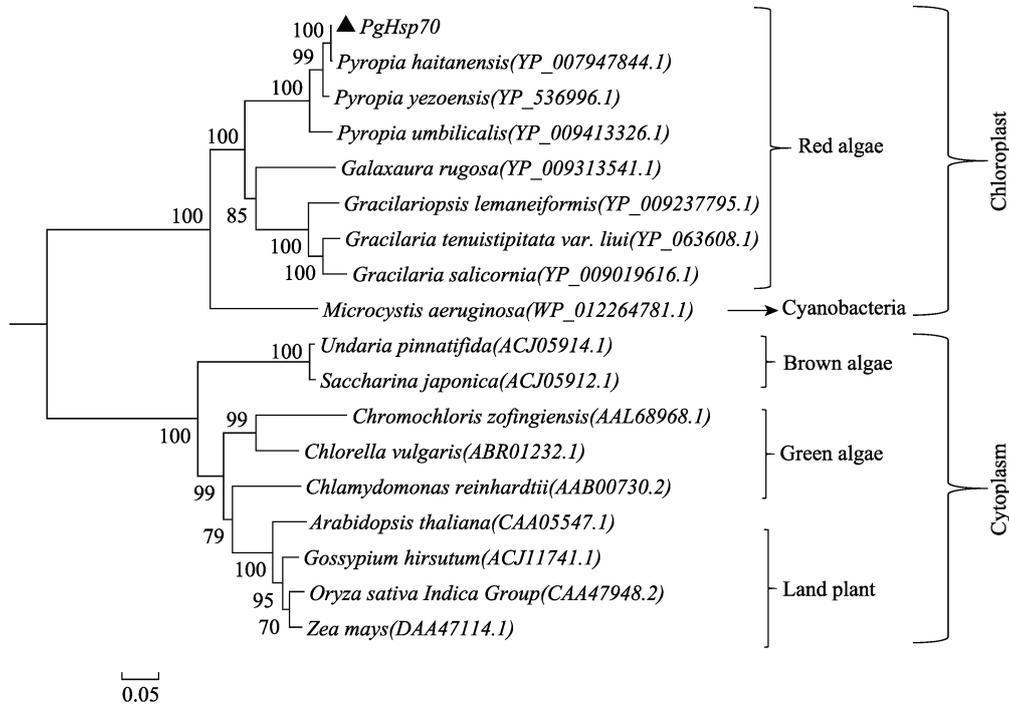


图 4 采用 NJ 法构建的基于 *PgHsp70* 基因所编码氨基酸序列的系统进化树  
Fig.4 Phylogenetic tree based on *PgHsp70* amino acid sequences by the NJ method

### 2.3 *PgHsp70* 基因在高温胁迫下的表达

基因在特定条件下表达水平的变化有助于了解相关基因的功能。为研究广东紫菜 *Hsp70* 对高温胁迫的功能响应,本研究采用荧光定量 PCR 技术检测 *PgHsp70* 基因在不同温度(22℃、27℃和 31℃)处理下,不同时间水平(0、1/6、1/2、1、6、12、24、36 h)基因相对表达水平变化。*PgHsp70* 基因在高温胁迫过程中相对表达变化趋势见图 5,内参为 *UBC*。检测结果显示,温度对 *PgHsp70* 基因表达水平有显著影响, *PgHsp70* 基因表达量在不同温度胁迫下随时间变化趋势基本一致,均呈现 1 h 之前先上调、1 h 之后下调的趋势,且均于 1 h 表达量到达最高水平,分别为未经高温处理组的 3.9 倍、7.1 倍和 11.1 倍。在温度胁迫 0~1 h 时, *PgHsp70* 基因表达量显著升高 ( $P<0.05$ ), 31℃ 温度组基因表达水平一直高于其他温度组, 27℃ 温度组基因表达水平在 1/6~1/2 h 间低于 22℃, 在 1 h 时高于 22℃; 随着胁迫时间的增加(1 h 之后), 不同温度 *PgHsp70* 基因表达量均显著下调

( $P<0.05$ ),但在高温胁迫 6~36 h 之间, *PgHsp70* 基因表达水平无显著性差异( $P>0.05$ )。因此, *PgHsp70* 基因在应答高温胁迫中发挥着重要的作用,短时间内迅速大量表达以适应高温环境,在一定胁迫时间内温度越高,反应越灵敏,但应对高温胁迫的能力有限。

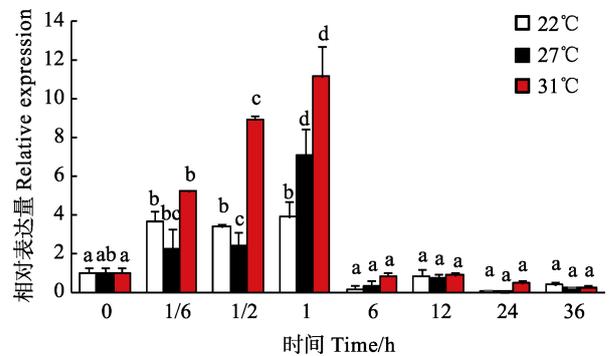


图 5 广东紫菜 *Hsp70* 基因  
在高温胁迫过程中相对表达变化  
Fig.5 The relative expression of *Hsp70* gene  
in *P. guangdongensis* during high temperature stress

### 3 讨论

热激蛋白是细胞受到不良环境(如干旱、洪涝、低温、高温、盐渍等)刺激时被激活并表达增强的一类蛋白(待真真等, 2014; 陈玉婷等, 2015)。其中, *Hsp70* 是研究最多、在生物体内分布最广、进化上最保守及生物学功能多样的一类热激蛋白(齐妍等, 2013)。通常可分为 2 个区域: 含有 ATP 酶结构域的 N-端高度保守区和含有多肽结合结构的 C-端区域, 2 个区域之间由绞链相连(Genevaux *et al*, 2007)。编码的氨基酸序列则一般有 3 条特征性序列: IDLGTTNS, VFDLGGGTFDVSVL, VVLVGGSTRIPAIQQ(郑红妍, 2017)。作者从广东紫菜叶状体中成功克隆了 2004 bp 的 *Hsp70* 基因, ORF 长度为 1866 bp, 可编码 621 个氨基酸, 预测分子量为 67.7 kDa, 理论等电点为 4.87(图 2)。克隆获得的 *PgHsp70* 推导出来的氨基酸序列与其他大多数紫菜相似, 378~534 位点是多肽结合域, 527~595 位点是 C 末端结构域, 也含有 3 条特征性序列(图 2)。该序列与其他物种的 *Hsp70* 基因氨基酸序列对比显示(图 3), 与同为南方的坛紫菜 *Hsp70* 氨基酸序列相似性更是高达 99%, 表明其高度的保守性, 其次才与北方条斑紫菜 *Hsp70* 氨基酸序列相似性达 98%, 表明地域位置更近, 同源性可能更高。而与不同属的细基江蓠繁枝变种 *Hsp70* 氨基酸序列相似性只有 78%。与陆生植物相似性则更低, 在系统进化树中 *PgHsp70* 明显地与陆生植物区分开来(图 4), 说明亲缘关系越相近的物种和生境越接近的物种同源性可能越高, 反之则同源性越低, 可作为分子进化的一种依据, 这与刘伟等(2012)对坛紫菜 *Hsp70* 基因的研究结果基本一致。系统进化树结果还表明(图 4), *Hsp70* 蛋白按亚细胞定位不同分别聚类于一支, *PgHsp70* 蛋白与红藻、蓝藻亲缘关系较近聚类于叶绿体定位的 *Hsp70* 蛋白, 说明 *PgHsp70* 蛋白定位于叶绿体中。

温度是影响藻类生长分布的重要因素, 李恒等(2013)研究表明, 温度的变化对大型海藻的生长具有显著影响。对紫菜来说, 高温是制约粤东沿海紫菜养殖生产发展的主要因素, 近年来在汕头地区更是多次发生高温烂菜烂苗事件, 严重威胁当地紫菜栽培业的发展。已有大量文献报道和证据表明, *Hsp70* 在逆境胁迫响应中发挥着重要的调控作用, 具有提高机体抗热能力, 例如, 顾颖慧(2011)研究发现, 耐高温品种 981 龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)在热激后, *Hsp70* 的表达量明显高于野生型龙须菜, 说明 *Hsp70* 是 981 龙须菜较野生型龙须菜耐高温的重要因素。

韩俊英等(2011)对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)的研究证明, 温度可以引起脊尾白虾 *Hsp70* 的高表达, 说明 *Hsp70* 在动植物中均扮演抗逆境胁迫的角色。为探究 *Hsp70* 在广东紫菜高温适应性的作用, 作者从广东紫菜 *Hsp70* 基因着手, 分别在不同温度下对广东紫菜叶状体进行高温胁迫实验, 分析了不同温度胁迫过程中 *Hsp70* 基因表达变化趋势。图 5 的研究结果显示, *PgHsp70* 基因表达量在不同温度胁迫下均呈现 1 h 之前先上调、1 h 之后下调的趋势, 且均于 1 h 表达量到达最高水平。在温度胁迫 0~1 h 时, *PgHsp70* 基因表达量显著升高( $P < 0.05$ ), 31℃ 温度组基因表达水平一直高于其他温度组, 27℃ 温度组基因表达水平在 1/6~1/2 h 间低于 22℃, 在 1 h 时高于 22℃; 胁迫 1 h 之后, 不同温度 *PgHsp70* 基因表达量均显著下调( $P < 0.05$ )。说明 *PgHsp70* 对于高温胁迫反应非常迅速, 短时间内大量积累表达, 温度越高, 反应越强烈, 随着胁迫时间的推移, *PgHsp70* 表达量下降, 该研究结果与现有的多数文献报道情况基本一致(Ji *et al*, 2015)。由此, 作者认为 *Hsp70* 应答高温胁迫的调节作用机制可能一样。当高温胁迫时, 机体受到温度刺激造成某些功能蛋白受到抑制, 从而激活 *Hsp70* 基因, 并使其表达量快速大量上调以维持功能蛋白稳态, 一方面, 当 *Hsp70* 大量表达时受到自身的反馈抑制, 使其开始下调, 另一方面, 胁迫持续进行使机体长时间处于亚健康状态时, 超越了 *Hsp70* 维持机体功能蛋白稳态的限度, 各种生理功能开始受到影响, *Hsp70* 表达量出现下调。当然, 一个机体的响应调控是复杂多变的, 远远比作者所述的复杂, 但无论如何, *Hsp70* 对维持生物体抗胁迫动态平衡的作用十分重要, 其开发利用对高温地区紫菜栽培生产乃至各个领域都有不容忽视的现实意义。

### 参 考 文 献

- Bukau B, Horwich AL. The *Hsp70* and *Hsp60* chaperone machines. *Cell*, 2013, 92(3): 351–366
- Chen YT, Xu Y, Ji DH, *et al*. Cloning and expression analysis of two small heat shock protein (*sHsp*) genes from *Pyropia haitanensis*. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(2): 182–192 [陈玉婷, 徐燕, 纪德华, 等. 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. 水产学报, 2015, 39(2): 182–192]
- Dai ZZ, Li B, Xu Y, *et al*. Cloning and expression pattern analysis of two heat shock protein (*Hsp90*) genes from *Pyropia haitanensis*. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(3): 340–349 [待真真, 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]
- Freeman LA. Cloning full-length transcripts and transcript variants using 5' and 3' RACE lipoproteins and cardiovascular disease. Humana Press, 2013: 3–17
- Genevaux P, Georgopoulos C, Kelley WL. The Hsp70 chaperone machines of *Escherichia coli*: A paradigm for the repartition of chaperone functions. *Molecular Microbiology*, 2007, 66(4): 840–857
- Gu YH. Molecular cloning and expression analysis of heat-shock-protein 70 (HSP70) genes from *Gracilaria lemaneiformis* under heat shock. Master's Thesis of Ocean University of China, 2011, 2–4 [顾颖慧. 龙须菜热激蛋白 70(HSP70)基因克隆及热激下的表达模式分析. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2011, 2–4]
- Guy CL, Li QB. The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family. *Plant Cell*, 1998, 10(4): 539–556
- Han JY, Li J, Li JT, *et al.* Cloning and expression of heat shock protein 70 (HSP70) of *Exopalaemon carinicauda*. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(8): 1130–1138 [韩俊英, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾热休克蛋白 HSP70 基因的克隆及其表达分析. 水产学报, 2011, 35(8): 1130–1138]
- Ji DH, Li B, Xu Y, *et al.* Cloning and quantitative analysis of five heat shock protein 70 genes from *Pyropia haitanensis*. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(1): 499–509
- Lai XJ, Yan XJ, Yang R, *et al.* Digital gene expression profiling analysis of *Pyropia haitanensis* (Rhodophyta) under high temperature stress. *Acta Oceanologica Sinica*, 2014, 36(6): 104–111 [赖晓娟, 严小军, 杨锐, 等. 高温胁迫下坛紫菜的数字基因表达谱研究. 海洋学报, 2014, 36(6): 104–111]
- Li B, Xu Y, Ji DH, *et al.* Effects of high temperature and non-aeration stress on the quality of *Porphyra haitanensis*. *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]
- Li H, Li MZ, Cao J, *et al.* Effects of temperature on nitrogen uptake and growth in several species of macroalgae. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(1): 159–165 [李恒, 李美珍, 曹婧, 等. 温度对几种大型海藻硝氮吸收及其生长的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(1): 159–165]
- Li XL, Wang WJ, Liang ZR, *et al.* Antioxidant physiological characteristics of wild *Pyropia yezoensis* under desiccation stress. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(5): 156–163 [李晓蕾, 汪文俊, 梁洲瑞, 等. 野生条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)叶状体对干出胁迫的抗氧化生理响应特征. 渔业科学进展, 2017, 38(5): 156–163]
- Liu W, Yang R, Xu LN, *et al.* Cloning and expression of *hsp70* for *Porphyra haitanensis*. *Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering)*, 2012, 25(2): 17–25 [刘伟, 杨锐, 徐丽宁, 等. 坛紫菜 *hsp70* 基因克隆与表达. 宁波大学学报(理工版), 2012, 25(2): 17–25]
- Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, 62(6): 670–684
- Mayer MP. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends in Biochemical Sciences*, 2013, 38(10): 507–514
- Qi Y, Xu ZS, Li PS, *et al.* Research progress on molecular mechanism and application of HSP70 in plants. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013, 14(3): 507–511 [齐妍, 徐兆师, 李盼松, 等. 植物热激蛋白 70 的分子作用机理及其利用研究进展. 植物遗传资源学报, 2013, 14(3): 507–511]
- Raha S, Merante F, Proteau G, *et al.* Simultaneous isolation of total cellular RNA and DNA from tissue culture cells using phenol and lithium chloride. *Gene Analysis Techniques*, 1990, 7(7): 173–177
- Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 1962, 18(12): 571–573
- San C, Sunhee K, Sungoh I, *et al.* The heat shock protein 70a from *Pyropia seriata* increases heat tolerance in *Chlamydomonas*. *Plant Omics*, 2015, 8(4): 327–334
- Snoeckx LH, Cornelussen RN, van Nieuwenhoven FA, *et al.* Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology. *Physiological Reviews*, 2001, 81(4): 1461–1497
- Tang Q, Li S, Zhang H, *et al.* Correlation of the cyclin A expression level with porcine circovirus type 2 propagation efficiency. *Archives of Virology*, 2013, 158(12): 2553–2560
- Tian L, Yang J, Hou W, *et al.* Molecular cloning and characterization of a P-glycoprotein from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(11): 22891–22905
- Tisseres A, Mitchell AK. Some new proteins induced by temperature shock in *Drosophila*. *Journal of Molecular Biology*, 1974, 84: 389–398
- Tseng CK, Chang TJ. On two new *Porphyra* from China. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1978, 9(1): 76–83
- Wang YC, Li G, Pan GY, *et al.* Comparative study on the temperature adaptability of *Porphyra guangdongensis* and *P. haitanensis*. *Journal of Fisheries of China*, 1982, 6(4): 307–312 [王永川, 李刚, 潘国瑛, 等. 广东紫菜和坛紫菜温度适应性的比较研究. 水产学报, 1982, 6(4): 307–312]
- Wang YC, Pan GY, Jiang FK, *et al.* On artificial cultivation of *Porphyra guangdongensis*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1978, 9(1): 85–88 [王永川, 潘国瑛, 蒋福康, 等. 广东紫菜的人工养殖试验. 海洋与湖沼, 1978, 9(1): 85–88]
- Wang YP, Jiang JD. The structure and function of heat shock protein 70. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2010, 32(2): 305–313 [王宇萍, 蒋建东. 热休克蛋白 70 的结构和功能. 中国细胞生物学学报, 2010, 32(2): 305–313]
- Wu R, Zhang JT, Zhao X, *et al.* Comparative the effect which Trizol method and RNA Fast1000 kit method has been used to extract the total RNA from the peripheral blood. *National*

- Medical Frontiers of China, 2011, 6(5): 60–61 [武荣, 张俊涛, 赵霞, 等. Trizol 与 RNA Fast1000 试剂盒提取外周抗凝血总 RNA 的方法比较. 中国医疗前沿, 2011, 6(5): 60–61]
- Zhang J, Wei XL, Chen LP, *et al.* Sequence analysis and expression differentiation of chemokine receptor CXCR4b among three populations of *Megalobrama amblycephala*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, 40(2): 195–201
- Zhang S, Wei J, Li J, *et al.* Immunohistochemical study of heat shock protein 70 in mouse endometrium during early pregnancy. *Chinese Journal of Anatomy*, 2002, 25: 21–24
- Zheng BF, Li J. *Flora Algarum Marinarum Sinicarum* (Tomus II Rhodophyta, No.1 Porphyridiales Erythropeltiales Goniotrichales Bandiales). Beijing: Science Press, 2009, 65–105 [郑宝福, 李钧. 中国海藻志(第二卷红藻门, 第 1 册紫球藻目, 红盾藻目, 角毛藻目, 红毛菜目). 北京: 科学出版社, 2009, 65–105]
- Zheng HY. The evolution of heat shock protein in algae and study on the *HSP70* gene from three species of *Pyropia* by cloning and expression. Master's Thesis of Shantou University, 2017, 60–63 [郑红妍. 藻类热激蛋白系统进化研究及三种紫菜 *HSP70* 基因的克隆及表达. 汕头大学硕士研究生学位论文, 2017, 60–63]
- Zhou XH, Li XS, Wang P, *et al.* Expression profiles of *HSP70* gene in gametophytic blade of laver *Porphyra yezoensis* ueda by high temperature stress. *Fisheries Science*, 2011, 30(4): 233–237 [周向红, 李信书, 王萍, 等. 高温胁迫下条斑紫菜叶状体 *HSP70* 基因的表达谱分析. 水产科学, 2011, 30(4): 233–237]

(编辑 冯小花)

## The cDNA Cloning and Expression Analysis of the *Hsp70* Gene from *Pyropia guangdongensis*

ZENG Jun, CHEN Weizhou<sup>①</sup>, CHEN Zepan, LIU Haoran

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Marine Biotechnology, Shantou University, Shantou 515063)

**Abstract** In order to explore the molecular mechanisms of the *Hsp70* gene in *Pyropia guangdongensis*, we have stimulated it with high temperature stresses. The aim was to provide technical references for the cultivation of *P. guangdongensis*. The full-length of *PgHsp70* was obtained by rapid amplification of cDNA ends technical (RACE). On this basis, the expression of *PgHsp70* with the different temperature (22 °C, 27 °C, and 31 °C) stresses after 0, 1/6, 1/2, 1, 6, 12, 24, and 36 h were detected using quantitative real-time PCR. The results showed that the full-length cDNA of *PgHsp70* was 2004 bp, including an open reading frame (ORF) of 1866 bp, encoding a polypeptide of 621 amino acids. The molecular mass of the deduced amino acid sequence was 67.7 kDa, with an estimated pI of 4.87. The expression of the *PgHsp70*, as measured by qRT-PCR, can be significantly induced by high-temperature stress. The three kinds of expression profiles for *PgHsp70* were similar at different times, and all of them significantly increased first and then reached their maximum levels after one hour, and then dramatically decreased. Compared to the temperature stress of 22 °C and 27 °C, the expression of the *P. guangdongensis* with the 31 °C temperature stress reached the highest level after being challenged for 1 h and was 11-fold higher than the normal. These results suggested that *PgHsp70* plays an essential role in response to high-temperature stresses.

**Key words** *Pyropia guangdongensis*; High temperature stress; *Hsp70*; Rapid amplification of cDNA ends (RACE); Quantitative real-time PCR

① Corresponding author: CHEN Weizhou, E-mail: wzchen@stu.edu.cn