

盐藻胞浆 hsp70 cDNA 的克隆及其 mRNA 的诱导表达

姜国忠, 许培荣, 牛向丽, 王建民, 袁保梅, 薛乐勋

(郑州大学 医学院细胞实验室, 河南 郑州 450052)

摘要: 用 cDNA 末端快速扩增方法克隆得到了一个 2652 bp 的盐藻 (*Dunaliella salina*) 胞浆 hsp70 cDNA 全长, 编码着 650 个氨基酸残基的多肽。推导的氨基酸序列有 2 个 ATP 酶结合位点和一个多肽结合区。由克隆得到的盐藻 cDNA 推导的氨基酸序列, 经 GenBank blast 后与数据库中胞浆 hsp70 序列一致。与莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)、人、小麦 (*Triticum aestivum*) 和啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 胞浆 hsp70 的序列一致性分别为 83%、80%、81.5% 和 80.5%。Northern 印迹显示, 90 min 后, mRNA 量在 40℃ 热休克时是光诱导时的 3 倍。光诱导则使 hsp70 mRNA 积累相对迟缓。结果表明, 所克隆得到的 hsp70 基因蛋白产物定位在盐藻细胞浆中, 光诱导和热休克均可以使 hsp70 mRNA 水平明显增高, 但以热休克为显著。

关键词: 盐藻 (*Dunaliella salina*); hsp70; RACE; 热休克; 光诱导

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2005)05-0043-07

热休克蛋白 70 家族是目前已知的最保守的蛋白家族之一。在绿色植物和藻类中, 不同 hsp70 基因的编码产物分布在胞浆^[1]、叶绿体^[2]和线粒体^[3]内, 参与新生蛋白质的正确折叠、转运及其降解, 对细胞的生长、分化和各种环境适应都起着重要作用^[4]。hsp70 的表达不仅与温度有关, 而且许多病理因素和环境胁迫均可诱导生成大量的 hsp70 产物。这些因素主要包括: 缺氧、感染、重金属中毒和氨基酸类似物等^[4]。研究发现, 将经过暗培养的细胞迅速转移到强光环境中继续培养后, 镶嵌在叶绿体内囊体膜上的光合系统 II (photosystem II, psII) 由于突然的强光辐射而造成不可逆损伤, 导致叶绿体光合作用功能缺失^[5-6]。因此, 这种辐射可以作为应激条件诱导叶绿体定位的 hsp70, 后者参与 psII 光损伤的修复^[2,7]。

杜氏盐藻 (*Dunaliella salina*) 是一种单细胞绿藻, 是生产 β -胡萝卜素的良好资源^[8]。近年来, 盐藻在研究 psII 光损伤修复方面越来越受到重视^[2,6], 盐藻叶绿体定位的 hsp70B 能够通过光辐射而大量生成并参与 psII 光损伤修复过程^[6]。作者在前期工作的基础上^[9], 进一步克隆得到盐藻胞浆定位的 hsp70 cDNA 全长 (GenBank Accession AY078499), 并初步探讨 hsp70 mRNA 表达水平与光和热诱导的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

杜氏盐藻 (*D. salina* UTEX 1644) 购自美国 (The University of Texas), Trizol 试剂为 Gibico 产品, Taq DNA 聚合酶、连接酶、T-A 载体及逆转录酶均为 Promega 公司产品。杂交试剂盒 DiG High prime DNA labeling and Detection stater kit II 购自 Roche 公司。

1.2 方法

参见分子克隆手册^[10]。

1.2.1 盐藻细胞的诱导培养

参照文献^[2], 盐藻常规接种到 PKS 培养液中, 置 23℃ 光照培养箱中进行培养。当细胞达到 $3 \times$

收稿日期: 2003-11-11; 修回日期: 2004-03-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30270031); 河南省重大科技攻关项目 (0122032500); 河南省杰出人才创新基金项目 (0221001900)

作者简介: 姜国忠 (1970-), 男, 内蒙赤峰人, 博士研究生, 讲师, 主要从事肿瘤病理学研究, E-mail: guozhong-jiang@yahoo.com.cn; 薛乐勋 (1942-), 通讯作者, 男, 河南修武人, 研究员, 博士生导师, 电话: 0371-6999548 E-mail: lxue@public2.zz.ha.cn,

10^5 个/mL 时, 分别取 100 mL 进行光培养和暗培养, 暗培养 17 h 后迅速转移到光照培养箱中依不同的

时间进行诱导, 光照强度为 8000 lx。温度诱导为正常温度的藻细胞转移到 40℃ 水浴中, 而光照条件维持不变, 然后在不同的时间收获盐藻细胞。

1.2.2 盐藻细胞总 RNA 的制备

用 Trizol 一步法提盐藻细胞总 mRNA, 具体操作按说明书要求进行, 最后沉淀物用 50 μ L DEPC 处理的水溶解, 甲醛变性电泳测定 RNA 完整性, 紫外分光光度计测定含量, 置 -80℃ 备用。

1.2.3 3'和 5'RACE

参照文献[11]方法, 3'RACE 第一轮 PCR 引物为:

上游 GTGCAGAACGATGCAAAGCTC,

下游 CTGATCTAGAGGTACCGGATCC(T)12,

第二轮 PCR 引物为:

上游 CTACAAGGGTGAAGAAGAAGGTG,

下游 CTGATCTAGAGGTACCGGATCC;

5'RACE 第一轮 PCR 引物为:

上游 CTGATCTAGAGGTACCGGATCC(T)12,

下游 TGIGTTGAAGGGGTTTCATG,

第二轮 PCR 引物为:

上游 CTGATCTAGAGGTACCGGATCC,

下游 ACCTGATTCTTGGCGGCATCG。

将第二轮 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后用胶回收, 连接到 T 载体上, 转化大肠杆菌 JM109, 挑选菌落扩增测序。

1.2.4 Northern 印迹

10 μ g 总 RNA 于甲醛凝胶变形电泳后 (含 2.2 mol/L 甲酰胺的 1% 琼脂糖), 用毛细管法转移到尼龙膜上, 于 80℃ 固定 2 h, 预杂交 30 min。然后在含探针的杂交缓冲液中杂交 4 h, 连接抗体、洗膜、激活荧

光, 最后曝光到 X 胶片上。所用探针为 3'RACE 克隆产物, 用地高辛标记。

1.2.5 序列分析

序列翻译与分析用网上软件处理, 氨基酸比较用 BLAST 软件处理。

2 结果

2.1 盐藻 hsp70 cDNA 序列克隆

运用 RACE 方法, 5'端获得一个 245 bp 的扩增片段, 3'端的扩增产物为 2269 bp, 两者经与已知的部分序列拼接后, 获得盐藻一个 2652 bp cDNA 全长。该序列在假定转录起始位点上游有 60 bp 长, 而 3'非翻译区为 626 bp, 此外在 cDNA 多聚 A 位点上游 17 bp 处发现一个假定的加多聚 A 的信号序列 "AATAAA"。该克隆的基因包含着一个开放阅读框架, 编码一个 650 个氨基酸的连续多肽, 从推定的编码产物中发现 LGGGTFDVS 和 FEVKSTA 两个 ATP 结合位点及一个 ARALRRLR-TACERAKRTLSS 钙调节蛋白结合区 (图 1)。

2.2 推导的氨基酸序列与 hsp70 家族同源性比较

由克隆得到的盐藻 cDNA 推导的氨基酸序列, 经 GenBank Blast 分析后与数据库中胞浆 hsp70 序列一致。与莱茵衣藻、人、小麦和啤酒酵母胞浆 hsp70 的序列一致性分别为 83%、80%、81.5% 和 80.5%。将整个序列分成 3 个部分, 位于 1~386 氨基酸残基一致性平均 95%, 384~543 氨基酸残基一致性平均 89%, 而 542~649 位氨基酸残基一致性低于 30% (图 2)。

2.3 盐藻 hsp70 密码子偏爱性分析

表 1 显示, 盐藻 hsp70 cDNA 序列推导的密码子。编码氨基酸的密码子分布不均一, 有些存在着明显的倾向性。20 个氨基酸中不编码氨基酸的密码子有: Arg - GGG, AGA; Ile - ATA; Leu - TTA; Cys - TGT; lys - AAA。

```

GGGCGAGAAGGGAAGAGTTGTGAATTCTGTCACTTTCCACGCACACAAGAACCACAATATGCCCCGGAAGCACCAGCCATTGGCATT
GACTTGGGCACCCTTACAGCTGCGTTGGCGTGGCAAATGACCGCGTGCAGATTATGCCAACGACAGGGCAACCGCACCACCCCC
D L G T T Y S C V G V W Q N D R V E I I A N D Q G N R T T P
TCGTACGTGGCCTTACCGGATGCTGAGCGCTGATTGGCGATGCCGCCAAGAATCAGGTGCGCATGAACCCCTTCAACACAGTGTTCGAT
S Y V A F T D A E R L I G D A A K N Q V A M N P F N T V F D
GCCAAGCGCTTGAATGGCCGCAAGTTCGCCGACCGAATGTGCAGAACGATGCAAAGCTTGGCCCTTCCAAGTGCCTCTGGCCCTGGT
A K R L I G R K F A D Q N V Q N D A K L W P F Q V R S G P G
GACATTCAGAGATTGTAGTAAGCTACAAGGGTGAAGAAGGTTTCAAGGCCGAGGAGATTTCTCCATGCTGCTGATCAAGATGAAG
D I P E I V V S Y K G E K K V F K A E E I S S M A I L I K M K
GAGACTGCCCAAGCTACCTGGGCTCTGACCGGAGGTCAAGAAGGCTGTGGTACTGTGCTTACTTCAACGACAGCCAGCGCCAG
E T A Q A Y L G S D R E V K K A V V T V P A Y F N D S Q R Q
GCAACCAAGGATGCTGGTGCATTGACGGCTTGGAGGCTTTCGATCATCAACGAGCCCACTGCTGCCATGTCATGTTGGAC
A T K D A G A I A G L E V L R I N E P T A A A I A Y G L D
AAGAAAGCATCAAATGTGGCGAGCGCAACGTCTGCATTTTGCATTTGGGAGGTGGCACCTTCGATGTGTCCCTGCTGACCATTTGAGAA
K K A S N V G E R N V C I F D L G G G T F D V S L L T I E E
GGTATCTTTGAGGTCAAAGTCCACTGCTGGTATACACACTGGGAGGTGAAGACTTCGATGAGCGCCCGTCAACCACTTTGCCAATGAA
G I F E V K S T A G D T H L G G E D F D E R P V N H F A N E
TTCCAGCGCAAGTTCAAGAAGGACCTGCGCACCTCTGCCCGTCCCGCTCCGCACTGCTTGCAGCGCGCAAAAGCGCACTCTG
F Q R K F K K D L R T S A R A L R R L R T A C E R A K R T L
TCGAGTCTGCCAAGGCTCCATTGCGACTCCCTGTTGCGAGGTGCGGACTTTGCCACCTCCATCACTCGTCCAGGTTTGGAGG
S S A A Q A S I E L D S L F E G A D F A T S I T R A R F E E
CTCTGCATGACCTTTCGCAAGTGCATGGACCCCGTTCGAAAGTCCCTGCGTGCATGCCAAGATGGATAAGGCCAGGTGCATGATGTG
L C M D L F R K M D P V E K C L R D A K M D K G Q V H D V
GTGCTGGTTGGCGTCTACTCGTATTCCCAAGGTCCAAAGTCTGCTGCAGGACTTCTTCAATGCCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAAC
V L V G G S T R I P K V Q S L L Q D F F N G K E L N K S I N
CCCAGTAGGCTGTGCCATATGGTCAGCTGTGCAGGCTGCCATCCTGACAGGCGAGGGTGGTGAAGAAGTGCAGGACTGCTGTTGCTG
P D E A V A Y G A A V Q A A I L T G E G G E K V Q D L L L L
GATGTCACCCCGCTGTCCCTGGTCTGGAGACTGCTGGTGGTGTGATGACCACCTCATTAAACCGCAACACCCTATCCCTACCAAGAAG
D V T P L S L G L E T A G G V M T T L I N R N T T I P T K K
GAGCAGGTTTTCTCTACCTACAGCGACAACCAGCCTGGTGTGCTCATCCAGGTGTATGAGGERTGAGCGTCTGTACCAAGGACAACAAC
E Q V F S T Y S D N Q P G V L I Q V Y E G E R A R T K D N N
CTGCTGGGCAAGTTCGAGCTGCTGGCATTCTCTGCCCCCTCGTGGTGTCCCTCAGATTGCGTCACTTTCGATATTGACGCTAACGGC
L L G K F E L S G I P P A P R G V P Q I C V I F D I D A N G
ATCCTGAATGTATCTGCTGAGGATAAGAGCACAGGAACCAAGAACAAGATCACCATCACCAATGACAAGGCCGACTTACCAAGGATGAC
I L N V S A E D K S T G T K N K I T I T N D K G R L T K D D
ATTAAGCGCATGGTTCAGGAGCGAGAAAAGTACAAGGCAGATGATGAGGCTTTGAAGAAGAAGGTTGAGGCCAAGAACAACCTTTGAGAAC
I K R M V Q E A E K Y K A D D E A L K K K V E A K N N F E N
TATGCCATAAATGCGCAACACCATCCGTGAGGAGAAGGTGCCCCAGGCCATCGGTGGAGAGGACAAGGAGAAGATCGAGAAGGCCCTG
Y A Y N M R N T I R E E K V A Q A I G G E D K E K I E K A L .
CATGAAGCTATGGAGTGGTGGATGCCAACAGCAGGAGGTTGAAGAGTATGAGCACAAGCTCAAGGCCCTAGAGGATCTGTGCAAC
H E A M E W L D A N Q Q A E V E E Y E H K L K A L E D L C N
CCCATCACTCGCATGTACCAGGAGCTGGTGGTGGTGCACCACCTCCAGGTGCTGGTGGTGGTGCAGCCCAAGGGCGCAGGTGGA
P I I T R M Y Q G A G G G A P P P G A G G G A P E G A G G
CCAGGTGGGCCCAAGATCGAGGAGTCTGACTAAATTAAGACAAGATCTGGTGTGTGCAGCTGCTCCTGCATAAGAAGTCTGTTGTGAA
P G G P K I E E V D ★
AATTGATGAGTAGAATTAGGCACGATTGGGGTCCCATGTGACATGTGAGGGTGTCTGCTAGGCAAAATCAAGCTTGTACTACATCCGG
GAGTAAGAACAACAGACCCAATAAGTGCCAGTTTTACCCATGTGCTGTTTTATGAGAAATGGCTGGTCTCCTTGAACGTGAACAGATGG
GAGTGTGCTAATTACATGCTGGAGTCTTTTCTATGTCTTAATCCGTCAAATTTCTGTACCTCTGTGAAGGTGCAAGAATTTGAGCAGC
TTTCATTTCAATTTATCCTTAGGGTATTGTAGATACAAAACCTCTTCGCTCGGACTTCTATGCTTTGCTGTGTGTACAAGTGAACATGC
AGACATGTTACAATCGTCTTACACGATAATGTAGAGACATTAATATTAGATGATAACGAAATGTTTACTGACCCTTTAACTTTACCTT
CTATACAAAATGGTTACAATGGTTACAATAGGGGGTGACCTTCAGCCAGGTGTTTTGGCTGATCGGCTTGTGACTGGTCTCAGCCAGCC
AAAAATAAATCCATTATCTTGGATATAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

图 1 盐藻 hsp70 cDNA 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid (aa) sequences of hsp70 cDNA from *D. salina*

★表示终止信号, 黑体硷基示多聚 A 化的信号, A.T.P 结合位点用实线标注, 钙调素结合位域用虚线标注。

the TAA stop codon is indicated by an asterisk (*) and the putative polyadenylation signal is boldfaced. A.T.P - binding sites are indicated by a solid line. The calmodulin - binding domain is marked with a dotted line.

D. S. MPREAPAIGIDLGTYSYCVGVWQNDRVEI | ANDQGNRTTPSYVAFDAERL | GDAAKNOVAMNPFNTVFDKRL | GRKFADQNV
 C. R. MGKEAPAIGIDLGTYSYCVGVWQNDRVEI | ANDQGNRTTPSYVAFDTERL | GDAAKNOVAMNPRHTVFDKRL | GRKFSDP | V
 Human MAKAAAVGIDLGTYSYCVGVFQHGKVEI | ANDQGNRTTPSYVAFDTERL | GDAAKNOVALNPQNTVFDKRL | GRKFGDPVV
 T. A. MAKGEPAIGIDLGTYSYCVGVWQNDRVEI | ANDQGNRTTPSYVAFDTERL | GDAAKNOVAMNPTNTVFDKRL | GRKFSDPVS
 S. C. MSKAVGIDLGTYSYCVAVHAFANDRVEI | ANDQGNRTTPSYVAFDTERL | GDAAKNOAAMNPHNTVFDKRL | GRKFDDEPVE

D. S. QNDAKLWPFQVRSRGPQD-PE | VVSYKGEKVFKAEE | SSMVL | KMKETAQAYLGSQREVKKAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGA | A
 C. R. QADIKLWPFQVRAGAHDPVE | VVSYKNEEKVFKAEE | SSMVL | KMKETAQASLGADREVKKAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGM | A
 Human QSDMKHWPFQV | NDG-DKPKVQVSYKGETKAFYPEE | SSMVL | TKMKE | AEAYLGY- -VTNAV | TVPAYFNDSQRQATKDAGV | A
 T. A. QSDMKLWPFKV | PGPADKPM | VVNYKGEKQFAEE | SSMVL | KMRE | AEAFLGNS- -VKNVAVTVPAYFNDSQRQATKDAGA | A
 S. C. TNDAKHYPFKV | DKGG-KPVVQVEYKGETKTFPEE | SSM | LTKMKETAENFLGTE- -VKDAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGT | A

D. S. GLEVLRI | NEPTAAA | AYGLDKKASNVGERNVCI | FDLGGGTFDVSLLT | EEG | FEVKSTAGDTHLGGEDFDERPVNHFANEFQRK
 C. R. GLEVLRI | NEPTAAA | SYGLDKKDSGLGERNVL | FDLGGGTFDVSLLT | EEG | FEVKATAGDTHLGGEDFDERLVNHFANEFQRK
 Human GLNVLRI | NEPTAAA | AYGLDRTGK- -GERNVL | FDLGGGTFDVSILT | DDG | FEVKATAGDTHLGGEDFNRLVNHFVEEFKRK
 T. A. GLNVLRI | NEPTAAA | AYGLDKKATSTGEKNVL | FDLGGGTFDVSLLT | EEG | FEVKATAGDTHLGGEDFNRMVNHVFQEFKRK
 S. C. GLNVLRI | NEPTAAA | AYGLDKK- -SQK- -EHNVL | FDLGGGTFDVSLLS | DEGVFEVKATAGDTHLGGEDFSRLVNFLAEFEKRK

D. S. FKKDLRTSARALRRLRTACERAKRTLSSAAQAS | ELDLSEFEGADFATS | TRARFEELCMDLFRKCMDPVEKCLRDAKMDKGOVHD
 C. R. YKKDLKTSRALRRLRTACERAKRTLSSAAQTT | ELDLSEFEGVDFATS | TRARFEELCMDLFRKCMDPVEKCLRDAKMDKMTVHD
 Human HKKD | SONKRAVRLRTACERAKRTLSSSTAQSL | ELDLSEFEGIDFYS | TRARFEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAG | HD
 T. A. HKKD | TGNPRALRRLRTACERAKRTLSSSTAOTT | E | DLSLEYGVDFYTT | TRARFEELNMDLFRKCMPEVEKCLRDAKMDKSTVHD
 S. C. NKKDLTTNQRSLRRLRTAAERAKRTLSSSAQTS | E | DLSLEFEG | DFYS | TRARFEELCADLFRSTLEPVEKVLADSKLDKSD | -D

D. S. V-VLVGGSTRIPKVQSLLDQFFNGKELNKS | NPDEAVAYGAAVQAA | ILTGEGGEKVQDLLLLDVTPSLGLETAGGVMTTL | INRN
 C. R. V-VLVGGSTRIPKVQQLLDQFFNGKELNKS | NPDEAVAYGAAVQAA | ILTGEGGEKVQDLLLLDVTPSLGLETAGGVMTVL | IPRN
 Human L-VLVGGSTRIPKVQKLLDQFFNGRDLNKS | NPDEAVGYGAAVQAA | LMGDKSENVQDLLLLDVAPLSLGLETAGGVMTAL | IKRN
 T. A. V-VLVGGSTRIPKVQQLLDQFFNGKELCKS | NPDEAVAYGASVQAA | ILSGEGNEKVQDLLLLDVTPSLGLETAGGVMTTL | IPRN
 S. C. E | VLVGGSTRIPKVQKLVSDFFNGKEPNRS | NPDEAVAYGAAVQAA | ILTGDSSTQDLLLLDVAPLSLGL | ETAGG | INTKL | IPRN

D. S. TT | IPTKKEQVFSYSDNQPGVL | IQVYEGERARTKDNLLGKFELSG | PPAPRGVPQ | ICV | IFD | DANG | LNVAEDKSTGTGNK | IT | I
 C. R. TT | IPTKKEQVFSYSDNQPGVL | IQVYEGERARTKDNLLGKFELTG | PPAPRGVPQ | INV | IFD | DANG | LNVAEDKTTGNK | IT | I
 Human ST | IPTKQTF | ITSYSDNQPGVL | IQVYEGERAMTKDNLLGRFELSG | PPAP- -GVPQ | EVTFD | DANG | LNVTATDKSTGKANK | IT | I
 T. A. TT | IPTKKEQVFSYSDNQPGVL | IQVYEGERARTKDNLLGKFELSG | PPAPRGVPQ | TVCFD | DANG | LNVAEDKTTGQKNK | IT | I
 S. C. ST | IPTKKEVFSYADNQPGVL | IQVFEGERTRTKDNLLGKFELSG | PPAPRGVPQ | EVTFD | DANG | LNVAEVEKGTGKSNK | IT | I

D. S. TNDKGRLLTKDD | I KRMVQEAEEKYKADDEALKKKVEAKNNFENYAYNMRNT | IREEKVAQA | IGGEDKEK | EKALHEAMEWLDANQQAEV
 C. R. TNDKGRLLSKDE | IERMVQEAEEKYKADDEQL- -KKVEAKNSLENYAYNMRNT | IREDKVASQLSASDKESMEKALTAAMDWLEANGMAEV
 Human TNDKGRLLSKEE | IERMVQEAEEKYKAEDEVQERERSAKNALESYAFNMKSAYEVEGLKKG | ISEADKKKVLDKCQEV | ISWLDANTLAEK
 T. A. TNDKGRLLSKEE | I KRMVQEAEEKYKAEDEEHKKKVDKNALENYAYNMRNTVKKDK | IASKLGADKKKVEEA | IEGT | ISWLDANGLAEA
 S. C. TNDKGRLLSKED | I KRMVQEAEEKYKAEDEQEAQRVQAKNQLSEYAF | TLKNSVSENNFKEKVGEEDEARKLEAAAODA | INWLDASQAAST

D. S. EEYEHKLEKALEDLGNPI | ITRMYQG- -AG- -GGAPPPGAGGGAPEGAGGPGGPK | IEVD
 C. R. EEFEHLLKELEGLGNPI | ITRLYQGAGAGGMPGGGAGAGAAP- -SGGSGAGPK | IEVD
 Human DEFENKRLKELEQVGNPI | ISGLYQG- -AGGPGPGFGAQG- -PKGGSGSG- -PT | IEVD
 T. A. DEFEDKMLELEGLGNPI | IAKMYQGAAPDMGGGM- -GMDADM- -PAGGGGAG- -PK | IEVD
 S. C. EEYKEROKELEGVANPI | MSKFY- -GAAGGAPGAGPVPVAGAGPTGAPDNG- -PTVEEVD

图 2 盐藻胞浆 hsp70 cDNA 推导的氨基酸序列与莱茵衣藻、人、小麦和啤酒酵母的比较

Fig. 2 Comparison of deduced aa sequences of cytosolic hsp70 from *D. salina* (D. S.) with those of *Chlamydomonas reinhardtii* (C. R.), human, *Triticum aestivum* (T. A.) and *S. cerevisiae* (S. C.)

阴影部分代表同源区

homologies are indicated by shaded boxes and gaps by dashes, respectively

表 1 盐藻 hsp70 cDNA 序列推导的密码子偏爱性分析

Tab. 1 codon usage in the *D. salina* hsp70 cDNA

氨基酸和 密码子	密码子 总数	密码子 百分比 (%)	氨基酸 和密码子	密码子 总数	密码子 百分比 (%)
Ala	67		Cys	8	
GCT	20	30	TGT	0	0
GCC	32	48	TGC	8	100
GCA	14	21	Gln	25	
GCG	1	1	CAA	4	16
Arg	34		CAG	21	84
CGT	9	26	Glu	54	
CGC	23	68	GAA	8	15
CGA	1	3	GAG	46	85
CGG	0	0	Trp		
AGA	0	0	TGG	3	
AGG	1	3	Met		
His	5		ATG	12	
CAT	2	40	Pro	27	
CAC	3	60	CCT	9	33
Ile	39		CCC	11	41
ATT	20	51	CCA	6	22
ATC	19	49	CCG	1	4
ATA	0	0	Ser	27	
Thr	37		TCT	8	30
ACT	12	32	TCC	8	30
ACC	20	54	TCA	1	4
ACA	4	11	TCG	2	7
ACG	1	3	AGT	2	7
Phe	24		AGC	6	22
TTT	5	21	Asp	44	
TTC	19	79	GAT	20	45
Gly	55		GAC	24	55
GGT	29	53	Lys	51	
GGC	19	35	AAA	0	0
GGA	6	10	AAG	51	100
GGG	1	2	Tyr	14	
Leu	47		TAT	5	36
TTA	0	0	TAC	9	64
TTG	11	23	Val	44	
CTT	1	2	GTT	7	16
CTC	6	13	GTC	13	29
CTA	1	2	GTA	3	7
CTG	28	60	GTG	21	48
Asn	33		STOP		
AAT	9	27	TAA	1	
AAC	24	73	TAG	0	
			TGA	0	

2.4 盐藻 hsp70 mRNA 的诱导表达

将诱导时间分成 0、15、30、45、60、90 和 120 min 6 个时间段, Northern 印迹结果显示, 光和热均可诱导盐藻 hsp70 mRNA 水平增高。热休克 90 min 后 mRNA 量是 30 min 时的 3 倍。光诱导则使 hsp70 mRNA 积累相对迟缓(图 3, 4)。

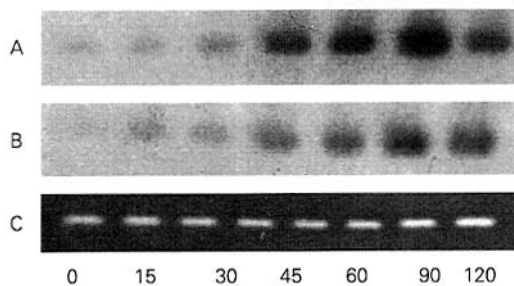


图 3 盐藻胞浆 hsp70 mRNA 在不同时间进行的热和光诱导表达

Fig. 3 cytosolic hsp70 mRNA of *D. salina* in response to irradiance stresses of heat and light

A: 常规培养的盐藻细胞迅速转移到 40°C 温度进行诱导, 然后根据不同的诱导时间收获细胞; B: 暗培养的盐藻细胞转移到光照条件下诱导培养, 依据不同时间收获细胞; C: 18S rRNA 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色对照

A. Northern blot shows the effect of a temperature (40°C) for different periods of 0, 15, 30, 60, 90 and 120 min. B. Northern blot shows induction of the hsp70 mRNA level, occurring from a low light to high light shift of the cultures (0~120 min). C. 18s rRNA stained by ethidium bromide is as a control to quantitate RNA loading and transfer.

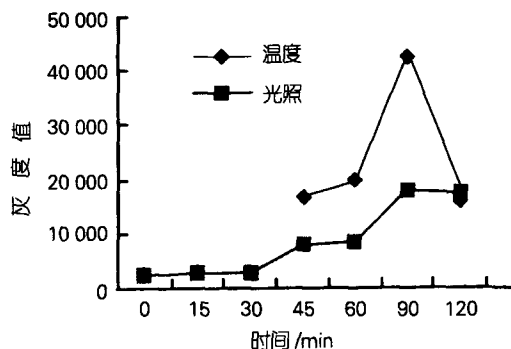


图 4 光和温度对杜氏盐藻 hsp70 mRNA 表达水平的影响

Fig. 4 The induction of the hsp70 mRNA of *D. salina* by light and temperature

3 讨论

hsp70 是热休克蛋白家族中最保守的蛋白之一,

因此它们在细胞生物学及生物化学方面起着重要作用[4]。Hsp70以不同的形式存在于细胞中,当新生多肽在胞浆的核糖体内合成时,胞浆 hsp70 便与之结合以防止在未完全合成之前出现不正确的折叠。当新生多肽完全从核糖体释放后,胞浆 hsp70 仍然与之结合充当“分子伴娘”的作用,或者作为调节蛋白帮助多肽进行正确折叠和组装。如果多肽定位在细胞器内,胞浆 hsp70 便协助多肽到达细胞器表面促成其转位状态,一旦转位开始,位于叶绿体膜、线粒体基质或内质网腔中的 hsp70 便帮助多肽向细胞器中转运。转运完成后,细胞器内的 hsp70 向胞浆 hsp70 那样参与多肽的折叠和组装。作者在前期工作[9]的基础上,利用 RACE 方法分离得到了盐藻 hsp70 完整的 cDNA 序列,总长 2652 bp。该序列 5'非翻译区(UTR)较短,但是 3'UTR 却很长,约占转录体总长的 1/4(626/2652),这种 3'端长 UTR 在衣藻的 α 和 β 球蛋白基因中也存在^[12],可能对稳定 mRNA 中起重要作用。盐藻 Hsp70 基因编码一个由 650 个氨基酸残基组成的多肽。比较推导的氨基酸序列,发现盐藻 Hsp70 与莱茵衣藻 hsp70A^[1]有 95% 的同源性,与其他真核生物如人、小麦和酵母胞浆 hsp70 的同源性平均为 85%~93%。尽管本实验没有直接检测基因产物的亚细胞定位,但通过上述比较,认为从盐藻克隆到的 cDNA 所编码产物是热休克蛋白家族中的新成员,该蛋白产物定位在胞浆,而不同于已经从盐藻分离到的 hsp70B^[2],后者由核基因编码却在叶绿体内执行其功能。

热休克蛋白 70 家族在结构和功能上高度保守^[4],与其功能相适应,在结构上被分为 3 个功能区,所有的 hsp70 都结合 ATP,该结合序列定位在 N 端 1~386 氨基酸残基,是 ATP 酶结合位点(ATPase site)^[13-14];另外一个保守序列是肽结合域(peptide-binding domain),位于 384~543 氨基酸残基间,能够与多肽结合^[15];最后一部分氨基酸序列保守性很差,可能与不同蛋白质的特定的功能有关。盐藻 Hsp70 cDNA 编码蛋白中具有 hsp70 家族共有保守的结构域,此外还拥有钙调节蛋白结合区^[16],说明基因产物能够利用 ATP 作为能量来源,在细胞中与底物蛋白结合,执行“分子伴侣”的功能^[4]。编码多肽的 C 端为所有盐藻 hsp 特有的 EEVD 保守结构,是 hsp70 必不可少的功能单位^[17]。

作者用盐藻 hsp70 cDNA 做标记探针, Northern 印迹检测 mRNA 水平。将 23°C 培养的盐藻细胞转移到 40°C,盐藻 hsp70 mRNA 表达水平提高,90 min 后 hsp70 mRNA 水平是光诱导时的 3 倍,光诱导则相对迟缓。众所周知,psII 是利用光能将水分解为 H₂ 和 O₂ 的“氧气

工厂”,它镶嵌在叶绿体内囊体膜上,当光辐射程度过强时,psII 与 O₂ 结合产生过量的 O²⁻,后者由于强氧化性而引起 psII 所谓的“光-氧化损伤”^[5]。作为生物进化的结果,在 psII 内也同时存在着另外一套精确的修复调控机制,来修复该损伤^[5]。研究表明,叶绿体定位的 hsp70B 参与 psII 光损伤的修复过程^[2]。本实验中的盐藻 hsp70 为胞浆中的蛋白产物,主要功能受限在细胞浆中,但在本研究结果中光诱导也可以使 hsp70 mRNA 水平升高,提示盐藻 hsp70 在这种应激状态下加强了对细胞的保护功能,可能参与了 psII 光损伤修复中必需的核基因编码蛋白的转运。本研究中盐藻 hsp70 的表达模式与衣藻 hsp70A 诱导表达模式相同,这种核编码、胞浆定位的 hsp70 同样与光诱导有关^[1,18]。启动子缺失分析发现,在衣藻 hsp70A 5'启动子调控区内存在着 2 个相对独立的顺式作用元件,分别与光和热 2 种不同的诱导方式相关^[18]。盐藻 hsp70 是否也存在这样作用机制及其在胞浆中如何发挥光损伤修复作用,有待于进一步研究。

本研究的另外一个动因在于为盐藻建立一个有效的转化系统,用于外源目的基因的转化。转基因研究表明,表达效率的高低与密码子偏爱性有重要关系,两者密码子偏爱性相同或相近,则表达效率高,反之表达效率低或不表达。盐藻胞浆 Hsp70 基因编码氨基酸的偏爱性分析显示,20 个氨基酸中不编码氨基酸的密码子有:Arg-GGG,AGA;Ile-ATA;Leu-TTA;Cys-TGT;Lys-AAA。提示外源基因编码的氨基酸如果出现上述密码子时,应该改造成盐藻能偏爱的密码子,否则有可能出现基因沉默现象。

参考文献:

- [1] Muller F W, Igloi G L, Beck C F. Structure of a gene encoding heat-shock protein HSP70 from the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Gene*, 1992, **111**(2):165 - 173. 3
- [2] Yokthongwattana K, Chrost B, Behrman S, et al. Photosystem II damage and repair cycle in the green alga *Dunaliella salina*: involvement of a chloroplast-localized HSP70[J]. *Plant Cell Physiol*, 2001, **42**(12):1 389 - 1 397.
- [3] Dessi P, Pavlov P F, Wallberg F, et al. Investigations on the in vitro import ability of mitochondrial precursor proteins synthesized in wheat germ transcription-translation extract [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, **52**(2):259 - 271.
- [4] Kiang J G, Tsokos G C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology[J]. *Pharmacol Ther*, 1998, **80**(2):183 - 201.
- [5] Rutherford A W, Faller P. Photosystem II: evolutionary perspectives [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2003,

- 358(1 429):245 - 253.
- [6] Jin E, Yokthongwattana K, Polle J E, *et al.* Role of the reversible xanthophyll cycle in the photosystem II damage and repair cycle in *Dunaliella salina*[J]. *Plant Physiol*, 2003, **132**(1):352 - 364.
- [7] von Gromoff E D, Treier U, Beck C F. Three light - inducible heat shock genes of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Mol Cell Biol*, 1989, **9**(9):3 911 - 3 918.
- [8] Kay R A. Microalgae as food and supplement[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1991, **30**(6):555 - 573.
- [9] 姜国忠, 牛向丽, 吕玉民, 等. 盐藻 hsp70a cDNA 片段的克隆与分析 [J]. *遗传*, 2003, **25**(5):573 - 576.
- [10] 萨母布鲁克, 弗里奇, 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南第 2 版[M]. 金冬雁, 黎孟枫译. 北京:科学出版社, 1992.
- [11] Fehr C, Fickova M, Hiemke C, *et al.* Rapid cloning of cDNA ends polymerase chain reaction of G - protein - coupled receptor kinase 6: an improved method to determine 5' - and 3' - cDNA ends[J]. *Brain Res Brain Res Protoc*, 1999, **3**(3):242 - 251.
- [12] Silflow C D, Chisholm R L, Conner T W, *et al.* The two alpha - tubulin genes of *Chlamydomonas reinhardtii* code for slightly different proteins[J]. *Mol Cell Biol*, 1985, **5**(9): 2 389 - 2 398.
- [13] McLellan C A, Raynes D A, Guerriero V. HspBP1, a hsp70 cochaperone, has two structural domains and is capable of altering the conformation of the Hsp70 ATPase domain[J]. *J Biol Chem*, 2003, **278**(21):19 017 - 19 022.
- [14] Miernyk J A, Hayman T G. ATPase activity and molecular chaperone function of the stress70 proteins [J]. *Plant Physiol*, 1996, **110**(2):419 - 424.
- [15] Strub A, Rottgers K, Voos W. The Hsp70 peptide - binding domain determines the interaction of the ATPase domain with Tim44 in mitochondria [J]. *EMBO J*, 2002, **21**(11):2 626 - 2 635.
- [16] Sun X T, Li B, Zhou G M, *et al.* Binding of the maize cytosolic Hsp70 to calmodulin, and identification of calmodulin - binding site in Hsp70 [J]. *Plant Cell Physiol*, 2000, **41**(6):804 - 810.
- [17] Freeman B C, Myers M P, Schumacher R, *et al.* Identification of a regulatory motif in Hsp70 that affects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ - 1[J]. *EMBO J*, 1995, **14**(10):2 281 - 2 292.
- [18] Kropat J, von Gromoff E D, Muller F W, *et al.* Heat shock and light activation of a *Chlamydomonas* HSP70 gene are mediated by independent regulatory pathways [J]. *Mol Gen Genet*, 1995, **248**(6):727 - 734.

Cloning of cytosolic hsp70 cDNA in *Dunaliella salina* and the expression of hsp70 mRNA

JIANG Guo - zhong, XU Pei - rong, NIU Xiang - li, WANG Jian - min, YUAN Bao - mei, XUE Le - xun
(Laboratory For Cell Biology, Zhengzhou University Medical College, Zhengzhou 450052, China)

Received: Nov., 11, 2003

Key words: *Dunaliella salina*; hsp70; RACE; heat shock; light stress

Abstract: A full - length cDNA of the *Dunaliella salina* cytosolic hsp70 gene was cloned and sequenced using RACE technique. Northern blot was performed to investigate the expression patterns of the hsp70 of the *D. salina* cells upon shifting a culture from 23°C to 40°C and from low - to high - light growth conditions, respectively. A cDNA of 2652 bp was obtained and deduced to 650 amino acids with two ATPase domains (LGGGIFDVS, FEVKSTA) and a peptide binding domain (ARALRRRLRTACERAKRTLSS). The identities of deduced amino acids to the cytosolic hsp70 from *Chlamydomonas reinhardtii*, human, *Triticum aestivum* and *Scerevisiae* were 83%, 80%, 81.5% and 80.5%, respectively. The level of hsp70 mRNA at 40°C for 90 min was 3 - fold higher than that in light stress at the same time. In contrast, a slow increase of hsp70 mRNA was observed after light stress. These findings suggest that the expression of cytosolic hsp70 mRNA of *D. salina* can be induced by both heat or light stresses.

(本文编辑:张培新)