

研究论文

小胸鳖甲热激蛋白基因 (*Mphsp70*) 的克隆、 序列分析及温度对其表达的影响*

马文静 马 纪**

(新疆大学生命科学与技术学院 新疆生物资源基因工程重点实验室 乌鲁木齐 830046)

摘 要 采用 RACE-PCR 技术,从荒漠甲虫小胸鳖甲 *Microdera punctipennis* Kaszab 克隆 *hsp70* 基因全长 cDNA 序列,命名为 *Mphsp70*。测序结果表明,序列全长 2 207 bp,该序列覆盖了完整编码区,编码 647 个氨基酸,分子量为 70.69 ku,理论等电点为 5.57 (GenBank 登录号 JF421286.1)。此序列包含 142 bp 的 5'端非翻译区和 124 bp 的含有多聚腺苷酸信号序列 AATAAA 和 poly A 尾的 3'端非翻译区以及 1 941 bp 的开放阅读框。该基因无内含子,符合诱导型 Hsp70 的特征。经 BLAST 检索分析,由 *Mphsp70* 的核苷酸序列推定的氨基酸序列与已知的光滑鳖甲 Hsp70 高度同源,同源性高达 97.22%。通过荧光定量 RT-PCR 技术研究昆虫受到高温胁迫时该基因的表达,结果表明:经 37℃ 和 42℃ 处理昆虫 1 h 后诱导昆虫体内 *hsp70* 的表达,其表达量分别为对照组 (25℃) 的 21.57 倍和 389.3 倍,随着处理时间的延长,表达量降低。该研究结果为深入研究小胸鳖甲的抗逆机理提供了新的思路。

关键词 小胸鳖甲, 热激蛋白 70, 高温处理, 实时定量 PCR

Cloning and sequence analysis of a heat shock protein gene (*Mphsp70*) from *Microdera punctipennis* and its expression in relation to high temperatures

MA Wen-Jing MA Ji**

(Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology,
Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract The full length cDNA sequence of the heat shock protein 70 gene from *Microdera punctipennis* Kaszab (a desert beetle found in Xinjiang) was isolated using the RACE-PCR technique, and designated as *Mphsp70*. Sequence analysis indicated that *Mphsp70* is 2 207 bp in length and contains a 5'-terminal untranslated region (5'-UTR) of 142 bp, a 3'-UTR of 124 bp with a polyadenylation signal sequence AATAAA and a poly (A) tail, and an open reading frame of 1 941 bp encoding 647 amino acid residues with estimated molecular weight of 70.69 ku. The theoretical isoelectric point is 5.57 (GenBank No. JF421286.1). *Mphsp70* contains no intron, a distinctive feature of inducible *hsp70* genes. A sequence homology search using BLAST revealed that MpHsp70 had a high similarity (97.22%) to ApHsp70 from the desert beetle *Anatolica polita*. The results of real-time quantitative PCR indicate that the mRNA level of *Mphsp70* at 37℃ and 42℃ was respectively 21.57 and 389.3 times that of the control at 25℃, and that these levels decreased with time at high temperatures. These results will facilitate further research on the environmental adaptability of this desert beetle.

Key words *Microdera punctipennis*, *hsp70* gene, high temperature, real-time quantitative PCR

当细胞或生物体在一定时间 (几小时、几分钟、甚至几秒钟) 内遭受高于其正常生长温度 8 ~

* 资助项目:国家自然科学基金(31060292)、新疆生物资源基因工程重点实验室开放课题(XJDX0201-201105)。

**通讯作者:majiuci@xju.edu.cn

收稿日期:2011-04-10,接受日期:2011-06-24

12℃ (亚致死温度 sub-lethal temperature) 以上的温度时,可以新合成热激蛋白 (heat shock protein, HSP) 或使其含量增加 (王海鸿和雷仲仁, 2005)。产生 HSP 是生物体对极端环境因素刺激所做出的应急响应,它可作为分子伴侣协助新生肽链的折叠、修复和降解变性的蛋白质及变性蛋白质的重新定位 (Hartl, 1996; Lindquist and Craig, 1988; Parsell and Lindquist, 1993)。热激蛋白最早发现于黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Tissieres *et al.*, 1974) 并广泛分布于微生物、植物、动物等各种生物体内。根据分子量的大小将 HSP 分为以下几个家族: Hsp90 (分子量约 85 ~ 90 ku), Hsp70 (分子量约 68 ~ 73 ku), Hsp60, Hsp47 和小分子量 smHsps (分子量约 16 ~ 24 ku)。不同种属生物的同类 HSP 的核酸序列及蛋白质氨基酸序列高度相似,以 Hsp70 最为保守,研究的也最为广泛。目前已发现在环境胁迫因子,如高温、重金属和微生物感染等刺激下, Hsp70 的表达量显著增加 (Lindquist and Craig, 1988; Basu *et al.*, 2002)。近些年研究发现,热激蛋白在昆虫应对低温时也发挥一定的作用,黑腹果蝇 (Sinclair *et al.*, 2007) 和库蚊 *Culex pipiens* (Rajamohan and Sinclair, 2008) 幼虫在热激后耐寒性提高。光滑鳖甲 *Anatolica polita* 成虫 *hsp70* 的表达不仅受高温诱导,经 -5℃ 冷处理后其 mRNA 转录水平明显高于 -10℃ 和 4℃ 处理,表明冷休克也诱导 *hsp70* 的表达 (陈亮等, 2007)。

小胸鳖甲 *Microdera punctipennis* Kaszab 隶属于鞘翅目 (Coleoptera) 拟步甲科 (Tenebrionidae) 小胸鳖甲属 (*Microdera*), 是分布于新疆准噶尔盆地沙漠地区的特有种 (黄人鑫等, 2005)。作者在长期的野外研究中发现,小胸鳖甲为避光喜阴昆虫,夜行性,在炎热夏季的白天主要栖息于荒漠灌木梭梭及红柳的根部土层中,傍晚温度下降后开始取食等活动。准噶尔盆地位于欧亚大陆腹地,昼夜温差和季节温差变化很大,炎热的夏季温差可达 30℃ (傅伯杰等, 2000)。小胸鳖甲能在这种极端环境下生存,表明经过长期的进化它可以很好地适应剧烈的环境温度变化,具有很强的耐热能力。热激蛋白可能参与小胸鳖甲对环境高温及其它刺激因素的响应,研究荒漠昆虫小胸鳖甲热激蛋白基因的表达及其对环境极端温度变化的响应,有助于从分子水平认识荒漠昆虫的耐热机制。

本研究采用同源序列比对、RT-PCR 和 RACE 技术从小胸鳖甲中克隆出 *hsp70* 的全长 cDNA 序列,并利用实时定量 PCR 测定了该基因在不同高温条件下的表达规律,研究发现 42℃ 热激 1 h 可使小胸鳖甲 *hsp70* mRNA 比室温下增加约 400 倍,表明小胸鳖甲 *hsp70* 的表达是高度热诱导的。

1 材料与方法

1.1 试虫

小胸鳖甲采自新疆阜康市 103 团古尔班通古特沙漠边缘地带。采集后在室内进行短期饲养。自然光周期,室温,喂其新鲜卷心菜及麦麸等。

1.2 主要试剂

Tag DNA 聚合酶、DNaseI、dNTP Mixture、RNase inhibitor、Oligo (dT)、Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H)、5' Full RACE Core Set、3' Full RACE Core Set、DNA Marker、pMD19-T 测序载体均为大连 TaKaRa 公司产品; DNase/RNase-Free ddH₂O 和 DNA 片段回收试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 带有 ROX 的 Platinum SYBR GREEN qPCR SuperMix-UDG 和 Trizol RNA 提取液为 Invitrogen 公司产品; 大肠杆菌 DH 5 α 菌株为作者所在实验室保藏菌种; 其余所用的化学试剂 (无水乙醇、三氯甲烷、异丙醇等) 均为国产分析纯。

1.3 引物设计与合成

用于实验的所有引物如表 1 所示, P1、P2 用于扩增小胸鳖甲热激蛋白基因 (*Mphsp70*) 核心片段。P3、P4 是根据 *Mphsp70* 核心片段序列设计的 5' RACE 特异引物; P5、P6 是根据核心片段序列设计的 3' RACE 特异引物; P7、P8 用于扩增 *Mphsp70* cDNA 全长序列; P9、P10 是进行 *Mphsp70* 实时定量 PCR 的引物; P11、P12 是根据 GenBank 中已经发表的黑腹果蝇、家蚕 *Bombyx mori* 和烟草天蛾 *Manduca sexta* 的 β -actin 基因的编码区保守序列设计的实时定量 PCR 反应的内标引物。所有引物均由上海生工生物技术有限公司合成。

1.4 小胸鳖甲总 RNA 的分离和 cDNA 的合成

将小胸鳖甲成虫全虫置于冰冷的研钵中用液氮研磨至粉末状后,将其置于 1 mL Trizol 试剂中充分混匀,利用氯仿、异丙醇抽提 RNA,最后将提取的 RNA 溶解于无 RNase 水中。用 1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外/可见分光光度计 (NanoDrop

ND1000 Spectrophotometer)测定总 RNA 的浓度和纯度。cDNA 的获得以 1.0 μ g 总 RNA 为模板,反转录用 Oligo (dT) 作下游引物,70℃ 保温 10 min 后迅速置于冰上 2 min 以上。加入 MLV 反转录酶

进行反转录反应,42℃ 保温 1 h,70℃ 保温 15 min 后冰上冷却,将反转录产物 cDNA 置于 -20℃ 冰箱保存备用。

表 1 实验中所用的引物序列

Table 1 Nucleotide sequences of primers used in the experiments

引物 Primers	编号 Serial number	引物序列 Primer sequences 5'→3'
ApHsp70 F	P1	5'-CGCTGCTATCGCTTACGG-3'
ApHsp70 R	P2	5'-TTAATCAACTTCCTCGATAGTGGG-3'
5'RACE GSP1	P3	5'-GCTGGAAGACAACGTGCGCTTGG-3'
5'RACE GSP2	P4	5'-CCTGCGGTGGCTCTGACCTCGAACA-3'
3'RACE GSP1	P5	5'-CCGGAATTACAGAAACATCACCATC-3'
3'RACE GSP2	P6	5'-GCGGAGAATAGCGGCTAGGAATCAATT-3'
Hsp70 F1	P7	5'-AAACAAGCAAGAGCATCAAAG-3'
Hsp70 R1	P8	5'-ATTACTACATCTACTATATT TTACAAAAGA-3'
Hsp70 F2	P9	5'-AAGAACGACAAGGGCAGACTG -3'
Hsp70 R2	P10	5'-CCTTCTAATT GATTCCTAGCCGCT-3'
β -actin F	P11	5'-TACTCCGTATGGATCGGTGGATC-3'
β -actin R	P12	5'-TTAGAAGCACTTGGGTGGAC-3'

1.5 小胸鳖甲 *Mphsp70* 核心片段的克隆

以上述 cDNA 为模板,使用 P1, P2 引物扩增 *Mphsp70* 核心片段。反应条件:94℃ 5 min;94℃ 30 s,50℃ 30 s,72℃ 2 min,35 个循环;72℃ 7 min。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离,切胶回收试剂盒回收。然后连接到 pMD19-T 载体上,转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞,涂布于 Amp⁺ 抗性的 LB 平板上,挑取单个白色菌落进行培养,碱裂解法制备质粒 DNA,用 PCR 及 *Sal* I 和 *Bam* HI 双酶切鉴定,筛选阳性重组子,送上海生工生物技术有限公司测序。

1.6 *Mphsp70* cDNA 3'端和 5'端序列的扩增

根据已获得的 *Mphsp70* 核心片段的测序结果,设计特异的 3'RACE 和 5'RACE 引物。根据 RACE 反应试剂盒的使用说明,分别扩增 3'和 5'端 cDNA 序列。5'RACE 通过 2 轮巢式 PCR 反应完成,第 1 轮 PCR 反应以 cDNA 为模板,利用 P3 和 5' RACE Outer Primer [5'-CA TGGCTACATGCTGACAGCCTA -3'] 进行扩增;第 2 轮反应取 2.0 μ L 第 1 轮 PCR 产物为模板,利用 P4 和 5' RACE Inner Primer [5'-CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG-3'] 进行 5'片段的扩增。同样,3'RACE 也是通过 2

轮巢式 PCR 反应完成。第 1 轮 PCR 反应以 cDNA 为模板,利用 P5 和 3'RACE Outer Primer [5'-TACCGTCGTTCCACTAGT GAT TT-3'] 进行扩增;第 2 轮反应取第 1 轮 PCR 产物 2.0 μ L 为模板,利用 P6 和 3' RACE Inner Primer [5'-CGCGGATCCTCCA CTAGTGATTTCACTATAGG-3'] 进行扩增。将第 2 轮扩增产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离,回收产物进行克隆,酶切鉴定和测序。

1.7 *Mphsp70* cDNA 全长序列的确定

将 *Mphsp70* 核心片段和 3'RACE 和 5'RACE 片段拼接成完整的 *Mphsp70* cDNA 全长序列,以此设计特异性引物 P7、P8,扩增包含编码区的 cDNA 片段,然后测序比对分析得到 *Mphsp70* cDNA 的全长序列。

1.8 对小胸鳖甲的高温处理

取室内短期饲养(25℃)的小胸鳖甲成虫置于 GNP-9080 型隔水式恒温培养箱在 37℃ 和 42℃ 分别处理 1、3、5 h,随机各取 4 只迅速冻于液氮中,提取总 RNA,RT-PCR 检测热激条件下 *Mphsp70* 的 mRNA 水平。

1.9 实时定量 PCR 检测 *Mphsp70* 的 mRNA 水

平

根据已获得的 *Mphsp70* 核心序列,在靠近核心序列 3'端设计 RT-PCR 引物 P9,P10,扩增长度为 121 bp。参照基因 β -actin 扩增长度为 120 bp,取相同量的逆转录产物进行 PCR 反应,每份产物同时扩增 β -actin 参照基因,反应按照操作说明进行。PCR 反应采用专用荧光检测管在 GeneAmp 5700 sequence detector 仪器中进行。每个样品重复 2 次。反应条件:50℃ 2 min;95℃ 2 min;95℃ 15 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,45 个循环。每次 PCR 程序完成后,在 72℃ 检测产物溶解曲线,记录 Ct 值。用 PRISM 软件的单因素方差分析对数据进行分析当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取和 RT-PCR 及 RACE

用 Trizol 试剂提取总 RNA,测得总 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 为 2.04,表明提取的 RNA 纯度较好,符合 RT-PCR 的要求。

以 cDNA 为模板,P1、P2 为引物扩增 *Mphsp70* 核心片段的凝胶电泳结果如图 1。测序结果表明该片段长 1 411 bp,BLAST 结果表明该片段与 GenBank 上已注册的光滑鳖甲 *hsp70* 基因相似性较高(图 1 中条带 1)。在此序列基础上,分别扩增 *Mphsp70* 的 5'端(含翻译区)和 3'端(含 polyA 尾)。测序拼接后可知,通过 3'-RACE 扩增得到一段 454 bp(图 1 泳道 3)的片段,通过 5'-RACE 扩增得到一段 816 bp(图 1 泳道 4)的片段。将上述序列拼接得到 *Mphsp70* 的 cDNA 全长序列,再通过

P7、P8 扩增约 2 000 bp 的全长片段(图 1 泳道 6),经测序验证全序列的正确性,得到 *Mphsp70* cDNA 的全长序列。

2.2 序列比对和生物信息学分析

用 DNAMAN 5.0 软件分析测序结果显示,*Mphsp70* 全长序列共 2 207 bp,含有一个 142 bp 的 5'非翻译区(5'-UTR),1 941 bp 的开放阅读框(ORF),124 bp 的 3'非翻译区(3'-UTR),其末端含有 poly A 尾,多聚腺苷酸信号序列 AATAAA 位于 poly A 上游 10 bp 处(图 2:A)。利用 ExPASy server 的 ProtParam 程序推导出 *Mphsp70* 编码 646 个氨基酸,MpHsp70 分子量为 70.69 ku,理论等电点为 5.57。负电荷残基(Asp + Glu)总数 90 个,正电荷残基(Arg + Lys)总数 82 个,富含丙氨酸(9.0%),甘氨酸(8.7%),亮氨酸(8.0%),天冬氨酸(7.6%)等,色氨酸含量较低,只有 0.5%。用 ExPasy 在线数据库 PROSITE 分析发现,MpHsp70 含有 2 个 Hsp70 家族的签名序列 LIFDLGGGTFDVSIL (197 - 210aa) 和 IVLVGGSTRIP KIQS (335 - 349aa)、Dnak 特征基序 IDLGTT-S-V、由 RARFEEL 组成的非细胞器基序,以及胞质 Hsp70 特征基序 EEVD(图 2:B)。C 末端含有保守的 GPTIEVD 序列,这个保守的末端氨基酸序列存在于绝大多数真核生物的 Hsp70 中,是一种细胞质特异性调控基序,影响 ATP 酶结构域的活性及与底物结合的活力,在热激状态下调控 *hsp70* mRNA 的转录量。利用 SignalP 3.0 Server 软件对 MpHsp70 蛋白序列在线分析信号肽序列,发现该蛋白不存在信号肽酶切位点,无信号

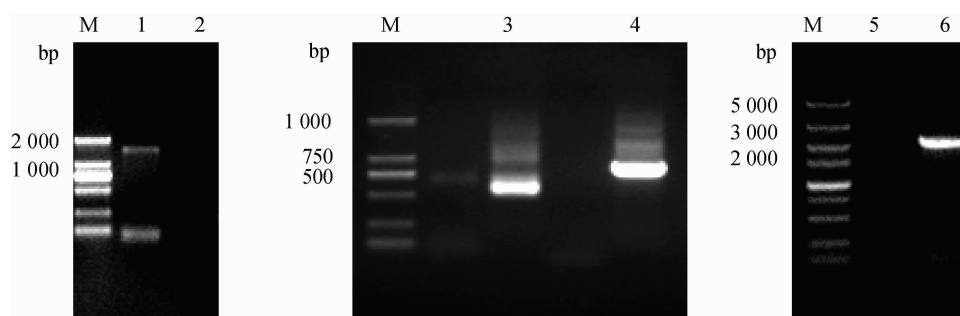
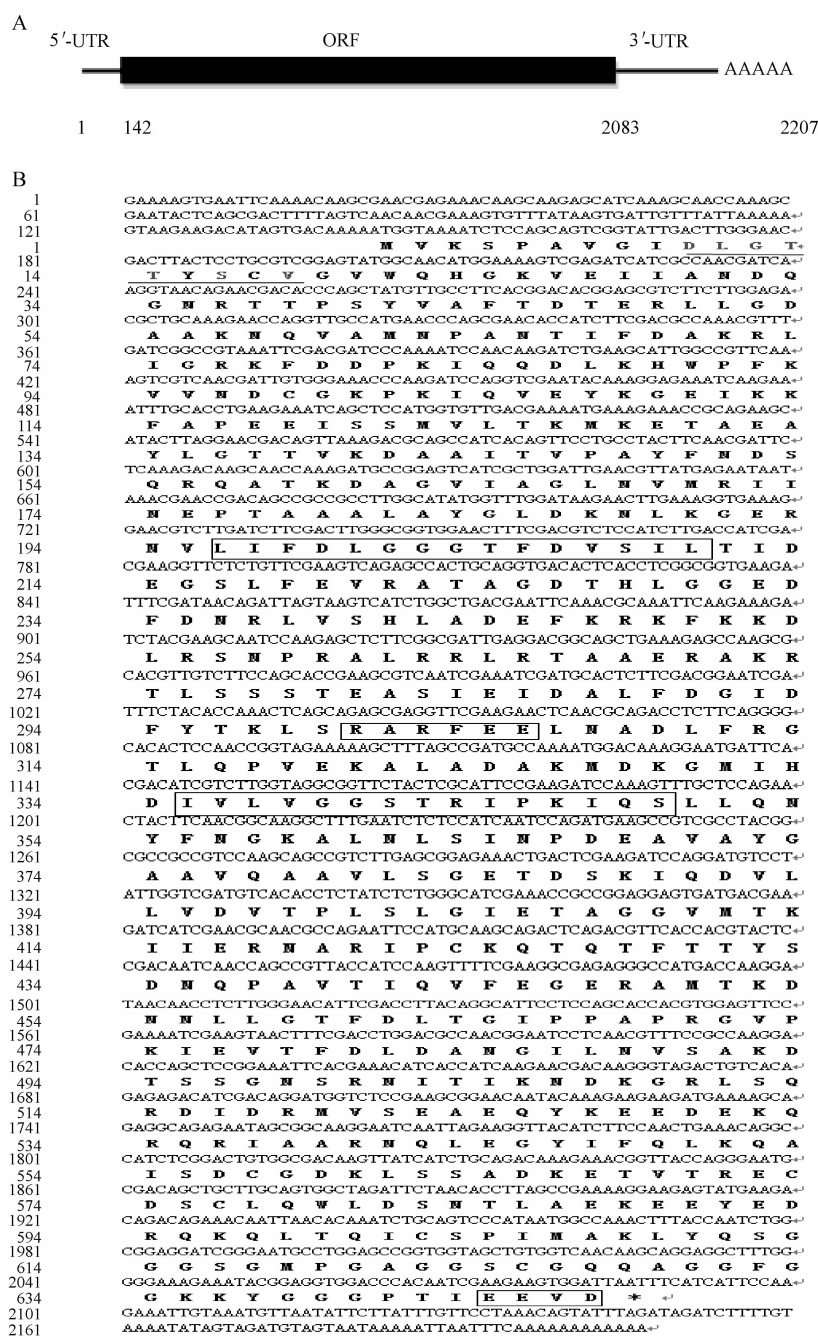


图 1 小胸鳖甲 *Mphsp70* cDNA 的 PCR 和 RACE 扩增产物

Fig. 1 RT-PCR and RACE products of *hsp70* cDNA from *Microdera punctipennis*

M:标准分子量 DNA maker;1:核心片段扩增产物 product of *hsp70* core fragment;2,5:阴性对照 negative controls;3,3'RACE 片段 3'RACE fragment;4,5'RACE 片段 5'RACE fragment;6:全长片段 product of *hsp70* full length.

图2 *Mphsp70* 基因 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列Fig.2 *Mphsp70* cDNA sequence and the deduced amino acid sequence

A. *Mphsp70* 基因序列结构图,全长 2 207 bp,完整开放阅读框为 1 941 bp; B. *Mphsp70* cDNA 的核酸序列和推导的氨基酸序列(黑体)。下划线部分为 Dnak 特征基序 IDLGTT-S-V,方框部分依次为 Hsp70 签名序列 LIFDLGGGTFDVSIL、非细胞器基序 RARFEEL、Hsp70 签名序列 IVLVGGSTRIPKIQS、胞质 Hsp70 特征基序 EEVD。氨基酸序列中星号为 cDNA 的终止密码子 TAA。

A. schematic diagram of *Mphsp70* cDNA sequence. The total length is 2 207 bp with ORF of 1 941bp. B. the nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of *Mphsp70* cDNA. The underline indicates Dnak characteristic motif IDLGTT-S-V. The boxed sequences from left to right indicate Hsp70's signature sequence LIFDLGGGTFDVSIL, non-organelle motif, Hsp70's signature sequence IVLVGGSTRIP KIQS and the Hsp70 special motif EEVD, respectively. The asterisk in the amino acid sequence indicates the stop codon.

MpHsp70 1	MVKSPAVGIDLGTTYSVGVWQHGGVEIIANDQGNRTTPSVAFDTERLIGDAAKNQVAM
ApHsp70 1	MVKAPAVGIDLGTTYSVGVWQHGGVEIIANDQGNRTTPSEVAFDTERLIGDAAKNQVAM
TcHsp70 1	MVKSPAVGIDLGTTYSVGVWQHGGVEIIANDQGNRTTPSVAFDTERLIGDAAKNQVAM
AyHsp70 1	...MPAIGIDLGTTYSVGVWQHGGVEIIANDQGNRTTPSVAFDTERLIGDAAKNQVAM
MpHsp70 60	NPSNTIFDAKRLIGRKFDDEKIQQLKHWPFFKVINDCGKPKIQVEKGEKKFAPEEISS
ApHsp70 61	NPSNTIFDAKRLIGRKFDDEKIQQLKHWPFFKVINDCGKPKIQVEKGEKKFAPEEISS
TcHsp70 61	NPSNTIFDAKRLIGRKFDDEKIQQLKHWPFFKVINDCGKPKIQVEKGEKKFAPEEISS
AyHsp70 58	NPSNTIFDAKRLIGRKFDDEKIQQLKHWPFFKVINDCGKPKIQVEKGEKKFAPEEISS
MpHsp70 121	MVLTKMKETAAYLGTIVKDAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVMRIINEPTAAAL
ApHsp70 121	MVLTKMKETAAYLGTIVKDAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVMRIINEPTAAAL
TcHsp70 121	MVLTKMKETAAYLGTIVKDAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVMRIINEPTAAAL
AyHsp70 121	MVLTKMKETAAYLGTIVKDAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVMRIINEPTAAAL
MpHsp70 181	AYGLDKNLKGERNVLIFDLGGGTFDVSILIDEGLSFEVRATAGDTHLGGEDFDNRLVSH
ApHsp70 181	AYGLDKNLKGERNVLIFDLGGGTFDVSILIDEGLSFEVRATAGDTHLGGEDFDNRLVNH
TcHsp70 181	AYGLDKNLKGERNVLIFDLGGGTFDVSILIDEGLSFEVRATAGDTHLGGEDFDNRLVNH
AyHsp70 181	AYGLDKNLKGERNVLIFDLGGGTFDVSILIDEGLSFEVRSATAGDTHLGGEDFDNRLVNH
MpHsp70 241	LAEFEFRKKFKDLRSNPRALRLRTAAERAKRTLSSTSEASIEIDALFDGIDFYTKLSRA
ApHsp70 241	LAEFEFRKKFKDLRSNPRALRLRTAAERAKRTLSSTSEASIEIDALFDGIDFYTKVIRA
TcHsp70 241	LAEFEFRKKFKDLRSNPRALRLRTAAERAKRTLSSTSEASIEIDALFDGIDFYTKLSRA
AyHsp70 241	LAEFEFRKKFKDLRSNPRALRLRTAAERAKRTLSSTSEATIEIDALYEGIDFYTRVIRA
MpHsp70 301	RFEELNADLFRGTLCPVEKALIDAKLDKGIHDIIVLVGGSTRIPKICSLQLQNYENGKRLN
ApHsp70 301	RFEELNADLFRGTLCPVEKALIDAKLDKGIHDIIVLVGGSTRIPKICSLQLQNYENGKRLN
TcHsp70 301	RFEELNADLFRGTLCPVEKALIDAKLDKGIHDIIVLVGGSTRIPKICSLQLQNYENGKRLN
AyHsp70 301	RFEELNADLFRGTLCPVEKALIDAKLDKGIHDIIVLVGGSTRIPKICSLQLQNEFCGKRLN
MpHsp70 421	PCKQQTFTTYSNDQPAVTIQVEGERAMTKDNNLLGTFDLTGIPPAPRGVPEKIDVTFDL
ApHsp70 421	PCKQQTFTTYSNDQPAVTIQVEGERAMTKDNNLLGTFDLTGIPPAPRGVPEKIDVTFDL
TcHsp70 421	PCKQQTFTTYSNDQPAVTIQVEGERAMTKDNNLLGTFDLTGIPPAPRGVPEKIDVTFDL
AyHsp70 421	PCKQQTFTTYSNDQPAVTIQVEGERAMTKDNNLLGTFDLTGIPPAPRGVPEKIDVTFDM
MpHsp70 481	DANGILNVSAKDTSSGNSNITIKNDKGRLSQKIDRMVSEAEYKKEEDEKQRQRIARN
ApHsp70 481	DANGILNVSAKDTSSGNSNITIKNDKGRLSQKIDRMVSEAEYKKEEDEKQRQRIARN
TcHsp70 481	DANGILNVSAKDTSSGNSNITIKNDKGRLSQKIDRMVSEAEYKKEEDEKQRQRIARN
AyHsp70 481	DANGILNVSAKENSTERSNIVIKNDKGRLSQAEIDRMVSEAEYKKEEDEKQRQRIARN
MpHsp70 541	QLEGYIFQLKQAISDCGDKLSSADKETVIRECDSCICWLDSENTLAEFEYEDKQKQITQI
ApHsp70 541	QLEGYIFQLKQAISDCGDKLSSADKETVIRECDSCICWLDSENTLAEFEYEDKQKQITQV
TcHsp70 541	QLEGYIFQLKQAISDCGDKLSSADKETVIRECDSCICWLDSENTLAEFEYEDKQKQISSI
AyHsp70 541	QLEAYVESVRCALDDAGNKLTADKSTARNACIEAFRWLDNNTLAEFEYEDKQKQRI
MpHsp70 601	CSFIMAKLYQSGGGSGMPGAGGSCGQAGGFGGKKYGGGPTIEEVD
ApHsp70 601	CSFIMAKLYQSGGGSGMPGAGGSCGQAGGFGGKKYGGGPTIEEVD
TcHsp70 601	CSFIMAKLYQSGGGSGMPGAGGSCGQAGGFGGKKYGGGPTIEEVD
AyHsp70 601	RSEVMYKMHGGAAGCTPGGAPGYQPKDG.....PTVEEVD

图3 4种不同昆虫 Hsp70 氨基酸同源性比较

Fig. 3 Comparison of the amino acid sequences of Hsp70 from four inset species

MpHsp70: 小胸鳖甲 *Microdera punctipennis*; ApHsp70: 光滑鳖甲 *Anatolica polita*;TcHsp70: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*; AyHsp70: 半目大蚕蛾 *Antheraea yamamai*.

肽,是一种非分泌型蛋白。

在 NCBI 上通过 BLAST 分析,将小胸鳖甲 HSP 开放阅读框的氨基酸序列与光滑鳖甲 (GeneBank 登录号 EF569673.1)、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (GeneBank 登录号: XP974442)、半目大蚕蛾 *Antheraea yamamai* (GenBank 登录号: AB179657.1) 的 Hsp70 氨基酸

序列作比较分析,其中小胸鳖甲与同为拟步甲科的光滑鳖甲和赤拟谷盗的相似性分别为 97.22% 和 94.59%,与鳞翅目 (Lepidoptera) 天蚕蛾科 (Saturniidae) 的半目大蚕蛾相似性为 81.45%。氨基酸序列比对结果见图 3,整个分子的氨基端保守性较羧基端保守性高。利用 MEGA 4 软件对上述 4 条序列及二化螟 (*Chilo suppressalis*, GeneBank 登

录号 ADE05296.1), 粘虫 (*Mythimna separata*, GeneBank 登录号 ABY55233.1), 谢氏宽漠王 (*Mantichorula semenowi*, GeneBank 登录号 ADB44081.1), 果蝇 (*Drosophila auraria*, GeneBank 登录号 CAA55168), 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, GeneBank 登录号 CAA05547.1) 等动植物的 Hsp70 氨基酸序列比对, 采用 Neighbor-Joining 法, 重复 1 000 次, 构建 Bootstrap 验证的系统发育树 (图 4), 结果表明 Hsp70 保守性很强, 从图 4 上可知 MpHsp70 与同科的光滑鳖甲亲缘关系最近, 其次是赤拟谷盗, 而与同科的谢氏宽漠王亲缘关系较远, 推测可能与它们的地理环境不同有关。小胸鳖甲与光滑鳖甲采集地点相同, 其生活环境也较为相似, 而谢氏宽漠王则是分布在我国内蒙古阿拉善东部、宁夏中北部和蒙古南缘的一个特有种。

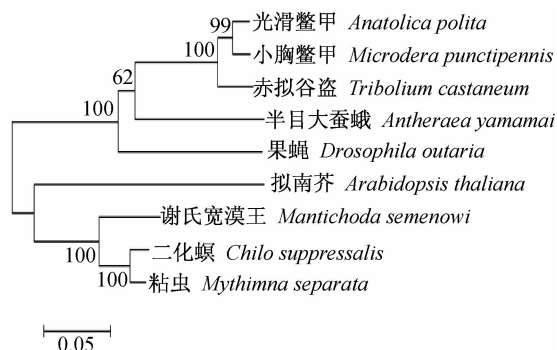


图 4 不同生物 Hsp70s 系统发生树
Fig. 4 Phylogenetic tree of Hsp70s among different organisms

2.3 高温胁迫对 *Mphsp70* 基因 mRNA 水平的影响

实时定量 PCR 结果显示, 小胸鳖甲经不同的高温处理 1 h 时间后, 与室温下的对照组相比, *Mphsp70* 的表达水平均显著提高, 但是对不同温度的响应强度和方式有较大差异 (图 5)。在 37℃ 处理 1 h 后, *Mphsp70* 的表达量就达到对照组 (25℃) 的 21.57 倍, 之后表达量下降, 3 h 时降为对照的 3.52 倍, 5 h 后的表达量反而低于对照组。42℃ 处理昆虫后, *Mphsp70* 的表达与 37℃ 处理有相似的先升高后降低的变化趋势, 但是变化强度比 37℃ 处理强烈。42℃ 处理 1、3、5 h 时, *Mphsp70* 的表达量分别为对照组的 389.3 倍、70.73 倍和 25.7 倍。

由此可见, 小胸鳖甲的热激蛋白基因表达受高温诱导, 且对不同高温胁迫的响应强度不同。

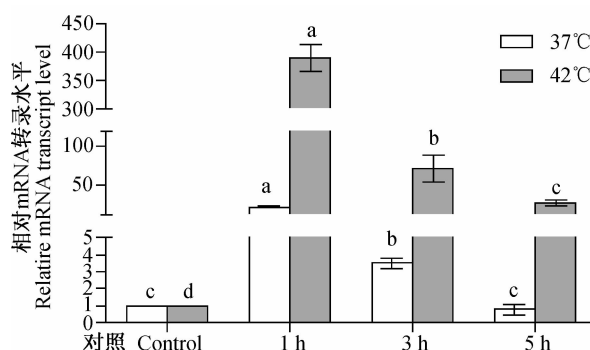


图 5 高温胁迫对 *Mphsp70* mRNA 转录水平的影响

Fig. 5 Effects of high temperature on the mRNA level of *Mphsp70*

不同字母表示同一组不同时间点的差异显著 ($P < 0.05$)。

Different letters indicate significant difference at 0.05 level at different time points of the same group.

3 讨论

本研究利用 RT-PCR 结合 RACE 技术从荒漠昆虫小胸鳖甲中首次克隆得到 *hsp70* cDNA 全长序列。 *Mphsp70* cDNA 全长 2 207 bp, 包含 1 个长为 1 941 bp 的 ORF、142 bp 的 5'-UTR 和 124 bp 的 3'-UTR。诱导型 *hsp70* 基因的一个显著特征是无内含子 (Molinaa *et al.*, 2000; Franzellitti and Fabbri, 2005)。本次克隆到 *Mphsp70* 基因在编码区不含内含子, 可能属于诱导型 *hsp70* 基因。

通过氨基酸序列比对可知, MpHsp70 与其它真核生物的 Hsp70 有着极高的序列相似性, 其中与鞘翅目拟步甲科光滑鳖甲和赤拟谷盗相似性较高, 分别为 97.22% 和 94.59%。氨基酸序列表明 MpHsp70 包含 647 个氨基酸, 分子量为 70.69 ku, 理论等电点为 5.57。序列包含真核生物 Hsp70 高度保守的 2 个家族标签序列、Dnak 特征基序、非细胞器基序。与所有真核生物一样, MpHsp70 在 C 末端也具有高度保守的细胞质特异性调控基序 EEVD (Demand *et al.*, 1998; Vayssier *et al.*, 1999), 说明 MpHsp70 主要存在于细胞质中, 进一步说明本实验获得了小胸鳖甲 *hsp70* 基因。

本研究观察到小胸鳖甲 *Mphsp70* 具有快速热响应机制。受热刺激后 *Mphsp70* mRNA 大量表

达,经 37 和 42℃ 处理昆虫 1 h 后,*Mphsp70* 的表达量分别为对照组 (25℃) 的 21.57 倍和 389.3 倍,表明在受到低于致死温度的热刺激时,小胸鳖甲 *Mphsp70* 能在短时间内做出响应,尤其是对 42℃ 处理的反应十分强烈,1 h 就使 *Mphsp70* mRNA 达到室温下的约 400 倍。*hsp70* 基因对高温刺激的这种高强度反应在其他高等生物中尚未见报道,这是否与荒漠昆虫适应干旱荒漠的频繁而极端的温度变化有关,需要做深入研究。在热激过程中,诱导型 *hsp70* mRNA 的表达会显著增加,且诱导水平依应激强度和持续时间的长短而不同,这种诱导表达一般认为是短时间响应的 (Molinaa *et al.*, 2000; Franzellitti and Fabbri 2005)。由于 *Mphsp70* 与其它物种的 *hsp70* 基因一样没有内含子,其 mRNA 加工可快速进行,所以机体可以对热激做出快速反应 (Gray *et al.*, 1999)。拟步甲昆虫谢氏宽漠王经 42℃ 热激 1 h 后,肌肉 *hsp70* mRNA 水平达到高峰 (唐婷等, 2008), 35℃ 处理地中海贻 1 h 后,可快速诱导 *hsp70* 的表达 (Franzellitti and Fabbri, 2005)。

有研究表明,热激条件下小鼠睾丸组织 *hsp70* 基因的表达在 31、34 和 37℃ 随应激时间的延长, *hsp70* mRNA 呈现先升高后下降的趋势 (刘一诺等, 2010); 团头鲂在 34℃ 持续热激下, 6 h 后肝脏 Hsp70 mRNA 水平达到最大值 (明建华等, 2009); 在 37℃ 处理可口革囊星虫,其 *hsp70* 基因的转录水平在 24 h 后达到最大值,为对照组的 2.51 倍,随后呈下降趋势 (Su *et al.*, 2010); 程培周等 (2007) 发现皱纹盘鲍 *hsp70* 在热处理后,肌肉组织 *hsp70* 的表达呈时间依赖性,存在先升高后降低的趋势。不同生物对热处理的响应程度有差异,可能与热激蛋白基因在不同物种或组织的差异性表达以及热激强度等有关 (Park *et al.*, 2007)。但这些生物中 *hsp70* 表达对热处理响应的方式与本研究的結果基本一致。研究发现, HSP 对高温胁迫存在负反馈调控机制 (Morimoto, 1993)。在热胁迫条件下,热激转录因子 (heat shock transcription factor, HSF) 首先被激活形成三聚体并转入核内与热激元件 (heat shock element, HSE) 结合,以此启动热激蛋白基因的转录, Hsp70 mRNA 水平随之出现明显增加。高浓度 HSPs 与 HSF 结合并抑制 HSF 的活性,从而减少 HSF 和 HSE 的特异性结合,控制热激蛋白基因的转录,使 Hsp70

mRNA 含量维持在一定的水平。荒漠昆虫小胸鳖甲热激蛋白基因表达调控是否存在负反馈机制有待继续研究。对荒漠昆虫热激蛋白基因表达调控的研究将有助于从分子生物学水平揭示昆虫对荒漠环境的适应性。

参考文献 (References)

- Basu N, Todgham AE, Ackerman PA, Bibeau MR, Nakano K, 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, 295(2):173—183.
- Demand J, Lüders J, Höhfeld J, 1998. The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. *Mol. Cell. Biol.*, 18(4):2023—2028.
- Franzellitti S, Fabbri E, 2005. Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 336(4):1157—1163.
- Gray CC, Amrani M, Yacoub MH, 1999. Heat stress proteins and myocardial protection: experimental model or potential clinical tool? *Intern. J. Biochem. Cell Biol.*, 31(5):559—573.
- Hartl FU, 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381(6583):571—580.
- Lindquist S, Craig EA, 1988. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 22:631—677.
- Molinaa A, Biemara F, Muller F, Lyengar A, Prunet P, Maclean N, Martial JA, Muller M, 2000. Cloning and expression analysis of an inducible HSP70 gene from tilapia fish. *FEBS Lett.*, 474(1):5—10.
- Morimoto RI, 1993. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science*, 259(5100):1409—1410.
- Park H, Ahn IY, Lee HE, 2007. Expression of heat shock protein 70 in the thermally stressed Antarctic clam *Laternula elliptica*. *Cell Stress Chaperon.*, 12(3):275—282.
- Parsell DA, Lindquist S, 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Gen.*, 27(1):437—496.
- Rajamohan A, Sinclair BJ, 2008. Short-term hardening effects on survival of acute and chronic cold exposure by *Drosophila melanogaster* larvae. *J. Insect Physiol.*, 54(4):708—718.
- Sinclair BJ, Gibbs AG, Roberts SP, 2007. Gene transcription during exposure to and recovery from cold and desiccation stress in *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol. Biol.*, 16(4):435—443.
- Tissieres A, Mitchell HK, Tracy U, 1974. Protein synthesis

- in salivary glands of *Drosophila melanogaster*; relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.*, 84(3):389—398.
- Vayssier M, Leguerhier F, Fabien JF, Philippe H, Vallet C, Ortega-Pierres G, Soule C, Perret C, Liu M, Vega-Lopez M, Boireau P, 1999. Cloning and analysis of a *Trichinella britovi* gene encoding a cytoplasmic heat shock protein of 72 kD. *Parasitology*, 119:81—93.
- Su XR, Du LL, Li YY, Li Y, Zhou J, Li TW, 2010. Cloning and expression of HSP70 gene of sipuncula *Phascolosoma esculenta*. *Fish Shell Fish Immun.*, 28: 461—466.
- 陈亮, 张富春, 黄萍, 马纪, 2007. 光滑鳖甲热激蛋白 70 基因的克隆及表达. *昆虫学报*, 50(9):883—888.
- 程培周, 刘晓, 张国范, 高其康, 2007. 荧光定量 PCR 方法分析皱纹盘鲍 HSP70 在温度胁迫下的表达. *海洋科学*, 30(10):77—81
- 傅伯杰, 刘国华, 孟庆华, 2000. 中国西部生态区划及其区域发展对策. *干旱区地理*, 23(4):289—297.
- 黄人鑫, 吴卫, 毛新芳, 胡红英, 范兆田, 侯艳君, 李新平, 杜春华, 邵红光, 黄翔, 欧阳彤, 2005. 新疆荒漠昆虫区系及其形成与演变. 乌鲁木齐:新疆科学技术出版社. 37—47.
- 刘一诺, 郝林琳, 张莹, 王佳, 赵志辉, 2010. 热应激条件下小鼠睾丸组织 HSP70 基因表达谱的研究. *青岛农业大学学报*, 27(2):135—138.
- 明建华, 谢骏, 刘波, 何义进, 周群兰, 潘良坤, 俞菊华, 徐跑, 2009. 团头鲂 HSP70 cDNA 克隆、序列分析以及热应激对其 mRNA 表达的影响. *中国水产科学*, 16(5): 635—648.
- 唐婷, 柳峰松, 任国栋, 2008. 谢氏宽漠王 HSP70 基因 cDNA 片段的克隆及热激条件下的表达. *昆虫学报*, 51(4):365—371.
- 王海鸿, 雷仲仁, 2005. 昆虫热休克蛋白的研究进展. *中国农业科学*, 38(10):2023—2034.