

腐烂茎线虫热激蛋白新基因的克隆与序列分析

耿甜^{1,2} 彭德良¹ 李建洪² 黄文坤¹ 王高峰¹ 彭焕¹ 龙海波¹

1. 中国农业科学院植物保护研究所/植物病虫害生物学国家重点实验室,北京 100193;

2. 华中农业大学植物科学技术学院,武汉 430070

摘要 热激蛋白 90 基因(heat shock protein 90 genes, *hsp90s*)是与生物发育、生物防御反应以及生物抗环境胁迫等相关的多功能基因。本试验以 RT-PCR 结合 RACE 方法从腐烂茎线虫 *Ditylenchus destructor* 中克隆出 1 个 *hsp90*, 命名为 *Dd-hsp90-1*, 基因登录号为 HQ901595。 *Dd-hsp90-1*cDNA 全长序列含有 1 个 2 160 bp 的开放性阅读框(ORF), 编码 719 个氨基酸残基, 其 5' 末端和 3' 末端分别含有 70 bp 和 117 bp 的非编码区(UTR)。 *Dd-hsp90-1* 内含子外显子结构分析结果表明, 其基因组序列包含 9 个内含子, 且各内含子两端剪接位点序列遵守 GT/AG 规则。 *Dd-hsp90-1* 基因的推定蛋白 Dd-HSP90-1 分子质量约为 82.79 ku。该基因为单拷贝基因, 并且与其他热激蛋白 90 基因高度同源。 Dd-HSP90-1 具有热激蛋白 90 家族保守的序列和基系。此外, 该基因还具有胞质型热激蛋白 90 的 5 个特征序列和特异 MEEVD 基系, 这表明 *Dd-hsp90-1* 为胞质型热激蛋白 90。系统进化分析结果显示, *Dd-hsp90-1* 与松材线虫热激蛋白 90 基因(GenBank 登录号 ACY01918)亲缘关系最近, 氨基酸序列一致性达到 86.65%。同时, 热激蛋白 90 基因的系统进化分析结果也体现了植物寄生线虫之间的取食行为差异。

关键词 腐烂茎线虫; 热激蛋白 90 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号 S 432.4⁺5

文献标识码 A

文章编号 1000-2421(2011)06-0693-08

热激蛋白(heat shock proteins, HSPs)为一类多基因家族蛋白, 依据热激蛋白的分子质量和氨基酸序列同源性与功能, 可将其分为 5 个主要家族: HSP100 家族、HSP90 家族、HSP70 家族、HSP60 家族和小分子 HSP 家族, 其中分子质量在 82~90 ku 之间的热激蛋白为 HSP90^[1-2]。HSP90 家族又可分为 5 个亚蛋白家族: 位于细胞质中的 HSP90A、位于内质网中的 HSP90B、位于叶绿体中的 HSP90C、线粒体 TNFR 关联蛋白(mitochondrial TNFR-associated protein, TRAP)和细菌高温蛋白 G(bacterial high temperature protein G, HtpG)^[3-4]。

HSP90s 参与多种生物学过程, 具有复杂的生物学功能。HSP90s 具有 ATP 酶活性, 其与底物蛋白结合, 依靠 ATP 水解释放的能量引导蛋白的正确折叠^[4]。HSP90s 不但能与其他蛋白结合, 稳定其蛋白的空间结构, 还能促进蛋白的降解, 如

HSP90s 能促进脑视网膜血管瘤病肿瘤抑制因子(Von Hippel-Lindau disease tumour suppressor)的降解^[5]。此外, HSP90s 在端粒的延伸过程中具有重要的功能。DNA 复制过程中端粒(telomere)的延伸需要多种蛋白相互作用协同完成, 其中多种蛋白与蛋白、蛋白与 DNA 序列之间的相互作用均需要 HSP90 的参与^[6]。

在动物免疫系统中, HSP90 能与抗原多肽(antigenic peptides)结合, 并将其传递给 MHC-1 分子, 发挥抗原递呈作用(antigen presentation)^[7]。在植物的生物抗性反应中, HSP90 同样具有重要的功能。范海延等人研究了黄瓜品系 S17 叶片受白粉病菌胁迫后的蛋白质组变化, 结果发现黄瓜叶片接种白粉病菌 48 h 之后, 热激蛋白 90 基因上调表达^[8]。在拟南芥及番茄类植物中, HSP90 参与抗病基因介导的抗病信号转导过程, 如抗性基因 *Mi* 基因介导的抗病信号转导过程^[9-11]。在前人研究的基

收稿日期: 2011-03-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871627)

耿甜, 华中农业大学植物科学技术学院硕士研究生。研究方向: 植物线虫分子生物学。E-mail: gengtian1985@163.com

通讯作者: 彭德良, 博士, 研究员。研究方向: 植物线虫分子生物学。E-mail: dlpeng@ippcaas.cn;

李建洪, 博士, 教授。研究方向: 植物保护。E-mail: jianhl@mail.hzau.edu.cn

础上, Bhattarik 等^[11]构建了抗性基因 *Mi* 基因介导的抗病信号转导模型: HSP90 与 *Mi* 蛋白和 SGT1 蛋白(或者 SGT2 蛋白)组成抗病基因介导的信号转导复合物(R-signaling complex), *Mi* 蛋白监控 RME1 蛋白的修饰变化; 当 RME1 被线虫或者昆虫无毒蛋白决定因子(Avr determinant)修饰后, *Mi* 蛋白识别 RME1 并与之结合, 进而引起 *Mi* 蛋白空间构象变化, 激活抗病基因介导的抗病信号转导途径(R-signaling pathway)。

研究发现, *hsp90* 基因在丝状线虫(*Filarical nematodes*)和秀丽小杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)适应环境温度变化的过程中具有重要的功能^[12]。De 等^[13]首次对植物寄生线虫甘蓝根结线虫 *Meloidogyne artiellia hsp90* 基因(*Mt-hsp90*) 在环境温度变化过程中的表达水平进行了分析, 结果发现, 不同温度条件下其卵和 2 龄幼虫的 *Mt-hsp90* 基因差异表达, 而且, 该基因同秀丽小杆线虫 *Daf-21* 基因为同源基因, 推测 *Mt-hsp90* 可能具有 *Daf-21* 类似的功能, 参与甘蓝根结线虫抗温度胁迫。目前, 在腐烂经线虫中仍未见有关其 *hsp90* 基因的报道。笔者首次从腐烂茎线虫中克隆出 1 个 A 型 *hsp90* 基因, 旨在为研究植物寄生线虫 *hsp90* 基因的生物学功能提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

腐烂茎线虫为笔者所在实验室收集、保存的江苏省铜山县地区种群。腐烂茎线虫培养方法: 将半裸镰刀菌 *Fusarium semitectum* 接种在 PDA 培养基上, 25 °C 条件下培养 4 d, 再用无菌玻璃吸管将含有腐烂茎线虫的虫液转移至 PDA 培养基中, 并往 PDA 培养基中接种腐烂茎线虫, 腐烂茎线虫以半裸镰刀菌为食, 在 25 °C 条件下进行繁殖^[14-16]。培养 40~50 d 后, 向培养皿皿盖中加适量无菌水, 用无菌玻璃吸管将培养皿皿盖上的虫体转移至

1.5 mL 的 DNase/RNase-free 离心管中。待线虫沉入离心管底部后, 用移液器吸弃上层水相。加入 DEPC 处理水重悬浮虫体, 待线虫沉入离心管底部后用移液器吸弃上层水相, 如此洗涤 5 次。将约 100 μ L 的线虫(约 10 000 头)加入到 1.5 mL 的 DNase/RNase-free 离心管中, 并加入 1 mL TRIzol, 液氮速冻, -80 °C 保存备用。

大肠杆菌感受态 TOP010、DNA Marker 和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购自天根生化科技有限公司; EXTaq 酶购自 TaKaRa 公司; TRIzol 试剂、Gene Race[®] Core Kit 和 SuperScribe[™] III First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒购自 Invitrogen; pGEM-T easy 系统试剂盒购自 Promega 公司; DIG DNA PCR 标记试剂盒购自北京美莱博医学科技有限公司; DIG High Primer DNA Labeling and Detection Starter Kit I 购自 Roche 公司(德国)。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 第 1 链合成

将以 TRIzol 试剂保存的腐烂茎线虫用冻融法进行裂解提取总 RNA。按照 Gene Race[®] Core Kit 和 SuperScribe[™] III First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒说明书步骤合成 mRNAs 5'端和 3'端完整的 cDNA 第 1 链。

1.3 基因组 DNA 的提取

腐烂茎线虫基因组 DNA 的提取参照 Patel 的方法^[17]进行并略加改动。将腐烂茎线虫与线虫裂解液混合, 65 °C 温浴 1 h。DNA 用酚/氯仿抽提, 并用乙醇沉淀。DNA 用去离子水溶解, 并在 37 °C 条件下用 RNase A 处理 30 min。

1.4 3'RACE

按照 SuperScribe[™] III First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒说明书步骤进行腐烂茎线虫 HSP90 基因的 3'RACE 试验。腐烂茎线虫 *hsp90* 的 EST 序列来自笔者所在实验室构建的腐烂茎线虫 cDNA 文库(表 1)。

表 1 腐烂茎线虫 *hsp90* 的 EST 序列

Table 1 EST sequence of *hsp90* in *D. destructor*

基因 Gene	基因的 EST 序列 EST sequence(5'-3')
<i>hsp90</i>	GGAGTTGGACTCTGGCAAGGAGCTGTTCATCAAGATCACGCCGAACAAGGCCGAGAAGACGCTCACTC TCATGGACACTGGCGTTGGAATGACCAAGGCTGACCTCGTGAACAATCTCGGAACGATGCAAGTGC GGAACCAAGGCTTTCATGGAGGCTCTTCAGGCTGGCGCAGACATCTCGATGATTGGTCAATTCCGGTGTG GGATTCTATTCGGCGTCTTGTATTGCTGACCGCTTGTGCTCACTTCGAAGCACAACGATGACGAATGC CATCAATGGGAATCCTCTGCTGGCGGCTCGTTCATATCCGTCGCGTTGAAGATCCAGAGCTTACCCGT GGCACTAAGGTGGTCTTTACATGAAGGAGGATCAAACCGAATACCTCGAAGAGCGCCGTATCAAGGA GATCGTCAAGAAGCACTCGCAGTTCATTGGATATCCCATCAAATTGC

根据该表 1 的 EST 序列,用软件 Primer 5.0 及 DNAMAN 设计基因特异引物 S1、S2(表 2),以 cDNA 第 1 链为模板,以 3' GeneRace Primer 及 S1 为引物进行 PCR 反应。PCR 反应条件:94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 45 s, 56 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 2.5 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。再以该 PCR 产物 100 倍稀释液为模板,以 3' GeneRace Nested Primer 和 S2 为 PCR 引物,进行 Nested PCR 反应。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 45 s, 60 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 2.5 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离,纯化目的片段,再进行连接、转化、克隆,PCR 菌液检测后测序。

表 2 试验中使用的 PCR 引物

Table 2 PCR primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence
S1	AAGGCTGACCTCGTGAACAATCTC
S2	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT
S3	TTGGTTCCCGACTTGGCAATCGTTCC
S4	CCCAAGTTTGAGAAATCA
S5	TGTGGAGATCTTGTGAAGTATA
S6	GAAGTCTACGAAGCATTCTCCA
S7	CAGAGTTGTCCACGGTTTCCTT

1.5 5'RACE

按照 SuperScribeTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒说明书步骤进行腐烂茎线虫 *hsp90* 的 5'RACE 试验。根据腐烂茎线虫 *hsp90* 的 EST 片段,用软件 Primer 5.0 和 DNAMAN 设计基因特异引物 S3(表 2)。以 cDNA 第 1 链为模板,以 S3 和 5' GeneRace Primer 为引物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 45 s, 72 °C 延伸 3 min, 5 个循环; 94 °C 变性 45 s, 70 °C 延伸 3 min, 5 个循环; 94 °C 变性 45 s, 67 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 25 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离,纯化目的片段,再进行连接、转化、克隆,PCR 菌液检测后测序。

1.6 cDNA 全长扩增

依据 cDNA 拼接序列,设计基因特异引物 S4、S5(表 2),对 cDNA 序列进行全长扩增。以 cDNA 第 1 链为模板,以 S4、S5 为引物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件:94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 45 s, 53 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 3 min, 5 个循环; 94 °C 变性 45 s, 48 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 3 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物以 1.0% 琼脂糖

凝胶电泳分离,纯化目的片段,再进行连接、转化、克隆,PCR 菌液检测后测序。

1.7 基因组序列克隆

依据目的基因 cDNA 序列,在两端非编码区及其附近设计基因特异引物,结果发现引物 S4、S5 符合条件(表 2)。以腐烂茎线虫 DNA 为模板,以 S4、S5 为引物进行 PCR 反应,扩增目的基因的基因组序列。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 53 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 4 min, 5 个循环; 94 °C 变性 1 min, 48 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 5 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离,纯化目的片段,再进行连接、转化、克隆,PCR 菌液检测后测序。

1.8 基因序列及其编码蛋白氨基酸序列分析

在 NCBI 网站(www.ncbi.nlm.nih.gov/)进行基因 Blast X 同源比对分析,用软件 DNAMAN 对基因 cDNA 序列进行开放性阅读框预测及其核苷酸序列翻译。以软件 Clustal X 对来自 6 个不同物种的 HSP90(表 3)和本研究中克隆的 HSP90 氨基酸序列进行多序列比对,其结果用软件 GENEDOC 进行编辑。以软件 MEGA 4.0 UPGMA 算法对来自 9 个不同物种的 HSP90(表 4)和本研究中克隆的 HSP90 进行系统进化分析。以 Compute pI/Mw (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html) 预测蛋白分子质量,以 GSDS (http://gsds.cbi.pku.edu.cn/)进行基因内含子外显子结构分析。

表 3 6 个不同物种中的 HSP90 序列信息

Table 3 Information of HSP90s from six different species

物种 Species	基因库登录号 GenBank accession of HSP90
<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	ACY01918
<i>Heterodera glycines</i>	ACR57216
<i>Meloidogyne incognita</i>	ADD10372
<i>Caenorhabditis briggsae</i>	Q18688
<i>Homo sapiens</i>	NP_031381
<i>Escherichia coli</i>	ADR25877

表 4 来自 9 个不同物种中的 HSP90

Table 4 HSP90s from nine different species

物种 Species	基因库登录号 GenBank accession of HSP90
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Q18688
<i>Haemonchus contortus</i>	ACU00668
<i>Brugia pahangi</i>	CAA06695
<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	ACY01918
<i>Heterodera glycines</i>	ACR57216
<i>Meloidogyne artiellia</i>	CAU15484
<i>Meloidogyne incognita</i>	ADD10372
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EDN60908
<i>Escherichia coli</i>	ADR25877

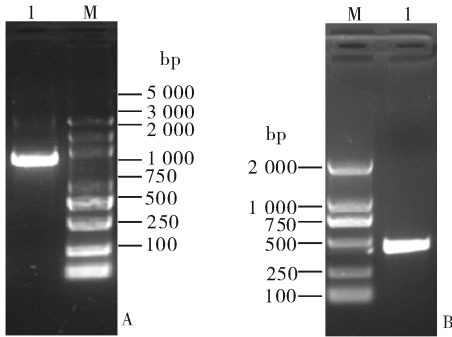
1.9 Southern 分析

将 15 μg 腐烂茎线虫基因组 DNA 分装至 3 个 0.2 mL PCR 管中,用限制性内切酶 *EcoR* I、*EcoR* V 和 *Hind* III 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下酶切 16 h。根据目的基因的基因组序列设计序列特异引物 S6 和 S7 (表 2)。参照 DIG DNA PCR 标记试剂盒说明书合成探针,并依照 DIG High Primer DNA Labeling and Detection Starter Kit I 试剂盒说明书进行杂交和显影。

2 结果与分析

2.1 *hsp90* cDNA 全长的克隆与序列分析

根据腐烂茎线虫 *hsp90* 的 EST 序列,用 RACE 技术克隆该基因 3' 和 5' cDNA 末端序列,测序结果表明,其大小分别为 1 685 bp 和 395 bp (图 1)。

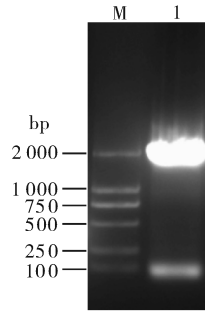


M: DL 2 000 marker; 1: PCR 产物 PCR products.

图 1 腐烂茎线虫 *hsp90* 3' 和 5' RACE 的 PCR 产物

Fig. 1 PCR products of *hsp90* gene from *D. destructor* 3' and 5' RACE

对已获得的 2 个 cDNA 片段同腐烂茎线虫 *hsp90* EST 序列进行序列拼接,结果获得了 1 个全长为 2 347 bp 的 cDNA 序列。在该 cDNA 序列两端设计基因特异引物,进行 PCR 扩增、测序,结果克隆到 1 个为 2 253 bp 的 cDNA 片段 (图 2)。将此 2 253 bp 的 cDNA 片段和目的基因 cDNA 拼接序列进行比对分析,分析结果显示两序列一致,这表明从腐烂茎线虫中克隆的 HSP90 基因 cDNA 拼接序列正确。该 *hsp90* 基因 cDNA 全长含有 1 个 2 160 bp 的开放性阅读框,其 5' 端起始密码子 ATG 前有 1 个 70 bp 的非编码区,3' 端有 1 个 117 bp 的非编码区,且 3' 端有多聚腺苷酸尾及加尾信号 (AATAAA)。因此,从腐烂茎线虫中克隆的 *hsp90* cDNA 序列为完整序列,命名为 *Dd-hsp90-1*,其 GenBank 登录号为 HQ901595。



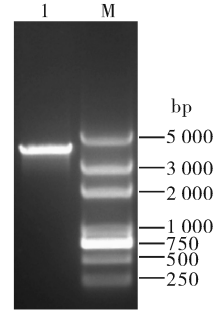
M: DL 2 000 marker; 1: 引物 S4 & S5 的 PCR 产物 Product of PCR primers S4 & S5.

图 2 腐烂茎线虫 *hsp90* cDNA 全长的 PCR 扩增

Fig. 2 Amplification of PCR primers S4 & S5 of *hsp90* gene from *D. destructor*

2.2 *hsp90* 的基因组序列克隆及序列分析

以基因特异引物 S4 和 S5 为 PCR 引物,以腐烂茎线虫基因组 DNA 为模板扩增目的基因的基因组序列并测序,结果克隆到 1 个 4 008 bp 大小的 DNA 片段 (图 3)。



M: DL 2 000 marker; 1: 引物 S4 & S5 的 PCR 产物 Product of PCR primers S4 & S5.

图 3 腐烂茎线虫 *hsp90* 的基因组序列克隆

Fig. 3 Clone of *hsp90* genomic sequence from *D. destructor*

依据腐烂茎线虫 *hsp90* cDNA 全长序列及其基因组序列进行内含子外显子结构分析,结果显示,其基因含有 9 个内含子,1 个 70 bp 的 5'-UTR 和 1 个 117 bp 的 3'-UTR,且内含子两端拼接位点序列遵守 GT/AG 规则 (图 4)。

2.3 HSP90 氨基酸的序列分析

根据从腐烂茎线虫中克隆的 *hsp90* cDNA 全长序列推测其编码蛋白含有 719 个氨基酸残基,分子质量约为 82.79 ku。以 SingalP 3.0 对腐烂茎线虫 HSP90 进行信号肽预测,结果显示在其氨基端没有信号肽。以来自不同物种的 7 种 HSP90 氨基酸序列进行序列比对分析,结果表明,腐烂茎线虫 HSP90 含有 HSP90 蛋白家族保守的亮氨酸拉链序

列 (leucine zipper sequence)、LXXLL 序列和 GXXGXXG 基系以及胞质型 HSP90 蛋白家族的 5 个特征序列和 MEEVD 基系^[18] (图 5)。由此可见,从腐烂茎线虫中克隆到的基因为胞质型 *hsp90*,且属于 A 型。

2.4 HSP90 的系统进化分析

腐烂茎线虫与其他物种的 HSP90 系统进化分析表明,来自人体寄生线虫捻转血矛线虫 *Haemonchus contortus*、彭亨布鲁线虫 *Brugia pahangi* 和植物寄生线虫腐烂茎线虫、松材线虫 *Bursaphelenchus*

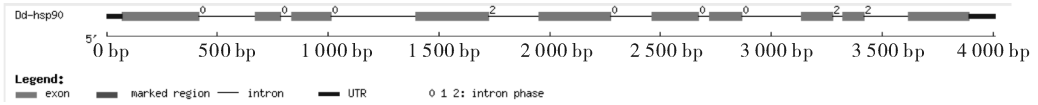


图 4 腐烂茎线虫 *hsp90* 的内含子外显子结构分析结果

Fig. 4 Intron-exon structure analysis result of *hsp90* from *D. destructor*

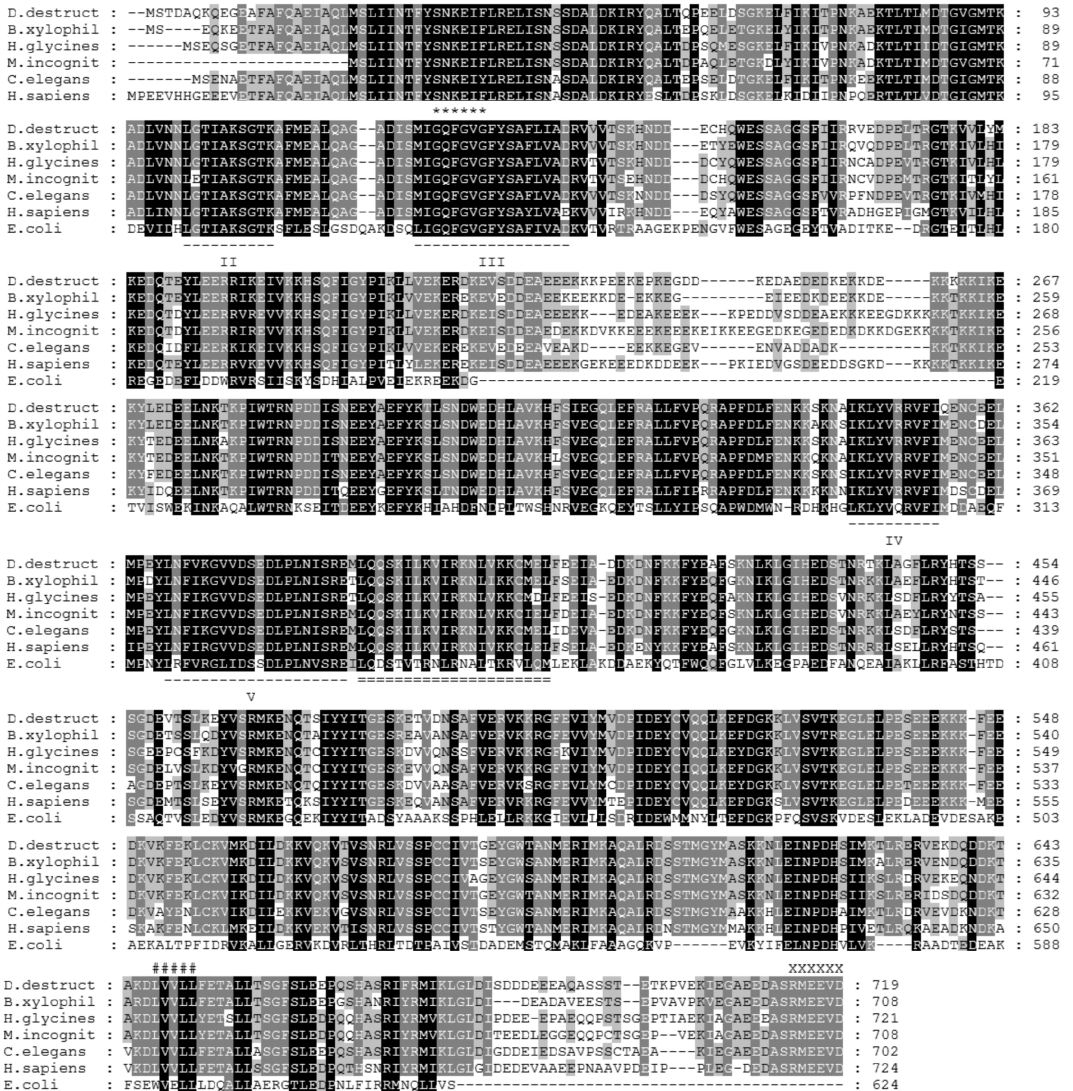


图 5 腐烂茎线虫与其他物种 HSP90 氨基酸的序列比对分析

Fig. 5 Multi-sequence alignment of heat shock protein 90 from *D. destructor* and other species

下划线标注 HSP90 的 5 个特征序列。双下划线标注保守的亮氨酸拉链序列。“#”号标注保守的 LXXLL 序列,该序列能与细胞核受体结合。“*”号标注 GXXGXXG 基系。“XXXXX”号标注胞质型 HSP90 具有的 MEEVD 基系。The five HSP90 signature sequences are underlined. The consensus leucine zipper sequence is double underlined. The consensus LXXLL sequence, which has been shown to bind nuclear receptors, is indicated with the sign “#”plus sign. The GXXGXXG motif was indicated with the sign “*”. The cytoplasmic HSP90 sequence motif (MEEVD) is indicated with the sign “XXXXX”.

xylophilus 以及自由生线虫秀丽小杆线虫的 HSP90 聚为一支, 而植物寄生线虫大豆孢囊线虫 *Heterodera glycines*、南方根结线虫 *Meloidogyne incognita* 和甘蓝根结线虫的 HSP90 形成另一进化支系(图 6)。同源比对分析结果显示, 腐烂茎线虫

HSP90 与来自秀丽小杆线虫、捻转血矛线虫、彭亨布鲁线虫、松材线虫、大豆孢囊线虫、甘蓝根结线虫和南方根结线虫的 HSP90 氨基酸序列一致性分别达到 82.20%、83.59%、85.02%、86.65%、83.45%、84.46% 和 82.33%。

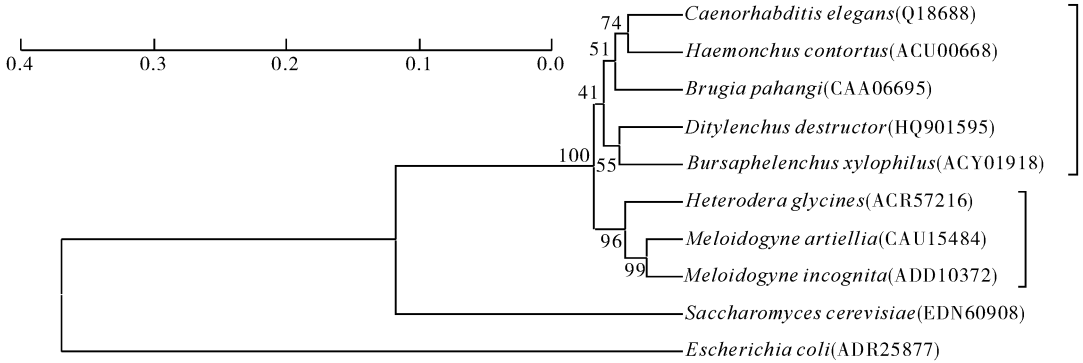
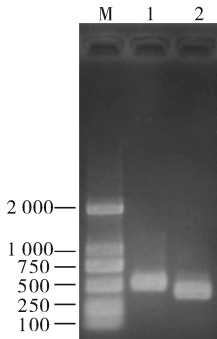


图 6 不同物种的 HSP90s 系统进化分析

Fig. 6 Phylogenetic tree of heat shock protein 90s from different species

2.5 腐烂茎线虫 *hsp90* 的 Southern 分析

为分析腐烂茎线虫 *hsp90* 的拷贝数, 以 PCR 方法合成了 1 条腐烂茎线虫 *hsp90* 特异的地高辛标记探针, 其大小为 375 bp(图 7), 该探针序列包含 1 个限制性内切酶 *Hind* III 的酶切位点。



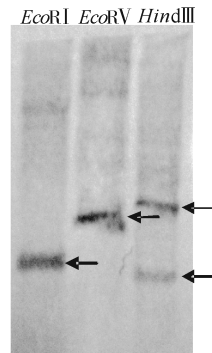
M: DL 2 000 marker; 1: 以引物 S6 和 S7 进行 PCR 扩增合成的腐烂茎线虫 *hsp90* 地高辛标记探针。Digoxigenin labeled probe of *D. destructor hsp90* gene synthesized by PCR amplification with primers S6 and S7; 2: 未进行地高辛标记引物 S6 和 S7 的 PCR 产物。Unlabeled PCR product of primers S6 and S7.

图 7 腐烂茎线虫 *hsp90* 的探针合成

Fig. 7 Probe synthesis of *hsp90* from *D. destructor*

以限制性内切酶 *Eco*R I、*Eco*R V 和 *Hind* III 分别对腐烂茎线虫基因组 DNA 进行酶切, 并以 *hsp90* 地高辛标记探针进行杂交。结果显示, *Eco*R I、*Eco*R V 和 *Hind* III 酶切的腐烂茎线虫基因组分别显示 1 条、1 条和 2 条条带(图 8)。这表明腐烂茎线虫 *hsp90* 为单拷贝基因。由于在探针序列中存在

1 个 *Hind* III 的酶切位点, 因此 *Hind* III 在探针杂交序列中将单拷贝的腐烂茎线虫 *hsp90* 酶切成 2 段, 杂交探针与 *hsp90* 基因的 2 段分别杂交, 进而显示 2 条条带(图 8)。



以腐烂茎线虫 2 龄幼虫基因组 DNA 进行 DNA 限制内切酶酶切反应后, 对其 *hsp90* 杂交探针进行 Southern 分析。箭头处表示与 *hsp90* 杂交探针杂交显色的条带。A Southern blot of restriction enzyme-cleaved genomic DNA extracted from *D. destructor* second-stage juveniles was hybridized with a probe obtained by PCR amplification of the *D. destructor hsp90* gene. Bands that hybridized to the *hsp90* probe are indicated by arrows.

图 8 腐烂茎线虫 *hsp90* 的 Southern 分析

Fig. 8 Southern blot of *hsp90* from *D. destructor*

3 讨论

系统进化分析结果表明, 腐烂茎线虫 *hsp90* 与松材线虫 *hsp90* 基因属于同一个进化支系, 表明这 2 个物种的热激蛋白基因可能功能同源。此外, 腐

烂茎线虫与松材线虫的热激蛋白形成的进化支系独立于来自大豆孢囊线虫、甘蓝根结线虫和南方根结线虫的 *hsp90* 基因形成的进化支系,这与这几种植物寄生线虫之间生理特性的异同点吻合。腐烂茎线虫与松材线虫为食真菌的植物寄生线虫^[14, 19],在植物体内不能诱导植株形成特异组织结构——取食位点(feeding site),表现为迁移性寄生方式^[20]。大豆孢囊线虫、甘蓝根结线虫和南方根结线虫不食真菌,而且在寄主植株中诱导植株形成取食位点,通过取食位点获取植物体内的营养物质,表现为固着性寄生方式^[21]。因此,*hsp90* 的系统进化分析结果体现了这几种植物寄生线虫取食行为的异同。

从腐烂茎线虫中克隆的 *hsp90* 基因为单拷贝,这与秀丽小杆线虫^[22]、大豆孢囊线虫和爪哇根结线虫 *Meloidogyne javanica*^[18]、果蝇^[23]以及鳞翅类动物家蚕 *Bombyx mori* 和草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*^[24] 中的 *hsp90* 拷贝数一致。由此可以推测,在植物寄生线虫中,*hsp90* 基因可能均为单拷贝基因。

Skantar 等^[18] 研究发现,植物寄生线虫北方根结线虫 *M. hapla* 2 个不同种群间 *hsp90* 基因序列表现差异,据此推测 *hsp90* 基因可能实现植物寄生线虫不同种群的分子鉴定。但由于有关植物寄生线虫不同种群的 *hsp90* 基因序列信息很少,这一研究推论仍有待进一步的验证。因此,今后有必要对腐烂茎线虫不同种群中的 *hsp90* 基因进行克隆并对基因序列进行比较分析,进一步探讨 *hsp90* 基因在植物寄生线虫种群分子鉴定中的应用价值。

参 考 文 献

- [1] 戴素明,成新跃,肖启明,等. 松材线虫 Hsp70 基因的克隆与原核表达[J]. 植物病理学报,2007,37(5):512-519.
- [2] GUPAT S C, SHARMA A, MISHRA M, et al. Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? [J]. Life Sciences, 2010, 86(11/12): 377-384.
- [3] CHEN B, ZHONG D, MONTEIRO A. Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms[J]. BMC Genomics, 2006, 7: 156.
- [4] TAIPALE M, JAROSZ D F, LINDQUIST S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2010, 11: 515-528.
- [5] MCCLELLAN A J, SCOTT M D, FRYDMAN J. Folding and quality control of the VHL tumor suppressor proceed through distinct chaperone pathways[J]. Cell, 2005, 121(5): 739-748.
- [6] DEZWAAN D C, FREEMAN B C. HSP90 manages the ends [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2010, 35(7): 384-391.
- [7] TSAN M F, GAO B. Heat shock proteins and immune system [J]. Journal of Leukocyte Biology, 2009, 85(6): 905-910.
- [8] 范海延, 陈捷, 曲波, 等. 应答白粉病菌胁迫的黄瓜 S 17 叶片功能蛋白质组学初步分析[J]. 植物病理学报, 2009, 39(6): 650-652.
- [9] TAKAHASHI A, CASAIS C, ICHIMURA K, et al. HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in *Arabidopsis* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2003, 100(20): 11777-11782.
- [10] HUBERT D A, TORNERO P, BELKHADIR Y, et al. Cytosolic HSP90 associates with and modulates the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance protein [J]. The EMBO Journal, 2003, 22(21): 5679-5689.
- [11] BHATTARAI K K, LI Q, LIU Y, et al. The *Mt*-1-mediated pest resistance requires Hsp90 and *Sgt1* [J]. Plant Physiology, 2007, 144: 312-323.
- [12] DEVANEY E. Thermoregulation in the life cycle of nematodes [J]. International Journal for Parasitology, 2006, 36(6): 641-649.
- [13] DELUCA F, DIVITO M, FANELLI E, et al. Characterization of the heat shock protein 90 gene in the plant parasitic nematode *Meloidogyne artiellia* and its expression as related to different developmental stages and temperature [J]. Gene, 2009, 440(1/2): 16-22.
- [14] YOUNG H K, SEUNG H O. *In vitro* culture and factors affecting population changes of *Ditylenchus destructor* of ginseng [J]. Korean Journal of Plant Pathology, 1995, 11(1): 39-46.
- [15] 徐进军, 李世东, 杨之为. 马铃薯茎线虫的培养 [J]. 西北农业学报, 2004, 13(4): 77-80.
- [16] 丁中, 彭德良, 高必达, 等. 甘薯茎线虫乙酰胆碱酯酶基因 *ace-3* 全长 cDNA 的克隆和序列分析 [J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(2): 326-331.
- [17] PATEL N. Functional analyses of cyst nematode parasitism genes [D]. North Carolina: North Carolina State University, 2008.
- [18] SKANTAR A M, CARTA L K. Molecular characterization and phylogenetic evaluation of the *hsp90* gene from selected nematodes [J]. Journal of Nematology, 2004, 36(4): 466-480.
- [19] 陆伟, 陈学新, 郑经武, 等. 松材线虫与拟松材线虫 rDNA 中 ITS 区的比较研究 [J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(4): 387-390.
- [20] MOENS M, PERRY R N. Migratory plant endoparasitic nematode: a group rich in contrasts and divergence [J]. Annual Review of Phytopathology, 2009, 47: 313-332.
- [21] DAVIS E L, HUSSEY R S, BAUM T J. Parasitism genes: what they reveal about parasitism [J]. Plant Cell Monographs, 2009, 15: 15-44.

- [22] BIRNBY D A, LINK E M, VOWELS J J, et al. A transmembrane guanylyl cyclase (DAF-11) and Hsp90 (DAF-21) regulate a common set of chemosensory behaviors in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 2000, 155: 85-104.
- [23] KONSTANTOPOLOU I, SCOURAS Z G. The heat-shock gene *hsp83* of *Drosophila auraria*: genomic organization, nucleotide sequence, and long antiparallel coupled ORFs (LAC ORFS) [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1998, 46(3): 334-343.
- [24] LANDAIS I, POMMET J M, MITA K, et al. Characterization of the cDNA encoding the 90 kDa heat-shock protein in the Lepidoptera *Bombyx mori* and *Spodoptera frugiperda* [J]. *Gene*, 2001, 271(2): 223-231.

Cloning and sequence analysis of a new heat shock protein gene from *Ditylenchus destructor*

GENG Tian^{1,2} PENG De-liang¹ LI Jian-hong² HUANG Wen-kun¹
WANG Gao-feng¹ PENG Huan¹ LONG Hai-bo¹

1. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences /

State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Beijing 100193, China;

2. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Heat shock protein 90 genes (*hsp90s*) are multifunctional genes, which are related to biological development, biological defense reactions, environmental stress tolerance and so on. In this research, a heat shock protein 90 gene (*Dd-hsp90-1*; GenBank Accession: HQ901595) was cloned from *Ditylenchus destructor* by RT-PCR and RACE. The cDNA sequence consisted of a 2 160 bp open reading frame (ORF) encoding 719 amino acid residues that was flanked by a 70 bp 5' untranslated region (UTR) and a 117 bp 3'-UTR. The result of intron-exon structure analysis showed that the genomic sequence of *Dd-hsp90-1* also contained 9 introns. And all the introns obeyed the GT/AG rule in the splice-site junctions. The molecular weight of *Dd-hsp90-1* deduced protein was about 82.79 ku. *Dd-hsp90-1* was a single copy gene was highly homologous to other *hsp90s*. There were consensus amino acid sequences and motifs of HSP90s in the amino acid sequence of deduced protein Dd-HSP90-1. Furthermore, the deduced protein Dd-HSP90-1 also contained five signature sequences and MEEVD motif specific to cytoplasmic HSP90s. All of these demonstrated that *Dd-hsp90-1* was an cytoplasmic *hsp90*. Phylogenetic dendrogram indicated that *Dd-hsp90-1* was most closely related to *Baursaphelenchus xylophilus hsp90* (ACY01918) with 86.65% sequence identity. It also revealed the differences in the feeding behaviors of plant parasitic nematodes.

Key words *Ditylenchus destructor*; heat shock protein 90 genes; cloning; sequence analysis

(责任编辑:陈红叶)