

徐剑文, 赵 君, 刘剑光, 等. 芝麻全基因组 *Hsp70* 基因的鉴定与生物信息学分析[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(3): 493-502.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.03.003

芝麻全基因组 *Hsp70* 基因的鉴定与生物信息学分析

徐剑文, 赵 君, 刘剑光, 肖松华
(江苏省农业科学院经济作物研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 利用隐马尔可夫模型(HMM)对芝麻全基因组 *Hsp70* 基因进行了系统分析,共鉴定出 21 个 *Hsp70* 基因,其中 17 个属于 *DnaK* 基因亚家族,4 个属于 *Hsp110/SSE* 基因亚家族。根据系统进化树分析和亚细胞定位结果,将芝麻 21 个 *Hsp70* 基因分为 6 个亚组,其中 I 亚组 3 个,定位于叶绿体;II 亚组 2 个,定位于线粒体;III 亚组 5 个,定位于内质网;IV 亚组 6 个,定位于细胞质基质;V 亚组 4 个,属于 *Hsp110/SSE* 基因家族;VI 亚组 1 个。芝麻 *Hsp70* 基因启动子区域顺式作用元件功能预测结果显示,*Hsp70* 基因参与芝麻的生长发育和逆境胁迫响应等生理过程。

关键词: 芝麻; *Hsp70* 基因; 生物信息学分析

中图分类号: S565.301

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2017)03-0493-10

Genome-wide identification and bioinformatics analysis of *Hsp70* gene family in *Sesamum indicum*

XU Jian-wen, ZHAO Jun, LIU Jian-guang, XIAO Song-hua
(Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: In this study, *Hsp70* genes in the sesame genome were systematically analyzed with Hidden Markov Model (HMM). A total of 21 *SiHsp70* genes were identified, among which, seventeen belong to *DnaK* subfamily and four of them belong to *Hsp110/SSE* subfamily. Based on the phylogenetic and subcellular localization analysis, the 21 *SiHsp70* genes were classified into 6 subgroups. Three chloroplast-localized genes belong to subgroup I, two mitochondrial-localized genes belong to subgroup II, five ER-localized genes belong to subgroup III, six cytoplasmic-localized genes belong to subgroup IV, four *Hsp110/SSE*-type genes belong to subgroup V, and one gene belongs to subgroup VI. The cis-acting elements in the promoters of *SiHsp70* genes were further analyzed, and the results demonstrated that they were involved in growth, development and stress response.

Key words: *Sesamum indicum*; *Hsp70* gene; identification; bioinformatics analysis

热激蛋白(Heat shock protein, Hsp)广泛存在于植物、动物和微生物中,1962 年, Ritossa 首次在地中海果蝇(*Drosophila melanogaster*)中发现该种

蛋白质^[1-5]。在细胞受到外界不利环境刺激时,该类蛋白编码基因的表达受到诱导。根据蛋白质分子量大小,Hsp 蛋白被分为 Hsp100、Hsp90、Hsp70、Hsp60 和小分子 Hsp^[6-7]。其中,Hsp70 是一类结构高度保守的重要 Hsp 蛋白家族,广泛参与生物应激反应^[8-9]。根据其表达特征可分为 Hsc70 (Heat shock cognate protein)和 Hsp70 2 大类,而根据其结构特征 Hsp70 又被分为 *DnaK* 和 *Hsp110/SSE* 2 个亚家族。

收稿日期:2016-09-08

基金项目:江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(14)2038]

作者简介:徐剑文(1984-),男,江苏南京人,博士,助理研究员,主要从事作物遗传育种研究,(E-mail) gunman_xu@hotmail.com

通讯作者:肖松华,(Tel)025-84390363;(E-mail) njxsh@sina.com

动物中 Hsp70 的研究起步较早,很多 Hsp70 蛋白的功能被深入地揭示。有研究结果表明,在正常环境中,Hsp70 主要参与蛋白质的代谢与组装,而当受到外界环境刺激时,Hsp70 大量表达并与靶蛋白结合,保护其结构和功能^[10-12]。近年来,Hsp70 在医学上的功能受到越来越多的关注^[13]。研究发现 Hsp70 能够促进免疫反应,并能诱发肿瘤细胞凋亡^[14]。植物 Hsp70 能够与人类抗原提呈细胞上的受体结合,并在免疫反应中发挥功能^[15-16]。

植物 Hsp70 功能的研究要落后于动物 Hsp70 的研究。近年来的相关研究结果显示,Hsp70 在植物生长发育过程中发挥重要作用。拟南芥中 *Hsc70-1* 基因的过量表达会抑制侧根的生成和根尖分生组织的活性,从而导致植株矮化^[17-18]。而 *AtHsp70-15* 基因的缺失突变会引起植株矮化和叶片畸形^[19]。在植物对非生物胁迫的响应过程中,Hsp70 基因也发挥着重要作用。拟南芥中 *Hsc70-1* 基因的过量表达能够提高植株对高温胁迫的耐性^[20]。水稻线粒体 *Hsp70* 基因能够维持线粒体膜电位差的稳定并抑制活性氧物质的扩散,从而提高对高温的耐性^[21]。此外,过量表达拟南芥 *Hsc70-1* 基因和水稻线粒体 *Hsp70* 基因能够提高植物对盐胁迫的耐受性^[18]。胡秀丽等认为,Hsp70 基因通过提高植物细胞中抗氧化保护酶的活性,从而提高耐盐性和耐高温性^[22]。而在植物对生物胁迫的响应过程中,Hsp70 也发挥着重要作用。沉默烟草中 *Hsp70* 基因会降低植株对假单胞杆菌的非宿主抗性^[23]。拟南芥中的胞质 *Hsc70* 和核 *Hsc70* 基因通过与 *SGT1* 基因的相互作用调控拟南芥的免疫应答,其缺失突变会导致植株对病原菌防御能力的丧失^[24]。而 *AtHsp70-15* 基因的缺失突变能够提高拟南芥对萝卜花叶病毒(TuMV)的抗性,但也会降低对高温等非生物胁迫的耐性^[19]。

Hsp70 基因在植物生长发育和胁迫响应中起重要作用,近年来其功能越来越受到重视,陆续从拟南芥、水稻、烟草等植物中鉴定出 *Hsp70* 基因。2014 年芝麻(*Sesamum indicum*)全基因组测序完成^[25]。目前关于芝麻中 *Hsp70* 基因的信息还没有报道。本研究利用隐马可链夫模型(Hidden Markov Model, HMM),在芝麻基因组中鉴定 *Hsp70* 基因,并分析其进化关系及结构特征,再通过分析这些 *Hsp70* 基因

的启动子顺式作用元件,预测芝麻 *Hsp70* 基因的功能,为芝麻 *Hsp70* 基因的分子生物学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 芝麻 *Hsp70* 基因的鉴定

从 Pfam 数据库获取 Hsp70 种子文件(PF00012),利用 HMMER 3.0 程序包中的 *hmm-build* 命令将其转化成隐马氏模型序列模式。从 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)下载芝麻基因组序列,利用 HMMER 3.0 程序包中的 *hmmsearch* 命令预测芝麻基因组中 Hsp70 蛋白编码基因。利用 MolQuest 软件(2.3.3)中的 Fgenesh 程序(<http://Linux1.softberry.com/berry.phtml>)预测基因组中的 ORF。利用 CCD 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析预测到的芝麻 Hsp70 蛋白序列,确认其含有 Hsp70 家族结构域。

1.2 芝麻 *Hsp70* 基因的连锁群定位和结构分析

根据 HMMER 3.0 预测到的芝麻 *Hsp70* 基因的信息,利用 Mapchart 2.30(<http://www.wageningenur.nl/en/Expertise-Services/Research-Institutes/plant-research-international/About/Organisation/Bio-metrie/Collaboration/Software-Service/Download-MapChart.htm>)进行连锁群定位作图。根据芝麻 *Hsp70* 的基因组序列和 CDS 序列,利用 GSDS 2.0 软件(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)进行基因结构分析并作图。

1.3 芝麻 *Hsp70* 蛋白的分类与系统发育分析

利用 ClustalX 1.83 软件对芝麻 Hsp70 和拟南芥的 Hsp70 蛋白氨基酸序列进行多序列比对,结合比对结果与拟南芥 Hsp70 蛋白的分类依据,进行芝麻 Hsp70 的分类。利用 MEGA 5.0 软件 Neighbor-Joining 算法构建系统进化树,设置 JTT 模型,位点替换速率 Gamma 分布,Bootstrap 值为 1 000。利用 MEGA 5.0 软件的 Pairwise Distances 算法,根据核苷酸序列分析各芝麻 *SiHsp70* 基因之间的遗传距离。

1.4 芝麻 *Hsp70* 基因的功能预测

利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)网站预测候选 *SiHsp70* 基因启动子区域包含的转录因子顺式作用元件,分析基因的调控方式,并预测其功能。

2 结果与分析

2.1 芝麻 *Hsp70* 基因的鉴定与连锁群定位

利用 Pfam 工具搜索和在线数据库 CDD 比对鉴定,共获得 21 个典型的芝麻 *Hsp70* 蛋白编码基因,根据其在连锁群上的位置分别命名为 *SiHsp70-01* ~

SiHsp70-21 (表 1)。除第 6 和第 9 连锁群外,21 个芝麻 *Hsp70* 基因被锚定于其余 10 条连锁群上(图 1)。第 8 和第 10 连锁群上 *Hsp70* 基因数目分布最多,均包含 5 个家族成员;第 2、第 4、第 7、第 11 和第 12 连锁群上 *Hsp70* 基因数目最少,只含有 1 个成员;其余连锁群上包含 2 个 *Hsp70* 基因。

表 1 芝麻 *Hsp70* 基因家族信息

Table 1 The information of *Hsp70* gene family in sesame

基因	GenBank 编号	基因组序列长度 (bp)	ORF 长度 (bp)	氨基酸长度 (aa)	连锁群
<i>SiHsp70-01</i>	LOC105164015	6 019	2 571	856	1
<i>SiHsp70-02</i>	LOC105165268	2 240	1 968	655	1
<i>SiHsp70-03</i>	LOC105175877	4 050	2 085	694	2
<i>SiHsp70-04</i>	LOC105157615	6 311	2 538	845	3
<i>SiHsp70-05</i>	LOC105158297	2 406	1 968	655	3
<i>SiHsp70-06</i>	LOC105160324	3 845	1 998	665	4
<i>SiHsp70-07</i>	LOC105161464	3 007	1 941	646	5
<i>SiHsp70-08</i>	LOC105162907	2 288	1 956	651	5
<i>SiHsp70-09</i>	LOC105166756	4 139	1 998	665	7
<i>SiHsp70-10</i>	LOC105169310	3 578	2 031	676	8
<i>SiHsp70-11</i>	LOC105169306	3 729	2 031	676	8
<i>SiHsp70-12</i>	LOC105167430	8 277	2 715	904	8
<i>SiHsp70-13</i>	LOC105169084	5 717	2 115	704	8
<i>SiHsp70-14</i>	LOC105169436	2 504	1 971	656	8
<i>SiHsp70-15</i>	LOC105171342	3 099	1 722	573	10
<i>SiHsp70-16</i>	LOC105171901	2 976	1 950	646	10
<i>SiHsp70-17</i>	LOC105172378	3 058	1 974	657	10
<i>SiHsp70-18</i>	LOC105172524	4 092	2 115	704	10
<i>SiHsp70-19</i>	LOC105172577	2 962	1 977	658	10
<i>SiHsp70-20</i>	LOC105174436	3 317	1 941	646	11
<i>SiHsp70-21</i>	LOC105175352	7 768	2 271	756	12

2.2 芝麻 *Hsp70* 基因的结构及分类

利用 GSDS 2.0 软件 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>),根据芝麻 *Hsp70* 基因家族各成员的 ORF 及其对应的基因组序列进行基因作图。结果显示:21 个 *SiHsp70* 基因之间在内含子、外显子数量上存在较大差异。在 21 个 *Hsp70* 基因中,外显子和内含子数量最多的是 *SiHsp70-12*,含有 14 个外显子和 13 个内含子,而 *SiHsp70-02*、*SiHsp70-05*、*SiHsp70-08* 和 *SiHsp70-15* 基因没有内含子。其中 *SiHsp70-01* 和 *SiHsp70-03* 以及 *SiHsp70-10* 和 *SiHsp70-11* 在基因结构

上具有很高的相似性(图 2)。

依据芝麻的 21 个 *Hsp70* 蛋白,Sung 等^[26]报道的拟南芥中 14 个 *Hsp70* 蛋白和 Lin 等^[27]报道的拟南芥 *Hsp110*/SSE 亚族 3 个 *Hsp70* 蛋白氨基酸序列的 ClustalW 多序列比对结果,结合 Neighbor-joining (J) 和 Bootstrap 方法,分析芝麻 *Hsp70* 蛋白的同源性和系统进化关系。结果表明,芝麻中 21 个 *Hsp70* 基因被分为 6 个亚组(图 3)。其中 *SiHsp70-01*、*SiHsp70-04*、*SiHsp70-12*、*SiHsp70-21* 属于 *Hsp110*/SSE 基因家族,而其他 *Hsp70* 基因属于 *DnaK* 基因家族。

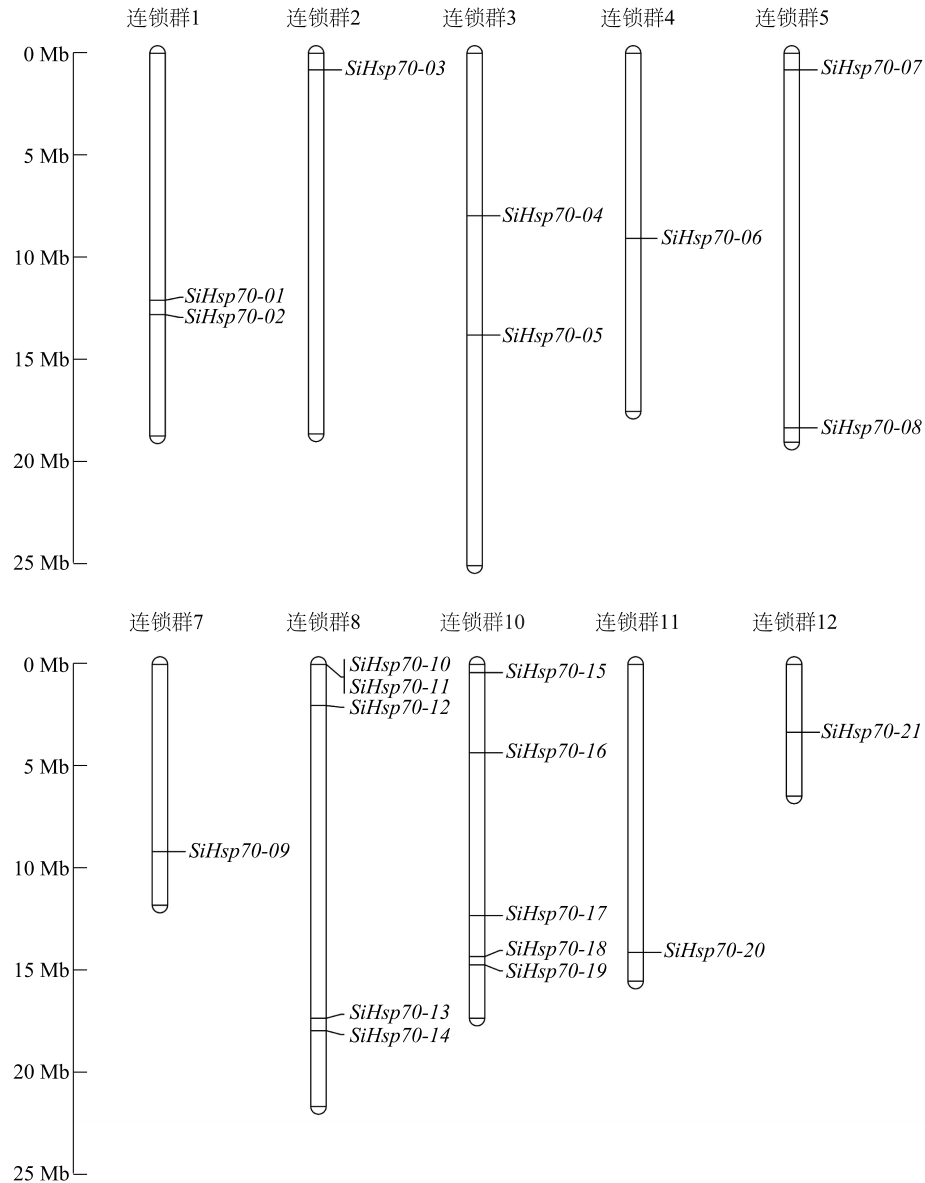


图 1 *SiHsp70* 基因在芝麻连锁群组上的相对位置

Fig.1 The relative position of *SiHsp70* genes in linkage groups of sesame genome

根据系统进化分析的结果,进一步利用 Clustal X 程序对同一亚组中的芝麻 Hsp70 蛋白家族氨基酸序列进行多序列比对。结果(图 4)显示:I 亚组中的芝麻 *SiHsp70* 蛋白与 *AtcpHsc70-1* (CAB45063)、*AtcpHsc70-2* (BAA97012) 在氨基酸序列上具有高度的相似性;II 亚组中的芝麻 *SiHsp70* 蛋白与 *AtmtHsc70-1* (CAB37531)、*AtmtHsc70-2* (CAB89371) 在氨基酸序列上具有高度的相似性;III 亚组中的芝麻 *SiHsp70* 蛋白与 *AtBiP-1* (AAF88019)、*AtBiP-2* (BAB08435)、*AtBiP-3* (AAB70400) 在氨基酸序列

上具有更高的相似性;在 IV 亚组中,芝麻 Hsp70 蛋白与拟南芥 Hsp70 蛋白在氨基酸序列上表现高度的相似性;在 V 亚组中,*SiHsp70-01*、*SiHsp70-04*、*AtHsp70-14* (AAG52240)、*AtHsp70-15* (AAG52244) 在整体上表现高度的相似性,而 *SiHsp70-21*、*AtHsp70-16* (AAD30257) 在整体上的相似度更高。此外,DnaK 亚家族中 Hsp70 蛋白的 N-端都包含高度保守的 ATP 结合基序 IDLGTT(N/Y)S(图 4),而 Hsp110/SSE 亚家族中的 Hsp70 蛋白则没有该基序。

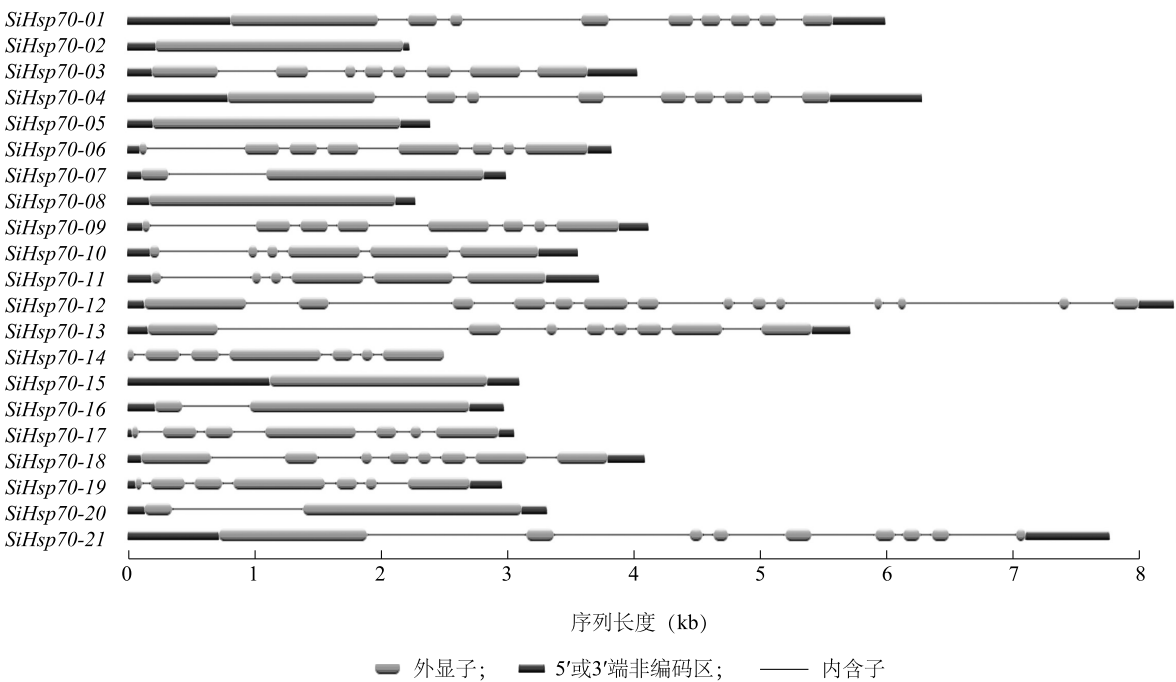


图 2 芝麻 *Hsp70* 家族成员的基因结构
Fig.2 The structure of *SiHsp70* gene family

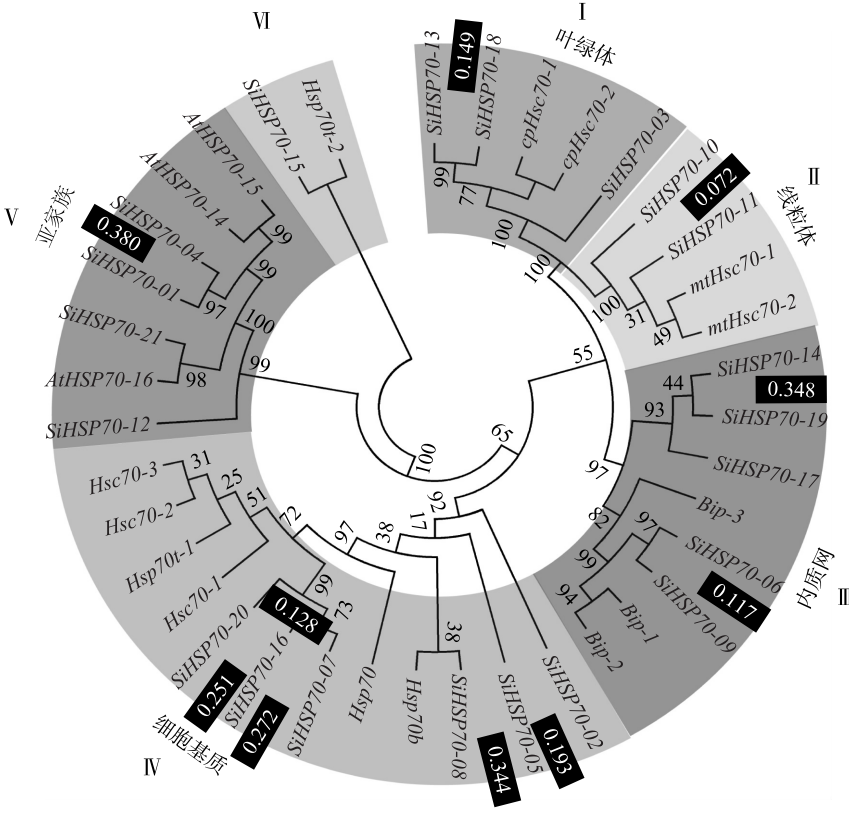
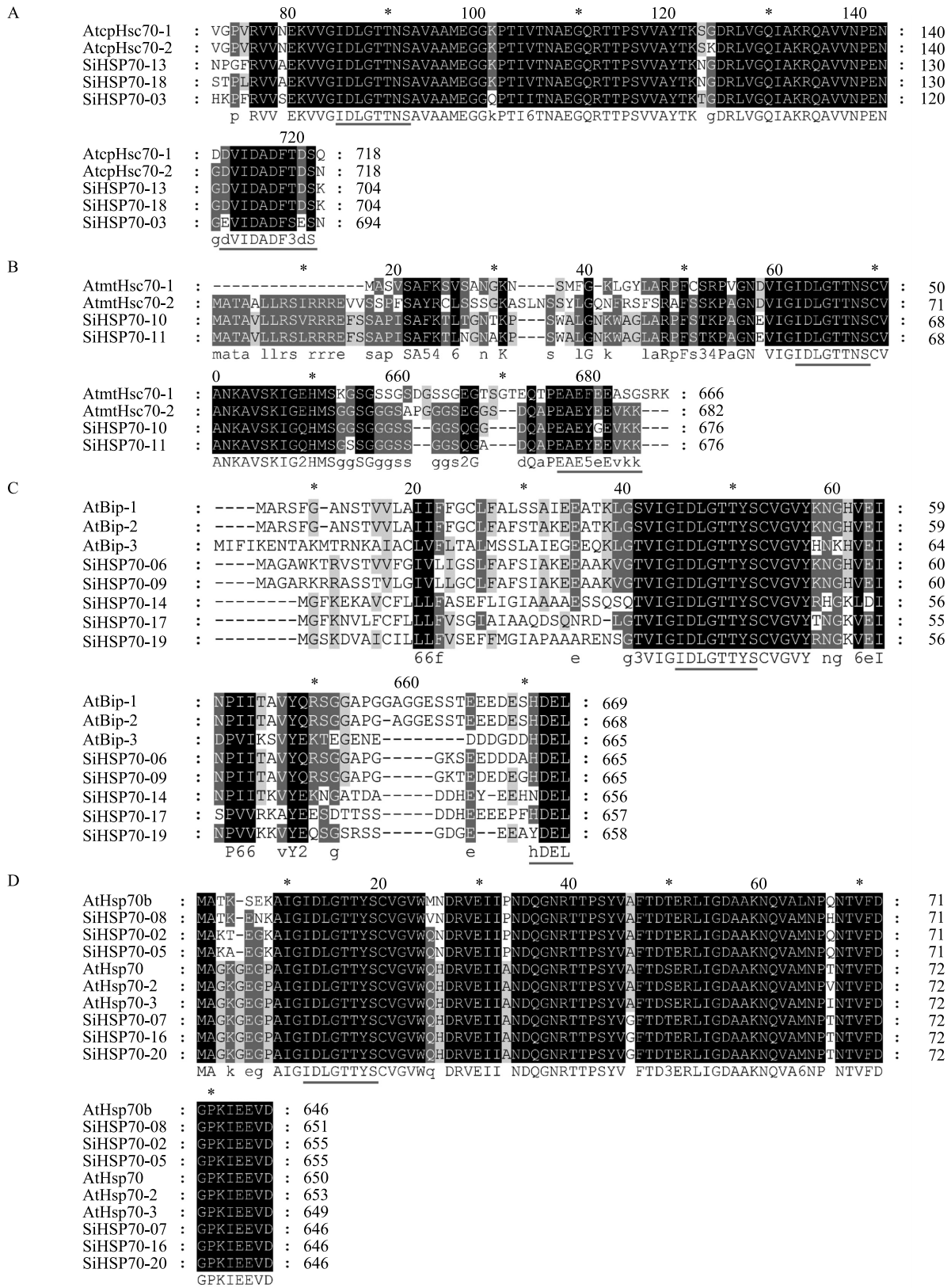


图 3 芝麻和拟南芥 *Hsp70* 基因的系统发生树与遗传距离分析
Fig.3 The phylogenetic tree and genetic distance of *Hsp70* genes from *Sesamum indicum* and *Arabidopsis thaliana*



A:第 I 亚组中与 AtcpHsc70 同源的 Hsp70;B:第 II 亚组中与 AtmtHsc70 同源的 Hsp70;C:第 III 亚组中的 Hsp70;D:第 IV 亚组中的 Hsp70。

图 4 不同亚组中 Hsp70 蛋白氨基酸序列对比

Fig.4 Amino acid sequence alignment of different Hsp70 subgroups

利用 MEGA 软件对 *SiHsp70* 基因的核苷酸序列进行遗传距离分析,发现 *SiHsp70-01* 与 *SiHsp70-04*、*SiHsp70-02* 与 *SiHsp70-05*、*SiHsp70-05* 与 *SiHsp70-08*、*SiHsp70-06* 与 *SiHsp70-09*、*SiHsp70-07* 与 *SiHsp70-16*、*SiHsp70-07* 与 *SiHsp70-20*、*SiHsp70-11* 与 *SiHsp70-12*、*SiHsp70-13* 与 *SiHsp70-18*、*SiHsp70-14* 与 *SiHsp70-19*、*SiHsp70-16* 与 *SiHsp70-20* 之间的遗传距离很小,分别为 0.380、0.193、0.344、0.117、0.272、0.128、0.072、0.149、0.348、0.251(图3)。

2.3 芝麻 *Hsp70* 蛋白亚细胞定位预测

根据已报道的芝麻 *Hsp70* 蛋白在拟南芥中同源蛋白的定位信息,预测 *SiHsp70* 的亚细胞定位(图3)。I 亚组中的拟南芥 *Hsp70* 蛋白定位于叶绿体(Chloroplast),预测该亚组中的 *SiHsp70* 蛋白定位于叶绿体中。II 亚组中的拟南芥 *Hsp70* 定位于线粒体(Mitochondrial),预测该亚组中的 *SiHsp70* 蛋白定位于线粒体中。III 亚组中的拟南芥 *Hsp70* 定位于内质网(ER),预测该亚组中的 *SiHsp70* 蛋白定位于内质网。IV 亚组中的拟南芥 *Hsp70* 定位于细胞质基质(Cytoplasmic),预测该亚组中的 *SiHsp70* 蛋白定位于细胞质基质。V 亚组中的拟南芥 *Hsp70* 属于 *Hsp110/SSE*

亚家族,定位于细胞质基质(Cytoplasmic),预测该亚组中的 *SiHsp70* 蛋白也定位于细胞质基质。VI 亚组中的 *AtHsp70t-2* 没有相关定位结果。

芝麻和拟南芥中 *Hsp70* 蛋白的氨基酸序列比对结果显示:第 I 亚组中定位叶绿体的 *Hsp70* 蛋白 C-端都包含(D/E)VIDADF(T/S)(D/E)S 基序;第 II 亚组中除 *AtmtHsc70-1* 外定位线粒体的 *Hsp70* 蛋白 C-端都包含 PEAHEY(E/G)EVKK 基序;第 III 亚组中定位内质网的 *Hsp70* 蛋白 C-端都包含内质网定位特征基序 HDEL;第 IV 亚组中定位细胞质基质的 *Hsp70* 蛋白 C-端都包含细胞质基质定位特征基序 EEVD(图4)。

2.4 芝麻 *Hsp70* 基因的功能分析

利用在线软件 PlantCARE 分析 *SiHsp70* 基因启动子包含的顺式作用元件,从而预测 *SiHsp70* 基因的功能。结果显示:在 21 个 *SiHsp70* 基因启动子上除了最基本的 TATA-box 和 CAAT-box 外,还包含了大量其他顺式作用元件,主要包括与光响应相关的顺式作用元件、与发育相关的顺式作用元件、与调节相关的顺式作用元件、与胁迫相关的顺式作用元件和与激素相关的顺式作用元件(表2~表4)。

表2 芝麻 *Hsp70* 基因启动子区域与光响应、发育、调节相关的顺式作用元件

Table 2 The light responsive, development and regulation related cis-acting elements in the promotor of *Hsp70*

元件相关生理过程	元件	功能	元件相关生理过程	元件	功能
光响应	AE-box	光响应	发育	GCN4_motif	胚乳表达
	AT1-motif	光响应		CAT-box	分生组织特异表达
	ATCT-motif	光响应		CCGTCC-box	分生组织特异表达
	ATGCAAAT motif	光响应		HD-Zip 1	栅栏叶肉细胞分化
	Box 4	光响应		HD-Zip 2	叶形态发育
	G-Box	光响应	调节	RY-element	种子特异调控
	GA-motif	光响应		AT-rich element	ATBP-1 蛋白结合位点
	Box I	光响应		HD-Zip 3	蛋白结合位点
	GATA-motif	光响应		Box III	蛋白结合位点
	Sp1	光响应		CCAAT-box	MYBHv1 蛋白结合位点
	as-2-box	光响应		MBSI	MYB 蛋白结合位点
	GT1-motif	光响应		A-box	顺式调节元件
	I-box	光响应		OBP-1 site	顺式调节元件
	TCT-motif	光响应		5UTR Py-rich stretch	顺式调节元件
	ACE	光响应		AT-rich sequence	诱导因子响应元件
	CATT-motif	光响应		EIRE	诱导因子响应元件
发育	Skn-1_motif	胚乳表达		ELI-box3	诱导因子响应元件

表 3 芝麻 *Hsp70* 基因启动子区域与胁迫相关的顺式作用元件Table 3 The stress related cis-acting elements in the promotor of *SiHsp70*

基因	HSE	TC rich repeats	WUN motif	ARE	GC motif	Box W1	MBS	LTR
<i>SiHsp70-01</i>	1	1	1	—	—	—	—	—
<i>SiHsp70-02</i>	—	—	—	3	—	1	1	—
<i>SiHsp70-03</i>	—	1	—	1	—	—	1	—
<i>SiHsp70-04</i>	—	1	—	1	—	—	3	—
<i>SiHsp70-05</i>	2	—	1	3	—	1	2	1
<i>SiHsp70-06</i>	1	—	—	1	—	—	1	1
<i>SiHsp70-07</i>	1	1	—	1	—	—	1	1
<i>SiHsp70-08</i>	2	2	—	1	—	1	—	—
<i>SiHsp70-09</i>	5	2	—	1	—	—	—	—
<i>SiHsp70-10</i>	—	1	1	—	—	—	1	—
<i>SiHsp70-11</i>	2	3	—	—	—	1	2	—
<i>SiHsp70-12</i>	—	—	—	—	3	2	3	—
<i>SiHsp70-13</i>	—	2	—	—	—	1	2	—
<i>SiHsp70-14</i>	—	—	2	1	—	1	1	—
<i>SiHsp70-15</i>	2	4	—	2	—	1	1	—
<i>SiHsp70-16</i>	4	2	—	2	—	—	2	—
<i>SiHsp70-17</i>	1	2	—	1	—	—	1	—
<i>SiHsp70-18</i>	—	3	—	1	—	2	1	—
<i>SiHsp70-19</i>	4	—	—	1	—	4	—	—
<i>SiHsp70-20</i>	1	2	—	3	—	3	2	—
<i>SiHsp70-21</i>	—	2	1	2	—	—	2	2

表中数值代表在启动子区域检索到的相关顺式作用元件数量。

SiHsp70 基因启动子区域包含 3 种以上与光响应相关的顺式作用元件,此外还包含与发育相关的顺式作用元件(表 2)。其中,Skn-1 motif 和 GCN4 motif 是胚乳特异性表达元件,CAT box 和 CCGTCC box 是分生组织特异表达元件,HD Zip 1 是栅栏叶肉细胞分化相关的元件,HD Zip 2 是叶片形态发育相关的元件,RV element 是种子特异表达元件。部分 *SiHsp70* 基因启动子区域还含有一些与调节相关的顺式作用元件。其中 AT rich element、HD Zip 3、Box III、CCAAT box 和 MBSI 是蛋白结合位点,A box、OBP-1 site 和 5UTR Py rich stretch 是调节表达量的元件,AT rich sequence、EIRE 和 ELI box3 为激发子响应元件。推测 *SiHsp70* 基因广泛参与芝麻的光响应、光合作用、种子萌发、叶片形态建成、根茎伸长等生长发育过程。

SiHsp70 基因启动子区域含有多种与胁迫相关的顺式作用元件(表 3)。HSE 元件与热胁迫响应相关,TC-rich repeats 元件与防御和胁迫响应相关,WUN motif 元件与机械损伤胁迫响应相关,ARE 元

件和 GC motif 元件与厌氧胁迫诱导相关,Box-W1 元件与真菌侵染诱导表达相关,MBS 元件与干旱胁迫诱导表达相关,LTR 元件与低温胁迫响应相关。因此,推测 *SiHsp70* 基因与芝麻的胁迫响应相关。

SiHsp70 基因启动子区域含有多种与激素响应相关顺式作用元件(表 4)。TCA element 元件与水杨酸响应相关,CGTCA motif 元件和 TGACG motif 元件与茉莉酸甲酯响应相关,ERE 元件与乙烯响应相关,TATC box 元件、GARE motif 元件和 P box 元件与赤霉素响应相关,TGA element 元件、AuxRE 元件和 AuxRR core 元件与生长素响应相关,ABRE 元件和 motif IIb 元件与脱落酸响应相关,O2-site 元件与玉米素响应相关。因此,推测 *SiHsp70* 基因与芝麻的激素响应相关。

启动子分析结果显示,*SiHsp70* 基因启动子包括大量与光响应、生长发育、胁迫响应、激素响应相关的顺式作用元件,广泛参与到芝麻的生长发育和胁迫响应过程中。

表 4 芝麻 *Hsp70* 基因启动子区域与激素相关的顺式作用元件
Table 4 The hormone related cis-acting elements in the promotor of *SiHsp70*

基因	TCA element	CGTCA motif	TGACG motif	ERE	TATC box	GARE motif	P box	TGA element	AuxRE	AuxRR core	ABRE	motif IIb	O2-site
<i>SiHsp70-01</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>SiHsp70-02</i>	1	1	1	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>SiHsp70-03</i>	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-
<i>SiHsp70-04</i>	2	1	1	-	-	-	-	-	-	-	2	-	1
<i>SiHsp70-05</i>	1	-	-	1	-	-	-	1	1	-	-	1	-
<i>SiHsp70-06</i>	2	3	3	-	-	-	-	-	-	1	4	-	1
<i>SiHsp70-07</i>	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
<i>SiHsp70-08</i>	2	4	4	1	-	-	-	2	-	-	4	-	-
<i>SiHsp70-09</i>	1	4	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>SiHsp70-10</i>	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>SiHsp70-11</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	1
<i>SiHsp70-12</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>SiHsp70-13</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	2	-	1
<i>SiHsp70-14</i>	-	3	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>SiHsp70-15</i>	-	-	-	1	1	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>SiHsp70-16</i>	-	2	2	2	1	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>SiHsp70-17</i>	-	1	1	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-
<i>SiHsp70-18</i>	1	1	1	-	-	-	1	1	-	-	1	-	-
<i>SiHsp70-19</i>	-	1	1	-	1	-	-	-	-	-	1	-	2
<i>SiHsp70-20</i>	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>SiHsp70-21</i>	1	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-

表中数值代表在启动子区域检索到的相关顺式作用元件数量。

3 讨论

近年来,测序技术发展迅速,陆续有种植物的全基因组被测序。2014 年芝麻基因组测序完成,为芝麻的基因组学和生物信息学研究奠定了基础。本研究对芝麻基因组中 21 个 *Hsp70* 基因进行系统进化树分析,结果显示:在芝麻基因组中多对 *SiHsp70* 基因之间具有较高的同源性,其基因结构和核苷酸序列具有高度的相似性。推测这些 *SiHsp70* 基因的高度相似是由于在进化过程中芝麻基因组的串联重复、随机重复、插入等原因造成,它们发生在各亚家族分化之后,在基因家族的进化和扩充过程中起到重要作用。其中 *SiHsp70-10* 和 *SiHsp70-11* 在连锁群上的物理距离非常接近,而它们之间的遗传距离也最小,仅为 0.072,推测该串联重复在芝麻基因组的进化过程中是最晚出现的。

Hsp70 蛋白在植物的生长发育过程中发挥着重要作用。拟南芥 *AtHsp70-15* 的缺失突变会导致植株矮化和叶片畸形^[19],而 *AtHsc70-1* 的过量表达会

导致侧根减少和根分生组织分裂活性降低^[18]。芝麻 *SiHsp70* 启动子区域都含有分生组织特异表达、栅栏叶肉细胞分化和叶片形态建成的顺式作用元件。因此推测芝麻 *Hsp70* 蛋白也参与了分生组织生长、叶形态建成等生长发育过程。

植物 *Hsp70* 蛋白在非生物胁迫响应中发挥重要作用。*AtHsc70-1* 的过量表达能够提高拟南芥的耐热性和耐盐性^[18, 26],菠菜中的内质网 *Hsc70* (*BiP*) 基因在冷害胁迫下大量表达^[28]。芝麻 *Hsp70* 的启动子中含有热胁迫和低温胁迫响应相关的顺式作用元件。推测,芝麻 *Hsp70* 蛋白也参与了对包括高温、低温在内的非生物胁迫的响应过程。*Hsp70* 基因在植物对生物胁迫的抗性中也起到重要的作用^[19, 23-24, 29]。芝麻 *Hsp70* 启动子区域含有真菌侵染诱导表达相关 Box-W1 元件,说明该基因也参与了芝麻对生物胁迫的响应。此外,*SiHsp70* 基因启动子区域还含有与激素响应相关顺式作用元件,芝麻 *Hsp70* 基因可通过参与这些激素调控途径而调节植物的生长发育和胁迫响应过程。

参考文献:

- [1] 李静婷,刘子记,赵旭耀,等.小麦小分子热激蛋白 *TasHSP16.9* 基因在逆境应答中的表达分析[J].江苏农业科学,2016,44(7):39-41.
- [2] 李 翠,侯 蕾,任 丽,等.花生热激蛋白 AhHSP70 与热激因子 AhHSP 基因的克隆及表达分析[J].山东农业科学,2015,47(4):1-7.
- [3] RITOSSA F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila [J]. Cellular & Molecular Life Sciences Cmls, 1962, 18 (12): 571-573.
- [4] 姜建军,王凤英,黄立飞,等.瓜实蝇热激蛋白基因 *jlsp7* 的克隆及序列分析[J].南方农业学报,2015,46(5):800-805.
- [5] 张 青,陆明星,祝树德.灰飞虱 2 种热激蛋白基因 *Hsp70* 的克隆、分析[J].江苏农业学报,2015,31(6):1257-1264.
- [6] TAKAHASHI K H, RAKO L, TAKANO-SHIMIZU T, et al. Effects of small *Hsp* genes on developmental stability and microenvironmental canalization [J]. BMC Evolutionary Biology, 2010, 10 (2): 162-167.
- [7] MAYOR A, MARTINON F, SMEDT T D, et al. Crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses [J]. Nature Immunology, 2007, 8 (5): 497-503.
- [8] TKÁČOVÁ J, ANGELOVIČOVÁ M. Heat shock proteins (Hsps): a review [J]. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies, 2012, 45 (1): 349-353.
- [9] CLARK M S, PECK L S. HSP70 heat shock proteins and environmental stress in antarctic marine organisms: A mini-review [J]. Marine Genomics, 2009, 2 (1): 11-18.
- [10] SCHAFFITZEL E, RÜDIGER S, BUKAU B, et al. Functional dissection of trigger factor and DnaK: interactions with nascent polypeptides and thermally denatured proteins [J]. Biological Chemistry, 2001, 382 (8): 1235-1243.
- [11] FRYDMAN J. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones [J]. Annual Review of Biochemistry, 2001, 70 (1): 603-647.
- [12] PRATT W B, TOFT D O. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery [J]. Experimental Biology & Medicine, 2003, 228 (2): 111-133.
- [13] KIRSCHKE E, GOSWAMI D, SOUTHWORTH D, et al. Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles [J]. Cell, 2014, 157 (7): 1685-1697.
- [14] ASSIMON V A, SOUTHWORTH D R, GESTWICKI J E. Specific binding of tetratricopeptide repeat (TPR) proteins to heat shock protein 70 (Hsp70) and heat shock protein 90 (Hsp90) is regulated by affinity and phosphorylation [J]. Biochemistry, 2015, 54 (48): 7120-7131.
- [15] BURIANI G, MANCINI C, BENVENUTO E, et al. Plant heat shock protein 70 as carrier for immunization against a plant-expressed reporter antigen [J]. Transgenic Research, 2011, 20 (2): 331-344.
- [16] BURIANI G, MANCINI C, BENVENUTO E, et al. Heat-shock protein 70 from plant biofactories of recombinant antigens activate multi-epitope-targeted immune responses [J]. Plant Biotechnology Journal, 2012, 10 (3): 363-371.
- [17] SU P H, LI H M. Arabidopsis stromal 70-kD heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds [J]. Plant Physiology, 2008, 146 (3): 1231-1241.
- [18] CAZALÉ A C, CLÉMENT M, CHIARENZA S, et al. Altered expression of cytosolic/nuclear HSC70-1 molecular chaperone affects development and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60 (9): 2653-2664.
- [19] JUNGKUNZ I, LINK K, VOGEL F, et al. AtHsp70-15-deficient *Arabidopsis* plants are characterized by reduced growth, a constitutive cytosolic protein response and enhanced resistance to TuMV [J]. Plant Journal, 2011, 66 (6): 983-995.
- [20] SUNG D Y, GUY C L. Physiological and molecular assessment of altered expression of Hsc70-1 in *Arabidopsis*. Evidence for pleiotropic consequences [J]. Plant Physiology, 2003, 132 (2): 979-987.
- [21] QI Y, WANG H, ZOU Y, et al. Over-expression of mitochondrial heat shock protein 70 suppresses programmed cell death in rice [J]. FEBS Letters, 2011, 585 (1): 231-239.
- [22] 胡秀丽,李艳辉,杨海荣,等. HSP70 可提高干旱高温复合胁迫诱导的玉米叶片抗氧化防护能力 [J]. 作物学报, 2010, 36 (4): 636-644.
- [23] KANZAKI H, SAITOH H, ITO A, et al. Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana* [J]. Molecular Plant Pathology, 2003, 4 (5): 383-391.
- [24] NOËL L D, CAGNA G, STUTTMANN J, et al. Interaction between SGT1 and cytosolic/nuclear HSC70 chaperones regulates *Arabidopsis* immune responses [J]. Plant Cell, 2008, 19 (12): 4061-4076.
- [25] WANG L, YU S, TONG C, et al. Genome sequencing of the high oil crop sesame provides insight into oil biosynthesis [J]. Genome Biology, 2014, 15 (2): 1-13.
- [26] SUNG D Y, VIERLING E, GUY C L. Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* Hsp70 gene family [J]. Plant Physiology, 2001, 126 (2): 789-800.
- [27] LIN B L, WANG J S, LIU H C, et al. Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana* [J]. Cell Stress & Chaperones, 2001, 6 (3): 201-208.
- [28] ANDERSON J V, GUY C L. Spinach leaf 70-kilodalton heat-shock cognate stabilizes bovine adrenal glucose-6-phosphate dehydrogenase in vitro without apparent stable binding [J]. Planta, 1995, 196 (2): 303-310.
- [29] CRONJÉ M J, WEIR I E, BORNMAN L. Salicylic acid-mediated potentiation of Hsp70 induction correlates with reduced apoptosis in tobacco protoplasts [J]. Cytometry Part A, 2004, 61 (1): 76-87.

(责任编辑:张震林)