

烟草 *Hsp70* 基因家族的鉴定及 *NtHsp70Chl* 基因的表达分析

陈二龙¹, 范志勇², 王松峰³, 王德勋², 朱凯², 孙军伟², 苏家恩², 宋朝鹏^{1*}

(1.河南农业大学烟草学院, 郑州 450002; 2.云南省烟草公司大理州公司, 云南 大理 671000; 3.中国农业科学院烟草研究所, 农业部烟草生物学与加工重点实验室, 青岛 266101)

摘要:为探明烟草热激蛋白 70(*Hsp70*)基因家族的特征及烟叶主脉中 *NtHsp70Chl* 基因在烘烤条件下的表达模式,对 *Hsp70* 基因家族进行了亚细胞定位、系统进化、基因结构、染色体定位,并对 *NtHsp70Chl* 基因进行了烘烤条件下实时荧光定量表达 PCR 分析。结果表明,烟草基因组中 *Hsp70* 基因家族共有 61 个成员,蛋白序列长度不等,等电点在 4.52~9.75 范围内,各成员蛋白分别定位于细胞质、内质网、细胞外基质、叶绿体和线粒体中;烟草 *Hsp70* 基因家族分为 6 组,定位于叶绿体的成员均存在 VI-a 亚组;61 个 *NtHsp70* 基因分布于 18 条染色体上,经亚细胞定位于叶绿体的基因分别位于 6、17 和 19 号染色体上;烟草 *Hsp70* 家族中具有 10 个基因重复和 5 个旁系同源基因;经 RT-qPCR 检测分析,定位于烟草叶绿体中的 *NtHsp70Chl* 基因对高温诱导的敏感性较弱。本研究为深入研究烟草 *Hsp70* 的功能奠定了基础。

关键词:烟草;主脉组织;*Hsp70* 基因家族;生物信息学;*NtHsp70Chl*;高温诱导

中图分类号:S572.03

文章编号:1007-5119(2018)02-0008-09

DOI:10.13496/j.issn.1007-5119.2018.02.002

Bioinformatics of Tobacco (*Nicotiana tabacum*) *Hsp70* Gene Family and Expression Analysis of *NtHsp70Chl* in Midrib

CHEN Erlong¹, FAN Zhiyong², WANG Songfeng³, WANG Dexun², ZHU Kai²,
SUN Junwei², SU Jiaen², SONG Zhaopeng^{1*}

(1. College of Tobacco Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China 2; Dali Tobacco Company of Yunnan Province, Dali 671000, Yunnan, China; 3. Key Laboratory of Tobacco Biology and Processing, Ministry of Agriculture, Tobacco Research Institute of CAAS, Qingdao 266101, China)

Abstract: In order to study the relevant biological information of the tobacco heat shock protein 70 (*Hsp70*) gene family and the specific expression of the chloroplast-localized members *NtHsp70Chl* in tobacco midrib, subcellular location, system evolution, Gene structure, chromosome location, and real-time fluorescence quantitative expression PCR analysis were carried out. The results showed that 61 members of the tobacco *Hsp70* gene family were identified. The numbers of amino acid contained in the protein sequence were different, and the isoelectric point was in the range of 4.52~9.75. And the protein members were predicted to be localized in the cytoplasm, endoplasmic Reticulum, extracellular matrix, chloroplast (4 members) and mitochondria respectively. The tobacco *Hsp70* gene family was divided into 6 groups, and the *NtHsp70Chl* genes were all in the VI-a subgroup. 61 *NtHsp70* genes are located on 18 chromosomes, and *NtHsp70Chl* genes were located on chromosomes 6, 17, and 19, respectively. In tobacco *Hsp70* family, there are 10 duplications and 5 paralogous genes. According to RT-qPCR analysis, the *NtHsp70Chl* genes in tobacco midrib were weakly sensitive to high-temperature stress. This study laid the foundation for further exploration and application of tobacco *Hsp70* functions.

Keywords: tobacco; midrib tissue; *Hsp70* gene family; bioinformatics; *NtHsp70Chl*; high temperature induction

烟叶在烘烤过程中处于高温和水分胁迫的环境^[1]。*Hsp70* 基因在高温或干旱诱导的条件下表达量上调, *Hsp70* 蛋白参与蛋白质的正确折叠, 调节

蛋白在细胞内积累, 增加组织的耐热性^[2-4]。叶绿体内 *Hsp70* 蛋白可协助基质中蛋白转运, 是必要的 ATP 酶, 与类囊体膜的形成和病原微生物入侵的嗜

基金项目: 中国烟草总公司云南省公司项目“防治烘烤过程中烟叶腐烂霉变技术研究推广”(2016YN10)、“返青寡日照等条件下难落黄烟叶的烘烤技术研究及推广”(2015YN20)

作者简介: 陈二龙(1992-), 男, 硕士研究生, 主要从事烟草调制加工研究。E-mail: celyctz@163.com。*通信作者, E-mail: ycszp@163.com

收稿日期: 2017-07-22

修回日期: 2017-11-17

好有一定关系^[5-8]。

烟叶在烘烤过程中(逆境条件)进行代谢活动,且在一定程度上促进病原微生物的入侵或扩散,此时,细胞内一些抗性基因表达或上调,如 *TLHS1*、*LFD*、*NPK1* 和 *Hsp70* 等^[9-12]。*Hsp70* 蛋白作为分子伴侣,其 N 端核酸结合域(NBD)与 ATP/ADP 相互作用,控制 C 端底物结构域(SBD)以催化剂的形式调节蛋白质的折叠和积累^[13-14]。*Hsp70* 基因家族成员的功能具有多样性,如拟南芥中的 *AtHsp70-15* 在其植株的耐热性方面发挥重要的作用^[15],哈茨木霉菌的 *Hsp70* 基因通过转基因表达使拟南芥对高温以及非生物胁迫的抗性增加^[16],斑茅在干旱胁迫的条件下,*Hsp70* 基因表达量上调,对调节细胞膜热稳定性和水分相对含量具有积极作用^[17],部分植物体中 *Hsp70* 参与病原微生物的蛋白质折叠等^[18]。*Hsp70* 的亚细胞位置可分为 4 类:内质网、细胞质、线粒体及叶绿体^[19]。目前,对植物 *Hsp70* 基因家族数据研究对象主要包括拟南芥^[20]、胡杨^[21]、水稻^[22]、大豆^[23]等,关于烟草 *Hsp70* 基因家族成员的研究较少。

研究烟草 *Hsp70* 基因家族成员的特征、进化和表达模式,对于进一步探讨烟草中 *Hsp70* 基因家族的功能及指导烟叶的烘烤具有重要的作用。本研究在烟草全基因组的背景下,运用生物信息学的方法挖掘烟草 *Hsp70* 基因家族的潜在信息,并以烟叶主脉组织内 *NtHsp70Chl* 基因成员为研究对象,采用实时荧光定量表达探索其在热激条件下的反应。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2016 年在云南省弥渡县红花大金元基地调制实验室进行。

烟草(*Nicotiana tabacum* L.)*Hsp70* 基因家族的相关序列,下载于 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 Sol Genomics Network (<https://solgenomics.net/>) 数据库^[24-25]。拟南芥的 *Hsp70* 蛋白序列来源于 TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) 和 NCBI 数据库^[26-27]。

烟草品种为红花大金元,取样地理位置为凤仪镇。取样:(1)在常规烘烤(变黄前期干球/湿球温度为 35 °C/35 °C,烘烤时长 8 h,烟叶状态为叶尖变软;变黄中期 38 °C/37 °C,32 h,叶片达到 8 黄;变黄后期 42 °C/36 °C,16 h 叶片 9 成黄)过程中,于烘烤 0、12、24、36、48、60 h 随机取顶层烟叶 3 片,从主脉端口向下除去 1 cm,以新端口为参照,向下取 2 cm,去除两侧叶耳,将 3 条主脉混合包裹于锡箔纸中,放于液氮中并进行标记;(2)将适熟烟叶随机装于 3 组 ZLX- 型烟叶烘烤箱(±0.5 °C,郑州智联自动化设备有限公司),第 1 组烘烤箱的温湿度设定为 35 °C/35 °C,第 2 组设定为 38 °C/38 °C,第 3 组为 42 °C/42 °C,期间的 3 组烘烤箱温湿度设定均保持不变,在 0、12 和 24 h 进行取样,步骤同上。

1.2 烟草 *Hsp70* 基因家族的鉴定

利用已获得拟南芥 *Hsp70* 基因家族的蛋白序列为比对文件^[20],从上述数据库中进行 BLAST (1e-10),将重复序列去除,并构建本地数据库;从 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) 数据库获得具有 *Hsp70* 结构域的种子文件(PF00012)^[28],通过 HMMER3.0 软件搜索本地数据库,确认获取的蛋白序列具有典型 *Hsp70* 结构域。采用 ProtParam (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>) 在线工具,预测烟草 *Hsp70* 的等电点、序列长度及分子量^[29]。烟草 *Hsp70* 的亚细胞定位的预测运用 ProtComp(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=protcomppl&group=programs&subgroup=proloc>)工具进行分析^[30]。

1.3 烟草 *Hsp70* 基因的系统进化分析

运用 ClustalW2 软件对烟草中 61 个 *Hsp70* 及拟南芥中已被确认功能的 *Hsp70* 蛋白序列进行比对^[31];MEGA6 软件将比对结果进一步分析转化,生成进化树,其构建方式使用邻接法(NJ)^[32]。

1.4 烟草 *Hsp70* 基因的染色体定位和结构分析

依据烟草 *Hsp70* 基因定位于染色体中的信息,采用 Mapinspector 软件呈现基因位于染色体中轮

廓图^[33];依据两个基因的匹配长度以及相似性是否大于80%判定基因复制,而基因是否处于同一染色体中判定串联复制或片段复制^[34]。根据烟草 *Hsp70* 基因 DNA 和 CDS 序列的数据,采用 GSDS2 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 在线工具绘制基因结构图^[35]。

1.5 烟草 *Hsp70* 基因的荧光定量表达分析

在亚细胞定位的结果中选择定位于叶绿体的4个烟草 *Hsp70* (*NtHsp70Chl*) 基因,由于其相似性程度较高,特设计共用引物。将提取的 RNA 采用 NanoDrop 2000 分光光度计(Thermo Scientific, USA) (OD260/OD280) 测定浓度,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, RNA 逆转录试剂 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR 由 Vazyme 公司生产(货号: R223-01)。依据基因序列信息,通过 Roche LCPDS2 软件设计特异性引物,并由上海捷瑞生物工程有限公司合成,采用烟草 L25 作为内参基因,荧光定量 PCR 引物和扩增产物如表 1。PCR 使用的试剂盒为 QuantiFast® SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, Germany),并在荧光定量 LightCycler® 480 II 型 PCR 仪 (Roche, Swiss) 上进行反应。PCR 反应程序: 95 °C 5 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。根据熔解曲线检测扩增产物特异性:从 60 °C 缓慢升温至 97 °C,每 1 °C 采集 5 次荧光信号。依据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 对数据进行换算^[36]。

2 结果

2.1 烟草 *Hsp70* 家族成员信息

在烟草全基因组数据中检索,分析获得 61 个烟草 *Hsp70* 家族成员,依据各成员在染色体中的定位结果,依次对其进行命名为 *NtHsp70-(1-61)*。通过分析 *NtHsp70* 家族成员理化特性,等电点的范围

为 4.52 (*NtHsp70-37*) 至 9.75 (*NtHsp70-18*); *Hsp70* 蛋白序列最长的为 *NtHsp70-60*,由 904 个氨基酸组成,最短的序列为 *NtHsp70-32*,由 118 个氨基酸组成。亚细胞定位结果表明, *NtHsp70* 蛋白多定位于细胞质及内质网中,其家族成员数量分别为 25 和 23 个; 6 个家族成员定位于线粒体; 4 个家族成员 (*NtHsp70-19*、*NtHsp70-38*、*NtHsp70-41* 和 *NtHsp70-43*) 定位于叶绿体; 仅 3 个家族成员定位于胞外基质。*NtHsp70* 家族成员的详情信息见表 2。

2.2 烟草 *Hsp70* 家族成员进化与基因结构分析

以烟草 *Hsp70* 基因家族的蛋白序列与拟南芥 *AtHsp70-1* (CAB85987)、*AtHsp70-2* (CAB85986)、*AtHsp70-3* (AAF14038)、*AtHsp70-4* (BAB02269)、*AtHsp70-5* (AAF18501)、*AtHsp70-6* (CAB45063)、*AtHsp70-7* (BAA97012)、*AtHsp70-8* (AAD15393)、*AtHsp70-9* (CAB37531)、*AtHsp70-10* (CAB89371)、*AtHsp70-11* (AAF88019)、*AtHsp70-12* (BAB08435)、*AtHsp70-13* (AAB70400)、*AtHsp70-14* (AAG52240)、*AtHsp70-15* (AAG52244)、*AtHsp70-16* (AAD30257)、*AtHsp70-17* (CAB46039) 和 *AtHsp70-18* (AAG51503) 的蛋白序列共同组建系统进化树(图 1)。筛选进化树获得最终聚类结果,依据拓扑结构及拟南芥家族组别划分将其分为 ~ 组,其成员数分别为 9、21、2、12、9、8 个。、和 组内的蛋白质主要定位于细胞质(组 *NtHsp70-17* 和 *NtHsp70-22*、组 *NtHsp70-18*、*NtHsp70-29*、*NtHsp70-39*、*NtHsp70-60* 和 *NtHsp70-61* 除外), 和 组成员主要位于内质网(组 *NtHsp70-8*、*NtHsp70-27*、*NtHsp70-30* 和 *NtHsp70-32* 除外), 组中的蛋白定位于能量供应细胞器中,其中 VI-a 亚组的 *NtHsp70* 成员定位于叶绿体, VI-b 亚组成员位于线粒体; I

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Sequence of fluorescent quantitative PCR primers

引物名称	序列 (5'-3')	扩增产物大小
Name of primers	Sequence of primers (5' to 3')	Amplification product size /bp
<i>NtHsp70Chl-F</i>	GACAAACAAGCTCTCAACG	125
<i>NtHsp70Chl-R</i>	ATAIGTTTAGGACCAATCCGCA	125
<i>NtL25-F</i>	CCCCTCACCACAGAGTCTGC	51
<i>NtL25-R</i>	AAGGGTGTGTGTCTCAATCTT	51

表2 烟草 *Hsp70* 基因家族信息
Table 2 Information of tobacco the *Hsp70* gene family

基因名称 Gene name	基因登录号 Gene ID	等电点 Isoelectric point	氨基酸 Amino acid/aa	分子量 Molecular weight/D	亚细胞定位 Subcellular localization	染色体位置 Chromosome location
<i>NtHsp70-1</i>	LOC104248209	5.11	666	73 442.23	内质网	1:761437..765998
<i>NtHsp70-2</i>	LOC107805460	4.56	290	32 031.64	内质网	1:761430..766016
<i>NtHsp70-3</i>	LOC107805427	5.06	668	73 670.44	内质网	1:761323..766026
<i>NtHsp70-4</i>	LOC107777893	5.64	753	84 109.24	细胞质	1:103035522..103050532
<i>NtHsp70-5</i>	LOC107795135	5.13	649	71 104.61	细胞质	2:12281505..12284911
<i>NtHsp70-6</i>	AY372070	5.07	653	71 287.16	细胞质	2:12282373..12285690
<i>NtHsp70-7</i>	AY372069	5.02	653	71011.03	细胞质	2:12282983..12286030
<i>NtHsp70-8</i>	LOC107790051	9.04	396	42 883.90	线粒体	2:19998288..20000811
<i>NtHsp70-9</i>	LOC107811763	5.64	895	99 430.88	内质网	2:102965209..102974730
<i>NtHsp70-10</i>	LOC107781175	5.01	691	77 195.97	内质网	2:102968776..102969523
<i>NtHsp70-11</i>	LOC107822929	7.77	330	36 325.76	内质网	2:102973117..102974938
<i>NtHsp70-12</i>	LOC107804151	5.23	659	72 409.00	细胞质	4:16574685..16576926
<i>NtHsp70-13</i>	LOC104108382	5.28	654	71 884.38	细胞质	4:16574572..16576954
<i>NtHsp70-14</i>	LOC107796657	5.20	573	63 010.43	细胞质	4:16574576..16576979
<i>NtHsp70-15</i>	LOC107825874	5.22	656	72 064.62	细胞质	4:16575087..16577307
<i>NtHsp70-16</i>	LOC104234260	5.08	648	70 968.42	细胞质	5:10283928..10287476
<i>NtHsp70-17</i>	LOC104237237	4.97	254	28 311.61	胞外基质	5:31203464..31207928
<i>NtHsp70-18</i>	LOC107802379	9.75	582	67 017.47	胞外基质	6:102532669..102536286
<i>NtHsp70-19</i>	LOC107803795	5.22	692	74 445.28	叶绿体	6:2022838..2028587
<i>NtHsp70-20</i>	LOC104218227	5.14	667	74 497.58	内质网	7:14352043..14355543
<i>NtHsp70-21</i>	LOC107829892	5.13	649	72 604.53	内质网	7:14352732..14356284
<i>NtHsp70-22</i>	LOC107814250	5.67	573	62 604.14	内质网	7:63709136..63712205
<i>NtHsp70-23</i>	LOC104247155	5.30	846	93 776.56	细胞质	8:1858770..1864630
<i>NtHsp70-24</i>	LOC107774811	5.87	681	72 988.90	线粒体	9:95675412..95679906
<i>NtHsp70-25</i>	LOC104099040	5.13	651	71 109.59	细胞质	9:96220948..96224435
<i>NtHsp70-26</i>	LOC107823108	5.17	651	71 108.61	细胞质	9:96221165..96224478
<i>NtHsp70-27</i>	LOC104232484	4.55	150	16 430.35	细胞质	9:96223826..96224278
<i>NtHsp70-28</i>	LOC104227119	5.13	648	70 966.44	细胞质	9:96334773..96337874
<i>NtHsp70-29</i>	LOC107766295	5.17	648	70 876.29	内质网	9:96335681..96338847
<i>NtHsp70-30</i>	LOC107813949	8.76	271	29 557.26	胞外基质	11:38343217..38345442
<i>NtHsp70-31</i>	LOC107769992	5.64	573	62 535.95	内质网	14:64376792..64379861
<i>NtHsp70-32</i>	LOC107774810	4.88	118	12 577.88	线粒体	14:102300371..102301059
<i>NtHsp70-33</i>	LOC107800496	5.18	856	94 504.51	细胞质	15:11151589..11157894
<i>NtHsp70-34</i>	LOC107784103	5.32	854	94 242.13	细胞质	15:11180281..11186087
<i>NtHsp70-35</i>	LOC107776733	5.08	666	73 411.22	内质网	15:113938560..113942799
<i>NtHsp70-36</i>	LOC104221177	5.17	666	73 413.20	内质网	15:113938237..113942792
<i>NtHsp70-37</i>	LOC107799921	4.52	168	18 838.61	内质网	15:113938230..113942799
<i>NtHsp70-38</i>	LOC107779834	5.10	689	73 925.75	叶绿体	17:6201965..6208159
<i>NtHsp70-39</i>	LOC104095897	5.40	639	70 828.59	内质网	17:35644444..35647715
<i>NtHsp70-40</i>	LOC107785197	8.59	187	20 967.79	细胞质	18:68908802..68916410
<i>NtHsp70-41</i>	LOC104103207	5.23	707	75 174.75	叶绿体	19:111097589..111101970
<i>NtHsp70-42</i>	LOC104113775	5.18	668	74 477.59	内质网	19:120034761..120038175
<i>NtHsp70-43</i>	LOC104094426	5.24	707	75 307.85	叶绿体	19:132517255..132521922
<i>NtHsp70-44</i>	LOC107818867	5.07	667	73 522.32	内质网	21:41190693..41193006
<i>NtHsp70-45</i>	LOC104236508	5.07	667	73 536.35	内质网	21:41190749..41194753
<i>NtHsp70-46</i>	LOC107778329	5.04	667	73 481.28	内质网	21:41190758..41194787
<i>NtHsp70-47</i>	LOC107771425	5.08	668	73 744.45	内质网	21:41190954..41194731
<i>NtHsp70-48</i>	LOC107771128	5.21	667	73 976.05	内质网	21:41190862..41194624
<i>NtHsp70-49</i>	LOC107775921	5.75	681	73 131.94	线粒体	22:19998284..20002242
<i>NtHsp70-50</i>	LOC107779402	8.76	385	41 588.32	线粒体	22:19998246..20001406
<i>NtHsp70-51</i>	LOC107766483	5.27	844	93 262.93	细胞质	22:20880101..20885900
<i>NtHsp70-52</i>	LOC107803414	5.18	585	64 352.11	细胞质	22:48208194..48211012
<i>NtHsp70-53</i>	LOC104100529	5.10	648	71 087.57	细胞质	23:120809444..120812680
<i>NtHsp70-54</i>	LOC104228095	5.10	650	71 275.71	细胞质	23:120809341..120812607
<i>NtHsp70-55</i>	LOC107765377	5.52	611	68 426.43	细胞质	23:123915822..123929548
<i>NtHsp70-56</i>	LOC107764274	4.96	286	30 558.57	线粒体	23:126543515..126545184
<i>NtHsp70-57</i>	LOC104093630	5.08	648	70 968.42	细胞质	24:31202436..31205677
<i>NtHsp70-58</i>	LOC107812563	8.73	143	15 993.30	细胞质	24:32237285..32237715
<i>NtHsp70-59</i>	LOC107781367	5.99	145	16 619.87	细胞质	24:32237282..32237782
<i>NtHsp70-60</i>	LOC107784150	7.53	904	99 828.75	内质网	24:110654366..110658185
<i>NtHsp70-61</i>	LOC107774302	6.36	896	98 876.73	内质网	24:110654473..110658298

和V组属于 Hsp110/SSE 亚家族，II、III、IV、VI组属于 Dnak 亚家族。*NtHsp70* 具有 5 对旁系同源基因(*NtHsp70-4/55*、*NtHsp70-19/38*、*NtHsp70-23/51*、*NtHsp70-33/34*、*NtHsp70-41/43*)。I 组外显子主要

集中在 5' 端，II 组外显子主要集中在 3' 端，III 组外显子无内含子或内含子序列较短，IV 组外显子分散存在于 3' 端，V 和 VI 组的外显子分布无明显规律。

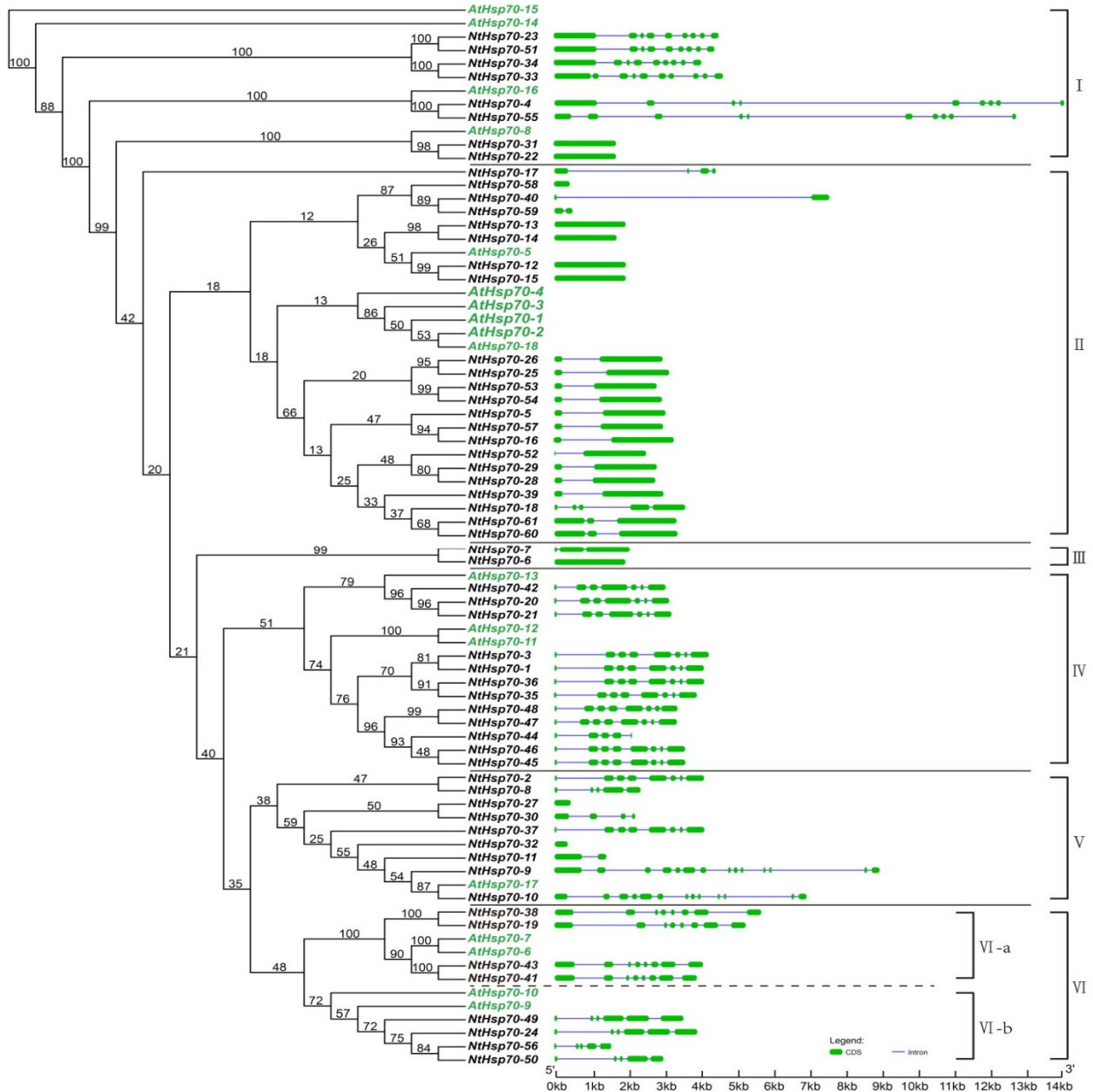


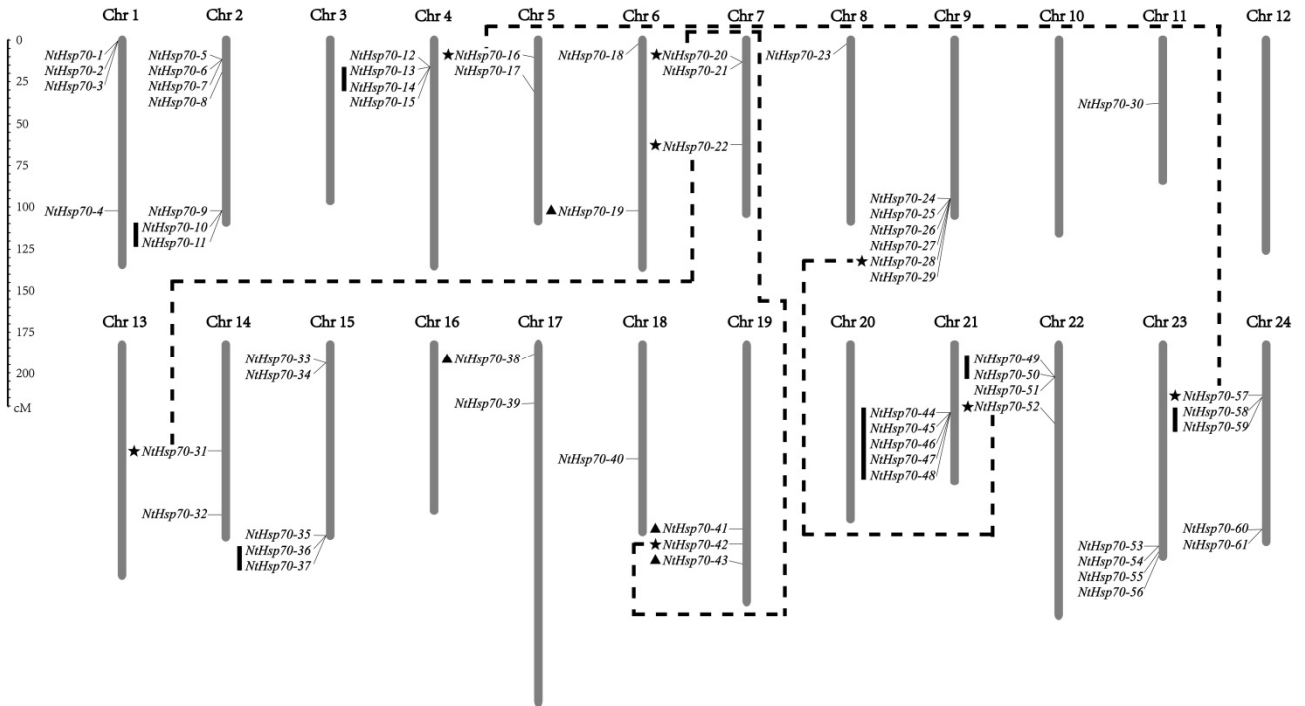
图 1 烟草 *Hsp70* 家族成员进化与基因结构

Fig. 1 Evolution and genetic structure of tobacco *Hsp70* family members

2.3 烟草 *Hsp70* 基因的染色体定位

为明确烟草 *Hsp70* 基因家族的组成与分布形式，依据其定位信息，制作染色体分布的信息图(图 2)。烟草的 24 条染色体内分布 61 个 *NtHsp70* 基因，其在染色体中的分布位置有所不同，多数分布于染色

体的端部；每条染色体中的 *NtHsp70* 基因个数具有差异，2 号染色体含有 7 个基因家族成员，其成员数目最多，9 号染色体含有 6 个家族成员，15、21 和 24 号染色体均包含 5 个家族成员，1、4、22 和 23 号染色体均具有 4 个家族成员，7 和 19 号染色



注：黑色实线标记串联重复基因对或基因簇，黑色虚线标记片段重复基因对；带★为片段重复基因；带▲为在叶绿体中表达的基因。

Note: Black lines mark tandem repeat genes or gene cluster, the black dashed lines mark fragment repeat genes; triangles indicate genes that are localized in the chloroplast.

图 2 烟草 *Hsp70* 基因的染色体定位

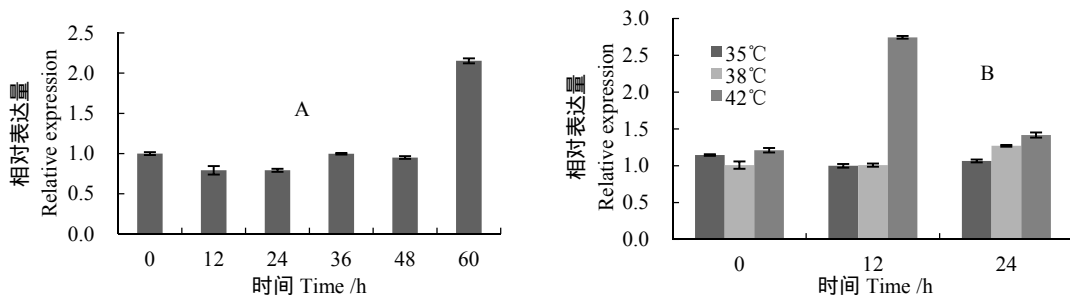
Fig. 2 Chromosomal localization of tobacco *Hsp70* genes

体均有 3 个家族成员，5、6、14 和 17 号染色体中有 2 个家族成员，8、11 和 18 号染色体成员数最少，均为 1 个基因家族成员，于叶绿体中表达的基因分别位于 6、17 和 19 号染色体，目前 3、10、12、13、16 和 20 号染色体无任何 *NtHsp70* 基因家族成员信息。通过分析基因之间的关系，发现 *NtHsp70* 基因家族中共存在 10 个基因复制，分别为 1 组（*NtHsp70-44* 至 *NtHsp70-48*）基因簇、5 对串联重复（*NtHsp70-10/11*、*NtHsp70-13/14*、*NtHsp70-36/37*、

NtHsp70-49/50、*NtHsp70-58/59*）和 4 对片段重复（*NtHsp70-16/57*、*NtHsp70-20/42*、*NtHsp70-22/31*、*NtHsp70-28/52*）。基因重复促进烟草 *Hsp70* 家族成员扩增。

2.4 *NtHsp70Chl* 在烟草叶片主脉组织中的表达

由于叶绿体中 *NtHsp70Chl* 基因的表达特性与环境条件相关，所以，本研究对烟叶主脉的 *NtHsp70Chl* 基因进行荧光定量 PCR 表达分析（图 3）。



注：A 为常规烘烤过程中 *NtHsp70Chl* 基因的相对表达量；B 为不同温度烘烤过程中 *NtHsp70Chl* 基因的相对表达量。

Note: A is the relative expression of *NtHsp70Chl* genes in the conventional baking process; B is the relative expression of *NtHsp70Chl* genes during the process of baking at different temperatures.

图 3 烟草叶片主脉组织中 *NtHsp70Chl* 的表达

Fig. 3 Expression of *NtHsp70Chl* in the midrib tissue of tobacco leaves

在常规烘烤 12、24、36 h (干湿球 38 °C/37 °C) 和 48 h (干湿球 42 °C/36 °C) 时, *NtHsp70Chl* 基因的表达量处于平稳状态, 60 h (干湿球 42 °C/36 °C) 时, 基因表达量明显上调。在 35 °C 条件下烘烤, *NtHsp70Chl* 基因的表达量随时间无明显变化, 甚至有所下降趋势; 38 °C 条件下烘烤, 叶绿体 *NtHsp70Chl* 基因在 24 h 表达量上调; 42 °C 条件下烘烤, 12 h 时 *NtHsp70Chl* 表达量明显上调, 至 24 h 时, 表达量明显下调。可见, 烘烤温度越高, 基因的表达上调的时间越短, 且基因表达量逐渐增加, 在 42 °C 的条件下, *NtHsp70Chl* 基因优先被诱导表达, 表达量明显上调。

3 讨论

对烟草 *Hsp70* 基因进行了家族鉴定分析, 结果表明, 其基因数具有 61 个, 数目大于拟南芥 (18 个), 产生该结果的原因可能有两种, 一种是由于四倍体的栽培烟草汇集祖先绒毛烟草和林烟草的基因(该烟草具有 24 条染色体, 除 3、10、12、13、16 和 20 号染色体外, 均含有 *Hsp70* 基因), 另一种是由于基因复制致使基因家族成员扩增 (*NtHsp70* 基因家族中共存在 10 个基因复制)。通过亚细胞定位分析, 存在于细胞质和内质网的 *NtHsp70* 家族成员所占比例较大, 其原因为该成员承担 *NtHsp70* 的主要功能, 即细胞质中 *NtHsp70* 成员具有协同参与信息传递于细胞核中的作用, 进而调控细胞核内基因表达^[37], 位于内质网上的成员协助蛋白质的正确折叠, 纠正或降解蛋白质^[38-39]。

由于系统进化树的聚类, 依据蛋白序列的结构和功能的相似性, 因此可根据已知蛋白特性推测同一类未知蛋白特性。通过烟草 *Hsp70* 蛋白序列与拟南芥的聚类结果, 推测烟草中细胞质和线粒体中发挥作用的 *Hsp70* 易被高温诱导, 而内质网和叶绿体中发挥作用的 *Hsp70* 受高温影响较小^[40], I 和 V 组 *Hsp70* 影响烟草生长和烟叶形态, 与细胞质蛋白正确折叠相关^[15], II 和 III 组参与多样化发育过程及信号通路^[41], VI-a 亚组蛋白参与蛋白转运至基质和保

护光系统 II, 具有 ATP 酶活性, 是叶绿体的重要组成部分^[5,7,42]。

对烟草 *Hsp70* 基因家族进行染色体定位分析, 61 个成员不均匀地分布于 24 条染色体上, 含有 1 组基因簇、5 对串联重复和 4 对片段重复, 主要原因为基因复制。基因复制扩增家族成员, 此外, 基因复制后, 内含子数目发生变化, 即基因结构改变, 使基因功能特性增加, 因此推测基因复制在 *NtHsp70* 蛋白多样性中发挥重要作用^[43]。

对常规烘烤中和不同温湿度烘烤过程的样品的荧光定量表达分析结果表明, 42 °C 烘烤 12 h 左右基因表达量明显上调, 即 *NtHsp70Chl* 在相对较高的温度条件下表达, 且诱导时间相对较长^[44], 说明 *NtHsp70Chl* 对温度敏感性差, 不易被诱导^[40]。此外, 研究在烘烤过程中表达的 *NtHsp70* 基因, 以及该基因瞬时表达的最适时间, 尚需进一步完善。

4 结论

烟草 *Hsp70* 基因家族鉴定获得 61 个成员, 其中定位于叶绿体的 4 个; 在系统进化树中分为 6 个组, 2 个亚组, 而于叶绿体定位的基因属于 VI-a 亚组, 具有 8 个外显子; 61 个基因不均匀地分布于 24 条染色体上, 叶绿体定位的基因位于 6、17 和 19 号染色体。 *NtHsp70Chl* 基因的荧光定量表达显示其对高温诱导的敏感性不强。

参考文献

- [1] 宫长荣. 烟草调制学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 248-250.
GONG C R. Tobacco Modulation [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2011: 248-250.
- [2] 王明强, 张道远. 植物热激蛋白 70 基因家族及其生物学功能研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(2): 421-428.
WANG M Q, ZHANG D Y. Research advance of heat shock protein 70 gene family and its biological functions in plant[J]. Genomics and Applied Biology, 2015, 34(2): 421-428.
- [3] USMAN M G, RAFII M Y, MARTINI M Y, et al. Molecular analysis of *Hsp70* mechanisms in plants and their function in response to stress[J]. Biotechnology & Genetic Engineering Reviews, 2017, 25: 1-14.

- [4] LI Z, LONG R, ZHANG T, et al. Molecular cloning and functional analysis of the drought tolerance gene *MsHSP70* from alfalfa (*Medicago sativa* L.)[J]. Journal of Plant Research, 2017, 130(2): 387-396.
- [5] SU P H, LI H M. Stromal *Hsp70* is important for protein translocation into pea and *Arabidopsis* chloroplasts[J]. Plant Cell, 2010, 22(5): 1516-1531.
- [6] LIU C, WILLMUND F, GOLECKI J R, et al. The chloroplast HSP70B-CDJ2-CGE1 chaperones catalyse assembly and disassembly of VIPP1 oligomers in *Chlamydomonas*[J]. Plant Journal, 2007, 50(2): 265-277.
- [7] LATIJNHOUWERS M, XU X M, MØLLER S G. Arabidopsis stromal 70-kDa heat shock proteins are essential for chloroplast development[J]. Planta, 2010, 232(3): 567-578.
- [8] HUANG Y W, HU C C, TSAI C H, et al. Chloroplast Hsp70 isoform is required for age-dependent tissue preference of bamboo mosaic virus in mature *Nicotiana benthamiana* leaves[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2017, 30(8): 631-645.
- [9] PARK S M, HONG C B. Class I small heat-shock protein gives thermotolerance in tobacco[J]. Journal of Plant Physiology, 2002, 159(1): 25-30.
- [10] TOGNETTI V B, PALATNIK J F, FILLAT M F, et al. Functional replacement of ferredoxin by a cyanobacterial flavodoxin in tobacco confers broad-range stress tolerance[J]. Plant Cell, 2006, 18(8): 2035-2050.
- [11] SHOU H, BORDALLO P, WANG K. Expression of the *Nicotiana* protein kinase (NPK1) enhanced drought tolerance in transgenic maize[J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55(399): 1013-1019.
- [12] SUNG D Y, KAPLAN F, Lee K J, et al. Acquired tolerance to temperature extremes[J]. Trends in Plant Science, 2003, 8(4): 179-187.
- [13] DRAGOVIC Z, BROADLEY S A, SHOMURA Y, et al. Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s[J]. EMBO Journal, 2006, 25(11): 2519-2528.
- [14] MAYER M P, BUKAU B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism[J]. Cellular & Molecular Life Sciences, 2005, 62(6): 670-684.
- [15] 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.
- [16] MONTERO-BARRIENTOS M, HERMOSA R, CARDOZA R E, et al. Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum hsp70* gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses[J]. Journal of Plant Physiology, 2010, 167(8): 659-665.
- [17] AUGUSTINE S M, NARAYAN J A, SYAMALADEVI D P, et al. *Erianthus arundinaceus* HSP70 (EaHSP70) overexpression increases drought and salinity tolerance in sugarcane (*Saccharum*, spp. hybrid)[J]. Plant Science, 2015, 232: 23-24.
- [18] MATHIOUDAKIS M M, VEIGA R, GHITA M, et al. *Pepino mosaic virus* capsid protein interacts with a tomato heat shock protein cognate 70[J]. Virus Research, 2012, 163(1): 28-39.
- [19] RENNER T, WATERS E R. Comparative genomic analysis of the Hsp70s from five diverse photosynthetic eukaryotes[J]. Cell Stress & Chaperones, 2007, 12(2): 172-185.
- [20] 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.
- [21] YER E N, BALOGLU M C, ZIPLAR U T, et al. Drought-responsive *Hsp70* gene analysis in *Populus* at genome-wide level[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2016, 34(2): 483-500.
- [22] SARKARE N K, KUNDNANI P, GROVER A. Functional analysis of Hsp70 superfamily proteins of rice (*Oryza sativa*)[J]. Cell Stress & Chaperones, 2013, 18(4): 427-437.
- [23] ZHANG L, ZHAO H K, DONG Q L, et al. Genome-wide analysis and expression profiling under heat and drought treatments of *HSP70* gene family in soybean (*Glycine max* L.)[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 773.
- [24] BARRETT T, WILHITE S E, LEDOUX P, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets-update[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(1): 991-995.
- [25] FERNANDEZ-POZO N, MENDA N, EDWARDS J D, et al. The Sol Genomics Network (SGN)-from genotype to phenotype to breeding[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(1): 1036-1041.
- [26] SWARBRECK D, WILKS C, LAMESCH P, et al. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(1): 1009-1014.
- [27] LAMESCH P, BERARDINI T Z, LI D, et al. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(1): 1202-1210.
- [28] ZHAO Q, GAO J, SUO J, et al. Cytological and proteomic analyses of horsetail (*Equisetum arvense* L.) spore germination[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 441.
- [29] VIZCAÍNO J A, DEUTSCH E W, WANG R, et al. ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination[J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(3): 223-226.
- [30] 陈继圣, 郑士琴, 郑武, 等. 全基因组预测稻瘟菌的分泌蛋白[J]. 中国农业科学, 2006, 39(12): 2474-2482.
- CHEN J S, ZHENG S Q, ZHENG W, et al. Prediction for secreted proteins from *Magnaporthe grisea* genome[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(12): 2474-2482.
- [31] PATEL S, PANCHAL H, ANJARIA K. Phylogenetic analysis of some leguminous trees using CLUSTALW2 bioinformatics tool[C]//IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine Workshops. IEEE, 2013: 917-921.

- [32] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology & Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [33] 周喆, 张彩霞, 张利义, 等. 苹果 *LysM* 基因家族的生物信息学及表达分析[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(13): 2602-2612.
- ZHOU Z, ZHANG C X, ZHANG L Y, et al. Bioinformatics and expression analysis of the *LysM* gene family in apple[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(13): 2602-2612.
- [34] YANG S, ZHANG X, YUE J X, et al. Recent duplications dominate NBS-encoding gene expansion in two woody species[J]. *Molecular Genetics & Genomics*, 2008, 280(3): 187-198.
- [35] 郭安源, 朱其慧, 陈新, 等. GSDS: 基因结构显示系统[J]. *遗传*, 2007(8): 1023-1026.
- GUO A Y, ZHU Q H, CHEN X, et al. GSDS: a gene structure display server[J]. *Hereditas(Beijing)*, 2007, 29(8): 1023-1026.
- [36] DING X, ZHANG X, YANG Y, et al. Polymorphism, expression of natural resistance-associated macrophage protein 1 encoding gene (*NRAMP1*) and its association with immune traits in pigs[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2014, 27(8): 1189-1195.
- [37] KOSE S, IMAMOTO N. Nucleocytoplasmic transport under stress conditions and its role in HSP70 chaperone systems[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1840(9): 2953-2960.
- [38] WANG J, LEE J, LIEM D, et al. *HSPA5* gene encoding Hsp70 chaperone BiP in the endoplasmic reticulum[J]. *Gene*, 2017, 618: 14-23.
- [39] HAN S, LIU Y, CHANG A. Cytoplasmic Hsp70 promotes ubiquitination for endoplasmic reticulum-associated degradation of a misfolded mutant of the yeast plasma membrane ATPase, PMA1[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(36): 26140-26149.
- [40] 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.
- [41] LENG L, LIANG Q, JIANG J, et al. A subclass of HSP70s regulate development and abiotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Plant Research*, 2016, 130(2): 349-363.
- [42] SCHRODA M, VALLON O, WOLLMAN F A, et al. A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition[J]. *Plant Cell*, 1999, 11(6): 1165-1178.
- [43] WANG Y, XU T, PATERSON A H. Different patterns of gene structure divergence following gene duplication in Arabidopsis[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 652-660.
- [44] 王明强, 张道远. 植物热激蛋白 70 基因家族及其生物学功能研究进展[J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(2): 421-428.
- WANG M Q, ZHANG D Y. Research advance of heat shock protein 70 gene family and its biological functions in plant[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2015, 34(2): 421-428.

《烟草科技》2018年第3期目次

烟草慢阴离子通道蛋白基因 <i>NtSLAH1</i> 的克隆及表达分析.....	张 慧, 金立锋, 徐国云, 等	1
水泥厂对周边环境及烟叶重金属积累的影响.....	王爱国, 张仕祥, 戴华鑫, 等	7
攀西典型烟田水碳通量变化的时间敏感性分析.....	徐同庆, 徐宜民, 孙 薇, 等	15
3种植物提取物混用对黄曲条跳甲成虫的控制作用.....	赖泉荣, 白建保, 顾 钢, 等	24
滤嘴通风对卷烟烟气酸性成分的影响.....	谢玉龙, 朱先约, 蔡君兰, 等	30
一种纤维素基释烟材料的燃烧热解特性及应用评价.....	陈 刚, 张亚平, 彭晓萌, 等	37
NH ₄ Cl在卷烟滤嘴降温方面的应用.....	华 青, 陶立奇, 卢 琳, 等	46
基于滤纸基质研究干燥过程中的Maillard反应.....	蔡何青, 吴丽洒, 葛 畅, 等	56
2-L-苏氨酸-2-脱氧-D-葡萄糖的合成、热裂解及抗氧化性能.....	武超伟, 陈芝飞, 赵永振, 等	62
基于TDLAS技术测量卷烟燃吸逐口耗氧量.....	邓 楠, 邢昆明, 张明建, 等	72
烟草加料过程中双流体喷嘴雾化粒径的分布特性.....	王 宇, 李 晓, 张明建, 等	78
大型滤棒物流系统升级改造优化效果评估.....	程 哲	87
基于恒脱水量的HDT烘丝机烘丝模式的设计.....	孙成顺, 蔡培良, 周家贤, 等	95
ZJ112卷接机组卷烟纸和滤棒计量系统的设计.....	王金晨, 马万强, 张东生, 等	101
《烟草科技》“烟草工艺”WOS数据库被引论文分析.....	周雅宁	108