

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170407001

http://www.yykxjz.cn/

袁艳敏, 刘福利, 梁洲瑞, 汪文俊, 孙修涛, 王飞久. 海带 *hsp70* 基因的克隆、分析及转录水平定量研究. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 152-158

Yuan YM, Liu FL, Liang ZR, Wang WJ, Sun XT, Wang FJ. Cloning, bioinformatics and quantitative expression analysis of *hsp70* in *Saccharina japonica*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 152-158

## 海带 *hsp70* 基因的克隆、分析及转录水平定量研究

袁艳敏<sup>1,2</sup> 刘福利<sup>2,3①</sup> 梁洲瑞<sup>2</sup> 汪文俊<sup>2</sup> 孙修涛<sup>2</sup> 王飞久<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

**摘要** 本研究以海带(*Saccharina japonica*) ‘海天 1 号’为材料, 通过 RACE-PCR 方法获得海带 *hsp70*(*Sjhsp70*)基因全长 cDNA 序列。序列分析表明, 全长 cDNA 长度为 3778 bp, 含有 1 个 2892 bp 的开放阅读框, 5'和 3'非编码区的长度分别为 101、785 bp。蛋白质氨基酸含量和理化性质分析显示, 该蛋白为稳定蛋白。应用 BLASTP 程序对不同物种 HSP70 蛋白比较分析表明, 海带与长囊水云(*Ectocarpus siliculosus*)的 HSP70 蛋白具有较高的同源性, 用 HSP70 蛋白构建的进化树显示, 海带与长囊水云聚为一类。二级结构预测该蛋白由 963 个氨基酸组成, 包含 35 个  $\alpha$  螺旋和 25 个  $\beta$  折叠。以酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)HSP110 蛋白三维结构 3C7N 为模板, 在 I-TASSER 软件上预测海带 HSP70 蛋白的三维结构, 预测的蛋白结构与 3C7N 的 A 链在折叠和二级结构方面非常类似。对 *Sjhsp70* 基因在温度胁迫下表达变化分析表明, 高温对 *Sjhsp70* 的表达量具有显著影响, *Sjhsp70* 在 25℃、24 h 胁迫条件时, 表达量达到最大值。本研究为阐明海带 HSP70 蛋白特性及其应对环境胁迫的机理提供理论依据。

**关键词** 海带 ‘海天 1 号’; HSP70; RACE; 生物信息学分析; 荧光定量 PCR  
**中图分类号** Q75; S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)04-0152-07

热休克蛋白(Heat shock proteins, HSPs)是由暴露于应激条件下的细胞产生的, 结构上高度保守, 在原核和真核细胞中广泛存在的一类蛋白。HSPs 首次应用于描述果蝇(*Drosophila melanogaster*)的热休克反应, 从此, HSPs 开始受到广泛的关注和研究(Wang *et al.*, 2004; 栗振义等, 2016)。HSP 在正常和应激情况下均发

挥重要的生理功能, 但在胁迫条件包括热激、物理、化学和生物等胁迫因子下表达量显著增加(齐妍等, 2013)。按照分子量的不同, HSPs 分为 HSP100、HSP90、HSP70、HSP60 以及小分子热休克蛋白(Waters *et al.*, 1996)。其中, HSP70 是研究较多、较深入的蛋白, 在逆境环境下, 该蛋白具有分子伴侣的功能, 参与新生

\* 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2016PT03)、现代农业产业技术体系藻类体系离岸式养殖岗位专项(CARS-50)和青岛市民生科技计划项目(17-3-3-65-nsh)共同资助[This work was supported by the Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS(2016PT03), China Agricultural Research System-Algae Offshore Aquaculture (CARS-50), and Qingdao City Science and Technology Project (17-3-3-65-nsh)]. 袁艳敏, E-mail: yuanym2991@163.com

① 通讯作者: 刘福利, 副研究员, E-mail: liufl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-04-07, 收修改稿日期: 2017-05-08

肽的成熟及蛋白质变性后的复性、降解,维持细胞内环境的稳定,进而对细胞具有保护作用(刘伟等,2012)。近年来,已从多种藻类中克隆获得了 *hsp70* 序列,对多种藻类 *hsp70* 基因的结构和功能、调控机理等进行了研究, Muller 等(1992)在研究单细胞藻类茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) *hsp70* 基因的结构时发现,其不同于高等植物 *hsp70* 基因的结构,说明在不同的生物体中, *hsp70* 基因具有序列的多样性。

海带 (*Saccharina japonica*) 是一种冷温性海藻,是海洋生态系统中的重要组成成分,也是我国最早开展全人工养殖和育苗的经济海藻,为我国水产养殖发挥重要贡献(王飞久等,2008)。海带‘海天1号’是南方耐高温品系与北方高产品系经过杂交后,再通过连续自交几代后,选育获得的海带新品系,其具有产量高、耐高温、成熟稍早等特点(姚海芹等,2016)。本研究以海带‘海天1号’为材料,通过 RACE 方法获得 *Sjhsp70* 全长 cDNA 序列,根据序列信息研究其蛋白质结构和性质,并通过荧光定量 PCR 分析温度对 *hsp70* 基因表达量的影响,以期对海带耐高温的分子机制研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料处理

2015年11月12日,海带‘海天1号’采自山东荣成青鱼滩养殖海域,挑选大小均匀、健康无损伤的个体,长度约为5~6 cm。将取回的海带幼苗在温度为13℃、光强为30~50  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、光周

期为12L:12D条件下,培养1 d,培养液为含有  $\text{NaNO}_3$  和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液的灭菌海水,N浓度为3 mg/L,N:P=10:1,充气悬浮培养。在高温(25℃)分别处理0、3、6、12、18、24、30、36 h,以0为参考,比较 *Sjhsp70* 基因在高温胁迫不同时间的表达情况。在不同温度(2℃,6℃,10℃,14℃,18℃,22℃,25℃)时,处理3 h,以10℃为参考,比较 *Sjhsp70* 基因在不同温度的表达情况。

### 1.2 总 RNA 提取

采用 RNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)进行海带总 RNA 的制备和提取,方法参照试剂盒说明书。制备后的 RNA 经过琼脂糖(1.2%)凝胶电泳检测,检查其完整性,并在  $A_{260}:A_{280}$  条件下,检测总 RNA 的纯度。

### 1.3 RACE 法克隆 *Sjhsp70* cDNA 全长序列

5'-RACE 和 3'-RACE 模板采用 Gene Racer™ Kit (Invitrogen)进行合成。根据本实验室转录组测序数据库中的海带 *hsp70* 基因序列,采用 Primer Premier 6.0 软件分别设计 5'-RACE 引物 HSP70-R1、HSP70-R2 和 3'-RACE 引物 HSP70-F1、HSP70-F2(表1),由生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成。所用的其他引物序列见表1。根据 RACE 试剂盒说明,分别使用 PCR 扩增得到 5'末端和 3'末端,采用琼脂糖凝胶(1.5%)电泳对 PCR 产物进行分析。确定目的条带后切胶回收,连接于 pUCm 载体,进行转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,挑选阳性克隆,送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,根据测序序列拼接获得全长 cDNA。

表1 引物名称及序列

Tab. 1 Primer name and sequence

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
5' GeneRacer outer primer	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA
5' GeneRacer Inner primer	GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA
HSP70-R1	CGTGATCTTGGTGAAGGTCTGCTTGGGTT
HSP70-R2	CGTGTTTCGTCACAATCTCCAACGGCTT
3' GeneRacer outer primer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG
3' GeneRacer Inner primer	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG
HSP70-F1	CCCCTGAAGAAGACCCTGAGCATCACC
HSP70-F2	GGCGTTGTCGCCTTCGCCAAGAAA

### 1.4 生物信息分析

开放阅读框(ORF)识别:利用 NCBI 中的 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.htm1>) 寻找基因序列完整的 ORF。

蛋白质组分分析:利用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)在线工具分析 HSP70 蛋白质质的基本参数。用 NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)在线工具预测蛋白磷酸化位点。

多序列比对和进化树构建:用 BLASTP 程序寻找

海带 *hsp70* 基因的同源序列,再用 CLC Genomics Workbench 8 软件对获得的同源序列进行多序列比对。根据多序列比对结果,用 MEGA5.2 软件中的 Neighbor-Joining 法进行进化树构建。

蛋白质二级结构预测:利用 CLC Genomics Workbench 8 软件进行蛋白质二级结构分析来预测其二级结构及序列中含有的蛋白激酶 C 磷酸化位点、N 端糖基化位点,并在二级结构图中标注。

蛋白三维结构的预测:目标蛋白三维结构基于同源建模的 I-TASSER 在线软件(<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)进行预测。

### 1.5 定量 PCR 分析

采用 qPCR 技术,分析 *Sjhs70* 在不同温度及不同高温诱导下 mRNA 的转录差异,选择  $\alpha$ -微管蛋白( $\alpha$ -Tubulin)为内参基因,*Sjhs70* 与内参基因参照引物序列见表 2。荧光 qPCR 反应体系为 2 × SYBR Green Mix, 25  $\mu$ l; PCR 正向引物, 1  $\mu$ l; PCR 反向引物, 1  $\mu$ l; 模板 cDNA, 5  $\mu$ l; ddH<sub>2</sub>O, 18  $\mu$ l, 总反应体系为 50  $\mu$ l。针对每个模板的每对引物设置 3 个重复以及 1 个阴性对照。荧光定量 PCR 反应程序: 95℃ 预变性 10 min 后, 按照 95℃, 30 s; 53℃, 30 s; 72℃, 1 min 的反应程序进行 40 个循环。融解曲线反应程序: 由 60℃ 递进升温到 95℃ 步进 0.5℃, 恒温 10 s。用 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  法计算 *Sjhs70* 的相对表达量。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Sjhs70* 全长 cDNA 克隆及分析

利用 RNeasy Plant Mini Kit 提取海带总 RNA, A<sub>260</sub>:A<sub>280</sub> 比值为 1.92, 表明所制备的海带 RNA 纯度较高。琼脂糖凝胶电泳检测 28 s 和 18 s 2 条主要条带清晰明显, 表明获得的海带总 RNA 完整性较好(图 1A)。用特异性引物与 Gene Racer 引物分别进行 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测表明, 5'-RACE PCR 特异性条带大小为 250 bp 左右(图 1B), 3'-RACE PCR 特异性条带大小为 2000 bp 左右(图 1C),

分别测序并拼接后获得 *Sjhs70* 全长 cDNA 序列, *Sjhs70* 含有一个 2892 bp 长的开放阅读框, 5'和 3'非编码区的长度分别为 101、785 bp, Poly A 尾巴信号肽区域位于 3765~3770 bp 处。将 *Sjhs70* 序列提交至 NCBI 数据库, 序列号为 KY986415。

### 2.2 SjHSP70 理化性质分析

使用 ProtParam 对 *Sjhs70* 编码的 SjHSP70 蛋白进行分析, SjHSP70 含有 963 个氨基酸, 其分子量为 103290.11 Da, 理论等电点为 4.83。该蛋白含有 163 个带负电荷的氨基酸残基和 118 个带正电荷的氨基酸残基, 它的 N 端以甲硫氨酸起始。该蛋白脂肪族指数为 79.00, 疏水性指数为 -0.369, 不稳定性指数为 33.12, 可归类为稳定性蛋白。

### 2.3 SjHSP70 序列分析

对 SjHSP70 的氨基酸序列进行 BLAST 分析。结果显示, SjHSP70 与其他物种的 HSP 蛋白具有较高的同源性。其中, 与长囊水云的 HSP70 蛋白的相似度达到了 76.69%, 与单胞藻(*Aureococcus anophagefferens*)的 HSP70 蛋白相似度为 44%, 说明本研究获得的基因序列确为热休克蛋白家族的编码基因。对 SjHSP70 序列进一步分析发现, SjHSP70 包括 N 末端核酸结合区、底物结合区和 C 末端, N 末端核酸结合区位于第 31~418 个氨基酸之间, 底物结合区位于第 426~598 个氨基酸之间。HSP70 蛋白 N 末端氨基酸序列高度保守, 具有结合并水解 ATP 的活性中心。应用 SignalP 4.1 软件分析发现, SjHSP70 的 N 端具有一段 28 个氨基酸的信号肽, 且 SjHSP70 的 C 末端氨基酸序列为 EDEL, 据此判断 SjHSP70 可能位于内质网内。

本研究得到的 SjHSP70 与之前报道的海带 HSP70 (Fu *et al.*, 2009)相似度约为 30%, 其中, 2 个蛋白的前 600 个氨基酸序列相似度约为 40%, 说明海带中 HSP70 的 N 端的保守性更强。为了比较 SjHSP70 与其他在大型海藻中报道的 HSP70, 从 NCBI 数据库中下载了裙带菜 (*Undaria pinnatifida*)、坛紫菜 (*Porphyra haihanensis*)、浒苔 (*Enteromorpha* sp.) 等 12 种海藻的

表 2 *Sjhs70* 定量 PCR 引物与内参基因引物序列  
Tab. 2 *Sjhs70* quantitative PCR primer and reference gene primer sequences

基因 ID Gene ID	引物 ID Primer ID	引物序列 Primer sequence (5'-3')	产物长度 Length of product (bp)
<i>Sjhs70</i>	sjHSP70-1-f50	AGACAAACAAGAGGCGAACCAA	100
	sjHSP70-1-r149	ATCCTGCCAGAAGCCCACC	
$\alpha$ -Tubulin	TUA-F	CACCACTACCTGCCACCACA	119
	TUA-R	CAGACCGCAACATTTCAACC	

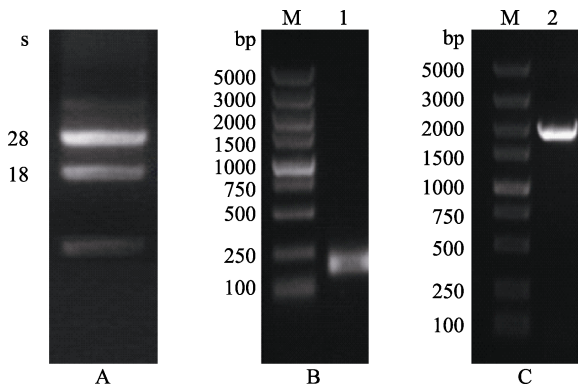


图 1 *Sjhs70* 总 RNA 和 RACE 电泳

Fig.1 Total RNA and RACE electrophoresis patterns

A: 海带总 RNA 电泳; B: 5'-RACE PCR 电泳;  
 C: 3'-RACE PCR 电泳; M: DNA 分子量标准; 泳道 1: 5'-RACE  
 PCR 电泳结果; 泳道 2: 3'-RACE PCR 电泳结果  
 A: Total RNA electrophoresis patterns; B: 5'-RACE PCR  
 electrophoresis patterns; C: 3'-RACE PCR electrophoresis  
 patterns; Lane M: DL5000 Marker; Lane 1: *hsp70* 5'-RACE  
 PCR results; Lane 2: *hsp70* 3'-RACE PCR results

HSP70 序列(图 2), 对其进行多序列比对分析发现, *SjHSP70* 与长囊水云的 HSP70 蛋白的相似度达到了 76.69%, 与其他大型海藻的 HSP70 相似度在 30%~40% 之间, 进化树显示, *SjHSP70* 与长囊水云 HSP70 聚为单独的一枝, 与其他海藻中的 HSP70 的距离较远。

2.4 *SjHSP70* 蛋白结构分析

应用 CLC Genomics Workbench 软件进行 *SjHSP70* 蛋白的二级结构预测, 该蛋白由 963 个氨基酸组成, 包含 35 个  $\alpha$  螺旋和 25 个  $\beta$  折叠。氨基酸序列中的蛋白激酶 C 磷酸化位点和糖基化位点见图 3。从图 3 可以看出, 应用 NetPhos 工具预测蛋白质中丝氨酸、苏氨

酸和酪氨酸的磷酸化位点, 在 HSP70 蛋白质中共预测出 23 个丝氨酸磷酸化位点, 12 个苏氨酸磷酸化位点和 8 个酪氨酸磷酸化位点。

海带 *SjHSP70* 和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) HSP110 分别有 963 和 650 个氨基酸, 酿酒酵母 HSP110 蛋白在 PDB 数据库里的 ID 为 3C7N。海带 *SjHSP70* 的三维结构(图 4)是以 3C7N 为模板在 I-TASSER 软件上预测的, 该蛋白从红色的碳端到蓝色的氮端, 蛋白结构 C 值为 -2.28, 表示其与 3C7N 的 A 链在折叠和二级结构方面非常类似。目标蛋白 *SjHSP70* 和模板蛋白酿酒酵母 HSP110 结构相似性的 TM 值和 RMSD 分别为 0.662 和 0.96Å。

2.5 温度诱导下 *Sjhs70* 基因的转录分析

用荧光定量 PCR 对 *Sjhs70* 基因受高温(25°C)胁迫在不同时间和不同温度时, 处理 3 h 的转录水平进行分析, 结果见图 5 和图 6。从图 5 可以看出, 高温(25°C)胁迫时, 24 h 内随着胁迫时间的延长, *Sjhs70* 的表达量逐渐提高, 在 24 h 时达到表达量的最大值, 12 h 前增加速度较快, 12~24 h 间增加速度缓慢, 24 h 后表达量逐渐降低, 原因可能是 *Sjhs70* 的表达具有时效性, 在温度胁迫短时间内大量表达, 长时间胁迫会超出海带自身的调控能力, 从而导致表达量降低。

从图 6 可以看出, 不同温度处理海带幼孢子体, *Sjhs70* 转录受到明显的影响, 以海带生长的适宜温度 10°C 为参考, 温度小于 10°C 和大于 10°C 都会使得 *Sjhs70* 转录上调, 小于 10°C 时, 上调不显著, 大于 10°C 时, 温度越高表达量越高, 25°C 时表达量最高, 高温胁迫比低温胁迫对 *Sjhs70* 表达的影响更显著。

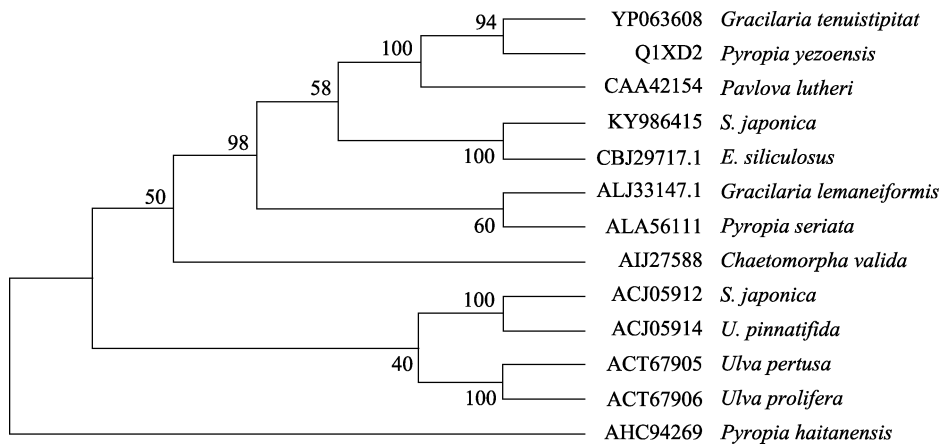


图 2 基于 HSP70 氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树

Fig.2 The phylogenetic tree constructed with HSP70 sequences from different species

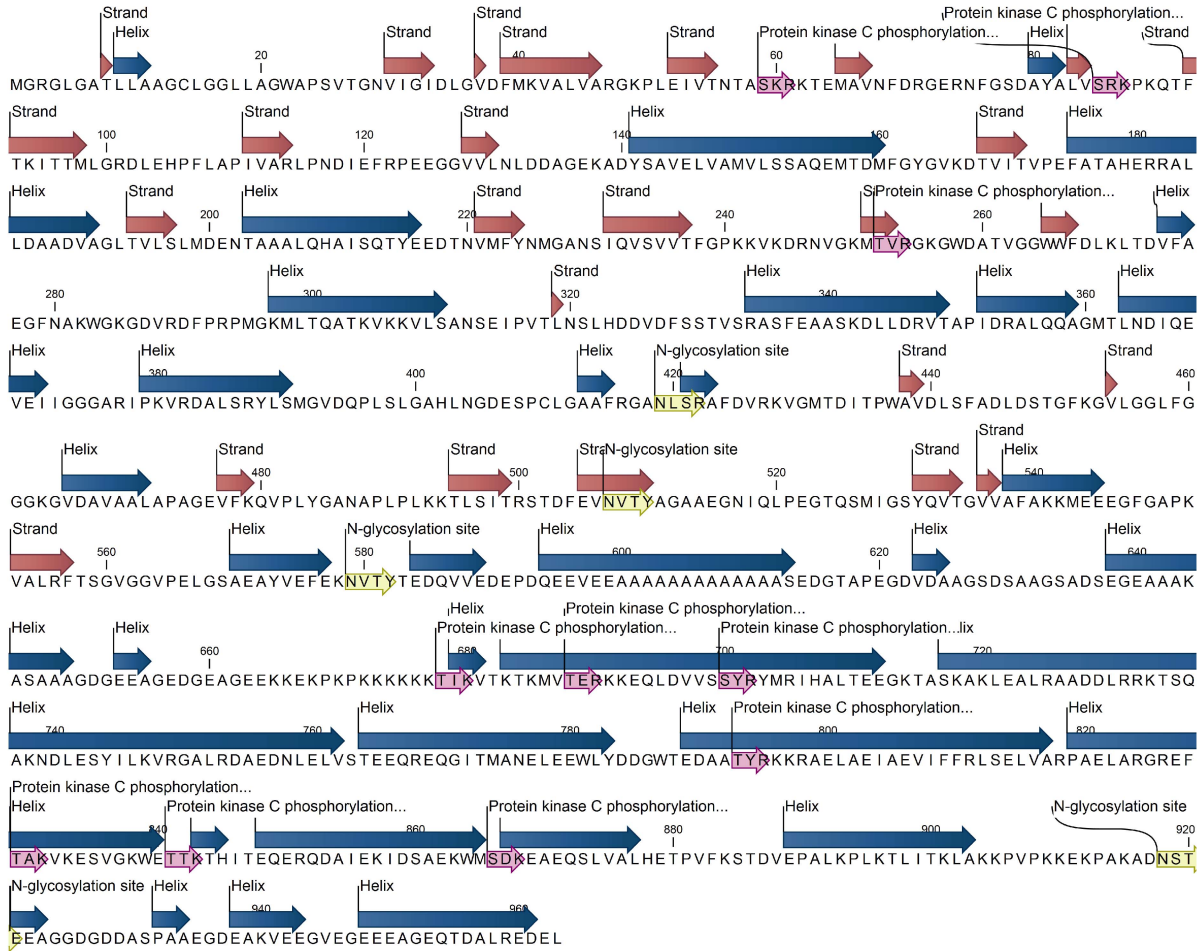


图 3 SjHSP70 蛋白质二级结构预测及功能位点注释

Fig.3 The predicted secondary structure and annotated function sites of the SjHSP70

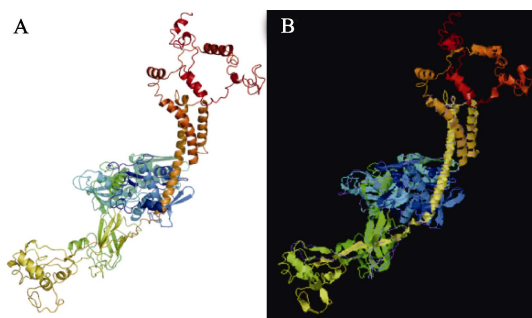


图 4 SjHSP70 蛋白的预测三维结构图及其与模板碳主链的重叠

Fig. 4 Predicted 3D structure model and the main chain interface structure of SjHSP70

A: SjHSP70 的三维结构; B: SjHSP70 结构和酿酒酵母 HSP110 蛋白碳主链的重叠。彩色结构的是海带 HSP70; 紫色线是酿酒酵母 HSP110 碳主链

A: Predicted 3D structure model of SjHSP70;

B: Superimposed prediction model and native cartoon structures of SjHSP70 and HSP110 of *S. cerevisiae*. Rainbow structure was represented of the SjHSP70. Purple line is displayed using the alpha carbon backbone trace of *S. cerevisiae* HSP110

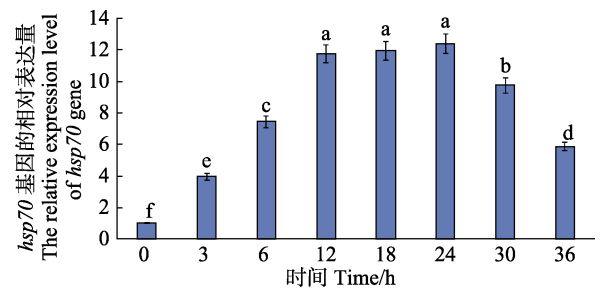


图 5 *Sjhs70* 在高温(25°C)诱导下的转录水平变化  
Fig.5 Variation of transcriptions of *Sjhs70* under high temperature of 25°C

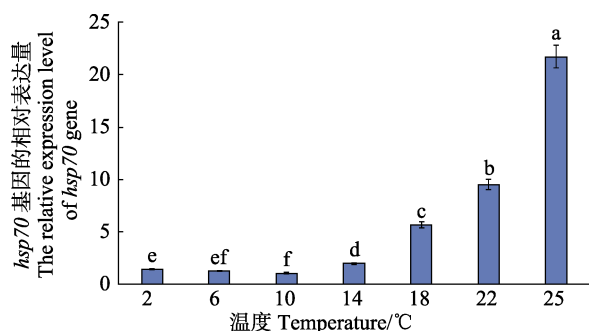
注: 不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

Note: Different letters represent significant difference ( $P < 0.05$ )

### 3 讨论

大量研究表明, *hsp70* 基因在调控植物抗逆过程中发挥重要作用, 植物在受到不利条件, 如高温逆境胁迫时, 会上调 *hsp70* 的表达量, 增强对高温胁迫的抵抗力, 其机制可能是 HSP70 蛋白可以参与新生蛋



图6 *Sjhsp70* 在不同温度下的转录水平Fig.6 Transcriptions of *Sjhsp70* at different temperatures

白折叠、稳定蛋白正常构象以及协助变性蛋白降解等 (Wang *et al.*, 2004; 王明强等, 2015)。Fu 等(2009)研究表明, 海带中 *hsp70* 基因表达受温度调控。本实验室在之前的海带转录谱研究发现, 多个 *hsp70* 基因在高温胁迫下表达上调(Liu *et al.*, 2014)。本研究克隆了其中的 1 个 *Sjhsp70* 基因, 该基因编码的 SjHSP70 蛋白含有 963 个氨基酸。与之前报道的海带中 HSP70 蛋白(Fu *et al.*, 2009)相比, 多出 306 个氨基酸。二者都具有 HSP70 蛋白特有的核酸结合区、铰链区、底物结合区以及 C 末端区, 其中, 在 N 端尤其是 ATP 结合位点区, 二者相似度高, 在铰链区、底物结合区和 C 末端, 二者的相似度较低。本研究获得 SjHSP70 初步判定位于内质网内, 而之前报道的海带 HSP70 (Fu *et al.*, 2009)是胞质蛋白, 二者可能具有不同的生理功能, 作用的底物可能不同, 故二者底物结合区的相似性较低。

根据 HSP70 的表达类型, 可分为组成型 HSP70 和诱导型 HSP70, 前者在正常条件下就有本底表达, 以维持细胞正常生命活动的需要, 而后者在受环境因素胁迫时诱导表达(Swindell *et al.*, 2007)。本研究发现, *Sjhsp70* 基因在正常生长条件下有微量表达, 受到高温和低温诱导时, 都会表达上调, 尤其是受到高温胁迫时, 表达量会大幅增加, 25°C 时的表达量是 10°C 的 21 倍之多。*Sjhsp70* 在受到高温胁迫(25°C)时, 24 h 后表达量达到顶峰, 超过 24 h 后, 表达量又开始降低。之前报道青岛养殖的海带受到热激处理时, 其 *hsp70* 在 25°C 处理 7 h 后, 表达量即可达到最大值(Fu *et al.*, 2009)。二者差异的原因, 可能是‘海天 1 号’的高温耐受性比青岛地区养殖海带的高温耐受性强, 可以在高温胁迫下, 持续高表达热休克蛋白, 以提高自身的耐受性。

本研究克隆获得了 1 个海带 *hsp70* 基因, 定量了该基因在海带高温胁迫时的表达特征, 并探讨了其对调控海带高温耐受性的作用。下一步工作将继续研究 *Sjhsp70* 在具有不同高温耐受性海带材料中的序列多

样性, 同时, 分析序列多样性与高温耐受性之间的相关性, 相关结果将为海带耐高温机制的研究提供重要的理论依据, 也为海带耐高温新品种的培育打下基础。

## 参 考 文 献

- Fu WD, Yao JT, Wang XL, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of a cytosolic Hsp70 gene from *Laminaria japonica* (Laminariaceae, Phaeophyta). *Marine Biotechnology*, 2009, 11 (6): 738–747
- Li ZY, Long RC, Zhang TJ, *et al.* Research progress on plant heat shock protein. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32 (2): 7–13 [栗振义, 龙瑞才, 张铁军, 等. 植物热激蛋白研究进展. *生物技术通报*, 2016, 32 (2): 7–13]
- Liu FL, Wang WJ, Sun XT, *et al.* RNA-Seq revealed complex response to heat stress on transcriptomic level in *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyta). *Journal of Applied Phycology*, 2014, 26(3): 1585–1596
- Liu W, Yang R, Xu LN, *et al.* Cloning and expression of *Hsp70* for *Porphyra haitanensis*. *Journal of Ningbo University (Natural Science and Engineering Edition)*, 2012, 25(2): 17–25 [刘伟, 杨锐, 徐丽宁, 等. 坛紫菜 *Hsp70* 基因克隆与表达. *宁波大学学报(理工版)*, 2012, 25 (2): 17–25]
- Muller FW, Igloi GL, Beck CF. Structure of a gene encoding heat-shock protein Hsp70 from the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene*, 1992, 111 (2): 165–173
- Qi Y, Xu ZS, Li PS, *et al.* Research progress on molecular mechanism and application of Hsp70 in plants. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013, 14 (3): 507–511 [齐妍, 徐兆师, 李盼松, 等. 植物热激蛋白 70 的分子作用机理及其利用研究进展. *植物遗传资源学报*, 2013, 14 (3): 507–511]
- Swindell WR, Huebner M, Weber AP. Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics*, 2007, 8 (1): 125
- Wang FJ, Sun XT, Gao CR. Cultivation of *Saccharina japonica* cultivars and non-polluted culture: One. *Scientific Fish Farming*, 2008, 85 (7): 14–16 [王飞久, 孙修涛, 高淳仁. 海带苗种培育及无公害养殖技术(一). *科学养鱼*, 2008, 85 (7): 14–16]
- Wang MQ, Zhang DY. Research advance of heat shock protein 70 gene family and its biological functions in plant. *Genomics and Applied Biology*, 2015, 34 (2): 421–428 [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. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34 (2): 421–428]
- Wang WX, Vinocur B, Shoseyov O, *et al.* Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(5): 244–252

Waters ER, Lee GJ, Vierling E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany*, 1996, 47 (3): 325–338

Yao HQ, Liang ZR, Liu FL, *et al.* Preliminary studies on the photosynthetic and respiration rate of young sporophyte of a

new *Saccharina* variety “Haitian No. 1” using liquid-phase oxygen measurement system. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37 (1): 140–147 [姚海芹, 梁洲瑞, 刘福利, 等. 利用液相氧电极技术研究“海天 1 号”海带幼孢子体光合及呼吸速率. *渔业科学进展*, 2016, 37 (1): 140–147]

(编辑 陈严)

## Cloning, Bioinformatics and Quantitative Expression Analysis of *hsp70* in *Saccharina japonica*

YUAN Yanmin<sup>1,2</sup>, LIU Fuli<sup>2,3①</sup>, LIANG Zhouhui<sup>2</sup>, WANG Wenjun<sup>2</sup>, SUN Xiutao<sup>2</sup>, WANG Feijiu<sup>2</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology(Qingdao), Qingdao 266071)

**Abstract** HSP70s are heat shock proteins that exist widely in prokaryotes and eukaryotes, and play important roles in biological resistance. The full cDNA sequence of a *hsp70* gene in *Saccharina japonica* (*Sjhsp70*) of 3778 bp was obtained by RACE technology. *Sjhsp70* consisted of an open reading frame (ORF) of 2892 bp, a 5' untranslated region (UTR) of 101 bp, and a 3' UTR of 785 bp. Analysis of amino acid content and physicochemical properties showed that Sjhsp70 is a stable protein. Comparison between the amino acid sequences of Sjhsp70 and the well-characterized orthologous HSP70 proteins from various species indicated that Sjhsp70 shares the highest similarity with the orthologous protein from *Ectocarpus siliculosus*. The phylogenetic tree of the examined proteins indicated that Sjhsp70 formed a group with a HSP70 from *E. siliculosus*. Secondary structure analysis of Sjhsp70 showed that it is composed of 35  $\alpha$ -helices and 25  $\beta$ -strands. Three-dimensional homology structure modeling of Sjhsp70 was predicted by the I-TASSER server according to the 3C7N template. Overall, the folding and secondary structures of Sjhsp70 were highly similar to those of 3C7N. To study the correlation between Sjhsp70 and the resistance to high-temperature stress in *S. japonica*, real-time variation in the expression of *Sjhsp70* under different temperatures and different stress times was determined. The results showed that high temperature had a significant effect on the expression of *Sjhsp70*. The expression of *Sjhsp70* continued to increase with increase in temperature, with the maximum *Sjhsp70* expression at 25°C after 24 h of high-temperature stress. This result indicates that *Sjhsp70* is probably related to high-temperature resistance in *S. japonica*. This study provides a foundation for the characterization of Sjhsp70 and for the study of Sjhsp70 function in the high-temperature stress response in *S. japonica*.

**Key words** *Saccharina japonica* ‘Haitian No.1’; HSP70; RACE; Bioinformatics analysis; Quantitative real-time PCR

① Corresponding author: LIU Fuli, E-mail: liufl@ysfri.ac.cn