

白背飞虱 *HSP90* 全长 cDNA 的克隆与特性分析

张道伟¹, 陈 静², 郭玉双³

(1. 遵义师范学院, 贵州 遵义 563002; 2. 遵义医学院, 贵州 遵义 563003; 3. 贵州省烟草科学研究所, 贵州 贵阳 550081)

摘要: 利用同源克隆及 RACE 的方法, 从白背飞虱 *Sogatella furcifera* 中克隆获得热激蛋白 *HSP90* 基因的全长 cDNA 序列 (Genbank 登录号: JQ743628), 该基因全长为 2 707 bp, 包含 421 bp 的 3' 非编码区域 (UTR) 和 93 bp 的 5' UTR, 开放阅读框 (ORF) 为 2 193 bp, 编码 730 个氨基酸。该基因预测的蛋白分子量为 83.85 kD, 等电点为 4.94, 无信号肽、糖基化位点及跨膜结构。在 N 端具有 *HSP90* 基因保守的 ATPase 结构, 含有 *HSP90* 家族的 C 末端的保守序列 MEEVD。从进化分析结果看出, 白背飞虱的 *HSP90* 与其它昆虫的 *HSP90* 蛋白的同源性较高, 与褐飞虱相比较, 同源性高达 98%。*HSP90* 基因的克隆和比较分析为进一步深入研究白背飞虱的抗逆机理、耐受性及进化具有重要意义。

关键词: 白背飞虱; *HSP90* 基因; 克隆; 特性分析; 序列分析

中图分类号: S435.112.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2012)06-0013-06

热激蛋白 (Heat stress protein, HSP) 又称热休克蛋白 (Heat shock protein, HSP), 是机体在应激情况下细胞内迅速合成的一组蛋白质。热激蛋白的诱导表达是昆虫机体抵抗高温胁迫的重要形式之一, 在昆虫的抗逆反应中起着十分重要的作用, 而且昆虫体内热激蛋白的表达量越高, 其耐热性就越强。除了高热之外, 多种应激源如重金属、饥饿、缺氧和缺血等都可以诱导 HSP 的表达。不同昆虫种间热激蛋白序列相对保守, 编码序列变异比较低, 但近期已有研究表明, 热激蛋白基因序列存在变异, 而且这类变异与生物体对温度的适应性之间存在着一定的相关性。

白背飞虱 (*Sogatella furcifera*) 属半翅目, 飞虱科, 是我国和许多亚洲国家当前水稻上的重要害虫。白背飞虱属寡食性害虫, 其对水稻的危害较大。首先, 白背飞虱直接取食水稻茎秆组织汁液, 吸收水稻株系养分, 使稻谷粒不饱满, 瘪粒多。另外, 白背飞虱在取食及产卵时, 造成的大量伤口, 有利于小球菌核病和水稻纹枯病对水稻的侵染。其次, 白背飞虱在取食为害时排泄的“蜜露”由于富含各种糖类、氨基酸类, 易招致煤烟病菌的滋生, 严重影响水稻生长, 造成稻谷减产甚至

绝收。目前国内外对白背飞虱耐热性的研究不多, 国外昆虫耐热性的研究主要是针对一些著名的模式生物或世界范围发生的害虫进行, 对飞虱类昆虫的耐热性研究甚少, 其耐热性发生机理的研究更是缺乏。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

1.1.1 试验材料 白背飞虱于人工气候箱内用水稻饲养, 温度为 27℃、相对湿度 95%±5%、光照 14 h、黑暗 10 h。

1.1.2 主要试剂和仪器 主要试剂和仪器有 Trans Taq DNA 聚合酶 HiFi、大肠杆菌 (*Escherichia Coli*) DH5α 购自北京全式金生物技术有限公司; 提取总 RNA 所用 Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司; 氨苄青霉素、DEPC、CaCl₂ 购自上海生工生物工程有限公司; BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit、dNTP、AMV (Reverse Transcriptase XL)、oligo d(T)₁₈、Ribonuclease Inhibitor、DNA Marker DL2000、pMD18-T 载体等购自 Takara 公司; DNA Gel Extraction kit 购自 Omega 公司, PCR 引物由上海英骏公司合成。PCR 扩增仪、凝胶成像系统为 BioRad 公司生产, DNA 电泳仪采用北京六一仪器厂的 DYY-6C 型电泳仪。

1.1.3 引物设计 将目前已经报道的昆虫中的 *HSP90* 基因进行序列比对, 设计简并引物, 引物序列见表 1。

收稿日期: 2012-03-14

第一作者简介: 张道伟 (1981-), 男, 河南省内乡县人, 博士, 讲师, 从事昆虫及农业螨类分子生物学研究。E-mail: zhang-dw1000@163.com。

通讯作者: 陈静 (1982-), 女, 贵州省遵义市人, 博士, 讲师, 从事昆虫功能基因的研究与利用。E-mail: chenjing_1983@126.com。

表 1 *SfHSP90* 基因的全长 cDNA 扩增策略和引物
Table 1 Cloning strategy and primers for *SfHSP90* full-length cDNA

扩增区域 Amplified region	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
中间片段 Middlefragment	HSP90-F1	5'-ACCGGYATYGGNATGAC-3'
	HSP90-F2	5'-TGGGARGAYGAYYTKGC-3'
	HSP90-R1	5'-CCATRTADCCCATNGTGGA-3'
	HSP90-R2	5'-TCCATRTTDGCVGWCCA-3'
3'-RACE	HSP90 3-1	5'-CAACTGCTCGCTCAAGGACTATGTGGG-3'
	HSP90 3-2	5'-GGAGAACCAGAAGCACATCTACTACAT-3'
5'-RACE	HSP90 5-1	5'-ATGTAGTAGATGTGCTTCTGGTTCTCC-3'
	HSP90 5-2	5'-CCCACATAGTCCTTGAGCGAGCAGTTG-3'
RACE 接头引物 RACE linker-adapter	UPM	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCA GTGGTATCAACGCAGAGT-3'
		5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
	NUP	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 取已饥饿 24 h 的新鲜白背飞虱 5 龄若虫 5 头置于无 RNase 的研钵中,加入液氮,迅速进行研磨至粉末状;然后用移液器加入 0.5 mL Trizol 于研钵中,继续进行研磨;待研钵中的固态物融化后,将其用移液器转移至 1.5 mL Eppendorf 管中,用力振荡 15 s,室温静置 5 min;加入 0.1 mL 氯仿,混合后静置 5 min,4℃,12 000 g 离心 15 min;小心取上清液移入一个新的 Eppendorf 管中,再加入 0.25 mL 异丙醇,室温静置 10 min,然后于 4℃,12 000 g 离心 10 min;倒掉上清液后,加入 0.5 mL 75%乙醇洗涤沉淀,4℃,7 500 g 离心 5 min,弃掉上清液;将 EP 管倒置在超净工作台 10~15 min,加入 30 μL 经过 DEPC 处理过的去离子水中,将所获得的 RNA 用凝胶电泳和分光光度计检测浓度和纯度。

1.2.2 RT-PCR 扩增 在总体积为 25 μL 的 EP 管中依次加入 1 μg 白背飞虱总 RNA,5 μL 的 5×AMV buffer,2 μL dNTP (10 mmol·L⁻¹),0.5 μL 的 AMV Reverse Transcriptase,补充 DEPC 处理水到 25 μL,在 42℃ 的水浴中保温 1.5 h 后,再 95℃ 放置 10 min 灭活 AMV RNase,即获得一链 cDNA。两对简并引物:HSP90-F1 及 HSP90-R1,HSP90-F2 及 HSP90-R2 根据已知的昆虫 *HSP90* 基因的保守结构域设计。第一次 PCR 采用 HSP90-F1 及 HSP90-R1 作为正反向

引物。扩增程序:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,46℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环,72℃ 延伸 10 min;第二次 PCR 采用巢式 PCR 扩增,用第一次 PCR 的产物稀释 50 倍作为模板,用引物 HSP90-F2 及 HSP90-R2 扩增,PCR 程序同第一次 PCR 扩增。

1.2.3 胶回收、连接、转化和验证 将 PCR 中的目的条带用琼脂糖凝胶电泳后按 DNA Gel Purification kit 试剂盒说明书回收片段后,连接到 pMD18-T 载体中,然后将其转入 DH5α 感受态细胞中,挑斑验证后送上海英骏公司测序。

1.2.4 cDNA 的末端快速扩增(RACE) 根据序列检测正确的白背飞虱 *HSP90* 基因中间片段,结合 RACE 试剂盒(Clontech BD SMART RACE cDNA Amplification Kit)操作指南构建 5' 和 3' RACE 文库。HSP90 3-1、HSP90 3-2、HSP90 5-1 和 HSP90 5-2 四条引物根据获得的中间片段序列来设计,分别用于扩增白背飞虱 *HSP90* 基因的 5' 和 3' 端序列。5' RACE 扩增采用试剂盒中的 UPM 引物和 HSP90 5-1,二次巢式 PCR 时采用 NUP 和 HSP90 5-2;同样,3' RACE 扩增采用试剂盒中的 UPM 引物和 HSP90 3-1,二次巢式 PCR 时采用 NUP 和 HSP90 3-2。PCR 扩增程序:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 2 min,35 个循环,72℃ 延伸 10 min。第二次 PCR 采用巢式

PCR 扩增,用第一次 PCR 的产物稀释 50 倍作为模板,PCR 程序跟第一次一样。

1.2.5 序列结构分析及系统学分析 序列分析方法采用 DNASTar 和 Vector 等软件进行,序列比对、氨基酸同源性分析及系统树构建等采用 ClustalW 和 MEGA 4.1 等分析。分子量、等电点、跨膜结构、信号肽、糖基化位点分析采用 EXPASY 数据库中 http://web.expasy.org/compute_pi/、<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>、<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> 等在线分析软件,二级结构预测采用 [http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)

pl? page=npsa_gor4. html 在线分析软件。

2 结果与分析

2.1 白背飞虱 *HSP90* 基因的克隆与序列分析

白背飞虱的 *HSP90* 基因的克隆中,首先经过 2 次 PCR,利用 HSP90-F2 及 HSP90-R2 作为引物,获得了一段约 900 bp 左右的片段。测序结果分析表明,该片段与同为飞虱科的昆虫褐飞虱的 *HSP90* 基因同源性最高,在氨基酸上达到 93% 的相似性,因此初步判定该片段为白背飞虱 *HSP90* 基因的部分片段。根据这段 cDNA 序列,分别在 5' 和 3' 端设计了 4 条特异性引物(见表 1)。利用白背飞虱的 5' 和 3' RACE 文库作为模

```

1  ACATGGGGATTGTTAATCAGAAGCTAAGGCTAAACCTTAAAGTTCGTTAAATTCGTTGTTGATTTTGTAAATTACTCTTGTGCATAAAGATGCCA
   E D V Q M E A G E V E T F V F Q A E I A Q L M S L I I N T F Y S N
100 GAAGACGTACAGATGGAAGCCGAGAGGTGGAGACTTTTGTCTCCAGGCGGAAATCGCCAGTTAATGTCATTGATCATAAACACCTTCTACTCCAAC
   K E I F L R E L I S N S S D A L D K I R Y E G L T D A S K L E S G
199 AAAGAAATCTTCTCGTGAATTGATTCAAACCTCTCTGATGCTTTGGACAAGATCAGATACGAAGGTCTCACTGATGCCAGCAAAATGGAATCTGGA
   K D L Q I K I I P N K N D R T L T I I D T G I G M T K A D L V N N
298 AAGGACCTGCAGATTAAGATCATCCAAACAAGATGATAGAACAACCTACCATCATTGATACCGGAATTGGTATGACAAAGGCTGACCTTGTGAACAAC
   L G T I A K S G T K A F M E A L Q A G A D I S M I G Q F G V G F Y
397 CTGGGAACAATCGCAAAATCAGGACAAAGCGTTTATGGAGGCTCTGCAGGCGCGCGACATCTCGATGATTGGTCAGTTTGGTGTGGGTTTCTAC
   S A Y L V A D K V T V T S K H N D D E Q Y L W E S A G G S F T V
496 TCGGCTACCTGGTGGCGACAAGGTGACTGTGACGTGCAAGCACAACGACGATGAGCAATACCTGTGGGAGTCATCCGCTGGAGGTTCTGTTTACGGTC
   R P D H T E P L G R G T K I V L Y I K E Y Q A E F L E E R K I K E
595 CGTCCAGACCACAGCAACCCCTTGGCCGCGGCACCAAGATCGTGCTCTACATCAAGGAGTACCAGGCCGAATTCCTCGAGGAGCGCAAGATCAAGGAG
   V V K K H S Q F I G Y P I K L L V E K E R D K E L S D D E A D E E
694 GTGGTGAAGAAGCACTCTCAGTTTATCGGCTACCCCATCAAGCTGCTGGTTCGAGAAGGAGCGCGACAAGGAATTGAGCGACGACGAGGTCGACGAGGAG
   E Q E E K K R E G E G D K A E D E E D K T P K I E D V E D E G E D
793 GAGCAGGAGGAGAAGAAGGAGGAGGTGAGGGTGACAAGGCGAAGACGAGGAGGACAAGACCAAGATCGAGGATGGAAGATGAGGGTGAGGAT
   G E K K K K K K K T V K E K Y T E D E E L N K T K P I W T S N S D
892 GCGGAGAAGAAAAGAAAAGAAAGACTGTCAAGGAGAAGTATACCGAGGATGAGGAGCTAAACAAGACAAAGCCCATCTGGACCAAGCAACTCTGAC
   D I G Q E E Y G E F Y K S L T N D W E D H L A V K H F S V E G Q L
991 GATATCGGTCAAGAGGAGTACGGCGAGTTCTACAAGTCGCTCACCACGACTGGGAGGACCATCTGGCTGTAAAGCACTTCTCTGTGAAGGTCAACTC
   E F R A L L F V P R R A P F D L F E N K K R K N N I K L Y V R R V
1090 GAGTTCAGAGCTCTTGTGTTTGTGCCCGTGTGCGCCCTTCGACCTCTTTGAAAACAAGAGCGCAAGAACACATCAAGCTGTATGTGCGCAGAGTG
   F I M D N C E D L I P E Y L N F I K G V V D S E D L P L N I S R E
1189 TTCATTATGGACAACGTGAAGACCTATCCCGAGTACCTGAACCTTCATCAAGGGCGTAGTCGACAGCGAGGATCTCCCACTCAACATTCTCGTGAG
   M L Q Q G N K I L K V I R K N L V K K C L E L F E E L A E D K D N Y
1288 ATGCTCCAGCAGAAACAAGATTCTGAAGTCATTGCAAGAAATTTGGTGAAGAAATTTTGAAGTATTTCGAGGAGTTGGCCGAGGACAAGGACAACATC
   K K F Y E Q F S K N L K L G I H E D S Q N R K K L S D L L R Y H T
1387 AAGAAGTCTATGAACAGTTTCAAGCAAGAACTGAAGTGGGCATCCACGAGGACAGCCAGAACAGGAAGAAGCTGTCTGACCTGTTGCGCTACACACA
   S A S G D D N C S L K D Y V G R M K E N Q K H I Y Y I T G E S K D
1486 TCAGCCTCAGGCGACGACAACGTGCTCGCTCAAGGACTATGTGGCGCCATGAAGGAGAACGAGAAGACATCTACTACATCACCGGAGAGAGCAAGGAC
   Q V A N S S F V E L V K K R G F E V V Y M T E P I D E Y V V Q Q M
1585 CAGGTTGCCAACTCATCGTTTGTGGAGCTTGTGAAGCGCGGATTCGAAGTTGTGTACATGACTGAGCCCATGACGAGTATGTGGTGCAGCAGATG
   K E Y D G K Q L V S V T K E G L E L P E D E E E K K K R E D D K A
1684 AAGGAGTACGATGGAAGCAGTGTGTCTGTACGAAGGAGGCGCTCGAACTGCCGAAGACGAAGAGGAGAAGAAGCGCGAAGACGACAAGGCC
   K F E N L C K V M K D I L D K K V E K V V V S N R L V E S P C C I
1783 AAGTTCGAGAACCTGTGCAAGGTGATGAAGGACATCTGGACAAGAAGTTGAGAAGGTGGTGGTGAGCAACAGGCTGGTGGAGTCGCGCTGTGTCATT
   V T S G F G W T A N M E R I M K A Q A L R D T S T M G Y M A A K K
1882 GTGACGTCACAGTTTGGTGGACGCAACATGGAGCGCATTATGAAGGCGCAGGCGCTGCGCGACATCCACCATGGGCTACATGGCGCCAAGAG
   H L E I N P D H S I I D T L R V K A D E D K N D K A V K D L V M L
1981 CATTGTGAAATCAACCCAGCACTCAATCATTGACACGCTGCGTGTGAAGGCGACGAGGACAAAAACGACAAGGCCGTCAAGGATCTGGTGTGCTG
   L F E T S L L S S G F A L E D P G V H A A R I H R M I K L G L C I
2080 CTGTTTCGAGACGTGCTGCTGCTGCGGCTTCGCCCTGGAGGACCTGGCGTGACGCGCGCGCATCCACCGCATGATCAAGCTGGGCTGTGTCATC
   E D D E P A P H D E E K V D A E M P P L E G E A S E D A S R M E E
2179 GAGGACGACGAGCGCGCGCCACGACGAAGAGAAGGTGACGCTGAAATGCCCGCTCGAAGGCGAAGCTTCCGAGGACGCGTGGTATGAGGAA
   V D *
2278 GTCGATTAAACAAACCAAGTGGTCAATGAATCTAAAAAGACTGTTTAATGTTACAAAAGACTTGTACATAGACCTTCATGTGAAAAACTCTAGTT
2377 CAAAAACGTTTCAAGAAACAAATATCAGTATTCAATGCTTTGAATGTAATTCACCTACAAATTATTGCAGTTTTGAACAGTAGCTTTTGACGTT
2476 GTTGTAAATTATCGAAATCGATTATTAGTATTTTGAATTTATACTACGTGGTAAGATTTCGTGATTCTTTATGTTGAAAAATTTATACGCACCGTTGAA
2575 TTTATGTTACAAATTGATTGACTAGTCGATTAGCTTTCTCTGAGTTTGTGTTTCACTTTGAAACTTTTGTATTAAATTCGGAATAAACCATCCAGTTT
2674 CTAATCAAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAG

```

图 1 *SfHSP90* 的核苷酸和氨基酸序列

方框为起始密码子和终止密码子,阴影为 C 末端的保守序列

Fig. 1 Nucleotide and amino acid sequences of *SfHSP90*

The start and stop codons are boxed. The conserved sequence in C-is shaded in gray

板经过两轮的PCR扩增后,在5'端扩增出1 500 bp左右的条带,在3'端扩增出1 200 bp左右的条带。经回收、连接、转化、验证和测序的结果证明为白背飞虱的HSP90基因。将5' RACE、3' RACE和中间片段的序列拼接,获得的白背飞虱的HSP90基因的cDNA全长为2 707 bp,包含421 bp的3'非编码区(UTR)和93 bp的5' UTR,开放阅读框(ORF)为2 193 bp,编码730个氨基酸(见图1)。

2.2 白背飞虱 HSP90 基因的结构特性

白背飞虱HSP90基因预测的蛋白分子量为83.85 kD,等电点为4.94。采用TMHMMServer v.2.0和SignalP 3.0 Server在线分析,没有发现其含有跨膜结构和信号肽。在N端具有HSP90

基因保守的ATPase结构(见图2),含有HSP90家族的C末端的保守序列MEEVD(见图1)。与所有已知昆虫的HSP90基因的结构一致。并且终止密码子以后和polyA以前发现了AATAAA结构,表明获得的为完整的cDNA序列。二级结构分析显示白背飞虱HSP90基因富含无规则卷曲(Random Coil)和 α -螺旋(Alpha helix),分别是35.34%和51.51%,分布于氨基酸序列的多个区域。延伸链(Extended strand)占氨基酸残基总数的13.15,无 β -转角分布区域(见图3)。

2.3 昆虫的 HSP90 基因的同源性分析

利用Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)将预测出的白背飞虱HSP90蛋白序列与其它物种HSP90及HSP70进行序列比



图2 白背飞虱的HSP90基因的cDNA结构

Fig. 2 Structure of HSP90 cDNA from *Sogatella furcifera*

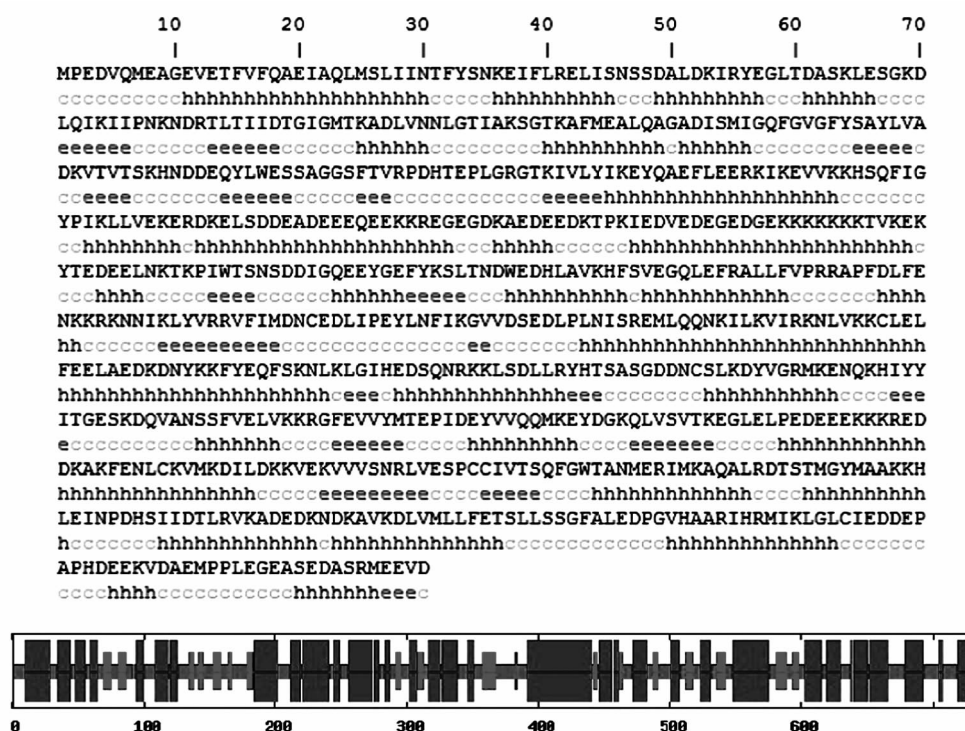


图3 白背飞虱 HSP90 蛋白的二级结构预测分析

图中序列长度:730 bp; α -螺旋:51.51%(376/730);延伸链:13.15%(96/730);无规则卷曲:35.34%(258/730); β -转角:0(0/730)

Fig. 3 Secondary structure prediction of HSP90 protein

Sequence length:730 bp; Alpha helix:51.51%(376/730); Extended strand:13.15%(96/730); Random coil:35.34%(258/730); Beta turn:0(0/730)

对[GenBank 登录号分别为:豌豆蚜 ApHSP90(XM_001943137),埃及伊蚊 AaHSP90(XM_001649702),半目大蚕蛾 AyHSP90(AB176669),烟粉虱 BtHSP90(EU934241),家蚕 BmHSP90(NM_001043411),地中海实蝇 CcHSP90(AM084221),二化螟 CshHSP90(AB206477),松毛虫 DpHSP90(EF213549),黑腹果蝇 DmHSP90(NM_079175),绿蝇 LcHSP90(EF584332),褐飞虱 NIHSP90(ADE34169),印度跳蚁 HsHSP90(EFN88374),中红侧沟茧蜂 MmHSP90(ABV55506),沙蚕 GfHSP90(ADK64952),美洲斑潜蝇 LsHSP90(AAW49253),意大利蜜蜂 NvHSP90(NP_001153536),甘蓝夜蛾 MbHSP90(BAF03554),玉米螟 OfHSP90(ADM26737),甜菜夜蛾 SeHSP90(ACL77779),甜菜夜蛾 SeHSP70(ACN78407),家蚕 BmHSP70(NP_001037396),苜蓿夜蛾 HvHSP70(ACS72236),豌豆蚜 ApHSP70(XP_001945786),赤拟谷盗 TcHSP70(NP_001164199),烟粉虱 BtHSP70(ADO14473),美洲斑潜蝇 LsHSP70(AAW32099),果蝇 DmHSP70(EDW14253)],用 Mega4.1 软件(Bootstrap 中的 UPMGA)对这些昆虫的 HSP90 蛋白进行进化树分析(见图 4),图 4

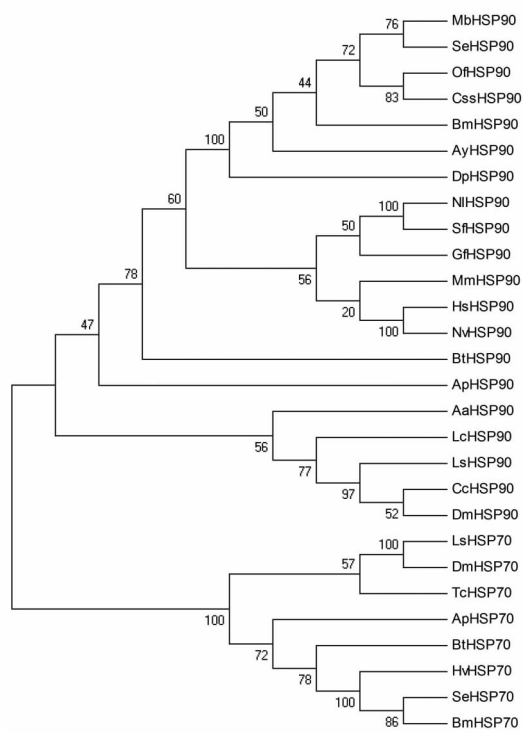


图 4 部分已知昆虫 HSP90 与 HSP70 的进化树分析

Fig. 4 A phylogenetic tree of HSP90 and HSP70 in insects

中的进化树可分成两大组,昆虫 HSP90 及 HSP70 分属两个支类。白背飞虱 HSP90 与同翅目昆虫褐飞虱的 HSP90 的亲缘关系较近,与双翅目昆虫黑腹果蝇、地中海实蝇、绿蝇、美洲斑潜蝇的 HSP90 亲缘关系较远,而与昆虫类 HSP70 在进化上明显最远,该结果与用 ClustalW 进行同源分析的结果一致。

3 结论与讨论

昆虫在自然界中遭遇高温胁迫和饥饿等不利因素的情况非常普遍,作为生物体在各种环境胁迫下诱导表达的热激蛋白是当今生物逆境研究中的一个重要内容。除抵御外界不良逆境的作用外,热激蛋白 HSP90 的另一个重要的作用是与类固醇激素受体及蛋白激酶等信号传导蛋白相互作用并形成复合体^[1],使其具有生物活性,即使是在无胁迫的条件下,HSP90 也是真核生物必不可少的^[2]。自 Ritossa 首次在果蝇中发现热激蛋白以来,其研究已取得了较大进展^[3],目前在昆虫中已开展热激蛋白相关研究的昆虫种类主要包括双翅目^[4]、鳞翅目^[5]、直翅目^[6-7]、蜚蠊目^[8]、膜翅目和鞘翅目等^[9-11],研究结果表明,除温度外的其它许多因子,如病原体入侵、胞外 pH 变化、紫外线照射、重金属、氨基酸类似物、高盐环境、水分胁迫、缺氧和饥饿等均能引起昆虫的热激反应。

HSP90 的分子特征是 25 kD 的 N-端具有一个靶蛋白的结合部位 P 和一个 ATP 功能域^[12-14],C-末端具有 MEEVD 域,这是所有真核细胞 Hsp90 的共同特性^[15]。该研究在获得白背飞虱 HSP90 基因中间片段的基础上,采用 RACE 方法分别克隆 5'末端和 3'末端核苷酸序列,最后通过重叠拼接的方法,将各个片段连接起来,得到了白背飞虱 HSP90 基因的全长 cDNA 序列。经氨基酸序列分析显示该基因在 N 端具有 HSP90 基因保守的 ATPase 结构,含有 HSP90 家族的 C 末端的保守序列 MEEVD,这与 HSP90 的结构特征相吻合。进化树研究的结果表明,白背飞虱 HSP90 与同翅目昆虫褐飞虱的 HSP90 的亲缘关系较近,与双翅目昆虫黑腹果蝇、地中海实蝇、绿蝇、美洲斑潜蝇的 HSP90 亲缘关系较远,而与昆虫类 HSP70 在进化上明显最远。该研究在克隆获得白背飞虱 HSP90 基因全长 cDNA 的基础上,对其序列进行了特性分析,为以后进一步研究其生物学功能打下基础。

参考文献:

- [1] Rutherford S L, Zuker C S. Protein folding and the regulation of signaling pathways [J]. Cell, 1994, 79 (7): 1129-1132.
- [2] Borkovich K A, Farrelly F W, Finkelstein D B, et al. Hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures[J]. Molecular and Cellular Biology, 1989, 9(9): 3919-3930.
- [3] Ritassa F M. Experimental activation of specific puffloci in polytene chromosomes of *Drosophila* [J]. Experimental Cell Research, 1964, 35: 601-607.
- [4] Ritossa F M. A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila* [J]. Experientia, 1962, 18: 571-573.
- [5] Dean R L, Atkinson B G. The acquisition of thermotolerance in larvae of *Calpodex ethius* (Lepidoptera) and the situation in vitro synthesis of heat-shock protein [J]. Can J Biochem Cell Biol, 1982, 61: 472-479.
- [6] Whyard S, Wyatt G R, Walker V K. The heat shock response in *Locustami gratoria* [J]. J Comp Physiol, 1986, 156: 813-817.
- [7] Baldaia L, Maisonhaute C, Porcheron P, et al. Effect of heat shock on protein synthesis in *Locustami gratoria* epidermis [J]. Arch Insect Biochem Physiol, 1987(4): 225-231.
- [8] Ruder G K, Ovsenek N, Heikkila J J, et al. Examination of heat shock gene expression in nerve cord isolated from heat-stressed American cockroach, *Periplaneta americana*, Biochem [J]. Cell Biol, 1989, 67: 168-178.
- [9] 王荫长. 昆虫生物化学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [10] 李斌, 夏庆友, 孙卫忠, 等. 昆虫 HSP 基因的系统研究 [J]. 蚕业科学, 2003, 29(4): 340-343.
- [11] Huang L H, Wang C Z, Kang L. Cloning and expression of five heat shock protein genes in relation to cold hardening and development in the leafminer, *Liriomyza sativa* [J]. J Insect Physiol. 2009, 55(3): 279-285.
- [12] Prodromou C, Roe S M, O'Brien R, et al. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone [J]. Cell, 1997 (a), 90(1): 65-75.
- [13] Prodromou C, Roe S M, Piper P W, et al. A molecular clamp in the crystal structure of the N-terminal domain of the yeast Hsp90 chaperone [J]. Nature Structural Biology, 1997(b), 4(6): 477-482.
- [14] Stebbins C E, Russo dA A, Schneider C, et al. Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex; Targeting of a protein chaperone by an antitumor agent [J]. Cell, 1997, 89(2): 239-250.
- [15] Peter C, Tamas S, Csaba S. The 90-kDa molecular chaperone family; Structures function and clinical applications. A comprehensive review [J]. Pharmacology Therapeutics, 1998, 79(2): 129-168.

Cloning and Characterization Analysis of *Heat Shock Protein 90* Gene from *Sogatella furcifera*

ZHANG Dao-wei¹, CHEN Jing², GUO Yu-shuang³

(1. Zunyi Normal College, Zunyi, Guizhou, 563002; 2. Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou, 563003; 3. Guizhou Tobacco Research Institute, Guiyang, Guizhou 550081)

Abstract: The heat shock protein 90 (HSP90) gene from *Sogatella furcifera* was cloned by homology cloning strategy and technique of Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE). The full-length cDNA of *S. furcifera* HSP90 (*Sf* HSP90) is 2 707 bp (Genbank number: JQ743628) and has an open reading frame of 2 193 bp, a 3' UTR (untranslated region) of 421 bp and a 5' UTR of 93 bp. The estimated molecular weight of HSP90 is 83.85 kD and pI is 4.94. There are no glycosylation sites, putative transmembrane domain and signature peptide. It contains ATPase conservative domain in N-site and MEEVD signature sequence on C-site. Compared with *Nilaparvata lugens*, they are 98% identities and Phylogenetic analysis shows that these two species are most closely related. Cloning and comparison analysis of HSP90 genes from *S. furcifera* could be useful in the studies of anti-stress mechanism, tolerance improvement breeding and evolution for these animals.

Key words: *Sogatella furcifera*; HSP90 gene; cloning; characterization analysis; sequence analysis