

叶用莴苣 *LsHsp70* 基因的克隆及表达分析

李 婷, 韩莹琰, 郝敬虹, 范双喜*, 任 月

(北京农学院植物科学技术学院, 北京 102206)

摘 要: 以叶用莴苣 (*Lactuca sativa* L.) 叶片为试材, 采用 RT-PCR 结合 RACE 技术, 克隆 *LsHsp70* 基因序列, 并利用实时荧光定量 PCR 技术检测耐热品种 ‘Z36’ 和热敏品种 ‘S106’ 在不同高温胁迫下 *LsHsp70* 基因的表达情况。结果表明, *LsHsp70* 基因的开放阅读框为 2 094 bp, 编码 697 个氨基酸, 推测蛋白质分子量为 74.1 kD, 具有 HSP70 家族 3 个标签序列 IDLGTTNS、VFDLGGGTFDVSVL 和 VILVGGSTRIPAV, 与拟南芥 *Hsp70* 同源性高达 92%。高温胁迫能够诱导 *LsHsp70* 表达; *LsHsp70* 对 37 °C 高温胁迫的响应比对 42 °C 高温胁迫的响应更为显著和迅速; 在相同胁迫温度下, 耐热品种 ‘Z36’ 比热敏品种 ‘S106’ 对高温的应激反应迟缓, 持续时间更长, 说明该基因的表达与叶用莴苣耐热性有一定的关联。

关键词: 叶用莴苣; *LsHsp70*; 克隆; 基因表达; 高温胁迫; 耐热性

中图分类号: S 636.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 06-1081-09

Cloning and Expression Analysis of *LsHsp70* from *Lactuca sativa*

LI Ting, HAN Ying-yan, HAO Jing-hong, FAN Shuang-xi*, and REN Yue

(Plant Science and Technology College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: The full-length cDNA of *Hsp70* in *Lactuca sativa* L. was cloned using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid-amplification of cDNA ends (RACE). The results showed that *LsHsp70* open reading frame is 2 094 bp which encoding a polypeptide of 697 amino acids with an estimated molecular mass of 74.1 kD. The three highly conserved HSP70 family signatures is IDLGTTNS, VFDLGGGTFDVSVL and VILVGGSTRIPAV. The similarity of amino acids between *Hsp70* with the homologous gene in *Arabidopsis thaliana* is 92%. The expression patterns were analyzed by Real-time quantitative PCR in heat-resistant type ‘Z36’ and heat-sensitive type ‘S106’ under different high temperatures. The results showed that the high temperature could promote *LsHsp70* expression, and *LsHsp70* expression responses under 37 °C were more sensitive and had a large accumulation than under 42 °C; In the same temperature, ‘Z36’ responses speed were more slowly and last longer.

Key words: *Lactuca sativa* L.; *LsHsp70*; cloning; gene express; high temperature stress; heat resistance

热激蛋白 (heat shock protein, HSP) 广泛存在于生物体中。根据分子量的大小, HSP 家族可分

收稿日期: 2013-02-26; 修回日期: 2013-05-15

基金项目: 北京市自然科学基金项目 (6112005); 北京市叶类蔬菜创新团队建设专项 (blvt-02); 北京市科技新星计划项目 (2010B020)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: fsx20@163.com; Tel: 13910036239)

成 HSP110、HSP90、HSP70、HSP60、sHSP（小 Hsp，分子量 15 ~ 30 kD）和泛素等 6 大类。其中 HSP70 是高度保守并且普遍存在的一类十分重要的细胞功能蛋白（Feder & Hofmann, 1999）。高等植物中 HSP70 具有分子伴侣功能，在新合成肽的转运、折叠、跨膜运输以及蛋白修复和降解过程中都起到非常重要的作用（Morimoto et al., 1997; Fink, 1999）。在高温胁迫条件下，HSP70 能结合部分折叠和变性的蛋白质防止其聚集（Miernyk et al., 1992），协助变性蛋白质重新折叠，保护细胞免受损害（Tanaka et al., 2007; Mycko et al., 2008），也能促进蛋白质折叠成正确的构象（Sun & MacRae, 2005; Haslbeck, 2006）。有研究表明，无论是在植物的生长发育阶段还是在植物抵御环境胁迫过程中，HSP70 都发挥着重要的作用（Latijnhouwers et al., 2010）。普遍认为，HSP70 是保护细胞的物质基础，但是其发挥作用的机理尚不明确。

叶用莴苣的耐热性较差，超过 30 °C 就难以正常栽培（Reynolds & Thompson, 1971; Gray, 1975; Thompson et al., 1979）。有关叶用莴苣耐热性的研究，陈青君等（2011）探讨了耐热性的鉴定方法，筛选出几个评价叶用莴苣耐热性的重要指标。韩良玉等（2005）从形态与生理生化方面研究了品种间耐热性差异的特征。贾娇等（2011）用水溶性壳聚糖溶液处理叶用莴苣种子，显著提高了其耐热性。李新亮等（2010）用大分子和小分子丝素蛋白对叶用莴苣幼苗进行处理，能明显缓解高温胁迫对叶用莴苣幼苗造成的伤害。郑佳秋等（2008）从白菜中克隆出小分子热激蛋白基因 *BcHsp*，并且证明这个基因的表达受高温逆境诱导，通过实时荧光定量 PCR 检测表明，*BcHsp* 在白菜叶片中的表达特征说明它可能与叶片耐热性关系更为密切。但是目前在叶用莴苣中还未见热激蛋白基因与抗热性关系方面的研究报道。本研究中首先从叶用莴苣叶片中克隆 *LsHsp70* 基因全长，对基因序列及其翻译的氨基酸序列进行分析，并对叶用莴苣耐热品种 ‘Z36’ 和热敏品种 ‘S106’ 分别进行 37 °C 和 42 °C 的高温胁迫处理，采用实时荧光定量 PCR 技术检测高温条件下 *LsHsp70* 基因表达量，探讨 *LsHsp70* 参与叶用莴苣抵抗高温胁迫的作用特性，以期为进一步研究叶用莴苣耐热性的分子机理奠定基础，并为调控叶用莴苣耐热性，进而实现夏季耐热栽培提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 材料和处理方法

以叶用莴苣 (*Lactuca sativa* L.) 耐热品种 ‘Z36’ 和热敏品种 ‘S106’ 为试材。2011 年 3 月 19 日，选取饱满一致无病虫害的种子，均匀平铺在有两层湿滤纸的培养皿中，放入种子催芽箱（温度为 25 °C，相对湿度为 75% ± 5%）中萌发。出芽后选取生长一致的种子播种于直径 10 cm 的黑色营养钵内，营养基质为草炭:蛭石 = 2:1（体积比）。营养钵放置于北京农学院日光温室中培养，幼苗长到 4 叶 1 心时，移至人工气候培养箱，设置为 25 °C，12 000 lx 光照 12 h；20 °C 无光照 12 h。适应 1 周之后进行不同高温处理。

将幼苗分别在 37 °C、42 °C 和 25 °C（对照）处理 0、30、60、120、240 和 300 min。于中午 12 时开始在不同高温处理不同时间点，分别随机选 3 株生长一致的幼苗，取其第 3、4 片叶混合样，液氮速冻，-80 °C 超低温冰箱保存备用。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

使用总 RNA 提取试剂盒（Trizol，上海生工生物工程技术有限公司）提取总 RNA，并用 DNase I（TaKaRa）处理以去除基因组 DNA 的污染。以提取的总 RNA 为模板，用 Reverse Transcriptase M-MLV（RNase H⁻）试剂盒（TaKaRa）进行 cDNA 第一链的合成，将 0.5 ~ 2 μg 纯化的总 RNA 反

转录成第一链 cDNA, 作为基因扩增及实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, qRT-PCR) 的模板。

1.3 *LsHsp70* 基因序列的克隆

根据 GenBank 中公布的植物 *Hsp70* 保守片段设计一对兼并引物用于 *LsHsp70* 保守序列的扩增, Hsp-F: CCAGAAATCATTTGTCAAGC 和 Hsp-R: CCAAVACACCAGCCTG, 以 37 °C/32 °C, 热激 2 h 的 ‘Z36’ 幼叶 RNA 反转的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。

基于得到的 *LsHsp70* 片段序列测序结果, 分别设计 3' 和 5' 端引物 Ls70GSP1: GGTGCTAGC ACATTGCCTAGTGATGAGG 和 Ls70GSP2: CCGTTCTTCGTGTACGCCACCACC, UPM 通用引物由 RACE 试剂盒提供, 根据试剂盒说明, 其反应条件为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 64 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经回收、纯化, 与 PMD18-T vector (TaKaRa) 连接, 转化 TOP10 感受态细胞, 蓝白斑筛选后测序 (上海生工生物工程技术有限公司)。用 DNAMAN 软件拼接以上序列获得叶用莴苣 *LsHsp70* 基因全长 cDNA 序列。

1.4 实时荧光定量 PCR

用 SYBR Green 荧光染料法, 用 CFX96 (Bio-Rad) 实时荧光定量 PCR 仪对 *LsHsp70* 在不同处理下的表达量进行检测分析 (Ficko & Cernelc, 2005)。扩增目标基因 *LsHsp70* 的引物 LsHsp70-F: GAATCACAAACTCCGCCG 和 LsHsp70-R: GCACCACCGTGTAGGAAAC。叶用莴苣内参基因 *18S ribosomal RNA* (序列号: HM047292.1) 的荧光引物 18SR-F: GTGAGTGAAGAAGGGCAATG 和 18SR-R: CACTTTCAACCCGATTCACC, 根据试剂盒 Real Master Mix (SYBR Green) PCR (购自宝生物公司) 操作步骤进行, 标准品 cDNA 和待测样品均设置 3 次重复。对反转录所得的 cDNA 分别进行 5 倍梯度稀释 (1: 1: 10、1: 100、1: 1 000、1: 100 000) 实施荧光定量反应, 然后绘制相对标准曲线。*LsHsp70* 基因 RT-qPCR 扩增的反应体系为 20 μ L, 包括: 9 μ L Real Master Mix 混合液、2 μ L cDNA、1 μ L LsHsp70-F (10 μ mol \cdot L⁻¹)、1 μ L LsHsp70-R (10 μ mol \cdot L⁻¹)、7 μ L ddH₂O。反应程序为: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 20 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 次循环, 每次循环第 3 步进行荧光采集, 最后 95 °C 变性 1 min, 退火至 55 °C (每隔 10 s 上升 0.15 °C) 后保温 1 min, 接着检测其荧光值, 绘制熔点曲线。内参基因的 *18S rRNA* PCR 扩增的反应体系为 20 μ L, 包括: 9 μ L Real Master Mix 混合液、2 μ L cDNA、1 μ L 18SR-F (10 μ mol \cdot L⁻¹)、1 μ L 18SR-R (10 μ mol \cdot L⁻¹)、7 μ L ddH₂O。其反应程序与 *LsHsp70* 基因的反应程序相同。

2 结果与分析

2.1 *LsHsp70* 基因的克隆与序列比较

以叶用莴苣耐热型品种 ‘Z36’ 幼叶 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 扩增出一条 1 887 bp 的单一特异性条带。回收纯化产物后经过连接, 蓝白斑筛选, 测序并通过 NCBI 进行同源性比较表明, 与蓖麻 (XM 002526400.1)、番薯 (EU409605.1)、杨树 (XM 002441097.1)、菠菜 (AF035456.1)、拟南芥 (NM 118561.2) 和西瓜 (U92815.1) *Hsp70* 基因的同源性分别为 95%、93%、93%、93%、92% 和 91%, 初步证明该扩增产物是 *Hsp70* 基因片段。

根据 3'RACE 和 5'RACE 测序结果 (图 1), 拼接出叶用莴苣 *Hsp70* 基因 (图 1), cDNA 全长序列为 2 094 bp, 命名该基因为 *LsHsp70* (登录号: JX944711)。利用 DNAMAN 软件分析该基因的序列, 结果表明, 该基因含有 1 个编码 697 个氨基酸的完整阅读框。经过 NCBI 在线比对分析, 认为

2.2 *LsHsp70* 基因编码蛋白的理化性质和序列分析

根据 InterProScan 在线软件对编码氨基酸分子量、编码蛋白的结构域以及功能位点进行分析的结果, *LsHsp70* 的开放阅读框编码含 697 个氨基酸 (图 3), 分子量约为 74.1 kD 的蛋白, 其等电点 pI 为 5.26, 半衰期大于 10 h (*Escherichia coli* 中), 不稳定指数为 26.31, 属于稳定蛋白。蛋白质中含量比较高的是缬氨酸 (9.61%)、甘氨酸 (9.47%)、丙氨酸 (9.33%) 和赖氨酸 (8.32%), 含量比较低的是缬氨酸 (1.00%)、组氨酸 (0.57%)、半胱氨酸 (0.43%) 和色氨酸 (0.41%)。总的带负电荷的氨基酸残基 (Asp + Glu) 总数为 99 个, 总的带正电荷的氨基酸残基 (Arg + Lys) 总数为 86 个, 亲水性平均系数 (Grand average of hydropathicity) 为 -0.259, 预测该蛋白为亲水蛋白。

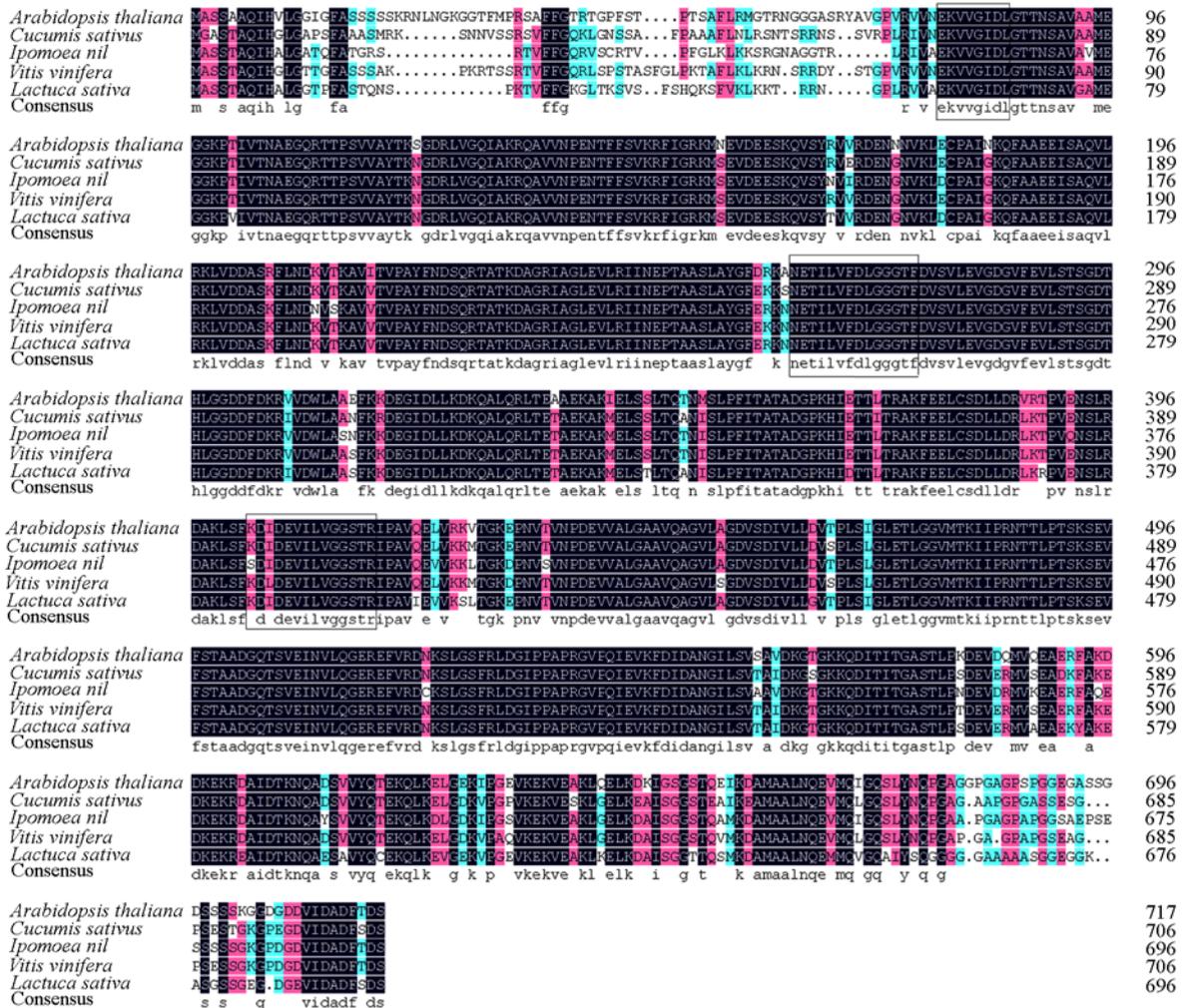


图 3 叶用莴苣 *LsHsp70* 与其他植物 *Hsp70* 氨基酸序列的同源性分析

Arabidopsis thaliana: 拟南芥 (NM 118561.2); *Ipomoea nil*: 番薯 (EU409604.1); *Cucumis sativus*: 黄瓜 (X73961.1);
Vitis vinifera: 葡萄 (XM_002279065.2); *Lactuca sativa*: 叶用莴苣 (JX944711)。
 方框表示真核生物 HSP70 序列保守的 3 个家族标签, 下划线表示叶绿体相同氨基酸特征序列。

Fig. 3 Comparison of amino acid sequences of *LsHsp70* from and other plants

Arabidopsis thaliana: NM 118561.2; *Ipomoea nil*: EU409604.1; *Cucumis sativus*: X73961.1;
Vitis vinifera: XM_002279065.2; *Lactuca sativa*: JX944711.

The amino acids in the brackets indicate the three highly conserved HSP70 family signatures;
 The same amino acid was underlined.

经预测, *LsHsp70* 氨基酸的二级结构中包含 295 处 α -螺旋(alpha helix), 占二级结构的 42.32%; 有 143 处延伸链(extended strand), 占二级结构的 20.52%; 有 215 处无规则卷曲(random coil), 占二级结构的 30.85%。

将得到的序列与 NCBI 中的核苷酸序列数据库用 BLAST 软件进行同源性比较分析。结果表明, 由 *LsHsp70* 基因推测的完整氨基酸序列与拟南芥(*Arabidopsis thaliana* NM 118561.2)、黄瓜(*Cucumis sativus* X73961.1.)、葡萄(*Vitis vinifera* XM_002279065.2)、番薯(*Ipomoea nil* EU409604.1.) 的叶绿体 *Hsp70* 的同源性分别为 92%、88%、87%和 86%。采用 DNAMAN 软件对 *LsHsp70* 的氨基酸与其他植物 *Hsp70* 氨基酸序列的多重序列比对见图 3。氨基酸序列分析发现, *LsHsp70* 氨基酸序列保守的 3 个家族标签: IDLGTTNS(66~73 aa)、VFDLGGGTFDVSVL(250~263 aa)和 VILVGGSTRIPAV(391~403 aa), 该基因无明显的定位基序序列, 但有与叶绿体基序序列极为相似 VIDADFSDS(687~696 aa) 序列, 且通过 Blast 比对发现其与拟南芥叶绿体 *Hsp70* 同源性高达 92%, 因此推测其定位于叶绿体内。叶用莴苣与其他植物 *Hsp70* 氨基酸序列有较多的保守区, N 端和 C 端保守性较差, 有一些可变序列, 但是 C 末端“VIDADF”高度保守。

2.3 不同物种 *Hsp70* 家族基因的系统进化树分析

为进一步了解叶用莴苣 *LsHsp70* 和其他植物之间的亲缘关系, 利用软件 Clustal X 和 MEGA 5.0, 通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Blast 比对, 将 *LsHsp70* 序列推测的氨基酸序列与数据库中已经登录的 10 种 *Hsp70* 氨基酸序列构建(bootstrap)系统进化树, 结果(图 4)符合进化规律, 如大豆与豌豆亲缘关系很近, 其 *Hsp70* 氨基酸序列属于一个分支; 葡萄与杨树属于一个分支, 与施季森等(2012)研究的结果葡萄和杨树属于真蔷薇 I (Eurosoid I clade) 进化支相一致。拟南芥和叶用莴苣在一个分支, 也与 NCBI Blast 的比对结果相吻合。

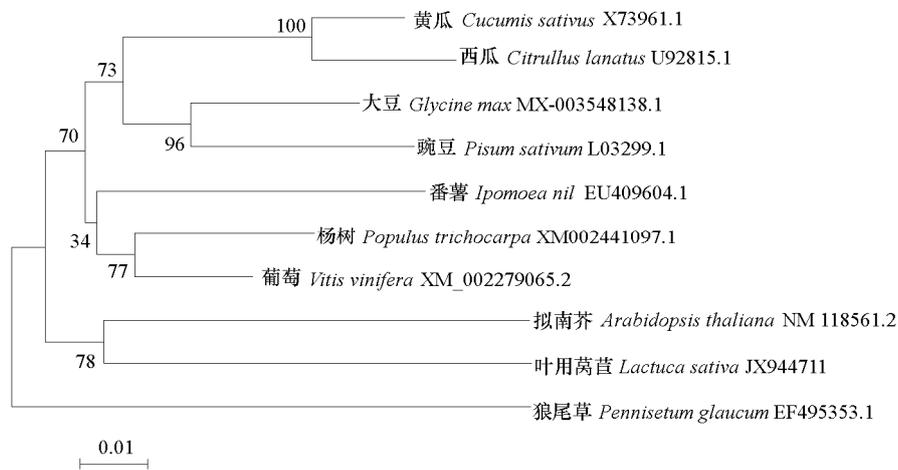


图 4 不同植物 *Hsp70* 氨基酸序列系统进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic trees of the deduced amino acid sequences of plant HSP70 by MEGA 5.0

2.4 *LsHsp70* 基因在不同高温处理下的表达分析

由 iCycleriQTM 自动测出的叶用莴苣内参基因 *18S rRNA* 的 PCR 扩增效率和相关系数分别为 97.8%和 0.999; 测出 *LsHsp70* 的扩增效率和相关系数分别为 90.8%和 0.999, 说明该试验具有良好的重复性和较高的扩增效率。经熔点曲线分析, *18S rRNA* 和 *LsHsp70* 均只有一个 T_m 值, 分别为 87 °C 和 81 °C, 表明 *18S rRNA* 和 *LsHsp70* 所用引物具有高度特异性, 其 PCR 扩增产物均为目的片段,

不含引物二聚体。

由图 5 可以看出, 高温胁迫诱导耐热品种 ‘Z36’ 和热敏品种 ‘S106’ 的 *LsHsp70* 基因表达。虽然两品种的 *LsHsp70* 基因对高温胁迫响应的总趋势相同, 即表达量在短时间内均增加, 随后出现下降趋势, 但是又存在一定差异, 即耐热品种 ‘Z36’ 中 *LsHsp70* 基因表达变化迟于热敏品种 ‘S106’, 总的表达水平也高于热敏型品种。

在热敏品种 ‘S106’ 中, 该基因明显受高温诱导表达, 在 25 °C 生长条件下能检测到 *LsHsp70* 基因的表达; 37 °C 热激 30 min 时表达量显著增加, 并达到最大值, 其后有所下降, 在热激 300 min 时低于对照表达量; 42 °C 热激 30 min 时其表达量较 25 °C 出现小幅度增加, 随后迅速下降, 甚至低于对照。

在耐热品种 ‘Z36’ 中, 在 25 °C 生长条件下能检测到 *LsHsp70* 基因的表达; 37 °C 高温条件下表达量显著增加, 并在处理 120 min 时达到最大值, 随后有所下降; 42 °C 高温条件下其表达量较 25 °C 出现小幅度增加, 在处理 120 min 时达到最大值, 随后迅速下降, 在热激 300 min 时低于对照表达量。

从以上结果可以看出, 该基因在两品种中都受到高温诱导表达。相同品种, 相同处理时间该基因在 37 °C 的表达量大于在 42 °C, 显示 *LsHsp70* 对 37 °C 高温胁迫的响应比对 42 °C 高温胁迫的响应更为显著。在相同高温胁迫条件下, *LsHsp70* 基因在热敏品种 ‘S106’ 中经高温处理后立即加速表达, 而耐热品种 ‘Z36’ 对高温胁迫的反应较迟钝, 说明 *LsHsp70* 基因表达与叶用莴苣耐热性有一定的关系。

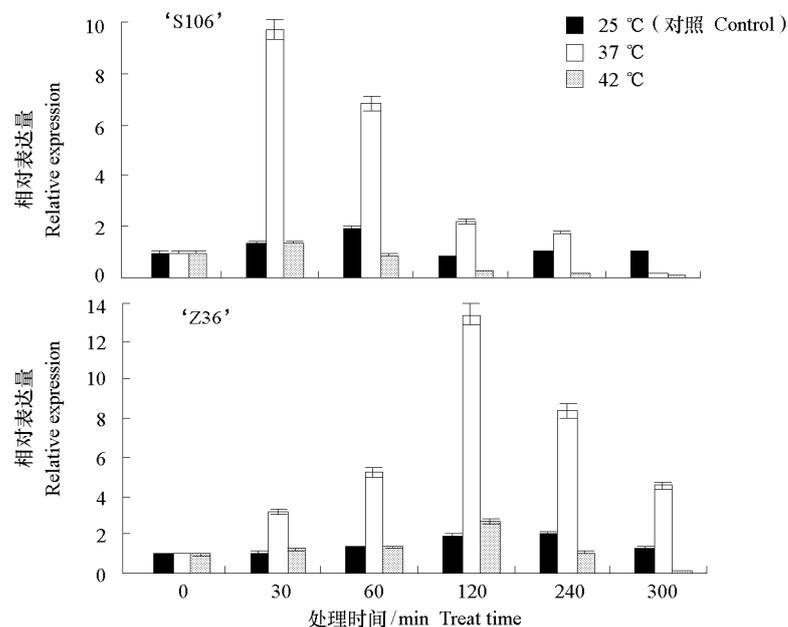


图 5 叶用莴苣耐热品种 ‘Z36’ 和热敏品种 ‘S106’ 在 25、37、42 °C 温度下 *LsHsp70* 基因的表达量

Fig. 5 Expression analysis of *LsHsp70* under 25, 37, 42 °C of heat-resistant type ‘Z36’ and heat-sensitive type ‘S106’

3 讨论

Hsp 是一类大的基因家族, 具有高度的保守性 (Boorstein et al., 1994), 大量的研究表明, 它们参与许多细胞的正常生理过程, 对调节细胞内环境的稳定性具有重要作用 (Montero-Barrientos et al.,

2008), 与植物的耐热性有关, 并且在高温胁迫条件下其表达量显著高于正常状态 (Sanchez & Lindquist, 1990)。本研究中成功克隆了叶用莴苣中 *Hsp70* 基因, 命名为 *LsHsp70*。其具有 HSP70 家族 3 个标签序列 IDLGGTNS、VFDLGGGTFDVSVL 和 VILVGGSTRIPAV, 可能在叶用莴苣的生长发育阶段或者高温胁迫中起一定作用。该基因无明显的定位基序序列, 但有与叶绿体基序序列极为相似的 VIDAFSDS 序列, 这种定位基序的差异可能与热激蛋白诱导叶用莴苣耐热性的作用机理具有密切关系。经综合氨基酸序列同源性和系统进化树分析, 均与拟南芥叶绿体 *Hsp70* 同源性最高, 因此推测该基因属于叶用莴苣 *Hsp70* 基因, 定位于叶绿体内。*LsHsp70* 的获得, 将有助于进一步研究叶用莴苣高温耐热机制, 深入了解热激条件下叶用莴苣光合作用的机理、叶用莴苣叶绿体内的物质代谢与细胞质内物质代谢的关系, 从而提高光合潜力和耐热潜力。

有报道认为, HSP70 N 末端的氨基酸要比 C 末端的保守性高 (Munro & Phelham, 1986), 但是叶用莴苣 HSP70 的氨基酸序列中这一规律并不明显, 推测其 N 端、C 端的信号肽以及延伸序列与其他作物存在差异。

李慧聪等 (2010) 从玉米中克隆出 *ZmHsp70* 基因, 发现 42 °C 热胁迫能明显诱导 *ZmHsp70* 基因表达量的增加, 在处理 2 h 达到最大值, 随后降低; 北美短叶松、白云杉等树木的幼苗在高温胁迫条件下 *Hsp70* 的表达量迅速增加 (Gifford & Taleisnik, 1994)。Gong 等 (2010) 从紫茎泽兰中克隆出 *Hsp70* 基因, 并且在高温胁迫下叶片的 *Hsp70* 表达量增加, 这可能有助于提高植物对温度逆境耐受性; 顾颖慧 (2011) 在龙须菜中克隆 *Hsp70* 基因, 并且将两个耐热型不同的品种分别在 28 °C 和 32 °C 条件下进行高温处理, 发现同一品种 32 °C 处理的表达量比 28 °C 处理的表达量低, 作者认为这是因为植物体对热刺激超出一定的耐受范围就会影响机体进行自我保护和修复功能; 并且耐热品种的表达量高于热敏品种。在上述这些研究中, *Hsp70* 基因被认为对植物抵抗高温胁迫有重要作用。本研究中高温处理结果表明, 同一温度下, 耐热品种 ‘Z36’ 比热敏品种 ‘S106’ 对高温刺激的响应迟缓, 且持续时间更长。说明耐热品种 ‘Z36’ 比热敏品种 ‘S106’ 耐受高温的能力强。这与田间生理试验结果相符, 推测可以用 *LsHsp70* 基因的表达量作为衡量叶用莴苣耐热性的指标之一。

References

- Boorstein W R, Ziegelhoffer T, Craig E A. 1994. Molecular evolution of the Hsp70 multigene family. *Journal of Molecular Evolution*, 38 (1): 1 - 17.
- Chen Qing-jun, Han Ying-yan, Gu Jian-tian, Fan Shuang-xi. 2011. Evaluation of major agronomic traits and heat tolerance of lettuce germplasm resources. *China Vegetable*, (20): 20 - 27. (in Chinese)
- 陈青君, 韩莹琰, 谷建田, 范双喜. 2011. 叶用莴苣种质资源的主要农艺性状鉴定与耐热性评价. *中国蔬菜*, (20): 20 - 27.
- Feder M E, Hofmann G E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61: 243 - 282.
- Ficko T, Cernelc P. 2005. Real-time quantitative PCR assay for analysis of platelet glycol protein III a gene expression. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 62 (3): 241 - 250.
- Fink A L. 1999. Chaperone-mediated protein folding. *Physiological Reviews*, 79: 425 - 449.
- Gifford D J, Taleisnik E. 1994. Heat-shock response of pinus and picea seedlings. *Tree Physiology*, 14 (1): 103 - 110.
- Gong W N, Xie B Y, Wan F H, Guo J Y. 2010. Molecular cloning, characterization and heterologous expression analysis of heat shock protein genes (*hsp70* and *hsp90*) of invasive alien weed *Ageratina adenophorum* under heat and cold stress. *Weed Biology and Management*, 10 (2): 91 - 101.
- Gu Ying-hui. 2011. Molecular cloning and expression analysis of heat-shock-protein 70 (*Hsp70*) gene from *Gracilaria lemaneiformis* under heat shock [M. D. Dissertation]. Qingdao: Ocean University of China. (in Chinese)
- 顾颖慧. 2011. 龙须菜热激蛋白 70 (*Hsp70*) 基因克隆及热激下的表达模式分析 [硕士论文]. 青岛: 中国海洋大学.

- Gray D. 1975. Effects of temperature on the germination and emergence of lettuce *Lactuca sativa* cultivars. HortScience, 50: 349 - 361.
- Han Liang-yu, Gu Jian-tian, Fan Shuang-xi. 2005. Studies on the identification and appraising methods of heat resistance of head lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *capitata* DC.). Journal of Beijing University of Agriculture, 20 (4): 29 - 32. (in Chinese)
- 韩良玉, 谷建田, 范双喜. 2005. 结球莴苣耐热性鉴定方法初探. 北京农学院学报, 20 (4): 29 - 32.
- Hselbeck M. 2006. Recombinant expression and *in vitro* refolding of the yeast small heat shock protein Hsp42. International Journal of Biological Macromolecules, 38 (2): 107 - 114.
- Jia Jiao, Zhang Ting-ting, Gu Jian-tian. 2011. Influence of exogenous chitosan on germination and seeding growth of lettuce. Chinese Agricultural Science Bulletin, 27 (25): 138 - 141. (in Chinese)
- 贾 娇, 张婷婷, 谷建田. 2011. 高温下水溶性壳聚糖浸种对叶用莴苣种子萌发和幼苗生长的影响. 中国农学通报, 27 (25): 138 - 141.
- Latijnhouwers M, Xu X M, Miller S G. 2010. *Arabidopsis* stromal 70 kDa heat shock proteins are essential for chloroplast development. Plant, 232 (3): 567 - 578.
- Li Hui-cong, Guo Xiu-lin, Wang Dong-mei, Li Guo-liang. 2010. Responses of *Hsp70* gene expression to temperature stresses in maize (*Zea mays* L.). Journal of Agricultural University of Hebei, 33 (6): 12 - 15. (in Chinese)
- 李慧聪, 郭秀林, 王冬梅, 李国良. 2010. 玉米热激蛋白 70 基因对温度胁迫的响应. 河北农业大学学报, 33 (6): 12 - 15.
- Li Xin-liang, Zhang Ji-fang, Jia Jiao, Tan Wen-bo, Gu Jian-tian. 2010. Physiological and biochemical changes of lettuce seedlings under heat stress after silk fibroin solution treatment. Journal of Beijing University of Agriculture, 25 (2): 22 - 25. (in Chinese)
- 李新亮, 张冀芳, 贾 娇, 谭文博, 谷建田. 2010. 蚕丝蛋白溶液处理后生菜幼苗在高温胁迫下的生理生化变化. 北京农学院学报, 25 (2): 22 - 25.
- Miernyk J A, Duck N B, Shatters R G, Folk W R. 1992. The 70 kilodalton heat shock cognate can act as a molecular chaperone during the membrane translocation of a plant secretory protein precursor. Plant Cell, 4: 821 - 829.
- Morimoto R I, Kline M P, Bimston D N, Cotto J J. 1997. The heat shock response: Regulation and function of heat shock proteins and molecular chaperones. Essays in Biochemistry, 32: 17 - 29.
- Montero-Barrientos M, Hermosa R, Nicola's C, Cardoza R, Gutierrez S, Monte E. 2008. Overexpression of a *Trichoderma Hsp70* gene increases fungal resistance to heat and other abiotic stresses. Fungal Genetics and Biology, 45 (11): 1506 - 1513.
- Munro S, Phelham H R. 1986. An Hsp70-like protein in the ER: Identity with the 78 kD glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. Cell, 46 (2): 291 - 300.
- Mycko M P, Cwiklinska H, Walczak A, Libert C, Raine C S, Selmaj K W. 2008. A heat shock protein gene (*Hsp70.1*) is critically involved in the generation of the immune response to myelin antigen. European Journal of Immunology, 38: 1999 - 2013.
- Reynolds T, Thompson P A. 1971. Characterisation of the high temperature inhibition of germination of lettuce (*Lactuca sativa* L.). Physiologia Plantarum, 24 (3): 544 - 547.
- Sanchez Y, Lindquist S L. 1990. *Hsp104* required for induced thermotolerance. Science, 248 (4959): 1112 - 1115.
- Shi Ji-sen, Wang Zhan-jun, Chen Jin-hui. 2012. Progress on whole genome sequencing in woody plants. Hereditas, 34 (2): 145 - 156. (in Chinese)
- 施季森, 王占军, 陈金慧. 2012. 木本植物全基因组测序研究进展. 遗传, 34 (2): 145 - 156.
- Sun Y, MacRae T H. 2005. The Small heat shock proteins and their role in human disease. FEBS Journal, 272 (11): 2613 - 2627.
- Tanaka K I, Namba T, Arai Y, Fujimoto M, Adachi H, Sobue G, Takeuchi K, Nakai A, Mizushima T. 2007. Genetic evidence for a protective role for heat shock factor 1 and heat shock protein 70 against colitis. Biological Chemistry, 282: 23240 - 23252.
- Thompson P A, Cox Stephanie A, Sanderson R H. 1979. Characterization of the germination responses to temperature of lettuce (*Lactuca sativa* L.) achenes. Annals of Botany, 43 (3): 319 - 334.
- Zheng Jia-qiu, Hou Xi-lin, Chen Xiao-feng. 2008. Cloning and expression analysis of *Hsp* gene from *Brassica campestris* ssp. *chinensis*. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 28 (10): 1935 - 1940. (in Chinese)
- 郑佳秋, 侯喜林, 陈晓峰. 2008. 不结球白菜热激蛋白基因克隆及表达. 西北植物学报, 28 (10): 1935 - 1940.