

• 生物技术与方法 •

木薯 *HSP21* 基因的电子克隆与生物信息学分析

杜尚广, 余波

南昌师范学院 生物系, 江西 南昌 330000

杜尚广, 余波. 木薯 *HSP21* 基因的电子克隆与生物信息学分析. 生物工程学报, 2020, 36(7): 1422–1430.

Du SG, Yu B. *In silico* cloning and bioinformatics analysis of *HSP21* in *Manihot esculenta*. Chin J Biotech, 2020, 36(7): 1422–1430.

摘要: *HSP21* 是植物响应高温胁迫的关键基因, 在防止蛋白变性、保护细胞结构和维持植物正常生长发育等方面发挥重要作用, 克隆 *HSP21* 基因是揭示木薯抵抗高温胁迫分子机制的基础。为得到木薯 *HSP21* 同源基因及分析其表达蛋白的性质, 文中采用电子克隆技术对新基因进行组装和衍生, 并使用生物信息学分析方法, 对预测蛋白的一级至高级结构、亲水性/疏水性、信号肽、蛋白同源性和系统进化等进行全面解析。结果表明, *HSP21* 基因含有 969 个碱基对, 其开放阅读框有 705 个碱基, 预测蛋白含 234 个氨基酸。预测蛋白是非跨膜蛋白, 具有碱性和亲水性, 主要定位于叶绿体内。通过多重序列比对和系统进化分析发现, 木薯与巴西橡胶树、蓖麻和麻疯树等植物的 *HSP21* 蛋白同源性较高。结果可为该基因的克隆和转化提供参考依据。

关键词: 木薯, *HSP21* 基因, 电子克隆, 生物信息学

In silico cloning and bioinformatics analysis of *HSP21* in *Manihot esculenta*

Shanguang Du, and Bo Yu

Department of Biology, Nanchang Normal University, Nanchang 330000, Jiangxi, China

Abstract: *HSP21* gene is a key gene to respond high temperature stress in plant and plays an important role in preventing protein denaturation, protecting cell structure and maintaining normal growth and development. Therefore, cloning *HSP21* gene is the basis for revealing the molecular mechanism of resistance to high temperature stress in cassava. To obtain cassava *HSP21* homologous gene and analyze the properties of predicted protein, electronic cloning technology was used to assemble and derivate new gene in this study, and bioinformatics analysis method was used to analyze the primary to highest structure, hydrophilicity/hydrophobicity, signal peptide, protein homology and phylogenetic evolution of expressed protein. *HSP21* gene was 969 bp, its open reading frame was 705 bp, and the predicted protein contains 234 amino acids. The predicted protein is a

Received: November 12, 2019; **Accepted:** January 9, 2020

Supported by: Key Project of Science and Technology Research of Jiangxi Provincial Department of Education (No. GJJ181070), Key Research and Development Program of Science and Technology Plan of Jiangxi Province (No. 20192BBFL60008), Science and Technology Innovation Team Project of Nanchang Normal University (No. NSTD20143005).

Corresponding authors: Bo Yu. Tel: +86-791-83817248; E-mail: yuboju@163.com

Shanguang Du. Tel: +86-791-83817248; E-mail: duguangss@foxmail.com

江西省教育厅科学技术研究重点项目 (No. GJJ181070), 江西省科技计划项目重点研发计划 (No. 20192BBFL60008), 南昌师范学院科技创新团队项目 (No. NSTD20143005) 资助。

non-transmembrane protein that is alkaline and hydrophilic, and is mainly localized in the chloroplast. Through multiple sequence alignment and phylogenetic analysis, it was found that the cassava HSP21 protein has high homology with other plants such as *Hevea brasiliensis*, *Ricinus communis*, and *Jatropha curcas*. The results could provide reference for the study of cloning and transformation of this gene.

Keywords: Cassava, HSP21, *in silico* cloning, bioinformatics

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz), 又称树薯, 与甘薯、马铃薯并称为全球三大薯类, 它是国内外广泛种植的大戟科木薯属粮食作物, 也是一种价值很高的工业材料和养殖饲料, 被誉为“淀粉之王”、“地下粮仓”^[1]。木薯具有耐贫瘠^[2]、耐干旱^[3]、喜高温^[4]的特点, 单位面积产量较高, 是一种适应性很强的作物。目前木薯研究主要集中在种质抗寒、农艺性状等方面, 对抗高温分子机制的研究较少^[5]。

小热休克蛋白 (Small heat shock proteins, sHSPs) 基因广泛存在于植物中, 它是热激蛋白基因家族中一类重要的热应激基因, 高温胁迫会激发该基因的表达^[6-7]。sHSPs 能有效抑制蛋白质变性、保持细胞膜、细胞骨架稳定及诱导抵抗高温胁迫相关基因的表达, 所以它在维持植物正常生命活动中发挥重要作用^[8-11]。高温环境下, sHSPs 能够有效调节植物细胞膜的流动性, 并与构象改变的蛋白质结合, 等温度恢复正常时, 蛋白质与之分离并恢复正常的构象; 并且 sHSPs 能防止细胞发生非正常凋亡, 有效减少高温对植物的伤害^[12-14]。

HSP21 热激蛋白是一类重要的 sHSP 蛋白, 是一种进化上比较保守的蛋白质, 它广泛分布于植物的各个部位^[15]。对拟南芥、水稻和烟草等模式植物研究发现, HSP21 热激蛋白不仅在高温中抵抗热胁迫, 也在其他胁迫时保护细胞, 并在植物生长发育中发挥重要作用^[16-17]。近年来, sHSP 基因的功能在模式植物中得到广泛的研究, 而木薯 sHSP 基因的功能还存在许多盲区, 甚至 HSP21 基因尚未被克隆^[16-17]。木薯是广泛种植于热带和亚热带的耐热性作物, 克隆 HSP21 基因可为其表达载体构建、遗传转化以及热胁迫下光合保护机

制的研究奠定基础。传统的基因克隆技术主要包含简并序列克隆技术、定位克隆技术和转座子标签克隆技术等, 这些方法虽能较好地完成基因克隆的目的, 但实验步骤繁琐、试剂用量大且时间太长, 并耗费大量人力和物力^[18-19]。基因电子克隆技术是利用现有数据库对目标基因的表达序列标签 (EST 序列) 进行采集、组装和衍生, 得到所需要的 cDNA 序列, 该技术不仅能准确、快速地得到新基因, 而且节省大量的人力物力。

本研究使用电子克隆技术, 利用拟南芥 HSP21 基因的核苷酸序列, 得到木薯相应的 EST 序列, 利用序列组装软件进行拼结、衍生, 得到木薯 HSP21 基因的 cDNA 序列, 并利用生物信息学方法预测其表达蛋白的性质。这为该基因的克隆、表达载体构建、遗传转化以及热胁迫分子机制的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 木薯 HSP21 基因的电子克隆

以拟南芥 HSP21 的基因序列 (Gene ID: 828881) 为探针, 在木薯的 EST 库中通过 blastn 搜寻同源的 EST 序列, 选择能够覆盖探针核苷酸序列的 EST 序列, 利用 CAP3 在线软件 (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>) 对序列进行组装和衍生, 得到的 cDNA 继续对比, 直至无新的 EST 序列可组装。

1.2 木薯 HSP21 基因的序列分析

分别利用 DNAMAN、ORFfinder 完成氨基酸序列的翻译和开放阅读框的寻找; 分别利用在线软件 (<https://web.expasy.org/protparam/> 和 <https://web.expasy.org/protscale/>) 分析表达蛋白的基本理化指

数、亲水性/疏水性^[1-3]；分别利用在线软件 ProtComp v9.0 和 TMHMM 工具分析该蛋白亚细胞定位和跨膜区域；利用 NetPhos 3.0 和 SignalP 4.1 在线软件分析磷酸化位点与信号肽；使用 SOPMA 和 SWISS-MODEL 在线软件分析二级及高级结构。

1.3 系统进化树构建

利用 ClustalX 2.0 对木薯、巴西橡胶树、蓖麻、麻疯树等 12 种不同物种的 HSP21 氨基酸序列进行多重比对^[1-3]，参数默认，保存 aln 文件；然后在 MEGA X 软件中打开该 aln 文件，建立 HSP21 同源蛋白的系统进化树，以 Kimura 双参数模型计算遗传距离，设置检验方法 (Bootstrap method)，循环次数为 1 000。

2 结果与分析

2.1 木薯 HSP21 基因 cDNA 克隆

利用拟南芥 HSP21 核苷酸序列，在 NCBI 数据库中进行木薯 EST 序列的 blastn，得到 4 条相关的 EST 序列，并具有重叠群特点，使用 CAP3 在线软件拼装和衍生，获得一段总长为 969 个碱基的 cDNA 序列 (图 1)。使用 ORFfinder 软件分析可知，此 cDNA 的 ORF 框为 112-816 碱基 (图 2)，起始和终止密码子分别是 ATG 和 TGA，表达蛋白含有 234 个氨基酸。Blastx 分析表明，该序列与巴西橡胶树、蓖麻的 HSP21 蛋白具有较高的亲缘关系^[19-21]，序列一致性分别为 83% 和 73%，且能比对到同源蛋白的首尾两端，即该 cDNA 序列是完整的，命名基因为 *MeHSP21*，表达蛋白为 MeHSP21。

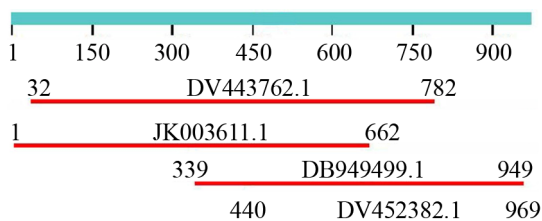


图 1 木薯 HSP21 基因的 cDNA 拼接图

Fig. 1 Assembled cDNA drawing of cassava HSP21 gene.

2.2 MeHSP21 基因表达蛋白理化性质分析

使用 ProtParam tool 分析 cDNA 表达蛋白的理化参数，该蛋白质分子式、分子量和理论等电点分别为 $C_{1134}H_{1847}N_{327}O_{359}S_{10}$ 、26.10 kDa 和 7.71，是碱性蛋白质；脂肪系数、负电荷残基 (天冬氨酸+谷氨酸) 和正电荷残基 (精氨酸+赖氨酸) 分别是 74.91、35.00 和 36.00；不稳定系数和平均总亲水性分别是 36.01 和 -0.584，属于稳定亲水蛋白 (表 1)。预测蛋白含有 20 种氨基酸，含量最多的是丝氨酸 (Ser)，最少的是组氨酸 (His) 和酪氨酸 (Tyr)。

2.3 MeHSP21 基因表达蛋白疏水性/亲水性分析

对木薯 MeHSP21 蛋白的一级结构进行 ProtScale 分析，该多肽链的第 216 位 Phe 和第 174 位的 Lys 分别具有最高分值 (1.500) 和最低分 (-2.867)，即前者疏水性最强，后者亲水性最强 (图 3)。利用 ProtParam 分析可知，氨基酸序列平均疏水指数为 -0.584，即该蛋白为亲水性蛋白。

2.4 亚细胞定位和跨膜区分析

使用 ProtComp v.9.0 在线软件分析目标蛋白亚细胞定位 (表 2)，在叶绿体中此蛋白质具有最大分数 (9.27)；即表达蛋白可能是主要定位于叶绿体内的功能蛋白。利用 TMHMM v.2.0 在线分析 (图 4)，此蛋白质没有明显的跨膜区，为非生物膜上的功能蛋白。

2.5 磷酸化位点与信号肽分析

蛋白质磷酸化是成熟后修饰的重要方式，磷酸化修饰和表达蛋白的功能成正相关^[22-24]。利用 NetPhos 3.0 服务在线分析 (图 5)，此蛋白含有的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸磷酸化位点数目分别是 19、8、0。利用 SignalP 4.1 信号肽分析，第 17 位的赖氨酸残基拥有最高原始剪切位点分值 (C-score) 和最高综合剪切位点分值 (Y-score)，分别为 0.132 和 0.147，且多肽链首位蛋氨酸残基的最高信号肽分值 (S-score) 为 0.181 (图 6)。所有分值均低于平均分 0.5，即该蛋白是无信号肽结构的非分泌蛋白。

```

1  GACCATCAATCATCTGTGTCAGCAAATCAAGAAAGTCCTCAACATCTCTGCACACTCGCAC
61  AAAAAAAAAAAGTTTCATTCTTTCTGCTACTACACAATTTTATAGGGGGCTATGGCTTCT
                                         M A S
121  ACAACTCTGTCTTGGTCAGCTGCTCCTTTGGTGTGCAAGAAACCCATTAACACTTCAACG
    T T L S W S A A P L V S K K P I N T S T
181  AAAGGAACCATTCCTTGCTCATTGAGCTCCACACAGAGAGGTTCCAACCTGTTTCGACCT
    K G T I P C S L S F P Q R G S N S V R P
241  TCACGGCTGTCTTTTGTGAGAGCTCAGGCAGCAGGAGATAACAAGGACACATCCGIGGAT
    S R L S F V R A Q A A G D N K D T S V D
301  GTGCAAGTCAATCCTCAGGGTAGCCAAGGCACAGCAGTTGAAAAAAGACCTAGGAGGCAG
    V Q V N P Q G S Q G T A V E K R P R R Q
361  CTGGCCGTTGATGTCTCACCTTTTCGGTTTGGTGGATCCATTGTCTCCGATGAGGACAATG
    L A V D V S P F G L L D P L S P M R T M
421  CGTCAAATGATGGACACAATGGACAGGATATTTGAGGATGCGATGACACTGCCTGGAAGC
    R Q M M D T M D R I F E D A M T L P G S
481  AGAAGCAGAACAGTAGGAGAAGTACGAGCACCATGGGACATCAAAGAAGATGAAAACGAG
    R S R T V G E V R A P W D I K E D E N E
541  TTCAAGCTGAGGTTTCGACATGCCAGGACTCTCAAAGGAGGACGTGAAGGTGTTTGTGGAG
    F K L R F D M P G L S K E D V K V F V E
601  GAAGATGTGCTTGTATTAAGGGTGAACATAAAAAACGAAGAAGGTGGAGAGGATTCATGG
    E D V L V I K G E H K N E E G G E D S W
661  GCTAGCAGAAGTCTCAGTTCTTACGATACACGTCTTAAACTCCCAGATAACTGCGAGAAA
    A S R S L S S Y D T R L K L P D N C E K
721  GATAGAATCAAGGCGGAGTTGAAGAATGGAGTCTGTTCATTCCATTCTAAAACCAA
    D R I K A E L K N G V L F I S I P K T K
781  GTGGAACGCAAGGTGATTGATGTAGAAATCCAGTGAAGGATTGATGCAGATGATCGAAGA
    V E R K V I D V E I Q *
841  TGCTTAACTATATAGATGAGTGTCTTTGGCTTTCAGAGTGTGGAGTTGTTGCTATGTGT
901  ATAAAACGATGCGTTTGGAAATATGTATAATTAATCAGAAATAACATCAAAAAAAAAAAAA
961  AAAAAATGC

```

图 2 木薯 *HSP21* 基因的 cDNA 及预测蛋白序列分析

Fig. 2 The sequence analysis of cDNA and predicted protein of *HSP21* gene in cassava.

表 1 表达蛋白理化性质预测

Table 1 Physicochemical properties prediction of expressed protein

Items	Results
Molecular formula	C ₁₁₃₄ H ₁₈₄₇ N ₃₂₇ O ₃₅₉ S ₁₀
Molecular weight	26.10 kDa
Theoretical pI	7.71
Total number of negatively charged residues (Asp+Glu)	35.00
Total number of positively charged residues (Arg+Lys)	36.00
Instability index	36.01
Aliphatic index	74.91
Grand average of hydropathicity	-0.584

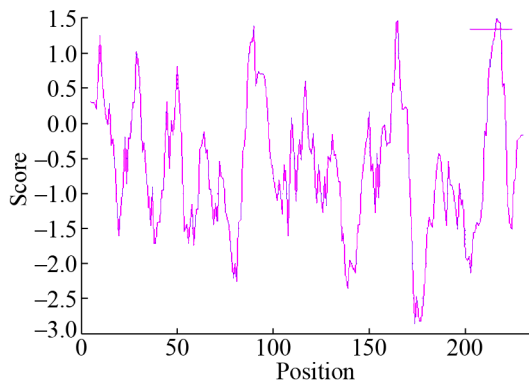


图3 木薯 HSP21 蛋白疏水性/亲水性预测
Fig. 3 Predicted hydrophilicity/hydrophobicity of HSP21 protein in cassava.

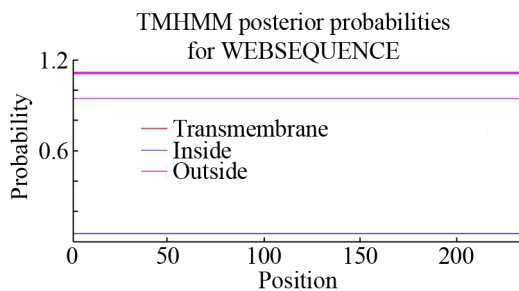


图4 木薯 HSP21 蛋白跨膜区域预测
Fig. 4 Predicted transmembrane region of HSP21 protein in cassava.

表2 木薯 HSP21 蛋白亚细胞定位分析
Table 2 Analysis of subcellular localization of HSP21 protein in cassava

Location	LocDB	PotLocDB	Neural nets	Pentamers	Integral
Nuclear	-	-	-	-	-
Plasma membrane	-	-	0.96	-	0.10
Extracellular	-	-	0.99	0.28	0.52
Cytoplasmic	-	-	-	-	-
Mitochondrial	-	-	-	1.05	0.05
Endoplasmic reticulum	-	-	-	0.02	-
Peroxisomal	-	-	0.96	-	0.05
Golgi apparatus	-	-	0.11	0.20	0.01
Chloroplast	10.00	3.00	-	3.96	9.27
Vacuolar	-	-	-	0.08	-

Note: "-" represents a value of "0.00".

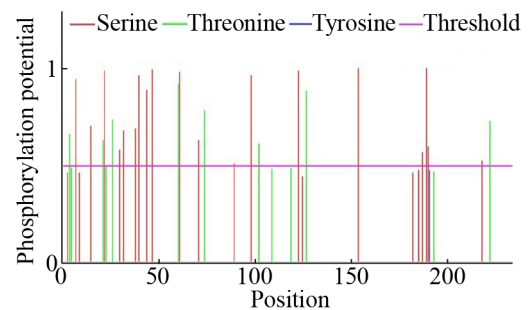


图5 木薯 HSP21 蛋白磷酸化位点分析
Fig. 5 Analysis of phosphorylation sites of HSP21 protein in cassava.

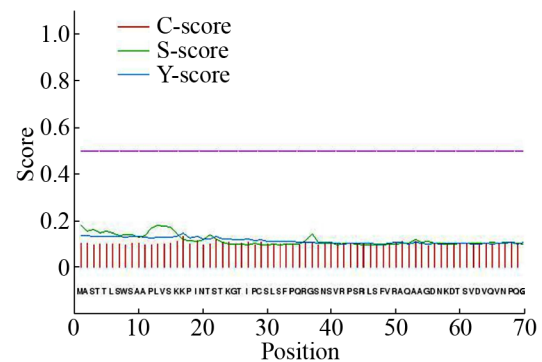


图6 木薯 HSP21 蛋白信号肽分析
Fig. 6 Analysis of signal peptide of HSP21 protein in cassava.

2.6 高级结构的预测

使用SOPMA分析MeHSP21蛋白的二级结构可知,多肽链中含有3种氨基酸序列,分别是16.24%的 α 螺旋、17.52%的延伸链和66.24%的无规则卷曲序列(图7)。选取“5nms.pdb”模板,利用SWISS-MODEL预测该蛋白三级结构,序列一致性和覆盖度分别是77.86%、60%,空间结构主要由 α 螺旋、 β 折叠和无规则卷曲构成;利用VMD 1.9.3软件绘制其三维结构,见图8。

2.7 氨基酸同源性分析及进化树构建

利用NCBI数据库对木薯MeHSP21的氨基酸序列比对发现,木薯与巴西橡胶树 *Hevea brasiliensis* (XP_021679758.1)、哥伦比亚锦葵 *Herrania umbratica* (XP_021290181.1)、蓖麻 *Ricinus*

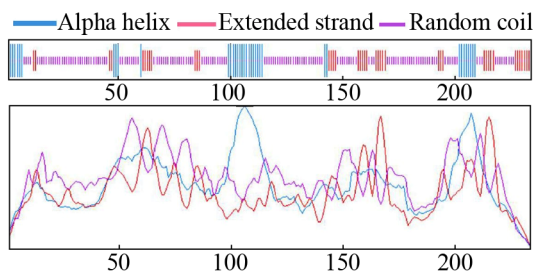


图 7 木薯 HSP21 蛋白的二级结构分析

Fig. 7 Analysis of the secondary structure of HSP21 protein in cassava.

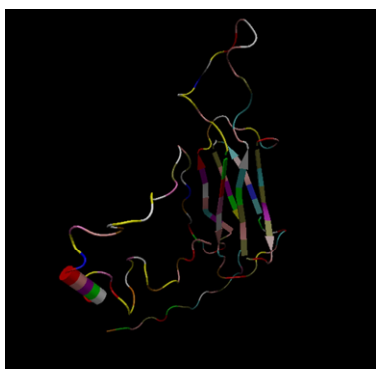


图 8 木薯 HSP21 蛋白的三级结构分析

Fig. 8 Tertiary structure analysis of HSP21 protein in cassava.

communis (XP_002532054.1)、可可 *Theobroma cacao* (EOY23687.1)、长蒴黄 *Corchorus olitorius* (OMO97779.1)、麻疯树 *Jatropha curcas* (XP_012071995.1)、圆果黄麻 *Corchorus capsularis* (OMO95089.1) 等植物的 HSP21 同源蛋白序列一

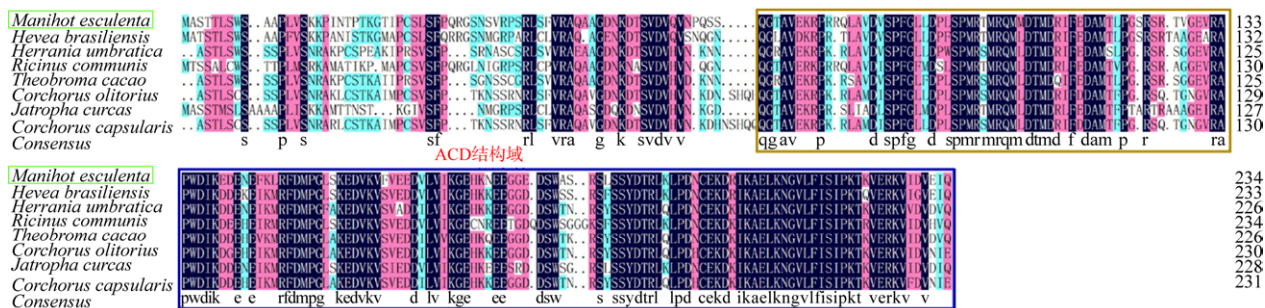


图 9 木薯与其他植物的 HSP21 氨基酸序列多重比对

Fig. 9 Multiple alignment of HSP21 amino acid sequences of cassava and other plants.

致性分别为 83%、74%、73%、74%、73%、74%、72%。利用 DNAMAN 对 HSP21 的氨基酸序列多重比对 (图 9), 以上 8 种植物的 HSP21 蛋白具有一定的相似性, 观察发现, HSP21 的 72–234 氨基酸序列具有很高的相似性, 其中 136–234 氨基酸序列 (ACD 结构域, α -crystallin domain) 高度相似。

利用 ClustalX 2.0 和 MEGA X 对 HSP21 蛋白的氨基酸序列进行系统发育分析 (图 10)^[1-3], 木薯与巴西橡胶树 *H. brasiliensis*、蓖麻 *R. communis*、麻疯树 *J. curcas* 处于同一分支, 这 4 种植物同属于大戟科, 具有很高的同源性; 而櫻桃李、草莓等蔷薇科植物的 HSP21 同源蛋白亦聚在另一分支, 这与它们在植物进化系统所在位置完全吻合^[25-27]。

3 讨论

木薯是我国南方地区广泛种植的薯类作物, 以其地下块茎含有丰富的淀粉而成为一种世界性的粮食作物^[28], 并且, 它又是重要的工业原料和动物饲料^[29], 因此具有重要的经济价值^[30]。利用基因克隆技术改良木薯品种是开发其种质资源的基础, 随着万种植物基因组计划的开展和深度测序水平的不断提高, 越来越多的植物基因组被测序。电子克隆技术因具有快速、准确和成本低的优点在基因功能研究中发挥重要的作用。

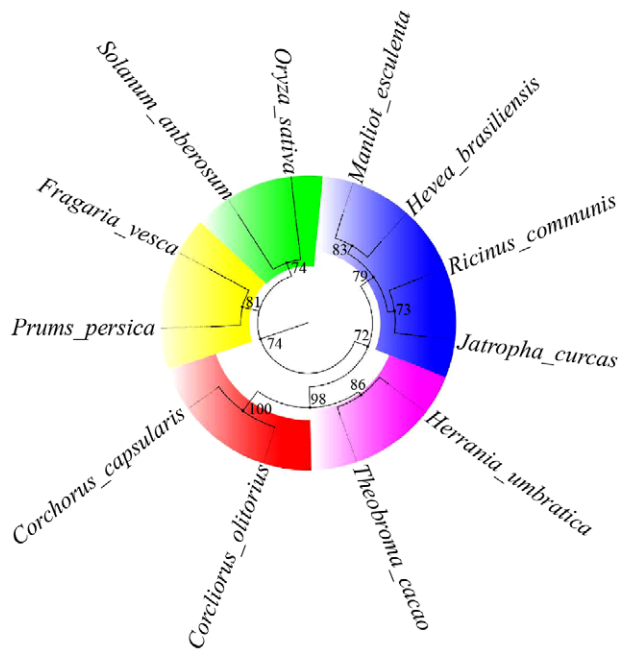


图 10 不同植物中 HSP21 同源蛋白的系统进化树
Fig. 10 Phylogenetic tree of HSP21 in different plants.

科学家现已完成了木薯野生祖先种和栽培种的全基因组测序，并克隆出 K^+ 通道蛋白 AKT1、钙调蛋白转录因子 CAMTA、金属硫蛋白 MT 和乙烯信号转导蛋白 EIL 等蛋白质的相关基因，阐释了木薯离子吸收、生长发育调控、活性氧耐受及免疫应答等机理，但对热胁迫抵抗的分子机制知之甚少^[31-32]。在 30 °C 的高温下，植物叶绿体结构受损严重、类囊体膜功能异常、光系统 I 和 II 活力大幅降低，光合作用遭受严重抑制^[33-34]，HSP21 蛋白是定位于木薯叶绿体内的功能蛋白，在热胁迫中起到防止蛋白变性、稳定叶绿体结构和维持细胞光合作用正常进行的作用^[7,12]。因此，克隆该基因对揭示热胁迫下光合功能保护的分子机制具有十分积极的意义。

研究表明，HSP21 亲水蛋白存在于叶绿体内，是叶绿体发育必需的功能蛋白^[12]，本研究结果与之吻合（图 3、4、6）。在不同植物中，HSP21 氨基酸序列虽有一定的变异性，但有些结构特征是保守的^[35-36]。对拟南芥、水稻和烟草等研究发现，HSP21 蛋白的 N 端是由长度可变的氨基酸序列组成

（平均长度 55 个氨基酸），C 端的 ACD 结构域由 6–8 个反向平行的 β 折叠构成（约 90 个氨基酸）^[37-39]。本研究发现，木薯 C 端 ACD 结构域含有 98 个氨基酸，由 6 个 β 折叠构成（图 8–9），这和以往报道吻合^[37-39]。和其他植物相比，木薯 HSP21 蛋白 N 端的序列一致性较小（含有 50 个氨基酸），N 端区域能够调节 HSP21 与变性蛋白的结合^[39]，可能在木薯抵抗高温胁迫中发挥重要作用。

本文利用拟南芥 HSP21 基因序列，得到木薯的相应 EST 序列，利用软件进行拼结、衍生，得到木薯 MeHSP21 基因的 cDNA 序列，并利用生物信息学方法预测表达蛋白的性质。该蛋白是含有 234 个氨基酸、具有碱性和亲水性的非跨膜蛋白，主要在叶绿体内发挥作用。通过氨基酸序列比对发现，木薯 MeHSP21 蛋白与巴西橡胶树、蓖麻和麻疯树等植物的 HSP21 蛋白同源性较高。本研究为该基因的克隆、表达载体的构建和遗传转化提供参考。

REFERENCES

- [1] Wang YQ, Zhang F, Li RM, et al. Cloning and expression of *MeAnn1* gene from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Mol Plant Breed*, 2015, 13(11): 2477–2483 (in Chinese).
王雨晴, 张帆, 李瑞梅, 等. 木薯 *MeAnn1* 基因的克隆及表达分析. *分子植物育种*, 2015, 13(11): 2477–2483.
- [2] Ma WH, Li XY, Shen JS, et al. Transcriptomic analysis reveals *Apis mellifera* adaptations to high temperature and high humidity. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 184: 109599.
- [3] Li JH, Sun HY, Ruan MB, et al. Cloning and sequence analysis of low temperature inducible gene *MeLTI6A* promoter from *Manihot esculenta*. *Chin J Trop Crops*, 2013, 34(11): 2164–2171 (in Chinese).
黎娟华, 孙海彦, 阮孟斌, 等. 木薯低温诱导基因 *MeLTI6A* 的启动子的克隆与序列分析. *热带作物学报*, 2013, 34(11): 2164–2171.
- [4] Liao WB, Peng M. Gene cloning of DELLA protein

- from cassava and its expression patterns under drought stress. *J Trop Organ*, 2012, 3(4): 298–304 (in Chinese).
- 廖文彬, 彭明. 木薯赤霉素途径 DELLA 蛋白基因克隆及其对于干旱胁迫的响应. *热带生物学报*, 2012, 3(4): 298–304.
- [5] Xiang XH, Wu XR, Chao JT, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the *WRKY* gene family in common tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Hereditas* (Beijing), 2016, 38(9): 840–857 (in Chinese).
- 向小华, 吴新儒, 晁江涛, 等. 普通烟草 *WRKY* 基因家族的鉴定及表达分析. *遗传*, 2016, 38(9): 840–857.
- [6] Frezzato F, Raggi F, Martini V, et al. *HSP70/HSF1* axis, regulated via a PI3K/AKT pathway, is a druggable target in chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer*, 2019, 145(11): 3089–3100.
- [7] Pareek A, Rathi D, Mishra D, et al. Physiological plasticity to high temperature stress in chickpea: adaptive responses and variable tolerance. *Plant Sci*, 2019, 289: 110258.
- [8] Ren HY, Luo MX, Chen JZ, et al. Identification of TPD52 and DNAJB1 as two novel bile biomarkers for cholangiocarcinoma by iTRAQ-based quantitative proteomics analysis. *Oncol Rep*, 2019, 42(6): 2622–2634.
- [9] Sayed S, Faruq O, Hossain M, et al. Thermal cycling effect on osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells loaded on 3D-porous Biphasic Calcium Phosphate (BCP) scaffolds for early osteogenesis. *Mater Sci Eng C*, 2019, 105: 110027.
- [10] Shanmugasundaram R, Wick M, Lilburn MS. Effect of a post-hatch lipopolysaccharide challenge in Turkey poults and ducklings after a primary embryonic heat stress. *Dev Comparat Immunol*, 2019, 101: 103436.
- [11] Trivedi J, Parveen A, Rozy F, et al. Discovery of 2-isoxazol-3-yl-acetamide analogues as heat shock protein 90 (HSP90) inhibitors with significant anti-HIV activity. *Eur J Med Chem*, 2019, 183(11): 111699.
- [12] Wang QY, Buchanan RL, Tikekar RV. Evaluation of adaptive response in *E. coli* O157:H7 to UV light and gallic acid based antimicrobial treatments. *Food Control*, 2019, 106: 106723.
- [13] Yeh CH, Sun LW, Lai CM, et al. Effect of ethanol extracts of *Hericium erinaceus mycelium* on morphine-induced microglial migration. *Mol Med Rep*, 2019, 20(6): 5279–5285.
- [14] Yuan JL, Guo JL, Wang HY, et al. Acute toxicity of cypermethrin on the juvenile of red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Chemosphere*, 2019, 237: 124468.
- [15] Kasim WA, Nessem AA, Gaber A. Effect of seed priming with aqueous extracts of carrot roots, garlic cloves or ascorbic acid on the yield of *Vicia faba* grown under drought stress. *Pak J Bot*, 2019, 51(6): 1979–1985.
- [16] Sun X, Yin YH, Kong LC, et al. The effect of propofol on hypoxia-modulated expression of heat shock proteins: potential mechanism in modulating blood-brain barrier permeability. *Mol Cell Biochem*, 2019, 462(2): 85–96.
- [17] Habashy WS, Milfort MC, Rekaya R, et al. Cellular antioxidant enzyme activity and biomarkers for oxidative stress are affected by heat stress. *Int J Biometeorol*, 2019, 63(12): 1569–1584.
- [18] Pignataro L. Alcohol protects the CNS by activating HSF1 and inducing the heat shock proteins. *Neurosci Lett*, 2019, 713: 134507.
- [19] Dos Reis SP, De Souza Conceição Tavares L, De Nazaré Monteiro Costa C, et al. Molecular cloning and characterization of a novel RING zinc-finger protein gene up-regulated under *in vitro* salt stress in cassava. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(6): 6513–6519.
- [20] Duraisamy R, Natesan S, Muthurajan R, et al. Molecular studies on the transmission of indian cassava mosaic virus (ICMV) and sri lankan cassava mosaic virus (SLCMV) in cassava by *Bemisia tabaci* and cloning of ICMV and SLCMV replicase gene from cassava. *Mol Biotechnol*, 53(2): 150–158.
- [21] Guo DH, Tian HM, Xu YS, et al. Cloning and expression of β -glucosidase from cassava in *Pichia pastoris* GS115. *Advances in Applied Biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015: 11–20.
- [22] Abdalla NA, Ragab ME, El-Miniawy SEDM, et al. Callus induction, regeneration and molecular characterization of cassava (*Manihot esculenta*

- Crantz). *J Appl Sci Res*, 2013, 9(6): 3781–3790.
- [23] Duff-Farrier CRA, Mbanzibwa DR, Nanyiti S, et al. Strategies for the construction of cassava brown streak disease viral infectious clones. *Mol Biotechnol*, 2019, 61(2): 93–101.
- [24] Mohammed IU, Abarshi MM, Muli B, et al. The symptom and genetic diversity of cassava brown streak viruses infecting cassava in east africa. *Adv Virol*, 2012: 795697.
- [25] Mbewe W, Kumar PL, Changadeya W, et al. Diversity, distribution and effects on cassava cultivars of cassava brown streak viruses in malawi. *J Phytopathol*, 2015, 163(6): 433–443.
- [26] Lengbamroung P, Vichukit V, Visser RGF, et al. Cloning and molecular characterization of α - and β -amylase genes from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Kaset J Nat Sci*, 2005, 39(3): 446–454.
- [27] Nassar NMA, Dos Santos E, David SRO. The transference of apomixis genes from manihot neusana nassar to cassava, *M. esculenta* crantz. *Hereditas*, 2004, 132(2): 167–170.
- [28] Wei MM, Li WG, Gao XS, et al. The research progress and prospect of cold resistant breeding of tropical crops in China. *Chin J Trop Crops*, 2015, 36(4): 821–828 (in Chinese).
位明明, 李维国, 高新生, 等. 中国热带作物抗寒育种研究进展与展望. *热带作物学报*, 2015, 36(4): 821–828.
- [29] Wang HJ, Wang WQ, Li WB, et al. Research progress of cold resistance and cultivation practice for cassava moving northward. *Chin J Trop Crops*, 2016, 37(7): 1437–1443 (in Chinese).
王惠君, 王文泉, 李文彬, 等. 木薯的抗寒性及北移栽培技术研究进展综述. *热带作物学报*, 2016, 37(7): 1437–1443.
- [30] Zhong YH, Lu BY, Li KM. Research advances on the safety, nutrition and processing of cassava. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2019, 19(6): 284–292 (in Chinese).
钟永恒, 陆柏益, 李开绵. 木薯质量安全、营养品质与加工利用新进展. *中国食品学报*, 2019, 19(6): 284–292.
- [31] Elias AA, Rabbi I, Kulakow P, et al. Improving genomic prediction in cassava field experiments by accounting for interplot competition. *G3*, 2018, 8(3): 933–944.
- [32] Ding ZH, Fu LL, Tie WW, et al. Clone and expression characteristics of *MeTPS9* gene in cassava. *Biotechnol Bull*, 2017, 33(11): 84–91 (in Chinese).
丁泽红, 付莉莉, 铁韦韦, 等. 木薯 *MeTPS9* 基因克隆及表达特性分析. *生物技术通报*, 2017, 33(11): 84–91.
- [33] Ali AH, Abdelrahman M, Radwan U, et al. Effect of *Thermomyces* fungal endophyte isolated from extreme hot desert-adapted plant on heat stress tolerance of cucumber. *Appl Soil Ecol*, 2018, 124: 155–162.
- [34] Chidambaranathan P, Kumar PT, Satheesh V, et al. Genome-wide analysis identifies chickpea (*Cicer arietinum*) heat stress transcription factors (*Hsfs*) responsive to heat stress at the pod development stage. *J Plant Res*, 2018, 131(3): 525–542.
- [35] Poulain P, Gelly JC, Flatters D. Detection and architecture of small heat shock protein monomers. *Plos One*, 2010, 5(4): e9990.
- [36] Kriehuber T, Rattei T, Weinmaier T, et al. Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins. *FASEB J*, 2010, 24(10): 3633–3642.
- [37] Mahmood T, Safdar W, Abbasi BH, et al. An overview on the small heat shock proteins. *Afr J Biotechnol*, 2010, 9(7): 927–949.
- [38] Mcdonald ET, Bortolus M, Koteiche HA, et al. Sequence, structure, and dynamic determinants of Hsp27 (HspB1) equilibrium dissociation are encoded by the N-terminal domain. *Biochemistry*, 2012, 51(6): 1257–1268.
- [39] Jaya N, Garcia V, Vierling E. Substrate binding site flexibility of the small heat shock protein molecular chaperones. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(37): 15604–15609.

(本文责编 陈宏宇)