

荧光定量 PCR 方法分析皱纹盘鲍 HSP70 在温度胁迫下的表达

程培周^{1,2}, 刘 晓¹, 张国范¹, 高其康³

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049; 3. 浙江大学 分析测试中心, 浙江 杭州 310029)

摘要:根据皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai* Ino) HSP70 和 Actin mRNA 序列, 设计合成引物, 建立了皱纹盘鲍 HSP70 的荧光定量 PCR 技术平台, 并用于检测皱纹盘鲍在热激处理后不同恢复时间 HSP70 的转录水平变化。结果表明在热诱导后, 肌肉组织 HSP70 的表达呈时间依赖性, 存在先升高后降低的趋势, 在热诱导后 2 h, 肌肉 HSP70 基因的表达量明显升高, 是对照组 (0 h) 的 15 倍, 随后 HSP70 的表达量继续升高, 在诱导后 12 h 达到最高值, 是对照组的 21 倍。然后表达量开始回落, 至热诱导后 96 h, HSP70 表达量降至初始值, 表现出一种瞬时表达的趋势。

关键词:皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai* Ino); 热激蛋白 70; 荧光定量 PCR

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096 (2007) 10-0077-05

应激时机体组织细胞内热激蛋白 (heat shock protein, HSP) 的量会发生急剧变化以稳定改变了的细胞内环境, 维持细胞的生存。HSP 含量发生急剧变化的原因可能是应激时 HSP 基因转录水平的变化^[1]; 热激蛋白可能通过不同的调节方式由细胞核进入细胞质, 在细胞各组织中有选择地进行表达^[2]; 也可能是 HSP mRNA 的稳定性在应激时有所变化; 或者是在机体受到应激时, 热激蛋白的降解速度发生改变所致^[3]。HSP 的研究目前主要集中在功能和表达调控两个方面, 其中 HSPs 的表达调控研究主要在转录和翻译两个水平, 以前者为主。因此正确度量应激反应过程中 HSPs 含量的改变是许多学者所关注的重点问题之一, 建立有效的 HSPs mRNA 定量方法也是非常必要的。实时荧光定量 PCR (fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR) 技术是近几年开发成功的准确的基因定量方法, 与 Northern 印迹法、斑点印迹法相比, 具有准确、灵敏、简便等特点, 在微生物的检测、转基因食品的检测、基因表达研究等方面有重要的应用价值^[4]。SYBR Green 模式的荧光 PCR 是利用荧光染料 SYBR Green I 与 DNA 双链结合后释放荧光的特点而建立的一种应用较广的荧光 PCR 技术, 它具有成本低、不需设计探针, 且适合于高度变异的基因检测等优点。本试验利用 PCR 产物样品制作标准曲线, 以及利用 SYBR Green I 染料建立实时荧光定量 RT-PCR 技术平台, 对 HSP70 在温度胁迫下不同恢复时间的表达进行实时检测, 研究热激应激时 HSP mRNA 转录水平的变化, 以探讨应

激时 HSP 量变化的原因和机理。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai* Ino) 取自薛家岛养殖场, 平均壳长为 63 mm ± 4.5 mm, 在 16 ℃ 控温的沙滤海水暂养, 气泵充气保证供氧, 每天换水一次, 每天投喂海带, 暂养 7 d。将鲍从 16 ℃ 海水取出放入 30 ℃ 海水中保持 1 h。然后放回到 16 ℃ 海水中, 处理后在不同的时间 (0, 2, 12, 24, 72 和 96 h) 随机取 3 头鲍的肌肉组织于 -80 ℃ 保存。抽提 RNA。

Trizol 购自 Invitrogen 公司; M-MLV, RQ1 RNase-Free DNase 购自 Promega 公司; PCR 产物纯化试剂盒 (OMEGA, USA) 购自 OMEGA 公司; SYBR Green I 染料, 上海开放科技有限公产品; iCycler™ 荧光实时多波长 PCR 检测系统, 美国 Bio-Bid 公司产品。

收稿日期: 2006-05-18; 修回日期: 2006-06-20

基金项目: 国家 863 计划项目 (2003AA603023, 2004AA626070); 国家自然科学基金项目 (30371117)

作者简介: 程培周 (1977-), 男, 山东潍坊人, 博士, 助研, 研究方向为贝类遗传育种, E-mail: chenpeizhou@ms.qdio.ac.cn; 张国范, 通讯作者, 研究员, 博导, E-mail: gfzhang@ms.qdio.ac.cn

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取及纯化

RNA 用 Trizol Reagent (Invitrogen) 按照说明书提取。用 RQ1 RNase-Free DNase 消化去除总 RNA 样品中的 DNA, 加入 2~5 μL DNase buffer, 2~5 μL DNase; 在 37 °C 下温浴 30 min; 加入 2 μL Stop Buffer, 65 °C 10 min, 终止反应; 电泳, 紫外分光光度计测量 RNA 浓度及纯度。

1.2.2 引物设计

利用 primer premier5.0 引物设计软件根据皱纹盘鲍 HSP70 全长序列 (GenBank Accession no.: DQ324856) 设计特异性引物: HSP70 F: 5'-GAT GCC AAT GGT ATC CTC AAT G-3'; HSP70 F: 5'-TGA AGA TGA CAA GAA GAC CA-3'; HSP70 R: 5'-ACT TCT ACT GTT CTT CTG GT-3'; HSP70 F1 和 HSP70 R 扩增片段为 520 bp, 回收片段, 作为标准曲线用 DNA。HSP70 F 和 HSP70 R 预期扩增片段长度为 260 bp, 应用于 HSP70 的定量。持家基因 -actin 的引物是基于 GenBank (GenBank Accession No: A Y380809) 的序列设计: -actinF (5'-CCG ACG GTC AGG TCA TCA C-3'); -actinR (5'-CTC ATC GTA CTC CTG CTT G-3') 预期的 -actin 产物长度为 350 bp 左右。

1.2.3 Real Time PCR

PCR 反应体系为总体积 25 μL: Bio-Rad Super s YbR-Green mix 12.5 μL; 模板 2.0 μL; 正向引物 (5 μmol/L) 0.5 μL; 反向引物 (5 μmol/L) 0.5 μL; 超纯水 10 μL, 补足 25 μL。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s; 55 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 1 min;

40 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 根据标准曲线, 求出待测 cDNA 中目的基因 (模板) 的原始数量 (浓度) 对标准品的比值。归一化: 每份 cDNA 中目的基因量除以持家基因量。计算一个目的基因 (转录水平) 在不同 cDNA 样品中相差的倍数公式为

$$F_{olds} = \frac{C_1}{C_2} \div \frac{C_3}{C_4}$$

式中, C_1 : HSP70 基因处理样品的根据标准曲线将 C_t 值转化为模板的原始浓度; C_2 : 持家基因处理样品的根据标准曲线将 C_t 值转化模板原始浓度; C_3 : HSP70 基因对照样品的根据标准曲线将 C_t 值转化模板原始浓度; C_4 : 持家基因对照样品的根据标准曲线将 C_t 值转化模板原始浓度; C_t : 指产生可被检测到的荧光信号所需的最小循环数。

2 结果

2.1 标准曲线的建立

HSP70 F 和 HSP70 R 引物扩增片段为 520 bp, 回收片段, 作为标准曲线用 DNA。分光光度计分析回收 PCR 产物的质量浓度为 0.0385 g/L, $A_{260/280}$ 为 1.88, 适合作为标准品分析。实验结果显示, HSP70 标准品 DNA 在稀释 $10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8$ 倍后制作标准曲线, 从图 1 可知, 标准曲线回归方程为 $y = -3.483x + 36.636$, 斜率为 -3.536, 相关系数为 0.996 ($P < 0.01$), PCR 扩增效率为 93.78%, 其中 y 代表 C_t 值, x 代表模板量的对数值。结果表明标准曲线的斜率值接近理想值 -3.322, 一致系数也接近 1.000。

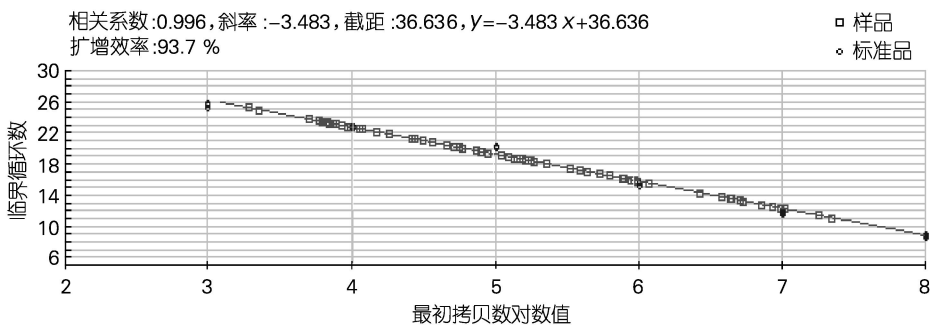


图 1 HSP70 标准曲线

Fig. 1 Standard curve for HSP70

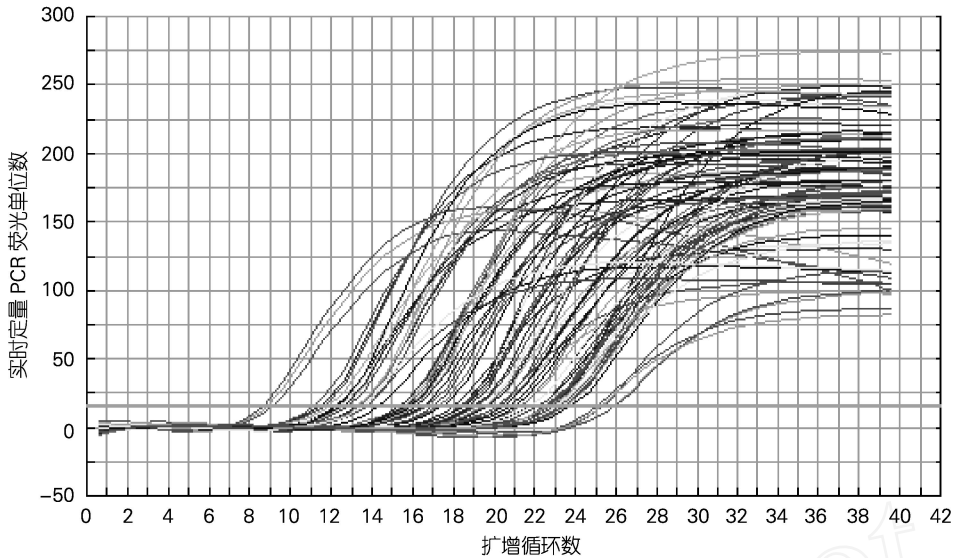


图2 HSP70 扩增曲线

Fig. 2 HSP70 Real-time amplification curve

2.2 热诱导后肌肉组织 HSP70 表达变化

如图 3 所示,分析结果表明:在热诱导后,肌肉组织 HSP70 表现出具有显著差异的时间依赖性。表现为先升高后降低的趋势,在肌肉热诱导后 2 h, HSP70 基因的表达量明显升高,是对照组(0 h)的 15 倍,随后 HSP70 的表达量继续升高,且在诱导后 12 h 达到最高值,是对照组的 21 倍。然后表达量开始回落,至热诱导后 96 h, HSP70 表达量基本降至初始值。表现出一种瞬时表达的趋势。

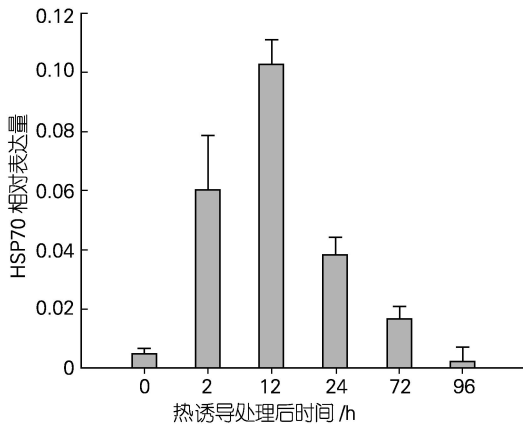


图3 Real-time PCR 检测热诱导后肌肉组织不同时间点的 HSP70 表达

Fig. 3 Real-time PCR analysis of HSP70 gene expression in response of heat shock

3 讨论

本试验建立了皱纹盘鲍的 HSP70 荧光定量的检测技术平台。SYBR Green I 是一种可与 dsDNA 双螺旋小沟区域结合的具有绿色激发波的染料。荧光定量 PCR 反应过程中,随着 PCR 产物的增加,PCR 产物与 SYBR Green I 结合的量增大,两者结合后形成的荧光信号可被仪器检测到,每个循环延伸结束后,在 80 °C 收集荧光 8 s,所得的荧光信号实时地反映了 PCR 过程中产物量的增加;熔解曲线分析可以对 PCR 产物的特异性进行鉴定;标准曲线制作采用了 PCR 产物回收法,结果表明该方法简单可行,未知样品通过与标准曲线比较即可得定性及定量的结果。由于试验选取的组织块具有一定程度的差异,抽提的 RNA 得率会出现偏差,各样品 RNA 反转录效率的差异都将会影响到最后的结果而产生误差。为了较充分地比较 HSP mRNA 转录水平的差异,笔者在试验中检测了每个样品的持家基因 Actin 的相对数量,用以把目的基因归一到相同细胞数进行比较,使细胞数目的差异(误差)尽可能降低。提取的所有 RNA 模板用 DNase I 进行了消化,消除在取 RNA 过程中带有的少量基因组 DNA 所带来的干扰。

Real-Time-PCR 检测到热诱导后皱纹盘鲍肌肉组织中 HSP70 在不同时间点的转录表达。在热诱导后,肌肉组织 HSP70 表达表现出具有显著差异的时间变化。在肌肉热诱导后 2 h, HSP70 基因的表达量明显升高,是对照组(0 h)的 15 倍,随后 HSP70 的表

达量继续升高,且在诱导后 24 h 达到最高值,是对照组的 21 倍。然后表达量开始回落,至热诱导后 96 h, HSP70 表达量基本降至初始值。

HSP70 是主要的胁迫诱导 HSP 蛋白,许多内部及外部环境条件均能诱导其表达,如:热诱导、寄生虫、酒精、重金属、挤压及炎症等。各种胁迫因子均导致细胞内变性蛋白质的含量增加^[5]。在细胞内, HSP70 作为“分子伴侣”可辨认和稳定蛋白质在折叠、装配过程中的中间产物,当细胞处于应激状态时,它可结合细胞内变性或新合成的异常蛋白,限制其聚合或将其修复,不能修复者将其降解,同时还可促进某些变性蛋白的降解和清除,重新激活某些酶的活性,以维持细胞的功能和生存,以及抵抗某些细胞毒性因素引起的细胞凋亡、延长细胞的存活^[6]。HSP 可增加细胞对伤害性刺激的耐受性,提高细胞的存活率,具有明显的保护作用^[7]。

在大部分生物中,热诱导均能使 HSP70 的表达量升高,诱导性 HSP70 是 HSP70s 家族中研究最多的成员之一^[8,9]。早期的研究表明,此类蛋白的诱导与生物对高温的耐受力呈密切的相关性^[8]。在相对较高的温度条件下, HSP70 可以促进生长,在接近致死温度时, HSP70 保护生物体维持生活力。众所周知,热诱导可以使细胞中蛋白质变性并发生聚合,并破坏重要细胞器的完整性,抑制某些重要的生理生化过程,如转录和表达过程。而在其他生物的大量研究中,从正反两方面证明了热休克所诱导的保护作用是由于热休克蛋白高表达,尤其是 HSP70 高表达的结果。HSP70 可以与新生蛋白及受热诱导影响而伸展的蛋白结合,防止它们产生聚合并催化它们重新折叠成原来的状态^[10],这是其热耐受的分子机制之一。本试验研究了不同胁迫条件对皱纹盘鲍 HSP70 基因的表达影响,结果发现胁迫条件对皱纹盘鲍 HSP70 的表达影响与其他生物中的研究结果一致^[11,12]。热诱导能促进 HSP70 的上调表达,表明 HSP70 可能参与了皱纹盘鲍的免疫。

参考文献:

- [1] Shyu W C, Kao M C, Chou W Y, *et al.* Heat shock modulates prion protein expression in human NT-2 Cells [J]. **Molecular Neuroscience**, 2000, 2:771-774.
- [2] Saavedra C A, Hammell C M, Heath C V. Yeast heat shock mRNAs are exported through a distinct pathway defined by Riplp [J]. **Genes and Development**, 1997, 11:2 845-2 856.
- [3] Benedetti A, Baglioni C. Translational regulation of the synthesis of a major heat shock protein in HeLa cells[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 1986, 261:15 800-15 804.
- [4] 张立国,张璐. 实时定量 PCR 技术的介绍[J]. **生物技术**, 2003, 13(2):39-40.
- [5] Feder M E, Hofmann G E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology[J]. **Annu Rev Physiol**, 1999, 61: 243-282.
- [6] Mayer M P, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism[J]. **Cell Mol Life Sci**, 2005, 62: 670-684.
- [7] Kabakov A E, Budgaova K R, Bryantsev A L. Heat shock protein 70 or heat shock protein 27 overexpressed in human endothelial cells during posthypoxic reoxygenation can protect from delayed apoptosis[J]. **Cell Stress Chaperones**, 2003, 8: 335-347.
- [8] Buckley A B, Owen M E, Hofmann G E. Adjusting the thermostat: the threshold induction temperature for the heat-shock response in intertidal mussels (genus *Mytilus*) changes as a function of thermal history [J]. **The Journal of Experimental Biology**, 2001, 204, 3 571-3 579.
- [9] Hofmann G E, Buckley B A, Airaksinen S, *et al.* Heat-shock protein expression is absent in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* (Family nototheniidae) [J]. **The Journal of Experimental Biology**, 2000, 203: 2 331-2 339.
- [10] Welch W J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease[J]. **Physiological Review**, 1992, 72 (4): 1 063-1 081.
- [11] Amro M H, Daniel P C. Phenotypic plasticity of HSP70 and HSP70 gene expression in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*): Implications for thermal limits and induction of thermal tolerance [J]. **Biol Bull**, 2003, 205: 160-169.
- [12] Deane E E, Woo N Y S W. Cloning and characterization of the hsp70 multigene family from silver sea bream: Modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2005, 330: 776-783.

Real-time PCR analysis of HSP70 gene expression in response to heat shock

CHENG Pei-zhou^{1,2}, LIU Xiao¹, ZHANG Guo-fan¹, GAO Qi-kang³

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. Center of Analysis & Measurement of Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Received : May, 18, 2006

Key words : abalone *Haliotis discus hannai* Ino.; Heat shock protein 70; FQ-PCR

Abstract : The transcription changes of abalone HSP mRNA were studied during the heat stressing. According to the specific sequence of HSP70 and ACTIN mRNA, the primers were designed and synthesized. By means of established fluorescence quantitative RT-PCR method, the transcription changes of the HSP70 mRNA and the HSP70 mRNA in muscle of transport stressed abalone were studied after 2, 12, 24, 72 and 96 h after heat shock. The volume ratios were calculated as the HSP70 relative expression values. In muscle, levels of HSP70 were significantly increased compared to untreated control abalone, at 2 h of recovery following the heat shock. HSP70 levels reached the peak, at 12 h of recovery. After that, the HSP70 levels dropped till 96 h, when HSP70 returned to control levels.