

# 克氏原螯虾热休克蛋白 70 基因表达的定量研究

孙 勇<sup>1</sup>, 章 力<sup>2</sup>, 雷腊梅<sup>1</sup>, 李慕婵<sup>1</sup>, 吴 任<sup>1</sup>, 谢数涛<sup>1</sup>

(1. 暨南大学 生命科学技术学院 水生生物研究中心, 广东 广州 510632; 2. 西南大学 生命科学学院 重庆市水产科学重点实验室, 重庆 400715)

**摘要:**根据实验室克隆的克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*) HSP70(scHSP70)的核酸序列,制备内部缺失 42 bp 的核酸片段作为竞争性模板。采用竞争性 RT-PCR 的方法,定量测定克氏原螯虾组织的 scHSP70 mRNA 的表达量。结果显示,scHSP70 有广泛的组织分布,但是在正常情况下表达量均较低。经 2 h 热休克处理,7 种组织的 scHSP70 mRNA 的表达量均显著上升,表明该 scHSP70 可能是一种热诱导型 HSP70。心脏组织 scHSP70 在热激前后的表达量均较高,分别为  $1.12 \times 10^5$  和  $4.80 \times 10^5$  分子/ $\mu\text{g}$  总 RNA。而血细胞中 scHSP70 的表达在热激前后均处于最低水平,分别为  $0.191 \times 10^4$  和  $1.61 \times 10^4$  分子/ $\mu\text{g}$  总 RNA。在 0~8 h 长时间的热休克实验中,心脏组织 scHSP70 的表达随着热休克时间的延长,呈现增强的趋势,提示心脏组织在虾类的应激反应中发挥了重要的作用。

**关键词:**克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*); 热休克蛋白 70; 热休克; 表达; 竞争性 PCR

**中图分类号:**Q75

**文献标识码:**A

**文章编号:**1000-3096(2009)08-0021-05

热休克蛋白(heat shock proteins,简称 HSPs)是广泛存在于真核和原核细胞中一类非常保守的蛋白质,分为很多家族,其中 HSP70 家族是最重要的、也是功能最复杂的一类蛋白,它主要以“分子伴侣”的形式协助新生多肽的折叠、转运以及变性蛋白的修复和重折叠等,而且它在细胞保护、抗凋亡以及免疫治疗等方面也发挥着重要的功能<sup>[1]</sup>。目前,HSP70s 研究主要集中在脊椎动物。而对于无脊椎动物,特别是水生无脊椎动物 HSP70s 的研究比较少<sup>[2]</sup>,这主要体现在 HSP70s 基因信息量少以及 EST 数据库少,所以很难开展其 HSP70s 的功能研究及从基因水平探讨 HSP70s 与环境应激之间的关系,这无疑给水生无脊椎动物 HSP70s 深入研究带来了障碍<sup>[3]</sup>。

甲壳动物是一类重要的水生无脊椎动物,它们大多具有重要的经济价值和商业前景,已成为很多国家和地区争相养殖的对象,然而它们的生存在很大程度上受到了许多环境因素的影响,包括温度、缺氧、重金属离子、感染、饥饿等,这些因素与体内热休克蛋白的表达水平有紧密联系。克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*),作为重要的淡水经济虾类,是中国虾类养殖的重要品种,分布范围广,对环境的适应性强,病害少,耐低氧,对重金属有很强的富集作用,对养殖水质要求不高,在一些受污染的水域甚至一些鱼类难以成活的水体也能生存。同时,在克氏原螯虾体内增殖白斑综合症病毒(white spot syndrome virus,简称 WSSV)的试验获得成功<sup>[4]</sup>,该虾

已经成为 WSSV 病毒研究良好的实验对象,并展开了广泛的应用研究。但是,有关克氏原螯虾 HSP70 基因克隆及表达的研究却未见报道。作者在本实验室克隆的克氏原螯虾 HSP70 基因 cDNA 全序列(scHSP70, GenBank 登录号为 DQ301506)的基础上,采用竞争性 PCR 方法定量研究在热休克条件下该 HSP70 的表达情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

克氏原螯虾购自广州市黄沙水产市场,体长为  $8 \text{ cm} \pm 1.5 \text{ cm}$ 。实验前于水族箱中暂养 2 周,水温保持在  $20^\circ\text{C}$  左右,每日喂食 2 次,待其状态稳定,选取蜕皮间期的虾用于实验。

### 1.2 热休克处理

克氏原螯虾  $35^\circ\text{C}$ (预实验测定该温度约为亚致死温度)热休克 2 h,室温恢复 1.5 h,取其心脏、肌肉、血液、消化腺、触角腺、精巢、肠共 7 种重要组织作为组织表达实验的材料,取未经热休克的虾作为对照。

克氏原螯虾  $35^\circ\text{C}$  热休克 1, 2, 4, 6, 8 h, 室温恢复 1.5 h, 取其心脏组织。未经热休克的虾作为对照。

收稿日期:2007-06-09;修回日期:2009-02-18

基金项目:暨南大学人才科研启动基金资助项目(51204019)

作者简介:孙勇(1978-),男,安徽淮南人,硕士研究生,主要从事虾类分子生物学及免疫学研究,E-mail: sunyong0501@126.com;谢数涛,通信作者,E-mail: xieshutao@yahoo.com.cn

### 1.3 总 RNA 提取及 cDNA 合成

将各组织样品经液氮冷冻研磨后,按照 Trizol (Invitrogen)的操作说明提取总 RNA。从虾体抽血方法参照文献[5],然后按照 Catrimox-14™ RNA Isolation Kit (TaKaRa)的说明书提取总 RNA。使用核酸定量仪 SmartSpec Plus (Bio-Rad)测定各样品的 RNA 浓度。用 RQ1 RNase-free DNase(Pro-mega)处理总 RNA。以 Oligo(dT)<sub>18</sub> 作为引物逆转录合成第一链 cDNA。

### 1.4 scHSP70 mRNA 表达水平的测定

参考 Gilliland 等<sup>[6]</sup>与 Sullivan 等<sup>[7]</sup>的方法,采用竞争性 PCR 方法测定组织样品中 scHSP70 mRNA 含量。竞争标准 scHSP70 cDNA competitor 的制备依照 Celi 等<sup>[8]</sup>的方法(图 1),采用正向引物 P-F3 和下游特别设计的反向引物 P-CP 进行 PCR 扩增。

P-F3: 5'-GGTGTGGTGGGAGGGTCTA-3';  
P-CP: 5'-GGCTCGCTCTCCCTCATACTACTT-GCTGTTGCTTGGTT-3'。

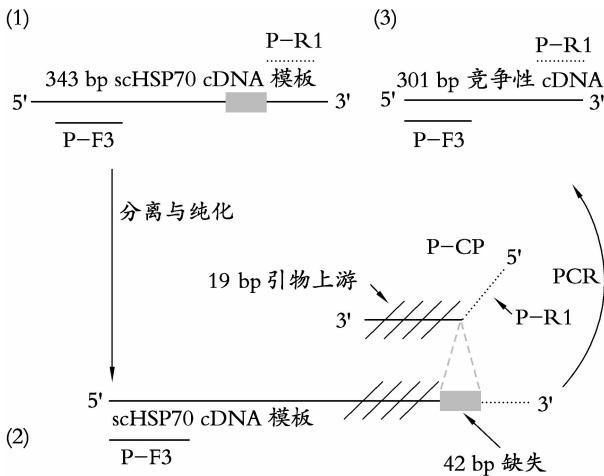


图 1 scHSP70 cDNA 竞争性模板片段的构建

Fig. 1 Overview of scHSP70 cDNA competitor template construction

(1) 采用 scHSP70 cDNA 扩增 HSP70 cDNA 竞争性模板;  
(2) HSP70 5' 引物和特殊设计的反向引物用于 PCR 扩增;  
(3) 扩增得到 301 bp 竞争性 cDNA 产物(42 bp 缺失)

(1) The HSP70 cDNA competitor was amplified using the scHSP70 cDNA template; (2) The HSP70 5' primer and a 40 bp composite primer (P-CP), which was designed to eliminate a 42 bp region within the HSP70 cDNA template, were used for PCR; (3) This resulted in a 301 bp competitor cDNA product(42 bp deletion)

PCR 扩增条件为:预变性 94℃ 4 min,变性 94℃ 30 s,退火 59℃ 30 s,延伸 72℃ 30 s,共 35 个循环,最后 72℃ 8 min。PCR 产物经 2.5%琼脂糖凝胶电泳后回收。该片段相当于在 P-F3 和 P-R1(nt 1004~1346,共 343 bp)片段内部产生一个 42 bp 的缺失。通过

连续 2 倍稀释配制系列浓度的 scHSP70 cDNA 标准,将这些竞争标准 HSP70 cDNA 梯度液 1 μL 分别加入到 0.2 μg 的 cDNA 组织样品中,再用引物 P-F3 和 P-R1(5'-GGCTCGCTCTCCCTCATACTACTT-3')同时扩增组织样品中的 scHSP70 cDNA 和作者制备的用于定量的竞争标准 HSP70 cDNA competitor。PCR 反应条件同前所述。PCR 产物经 2.5%琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色后用凝胶成像系统 Gel Doc XR system(Bio-Rad)及相关软件 Quantity One 进行分析。样品 scHSP70 cDNA 带(343 bp)与竞争标准 cDNA 带(301 bp)可根据片段大小不同而区分并定量,与样品 scHSP70 cDNA 带亮度比为 0.9~1.1 的竞争标准 HSP70 cDNA 带被用于确定组织样品中 scHSP70 cDNA 的含量,再通过样品 HSP70 cDNA 的 PCR 产物分子数量将其含量换算成 HSP70 基因 mRNA 数量。

### 1.5 数据分析

用 3 个平行重复实验的平均值±标准差表示克氏原螯虾 scHSP70 mRNA 表达量,数据分析用 SPSS 软件包 LSD 法进行多重比较,当 P<0.05 时认为差异显著。

## 2 结果与分析

克氏原螯虾组织样品 scHSP70 cDNA 竞争性 PCR 的代表性结果见图 2。scHSP70 cDNA 的产物(343 bp)与用于定量的竞争标准 cDNA 的 PCR 产物(301 bp)经 2.5%琼脂糖凝胶电泳可很好地分开,并显示该心脏样品 scHSP70 cDNA 的含量与竞争标准 3.2×10<sup>-5</sup> mg/L 的含量相等。采用下述换算公式计算样品中 HSP70 cDNA 分子数:1 mg/L 的 301 bp DNA 片段=3.00×10<sup>9</sup> 分子/μL,样品总 RNA 中 HSP70 mRNA 分子数=4.80×10<sup>5</sup> 分子/μg 总 RNA。同理,可以计算出其他样品的分子数。表 1 给出实验测得热休克处理 2 h 前后不同组织样品 scHSP70 mRNA 分子数。同时,采用竞争性 PCR 测定热休克 0~8 h 下的心脏组织表达变化的结果见图 3。

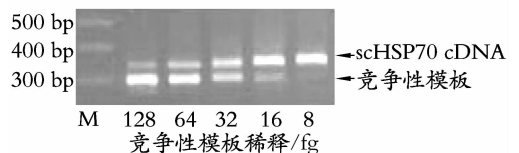


图 2 竞争性 PCR 确定热休克 2 h 心脏组织样品 HSP70 的 cDNA 含量

Fig. 2 Competitive RT-PCR assay to quantify scHSP70 cDNA level in heart tissue by 2 h heat shock treatment

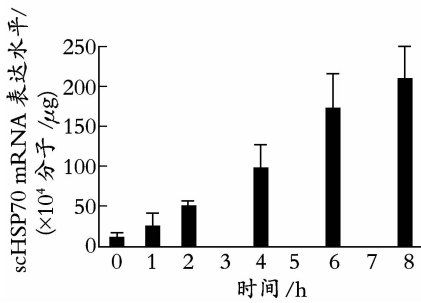


图3 心脏组织 scHSP70 mRNA 表达量随时间的变化

Fig. 3 The scHSP70 mRNA expression levels in heart tissues from *P. clarkii* after different heat shock times and 1.5 h recovery

表1 采用竞争性 PCR 测定热休克 2 h 虾的 7 种组织 HSP70 转录表达量 ( $\times 10^4$  分子/ $\mu\text{g}$ )

Tab. 1 Quantification of scHSP70 mRNA levels by competitive RT-PCR assay in response to 2 h heat shock treatment ( $\times 10^4$  molecules/ $\mu\text{g}$ )

组织	热激前	热激后
心脏	11.2 $\pm$ 2.11	48.0 $\pm$ 5.31 *
肌肉	1.52 $\pm$ 0.54	24.1 $\pm$ 8.52 *
血液	0.191 $\pm$ 0.4	1.61 $\pm$ 0.82 *
消化腺	1.38 $\pm$ 0.67	22.1 $\pm$ 4.93 *
触角腺	2.81 $\pm$ 0.96	24.1 $\pm$ 5.04 *
精巢	1.47 $\pm$ 1.12	22.4 $\pm$ 8.01 *
肠	1.61 $\pm$ 1.1	26.4 $\pm$ 5.40 *
鳃	1.59 $\pm$ 1.14	25.98 $\pm$ 1.13 *

注: 数据表示为平均值 $\pm$ 标准差, 每组样本各为 5 只; \* ( $P < 0.05$ )表示热休克处理组与对照组差异显著

由表 1 可见, scHSP70 mRNA 热休克前后在各组织中均有所表达。热休克前, scHSP70 mRNA 在 7 种组织中表达量均相对较低。经过 2 h 热休克处理, 表达量均显著上升 ( $P < 0.05$ ), 说明 scHSP70 是一种诱导型的 HSP70。此外, 在 2 h 35 $^{\circ}\text{C}$  热休克的条件下, 7 种组织中心脏 scHSP70 mRNA 的表达最高, 在正常情况下心脏 scHSP70 的表达也达到 1.12  $\times 10^5$  分子/ $\mu\text{g}$  总 RNA, 在所测定的对照组织中最高, 提示心脏组织在虾类的应激反应中发挥了重要的作用。血细胞中 scHSP70 的表达在热激前后均处于最低水平。在 2 h 热休克时间里, 各种组织相对于热休克前的表达增幅相差很大。消化腺、肠和鳃的变化最大, 表达量上升 15 倍以上, 其他组织为 3~8 倍。这可能与热休克前各组织的基本表达量有关, 如心脏, 在正常情况下, 表达量相对较高, 2 h 热休克

时, 表达量只上升 3.3 倍。

从图 3 中可以看出, 心脏组织在经过 1 h 的热休克, scHSP70 mRNA 的表达量已经有明显的增加, 说明 scHSP70 基因在应激条件下, 能够快速启动转录和翻译, 从而起到对细胞的保护作用。而且, 表达量随着热休克时间的延长, 呈现增强的趋势, 提示 scHSP70 对细胞发挥一种连续性的保护作用。

### 3 讨论

热休克蛋白(HSPs)是进化上高度保守、功能上至关重要的一类蛋白, 它广泛存在于从低等原核生物到高等哺乳动物的整个生物界。正常情况下, 热休克蛋白主要行使分子伴侣功能, 并参与蛋白质代谢、细胞周期调控、细胞凋亡等重要的生命活动<sup>[9~11]</sup>。在细胞或生物体受到接近致死的高温刺激时, 大部分基因的转录表达和翻译被关闭。相反, 热休克蛋白家族成员基因高效表达, 从而合成大量这类蛋白。热休克蛋白的大量合成有利于生物体抵抗高温刺激造成的损伤。除热休克外, 其他因素如缺氧、重金属离子、感染、饥饿、创伤、代谢毒物等也会诱导热休克蛋白的高表达, 从而使生物体抵抗这些不良刺激的损害。其中热休克蛋白 70(HSP70)家族最为保守, 研究也最为广泛。HSP70 的机体保护功能已由大量的研究报道所证实<sup>[12]</sup>。

迄今, 水生动物 HSPs 的研究主要集中在鱼类, 仅从少数几个种的鱼类中克隆得到, 如: 虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[13]</sup>, 青鳉 (*Oryzias latipes*)<sup>[14]</sup>, 斑马鱼 (*Danio rerio*)<sup>[15]</sup>, 罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)<sup>[16]</sup>等。虾类生物 HSP70s 的研究刚刚开始。2004 年 Liu 等<sup>[3]</sup>首先在罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 中克隆了两种 HSP70s 并研究了它们的表达特征, 发现一种为组成型, 另一种为诱导型。Lo 等<sup>[5]</sup>和 Jiao 等<sup>[17]</sup>分别从斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 和中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 中克隆得到一种组成型 HSP70 基因。克氏原螯虾是重要的淡水虾类, 具有很强的抵御各种环境胁迫和刺激的能力, 但是其 HSP70 基因的克隆及在热诱导条件下的表达研究未见报道。

作者根据本实验室克隆得到的克氏原螯虾 scHSP70 基因序列, 采用竞争性 PCR 方法定量研究在热休克条件下该 HSP70 的表达情况。最初作者

采用以  $\beta$ -actin 作为内参的半定量方法研究其表达情况。但是这种方法仅得到 scHSP70 的相对表达量,而且 PCR 产物受到不同的引物扩增效率和反应条件差异的影响<sup>[18]</sup>。同时,该方法限定在 PCR 反应的指数期,这些因素都限制了半定量方法的使用。竞争性 PCR 方法克服了这些问题<sup>[19]</sup>。首先检测时目的片段和竞争片段长度接近且利用相同的引物,保证了扩增效率的一致性,同时反应可以延伸至平台期,这些特点保证了反应的一致性,并且增大了检测范围<sup>[20]</sup>。作者建立的竞争性 PCR 方法定量检测 HSP70 mRNA,快速,简便,为今后开展有关提高虾类自身免疫力和抵御各种病原侵害的研究提供必要的支持。

#### 参考文献:

- [1] Morimoto R I, Santoro M G. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacological targets for cytoprotection [J]. *Nat Biotechnol*, 1998, 16: 833-838.
- [2] 曾勇, 陆承平. 克氏原螯虾热休克蛋白 70 ku 类似物基因的 cDNA 分析 [J]. *海洋科学*, 2006, 30(6): 31-34.
- [3] Liu J, Yang W J, Zhu X J, *et al.* Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2004, 9(3): 313-323.
- [4] 朱建中, 陆承平. 对虾白斑综合症病毒在螯虾动物模型的感染特性 [J]. *水产科学*, 2001, 25(1): 47-51.
- [5] Lo W Y, Liu K F, Liao I C, *et al.* Cloning and molecular characterization of heat shock cognate 70 from tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2004, 9: 332-343.
- [6] Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, *et al.* Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 2 725-2 729.
- [7] Sullivan V K, Cousins R J. Competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction shows that dietary zinc supplementation in humans increases monocyte metallothionein mRNA levels [J]. *Nutr*, 1997, 127: 694-698.
- [8] Celi F S, Zenilman M E, Shuldiner A R. A rapid and versatile method to synthesize internal standards for competitive PCR [J]. *Nucl Acids Res*, 1993, 21: 104.
- [9] Hightower L E. Heat shock, stress proteins, chaperones and proteotoxicity [J]. *Cell*, 1991, 66: 191-197.
- [10] Hendrick J P, Hartl F U. Molecular chaperone functions of heat shock proteins [J]. *Annu Rev Biochem*, 1993, 62: 349-384.
- [11] Welch W J. How cells respond to stress [J]. *Sci Am*, 1993, 269: 56-64.
- [12] Juliann G K, George C T. Heat shock protein 70 kD: molecular biology, biochemistry, and physiology [J]. *Pharmacol Ther*, 1998, 80(2): 183-201.
- [13] Kothary R K, Jones D, Candido E P. 70-kilodalton heat shock poly-peptides from rainbow trout: characterization of cDNA sequences [J]. *Mol Cell Biol*, 1984, 4: 1 785-1 791.
- [14] Arai A, Naruse K, Mitani H, *et al.* Cloning and characterization of cDNAs for 70-kDa heat-shock proteins (Hsp70) from two fish species of the genus *Oryzias* [J]. *Jpn J Genet*, 1995, 70: 423-433.
- [15] Lele Z, Engel S, Krone P H. hsp47 and hsp70 gene expression is differentially regulated in a stress and tissue-specific manner in zebrafish embryos [J]. *Dev Genet*, 1997, 21: 123-133.
- [16] Molina A, Biemar F, Muller F, *et al.* Cloning and expression analysis of an inducible HSP70 gene from tilapia fish [J]. *FEBS Lett*, 2000, 474: 5-10.
- [17] Jiao C Z, Wang Z Z, Li F H, *et al.* Cloning, sequencing and expression analysis of cDNA encoding a constitutive heat shock protein 70 (HSC70) in *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Chin Sci Bull*, 2004, 49(22): 2 385-2 393.
- [18] Deane E E, Woo N Y S. Cloning and characterization of the hsp70 multigene family from silver sea bream; Modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 330: 776-783.
- [19] Kohler T, Labner D, Thamm B, *et al.* Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction: nonradioactive PCR methods [M]. Germany Berlin: Springer-Verlag, 1995. 3-13.
- [20] Sullivan V K, Cousins R J. Competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction shows that dietary zinc supplementation in humans increases monocyte metallothionein mRNA levels [J]. *Nutr*, 1997, 127: 694-698.

# Quantification of scHSP70 mRNA levels in *Procambarus clarkii*

SUN Yong<sup>1</sup>, ZHANG Li<sup>2</sup>, LEI La-mei<sup>1</sup>, LI Mu-chan<sup>1</sup>, WU Ren<sup>1</sup>, XIE Shu-tao<sup>1</sup>

(1. Research Center of Hydrobiology, College of Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Key Laboratory of Aquatic Science of Chongqing, School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

**Received:** Jun. , 9, 2007

**Key words:** *Procambarus clarkii*; heat shock protein 70; heat shock; expression; competitive PCR

**Abstract:** A competitor cDNA fragment was constructed and used as a quantitative template. This fragment was derived from scHSP70 cDNA cloned from *Procambarus clarkii*. This design created a 42 bp internal deletion of the target scHSP70 cDNA and yielded a 301 bp competitor cDNA template. Competitive RT-PCR was used to quantify the scHSP70 cDNA copies in all tissue samples which were proportional to scHSP70 mRNA levels. The results showed that scHSP70 distributed in all the tissues examination, such as heart, muscle, hemocytes, digestive gland, antennal gland, testis and intestine. However, under a normal condition, the expression levels of scHSP70 mRNA were much lower in all tissues compared to treated ones. Challenge of *P. clarkii* with 2 h heat shock resulted in dramatic increases in the expression levels of scHSP70 mRNA in all tissues. The upregulated mRNA expression of the scHSP70 following heat shock indicates that scHSP70 gene was apparently inducible by thermal challenge and involves in stress responses. The levels in heart tissues remained the highest under unstressed and stressed conditions, from  $1.12 \times 10^5$  to  $4.80 \times 10^5$  molecules/ $\mu\text{g}$  total RNA with heat shock. In heart tissue, the level of scHSP70 mRNA gradually increased compared with untreated crayfish, which showed the heart tissue might play an important physiological role in stress response in the crayfish. The level in hemocytes was still lowest among all tissues, although it was upregulated from  $0.191 \times 10^4$  to  $1.61 \times 10^4$  molecules/ $\mu\text{g}$  total RNA.

(本文编辑:谭雪静)