家蚕小热激蛋白家族成员 *Hsp23.7* 基因的克隆与分析*

罗素娟^{1,2} 杨慧鹏^{1,2} 李轶女² 张志芳² 张耀洲^{1***}

(1. 浙江理工大学生物化学研究所 杭州 310018; 2. 中国农业科学院生物技术研究所 北京 100081)

Cloning and analysis of small heat-shock gene Hsp23. 7 from Bombyx mori. LUO Su-Juan^{1,2**}, YANG Hui-Peng^{1,2}, LI Yi-Nv² ZHANG Zhi-Fang² ZHANG Yao-Zhou^{1***}(1. Institute of Biochemistry, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; 2. Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract Hsp23.7 is one of the small heat-shock family of proteins. The Hsp23.7 gene of $Bombyx\ mori\ L$. (Bm-Hsp23.7) was cloned and expressed in $E.\ coli$. The candidate ORF of Bm-Hsp23.7 contains 210 amino acids. Its molecular weight (mw) is 23.7 ku and isoelectric point (pI) is 5.17. Real-time PCR data was used to reveal the profile of the spatio-temporal expression pattern of Bm-Hsp23.7. Absolute quantization demonstrated that Bm-Hsp23.7 was expressed at different levels in all tissues of 5th instar larva of $B.\ mori$. The highest level of expression was in the ovary (3.64 × 107 copy numbers/ μ g), followed by the fat bodies, then the wing discs and malpighian tubules. The lowest level of expression was in hemocytes (7.11 × 103 copy numbers/ μ g).

Key words Bombyx mori Bm-Hsp23. 7 gene small heat shock protein family tissue expression pattern, Real-time PCR

摘 要 Hsp23.7 基因是小热激蛋白家族的成员 ,本文研究了家蚕 $Bombyx\ mori\ L$. 的 Hsp23.7 基因 ,并对其进行了原核表达 ,获得了相应分子量的表达产物。推导的开放阅读框编码 210 个氨基酸 ,分子量为23.7 ku ,等电点为 5.17。同时 ,利用实时定量 PCR 技术对 Hsp23.7 基因在家蚕不同组织的表达谱进行了鉴定。结果显示 Hsp23.7 基因在 5 龄幼虫时期的各组织中都有表达 ,在卵巢中表达量最高 ,达到 3.64 \times 10 7 拷贝数 / μ g ,其次在脂肪体 ,翅原基 ,马氏管中表达量也较高 ,在血淋巴中表达量最低 ,仅为 7.11 \times 10 3 拷贝数 / μ g。

关键词 家蚕 Hsp23.7 基因 小热休克蛋白家族 组织表达谱 实时定量 PCR

热激蛋白(Heat shock proteins ,HSPs)是生物体对高温等外界刺激迅速作出的应激反应,关闭正常的基因表达 ,开启一组应激基因的表达 ,而产生的一组结构上非常保守的特殊蛋白质 ,使生物体能快速、短暂调整应激过程中细胞的存活机制 ,促进细胞抗损伤 ,并有助于细胞恢复正常的结构和机能^[1]。 HSPs 在结构上高度保守 ,广泛存在于原核和真核细胞中^[2]。目前 ,按分子量大小可将 HSPs 分为 5 个家族^[3] ,分别为 HSP100 ,HSP90 ,HSP70 ,HSP60 和小热激蛋白家族 sHSP。sHSP 是极富多样性的家

族 ,已被证实的有脊椎动物 $\alpha A \times \alpha B$ 晶体蛋白 $(\alpha A \times \alpha B - \text{crystallin})$ 和 $12 \sim 43 \text{ku}$ 的小热激蛋白 ,以及 2 个分枝杆菌表面抗原和 1 个血吸虫主要抗原 $[^{41}]$ 。 sHSP 的主要结构由 N 端域和 C 端域 2 个部分组成。多变的 N 端域能够调节低聚反应 ,它与大的低聚体复合物的形成及分

收稿日期:2009-09-17,修回日期:2009-11-27

^{*} 资助项目:国家自然科学基金(30770279)、国家 863 计划课题(2007AA021703;2006AA10A119)。

^{**} E-mail: luosujuan@ 126. com

^{***}通讯作者 Æ-mail:yaozhou@ chinagene. com

子伴侣活性有关 $^{[5]}$ 。 $^{[5]}$ 。 $^{[5]}$ 。 $^{$

本文克隆并表达了家蚕 sHSP 基因家族的一个成员 *Hsp23.7* 基因,同时采用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)技术对该基因在家蚕 5 龄幼虫不同组织的表达情况进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料

商用杂交种: 菁松×皓月; 人工饲料购自山东省烟台蚕业研究所, 调制按照生产商的方法进行。家蚕 $1\sim4$ 龄幼虫按《中国养蚕学》[11] 中标准方法饲育 5龄起蚕开始将试验用蚕置于25%、 $70\%\sim80\%$ 相对湿度条件下饲养并进行实验。

Taq 酶及相应 PCR 反应的试剂 "Trizol 试剂 盒为 Invitrogen 公司产品; 内切酶、反转录第一链 cDNA 试剂盒为 Promega 公司产品; 荧光定量 PCR 试剂 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 为 TOYOBO 公司产品。

1.2 家蚕总 RNA 的提取

家蚕饲养至 5 龄幼虫第 6 d 时,解剖获得前丝、中丝、后丝、头部、表皮、脂肪体、中肠、精巢、卵巢、翅原基、气管丛、血淋巴及马氏管 13 个组织器官,参照 Trizol 试剂盒的说明书提取各组织器官及蛹期的总 RNA。

1.3 cDNA 第一链合成

取 $1~\mu g$ 总 RNA 反转录 ,参照 Promega 公司提供的反转录第一链 cDNA 试剂盒说明书进

行。

1.4 家蚕 *Bm-Hsp23.7* 基因的克隆和表达载 体构建

根据在 NCBI 搜索到的 Bm-Hsp23.7 基因 (GenBank 登陆号: NM_001043477),设计引物: Bm-Hsp23.7-F: GGGGGATCCATGAAGAATTT-CATTCC(划横线处为 BamH I 酶切位点)

Bm-Hsp23. 7-R: GGGCTCGAGTTATTGCA-TTTCTGAC(划横线处为 Xho I 酶切位点)

以家蚕蛹期 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。 扩增条件:94℃ 5 min;94℃ 1 min 56℃ 45 s, 72℃ 1 min 35 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物 经1% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色检测后, 将 DNA 片段回收、酶切 ,与酶切后的 pET-28a 连接 ,转化大肠杆菌 TG1 ,得到表达载体。经测 序鉴定后,把重组的原核表达质粒转化大肠杆 菌 BL21 后,挑取单个菌落接种 4 mL LB 培养 基(Kan:50 mg/mL)中 37℃继续振荡培养 2.5 h后(OD 值大约为 0.5 左右),加 IPTG 至终浓 度为 0.5 mmo1/L 37℃继续振荡培养 5 h。收 集菌体进行 SDS-PAGE 分析 ,分离胶和浓缩胶 配制参照 TaKaRa 商品目录上的方法,浓度分 别为 15% 和 5%。电泳完毕后用考马斯亮蓝 R-250 进行染色 20 min ,然后脱色直至蛋白质 条带清晰可见为止。

1.5 荧光定量 PCR 引物设计

根据所得的序列,设计一对特异性引物:上游引物为 Primer 1:5'- GGCGTCTTTGGC-CCGCGACCTAG-3',下游引物为 Primer 2:5'-GTCAGCGGATAGCTCGGAGACGAC-3',扩增目的条带长度为 250 bp。

1.6 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 分析

利用 1.5 中设计的引物 ,以反转录的 13 个组织的 cDNA 为模板 ,于 iCycler iQ5 Real-time PCR 检测系统(Bio-Rad)进行操作 ,重复 3 次(计算标准差),PCR 反应体系: SYBR Green Realtime PCR Master Mix 10 μL、Primer 1 (10 mM) 0.5 μL、Primer 2 (10 mM) 0.5 μL、cDNA (约相当于 10 ng RNA 的反转录产物)1 μL ,再

用 ddH_2O 补充至终体积 20 μ L。用如下程序在 荧光定量 PCR 仪上进行检测:95 $\mathbb C$ 3 min;95 $\mathbb C$ 15 s $62 \mathbb C$ 15 s $72 \mathbb C$ 30 s 40 个循环;溶解曲线 从 55 $\mathbb C$ 到 95 $\mathbb C$,每 0.5 $\mathbb C$ 读取 10 s。

1.7 数据分析

2 结果与分析

2.1 家蚕 Bm-Hsp23.7 基因 ORF 的克隆

以家蚕蛹期 cDNA 为模板,以 Bm-Hsp23.7-F/Bm-Hsp23.7-R 引物组合,进行 RT-PCR 扩增 Hsp23.7 基因的开放阅读框架(open reading frame, ORF) ORF。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,出现 1条约 600 bp 的特异条带(图1),与预期的片段大小相符。将该片段纯化回收,酶切,与酶切后的 pET-28a 连接,转化大肠杆菌 TG1,筛选阳性克隆。将筛选出的阳性克

隆经 Bam H I n Xho I 双酶切并测序(图 1),结果表明两者完全一致,由此我们成功克隆到了家蚕 Hsp23. 7 基因 630 bp 的完整的 ORF 序列。

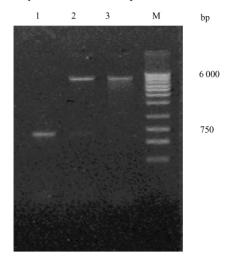


图 1 家蚕 *Hsp23.7* 基因重组质粒的酶切鉴定
1. *Bm-Hsp23.7* 基因 ORF 的 PCR 产物 2. pET-28a—*Bm-Hsp23.7* DNA/*Bam*H I + *Xho* I 3. pET-28aDNA/*Bam*H I + *Xho* I M. DL 2 000 分子量标准

2.2 家蚕 Bm-Hsp23.7 基因的诱导表达

将克隆的 *Bm-Hsp23*.7 基因克隆到 pET-28a 质粒中,在 *E. coli*, BL21(DE3)菌株表达,表达产物进行 SDS-PAGE 电泳分析(图 2)。结果显示含重组质粒的单克隆细菌诱导表达后,SDS-PAGE 电泳检测大约在分子量 30 ku 处明显有 1 条表达量很高的蛋白条带,而 *Bm-Hsp23*.7 基因未诱导与空载 pET-28a 在此处条

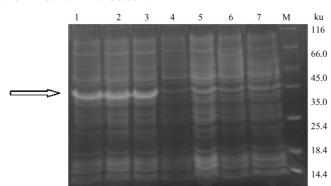


图 2 家蚕 *Hsp23*. 7 基因的诱导表达 1~3. IPTG 诱导的 *Bm-Hsp23*. 7 基因的表达;

4. 空载 pET-28a 的表达 5~7. Bm-Hsp23. 7 基因未诱导 M. 低分子量蛋白 Marker

带不明显。

2.3 家蚕 Bm-Hsp23.7 基因组织表达谱分析

6 d 的不同组织中的表达水平,表示的是每微克总 RNA 中目的基因拷贝数的 lg 值 (即以 10 为底的拷贝数的对数值),其中卵巢中表达量最高,每微克总 RNA 中所含目的基因拷贝数达到 3.64×10⁷,在头部、前部丝腺和中部丝腺表达量比较低,每微克总 RNA 中所含目的基因拷贝数在 10⁵ 左右,而在血细胞中表达量最低,每微克总 RNA 中所含目的基因拷贝数仅达到7.11×10³,其他 8 个组织表达量在 2.68×10⁶~3.24×10⁶之间。

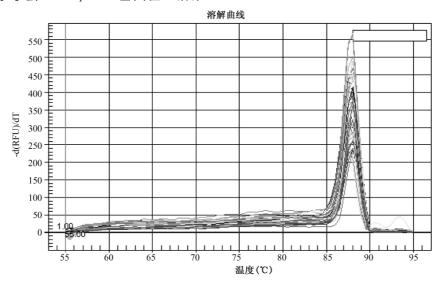


图 3 Bm-Hsp23.7 溶解曲线

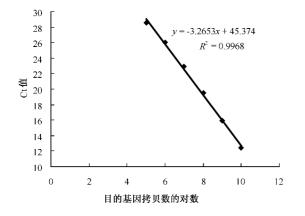


图 4 Bm-Hsp23. 7 标准曲线(绝对定量法)

3 小结

本文克隆了家蚕 Hsp23. 7 基因 ,并将其克隆到大肠杆菌表达载体 pET-28a 中。其重组质粒在 BL21 菌株中经 IPTG 诱导后表达出大量目的蛋白 ,这为后续研究家蚕的 sHSP23. 7 蛋白 ,做了很好的准备。同时 ,我们对该基因的表达谱情况进行了分析 ,通过 Real-time PCR 的结果可以看出 Bm-Hsp23. 7 基因在家蚕 5 龄幼虫时期的所有组织中都有表达 ,但是在各组织中表达量的差异非常大。在 5 龄幼虫时期 ,卵巢中表达量最高 ,其次在脂肪体 ,翅原基 ,马氏管中表达量也较高 ,在血细胞中表达量最低。

做荧光定量 PCR 时 我们发现不同组织中

内参基因 *ActinA*₃ 的 Ct 数值相差很大,目前,我们还没有找到一种更为合适的内参基因,因此

在此进行了绝对定量分析。

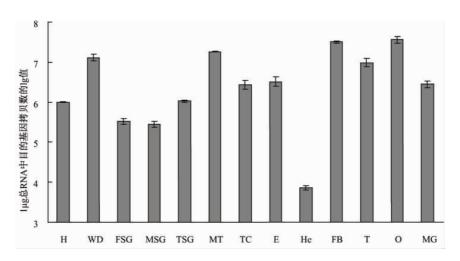


图 5 5 龄第 6 d 各组织中 Bm-Hsp23. 7 基因的表达量

H(头部),WD(翅原基),FSG(前丝),MSG(中丝),TSG(后丝),MT(马氏管),TC(气管丛), E(表皮),He(血球),FB(脂肪体),T(睾丸),O(卵巢),MG(中肠)

参 考 文 献

- 1 陈华友 涨春霞 ,马晓珂 ,等. 极端嗜热古菌的热休克蛋白. 生物工程学报 ,2008 **24**(12): 2 011 ~2 021.
- 2 Fu X., Jiao W., Chang Z. Phylogenetic and biochemical studies reveal a potential evolutionary origin of small heat shock proteins of animals from bacterial class A. J. Mol. Evol. 2006, (62): 257 ~ 266.
- 3 Kim K. K., Kim R., Kim S. H. Crystal structure of a small heat-shock protein. J. Nature 1998 394 (6 693):595 ~ 599.
- 4 夏佳音 涨耀洲. 小热休克蛋白的结构和功能. 中国生物化学与分子生物学报 2007 **23**(11): 911~915.
- Martin H., Andreas K., Johannes B., et al. Structural dynamics of archaeal small heat shock proteins. J. Mol. Biol., 2008 378: 362 ~ 374.
- 6 Nakamoto H., Vigh L. The small heat shock proteins and their clients. Cell Mol. Life Sci. 2007 64: 294 ~ 306.

- 7 Sun Y., MacRae T. H. Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cell Mol. Life. Sci.*, 2005, 62: 2460~2476.
- 8 Haslbeck M. Recombinant expression and in vitro refolding of the yeast small heat shock protein Hsp42. Int. J. Biol. Macromol. 2006 38 (2): 107 ~ 114.
- 9 Quinlan R. Cytoskeletal competence requires protein chaperones. Prog. Mol. Subcell. Biol., 2002, 28: 219 ~ 233.
- 10 Sun Y. ,MacRae T. H. The small heat shock proteins and their role in human disease. FEBS J. 2005 272 (11):2 613 ~2 627.
- 11 吕鸿声. 中国养蚕学. 上海: 上海科学技术出版社, 1991. 401~403.