

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 (3.64×10^7 copy numbers/ μg), followed by the fat bodies, then the wing discs and malpighian tubules. The lowest level of expression was in hemocytes (7.11×10^3 copy numbers/ μg).

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 3.64×10^7 拷贝数/ μg ,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 7.11×10^3 拷贝数/ μg 。

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 是极多样性的家

族,已被证实的有脊椎动物 αA 、 αB 晶体蛋白(αA 、 αB -crystallin)和 12~43ku 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^[4]。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

* 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, E-mail: yaozhou@chinagene.com

收稿日期:2009-09-17, 修回日期:2009-11-27

子伴侣活性有关^[5]。C 端域含有一个相当保守的 α 晶体蛋白 (α -crystallin) 结构域,是所有小热激蛋白家族成员所共有的结构域,此结构域由 80~100 个氨基酸残基组成,包含 9 个 β 片层^[6]。许多研究表明,不管机体处于应激状态还是处于正常生理状态,sHSP 都参与复杂和重要的生物学过程,如 sHSP 可以作为分子伴侣^[7],阻止蛋白间不必要的相互作用,帮助变性蛋白重新折叠^[8],诱导生物体耐热性,稳定细胞骨架^[9],参与细胞的损伤与修复,在生物体的生长、发育及进化过程中,在维持机体的生理状态以及某些疾病的病理生理过程中均发挥重要作用^[10]。

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 $\times$ 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 1~4 龄幼虫按《中国养蚕学》^[11]中标准方法饲养,5 龄起蚕开始将试验用蚕置于 25℃、70%~80% 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 μ 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: GGGGATCCATGAAGAATTT-CATTCC (划横线处为 *Bam*H 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 mmol/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 μ L、Primer 1 (10 mM) 0.5 μ L、Primer 2 (10 mM) 0.5 μ L、cDNA (约相当于 10 ng RNA 的反转录产物) 1 μ L,再

用 ddH₂O 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 $^{\circ}$ C 3 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,62 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环;溶解曲线从 55 $^{\circ}$ C 到 95 $^{\circ}$ C,每 0.5 $^{\circ}$ C 读取 10 s。

1.7 数据分析

标准曲线的制作:Real-time PCR 产物经电泳回收,测其 OD₂₆₀,由 1 OD₂₆₀ 相当于 50 μ g / mL 双链 DNA,用 DNastar 软件计算目的片段的分子量,计算出 10¹⁰ 个基因拷贝数所需回收产物的量,并按每 μ L 10¹⁰ ~ 10⁵ 个拷贝进行梯度稀释作为标准样进行荧光定量 PCR。以所得 Ct 值对相应的拷贝数的对数作图,即得该基因扩增的标准曲线及其线性方程 $y = ax + b$ 。对荧光定量 PCR 结果进行绝对定量分析,根据标准曲线方程计算 x 值,则待测基因的拷贝数 $Y = 10^x$ 。最终获得 *Hsp23.7* 基因在家蚕 5 龄第 6 d 的组织表达谱。

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)。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 和 *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。

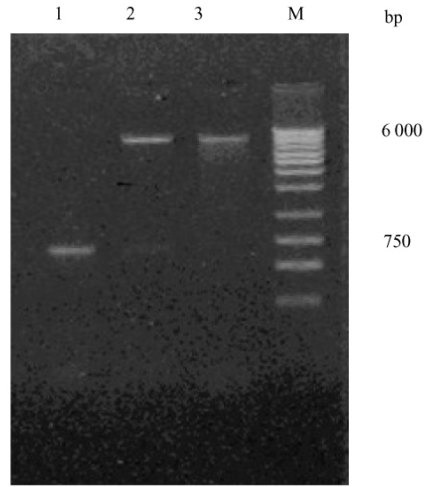


图 1 家蚕 *Hsp23.7* 基因重组质粒的酶切鉴定

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-28a DNA/*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

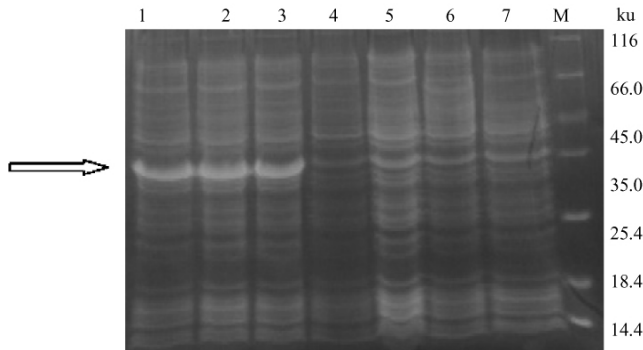


图 2 家蚕 *Hsp23.7* 基因的诱导表达

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

将 5 龄第 6 d 家蚕幼虫的不同组织总 RNA 经反转录后得到的 cDNA 稀释成原来体积的 4 倍,取 1 μL (约相当于 10 ng 总 RNA 转录量) 做模板进行 Real-time PCR,每个样品做 3 个重复 (图 3)。在试验过程中,溶解曲线有非常明显的单一峰,说明该基因均具有较好的特异性扩增。制作标准曲线并制定线性方程 (图 3 A),曲线的 R^2 等于 0.9968,说明线性非常好 (误差小);图 5 所示家蚕 *Bm-Hsp23.7* 基因在 5 龄第

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 3.64×10^7 ,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 10^5 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 7.11×10^3 ,其他 8 个组织表达量在 $2.68 \times 10^6 \sim 3.24 \times 10^6$ 之间。

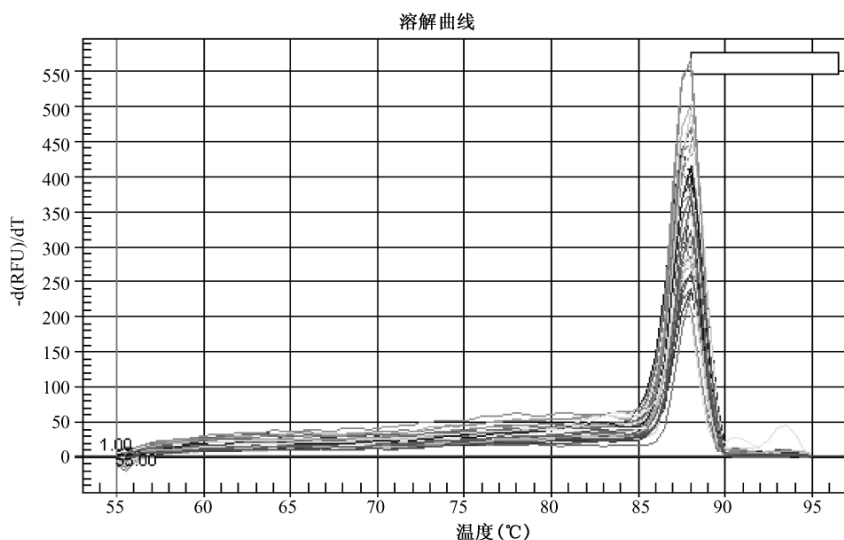


图 3 *Bm-Hsp23.7* 溶解曲线

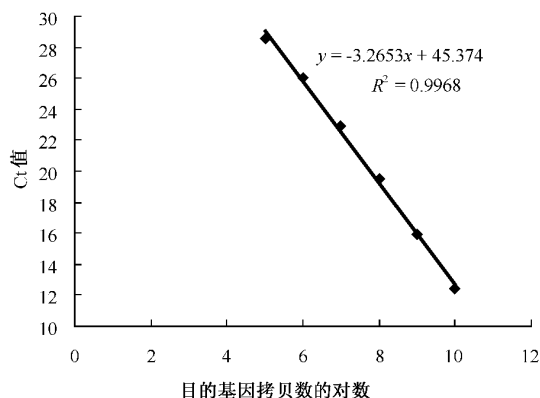


图 4 *Bm-Hsp23.7* 标准曲线 (绝对定量法)

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 *ActinA₃* 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。

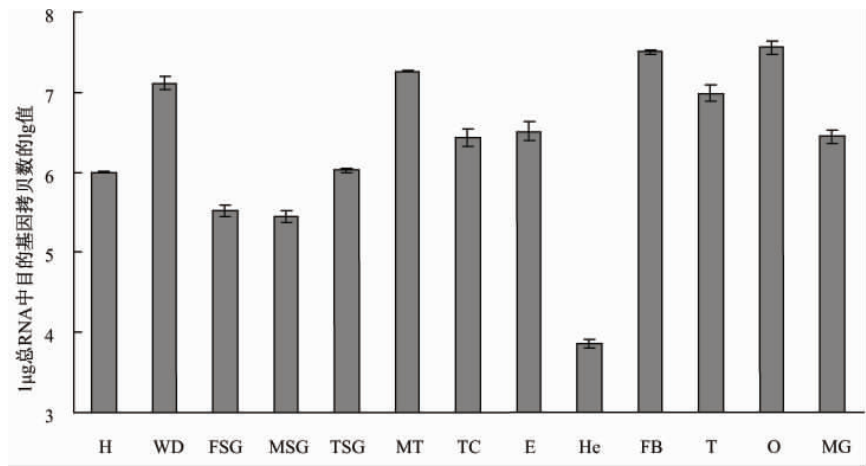


图5 5龄第6d各组织中 *Bm-Hsp23.7* 基因的表达式
H(头部) ,WD(翅原基) ,FSG(前丝) ,MSG(中丝) ,TSG(后丝) ,MT(马氏管) ,TC(气管丛) ,
E(表皮) ,He(血球) ,FB(脂肪体) ,T(睾丸) ,O(卵巢) ,MG(中肠)

参 考 文 献

1 陈华友 ,张春霞 ,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 ,张耀洲. 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.

5 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**: 2 460 ~2 476.

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.