

斑马鱼*notch1a*和*notch1b*对*hsp70*基因的调控作用

王子睿 王昱杰 周泽斌 邱军强 李伟明 张庆华

REGULATION OF *HSP70* GENE BY *NOTCH1A* AND *NOTCH1B* IN ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)

WANG Zi-Rui, WANG Yu-Jie, ZHOU Ze-Bin, QIU Jun-Qiang, LI Wei-Ming, ZHANG Qing-Hua

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2024.2023.0320>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

斑马鱼和鲤*miR-1-2/133a-1*基因间序列活性和调控研究

STUDY ON THE INTERGENE SEQUENCE ACTIVITY AND REGULATION OF *MIR-1-2/133A-1* IN ZEBRAFISH AND CARP

水生生物学报. 2021, 45(3): 507–513 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.040>

敲除*trim47*基因斑马鱼脑和脾的比较转录组学分析

COMPARATIVE TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS OF BRAIN AND SPLEEN IN *TRIM47* KNOCKOUT ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)

水生生物学报. 2021, 45(3): 495–506 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.036>

血红素加氧酶1在斑马鱼低氧应激中的保护作用研究

STUDIES ON THE PROTECTIVE ROLE OF ZEBRAFISH *HO1* IN RESPONSE TO HYPOXIA

水生生物学报. 2017, 41(1): 43–49 <https://doi.org/10.7541/2017.6>

斑马鱼*ftr56*基因克隆表达及功能研究

MOLECULAR CLONING, EUKARYOTIC EXPRESSION AND FUNCTION STUDY OF *FTR56* FROM *DANIO RERIO*

水生生物学报. 2020, 44(1): 20–25 <https://doi.org/10.7541/2020.003>

方格星虫*dmrt1*基因的克隆和表达分析

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF PEANUT WORMS TRANSCRIPTION FACTOR *DMRT1*

水生生物学报. 2019, 43(6): 1210–1215 <https://doi.org/10.7541/2019.143>

不同链长脂肪酸对斑马鱼的性腺脂肪酸组成、繁殖力与仔鱼成活率的影响

INFLUENCE OF FATTY ACIDS WITH DIFFERENT CHAIN LENGTH ON FATTY ACID COMPOSITION OF OVARIES, FECUNDITY AND SURVIVAL RATE OF LARVAE IN ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)

水生生物学报. 2017, 41(4): 766–773 <https://doi.org/10.7541/2017.95>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2024.2023.0320

斑马鱼 *notch1a* 和 *notch1b* 对 *hsp70* 基因的调控作用

王子睿^{1,2} 王昱杰^{1,2} 周泽斌^{1,2} 邱军强^{1,2} 李伟明³ 张庆华^{1,2}

(1. 上海海洋大学水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学国家水生动物病原库, 上海 201306; 3. 密歇根州立大学渔业与野生生物系, 美国 东兰辛 48824)

摘要: 研究旨在通过双荧光素酶报告基因实验探究斑马鱼 *notch1a* 和 *notch1b* 基因对 *hsp70* 的调控作用。通过NCBI数据库检索获取了斑马鱼 *notch1a* 和 *notch1b* 基因的CDS序列, 对其胞内段(Notch1a/Notch1b intracellular domain, N1aICD/N1bICD)进行克隆并构建pCMV-N1aICD和pCMV-N1bICD真核表达载体, 在人胚肾细胞(HEK293T)中用Western Blot和亚细胞定位检测N1aICD和N1bICD的表达。通过生信分析并克隆斑马鱼 *hsp70* 启动子序列, 构建pGL3-*hsp70*-pro报告基因, 并在HEK293T中检测该报告基因的双荧光素酶活性。之后在HEK293T细胞中过表达 *notch1a* 和 *notch1b* 基因, 通过双荧光素酶报告基因实验检测pGL3-*hsp70*-pro的活性变化, 以此探究 *notch1a* 和 *notch1b* 对 *hsp70* 基因的调控作用。实验结果显示真核表达载体pCMV-N1aICD和pCMV-N1bICD构建成功, Western Blot显示pCMV-N1aICD和pCMV-N1bICD可正常表达, 亚细胞定位显示N1aICD和N1bICD蛋白表达在HEK293T的细胞核中; 双荧光素酶实验显示pGL3-*hsp70*-pro报告基因在HEK293T细胞中具有活性, 是阴性对照质粒的3.7倍; 在HEK293T细胞中pCMV-N1aICD和pCMV-N1bICD真核表达载体能够显著增强pGL3-*hsp70*-pro的活性, 分别为对照组的4.9倍和5.1倍。实验结果表明斑马鱼 *notch1a* 和 *notch1b* 基因可显著增强 *hsp70* 基因的表达, 为进一步研究Notch分子通过Hsp70进行抗感染免疫的分子机制提供了实验材料并奠定了理论基础。

关键词: *notch1a*; *notch1b*; *hsp70*; 双荧光素酶报告基因; 细胞凋亡; 斑马鱼

中图分类号: Q344⁺.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2024)05-0829-10



细胞凋亡(Apoptosis)是在宿主自身生理机能或其他外界环境因子作用影响下, 通过去除各种受损的和一些不必要的细胞来维持宿主内环境物质的基本稳定^[1]。热休克蛋白(Heat shock proteins, Hsp)是一组高度保守的蛋白, 参与应激条件下细胞内分子的运输和保护。热休克蛋白70 (Hsp70)是热休克蛋白家族的重要成员和主要分子伴侣, 在细胞的细胞质和细胞核中参与蛋白质的折叠和易位。当细胞受到缺氧、热休克等刺激破坏时, 促凋亡因子将被激活释放进入到胞质, 形成凋亡小体并导致细胞发生凋亡^[2], 同时细胞会表达高水平的Hsp70, 在多

个水平上通过修复、重新合成受损蛋白并稳定未折叠蛋白来抑制细胞色素C的释放, 阻止Caspase-3活化上游细胞凋亡信号^[3]。银色鲮脂鲤(*Prochilodus argenteus*)作为洄游性鱼类, 非洄游期精巢内Hsp70显著升高并抑制Caspase-3活性, 保护生殖细胞免受Caspase-3依赖性凋亡^[4]。氧化应激会导致鲢(*Mugil cephalus*)肝细胞受损, 肝细胞中Hsp70的上调可以抑制细胞凋亡信号调节激酶1蛋白的表达, 抵抗应激条件下肝细胞的凋亡^[5]。重组哈维弧菌(*Vibrio harveyi*)溶血素刺激海鲷(*Mylio macrocephalus*)成纤维细胞后, 降低细胞线粒体膜电位并激活

收稿日期: 2023-10-09; 修订日期: 2023-11-28

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项(2019YFD0900102); 教育部留学回国人员科研启动基金(D-8002-15-0042); 水产动物疾病与基因编辑育种的平台建设和前沿科学研究项目(A1-3201-19-3013)资助 [Supported by the National Key Research and Development Plan “Blue Granary Science and Technology Innovation” Project (2019YFD0900102); Ministry of Education Returnee Scientific Research Start-up Fund (D-8002-15-0042); Platform Construction and Cutting-edge Scientific Research project of Aquatic Animal Disease and Gene Editing Breeding (A1-3201-19-3013)]

作者简介: 王子睿(1997—), 男, 硕士研究生; 研究方向为水产动物免疫学。E-mail: zrwang970910@163.com

通信作者: 张庆华, 教授; 主要从事水产动物病害及控制方法的研究。E-mail: qhzhang@shou.edu.cn

Caspase-3诱导细胞凋亡,通过急性热休克升高Hsp70表达量,同时抑制细胞凋亡^[6]。由此可见,Hsp70的抗凋亡功能在鱼类应对环境条件变化及抗病原菌感染方面发挥重要作用。

Notch信号通路是众多蛋白分子组成的复杂信号传导系统,参与跨物种的各种生物学过程,例如器官形成、组织功能和组织修复等^[7]。成熟的Notch分子是由胞外结构域(Notch extracellular domain, NECD)、跨膜域(Transmembrane domain, TM)和胞内段(Notch intracellular domain, NICD)组成^[8],新合成出的Notch在S1位点被Furin-like蛋白酶切割,形成一个以非共价键结合的单次跨膜蛋白。当胞外段与相邻细胞的配体结合后,Notch受体构象发生变化暴露出S2位点,使其被ADAM金属蛋白酶切割部分胞外段。最后在S3位点由 γ -分泌酶切割跨膜域并形成成熟的胞内段NICD,再与DNA连接蛋白CSL(CBF-1, Su(H), Lag-1)结合^[9],在MAM(Mastermind)/Lag-3蛋白识别后三者形成Notch转录激活复合物,从而调控下游靶基因的转录和翻译^[10]。因此,Notch信号可能在几个水平上受到调控,包括配体结合受体及在运输过程中Notch组分与伴侣蛋白的相互作用^[11]。在哺乳动物中Notch1参与细胞凋亡已得到很好的证实。在人类成体细胞中发现提高Notch1和Notch3的表达量,可以显著促进血管平滑肌细胞生长的同时抑制细胞凋亡^[12]。在人类喉鳞状细胞癌组织中降低Notch1的表达可以抑制癌细胞生长,诱导癌细胞凋亡^[13]。

在斑马鱼(*Danio rerio*)中存在*notch1a*和*notch1b*两个同源保守基因,与哺乳动物的*notch1*基因高度相似。目前对Notch1a的研究主要关注于造血功能和骨髓生成^[14]方面的作用,Notch1b在斑马鱼胚胎发育过程参与心脏瓣膜的形成^[15]和血管生成^[16]。研究发现在青鳉(*Oryzias latipes*)中高温热休克条件下青鳉精巢内细胞大量凋亡,同时*notch1a*和*notch3*基因表达量升高,如果抑制Notch1a的活性会导致精原干细胞的减少,因此Notch1a能保护精原干细胞免受热应激导致的细胞凋亡^[17]。鲤(*Cyprinus carpio*)胚胎在胚孔闭合阶段对热应激高度敏感,高温刺激胚胎会增加胚胎中Caspase-3介导的细胞凋亡,激活Hsp70可以抑制凋亡体的形成^[18],因此Notch1a和Hsp70均具有保护鱼类细胞免受热应激导致凋亡的功能。野生小鼠中发现Notch的配体Jagged1和Delta-like1刺激活化的CD4 T细胞后,细胞免疫共沉淀显示Hsp70和Notch1之间存在直接相互作用,共定位于CD4 T的细胞核中^[11],但在硬骨鱼类中*hsp70*基因与Notch信号通路之间是否存在相

应的调控关系未有报道,我们猜测Notch1a和Notch1b会通过调控*hsp70*进而影响细胞的凋亡。

斑马鱼作为常见的模式生物其基因组信息明确,70%的人类基因至少有一个斑马鱼直系同源基因^[19],大部分凋亡基因在斑马鱼与脊椎动物上有很高的保守性,同时许多诱导哺乳动物细胞凋亡及检测凋亡的实验方法对斑马鱼也有效^[20],因此后续在斑马鱼体内研究凋亡和免疫具有很好的优势^[21]。斑马鱼中存在的Notch1a和Notch1b是否具有与哺乳动物的Notch1相似的生物学功能目前并不清楚,因此本研究以斑马鱼为研究对象,克隆*notch1a*和*notch1b*基因的胞内段序列,即从S3酶切位点开始,包含一个RAM结构域、ANK重复序列和一个PEST结构域^[22]的胞内段,构建pCMV-N1aICD、pCMV-N1bICD真核表达载体和pGL3-*hsp70*-pro报告基因,利用双荧光素酶报告基因系统探究*notch1a*和*notch1b*基因与*hsp70*基因的调控关系,旨在为Notch分子的功能研究及鱼类细胞凋亡的分子调控机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验用鱼为AB品系野生型斑马鱼,购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所斑马鱼技术平台。成熟斑马鱼交配产卵后由本实验室饲养,参照(http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html)养殖方法进行,遵照上海海洋大学实验动物伦理委员会的批准(SHOU-DW-2016-002)进行相应的实验,pCMV-Tag2B载体、pGL3-Enhancer载体、内参质粒phRL-TK和HEK293T细胞(人胚肾细胞)由海军军医大学李楠教授惠赠;pMD™19-T Vector Cloning Kit (Takara, 6013),T4连接酶(NEB, M0202S),同源重组连接酶(Vazyme, C112-01),Hieff Trans[®] Liposomal Transfection Reagent (YASSEN, 40802ES02),小鼠抗FLAG-tag单克隆抗体(YASSEN, 30503ES60),Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (Invitrogen, 31430),HRP Conjugated Anti-beta Actin Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody (Huabio, ET1702-67),Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen, 1834337),Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit (YASSEN, 11402ES60)。

1.2 斑马鱼*notch1a*、*notch1b*基因系统发育分析

登录NCBI网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),搜索在线数据库中的Nucleotide数据库,获得各物种的*notch1*和斑马鱼*notch1a*、*notch1b*基因的氨基

酸序列, 将搜索到的氨基酸序列导入MEGA7.0软件中, 用邻接法构建系统进化树。通过DNAMAN将斑马鱼Notch1a及Notch1b氨基酸序列分别与人和小鼠的Notch1氨基酸序列进行比对。

1.3 斑马鱼*notch1a*、*notch1b*基因扩增

首先从NCBI网站下载斑马鱼*notch1a*基因(NM_131441.1)和*notch1b* 基因(NM_131302.2)的CDS序列, 提取受精后1 d的斑马鱼RNA并反转录成cDNA, 根据表 1引物*notch1a*-F1/R1和*notch1b*-F1/R1分别扩增*notch1a*基因和*notch1b*基因, 将PCR产物连接到pMD-19T载体上。将连接产物加置DH5α感受态细胞内进行转化, 涂板挑选单个菌落进行扩播并送测鉴定, 测序成功后提取质粒。

1.4 构建斑马鱼N1aICD和N1bICD真核表达载体

根据目的基因序列及pCMV-Tag2B载体序列

表 1 实验所用引物序列

Tab. 1 Primer sequence used in the experiment

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'—3')	用途 Usage
<i>notch1a</i> -F1	GGCCTCCAGTGGAACCT	CDS 序列扩增 Amplification of CDS sequences
<i>notch1a</i> -R1	CTACTTGAAGGCTTCTGG AATATG	
<i>notch1b</i> -F1	CAAAGGCTCCGTGGTTTA T	
<i>notch1b</i> -R1	AAGCAGGCTTATGGAATG TG	
<i>notch1a</i> -F2	CGCGGATCCTCCAGGAAG AGGAAGCGGG	表达载体构建 Construction of expression vector
<i>notch1a</i> -R2	CCCAAGCTTCTTGAAGGC TTCTGGAATATGGTTCATC	
<i>notch1b</i> -F2	CGCGGATCCTCCCGTAAA CGGCGCCG	
<i>notch1b</i> -R2	CCCAAGCTTCTTGAATTGC TCGGGCATGTG	
<i>hsp70</i> -F	CGAGCTCTTACGCGTGCT AGCTGAAGTGGACGGATT GAGTGA	报告基因载体构建 Construction of reporter gene vector
<i>hsp70</i> -R	ACTTAGATCGCAGATCTC GAGAAACACCTCGTCGGG GAAAA	

特点, 选择*Bam*H I 和*Hind* III作双酶切位点, 以上一步所得质粒为模板设计引物*notch1a*-F2/R2和*notch1b*-F2/R2 (表 1), 扩增自S3酶切位点后的胞内段NICD序列(图 1)。将PCR扩增产物和表达载体pCMV-Tag2B通过限制性内切酶进行双酶切, 并通过T4连接酶进行连接, 将连接产物加置DH5α感受态细胞内进行转化, 涂板挑选单个菌落进行扩播并送测鉴定, 测序成功后提取无内毒素质粒, 于-20℃保存备用。获得pCMV-N1aICD和pCMV-N1bICD的真核表达载体质粒, 用Snapgene软件构建质粒图谱。

1.5 Western Blot法分析N1aICD和N1bICD蛋白的表达

首先将生长状态良好的HEK293T细胞接种到6孔细胞培养板中, 置37℃待细胞达到70%—80%融合率时开始进行转染。用Hieff Trans[®] Liposomal Transfection Reagent转染试剂将pCMV-N1aICD、pCMV-N1bICD和pCMV-Tag2B载体质粒转染至HEK293T细胞, 均转染1000 ng, 24h后提取总蛋白, 取30 μL蛋白样品进行SDS-PAGE聚丙烯酰胺凝胶电泳, 通过湿转转膜法将跑完电泳的总蛋白转至NC膜上, 用5%的脱脂奶粉在室温下封闭1h, PBST漂洗5min, 重复3次。鼠源FLAG-tag抗体1:2000稀释后, 置于4℃冰箱孵育过夜, PBST漂洗5min, 重复3次。山羊抗鼠抗体1:2000稀释后孵育3h, PBST漂洗5min, 重复3次。配制显色液, 均匀滴于NC膜上, 观察Western Blot结果条带。

1.6 亚细胞定位检测N1aICD和N1bICD蛋白表达

首先将生长状态良好的HEK293T细胞接种到35 mm细胞培养皿中, 置37℃待细胞达到70%—80%融合率时开始进行转染。用转染试剂将pCMV-N1aICD、pCMV-N1bICD和pCMV-Tag2B载体质粒均转染2000 ng。转染24h后, 在培养皿中加1 mL

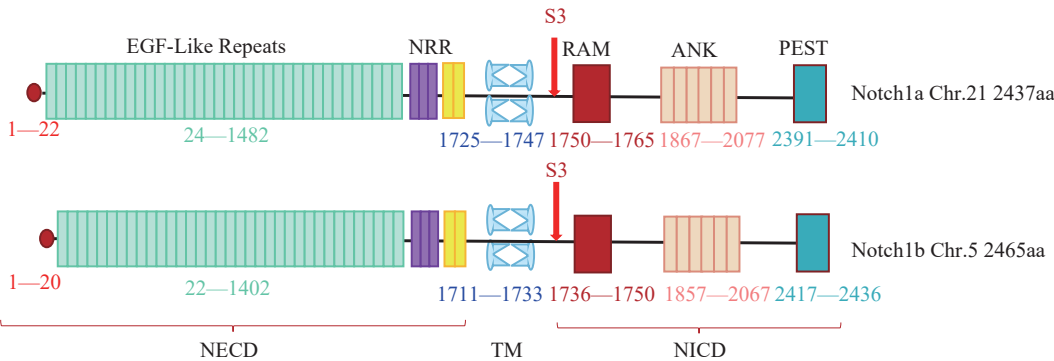


图 1 斑马鱼Notch1a和Notch1b结构示意图

Fig. 1 Structure diagram of zebrafish Notch1a and Notch1b

NECD. 胞外结构域; TM. 跨膜域; NICD. 胞内段

NECD. Notch extracellular domain; TM. Transmembrane domain; NICD. Notch intracellular domain

4%多聚甲醛固定15min, 贴壁吸去固定液, 加入1×PBS 漂洗5min, 重复3次。在培养皿中加500 μL提前预冷处理过的100%甲醇透化培养细胞, 置于-20℃冰箱孵育10min, 加入1×PBS 漂洗5min, 重复此操作3次。加入封闭缓冲液(1×PBS/5% 正常山羊血清/0.3% Triton X-100)封闭样品1h。吸去封闭缓冲液, 孵育一抗(1×PBS/1% BSA/0.3% TritonX-100/1:1000 小鼠抗 FLAG-tag 单克隆抗体), 置于4℃冰箱过夜, 加入1×PBS 漂洗5min, 重复3次。加入包含偶联荧光素的二抗, 并室温下避光孵育1—2h, 用1×PBS 漂洗3次, 再加入DAPI, 避光孵育1—2h。用1×PBS漂洗3次后, 在共聚焦显微镜(Leica, STELLARIS 5)下用明场及荧光观察样本并拍照记录。

1.7 斑马鱼 *hsp70* 启动子报告基因构建

运用在线工具 UCSC genome browse (<http://www.genome.ucsc.edu>)预测 *hsp70* 基因启动子序列。通过 Methprimer-Design (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>)软件进行预测 *hsp70* 基因启动子的 CpG 岛。使用 AliBaba2.0 (<http://gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>)软件预测转录因子结合位点。根据启动子的自身序列以及所用载体 pGL3-Enhancer 设计引物, 并在正反引物前添加同源臂(表1)。PCR 反应所用模板为受精后1d的斑马鱼基因组, 将报告基因载体 pGL3-Enhancer 通过限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Xho* I 进行双酶切。将PCR产物及线性化的载体进行纯化处理之后, 用同源重组连接酶 ClonExpress Mix 将这二者充分混合后并在PCR仪中进行50℃反应30min, 将连接产物冰浴反应5min加置DH5α感受态细胞内进行转化, 涂板挑选单个菌落, 扩播后送测鉴定。

1.8 *hsp70* 启动子报告基因的活性检测

HEK293T 细胞置于24孔细胞培养板培养, 铺板时计算细胞密度, 1.0×10^5 个细胞/孔, 24h后融合率达到70%—80%即可进行转染。按体系(表2)转染24h后用双荧光素酶报告基因实验分析 *hsp70* 启动子活性。

1.9 检测 *notch1a*、*notch1b* 对 *hsp70* 作用

HEK293T 细胞置于24孔细胞培养板培养, 铺板

表2 *hsp70* 报告基因活性检测转染体系

Tab. 2 Transfection system for detecting *hsp70* promoter reporter gene activity

组别 Group	pGL3- Enhancer (ng)	pGL3- <i>hsp70</i> - pro (ng)	pRL- TK (ng)
1	200	0	20
2	0	200	20

时计算细胞密度, 1.0×10^5 个细胞/孔, 24h后融合率达到70%—80%即可进行转染。将内参质粒 pRL-TK、pCMV-N1aICD、pCMV-N1bICD 和 pGL3-*hsp70*-pro, 配制转染体系后按不同分组(表3)将转染复合物加入到24孔板的 HEK293T 细胞中, 过表达 *notch1a* 和 *notch1b* 基因24h后检测 *hsp70* 启动子活性。

每组有3次技术重复, 实验重复3次, 结果用平均值±标准误(mean±SE)表示, 用 Prism 6.0 软件进行显著性差异分析, $P < 0.05$ 时, 认为具有显著性差异。

表3 转染复合物配制表

Tab. 3 Formulation table of transfected compound

组别 Group	pCMV- Tag2B (ng)	N1aICD (ng)	N1bICD (ng)	pGL3- <i>hsp70</i> - pro (ng)	pRL-TK (ng)
1	200	0	0	100	10
2	0	200	0	100	10
3	0	0	200	100	10

2 结果

2.1 斑马鱼 *notch1a*、*notch1b* 基因系统发育分析

通过 DNAMAN 软件将斑马鱼 Notch1a 及 Notch1b 氨基酸序列与人 (*Homo sapiens*) 和小鼠 (*Mus musculus*) 的 Notch1 氨基酸序列进行比对, 斑马鱼的 Notch1a 氨基酸序列与人 (NP_060087.3) 和小鼠 (NP_032740.3) 的 Notch1 的一致性分别为 66.86% 和 64.41%, Notch1b 氨基酸序列与人和小鼠的 Notch1 的一致性分别为 67.67% 和 67.72%, 斑马鱼 Notch1a 及 Notch1b 氨基酸序列的一致性为 68.72% (表4)。

表4 斑马鱼 Notch1a、Notch1b 和人、小鼠 Notch1 氨基酸相似性分析(%)

Tab. 4 Amino acid similarity analysis of zebrafish Notch1a, Notch1b, human and mouse Notch1 (%)

物种 Species	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>		人 <i>Homo sapiens</i>	小鼠 <i>Mus musculus</i>
	Notch1a	Notch1b	Notch1	Notch1
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	Notch1a	100.00	68.72	66.86
	Notch1b	68.72	100.00	67.67
				64.41
				67.72

为了分析斑马鱼 *notch1a* 和 *notch1b* 基因的系统进化关系, 本研究通过 MEGA 7.0 软件中的邻接法比对相应序列, 将斑马鱼中的 Notch1a 和 Notch1b 氨基酸序列与哺乳类、鸟类及其他鱼类等相关物种的 Notch1 氨基酸序列进行比对, 构建进化树(图2)。结果表明斑马鱼与鲤 (*Cyprinus carpio*)、鲫 (*Carassius auratus*) 等鲤科鱼类进化距离最近, 鱼类中斑马鱼与其他硬骨鱼类的 Notch1a 和 Notch1b 各自聚为

一支, 哺乳动物和鸟类的 *Notch1* 形成各自的分支。

2.2 斑马鱼 pCMV-N1aICD 和 pCMV-N1bICD 真核表达载体的构建及验证

克隆出斑马鱼 *notch1a* 和 *notch1b* 基因的胞内段后进行电泳(图 3A), 其中 *notch1a* 胞内段序列长度为 2067 bp, *notch1b* 胞内段序列长度为 2196 bp, 将 PCR 产物进行纯化处理后与双酶切线性化后的 pCMV-Tag2B 载体用 T4 连接酶进行了连接, 测序验证构建质粒与预测结果一致。

为验证重组质粒在细胞中的表达情况, 我们用 pCMV-Tag2B 和重组质粒转染 HEK293T 细胞 24h 培养后, 提取细胞内的总蛋白, 通过 Western Blot 利用鼠源 FLAG-tag 标签特异性抗体进行检测, 发现了特异性目的条带的表达(图 3B), 而转染 pCMV-Tag2B 的对照组未检测出目的蛋白。将重组质粒命名为 pCMV-N1aICD(图 3C) 和 pCMV-N1bICD(图 3D)。

2.3 亚细胞定位检测 N1aICD 和 N1bICD 的表达位置

为确认重组质粒 pCMV-N1aICD 和 pCMV-N1bICD 在细胞中的表达位置, 我们用 DAPI 试剂对 HEK-293T 细胞染色, 使细胞核能发出蓝色荧光, FLAG 抗体标记重组质粒(绿色荧光), 并对细胞分别进行了明场和荧光观察, 同时 pCMV-Tag2B 质粒用作阴性对照, 能够观察到 N1aICD 和 N1bICD 在 HEK293T 细胞核中正常表达(图 4)。

2.4 斑马鱼 *hsp70* 启动子序列分析结果

通过 Methprimer-Design 软件预测发现斑马鱼 *hsp70* 启动子上同时存在 2 个 CpG 岛(图 5A)。使用 AliBaba 软件系统预测发现斑马鱼 *hsp70* 启动子上存在 NF-1、NF-kappaB、Oct-1、Sp-1、GATA-1 和

HSF 等重要的转录因子结合位点(图 5B)。

2.5 *hsp70* 启动子报告基因的构建及活性检测

克隆 *hsp70* 启动子片段后进行电泳(图 6A), 获得 *hsp70* 启动子序列长度为 3173 bp 的条带, 将 PCR 产物进行纯化处理后与双酶切后的线性化载体 pGL3-Enhancer 连接, 测序检验克隆成功。将 pGL3-*hsp70*-pro 报告基因转染 HEK293T 细胞, 对照组转染 pGL3-Enhancer, 24h 后进行双荧光素酶报告基因活性检测。检测结果显示 pGL3-*hsp70*-pro 活性为对照组质粒的 3.7 倍(图 6B), 说明构建的斑马鱼 pGL3-*hsp70*-pro 报告基因具有转录活性。

2.6 斑马鱼 *notch1a* 和 *notch1b* 可促进 *hsp70* 启动子转录活性

将构建好的 pCMV-N1aICD 和 pCMV-N1bICD 质粒分别与 pGL3-*hsp70*-pro 质粒共同转染至 HEK293T 细胞中。在 24h 检测显示过表达 *notch1a* 后 pGL3-*hsp70*-pro 的报告基因转录活性为对照组的 4.9 倍, 过表达 *notch1b* 后 pGL3-*hsp70*-pro 的报告基因转录活性为对照组的 5.1 倍, 二者均对 pGL3-*hsp70*-pro 报告基因有显著的促进作用(图 7)。

3 讨论

目前在斑马鱼 DNA 数据库中发现了 *bcl-2* 家族、凋亡诱导因子 *bax* 和 *caspase* 家族等几类细胞凋亡相关的基因^[23], 在鱼类及哺乳动物细胞凋亡调节中都有各自的同源基因, 这表明斑马鱼和其他鱼类以及高等脊椎动物进化过程中大多数凋亡途径的分子机制是高度保守的^[24], 因此斑马鱼已被广泛应用于研究胚胎发育、免疫应答及应激过程中的细

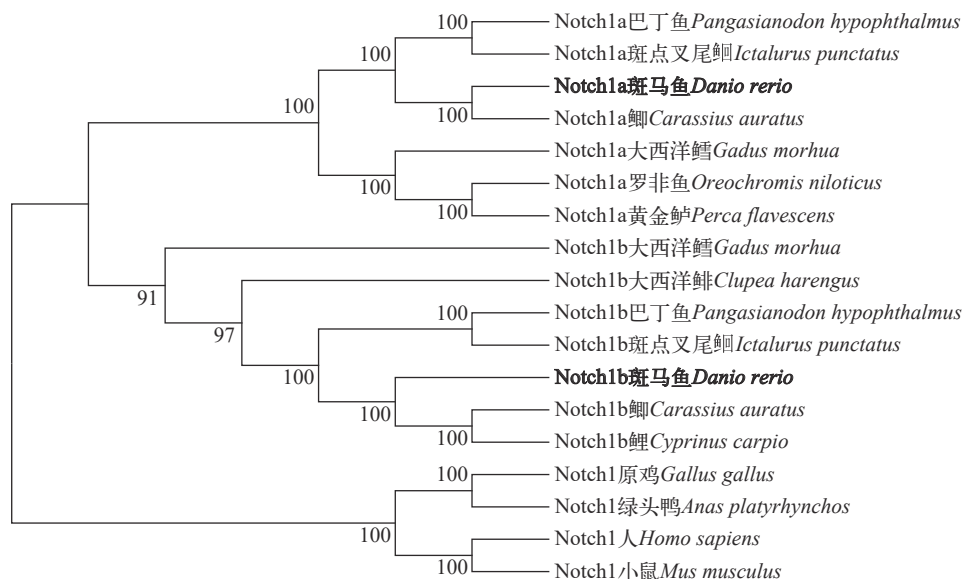


图 2 NJ法构建Notch1进化树

Fig. 2 Construction of Notch1 evolutionary tree by NJ method

胞凋亡。

Notch信号在许多物种中被发现是调节细胞命运的重要通路, Notch分子的结构和功能在不同物种间具有一定的保守性, 通过复杂的分子机制参与生物体细胞的凋亡和免疫功能^[25]。在长期的进化过程中, 斑马鱼有*notch1a*和*notch1b*两个同源基因, 二者的氨基酸序列与人类Notch1的一致性分别高达66.86%和67.67%, 与小鼠Notch1的一致性分别高达64.41%和67.72%。在大鼠中胆碱可促进热休克转录因子HSF (Heat shock transcription factor, HSF) 和Notch1胞内段的表达, 从而减轻药物诱导的大鼠心肌细胞凋亡^[26]。Notch1的胞内段N1ICD被Nrf2启动子募集后进而激活Nrf2通路, 共同控制神经元的分化和凋亡^[27]。而鱼类Notch1a和Notch1b在细胞凋亡中的确切作用目前还知之甚少, 在本实验中以构建的斑马鱼pCMV-N1aICD和pCMV-N1bICD载体质粒作为研究工具, 发现两者的亚细胞定位均在细胞核中, 与哺乳动物中Notch1胞内段的亚细胞定位相一致, 推测他们可能具有哺乳动物Notch1的

类似功能。

Hsp70作为抗凋亡蛋白在细胞中通过多种方式干扰细胞凋亡, 涉及鱼类对环境污染物和食物毒素的应激反应^[28], 因此也被称为应激蛋白^[29]。虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 应对热应激会通过上调Hsp70的表达来恢复受损蛋白质的结构, 抑制细胞凋亡来发挥抗热应激作用^[30]。高温会导致暗纹东方鲀 (*Ta-kifugu obscurus*) 血细胞产生内源性活性氧致使细胞凋亡, Hsp70可以重新组装变性的蛋白质并消除有毒的活性氧积累, 保护暗纹东方鲀免受氧化应激^[31]。在皮质醇应激条件下, 海鲈 (*Perca fluviatilis*) 的头肾细胞高表达的Hsp70可以使细胞能够在损伤刺激中存活^[32], 因此Hsp70对鱼类个体健康生长和维持自身免疫功能具有重要意义。本实验克隆了斑马鱼*hsp70*启动子, 用同源重组技术构建了pGL3-*hsp70*-pro报告基因载体, 在HEK293T细胞中检测其具有较高的活性, 且双荧光素酶报告基因系统研究结果表明, 斑马鱼分化出来的*notch1a*和*notch1b*对*hsp70*的转录活性均有促进作用, 而且二者对*hsp70*的调

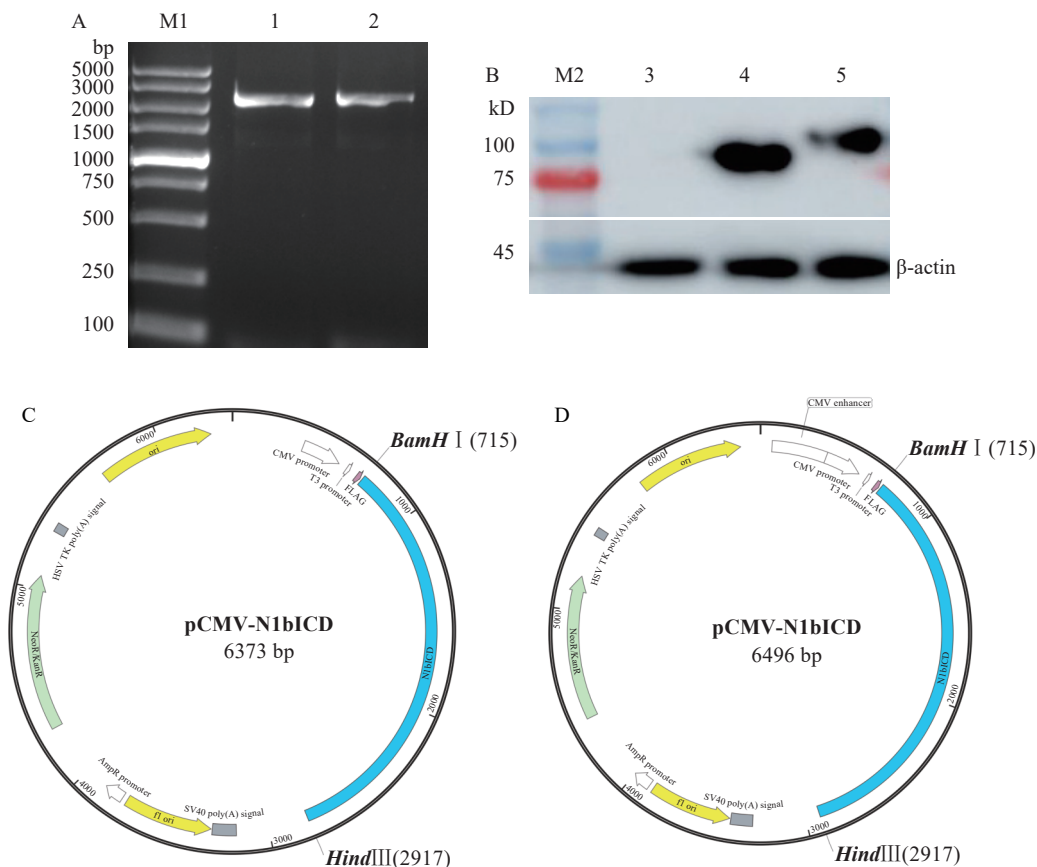


图3 pCMV-N1aICD和pCMV-N1bICD真核表达载体的构建及验证

Fig. 3 Construction and validation of pCMV-N1aICD and pCMV-N1bICD eukaryotic expression vectors

M1. DL5000 DNA Marker; 1. *notch1a*基因胞内段; 2. *notch1b*基因胞内段; M2. 蛋白分子量标准; 3. pCMV-Tag2B; 4. pCMV-N1aICD; 5. pCMV-N1bICD

M1. DL5000 DNA Marker; 1. N1aICD; 2. N1bICD; M2. protein marker; 3. pCMV-Tag2B; 4. pCMV-N1aICD; 5. pCMV-N1bICD

控作用相似,可能共同参与了斑马鱼细胞凋亡的调控。在小鼠RAW 264.7巨噬细胞中发现Notch1可以激活NF- κ B信号通路并参与调控巨噬细胞的凋亡^[33]。本研究通过生信分析发现斑马鱼*hsp70*启动子上同样存在NF- κ B等转录因子结合位点,因此我们猜测斑马鱼Notch1a和Notch1b可能通过NF- κ B途

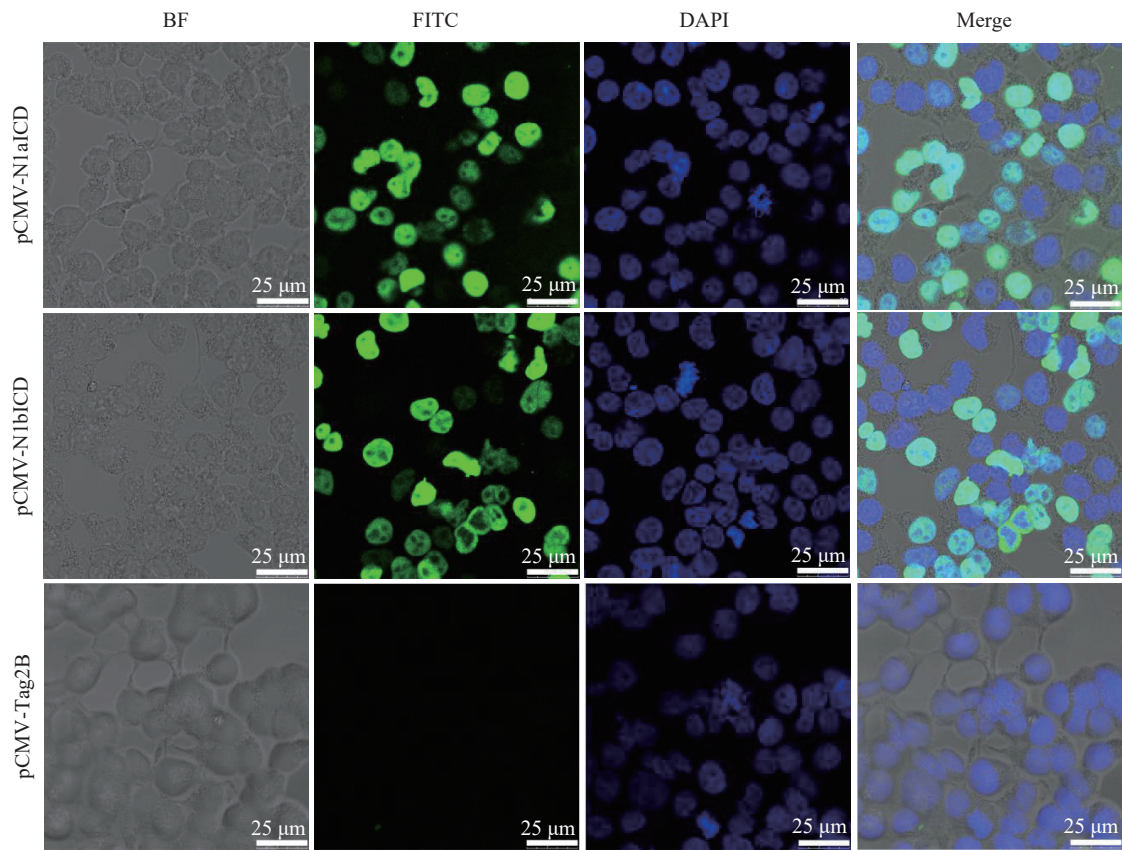


图 4 N1aICD和N1bICD在HEK293T细胞中的定位
Fig. 4 Localization of N1aICD and N1bICD in HEK293T cells

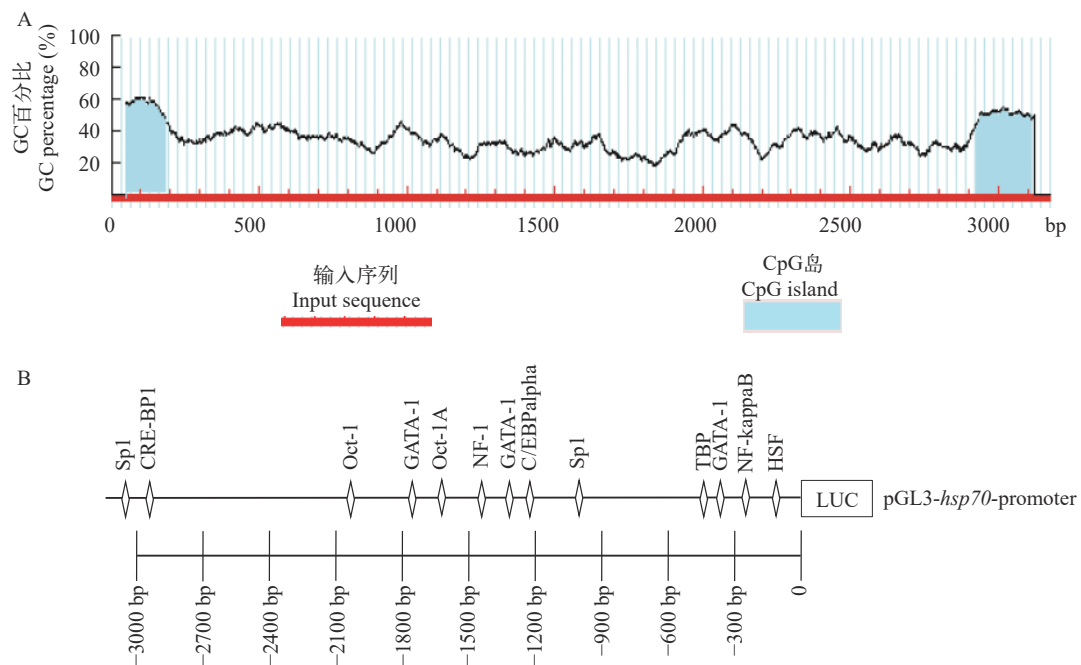


图 5 斑马鱼*hsp70*启动子CpG岛和转录因子结合位点的预测
Fig. 5 Prediction of CpG island and transcription factor binding sites in zebrafish *hsp70* promote

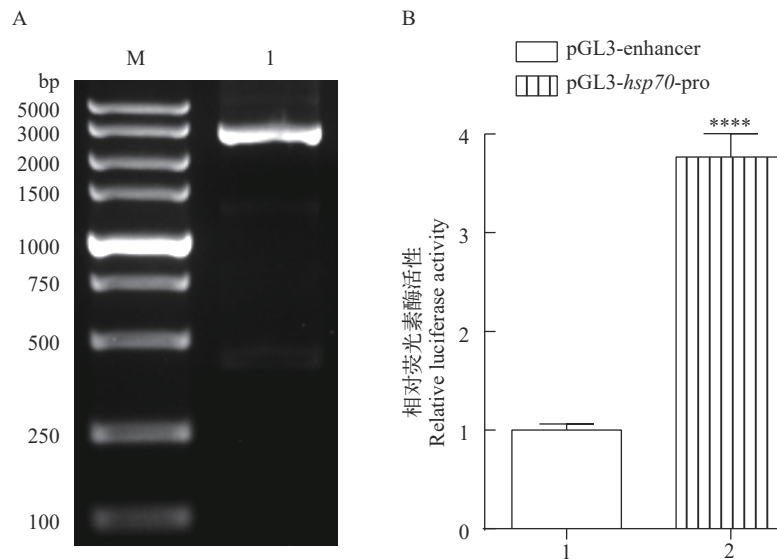


图 6 pGL3-*hsp70*-pro 报告基因的构建及活性检测

Fig. 6 Construction and activity detection of pGL3-*hsp70*-pro reporter gene

M. DL5000 DNA Marker; 1. *hsp70* 启动子的扩增; **表示与对照组有极显著性差异 ($P < 0.01$)

M. DL5000 DNA Marker; 1. cloning of *hsp70* promoter; ** means very significant difference compare with the control ($P < 0.01$)

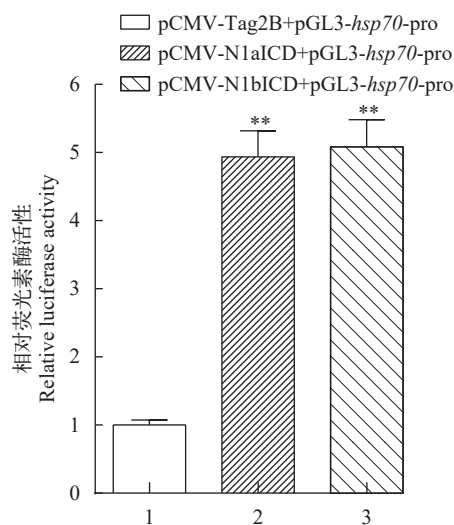


图 7 验证 N1aICD 和 N1bICD 对 pGL3-*hsp70*-pro 转录活性的影响
Fig. 7 Verification the effects of N1aICD and N1bICD on pGL3-*hsp70*-pro transcriptional activity

**表示与对照组有极显著性差异 ($P < 0.01$); 1. pCMV-Tag2B+pGL3-*hsp70*-pro; 2. pCMV-N1aICD+pGL3-*hsp70*-pro; 3. pCMV-N1bICD+pGL3-*hsp70*-pro

**means very significant difference compare with the control ($P < 0.01$); 1. pCMV-Tag2B+pGL3-*hsp70*-pro; 2. pCMV-N1aICD+pGL3-*hsp70*-pro; 3. pCMV-N1bICD+pGL3-*hsp70*-pro

径进而影响 *hsp70*, 这需要进一步的研究来证明, 希望我们构建的 *hsp70* 报告基因可以为后续探究该基因在鱼类免疫及抗凋亡信号通路中的具体机制提供帮助。

在养殖过程中鱼类容易接触环境中的重金

属、病原菌和氨等不良因素, 而 Hsp70 已经被证明在鱼类及哺乳类免疫系统、细胞凋亡和炎症过程中具有非常重要的作用。本研究使用双荧光素酶报告基因系统, 在斑马鱼中发现 *notch1a* 和 *notch1b* 对 *hsp70* 具有正向调控作用, 实验结果可以为后续进一步研究鱼类不同信号途径在细胞凋亡和免疫应答中的作用机制提供帮助, 对其他经济鱼类的细胞凋亡调控、抵抗病原感染及绿色生物制剂的开发提供了新的靶点。

参考文献:

- [1] Chen F J, Fu S Y, Ma M, *et al.* Hypoxia stress on the activity of antioxidant enzymes, neuronal apoptosis and expression of related genes of telencephalon in *Gymno-cypris przewalski* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2023, **47**(4): 572-580. [陈付菊, 付生云, 马敏, 等. 低氧胁迫对青海湖裸鲤端脑抗氧化酶活性、细胞凋亡及相关基因表达的影响 [J]. 水生生物学报, 2023, **47**(4): 572-580.]
- [2] Guo Z, Song T, Wang Z, *et al.* The chaperone Hsp70 is a BH3 receptor activated by the pro-apoptotic Bim to stabilize anti-apoptotic clients [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, **295**(37): 12900-12909.
- [3] Kong F, Wang H, Guo J, *et al.* Hsp70 suppresses apoptosis of BRL cells by regulating the expression of Bcl-2, cytochrome C, and caspase 8/3 [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 2016, **52**(5): 568-575.
- [4] Domingos F F T, Thomé R G, Martinelli P M, *et al.* Role of HSP70 in the regulation of the testicular apoptosis in a seasonal breeding teleost *Prochilodus argenteus* from the São Francisco River, Brazil [J]. *Microscopy Research and*

- Technique*, 2013, **76**(4): 350-356.
- [5] Padmini E, Tharani J. Heat-shock protein 70 modulates apoptosis signal-regulating kinase 1 in stressed hepatocytes of *Mugil cephalus* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2014, **40**(5): 1573-1585.
- [6] Deane E E, Jia A, Qu Z, *et al.* Induction of apoptosis in sea bream fibroblasts by *Vibrio harveyi* haemolysin and evidence for an anti-apoptotic role of heat shock protein 70 [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2012, **35**(4): 287-302.
- [7] Zhou B, Lin W, Long Y, *et al.* Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2022, **7**(1): 95.
- [8] Bi P, Kuang S. Notch signaling as a novel regulator of metabolism [J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2015, **26**(5): 248-255.
- [9] Tabaja N, Yuan Z, Oswald F, *et al.* Structure-function analysis of RBP-J-interacting and tubulin-associated (*RITA*) reveals regions critical for repression of Notch target genes [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, **292**(25): 10549-10563.
- [10] Langridge P D, Struhl G. Epsin-dependent ligand endocytosis activates Notch by force [J]. *Cell*, 2017, **171**(6): 1383-1396.
- [11] Juryńczyk M, Lewkowicz P, Domowicz M, *et al.* Heat shock protein 70 (Hsp70) interacts with the Notch1 intracellular domain and contributes to the activity of Notch signaling in myelin-reactive CD4 T cells [J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2015(287): 19-26.
- [12] Sweeney C, Morrow D, Birney Y A, *et al.* Notch 1 and 3 receptors modulate vascular smooth muscle cell growth, apoptosis and migration via a CBF-1/RBP-Jk dependent pathway [J]. *The FASEB Journal*, 2004, **18**(12): 1421-1423.
- [13] Dai M, Fang F, Zou Y, *et al.* Downregulation of Notch1 induces apoptosis and inhibits cell proliferation and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Oncology Reports*, 2015, **34**(6): 3111-3119.
- [14] Bugeon L, Taylor H B, Prohazky F, *et al.* The NOTCH pathway contributes to cell fate decision in myelopoiesis [J]. *Haematologica*, 2011, **96**(12): 1753-1760.
- [15] Fontana F, Haack T, Reichenbach M, *et al.* Antagonistic activities of Vegfr3/Flt4 and Notch1b fine-tune mechanosensitive signaling during zebrafish cardiac valvulogenesis [J]. *Cell Reports*, 2020, **32**(2): 107883.
- [16] Hu Y X, Zhu R F, Qin Y W, *et al.* Zfp3611b protects angiogenesis through *Notch1b/Dll4* and *Vegfa* regulation in zebrafish [J]. *Atherosclerosis*, 2020(309): 56-64.
- [17] Moreno Acosta O D, Boan A F, Hattori R S, *et al.* Notch pathway is required for protection against heat stress in spermatogonial stem cells in medaka [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2023, **49**(3): 487-500.
- [18] Sales C F, Lemos F S, Morais R D V S, *et al.* Thermal stress induces heat shock protein 70 and apoptosis during embryo development in a Neotropical freshwater fish [J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 2019, **31**(3): 547-556.
- [19] Howe K, Clark M D, Torroja C F, *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. *Nature*, 2013, **496**(7446): 498-503.
- [20] Eimon P M, Ashkenazi A. The zebrafish as a model organism for the study of apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2010, **15**(3): 331-349.
- [21] Wang L, Liang X F, Liao W Q, *et al.* Research progress on cell apoptosis during embryonic development of the zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Hereditas*, 2006, **28**(8): 1009-1014. [王琳, 梁旭方, 廖婉琴, 等. 斑马鱼胚胎发育中细胞凋亡的研究进展 [J]. *遗传*, 2006, **28**(8): 1009-1014.]
- [22] Pancewicz J. A brief overview of clinical significance of novel Notch2 regulators [J]. *Molecular & Cellular Oncology*, 2020, **7**(5): 1776084.
- [23] Eimon P M. Studying Apoptosis in the Zebrafish [M]. Regulated Cell Death Part A: Apoptotic Mechanisms. Amsterdam: Elsevier, 2014: 395-431.
- [24] Yamashita M. Apoptosis in zebrafish development [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, **136**(4): 731-742.
- [25] Artavanis-Tsakonas S, Rand M D, Lake R J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development [J]. *Science*, 1999, **284**(5415): 770-776.
- [26] Xu M, Bi X Y, Xue X R, *et al.* Activation of the M3AChR and Notch1/HSF1 signaling pathway by choline alleviates angiotensin II-induced cardiomyocyte apoptosis [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, **2021**: 1-17.
- [27] Chen Y, Pang J, Ye L, *et al.* Disorders of the central nervous system: insights from Notch and Nrf2 signaling [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2023, **166**: 115383.
- [28] Roberts R J, Agius C, Saliba C, *et al.* Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2010, **33**(10): 789-801.
- [29] Wu S N, Huai L L, Li H J, *et al.* Cloning and expression analysis of heat shock protein 70 gene from *Hyriopsis cumingii* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, **41**(1): 50-55. [吴圣楠, 隗黎丽, 李海军, 等. 三角帆蚌热休克蛋白70基因克隆及其表达分析 [J]. *水生生物学报*, 2017, **41**(1): 50-55.]
- [30] Li L, Liu Z, Quan J, *et al.* Comprehensive proteomic analysis to elucidate the anti-heat stress effects of nano-selenium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022(241): 113736.
- [31] Cheng C H, Yang F F, Liao S A, *et al.* High temperature induces apoptosis and oxidative stress in pufferfish (*Takifugu obscurus*) blood cells [J]. *Journal of Thermal Biology*, 2015(53): 172-179.

- [32] Celi M, Vazzana M, Sanfratello M A, *et al*. Elevated cortisol modulates *Hsp70* and *Hsp90* gene expression and protein in sea bass head kidney and isolated leukocytes [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, 175(3): 424-431.
- [33] Chen G Q, Wang Q M, Yu M, *et al*. Notch signaling is involved in regulation of LPS-induced macrophage apoptosis through JNK/NF- κ B signaling pathway [J]. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 2020, 34(1): 39-48.

REGULATION OF *HSP70* GENE BY *NOTCH1A* AND *NOTCH1B* IN ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)

WANG Zi-Rui^{1,2}, WANG Yu-Jie^{1,2}, ZHOU Ze-Bin^{1,2}, QIU Jun-Qiang^{1,2}, LI Wei-Ming³ and ZHANG Qing-Hua^{1,2}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Department of Fisheries and Wildlife, Michigan State University, East Lansing, MI 48824)

Abstract: The aim of this study was to investigate the regulatory role of zebrafish (*Danio rerio*) *notch1a* and *notch1b* genes on *hsp70* by using a dual luciferase reporter gene assay. The CDS sequences of zebrafish *notch1a* and *notch1b* genes were obtained through NCBI database search, and their intracellular domains (Notch1a/Notch1b intracellular domain, N1aICD/N1bICD) were cloned. Eukaryotic expression vectors, pCMV-N1aICD and pCMV-N1bICD, were constructed. The expressions of N1aICD and N1bICD were detected in human embryonic kidney cells (HEK293T) through Western Blot and subcellular localization. The zebrafish *hsp70* promoter sequence was analyzed, cloned, and incorporated into the pGL3-*hsp70*-pro reporter gene, which was constructed and assayed for dual luciferase activity in HEK293T. Overexpression of *notch1a* and *notch1b* genes in HEK293T cells was performed, and changes in pGL3-*hsp70*-pro activity were detected using a dual-luciferase reporter gene assay. The results showed that the successful construction of eukaryotic expression vectors pCMV-N1aICD and pCMV-N1bICD. Western Blot analysis confirmed the normal expression of pCMV-N1aICD and pCMV-N1bICD, while the subcellular localization assay showed the normal expression in the nucleus of HEK293T cells. The dual-luciferase reporter gene showed that the pGL3-*hsp70*-pro reporter gene was active in HEK293T cells, exhibiting activity 3.7 times higher than that of the empty plasmid. Additionally, the pCMV-N1aICD and pCMV-N1bICD eukaryotic expression vectors significantly enhanced the activity of pGL3-*hsp70*-pro in HEK293T cells, showing increases of 4.9-fold and 5.1-fold compared to the control, respectively. The results indicated that zebrafish *notch1a* and *notch1b* genes play a substantial role in enhancing the expression of *hsp70* gene. This provides experimental materials and a theoretical foundation for further investigation into the immune mechanism of Notch molecular in defense against infection and apoptosis through Hsp70.

Key words: *notch1a*; *notch1b*; *hsp70*; Luciferase; Apoptosis; *Danio rerio*