

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00317

日本三角涡虫 *hsp70* cDNA 克隆及原核表达

马克学 陈广文 娄昊 费利娜

(河南师范大学生命科学学院, 新乡 453007)

摘要: 热休克蛋白 70 是热休克蛋白家族中的重要成员, 它在保护生物体免受各种胁迫中发挥重要作用。由于其惊人的再生能力, 淡水涡虫作为研究再生和发育的模式动物受到研究者关注。但是, 有关涡虫抗逆性的分子机制却少有报道。研究采用 RACE (Rapid amplification of cDNA end) 技术首次从日本三角涡虫中克隆出 *hsp70* (*Djhsp70*) 全长 cDNA 序列。 *Djhsp70* cDNA 全长 2066 bp, 含有 1947 bp 的开放阅读框, 编码 648 个氨基酸, 分子量 71.18 kD, GenBank 登录号 EU380241。 *DjHSP70* 的氨基酸含有真核生物 HSP70 家族蛋白的三个标签序列(9–16 位的 IDLGTTYS、199–206 位的 DLGGGTFD、334–339 位的 IVLVGG)和末端高度保守序列 EEVD。经 BLAST 检索分析, *Djhsp70* 的核苷酸序列和推定的氨基酸序列与目前已知 HSP70 家族成员高度同源。有趣的是, HSP70 亲缘关系分析表明: 涡虫更靠近脊椎动物, 而与无脊椎动物果蝇和线虫相距较远。为了制备抗体研究 *DjHSP70* 的组织学定位, 实验还成功构建了 *DjHSP70* 表达载体, 在 IPTG 诱导下表达出约 76 kD 的融合蛋白。 *Djhsp70* cDNA 的克隆与表达载体的构建为下一步工作奠定了基础。

关键词: 日本三角涡虫; HSP70; 克隆; 表达

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2010)02-0317-06

应对外界的各种生存压力, 如温度变化、组织损伤、重金属污染和病原体侵袭等, 绝大多数生物体都表达一些高度保守的防御性蛋白, 而目前研究最多的是热休克蛋白 70 (Heat Shock Protein, HSP70) 多基因家族^[1]。作为分子伴侣, HSP70 在蛋白质的折叠、跨膜转运、错误折叠蛋白的降解等方面发挥重要功能^[2]。大量研究表明 HSP70 表达受环境胁迫和生理胁迫的影响, 并与细胞的增殖、分化和神经系统的构建密切相关^[3–9]。

扁形动物门的淡水涡虫以惊人的再生能力而闻名。著名的遗传学家摩尔根研究表明: 切割下来的涡虫组织块小到涡虫虫体的 1/279 时仍然能够再生出一条小涡虫^[10]。因此, 涡虫又被誉为“切不死的动物(Immortal under the edge of the knife)”。此外, 涡虫具有极强的耐饥饿能力。一条成体涡虫饥饿数月后虫体缩小到 1 mm, 但生理功能基本不受任何影

响, 一旦获得食物供应又重新生长^[11]。作为水生动物, 涡虫很容易受温度变化、水体污染等影响。然而, 作为从细菌到人类共有的防御性蛋白-HSP70 至今在涡虫中尚未报道。为了丰富 HSP70 家族成员, 研究涡虫抗逆性的分子机制, 本实验采用 RACE 技术成功地从日本三角涡虫(*Dugesia japonica*)中克隆出 *hsp70* 全长 cDNA 序列, 同时采用原核表达系统构建了表达融合蛋白的重组载体, 对 *DjHSP70* 蛋白的体外表达进行了初步探索。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂

日本三角涡虫采自新乡塔岗水库, 实验前至少饥饿一周。Taq 酶、DNA 连接酶、逆转录酶、限制性内切酶、RACE 试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒购自 TaKaRa, 总 RNA 提取试剂盒和 pUCm-T 载体购

收稿日期: 2009-03-12; 修订日期: 2009-11-22

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30870368, 30670247, 30170119); 河南省杰出青年基金(No.0312001100); 河南省创新人才基金(No.2005126); 教育部高等学校博士点基金(No.200804760003)资助

作者简介: 马克学(1972—), 男, 河南项城市人; 硕士; 主要从事淡水涡虫分子细胞生物学研究。E-mail: makexue@sina.com

通讯作者: 陈广文(1963—), 教授, 博士生导师; Tel: 0373-3326190; E-mail: chengw0183@sina.com

自上海生工, 所用引物由北京三博远志合成。JM109 菌株、BL21 菌株和 pET-28a 表达载体由梁卫红教授惠赠。

1.2 总 RNA 提取

取 3—4 条涡虫于液氮中研磨成粉末后, 在液氮挥发完全前加入 Trizol, 按照试剂盒操作说明提取总 RNA, 取 2 μ g 总 RNA 逆转录为 cDNA, 并以此为模板进行 PCR 扩增。

1.3 Djhsp70 全长 cDNA 克隆

利用 Song, et al.^[12]报道的一对 hsp70 兼并引物 hsp70F 5'-CAGGAATTCAARCGYAAACAC-3'和 hsp70R 5'-TTGGTCATKGTCTCGYTCTCC-3'从日本三角涡虫中扩增 hsp70 部分 cDNA 序列。PCR 参数如下: 94 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 35 个循环, 终延伸 72 $^{\circ}$ C 10min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳纯化后, 连入 pUCm-T 载体, 连接产物转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 蓝白斑筛选和 PCR 鉴定阳性转化子, 正确的转化子送北京三博远志测序。根据上述已知的 hsp70 部分 cDNA 序列设计 Djhsp70 5'-RACE 特异性引物 (5'-TCTTGTGTTTGCGCTTGAATTCCTG-3') and Djhsp70 3'-RACE 特异性引物 (5'-GCTTGTGAACGCGCTAGACGA ACTC-3')用于 cDNA 末端扩增。5'-RACE 和 3'-RACE 按照 TaKaRa RACE 试剂盒操作, PCR 产物连接 pUCm-T 载体送北京三博远志测序。

1.4 序列比对和生物信息学分析

序列同源性比对和相似性搜索用在线生物学软件 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> 进行, 多序列比对采用生物软件 Danman 6.0, 开放阅读框(ORF)预测和氨基酸序列分析采用在线生物软件 <http://www.expasy.org>。HSP70 亲缘关系树采用 Clustal X1.83 和 Mega 3.1 生物软件构建, 系统树各分支的置信度由“Bootstrap”法, 1000 次循环检验。

1.5 DjHSP70 表达载体的构建及其原核表达

根据 Djhsp70 ORF 序列设计一对特异性引物 Hind III F: 5'-ACAAGCTTGCATGTCAAAGGACCAGCAGTT-3'和 Xho I R: 5'-CACTCGAGTTAGTCAACCTCCTCGATGGT-3', 以 cDNA 为模板扩增 Djhsp70 ORF 序列。PCR 参数如下 (PrimesSTAR HS DNA Polymerase): 94 $^{\circ}$ C 5min, 98 $^{\circ}$ C 10s, 62 $^{\circ}$ C 15s, 72 $^{\circ}$ C 3min, 30 个循环, 终延伸 72 $^{\circ}$ C 10min。PCR 产物加 A 处理后, 连入 pUCm-T 载体, 转化 JM109 受体菌。将筛选的阳性重组克隆质粒和表达质粒

pET-28a 分别进行 Hind III 和 Xho I 双酶切和凝胶回收处理, 目的片段与双酶切的 pET-28a 连接后转化 BL21 感受态细胞。将经过 PCR 筛选和酶切鉴定后的阳性重组克隆送上海英骏生物技术有限公司测序。

将鉴定的阳性重组细菌接种到 LB 培养液(含 50 μ g/mL 卡那霉素), 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至菌液 A_{600} 值为 0.5 时, 加入 IPTG 使其终浓度为 1 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 诱导表达。在加入诱导剂后 0.5、1、2、4、6h 收集菌液 1 mL 经 12000 r/min 离心 5min, 弃上清液 4 $^{\circ}$ C 保存。同时, 为研究 DjHSP70 表达量与诱导剂量的关系, 待菌体浓度为 A_{600} 在 0.6 左右后, 加诱导剂 IPTG 至终浓度分别为 0.01、0.03、0.05、0.1、0.5、1.0、2.0 mmol/L 诱导蛋白表达, 4h 后取样经 12000 r/min 离心 5min, 弃上清后 4 $^{\circ}$ C 保存。样品用 100 μ L pH 7.4 的 PBS 悬浮细菌沉淀物, 加入等体积的 2 $\times$ 样品缓冲液, 水浴煮沸 10min, 通过 SDS-PAGE 检测表达产物。

2 结 果

2.1 Djhsp70 全长 cDNA 克隆

采用同源克隆的策略, 以日本三角涡虫 cDNA 为模板, 用设计的简并引物进行 PCR 扩增, 结果获得 600 bp 左右的单一片段(图 1A), 与报道的大小完全一致^[12]。经 Blast 软件分析表明该片段与 GenBank 上已注册 hsp 基因家族高度同源, 表明此片段为日本三角涡虫 hsp70 部分序列。在此序列的基础上, 我们用设计的 Djhsp70 3'-RACE 特异性引物获得

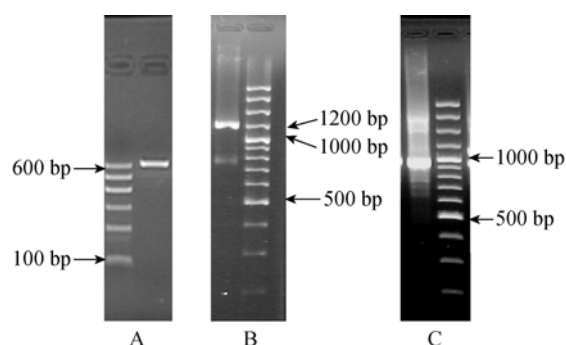


图 1 日本三角涡虫 hsp70 全长 cDNA 克隆

Fig. 1 Cloning the full-length hsp70 cDNA from planarian *Dugesia japonica*

A. 兼并性引物扩增片段; B. 3'-RACE 扩增片段; C. 5'-RACE 扩增片段。

A. Amplification fragment using degenerate primer; B. 3'-RACE amplification fragment; C. 5'-RACE amplification fragment

约 1200 bp 左右的片段含有 polyA 尾巴(图 1B), 用 *Djhsp70* 5'-RACE 特异性引物获得约 1000 bp 左右片段(图 1C)。在这 3 个片段的基础上我们拼接出一个 2066 bp 的核苷酸序列代表日本三角涡虫 *hsp70* 基因的全长 cDNA。将该序列命名为 *Djhsp70*, 并在 GenBank 注册(GenBank 登录号 EU380241)。

2.2 *Djhsp70* 生物信息学分析

经生物软件分析, 日本三角涡虫 *hsp70* 基因的全长 cDNA 为 2066 bp, 5'-末端有 52 bp 的非翻译区, 3'-末端有 67 bp 非翻译区并含有一个短的 polyA 尾巴, 开放阅读框(ORF)长度为 1947 bp, 预测编码蛋白质的分子量为 71.18 kD, 等电点为 5.56。*DjHSP70* 氨基酸列中含有真核生物 HSP70 家族蛋白的三个标签序列(9—16 位的 IDLGTTYS, 199—206 位的 DLGGGTFD, 334—339 位的 IVLVGG)和末端高度保守序列 EEVD^[13,14]。

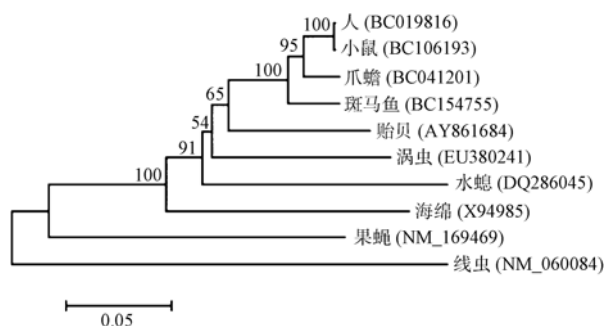


图 2 邻接法构建的 HSP70 家族亲缘关系树(括号内为 GenBank 注册号)

Fig. 2 A phylogenetic tree of HSP70 family members constructed with the neighbour-joining method (The Genbank accession number was bracketed)

运用在线生物学软件 Blast 对日本三角涡虫 HSP70 的核苷酸序列和氨基酸序列进行相似性搜索, 并运用 Danman 软件对涡虫 HSP70 与其他真核生物 HSP70 的氨基酸序列进行同源性比较, 结果表明 *DjHSP70* 与其他真核生物中 HSP70 家族蛋白高度同源, 在核苷酸序列上与贻贝(*M. galloprovincialis*, Genbank accession No. AY861684)和大口鲶(*S. meridionalis*, Genbank accession No. EF406131)的一致性高达 94%, 在氨基酸序列上与人(*H. sapiens*, Genbank accession No. BC019816)、非洲爪蟾(*X. laevis*, Genbank accession No. BC041201)、斑马鱼(*D. rerio*, Genbank accession No. BC154755)的一致性分别是 85.49%、86.00% and 85.52%。但是, *DjHSP70*

氨基酸序列与无脊椎动物果蝇(*D. melanogaster*, Genbank accession No. NM-169469)和线虫(*C. elegans*, Genbank accession No. NM-060084)的一致性却只有 72.38%、66.72%。利用 Clustal X1.83 和 Mega 3.1 构建 HSP70 亲缘关系树(图 2), 结果显示涡虫 HSP70 与软体动物们的贻贝亲缘关系最近, 靠近脊椎动物, 而与果蝇和线虫较远。这个结果与最近提出的涡虫新的分类地位一致, 涡虫和贻贝同属于冠轮动物(Lophotrochozoa), 而线虫和果蝇属于蜕皮动物(Ecdysozoa)^[15]。

2.3 *DjHSP70* 表达载体的构建及其原核表达

我们利用设计的 *Djhsp70* ORF 特异性引物以 cDNA 为模板成功克隆出 ORF 序列 1947 bp (图 3), 将目的片段加 A 处理后连接 pUCm-T 载体, 转化 JM109 受体菌。将筛选的阳性重组克隆质粒和表达质粒 pET-28a 分别进行 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切和凝胶回收处理, 目的片段与双酶切的 pET-28a 连接后转化 BL21 感受态细胞。从阳性克隆中提取质粒 DNA, 经 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切后释放出目的基因(图 3), 说明 *DjHSP70* 表达载体构建成功, 并经上海英骏生物公司测序证实读码框架完全正确。

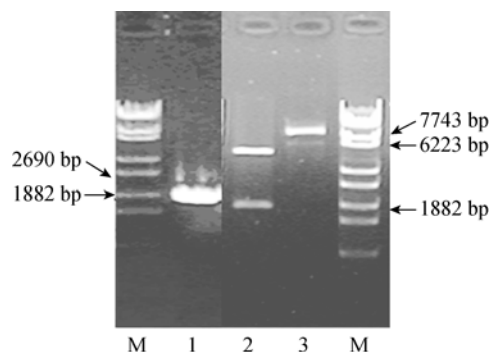


图 3 *DjHSP70* 表达载体的构建与鉴定

Fig. 3 Construction and identification of *DjHSP70* expression vector

1. *Djhsp70* ORF; 2. pET-28a 阳性重组表达质粒的双酶切; 3. pET-28a 阳性重组表达质粒; M. λ -EcoT14 I digest

1. *Djhsp70* ORF fragment; 2. pET-28a positive recombinant expression plasmid digested by *Hind*III 和 *Xho* I; 3. pET-28a positive recombinant expression plasmid; M. λ -EcoT14 I digest

将筛选出的 pET-28a-*DjHSP70* 阳性表达菌株接种到 LB 培养液(含 50 μ g/mL 卡那霉素), 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至菌液 A_{600} 值为 0.5 时, 加入 IPTG 使其终浓度为 1 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 诱导表达。经 SDS-PAGE 检测显示(图 4), 所表达的融合蛋白的分子量在 76 kD 左右,

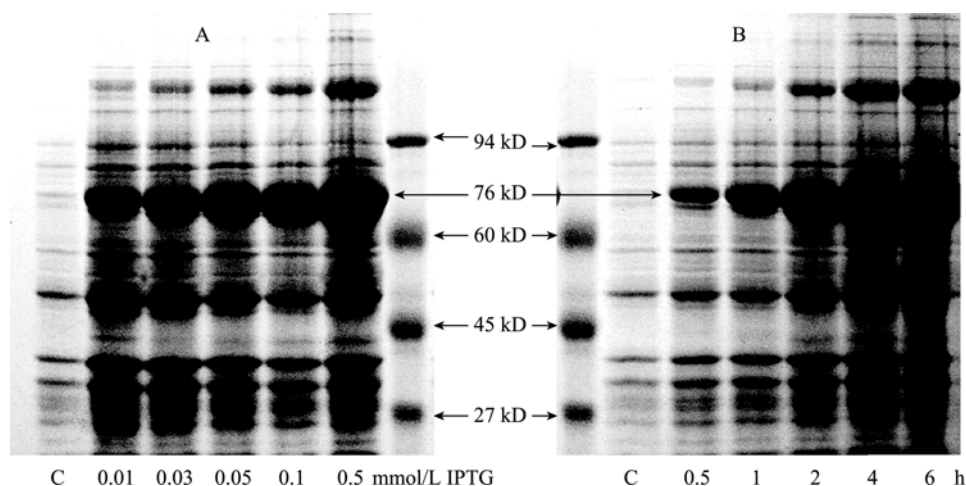


图4 SDS-PAGE 检测 DjHSP70 的原核表达

Fig. 4 Detecting the DjHSP70 expression in prokaryotic cell by SDS-PAGE electrophoresis

A. 不同 IPTG 诱导浓度的 SDS-PAGE 分析结果; B. 不同诱导时间对 DjHSP70 表达影响的 SDS-PAGE 分析结果

A. The influence of different IPTG final concentration on the DjHSP70 expression; B. The influence of different induction time on the DjHSP70 expression

与预期相符。同时结果显示该表达菌株对 IPTG 诱导非常敏感, 在加入 IPTG 后 0.5h 即能明显检测到融合蛋白表达(图 4B), 4h 后蛋白表达量基本达到高峰, 以后增加诱导时间蛋白表达量基本没有变化。pET-28a-DjHSP70 阳性表达菌株在未诱导条件下没有融合蛋白表达。

为研究蛋白表达量与诱导剂量的关系, 加入诱导剂 IPTG 分别至终浓度为 0.01、0.03、0.05、0.1、0.5、1、2 mmol/L 诱导 4h 后进行 SDS-PAGE 检测, 结果显示(图 4A)该菌株对 IPTG 的浓度非常敏感, 0.01 mmol/L IPTG 即能显著诱导 DjHSP70 融合蛋白表达, 0.5 mmol/L IPTG 终浓度诱导融合蛋白表达量基本达到高峰, 增加 IPTG 诱导浓度融合蛋白的表达量没有变化, 说明 0.5 mmol/L IPTG 终浓度即能满足诱导条件。

3 讨论

自从首次在果蝇中报道热休克效应以来^[16], 热休克蛋白作为研究生物抗逆性的一个重要指标在各种生物体中广泛应用。近年来, 国内外淡水涡虫研究比较活跃, 主要集中在涡虫分类、生理生化及再生等方面^[17-19], 有关涡虫抗逆性的研究几乎无人涉及。本实验采用 RACE 技术成功地从日本三角涡虫中克隆出 *hsp70* 全长 cDNA 序列, 并利用生物软件推导出其氨基酸序列。经 BLAST 检索分析, 无

论是核苷酸序列还是氨基酸序列都与目前报道的 HSP70 高度同源, 并且 DjHSP70 氨基酸序列中含有真核生物 HSP70 家族蛋白的标签序列, 因此, 我们认为该基因属于 *hsp70* 基因家族。

此外, 我们成功地构建了 DjHSP70 表达载体, 经 IPTG 诱导、SDS-PAGE 检测显示所表达的融合蛋白的分子量在 76 kD 左右, 与预期相符。同时, 我们还发现该表达菌株对 IPTG 的诱导浓度非常敏感, 0.01 mmol/L IPTG 即能显著诱导 DjHSP70 融合蛋白表达, 0.5 mmol/L IPTG 终浓度诱导融合蛋白表达量基本达到高峰。从诱导时间上看, 在加入 IPTG 后 0.5h 即能明显检测到融合蛋白表达, 4h 后蛋白表达量基本达到高峰。DjHSP70 表达条件的初步优化为下一步融合蛋白的纯化、抗血清制备奠定了基础。

总之, 本实验首次报道了涡虫中 *hsp70* 的全长 cDNA 序列并成功构建了表达载体, 为利用 DjHSP70 作为指标研究涡虫的抗逆性、研究 DjHSP70 的组织学定位及功能研究奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] Schlesinger M J. Heat shock proteins [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, **265**: 12111—12114
- [2] Feder M E, Hofmann G E. Heat-shock proteins, molecular

- chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology [J]. *Annual Review of Physiology*, 1999, **61**: 243—282
- [3] Hashiguchi N, Ogura H, Tanaka H, *et al.* Enhanced expression of heat shock proteins in leucocytes from trauma patients [J]. *Journal of Trauma*, 2001, **50**: 102—171
- [4] Hatayama T, Asai Y, Wakatsuki T, *et al.* Regulation of *hsp70* synthesis induced by cupric sulfate and zinc sulfate in thermotolerant HeLa cells [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, **114**: 592—597
- [5] Hofman G E, Somero G N. Evidence for protein damage at environmental temperature: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and *hsp70* in the intertidal mussel *Mytilus trossulus* [J]. *Journal of Experimental Biology*, 1995, **198**: 1509—1518
- [6] Walsh D, Li Z, Wu Y, *et al.* Heat shock and the role of the HSPs during neural plate induction in early mammalian CNS and brain development [J]. *Cellular and Molecular Life Science*, 1997, **53**: 198—211
- [7] Akerfelt M, Trouillet D, Mezger V, *et al.* Heat shock factors at a crossroad between stress and development [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2007, **1113**: 15—27
- [8] Walsh D, Li K, Wass J, *et al.* Heat-shock gene expression and cell cycle changes during mammalian embryonic development [J]. *Developmental Genetics*, 1993, **14**: 127—136
- [9] Walsh D, Li K, Speirs J, *et al.* Regulation of the inducible heat shock 71 genes in early neural development of cultured rat embryos [J]. *Teratology*, 1989, **40**: 321—334
- [10] Morgan T H. Experimental studies of the regeneration of *Planaria maculate* [J]. *Archives of Entwicklungsmech Organ*, 1898, **7**: 364—397
- [11] Newmark P A, Sánchez Alvarado A. Not your father's planarian: A classic model enters the era of functional genomics [J]. *Nature*, 2002, **3**: 210—219
- [12] Song L, Wu L, Ni D, *et al.* The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819) responding to bacteria challenge and naphthalin stress [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, **21**: 335—345
- [13] Shim J K, Jung D O, Park J W, *et al.* Molecular cloning of the heat-shock cognate 70 (*Hsc70*) gene from the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, and its expression in response to heat shock and starvation [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B*, 2006, **145**: 288—295
- [14] Cheng P, Liu X, Zhang G, *et al.* Cloning and expression analysis of a *HSP70* gene from Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, **22**: 77—87
- [15] Carranza S, Baguña J, Riutort M. Are the Platyhelminthes a Monophyletic Primitive group? An assessment using 18S rDNA sequences [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1997, **14**: 485—497
- [16] Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila* [J]. *Experientia*, 1962, **18**: 571—573
- [17] Zhang X, Huang S J. Karyotype studies of freshwater *Dugesia* planarians from China [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(3): 393—396 [张栩, 黄诗笺. 中国淡水三角涡虫染色体组型的研究. 水生生物学报, 2007, **31**(3): 393—396]
- [18] Pan H C, Fan J, Wang F F, *et al.* Effect of Medium pH on population growth, asexual reproduction and activity of six enzymes of *Dugesia japonica* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(3): 339—344 [潘红春, 范杰, 王芳芳, 等. pH 值对日本三角涡虫种群增长、无性生殖及 6 种酶活力的影响. 水生生物学报, 2008, **32**(3): 339—344]
- [19] Saló E. The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarian (Platyhelminthes) [J]. *Bioessays*, 2006, **28**: 546—559

CLONING AND PROKARYOTIC EXPRESSION OF *HSP70* cDNA FROM PLANARIAN *DUGESIA JAPONICA*

MA Ke-Xue, CHEN Guang-Wen, LOU Hao and FEI Li-Na

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007)

Abstract: Heat shock protein 70 (HSP70) is an important member of the heat shock protein family, and it plays a key role in the process of protecting organisms from various stresses. Owing to its powerful regenerating ability, freshwater planarian has been attached high importance as model animal for the study of development and regeneration. However, little reports has addressed on stress response in planarians. In this study, the full-length *hsp70* cDNA was firstly isolated and sequenced from planarian *Dugesia japonica* (*Djhsp70*) using rapid amplification of cDNA end (RACE) technology. The full-length cDNA of *Djhsp70* was 2066 bp containing an open reading frame (ORF) of 1947 bp encoding a polypeptide of 648 amino acids with a predicted molecular mass of 71.18 kDa, which was registered in GenBank with accession No. EU380241. The deduced amino acid sequence of DjHSP70 shared three signatures motifs (IDLGTTYS at the position of 9—16, DLGGGTFD at 199—206 and IVLVGG at 334—339) and the C-terminal consensus EEVD of eukaryotic HSP70 family. A sequence homology search using BLASTN and BLASTP revealed that DjHSP70 had high homology with other known HSP70s. Interestingly, the phylogenetic analysis of HSP70 revealed that planarian had a closer relationship to vertebrates, but far from to other invertebrates such as *D. melanogaster* and *C. elegans*. For preparing the antibody to study the subcellular location of DjHSP70, DjHSP70 expression vector was successfully constructed and expressed a 76 kDa fusion protein in agreement with the expected molecular weight after the induction with IPTG. *Djhsp70* cDNA cloning and construction of its expression vector provided a basis for further study in our laboratory.

Key words: Planarian *Dugesia japonica*; HSP70; Cloning; Expression