

凡纳滨对虾热休克蛋白70的原核高效表达

吴任, 谢数涛, 孙勇, 完颜小青, 张其中
(暨南大学水生生物研究所, 广东广州 510632)

摘要: 将凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 热休克蛋白70基因 (heat shock protein 70, HSP70) 克隆到原核表达载体 pET-3c 中, 经酶切和 DNA 测序鉴定后, 将重组质粒转入表达宿主 BL21 (DE3), 在不同温度、时间下经 IPTG 诱导表达, 收集菌液, 进行 SDS-PAGE 和 Western blot 检测, 并用软件 Bandscan 分析蛋白表达水平。结果表明, 成功构建含凡纳滨对虾 HSP70 基因的重组表达载体 pET-3c/HSP70, 表达的目标蛋白相对分子量约为 72 kD, 并能与小鼠抗人 HSP70 抗体特异性结合。37℃ 诱导 5 h 目标蛋白表达量最高; 但 25℃ 诱导目标蛋白的可溶性比例达 80%, 目标蛋白占全菌总蛋白 70% 以上, 均较 37℃ 为高。[中国水产科学, 2006, 13(2): 305-309]

关键词: 凡纳滨对虾; 热休克蛋白70; 原核表达

中图分类号: S917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)02-0305-05

热休克蛋白 (heat shock proteins, HSP) 是一组存在于所有生物体内的多肽类蛋白家族。HSP70 是已知热休克蛋白家族中最重要的一种, 作为应激保护蛋白, 在应激条件下其表达量显著升高, 在蛋白质的折叠、装配、转运和不可复性多肽的降解及其调控过程中起着关键作用^[1]。大量研究表明, HSP70 可以维持细胞内稳态, 它在细胞内的大量表达可以明显改善细胞的生存能力, 提高对环境胁迫或伤害的耐受性。

对虾白斑综合症 (white spot syndrome, WSS) 是目前危害世界对虾养殖业的最主要疾病, 虾塘水环境突变是其暴发的主要诱因之一^[2]。热休克蛋白70 能缓解或减轻机体 (细胞) 所受到的应激损伤, 维持机体自身平衡, 减轻、甚至消除外界刺激源的影响^[3,9-10], 因此, 热休克蛋白70 (HSP70) 在对虾适应不利环境以及控制 WSS 暴发方面值得引起关注和研究。目前国内外关于对虾 HSP70 的研究很少, 焦传珍等^[4]通过 cDNA 克隆获得 1 条中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 的组成型 HSP70 基因序列, 并对中国对虾各组织器官的 HSP70 表达作了 RT-PCR 半定量检测; 郭振宇等^[5]利用冷、热应激和 WSSV (white spot syndrome virus) 刺激中国对虾后, 用鼠抗牛 HSP70 抗体检测到诱导型 HSP70 的表达

量增加; Liu 等^[6]从罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 中 cDNA 克隆获得 1 条诱导型 HSP70 和 1 条组成型 HSP70 基因序列; 吴任等^[7]曾对凡纳滨对虾基因组 DNA 直接 PCR 扩增, 获得 1 条含完整开放阅读框的 HSP70 基因序列。本研究通过构建含有凡纳滨对虾 HSP70 基因的重组表达质粒, 导入大肠杆菌, 实现对虾 HSP70 的高效表达, 旨在为进一步研究对虾 HSP70 的结构、功能和阐明其在对虾体内的分子保护机制提供必要条件。

1 材料与方法

1.1 材料

高保真扩增酶 KOD plus 购自 Toyobo, 凝胶回收纯化试剂盒购自 Qiagen, 大肠杆菌 DH5α、BL21 (DE3) 购自北京鼎国, 原核表达载体 pET-3c 为暨南大学药学院惠赠, 质粒 pMD-18-HSP70 由本室构建保存。限制性内切酶 *Nde* I 与 *Bpu* 1102 I、T₄ DNA 连接酶和蛋白分子量标记均购自 MBI 公司, 抗人的小鼠源 HSP70 单克隆抗体购自博士德, AP-羊抗鼠 IgG 二抗和 BCIP/NBT 显色试剂盒购自华美公司。

1.2 重组质粒 pET-3c-HSP70 的构建

用 primer5.0 设计分别带有 *Nde* I 和 *Bpu* 1102 I 酶切位点的 2 条引物, 上游引物: GTCATAT-

收稿日期: 2005-07-04; 修订日期: 2005-09-09.

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (04300664); 暨南大学人才科研启动基金资助项目 (51204019).

作者简介: 吴任 (1980-), 男, 硕士研究生, 主要从事对虾免疫研究. E-mail: hyehile98@sina.com

通讯作者: 谢数涛. E-mail: tsxiao@jnu.edu.cn

GGCAAAGGCACCTGCT;下游引物:GGGCTCAGCAGGAATTGTTTAATCG,以含有凡纳滨对虾HSP70基因的质粒pMD-18-HSP70为模板经PCR扩增,PCR纯化试剂盒对PCR产物进行回收,*Nde* I、*Bpu*1102 I分别双酶切PCR产物和表达载体pET-3c,经切胶回收后,以10 μ L反应体系(*T*₄ DNA连接酶2 μ L,10 $\times$ 连接缓冲液1 μ L,HSP70基因片段6 μ L,载体pET-3c 1 μ L)22 $^{\circ}$ C连接16 h,用全部连接液转化感受态大肠杆菌DH5 α ,涂含氨苄青霉素的平板,37 $^{\circ}$ C过夜,次日挑选单菌落接种含氨苄青霉素LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C振荡培养8 h,碱裂法小量抽提质粒,通过*Nde* I、*Bpu*1102 I双酶切鉴定,筛选含插入片段的阳性克隆,送上海英俊公司进行DNA测序。

1.3 重组质粒pET-3c-HSP70的表达及鉴定

将重组质粒pET-3c/HSP70转入大肠杆菌BL21(DE3),挑单菌落接种于含氨苄青霉素(100 μ g/mL)的LB培养基中,37 $^{\circ}$ C过夜,以1:100(体积比)比例接入新鲜LB培养基,37 $^{\circ}$ C摇至 $A_{600}=0.55\sim 0.6$,加入IPTG(1 mmol/L)诱导表达5 h,取1 mL菌液,12 000 r/min离心2 min,倒去液体,加200 μ L上样缓冲液重悬,100 $^{\circ}$ C煮5 min,等量上样,进行SDS-PAGE分析;聚丙烯酰胺电泳后,用半干电转仪(Bio-rad)将蛋白转移到硝酸纤维素膜上,10%脱脂奶粉30 $^{\circ}$ C封闭1 h,转至鼠抗人HSP70一抗(1:100,体积比)中4 $^{\circ}$ C过夜,次日室温孵育1 h,加入AP-羊抗鼠二抗(1:500,体积比)室温孵育1 h,洗涤后用BCIP/NBT显色试剂盒进行显色,拍照。

1.4 温度及诱导时间对HSP70表达的影响

设置3个温度诱导组。第1组:37 $^{\circ}$ C振荡培养至菌液 $A_{600}=0.5\sim 0.6$,加IPTG(1 mmol/L)诱导表达,在37 $^{\circ}$ C分别诱导1 h、3 h、5 h、7 h、10 h;第二组:30 $^{\circ}$ C振荡培养至菌液 $A_{600}=0.5\sim 0.6$,加IPTG(1 mmol/L)诱导表达,在30 $^{\circ}$ C分别诱导1 h、3 h、5 h、7 h、12 h;第三组:30 $^{\circ}$ C振荡培养至菌液 $A_{600}=0.5\sim 0.6$,加IPTG(1 mmol/L)诱导表达,在25 $^{\circ}$ C分别诱导1 h、3 h、5 h、7 h、12 h;收集不同条件诱导的菌液各1 mL,12 000 r/min离心后去培养液,加200 μ L上样缓冲液重悬,100 $^{\circ}$ C煮5 min,冷却后存于-20 $^{\circ}$ C。对照组为未加IPTG诱导剂处理。

超声裂解全菌:取上述菌液各1 mL,4 $^{\circ}$ C离心,100 μ L磷酸缓冲液(pH 7.4)重悬沉淀,冰浴超声裂解细菌,4 $^{\circ}$ C下12 000 r/min离心10 min,吸取上清

为可溶部分;沉淀重悬于100 μ L磷酸缓冲液,为不可溶部分。上清和沉淀各加入100 μ L 2 $\times$ 上样缓冲液,混匀,100 $^{\circ}$ C 5 min,等量上样,进行SDS-PAGE操作,用Bandscan5.0对拍照结果进行分析。

2 结果

2.1 重组质粒pET-3c/HSP70的构建及其序列测定

经PCR扩增,得到约1.96 kb的明亮条带。重组质粒pET-3c-HSP70经内切酶*Nde* I与*Bpu*1102 I双酶切,得到2条条带,大小分别约为4.5 kb和2.0 kb。用*Hind* III单酶切重组质粒pET-3c-HSP70,得到单一的约6.5 kb的条带(图1)。

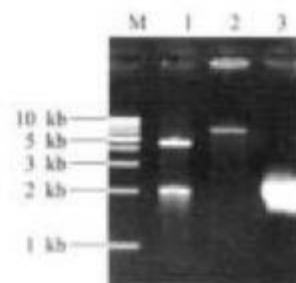


图1 重组质粒限制酶切分析及凡纳滨对虾HSP70基因的PCR扩增

Fig.1 Restriction analysis of recombinant plasmid and PCR amplification of HSP70 gene in *L. vannamei*
M: 1 kb DNA ladder; 1: pET-3c-HSP70/*Nde* I + *Bpu*1102 I; 2: pET-3c-HSP70/*Hind* III; 3: pMD-18-HSP70 PCR product

DNA测序结果与GenBank上凡纳滨对虾HSP70基因序列(AY645906)一致。用软件DNA-man5.2查找该序列上存在的理论酶切位点,分析结果显示不包括*Nde* I、*Bpu*1102 I和*Hind* III 3个酶切位点,与上述重组质粒的酶切结果相符合。说明成功构建了凡纳滨对虾HSP70基因的原核表达载体。

2.2 凡纳滨对虾HSP70在大肠杆菌BL21(DE3)中的表达与鉴定

SDS-PAGE结果显示,经IPTG诱导,含重组质粒pET-3c-HSP70的大肠杆菌在约72 kD位置有一条明显的蛋白条带,与凡纳滨对虾HSP70理论相对分子量一致,而未经诱导的菌和含空质粒pET-3c的菌均无此变化(图2~4)。Western blot结果显示,72 kD位置有特异性结合条带,显色效果与蛋白

表达量成正比(图 5),表明大肠杆菌表达的目标蛋白为凡纳滨对虾热休克蛋白 70。未经诱导含重组质粒 pET-3c-HSP70 的大肠杆菌也出现了 1 条很微

弱的特异性结合带,说明不加诱导剂 IPTG,也有少量的目标蛋白表达。

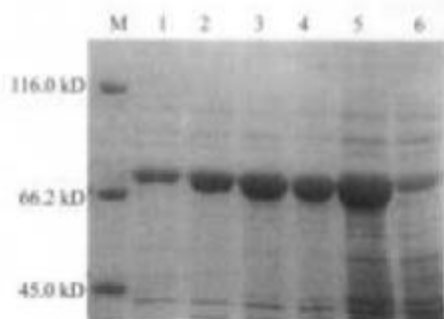


图 2 25 °C 诱导下凡纳滨对虾 HSP70 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中不同时间的表达

M: 分子量蛋白标准; 1~5: 依次为 pET-3c-HSP70 25 °C 诱导 1 h, 3 h, 5 h, 7 h, 12 h; 6: pET-3c-HSP70 37 °C 10 h, 未诱导。

Fig. 2 Expression of *L. vannamei* HSP70 gene in *E. coli* BL21 (DE3) at different time induced at 25 °C

M: Protein marker; 1~5: pET-3c-HSP70 induced for 1 h, 3 h, 5 h, 7 h, and 12 h at 25 °C, respectively; 6: pET-3c-HSP70, 10 h at 37 °C, uninduced

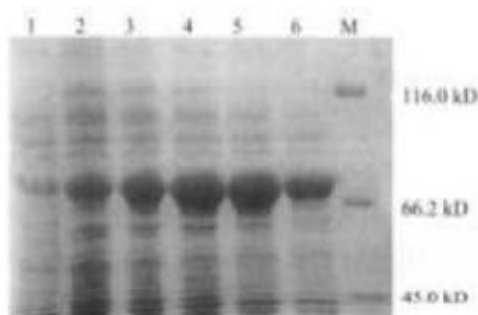


图 4 37 °C 诱导下凡纳滨对虾 HSP70 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中不同时间的表达

M: 分子量蛋白标准; 1: pET-3c-HSP70 37 °C 未诱导 10 h; 2~6: 依次为 pET-3c-HSP70 37 °C 诱导 10 h, 7 h, 5 h, 3 h, 1 h。

Fig. 4 Expression of *L. vannamei* HSP70 gene in *E. coli* BL21 (DE3) at different times induced at 37 °C

M: Protein marker; 1: uninduced pET-3c-HSP70 for 10 h at 37 °C; 2~6: induced pET-3c-HSP70 for 10 h, 7 h, 5 h, 3 h and 1 h at 37 °C, respectively

2.3 不同条件下凡纳滨对虾 HSP70 的诱导表达

用软件 Bandscan5.0 分析细菌蛋白含量。37 °C 诱导表达组的目标蛋白量在总菌蛋白量中的百分比约为 58%, 诱导 5 h 目标蛋白的表达量最高(图 2);

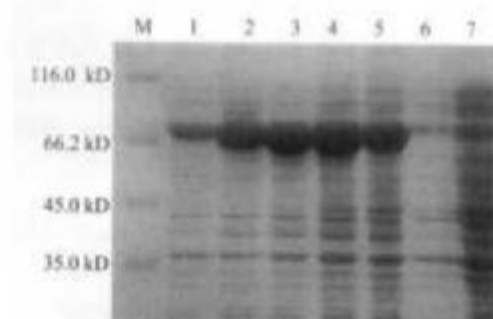


图 3 30 °C 诱导下凡纳滨对虾 HSP70 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中不同时间的表达

M: 分子量蛋白标准; 1~5: 依次为 pET-3c-HSP70 30 °C 下诱导 1 h, 3 h, 5 h, 7 h, 12 h; 6: pET-3c-HSP70 37 °C 10 h, 未诱导; 7: pET-3c 37 °C 下诱导 10 h

Fig. 3 Expression of *L. vannamei* HSP70 gene in *E. coli* BL21 (DE3) at different times induced at 30 °C

M: Protein marker; 1~5: induced pET-3c-HSP70 for 1 h, 3 h, 5 h, 7 h, and 12 h at 30 °C, respectively; 6: pET-3c-HSP70 10 h at 37 °C, uninduced; 7: pET-3c induced for 10 h at 37 °C

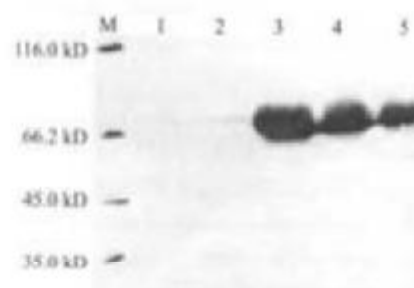


图 5 凡纳滨对虾 HSP70 表达的 Western blot 分析

M: 分子量蛋白标准; 1: pET-3c 37 °C 下诱导 10 h; 2: pET-3c-HSP70 37 °C 下未诱导 10 h; 3~5: pET-3c-HSP70 分别在 25 °C, 30 °C, 37 °C 下诱导 5 h。

Fig. 5 Western blot analysis on expression of HSP70 of *L. vannamei*

M: Protein marker; 1: pET-3c induced for 10 h at 37 °C; 2: uninduced pET-3c-HSP70 for 10 h at 37 °C; 3~5: pET-3c-HSP70 induced for 5 h at 25 °C, 30 °C and 37 °C, respectively

30 °C 诱导表达组的目标蛋白含量百分比约为 56%, 诱导 7 h 目标蛋白的表达量达到最高(图 3); 25 °C 诱导表达组的目标蛋白含量百分比可达 70% 以上, 诱导 12 h 的蛋白表达量最高(图 4)。说明调整温度

可提高目标蛋白在总菌蛋白含量中的比例。以不同浓度 IPTG (0.1 mmol/L, 0.5 mmol/L, 1 mmol/L) 进行诱导表达, 未发现目标蛋白表达量有明显变化。

目标蛋白可溶性表达的结果表明, 37 ℃ 和 30 ℃ 诱导中, 有 50% 以上目标蛋白以可溶性形式存在; 25 ℃ 诱导时, 近 80% 的目标蛋白以可溶性形式存在 (图 6), 说明低温利于目标蛋白的可溶性表达, 降低表达蛋白包涵体的形成。

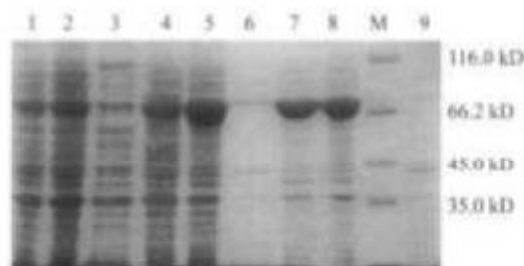


图 6 3 个不同诱导温度下凡纳滨对虾 HSP70 的可溶性表达分析

M: 分子量蛋白标准; 1-3: 分别为 pET-3c-HSP70 37 ℃ 诱导 5 h 的上清、全菌、沉淀; 4-6: 分别为 pET-3c-HSP70 30 ℃ 诱导 5 h 的上清、全菌、沉淀; 7-9: 分别为 pET-3c-HSP70 25 ℃ 诱导 5 h 的上清、全菌、沉淀。

Fig. 6 Analysis on expression of soluble proportion of *L. tuzimuzei* HSP70 under three different temperatures

M: Protein marker; 1-3: Supernate, whole bacteria and precipitate of induced pET-3c-HSP70 for 5 h at 37 ℃; 4-6: Supernate, whole bacteria and precipitate of induced pET-3c-HSP70 for 5 h at 30 ℃; 7-9: Supernate, whole bacterium and precipitate of induced pET-3c-HSP70 for 5 h at 25 ℃.

3 讨论

HSP70 家族具有一个普遍结构, 即一个高度保守的 N 端 M_r 44 000 ATP 功能结构域 (ATP binding domain) 和一个 C 端 M_r 25 000 多肽底物结合域。HSP70 作为多肽免疫载体分子参与抗原递呈并引发特异性免疫反应, 协助非天然构象蛋白分子正确折叠, 参与细胞凋亡和细胞周期的调控, 提高机体对胁迫因子 (高温、低氧、病害、创伤、重金属等) 的耐受性。近年来, 已有许多关于水生生物热休克蛋白的研究报道, 如用杀虫剂七氯处理美洲龙虾 (*Homarus americanus*) 幼体, 一定范围内 HSP70 表达水平随

时间增加而增加^[8]; 淡水海绵 (*Ephydatia fluviatilis*) 受亚致死热刺激后, 表现出对化学污染物有很强的抵抗力^[9]; 预热处理的波罗的海贻贝 (*Mytilus edulis*) 可对镉产生抗性, 并高表达 HSP70^[10]; 作者通过亚致死温度处理凡纳滨对虾, 常温恢复 2 h 后, 注射致死剂量的 WSSV, 发现存活时间明显高于未经亚致死温度应激的对照组^[1]。HSP70 可经诱导增加表达, 经适度热刺激, 不但可增加机体对致死高温的耐受性, 并且可提高机体对其他胁迫因子的抵抗能力, 说明 HSP70 的表达增加与机体自身保护能力的提高有着紧密联系。

通过软件 Vector NT19.0 对凡纳滨对虾 HSP70 基因进行模拟表达, 得知 HSP70 的 mRNA 二级结构及密码子偏爱性对表达均无影响, 本实验结果验证了这一点。pET 载体系列含不为大肠杆菌 RNA 聚合酶识别的 T7 强启动子, 使用大肠杆菌启动子系统 (如 tac, lac, trc, pl) 有困难的基因可在 pET 系统中稳定克隆和表达。所以本研究只着重质粒稳定性、诱导温度、时间和 IPTG 浓度对表达的影响等方面。实验表明, 一定浓度范围内的 IPTG 对表达无明显影响, 0.1~1 mmol/L 的 IPTG 都适用于重组载体的诱导表达。外源基因在大肠杆菌体内过量表达, 可能会对大肠杆菌产生细胞毒性, 在大肠杆菌分裂传代时, 部分细菌失去质粒, 降低含有重组质粒的细菌数量, 本研究分别在 30 ℃ 和 37 ℃ 培养菌液至 A_{600} 值为 0.6, 再进行诱导表达, 发现较低温度培养对重组质粒的拷贝数增加和质粒稳定性没有明显帮助, 相反, 37 ℃ 组诱导 5 h 可获得最大含量的目标蛋白。在 25 ℃ 诱导下, 目标蛋白占全菌蛋白的比例最高, 达 70% 以上, 而 37 ℃ 和 30 ℃ 诱导效果相近。低温诱导 (15~25 ℃) 通常可增加可溶性目标蛋白的比例, 本实验在 25 ℃ 进行诱导, 将可溶性目标蛋白比例提高至 80%, 实现了高比例活性蛋白的表达。此外, 表达可溶性最好的蛋白还依赖于宿主细胞的背景、培养条件和合适的载体配置。本研究表达的凡纳滨对虾 HSP70 经纯化后, 可制备鼠源的抗对虾 HSP70 单克隆抗体, 直接用于对虾 HSP70 表达检测。另外, 通过对虾活体注射 HSP70, 进一步研究 HSP70 在对虾白斑综合症应激发病中所起的保护作用。

1) 谢数涛, 吴 任, 许志能, 等. 亚致死温度热休克对凡纳滨对虾的保护作用[J]. 中山大学学报 (待发表).

参考文献:

- [1] Kiang J G, Tsokos G C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry and physiology[J]. *Pharmacol Ther*, 1998, 80: 183-201.
- [2] 杨丛海. 中国对虾养殖现状及健康养殖管理的发展[A]. 虾类养殖研究[C]. 北京: 海洋出版社, 2002. 36-41.
- [3] 王彦波, 周绪霞, 许梓荣. 热应激蛋白 70 的研究进展[J]. 免疫学杂志, 2003, 19(3): 79-82.
- [4] 焦传珍, 王在照, 李富花, 等. 编码中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 一种组成型热休克蛋白 70 (HSP70) 的 cDNA 克隆、测序及其表达分析[J]. 科学通报, 2004, 49(21): 2178-2186.
- [5] Guo Z Y, Jiao C Z, Xian J H, et al. Heat-shock protein 70 expression in shrimp *Penaeus chinensis* during thermal and immune-challenged stress[J]. *Chin Oceanol Limnol*, 2004, 22(4): 386-391.
- [6] 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 Chaper*, 2004, 9(3): 313-323.
- [7] 吴 任, 谢数涛, 张其中, 等. 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) HSP70 基因 PCR 扩增及序列分析[J]. 暨南大学学报, 2005, 26(3): 298-333.
- [8] Varo I, Serrano R, Pitarch E, et al. Bioaccumulation of chlorpyrifos through an experimental food chain: study of protein HSP70 as biomarker of sublethal stress in fish[J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2002, 42(2): 229-235.
- [9] Mueller W E G, Kotiol C, Kurelec B, et al. Combinatory effects of temperature stress and nonionic organic pollutants on stress protein (HSP70) gene expression in the freshwater sponge *Ephyraia fluviatilis* [J]. *Environ Toxicol Chem*, 1995, 14: 1203-1208.
- [10] Tedengren M, Olsson B, Reimer O, et al. Heat pretreatment increases cadmium resistance and HSP 70 levels in Baltic Sea mussels[J]. *Aquatic Toxicol*, 1999, 48: 1-12.

High level prokaryotic expression of heat shock protein 70 in *Litopenaeus vannamei*

WU Ren, XIE Shu-tao, SUN Yong, WANYAN Xiao-qing, ZHANG Qi-zhong
(Institution of hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: For the aim to set up a high level prokaryotic expression of heat shock protein 70 (HSP70) of *Litopenaeus vannamei* in *E. coli* BL21(DE3), the HSP70 gene of *Litopenaeus vannamei* was cloned into prokaryotic expression vector pET-3c, which subsequently, was determined by double-endonuclease digestion and DNA sequencing. The recombinant vector was transformed into *E. coli* BL21(DE3) and was induced to express by 1 mmol/L IPTG. The quantity of the expression product, under different temperatures and durations, was evaluated with the software BandsScan. The quality of expression product was identified by SDS-PAGE and Western blot. The recombinant expression vector pET-3c/HSP70, expressing a 72 kD protein that could be recognized by mouse source HSP70 monoclonal antibody, was successfully constructed. The quantity of expression product varied according to different inducing temperature as well as inducing duration. The optimal condition for high level expression was induced at 37 °C for 5 h. But the optimal temperature for the favorable proportion of soluble target protein and the highest ratio of target protein to total amount protein of *E. coli*, which was up to 80% and above 70% respectively, was 25 °C. This study provides a fundamental condition supporting researches on structure, function and biological activity of HSP70 of *Litopenaeus vannamei*. [*Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(2): 305-309]

Key words: *Litopenaeus vannamei*; heat shock protein 70 (HSP70); prokaryotic expression

Corresponding author: XIE Shu-tao. E-mail: tstoie@jnu.edu.cn