

近江牡蛎热休克蛋白70基因的原核表达研究

李薇¹, 张其中^{1,2}, 张占会¹, 崔森¹, 姚占娟¹, 何毛贤²

(1. 暨南大学水生生物研究所, 热带亚热带水生态工程教育部工程研究中心, 广东省高校水体富营养化与赤潮防治重点实验室, 广东广州510632; 2. 中国科学院南海海洋研究所, 广东广州510301)

摘要: 近江牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)热休克蛋白70(HSP70)家族成员是重要的抗逆和潜在污染预警分子。本研究将近江牡蛎HSP70基因cDNA连接到原核表达载体pQE30中, 构建近江牡蛎HSP70的重组表达质粒pQE30/HSP70。该重组质粒经酶切和测序鉴定后, 转入表达宿主大肠杆菌M15进行诱导表达, 经SDS-PAGE电泳和Western blot分析表明, 确实获得了重组蛋白的表达。分别在25℃、30℃和37℃下, 经0.2 mmol/L IPTG诱导融合蛋白表达, 其中, 在25℃下, 诱导的融合蛋白表达量最高, 表明该温度为恰当诱导温度; 在25℃下, 分别诱导重组蛋白表达2 h、4 h、6 h、8 h、12 h和16 h, 其中诱导12 h的蛋白表达量最高; 大部分融合蛋白以可溶形式存在于大肠杆菌M15中; 表达的重组融合蛋白分子量约69 kD, 并能与鼠源抗6×His的单克隆抗体特异性结合, 表明通过原核表达获得了近江牡蛎HSP70蛋白。实验表明, 在25℃下, 经0.2 mmol/L IPTG诱导表达12 h, 可获得大量可溶近江牡蛎HSP70蛋白。[中国水产科学, 2010, 17(3): 424-430]

关键词: 热休克蛋白70; 原核表达; 近江牡蛎

中图分类号: S917

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)03-0424-07

热休克蛋白70(Heat shock protein 70, HSP70)家族成员, 普遍存在于原核和真核细胞内^[1], 在细胞多种生命活动中起着重要作用, 如作为“分子伴侣”在细胞内多肽正确折叠、装配、转运, 蛋白质复性和不可复性多肽的清除及其调控过程中起着关键作用^[2-3]; 还参与抗原的加工和呈递过程, 与免疫应答相关^[4-5]; 以及抵抗不同信号通路引起的细胞凋亡^[1]等。当生物体受到外界环境因子(如高温、低温、病原入侵、污染等)胁迫时, HSP70s高效表达, 对细胞起修复和保护作用^[1,6]。可见HSP70s是生物维持基本生命活动的关键分子, 对其研究有助于揭示多种生命活动过程的关键机制。

近江牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)是中国南方沿海大量养殖的重要经济贝类, 饲养过程中时常发生由环境胁迫或病害引起的严重死亡事件^[7-9], 而

近江牡蛎HSP70家族成员与其抗逆和抗感染密切相关^[10], 所以, 研究近江牡蛎HSP70对防止近江牡蛎大规模死亡事件的发生具有重要意义。同时, 近江牡蛎分布在中国南方近岸海域, 该海域近年来受工业和生活污水污染日益严重, 随时监测其污染状况是控制和治理污染的基础。近江牡蛎对环境中污染物的富集能力强, 能指示其生活海区的水质状况, 已被中国“南海贻贝观察”体系选为主要监测生物^[11]。此外, 近江牡蛎HSP70s对污染反应灵敏, 是潜在的污染预警分子^[12]。由此可见, 无论抗逆防病, 还是污染预警, 都需要从研究近江牡蛎HSP70s分子的特点与功能, 而获得HSP70蛋白是进一步研究的基础。

本研究通过构建含有近江牡蛎HSP70基因的重组表达质粒, 导入大肠杆菌, 以实现近江牡蛎重组

收稿日期: 2009-09-23; 修订日期: 2009-12-27.

基金项目: 国家自然科学基金项目(40576056, 40976066); 广东省自然科学基金项目(04300664, 07300378); 中国博士后科学基金一等资助金(20070420144); 中国科学院海洋生物资源可持续利用重点实验室(LMB)、广东省应用生物学重点实验室(LAMB)和广东省海洋药物重点实验室(LMM)联合开放课题(LMB071003, LMB091005)资助.

作者简介: 李薇(1986-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水生动物分子生物学. E-mail: liwei19860212@126.com

通讯作者: 张其中, 教授. Tel: 020-35891381; E-mail: zqz666@sina.com

HSP70蛋白的高效表达,为进一步研究该蛋白的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

近江牡蛎 HSP70 质粒为本实验室构建。原核表达载体 pQE30 和受体菌 M15 为本实验室保存。限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Kpn* I、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、pMD-18T Vector 购自 TaKaRa 公司; PCR 产物凝胶回收试剂盒、小型质粒提取试剂盒、PVDF 膜、鼠源 Anti-His 一抗、羊抗鼠 IgG-HRP 二抗、HRP/DAB 显色试剂盒购自天根公司。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pQE30/HSP70 的构建 用小型质粒提取试剂盒分别提取 pQE30 和 HSP70 质粒,用 *Bam*H I 和 *Kpn* I 分别双酶切表达载体 pQE30 质粒和 HSP70 质粒。纯化酶切片段后,连接并转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 挑选氨苄青霉素抗性单菌落并扩增,进行 PCR 及 *Bam*H I、*Kpn* I 双酶切鉴定,筛选含有插入片段的阳性克隆,进行 DNA 测序。

1.2.2 重组表达载体 pQE30/HSP70 在大肠杆菌中的表达 将经 DNA 测序的重组质粒 pQE30/HSP70 转入大肠杆菌 M15,挑选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 (V:V) 接入新鲜 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C 培养菌液至 $A_{600}=0.5 \sim 0.55$,加入 0.2 mmol/L IPTG (该 IPTG 浓度由预实验确定,在预实验中,设置了 0.1 mmol/L、0.2 mmol/L 和 0.4 mmol/L 3 个浓度组,其中 0.2 mmol/L 浓度组诱导 HSP70 表达量最高),继续培养 2 h、4 h、6 h、8 h、12 h 和 16 h。取 1 mL 菌液,12 000 r/min 离心 1 min,弃上清,加 100 μ L 1 \times SDS 上样缓冲液重悬沉淀,100 $^{\circ}$ C 水浴 5 min,12% 的 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色,拍照。

1.2.3 诱导温度对重组 HSP70 表达的影响 设置 3 个温度诱导组,分别为 25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C,振荡培养至菌液 $A_{600}=1.40 \sim 1.45$,0.2 mmol/L IPTG 诱导表达,确定最恰当诱导温度。

1.2.4 诱导时间对重组 HSP70 表达的影响 在 25 $^{\circ}$ C

温度下振荡培养至菌液 $A_{600}=0.50 \sim 0.55$,0.2 mmol/L IPTG 诱导融合蛋白表达,分别诱导 2 h、4 h、6 h、8 h、12 h 和 16 h,以确定恰当诱导时间。收集不同诱导时间下的菌液各 1 mL,12 000 r/min 离心 1 min,弃上清,加 100 μ L 1 \times SDS 上样缓冲液重悬沉淀,100 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, SDS-PAGE 电泳,使用 GS-80 校准型光密度仪对结果拍照保存。

1.2.5 原核表达 HSP70 蛋白可溶性的初步分析

诱导表达菌,离心,按 5 mL/g 加入细菌裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,1 mmol/L EDTA,100 mmol/L NaCl) 重悬细菌,加入终浓度为 1 mg/L 的溶菌酶,搅拌均匀,4 $^{\circ}$ C 作用 30 min 后,-80 $^{\circ}$ C 与室温之间反复冻融 3 次,最后离心,分离细胞裂解上清液和沉淀,以 SDS-PAGE 电泳分析表达蛋白的可溶性。

1.2.6 重组表达蛋白的 Western blot 鉴定 用半干电转仪 (Bio-Rad) 将 SDS-PAGE 胶中的蛋白转至 PVDF 膜上,5% 丽春红预染 PVDF 膜,观察蛋白的转移情况,然后进行 Western blot 检验。其主要步骤如下:清洗 PVDF 膜后,将其放入封闭液中孵育 1~2 h;再转至鼠源抗 6 \times His 的一抗 (1:500, V:V) 中 4 $^{\circ}$ C 过夜;次日,将膜在羊抗鼠 IgG-HRP 二抗 (1:500, V:V) 中孵育 1 h;清洗后,用 HRP/DAB 显色试剂盒避光显色。

2 结果与分析

2.1 原核表达载体 pQE30/HSP70 的构建

图 1 为重组质粒 pQE30/HSP70 经限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Kpn* I 双酶切后的电泳结果,可见在 3.4 kb 和 2.0 kb 位置上各有 1 条带与预期结果一致,同时,该重组载体插入 DNA 片段的测序结果与近江牡蛎 HSP70 基因序列完全相同,表明近江牡蛎 HSP70 基因的原核表达载体构建成功。

2.2 近江牡蛎 HSP70 重组蛋白在大肠杆菌 M15 中的表达

图 2 为 37 $^{\circ}$ C 下经 0.2 mmol/L IPTG 诱导,含重组质粒 pQE30/HSP70 的大肠杆菌表达产物的 SDS-PAGE 电泳结果,该结果显示,在约 69 kD 位置有 1 条明显的蛋白条带,与近江牡蛎 HSP70 蛋白理论分子量一致。

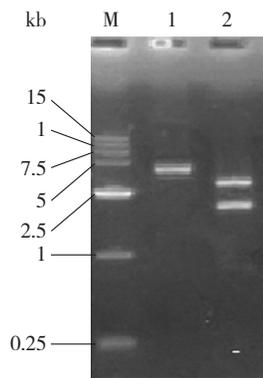


图1 *Bam*H I 和 *Kpn* I 酶切分析重组质粒 pQE30/HSP70
M: DL 15 000 DNA 分子量标准; 1: pQE30/HSP70 重组质粒; 2: *Bam*H I 和 *Kpn* I 双酶切重组质粒.

Fig. 1 Electrophoresis analysis of restriction enzyme digestion of recombinant plasmid pQE30/HSP70

M: DL 15 000 DNA marker; 1: recombinant plasmid pQE30/HSP70; 2: restriction enzyme digestion of pQE30/HSP70 by *Bam*H I and *Kpn* I.

2.3 诱导温度对近江牡蛎 HSP70 重组蛋白表达的影响

图3为 25 °C、30 °C 和 37 °C 下经 0.2 mmol/L IPTG 诱导, pQE30/HSP70 菌液浓度均达到吸光度值 $A_{600}=1.45 \sim 1.50$ 时的 SDS-PAGE 电泳结果。图中显示,

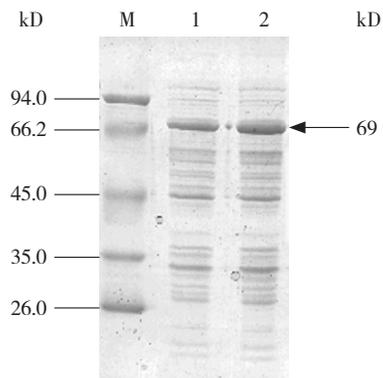


图2 37 °C 诱导下近江牡蛎重组 HSP70 在大肠杆菌 M15 中的表达

M: 蛋白质分子量标准; 1-2: 37 °C 诱导 pQE30/HSP70 表达 2 h 和 4 h.
Fig. 2 Expression of *Crassostrea hongkongensis* HSP70 gene in *E. coli* M15 for 2 h and 4 h induction at 37 °C

M: protein marker; 1-2: recombinant HSP70 induced for 2 h and 4 h at 37 °C.

25 °C 诱导组的重组 HSP70 表达量最高; 30 °C 诱导组次之; 37 °C 诱导组 HSP70 表达量最少。表明温度对重组蛋白的表达有明显影响, 本实验条件下, 25 °C 是合适的诱导温度。

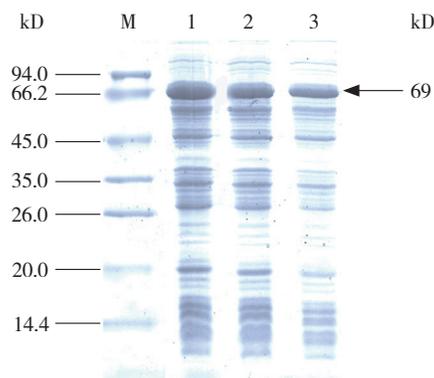


图3 不同诱导温度下近江牡蛎重组 HSP70 的表达水平

M: 蛋白质分子量标准; 1-3: 在 25 °C、30 °C、37 °C 诱导温度下的重组 HSP70 的表达量。

Fig. 3 Expression level of *Crassostrea hongkongensis* recombinant HSP70 at different induction temperature

M: protein marker; 1-3: expression level of recombinant HSP70 at 25 °C, 30 °C and 37 °C, respectively.

2.4 诱导时间与近江牡蛎 HSP70 重组蛋白表达量的关系

在 25 °C 下, 用 IPTG (0.2 mmol/L) 诱导近江牡蛎 HSP70 重组蛋白表达, 分别诱导 2 h、4 h、6 h、8 h、12 h 和 16 h, 发现随着诱导时间从 2 h 延长至 12 h, 重

组蛋白表达量逐步增高, 至 12 h 时表达量最大, 时间再延长至 16 h, 蛋白表达量下降, 表明本实验条件下 12 h 是最恰当的诱导时间。大肠杆菌 M15、含有空质粒 pQE30 和未经诱导的含有质粒 pQE30/HSP70 的宿主菌在相同位置均无此明显条带 (图 4)。

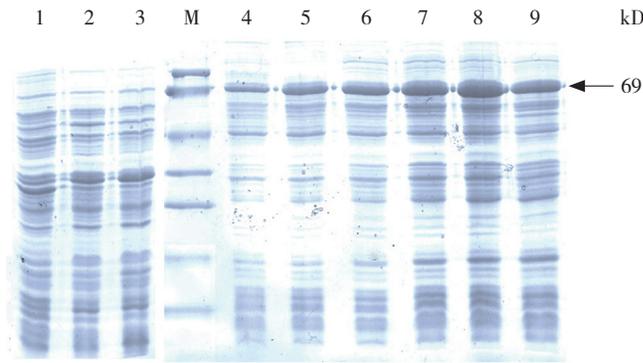


图4 25℃下诱导不同时间近江牡蛎重组HSP70的表达水平

M: 蛋白质分子量标准; 1,2: 分别诱导M15和空质粒pQE30 16 h; 3: 未诱导pQE30/HSP70 16 h; 4-9: 分别诱导pQE30/HSP70 2 h,4 h,6 h,8 h,12 h,16 h.

Fig. 4 Expression level of *Crassostrea hongkongensis* recombinant HSP70 induced for 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h and 16 h at 25 °C, respectively
M: protein marker; 1, 2: M15 and empty plasmid induced for 16 h; 3: recombinant plasmid of pQE30/HSP70 in an uninduced condition for 16 h; 4-9: pQE30/HSP70 induced for 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h and 16 h, respectively.

2.5 原核表达HSP70蛋白的可溶性

图5为重组HSP70蛋白可溶性的SDS-PAGE分析结果,可见HSP70表达产物主要存在于细菌裂解液上清中,只有少量存在于沉淀中,大部分HSP70蛋白以可溶形式存在于细胞中。

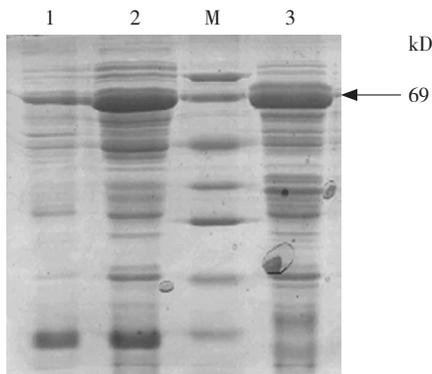


图5 近江牡蛎重组HSP70蛋白可溶性的SDS-PAGE分析
M: 蛋白质分子量标准; 1: 细菌裂解液沉淀; 2: 细菌裂解液上清; 3: 诱导表达全菌.

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of solubility of *Crassostrea hongkongensis* recombinant protein HSP70

M: protein marker; 1: precipitate of bacterium lysis solution; 2: supernatant of bacterium lysis solution; 3: induced whole bacterium.

2.6 重组HSP70蛋白的Western blot分析结果

Western blot结果显示,69 kD位置上出现了清晰的特异性条带,而未经诱导的重组菌无此条带(图6)。

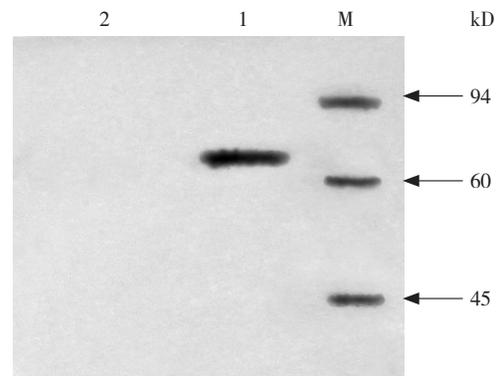


图6 近江牡蛎重组蛋白HSP70的Western blot分析
M: 蛋白质分子量标准; 1: 25℃下诱导pQE30/HSP70 12 h; 2: 25℃下未诱导pQE30/HSP70 16 h.

Fig. 6 Western blot analysis of *Crassostrea hongkongensis*'s recombinant protein HSP70 expression

M: protein marker; 1: pQE30/HSP70 induced for 12 h at 25 °C ; 2: pQE30/HSP70 in an uninduced condition for 16 h at 25 °C.

3 讨论

在原核蛋白表达过程中,要构建一个合适的原核表达体系,需要综合考虑三大因素,即表达载体、宿主菌株和表达诱导条件。此外,为了便于纯化表达蛋白,必须能获得大量的可溶性蛋白。

3.1 表达载体和宿主菌株的选择

本研究选择pQE30质粒作为原核表达载体。pQE30是pQE载体系列之一,含不被大肠杆菌RNA聚合酶识别的T5强启动子,低拷贝,且含有6×His

标记,在Western blot检测时能与鼠源抗6×His单抗特异性结合。使用大肠杆菌启动子系列(如tac、lac、trc、pl)可使低表达的基因在pQE系列载体中稳定表达。在宿主菌株的选择上,本研究选择了含有*pREP4*基因的大肠杆菌M15菌株,它能编码1个lac阻遏蛋白,该蛋白能与IPTG结合使lac阻遏蛋白失活,从而诱导pQE30载体中的插入基因得到表达。表达的蛋白几乎都可溶,不形成包涵体。

与pQE30相比,pET载体系列含有不被大肠杆菌RNA聚合酶识别的T7强启动子,高拷贝,蛋白表达总量明显高,却易形成包涵体。宿主菌株一般选用蛋白酶缺陷型菌株,如BL21(DE3)。T7强启动子的能力比T5启动子更强,它可以将大肠杆菌的资源最大程度调用过来表达外源蛋白,但是,目的蛋白来不及折叠而在宿主菌中形成不溶的包涵体颗粒,如克隆到表达载体pET-28c中的禽源巴氏杆菌链霉素耐药基因*StrA*,其在宿主菌BL21(DE3)中表达的蛋白以包涵体形式存在^[13];克隆至pET-28a的凡纳滨对虾桃拉病毒主要结构蛋白基因,在宿主菌BL21(DE3)中表达的重组蛋白均以包涵体形式存在^[14]。这些包涵体蛋白难以溶解,为后续纯化带来不便。所以,本研究选择了一个较弱的启动子载体,目的是获得可溶性重组蛋白,便于后续蛋白纯化。

3.2 近江牡蛎HSP70重组蛋白的鉴定

Western blot结果显示,在69 kD位置有1条特异性结合条带(图6),表明携带6×His标记的融合蛋白已经成功地在大肠杆菌M15中表达。DNA测序证实质粒上表达基因的碱基序列与近江牡蛎HSP70基因的序列一致,说明表达蛋白就是近江牡蛎的HSP70蛋白。此外,SDS-PAGE和Western blot结果显示,该表达蛋白的分子量与近江牡蛎HSP70蛋白的理论分子量69.7 kD一致,证明近江牡蛎HSP70基因在大肠杆菌M15中获得了成功表达,得到了近江牡蛎HSP70蛋白。

在对基因工程表达的动物HSP70蛋白检测中,不同研究者所用一抗不同。本研究采用的一抗为抗6×His的单抗,检测的是表达蛋白,其优点是能够准

确将表达蛋白与宿主菌蛋白区分开来,并且可利用6×His进行亲和层析纯化表达蛋白,缺点是不能直接证明表达蛋白是HSP70蛋白,还需结合表达质粒的测序和表达蛋白的分子量来共同证明。某些研究者利用HSP70蛋白的高度保守性,使用已经商业化的抗人HSP70单抗作一抗来检测基因工程表达的其他动物HSP70蛋白,如用鼠抗人HSP70单抗检测凡纳滨对虾HSP70蛋白^[15],鼠抗人HSP70单抗检测牛源HSP70^[16]。这样做的优点是可以直接证明表达蛋白是HSP70,省去了自己制备抗HSP70蛋白抗体的繁琐,但是,由于宿主菌本身表达的HSP70蛋白与人的HSP70蛋白在一定程度上存在同源性,与抗人HSP70单抗也可能存在一定交叉反应,所以,可能会一定程度影响实验结果。因此,本研究选择了抗6×His的单抗,既能检测表达蛋白,又便于后续蛋白纯化。

3.3 诱导条件对近江牡蛎HSP70重组蛋白表达的影响

温度是直接影响重组蛋白表达量的重要因素之一。本实验表明,当在25℃、30℃、37℃条件下诱导pQE30/HSP70菌液达吸光度值 $A_{600}=1.45 \sim 1.50$ 时,3组的细菌数量接近,25℃诱导组的融合蛋白表达量在3个组中最高(图3),说明25℃是该重组蛋白的恰当诱导温度,这与吴任等^[15]和苏友禄等^[17]报道的37℃诱导下目标蛋白表达量最高这一结果明显不一致。产生这种差异的可能原因是:本实验是在相同或相近细菌量(同种菌液吸光度值相同代表菌液密度相同或接近)的情况下比较不同温度组的重组蛋白表达量,而吴任等和苏友禄等是在不同温度下,经历相同时间后,比较同体积菌液中的目标蛋白量,这样会因为温度较高组菌液密度高,从而导致目标蛋白量也相应较高。

有报道指出,0.1~1 mmol/L范围内的IPTG均适于重组蛋白诱导表达^[15],而低浓度的IPTG可以减少化学物质对细胞的损伤^[18]。在预实验基础上,本实验将IPTG浓度确定为0.2 mmol/L,实验结果证明该浓度诱导近江牡蛎HSP70重组蛋白表达是可行的。

参考文献:

- [1] 王彦波,周绪霞,许悻荣. 热应激蛋白70的研究进展[J]. 免疫学杂志,2003,19(3): 79-82.
- [2] Kiang J G, Tsokos G C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry and physiology [J]. *Pharmacol Ther*, 1998, 80(2): 183-201.
- [3] Fink A L. Chaperone-mediated protein folding [J]. *Physiol Rev*, 1999, 79(2): 425-449.
- [4] Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2: 185-194.
- [5] Milani V, Noessner E, Ghose S, et al. Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation [J]. *Int J Hypertherm*, 2002, 18: 563-575.
- [6] Mads D. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions [J]. *FEBS Letters*, 2007, 581: 3702-3710.
- [7] 李春勇,张其中,张占会. 三种水产药物对近江牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)的影响[J]. *四川动物*, 2006, 25(1): 153-154.
- [8] 占春霞,张其中,李春勇. 两种杀虫剂对近江牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)的致死作用[J]. *四川动物*, 2006, 25(1): 155-156.
- [9] 张占会,张其中,李春勇,等. 养殖近江牡蛎致病弧菌的分离与鉴定[J]. *热带海洋学报*, 2008, 27(6): 49-56.
- [10] 贾晓平,林钦,李纯厚,等. 南海渔业生态环境与生物资源的污染效应研究[M]. 北京: 海洋出版社, 2004: 386.
- [11] 张其中. 近江牡蛎HSC70基因的全长cDNA克隆及其在非生物和生物因素胁迫下的表达定量[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2002: 1-132.
- [12] 李春勇. 敌百虫诱导近江牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*) HSC70基因表达的定量研究[D]. 广东: 暨南大学, 2007: 1-81.
- [13] 高丰,金天明,喻华英,等. 禽源巴氏杆菌链霉素耐药基因StrA的克隆及原核表达[J]. *中国兽医学报*, 2004, 24(3): 245-247.
- [14] 刘棠,彭小莉,陈亮,等. 凡纳滨对虾桃拉综合症病毒主要结构蛋白基因的克隆及原核表达[J]. *台湾海峡*, 2007, 26(3): 356-361.
- [15] 吴任,谢数涛,孙勇,等. 凡纳滨对虾热休克蛋白70的原核高效表达[J]. *中国水产科学*, 2006, 3(2): 305-309.
- [16] 蔡亚非,王根林. 牛源HSP70基因点突变、分子进化和pET32a-c(+)原核表达[J]. *动物学报*, 2005, 51(6): 1080-1090.
- [17] 苏友禄,冯娟,孙秀秀,等. 赤点石斑鱼神经坏死病毒MCP基因原核表达条件优化[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(6): 2422-2424.
- [18] 里斯. 基因与基因组分析[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2006: 352.

Prokaryotic expression of heat shock protein 70 gene in *Crassostrea hongkongensis*

LI Wei¹, ZHANG Qizhong^{1,2}, ZHANG Zhanhui¹, CUI Miao¹, YAO Zhanjuan¹; HE Maoxian²

(1. Institute of Hydrobiology, Jinan University; Engineering Research Center of Tropical and Subtropical Aquatic Ecological Engineering Ministry of Education; Key Laboratory of Aquatic Eutrophication and Control of Harmful Algal Blooms of Guangdong Higher Education Institutes, Guangzhou 510632, China; 2. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

Abstract: Heat shock protein 70s (HSP70s) play an important role in folding, assembling, transferring proteins and degradating, regulating polypeptides of living things, and contribute to the protection of cellular proteins by functioning as molecular chaperones. Moreover, they take part in immune activity against pathogens, sensitively respond to various pollutants and so on. Therefore, HSP70s are key molecules of cells. The oyster, *Crassostrea hongkongensis*, is one of the most important economic mollusc and inhabits alongshore in South China Sea. It has become an important reared edible species and a monitoring animal for early warning of marine environment pollution in shore. Because oyster's HSP70 is involved in controlling diseases and monitoring polluting status of marine environment, it is necessary to get the HSP70 protein's monoclonal antibody for further research of the HSP70's function. Then enough HSP70 protein should be prepared. The present study aims to synthesize HSP70 with prokaryotic expression method. The recombinant expression plasmid pQE30/HSP70 was constructed by means of linking the oyster's HSP70 cDNA with prokaryotic expression vector pQE30. It was identified by endonuclease digestion and DNA sequencing of the recombinant plasmid. Then, the recombinant plasmid pQE30/HSP70 was transformed into *Escherichia coli* M15 and induced to express the fusion protein with 0.2 mmol/L IPTG. The fusion protein was identified by SDS-PAGE and Western blot. The expressed protein quantity induced at 25 °C is the highest among those induced at 25 °C, 30 °C and 37 °C. Thus, 25 °C is the fittest inducing temperature. Meanwhile, the expression level induced for 12 h at 25 °C is up to the highest, so the fittest induction time was 12 h. In the fittest condition, HSP70, a 69 kD protein, could be highly expressed in *E. coli* M15 as a soluble protein, and was identified by means of western blot with the monoclonal antibody against 6 × His. The prokaryotic expression vector pQE30/HSP70 was constructed for the fusion protein expression of the oyster HSP70. The recombinant protein was highly expressed as a soluble protein in *E. coli* M15, which would promote further study of the HSP70 function. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (3): 424–430]

Key words: heat shock protein 70 (HSP70); prokaryotic expression; *Crassostrea hongkongensis*

Corresponding author: ZHANG Qizhong. E-mail: zqz666@sina.com.