

热休克蛋白 70(HSP70)基因在中国对虾染色体上的定位

张绍萍^{1,2}, 张晓军¹, 相建海¹

(1. 中国科学院海洋研究所, 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:以热休克蛋白 70(HSP70)基因为探针, 利用荧光原位杂交(FISH)的方法, 将其初步定位在中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)染色体上。观察 150 组精巢细胞染色体, 有 111 组染色体有 3 个杂交信号, 占所观察的 74%, 由此得出, 热休克蛋白 70 基因(HSP70)很可能存在于中国对虾减数分裂细胞 3 对染色体的 3 个位点上。本研究首次将功能基因定位在了对虾染色体上, 为中国对虾的遗传物理图谱的构建提供了有效可行的方法。

关键词:热休克蛋白(HSP70)基因; 荧光原位杂交(FISH); 基因定位; 中国对虾

中图分类号:Q959.223 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2004)06-0497-04

热休克蛋白(HSPs)是进化上高度保守、功能上至关重要的一族蛋白^[1], 它广泛存在于从低等原核生物到高等哺乳动物的整个生物界。正常情况下, 热休克蛋白主要行使分子伴侣功能, 并参与蛋白质代谢、细胞周期调控、细胞凋亡等重要生命活动^[2-4]。其中 HSP70 最为保守, 对其研究也最为广泛。绝大多数真核生物的 HSP70 是多基因家族, 人至少有 10 个功能 HSP70 基因^[5], 小鼠的染色体上至少也有 8 个 HSP70 基因^[6]。

中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是我国重要的经济海水养殖种类之一, 但是近年来对虾白斑杆状病毒(WSSV)病害的大规模暴发给对虾生产造成了巨大损失。在养殖过程中发现, 环境温度能够影响某些对虾病的暴发流行, 比如中国对虾 WSSV 在水温 18℃以上才会致病^[7]; 鉴于 HSPs 在保护机体免受热休克伤害中的作用, 进行热休克蛋白研究对于了解对虾的发病机理可能是非常重要的。

由细胞遗传学、分子生物学、免疫学和显微图像分析技术结合而产生的荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)技术近年来发展迅速, 该技术已成为一种在分子水平上进行细胞遗传学研究的重要工具, 在染色体的鉴定、识别、重排和进化及基因图谱的构建方面取得了令人瞩目的成绩^[8]。

本研究利用荧光原位杂交技术首次将功能基因

定位在中国对虾的染色体上, 旨在为进一步研究热休克蛋白基因和对虾遗传物理图谱打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用虾取自中国科学院海洋研究所生物培育楼人工养殖的健康中国对虾, 平均体长 8~9 cm。Digoxigenin-11-dUTP 和 FITC(Fluorescence isothiocyanate, 一种荧光染料)标记的 Digoxigenin 抗体购自 Roche 公司。Taq DNA 聚合酶购自 Promega 公司。PI(Propidium Iodide, 碘化丙啶, 一种荧光染料)购自 Sigma 公司。去离子甲酰胺、硫酸葡聚糖、鲑精 DNA 购自上海 Sangon 生物工程公司。

1.2 对虾基因组 DNA 的提取

取对虾肌肉组织, 按照上海 Sangon 生物公司的基因组 DNA 抽提试剂盒提取基因组 DNA。

1.3 荧光原位杂交分析

1.3.1 染色体标本的制备 采用改良的气干法^[9]。即取对虾, 按照 1 μg/g 体重的比例注射秋水仙素。然后避光暂养 4 h, 取出精巢, 0.075 mol/L KCl 溶液低渗 40 min, Crany's 液固定后滴片, 空气干燥后用 10% 的 Giemsa 染色, 镜检备用。

1.3.2 探针制备 以中国对虾基因组 DNA 为模板, HSP70 基因的引物序列由焦传珍博士提供(中

收稿日期: 2004-03-03; 修订日期: 2004-06-28.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30230280; 30200213); 国家“973”基础研究项目(G1999012007); 国家“863”高技术研究发展项目(2002AA628030).

作者简介: 张绍萍(1979-), 女, 硕士. E-mail: zhangshaoping@ms.qdio.ac.cn

通讯作者: 相建海. E-mail: jhxiang@ms.qdio.ac.cn

国对虾 *HSP70* 基因的克隆和分析研究, 另文发表): p1: 5' ctg gaa cca tct cgg gtc tta a 3', p2: 5' tga tet acg atg ggt cga ttt g 3' 由 Sangon 生物工程公司合成。PCR 扩增反应体系 (总体积 20 μ L): 包括模板 100 ng, 10 pmol/ μ L 的 P1、P2 引物各 1 μ L, 10 $\times$ buffer 2 μ L, (25 mmol/L) $MgCl_2$ 1.6 μ L, 10 mmol/L dNTP 混合物 0.4 μ L (其中 Digoxigenin-11-dUTP: dTTP = 1:2), (5 u/ μ L) *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}C$ 预变性 4 min, 94 $^{\circ}C$ 变性 30 s, 61 $^{\circ}C$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}C$ 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min。用未混合 Digoxigenin-11-dUTP 的 dUTP 混合物同样条件进行 PCR 对照。取 5 μ L PCR 产物在含溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 用 Pharmacia 公司的 ImageMaster VDS 成像系统观察。

1.3.3 染色体预处理 挑选中期分裂相好的染色体片在 37 $^{\circ}C$ 的 2 $\times$ SSC (saline sodium citrate, Na^+ 溶液, pH 7.4 溶液) 中脱色 30 min, 再在 70%、85%、100% 的系列乙醇依次脱水各 2 min, 风干后, 将玻片置于 70% 的去离子甲酰胺中 72 $^{\circ}C$ 变性 2 min, 立即放入 -20 $^{\circ}C$ 的梯度冰乙醇 (70%、85%、100%) 中脱水干燥备用。

1.3.4 杂交 将制备好的探针杂交液 (48% 去离子甲酰胺, 8% 硫酸葡聚糖, 鲑精 DNA 0.25 μ g/ μ L, 探针 DNA 100 ng, 2 $\times$ SSC 配制) 75 $^{\circ}C$ 变性 5 min 后立即放入冰水中。然后把处理好的探针杂交液加到干燥的已变性的染色体玻片上, 盖上经过硅烷化的盖玻片。37 $^{\circ}C$ 杂交过夜 (18~20 h), 以未加探针 DNA 的杂交液进行同样操作作为对照。

1.3.5 洗脱及检测 杂交后的载玻片依次在 40 $^{\circ}C$ 50% 的甲酰胺 (2 $\times$ SSC 配制), 40 $^{\circ}C$ 2 $\times$ SSC 中洗 3 次, 每次 5 min, 然后在 0.1 mol/L (pH 8.0) PBD (磷酸缓冲液, pH 7.4) 中洗 2 次, 每次 2 min。取出样品, 吸去多余液体, 加 20 μ L 标有荧光染料 FITC 的 Digoxigenin 抗体 (5 μ g/mL), 加盖玻片在潮湿的平皿内于 37 $^{\circ}C$ 处理 20 min, 去掉盖玻片在 PBD 内充分漂洗。用 0.1 μ g/mL PL/PBS (Phosphate-buffered saline, PBS, 磷酸缓冲液, 0.01 mol/L NaH_2PO_4 , pH 7.4) 染色, 加盖后置避光的湿盒内。用 Zeiss El-Einsatz 荧光显微镜观察, 用 Kodak DMS 120 数码相机拍照, 对结果进行统计分析。

2 结果

2.1 PCR 产物

PCR 产物的电泳结果如图 1。*HSP70* 基因经

PCR 扩增产生一条 1 000 bp 左右的带, 结合 Digoxigenin-11-dUTP 后 PCR 产物由于分子量的增加而移到 1 200 bp 左右。

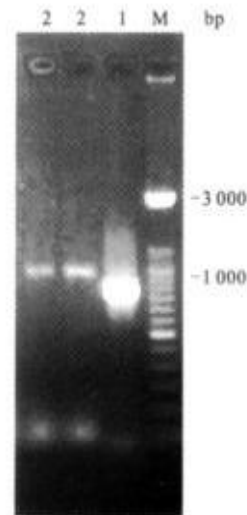


图 1 热休克蛋白基因在中国对虾中的 PCR 扩增产物和标记 DIG 的扩增产物

1. 没有标记的 PCR 产物; 2. 标记了 DIG 的 PCR 扩增产物。

Fig. 1 Products of PCR amplification of *HSP70* and DIG labeled fragments in the *Fenneropenaeus chinensis*

Lane 1: unlabeled PCR products; Lane 2: DIG-labeled PCR products.

2.2 FISH 结果

观察的 150 组精巢细胞染色体, 有 111 组的染色体有 3 个黄绿色杂交信号 (图 2), 占所观察的 74%, 这 3 个杂交信号分别位于 3 条染色体上。其余的分裂相中, 一个信号、两个信号和多个信号不等, 这可能与染色体的丢失和杂信号的存在有关。

3 讨论

FISH 技术作为一种最直接的分析 DNA 序列在染色体或 DNA 分子排列的分子细胞遗传学技术得到广泛的应用。但是, 在对虾中的实际操作存在许多困难, 由于对虾染色体数目多, 分裂中期呈短棒状甚至颗粒状, 具有不易分带等特点, 目前还没有关于对虾 FISH 的研究文献报道。本实验借鉴了其他动植物 FISH 的研究方法, 利用 *HSP70* 基因为探针, 对其进行定位, 取得了初步结果, 同时建立了适宜对虾荧光原位杂交的技术体系。

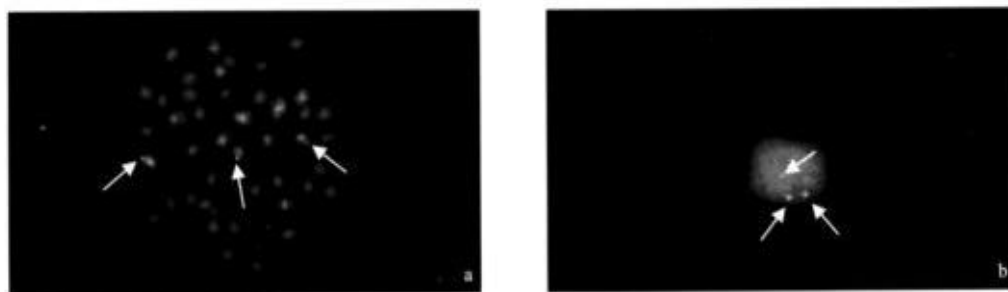


图2 HSP70 基因的荧光原位杂交结果

a: 信号分布在 3 条不同的染色体上; b: 间期细胞核上 3 个荧光信号。

Fig.2 Hybridization signals of HSP70 gene on chromosomes of *F. chinensis*

a: metaphase with signals on three chromosomes; b: a nucleus with three signals.

本研究首次尝试了功能基因在对虾染色体上的定位,针对中国对虾作为实验材料,本实验在方法上做了一些改进:①由于中国对虾染色体数目多,选择了精巢细胞的减数分裂染色体为研究对象,这样得到的染色体数目上少了一半,并且分裂相数目非常多,便于杂交后的观察和统计;②实验发现,制备好的染色体不能立即用来做杂交,放置的时间在 1~6 个月较好;③实验中还发现,杂交孵育的过程中由于环境适宜,染色体片上很容易长满细菌,干扰正常观察。因此在探针杂交液中加了少量的青霉素,很好地抑制了细菌生长,并没有影响杂交效果;④在实验的过程中杂信号非常严重,换用较严格的洗脱条件 ($0.4 \times \text{SSC}$),就能比较有效的洗掉杂信号。这些技术上的改进取得了明显的结果,然而,实际上 FISH 信号仍然不够明亮,所得结果仅仅可以知道荧光探针杂交到了染色体上,很难确定信号在染色体的具体位置。下一步我们将针对对虾染色体小的特点,尝试制备纤维状染色体,在对虾拉长的 DNA 纤维上进行 FISH 杂交,以提高杂交的灵敏度和定位的精确度。

本研究选择 HSP70 基因作为杂交探针,主要是由于其拷贝数较多,高度保守,易于进行物种间比较。人类至少有 10 个有功能的 HSP70 基因,已知有 8 个定位在 5 对染色体上^[5,10]。对虾 HSP70 家族的成员基因数目目前还没有报道,本实验用对虾的 HSP70 基因为探针在减数分裂的 3 条染色体上得到了杂交信号。尽管这只能作为一种初步的基因定位,但至少可以知道对虾 HSP70 基因是多拷贝的,并且存在于不同的染色体上。当然还不能完全排除染色体上存在其他的 HSP 家族基因,由于序列

保守性强, HSP70 基因探针可以杂交上。这些问题还有待于进一步研究。

对虾基因组研究刚刚开始,由于染色体小,数目庞大且形态相似,迄今都无法把不同染色体区分开来,通过不同基因的染色体的定位, FISH 技术有可能成为一种鉴别中国对虾单条染色体的可行方法,并可以用于构建初级染色体物理图谱。目前可利用的探针数目非常有限,要构建精细的物理图谱,首先应该解决探针的来源问题,因此下一步应该在稳定技术体系的基础上,制备对虾的 BAC 探针,以提高 FISH 杂交的灵敏度和成功率,实现更多、更精确的功能基因定位。

参考文献:

- [1] Tatusov R L, Koonin E V, Lipman A. A genomic perspective on protein families[J]. Science, 1997, 278: 631 - 637.
- [2] Hightower L E. Heat shock, stress proteins, chaperones and proteotoxicity[J]. Cell, 1991, 66: 191 - 197.
- [3] Hendrick J P, Hartl F U. Molecular chaperone functions of heat shock proteins[J]. Annu Rev Biochem, 1993, 62: 349 - 384.
- [4] Welch W J. How cells respond to stress[J]. Sci Am, 1993, 269: 56 - 64.
- [5] Lori L C, Bonnycastale, Yu Chang-En, et al. Cloning, Sequencing, and mapping of the human chromosome 14 Heat Shock Protein Gene (HSPA2)[J]. Genomics, 1994, 23: 85 - 93.
- [6] Anderson R L, Van Kersen I, Kraft P E, et al. Biochemical analysis of heat-resistant mousetumor cell strains: A new member of the HSP70 family[J]. Mol Cell Biol, 1989, 9: 3 509 - 3 516.
- [7] 王运涛, 徐洪涛, 李晨曦, 等. 暴发性流行病原对中国对虾越冬亲虾人工感染的研究[J]. 海洋科学, 1999, 23: 3 - 5.
- [8] 权洁霞, 戴继助. 荧光原位杂交技术 (FISH) 在鱼类遗传学研究中的应用及前景[J]. 动物学研究, 1999, 20(3): 225 - 229.
- [9] 相建海. 中国对虾染色体的研究[J]. 海洋与湖泊, 1988, 19

(3):205-209.

[10] Harrison G S, Drabkin H A, Kao F T, et al. Chromosomal loca-

tion of human genes encoding major heat-shock protein *HSP70*[J]. *Somatic Cell Mol Genet*, 1987, 13: 119-130.

Localization of gene encoding heat shock protein, *HSP70*, to chromosome of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*

ZHANG Shao-ping, ZHANG Xiao-jun, XIANG Jian-hai

(1. Experimental Marine Biology Laboratory, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: A conservative gene, heat shock protein 70 (*HSP70*), was mapped to the chromosomes of the Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) with Fluorescence *in situ* hybridization (FISH). FISH is a powerful tool for chromosome assignment and analysis, and it has been successfully applied in many species. However, this is still a challenge in the Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*); one reason is the large chromosome number of *F. chinensis* ($2n=88$); the other reason is that the chromosomes of *F. chinensis* are compressed with the similar figure.

In this study, the *HSP70* was firstly mapped to the chromosome of the Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). With the successive chromosome preparation, probe construction and fluorescence *in situ* hybridization, *HSP70* produced signals on nuclei and metaphase haploid. Analysis of chromosomes shows that 111 of 150 (74%) observed sets of testis haploid chromosomes produced three hybridization signals, which located respectively on three different chromosomes. The results indicated that *HSP70* was assigned to three loci of the haploid chromosome. The FISH result suggests that *HSP70* may have three loci haploid cells of Chinese shrimp. This study is the first step for the chromosome assignment of many interesting genes, which may provide important insight on the organization and evolution of the Crustacea genome. In addition, the chromosome assignment of the genes could promote the cytogenetical analysis and the physical map of *F. chinensis*.

Key words: *HSP70* gene; fluorescence *in situ* hybridization (FISH); gene localization; Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*)

Corresponding author: XIANG Jian-hai. E-mail: jhxiang@ms.qdio.ac.cn

欢迎订阅《中国水产文摘》

《中国水产文摘》由中国水产科学研究院渔业综合信息研究中心主办,是我国惟一一本全面报道国内水产科技文献的综合性检索期刊。本刊全面收录了水产科技有关及相关文献,目前年报道量3000条以上。本刊为双月刊,每双月底出版。每期定价12.00元,全年总价72.00元。邮发代号:18-126。可向各地邮局订阅,也可直接向本编辑部订阅。本刊建有《中国水产文献数据库》,可根据用户的需求,对1985年创刊以来报道的水产文献进行专题检索,并可有偿提供数据库光盘或软盘。编辑部尚有过刊,欢迎订阅。编辑部地址:北京市永定路南口青塔村150号 邮编:100039 开户银行:北京工商银行永定路分理处;账号:144428 28;户名:中国水产科学研究院。电话:(010)68673921;传真:(010)68673931,68676685;E-mail: wenzhai@cafs.ac.cn