

文章编号: 1004-7271(2007)02-0103-06

大黄鱼热激蛋白 cDNA 克隆及系统发育分析

李凌云¹, 张祖兴¹, 邬勇¹, 陈炯², 史雨红²

(1. 宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211;
2. 浙江省农业科学院病毒学与生物技术研究所, 浙江 杭州 310021)

摘要:根据已报道的 HSP 基因序列(EMBL 登录号: AF506290), 设计出特异引物, PCR 扩增后测序, 获得 1.7 kb 大小的大黄鱼热激蛋白 cDNA 基因序列。HSP 氨基酸序列的系统进化分析表明: 不同物种编码的 HSP 存在一些明显相关的群体, 高等动物编码的 HSP 在进化上紧密相关, 形成一个显著群体, 大黄鱼编码的 HSP 蛋白位于高等动物群体中, 这与大黄鱼的亲缘关系大致吻合, 其中与非洲爪蟾的同源性最高(92.3%), 也间接印证了脊椎动物中两栖纲动物与鱼纲动物的亲缘关系。通过大黄鱼 HSP 基因的提取和分析, 可为以后制备出核酸探针、筛选和克隆出一批具有优良性状的基因、构建基因文库等研究工作奠定基础, 同时对大黄鱼的品质改良和良种的选育有重要意义。

关键词: 大黄鱼; 热激蛋白 cDNA; 克隆; 系统发育
中图分类号: S 917 **文献标识码:** A

Cloning and sequence analysis of phylogenetic evolution of heat shock protein (HSP) cDNA in *Pseudosciaena crocea*

LI Ming-yun¹, ZHANG Zu-xing¹, WU Yong¹, CHEN Jiong², SHI Yu-hong²

(1. Life Science and Biotechnology Academy, Ningbo University, Ningbo 315211, China;
2. Department of Virology and Biotechnology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract: Divergent primers were designed for HSP amplification according to the sequence in Genbank (EMBL: AF506290). After PCR and sequencing, it was showed that the HSP gene sequence of *P. crocea* was about 1.7 kb in length. According to the phylogenetic tree, the tree consisted of some distinct branches, which were constructed by HSP of different species, and animals belonged to the same branch. And *P. crocea* shared highest homology with *Venous leaves* (African clawed frog), which confirmed the hypothesis that the Amphibian was subsequent to the Pisces in the evolutionary lineage partially. And the construction work in this paper could lay a basis for subsequent work of nucleotide probe preparation, clone and selection of some kinds of fine functional genes for culture, construction of *P. crocea* cDNA library, and was of great meaning for the development for the culture of *P. crocea*.

Key words: *Pseudosciaena crocea* (Richardson); heat shock protein (HSP) cDNA; clone; phylogenetic analysis

热激蛋白(Heat Shock Protein, HSP)是生物细胞在应激原特别是环境高温诱导下所生成的一组蛋

收稿日期: 2006-03-14

基金项目: 国家高技术研究发展计划("863")项目(2002AA603021); 宁波市重大招标项目(2004C100040)

作者简介: 李凌云(1942-), 男, 教授, 主要从事遗传育种与种质种苗工程方面的研究。E-mail: limingyun@nbip.net

白质,是目前发现的非特异性的主要分子伴侣蛋白之一,直接参与并促进细胞内蛋白质从初生链的合成到多亚基复合体折叠、装配的整个生物过程^[1-4]。海洋生物中热激蛋白的研究近年来主要是关于恒定低温环境下生物体热激反应能力变化情况、生物体热耐受温度范围以及高渗透压下机体内热激蛋白的变化情况及功能等^[5-8]。由于热激蛋白在生物体耐热性方面的作用,许多学者试图找到环境温度与热激蛋白表达方式之间的关系。Tomanek^[9]等比较4种裸鳃目(Nudibanchia)海牛的热激反应,发现生活在不同地区的同一家族的生物 Ton (热激蛋白开始增加合成时的温度)、Tpeak(热激蛋白合成量最大时的温度)以及 Toff(热激蛋白的合成不受热激活时的温度)温度域是不同的。海洋生物中有关热激蛋白研究比较多的就是高渗透压下热激蛋白的变化情况^[10-12]。1999年 Carpenter^[10,11]等证明热激后鲑鱼体内产生的 HSP70 能提高其抗高渗的能力;1999年 Smith^[13]又证明暴露于高渗环境中的幼鲑鱼组织内 HSP70 的含量增加了10倍。但迄今为止,未见有关大黄鱼 HSP 的相关报道,因此希望通过大黄鱼 HSP 基因提取和分析,可为今后制备出核酸探针、筛选和克隆出一批具有优良性状的基因,构建基因文库等研究工作奠定基础,以促进大黄鱼养殖业的健康快速发展。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验用12尾大黄鱼样本(250 g左右)取自宁波象山港养殖网箱,活体带回实验室后解剖,取肝脏,盛放于1.5 mL的离心管中,超低温冰箱-70℃保存备用。采样前,用含0.1% DEPC水浸泡与样品接触的所有玻璃及金属器皿等24 h以上,120℃高温高压灭菌之后高温烤干。克隆载体质粒 pGEM-T 和大肠杆菌 TG1 购自 Promega 公司。

1.2 总 RNA 抽提

总 RNA 抽提采用 Rneasy Animal Mini Kit(QIAGEN 公司),方法略加修改:其间等体积的酚/氯仿抽提蛋白质两次,等体积的 LiCl 沉淀4h,70%的乙醇洗两次后,溶解于 DEPC 水处理过的 ddH₂O 中,-70℃保存备用。

1.3 引物设计

根据已发表的 HSP-70 基因序列(EMBL 登陆号:AF506290)设计特异性扩增引物:上游(1~25bp):CCATATGGAGAAAGTTCAGCATTGA;下游 HSP(1633~1659):AAGATCTCAACGAATGGCTATCAGTC。

1.4 RT-PCR

以总 RNA 为模板,M4-T(5'-GTTTTCCAGTCACGAC(T)₁₅-3')为起始引物,cDNA 合成体系为:10.5 μL total RNA;buffer 4 μL;2 μL 10 mmol/L dNTP;2 μL 0.5 ug/μL M4-T;0.5 μL RNA 酶抑制剂(23 U/μL);1 μL AMV 逆转录酶(200 U/μL);37℃水浴1.5 h。以经逆转录合成的 cDNA 第一链作为扩增模板,采用 ExTaq DNA 聚合酶(5 U/μL),上述引物进行 PCR 扩增;反应程序为:94℃预变性2 min;30个循环扩增(94℃30 s,56℃30 s,72℃1 min);56℃延伸反应10 min;4℃保存。

1.5 PCR 产物的检测和 DNA 片断的切胶纯化回收

PCR 产物检测应用1%的低熔点琼脂糖凝胶电泳(TAE 溶液配制),EB 染色后紫外灯下观察拍照记录。PCR 扩增产生的非特异性片断会影响连接反应中目的片断的连接效率,产生大量的假阳性克隆,因此切胶纯化是外源基因片断的克隆中重要的步骤之一。将紫外灯(302 nm)下观察到的目的条带用干净锋利的刀片切下,转入一灭菌过的 Eppendorf 管中,应用切胶纯化试剂盒(QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN)纯化;-30℃保存备用。

1.6 cDNA 亚克隆

应用 T₄DNA 连接酶,将纯化产物连接进 pGEM-T 载体;将连接产物转化到大肠杆菌 TG1。质粒载体多克隆位点在 LacZ 基因中,重组质粒用 α-互补进行筛选,转化的 E. coli 涂布含有 X-gal/IPTG 的

LB 平板,挑选白色菌落进行质粒鉴定,质粒 PCR 鉴定后进行测序。

1.7 序列分析

HSP 序列分析采用 GCG 软件包,同时与其他 HSP 序列构建系统进化树,系统树的建立应用 DNADIST 和 NJ 分析方法。

2 结果与分析

2.1 PCR 结果

通过特异性引物对大黄鱼基因进行 PCR 扩增,扩增产物通过 1% Agarose 凝胶电泳得到单一,明亮的 1.7 kb 的条带。测序结果经 BLAST 检验,与 NCBI 收录的 HSP 基因片断同源性较高(91.7%),可初步认定扩增得到的条带是 HSP 基因(图 1)。

2.2 大黄鱼热激蛋白(HSP)基因序列分析

大黄鱼热激蛋白(HSP) cDNA 编码序列长度为 1 630 bp,编码长度为 543 个氨基酸序列。氨基酸序列与其他 HSP 序列相比都有较高(92.3%)的同源性(图 2)。

2.3 同源性分析和进化树构建

采用 DNADIST 和 NEIGHBOR 分析方法,对大黄鱼 HSP 和其他 19 种 HSP 编码的多聚蛋白核苷酸序列进行系统进化树分析(图 3)。

大黄鱼的 HSP 基因跟其他动物基因编码序列有较高的同源性,其中与非洲爪蟾最高,为 92.3%,在进化树上也可以看出。HSP 相似蛋白的核苷酸序列系统进化树分析表明,不同物种编码的 HSP 存在一些明显相关的群体,如不同酵母编码的 HSP 在进化上紧密相关,形成一个显著群体;高等动物编码的 HSP 在进化上也紧密相关,形成一个显著群体;并且在这些群体中,物种亲缘关系高的其编码的 HSP 进化相关性也高。大黄鱼编码的 HSP 蛋白位于高等动物群体中,在该群体中,大鼠、小鼠、中国地鼠和人组成了一个进化高度相关群体;非洲爪蟾和热带爪蟾与其关系略远,大黄鱼与该群体远源相关。并且高等动物群体与低等动物果蝇和家蚕形成的小群体位于同一大的进化分支上,这与这些动物间的亲缘关系吻合;同时系统进化树显示大黄鱼的 HSP 跟两栖类非洲爪蟾的 HSP 最为接近,这也从侧面印证了脊椎动物中两栖纲动物与鱼纲动物的亲缘关系^[4]。

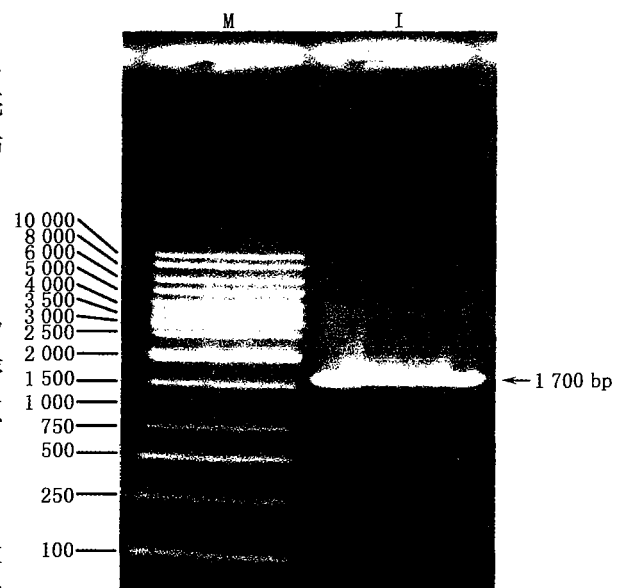


图 1 大黄鱼热激蛋白(HSP)基因 PCR 扩增产物凝胶电泳图

Fig. 1 1% agarose gel electrophoresis of HSP gene PCR products.

M: 1kb DNA Ladder; I: HS 基因 PCR 扩增产物

CGAC

ATGGAGAAAGTTTCAGCATTGAAAGACCAGGAAACAAGGCCTGAGTGC CGGAAACATTGATGAGGCTGTACGTTGCTACACCGAAGCT
 M E K V S A L K D Q G N K A L S A G N I D E A V R C Y T E A
 GTGGCCCTTGACCCCTCAACCATGTCTGTTCACTAACCAGATCAGCTGCCTACGCCAAGAAAGGCAACTATGAGAATGCTCTCCAGGAT
 V A L D P S N H V L F S N R S A A Y A K K G N Y E N A L Q D
 GCCTGTCAGACCA'CAAGATCAAGCCTGACTGGGGCAAGGGCTACTCCCGCAAAGCTGCAGCATTGGAA'TTCTTGGCAGATTGGAGAT
 A C Q T I K I K P D W G K G Y S R K A A A L E F L G R L E D
 GCTAAAGCAACTACCATGAGGACTCGACAAGGCCAATAATCAGCAACTGAAAGAGGGTTTACAGAACATTGAGGCCCGCTTGCA
 A K A T Y H E G L R Q E P N N Q Q L K E G L Q N T E A R I A
 GAGAAATCAATGATGAACCCCTTCGCCATGCCCAACTTGTATCAGAAGCTGGAGAGTGATTCTCGGACCCGTGAGCTTCTGTCAGAACCC
 E K S M M N P F A M P N L Y Q K L E S D S R T R E L L S E P
 AGCTACAGAGAAGTCTGGAGCAGCTCAGGAACAAACCATCGGAGCTTGGAACGAAGCTGCAGGATCCCAGAGTGATGACCACACTCTCT
 S Y R E L L E Q L R N K P S E L G T K L Q D P R V M T T L S
 GTGCTGCTGGGACTGAATCTGTCTGAGATGGAAGAAGCGAAGAGCCACTCCCCCTCTCTCCAAAACCCAAAGAGACTCAGCCACCT
 V L L G L N L S E M E E D E E P T P P P P P K P K E T Q P P
 CCTCCAAAGAGAACCTTCCCGAAAACAAGAGAAAGCCCTTGAAGGAAAAAGAACTTGGGAATACTGCATATAAGAATAAGGACTTT
 P P K E E D L P E N K R K A L K E K E L G N T A Y K N K D F
 GAAACAGCGCTGAAACAT'TATGAAGAAGCAGTCAAACATGACCCCGCCAAATGACCTACATATTAATCAAGCAGCTGTGTTCTT'GAG
 E T A L K H Y E E A V K H D P A N M T Y I L N Q A A V F F E
 AAGGAGACTTGGAGAAGTGCAGAGCTGTGTGAGAAGGCCAT'TGATGTTGGCAGAGAGAACCCGGAAGACTACAGACAAATTGCTAAG
 K G E L E K C R E L C E K A I D V G R E N R E D Y R Q I A K
 GCCTTGGCTAGGATTGCCAACTCATACTTCAAGGAGGAGAATCAAGAAGCAGTTCAGTAT'TCAACAAGACTTGCACAGCATCGT
 A L A R I G N S Y F K E E K Y K E A V Q Y F N K S L T E H R
 ACTCCTGACGCTTGAAGAAGTGTCAACAGGCAGAGAAGATATTGAAGGAGAGGAGAAGCTAGCCCTACATCAACCCCTGAGTTAGCCCTG
 T P D V L K K C Q Q A E K I L K E E E K L A Y I N P E L A L
 GAAGAGAAGAGCAGGGGCAACGACGCCTTCCAGAAAGGAGACTATCCCTTAGCCATGAAACAT'TACAGCGAGGCCATCAAGAGAAACCC
 E E K S R G N D A F Q K G D Y P L A M K H Y S E A I K R N P
 AGTGATGCGAAACTCTTCACTAACAGAGCTGCCTGCTACACAAAGCTGT'TGGAGT'TCAGCTTGCCTGAAGGAT'TGTGAAGCGTGCATC
 S D A K L F S N R A A C Y T K L L E F Q L A L K D C E A C I
 AAATTGAGCCTACCTTCAATCAAAGGCTACACGCGCAAAGGAGCTGCCTTGGAGGCCATGAAAGACTTTACAAAAGCTATGGATGCATAC
 K L E P T F I K G Y T R K G A A L E A M K D F T K A M D A Y
 CAGAAGGCTCTGGAGCTTGACTCTTCTCAAAGGAAGCCACAGAGGGATGCAGCGCTGTATGGTCAGTCAGGCCACGAGGAACGACAGT
 Q K A L E L D S S S K E A T E G M Q R C M V S Q A T R N D S
 CCTGAGGATGTGAAGAAAAGGGCCATGGCTGATCCCGAGGTGCAGCAGATTATGAGTGACCCAGCCATGCGCATGATCCTT'GAGCAAATG
 P E D V K K R A M A D P E V Q Q I M S D P A M R M I L E Q M
 CAGAAGGACCCCTCAGCGCTAAGCGACCACTTGAAAAATCCAGTATTGCTCAGAAGATT'CAGAAACTCATTGATGTCGGACTGATAGCC
 Q K D P Q A L S D H L K N P V I A Q K I Q K L I D V G L T A
 ATTCGTTGATAATGGTAGATATTTGTGTACAGCTA

图2 大黄鱼 HSP 基因序列以及推导出的氨基酸序列

Fig. 2 The HSP sequence of *Pseudosciaena crocea* and its deduced amino acid sequence

参考文献:

- [1] 陈建南,张性坦.人和植物中的热激蛋白功能研究新进展[J].遗传,1997,19(4):45-48.
- [2] 黄惠芳,马飞.热激蛋白的分子进化研究[J].厦门大学学报(自然科学版),2004,43(8):166-170.
- [3] Feder M. Heat shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology [J]. Ann Rev Phys, 1999,61:243-282.
- [4] Gething M. J. Guidebook to molecular Chaperones and Protein2Folding Catalysts [M]. Oxford, New York: Oxford University Press, 1997.
- [5] 李俊杰,桑润滋,田树军,等.热激蛋白在动物应激中的应用[J].家畜生态,2004,25(3):44-46.
- [6] 杨国正.热激蛋白研究概况[J].中国农学通报,1997,13(5):47-49.
- [7] Morimoto R. Regulation of the heat shock transcriptional response: Cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones and negative regulators[J]. Genes Dev, 1998, 12:3788-3796.
- [8] Pratt W, Stephen H, Greg A, et al. The hsp90 - based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1998, 217:420-434.
- [9] Tomanek L, Somero G. Evolutionary and acclimation induced variation in the heat shock responses of congeneric marine snails (*Genus tegula*) from different thermal habitats: implications for limits of thermotolerance and biogeography [J]. J Exp Biol, 1999, 202:2925-2936.
- [10] 孙旭彤,张士瑾,刘振辉,等.热激蛋白研究概况及其在海洋生物中的研究进展[J].海洋科学,2002,26(6):24-27.
- [11] Carpenter C, Hofmann G. Expression of 70kDa heat shock proteins in Antarctic and New Zealand notothenioid fish [J]. Comp Biochem Physiol Part A, 2000, 125:229-238.
- [12] Zou J, Y Guo, Toumy G, et al. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress sensitive complex with HSF1 [J]. Cell, 1998, (4):471-480.
- [13] Bruemmer-Smith S, Stuber F, Schroeder S. Protective functions of intracellular heat - shock protein (HSP) 70 - expression in patients with severe sepsis [J]. Intensive Care Med, 2001, 27:1835-1848 .