

# 近江牡蛎 Hsc70 蛋白基因 cDNA 片段的克隆 及 Southern 杂交和 RT-PCR 分析\*

张其中 吴信忠\*\* 高劲松 潘金培

(中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301)

(西南师范大学生命科学学院, 重庆 400715) (中山大学达安基因诊断中心, 广州 510089)

## Cloning, Southern blotting and RT-PCR analysis of a cDNA fragment encoding of 70 kDa heat shock cognate protein (Hsc70) from the oyster (Crassostrea ariakensis)\*

ZHANG Qi-Zhong WU Xin-Zhong\*\* GAO Jin-Song PAN Jin-Pei

(South China Sea Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

(College of Life Science, Southwest China Normal University, Chongqing 400715, China)

(Da'an Gene Diagnostic Center of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510089, China)

**Abstract** In order to elucidate the molecular mechanisms of the oyster (*Crassostrea ariakensis*) against adverse stimulating factors, we cloned and sequenced a partial cDNA encoding a 70 kDa heat shock cognate protein (Hsc70) from the oyster. The live oysters were obtained from Chengcun, Yangxi County, Guangdong Province, China. Various tissues, including mantle, gills, adductor muscle, heart and blood cells, were respectively collected from 5 untreated live oysters or treated ones at 36 °C for 1.5 hours, and immediately frozen in liquid nitrogen except for the blood cells which were suspended with Trizol Reagent after centrifugation (12 000 r/min for 30 s) and stored at -20 °C. Total RNA was isolated using Trizol Reagent according to the manufacture's instructions. The first strand cDNA was synthesized using reverse transcriptase Superscript according to the manufacture's instructions. The primers were designed from a conserved region of *C. gigas* Hsc70 cDNA sequence (GeneBank accession No. AF144646). The polymerase chain reaction (PCR) was performed for 30 cycles with denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 49 °C for 40 s, and elongation at 72 °C for 30 s. The product was cloned to pGEM-T easy vector and sequenced. It is 509 base pairs (bp) and possesses 94% identity with the cDNA encoding *C. gigas* Hsc70 using Blastn. This homology was strongly confirmed by amino acid sequence comparison using the Blastx (99%). The 509 bp fragment was labeled with <sup>32</sup>PdCTP and a random primer DNA labeling kit and employed as a probe to perform Southern blotting, the result demonstrated that the cDNA came from a partial mRNA transcript of *C. ariakensis* genomic DNA gene. The polymerase chain reaction (PCR) was carried out to investigate the expression of Hsc70, Using the cDNAs of several tissues, such as gills (heat shocked), mantle, adductor muscle (heat shocked), heart, blood cells (one sample with heat shock for 1.5 hours at 36 °C and another without any stimulus). The PCR results revealed that Hsc70 transcripts could be detected in all the tissues analyzed and greatly increased in the tissues with heat shock. The results showed that the Hsc70 is ubiquitously and constitutively expressed but can be stimulated by heat shock. All the facts above firmly established that the cloned cDNA fragment was a part of the cDNA encoding a Hsc70 protein in the oyster *C. ariakensis* [Acta Zoologica Sinica 49 (5): 708 - 712, 2003].

**Key words** Oyster (*Crassostrea ariakensis*), Hsc70 gene, cDNA sequence, Southern blotting, RT-PCR

**关键词** 近江牡蛎 70 kDa 热休克蛋白基因 cDNA 序列 Southern 杂交 RT-PCR

2002-11-21 收稿, 2003-05-23 修回

\* 国家自然科学基金 (No. 39970581)、国家自然科学基金农业倾斜项目 (No. 30170741)、中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-SW-302-8) 和广东省科技创新百项工程资助项目 (No. 99B06201G) [This research was funded by National Natural Science Foundation of China (No. 39970581 and 30170741), Key Science Program of Chinese Academy of Sciences (KSCX2-SW-302-8), and Key Science Program of Guangdong Province (No. 99B06201G)]

\*\* 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: wuxinz@zju.edu.cn

第一作者简介 张其中, 男, 39岁, 博士, 教授。研究方向: 水生动物病害学及分子生物学。E-mail: zhangqzdr@sohu.com

© 2003 动物学报 Acta Zoologica Sinica

Hsc70 (70 kDa heat shock cognate) 蛋白是 70 kDa 热休克蛋白家族的成员之一, 存在于所有原核及真核生物细胞中, 在正常情况下就有表达, 但在环境胁迫因子 (如高温、重金属和微生物感染等等) 的刺激下, 其表达量显著增加 (Kiang *et al.*, 1998)。Hsc70 蛋白作为分子伴侣在蛋白质拆叠形成正确的空间构象以及在变性蛋白质复性和清除细胞内永久变性蛋白中起着十分重要的作用, 在蛋白质运输和抗感染中也发挥了关键作用 (Kiang *et al.*, 1998; Healy *et al.*, 1992; Drew *et al.*, 2001)。因此, 它是生物体抗逆和抗感染的重要分子。关于牡蛎热休克蛋白的报道, 迄今为止, 仅见几篇论文报道 (Clegg *et al.*, 1998; Courdon *et al.*, 2000; Rathinam *et al.*, 2000; Shamseldin *et al.*, 1997; Tirard *et al.*, 1995), 这些研究已初步表明热休克能诱导牡蛎产生抗逆性并与热休克蛋白的高表达密切相关, 这在离体和活体研究中都得到了证实。近两年才见到太平洋长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)、美洲牡蛎 (又称美国东部牡蛎) (*C. virginica*) 和欧洲扁牡蛎 (*Ostrea edulis*) 的 70 kDa 热休克蛋白基因序列的报道 (Courdon *et al.*, 2000; Rathinam *et al.*, 2000)。由此可见牡蛎热休克蛋白的研究尚十分薄弱, 涉及基因的研究就更少。近江牡蛎 (*Crassostrea ariakensis*) 是我国特有的重要经济贝类, 在南方诸省大规模养殖, 近年来每年都发生严重死亡事件。研究与抗逆和抗感染密切相关的 Hsc70 蛋白基因, 无疑对进一步研究和控制近江牡蛎大量死亡事件的发生和保障牡蛎养殖业的健康发展有十分重要的意义。本文首次报道了近江牡蛎 Hsc70 蛋白基因的部分 cDNA 序列。

## 1 材料与方法

### 1.1 取材

实验材料为鲜活近江牡蛎, 取自广东省阳西县程村, 系人工吊养的 2 龄贝。从海上采得近江牡蛎后, 快速取下小块外套膜、鳃、消化腺、闭壳肌和整个心脏, 分别装于冻存管, 置液氮中冻存。将 20 只鲜活牡蛎在 4~5 h 内运回实验室暂养, 连续充气; 24 h 后, 用一次性注射器吸取 5 只活牡蛎血淋巴液, 离心 (12 000 r/min, 30 s) 后弃上清, 立即加入 1 ml TRizol Reagent (Gibco 公司) 重悬沉淀 (血细胞), 可继续提取 RNA, 亦可暂放 -20 ℃。选 5 只活牡蛎进行热休克处理 (水温从 21 ℃升至 36 ℃, 1.5 h), 然后按上述方法取材。

### 1.2 RNA 的提取

**1.2.1 血细胞 RNA 的提取** 用注射器反复吸打 TRizol Reagent 重悬的血细胞溶液至无可见小粒为止, 后面的步骤按 TRizol 产品说明进行。电泳分析 RNA 质量。

**1.2.2 各组织 RNA 的提取** 将液氮冻存的小块组织放入适量的 TRizol 中, 用匀浆机匀浆至无可见小粒为止。继后的操作按 TRizol 产品说明进行。电泳分析 RNA 质量。

**1.2.3 RNA 定量** 用 PU8800 紫外可见分光光度计 (Philips) 测量  $A_{260}$  和  $A_{280}$  并计算浓度, 要求  $A_{260}/A_{280} = 1.8 \sim 2.0$ 。

### 1.3 第一链 cDNA 的合成

按照逆转录酶 Superscript (Gibco 公司) 的操作说明进行。

### 1.4 引物设计

根据 GenBank 中太平洋长牡蛎 Hsc70 的 cDNA 序列 (等录号 AF144646) 与其它物种 HSP70 和 Hsc70 序列比较, 综合分析后, 设计引物序列: 上游引物 5' GTGAAAGGGCAAAGAGG 3', 下游引物为 5' TGGTTGGTTGTCGGAAGT 3', PCR 产物长度预期为 509 bp。

### 1.5 多聚酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR)

50  $\mu$ l PCR 反应体系含 32.75  $\mu$ l 灭菌双蒸水, 10  $\times$ buffer 5  $\mu$ l, 2.5 mmol/L 4  $\times$ dNTPs (Takara 公司) 混合液 4  $\mu$ l, 20 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ l, 10  $\mu$ mol/L 上、下游引物各 1  $\mu$ l, cDNA 2  $\mu$ l, 2.5 U Taq 多聚酶 (Takara 公司), 适量矿物油。在 PE480 (PE 公司, 美国) 热循环仪上, 按以下反应条件进行 PCR 循环: 94 ℃ 预变性 2 min, 94 ℃ 30 s, 49 ℃ 40 s, 72 ℃ 30 s, 循环 30 次, 72 ℃ 延伸 10 min, 最后进入 4 ℃ 状态。

### 1.6 PCR 产物的回收

用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物, 在紫外灯下切下目标带, 用胶回收试剂盒 (Gibco 公司) 回收产物 (按产品操作手册进行)。

### 1.7 回收 PCR 产物的克隆、筛选、测序和序列分析

根据 pGEM-T 载体 (Promega 公司) 的产品说明操作, 建立 10  $\mu$ l 连接体系, 于 4 ℃ 连接 16~24 h。用连接产物转化 DH5 制作的感受态细胞, 通过蓝白斑筛选, 挑取白色菌斑扩大培养, 并按质粒 DNA 抽提试剂盒 (Gibco 公司) 操作说明抽提

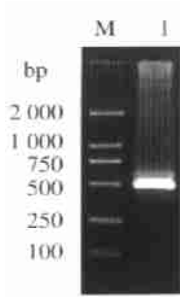


图 1 近江牡蛎 Hsc70 蛋白基因 cDNA 片段的扩增  
 Fig. 1 Amplification of cDNA fragment of 70 kDa heat shock cognated protein (Hsc70) gene in *C. ariakensis*  
 M: DNA 分子量标准 (DNA molecular weight marker)  
 1: PCR 扩增产物 (Product of PCR amplification)

质粒 DNA, 用 *EcoR* (TaKaRa 公司) 酶切鉴定。

将阳性克隆送上海博亚公司用通用引物双向测序 (ABI PRISM™ 377 全自动荧光测序仪)。将测得的 cDNA 序列及其翻译的氨基酸序列, 用 BLAST 软件进行同源性比较和分析。

### 1.8 DNA 的抽提和内切酶消化

取冻存于 -80 的近江牡蛎和翡翠贻贝 (*Mytilus smaragdinus*) (用作 Southern 杂交的对照) 鳃组织, 用灭菌手术剪剪碎材料, 放入 1.5 ml 小离心管中, 用基因组 DNA 抽提试剂盒 (上海生物工程公司), 按操作说明进行。用 *EcoR* 酶切 20 μg DNA 10 h (37 )。

### 1.9 Southern 杂交分析

用随机引物 DNA 标记试剂盒 (Gibco 公司) 和 <sup>32</sup>PdCTP (北京亚辉生物医学工程公司) 标记

```

1   gt gaa agg gca aag agg acc ctg tcc tcg agc tcc cag
1   E R A K R T L S S S S Q
39  gcc agc att gag att gac tct ctg ttc gag ggc att gat
13  A S I E I D S L F E G I D
78  ttc tac aca agt att acc agg gct agg ttt gag gag ctg
26  F Y T S I T R A R F E E L
117 aat gct gac ttg ttc cga ggc acc atg gag ccc gtg gag
39  N A D L F R G T M E P V E
156 aag gct ctg aga gac gcc aag ctg gac aag gcc cag atc
58  K A L R D A K L D K A Q I
195 cac gac atc gtc ctg gtc gga ggg tcc aca cgt atc cca
65  H D I V L V G G S T R I P
234 aag atc cag aaa ctc cta cag gac ttc ttt aac ggc gag
78  K I Q K L L Q D F F N G E
273 gaa ctg aac aaa tcc atc aac cct gat gaa gct gtt gct
91  E L N K S I N P D E A V A
312 tat gga gca gct gtc cag gcc gcc att ctg tcg gga gac
104 Y G A A V Q A A I L S G D
351 aag tcc gag gag gta cag gac ttg ctc ctg ttg gac gtc
117 K S E E V Q D L L L L D V
390 acc ccc ctg tcc ttg ggt atc gaa aca gcc gga gga gtg
130 T P L S L G I E T A G G V
429 atg acc aac ctc atc aag agg aac act acc att cca acc
143 M T N L I K R N T T I P T
468 aaa cag acg cag act ttc acc acg tac tcc gac aac caa cca
156 K Q T Q T F T T Y S D N Q P
  
```

图 2 近江牡蛎 Hsc70 cDNA 片段的核苷酸序列和推导的氨基酸顺序

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of Hsc70 cDNA fragment in *C. ariakensis*

方框内字母代表与太平洋长牡蛎 Hsc70 不同的氨基酸 (The different amino acid is in a box compared with that of *C. gigas* Hsc70)

从已测序的重组质粒上切下的克隆片段作为探针, 与未经酶消化的近江牡蛎基因组 DNA 和翡翠贻贝基因组 DNA 以及经 *EcoR* 消化的近江牡蛎基因组 DNA 产物杂交, 参照 Sambrook *et al.* (1989) 所述方法进行。

## 2 结果

### 2.1 近江牡蛎 Hsc70 蛋白基因 PCR 扩增的 cDNA 片段及胶回收

用特异引物进行 PCR 扩增, 经电泳分析发现在 500 bp 处有一条明亮的扩增带 (图 1), 与预期接近。将该条带用前述方法回收, 贮于 -20 °C 作后续研究。

### 2.2 PCR 扩增的 cDNA 片段的核苷酸序列及推导的氨基酸顺序

将凝胶回收的 PCR 片段克隆于 pGEM-T easy vector 中, 用通用引物测序后, 发现该片段长度为 509 bp, 与预期长度一致。核苷酸序列和推导的氨基酸顺序见图 2。

### 2.3 Southern 杂交分析

为了证实 PCR 扩增的上述 509 bp 的 cDNA 片段确系近江牡蛎基因组基因的表达产物, 用随机引物 DNA 标记试剂盒标记自重组质粒上切下的克隆片段作为探针, 对近江牡蛎基因组 DNA (等量分成两份, 一份用 *EcoR* 酶切, 另一份不酶切) 和翡翠贻贝的基因组 DNA (不酶切) 进行 Southern 杂交分析, 结果见图 3。该结果显示没有酶切的近江牡蛎基因组 DNA 和用 *EcoR* 酶切的产物都得到了一条杂交带, 而翡翠贻贝的基因组 DNA 中无杂交信号。由此证明, 先前 PCR 扩增片段确系近江牡蛎的基因表达产物, 而非假阳性。也表明该段 PCR 产物作为杂交探针在不同亲缘关系贝种的个体中无交叉反应信号, 具有显著特异性。

### 2.4 Hsc70 在不同组织中表达的 RT-PCR 检测

近江牡蛎未经热休克的外套膜、心脏和血细胞以及经热休克的鳃、闭壳肌和血细胞的 RT-PCR 结果见图 4, 这说明该 Hsc70 基因在未经热休克的近江牡蛎不同组织器官中都表达, 是一种组成性成分, 但经热休克后, 表达量显著上升。

## 3 讨论

对本次获得的 cDNA 序列以及推导的氨基酸顺序采用 Blast 程序与 GenBank 和 Swiss-Prot/TrEMBL 数据库进行同源性搜索, 结果发现: 该 cDNA

序列与太平洋长牡蛎 Hsc70 的 cDNA 序列 (登录号 AF144646) 的同源性高达 94%, 在 509 bp 中, 仅 26 个脱氧核苷酸发生替换, 其中以 c 与 t 间的转换为主 (14 次), 其次为 a 与 g 间的转换 (9 次), 而



图 3 用克隆的 cDNA 片段作标记探针对近江牡蛎基因组 DNA 进行 Southern 杂交的结果

Fig. 3 Southern blotting of *C. ariakensis* genomic DNA probed with the labeled cDNA fragment cloned

- 1: 翡翠贻贝基因组 DNA (*M. smaragdinus* genomic DNA) 2: 近江牡蛎基因组 DNA (*C. ariakensis* genomic DNA) 3: *EcoR* 酶切的近江牡蛎基因组 DNA (*C. ariakensis* genomic DNA digested by *EcoR*)

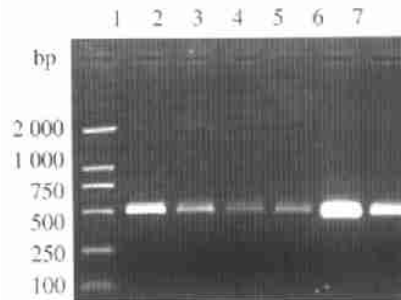


图 4 Hsc70 基因在经或未经热诱导的近江牡蛎的不同器官组织中表达的 RT-PCR 分析

Fig. 4 Expression of Hsc70 gene in various tissues of

*C. ariakensis* with or without heat shock with RT-PCR

- 1: DNA 分子量标准 (DNA molecular weight marker) 2: 热休克的鳃 (Gills with heat shock) 3: 未热休克的血细胞 (Blood cells without heat shock) 4: 未热休克的心脏 (Heart without heat shock) 5: 未热休克的外套膜 (Mantle without heat shock) 6: 热休克的血细胞 (Blood cells with heat shock) 7: 热休克的闭壳肌 (Adductor muscle with heat shock)

嘌呤与嘧啶间的颠换仅 3 次。氨基酸的同源性更高 (99%), 在推导的 169 个氨基酸中, 仅 1 个氨基酸不同, 即推导序列第 90 位氨基酸为谷氨酸 (E), 而太平洋长牡蛎为赖氨酸 (K) (图 2)。与欧洲扁

牡蛎 (*O. edulis*) Hsc70 基因 (登录号: AJ305316) 的同源性高达 93%, 氨基酸的同源性也高达 96%。然而, 该 cDNA 序列与美国东部牡蛎的 Hsp70 基因的 cDNA 序列 (登录号 AJ271444) 的同源性仅为 74.5%, 显著低于与前两种牡蛎 Hsc70 基因 cDNA 的同源性。这说明所克隆的 cDNA 片段为 Hsc70 蛋白基因的部分 cDNA。

Hsc70 基因具有两个特点, 即在正常情况下各器官中就表达, 而受热休克后, 表达量显著上升。通过 RT-PCR 检测所克隆基因在受热休克或未经热休克的近江牡蛎不同器官中的表达情况, 可进一步证明所克隆的 cDNA 为 Hsc70 基因的表达产物。RT-PCR 结果显示该基因在未经热休克的近江牡蛎不同组织器官中都表达, 并且受热诱导后表达量显著上升, 这一性质符合 Hsc70 基因的特点, 进一步证明该 cDNA 片段是 Hsc70 基因的表达产物。同时, Southern 杂交证实该 cDNA 克隆来自近江牡蛎而非别的物种的基因组基因的表达产物。因此, 所克隆的 cDNA 片段无疑是近江牡蛎 Hsc70 蛋白基因的 cDNA。

**致 谢** 在取样过程中得到了阳西县政府副县长梁成满先生和海洋与水产局邱马银副局长、陈成光股长和张小兵主任等工作人员的大力支持, 中山大学分子医学中心提供了实验条件。在此一并致谢!

#### 参考文献 (References)

Clegg, J. S., K. R. Uhlinger, S. A. Jackson, G. N. Cherr, E.

- Rifkin and C. S. Friedman 1998 Induced thermotolerance and the heat shock protein70 family in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **7**: 21~30.
- Courdon, I., L. Gricourt, K. Kellner, P. Roch and J. M. Escoubas 2000 Characterization of a cDNA encoding a 72 kDa heat shock cognate protein (Hsc 72) from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *DNA Sequence* **11** (3~4): 265~270.
- Drew, B., D. Miller, T. Toop and P. Hanna 2001 Identification of expressed Hsp s in blacklip abalone (*Haliotis rubra* Leach) during heat and salinity stress. *Journal of Shellfish Research* **20**: 695~703.
- Healy, A. M., E. Mariethoz, L. Pizurki and B. S. Polla 1992 Heat shock proteins in cellular defense mechanisms and immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences* **21**: 319~330.
- Kiang, J. G. and G. C. Tsokos 1998 Heat shock protein 70 kDa molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacology and Therapeutics* **80**: 183~201.
- Rathinam, A. V., T. T. Chen and R. M. Grossfeld 2000 Cloning and sequence analysis of a cDNA for an inducible 70 kDa heat shock protein (Hsp 70) of the American oyster (*Crassostrea virginica*). *DNA Sequence* **11**: 261~264.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis 1989 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shamseldin, A. A., J. Clegg, C. S. Friedman, G. N. Cherr and M. C. Pillai 1997 Induced thermotolerance in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research* **16**: 487~491.
- Tirard, C. T., R. M. Grossfeld, J. F. Levine and S. S. Kennedy 1995 Effect of hyperthermia *in vitro* on stress protein synthesis and accumulation in oyster haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology* **5**: 9~25.