

## 盐度胁迫下三疣梭子蟹热休克蛋白 HSP90a 的原核表达

覃 焜<sup>1</sup>, 许强华<sup>1,2,3,4\*</sup>

(1. 上海海洋大学海洋科学学院, 上海 201306;

2. 上海海洋大学大洋渔业资源可持续开发省部共建教育部重点实验室, 上海 201306;

3. 上海海洋大学农业部大洋渔业资源环境科学观测实验站, 上海 201306;

4. 上海海洋大学国家远洋渔业工程技术研究中心, 上海 201306)

**摘要:** 为证明三疣梭子蟹 HSP90a 蛋白与盐度胁迫的相关性, 实验根据 GenBank 上提供的三疣梭子蟹 HSP90a 基因蛋白编码区序列, 构建 pET28-HSP90a 原核表达重组质粒在大肠杆菌 DE3(BL21)中进行的盐度胁迫表达。结果显示, 转重组质粒的大肠杆菌生存率明显高于转空载体的大肠杆菌, 越接近大肠杆菌盐度耐受极限值, 两者差异越显著, 在盐度胁迫最高值(1 050 mmol/L)下, 两者差异达到 10.7 倍, 说明在盐度胁迫下三疣梭子蟹 HSP90a 对大肠杆菌有保护作用, 能显著提高大肠杆菌对盐度胁迫的耐受力。由此推测, HSP90a 蛋白可能参与了三疣梭子蟹盐度适应的生理过程。

**关键词:** 三疣梭子蟹; HSP90a; 原核表达; 盐度胁迫

**中图分类号:** Q 786; S 917.4

**文献标志码:** A

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)作为我国沿海的重要经济蟹类, 属于广盐性水生生物种, 盐度适应范围为 10~35, 最适盐度为 25~30<sup>[1]</sup>, 整个生活史都受到外界环境中盐度的影响。三疣梭子蟹的盐度适应性涉及到个体、组织到分子水平上的一系列适应, 而分子水平上的渗透调节机制是控制其盐度适应性的根本因素。

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs), 也称应激蛋白, 是一组在生物进化过程中高度保守的蛋白质分子家族。凡是能对细胞造成损害的各种因素都能引起热休克蛋白表达量发生变化, 例如热胁迫<sup>[2]</sup>。根据分子量大小, 热休克蛋白可以分为若干个家族 HSP90、HSP70、HSP60 等<sup>[2]</sup>。HSP90 是热休克蛋白中研究最多的家族之一, 也是其中为数不多的含有内含子的成员之一<sup>[3]</sup>。HSP90 又分为两种亚型: 诱导型 HSP90a 和结构型 HSP90b<sup>[4]</sup>。

Zhang 等<sup>[5]</sup>关于三疣梭子蟹 HSP90 的研究表明, 三疣梭子蟹的 HSP90b mRNA 在肌肉中高表达, 而

在肝胰腺、鳃和卵巢中低表达, 这一结果跟斑马鱼(*Danio rerio*)HSP90 研究结果一致, 斑马鱼的 HSP90b 在发育的骨骼肌中特异表达, 由此推测, 三疣梭子蟹 HSP90b 主要与肌肉生长过程相关。该项研究还揭示, 盐度胁迫条件下, 三疣梭子蟹鳃的 HSP90a mRNA 的表达水平高于 HSP90b<sup>[5]</sup>, 推测 HSP90a 蛋白在维持体内稳态, 提高细胞耐受力上的作用明显。

为进一步揭示三疣梭子蟹 HSP90a 蛋白与环境盐度适应的相关性, 本实验根据 GenBank 上提供的三疣梭子蟹 HSP90a 的基因全长序列, 构建其原核表达载体, 比较不同盐度条件下转重组质粒的大肠杆菌生长情况, 以此探索 HSP90a 蛋白在三疣梭子蟹盐度适应生理过程中所呈现的功能。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

三疣梭子蟹购于上海芦潮港码头, 解剖活蟹取

收稿日期: 2011-08-22

修回日期: 2012-02-15

资助项目: 国家自然科学基金项目(30800840); 上海市科委青年科技启明星人才计划项目(09QA1402600)。

通讯作者: 许强华, E-mail: qhxu@shou.edu.cn

鳃,收集到的鳃样品存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

## 1.2 方法

**总 RNA 提取** 取三疣梭子蟹鳃组织约 100 mg,利用 Trizol Reagent(Invitrogen)提取总 RNA,方法参见试剂说明。提取的 RNA 经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后,利用紫外分光光度计测定浓度,置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

**原核表达载体的构建** 根据 GenBank 上提供的 HSP90a 蛋白编码区序列(GenBank: FJ392027.1)和 pET28a(+)(Novagen)原核表达载体质粒序列设计上游引物 H90F (CGGAATTCATGCCTGAGGATGCTGCC)和下游引物 H90R (CCGCTCGAGTTAGTCACTTCCTCCATGC),引入 *EcoR* I 和 *Xho* I 两个酶切位点。PCR 程序为  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min;  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 45 s,  $64.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  45 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  3 min, 30 个循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  10 min。回收目的片段与 TA 克隆载体 pMD 18-T (TAKARA)连接转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株中,于含有氨苄青霉素 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LB 固体培养平板进行蓝白斑筛选,取阳性克隆质粒送去测序。测序正确的 pMD 18-HSP90a 质粒进行 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切,回收 HSP90a 目的片段,与 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后的 pET28a (+)载体连接转化至 DH5  $\alpha$  菌中进行筛选,将阳性克隆 pET28-HSP90a 重组质粒转化至大肠杆菌表达菌 DE3(BL21)感受态细胞中培养。

**pET28-HSP90a 重组质粒的诱导表达** 转 pET28- HSP90a 重组质粒菌株的单菌落于 5 mL 含卡纳霉素的 LB 液体培养基中,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  振荡培养至  $\text{OD}_{600}$  约为 0.5,分别加入 IPTG 至浓度为 0.1、0.5 和 1.0 mmol/L,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  继续培养。分别在 3 和 6 h 时收集菌体,4%SDS 溶液处理 2 min 后加入 SDS 上样缓冲液煮沸 5 min,离心去上清之后进行 SDS-PAGE 电泳,检测重组质粒 pET28-HSP90a 的表达情况。

**正常情况下大肠杆菌的生长曲线测定** 分别挑取正常菌株、转 pET28a(+)-空载体菌株和转 pET28-HSP90a 重组质粒菌株的单菌落,在 LB 液体培养基中  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养至  $\text{OD}_{600}$  约为 1.5 时,以 1 : 100 稀释于含有 200 mL LB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中继续培养,每隔 30 分钟测定 1 次  $\text{OD}_{600}$  值,每样品重复 3 次,绘制生长曲线<sup>[6]</sup>。

**不同盐度下的大肠杆菌生长情况** 分别挑取转 pET28a(+)-空载体菌株和转 pET 28-HSP90a 重

组质粒菌株的单菌落,在装有 200 mL LB 液体培养基的 1 L 锥形瓶中  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养至  $\text{OD}_{600}$  为 0.8 时,用 50 mL 离心管收集 20 mL 菌液菌体,去上清后每 20 mL 菌体重新加入含有不同浓度 NaCl (0~1 050 mmol/L)的 20 mL LB 液体培养基,并加入 IPTG 调至诱导终浓度为 1.0 mmol/L,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  继续培养 12 h,测定  $\text{OD}_{600}$  值,重复实验 3 次<sup>[7]</sup>。数据采用 SPSS11.0 软件的配对样本 *t* 检验进行统计学分析,比较多种盐度胁迫下的转 pET28a(+)-空载体和转 pET28-HSP90a 重组质粒的菌株生长差异。

## 2 结果

### 2.1 PtHSP90a 原核表达载体的构建及重组质粒的构建

利用引物 H90F 和 H90R 扩增得到 1 条 2 200 bp 的序列(图 1-a),回收目的片段后与 pMD18-T 连接转化后,PCR 扩增和双酶切两步筛选阳性克隆(图 1-b, e),送去克隆测序结果与三疣梭子蟹 HSP90a 序列一致,为正向插入。*EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切 pMD18-HSP90a 质粒和 pET28a(+)-后(图 1-c, e),用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接转化后 PCR 扩增和双酶切两步筛选(图 1-d),提取阳性克隆质粒 pET28-HSP90a 转化到大肠杆菌表达菌 DE3(BL21)。

### 2.2 pET28-HSP90a 重组质粒的诱导表达

IPTG 诱导后的菌体蛋白 SDS-PAGE 结果如图 2 所示,经不同浓度 IPTG 诱导 3、6 h 的含重组质粒的大肠杆菌在 66~94 ku 之间的某一条带相比未经诱导的大肠杆菌要较深,这与预期的重组质粒蛋白理论值 87 ku 相符,这说明三疣梭子蟹 HSP90a 基因能在大肠杆菌中正常表达。

### 2.3 正常情况下大肠杆菌的生长曲线

3 种菌株生长曲线基本一致,说明正常条件下,导入 pET28- a(+)-空载体和 pET28-HSP90a 重组质粒 DE3(BL21)菌株的生长无明显影响(图 3)。

### 2.4 不同盐度下的大肠杆菌生长情况

在不同盐度下,转 pET28-HSP90a 重组质粒菌株的生长情况要比转 pET28a(+)-空载体菌株的生长情况要好,尤其是在越接近大肠杆菌最大盐度耐受极限值(约为 1 112 mmol / L)时,两菌株的生长差异极其显著( $P<0.001$ )(图 4)。在最高盐度(1 050 mmol/L)时,转 pET28a(+)-空载体菌株基本不长,而转 pET28-HSP90a 重组质粒菌株仍有生长趋势(图

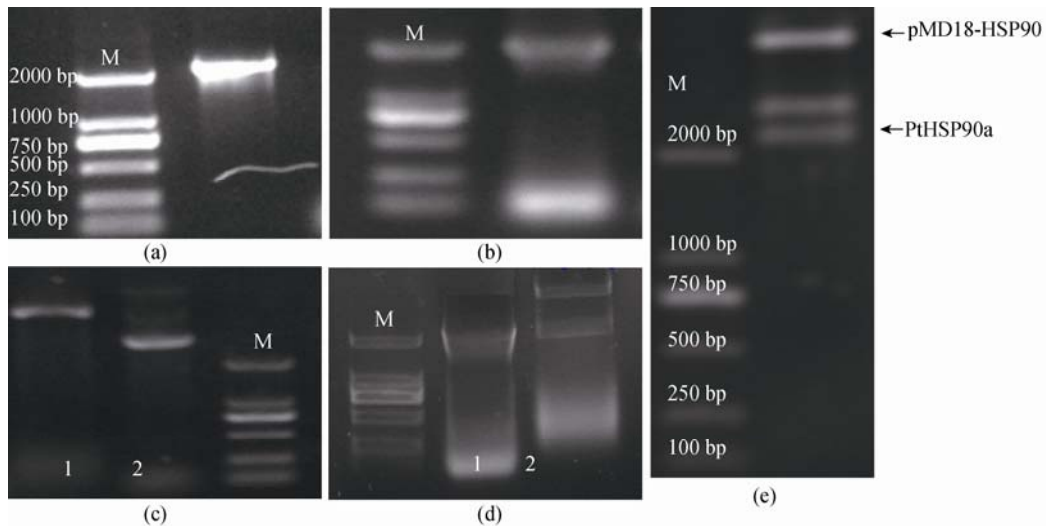


图 1 PtHSP90a 原核表达载体构建及重组质粒的鉴定电泳图

(a) HSP90a PCR 片段; (b) pMD18-HSP90a 阳性克隆液 PCR 鉴定; (c). pET28a (+)质粒酶切前后比较: 1.pET28a (+)双酶切产物; 2. pET28a(+)/质粒; (d). pET28-HSP90a 重组质粒鉴定: 1. 阳性克隆液 PCR 鉴定; 2. 重组质粒双酶切鉴定; (e) pMD18-HSP90a 质粒双酶切鉴定; M. DL2000。

Fig. 1 Electrophoresis of construction of pET28-HSP90a and screening for recombinant clones

(a) HSP90a PCR segment; (b) Screening for pMD18-HSP90a recombinant clones by PCR; (c) Comparison between pET28a(+) digested and non-digested: 1. pET28a(+) digested with *EcoR* I and *Xho* I; 2. pET28a(+) vector; (d). Screening for pET28-HSP90a recombinant clones: 1. Screening for recombinant clones by PCR; 2. Screening for recombinant clones digested with *EcoR* I and *Xho* I; (e) Screening for pMD18-HSP90a recombinant clones digested with *EcoR* I and *Xho* I; M. DL2000.

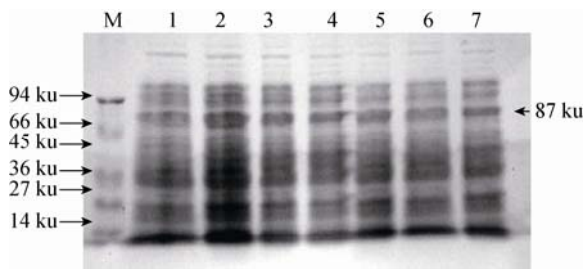


图 2 含 pET28-HSP90a 的大肠杆菌 DE3(BL21) 表达的 SDS-PAGE 图

1. 未经 IPTG 诱导的大肠杆菌 DE3; 2-4. 分别为 0.1、0.5、1.0 mmol/L IPTG 诱导 3 h 的大肠杆菌 DE3; 5-7. 分别为 0.1、0.5、1.0 mmol/L IPTG 诱导 6 h 的大肠杆菌 DE3。

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expressed product pET28-HSP90a

1. *E. coli* (DE3) without IPTG inducement; 2-4. *E. coli* (DE3) were induced by 0.1, 0.5 and 1.0 mmol/L IPTG for 3 h, respectively; 5-7. *E. coli* (DE3) were induced by 0.1, 0.5 and 1.0 mmol/L IPTG for 6 h respectively.

4-b), 转 pET28-HSP90a 重组质粒菌株增长值是转 pET28a (+)空载体菌株的 10.7 倍, 表明三疣梭子蟹 HSP90a 蛋白可以增强大肠杆菌 DE3(BL21)的盐度耐受力, 在高盐胁迫下能保护大肠杆菌继续增长。

3 讨论

Satempfli 等<sup>[8]</sup>研究认为, 热休克蛋白的诱导合成与海洋生物耐热性及耐盐性的获得有平行关系。HSP90 基因与生物盐度适应性间的关系已经在多种

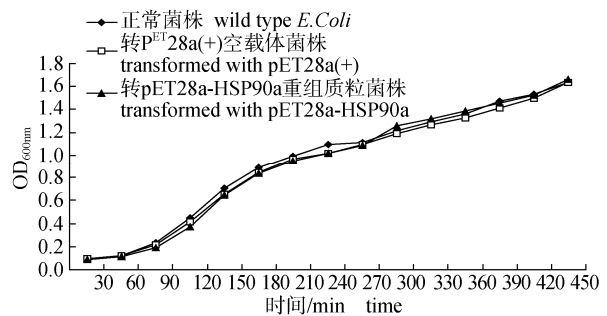


图 3 37 °C 三种不同类型的大肠杆菌 DE3(BL21) 的生长曲线

Fig. 3 Growth curves of three types of *E. coli* DE3(BL21) at 37 °C

物种中有所研究<sup>[9-17]</sup>, 但不同物种中, HSP90 基因在盐度胁迫下的表达情况各不相同,大西洋鲑(*Salmo salar*)从淡水转移到海水, HSP90 mRNA 表达量增加<sup>[11]</sup>; 大鳞鲑 (*Oncorhynchus tshawytscha*) HSP90mRNA 表达量在淡水和海水中的变化不明显<sup>[16]</sup>; 吴郭鱼 (*Oreochromis mossambicus*)HSP90- mRNA 表达量在盐度为 25 的海水中要高于淡水, 但在盐度为 35 的海水中的表达量要低于淡水<sup>[17]</sup>。

三疣梭子蟹 HSP90a 基因的半定量实验表明, 受到盐度胁迫 2 h 的三疣梭子蟹 HSP90a mRNA 表达量在高盐、正常盐度、低盐条件下的差异不明显<sup>[5]</sup>, 并推测三疣梭子蟹 HSP90a 与盐度适应的相关性不

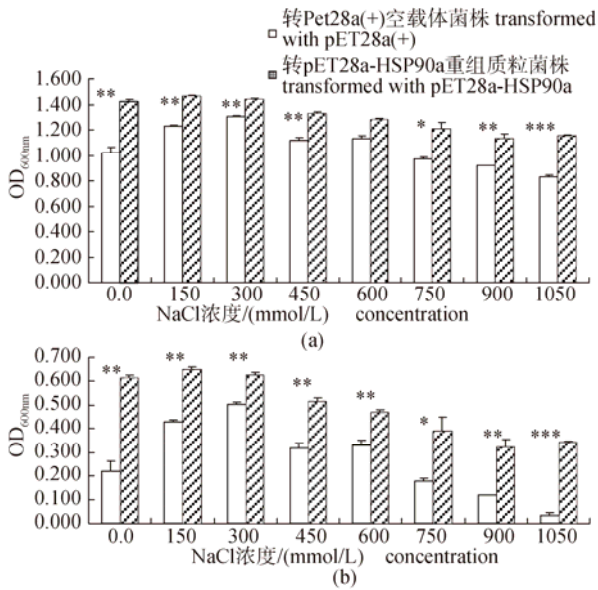


图4 不同盐度胁迫下,大肠杆菌DE3(BL21)生长情况对比(\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ )

(a) 两种大肠杆菌的总生长情况;(b) 盐度胁迫后,两种大肠杆菌的生长情况

Fig. 4 Growth status comparisons of two types of *E. coli* DE3(BL21) under different salinity challenges (\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ )

(a) The gross growth of two types of *E. coli* DE3 (BL21); (b) Increase of two types of *E. coli* DE3 (BL21) after different salinity challenges

明显。而在本研究原核表达实验中,转 pET28-HSP90a 重组质粒菌株的总体生长情况要比转 pET28a(+)空载体菌株的生长情况要好(图4),这说明三疣梭子蟹 HSP90a 与盐度胁迫适应存在着一定的相关性。本研究与 Zhang 等<sup>[5]</sup>的研究结果存在差异,推测这可能是因为三疣梭子蟹 HSP90a mRNA 在盐度胁迫下的表达量与胁迫时间具有一定的相关性,2 h 的盐度胁迫还不足以诱导 HSP90a mRNA 大量表达,以及 HSP90a 蛋白的大量合成。这样的推测在 Reddy 等<sup>[18]</sup>对珍珠粟胞质 HSP90 的表达研究中得到了验证,盐度胁迫 8 h,珍珠粟体内 HSP90 的表达量变化不大;特别是在盐度胁迫 1~4 h, HSP90 的表达量基本无变化;直到胁迫 24 h,表达量才显著增加。珍珠粟胞质 HSP90 原核表达实验表明,导入 HSP90 重组质粒,诱导培养 12 h 后就能明显提高大肠杆菌在盐度胁迫(0~650 mmol/L)下的生存能力。可见,短时间盐度胁迫下,三疣梭子蟹 HSP90a mRNA 表达量的不明显改变,不足以得出三疣梭子蟹 HSP90a 与盐度适应没有相关性的结论。

根据三疣梭子蟹 HSP90a 原核表达结果,实验认为,三疣梭子蟹 HSP90a 基因与盐度胁迫适应存在一定相关性。转入的三疣梭子蟹 HSP90a 蛋白可

以增强大肠杆菌的盐度耐受性,在高盐胁迫下的一段时间内仍能保护大肠杆菌继续增长。三疣梭子蟹 HSP90a 在大肠杆菌中表达的实验结果表明,HSP90a 蛋白可能参与了三疣梭子蟹盐度适应的生理过程。

#### 参考文献:

- [1] 胡则辉,徐君卓,石建高. 浙江沿海三疣梭子蟹的养殖模式[J]. 现代渔业信息, 2011, 26(3): 3-5.
- [2] 程维杰,李秋玲,孙延鸣,等. 热休克蛋白 70(HSP70)研究进展[J]. 畜牧兽医杂志, 2008, 27(6): 55-57.
- [3] 林亚秋,郑玉才,吉红,等. 草鱼 HSP90 基因 cDNA 序列克隆及其组织表达差异[J]. 水产科学, 2009, 28(8): 439-442.
- [4] Heikkila J J. Heat shock protein gene expression and function in amphibian model systems[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2010, 156(1): 19-33.
- [5] Zhang X Y, Zhang M Z, Zheng C J, et al. Identification of two hsp90 genes from the marine crab, *Portunus trituberculatus* and their specific expression profiles under different environmental conditions[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2009, 150(4): 465-473.
- [6] 栾东东,董玉芝. 刺山柑 70 kD 热休克蛋白基因克隆及原核表达[J]. 西北植物学报, 2009, 29(7): 1291-1297.
- [7] Reddy P S, Mallikarjuna G, Kaul T, et al. Molecular cloning and characterization of gene encoding for cytoplasmic Hsc70 from *Pennisetum glaucum* may play a protective role against abiotic stresses[J]. MGG Molecular Genetics and Genomics, 2010, 283(3): 243-254.
- [8] Satempfli C, Slooten K B V, Tarradellas J. HSP70 instability and induction by a pesticide in *Folsomia Candida*[J]. Biomarkers, 2002, 7(1): 68-79.
- [9] Fu D K, Chen J H, Zhang Y, et al. Cloning and expression of a heat shock protein (HSP) 90 gene in the haemocytes of *Crassostrea hongkongensis* under osmotic stress and bacterial challenge[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 31(1):118-125.
- [10] Deane E E, Kelly S P, Luk J C Y, et al. Chronic salinity adaptation modulates hepatic heat shock protein and insulin-like growth factor I expression in black sea bream[J]. Marine Biotechnology (New York), 2002, 4(2):193-205.
- [11] Pan F, Zarate J M, Tremblay G C, et al. Cloning and characterization of salmon hsp90 cDNA upregulation by thermal and hyperosmotic stress[J]. Journal of Experimental Zoology, 2000, 287(3): 199-212.
- [12] Choi C Y, An K W. Cloning and expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and osmotic stress transcription factor 1 mRNA in black porgy, *Acanthopagrus schlegelii* during osmotic stress[J]. Comparative Biochemistry and Physi-

- ology Part B Biochemistry & Molecular Biology, 2008, 149(1): 91–100.
- [13] Yang W K, Hseu J R, Tang C H, *et al.* Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase expression in gills of the euryhaline sailfin molly, *Poecilia latipinna*, is altered in response to salinity challenge[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2009, 375(1–2): 41–50.
- [14] Spees J L, Chang S A, Snyder M J, *et al.* Osmotic induction of stress-responsive gene expression in the Lobster *Homarus americanus*[J]. Biological Bulletin (Woods Hole), 2002, 203(3): 331–337.
- [15] Chang E S. Stressed-out lobsters: *Crustacean hyperglycemic* hormone and stress proteins[J]. Integrative and Comparative Biology, 2005, 45(1): 43–50.
- [16] Palmisano A N, Winton J R, Dickhoff W W, *et al.* Tissue-specific induction of Hsp90 mRNA and plasma cortisol response in chinook salmon following heat shock, seawater challenge, and handling challenge[J]. Marine Biotechnology(New York), 2000, 2(4): 329–338.
- [17] Yang M W, Huang W T, Tsai M J, *et al.* Transient response of brain heat shock proteins 70 and 90 to acute osmotic stress in Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) [J]. Zoological Studies, 2009, 48(6): 723–736.
- [18] Reddy P S, Thirulogachandar V, Vaishnavi C S, *et al.* Molecular characterization and expression of a gene encoding cytosolic Hsp90 from *Pennisetum glaucum* and its role in abiotic stress adaptation [J]. Gene, 2011, 474(1–2): 29–38.

## The prokaryotic expression of recombinant heat shock protein HSP90a of *Portunus trituberculatus* under salinity stress

QIN Ye<sup>1</sup>, XU Qiang-hua<sup>1,2,3,4\*</sup>

(1. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Scientific Observing and Experimental Station of Oceanic Fishery Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

4. National Distant-water Fisheries Engineering Research Center, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Heat shock protein 90 is a multi-functional molecular chaperone that plays an essential role in both cellular metabolism and stress response. The swimming crab, *Portunus trituberculatus* is an important marine fishery and aquaculture species. Water salinity conditions influence its artificial propagations significantly. In order to prove the relationships between HSP90a protein and salinity stress, we investigated the prokaryotic expression of *P. trituberculatus* HSP90a recombinant protein under a series of salinity stress. Based on the coding sequences of *P. trituberculatus* HSP90a protein in GenBank, we cloned the full length of HSP90a gene. Recombinant pET28-HSP90a prokaryotic expression recombinant plasmid was constructed and expressed in *Escherichia coli*. DE3 (BL21) under a series of salinity stress. Results showed that the survival rate of recombinant plasmid transferred *Escherichia coli* was higher than that of empty vector transferred cells. When the salinity challenge was close to the salinity tolerance maximum value of *E. coli*, the difference of survival rate between those two kinds of cells became more significant. For example, at the highest salinity challenge condition (1 050 mmol/L), the survival rate of recombinant plasmid transferred *E. coli* was 10.7 times higher than that of empty vector transferred cells. Therefore, our results indicated that *P. trituberculatus* HSP90a protein possessed protective effect against salinity stress and HSP90a protein might be involved in salinity adaptation physiological process in *P. trituberculatus*.

**Key words:** *Portunus trituberculatus*; HSP90a; prokaryotic expression; salinity stress

**Corresponding author:** XU Qiang-hua. E-mail: qhxu@shou.edu.cn