

半定量 RT-PCR 方法检测热应激对鲫鱼肝脏中 HSP70 mRNA 含量的影响

苏 岭^{1,2} 李绍戊¹ 王 荻¹ 刘红柏¹ 卢彤岩¹ 尹家胜^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所 黑龙江 哈尔滨 150070; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院 上海 201306)

摘要: 依据 GenBank 已公布的鲫鱼热激蛋白 70(Heat shock protein70, HSP70) 和 beta-actin mRNA 序列, 分别设计两对引物, 应用半定量 RT-PCR 方法检测应激处理后不同恢复时期鲫鱼(*Carassius auratus*) 肝脏中 HSP70 mRNA 的表达情况。结果表明, 诱导后肝脏组织中 HSP70 mRNA 的表达量呈现时间依赖性, 存在先升高后回落的趋势。在诱导后 1 h 即有所升高, 在 4 h 时达到最高值, 之后逐渐降低, 至 48 h 表达量降至最初值。研究结果为鲫鱼 HSP70 的研究提供了基础数据, 也为将 HSP70 用作鱼类生理状态的诊断提供了理论依据。

关键词: 鲫鱼; 半定量 RT-PCR; 热应激; HSP70

中图分类号: S917 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010) 增刊-0100-06

Semi-quantitative RT-PCR Method of Detection of Heat Stress on Fish Liver Content of HSP70 mRNA

SU Ling^{1,2} LI Shao-wu¹ WANG Di¹ LIU Hong-bai¹ LU Tong-yan¹ YIN Jia-sheng^{1,2}

(1. Heilongjiang River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: This research investigated the variation of HSP70 mRNA content in the liver of *Carassius auratus* at different time lapses after heat stress processing by using semiquantitative RT-PCR. Two primers were designed for this study according to the sequences of *Carassius auratus*'s heat shock protein70 (HSP70) and beta-actin mRNA published by GenBank. The results show that the HSP70 expression in liver tissue is time-dependent by showing an increase-to-decline trend. The expression starts to increase 1 hour after inducing and reaches a maximum 4 h later. Subsequently, it begins to decline continuously and eventually returns to its initial value until 48 h later.

Key words: *Carassius auratus*; Semiquantitative RT-PCR; Heat shock; Heat shock protein 70

自从 Ritassa 在果蝇的研究中发现热休克反应 (Heat shock proteins, HSP) 和 Tissieres 等^[1] 发现热休克反应中转录合成热休克蛋白 (Heat shock proteins, HSPs) 以来, 陆续报道证明, 几乎所有生物细胞在温度升高时均可合成热休克蛋白^[2]。不仅如此, 其他一些因素, 如低温、缺氧、重金属离子等胁迫条件, 同样可以诱导此类蛋白质的产生^[3]。HSP 含量发生急剧变化可能是应激时 HSP 基因转录水平发生了变化^[4]; 可能是热激蛋白通过不同的调节方式由细胞核进入细胞质, 在细胞各组织中有选择的进行表达^[5]; 也可能是 HSP mRNA 的稳定性在应激

时有所变化或者是在机体受到应激时, 热激蛋白的降解速度发生改变所致^[6]。

HSPs 是一组结构上非常保守的特殊蛋白质, 按照分子量大小通常将 HSPs 分为 4 类: HSP90 家族、HSP70 家族、HSP60 家族及小分子量 smHSP 家族^[7]。HSP70 是其中一类最保守和最重要的, 也是鱼类中研究最广泛的一类热休克蛋白家族。有关鱼类热休克蛋白的研究报道多集中在蛋白质水平, 但多种鱼类编码热应激蛋白的基因序列也已被克隆和检测, 包括虹鳟^[8]、青鳉^[9]、斑马鱼^[10]、罗非鱼^[11]、鲤鱼^[12]等。Airaksinen 等比较了斑马鱼在冷热胁迫

收稿日期: 2010-06-08

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (nycytx-49-10); 农业公益性行业专项 (20080313)

作者简介: 苏 岭 (1985-), 男, 河北邯郸人, 硕士, 主要从事鱼类病害研究。

通讯作者: 刘红柏 (1970-), 女, 山东人, 副研究员, 博士, 主要从事鱼类免疫方面研究。

条件下的表达模式的差异^[13], Das 等分析了鲤鱼的 HSP70 的组织特异性表达^[14]。Curri 和 Tufts 首次表明虹鳟中 HSP70 的表达主要在转录水平进行调控^[15]。目前, HSP70 的研究主要集中在功能和表达调控这两个方面, 其中 HSP70 的表达调控研究主要在转录和翻译两个水平, 以前者为主。因此正确度量应激反应过程中 HSPs 含量, 建立有效的 HSPs mRNA 定量方法也是非常必要的。

定量 PCR(Quantitative PCR) 是用 PCR 技术评估样本中靶基因的分子数, 实现对核酸信息的量化分析及比较^[16]。使用持家基因(Housekeeping gene)作为内参物(Internal standard), 与目的基因一起进行 PCR, 通过电泳灰度比值来量化基因表达情况, 这样的方法也称为半定量 PCR(Semiquantitative PCR), 因为得到的数值为相对的量, 而非绝对的量。半定量 RT-PCR 方法简便, 花费低又具有很高的灵敏度和特异性。因此成为检测微量样品变化量的一种广泛使用的较理想的方法。这种方法又因内参的使用而区分出两种方法: 一个是将目的基因的引物和内参引物分别放在两个反应体系中进行 PCR, 之后进行电泳分析; 另外一个方法是将目的基因的引物和内参引物放在一个反应体系中 PCR, 然后经电泳分析, 但引物之间可能存在竞争。本研究以鲫鱼(*Carassius auratus*)为研究对象, 用目的基因引物和内参引物分放两个反应体系的半定量 RT-PCR 方法检测了热诱导后不同时间肝脏中 HSP mRNA 的含量, 旨在为 HSP70 在鲫鱼中的研究提供基础数据, 也为 HSP70 是否可以作为鲫鱼养殖中应激反应的一种分子标记提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

鲫鱼 2009 年 10 月下旬购自黑龙江水产研究所松浦实验站。体长(11.22 ± 2.47) cm, 体重(35.24 ± 5.12) g。全部 24 尾鱼暂养于室内水族箱, 水温 18℃, 气泵充气保证供氧。每天投喂配合饲料, 每周换水一次, 暂养 1 个月。将鲫鱼从 18℃ 水中取出放入 28℃ 水中保持 1 h, 然后放回到 18℃ 水中, 处理后在每个时间点(0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h)随机取 3 尾鲫鱼的肝脏, 液氮速冻后置 -80℃ 保存。

Trizol 购自 Invitrogen 公司; Rever Tra Ace、RNase Inhibitor 均购自 TOYOBO 公司; DEPC 处理水、异丙醇、氯仿、75% 乙醇等均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 取 50 mg 组织放入研磨器,

加 1 mL Trizol 研磨组织至完全弥散均匀。室温放置 5 min 后, 12 000 r/min 4℃ 离心 5 min。取上清转移入另一洁净离心管, 加 200 μ L 氯仿, 上下颠倒混匀后室温放置 10 min。12 000 r/min 4℃ 离心 15 min, 取上清转移入另一离心管, 加入 0.5 mL 异丙醇, 将管中液体轻轻混匀, 室温静置 10 min。12 000 r/min 4℃ 离心 10 min 后弃上清, 加入 1 mL 75% 冰乙醇轻轻洗涤沉淀, 7 500 r/min 4℃ 离心 5 min。将沉淀晾干, 加 20 μ L DEPC 水溶解, 放入 -80℃ 保存。用 1% TAE 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 反转录 取 3 μ L 总 RNA 模板至 0.2 mL PCR 管, 加 2 μ L OligodT, 70℃ 水浴 5 min, 冰上冷却 5 min。加入 5 \times RT Buffer 4 μ L, 10 mmol/L dNTP 2 μ L, RNA 酶抑制剂 0.5 μ L, DEPC 水 7.5 μ L, 反转录酶 1 μ L, 终体积 20 μ L。42℃ 水浴 1 h, 之后 99℃ 5 min 灭活酶活性。 -20℃ 保存。

1.2.3 半定量 PCR

1.2.3.1 引物设计 依据 GenBank 公布的鲫鱼 HSP70 和 beta-actin mRNA 全序列(序列号分别为 AB092839.2 和 AB039726)用 Primer5.0 软件设计上下游引物:

HSP70 upper 5'-TGATGGAGGGAAGCCGAAAG-3',
lower 5'-GAAATAGGCAGGAAGTGTGAT-3', PCR
产物为 163 bp 的片段;

Beta-actin upper 5'-ATGCGGAAACTGGAAAGG-3',
lower 5'-TGAGGGCAGAGTGGTAGA-3', PCR 产
物为 117 bp 的片段。引物由上海生工生物工程技
术服务有限公司合成。

1.2.3.2 反应体系 1 μ L cDNA 产物, 0.2 μ L TaqDNA 聚合酶, HSP70 上下游引物, Beta-actin 上下游引物各 1 μ L, dNTP(2.5 mmol/L) 2 μ L, MgCl₂(25 mmol/L) 1.5 μ L, 10 \times Buffer 2.5 μ L, 加 ddH₂O 至总体积为 25 μ L。为避免引物对之间对缓冲体系的竞争, 分管进行 PCR。反应条件如下: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s; 72℃ 后延伸 10 min。

1.2.3.3 循环数确定 PCR 反应条件应控制所有进行分析的样品在分析时并未到达平台期, 即扩增是在线性的范围内进行的。而目的基因的模板量大大低于持家基因, 所以很少会同时到达平台期, 这就需要选择合适的循环数来保证目的基因和内参基因在分析时都处于线性扩增期。本试验将循环数设置梯度, 对各梯度的电泳结果进行分析, 制备循环数和灰度的图表, 在图表上选择最佳循环数。

1.2.4 半定量 RT-PCR 产物分析 本试验 PCR 产

物用 Goldview 染色,在 TAE 电泳缓冲液中以 1% TAE 琼脂糖凝胶电泳,凝胶电泳显像仪拍照。用 Bandsan5.0 软件进行定量分析。

2 结果与分析

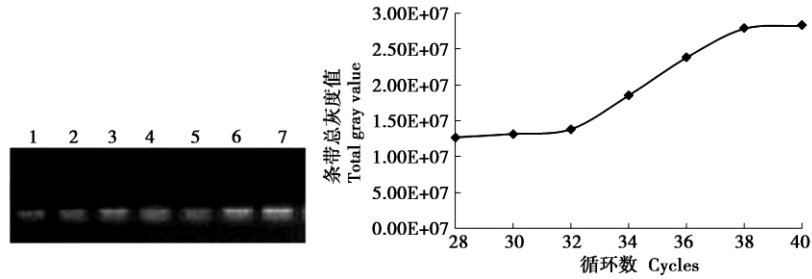
2.1 循环数的确定

图 1 显示 HSP70 基因 38 个循环时进入平台期,图 2 显示 Beta-actin 基因 36 个循环时进入平台期。为确保分析时两种基因都处于线性期,选择 34

个循环进行半定量 PCR。

2.2 半定量 RT-PCR

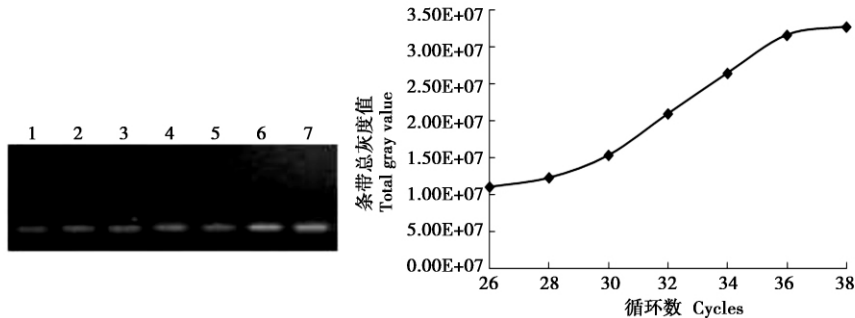
图 3 中,泳道 1~8 分别为 8 个时间点采集的样本。每个时间点采样 3 尾,亮度相近,只截取 1 尾的图像。表 1 中,每一组都由 8 个时间点的各一尾组成。由图 4 可以看出,热诱导后 1 h,HSP70 的表达量即发生变化,随着处理后时间的增加表达量不断升高,在 4 h 时出现最高值,此时约为起始值的 2.9 倍。之后逐渐回落,至 48 h 时基本恢复初始水平。



A. HSP70 PCR 结果; B. HSP70 PCR 产物定量结果; 1~7. 28 30 32 34 36 38 40 个循环。
A. PCR product of HSP70; B. Quantification of PCR products of HSP70; 1~7. 28 30 32 34 36 38 40 cycles.

图 1 HSP70 平台期循环数电泳分析

Fig. 1 Electrophoresis result of HSP70 plateau cycles



Beta-actin PCR 结果; B. Beta-actin PCR 产物定量结果; 1~7. 26 28 30 32 34 36 38 个循环。
PCR product of Beta-actin; B. Quantification of PCR products of Beta-actin; 1~7. 26 28 30 32 34 36 38 cycles.

图 2 Beta-actin 平台期循环数电泳分析

Fig. 2 Electrophoresis result of Beta-actin plateau cycles

表 1 HSP70 和 Beta-actin 相应条带的灰度值

Tab. 1 Gray value of each band corresponded to HSP70 and Beta-actin

		灰度值 Gray value of each band							
		0 h	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
第一组 The first group	HSP70	1 428.7	2 225.8	3 151.9	1 852.3	3 583.5	2 463.7	2 655.5	2 498
	Actin	2 511.3	2 621.2	2 766.8	1 065.3	2 703.1	3 232.4	4 065.2	4 291.1
	HSP70/Actin	0.57	0.85	1.14	1.74	1.33	0.76	0.65	0.58
第二组 The second group	HSP70	1 268.5	1 705	2 978.3	4 960.2	4 042.1	3 970.5	2 865.6	3 089
	Actin	2 320.5	2 065.3	2 584.5	3 331.3	3 051.3	5 309.2	4 532.5	5 651.8
	HSP70/Actin	0.55	0.83	1.15	1.49	1.32	0.75	0.63	0.55
第三组 The third group	HSP70	1 359.2	2 243.7	3 185.7	2 603.2	3 795.5	3 587.2	2 687.0	2 510.0
	Actin	2 471.3	2 609.0	2 844.4	1 549.5	2 919.6	4 782.9	4 265.1	4 735.8
	HSP70/Actin	0.55	0.86	1.12	1.68	1.30	0.75	0.63	0.53
	HSP70/Actin 平均数	0.557	0.847	1.137	1.637	1.317	0.753	0.637	0.553

3 讨论

HSP70 是最主要的胁迫诱导 HSP 蛋白,许多内

部及外部环境条件均能诱导其表达,如:温度诱导、盐度诱导、重金属及炎症等。胁迫因子导致细胞内变性蛋白数量的增加^[17],而 HSP70 作为“分子伴

侣”可辨认并与蛋白质在折叠、装配过程中的中间产物结合,起到稳定的作用,维持体内蛋白质的平衡。当细胞处于应激状态时,它可结合变性以及新合成的异常蛋白,修复或者降解,并激活新的蛋白合成,维持细胞生存及其功能,抵抗细胞毒素引起的细胞凋亡^[18]。近年来已有将其作为环境监测中生物指标的报道^[19-20]。也有学者认为,HSP70 具有高度保守的序列以及在受到环境胁迫后能够大量表达的特性,使其有可能成为一种生物指标,用来诊断鱼类的生理状态^[7],还有学者已经将环境胁迫下,机体的 HSP70 含量变化的高低作为衡量中草药对机体抗病、抗逆功能作用的指标^[21-23]。

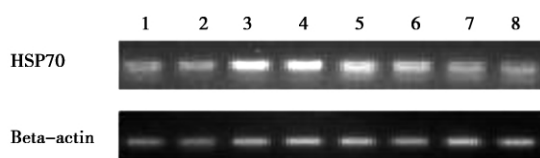


图3 HSP70 ,Beta-actin cDNA PCR 电泳扫描结果

Fig.3 Electrophoresis result of PCR products of HSP70 and Beta-actin

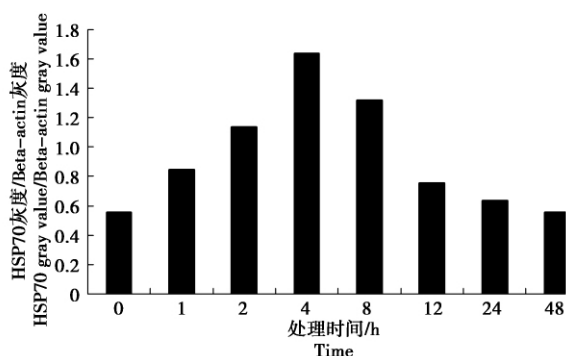


图4 半定量 PCR 检测热诱导后不同时间点鲫鱼肝脏中 HSP70 mRNA 的表达量

Fig.4 Semiquantitative PCR analysis of HSP70 gene expression in response of heat shock

鱼类 HSP70 存在广阔的应用前景。现有的研究报道多集中在虹鳟^[8]、罗非鱼^[11]、大黄鱼^[24]、虾^[23]、鲍^[25]等名特优的水产养殖种类,而大宗鱼类如四大家鱼等却鲜有报道。沈骅等^[20]研究了金属离子对鲫鱼脑组织中 HSP70 的影响,但只是处在蛋白质水平。在名特优种类的研究开始向功能基因组学转入的现在,居于我国主要消费种类的大宗鱼类亟待大量前期研究数据的收集。

本试验用半定量 RT-PCR 方法对热应激后鲫鱼在多个时间点采样,得到了 HSP70 表达与时间的关系。采用这样的半定量方法无需考虑各样本间总 RNA 的提取效率,反转录效率,cDNA 的 PCR 效率。但是样本中目的基因和内参基因的起始含量各不相同,而该定量方法又是基于 PCR 过程中指数增长期

的线性增长关系,所以分析时必须保证所有待分析样本都处在指数增长期。正是基于这种考虑,试验过程中进行了循环周期数的确定。试验检测出鲫鱼在受到热刺激后,肝脏中 HSP mRNA 的表达量呈现出一种严格的时间依赖性。热激 1 h 后即开始升高,随着时间不断升高,在 4 h 的时候表达量达到最高值,为起初的 2.9 倍。之后开始降低,48 h 后基本降至初始值。这一趋势与已有报道的其他生物一致^[25]。瞬时热刺激诱导机体变性蛋白、异常蛋白量增加,正常状态的蛋白平衡被打破,从而引发一些维持正常生命功能的酶活减弱甚至丧失。HSP70 基因通过相关途径的调节,细胞中 HSP70 mRNA 含量升高,表达的蛋白增加。作为“分子伴侣”,其结合变性蛋白折叠、装配中的中间产物,促进多肽链向天然构象转变,修复应激给机体带来的损害。应激后恢复时间增长,蛋白质变性现象减少,HSP70 的表达量回落。

参考文献:

- [1] Tissieres A ,Mitchell H K ,Tracy U M. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs [J]. *Journal of Molecular Biology* , 1974 ,84(3) : 389 - 398.
- [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(B08) : 166 - 170.
- [3] Piano A ,Franzelli S ,Tinti F *et al* . Sequencing and expression pattern of inducible heat shock gene products in the European flat oyster ,*Ostrea edulis* [J]. *Gene* ,2005 , 361: 119 - 126.
- [4] Shyu W C ,Kao M C ,Chou W Y *et al* . Heat shock modulates prion protein expression in human NT-2 cells [J]. *Molecular Neuroscience* 2002 ,2: 771 - 774.
- [5] Saavedra C A ,Hammell C M ,Heath C V. Yeast heat shock mRNAs are exported through a distinct pathway defined by Riplp [J]. *Genes and Development* ,1997 ,11: 2845 - 2856.
- [6] Benedetti A ,Baglioni C. Translational regulation of the synthesis of a major heat shock protein in HeLa cells [J]. *The Journal of Biological Chemistry* ,1986 ,261: 15800 - 15804.
- [7] 祝璟琳 ,王国良. 鱼类 HSP70 的研究进展 [J]. 宁波大学学报: 理工版 2007 ,20(4) : 446 - 450.
- [8] Kothary R K ,Burgess E A ,Candido E P M. The heat shock phenomenon in cultured cells of rainbow trout: HSP70 mRNA synthesis and turnover [J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* ,1984 , 783(2) : 137 - 143.
- [9] Arai A ,Naruse K ,Mitani H *et al* . Cloning and character-

- ization of cDNAs for 70kDa heat-shock proteins(HSP70) from two fish species of the genus *Oryzias* [J]. *Japanese Journal of Genetics* ,1995 ,70(3) : 423 – 433.
- [10] Lele Z ,Engel S ,Krone P H. HSP47 and HSP70 gene expression is differentially regulated in a stress-and tissue-specific manner in zebrafish embryos [J]. *Developmental Genetics* ,1997 ,21(2) : 123 – 133.
- [11] Lim E H ,Brenner S. Short-range linkage relationships , genomic organization and sequence comparisons of a cluster of five HSP70 genes in *Fugu rubripes* [J]. *Cell and Molecular Life Sciences* ,1999 ,55(4) : 668 – 678.
- [12] Molina A ,Biemar F ,Muller F *et al.* Cloning and expression analysis of an inducible HSP70 gene from tilapia fish [J]. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 2000 ,474(1) : 5 – 10.
- [13] Park J H ,Lee J J ,Yoon S *et al.* Genomic cloning of the HSC71 gene in the hermaphroditic teleost *rivulus* *Marmoratus* and analysis of its expression in skeletal muscle: identification of a novel muscle-preferred regulatory element [J]. *Nucleic Acids Research* ,2001 ,29(14) : 3041 – 3050.
- [14] Ali K ,Dorgai L ,Abraham M *et al.* Tissue-and stressor-specific differential expression of two HSC70 genes in carp [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003 ,307(3) : 503 – 509.
- [15] Iwama G K ,Thomas P T ,Forsyth R B *et al.* Heat shock protein expression in fish [J]. *Review in Fish Biology and Fisheries* ,1998 ,8: 35 – 56.
- [16] 林 玲. 定量 PCR 技术的研究进展 [J]. *国外医学遗传学分册* ,1999 ,22(3) : 116 – 120.
- [17] Feder M E ,Hofmann G E. Heat-shock proteins ,molecular chaperones and the stress response: evolutionary and ecological physiology [J]. *Annu Rev Physiol* ,1999 ,61: 243 – 282.
- [18] Mayer M P ,Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism [J]. *Cell Mol Life Sci* , 2005 ,62: 670 – 684.
- [19] 胡 炜 ,汪亚平 ,周永欣. Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 诱导稀有构鲫应激蛋白的研究 [J]. *水生生物学报* ,2001 ,25(1) : 50 – 53.
- [20] 沈 骅 ,张景飞 ,王晓蓉 ,等. Cu^{2+} 、Cu-EDTA 对鲫鱼脑组织应激蛋白 HSP70 诱导的影响 [J]. *环境科学* , 2004 ,25(3) : 94 – 97.
- [21] 陈 琦 ,华修国 ,顾晓峰 ,等. 复方中草药对大鼠热应激蛋白 70mRNA 的表达影响 [J]. *动物营养学报* , 2006 ,24(1) : 61 – 64.
- [22] 马得莹 ,单安山. 几种中草药抗蛋鸡热应激作用分子机制的初步研究 [J]. *动物营养学报* ,2007 ,19(3) : 283 – 288.
- [23] 雷爱莹 ,曾地刚. 复方中草药对凡纳滨对虾热应激蛋白 70 基因表达的影响 [J]. *广西农业科学* ,2008 ,39(6) : 830 – 833.
- [24] 张祖兴 ,李明云 ,陈 炯 ,等. 大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 热激蛋白的基因克隆、原核表达及抗血清的制备 [J]. *海洋与湖沼* ,2006 ,37(4) : 337 – 341.
- [25] 程培周 ,刘 晓 ,张国范 ,等. 荧光定量 PCR 方法分析皱纹盘鲍 HSP70 在温度胁迫下的表达 [J]. *海洋科学* ,2007 ,31(10) : 77 – 81.