

KK-42对凡纳滨对虾热激蛋白基因表达的诱导作用

李昕, 夏西超, 宁黔冀*

(河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要:为探讨咪唑类物质 KK-42 可能的作用机制,首次克隆了热激蛋白 90 (HSP90) 部分 mRNA 序列,研究了 HSP90 以及 HSP70 基因的时空表达以及 KK-42 对其表达的影响。将体长 3.5~5.0 cm 凡纳滨对虾幼虾随机分为 2 组,分别用 1.95×10^{-4} mol/L 的 KK-42 溶液或不含 KK-42 的溶液浸泡处理 1 min,之后在相同条件下常规饲养。结果显示,HSP90 和 HSP70 在凡纳滨对虾大颚器官、眼柄、肌肉和肝胰腺都有表达,其中,肝胰腺中的表达水平较高。实验期间,肝胰腺中两种 HSP mRNA 水平虽有一定波动,但含量相对较低;KK-42 处理可显著诱导肝胰腺 HSP 的表达,在处理后的第 1、2、3 天,HSP70 和 HSP90 mRNA 含量分别比相应的对照组升高了 243.4%、141.3%、410.5% 和 121.6%、505.5%、481.7%。结果表明,KK-42 处理可显著提高凡纳滨对虾肝胰腺 HSP90 和 HSP70 基因的转录水平。

关键词: 凡纳滨对虾; KK-42; 热激蛋白 90; 热激蛋白 70

中图分类号: Q 459; S 917

文献标志码: A

热激蛋白(heat stress protein, HSP)是一组进化高度保守的蛋白,具有维持并促进新生多肽正确折叠,行使分子伴侣功能,在动物耐受不良环境和自我保护过程中发挥重要作用^[1-2]。依照其分子量大小,可分为 HSP100、HSP90、HSP70、HSP60 和小分子量热激蛋白^[3]。一般情况下,HSP 基因在正常细胞中仅少量表达,参与机体的生长代谢,当受到热、病原感染、氧化应激、重金属、外源物等刺激时,会引发 HSP 在机体中的表达升高^[4-5]。其中研究较多的是 HSP70,上调其表达可提高斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 抵御鳃相关病毒 (gill associated virus)^[6]、细菌侵害的能力^[7];有助于虾夷盘扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 抵御镉胁迫^[8];提升克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 的环境适应能力^[9];有利于刺参 (*Apostichopus japonicus*) 更好的适应温度的突然变化^[10];另外 HSP90 的表达升高可以增强三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 对金属离子的耐受性^[11]。

在凡纳滨对虾的养殖过程中,虾苗期(0.6~1.2 cm)是一个比较敏感的阶段,死亡率相对较高,宁黔冀等^[12]首次发现咪唑类 KK-42 可提高虾苗成活率,但机理尚不清楚。鉴于 HSP 在增强生物自身抗逆性方面的重要作用,我们推测 KK-42 的作用靶之一可能是该类蛋白。据此,我们首次克隆出凡纳滨对虾 HSP90 部分序列,采用 Real-time PCR 方法,分析了 HSP70 和 HSP90 基因在凡纳滨对虾幼虾中的时空表达以及 KK-42 对其表达的影响,旨在为阐明 KK-42 的作用机理提供资料。

1 材料与方法

1.1 凡纳滨对虾的处理

凡纳滨对虾养殖于巩义市黄河生态渔业产业园。在面积 2 664 m²、水深 1.5 m 的池塘中,架设 2 个(10.0 m×6.0 m×1.5 m)网箱,从池塘中采集健康幼虾(体长 3.5~5.0 cm)800 头,随机分成 2 组,其中一组用 1.95×10^{-4} mol/L 的 KK-42 (烟台大学应用化学系提供,纯度 ≥95%) 溶液浸

收稿日期:2010-11-24 修回日期:2011-04-21

资助项目:国家自然科学基金项目(30940008);高等学校博士学科点专项科研基金(20094104110003);河南省高校科技创新人才支持计划(2009HASTIT022)

通讯作者:宁黔冀,E-mail:ningqianji1964@163.com

泡处理 1 min^[13],取出,空气中静置数秒,立刻投入到网箱中,按正常方式养殖;对照组用不含 KK-42 的溶液处理,方法同上。KK-42 处理后不同时间,取处理组及对照组凡纳滨对虾,分别解剖各组织,液氮速冻, -80 °C 保存。

1.2 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成

用 RNAiso Plus (TaKaRa) 提取凡纳滨对虾肝胰腺、大颚器官、眼柄和肌肉总 RNA,总 RNA 的完整性和纯度用凝胶电泳检测, RNA 的浓度根据 A₂₆₀ 进行定量。按照 PrimeScript™ RT 试剂盒 (TaKaRa) 操作说明合成 cDNA 第一链。

1.3 HSP90 部分 mRNA 序列克隆

根据 HSP90 氨基酸高度保守区域设计兼并引物,正向引物为 5'-CCNATGG CNACNACN-GARGG-3',反向引物为 5'-CATRTTCANCCCAT-NGCRTCNCC-3'。50 μL PCR 反应体系: TaKaRa Taq™ (5 U/μL) 0.25 μL, 10 × PCR Buffer (Mg²⁺ Plus) 5 μL, dNTP 4 μL, cDNA 2.5 ng, 引物各 1 μL, 灭菌水补至 50 μL。PCR 循环条件: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 °C 终延伸 10 min。PCR 扩增产物进行检测纯化,按照 T₄ DNA Ligase Kit (Promega) 要求连接在 pGEM-T 载体上进行转化测序。

1.4 HSP90 和 HSP70 mRNA 水平的定量测定

根据凡纳滨对虾 HSP70、源于我们结果的 HSP90 和内参 β-actin 的 cDNA 序列设计目的基因 HSP70 (AY645906)、HSP90 (HQ008268) 和 β-actin (AY486466),引物由上海生工生物公司合成。目的基因 HSP70 正向引物为 5'-AACGAGAG-CARCAAAGCCAAAG-3',反向引物为 5'-CAGGCACAGTGACTACAGCATC-3'; HSP90 正向引物为 5'-CTCTCAGTTCAT TGGCTATCCC-3',反向引物为 5'-GCTCGTCGTCGTTGTTCTTG-3'; β-actin 正向引物为 5'-CATCCACGAGACCA-CCTACAAC-3',反向引物为 5'-GAAATACT-GCCTCGCTCCCTC-3'。Real-time PCR 按照 SYBR Premix Ex Taq™ (TaKaRa, Japan) 要求进行,简单来说,在 20 μL 的反应体系中依次加入灭菌双蒸水 8.8 μL, 2 × SYBR Premix Ex Taq™ 8 μL, ROX Reference Dye II 0.4 μL, 正反向引物各 0.4 μL, cDNA 模板 2 μL, 离心,按照两步法 PCR 扩增标准程序进行扩增,PCR 循环条件,预

变性: 95 °C 30 s, 循环次数 1 次; PCR 反应: 95 °C 3 s, 60 °C 30 s, 循环次数 40 次。结果采用 2^{-ΔΔC_t} 法进行分析,实验所得数据采用 unpaired t-test 统计分析 (P < 0.05)。

2 结果

2.1 凡纳滨对虾肝胰腺 HSP90 部分 mRNA 序列

PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,仅出现一条与目的扩增产物分子量相同的条带 (图 1),测序为 970 bp。BLAST 证实为凡纳滨对虾 HSP90 部分 mRNA,现已在 NCBI 注册 (HQ008268)。

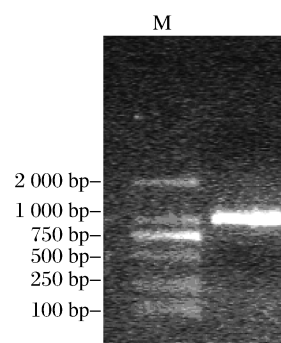


图 1 凡纳滨对虾肝胰腺 HSP90 cDNA PCR 产物凝胶电泳图

M: 2 000 bp 标准 cDNA。

Fig. 1 Gel electrophoresis of HSP90 cDNA sequence from *L. vannamei* hepatopancreas PCR product

M: 2 000 bp Maker.

2.2 HSP90 和 HSP70 转录物在凡纳滨对虾不同组织中的分布

HSP90 和 HSP70 在凡纳滨对虾大颚器官、眼柄、肌肉和肝胰腺都有表达,其中,肝胰腺中的表达水平较高,眼柄较低 (图 2)。

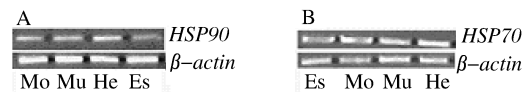


图 2 凡纳滨对虾 HSP90 和 HSP70 基因的空间表达 A: HSP90, B: HSP70, Mo: 大颚器官, Mu: 肌肉, He: 肝胰腺, Es: 眼柄。

Fig. 2 Spatial expressions of HSP90 and HSP70 in *L. vannamei*

A: HSP90, B: HSP70, Mo: mandibular organ, Mu: muscle, He: hepatopancreas, Es: eyestalk.

2.3 KK-42 对凡纳滨对虾肝胰腺 HSP90 表达的诱导作用

对照组肝胰腺中 HSP90 mRNA 水平的变化呈波动性降低,第 1、3 天和第 4 天分别比第 0 天减少了 53.3%、71.5% 和 56.5% (图 3)。KK-42 处理后,各时间点 mRNA 水平升高 69.1% 以上 ($P < 0.05$),其中第 2 天和第 3 天, mRNA 含量分别升高了 505.5% 和 481.7% ($P < 0.01$) (图 3)。

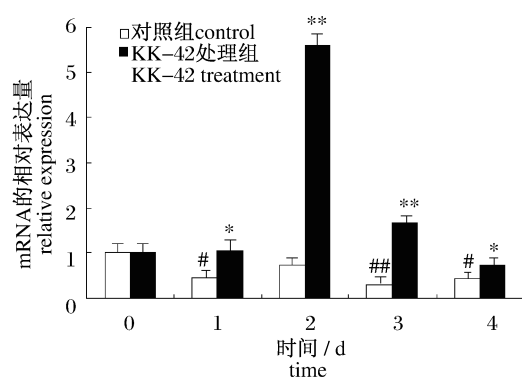


图 3 KK-42 对凡纳滨对虾肝胰腺 HSP90 表达的诱导作用

$n = 9$ /组/时间点,“*”“**”表示与相应对照组比有显著或极显著差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),“#”表示与第 0 天对照组比有显著差异 ($P < 0.05$),“##”表示与第 0 天对照组比有极显著差异。

Fig. 3 The induction of KK-42 on hepatopancreas HSP90 expression in *L. vannamei*

$n = 9$ /each group/each time point. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs control group at the same time. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs control group at 0th day.

2.4 KK-42 对凡纳滨对虾肝胰腺 HSP70 表达的诱导作用

在实验期间,对照组肝胰腺中 HSP70 mRNA 水平变化较小,只在第 2 天出现显著的升高(图 4)。KK-42 的处理可明显诱导 HSP70 表达,其 mRNA 含量在第 1、2 天和第 3 天分别比对照组升高了 243.4%、141.3% 和 410.5% ($P < 0.01$) (图 4)。

3 讨论

本研究发现,HSP90 和 HSP70 在凡纳滨对虾 4 种组织中均有表达,以肝胰腺水平最高。肝胰腺是甲壳动物的重要器官,为营养物消化、吸收以及外源物代谢的中心;同时也是对环境变化非常敏感的器官,参与甲壳动物的免疫防御^[3],在对温度等环境因子适应方面发挥重要作用^[2]。

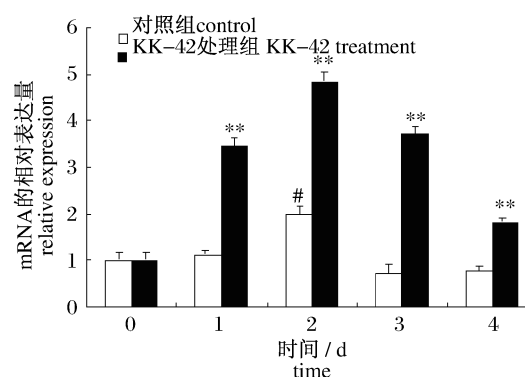


图 4 KK-42 对凡纳滨对虾肝胰腺 HSP70 表达的诱导作用

$n = 9$ /组/时间点,“**”表示与相应对照组相比有显著或极显著差异 ($P < 0.01$);“#”表示与第 0 天对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$)。

Fig. 4 The induction of KK-42 on hepatopancreas HSP70 expression in *L. vannamei*

$n = 9$ /each group/each time point. ** $P < 0.01$, vs, control group at the same time. # $P < 0.05$ vs. control group at 0th day.

在应激反应中,HSP 能维持细胞内必需蛋白质的空间构象,保护细胞生命活动。虽然 HSP 进化具有保守性,但他们在体内的分工存在一定差异^[14]。Real-time PCR 结果显示,在正常养殖条件下,肝胰腺中两种 HSP 表达的水平虽有一定的波动,但相对较低(图 3,图 4);KK-42 处理可显著诱导两种 HSP 的表达,但两者的变化趋势不同。在实验期间,KK-42 诱导的 HSP70 表达普遍维持在一个较高水平,变化幅度相对较小,推测 HSP70 是机体应对此类刺激的重要反应蛋白。研究表明,HSP70 是甲壳动物应对环境压力的一个极为重要的保护机制,可以作为一种压力标签^[15],或本身作为一种“危险”信号刺激机体先天免疫系统^[16]。引发 HSP70 升高的因素有多种,热刺激、病原体、水体渗透压变化以及重金属离子等均可导致斑节对虾 HSP70 高表达^[17-18]。而 KK-42 诱导的 HSP90 高表达尤以第 2 天最为显著,推测 HSP90 除了参与机体的应激反应外,可能还有其他的作用。据报道,HSP90 能帮助机体抵御生理及环境的压力因素^[11],而且对环境和病毒侵染的反应更加强烈而敏锐^[3];另外,HSP90 与细胞内蛋白激酶受体、转录因子、甾类激素受体等多种信号的转导过程有关^[19-20]。KK-42 诱导 HSP70 和 HSP90 的途径尚待进一步研究。

KK-42 主要应用于昆虫领域,因能加速昆虫的

蜕皮,故被称作保幼激素拮抗物。我们首次发现,适宜浓度的 KK-42 处理凡纳滨对虾虾苗,能够提高其成活率,但机理尚不清楚。处于虾苗期的凡纳滨对虾对环境变化较为敏感,抵抗力较弱,外界环境压力或病害很容易引起虾苗的死亡, KK-42 诱导肝胰腺 HSP90 和 HSP70 表达能增强动物对环境的适应性,这可能是其提高成活率的原因之一。当然,影响凡纳滨对虾成活率的因素有很多,既有外因(如环境条件)也有内因(如动物自身的免疫防御机能),这些都有待进一步研究。

参考文献:

- [1] LINDQUIST S, CRAIG E A. The heat shock proteins [J]. Annual Review of Genetics, 1988, 22: 631 - 677.
- [2] ALEXANDER G M, MILLER D. A biological role for the heat shock response in crustaceans [J]. Journal of Thermal Biology, 1990, 15(1) : 61 - 66.
- [3] RUNGRASSAMEE W, LEELATANAWIT R, JIRAVANICHPAISAL P, et al. Expression and distribution of three heat shock protein genes under heat shock stress and under exposure to *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon* [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2010, 34: 1082 - 1089.
- [4] FEDER M E, HOFMANN G E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology [J]. Annual Review of Physiology, 1999, 61: 243 - 282.
- [5] MOSELEY P. Stress proteins and the immune response [J]. Immunopharmacology, 2000, 48(3) : 299 - 302.
- [6] VEGA E, HALL M, DEGNAN B, et al. Short-term hyperthermic treatment of *Penaeus monodon* increases expression of heat shock protein 70 (HSP70) and reduces replication of gill associated virus (GAV) [J]. Aquaculture, 2006, 253(1 - 4) : 82 - 90.
- [7] ZHOU J, WANG W N, HE W Y, et al. Expression of HSP60 and HSP70 in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to bacterial challenge [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2010, 103 (3) : 170 - 178.
- [8] 方财王,王清育. 在镉胁迫下扇贝鳃组织应激蛋白的研究 [J]. 高等学校化学学报, 2010, 3: 507 - 513.
- [9] 孙勇,章力,李慕婵. 克氏原螯虾一种诱导型 HSP70 基因克隆及分析 [J]. 水生生物学报, 2009, 33(4) : 627 - 635.
- [10] 刘广彬,杨红生,刘石林. 温度选择对刺参群体在不同温度下生长及热休克蛋白表达的影响 [J]. 海洋科学, 2010, 34(7) : 49 - 53.
- [11] ZHANG X Y, ZHANG M Z, ZHENG C H, 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, 2009, 150(4) : 465 - 473.
- [12] 宁黔冀,杨洪,程鸿轩,等. 保幼激素拮抗物溶液及其提高水产养殖甲壳动物成活率方法 [P]. 2008, 发明专利: ZL200510017350. X
- [13] NING Q J, FU S G, XU X J, et al. A new and practical application of JH antagonist KK-42 to promoting growth of shrimp *Penaeus schmitti* [J]. Aquaculture, 2007, 270(1 - 4) : 422 - 426.
- [14] WEGELE H, MULLER L, BUCHNER J. HSP70 and HSP90-a relay team for protein folding [J]. Reviews of Physiology, Biochemistry Pharmacology, 2004, 151: 1 - 44.
- [15] LUAN W, LI F, ZHANG J, et al. Identification of a novel inducible cytosolic HSP70 gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and comparison of its expression with the cognate Hsc70 under different stresses [J]. Cell Stress Chaperones, 2010, 15 (1) : 83 - 93.
- [16] CUI Z, LIU Y, LUAN W, et al. Molecular cloning and characterization of a heat shock protein 70 gene in swimming crab (*Portunus trituberculatus*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 28(1) : 56 - 64.
- [17] DEANE E E, WOO N Y. Cloning and characterization of the HSP70 multigene family from silver sea bream: Modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation [J]. Biochemical and Biophysical Research Communication, 2005, 330(3) : 776 - 783.
- [18] LO W Y, LIU K F, LIAO I C, et al. Cloning and molecular characterization of heat shock cognate 70 from tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. Cell Stress Chaperones, 2004, 9(4) : 332 - 343.
- [19] SCHERRER L C, PICARD D, MASSA E, et al. Evidence that the hormone binding domain of steroid receptors confers hormonal control on chimeric proteins by determining their hormone-regulated binding to heat-shock protein 90 [J]. Biochemistry, 1993, 32(20) : 5381 - 5386.
- [20] PRATT W B. The role of the HSP90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase [J]. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 1997, 37: 297 - 326.

The induction of imidazole derivative KK-42 on heat shock protein expression in *Litopenaeus vannamei*

LI Xin, XIA Xi-chao, NING Qian-ji*

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Heat shock proteins (HSP) play important roles in coping with environmental stresses and self-protection in animals. Our previous study has demonstrated that the treatment of imidazole derivative KK-42 can increase the survival rate of *Litopenaeus vannamei*. In order to research the possible molecular mechanism of KK-42 effect on *L. vannamei*, a part of HSP90 mRNA sequence was first cloned; the spatial and temporal expressions of HSP90 and HSP70 as well as the effect of KK-42 on the expressions were determined. The shrimps (*L. vannamei*), 3.5 – 5.0 cm long, were soaked for 1 min in KK-42 solution at a concentration of 1.95×10^{-4} mol/L or in the solution without KK-42, and then cultured in normal way. Results showed that HSP90 and HSP70 were expressed in mandibular organ, eyestalk, muscle and hepatopancreas tissues, of which the levels from hepatopancreas were higher. Compared to treatment group, hepatopancreas HSP90 and HSP70 mRNA levels were relatively lower although the obvious fluctuations of the levels were found during experiment in control group. Administration of KK-42 could significantly induce hepatopancreas HSP90 and HSP70 expressions. The HSP70 and HSP90 mRNA contents increased by 243.4%, 141.3%, 410.5% and 121.6%, 505.5%, 481.7%, respectively, compared with the corresponding controls on day 1, day 2 and day 3 after KK-42 treatment. Our present study demonstrates that KK-42 treatment significantly induces the transcriptions of HSP90 and HSP70 from hepatopancreas, which is likely one of the mechanisms of promoting-survival effect of KK-42 on *L. vannamei*.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; KK-42; HSP90; HSP70

Corresponding author: NING Qian-ji. E-mail: ningqianji1964@163.com