

栉孔扇贝热休克蛋白 70 (HSP70) 基因的 BAC-FISH 定位

郇 聘^{1, 2}, 张晓军¹, 李富花¹, 张 洋^{1, 3}, 赵 翠^{1, 2}, 刘保忠¹, 相建海¹

(1.中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2.中国科学院 研究生院, 北京 100039 ; 3. Department of Soil & Crop Sciences, Texas A&M University, College Station, TX, USA)

摘要:利用 BAC-FISH 技术, 将包含 HSP70 基因的 BAC 克隆定位到栉孔扇贝的一对同源染色体的长臂上。HSP70 基因的染色体定位将对深入研究该基因的结构及功能并将其应用于生产实践提供基础支持。同时, 本研究是首次对栉孔扇贝低拷贝基因进行染色体定位的实践, 其结果将为栉孔扇贝的染色体的深入研究以及染色体鉴别等工作提供必要的参考。

关键词: 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*); 热休克蛋白 70 (HSP70); 荧光原位杂交; 染色体

中图分类号: Q23

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096 (2009) 07-0010-06

动物在自然界中需要适应各种各样的环境胁迫, 如温度胁迫 (高/低温胁迫)、缺氧胁迫、重金属胁迫以至于病原生物入侵等。为了减少不利环境条件对有机体造成的伤害, 动物体内存在一系列的因子, 在不利的环境条件下发挥作用, 维持细胞结构和功能。热休克蛋白家族 (Heat Shock Protein, HSP) 就是其中至关重要的一类蛋白。热休克现象最早是 1962 年发现的^[1], 它导致了一组称为热休克蛋白的蛋白家族的产生^[2]。热休克蛋白除了在高温胁迫中起作用外, 热休克蛋白家族最受人瞩目的功能是在细胞中行使分子伴侣的功能, 包括新生肽链的正确折叠与装配以及部分变性蛋白的挽救等^[3,4]。在热休克蛋白家族的成员中, HSP70 家族是最保守的一组, 其命名源自于其分子质量 (68~72 ku)。目前已经对从细菌到人在内许多物种的 HSP70 进行了广泛的研究。研究证实, HSP70 家族成员除了作为分子伴侣外, 还在生物遭受环境胁迫时发挥其它生理功能, 包括对抗重金属污染, 调理细胞凋亡等等^[5,6]。

栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 是中国最重要的海洋经济动物之一。病害问题是近年来栉孔扇贝养殖业发展的制约因素。许多与栉孔扇贝抗病抗逆性相关的基因被克隆并进行了相关研究^[7-15]。作为重要的抗逆相关基因之一, 栉孔扇贝的 HSP70 2003 年首次被克隆^[7]; 热休克蛋白可以使扇贝鳃组织中 HSP70 的表达明显升高^[16], 表明 HSP70 在栉孔扇

贝的抗逆过程中发挥作用。

除了编码序列的克隆和表达分析, 基因的染色体定位是功能基因研究的另外一个方面, 对基因的表达调控研究具有重要作用。对栉孔扇贝 HSP70 进行定位无疑将有力地促进该基因的功能研究。目前, 荧光原位杂交技术 (Fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 是对功能基因进行染色体定位最快捷有效的途径。在栉孔扇贝中, 通过 FISH 技术已经成功的定位了一些多拷贝基因, 包括 18S 核糖体 RNA 基因、组蛋白基因等^[17,18]。然而对于包括 HSP70 在内的大部分功能基因, 常规的 FISH 技术难以实现定位, 原因是这些序列拷贝数较低, 在常规的 FISH 手段下难以产生足够强的信号。对于这些低拷贝的序列, 一些大片段的克隆如 cosmid、BAC 等, 可以提供足够长的探针来产生可检测的信号^[19]。近来, Zhang 等^[20]构建了栉孔扇贝细菌人工染色体 (BAC) 基因组文库, 使以 BAC 质粒为探针的 FISH 技术 (BAC-FISH) 的应用成为可能, 为低拷贝功能基因的染色体定位提供了可靠的探针来源。

收稿日期: 2009-03-12; 修回日期: 2009-05-02

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (30730071)

作者简介: 郇聘 (1983-), 男, 山东新泰人, 博士研究生, 主要从事海产虾贝类基因克隆与定位研究, 电话: 0532-82898570, E-mail: huanpin@ms.qdio.ac.cn; 相建海, 通信作者, E-mail: jhxiang@ms.qdio.ac.cn

本研究以包含栉孔扇贝 HSP70 的 BAC 克隆为探针,利用 BAC-FISH 技术成功地将 HSP70 定位到栉孔扇贝有丝分裂中期分裂相上,为栉孔扇贝 HSP70 的后续研究提供了基础;同时对栉孔扇贝单条染色体的鉴别工作也起到推动作用。

1 材料与方法

1.1 BAC 克隆的验证

在前面的研究中, BAC 克隆 CFB123C08 被证明包含栉孔扇贝 HSP70^[20]。为了进一步验证,利用 Genbank 公布的栉孔扇贝 HSP70 序列(Genbank No. DQ466080)设计特异性引物: HSP70F: 5'-TCTCGACACTAGGCACTTC-3'; HSP70R: 5'-AGCACTCAGGTAGGCGTTT-3'。以 BAC 克隆为模板, HSP70F 和 HSP70R 为引物组合进行 PCR 反应。扩增产物转化入宿主菌 (*E. coli.*, Top10), 测序。

1.2 栉孔扇贝染色体的制备

栉孔扇贝染色体由担轮幼虫制备。成体栉孔扇贝购自山东省青岛市小港市场。在繁殖期,选取性腺发育饱满的个体,阴干刺激后分别取排出的精子和卵细胞进行人工授精。翌日取孵化出的担轮幼虫,在 0.01% 的秋水仙素溶液中处理 2.5 h,之后转移至 0.075 mol/L 的 KCl 溶液中低渗 15 min,低渗结束使用新鲜配制的 Canoy 氏固定液(甲醇:乙酸为 3:1)固定 2 次,每次 15 min,之后转入保存液中(甲醇:乙酸为 1:1),-20 °C 保存备用。染色体制备使用空气干燥法。取固定好的担轮幼虫样品,加入 50% 乙酸解离组织,从约 50 cm 高的地方将细胞悬液滴至预热(50 °C)的载玻片上,空气干燥。

1.3 探针合成及杂交缓冲液的制备

BAC 质粒的提取使用 Machery-Nagel 公司的 NucleoBond AX 100 kit 完成。使用 *Not* I 限制性内切酶消化质粒使插入片段与载体分离,脉冲场电泳检测质粒的插入片段情况。

取 1 μg 质粒,利用缺口平移的方法制备地高辛标记的探针(Digoxigenin Nick Translation Mix, Roche),合成好的探针采用琼脂糖凝胶电泳检测片段大小及分布。

在利用 BAC 探针杂交的过程中,需要使用封堵 DNA (*Cot*-1 DNA) 来封闭探针中可能存在的重复序列。*Cot*-1 DNA 的制备按照 Zwick (1997) 描述的方法完成^[21]。

探针和 10 倍的 *Cot*-1 DNA 及 50 倍的鲑精 DNA 共沉淀,溶于空白杂交缓冲液(50% 去离子甲酰胺, 2×SSC, 10% 硫酸葡聚糖, 50 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 7.0) 中,制备探针终质量浓度为 16.67 ng/μL 的杂交液。

1.4 荧光原位杂交

染色体片先用 0.16% pepsin 预处理(37 °C, 30 min) 以去除多余的蛋白成分,之后转入 2×SSC 中漂洗至少 2 min。将染色体片置于 70% 去离子甲酰胺中,68 °C 2 min 使 DNA 变性,之后立即转入梯度冰乙醇中脱水,以防止 DNA 复性,脱水后自然干燥。

开始杂交之前,首先将杂交液置 78 °C 3 min 变性,然后转入 37 °C 孵育 1 h,进行预退火,以封堵探针中的重复序列。预退火结束后,将杂交缓冲液加到染色体片上,盖上硅烷化处理的盖玻片,石蜡油封片,置黑暗湿盒中,37 °C 杂交 14~22 h。杂交完成后,脱去盖玻片,将染色体片在 45 °C 下,依次在 2×SSC、50% 甲酰胺和 0.2×SSC 中洗脱各 2 次,每次 5 min,以洗去非特异杂交的探针。洗脱完成后,对地高辛标记的探针,依次使用 mouse-anti-digoxigenin、FITC-rabbit-anti-mouse 和 FITC-goat-anti-rabbit 进行免疫荧光检测和信号扩增。抗体孵育完成后,使用 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 来对染色体进行复染, Nikon 80i 荧光显微镜观察,冷 CCD 照相,所得照片用 NIS-element (Nikon) 和 Photoshop (Adobe) 软件进行合成及对比度调整。

2 结果

2.1 BAC 克隆的验证

由引物组合 HSP70F 和 HSP70R 从 BAC 克隆 CFB123C08 得到特异性扩增产物。测序分析显示,该片段长约 830 bp,属于栉孔扇贝 HSP70 序列,进一步证实了 BAC 克隆 CFB123C08 中包含栉孔扇贝 HSP70 基因。

2.2 荧光原位杂交

脉冲场电泳显示所选 CFB123C08 BAC 质粒的插入片段约为 90 kb,由于质粒插入片段的内部存在 *Not* I 内切酶的酶切位点,质粒经酶切后产生了 3 个片段,除载体片段(V)外,另有两条插入片段(I)(图 1a)。以高纯度的 BAC 质粒为模板,缺口平移法制得了地高辛标记的探针。经琼脂糖凝胶电泳检测,反应后产物片段分布于 200~500 bp,显

示探针已制备完成 (图 1b)。



图 1 BAC 质粒的检测与标记

Fig.1 Examination of the BAC plasmid and the labeling of the probe

a: H. 质粒 CFB123C08; M. 分子质量标准; I. 插入片段; V. 载体。b: P. 探针; M. 分子质量标准
a: H. the plasmid CFB123C08; M. marker; I. Insert fragments; V. vector. b: P. probe; M. marker

由栉孔扇贝担轮幼虫制得了分散良好的中期分裂相。对 BAC 克隆 CFB123C08 进行了染色体定位研究。结果证实, 克隆 CFB123C08 定位于一对同源染色体的长臂 (图 2), 杂交信号明亮, 信噪比高, 没有发现信号数量和位置的变异, 杂交结果可信。

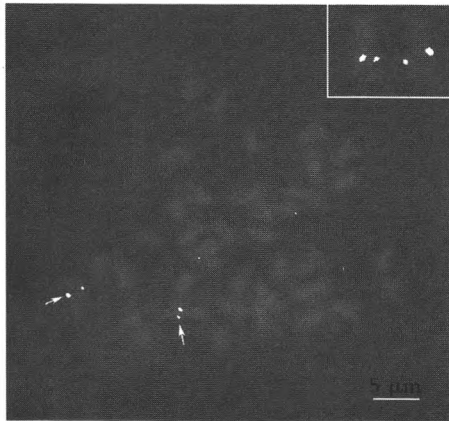


图 2 BAC 荧光原位杂交结果

Fig. 2 The HSP70-containing BAC clone CFB123C08 was localized to the long arms of a pair of homologous chromosomes of *Chlamys farreri* (indicated by arrows). The HSP70-containing chromosomes were zoomed in and showed in the right top insert figure. Bar = 5 μ m

3 讨论

在栉孔扇贝疾病暴发中有一个值得注意的现

象, 就是每年栉孔扇贝大规模死亡发生在夏季高温期; 时间上由南及北的传染病样波及^[22]。HSP70 在机体抵抗环境胁迫中的重要作用使其吸引了更多研究者的目光^[16, 23~26]。目前栉孔扇贝 HSP70 的研究均集中在 RNA 及蛋白水平的研究^[7,16], 而在 DNA 水平的研究并无报道。本研究首次将栉孔扇贝 HSP70 定位于其染色体上, 为在 DNA 水平研究 HSP70, 如基因连锁、遗传定位等工作打下了基础, 这些研究也必将为栉孔扇贝 HSP70 的深入功能研究提供支持。

栉孔扇贝染色体的研究始于上世纪 90 年代初, 王梅林等^[27]报道了栉孔扇贝的核型。然而在之后的十年时间里, 并无进一步的研究报道。究其原因, 是因为更高分辨率的细胞遗传学技术, 如 FISH 技术等, 没有被引入栉孔扇贝的染色体研究上, 所以无法获得更加精确的研究成果。近年来, Huang 等^[17]和 zhang 等^[18]开始利用 FISH 技术在栉孔扇贝染色体上成功地定位了 18S 核糖体 RNA 基因以及组蛋白基因, 为栉孔扇贝染色体的研究揭开了新的篇章。目前, 单个染色体的鉴别成为栉孔扇贝染色体研究中亟待解决的问题, 单条染色体的鉴别对于染色体微切割、非整倍体的鉴定及全基因组测序安装等均具有重要的应用价值^[19]。在各种染色体鉴别的方法中, 利用 FISH 技术开发染色体特异性探针是

一种很有前途的染色体鉴别方式。而在 FISH 探针的选择上,相对于其他类型的探针(如简单重复序列、多拷贝基因),大片段克隆由于序列独特和来源丰富的优点成为染色体特异性探针最好的来源。在部分海洋贝类中,已经利用大片段克隆作为探针开发了一些染色体特异性探针,成功鉴别了一些染色体。Wang 等^[28]利用 9 个 P1 克隆以及染色体的形态特点成功的鉴别了东方牡蛎 (*Crassostrea virginica*) 的 10 条染色体。使用大片段克隆鉴别栉孔扇贝染色体的工作也已经开始,Zhang 等^[29]利用 8 个 Fosmid 克隆鉴别了 8 条染色体。在本研究中,包含栉孔扇贝 HSP70 的克隆被只定位于一对同源染色体上,使其成为另一个理想的染色体特异性探针。同时与 Zhang 等^[29]使用随机克隆来进行染色体鉴别不同,本研究中使用的 BAC 克隆有明确的功能基因标签(HSP70 基因),这大大方便了研究结果在国内外不同实验室之间的比较和应用。

BAC-FISH 技术在模式生物以及其他常见陆生动植物中已经有很成熟的应用。然而对海洋贝类而言,其应用尚处在启动阶段。本研究通过对实验流程的优化,得到了稳定的实验结果。我们认为,要在海洋贝类中发展和应用 BAC-FISH 技术,应当注意下面一些关键的环节。首先是染色体的制备,分散良好、形态清晰且细胞质含量少的高质量染色体片是 BAC-FISH 技术成功的首要条件;其次,由于 BAC 质粒是单拷贝质粒,而探针的合成需要一定量的较高纯度的质粒,能否获得足量高纯度的 BAC 质粒是另外一个关键,高品质成品试剂盒的使用是获得良好效果的保证;最后, *Cot-1* DNA 的应用是使杂交信号与背景分开的关键因素。尽管有文献报道,部分大片段克隆的 BAC-FISH 实验中无需使用 *Cot-1* DNA^[30];然而本实验发现,对于大多数的克隆,不使用 *Cot-1* DNA 将导致整个基因组的均匀着色,无法判定杂交信号。因此足量的 *Cot-1* DNA 的使用是 BAC-FISH 成功与否的关键因素。

HSP70 基因以其重要的功能受到了众多研究者的重视。在对栉孔扇贝的先天免疫的研究中也发现了 HSP70 参与生物抗胁迫反应的证据^[16],为其在实际生产中应用提供了基础。本研究率先对栉孔扇贝 HSP70 的染色体定位展开了研究,将包含栉孔扇贝 HSP70 的 BAC 克隆定位到了一对同源染色体上。

在今后的工作中,如果能够利用与 HSP70 连锁的分子标记将其定位到遗传连锁图谱上;同时以 BAC 基因组文库为基础构建高密度物理图谱,则可实现该基因在染色体、遗传连锁图谱、物理图谱的同时定位,为 HSP70 更加深入细致的功能研究和实际应用提供坚实的基础。

参考文献:

- [1] Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*[J]. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 1962, **18**(12): 571-573.
- [2] Tissieres A, Mitchell H K. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs [J]. **Journal of Molecular Biology**, 1974, **85**(3):389-398.
- [3] Ohtsuka K, Hata M. Molecular chaperone function of mammalian HSP70 and HSP40—a review[J]. **International Journal of Hyperthermia**, 2000, **16**(3): 231-245.
- [4] Hartl F U, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the Cytosol: from nascent chain to folded protein [J]. **Science**, 2002, **295** (5 561): 1 852-1 858.
- [5] Urania C, Melchiorretto P, Morazzonib F, *et al.* Copper and zinc uptake and HSP70 expression in HepG2 cells [J]. **Toxicology in Vitro**, 2001, **15**(4-5): 497-502.
- [6] Beere H M, Green D R. Stress management – heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis [J]. **Trends in Cell Biology**, 2001, **11**(1): 6-10.
- [7] 吴龙涛, 宋林生, 胥炜, 等. 栉孔扇贝热休克蛋白 70 基因 cDNA 的克隆与分析[J]. 高技术通讯, 2003, **13**(11): 75-79.
- [8] Su J G, Song L S, Xu W, *et al.* cDNA cloning and mRNA expression of the lipopolysaccharide-and beta-1,3-glucan-binding protein gene from scallop *Chlamys farreri* [J]. **Aquaculture**, 2004, **239**: 69-80.
- [9] Gao Q, Song L, Ni D, *et al.* cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 90 gene in the haemocytes of Zhikong scallop *Chlamys farreri* [J]. **Comparative Biochemistry And Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, 2007, **147**(4):704-715.
- [10] Qiu L, Song L, Xu W, *et al.* Molecular cloning and

- expression of a toll receptor gene homologue from Zhikong scallop, *Chlamys farreri* [J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2007 (a), **22**(5):451-466.
- [11] Qiu L, Song L, Yu Y, *et al.* Identification and characterization of a myeloid differentiation factor 88 (MyD88) cDNA from Zhikong scallop *Chlamys farreri* [J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2007 (b), **23**(3):614-623.
- [12] Wang H, Song L, Li C, *et al.* Cloning and characterization of a novel C-type lectin from Zhikong scallop *Chlamys farreri* [J]. **Molecular Immunology**, 2007, **44**(5):722-731.
- [13] Yu Y, Qiu L, Song L, *et al.* Molecular cloning and characterization of a putative lipopolysaccharide-induced TNF- α factor (LITAF) gene homologue from Zhikong scallop *Chlamys farreri* [J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2007, **23**(2):419-429.
- [14] Zhang H, Song L, Li C, *et al.* Molecular cloning and characterization of a thioester-containing protein from Zhikong scallop *Chlamys farreri*[J]. **Molecular Immunology**, 2007, **44**(14):3 492-3 500.
- [15] Zhang H, Song L, Li C, *et al.* A novel C1q-domain-containing protein from Zhikong scallop *Chlamys farreri* with lipopolysaccharide binding activity [J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2008, **25**(3):281-289.
- [16] 曲凌云, 相建海, 孙修勤, 等. 温度刺激下栉孔扇贝不同组织热休克蛋白 HSP70 的表达研究[J]. 高技术通讯, 2005, **15**(5): 96-100.
- [17] Huang X, Bao Z, Bi K, *et al.* Chromosomal localization of the major ribosomal RNA genes in scallop *Chlamys farreri* [J]. **Acta Oceanologica Sinica**, 2006, **25**(3): 108-115.
- [18] Zhang L, Bao Z, Wang S, *et al.* Chromosome rearrangements in Pectinidae (Bivalvia: Pteriomorpha) implied based on chromosomal localization of histone H3 gene in four scallops [J]. **Genetica**, 2007, **130**:193-198.
- [19] 王永平, 郭希明. FISH 技术在贝类分子生物学研究中的应用[J]. 生命科学研究, 2001, **5**(4): 283-289.
- [20] Zhang Y, Zhang X, Scheuring C F, *et al.* Construction and characterization of two bacterial artificial chromosome libraries of Zhikong scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston, and identification of BAC clones containing the genes involved in its innate immune system [J]. **Marine Biotechnology**, 2008, **10**(4):358-65.
- [21] Zwick M S, Hanson R E, Islam-Faridi M N, *et al.* A rapid procedure for the isolation of C0t-1 DNA from plants [J]. **Genome**, 1997. **40**(1):138-142.
- [22] 王崇明, 刘英杰, 王秀华, 等. 栉孔扇贝急性病毒性坏死症 (AVND) 病理学观察与分析[J]. 海洋水产研究, 2007, **28**(4): 1-8.
- [23] Cruz-Rodríguez L A, Chu F L E. Heat-shock protein (HSP70) response in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to PAHs sorbed to suspended artificial clay particles and to suspended field contaminated sediments [J]. **Aquatic Toxicology**, 2002, **60**(3-4): 157-168.
- [24] Rathinam A V, Chen T T, Grossfeld R M. Cloning and sequence analysis of a cDNA for an Inducible 70 kDa heat shock protein (HSP70) of the American Oyster (*Crassostrea virginica*) [J]. **Mitochondrial DNA**, 2000, **11**(3- 4): 261- 264.
- [25] Cheng P Z, Liu X, Zhang G F, *et al.* Cloning and expression analysis of a HSP70 gene from Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) [J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2007. **22**(1-2): 77-87.
- [26] Guo Z Y, Jiao C Z, Xiang J H. Heat-shock protein 70 expression in shrimp *Fenneropenaeus chinensis* during thermal and immune-challenged stress[J]. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, 2004. **22**(4): 386-391.
- [27] 王梅林, 郑家声, 余海. 栉孔扇贝 *Chlamys farreri* (Jones & Preston, 1904)染色体核型[J]. 青岛海洋大学学报, 1990, **20** (1): 81-85.
- [28] Wang Y, Xu Z, Pierce J C, *et al.* Characterization of eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin) chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization with bacteriophage P1 clones [J]. **Marine Biotechnology**, 2005, **7**(3):207-214.
- [29] Zhang L, Bao Z, Wang S, *et al.* FISH mapping and

identification of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) chromosomes [J]. *Marine Biotechnology*, 2007, 10:151-157.

原位杂交 (BAC-FISH) 技术[J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(11): 1 216-1 222.

[30] 王凯, 张燕洁, 关兵, 等. 棉花细菌人工染色体的荧光

Chromosomal localization of heat shock protein 70 (HSP70) gene in Zhikong scallop *Chlamys farreri* using BAC-FISH

HUAN Pin^{1,2}, ZHANG Xiao-jun¹, LI Fu-hua¹, ZHANG Yang^{1,3}, ZHAO Cui^{1,2}, LIU Bao-zhong¹, Xiang Jian-hai¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. Department of Soil & Crop Sciences, Texas A&M University, College Station, TX, USA)

Received: Mar., 12, 2009

Key words: *Chlamys farreri*; HSP70; BAC-FISH; Chromosome

Abstract: Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) is one of key species in the marine aquaculture of China. Till present, the disease control is the main issue and many subjects were focused on disease-resistance and stress-related genes. Heat shock protein 70 (HSP70) shows diverse functions in the anti-stress reaction and pathogen-resistance reaction. However, the studies on HSP70 in *C. farreri* were mainly on a sequence analysis and expression profile, there is no result about the gene localization of HSP70. In this study, with the support of a BAC DNA library of *C. farreri*, a HSP70-containing BAC clone, CFB123C08, was mapped to the long arms of a pair of homologous chromosomes of *C. farreri* using BAC-FISH. This study would facilitate further studies on the HSP70 of *C. farreri*. And as the first attempt of chromosomal mapping of low-copy genes in *C. farreri*, this study would promote the researches on the chromosome identification of *C. farreri*.

(本文编辑: 康亦兼)