· 实验研究 ·

家蝇热休克蛋白 HSP20 基因克隆、表达和序列分析*

彭传林[1,2], 王宇[1,3], 吴建伟[1], 修江帆[1], 魏川川[1], 国果[1]

摘　要: 目的　对家蝇热休克蛋白 20(HSP20)基因进行生物信息学分析,并进行克隆、表达研究。**方法**　利用美国国家生物技术信息中心和瑞士生物信息学研究所的蛋白分析专家系统中有关基因和蛋白序列的分析工具,结合其他生物信息学分析软件包,从 GenBank 上家蝇基因组序列识别出编码 HSP20 的基因,分析预测该蛋白质的结构功能;设计引物 PCR 扩增 HSP20 基因,将其克隆到原核表达质粒 PEASY-E1 中,重组质粒在大肠杆菌 OrigmiB/DE3 中经用异丙硫代-β-D 半乳糖苷(IPTG)诱导表达,表达产物用十二烷基磺酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定。**结果**　HSP20 基因序列全长 865bp,最大开放阅读框(ORF)为 567bp,编码 188 个氨基酸,理论分子量为 21443.2 Da,等电点为 5.96;所构建的重组质粒经 PCR、双酶切及测序鉴定成功;SDS-PAGE 分析结果显示,重组质粒在 OrigmiB/DE3 中表达并纯化,得到的融合蛋白相对分子质量约为 21443.2 Da,诱导 12 h 蛋白表达量最高,SDS-PAGE 法得到的蛋白条带与目的蛋白大小相符。**结论**　成功构建 PEASY-E1-HSP20 重组原核表达质粒并表达出融合 HSP20 蛋白,为进一步研究该蛋白的功能奠定基础。

关键词:家蝇;热休克蛋白 20(HSP20);克隆;表达;序列分析

中图分类号:R 181.2+4　**文献标志码**:A　**文章编号**:1001-0580(2015)03-0330-04　DOI:10.11847/zgggws2015-31-03-23

Cloning expression and sequence analysis of heat shock protein 20 of *Musca domestica*

PENG Chuan-lin*, WANG Yu, WU Jian-wei, et al(* *Department of Parasitology, Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou Province* 550004, China)

Abstract: Objective　To analyze the structural characteristics of heat shock protein 20(HSP20) from *Musca domestica* and to clone and express the novel gene HSP20. **Methods**　Using bioinformatics software package and tools of bioinformatics at web sites of National Center for Biotechnology Information(NCBI), ExPaSy, and combining other bioinformatics software packages, we identified full-length genes encoding HSP20 proteins from the *Musca domestica* genome library of GenBank, then predicted and analyzed the characteristics of the deduced proteins. The genes encoding HSP20 was amplified with PCR, and cloned into a prokaryotic expression vector PEASY-E1. The recombinant plasmids were transformed into *E. coli* OrigmiB/DE3 and then the expression of the proteins was induced by isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside(IPTG). The recombinant proteins were purified by Ni-IDA affinity chromatography and tested with sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electophoresis(SDS-PAGE). **Results**　The full length sequence was 865 bp, containing an open reading frame(ORF) of 567 bp, encoding 188 amino acids with a predicted molecular weight of 21443.2 Da and an isoelectric point of 5.96. PCR, double enzyme digestion and DNA sequencing confirmed that the recombinant expression plasmid was successfully constructed. With SDS-PAGE, the recombinant plasmid PEASY-E1-SP20 was expressed and purified in OrigmiB/DE3, and the molecular weight of 21443.2 Da was noted in HSP20 protein bands. The highest amount of protein expression was generated 12 hours after the induction. The size of protein obtained by SDS-PAGE corresponded with target protein. **Conclusion**　A novel gene coding HSP20 of *Musca domestica* was cloned, expressed, purified successfully. The purified protein of HSP20 will be of importance for further research in biological function of the gene.

Key words: *Musca domestica*; heat shock protein 20; molecular cloning; prokaryotic expression; sequence analysis

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是生物体在高温或者其他类型的胁迫诱导细胞合成或表达量改变的一类蛋白,最早是由 Ritossa 对果蝇进行热诱导时发现的[1],能起到稳定和保护其他蛋白质"分子伴侣"的作用[2]。HSP 根据分子量的大小分为不同的亚型,分子量介于 12 ~ 43 kDa 的 HSP 被称为小热休克蛋白(small heat shock protein, sHSP)[3]。其中 sHSP20 具有松弛血管平滑肌、抑制血小板聚集等多重功能[4]。HSP20 是一个极具多样的家族,广泛分布于自然界中,不同的物种含有不同的 sHSP,而且不同的组织,其表达量也会不一样。不论机体处于何种状态,sHSP 均有相应的表达,参与机体的生物学过程,具有独特的生理作用[5]。家蝇在世界范围内广泛分布,是许多人类和动物疾病

* **基金项目**: 国家自然科学基金(81360254;81160204);国家科技支撑计划课题(2011BAC06B12)
作者单位: 1. 贵阳医学院寄生虫学教研室,贵州 贵阳 550004; 2. 皖北矿务局煤电集团总医院普外科; 3. 贵州省疾病预防控制中心
作者简介: 彭传林(1984 -),男,安徽人,医师,硕士在读,研究方向:昆虫分子生物学。
通讯作者: 吴建伟,E-mail:wjw@gmc.edu.cn
数字出版日期:2015 - 2 - 15 9:54
数字出版网址:http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20150215.0954.001.html

的传播媒介。有研究表明,家蝇可以携带并传播多种病原生物[6-9],而其自身却很少患病,为研究家蝇这种免疫特性,本研究对家蝇 HSP20 基因及其编码的蛋白质结构和特征进行研究,为进一步研究该基因的功能奠定基础。结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验材料　家蝇,由贵阳医学院寄生虫教研室常规饲养;载体 PEASY-E1 购于北京全式金生物公司,大肠杆菌菌株 DH5α、OrigmiB/DE3 由贵阳医学院寄生虫教研室常规保存。

1.1.2　主要试剂和仪器　限制性内切酶、T4 连接酶、rTaq 酶、dNTPs、DNA marker、protein marker、PCR 产物胶回收试剂盒、DNA 产物纯化试剂盒、质粒小量提取试剂盒均购于大连宝生物科技公司;其他试剂均为国产分析纯。隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂);数显不锈钢电热培养箱(上海博讯实业); PCR 扩增仪(德国 Eppendorf 公司);稳压稳流电泳仪(美国 GE 公司);紫外分光光度计(美国 GE 公司);Millipore 0.22 μm/0.45 μm 滤器(美国 Merck Millipore 公司);Milli-Q 超纯水仪(法国 Mill-ipore Pharmacia 公司)。

1.1.3　引物合成和 DNA 测序　基因扩增引物和重组质粒 DNA 测序由上海生物工程有限公司完成。

1.2　方　法

1.2.1　HSP20 基因的识别　利用美国国家生物技术信息中心(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)网站的开放阅读框探寻器确定其完整编码序列和编码的氨基酸序列。利用瑞士生物信息学研究所的蛋白分析专家系统(http://ca.expasy.org/)所提供的蛋白质在线分析工具,如 protparam (http://au.expasy.org/tools/protparam.html)预测氨基酸序列的分子量、等电点、稳定性指数等理化性质,InterPro Scan (http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/)预测氨基酸序列中的功能域。

1.2.2　HSP20 基因的扩增　利用 prmer5.0 软件,根据 GenBank(登录号:XM_005190903)上家蝇 HSP20 基因序列和 PEASY-E1 多克隆位点设计特异性引物如下:HSP20F:ATGTCCGTAGTGCCCCTAATGTTCCGTGATTGGTGG;HSP20R:TTAGGCAGTAGTAGTCTCAACCTTCTTTTCTTTA。以热胁迫后家蝇 3 龄幼虫提取 RNA,逆转录 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 条件:94 ℃预变性 5 min,94 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s,共 30 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳回收。

1.2.3　重组原核表达质粒的构建及鉴定　将 PCR 产物胶回收,按一定比例与原核表达质粒 PEASY-E1 连接,转化大肠杆菌 OrigmiB/DE3 感受态细胞,氨苄青霉素筛选阳性克隆。对阳性克隆提取质粒进行 PCR、双酶切和测序鉴定。

1.2.4　PEASY-E1-HSP20 在大肠杆菌 Origmi/DE3 中的诱导表达　取 50 μL 培养过夜的阳性克隆菌液,加入含氨苄青霉素的 5 mL LB 培养基中(菌液/培养基为 1/100),37 ℃、250 r/min 振摇至 A_{600} 为 0.6 时,加入异丙硫代-β-D 半乳糖苷(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)至终浓度 0.25 mmol/L诱导表达 12 h。离心收集菌体,在沉淀中加入 80 μL × SDS-PAGE 上样缓冲液,煮沸 8 ~ 10 min,12 000 r/min 离心取上清 10 μL 进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析。

1.2.5　重组蛋白的大量诱导、纯化　按照上述方法对阳性克隆进行大量诱导表达,离心收集菌体,按每克菌体加入 3mL 细菌细胞壁裂解液重悬菌体,反复冻融后冰上超声裂解(功率 150 W,持续 1 s,停 3 s,共 180 s),4 ℃、12 000 r/min,离心 20 min 后收集上清,分别取上清和沉淀样品处理后行 SDS-PAGE 判断该重组蛋白的可溶性。并收集上清,用 0.45 μL 滤膜过滤,参照镍离子金属螯合剂亲和层析柱说明书进行蛋白纯化,收集蛋白洗脱液,再将洗脱的目的蛋白在 PBS 透析液(pH 7.4)中 4 ℃透析 24 h。并根据说明书,用 Bradford 法对经过以上步骤获得的重组蛋白进行蛋白定量,于 -80 ℃保存备用。

2　结　果

2.1　HSP20 基因序列及蛋白质的理化性质分析(图 1)　HSP20 基因序列全长 865 bp,包含一个完整的最大开放阅读框(open reading frame, ORF)为 567 bp,编码 188 个氨基酸。ExPASy 中 ProtParam 预测 HSP20 的理论分子量 21 443.2 Da,其等电点为 5.96。280 nm 处的摩尔消光系数为 24 980 M^{-1} cm^{-1},0.1% 浓度的 ABS 为 1.165。若其成熟肽 N-末端为蛋氨酸时,在哺乳动物网状细胞体外表达的半衰期为 30 h,在酵母和大肠杆菌中表达的半衰期分别 >20 和 10 h。在溶液中 HSP20 的不稳定指数为 59.81,高于阈值 40,其性质不稳定;HSP 的疏水指数为 72.45,疏水性较高。

2.2　HSP20 亚细胞定位序列分析　ExPASy 中 TargetP 预测 HSP20 无信号序列,未发现线粒体、过氧化酶体、溶酶体和细胞核等亚细胞定位序列。

```
  1 TTGTTGGATTTTTTC TTGAGAAATTATTAG CAACGGAAAAGCGAA CGTTGAAACAACCGT ATCGAGAAAAATTAC
 76 CTTGGAAGGAAAACA TCAAAGGTAAATATC GAGATGTCCGTAGTG CCCCTAATGTTCCGT GATTGGTGGGATGAA
                                     M  S  V  V   P  L  M  F  R   D  W  W  D  E
151 CTTGAATTTCCAACG CGCACTTCGCGCCTT CTGGATCAACACTTC GGCATGGGCTTGAAG CGAGACGATTTGATG
     L  E  F  P  T   R  T  S  R  L   L  D  Q  H  F   G  M  G  L  K   R  D  D  L  M
226 TCATCTATATGGAAT AGTCGTCCAACAGTG TTACGATCTGGCTAT TTGCGACCATGGCAA CGCACATCTGGTTTG
     S  S  I  W  N   S  R  P  T  V   L  R  S  G  Y   L  R  P  W  Q   R  T  S  G  L
301 CAAAAGCAGGATTCG GGATCCACCCTCAAC ATCAACGACGAGAAG TTCGAAGTCATTCTA GATGTGCAACAATTC
     Q  K  Q  D  S   G  S  T  L  N   I  N  D  E  K   F  E  V  I  L   D  V  Q  Q  F
376 TCTCCGAATGAGATT AGTGTCAAAGTAACA GATAAGTTTGTGATT GTTGAAGCAAAACAC GAAGAGAAACAGGAC
     S  P  N  E  I   S  V  K  V  T   D  K  F  V  I   V  E  A  K  H   E  E  K  Q  D
451 GAACACGGCTTCGTA TCGAGACAATTTACC AGACGTTATATGCTG CCCAGTGACGTCAAT CCCGATTCTGTGACA
     E  H  G  F  V   S  R  Q  F  T   R  R  Y  M  L   P  S  D  V  N   P  D  S  V  T
526 TCATCCTTGTCGTCC GATGGTCTCCTGACT GTAACTGCACCCATG AAGAAATTGCCTCCT CCGGCTACTGAACGA
     S  S  L  S  S   D  G  L  L  T   V  T  A  P  M   K  K  L  P  P   P  A  T  E  R
601 GTAGTACCGATTTCG CAAACTGGACCCTCG TCTAAAGAAGATAAA GAAAAGAAGGTTGAG ACTACTACTGCCTAA
     V  V  P  I  S   Q  T  G  P  S   S  K  E  D  K   E  K  K  V  E   T  T  T  A  *
676 ATGGGACTATAATCA AAATCATTGAGACTA CAACCAAAATTATTG TATAGACTGCTTCTT TTATACTTTTTTACA
751 AACATTTTTGACTTT TGGCACCTGAATAAC CTTTTTGTAACATGT ATATTTGTACATTAT TTAATTCAATAGAAC
826 AGGTTTGAGATTTAT TTGTTGGAATAACTT AGCTATTTTG
```

图 1　HSP20 全长 cDNA 序列及其 ORF 编码的氨基酸序列

2.3　InterPro Scan 分析 HSP20 蛋白质功能结构域（图 2）　结果显示，该蛋白含有 HSP20 结构域，证实该蛋白属于小热休克蛋白 20 基因家族编码产物；无信号肽，与亚细胞定位分析相符。

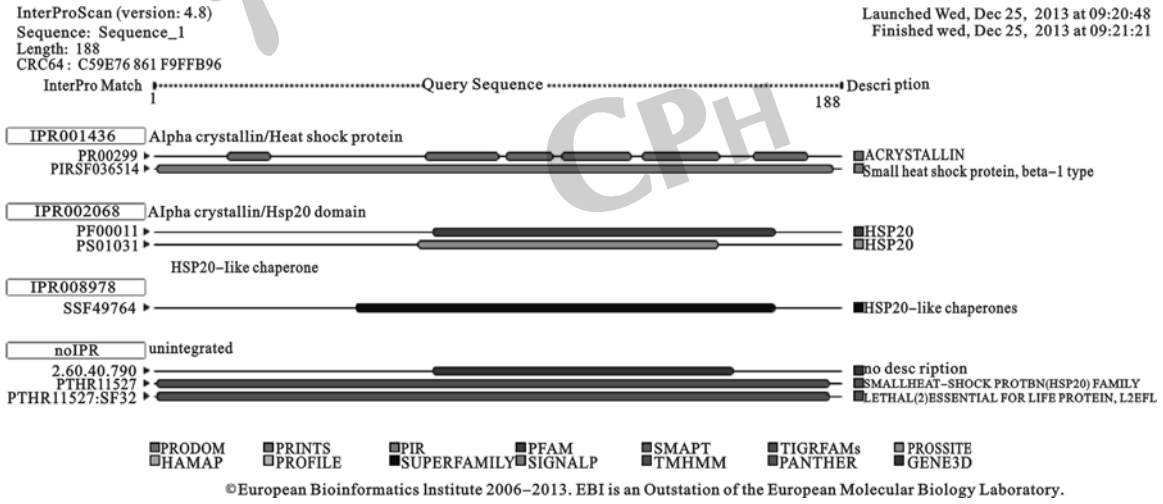
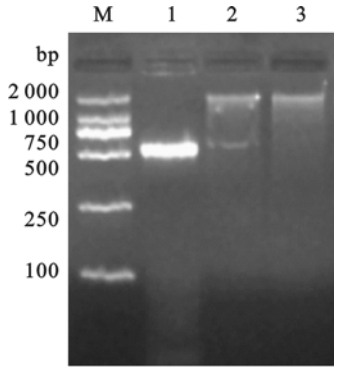


图 2　InterPro Scan 分析 HSP20 蛋白质功能结构域

2.4　蛋白质拓扑结构分析　Sec 预测 HSP20 蛋白 α 螺旋（H）和无规卷曲（L）的比例为 4.26∶67.55，β 折叠（E）与无规卷曲（L）的比例为 28.19∶67.55，二级结构以 β 折叠（E）为主。

2.5　PEASY-E1-HSP20 质粒构建及鉴定（图 3）　特异性引物扩增目的基因，2% 琼脂糖凝胶电泳后切胶回收目的基因，将目的基因与质粒载体按一定比例连接后，转化入感受态细胞，氨苄青霉素筛选阳性克隆子。将重组质粒进行 PCR 和双酶切后，2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。重组质粒双酶切后在 600 ~ 500 bp 有一清晰的条带，与目的基因（567 bp）的大小基本相符，测序结果证实重组质粒中插入序列与目的序列一致，表明 PEASY-E1-HSP20 质粒构建成功。

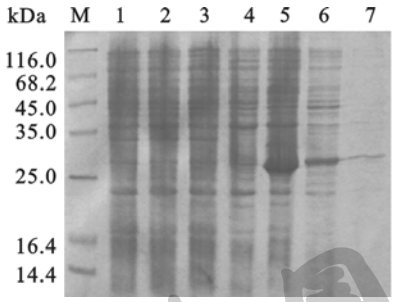


注：M：Marker（2 000 bp）；1：PCR 产物；2：双酶切鉴定结果；3：重组质粒PEASY-E1-HSP20。

图 3　重组质粒 PCR 及双酶切鉴定图

中国公共卫生 CPH

2.6　蛋白表达纯化结果(图 4)　将构建好的重组质粒 PEASY-E1-HSP20 转化到 *E. coli* OrigmiB/DE3 中经 IPTG 诱导表达,15% SDS-PAGE 分析结果如图 4 第 5、6 泳道所示,在 20 kDa 左右处出现表达条带,与目的蛋白分子量基本相符。将蛋白进行纯化,结果见图 4 第 7 泳道所示,证明目的蛋白纯化成功。用 Bradford 法测的该蛋白浓度为 0.32 mg/mL。



注:M:蛋白 Marker;1:PEASY-E1 未加 IPTG 诱导;2:PEASY-E1 加 IPTG 诱导;3:PEASY-E1-HSP20 未经 IPTG 诱导的 OrigmiB/DE3 全菌液;4:PEASY-E1-HSP20 加 IPTG 诱导的 OrigmiB/DE3 全菌液;5:PEASY-E1-HSP20 加 IPTG 诱导后的沉淀;6:PEASY-E1-HSP20 加 IPTG 诱导后的的上清;7:PEASY-E1-HSP20 加 IPTG 诱导表达后纯化蛋白。

图 4　15% SDS-PAGE 分析 PEASY-E1-HSP20 在大肠杆菌 OrigmiB/DE3 中表达纯化效果

3　讨　论

家蝇孳生于杂乱菌丛的环境中,传播疾病,是重要的媒介传播昆虫,其免疫防御、免疫协助得到很多研究者的关注[10]。sHSP 是 HSP 家族中的一个成员,因其分子量在 HSP 家族中最小而得名。目前对 HSP 研究报道较多,但是对家蝇 sHSP 研究报道较少,sHSP 作为分子伴侣在生物体的生命活动中发挥了重要作用。生物体在生命活动的不同时期,sHSP 均起到一定的生物学功能,能够协助生物体内变性蛋白质的结构进行重新折叠[11-12],可以诱导生物体产生耐热性、稳定性细胞骨架等[13],在生物体的生长、发育、进化过程中发挥了重要作用。

本研究根据 NCBI 上 GenBank 中家蝇 sHSP 中 HSP20 基因设计特异性引物,以家蝇 3 日龄幼虫提取总 RNA 后逆转录 cDNA 为模板,成功扩增出目的基因,测序结果证实与GenBank(登录号:XM_005190903)序列相符,通过生物信息学分析显示该基因包含一个完整的 ORF 为 567 bp,编码 188 个氨基酸,理论分子量为 21 443.2 Da,其等电点为 5.96。重组质粒在大肠杆菌 OrigmiB/DE3 中经 IPTG 诱导表达,并成功纯化目的蛋白,15% SDS-PAGE 分析显示纯化蛋白与目的蛋白分子量大小相符。

参考文献

[1] Huang LH, Wang HS, Kang L. Different evolutionary lineages of large and small heat shock proteins in eukaryotes[J]. Cell Res, 2008, 10: 1074-1076.

[2] Rani N, Bharti S, Manchanda M, et al. Regulation of heat shock proteins 27 and 70, p-Akt/p-eNOS and MAPKs by Naringin Dampens myocardial injury and dysfunction *in vivo* after ischemia/reperfusion[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82577.

[3] Gusev NB, Bukach OV, Marston SB. Structure, properties, and probable physiological role of a small heat shock protein with molecular mass 20 kDa (Hsp20, HspB6) [J]. Biochemistry (Moscow), 2005, 70(6): 762-772.

[4] Carra S, Sivilotti M, Zobel ATC, et al. HspB8, a small heat shock protein mutated in human neuromuscular disorders, has *in vivo* chaperone activity in cultured cells [J]. Human Molecular Genetics, 2005, 14: 1659-1669.

[5] Huang LH, Wang CZ, Kang L. Cloning and expression of five heat shock protein genes in relation to cold hardening and development in the *leafminer*, *Liriomyza sativa*[J]. Journal of Insect Physiology, 2009(55): 279-285.

[6] Ahmad A, Nagaraja TG, Zurek L. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 to cattle by house flies[J]. Prev Vet Med, 2007, 80(1): 74-81.

[7] Boulesteix G, Le Dantec P, Chevalier B, et al. Role of *Musca domestica* in the transmission of multiresistant bacteriain the centers of intensive care setting in sub-Saharan Africa [J]. Ann FrAnesth Reanim, 2005, 24: 361-365.

[8] 国果,吴建伟,付萍,等. 家蝇幼虫分泌型抗菌肽对大肠埃希菌抑菌作用[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(10): 1318-1321.

[9] 刘晖,王鑫,蔡辉霞,等. 抗菌肽 attacin 重组杆状病毒表达载体的构建[J]. 中国公共卫生, 2013, 16(11): 1871-1872.

[10] 魏洪,吴建伟,国果,等. 家蝇幼虫血淋巴提取物抗肿瘤作用[J]. 中国公共卫生, 2013, 29(2): 217-219.

[11] Li ZW, Li X, Yu QY, et al. The small heat shock protein (sHSP) genes in the silkworm, *Bombyx mori*, and comparative analysis with other insect sHSP genes[J]. BMC Evolutionary Biology, 2009, 9: 215.

[12] Haslbeck M. Recombinant expression and *in vitro* refolding of the yeast small heat shock protein Hsp4[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2006, 38(2): 107-114.

[13] Yang LL, Lü ZY, Hu SM, et al. *Schistosoma japonicum* proteomics analysis of differentially expressed proteins from ultraviolet-attenuated cercariae compared to normal cercariae[J]. Parasitol Res, 2009, 105(1): 237-248.

收稿日期: 2014-01-08　　(郭薇编辑　吴少慧校对)

中国公共卫生 CPH