

三株弧菌热休克蛋白 70 基因的克隆和序列分析*

黄东东, 何鸣筱, 吕 玲, 翁少萍, 常 迪, 邓先余, 何建国
(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 根据 GenBank 中同类蛋白序列设计特异 PCR 引物, 从 2 株创伤弧菌 *Vibrio vulnificus* 和 1 株河弧菌 *Vibrio fluvialis* 中扩增出热休克蛋白 70 (heat shock protein, hsp70) 基因片段。对这 3 个片段进行克隆、测序和分析的结果表明, 3 个片段长均为 1 911 bp, 包含完整的 hsp70 ORF, 编码 636 个氨基酸。它们的氨基酸序列与 GenBank 中其它物种 hsp70 的氨基酸序列比较发现, 2 株创伤弧菌 hsp70 基因序列和同种其它菌株的同源性高, 达 98% 以上; 而河弧菌的 hsp70 序列属首次克隆; 与多种原核和真核生物的 hsp70 氨基酸序列一起构建了系统进化树, 结果支持传统的分类结果。

关键词: 热休克蛋白 70 (hsp70); 创伤弧菌 *Vibrio vulnificus*; 河弧菌 *Vibrio fluvialis*

中图分类号: X5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2009) 03-0080-04

Cloning and Sequence Analysis of hsp70 of Three Strains of *Vibrio*

HUANG Dongdong, HE Mingxiao, LÜ Ling, WENG Shaoping, CHANG Di, DENG Xianyu, HE Jianguo
(School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: A pair of primers was designed according to the nucleotide sequence of the heat shock protein (hsp70) gene of vibrio reported in GenBank. With the specific primers, three target fragments were amplified from two of *Vibrio vulnificus* strains and a *Vibrio fluvialis* stain genomic DNA by PCR. The fragments were cloned and sequenced. The result showed that they included an ORF of 1911 bp which encoded a polypeptide of 636 amino acids. The identities of hsp70 among these two *Vibrio vulnificus* stains and other *Vibrio vulnificus* stains from GenBank are more than 98%. The hsp70 from *Vibrio fluvialis* was cloned for the first time. The neighbor-joining tree of hsp70 was constructed and it supported the traditional classification.

Key words: hsp70; *Vibrio vulnificus*; *Vibrio fluvialis*

热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 又称为应激蛋白, 是原核生物和真核生物在受热、生物应激、理化因素等应激原刺激后, 发生热休克反应时所产生的。一类在生物进化中最保守并由热休克基因所编码的伴随细胞蛋白, 它具有高度保守性及应激性, 普遍存在于从细菌到人的整个生物界^[1-2]。1974 年, Tissieres 首次证实该类蛋白的存在并且命名为热休克蛋白 (heat shock protein, hsp)^[3], 其中热休克蛋白 70 (hsp70) 是最重要的种类之一, 在原核和真核生物中都有广泛研究。hsp70 具有高度的保守性, 是一种重要的遗传分类依据。一些病

原微生物的 hsp70 具有强抗原性, 可以作为疫苗的候选成分^[4-5]。创伤弧菌是一种致命的人畜共患的嗜盐弧菌, 可引发败血症^[6]; 河弧菌也是一种人畜致病菌, 可引起腹泻等症状^[7]。目前报道 hsp70 基因序列的弧菌有一些, 但创伤弧菌的报道较少, 而河弧菌的 hsp70 属首次克隆得到。本文克隆了两株创伤弧菌和一株河弧菌的 hsp70 基因, 并进行测序和分析, 为这两种弧菌属的 hsp70 基因作为遗传分类的依据进行探讨, 同时为进一步研究其免疫原性提供分子生物学基础。

* 收稿日期: 2008-04-16

基金项目: 国家“863”计划资助项目 (2006AAZ445)

作者简介: 黄东东 (1971 年生), 男, 博士后; 通讯作者: 何建国; E-mail: lsshjg@mail.sysu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 材料

创伤弧菌菌株 CG051、CG067, 由台湾成功大学何连漪博士提供; 河弧菌菌株 CGMCC. 1608 购自广东省微生物研究所; 其它菌株均由中山大学寄生虫实验室保存提供。

质粒载体 pMD18-T、T4 DNA 连接酶、DNA 标准相对分子质量 DL2000 购自大连宝生物工程公司; Taq Plus 酶、胶回收试剂盒购自上海生工生物工程公司; 其它试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

细菌基因组 DNA 提取、PCR、质粒提取、基因克隆等操作参照文献 [8] 或依照试剂盒说明书进行; DNA 序列由上海基康生物工程有限公司测定并采用 DNASTar、Clustal X v1.83、phyip 3.63 和 Treeview 1.6.6 等软件进行处理和分析。

引物设计根据 GenBank 中已报道的创伤弧菌 CMCP6 株 (GenBank No. AE016798) 和 YJ016 株 (GenBank No. AP005333) hsp70 基因序列, 设计了一对通用的、可扩增出完整 hsp70 开放阅读框 (ORF) 的引物, 序列为: F: 5'-ATGGGTAAAATCAT-TGGTAT-3'; R: 5'-TTATTTCTTGTCTGTC-TTT-3'。

2 结果

2.1 hsp70 基因的克隆和序列测定

经 PCR 扩增得到 3 段长度约为 1.9 kb 片段, 插入 pMD18-T 载体进行测序。将此 3 段序列在 GenBank 数据库中经 Blast 比较, 表明扩增的序列均包含完整的 hsp70 基因 ORF, 全长均为 1 911 bp。经比较发现, CG051 株与创伤弧菌 CMCP6 株和 YJ016 株的 hsp70 核酸序列同源性分别达 98% 和

99%; 而 CG067 株与二者的同源性则均为 99%。河弧菌 CGMCC. 1608 与 GenBank 中的 hsp70 序列相比较, 同源性均低于 90%, 未见有河弧菌的相应序列匹配。CG051、CG067 和 CGMCC1608 三个菌株的 hsp70 序列已被提交至 GenBank, 编号为 AY498656 - AY498658。

2.3 hsp70 基因的氨基酸序列特征

使用 DNASTar 软件对这 3 株菌 hsp70 基因进行分析, 其基因全长为 1 911 bp, 编码由 636 个氨基酸组成的蛋白质。CG051、CG067 和 CGMCC 1608 相对分子质量分别是 68 800, 68 800 和 68 900。

将 3 株菌 hsp70 基因与其它菌株及其它物种的 hsp70 基因的氨基酸序列比较, 结果表明在分类上相距很远的物种 (鼠、人等), 其氨基酸序列也有 45% 以上的同源性; CG051、CG067 和 CGMCC1608 三个氨基酸序列和其他弧菌的相应序列同源性至少为 91.4%、91.2% 和 91.0% (表 1), 显示 hsp70 蛋白高度的保守性。应用 Clustal X v1.83 软件进行多序列比较也发现, 3 个菌株与其它物种的 hsp70 氨基酸序列, 在结构域 hsp70 处 (第 4 - 603 氨基酸) 同源性很高, 高度保守 (图 1)。

hsp70 氨基酸序列在不同的物种中有很强的同源性, 在进化过程中高度保守^[9]。鼠 hsp70 氨基酸序列与人类 hsp70 氨基酸序列的同源性约为 95%, 与小鼠的同源性约为 98%; 人类 hsp70 氨基酸序列与果蝇 hsp70 氨基酸序列的同源性为 73%, 与大肠杆菌诱导型 hsp70 (即 Dnak) 氨基酸序列的同源性则为 47%, 果蝇的 hsp70 基因与大肠杆菌的 Dnak 基因 (hsp70 基因家族) 的核苷酸序列同源性在 50% 以上。本文得到的 3 株弧菌 hsp70 基因也证实了 hsp70 基因保守性。

表 1 3 株弧菌与 9 个其它生物 hsp 70 氨基酸序列同源性比较¹⁾

Table 1 Comparison of hsp 70 genes from 9 species

	CMCP6	CG067	CGMCC	<i>V. cho</i>	<i>V. har</i>	<i>V. par</i>	<i>V. pro</i>	<i>E. coli</i>	酵母	老鼠	人类
CG051	99.8	99.8	91.4	91.5	93.4	95.6	94.3	83.5	47.5	48.1	48.1
CMCP6		100.0	91.2	91.7	93.2	95.4	94.2	83.3	47.3	48.0	48.0
CG067			91.2	91.7	93.2	95.4	94.2	83.3	47.3	48.0	48.0
CGMCC				91.0	92.0	92.1	91.5	82.4	46.4	46.9	46.9
<i>V. cho</i>					89.3	91.2	89.8	82.1	46.8	46.5	46.3
<i>V. har</i>						95.6	94.8	81.0	45.5	45.7	45.6
<i>V. par</i>							97.5	83.2	47.35	47.6	47.3
<i>V. pro</i>								82.8	46.90	47.4	47.3
<i>E. coli</i>									48.7	48.3	48.6
yeast										72.2	74.1
mouse											95.3

1) CG051: *Vibrio vulnificus* CG051; CG067: *Vibrio vulnificus* CG067; CMCP6: *Vibrio vulnificus* CMCP6; CGMCC: *Vibrio vulnificus* CGMCC. 1608; *V. cho*: *Vibrio cholerae*; *V. har*: *Vibrio harveyi*; *V. par*: *Vibrio parahaemolyticus*; *V. pro*: *Vibrio proteolyticus*; *E. coli*: *Escherichia coli*; yeast: *Saccharomyces cerevisiae*; mouse: *Mus musculus*; human: *Homo sapiens*

2.4 系统进化分析

通过应用 Clustal X v1.83、phyip 3.63 和 Treeview 1.6.6 软件, 根据 CG051、CG067 及 CGMCC.1608 三个菌株与其它物种 hsp70 氨基酸序列建立系统进化树 (Neighbor-joining method)。结果显示 (图 2), 系统进化树主要分为两支, 一支是原核物种, 包括所引用的弧菌和大肠杆菌; 另一支为真核物种, 包括人类、老鼠和酵母。而在原核生物这一支中, 大肠杆菌和所有的弧菌又分属两

个主要分支, 同时 3 株创伤弧菌 CG051、CG067 和 CMCP6 被分在一组, 遗传距离极近。以上结果与所引用物种的宏观分类结果很好地吻合, 显示出 hsp70 序列作为分子系统分类依据的优势, 也很好的说明了其高度的种内保守性。

热休克蛋白是原核和真核生物中一类分子伴侣, 在蛋白的折叠和重折叠中起关键作用, 是一类高度保守的蛋白质^[1-2]。目前对 hsp70 的研究覆盖了生理功能、病理、进化等很多方面, 研究的来源

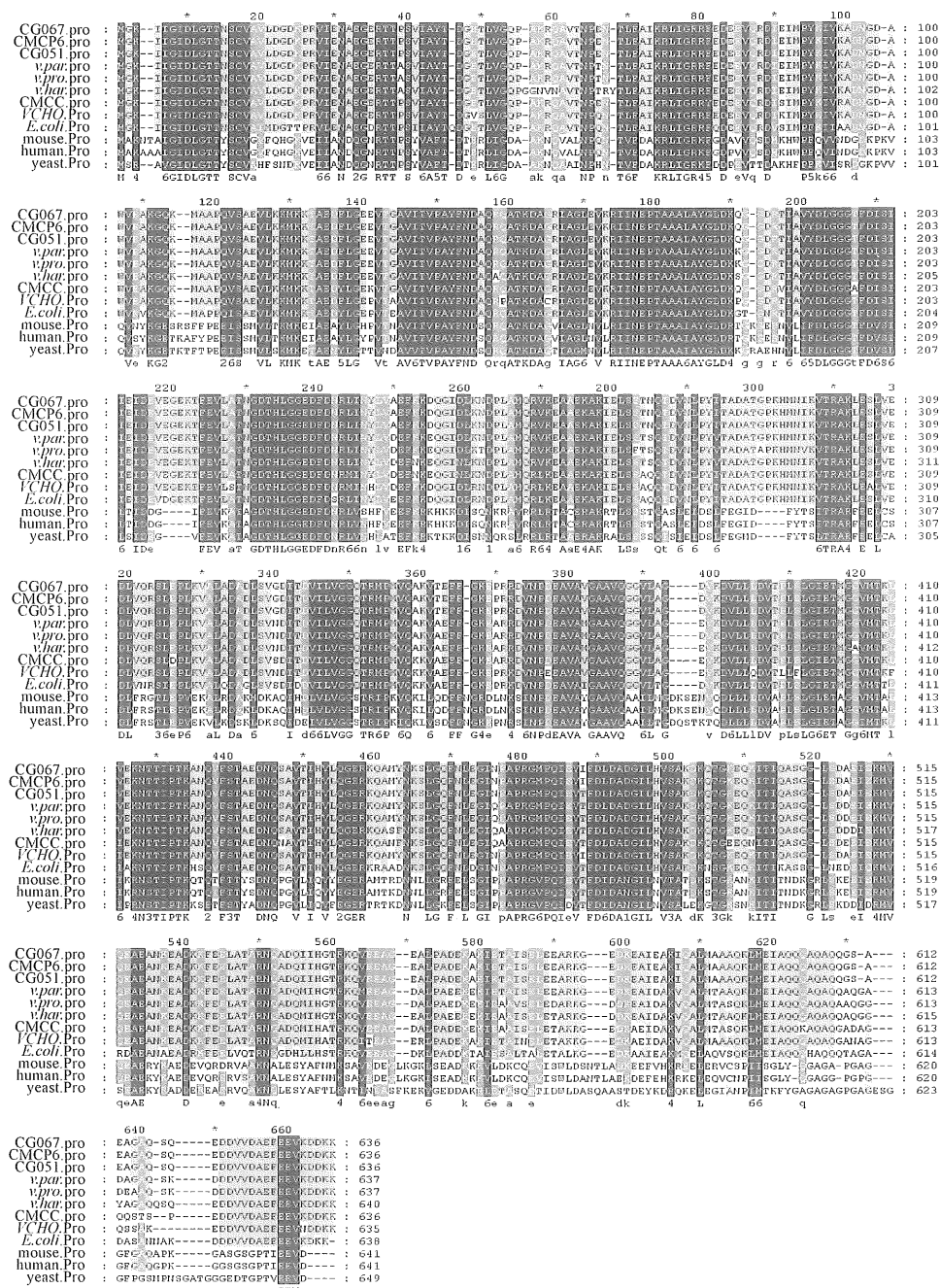


图1 3株菌与其它物种 hsp70 氨基酸序列比较

Fig. 1 Multiple amino acid sequence alignment of hsp70 encoded by CG051, CG067 and CGMCC.1608 and other species. Accession numbers: CG051, AY498656; CG067, AY498657; CGMCC, AY498658; CMCP6, AE016798; *V.cho*, CAA74627; *V.har*, AAC61692; *V.par*, BAC58916; *V.pro*, AAF27648; *E.coli*, NP_308041; yeast, AAC37398; mouse, AAC84169; human, BAB63300

范围也非常之广,从人类细胞到原核细菌都有覆盖。hsp70 蛋白具有多种生物学功能,包括分子伴侣功能、参与免疫反应、抗细胞凋亡功能、抗氧化功能、提高细胞的应激耐受性、促进细胞增殖、参与细胞骨架的形成和修复等等,广泛的生物学功能使其成为当今生命科学研究中的热点^[10]。在分子遗传领域,其基因序列的保守性,使得 hsp70 也广泛用于分子分类,很多物种已经建立了根据 hsp70 的进化模式,如好盐性古细菌^[11]、海绵动物^[12]、鱼类^[13]及刺细胞动物^[14]等。

有报道指出 hsp70 有可能是某些致病菌的致病因素^[15]。致病菌结核分枝杆菌 hsp70 是该菌的主要抗原成分之一^[16],人结核分枝杆菌 hsp70 的 DNA 疫苗免疫小鼠后,可显著提高其血清中 IFN- γ 的浓度;受该种菌攻击后其肺,肝脏部位的结核分枝杆菌较对照组少。另外,有报道指出,细菌感染时, hsp70 是它们的主要抗原^[17],免疫系统对这些高度保守的分子产生免疫应答。因此,细菌 hsp70 可以直接作为外源性抗原引发机体免疫反应,也可以和其他抗原多肽偶联或融合构建疫苗。我们得到的 hsp70 在创伤弧菌和河弧菌这两种病原菌中是否同样起到致病因子的作用、并用于疫苗研制,还需进一步探讨。

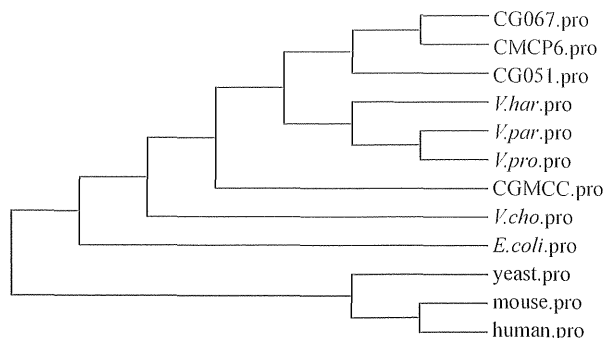


图2 根据12个物种的 hsp70 氨基酸序列建立的系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree based on the sequences of hsp70

参考文献:

- [1] NETZER W F, HARTL F U. Protein folding in the cytosol: Chaperonin-dependent and -independent mechanisms [J]. TIBS, 1998, 23:68-74.
- [2] HARTL F U, MARTIN J. Molecular chaperones in cellular protein folding [J]. Curr Opin Struct Biol, 1995, 5 (1):92-102.
- [3] TISSIERES A. The heat shock response [J]. J Mol Biol, 1974, 84:389-390.
- [4] KAKEYA H, UDONO H, IKUNO N, et al. A 77-kilodalton protein of *Cryptococcus neoformans*, a member of the heat shock protein 70 family, is a major antigen detected in the sera of mice with pulmonary cryptococcosis [J]. Infect Immun, 1997, 65(5):1653-1658.
- [5] BRUNHAM RC, PEELING R, MACLEAN I, et al. Post-abortion Chlamydia trachomatis salpingitis: correlating risk with antigen-specific serological responses and with neutralization [J]. J Infect Dis, 1987, 155(4):749-55.
- [6] WAITES W M, ARBUTHNOTT J P. Food illness: an overview [J]. Lancet, 1990, 336:724.
- [7] LEE J V, SHREAD P, FURNISS A L, et al. Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp. nov. (synonym group F vibrios, group EF6) [J]. J Appl Bacteriol, 1981, 50 (1):73-94.
- [8] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] 李冰祥, 蔡惠罗, 陈永林. 昆虫的热休克反应和热休克蛋白[J]. 昆虫学报, 1997, 40(4):417-427.
- [9] LI Bingxiang, CAI H uiluo, CHEN Y Dnglin. Heat shock response and heat shock proteins of insects [J]. Acta Entomol Sin, 1997, 40(4):417-427.
- [10] JULIANN G K, GEORGE C T. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry and physiology [J]. Pharmacol Ther, 1998, 80(2):184-185.
- [11] GUPTA R S, SINGH B. Cloning of the HSP70 gene from *Halobacterium marismortui*: relatedness of archaeobacterial HSP70 to its eubacterial homologs and a model for the evolution of the HSP70 gene [J]. J Bacteriol, 1992, 174(14):4594-4605.
- [12] KOZIOL C, LEYS S P, MÜLLER I M, et al. Cloning of Hsp70 genes from the marine sponges *Sycon raphanus* (Calcarea) and *Rhabdocalypus dawsoni* (Hexactinellida). An approach to solve the phylogeny of sponges [J]. Biol J Linn Soc, 1997, 62(4):581-592.
- [13] YAMASHITA M, HIRAYOSHI K, NAGATA K. Characterization of multiple members of the HSP70 family in platy fish culture cells: molecular evolution of stress protein HSP70 in vertebrates [J]. Gene, 2004, 336 (2):207-218.
- [14] BORCHIELLINI C, BOURY-ESNAULT N, VACELET J, et al. Phylogenetic analysis of the Hsp70 sequences reveals the monophyly of Metazoa and specific phylogenetic relationships between animals and fungi [J]. Mol Biol Evol, 1998, 15(6):647-655.
- [15] 陈裕充, 温海, 李志刚, 等. 新生隐球菌临床分离株热休克反应的差别及临床意义[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(4):433-436.
- [15] CHONG Yüchong, WENG Hai, LI Zhigang, et al. Heat shock reaction in *Cryptococcus neoformans*: Difference and its clinical significance[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2002, 23(4):433-436.
- [16] BONORINO C, NARDI N B, ZHANG X, et al. Characteristics of the strong antibody response to mycobacterial Hsp70: a primary, T cell-dependent IgG response with no evidence of natural priming or gamma delta T cell involvement [J]. J Immunol, 1998, 161(10):5210-5216.
- [17] LISA A E, ELIZABETH G I, JULIE M C, et al. The adjuvant effects of *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 70 result from the rapid and prolonged activation of antigen-specific CD8⁺ T cells *in vivo* [J]. J Immunol, 2002, 169:5622-5629.