

嗜热四膜虫五个 *hsp70* 基因的表达分析

冯立芳^{1,2}, 畅悦^{1,3}, 袁冬霞¹, 缪炜^{1,*}

(1. 中国科学院水生生物研究所 水生生物多样性与保护重点实验室, 湖北 武汉 430072;

2. 浙江工商大学 食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310012; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 鉴定得到嗜热四膜虫 13 个含有完整保守结构域的 *hsp70* 基因, 对其中 5 个高度相似且无内含子的 *hsp70* 基因进行表达分析。在 37、39 和 41 °C 热激条件下, 实时荧光定量 PCR 结果表明, *hsp70-2* 基因对热激响应最敏感。在四膜虫生长、饥饿和接合生殖这 3 种生理或发育状态下, Microarray 结果显示, *hsp70-4* 基因恒定且高表达; 在热激条件下, *hsp70-4* 基因的表达水平随着温度的升高而略微增加, 证实 *hsp70-4* 基因为热休克相关蛋白 *hsc70* 基因; 克隆的 *hsp70-4* 基因全长 2 208 bp, 开放阅读框长 1 959 bp, 编码 653 个氨基酸。Microarray 结果提示, *hsp70-3* 可能参与四膜虫饥饿早期(0~12 h)的耐受和接合生殖后期(6~10 h)的新大小核形成、老大核凋亡等事件; *hsp70-5* 可能参与四膜虫饥饿晚期(12~15 h)的耐受和接合生殖早期(0~6 h)的小核减数分裂、小核交换和原核(pronuclear)融合事件。Blast2GO 分析表明, 与 *hsp70-3* 和 *hsp70-5* 共表达的基因分别参与不同的生物学过程, 进一步反映了 *hsp70-3* 和 *hsp70-5* 这两个基因在功能上是存在差异的。

关键词: 嗜热四膜虫; *hsp70* 基因; 实时荧光定量 PCR; Microarray; RACE; 表达分析

中图分类号: Q959.117; Q786 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2011)03-0267-10

Expression analysis of 5 *hsp70* genes in *Tetrahymena thermophila*

FENG Li-Fang^{1,2}, CHANG Yue^{1,3}, YUAN Dong-Xia¹, MIAO Wei^{1,*}

(1. Key Laboratory of Aquatic Biodiversity and Conservation, Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;

2. College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China;

3. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Thirteen *hsp70* genes with complete conserved domains were identified in *Tetrahymena thermophila*, and expression of five similar and non-intron *hsp70* genes were analyzed. Under heat shock conditions of 37, 39 and 41 °C, *hsp70-2* mRNA had the highest relative expression level, suggesting it is closely related to heat shock. The basal level of constitutive *T. thermophila hsp70-4* gene was high during 20 physiological/developmental stages of growth, starvation and conjugation, and it changed little upon exposure to heat shock: evidence that *hsp70-4* is an *hsc70* gene. The *hsp70-4* cDNA is 2 208 bp long, and contains an open reading frame of 1 959 bp encoding 653 amino acids. Microarray data indicated that *T. thermophila hsp70-3* gene probably participated in early starvation (0–12 h) stress and late conjugation (6–10 h) events, such as new macronuclear and micronuclear anlagen formation and old macronuclear elimination. However, *hsp70-5* gene possibly participates in late starvation (12–15 h) stress and early conjugation (0–6 h) events such as micronuclear meiosis, micronuclear exchange and pronuclear fusion. Blast2GO indicated that they participated in dissimilar biological processes, suggesting *hsp70-3* and *hsp70-5* perform different functions.

Key words: *Tetrahymena thermophila*; Real time quantitative PCR; Microarray; RACE; Expression analysis

热休克蛋白(heat-shock protein, HSP)是生物适应环境变化的一个重要媒介分子, 温度、外源有毒化合物、紫外辐射等都会诱导细胞或机体产生应激反应, 迅速合成 HSP 作为分子伴侣参与蛋白质的合成、折叠、装配、运转和降解等过程, 以维持细胞

蛋白自稳, 提高细胞对应激源的耐受性, 增强抗氧化作用, 使细胞维持正常的生理功能(Sørensen et al, 2003; Saibil 2008)。热休克蛋白 70(HSP70)是 HSP 家族的主要一员, 它是细胞在应激条件下的主要表达产物, 对于外源有毒化合物的响应也迅速而灵敏

收稿日期: 2010-10-13; 接受日期: 2011-02-22

基金项目: 中国科学院知识创新项目(KSCX2-EW-G-6-4); 国家自然科学基金资助项目(31071993)

*通讯作者(Corresponding author), E-mail: miaowei@ihb.ac.cn; miaowei530@yeah.net

(Gupta et al, 2010)。根据表达情况, *hsp70* 基因家族可分为两类: 诱导型表达的 *hsp70* 基因(heat shock protein 70, *hsp70*)和组成型表达的 *hsp70* 基因(heat shock cognate gene, *hsc70*) (Karouna-Renier et al, 2003; Sørensen et al, 2003)。对生物体 *hsp70* 基因家族的研究, 可以更好地认识物种耐受胁迫的机制 (Daugaard et al, 2007), 这在单细胞生物, 如真菌 Chytridiomycete (*Blastocladiella emersonii*) (Georg & Gomes, 2007); 多细胞动物, 如线虫 *Caenorhabditis elegans* (Snutch et al, 1988)、果蝇 *Drosophila melanogaster* (Bettencourt & Feder, 2001); 高等动物, 如人 (Daugaard et al, 2007); 植物, 如拟南芥 *Arabidopsis* (Sung et al, 2001)等物种中已展开了研究, 但在原生动物中, 尚未有关 *hsp70* 基因家族或亚家族的相关报道。

原生动物四膜虫 *Tetrahymena* 隶属于纤毛门 (Ciliophora)、寡膜纲 (Oligohymenophorea)、膜口目 (Hymenostomatida)、四膜虫科 (Tetrahymenidae)、四膜虫属 (*Tetrahymena*), 是一种营自由生活的单细胞真核生物 (Shen, 1999)。目前, 嗜热四膜虫大核基因组测序工作 (*Tetrahymena* Macronuclear Genome Project) 已经完成 (Eisen et al, 2006), 这为从基因组水平鉴定嗜热四膜虫内 *hsp70* 基因家族成员奠定了基础。此外, 近期构建的四膜虫的全基因组基因芯片分析平台 (Miao et al, 2009) 和在此基础上建立的四膜虫基因表达数据库 (*Tetrahymena* Gene Expression Database, TGED, <http://tged.ihb.ac.cn>), 为嗜热四膜虫内 *hsp70* 基因家族成员的功能分析增加了丰富的信息。

关于四膜虫 *hsp70* 基因的研究主要在于不同热激条件下 *hsp70* 基因的表达变化规律 (Galego & Rodrigues-Pousada, 1985; Williams & Nelsen, 1997), 或是证实 HSP70 赋予嗜热四膜虫的高温耐受能力 (Hallberg et al, 1984, 1985), 或者是对 *hsp70* 基因上游调控元件的功能研究等方面 (Barchetta et al, 2008)。本研究在鉴定嗜热四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) *hsp70* 基因家族的基础上, 对其中 5 个高度相似且无内含子的 *hsp70* 基因进行表达分析, 并进一步探讨嗜热四膜虫 *hsp70* 基因的功能。

1 材料与方法

1.1 四膜虫细胞的培养

嗜热四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) (SB210

株) 由美国加州大学圣巴巴拉分校 Eduardo Orias 教授惠赠, 嗜热四膜虫 (B2086 株和 CU428 株) 由美国康奈尔大学 Peter Bruns 教授惠赠。四膜虫的培养基组分: 2% Proteose Peptone (Difco)、0.1% yeast extract (Oxide)、0.2% 葡萄糖 (国药集团)、0.003% Ferric citrate (Sigma), 溶于双蒸水, 经 103 kPa、120 °C 灭菌 20 min 后冷却至室温。取长势良好的对数生长期四膜虫按总体积的 0.2% (400 μL) 接种于 20 ml 培养基中, 30 °C 连续传代培养。

1.2 嗜热四膜虫 *hsp70* 基因的鉴定

在 5 μg/L 浓度三丁基锡 (Tributyltin, TBT) (Acros Organic) 处理嗜热四膜虫 CU428 株 24 h 后, 用 cDNA microarray 筛选得到 1 个应激响应基因 *hsp70* ——TTHERM_00125640 (Microarray 数据未发表)。根据该基因 ID 号, 在四膜虫基因组数据库 TGD (<http://www.ciliate.org/>) 中进行搜索得到预测基因所编码的氨基酸序列。以此基因的氨基酸序列为基础, 并添加人、酵母和拟南芥的 HSP70 序列, 对四膜虫全基因组数据库进行 Blastp 搜索 (Altschul et al, 1997); 得到的结果再次对四膜虫基因组进行 Blastp 搜索以找到四膜虫中所有的潜在 *hsp70* 基因。两次所得搜索结果在 NCBI 的 CDD 数据库——Conserved Domain Database (Marchler-Bauer et al, 2009) 以及 Pfam 数据库 (Finn et al, 2010) 中再次进行比对, 对具有 HSP70 保守结构域的基因进行鉴定, 最后总共得到了 13 个具有完整保守结构域的嗜热四膜虫 *hsp70* 基因。将这 13 个 *hsp70* 基因的核酸预测序列与嗜热四膜虫转录组测序结果 (数据未发表) 进行比对校正。

1.3 序列比对及系统发育树的构建

对鉴定得到 13 个 *hsp70* 基因, 使用 Muscle (Edgar, 2004) 和 Mafft (Katoh & Toh, 2008) 进行序列比对, 并辅以手工微调。接着用 Trimal (Capella-Gutierrez et al, 2009) 对 gap 超过 80% 的氨基酸比对位点进行删除。系统发育树用 FastTree (Price et al, 2010) 构建, 参数设置 -pseudo、-spr 4、-mlacc 2 以及 -slownni。我们对四膜虫系统发育树中一枝含有 5 个高度相似且无内含子的基因进行分析, 并将它们分别命名为 *hsp70-1* (TTHERM_01044390)、*hsp70-2* (TTHERM_00125640)、*hsp70-3* (TTHERM_01080440)、*hsp70-4* (TTHERM_00105110)、*hsp70-5* (TTHERM_00558440)。

1.4 热/冷胁迫处理

温度胁迫采用热激和冷激两种方式, 每组设 3 个平行样。热激处理条件为: 将装有 1 mL 对数生长期嗜热四膜虫(SB210 株)的离心管分别在 37 °C、39 °C 和 41 °C 的水浴热激, 经过 30 min 热激诱导后于相应温度下离心富集虫体。冷激条件为: 将装有 1 mL 对数生长期嗜热四膜虫(SB210 株)的离心管分别在 15 °C 水浴和 0 °C 冰上冷激, 经过 30 min 冷激诱导后于相应温度下离心富集虫体。

1.5 RNA 提取、cDNA 合成、mRNA 纯化、SMART cDNA 文库构建、5'和 3'RACE 及产物克隆测序

从上述步骤(1.4 节)热激处理条件下的嗜热四膜虫(SB210 株)中提取总 RNA, 提取方式参照试剂盒 TRIzol Reagent (Invitrogen)的说明步骤, 总 RNA 最终溶于 50 μL 以 DEPC 处理过的双蒸水中, 分光光度计 (Malcom)和琼脂糖凝胶电泳分别检测总 RNA 浓度和质量。总 RNA 反转录成 cDNA 的方法参见 Feng & Miao(2008)。

将 5 mL 嗜热四膜虫(SB210 株)在 39 °C 热激 1 h 后提取总 RNA, 接着以 PolyAtract® mRNA 纯化系统(Promega, Madison, WI)按照使用说明进行磁珠法纯化, 纯化后的 mRNA 使用 SMART cDNA 文库

构建试剂盒(Clontech Laboratories, Inc.)扩增合成 cDNA 文库(Guo et al, 2010)。

根据步骤上述 1.2 节中鉴定得到的嗜热四膜虫 *hsp70* 基因序列, 设计扩增 5 个高度相似 *hsp70* 基因的实时荧光定量 PCR 引物; 根据 SMART cDNA 文库构建试剂盒提供的接头全长序列设计一对通用引物 UTR(表 1)。用正向通用引物与反向 *hsp70*-4 引物扩增 *hsp70*-4 基因 5'RACE 序列, 用反向通用引物与正向 *hsp70*-4 引物扩增 *hsp70*-4 基因 3'RACE 序列: 2.5 μL 10×buffer, 0.5 μL 10 mmol/L dNTP (Fermentas), 0.4 μmol/L 引物, 1 unit Taq 酶(BD advantage)混合, 0.5 μL 文库 cDNA 模板, 最后用双蒸水配成 25 μL RACE 反应体系; RACE 反应按照下列程序进行: 94 °C 10 min 预变性, 94 °C 30 s, 62 °C 30 s, 72 °C 1 min 共 35 个循环反应, 最后于 72 °C 延伸 10 min。

PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶上进行电泳后, 特异 DNA 片段用 glass milk 胶回收试剂盒(Biostar, Canada)回收, 产物连接到 pGEM-T 载体(Promega)多克隆位点, 之后转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞液中, 涂平板挑斑。筛选出的阳性克隆菌液交由上海联合基因研究院测序。

表 1 RT-PCR 扩增 5 个 *hsp70* 基因所使用的引物
Tab. 1 Primer sequences used for RT-PCR amplification of 5 *hsp70* genes

引物名称 Primer name	正向引物序列 Forward primer sequence (5'-3')	反向引物序列 Reversed primer sequence (5'-3')
hsp70-1	AGATAATGGAGGAACCTTCTACTGA	AAGGTCTTTAGCACTCACATTTA
hsp70-2	ATCTTGTTGATGTCACCTCCTC	TTCATCCTCAGCCTGTATTAT
hsp70-3	CTGAAGGAGTTGCTGTCGGTAT	AACAGGTTAGGAAACGAATGCT
hsp70-4	CTTCAACGGTAAGGAACCCAACAG	CGAAGACTTGAATGAGGACACCAG
hsp70-5	TTGATGAAGTAATCCTTGTGG	TGATTGCTTTTGTGTCATTGGTC
UTR	GCAGTGGTATCAACGCAGAGTG	GGCGGCCGACATGTTTTTTT
18S	CCTGGGAAGGTACGGGTAAT	AAGTTCCACCAGACCATTCTG

1.6 实时荧光定量 PCR

以上述步骤 1.5 节中得到的总 RNA 反转录生成的 cDNA 为模板, 用表 1 的 *hsp70*-1、*hsp70*-2、*hsp70*-3、*hsp70*-4、*hsp70*-5 引物进行实时荧光定量 PCR 扩增, 内参基因选择嗜热四膜虫 18S rRNA 基因。实时荧光定量 PCR 反应体系: 2.5 μL 10×buffer, 0.5 μL 10 mmol/L dNTP, 0.4 μmol/L 引物, 1.2 μL EvaGreen (Biotium), 1 unit Hot start Taq 酶 (天为时代), 最后以双蒸水配成 25 μL PCR 反应体系。实时荧光定量 PCR 反应条件为: 94 °C 5 min 预变性, 中

间 40 个循环的 94 °C 10 s, 50 °C 10 s, 72 °C 20 s, 70°C 读板 1 s, 接着 72 °C 10 min 延伸, 最后制作融解曲线 65~90 °C, 以 0.5 °C/s 速率读取数据。每个样品设置 3 个平行样, 用 Chromo4™实时荧光定量 PCR 扩增仪(Bio-Rad)进行扩增, 反应结果数据由程序 Opticon 2 读取。基因的相对表达水平用软件 Relative Expression Software Tool 进行计算(Pfaffl et al, 2002)。统计方法采用软件自带的 ANOVA 法, $P<0.05$ 为有统计学意义。实时荧光定量 PCR 分析方法参考 Feng et al (2007)。

1.7 共表达基因分析

根据嗜热四膜虫 3 种典型生理/发育状态(生长、饥饿和接合生殖)20 个阶段的全基因组基因表达数据(数据来源于 TGED), 通过计算所有基因表达谱间的相关系数分别得到了四膜虫 *hsp70-3* 和 *hsp70-5* 基因的共表达基因(相关系数>0.9) (Miao et al, 2009)。然后对找到的候选基因用 Blast2GO 进行 gene ontology (GO)术语(term)的注释, 分析共表达基因之间的关系, 进而推测 *hsp70-3* 和 *hsp70-5* 基因的功能。

2 结果

2.1 嗜热四膜虫 *hsp70* 基因的鉴定与系统发育分析

在 TBT 胁迫条件下用 Microarray 筛选到一个应激响应基因 *hsp70* (TTHERM_00125640), Microarray 信号显示其表达上调 4.4 倍。以该预测 *hsp70* 基因所编码的氨基酸序列为基础, 经 blast 比对共得到 13 个含有完整保守结构域的嗜热四膜虫 *hsp70* 基因, 进一步结合嗜热四膜虫转录组测序结果(数据未发表)对这 13 个基因的剪接位点和核酸序列进行校正。

对鉴定得到的 13 个嗜热四膜虫 *hsp70* 基因构建系统发育树, 结果显示有 5 个 *hsp70* 基因聚成一个小的进化枝(图 1), 这 5 个 *hsp70* 基因均无内含子,

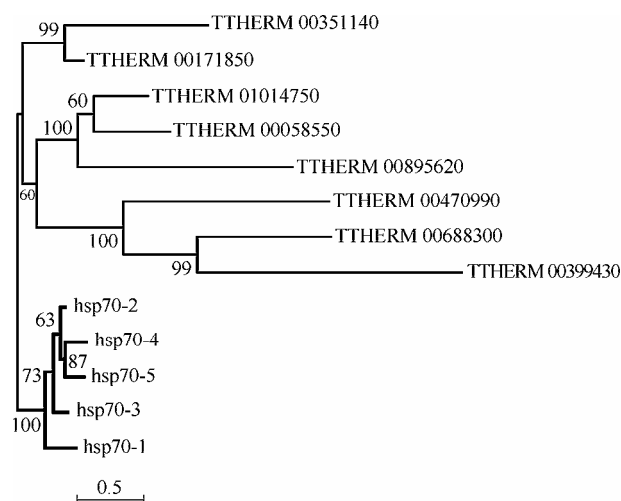


图 1 最大似然法构建的嗜热四膜虫 *hsp70* 基因家族不同基因型的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of *Tetrahymena thermophila hsp70* gene family members using a ML method

黑体标出本研究的 5 个 *hsp70* 基因。

Five interested *hsp70* genes were marked in bold.

由它们推导的氨基酸序列比对如图 2 所示, 两两之间的相似度为 67.5%~76%。

2.2 热激条件下 5 个 *hsp70* 基因的表达水平变化

在 37 °C、39 °C、41 °C 热激条件下, *hsp70-1*、*hsp70-2*、*hsp70-3*、*hsp70-4*、*hsp70-5* 这 5 个基因的表达水平高于正常生长时期的 30 °C(图 3)。除 *hsp70-4* 外, 其余 4 个 *hsp70* 基因的表达水平并不随着温度的升高而增加, 在 41 °C 时它们的表达水平要低于 39 °C。在 37、39、41 °C 这 3 个不同热激条件下, *hsp70-2* 对热激响应最敏感, 其表达水平在 5 个 *hsp70* 基因中是最高的, 分别比对照组 30 °C 时的表达水平高 12、82 和 15 倍。

2.3 冷激条件下 5 个 *hsp70* 基因的表达水平变化

以四膜虫正常生长条件 30 °C 为对照, 分别以 15 °C 和 0 °C 冷激作为刺激条件, 对 5 个 *hsp70* 基因的表达水平进行考察。结果显示, 除 *hsp70-4* 外, 其余 4 个 *hsp70* 基因对冷激都不响应(结果未显示)。在不同的冷激条件下, *hsp70-4* 基因的表达水平呈现为截然不同的规律: 在 15 °C 冷激 30 min 后 *hsp70-4* 表达水平提高了 1 倍, 但是在 0 °C 冷激 30 min 后 *hsp70-4* 表达水平却降低了 50%(图 4)。

2.4 3 种四膜虫典型生理/发育时期下 5 个 *hsp70* 基因的表达水平变化

根据四膜虫基因表达数据库(*Tetrahymena gene expression database*, TGED, <http://tged.ihb.ac.cn>)提供的四膜虫在 3 种典型生理/发育时期下的基因表达情况, 可将 5 个 *hsp70* 基因分为两大类: (1) 恒定且高表达的基因, *hsp70-4* 基因在四膜虫生长、饥饿及接合生殖时期表达稳定且表达量非常高, Microarray 信号值在 32 815~61 446 之间; (2) 差异表达的基因, 为 *hsp70-1*、*hsp70-2*、*hsp70-3*、*hsp70-5* 这 4 个基因: ① 在生长时期, *hsp70-3* 的信号值在 141~209, 有较低的表达水平, 而 *hsp70-1*、*hsp70-2*、*hsp70-5* 这 3 个基因不表达(信号值<100); ② 在饥饿时期的 0 h, *hsp70-1*、*hsp70-2*、*hsp70-3* 这 3 个基因表达量较生长后期($\sim 1 \times 10^6$ cells/mL)分别调高 42.6、15、33.6 倍, 其中 *hsp70-3* 基因的信号值最高, 为 7 022; 在饥饿时期的 0~12 h, *hsp70-1*、*hsp70-2*、*hsp70-3* 表达水平的变化趋势由高至低, *hsp70-5* 几乎不表达; 在饥饿时期的 12~15 h, *hsp70-5* 表达水平上调, 而 *hsp70-1*、*hsp70-2*、*hsp70-3* 的表达水平仍持续下降; 在饥饿时期的 15~24 h, *hsp70-1*、

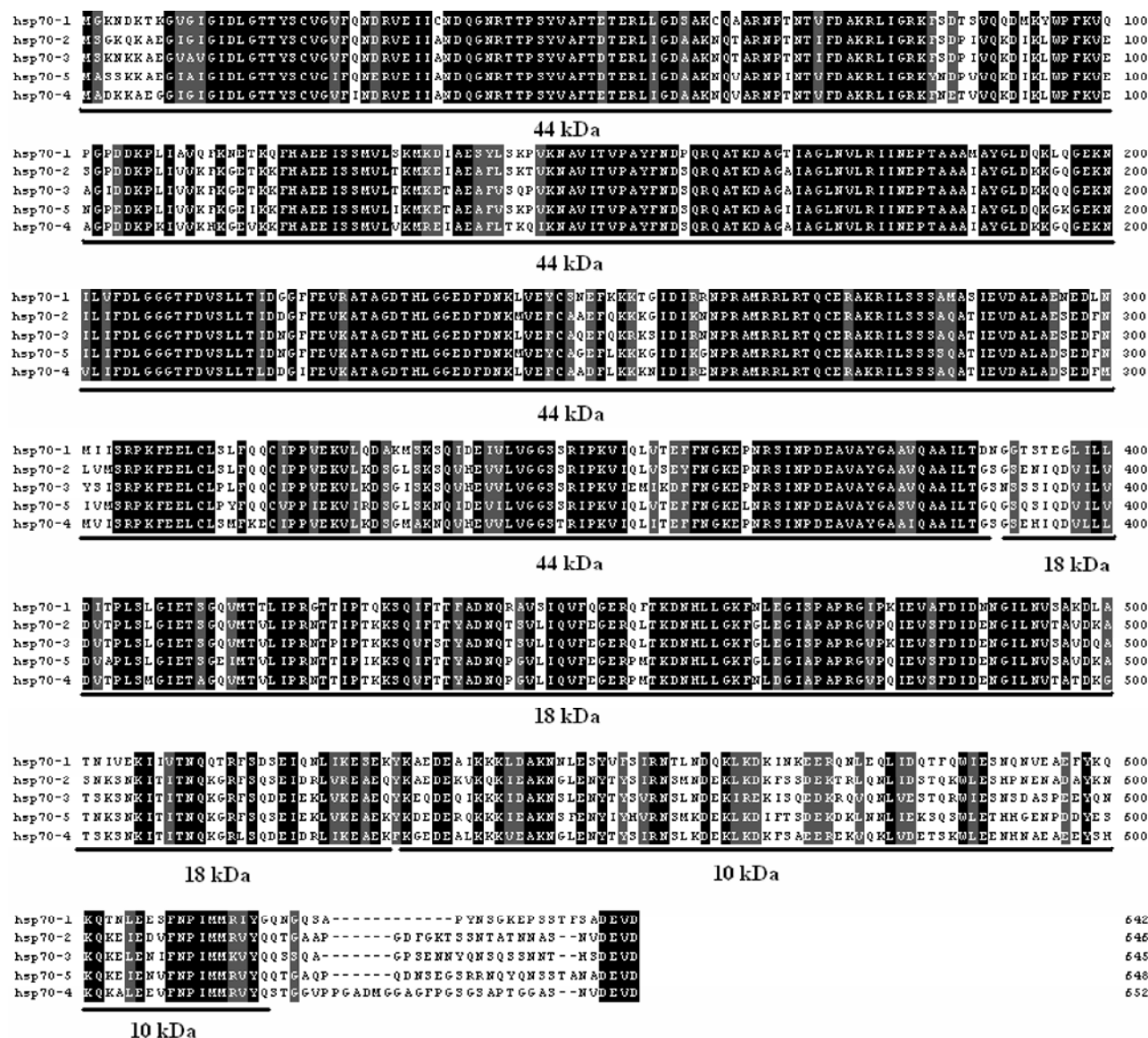


图2 5个 *hsp70* 基因推导的氨基酸序列比对
Fig. 2 Multiple sequence alignment of the HSP70

hsp70-2、*hsp70-3*、*hsp70-5* 这4个基因的表达都下降;③在接合生殖时期的0~6 h,仅*hsp70-5*高表达;在接合生殖时期的6~10 h,*hsp70-5*表达水平下降了80%,*hsp70-3*表达水平迅速上调16.6倍,*hsp70-2*表达水平上调2.4倍;在接合生殖时期的10~12 h,*hsp70-3*表达水平下降了68.75%,但*hsp70-2*表达水平持续上调2.4倍;在接合生殖时期的12~18 h,*hsp70-2*表达水平下降了81.8%,*hsp70-1*表达水平上调2.1倍(图5)。

2.5 嗜热四膜虫 *hsc70* 基因的克隆

嗜热四膜虫 *hsp70-4* 基因在四膜虫的正常生长条件下即高表达,而且热激后其表达量进一步提高,

属于典型的热休克相关蛋白 *hsc70* 基因。从嗜热四膜虫全长 cDNA 文库中克隆了 *hsc70* 基因的全长 cDNA, *hsc70* 无内含子,其开放阅读框长2208 bp,编码653个氨基酸,5'和3'非翻译区分别为94 bp和155 bp;在3'非编码区存在纤毛虫特有终止信号(ATTAA和AATTAA) (Boldrin et al, 2003) (图6)。

2.6 共表达基因分析

计算得到与嗜热四膜虫 *hsp70-3* 和 *hsp70-5* 共表达的基因分别有18个和392个,用Blast2GO对它们的功能进行注释,annotation结果分别成功得到10个(55.6%)和165个(42.1%)与GO terms相关的基

因, 它们所参与的生物学过程分别有 16 种和 113 种, 其中有 8 种生物学过程是重叠的(图 7)。

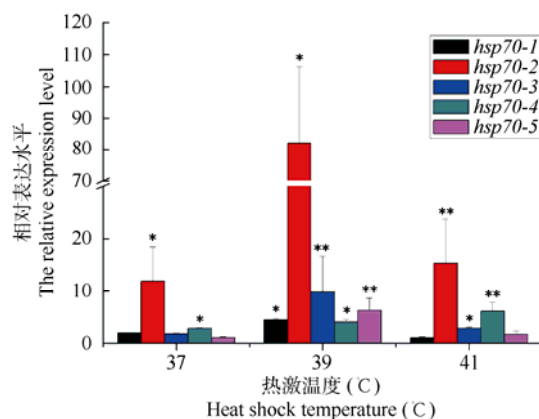


图 3 实时荧光定量 PCR 比较嗜热四膜虫 5 个 *hsp70* 基因在亚致死热激条件下(37、39 及 41 °C)的表达水平变化

Fig. 3 Comparative expression analysis of 5 *hsp70* genes in *Tetrahymena thermophila* treated with heat shock (37, 39, and 41 °C) using real time quantitative PCR

以培养条件 30 °C 为对照组, 每个样品均有 3 个平行样重复, 处理组与对照组之间的显著性表示为: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Growth temperature was the control temperature, and each sample run in triplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

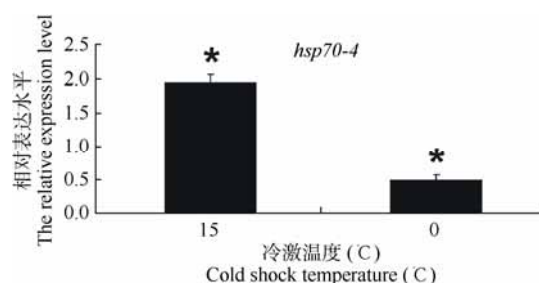


图 4 实时荧光定量 PCR 考察嗜热四膜虫 *hsp70-4* 基因在冷激条件下(15 °C 与 0 °C)的表达水平变化

Fig. 4 Comparative expression analysis of *hsp70-4* genes in *Tetrahymena thermophila* treated with cold shock (15 °C and 0 °C) using real time quantitative PCR

以培养条件 30 °C 为对照组, 每个样品均有 3 个平行样重复, 处理组与对照组之间的显著性表示为: * $P < 0.05$ 。

Growth temperature was the control temperature, and each sample run in triplicate. * $P < 0.05$ 。

3 讨论

3.1 嗜热四膜虫内存在五个结构高度相似的 *hsp70* 基因

热休克蛋白 HSP70 在细胞中行使多种功能, 包

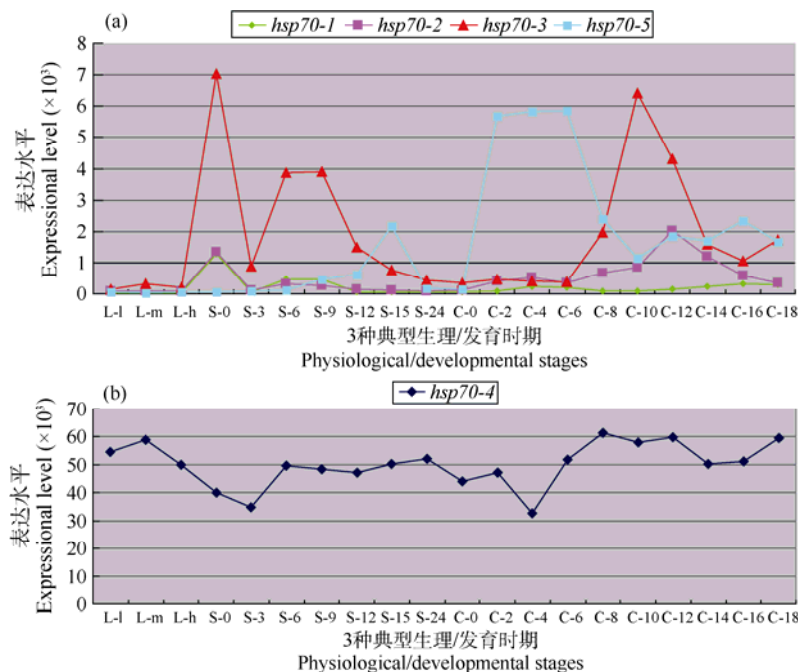


图 5 5 个 *hsp70* 基因的表达谱

Fig. 5 Expression profile of 5 *hsp70* gene

四膜虫 3 种典型生理/发育状态下的基因表达数据: 生长时期的 3 个时间点 L-l, L-m 及 L-h 分别对应 $\sim 1 \times 10^5$ cells/mL, $\sim 3.5 \times 10^5$ cells/mL 及 $\sim 1 \times 10^6$ cells/mL; 饥饿时期的 7 个时间点 S-0, S-3, S-6, S-9, S-12, S-15, S-24 分别对应 $\sim 2 \times 10^5$ cells/mL 细胞在 10 mmol/L pH7.5 Tris 缓冲液中饥饿了 0、3、6、9、12、15、24 h; 接合生殖时期的 10 个时间点 C-0, C-2, C-4, C-6, C-8, C-10, C-12, C-14, C-16, C-18 分别对应相同体积的 B2086 与 CU428 细胞混合了 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18 h (TGED, <http://tged.ihb.ac.cn/>)。图 5a 表示 *hsp70-1*、*hsp70-2*、*hsp70-3*、*hsp70-5* 这 4 个基因的表达谱; 图 5b 表示 *hsp70-4* 基因的表达谱。

Signal of gene expression during *Tetrahymena* three physiological/developmental stages from microarray data: For growing cells, L-l, L-m and L-h correspond respectively to $\sim 1 \times 10^5$ cells/mL, $\sim 3.5 \times 10^5$ cells/mL and $\sim 1 \times 10^6$ cells/mL. For starvation, $\sim 2 \times 10^5$ cells/mL were collected at 0, 3, 6, 9, 12, 15 and 24 hours (referred to as S-0, S-3, S-6, S-9, S-12, S-15 and S-24). For conjugation, equal volumes of B2086 and CU428 cells were mixed, and samples were collected at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 and 18 hours after mixing (referred to as C-0, C-2, C-4, C-6, C-8, C-10, C-12, C-14, C-16 and C-18) (data from TGED). Fig. 5a indicates the expression profile of *hsp70-1*, *hsp70-2*, *hsp70-3*, *hsp70-5*; Fig. 5b indicates the expression profile of *hsp70-4*。

图6 嗜热四膜虫 *hsc70* 基因的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 6 The cDNA and deduced amino acid sequence of *Tetrahymena thermophila* hsc70 gene

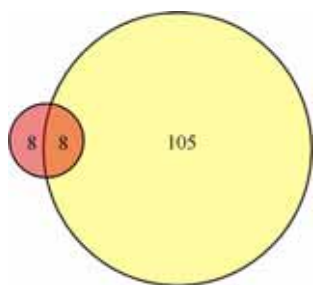


图7 维恩氏图显示与 *hsp70-3* 和 *hsp70-5* 共表达基因所参与的生物学过程比较

Fig.7 Venn-Diagram showing the comparison of biological processes between the co-expressed genes with *hsp70-3* and *hsp70-5*

与 *hsp70-3* 共表达基因所参与的生物学过程用红色表示, 与 *hsp70-5* 共表达基因所参与的生物学过程用黄色表示。

Biological process of co-expressed genes with *hsp70-3* was in red, while biological process of co-expressed genes with *hsp70-5* was in yellow.

括蛋白折叠、多聚体的耦合与解离、蛋白跨膜定位、热激响应等, 为顺利实现上述功能, 真核细胞的基因组往往编码多个 HSP70 蛋白(Lindquist & Craig, 1998)。目前在人(Daugaard et al, 2007)、果蝇(*Drosophila melanogaster*)(Bettencourt & Feder, 2001)、线虫(*Caenorhabditis elegans*)(Snutch et al, 1988)、拟南芥 *Arabidopsis* (Sung et al, 2001)、真菌 Chytridiomycete(*Blastocladiella emersonii*) (Georg & Gomes, 2007)等中均已鉴定到由多个 *hsp70* 成员组成的基因家族。但是有关原生动物 *hsp70* 基因家族或亚家族的信息匮乏, 尤其是模式生物四膜虫中, 在大核基因组测序工作完成前仅对个别 *hsp70* 的功能进行分析(Hallberg et al, 1984; Galego & Rodrigues-Pousada, 1985; Williams & Nelsen, 1997; Barchetta et al, 2008)。

本研究鉴定得到了 13 个具有完整保守结构域的嗜热四膜虫 *hsp70* 基因, 系统发育分析表明, 其中有 5 个基因聚成一个小进化枝(图 1)。推测这 5 个基因可能来源于基因的近期复制事件, 类似于四膜虫内已发现的其它基因家族的进化方式(Fu et al, 2009)。真核生物细胞质中的 HSP70 末端 4 个氨基酸组成高度保守, 无论是植物, 如拟南芥, 或是低等生物, 如果蝇, 还是高等动物, 如大鼠、牛、人等均由 EEVD 组成, 以维持 mRNA 的转录顺利完成(Kiang & Tsokos, 1998; Chou et al, 2003)。但在嗜热四膜虫内这 5 个高度相似的 HSP70 末端 4 个氨基酸组成却为 DEVD, 亦不同于原核生物 *E. Coli* 的 EEVKDKK, 推测四膜虫内 HSP70 成员的具体功能

可能有别于其它真核生物。进一步对这 5 个 *hsp70* 基因推导的氨基酸序列进行比对, 发现 N 端相对分子质量为 44 kDa 的 ATPase 功能域(ATP-binding domain)的序列几乎一致, 而 C 端相对分子质量为 18 kDa 的多肽结合功能域 (polypeptide-binding domain) 和相对分子质量为 10 kDa 的 C 端结构域(C-terminal domain)的相似度则稍低(图 2)。作为行使 ATP 水解活性区域的 ATPase 功能域(Kiang & Tsokos, 1998), 5 个 HSP70 蛋白序列的高度保守, 推测它们可能都具有水解 ATP 的功能; 而行使 HSP70 定位的 C 端相对分子质量为 18 kDa 的多肽结合功能域 (Wang et al, 1993; Demand et al, 1998)在 5 个 HSP70 蛋白序列中差异较大, 尤其是起自偶联作用的相对分子质量为 10 kDa 的 C 端结构域(Chou et al, 2003)差异更大, 说明这 5 个蛋白在四膜虫细胞内行使的具体功能可能是有所差异的。

3.2 *hsp70-2* 对热激响应最敏感

之前的研究表明, 嗜热四膜虫在 41 °C 热激 15 min 后即可检测到 *hsp70* 基因的表达产物, 在 41 °C 热激 1 h 后 HSP70 蛋白表达量趋于稳定(Williams & Nelsen, 1997; Hallberg et al, 1985); 但是, *hsp70-1* 至 *hsp70-5* 这 5 个基因的 mRNA 表达水平在 15~30 min 达到最高值, 在 1 h 后其表达量反而下降(Dr. Sabrina Barchetta, personal communication)。因此, 本研究采用热激 30 min 来研究上述 5 个 *hsp70* 基因的表达水平。

在 37 °C、39 °C、41 °C 热激条件下, 5 个 *hsp70* 基因的表达水平均高于正常生长时期的 30 °C, 其中以 *hsp70-2* 基因的表达水平为最高。推测嗜热四膜虫对热激的响应主要依赖于 *hsp70-2* 基因, 其它 4 个 *hsp70* 基因起到辅助作用。这在酵母胞质 *hsp70* 基因——*Ssa* 亚家族中已有类似的系统研究, *Ssa* 亚家族的成员之间功能虽然有重叠, 但是每个 *Ssa* 蛋白只在特定条件下行使功能, 其它成员只是起补偿作用(Craig et al, 1993)。嗜热四膜虫(*T. thermophila*)是一种迄今为止所有已知四膜虫属内耐热能力最高的物种(Nanney & Simon, 2000)。如实验室常用的梨形四膜虫(*T. pyriformis*) 在 32 °C 即无法繁殖生存, 而嗜热四膜虫在 40 °C 时仍能很好地存活(Frankel & Nelsen, 2001)。推测, *hsp70-2* 基因在嗜热四膜虫具有高耐热能力中可能起到主要作用。

3.3 鉴定得到的 *hsp70-4* 是一个热休克相关蛋白基因

在以 15 °C 和 0 °C 冷激条件下, 仅 *hsp70-4* 对冷

激有响应,其余 4 个 *hsp70* 基因的 mRNA 表达产物均检测不到,说明并不是所用的嗜热四膜虫 *hsp70* 基因对冷激有响应。在果蝇中也同样如此, *hsp70Aa* 对冷激响应最敏感,而 *hsp60*、*hsp67Ba*、*hsc70-1* 这 3 个基因在冷激条件下无表达产物(Colinet et al, 2010)。

考察四膜虫在 3 种典型生理/发育时期下的 *hsp70* 基因表达情况,发现 *hsp70-4* 基因在四膜虫的生长、饥饿及接合生殖时期表达稳定,表达量非常高;此外,在 37 °C、39 °C、41 °C 热激条件下, *hsp70-4* 的表达水平随温度的升高而进一步提高,据此认为该基因属于典型的组成型表达的热休克蛋白(Karouna-Renier et al, 2003; Sørensen et al, 2003),也称为热休克相关蛋白(heat shock cognate protein, hsc)。这是迄今为止在四膜虫内发现的首个 *hsc70*。而 *hsp70-1*、*hsp70-2*、*hsp70-3*、*hsp70-5* 这 4 个基因在生长时期表达量低或不表达,在热激条件下诱导高表达,属于诱导型表达的热休克蛋白。

3.4 *hsp70-3* 与 *hsp70-5* 在四膜虫生理/发育状态下行使不同的功能

在四膜虫的饥饿初期 0 h, *hsp70-1*、*hsp70-2*、*hsp70-3* 这 3 个基因的表达量迅速调高,其中以 *hsp70-3* 基因的信号值最高,而 *hsp70-5* 却不表达;随着饥饿时间的延长,在 12~15 h 的饥饿阶段, *hsp70-5* 的表达量才开始上升,但此时 *hsp70-1*、*hsp70-2*、*hsp70-3* 的表达量都已经明显下降。这说明饥饿处理会诱导四膜虫 *hsp70* 基因的表达。这与在其它生物体内发现的现象是一致的,无论是单细胞生物,如酵母,还是脊椎动物,如露斯塔野鲮鱼(*Labeo rohita*),饥饿导致它们体内的 *hsp70* 基因表达上调(Chughtai et al, 2001; Yengkokpam et al, 2008)。另一点值得注意的是,不同的饥饿时间段对应不同的 *hsp70* 基因表达,0~12 h 主要是 *hsp70-3* 起表达,12~15 h 则是 *hsp70-5* 在表达,提示 *hsp70-3* 和 *hsp70-5* 这两个基因在功能上是有差异的。

Hsp70 基因不仅可以被热激、饥饿等所诱导表

达,而且也会在发育时期表达,真菌(*B. emersonii*)的 *hsp70* 基因即属于此类(Bonato et al, 1987)。在四膜虫接合生殖时期, *hsp70-1*、*hsp70-2*、*hsp70-3*、*hsp70-5* 的表达均发生变化,其中 *hsp70-3* 和 *hsp70-5* 的表达水平最高,变化最明显。在接合生殖时期的 0~6 h,以 *hsp70-5* 表达为主,此阶段四膜虫细胞内的小核通过有丝分裂产生单倍体小核,并发生小核交换和原核(pronuclear)融合事件;在 6~10 h, *hsp70-5* 表达水平下降,而 *hsp70-3* 表达水平迅速上调,此阶段四膜虫细胞内的融合核发育成新的大核和新的小核,老大核凋亡(Cole et al, 1997; Cole & Soelter, 1997)。

根据嗜热四膜虫 3 种典型生理/发育状态(生长、饥饿和接合生殖)20 个阶段的全基因组基因表达数据,计算得到与 *hsp70-3* 共表达的基因有 18 个,其中 10 个是与 GO terms 相关的基因,参与 16 种生物学过程;与 *hsp70-5* 共表达的基因有 392 个,其中 165 个是与 GO terms 相关的基因,参与 113 种生物学过程。对这两类基因各自所参与的生物学过程进行比较,发现其中有 8 种过程是重叠的,涉及 DNA 代谢、DNA 修复、翻译后蛋白修饰、蛋白修饰、胞内蛋白运输、离子运输、磷酸化、羧酸代谢过程等,这些生物学过程可能与四膜虫受饥饿胁迫或接合生殖时期细胞分化、发育是相关的。进一步对这两类基因有差异的生物学过程进行比较,发现与 *hsp70-3* 共表达的基因主要参与脂肪酸氧化、脂肪酸代谢、脂肪酸分解、羧酸分解、脂修饰、脂氧化、细胞脂肪分解等过程;而与 *hsp70-5* 共表达的基因则主要参与细胞周期检验点控制、细胞形态发生、有丝分裂中期板汇集、有丝分裂 M 期、减数分裂、RNA 代谢、RNA 分解、mRNA 代谢等过程。上述结果显示 *hsp70-3* 和 *hsp70-5* 在饥饿和接合生殖阶段的表达谱显著不同,以及它们共表达基因所参与的生物学过程亦存在差异,说明 *hsp70-3* 和 *hsp70-5* 这两个基因在功能上是存在差异的。

参考文献:

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. *Nucleic Acids Res*, **25**(17): 3389-3402.
- Barchetta S, La Terza A, Ballarini P, Pucciarelli S, Miceli C. 2008. Combination of two regulatory elements in the *Tetrahymena thermophila* HSP70-1 gene controls heat shock activation [J]. *Eukaryot cell*, **7**(2): 379-386.
- Bettencourt BR, Feder ME. 2001. Hsp70 duplication in the *Drosophila melanogaster* species group: how and when did two become five? [J]. *Mol Biol Evol*, **18**(7): 1272-1282.
- Boldrin F, Santovito G, Negrison E, Piccinni E. 2003. Cloning and sequencing of four new metallothionein genes from *Tetrahymena thermophila* and *T. pigmentosa*: evolutionary relationships in *Tetrahymena* MT family [J]. *Protist*, **154**(3-4): 431-42.
- Bonato MC, Silva AM, Gomes SL, Maia JC, Juliani MH. 1987. Differential expression of heat-shock proteins and spontaneous synthesis of HSP70

- during the life cycle of *Blastocladiella emersonii* [J]. *Eur J Biochem*, **163**(1): 211-220.
- Capella-Gutierrez S, Silla-Martinez JM, Gabaldon T. 2009. TrimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses [J]. *Bioinformatics*, **25**(15): 1972-1973.
- Chou CC, Forouhar F, Yeh YH, Shr HL, Wang C, Hsiao CD. 2003. Crystal structure of the C-terminal 10-kDa subdomain of Hsc70 [J]. *J Biol Chem*, **278**(32): 30311-30316.
- Chughtai ZS, Rassadi R, Matusiewicz N, Stochaj U. 2001. Starvation promotes nuclear accumulation of the hsp70 Ssa4p in yeast cells [J]. *J Biol Chem*, **276**(23): 20261-20266.
- Cole ES, Cassidy-Hanley D, Hemish J, Tuan J, Bruns PJ. 1997. A mutational analysis of conjugation in *Tetrahymena thermophila*. 1. Phenotypes affecting early development: meiosis to nuclear selection [J]. *Dev Biol*, **189**(2): 215-232.
- Cole ES, Soelter TA. 1997. A mutational analysis of conjugation in *Tetrahymena thermophila*. 2. Phenotypes affecting middle and late development: third prezygotic nuclear division, pronuclear exchange, pronuclear fusion, and postzygotic development. *Dev Biol*, **189**(2): 233-245.
- Colinet H, Lee SF, Hoffmann A. 2010. Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster* [J]. *FEBS J*, **277**(1): 174-185.
- Craig EA, Gambill BD, Nelson RJ. 1993. Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis [J]. *Microbiol Rev*, **57**(2): 402-414.
- Daugaard M, Rohde M, Jäättelä M. 2007. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions [J]. *FEBS Lett*, **581**(19): 3702-3710.
- Demand J, Lüders J, Höfeld J. 1998. The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors [J]. *Mol Cell Biol*, **18**(4): 2023-2028.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput [J]. *Nucleic Acids Res*, **32**(5): 1792-1797.
- Eisen JA, Coyne RS, Wu M, Wu D, Thiagarajan M, Wortman JR, Badger JH, Ren Q, Amedeo P, Jones KM, Tallon LJ, Delcher AL, Salzberg SL, Silva JC, Haas BJ, Majoros WH, Farzad M, Carlton JM, Smith RK Jr, Garg J, Pearlman RE, Karrer KM, Sun L, Manning G, Elde NC, Turkewitz AP, Asai DJ, Wilkes DE, Wang Y, Cai H, Collins K, Stewart BA, Lee SR, Wilamowska K, Weinberg Z, Ruzzo WL, Wloga D, Gaertig J, Frankel J, Tsao CC, Gorovsky MA, Keeling PJ, Waller RF, Patron NJ, Cherry JM, Stover NA, Krieger CJ, del Toro C, Ryder HF, Williamson SC, Barbeau RA, Hamilton EP, Orias E. 2006. Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote [J]. *PLoS Biol*, **4**(9): e286.
- Feng LF, Miao W, Wu YX. 2007. Differentially expressed genes of *Tetrahymena thermophila* in response to tributyltin (TBT) identified by suppression subtractive hybridization and real time quantitative PCR [J]. *Aquat Toxicol*, **81**(1): 99-105.
- Feng LF, Miao W. 2008. Comparative analysis of the Hsp70 mRNA expression and heat tolerance in two regional *Carchesium polypinum* at different latitudes [J]. *Acta Zool Sin*, **54**(3): 525-530. [冯立芳, 缪炜. 2008. 不同纬度螯状独缩虫耐热能力及 Hsp70 mRNA 表达水平的比较. 动物学报, 54(3): 525-530.]
- Finn RD, Mistry J, Tate J, Coghill P, Heger A, Pollington JE, Gavin OL, Gunasekaran P, Ceric G, Forslund K, Holm L, Sonnhammer EL, Eddy SR, Bateman A. 2010. The Pfam protein families database [J]. *Nucleic Acids Res*, **38**(Database issue): D211-D22.
- Frankel J, Nelsen EM. 2001. The effects of supraoptimal temperatures on population growth and cortical patterning in *Tetrahymena pyriformis* and *Tetrahymena thermophila*: a comparison [J]. *J Eukaryot Microbiol*, **48**(2): 135-146.
- Fu C, Xiong J, Miao W. 2009. Genome-wide identification and characterization of cytochrome P450 monooxygenase genes in the ciliate *Tetrahymena thermophila* [J]. *BMC Genomics*, **10**: 208.
- Galeo L, Rodrigues-Pousada C. 1985. Regulation of gene expression in *Tetrahymena pyriformis* under heat-shock and during recovery [J]. *Eur J Biochem*, **149**(3): 571-578.
- Georg Rde C, Gomes SL. 2007. Comparative expression analysis of members of the Hsp70 family in the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii* [J]. *Gene*, **386**(1-2): 24-34.
- Guo LN, Yu T, Feng LF, Miao W. 2010. Cloning and expression analysis of *Tetrahymena* 2-oxoglutarate/malate carrier gene (*omc*) exposed to dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) [J]. *Chn J Appl Environ Biol*, **16**(2): 216-221. [郭利娜, 俞婷, 冯立芳, 缪炜. 2010. 四膜虫 *omc* 基因的克隆及在滴滴涕(DDT)暴露下的表达分析. 应用与环境生物学报, 16(2): 216-221.]
- Hallberg RL, Kraus KW, Findly RC. 1984. Starved *Tetrahymena thermophila* cells that are unable to mount an effective heat shock response selectively degrade their rRNA [J]. *Mol Cell Biol*, **4**(10): 2170-2179.
- Hallberg RL, Kraus KW, Hallberg EM. 1985. Induction of acquired thermotolerance in *Tetrahymena thermophila*: effects of protein synthesis inhibitors [J]. *Mol Cell Biol*, **5**(8): 2061-2069.
- Karouna-Renier NK, Yang WJ, Rao KR. 2003. Cloning and characterization of a 70 kDa heat shock cognate gene (HSC70) from two species of *Chironomus* [J]. *Insect Mol Biol*, **12**(1): 19-26.
- Katoh K, Toh H. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program [J]. *Brief Bioinform*, **9**(4): 286-298.
- Kiang JG, Tsokos GC. 1998. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology [J]. *Pharmacol Ther*, **80**(2): 183-201.
- Lindquist S, Craig EA. 1998. The heat-shock proteins [J]. *Annu Rev Genet*, **22**: 631-677.
- Marchler-Bauer A, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Lu S, Marchler GH, Mullokandov M, Song JS, Tasneem A, Thanki N, Yamashita RA, Zhang D, Zhang N, Bryant SH. 2009. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database [J]. *Nucleic Acids Res*, **37**(Database issue): D205-D210.
- Miao W, Xiong J, Bowen J, Wang W, Liu Y, Braguinets O, Grigull J, Pearlman RE, Orias E, Gorovsky MA. 2009. Microarray analyses of gene expression during the *Tetrahymena thermophila* life cycle [J]. *PLoS One*, **4**(2): e4429.
- Nanney DL, Simon EM. 2000. Laboratory and Evolutionary History of *Tetrahymena thermophila* [M]// Forney JD. *Tetrahymena thermophila*. San Deigo: Academic Press, 3-25.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, **30**(9): e36.
- Price MN, Dehal PS, Arkin AP. 2010. FastTree 2 - approximately maximum-likelihood trees for large alignments [J]. *PLoS One*, **5**(3): e9490.
- Shen YF. 1999. Ciliophora [M]//Protozoology. Beijing: Science Press, 454-456. [沈韞芬. 1999. 纤毛门[M]//原生动物学. 北京: 科学出版社, 454-456.]
- Snutch TP, Heschl MF, Baillie DL. 1988. The *Caenorhabditis elegans* hsp70 gene family: a molecular genetic characterization [J]. *Gene*, **64**(2): 241-255.
- Sung DY, Vierling E, Guy CL. 2001. Comprehensive expression profile analysis of the Arabidopsis Hsp70 gene family [J]. *Plant Physiol*, **126**(2): 789-800.
- Wang TF, Chang JH, Wang C. 1993. Identification of the peptide binding domain of hsc70. 18-Kilodalton fragment located immediately after ATPase domain is sufficient for high affinity binding [J]. *J Biol Chem*, **268**(35): 26049-26051.
- Williams NE, Nelsen EM. 1997. HSP70 and HSP90 homologs are associated with tubulin in hetero-oligomeric complexes, cilia and the cortex of *Tetrahymena* [J]. *J Cell Sci*, **110** (Pt 14): 1665-1672.
- Yengkokpam S, Pal AK, Sahu NP, Jain KK, Dalvi R, Misra S, Debnath D. 2008. Metabolic modulation in *Labeo rohita* fingerlings during starvation: Hsp70 expression and oxygen consumption [J]. *Aquaculture*, **285**(1-4): 234-237.