

白斑综合征病毒感染对凡纳滨对虾热休克蛋白 60 和 90 表达的影响

孙 凡^{1,2} 刘庆慧^{2*} 黄 捷²

(¹ 上海海洋大学, 201306)

(² 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 采用实时荧光定量 PCR 技术分析白斑综合征病毒(WSSV)感染凡纳滨对虾不同时段鳃、肠、肝胰腺、肌肉、类淋巴和血细胞组织中热休克蛋白(HSP)60 和 90 基因 mRNA 转录水平的变化。结果显示, HSP60 和 HSP90 在这 6 个组织中都有表达, WSSV 感染影响各组织中 HSP60 和 HSP90 mRNA 转录水平的表达, WSSV 感染抑制 HSP60 在鳃、肠、肌肉和血细胞的表达, 促进 HSP90 在鳃、肠、肝胰腺、肌肉、血细胞和类淋巴的表达, 表明 HSP60 和 HSP90 参与 WSSV 感染免疫反应。

关键词 凡纳滨对虾 WSSV 热休克蛋白 60 热休克蛋白 90

中图分类号 S945.46 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2013)02-0090-06

Expression of HSP60 and HSP90 in shrimp *Litopenaeus vannamei* during WSSV infection

SUN Fan^{1,2} LIU Qing-hui^{2*} HUANG Jie²

(¹ Shanghai Ocean University, 201306)

(² Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT The mRNA expression levels of HSP60 and HSP90 in tissues of gill, intestine, hepatopancreas, muscle, hemocyte and lymphoid were assayed by quantitative real-time PCR. Results showed that HSP60 and HSP90 were expressed in the six tissues. WSSV infection affected the transcription levels of HSPs mRNA. WSSV infection inhibited the expression of HSP60 in the tissues of gill, intestine, muscle and hemocyte, and promoted the expression of HSP90 in the tissues of gill, intestine, hepatopancreas, muscle, hemocyte and lymphoid. This indicated that both HSP60 and HSP90 took part in immune responses.

KEY WORDS *Litopenaeus vannamei* White spot syndrome virus HSP60 HSP90

热休克蛋白(Heat shock protein, HSP)是指细胞或生物体在一定时间内遭受热刺激及其他环境、生理或

国家重点基础研究发展计划(2012CB114401)、对虾行业专项(201103034)和国家自然科学基金(30871942)共同资助

* 通讯作者。E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn

收稿日期:2012-03-31;接受日期:2012-07-11

作者简介:孙 凡(1987-),女,硕士研究生,主要从事水生生物技术方面的研究。E-mail:fanfan693@163.com

病理胁迫时,新合成或含量增加的一类蛋白(Guttman *et al.* 1980; Hahn *et al.* 1982; Barbe *et al.* 1988)。根据分子量大小及序列同源性,热休克蛋白分为 HSP110、HSP100、HSP90、HSP70、HSP60、HSP40 和 HSP20 (Nover *et al.* 1997)。正常状态下,HSP60 以稳定状态存在于细胞质和线粒体基质中,当机体受到胁迫条件时,热休克蛋白大量合成,以恢复变性蛋白或凝聚蛋白的天然构象(龚兴国等 2003)。HSP90 也有恢复变性蛋白构象的功能(王宇萍等 2010)。

白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)于 1992 年首次发现于台湾,相继在世界范围内传播开来。由于其侵染的宿主非常广泛,每年给对虾养殖业造成了巨大的经济损失。研究表明,病原感染影响 HSPs 的表达,对虾受到 WSSV 感染胁迫后,组织中的 HSP21 和 HSP70 的表达量随着时间的变化表现出一定的变化(Huang *et al.* 2008; Xu *et al.* 2009)。有关 HSP60 和 HSP90 随 WSSV 感染在各组织中表达情况尚不清楚。据此,本研究采用实时荧光定量 PCR 方法,从转录水平上研究 WSSV 感染对虾后 HSP60 和 HSP90 在不同时段、不同组织中的表达情况,为深入研究热休克蛋白对 WSSV 感染的响应提供依据。

1 材料和方法

1.1 病毒和对虾

白斑综合征病毒(WSSV)为中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖生物疾病控制与分子病理学实验室保存。凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 于 2011 年 10 月 4 日购自山东省青岛市崂山区沙子口对虾养殖场,平均体长为 10.85 cm,平均体重为 7.01 g,经 PCR 检测不携带 WSSV,在室温下(24±1℃)的海水箱中暂养 7d。

1.2 对虾感染

取 27 尾凡纳滨对虾,每 4 尾虾放置于一个海水箱中。取 12 尾虾(3 箱)于虾腹部第 2 节注射 50 μ l WSSV (10⁶ 个病毒粒子/ μ l)作为 WSSV 感染组,另取 12 尾(3 箱)于虾腹部第 2 节注射 50 μ l PBS 作为对照组。分别于处理前(即 0 h)和处理后的 12、24、48 和 72 h 取 WSSV 组和 PBS 组各 3 尾虾,分别装入冻存管中,用液氮速冻,置于-80℃超低温冰箱中保存,以备提取 RNA 用。每次的 3 尾虾决定了后续实验,每组为 3 个平行。

1.3 总 RNA 的提取

分别提取对虾的鳃、肠、肝胰腺、肌肉、类淋巴和血细胞的总 RNA。采用 TRIzol 法提取组织中的总 RNA。在各组织研磨后提取的上清液中加入 TRIzol(大连宝生物工程有限公司),振荡混匀后室温静置 5 min;加入 1/5 TRIzol 体积的氯仿摇匀,室温静置 5 min;4℃、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液;加入等体积异丙醇,室温静置 10 min,4℃、12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液;沉淀中加入 1ml DEPC 水配制的 75%乙醇溶液洗涤,搅碎沉淀,4℃、12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,室温放置干燥;加入 50 μ l DEPC 水溶解,分光光度计(Nano Drop 2000)测其纯度和浓度。

1.4 cDNA 的合成

按照 PrimeScript[®] 1st Strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa)的说明书操作,在 10 μ l 的反应体系中加入 1.0 μ g 的总 RNA, Oligo dT Primer 1 μ l, dNTP Mixture 1 μ l, RNase free dH₂O 7 μ l, 65℃、5 min 后,冰上急冷 5 min。随后对上述体系中加入 5×PrimeScript[®] Buffer 4 μ l, RNase Inhibitor 0.5 μ l, PrimeScript[®] RTase 1 μ l, RNase free dH₂O 4.5 μ l, 混匀后, 30℃、10 min, 42℃ 反转录 1 h, 95℃、5 min。合成的 cDNA 作为 Real-time PCR 反应的模板,-20℃保存备用。

1.5 引物设计

利用 Primer Premier 5.0 引物设计软件。选取管家基因 β -actin 作为内参,基于 GenBank β -actin (Gen-

Bank: AAG16253.1)、凡纳滨对虾 hsp60 (GenBank: FJ710169.1)、hsp90 (GenBank: HQ008268.1) 和 vp28 (GI:17016817) 序列,设计引物(表 1),送交生工生物工程(上海)有限公司。

1.6 vp28 基因表达检测

配制 25 μ l 的反应体系,含 Ex Taq 0.2 μ l (5U/ μ l), dNTP 2 μ l, Ex Taq Buffer (10 \times) 2.5 μ l, 鳃 cDNA 模板 1 μ l, 上下游引物各 1 μ l (10 μ mol/L), DEPC 处理水 17.3 μ l。反应在 PCR 仪(ABI 公司)上进行扩增。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, X $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 扩增 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。其中 vp28 和 β -actin 的 X 分别为 52 $^{\circ}$ C 和 59 $^{\circ}$ C。

1.7 Real-time PCR

以得到的 cDNA 为模板,分别用 β -actin(内参)、hsp60、hsp90 的引物(表 1),进行荧光定量 PCR。配制 25 μ l 的反应体系,含 SYBR Premix Ex TaqTM (2 \times) 12.5 μ l, cDNA 模板 1 μ l, 上下游引物各 0.5 μ l (10 μ mol/L), DEPC 处理水 10.5 μ l。反应在 Rotor Gene 3000 荧光定量 PCR 仪(Corbett Research 公司,澳大利亚)上进行扩增。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, X $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 扩增 45 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。其中 hsp60 和 hsp90 的 X 分别为 55 $^{\circ}$ C 和 59 $^{\circ}$ C。

1.8 统计分析

分析不同组织中不同时刻的 HSP60、HSP90 的表达量,根据 Rotor Gene 3000 仪器自带软件采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法,0h 的实验组作为对照组,进行 PCR 结果分析,采用 SPSS 16.0 进行单因素方差分析,组间数比较用 LSD-t 检验,显著性检验水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 WSSV 对凡纳滨对虾的感染

为确定 WSSV 感染而致 vp28 基因在 mRNA 水平的变化,以不同时段 cDNA 为模板,对 vp28 进行 PCR 扩增,同时以对 β -actin 的 PCR 产物(121bp)作为参照,来分析 vp28 在不同感染时段表达情况。结果表明,感染 48h 后可检测到 605bp 的 vp28 扩增产物(图 1),表明 WSSV 感染对虾并在体内复制。

2.2 HSP60 和 HSP90 在不同组织中的表达情况

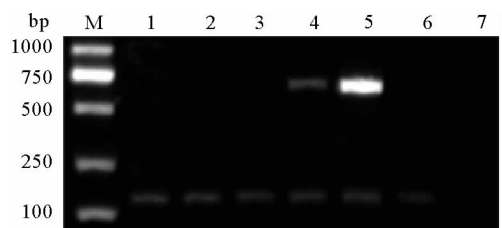
2.2.1 HSP60 和 HSP90 在鳃组织中的变化

WSSV 感染凡纳滨对虾之后,HSP60 在鳃组织中的表达受到明显的抑制,WSSV 感染 12h HSP60 的表达量降到最低值,为对照组的 2%,在检测的感染时间(12~72 h),实验组与对照组相比都有显著性差异;而 HSP90 的表达情况有些不同,在感染后 12h 表达量降至最低,比对照组减少了 77.5%,随后表达量一直回升,到了 72h 表达量已经显著超出了对照组 46%(图 2A)。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence(5'-3')
β -actinF	GCCCATCTACGAGGGATA
β -actinR	GGTGGTCGTGAAGGTGTAG
hsp60F	ATTGTCCGCAAGGCTATC
hsp60R	ATCTCCAGACGCTTCCAT
hsp90F	GCACGAAGGAGAACCAGAAGCACA
hsp90R	TGAACGCAGTATTCGTGATGCGT
vp28F	GCGGTCGACAATGGATCTTTCTTTTAC
vp28R	ATAGGATCCAACCTCGTCTCAGTGCCA



M. DNA 标准 DL 2000; 1. 0h; 2. WSSV 感染 12h; 3. WSSV 感染 24h; 4. WSSV 感染 48h; 5. WSSV 感染 72h; 6. PBS 注射 72h; 7. DEPC 水
M. DNA Marker DL 2000; 1. 0h; 2. WSSV infection 12h; 3. WSSV infection 24h; 4. WSSV infection 48h; 5. WSSV infection 72h; 6. PBS injection 72h; 7. DEPC H₂O

图 1 PCR 扩增 vp28 与 β -actin

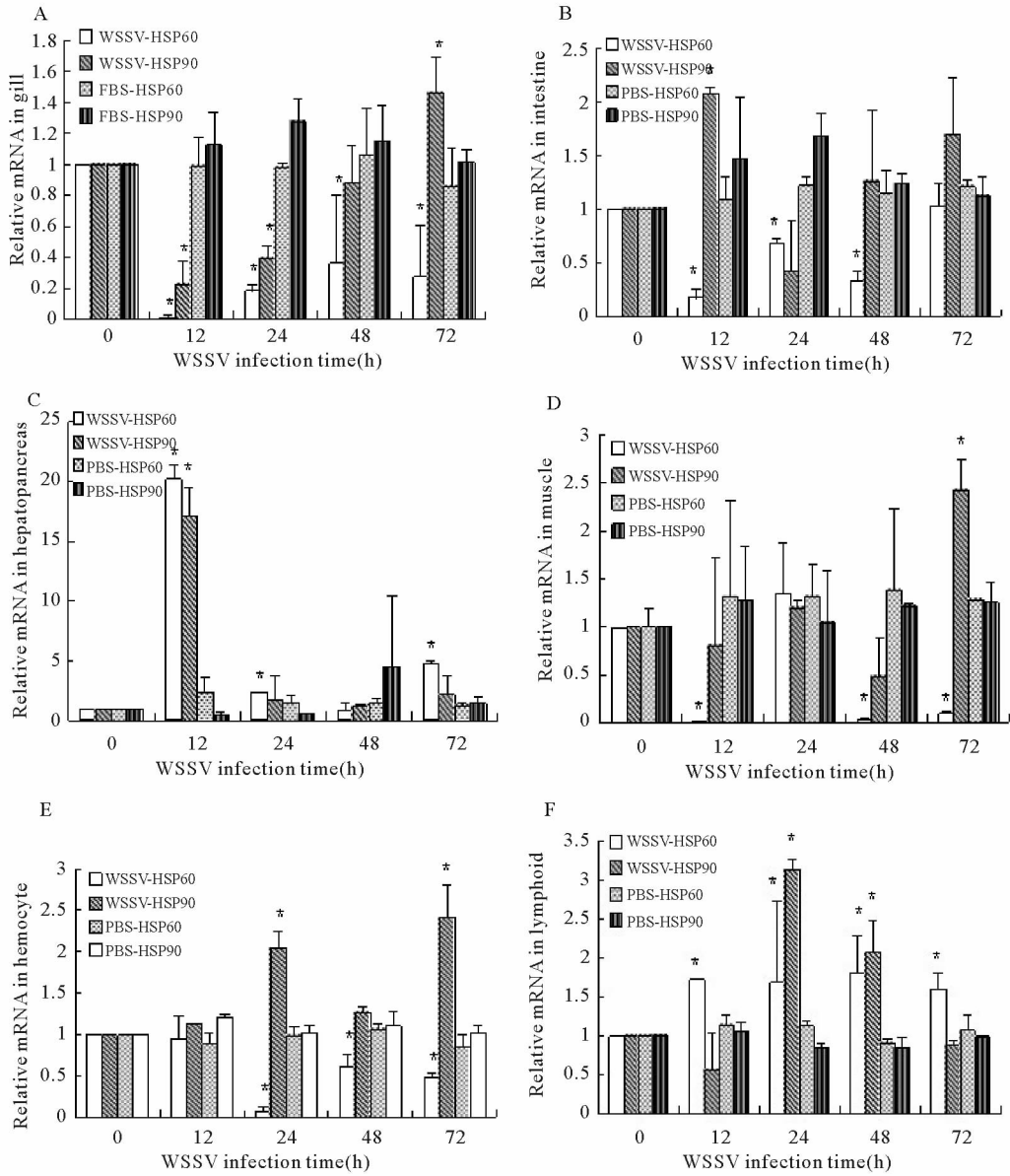
Fig. 1 Amplification of vp28 and β -actin by PCR

2.2.2 HSP60 和 HSP90 在肠组织中的变化

在肠组织中,WSSV 感染后,HSP60 的表达量开始明显下降,12h 降至最低值,为对照组的 17%,但是在 72h 时已经回升至和对照组基本一致;WSSV 感染对 HSP90 表达量的影响波动比较小,只有在 12h 时 HSP90 的表达量达到最高值,为对照组的两倍(图 2B)。

2.2.3 HSP60 和 HSP90 在肝胰腺组织中的变化

在肝胰腺中,WSSV 感染后 HSP60 和 HSP90 的变化趋势基本一致,均在 12h 达到最高值,分别比对照组高出 19 倍和 16 倍,随后下降(图 2C)。



A. 鳃, B. 肠, C. 肝胰腺, D. 肌肉, E. 血细胞, F. 类淋巴。星号 (*) 表示各个 WSSV 感染的实验组与对照组(0h)比较差异显著(P < 0.05)

A. Gill, B. Intestine, C. Hepatopancreas, D. Muscle, E. Hemocyte, F. Lymphoid. Asterisks denote statistically significant differences between WSSV infection groups and the control (P < 0.05)

图 2 Real-time PCR 分析 WSSV 感染前后 HSP60 和 HSP90 在不同组织中表达量的变化

Fig. 2 Analysis of HSP60 and HSP90 expression in different tissues by quantitative real-time PCR before and after WSSV infection

2.2.4 HSP60 和 HSP90 在肌肉组织中的变化

在肌肉组织中, WSSV 感染后, HSP60 的表达受到很大的影响, 12h 时其含量降至最低, 为对照组的 2%, 24h 时表达量明显回升, 48 和 72h 两个实验组又降至很低, 除了 24h 这一实验组, 其他的实验组与对照组都有显著性差异; HSP90 的变化比较迟缓, 开始至 48h 均无明显变化, 直至 72h 升到最高值, 比对照组升高了 142% (图 2D)。

2.2.5 HSP60 和 HSP90 在血细胞中的变化

在血细胞中, HSP60 和 HSP90 的变化同时起步, 都在 24h 表现出明显的变化, HSP60 此时达到最低值, 为对照组的 8.5%, 随后的两组也显著低于对照组; HSP90 在 24h 显著高于对照组, 并且在 72h 达到最高值, 比对照组升高了 141.5% (图 2E)。

2.2.6 HSP60 和 HSP90 在类淋巴中的变化

在类淋巴中, WSSV 感染后 HSP60 的表达量从 12h 开始就显著升高, 一直到 72h 都显著高于对照组; HSP90 表达量的升高稍迟于 HSP60, 24h 开始显著升高, 并且为最高值, 比对照组升高了 214% (图 2F)。

3 讨论

HSPs 在应激反应中的作用极其重要, 能够维持细胞内必须蛋白质的空间构象, 进而保证细胞的正常生命活动。目前关于三大主要的热休克蛋白家族 (HSP21、HSP70、HSP90) 的研究很广泛, 并且证明 HSP70 在协助初期的多肽链进行折叠以及促进受损的蛋白进行降解的过程中起到重要的作用 (Feder *et al.* 1999)。HSPs 能够被多种胁迫因素诱导表达, 早期的研究表明, 热激能够改变 HSP21、HSP70 和 HSP90 在对虾鳃和肝胰腺中的表达量 (Huang *et al.* 2008)。

本研究之前分别对实验组和对照组的 cDNA 模板进行了普通的 PCR 预实验, 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 目的条带单一。荧光定量 PCR 后, 观察同种基因的熔解曲线, 峰值唯一且基本在同一温度出现, 证明了产物的单一性。实验可以看出, 注射 PBS 组的 HSP60 和 HSP90 在不同组织中的表达量与对照组相比并未出现明显的差异。WSSV 感染对虾后, HSP60 和 HSP90 在不同时刻、不同组织中的表达量明显不同。在鳃和血细胞中, HSP60 的表达量均低于 HSP90 的表达量。在肝胰腺中, HSP60 的表达量均高于 HSP90 的表达量, 其他组织中的变化不规律。在肝胰腺中, HSP60 和 HSP90 表达量都在感染后的 12 h 达最高, 分别比对照组高出 19 倍和 16 倍。相比之下, 在被监控的时间段的其他组织中, HSP60 和 HSP90 即使有一定量的提高, 但是幅度相对较小。这可能与肝胰腺的重要作用有关, 据报道肝胰腺是甲壳纲动物的一个主要器官, 其在消化、吸收和分泌中起到重要作用 (Brunet *et al.* 1994)。

研究表明, WSSV 感染不同时段的对虾腹足中的 HSP21 的含量逐渐减少 (Huang *et al.* 2008), 而对虾血细胞中的 HSP70 的含量表现出先急剧升高再下降的趋势 (Xu *et al.* 2009)。本研究表明, WSSV 感染影响 HSP60 和 HSP90 的表达, 在所监控的时间段中, 对虾自身对于 HSP60 和 HSP90 的调节也有差异。对于 HSP60 的表达的调节在不同的组织中的变化情况也是不同的。在鳃、肠、肌肉、血细胞中, WSSV 感染后, HSP60 的表达受到了一定的抑制作用, 而在肝胰腺和类淋巴中, 其表达量明显提高。HSP60 的不同变化表明, 其在不同的组织中可能扮演着不同的角色。而 WSSV 感染后, HSP90 在不同组织中的表达量都有一个明显的上调阶段, 但上调的时间和程度并不一致, 推测这可能与其在机体的不同作用有关。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 是很多细胞部件的组成成份, 与细胞内蛋白激酶受体、转录因子等多种信号的转导过程有关 (Xu *et al.* 2002)。本研究为 HSP60 和 HSP90 在 WSSV 感染过程中的作用提供了基础数据。HSPs 与病原感染密切相关, 细菌感染对虾后影响 HSPs 的变化 (Jira *et al.* 2006), 病毒感染导致 HSPs 变化与病毒种类及感染细胞相关 (La *et al.* 1988)。本研究也表明, 基于 WSSV 感染的影响, 对虾自身调节了 HSP60 和 HSP90 表达量的变化, 可能是充当分子伴侣的角色去修复一些受损的蛋白或者有可能扮演信号分子的角色去启动、调节对虾体内的先天性免疫反应。

参 考 文 献

- 龚兴国,于 红. 2003. HSP60 的功能. 生物化学与生物物理进展,30(4):649
- 王宇萍,蒋建东. 2010. 热休克蛋白 70 的结构和功能. 中国细胞生物学学报, 32(2):305-313
- Barbe MF, Tytell M, Gower DJ, Welch WJ. 1988. Hyperthermia protects against light damage in the rat retina. *Science* 241(4874):1817-1820
- Brunet M, Arnaud J, Mazza J. 1994. Gut structure and digestive cellular process in marine crustacea. *Oceanogr Mar Biol* 32:335-367
- Feder ME, Hofmann GE. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 61:243-282
- Guttman SD, Glover CV, Allis CD, Gorovsky MA. 1980. Heat shock, deciliation and release from anoxia induce the synthesis of the same set of polypeptides in starved *T. Pyriformis*. *Cell* 22(1):299-307
- Hahn GM, Li GC. 1982. Thermotolerance and heat shock proteins in mammalian cells. *Radiation Research* 92(3):452-457
- Huang PY, Kang ST, Hsu TC and 4 others. 2008. Identification of the small heat shock protein, HSP21, of shrimp *Penaeus monodon* and the gene expression of HSP21 is inactivated after white spot syndrome virus (WSSV) infection. *Fish & Shellfish Immunology* 25:250-257
- Jira P, Lee BL, Soderhall K. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 211(4):213-236
- La NB, Latchman DS. 1988. A cellular protein related to heat-shock protein 90 accumulates during herpes simplex virus infection and is overexpressed in transformed cells. *Exp Cell Res* 178:169-179
- Nover L, Scharf KD. 1997. Heat stress proteins and transcription factors. *Cell Mol Life Science* 53:80-103
- Xu H, Yan F, Deng XB and 5 others. 2009. The interaction of white spot syndrome virus envelope protein VP28 with shrimp Hsp70 is specific and ATP-dependent. *Fish & Shellfish Immunology* 26:414-421
- Xu W, Mimnaugh EG, Kim JS and 2 others. 2002. Hsp90, not Grp94, regulates the intracellular trafficking and stability of nascent ErbB2. *Cell Stress Chaperones* 7(1): 91-96