

高温胁迫对近江牡蛎 *Hsp90* 表达及 CpG 甲基化的影响^{*}

王翠丽^{1,2}

(1. 南宁师范大学地理与海洋研究院, 广西南宁 530000; 2. 南宁师范大学, 北部湾环境演变与资源利用教育部重点实验室, 广西南宁 530000)

摘要:为了丰富广温性潮间带底栖生物的温度调控机制研究,本研究采用荧光定量 PCR 法、亚硫酸氢盐处理基因组 DNA 结合甲基化特异性 PCR (Methylation specific PCR, MSP) 法及染色质免疫共沉淀法,对 40℃ 热胁迫 24 h 后,近江牡蛎 (*Crassostrea rivularis*) 热休克蛋白 90 (Heat shock protein 90, *Hsp90*) 的 mRNA 表达及其核心启动子甲基化的调控模式进行研究。结果显示:近江牡蛎成贝在 40℃ 热胁迫 24 h 后,其消化腺、腮和心脏组织中 *Hsp90* mRNA 表达显著升高 ($P < 0.05$),核心启动子区 CpG 平均甲基化水平显著降低 ($P < 0.05$),其中邻近热休克元件 (Heat shock element, HSE) 的 CpG2、CpG3、CpG4 位点甲基化水平显著降低 ($P < 0.05$),CpG5 位点甲基化水平无显著变化 ($P > 0.05$),灰度分析显示消化腺和心脏组织中的 *Hsp90* 核心启动子与 RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II) 结合增强,腮组织中的 *Hsp90* 核心启动子与 RNA polymerase II 出现弱结合。表明 *Hsp90* 是近江牡蛎抵御高温胁迫的主要表达基因。

关键词:高温胁迫 近江牡蛎 热休克蛋白 90 核心启动子 甲基化

中图分类号: S827 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2019)04-0424-06

0 引言

近江牡蛎 (*Crassostrea rivularis*) 属于动物界 (Animalia)、软体动物门 (Mollusca)、瓣鳃纲 (Lamellibranchia)、翼形亚纲 (Pteriomorphia)、牡蛎目 (Osteroidea)、牡蛎科 (Ostreidae), 广温性潮间带底栖生物^[1-2]。有研究表明,近江牡蛎热胁迫后,热休克蛋白 90 (Heat shock protein 90, *Hsp90*) 的 mRNA 表达显著升高,可促进受损蛋白复性^[3-4],但目前还未见关于这一调控机制的相关研究报道。DNA 甲基化作为

一种表观遗传的重要形式,可以对内源及外界环境变化做出反应,因此,通过甲基化修饰 (DNA 甲基化和去甲基化) 调控基因表达,被认为在生物适应性中扮演重要角色^[5-6]。为揭示高温胁迫对近江牡蛎 *Hsp90* mRNA 表达及核心启动子 CpG 甲基化的影响,本研究以近江牡蛎成贝为实验对象,明确 *Hsp90* mRNA 在成贝中的组织分布,以及在高温胁迫条件下, *Hsp90* mRNA 组织表达、核心启动子 CpG 平均甲基化率、核心启动子各 CpG 位点甲基化率及与核心启动子 RNA polymerase II 结合等情况。该实验

^{*} 广西自然科学基金青年基金项目 (2018GXNSFBA281137), 北部湾环境演变与资源利用教育部重点实验室、广西地表过程与智能模拟重点实验室 (南宁师范大学) 联合开放基金项目 (GTEU-KLOP-X1702) 资助。

【作者简介】

王翠丽 (1982—), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事贝类病害防治, E-mail: djlwcl@163.com。

【引用本文】

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20190808.008

王翠丽. 高温胁迫对近江牡蛎 *Hsp90* 表达及 CpG 甲基化的影响 [J]. 广西科学, 2019, 26(4): 424-429.

WANG C L. Influence of high temperature stress on *Hsp90* expression and CpG methylation in *Crassostrea rivularis* [J]. Guangxi Sciences, 2019, 26(4): 424-429.

结果可丰富广温性潮间带底栖生物的温度调控机制研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

近江牡蛎(约2年龄)成贝样品采集于广西钦州湾茅尾海地区的两个养殖区(21°43'0" N, 108°35'8" E 和 21°39'21" N, 108°51'58" E), 养殖条件如下: 温度 31.5℃ 和 31.7℃, 盐度 17.7‰ 和 17.9‰, pH 值分别为 7.72 和 7.81, 电导率分别为 28.86 $\mu\text{s}/\text{cm}$ 和 29.17 $\mu\text{s}/\text{cm}$, 样品采集后放入采集箱中, 立即送回实验室处理。

1.1.2 主要试剂

RNAzol 试剂, 购自 MRC 公司; SYBR[®] Select Master Mix 试剂盒, 购自 ABI 公司; QIA quick Gel Extraction 试剂盒, 购自 QIAGEN 公司; rTaq E、10×PCR Buffer、2.5 mmol/L dNTP、DNA Marker 2000、基因组 DNA 提取试剂盒和克隆载体 PMD19-T Vectors, 购自 TaKaRa 公司; DH5 α 感受态细胞和 X-gal, 购自北京全式金公司; DNA MethylationTM kit, 购自 EZ Research 公司; EZ CHIP assay kit, 购自 Millipore 公司; 引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.1.3 主要仪器

电泳仪(型号为 Powerpac HV 164-5056), 购自 Bio-Rad 公司; 超微量紫外分光光度计(型号为 NanoDrop-1000), 购自 NanoDrop 公司; 全自动凝胶成像系统(型号为 Syngene Genius), 购自 Syngene 公司; 低温恒温槽(型号为 DC-1006), 购自无锡沃信仪器有限公司; 梯度热循环仪(型号为 T100), 购自 Bio-Rad 公司; 荧光定量 PCR 仪(型号为 7500FAST), 购自 ABI 公司; 高速离心机(型号为 5810R)、离心机(型号

为 mini spin plus), 购自 Eppendorf 公司; 紫外分光光度计(型号为 Cary 50), 购自 Varian 公司; 生物安全柜(型号为 HF Safe 760S), 购自 Heal Force 公司; 电热恒温鼓风干燥箱(型号为 DHG-9070A), 购自上海精宏设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 近江牡蛎 *Hsp90* 核心启动子序列分析

依据 GenBank 数据库中已登录的近江牡蛎 *Hsp90* 序列(登录号: HQ450642), 利用在线生物信息学软件和 Meth Primer 软件分析近江牡蛎 *Hsp90* 启动子序列并设计 MSP 引物。

1.2.2 近江牡蛎热胁迫

1.1.1 节实验动物采集后, 成贝放入 28℃、盐度 18.0‰、pH 值为 7.70 的水环境中驯养一周, 每天换水一次(换水量约达总体积的一半), 上午和下午各投喂适量扁藻; 驯养一周后, 将实验组水温升高至 40℃, 其余条件保持不变, 对照组所有条件均保持不变, 热胁迫 24 h; 取实验组和对照组各 12 只成贝进行解剖, 取其消化腺、腮、唇瓣、外套膜、肌肉柱和心脏组织于液氮速冻后 -80℃ 保存, 用于后续实验分析。

1.2.3 荧光定量 PCR 及数据分析

运用 RNAzol 法提取 1.2.2 节中成贝消化腺、腮、唇瓣、外套膜、肌肉柱和心脏组织样品中的总 RNA, 取 1.0 μg 总 RNA 进行反转录制备 cDNA 模板。根据 GenBank 已登录序列设计 *Hsp90*(登录号: HQ450642) 和 β -actin(登录号: AF026063) qPCR 引物(表 1), 在 7500 FAST real-time PCR 检测系统(Applied Bio systems)进行荧光定量分析, 以 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算结果。

1.2.4 MSP 及数据分析

运用 TaKaRa 基因组 DNA 提取试剂盒提取 1.2.2 节中成贝消化腺、腮、唇瓣、外套膜、肌肉柱和

表 1 近江牡蛎热休克蛋白 90 引物

Table 1 Primers for heat shock protein 90 in *C. rivularis*

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	产物长度 Product length (bp)
<i>Hsp90</i> qPCR	Forward: 5'-AAAAGGCAGAGGCAGACAAA-3' Reverse: 5'-ACGGGTTCTGTGTTTCTGG-3'	187
β -actin qPCR	Forward: 5'-CTGTGCTACGTTGCCCTGGACTT-3' Reverse: 5'-TGGGCACCTGAATCGCTCGTT-3'	129
<i>Hsp90</i> MSP	Forward: 5'-TTTTTCGTAAAAATTTATAGGAACGA-3' Reverse: 5'-TACATCAACCATTAATAAACCCGA-3'	149
<i>Hsp90</i> ChIP PCR	Forward: 5'-TATCATTTTTCCCTCGTAAAA-3' Reverse: 5'-TCAATACACATCCCAAAATAG-3'	202

心脏组织的基因组 DNA, 再依据 DNA Methylation™ kit 试剂盒说明书将每个组织样品的 0.5 μ g 基因组 DNA 进行亚硫酸氢盐处理, 制备 MSP 模板。根据 GenBank 已登录序列设计 *Hsp90* (登录号: HQ450642) MSP 引物(表 1)。MSP 实验中每个组织样品, 平行测序一次, 计算核心启动子 CpG 平均甲基化率(%)及各 CpG 位点甲基化率(%)。

1.2.5 染色质免疫共沉淀实验

依据 EZ ChIP assay kit 试剂盒说明书进行: 取 1.2.2 节中成贝消化腺、腮、唇瓣、外套膜、肌肉柱和心脏组织各 0.1 g, 在含有 1 μ g/mL 蛋白酶抑制剂 cocktail II 的 400 μ L PBS 缓冲液中充分消化, 消化后的组织加入 1 mL SDS Lysis 缓冲液裂解, 运用微尖超声破碎仪将基因组破碎为 0.2~0.8 kb 长度的小片段, 再将 2 μ g 的特异性 RNA 聚合酶 II 抗体加入破碎小片段中 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育, 孵育结束后, 以此为模板, 根据 GenBank 已登录序列设计 *Hsp90* (登录号: HQ450642) ChIP 引物(表 1), 进行 ChIP PCR 实验, PCR 产物进行 3% 琼脂糖凝胶检测及灰度分析。

2 结果与分析

2.1 近江牡蛎 *Hsp90* 核心启动子序列

近江牡蛎 *Hsp90* 核心启动子含有 1 个 CpG 岛、1 个 HSE、1 个 TATA box 元件, CpG 岛含有 7 个 CpG 位点(图 1), 其中 CpG1、CpG6 和 CpG7 位于 MSP 引物中(图 1), 所研究的 4 个 CpG 位点从 CpG2 到 CpG5 位置信息为 -125, -84, -74, -64(表 1)。

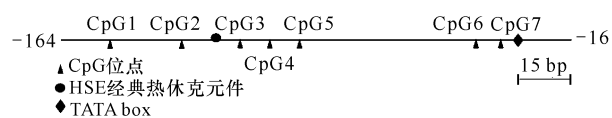


图 1 近江牡蛎 *Hsp90* 核心启动子序列

Fig. 1 The core promoter sequence of *C. rivularis Hsp90*

2.2 近江牡蛎 *Hsp90* mRNA 表达及核心启动子 CpG 平均甲基化率

Hsp90 基因在近江牡蛎消化腺、腮、唇瓣、外套膜、肌肉柱和心脏组织中均有表达(图 2a); 与对照组比较, 热胁迫 24 h 后实验组消化腺、腮和心脏组织中

Hsp90 mRNA 表达升高, 差异显著($P < 0.05$)(图 2a), *Hsp90* 核心启动子 CpG 平均甲基化率降低, 差异显著($P < 0.05$)(图 2b)。

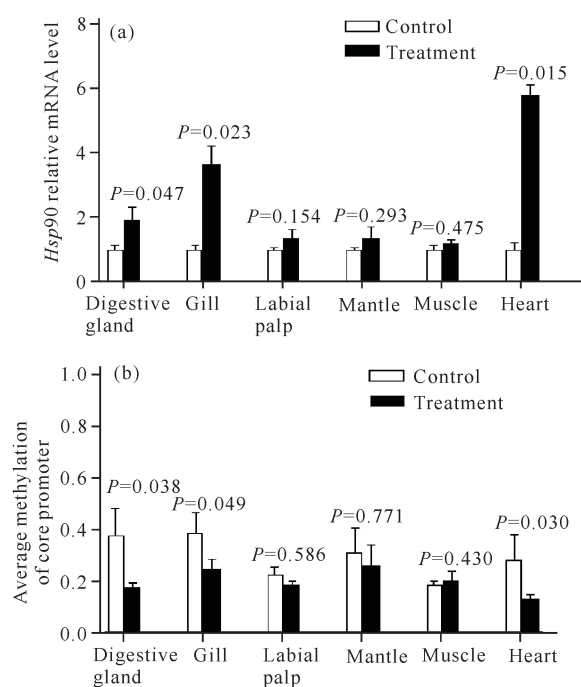


图 2 热胁迫 24 h 前后 *Hsp90* mRNA 相对表达及核心启动子平均甲基化率变化

Fig. 2 The *Hsp90* mRNA expression and core promoter methylation levels of *C. rivularis* before and after treatment by high temperature stress for 24 h

2.3 近江牡蛎 *Hsp90* mRNA 核心启动子各 CpG 位点平均甲基化率

热胁迫后, 与对照组比较, 实验组腮组织的 CpG2 平均甲基化率显著降低($P < 0.05$)(图 3a); 实验组消化腺组织和腮组织的 CpG3 平均甲基化率显著降低($P < 0.05$)(图 3b); 实验组心脏组织的 CpG4 平均甲基化率显著降低($P < 0.05$)(图 3c), 而较远距离的 CpG5 位点甲基化水平无显著变化(图 3d)。

2.4 染色质免疫共沉淀实验

热胁迫后, 灰度分析显示, 与对照组比较, 实验组消化腺和心脏组织 *Hsp90* 核心启动子与 RNA polymerase II 结合增强, 腮出现弱结合现象(图 4)。

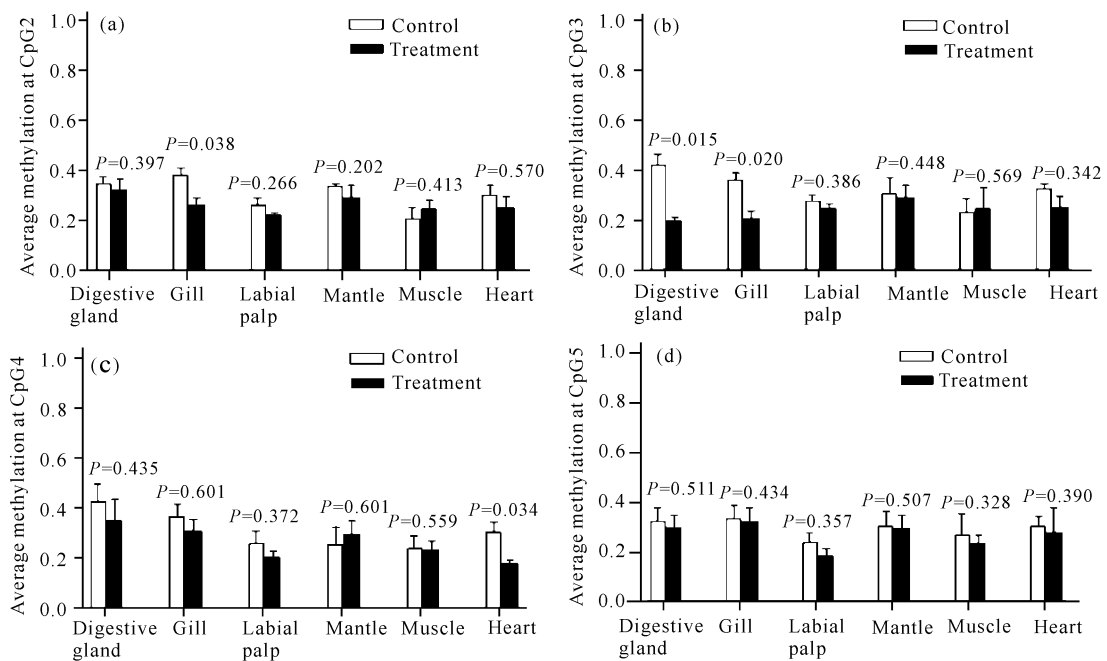


图3 热胁迫前后 *Hsp90* 核心启动子 CpG 位点甲基化

Fig. 3 The *Hsp90* CpGs methylation levels of *C. rivularis* before and after treatment by high temperature stress for 24 h

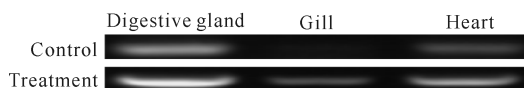


图4 热胁迫前后 *Hsp90* 核心启动子与 RNA polymerase II 结合

Fig. 4 Binding status of RNA polymerase II to *Hsp90* promoter in *C. rivularis* before and after treatment by high temperature stress for 24 h

3 讨论

荧光定量 PCR 结果显示:在非胁迫状态下, *Hsp90* mRNA 在近江牡蛎消化腺、腮、唇瓣、外套膜、肌肉柱和心脏组织中均有表达;热胁迫(40°C, 24 h)后,与对照组比较,实验组消化腺、腮和心脏组织中 *Hsp90* mRNA 相对表达都出现了显著性升高(图 2a),这一结果与陈晨^[3]在近江牡蛎中的热胁迫实验结果一致,也与 Farcy 等^[7]在欧洲鲍螺(*Haliotis tuberculata*)中所得结果较一致,表明 *Hsp90* mRNA 在短时间内极显著增加,是热胁迫中的机体应激调节现象,高热产生的 *Hsp90* 可增强细胞对下一次损伤的耐受,维持细胞的正常代谢,提高生存率^[8],但是这仅仅是几种特例还是普遍现象,需在多种物种中做进一步研究。

根据 GenBank 已登录近江牡蛎 *Hsp90* 序列(登

录号:HQ450642),分析其 5'端调控区的核心启动子,其含有 1 个 CpG 岛(-164~-16),1 个 HSE、1 个 TATA box(图 1)。利用亚硫酸氢盐处理基因组 DNA 结合 MSP 法,比较热胁迫前后 *Hsp90* 核心启动子 CpG 平均甲基化率,结果显示:与对照组比较,实验组消化腺、腮和心脏组织中核心启动子区 CpG 平均甲基化率降低,差异显著($P < 0.05$)(图 2b),表明甲基化可能参与调控 *Hsp90* 在热胁迫后的基因表达,从而提高近江牡蛎对热胁迫环境的适应性。以往在植物中的研究已经证明,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[9]、玉米(*Zea mays*)^[10]、蒲公英(*Taraxacum mongolicum*)^[11]和水稻(*Oryza glaberrima*)^[12]均可因被环境条件所胁迫从而修饰基因组 DNA 甲基化水平,调控环境胁迫下的基因表达,提高植物对环境的适应性^[13-16]。与植物相比,在水产动物皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)的研究中也显示,在环境因子胁迫下,基因组 DAN 甲基化模式的改变可启动胁迫响应机制,通过调控相关抗逆基因的表达,促使表型性状发生变异,增强皱纹盘鲍对不良环境的适应能力^[17]。

比较热胁迫前后 *Hsp90* 核心启动子各 CpG 位点平均甲基化率,与对照组比较,实验组腮组织的 CpG2 平均甲基化率显著降低;实验组消化腺组织和腮组织的 CpG3 平均甲基化率显著降低;实验组心脏

组织的 CpG4 平均甲基化率显著降低;而较远距离的 CpG5 位点甲基化水平无显著变化。HSE 是位于 *Hsp90* 基因 5' 端上游的一段特殊重复排列序列,热休克时,HSE 可增加对热休克因子(Heat shock factor, HSF)的结合,是 *Hsp90* 热休克反应中的重要元件^[18],推测去甲基的发生可降低 HSE 与 HSF 结合的空间位阻,从而更有利于 *Hsp90* 转录发生。

染色质免疫共沉淀实验结果显示,热胁迫后,与对照组比较,实验组消化腺和心脏组织 *Hsp90* 核心启动子与 RNA polymerase II 结合显著增强,而腮也出现弱结合现象(图 4)。这一实验结果证实了 MSP 实验的结果,邻近 HSE 的 CpG2、CpG3 和 CpG4 位点甲基化水平显著降低,可提高 *Hsp90* 核心启动子与 RNA polymerase II 结合强度,从而增加在热胁迫后 *Hsp90* mRNA 表达。

4 结论

Hsp90 是近江牡蛎抵御高温胁迫的主要表达基因,核心启动子甲基化模式参与调控 *Hsp90* 在热胁迫后的 mRNA 表达,从而提高近江牡蛎对热胁迫环境的适应性。

参考文献

- [1] 冯士笪,李凤岐,李少菁. 海洋科学导论[M]. 北京:高等教育出版社,1999:280-313.
- [2] 王如才,王昭萍. 海水贝类养殖学[M]. 青岛:中国海洋大学出版社,2008:72-94.
- [3] 陈晨. 近江牡蛎 HSP90 基因及其对理化胁迫和病原菌感染的反应[D]. 广州:暨南大学,2011.
- [4] NATHAN D F, VOS M H, LINDQUIST S. In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* *Hsp90* chaperone [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997, 94(24): 12949-12956.
- [5] ELANGO N, HUNT B G, GOODISMAN M A, et al. DNA methylation is widespread and associated with differential gene expression in castes of the honeybee, *Apis mellifera* [J]. Proceeding of the National Academy of Sciences, 2009, 106(27): 11206-11211.
- [6] BIRD A P, TAGGART M H. Variable patterns of total DNA and rDNA methylation in animals [J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8(7): 1485-1497.
- [7] FARCY E, SERPENTINI A, FIEVET B, et al. Identification of cDNA encoding *Hsp70* and *Hsp90* in the abalone *Haliotis tuberculata*: Transcriptional induction in response to thermal stress in hemocyte primary culture [J]. Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 146(4): 540-550.
- [8] RIABOWOL K T, MIZZEN L A, WELCH W J. Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibiotics against *Hsp70* [J]. Science, 1998, 242(4877): 433-436.
- [9] KAKUTANI T, MUNAKATA K, RICHARDS E J, et al. Meiotically and mitotically stable inheritance of DNA hypomethylation induced by *ddm1* mutation of *Arabidopsis thaliana* [J]. Genetics, 1999, 151(2): 831-838.
- [10] STEWARD N, ITO M, YAMAGUCHI Y, et al. Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(40): 37741-37746.
- [11] VERHOEVEN K J, JANSEN J J, VAN DIJK P J. Stress-induced DNA methylation changes and their heritability in asexual dandelions [J]. The New Phytologist, 2010, 185(4): 1108-1118.
- [12] KOU H P, LI Y, SONG X, et al. Heritable alteration in DNA methylation induced by nitrogen-deficiency stress accompanies enhanced tolerance by progenies to the stress in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Journal of Plant Physiology, 2011, 168(14): 1685-1693.
- [13] CÁCERES-PUIG J I, ABASOLO-PACHECO F, MAZON-SUASTEGUI J M, et al. Effect of temperature on growth and survival of *Crassostrea corteziensis* spat during late-nursery culturing at the hatchery [J]. Aquaculture, 2007, 272(1/2/3/4): 417-422.
- [14] WADA Y, MIYAMOTO T, KUSANO T, et al. Association between up-regulation of stress-responsive genes and hypomethylation of genomic DNA in tobacco plants [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2004, 271(6): 658-666.
- [15] ROMO Z M, RE A D, DÍAZ F, et al. Physiological responses of pink abalone *Haliotis corrugata* (Gray, 1828) exposed to different combinations of temperature and salinity [J]. Aquaculture Research, 2010, 41(7): 953-960.
- [16] ROBERTS S B, GAVERY M R. Is there a relationship between DNA methylation and phenotypic plasticity in invertebrates? [J]. Frontiers in Physiology, 2011, 2: 116.
- [17] 孔宁. 温度、盐度对皱纹盘鲍“97”选群生长发育的影响[D]. 北京:中国科学院大学, 2016.
- [18] BONNER J J, BALLOU C, FACKENTHAL D L. In-

teractions between DNA-bound trimers of the yeast
heat shock factor [J]. *Molecular and Cellular Biology*,

1994, 14(1):501-508.

Influence of High Temperature Stress on *Hsp90* Expression and CpG Methylation in *Crassostrea rivularis*

WANG Cuili^{1,2}

(1. Institute of Geography and Oceanography, Nanning Normal University, Nanning, Guangxi, 530000, China; 2. Key Laboratory of Environment Change and Resources Use in Beibu Gulf, Nanning Normal University, Nanning, Guangxi, 530000, China)

Abstract: In order to enrich the temperature regulation mechanism of benthic organisms in the eurythermic intertidal zone, using methods of qPCR, bisulfite treated genomic DNA combined with methylation specific PCR (MSP) and chromatin immunoprecipitation, the influence of high temperature stress on *Hsp90* expression and CpG methylation in *Crassostrea rivularis* were studied after 24 h heat stress at 40°C. Results showed that after 24 h of heat shock at 40°C, compared to the control group, the expression level of *Hsp90* was significantly increased ($P < 0.05$), the average methylation level of core promoter region CpG was significantly decreased ($P < 0.05$), especially the methylation levels of CpG2, CpG3 and CpG4 sites were significantly decreased ($P < 0.05$), which were adjacent to heat shock element (HSE), there was no significant change at methylation level of CpG5 site ($P > 0.05$). Grayscale analysis showed that the binding of *Hsp90* core promoter to RNA polymerase II was enhanced in digestive gland and heart tissues, and the *Hsp90* core promoter in the sputum tissue was weakly bound to RNA polymerase II. It indicates that *Hsp90* is the main expression gene of *C. rivularis* against high temperature stress.

Key words: high temperature stress, *Crassostrea rivularis*, heat shock protein 90, core promoter, methylation

责任编辑: 陆雁



微信公众号投稿更便捷

联系电话: 0771-2503923

邮箱: gxxk@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxxk.ijournal.cn/gxxk/ch>