

# 腾冲嗜热厌氧菌热休克蛋白 60 及其基因表达的热激动态变化分析

孟 博<sup>1</sup>, 王敬强<sup>1</sup>, 李 娜<sup>1</sup>, 马延和<sup>2</sup>, 刘斯奇<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院北京基因组研究所 北京 101318)

(<sup>2</sup> 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 热休克蛋白 60 (HSP60) 是细菌体内一种非常重要的分子伴侣, 其可以协助蛋白质或肽链的正确折叠和构型, 防止变性和降解。基于本实验室的早期观察, 腾冲嗜热厌氧菌的 HSP60 是一个典型的温度相关蛋白质, 在 80℃ 的表达水平最高。为了进一步了解嗜热菌应急的分子机制, 继续进行了在热激后 HSP60 基因表达的动态研究。将最适温度(75℃)下培养的腾冲嗜热厌氧菌迅速地转移至 80℃ 继续培养, 然后在不同的时间点上分别取样, 并通过双向电泳、Western blot 和 Real-time PCR 等方法, 分析了 HSP60 在 mRNA 和蛋白质水平上的表达量的改变。试验结果表明, 在 80℃ 热处理 4h 内的短期应急过程中, HSP60 蛋白水平一直呈上升趋势, 而它的 mRNA 水平则表现为先升高后下降的一个非对称性的峰形变化。HSP60 的 mRNA 和蛋白质的对温度的应答快慢程度是不同的。HSP60 的 mRNA 水平的显著变化在 1h 内便可观察到, 而蛋白质水平的显著改变要延迟 3h 左右。此外, HSP60 的 mRNA 和蛋白质对温度的应答量变大小也是不同的。

**关键词** 热休克蛋白 60 热激动态变化 腾冲嗜热厌氧菌 嗜热菌

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)02-0269-06

古细菌的生活环境相对来说比较接近原始地球的环境, 它们可能是地球上最原始的生物的直接后代。正因如此, 目前发现和研究的较多的极端环境细菌都是古细菌类。而真细菌在很多分子生物学和细胞生物学性状上与古细菌相差甚远, 它们却拥有不少进化性状。但是真细菌的嗜热菌的数目远少于古细菌。腾冲嗜热厌氧菌 (*Thermoanaerobacter tengcongensis*) 是我国科学家在云南腾冲地区发现的一种嗜热真细菌<sup>[1]</sup>。它的生长温度范围为 50℃ ~ 80℃, 能够利用葡萄糖和乳糖等为碳源。重要的是, 该菌的基因组已经被解析<sup>[2]</sup>, 而且它在最适条件下的蛋白质表达谱的测定也已完成<sup>[3]</sup>。这样, 腾冲嗜热厌氧菌显然是一个较为理想的研究嗜热机理的真细菌模型。

热休克蛋白质 60 (HSP60) 是生物体内广泛存在而且丰度较高的一种蛋白质。在原核细胞中, HSP60 (又名 GroEL) 是一个蛋白亚基的多聚物, 结合 7 个 ATP 分子形成了它的功能复合物。GroEL 和 GroES (HSP10) 协同形成的复合体属于细菌 I 型分子伴侣系统<sup>[4]</sup>, 起着帮助新合成的蛋白质或多肽的正

确折叠, 防止蛋白变性的作用<sup>[5,6]</sup>。一般认为, 在热诱导的情况下, HSP60 基因转录和翻译的活性都会被激活, 以避免细胞可能受到的热损伤。在胃幽门螺旋杆菌中, 当温度升高至 43℃ 时, *groEL* 基因在转录水平上表现出明显的热诱导特性<sup>[7]</sup>。在嗜热古细菌 *Pyrococcus furiosus* 中, 热激使得 HSP60 的表达量上调了 4.0 倍<sup>[8]</sup>。然而, 对 HSP60 在应急过程中的分子机制还了解甚少。从理论推断而言, 细菌的应急反应必须在相当短的时间内启动, 才能够有效地自我保护。因此, 研究分子伴侣系统在热激之后的基因表达的动态过程, 可能为深入了解嗜热菌的应急分子机制提供新的思路。

将腾冲嗜热厌氧菌在 55℃、75℃ 和 80℃ 3 个不同温度下培养, 再进行蛋白质组分析。我们观察到, 总的蛋白质表达水平随温度升高而有所下降。但是少数几个蛋白质的表达与温度呈密切相关性。其中 HSP60 是一个典型的温度正相关蛋白质, 腾冲嗜热厌氧菌在 80℃ 培养了 72h 后, 它的 HSP60 的相对浓度几乎是 55℃ 的 4.5 倍, 是 75℃ 的 1.5 倍<sup>[9]</sup>。这一事实清晰地表明, 腾冲嗜热厌氧菌的 HSP60 是

基金项目: 国家 973 项目 (2004CB719605)

\* 通讯作者。Tel 86-10-80485325; Fax 86-10-80485324; E-mail: siqiliu@genomics.org.cn

作者简介: 孟 博 (1981 - ) 女, 河南省三门峡市人, 博士研究生, 主要从事极端微生物腾冲嗜热菌热休克蛋白质的相关研究。E-mail: mengb@genomics.org.cn

收稿日期: 2005-09-22; 接受日期: 2005-10-19; 修回日期: 2005-12-21

维持细胞正常生理活动的一个重要蛋白质,同时,也引发了我们一系列的思考:HSP60的基因表达是如何适应于温度改变的?这个适应的过程究竟是快速的还是缓慢的?这个过程中HSP60的mRNA和蛋白质水平的变化趋势又如何?这些问题需要通过研究做出明确地回答。基于这些问题,本研究着重探讨HSP60蛋白在热激后基因表达的动态行为。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:**腾冲嗜热厌氧菌 MB4<sup>T</sup> 由中国科学院微生物研究所提供。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**本实验中所使用到的IPG胶条和2-DE电泳设备均为Amersham Biosciences的产品。所用到的化学试剂有Invitrogen公司的产品。Real-time PCR仪器为ABI 7300/7500。

### 1.2 腾冲嗜热厌氧菌的培养

采用改良的MB培养基培养腾冲嗜热厌氧菌 MB4<sup>T</sup> [11]。在75℃下,首先少量接种,当菌生长到对数期后(扩培后约18~20h),迅速转移至80℃继续培养,并分别于0、0.5、1、2和4h收集菌体。菌体经离心后,置于-80℃保存备用。

### 1.3 蛋白抽提

采用TCA-丙酮沉淀法制备蛋白质<sup>[9]</sup>,然后利用Bradford法测定蛋白质的浓度。

### 1.4 双向电泳(2-DE)

选用pH4~7的IPG胶条(线性、13cm),胶条泡涨后,蛋白质上样量为650μg/gel。等电聚焦的参数为表面温度20℃,无电压4h,50V恒定电压电泳8h,500V、1000V和8000V线性梯度电压电泳各1h,再以8000V恒定电压电泳至总伏小时数达到55000。聚焦结束后,将聚焦的胶条进行两步平衡,转移至12%的SDS-聚丙烯酰胺凝胶(26cm×20cm)上。第二相电泳在Ettan DALT Twelve系统中进行。分离的蛋白质用考马斯亮兰显色。为保证结果的可信性,每个样品平行两次电泳。

### 1.5 胶图分析

用Image Master 2D Platinum进行分析2-DE胶图。首先采用平行胶制作合成胶,然后将不同的样品的合成胶进行比较,并分析各蛋白质点的spot volume的变化,寻找差异点。

### 1.6 蛋白鉴定

将差异点从胶上切下后,用胰蛋白酶进行胶内消化,然后使用MALDI-TOF MS和LC-MS/MS相结合

的方法鉴定蛋白质。

### 1.7 HSP60抗体的制备

原核表达腾冲嗜热厌氧菌的HSP60基因,并纯化重组蛋白,获得浓度高于0.4mg/mL的抗原,共注射兔子4次。第一次注射量为0.3mg,以后每次注射的抗原量减半,每两次注射时间间隔3周,取血液得到抗血清,再用protein A琼脂糖进行纯化,得到抗体。

### 1.8 Western blot

提取的腾冲嗜热厌氧菌的蛋白质用12%的SDS-PAGE分离,然后电转移到PVDF膜上,用1:2000稀释的腾冲嗜热厌氧菌的HSP60多克隆抗体为一抗,和碱性磷酸酶标记的羊抗兔抗体作为二抗(Santa Cruz Biotechnology)。NBT和BCIP为显色剂。具体使用参照产品说明书。

### 1.9 腾冲嗜热厌氧菌总RNA的提取以及cDNA的反转录合成

采用TRIzol试剂(Invitrogen)提取腾冲嗜热厌氧菌的总RNA。将提取的总RNA定量测定之后,用SuperScript II试剂(Invitrogen)反转录合成cDNA一链。具体使用参照产品说明书。

### 1.10 Real-time PCR分析

用软件OLIGO 6设计PCR引物,引物序列为:HSP60 Upper:5'-GACAGAAGAAAGGAAATGCTCC-3', Lower:5'-TACCTGCTCCACCTACAATCG-3'; GADPH Upper:5'-GTTGTCTGACCAGGAACTAC-3', Lower:5'-GAAGTAAACGCTGCTATGAAG-3'。PCR体系均用20μL,各反应物的终浓度分别为:模板0.75ng/L,0.15mmol/L dNTP,2.25mmol/L MgCl<sub>2</sub>,0.5pmol/L引物,和0.025U/L Taq酶。使用的荧光染料为sybergreen。反应条件:95℃ 5min,5℃ 10s,60℃ 20s,72℃ 30s,78℃ 30s,40个循环,72℃ 10min。

### 1.11 数据分析

所有实验结果采用统计分析软件SigmaStat(SPSS Inc.)不同温度处理的显著性差异采用t检验。

## 2 结果

### 2.1 2-DE图像分析

根据我们过去的经验,腾冲嗜热厌氧菌的蛋白质制备物中含有一些较难去除的非蛋白质成分,对银染结果会有一定的影响,而HSP60在该菌中的丰度较高,较容易检测。所以,我们选择考氏染色法来鉴定蛋白质。染色后,从胶图上可以很明显的看到,该菌高丰度的可溶性蛋白质主要分布在分子量

25kDa 到 70kDa 和 pI4~6 之间的区域(图 1)。使用 Image Master 2D Platinum 软件进行胶图图像分析,结果表明,两块平行胶的匹配率均在 90% 以上;可检测的染色斑点总数随培养时间延长而分别为  $202 \pm$

$7(0h)$ 、 $207 \pm 1(0.5h)$ 、 $213 \pm 2(1h)$ 、 $215 \pm 2(2h)$ 、 $201 \pm 4(4h)$  和  $181 \pm 2(8h)$  个,这说明 80°C 下,腾冲嗜热菌的蛋白表达水平在 4h 内基本保持稳定。

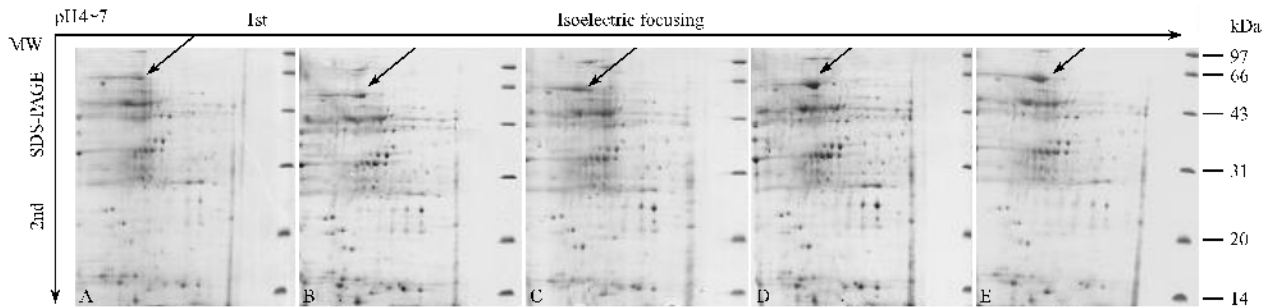


图 1 各个培养时间点的腾冲嗜热菌蛋白质的 2D 胶图

Fig.1 The images of 2DE for the protein extracts from *T. tengcongensis* withdrawn at intervals cultured at 80°C. A 0h; B 0.5h; C 1h; D 2h; E 4h.

## 2.2 HSP60 的蛋白表达差异分析

从图 1 可见,在表观分子量 60kDa 和 pI5 的范围内,有一个染色斑点的集合体随培养时间的延长,其染色的相对密度逐渐上升(图 2)。在培养 4h 后,相对密度较起始点有 3 倍以上的上调。采取多点取样的方法切点并进行胶内消化,再用 MALDI-TOF MS 和 LC-MS/MS 鉴定。结果表明,在 MALDI-TOF MS 的质谱图中有 31 个肽段与 HSP60 的理论预测值相符,序列覆盖率(sequence coverage)达到 63%。在 LC-MS/MS 的质谱图中有 33 个二级质谱图与 HSP60 的理论预测值相符。据此可以肯定,这些染色斑点就是 HSP60。图 3 为一个斑点的典型二级质谱图。值得注意的是,HSP60 在胶图上的表观分子量随培养

时间没有显著改变,但是,它的表观 pI 值变化较大。故而在胶图上表现为在同一分子量下,在较宽的 pH 范围内有一连串的染色斑点(图 2)。这很可能是由于 HSP 的修饰所致。但是究竟何种化学修饰? HSP 修饰蛋白的作用何在? 尚不得而知。

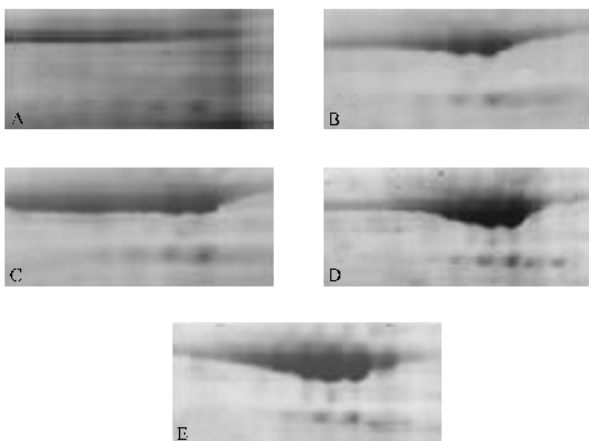


图 2 80°C 下,定量比较 HSP60 蛋白质在不同培养时间点的表达差异

Fig.2 The quantitative comparison of 2-DE spots of HSP60 from the bacterial cells cultured at different time at 80°C. A 0h; B 0.5h; C 1h; D 2h; E 4h.

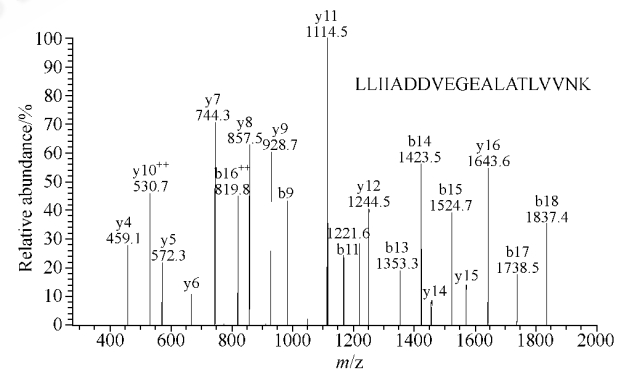


图 3 HSP60 的二级质谱谱图

Fig.3 The spectrum of LC-MS/MS resulted from the peptide of HSP60 eluted at RT = 38.98min. The parent ion 1049.512<sup>+</sup> was selected for MS/MS analysis and the tandem mass spectrum was confirmed the responding amino acid sequence, LLIHADDVEGEALATLVVNK, by analyzing b- and y-ions derived from the peptide ions.

## 2.3 Western blot 检测 HSP60

为了从另一个生物化学的方法检验蛋白质组的分析结果,同时也为了强化 HSP60 定量分析的准确性。我们利用重组的腾冲嗜热厌氧菌的 HSP60 产生多克隆抗体,然后应用该抗体检测 HSP60 在不同培养时间下的蛋白表达量。如图 4 所示,HSP60 抗体的免疫识别强度随着培养时间的延长而逐渐增大,分别为  $7(0h)$ 、 $15(0.5h)$ 、 $17(1h)$ 、 $20(2h)$  和  $24$

(4h) 至培养 4h, 免疫识别相对强度是起始态的 3.4 倍。此结果与 2DE 的分析结果完全一致。

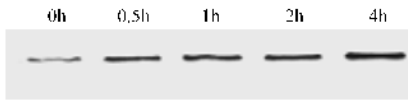


图 4 在 80°C 下, 定量比较 HSP60 蛋白质在不同培养时间上的表达差异 (Western blot 光密度比较)

Fig. 4 The quantitative comparison of HSP60 from the bacterial cells cultured at different time at 80°C using Western blot.

## 2.4 HSP60 mRNA 水平变化分析

HSP60 的 mRNA 水平的动态测定采用定量 PCR 法。为保证实验的重现性, 我们分别制备了两次样品, 并且每个样品作 3 个平行的 PCR 实验。然后取  $C_t$  的平均值作为计算的基础。以 GADPH 为参照基因, 可将不同培养时间点  $\Delta C_t$  值均一化, 计算出不同时期的 HSP60 基因相对于培养 0h 的变化倍数。结果如表 1, 当腾冲嗜热厌氧菌从最适生长温度转移至 80°C 时, HSP60 的 mRNA 表达呈短时间的下调 (在起始后的 30min), 但随之上调, 至峰顶之后又逐渐下降, 在培养 4h 后, HSP60 的 mRNA 的水平仅相当于 75°C 时的 1/4。

表 1 Real-time PCR 结果

Table 1 The result of Real-time PCR

t/h	C <sub>t</sub> (GADPH)	C <sub>t</sub> (HSP60)	$\Delta C_t$	Normalization
0	25.01 ± 0.25	20.1 ± 2.08	4.9 ± 0.24	1.00 ± 0.34
0.5	23.45 ± 0.08	20.2 ± 0.18	3.3 ± 0.1	0.32 ± 0.26
1.0	30.55 ± 0.09	24.2 ± 0.18	6.3 ± 0.1	2.70 ± 0.26
2.0	24.38 ± 0.3	19.3 ± 0.22	5.1 ± 0.22	1.15 ± 0.32
4.0	27.09 ± 0.03	24.3 ± 0.11	2.8 ± 0.07	0.22 ± 0.25

## 2.5 HSP60 蛋白质和 mRNA 水平的变化趋势比较

将 HSP60 的 mRNA 和蛋白质的表达动态数据整合在一起, 我们可以分析出 HSP60 基因在热激过程中应答状态 (图 5)。首先, HSP60 的 mRNA 和蛋白质对温度的应答趋势是不同的。在整个应急的过程中, HSP60 蛋白水平一直呈上升趋势, 而其 mRNA 水平的变化则表现为一个非对称性的峰形结构。意味着在长期高温条件下, HSP60 基因的转录或者是 mRNA 的稳定性可能受到抑制。反之, HSP60 基因的翻译或者是 HSP60 蛋白质的半衰期可能被激活。其次, HSP60 的 mRNA 和蛋白质对温度的应答快慢程度是不同的。由于转录和翻译在时间上前后顺序, 蛋白质表达的应答晚于转录是正常的。在温度从 75°C 突然升高到 80°C 时, HSP60 的 mRNA 水平的显著变化从 1h 就表现出来, 而蛋白水平的改变则是

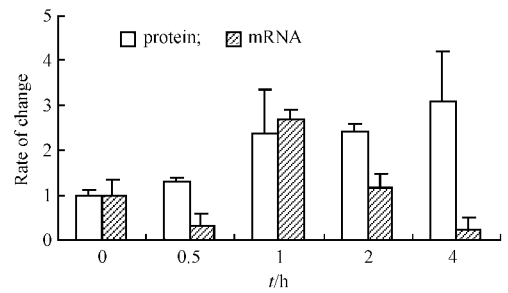


图 5 在热激条件下, 腾冲嗜热厌氧菌 HSP60 和蛋白质的表达动力学数据分析

Fig. 5 The dynamic analysis of the mRNA and protein of HSP60 from *T. tengcongensis* responding to elevated-temperature. The blank bar represents protein, the strip bar represents for mRNA.

在 4h 才有明显表现。最后, HSP60 的 mRNA 和蛋白质的对温度的应答量变大小是不同的。虽然 mRNA 的最大的表达增长约为 3 倍, 但在长期培养过程中, 其 mRNA 浓度总的而言是低于 75°C 的。

## 3 讨论

为了检测腾冲嗜热厌氧菌在热激条件下的应急分子机制, 我们特别关注在一个相对短的时间内, HSP60 的基因表达的动态过程。因为这一过程是细胞自我保护的关键时期。如上所述, 无论在 mRNA 或蛋白质水平上, 热激后 1h 内 HSP60 在腾冲嗜热菌的表达便有显著的增加。不过, 二者在动态曲线, 反应的快慢和反应的程度上均有差别。

热激下 HSP60 在转录水平上的调控多有报道。在藻青菌 *Synechococcus vulcanus* 中, 当温度从 50°C 升高到 63°C 后 15min, GroEL 的 mRNA 迅速上调至最高点, 但是 1h 之后显著地下降<sup>[10]</sup>。在短双歧杆菌 *Bifidobacterium breve* UCC 2003 中, 当温度从 37°C 升至 50°C 后, GroEL 的 mRNA 在 2.5h 内持续上调, 增至原来的 12 倍左右<sup>[11]</sup>。在幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*) 中, 当温度从 37°C 升至 42°C 后, 在 1.5h 内 GroEL 增加了 4 倍多, 但是 2h 后 GroEL 有下降了 20%。这些前期的研究启示, *groEL* 是一个对温度高度敏感的基因, 同时它的调节方式在不同细菌中可能是差别的。目前, GroEL 在大肠杆菌中的调控机制已经相当清楚。在正常生长温度下,  $\sigma^{32}$  因子与热休克蛋白 DnaK 相互作用形成复合物。一旦生活环境的温度升高,  $\sigma^{32}$  因子迅速地跟 DnaK 分开, 与 RNA 聚合酶的核心区发生相互作用, 而形成另一个激活的复合物, 这个复合物对于 GroE 的启动子具有相当强的亲和力, 可以加速 GroEL 和 GroES 的转录<sup>[12-17]</sup>。在腾冲嗜热厌氧菌基因组中存在着

两个  $\sigma^{32}$  因子的基因, TE1755 和 TTE2104<sup>[21]</sup>; 而且在最适生长条件下, 这两个基因也都能表达蛋白质<sup>[3]</sup>。而且在该菌基因组内也存在着与大肠杆菌(*E. coli*)一致的  $\sigma^{32}$  因子结合的 CIRCE 保守区域, 该区域的序列为 TTAGCACTC-N<sub>9</sub>-GAGTGCTAA<sup>[18]</sup>。如前所述, 腾冲嗜热厌氧菌 HSP60 的 mRNA 对热激是相当的敏感的, 1h 内就达到了转录的最高点, 2h 时回归至基础水平。综合上述几个事实, 我们推测, 腾冲嗜热厌氧菌的 HSP60 的转录调控可能与大肠杆菌的机制有相似之处。

既然 HSP60 的转录在温度升高的条件下会出现上调, 那末它翻译水平增加的可能性是比较大的。我们知道, 蛋白质是基因功能的表现形式; 不管 HSP60 的 mRNA 水平变化有多大, 如果没有 HSP60 的蛋白质执行防变性和防降解的功能, 细胞是不可能得到保护的。所以, 了解 HSP60 的转录和翻译之间的动态关系是极其重要的。然而, 目前有关 HSP60 的 mRNA 和蛋白质在应急状态下的对比研究还比较少。Martin 等通过利用 2-DE 方法分析了大豆慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*) 在热刺激下蛋白质组的变化情况发现, 将该菌的培养温度从最适温度提高 5℃ 后, 在短短的 30min 内就监测到有 19 个热休克蛋白表现出明显的随温度而表达量上升或下降, 其中 3 个蛋白被鉴定为 GroEL, 并且有两个 GroEL 都是反应最快且变化最为明显的蛋白质<sup>[19]</sup>。同样, 在乳酸杆菌 *Lactobacillus plantarum* 中, 该菌的 HSP60 蛋白表达在热激后明显改变, 1h 后增加为原来的 2.45 倍<sup>[20]</sup>。在抗辐射的细菌 *Deinococcus radiodurans* 中, 1h 热激促使 GroEL 的表达量明显上调为原来的 5.55 倍<sup>[21]</sup>。这些观察与我们的蛋白质分析结果非常相似。然而, 本文所提交的实验数据的特点在于, 我们从 mRNA 和蛋白质这两个 HSP60 的基因产物的角度, 动态地跟踪了它们在热激条件下变化。一个基本的事实是, 将腾冲嗜热厌氧菌热激到 80℃ 的短短四个小时内, HSP60 的 mRNA 表达呈波动态, 而它的蛋白质表达为持续上升。如何解释呢? HSP60 的 mRNA 在长期的高温下热不稳定性, 以及蛋白降解系统在高温下的失活, 也许可以为这个问题提供一个合理的诠释。

本实验结果中另一个值得关注的现象是, 在热激的起始阶段(约 0.5h 之内), HSP60 的 mRNA 水平呈下降趋势。我们重复了这个实验 3 次以上, 均得到相同的结果, 这意味着这种下调趋势是一种带有某种规律性的状态, 而且尚未见文献中有相关的报

导。如果把这种现象归结于 RNA 聚合酶的热抑制, 它显然无法解释随后的 HSP60 的 mRNA 表达回升。比较可能的是, 热激下整个 HSP60 的转录系统被暂时抑制, 但随着保温时间延长, 转录系统的蛋白质重新组合, 形成另一个活性较强的复合物。探讨 HSP60 的 mRNA 在热激条件下的快速负调节, 将是我们在下阶段将研究的一个重要命题。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Xue Y, Xu Y, Liu Y, et al. *Thermoanaerobacter tengcongensis* sp. nov., a novel anaerobic, saccharolytic, thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Tengcong, China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, **51**: 1335 - 1341.
- [ 2 ] Bao Q, Tian Y, Li W, et al. A complete sequence of the *T. tengcongensis* genome. *Genome Res*, 2002, **12**: 689 - 700.
- [ 3 ] Wang J, Xue Y, Feng X, et al. An analysis of the proteomic profile for *Thermoanaerobacter tengcongensis* under optimal culture conditions. *Proteomics*, 2004, **4**: 136 - 150.
- [ 4 ] Macario AJ, Lange M, Ahring BK, et al. Stress genes and proteins in the archaea. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999, **63**: 923 - 967.
- [ 5 ] Bukau B, Horwich AL. The hsp70 and hsp60 chaperone machines. *Cell*, 1998, **92**: 351 - 366.
- [ 6 ] Feltham JL, Gierasch LM. GroEL-substrate interactions: molding the fold, or folding the mold? *Cell*, 2001, **100**: 193 - 196.
- [ 7 ] Homuth G, Domm S, Kleiner D, et al. Transcriptional analysis of major heat shock genes of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, 2000, **182**: 4257 - 4263.
- [ 8 ] Keith R, Shockley, Donald E, et al. Heat shock response by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 2365 - 2371.
- [ 9 ] Carpentier SC, Witters E, Laukens K, et al. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, 2005, **5**: 2497 - 2507.
- [ 10 ] Roy SK, Nakamoto H. Cloning, characterization, and transcriptional analysis of a gene encoding an  $\alpha$ -crystallin-related, small heat shock protein from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 3997 - 4001.
- [ 11 ] Ventura M, Canchaya C, Zink R, et al. Characterization of the *groEL* and *groES* loci in *Bifidobacterium breve* UCC 2003: genetic, transcriptional, and phylogenetic analyses. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**: 6197 - 6209.
- [ 12 ] Walker DC, Girgis HS, Klaenhammer TR. The *groESL* chaperone operon of *Lactobacillus johnsonii*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 3033 - 3341.
- [ 13 ] Nakahigashi K, Yanagi H, Yura T, et al. DnaK chaperone-mediated control of activity of a sigma(32) homolog (RpoH) plays a major role in the heat shock response of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 2001, **183**: 5307 - 5310.

- [ 14 ] Pirkkala L , Nykanen P , Sistonen L , *et al.* Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J* , 2001 , **15** : 1118 – 1131.
- [ 15 ] Nakahigashi K , Ron EZ , Yanagi H , *et al.* Differential and independent roles of a sigma(32) homolog ( RpoH ) and an HrcA repressor in the heat shock response of *Agrobacterium tumefaciens* . *J Bacteriol* , 1999 , **181** : 7509 – 7515.
- [ 16 ] Wang Y , de Haseth PL. Sigma 32-dependent promoter activity *in vivo* : sequence determinants of the *groE* promoter. *J Bacteriol* , 2003 , **185** : 5800 – 5806.
- [ 17 ] da Silva AC , Simao RC , Susin MF , *et al.* Down regulation of the heat shock response is independent of DnaK and sigma32 levels in *Caulobacter crescentus* . *Mol Microbiol* , 2003 , **49** : 541 – 553.
- [ 18 ] Segal G , Ron EZ. Regulation and organization of *groE* and *dnaK* operons in eubacteria. *FEMS Microbiol Lett* , 1996 , **138** : 1 – 10.
- [ 19 ] unchbach M , Dainese P , Staudenmann W , *et al.* Proteome analysis of heat shock protein expression in *Bradyrhizobium japonicum* . *Eur J Biochem* , 1999 , **264** : 39 – 48.
- [ 20 ] Angelis MD , Cagno RD , Huet C , *et al.* Heat shock response in *Lactobacillus plantarum* . *Appl Environ Microbiol* , 2004 , **70** : 1336 – 1346.
- [ 21 ] Schmid AK , Lipton MS , Mottaz H , *et al.* Global whole-cell FTICR mass spectrometric proteomics analysis of the heat shock response in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* . *J Proteome Res* , 2005 , **4** : 709 – 718.

## Dynamic analysis of the heat shock protein 60 and its gene expression in *Thermoanaerobacter tengcongensis* induced by temperature increase

MENG Bo<sup>1</sup> , WANG Jing-qiang<sup>1</sup> , LI Na<sup>1</sup> , MA Yanhe<sup>2</sup> , LIU Si-qil<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Beijing Genomics Institute , Chinese Academy of Sciences , Beijing 101318 , China )

(<sup>2</sup> Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China )

**Abstract:** Heat shock protein 60 ( HSP60 ) is one of the important chaperonins , which can assist proper protein folding and configuration and can prevent denaturation and degradation of proteins as well. It was found that HSP60 in *Thermoanaerobacter tengcongensis* ( *T. tengcongensis* ) was typically temperature-dependent with the highest protein expression at 80°C . To understand the molecular mechanisms of thermophiles in their responding to heat stress , further investigation was conducted to examine the dynamic expression of HSP60 gene induced by higher temperature. The *T. tengcongensis* cells cultured at optimal temperature ( 75°C ) were transferred to 80°C followed by taking the aliquots at different time intervals. To monitor the expression levels of HSP60 mRNA and protein , these bacterial gene products were analyzed by two-dimensional electrophoresis , MALDI-TOF , HPLC-MS/MS , Western blot and quantitative PCR. The experimental data were calculated statistically and quantitatively , which indicate that the HSP60 protein increases steadily and significantly within 4h period after temperature raised , but its mRNA level is shown as a peak shape change within 1h. Obviously , the expression response of HSP60 protein to heat stress is significantly slower than that of its mRNA expression. Additionally , the expression extent of HSP60 mRNA and protein induced by raised-temperature is very different. In *E. coli* strains , the expression of HSP60 is usually regulated by the  $\sigma^{32}$  factor , which disassociates with DnaK immediately when the environmental temperature elevated. Since the genome of *T. tengcongensis* contains two  $\sigma^{32}$  genes , thus , it is likely that both bacteria share the similar mechanisms which regulate HSP60 transcription responding to the changes of temperature. Interestingly , the mRNA of HSP60 drops down about 70% within 30m responding to heat shock , but goes to the increased expression after then. Although this phenomenon is hard to explain based upon the current theory , it is plausible that the transcription in *T. tengcongensis* is temporally inhibited due to the culture temperature sharply raised.

**Keywords :** HSP60 ; Dynamics ; *Thermoanaerobacter tengcongensis* ; Thermophile