

合浦珠母贝热休克蛋白 *hsp70* 基因的克隆与表达分析

黄桂菊¹, 曲妮妮^{1,2}, 喻达辉¹, 李莉好^{1,3}

(1. 中国水产科学研究院 南海水产研究所, 广东 广州 510300; 2. 华中农业大学 水产学院, 湖北 武汉 430072; 3. 上海水产大学, 上海 200090)

摘要: 采用同源克隆和 RT-PCR 技术对合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) 热休克蛋白 *hsp70* 基因进行了克隆和表达分析。获得 cDNA 全长序列 2 365 bp, 其中 3' 非编码区域 (UTR) 为 318 bp, 5' UTR 为 88 bp, 开放阅读框 (ORF) 为 1 959 bp, 编码 652 个氨基酸, 分子量约为 71.39 kD, 理论等电点为 5.22, 并含有 3 个 HSP70 家族的签名序列 IDLGGTYS、DLGGGTFD 和 EEVD。同源性分析表明, 合浦珠母贝 HSP70 的氨基酸序列与太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 等双壳贝类的相似性高达 86% 以上, 基于氨基酸序列的聚类分析表明, 合浦珠母贝与牡蛎属种类亲缘关系最近。高温、高盐刺激后, 半定量 RT-PCR 检测发现 *hsp70* 基因的表达明显增加, 高温刺激的表达量高于高盐刺激, 高温刺激组不同组织的表达量由大到小依次为鳃、消化腺、外套膜、肌肉、性腺, 高盐刺激组不同组织的表达量由大到小依次为鳃、外套膜、肌肉、消化腺、性腺, 表明 HSP70 参与了机体对刺激的应答过程。该基因的克隆为进一步深入研究合浦珠母贝的抗逆机理及其遗传改良奠定了重要基础。[中国水产科学, 2007, 14 (5): 726–732]

关键词: 合浦珠母贝; 热休克蛋白 HSP70; 同源克隆; 体内表达

中图分类号: Q959.215

文献标识码: A

文章编号: 1005–8737–(2007)05–0726–07

合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) 是中国重要的产珠母贝, 所产珍珠即为历史悠久、闻名遐迩的南珠, 具有重要的经济价值。但近年来中国的海水珍珠生产中频频发生产珠贝大量死亡现象, 以及珍珠质量严重下降。环境条件日益恶化是造成这一后果的原因之一^[1], 因此提高其抗胁迫能力是目前急待解决的问题。

热休克蛋白 (Heat shock protein, HSP) 是一组存在于所有生物体内的多肽类蛋白家族。其中的 HSP70 是热休克蛋白家族中最重要的一种。作为应激保护蛋白, 在应激条件下, 如高温、缺氧、重金属、辐射、渗透压改变等, 其表达量显著升高^[2]; 在蛋白质的折叠、装配、转运和不可复性多肽的降解及其调控过程中起着关键作用^[3–4]。大量研究表明, HSP70 可以维持细胞内稳态, 它在细胞内的大量表达可以明显改善细胞的生存能力, 提高对环境胁迫或伤害的耐受性^[5–6]。

cDNA 末端快速扩增技术 (Rapid amplification

of cDNA end, RACE) 是 20 世纪 80 年代后期在 PCR 基础上逐步发展起来的一项基因克隆技术^[7], 目前已广泛应用于未知基因的全长 cDNA 克隆^[8]。与经典的通过 cDNA 文库筛选克隆全长 cDNA 的方法相比, 该法不仅具有方便快捷的特点, 同时可免除文库构建的繁琐和同位素对人体的危害。本研究采用 RACE 方法对合浦珠母贝的 *hsp70* 基因进行克隆分析, 并检测其在高温、高盐应激条件下的表达规律, 为深入探索合浦珠母贝的抗逆防御机制和抗逆选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验贝

2006 年 10 月 11 日从黄沙水产市场买回贝壳完整、开壳呼吸正常、健康活跃的合浦珠母贝 20 只, 贝龄约 1.5 龄, 壳高 2.5~3.5 cm, 暂养于曝气海水中, 连续充气, 水温 24 ℃。

收稿日期: 2006–12–25; 修订日期: 2007–02–05.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30571415).

作者简介: 黄桂菊 (1978–), 女, 硕士, 从事海洋生物遗传育种研究. E-mail: xaxhgi@126.com

通讯作者: 喻达辉. E-mail: pearlydh@163.com

1.2 总 RNA 的提取与 cDNA 第 1 链的合成

暂养 24 h 后选取 10 只贝进行热休克处理: 38 ℃ 1 h, 再回到 24 ℃ 恢复 2 h^[9]。然后解剖, 快速取出质量约 100 mg 的外套膜置于盛液氮的研钵中充分研磨, 添加 1 mL Trizol (Invitrogen), 移入经 DEPC 处理过的离心管中, 然后参照 Trizol Reagent 的操作说明提取总 RNA。利用紫外分光光度计测量 260 nm 的光吸收值, 计算总 RNA 的浓度。用变性甲醛凝胶电泳分析所提总 RNA 的质量, 根据 28S 和 18S 的比值判断 RNA 的完整性。

用 Oligo-dT 为逆转录引物 (表 1) 合成 cDNA 第 1 链, 参照 TaKaRa 的逆转录酶 M-MLV 的操作步骤进行, 取总 RNA 1 μg, Oligo-dT 300 pmol, 加 DEPC 处理水至 10 μL, 70 ℃ 保温 5 min 后在冰上急剧冷却, 然后加入 5×M-MLV 缓冲液 4 μL, dNTPs (各 10 mmol/L) 1 μL, RNase Inhibitor 20 U, M-MLV 200 U, 加 DEPC 处理水至 10 μL, 42 ℃ 1 h, 70 ℃ 10 min, 冰上冷却, -80 ℃ 保存备用。

表 1 PCR 扩增引物序列

Tab.1 Sequences of primers used in this study

引物 /Primer	序列 (5' → 3') /Sequence
Oligo-dT	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT ₍₃₀₎ VN
HSP70JB-F	GGCRARGAA YTRAACAART
HSP70JB-R	CGACCTTTGTCRTTTRGTRAT
HSP70F1	CTGGCGACAAATCAGAGG
HSP70F2	CGCTCATCAAGAGGAACA
HSP70R1	GTCGGAGTAAGTGGTGAAGG
HSP70R2	GGTGCTCTTATCCGTGGC
AP	AAGCAGTGGTATCAACGC
Oligo-dG	GGGGGGGGGGGGGGGGH
β-actinF	GCTACGTCGCCSTKGAYTT
β-actinR	CTCATCGTACTCCTGCTTGC
HF	CGTCTCACTGCTCGTTTG
HR	TCGCTGGTCTCAATGTTC

1.3 中间片段的克隆与测序分析

根据已知双壳贝类 *hsp70* 基因保守序列设计简并引物 HSP70JB-F/HSP70JB-R (表 1), 用 cDNA 第 1 链作模板扩增 *hsp70* 基因的中间片段。PCR 反应总体积为 20 μL, 包括 1 μL 单链 cDNA、0.2 mmol/L dNTPs、引物各 1 μmol/L、4.0 mmol/L MgCl₂、2 μL

10×buffer 和 0.5 U Taq 酶。PCR 反应程序为 94 ℃ 5 min, 然后 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 共 35 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经纯化回收后克隆到 pMD-18T 载体, 转化大肠杆菌 JM101, 经鉴定后将阳性克隆送往上海英骏公司测序。测序结果用 Blast 软件^[10]进行同源性分析, 以判断扩增片段是否属于 *hsp70* 基因。

1.4 *hsp70* 基因全长 cDNA 的克隆测序与同源性分析

根据中间片段序列设计特异引物 HSP70F1、HSP70F2、HSP70R1、HSP70R2 与 Oligo-dT 接头引物 AP 和 5' 端加尾引物 Oligo-dG (表 1) 分别用于 3' RACE 和 5' RACE。3' RACE: 先用引物 HSP70F1 和 AP 进行第 1 轮 PCR 扩增, 除引物外反应体系与中间片段克隆的 PCR 相同, 反应程序为 94 ℃ 5 min, 然后 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 90 s, 共 35 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物稀释 50 倍后取 1 μL 作模板, 再用引物 HSP70F2 和 AP 进行第 2 轮 PCR 扩增, 反应条件同上。扩增产物经克隆、鉴定后进行测序。5' RACE: 采用加尾法, 用 PCR 产物纯化试剂盒纯化回收 cDNA 第 1 链, 然后用末端转移酶 TdT 在第 1 链 cDNA 3' 端加 poly (C) 尾。以加尾 cDNA 为模板, 先用引物 Oligo-dG 和 HSP70R1 进行第 1 轮 PCR 扩增, 退火温度为 53 ℃, 其他反应条件同 3' RACE, 然后取 1 μL PCR 产物为模板, 再用引物 Oligo-dG 和 HSP70R2 进行第 2 轮 PCR 扩增, 退火温度为 60 ℃, 其他条件同第 1 轮反应, 扩增产物经克隆、鉴定后进行测序。

将 3' RACE、5' RACE 和中间片段的序列进行拼接获得全长 cDNA 序列, 并用 Blastn 软件与 GenBank 核酸数据库做同源性分析。同时用 DNASTar 软件将所获得的 cDNA 序列翻译成氨基酸序列, 确定开放阅读框 (Open reading frame, ORF), 用 Blastp 对全长氨基酸进行同源性分析, 用 Clustal X1.83^[11]对合浦珠母贝及其他物种的 HSP70 氨基酸序列进行多重比对, 然后用 MEGA3.1 软件^[12]构建 NJ 系统树。

1.5 *hsp70* 基因的组织表达分析

用高温 (38 ℃)、高盐 (40) 分别处理健康的合浦珠母贝 (各 3 只, 来源和处理方法同 1.1), 历时 1 h, 然后各在常温 (24 ℃)、常盐 (30) 条件下恢复 2 h, 同时设常温、常盐对照各 3 只。分别取经高温、高盐处理和对照组贝的外套膜、肌肉、鳃、消化腺、性腺 5 种

组织,按前述方法提取总 RNA 和合成第 1 链 cDNA。根据测得的 HSP70 全长 cDNA 序列设计特异引物 HF/HR 用于半定量 RT-PCR 检测,并根据 GenBank 中贝类的 β -actin 序列(AF026063、X75894 和 AY335441)设计内参引物 β -actinF/ β -actinR(表 1)作对照分析。先分别确定 HF/HR 和 β -actin F/ β -actinR 扩增的循环数,PCR 反应程序为 94 ℃ 4 min,然后 94 ℃ 30 s,退火 30 s,72 ℃ 30 s,共 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min,*hsp70* 和 β -actin 的退火温度分别为 57 ℃ 和 53 ℃,反应体系与 1.3 节中间片段扩增 PCR 相同。在获得优化循环参数分别为 35 和 38 的基础上,按上述条件分别对经高温、高盐处理和对照组贝的 5 种组织进行半定量 RT-PCR 分析。PCR 产物电泳后测定积分光密度(OD),然后计算 *hsp70* 与 β -actin 的积分光密度比值,根据比值的高低确定表达量的大小。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取与中间片段的克隆

提取的合浦珠母贝总 RNA 的 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 比值为 1.95,甲醛变性凝胶电泳结果显示有 28S 和 18S 两条清晰的条带,说明提取的总 RNA 完整性良好,符合 RACE 扩增的质量要求。用引物 HSP70JB-F/HSP70JB-R 扩增的中间片段长 461 bp。Blast 分析表明该片段与 GenBank 中已知的多个 *hsp70* 序列有较高的同源性。

2.2 全长 cDNA 的克隆与序列分析

3' RACE 获得 947 bp 的片段,其中包含终止密码子 TAA, RNA 不稳定模体(RNA instability motif)ATTTA 以及 17 bp 的 poly(A)。5' RACE 获得 1 573 bp 的片段,其中包含起始密码子 ATG。将上述 RACE 片段和中间片段进行拼接获得合浦珠母贝 *hsp70* 基因全长 cDNA 序列 2 365 bp (GenBank 注册号为 EF011061),包括 88 bp 的 5' 末端非翻译区(UTR),1 959 bp 的开放阅读框(ORF)和 318 bp 的 3' 末端非翻译区(图 1)。ORF 编码 652 个氨基酸,推测其蛋白质分子量为 71.39 kD,等电点为 5.22。Blast 分析发现与其他水生生物的同源性高

达 86% 以上,其中与太平洋牡蛎的 HSP70 的同源性为 91%,与扇贝(*Argopecten irradians*)和贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)的同源性为 90%,Blast 分析的 E 值为 0.000。而核苷酸序列 Blast 的 E 值也小于 0.005,从而表明获得的全长 cDNA 序列是 HSP70 家族成员之一。氨基酸序列特征分析找到 3 个 HSP70 家族签名序列:IDLGTTYS、DLGGGTFD 和 EEVD^[13](见图 1 下划线部分)和 1 个糖基化位点:NKSI^[14](见图 1 阴影部分)。

2.3 系统发育分析

NJ 系统树表明合浦珠母贝 HSP70 与牡蛎最为接近,然后依次与贻贝、扇贝、虾、蟹等无脊椎动物聚在一起。而包括人、鼠、鱼、爬行动物等在内的脊椎动物另聚为 1 支(图 2)。

2.4 *hsp70* 的组织表达

hsp70 和 β -actin 的 PCR 产物的积分光密度比值表明,经高温、高盐刺激后 HSP70 表达明显增加,而且高温刺激的表达量高于高盐刺激(图 3)。高温刺激组各组织的表达量由大到小依次为鳃、消化腺、外套膜、肌肉、性腺,高盐刺激组各组织的表达量由大到小依次为鳃、外套膜、肌肉、消化腺、性腺。

3 讨论

HSP70 家族蛋白具有一个普遍结构,即一个保守的 N 端和一个不太保守的 C 端。在合浦珠母贝 *hsp70* 基因序列可找到 HSP70 家族的 3 个签名序列,即 IDLGTTYS、DLGGGTFD 和 EEVD^[13]。但本序列 C 末端缺乏 GGMP 四肽重复序列,这与食用牡蛎(*Ostrea edulis*)和美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)相似^[15-16],而与太平洋牡蛎(*C. gigas*)不同^[17]。Demand 等^[18]的研究表明,GGMP 四肽重复序列、 α 螺旋亚区和 EEVD 模体三者可在 C 末端形成一个结构实体,该结构实体可能参与调节 HSP70 与分子伴侣的结合,但其确切功能还有待进一步研究。经 Blast 同源性分析发现合浦珠母贝 *hsp70* 基因与其他水生生物的 *hsp70* 基因具有较高的同源性(86% 以上),其中与太平洋牡蛎的 HSP70 的同源性最高(91%),其次为扇贝和贻贝(90%)。

CAAGAACACG
5' UTR→

CCGGCACTGCAGAAGGGTGTAGACAAGAAAGAGAAAAAAGAGAAAGATCTCCAGATTTATTTAAATAAGCTTGCAAA
 ATGAGTAAAGGACCGCCATCGGAATTGATCTTGGCACTACATATTCCTGCGTAGGTGATTTTCAGCATGGTAAAGTA
 M S K G P A I G I D L G T T Y S C V G V F Q H G K V
 GAAATCATCGCTAACGACCAGGGTAATCGTACCACCTAGCTATGTAGCCTTCACAGATACCGAGGGACTGATCGGA
 E I I A N D Q G N R T T P S Y V A F T D T E G L I G
 GATGCTGCCAAAAACCAGGTGGCCATGAACCCATCAAATACTATCTTTGATGCAAAGCGTCTGATTGGCAGAAAGTTT
 D A A K N Q V A M N P S N T I F D A K R L I G R K F
 GATGATCCAAACGTACAGGCAGATATGAACACTGGCCATTACAGTCGTTAACGAGTCTCCAAACCACGTATCAAA
 D D P N V Q A D M K H W P F T V V N E S S K P R I K
 GTAGATTACAAGGAGAGACAAGACATTCTTGGCTGAGGAGATCTCATCAATGGTCCCTCACTAAAAAGAGAGACC
 V D Y K G E N K T F L A E E I S S M V L T K M K E T
 ACTGAAGCTTACCTAGGAAAAACAATAACAATGCTGTAGTGACAGTACCAGCATACTCAATGATTCCAGAGACAG
 T E A Y L G K T I N N A V V T V P A Y F N D S Q R Q
 GCTACCAAGATGCTGGCACAATCGCTGGTCTCAATGTTCTACGTATCATCAATGAACCCACAGCAGCTGCTATCGCC
 A T R K D A G T I A G L N V L R I I N E P T A A A A
 TATGGTCTGGACAAGAAGGTCGGCGGAGAGCGCAACGTTCTGATCTTTGACTGGGAGGAGGAACCTTCGATGTATCC
 Y G L D K K V G G E R N V L I F D L G G G T F D V S
 ATCTGACAATAGAGACGGTATTTTGGAGTAAATCCACGTCTGGCGACACCCATCTTGGAGCGAGGACTTTGAC
 I L T I E D G I F E V K S T S G D T H L G G E D F D
 AACAGAATGGTGAATCACTTTATACAAGAATTCAAACGTAACACAAAAAGACATTTCCGAAAAACACGAGCAGTG
 N R M V N H F I Q E F K R K H K K D I S E N K R A V
 AGACGTCTTCGTACCGCATCGAGAGGGCAAAGCAACCTTATCGTCCAGTACTCAGGCTAGCGTAGAGATTGACTCT
 R R L R T A C E R A K R T L S S S T Q A S V E I D S
 TTGTTTGGAGGTATAGATTCTACACCACTATTACAGAGCTAGGTTTGAGGAGTTGAACGCCGATCTCTTCAGAGGG
 L F E G I D F Y T S I T R A R F E E L N A D L F R G
 ACCCTACAGCCTGTAGAGAAATCCATAATAGACGCCAAGATGGACAAAGGTCAAATTCAGATATCGTCTGGTTGGA
 T L Q P V E K S I I D A K M D K G Q I H D I V L V G
 GGCTCTACCAGAATCCCAAAATCCAAAACTGCTGCAAGATTTCTTCAACGGCAAGGAAGTGAACAAATCCATCAAC
 G S T T R I P K I Q K L L Q D F F N G K E L N K S I N
 CCTGACGAAGCTGTGACCTATGGTGCAGCGGTACAGGCAGCATTGTTGCTGGCGACAATCAGAGGAAGTGCAGGAT
 P D E A V A Y G A A V Q A A I L S G D K S E E V Q D
 CTCCTCTGTGGACGTTGCCCCGCTTTCCCTCGGTATCGAGACAGCCGGCGGTGTGATGACGTCGCTCATCAAGAGG
 L L L L D V A P L L G I E T A G G V M T S I K R
 AACACGACAATCCCCACCAAGCAGACACAGACCTTACCACCTTACTCCGACAATCAACCGGGTGTACTCATTACAGTA
 N T T I P T K Q T Q T F T T Y S D N Q P G V L I Q V
 TACGAAGGAGAGAGCCATGACCAAAAGATAACAATCTACTAGGAAGTTTGAACCTGACTGGTATCCCCCTGCCCC
 Y E G E R A M T K D N N L L G K F E L T G I P P A P
 CGTGGTGATACACAGATTGAGGTACATTCGACATCGATGCTAACGGTATCATGAACGTCCAGGCCACGGATAAGAGC
 R G V P Q I E V T F D I D A N G I M N V Q A T D K S
 ACCGGCAAGGAAAAATCACAATCACCAACGACAAAGGTCGCCTCAGCAAAAGCAGAGATCGACAGGATGTTAAGC
 T G K E N K I T I T N D K G R L S K D E I D R M L S
 GAAGCCGAAAAGTACAAACAGGAAGACGAAAAAAGATCGTATCACGGCCAAAGACGTCTGGAAGGCTACGCA
 E A E K Y K Q E D E K Q K D R I T A K N S L E S Y A
 TTCAACATGAAATCCATCGTGAAGATGAGAACTCAAAGACAAGATCGAGGAGGGTGATAAAATAAAATCAAGGAA
 F N M K S I V E D E K L K D K I E E G D K N K I K E
 AAGTGTGACGAGATCATCAAGTGGTTAGACACCAACCACTCGCGGAAAAAGGAGGAGTTGAAGACAAACAGAAAGGAA
 K C D E I I K W L D T N Q L A E K E E F E D K Q K E
 CTAGAGAAAGAATGTAATCCCATCATTACCAAGTTATACCAGGCAGCAGGTGGTGTCTCCCGTGGAGCCCCAGGGGT
 L E K E C N P I I T K L Y Q A A G G A P G G A P G G
 ATGCCACCAAACTTTGGTGGTGTGCTCCCGAGGAGGTGAAGCGAAGGCGGTTCCAGCGGTGGACCCACCATCGAGGAG
 M P P N F G G A A P G G G S E G G S S G G P T I E E
 GTCGATTAAGCTTTTGGCTAACCGAACGATTGAGAGAACAAAATCGTTAATTCATCAGAAATCCATCACGTTTTGAAG
 V D * 3' UTR →
 CTTACTTAAATATTTCTTGTCTAGTATTTATTAATATGTTGATTTTGAACGACTGTTACCGATTTCTTTTTCATTTTAC
 GTAATGGCATAGGGAAGAAATTCATCATTAATTAATCATTTGATGTTACCATCAGAATGAATAGTGCTAGTCAATTTAT
 GAGAGTATTGTTTACACTTCTGCATAATAGAAATGTTATGTGTTGTTCTACTTATCAAGTAAAACCTTGAAGCTGTAA
 AAAAAAAAAAAAAA

图1 合浦珠母贝 *hsp70* 基因的核苷酸序列和推测的氨基酸序列

注:下划线部分表示签名序列;阴影部分表示糖基化位点。

Fig.1 cDNA sequence of *hsp70* gene and predicted amino acid sequence of HSP70 of *Pinctada fucata*

Note: Underline indicates signature sequences. Shadow indicates glycosylation site.

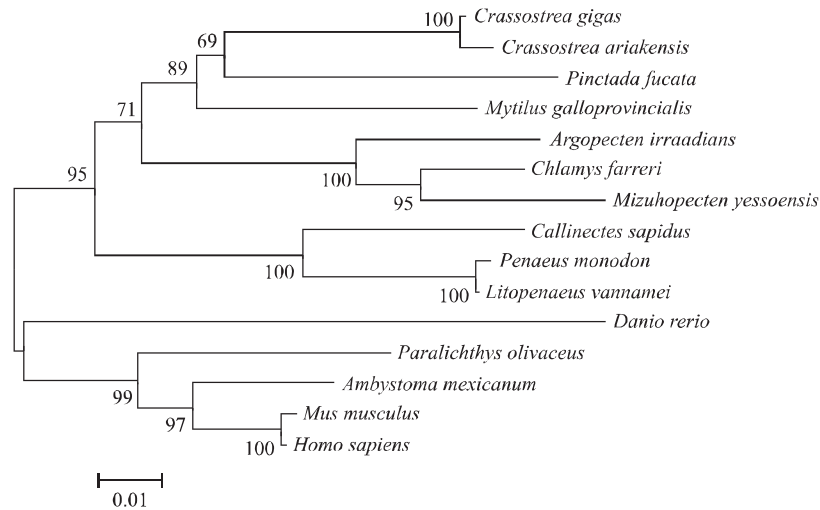


图2 利用MEGA3.1软件构建的基于HSP70氨基酸序列的NJ系统树

注:长牡蛎(AAD31042),近江牡蛎(AAO41703),合浦珠母贝(EF011061),紫贻贝(AAW52766),海湾扇贝(AAS17723),栉孔扇贝(AAO38780),虾夷扇贝(AAS17724),美洲蓝蟹(ABF83606),斑节对虾(AAQ05768),凡纳滨对虾(AAT46566),斑马鱼(AAH56709),牙鲆(AAC33859),墨西哥钝口螈(AAK31583),小家鼠(AAC84169),人(AAK17898). 数字代表各分支的置信度。

Fig.2 NJ tree based on HSP70 amino acid sequences using MEGA3.1

Crassostrea gigas, *Crassostrea ariakensis*, *Pinctada fucata*, *Mytilus galloprovincialis*, *Argopecten irradians*, *Chlamys farreri*, *Mizuhopecten yessoensis*, *Callinectes sapidus*, *Penaeus monodon*, *Litopenaeus vannamei*, *Danio rerio*, *Paralichthys olivaceus*, *Ambystoma mexicanum*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*. Numbers indicates the confidence level of each embranohment.

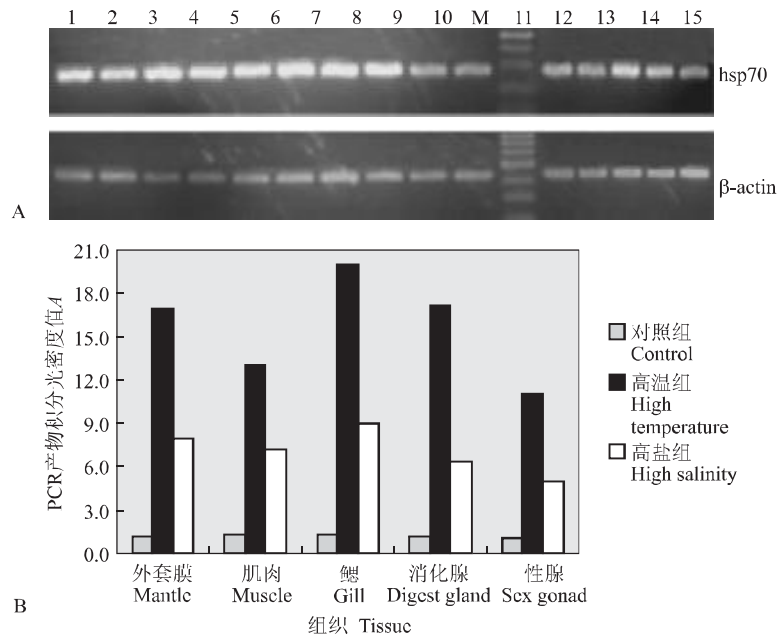


图3 *hsp70* 基因在合浦珠母贝不同组织中的表达

A: 各组织 PCR 产物电泳图谱; B: 各组织 PCR 产物积分光密度比值。

1-5: 高温刺激组; 6-10: 高盐刺激组; 11-15: 对照组; 1、6、11: 外套膜; 2、7、12: 肌肉; 3、8、13: 鳃; 4、9、14: 消化腺; 5、10、15: 性腺。

Fig.3 Expression of *hsp70* gene in different tissues of pearl oyster *Pinctada fucata*

A: PCR product; B: Ratio of integrated optical density (IOD).

1-5: stimulated with heat shock; 6-10: stimulated with high salty seawater; 11-15: control; 1、6、11: mantle; 2、7、12: muscle; 3、8、13: gill; 4、9、14: digest gland; 5、10、15: sex gonad.

HSP70 作为应激保护蛋白,任何应激均可诱导其合成增加,它能使动物迅速适应环境的变化,保护机体不受或少受损害。Cruz-Rodrigues 等^[19]用多环芳香烃等化学药物和污染水域的沉积物刺激美洲牡蛎,发现其体内 HSP70 大量表达,从而表明 HSP70 可参与机体对不良环境的抵御,维持细胞内环境的稳定。Nakano 等^[20]利用 2 种潮间杜父鱼 (*Oligocottus maculosus* and *O. snyderi*) 进行研究表明,当机体内 HSP70 储存较多时,机体具有更大的热耐受能力,能够适应更大的温差变化。淡水海绵 (*Ephydatia fluviatilis*) 受亚致死热刺激后,也表现出对化学污染物有很强的抵抗力^[21]。因此 HSP70 表达水平的高低对生物体的抗逆能力和环境适应能力具有重要的影响。本研究的表达实验中合浦珠母贝刺激组的 HSP70 表达明显增强,此结果与 Rathinam 等^[16]和 Smith 等^[22]的研究相符合。Rathinam 等^[15]的研究表明美洲牡蛎受热诱导后,鳃和外套膜的 HSP70 表达升高,Smith 等^[22]发现离体的大西洋鲑 (*Salmon salar*) 在高盐(高渗透压)胁迫下,鳃的 HSP70 mRNA 表达显著增加,本研究也发现高渗可诱导 HSP70 高表达,尤其在鳃中,其次是外套膜,而内部器官消化腺和性腺较前两者低,可能是由于鳃既是呼吸器官又是摄食器官,且鳃和外套膜直接浸在高渗透压的海水中,细胞受应激更严重,而性腺等内部器官不直接接触海水,受胁迫的程度较轻。在高温刺激下,对呼吸和消化的功能影响较大,所以鳃和消化腺的表达量较高,与美洲牡蛎的组织表达情况略有不同^[15]。而高温刺激的表达量高于高盐刺激,表明热休克蛋白对温度的刺激更敏感。上述研究表明,合浦珠母贝的 HSP70 参与了机体对刺激的应答过程,在机体的抗逆防御中发挥着重要作用。因此,筛选表达量高的个体进行遗传育种,或者通过转基因手段进行遗传育种,有可能提高后代对环境的适应能力。因此,作为一种重要的内源性细胞保护因子,合浦珠母贝 HSP70 具有重要的理论和应用价值。

合浦珠母贝是中国培育海水珍珠的重要贝种,但近年来养殖大规模死亡问题一直困扰着该产业的健康发展^[1]。引起合浦珠母贝死亡发生的原因是多方面的,可能是病原、环境和母贝种质本身三方面共同作用的结果。因此,合浦珠母贝 *hsp70* 基因的克隆为探索 HSP70 介导的抗逆能力,以及合浦珠母贝的抗逆育种及其健康养殖奠定了基础。

参考文献:

- [1] 艾红,李永振,丁彦文.海洋珍珠贝病害研究综述[J].上海水产大学学报,2003,12(1):61-64.
- [2] De Maio A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams[J]. Shock, 1999, 11(1):1-12.
- [3] Kiang J G, Tsokos G C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry and physiology[J]. Pharmacol Ther, 1998, 80(2):183-201.
- [4] Fink A L. Chaperone-mediated protein folding[J]. Physiol Rev, 1999, 79(2):425-449.
- [5] Feder M E, Hofmann G E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response[J]. Annu Rev Physiol, 1999, 61(1):243-282.
- [6] 王彦波,周绪霞,许悻荣.热应激蛋白 70 的研究进展[J].免疫学杂志,2003,19(3):79-82.
- [7] Loh E Y, Elliott J F, Cwirla S, et al. Polymerase chain reaction with single-sided specificity: analysis of T cell receptor δ chain[J]. Science, 1989, 243(4888):217-220.
- [8] 赵炜,郑佐华,毛裕民.全长 cDNA 的获得—RACE 及其他方法进展[J].生命科学,1999,11(4):92-96.
- [9] Piano A, Asirlli C, Caselli F, et al. Hsp70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important syster in Europe[J]. Cell Stess Chap, 2002, 7(3):250-257.
- [10] Wheeler D L, Chappey C, Lash A E, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(1):10-14.
- [11] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F J, et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(24):4 876-4 882.
- [12] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: an integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. Brief Bioinform, 2004, 5(2):150-163.
- [13] Boutet I, Tanguy A, Moraga D. Organization and nucleotide sequence of the Europe flat oyster *Ostrea edulis* heat shock cognate 70 (*hsc70*) and heat shock protein 70 (*hsp70*) genes[J]. Aquat Toxicol, 2003, 65(2):221-225.
- [14] Laursen J R, Liu H, Wu X J, et al. Heat-shock response in a molluscan cell line: characterization of the response and cloning of an inducible HSP70 cDNA[J]. J Invertebr Pathol, 1997, 70(3):226-233.
- [15] Piano A, Franzellitti S, Tiniti F, et al. Sequenceing and expression pattern of inducible heat shock gene products in the European flat oyster, *Ostrea edulis*[J]. Gene, 2005, 361(1):119-126.
- [16] Rathinam A V, Chen T T, Grossfeld R M, et al. Cloning and sequence analysis of a cDNA for an inducible 70 KDa heat shock protein (Hsp70) of the American oyster (*Crassostrea virginica*) [J]. DNA Seq, 2000, 11(3-4):261-264.
- [17] Boutet I, Tanguy A, Rousseau S, et al. Molecular identification

- and expression of Heat Shock Cognate 70 (*hsc70*) and Heat Shock Protein 70 (*hsp70*) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Cell Stress Chap, 2003, 8 (1): 76–85.
- [18] Demand J, L ders J, H hfeld J. The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors [J]. Mol Cell Biol, 1998, 18 (4): 2 023–2 028.
- [19] Cruz-Rodriguez L A, Chu F E. Heat-shock protein (HSP70) response in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to PAHs sorbed to suspended artificial clay particles and to suspended field contaminated sediments [J]. Aquat Toxicol, 2002, 60 (3–4): 157–168.
- [20] Nakano K, Iwamaa G K. The 70-kDa heat shock protein response in two intertidal sculpins, *Oligocottus maculosus* and *O. snyderi*: relationship of *hsp70* and thermal tolerance [J]. Comp Biochem Physiol, 2002, 133 (1): 79–94.
- [21] Mueller W E G, Koziol C, Kurelec B, et al. Combinatory effects of temperature stress and nonionic organic pollutants on stress protein (HSP70) gene expression in the freshwater sponge *Ephyrdia fluviatilis* [J]. Environ Toxicol Chem, 1995, 14 (4): 1 203–1 208.
- [22] Smith T R, Tremblay G C, Bradley T M, et al. Hsp70 and a 54 KDa protein (Osp54) are induced in salmon (*Salmon salar*) in response to hyperosmotic stress [J]. J Exp Zool, 1999, 284 (3): 286–298.

Cloning and expression analysis of heat shock protein 70 gene in pearl oyster *Pinctada fucata*

HUANG Gui-ju¹, QU Ni-ni^{1,2}, YU Da-hui¹, LI Li-hao^{1,3}

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430072, China; 3. College of Life Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Heat shock protein 70 gene was cloned from pearl oyster *Pinctada fucata* by homology clone and RT-PCR. The full length cDNA of *hsp70* obtained is 2 365 bp, containing a 3' UTR of 318 bp, a 5' UTR of 88 bp, and an ORF of 1 959 bp, encoding 652 amino acid residues with estimated molecular weight of 71.39 kD and theoretical isoelectric point of 5.22. Three signature sequences of HSP70 family: IDLGT-TYS, DLGGGTFD and EEVD were detected in the predicted amino acid sequenc. High identity of HSP70 in amino acid sequence (more than 86%) was observed between *P. fucata* and the other bivalve organisms including *Crassostrea gigas* through blast analysis, indicating that the cDNA cloned in this study belonged to the family of heat shock protein 70. Phylogenetic tree showed that *P. fucata* was closely related to *Crassostrea* oysters based on amino acid sequences of HSP70. After pearl oysters were stimulated by heat shock or highly salty seawater, transient expressions of *hsp70* gene were measured by semi-quantitative RT-PCR. The expression was up-regulated by the stimulations and higher expression occurred under heat shock than under high salinity. The order of tissue expression amounts from large to small was gill, digest gland, mantle, muscle, sex gland under heat shock treatment, while gill, mantle, muscle, digest gland, sex gland under high salinity treatment. This indicated that HSP70 in *P. fucata* responded actively to environmental stimulations. Thus the cloning of *hsp70* gene in the present study provided a basis for further investigation on anti-stress mechanism and genetic improvement of stress-tolerance in *P. fucata*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (5): 726–732]

Key words: *Pinctada fucata*; heat shock protein 70; homology clone; *in vivo* expression