

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00033

缢蛏 *ScHsc70* cDNA 的分子特性和表达分析

冯冰冰¹, 牛东红¹, 钟玉民¹, 陈慧², 林国文², 李家乐^{1,3}

1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 201306;
2. 福建省闽东水产研究所, 福建 宁德 352100;
3. 上海市高校水产养殖学 E 研究院, 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 从缢蛏(*Sinonovacula constricta* Lamarck) cDNA 文库中筛选出一条热休克蛋白 70(Heat shock protein 70, HSP70)同源序列, 采用 EST 扩增和 5'RACE(rapid amplification of cDNA ends, RACE)扩增方法获得全长 cDNA 序列, 共 2 335 bp, 包括 76 bp 的 5'非翻译区和 309 bp 的 3'非翻译区, 以及 1 950 bp 的开放阅读框。阅读框共编码 649 个氨基酸, 推算的分子量约为 70.89 kD, 理论等电点为 5.28。氨基酸序列分析结果表明, 该基因的氨基酸序列含有 HSP70 家族的 3 个签名序列, 2 个糖基化位点, 1 个 ATP-GTP 结合位点, 且 C 末端具有 GGXP 四肽重复序列以及细胞质特异性调控基序 EEVD。该基因是组成型 HSC70(Heat shock cognate 70)亚家族基因成员, 被命名为 *ScHsc70*。基于氨基酸序列的双壳贝类聚类分析表明, 缢蛏与南极帽贝(*Laternula elliptica*)、文蛤(*Meretrix meretrix*)的亲缘关系最近。荧光定量表达分析显示, *ScHsc70* mRNA 在缢蛏水管、鳃、斧足、外套膜、肝和性腺等组织中以不同水平存在, 其中在外套膜中的表达量最低, 而在水管和肝中的表达量最高。经副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和副鳃弧菌(*V. anguillarum*)诱导后, *ScHsc70* mRNA 在缢蛏肝中的水平呈现先升高后下降的变化趋势, 且分别在感染后的第 20 小时和第 30 小时达到最高。结果提示, 缢蛏 *ScHsc70* 基因可能参与了对细菌感染的防御反应。

关键词: 缢蛏; 热休克蛋白 70; 序列分析; 基因表达

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)01-0033-12

热休克蛋白(heat shock protein, HSPs)是生物体在应对各种物理、化学和微生物应激时启动表达的一组结构上非常保守的特殊蛋白质, 它们能快速调整细胞的存活机能, 保护细胞抵御损伤并有助于细胞恢复正常的结构和机能^[1]。热休克蛋白 70(HSP70)是一族最保守和最重要的热休克蛋白家族, 也是目前热休克蛋白家族中研究最为深入的一种。分子量为 72~80 kD 的 HSP70 家族成员最多, 共有 21 种蛋白质, 是一组进化上高度保守的应激蛋白, 按表达情况可分为组成型 HSC70(heat shock cognate 70)和诱导型 HSP70^[2]。HSP70 广泛分布于细胞核、细胞质、内质网、线

粒体和叶绿素等细胞的各个部分, 广泛参与各种机体和细胞的活动^[3]。近年来, 许多研究表明, HSP70 具有分子伴侣^[4]、抗细胞凋亡^[5-6]、抗氧化^[7]和免疫调节^[8-9]等重要功能。当机体处于应激状态下, HSP70 会大量表达, 因此有人认为 HSP70 的表达高低可间接反映机体的应激耐受水平。

贝类种类繁多, 而且大多具有重要的经济价值, 但是其生活的水环境中许多因素(如温度、重金属、缺氧、细菌感染等)制约着它们的分布, 而这种分布则与其体内应激蛋白的数量和表达程度息息相关^[10]。目前有关贝类 HSP70 的研究报道多集中在牡蛎^[11-15]、扇贝^[16-17]、贻贝^[18-20]和鲍^[10]

收稿日期: 2011-05-06; 修订日期: 2011-06-10.

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(2006AA10A410); 福建省海洋与渔业局重点项目(闽海鱼 2007015); 上海高校创新团队建设项目; 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金(SSC09016).

作者简介: 冯冰冰(1981-), 男, 博士, 从事水产动物种质资源与遗传育种研究. E-mail: fbb-1981@163.com

通信作者: 李家乐, 教授. E-mail: jlli2009@126.com, jlli@shou.edu.cn

中,而在滩涂贝类中仅见文蛤(*Meretrix meretrix*)^[21]中有报道。鉴于 HSP70 在抗病抗逆中的重要作用,开展贝类 HSP70 功能及其在各种应激条件下的表达研究显得尤为重要。

缢蛏(*Sinonovacula constricta* Lamarck)俗名蛏子、蜻子,属于双壳纲(Bivalvia)、帘蛤目(Veneroida)、截蛏科(Solecurtidae)、缢蛏属^[22],是中国、日本、韩国特有种类。缢蛏作为中国四大养殖贝类之一,其自然分布于河口或有少量淡水注入的内湾潮间带中、下区,在浙江和福建一带已有数百年的养殖历史。近年来,养殖缢蛏病害经常出现,而且日趋严重,死亡率高达 60%~80%,经济损失十分惨重。据报道,细菌性疾病是近几年缢蛏养殖中病害死亡的主要影响因素之一,特别是由弧菌引起的疾病比较严重,其易侵染缢蛏个体,导致缢蛏个体的免疫防御能力下降^[23-24]。有研究发现,肝组织是合成无脊椎动物免疫相关蛋白的重要组织^[25-27]。本研究从本实验室构建的缢蛏肝组织标准化 cDNA 文库中筛选出 1 条与 HSP70 高度相似的 EST 序列^[28],对其两端及 5'RACE 末端进行扩增并测序,得到缢蛏组成型 HSC70 的 cDNA 全序列,并利用实时荧光定量 PCR 技术分析该基因在健康缢蛏不同组织中的表达,以及在副溶血弧菌和鳃弧菌诱导后肝组织中的表达,以期为深入研究该基因在缢蛏免疫过程中的作用机理及指导遗传选育和遗传改良奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2010 年 4 月,从福建宁德漳湾镇二屿村沿海滩涂采集 400 个野生 1 龄活体缢蛏,带回实验室。将其放入装有过滤海水的水族箱中,连续充气,水温 20℃ 暂养 2 周。

随机挑选 9 个目测健康的缢蛏,分别取水管、鳃、斧足、外套膜、肝和性腺组织,将每 3 个个体的相同组织等量混合作为一个样品,共制成 3 个样品组。按 TaKaRa 的 RNAiso Plus 方法分别提取总 RNA,以分析基因在健康缢蛏各组织中的表达水平。

按照常规方法,在 28℃ 条件下,用终浓度为 0.4% 的福尔马林分别浸泡鳃弧菌和副溶血弧菌(由农业部上海海洋大学水生动物病原库提供)48 h。无菌检验确认菌体灭活后,用 PBS 缓冲液清洗 3 次,去掉残存的福尔马林,最终用 PBS 缓冲液制成 OD₆₀₀ = 0.4 的细菌悬液。

实验设置 4 个组,以不注射任何溶液的缢蛏作为空白对照组,以注射等量 PBS 缓冲液者作为注射对照组,以每只缢蛏斧足内注射 50 μL 鳃弧菌或副溶血弧菌菌悬液者作为鳃弧菌实验组和副溶血弧菌实验组,每组缢蛏为 80 个。注射完毕后,将缢蛏放回对应的水族箱暂养。在暂养后 0 h 取空白对照组样品,然后在注射后的第 4、8、12、20、30、48 和 72 小时,每个注射组取 9 个缢蛏个体,将每 3 个个体的肝组织等量混合成一个样品,共制成 3 个样品组。提取每个样品的总 RNA,用于细菌诱导后不同时间点的表达分析。

1.2 缢蛏 *ScHsc70* 基因全长 cDNA 的克隆和序列测定

根据缢蛏肝 cDNA 标准化文库中 EST 序列的比对结果,选取 1 条与其他生物 HSP70 具有高度相似性的 EST 序列,以文库质粒为模板,利用通用引物 M13F 和 M13R(表 1)对其扩增并测序,得到该基因的部分 mRNA 序列,包括部分开放阅读框和完整的 3'UTR。然后使用 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 与 Advantage[®] 2PCR Enzyme System 试剂盒进行 5'RACE 末端扩增,用 Primer primer 5.0 设计下游特异引物 Schsp70-F,试剂盒中的 UPM 为上游引物(表 1)。扩增 5'端的 PCR 反应参数: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min; 4℃ 保存。扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离检测,用 TIANgel Midi Purification Kit 回收目的片段 PCR 产物,连入克隆载体 pMD19-T,转化到感受态大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α,所获得的阳性克隆由上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定。

然后将该基因质粒扩增 PCR 产物序列和 5'RACE 末端扩增 PCR 产物序列进行拼接,获得

缙蛭 *ScHsc70* 基因的全长 cDNA 序列。

1.3 缙蛭 *ScHsc70* 基因序列与氨基酸序列的同源性分析及分子进化分析

将获得的 *HSC70* 基因的全长 cDNA 序列与 GenBank 核酸数据库及蛋白数据库做 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)分析。应用 ORFFinder 程序 (<http://www.n-cbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>)确定正确的开放阅读框 (open reading frame, ORF)并推导其编码的氨基酸序列。Prot-param 程序(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)预测氨基酸序列的物理参数, Tmpredserver(http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)分析跨膜结构, SigalP 3.0server 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/service/SignalP>) 预测信号肽, 蛋白分析软件 Antheprot 2000 分析氨基酸序列中的特征序列。使用 BLASTp 于 GenBank 中进行相似性检索, 使用 ClustalX 软件对相应的氨基酸序列进行分析。然后用 MEGA 4.0 软件, 采用邻位相接法(NJ)构建双壳贝类基于 HSP70 氨基酸序列的系统进化树, 采用 Bootstrap 重复 1 000 次计算各分支的置信度。

1.4 缙蛭 *ScHsc70* 基因的组织表达与时间表达分析

根据已获得的缙蛭 *ScHsc70* 基因的 cDNA 序列, 设计定量 PCR 引物 hsp70F 和 hsp70R, 以 *ScHsc70* mRNA 为模板, 参照 TaKaRa 的 Prime-script™ RT-PCR Kit 中 RT-PCR 体系, 逆转录 RNA

为 cDNA 第一条链。然后采用 SYBR Green 嵌合荧光法进行实时荧光定量 PCR 扩增反应, 反应体系以 cDNA 第一条链为模板, 以 18S rRNA 为内参基因, 通过 Bio-Rad CFX 96 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国)完成。荧光定量检测采用 Takara 公司的 SYBR 定量检测试剂盒。采用 20 μL 反应体系, 内含 Mix 10 μL、正反向引物(10 mmol/L)各 0.6 μL、ddH₂O 6.8 μL 及模板 cDNA 2 μL。反应程序为: 95 30 s; 95 5 s, 60 30 s, 40 个循环; 随后进行熔解曲线检测。所得的数据应用 2^{-ΔΔCT} 方法进行相对定量分析, 所有值均为 3 个反应的平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)。所得数据采用 SPSS 16.0 软件包进行 t-test 统计分析, *P*<0.05 认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 cDNA 扩增与分析

ScHsc70 基因的质粒扩增产物和 5'RACE 的产物分别约为 1 500 bp 和 1 600 bp; 将 2 个片段拼接后, 得到缙蛭 *ScHsc70* 基因的全长 cDNA 序列, 推导获得其氨基酸序列。该基因 cDNA 全长 2 335 bp(GenBank 登录号: JF748730), 包括 76 bp 的 5'端非翻译区(5'UTR), 309 bp 的 3'端非翻译区(3'UTR), 开放阅读框长度为 1 950 bp, 可编码 649 个氨基酸残基。3'UTR 区有典型的多聚腺苷酸加尾信号序列 AATAAA 和 PolyA 尾(图 1)。使用蛋白分析软件 Antheprot 2000 分析特征序列,

表 1 本研究所用引物序列
Tab. 1 Sequences of primers used in the study

引物 primer	序列(5'–3') sequence(5'–3')	产物长度/bp product length
M13F	GTAAAACGACGGCCAGT	1 462
M13R	AAACAGCTATGACCATGTTCA	
Schsp70-F	CCTTGCTCAATCGTCCCTTGTCAT	
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT (long)	1 613
	CTAATACGACTCACTATAGGGC (short)	
hsp70F	TCAGGGAAACAGGACCACA	368
hsp70R	GCTGGGAGTCGTTGAAGTAA	
18S-F	TCGGTTCTATTGCGTTGGTTTT	220
18S-R	CAGTTGGCATCGTTTATGGTCA	

```

1          acatggggaaccaggg
17  ttttgatcagtgaaagttcgaagaagatcacaaagaacaaagaacctcaccaaccagaga
77  ATGGCAAAGGCACCAAGCAGTCGGTATTGATTTGGGAACCACTATTCTGCGTGGGGGTG
    M A K A P A V G I D L G T T Y S C V G V
137  TTCCAGCATGGCAAAGTTGAGATCATTGCAAAACGATCAGGGAAACAGGACCAACAAAGT
    F Q H G K V E I I A N D Q G N R T T P S
197  TATGTGGCATTACAGACACCGAGCGATTGATCGGTGATGCTGCTAAGAACAGGTCGCC
    Y V A F T D T E R L I G D A A K N Q V A
257  ATGAACCCCAACAAACACAGTCTTTGATGCTAAGCGTTTAATTGGCCGAAAGTTTGAGGAT
    M N P T N T V F D A K R L I G R K F E D
317  GCTGCAGTTCAAGCAGATATGAAGCACTGGCCATTACGGTAAAAAGTATGGTGGCAAA
    A A V Q A D M K H W P F T V K S D G G K
377  CCAAAGATTGAAGTTGAATATAAGGGAGAGACAAAAACGTTTACCCAGAAGAAGTCTCT
    P K I E V E Y K G E T K T F Y P E E V S
437  TCCATGGTTCTCAGAAAAATGAAGGAACTGCAGAGGCTTACCTCGGAAAGACTGTTACC
    S M V L T K M K E T A E A Y L G K T V T
497  AACCGGCTAGTCACAGTACCAGCTTACTTCAACGACTCCACGCGACAGGCCACCAAGGAT
    N A V V T V P A Y F N D S Q R Q A T K D
557  GCTGGAACCTATTCTGGTCTTAATGTACTCCGTATCATCAATGAACCCACAGCTGCTGCC
    A G T I S G L N V L R I I N E P T A A A
617  ATTGCCTATGGTCTCGACAAGAAGTTGGCGGTGAGAGGAATGTCTCATCTTCGACTTA
    I A Y G L D K K V G G E R N V L I F D S
677  GGAGGCGGTACCTTTGATGTATCTATTCTACCATTTGAAGATGGCATCTTCGAGGTGAAA
    G G G T F D V S I L T I E D G I F E V K
737  TCCACATCAGGTGACACCACTTGGGTGGTGAAGACTTTGACAAATCGCATGGTGAACAC
    S T S G D T H L G G E D F D N R M V N H
797  TTCATCCAGGAGTTCAAACGCAACACAAGAAAGACATGAGTGACAACAAACGTGTGTG
    F I Q E F K R K H K K D M S D N K R A V
857  CGTCGTCTGCTACTGCTGTGAAGGGCGAAGAGAACTCTGTATCCAGCACACAGGCC
    R R L R T A C E R A K R T L S S S T Q Q
917  AGCATTGAAATCGACTCTTTGTTTGGGGTATTGACTTCTACACTAGCATCACCAGAGCC
    S I E I D S L F E G I D F Y T S I T R A
977  AGGTTTGAGGAGCTCAATGCAGATCTGTTCCGTGGCACCCTGGAACAGTTGAGAAAGTCC
    R F E E L N A D L F R G T L E P V E K S
1037  CTTTCGCGATGCCAAGATGGACAAGTCTGGCGTCAATGAGATTGTCTTGGTTGGTGGCTCC
    L R D A K M D K S G V N E I V L V G G S
1097  ACACGTATCCCAAGATCCAGAAGTTGTCCAGGACTTCTCAATGGCAAGGAGCTGAAT
    T R I P K I Q K L L Q D F F N G K E L N
1157  AAGAGCATCAACCTTGATGAGGCCGTCGCTATGGTGCAGCTGCCAGGCTGCCATCTTG
    A S I N P D E A V A Y G A A V Q A A I L
1217  CACGGAGACAAGTCCGAGGAGGTGACAGGATCTCTTGTGTTGGACGTCACTCCCTGTCA
    H G D K S E E V Q D L L L L D V T P L S
1277  CTCGGTATCGAGACCGCCGAGGTGTGATGACGTCCTCATCAAGAGGAACACCACCATC
    L G I E T A G G V M T S L I K R N T T I
1337  CCCACAAAACAGACCCAAACATTACCACTACTCAGACAATCAGCCAGGTGTGCTCATC
    P T K Q T Q T F T T Y S D N Q P G V L I
1397  CAGGTGTTTGAAGGAGCGAGCCATGACCAAGGACAATAATTGCTTGGGAAGTTTGAG
    Q V F E G E R A M T K D N N L L G K F E
1457  CTCACAGGCATTCCACAGCACCTCGAGGTGTACCCAGATTGAGGTACCTTTGACATT
    L T G I P P A P R G V P Q I E V T F D I
1517  GATGCCAACGGTATCCTGAACGTCTCTGCCACCGACAAGAGTACTGGCAAGGAGAACAAG
    D A N G I L N V S A T D K S T G K E N K
1577  ATCACCATCACAATGACAAGGACGATTGAGCAAGGATGAGATCGACAGAATGGTGAAT
    I T I T N D K G R L S K D E I D R M V N
1637  GATGCAGAGAAGTACAAGAACGAGGATGAGAACCAGAAGAACCAGCATCCAGGCCAAGAAC
    D A E K Y K N E D E N Q K N R I Q A K N
1697  CAGCTGGAGAGTTACTCATTTAATGAAGTCAACAGTAGAGGATGAGAACTAAAGGAC
    Q L E S Y S F N M K S T V E D E K L K D
1757  AAGATCAGTGAAGAAGACAAGAAAGTTATTCTGGACAAGTGCAATGATGTGATCCACTGG
    K I S E E D K K V I L D K C N D V I H W
1817  CTGGACGGTAACCAAGTGGCCGAGAAAGAGGAGTTGAGTCTAAGCAGAAAGGAAGTGGAG
    L D G N Q L A E K E E F E S K Q K E L E
1877  GGTGTATGCAACCCCATCATCACCAGCTGTACGCCGCCAGCGAGGTGCCCAAGGAGGT
    G V C N P I I T K L Y A A S G G A P G G
1937  ATGCCCGCGGTGCACCAACTTTGGTGGGGCTGGTGGTGCAGCTCCCGGTGGTGCCTCC
    M P G G A P N F G G A G G A A P G G A S
1997  CAAGGACCAACCATTGAAGAGGTGCGACTAAcaaccatcctcctacacatatcagacttcc
    Q G P T I E E V D *
    tgaacaaaacatgtttaccatctgtgtgttagttttacaactttcttggacttcacagaa
    tatttcaaaaatttatgatttccttaaatgtcagtttaagtcaaaaaaaaaaattttttt
    tgtgaatatgtgtccagaaaaaatcgtttcattttcattttcattccatcattat
    ttattcaattgtttgttacgtctgtttataacagacatgtgatcatgacctgaataaaaa
    caaaacagctcttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 1 缙蛭 *ScHsc70* 编码基因 cDNA 全长及推导的氨基酸序列

小写字母代表 3'、5'端非翻译区；大写字母代表编码区；粗体字母表示多聚腺苷酸加尾信号位点 AATAAA；*表示终止密码子；斜体部分为糖基化位点；下划线为签名序列及 C 端保守序列；方框部分为 ATP-GTP 结合位点；双下划线为 GGXP 四肽重复序列。

Fig.1 Full-length of cDNA and deduced amino acid sequence of *ScHsc70* gene from *Sinonovacula constricta*
3'and 5' untranslated regions are shown as small letters. Coding region is shown as capital letters. A putative polyadenylation signals (AATAAA) is bolded. Stop codon is marked with asterisk. Glycosylation sites are italic. Three signatures and one conserved sequence at carboxyl terminal are underlined. A putative ATP-GTP binding site is in box. Four terapeptides of GGXP at carboxyl terminal region are double underlined.

可找到 HSP70 家族的 3 个签名序列: IDLGTTYS、IFDLGGGTFDVSIL 和 IVLVGGST RIPKIQK, 以及 C 末端的细胞质特异性调控基序 EEVD^[14, 29–30]和 2 个糖基化位点: NKSI 和 NVSA^[31] (图 1)。同时发现 1 个 ATP-GTP 结合位点, 且 C 末端具有 GGXP 四肽重复序列^[32](图 1)。

推导得到多肽共有 649 个氨基酸, 分子量大约为 70.89 kD, 理论等电点为 5.28。甘氨酸(Gly)、赖氨酸(Lys)、丙氨酸(Ala)和谷氨酸(Glu)含量最高, 分别为 8.8%、8.6%、7.9%和 7.9%; 色氨酸(Trp)、半胱氨酸(Cys)和组氨酸(His)含量最少, 分别为 0.3%、0.6%和 1.1%(图 2)。带负电荷氨基酸残基 (Asp + Glu)97 个, 带正电荷氨基酸残基 (Arg + Lys) 82 个。脂肪族氨基酸指数为 78.75, 原子总量 9 963, 分子式为 C₃₁₀₅H₄₉₈₂N₈₅₈O₁₀₀₁S₁₇。不稳定指数为 34.38, 显示此蛋白质性质稳定。SignalP 程序中 NN 和 HMM 模型对信号肽的分析结果显示无

信号肽。跨膜结构预测结果显示其无跨膜结构。基于氨基酸序列采用 MEGA 4.0 软件以 NJ 法构建了双壳贝类 HSP70 家族的系统进化树(图 3), 每种贝类的 HSP70/HSC70 蛋白的缩写及 GenBank 登录号见表 2。结果显示, 系统树分为 A 和 B 两大支, 缢蛏归属于 A 大支内, 其与南极帽贝(*Laternula elliptica*)、文蛤(*Meretrix meretrix*)的亲缘关系最近。同时发现, B 大支中只有诱导型 HSP70, 而 A 大支囊括了诱导型 HSP70 和组成型 HSC70 两种类型。用 Bioedit 软件^[33]将以上 HSP70 家族基因的 C 末端区域进行比对(图 4), 结果显示, 在 A 大支中, 每个基因含有多个 GGXP 四肽重复序列以及 C 末端保守的 GPTIEEVD 序列; 而在 B 大支中两种特征序列均未发现。

2.2 缢蛏 *ScHsc70* 基因在各组织和各时间点的荧光定量表达分析结果

以 18S rRNA 为内参基因, 荧光定量 PCR 检

表 2 用于系统进化和序列比对分析的蛋白序列信息
Tab. 2 Information of the protein sequences used in phylogenetic and alignment analysis

蛋白缩写 protein abbreviation	编码基因名称 name of encoding gene	GenBank 登录号 accession number
CgHsp70	长牡蛎 <i>hsp70 Crassostrea gigas hsp70</i>	CAC83009
CgHsc70	长牡蛎 <i>hsc70 Crassostrea gigas hsc70</i>	CAC83683
CgHsp72	长牡蛎 <i>hsp72 Crassostrea gigas hsp72</i>	AAD31042
CgHsp70-1	长牡蛎 <i>hsp70-1 Crassostrea gigas hsp70-1</i>	BAD15286
CgHsc71	长牡蛎 <i>hsc71 Crassostrea gigas hsc71</i>	BAD15287
CvHsp70	维吉尼亚美东牡蛎 <i>hsp70 Crassostrea virginica hsp70</i>	CAB89802
CaHsp70	近江牡蛎 <i>hsp70 Crassostrea ariakensis hsp70</i>	AAO41703
OeHsp69-D2	欧洲牡蛎 <i>hsp69-D2 Ostrea edulis hsp69, clone D2</i>	AAM46635
OeHsp69-5	欧洲牡蛎 <i>hsp69-5 Ostrea edulis hsp69, clone 5</i>	AAM46634
OeHsp70	欧洲牡蛎 <i>hsp70 Ostrea edulis hsp70</i>	CAC83010
OeHsc70	欧洲牡蛎 <i>hsc70 Ostrea edulis hsc70</i>	CAC83684
PvHsp71	翡翠贻贝 <i>hsp71 Perna viridis hsp71</i>	ABJ98722
MgHsp70	紫贻贝 <i>hsp70 Mytilus galloprovincialis hsp70</i>	AAW52766
MgHsc71	紫贻贝 <i>hsc71 Mytilus galloprovincialis hsc71</i>	CAH04109
MgHsp70-1	紫贻贝 <i>hsp70-1 Mytilus galloprovincialis hsp70-1</i>	CAE51348
MgHsp70-2	紫贻贝 <i>hsp70-2 Mytilus galloprovincialis hsp70-2</i>	CAH04106
MgHsp70-3	紫贻贝 <i>hsp70-3 Mytilus galloprovincialis hsp70-3</i>	CAH04107
MgHsp70-4	紫贻贝 <i>hsp70-4 Mytilus galloprovincialis hsp70-4</i>	CAH04108
AiHsp70	海湾扇贝 <i>hsp70 Argopecten irradians hsp70</i>	AAS17723
CfHsp70	栉孔扇贝 <i>hsp70 Chlamys farreri hsp70</i>	AAO38780
MyHsp70	虾夷扇贝 <i>hsp70 Mizuhopecten yessoensis hsp70</i>	AAS17724
MmeHsp71	文蛤 <i>hsp71 Meretrix meretrix hsp71</i>	HQ256748
LeHsp70	南极帽贝 <i>hsp70 Laternula elliptica hsp70</i>	ABM92345

测缢蛏 *ScHsc70* 基因在水管、鳃、斧足、外套膜、肝、性腺 6 个组织中的表达, 结果显示 *ScHsc70* 基因在水管中表达量最高, 依次是肝、性腺、鳃、斧足和外套膜; 水管与斧足, 外套膜与水管、肝、

性腺间表达量存在着显著差异($P<0.05$, 图 5)。
以 18S rRNA 为内参基因, 荧光定量 PCR 检测经副溶血弧菌和鳃弧菌诱导后, 缢蛏肝组织中 *ScHsc70* mRNA 的表达。结果显示, 在感染后

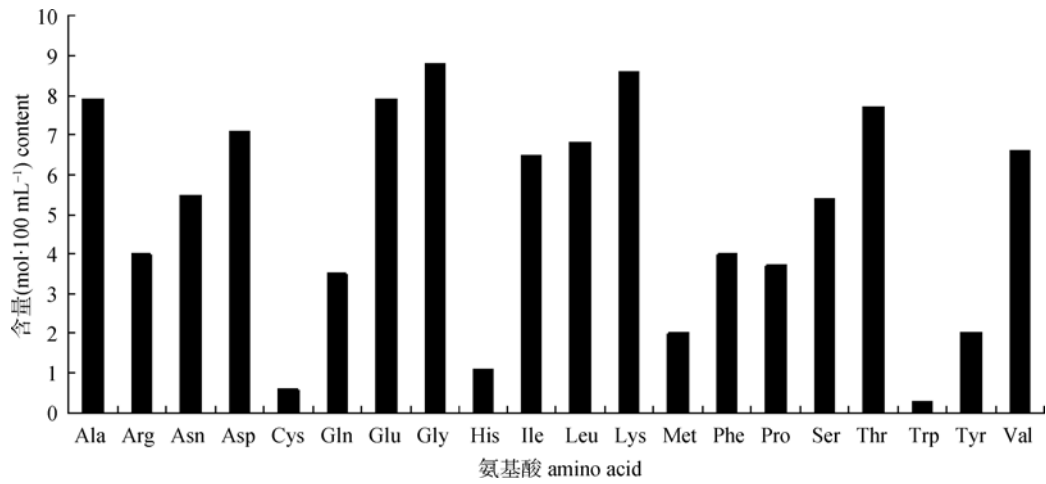


图 2 缢蛏 *ScHsc70* 的氨基酸组成
Fig.2 Amino acid composition of *ScHsc70* from *Sinonovacula constricta*

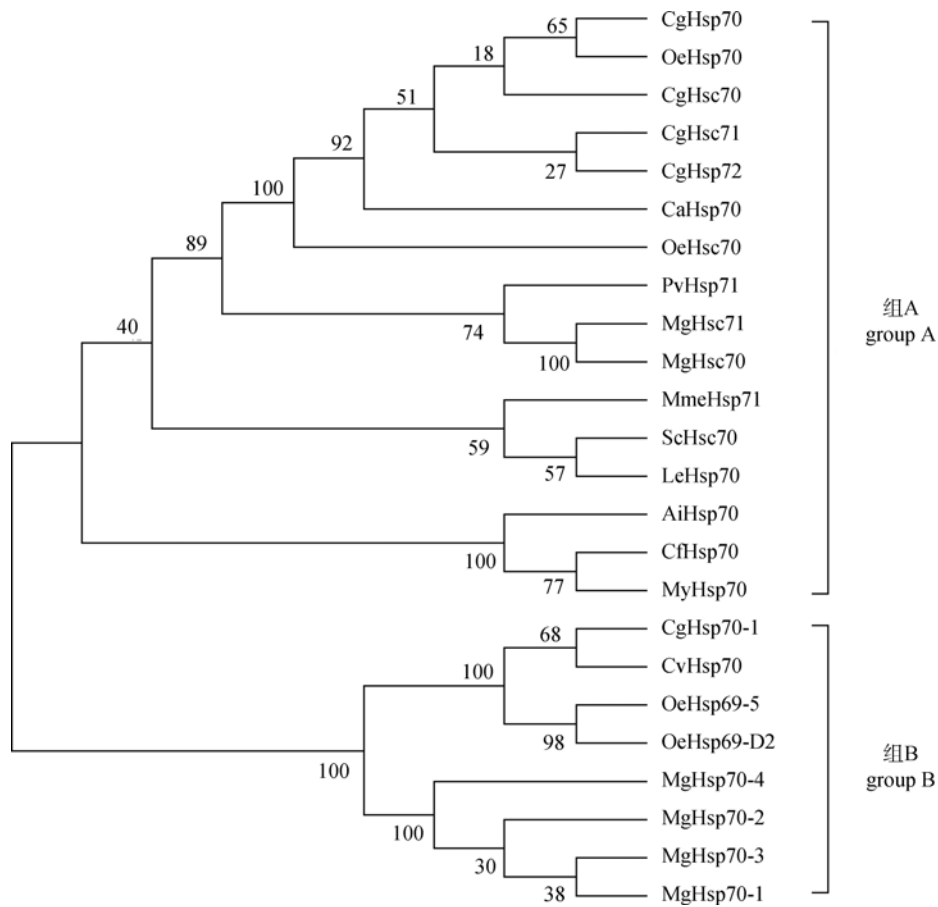


图 3 根据缢蛏 *ScHsc70* 和其他双壳贝类的 HSP70 氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树
Fig. 3 NJ phylogenetic tree depicting the relationship between *ScHsc70* and other bivalve HSP70 sequences

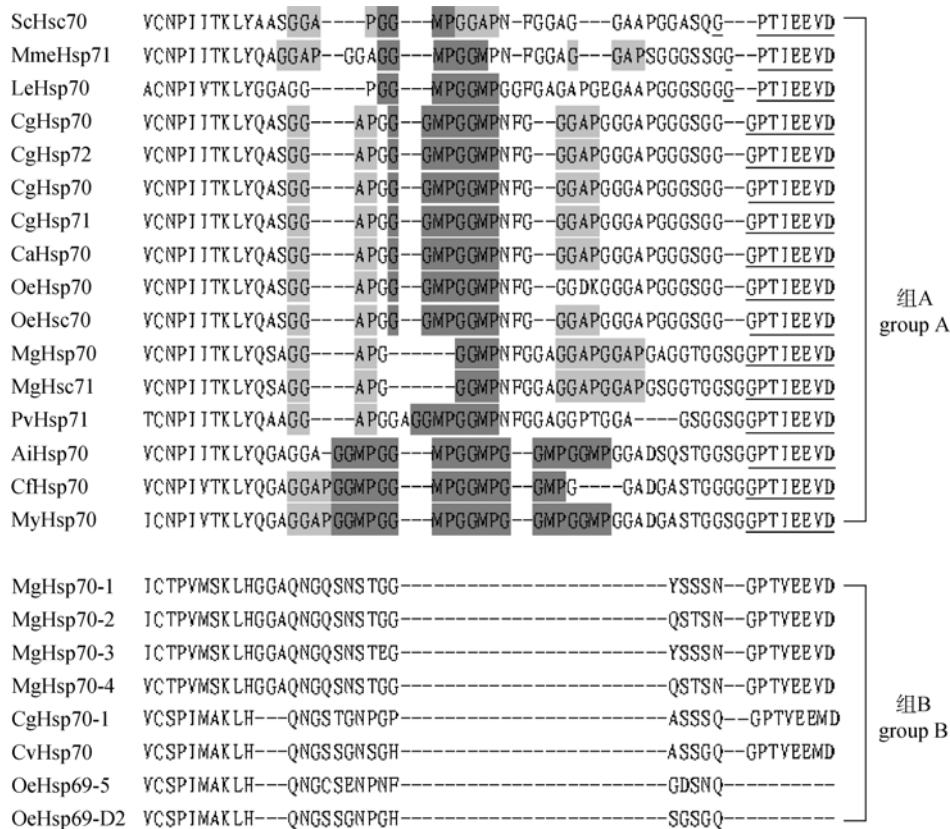


图 4 缢蛏 *ScHsc70* 和其他双壳贝类的 HSP70s C 末端区域的氨基酸序列比对结果
灰色背景为 GGXP 四肽重复序列; 下划线为 C 端保守序列 GPTIEEVD.

Fig.4 Alignment of carboxyl terminal region of amino acid sequences of *ScHsc70* and other bivalve HSP70s
Four terapeptides of GGXP at carboxyl terminal region are in gray. One conserved sequence of GPTIEEVD at carboxyl terminal is underlined.

4~72 h, 相对于空白对照组, 注射对照组、副溶血弧菌组和鳃弧菌组的表达均上调, 且注射对照组和副溶血弧菌组在感染后 20 h 达到最大值, 而鳃弧菌组在感染后 30 h 达到最大值。在感染后 4、12 和 20 h, 副溶血弧菌组与注射对照组的表达量间存在显著差异($P<0.05$); 而在感染后 4、8、12、20、30 和 48 h, 鳃弧菌组与注射对照组的表达量间存在显著差异($P<0.05$, 图 6)。

3 讨论

HSP70 家族是 HSPs 中含量最丰富的一个家族, 序列高度保守。现已有大量研究表明 HSP70 与生物的热耐受、免疫、病原感染及环境适应密切相关^[34]。细胞质中的 HSP70 家族基因包含了组成型 HSC70(Heat shock cognate 70)和诱导型 HSP70 两种亚家族。不同的 HSP70 基因具有不同的蛋白功能, Tavarria 等^[35]发现在人类中至少存在

11 种编码不同蛋白功能的 HSP70 基因。近些年来, 越来越多的贝类 HSP70 家族基因被发现和研

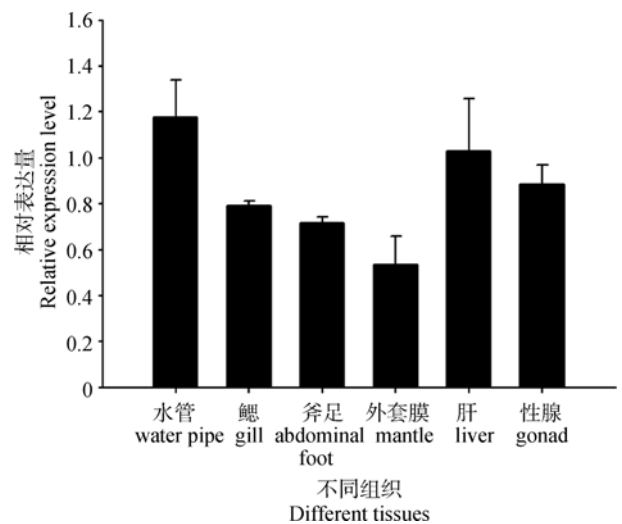


图 5 基于荧光定量 PCR 检测的 *ScHsc70* 基因在各组织中的表达水平

Fig.5 *ScHsc70* mRNA expression level in different tissues detected by qRT-PCR

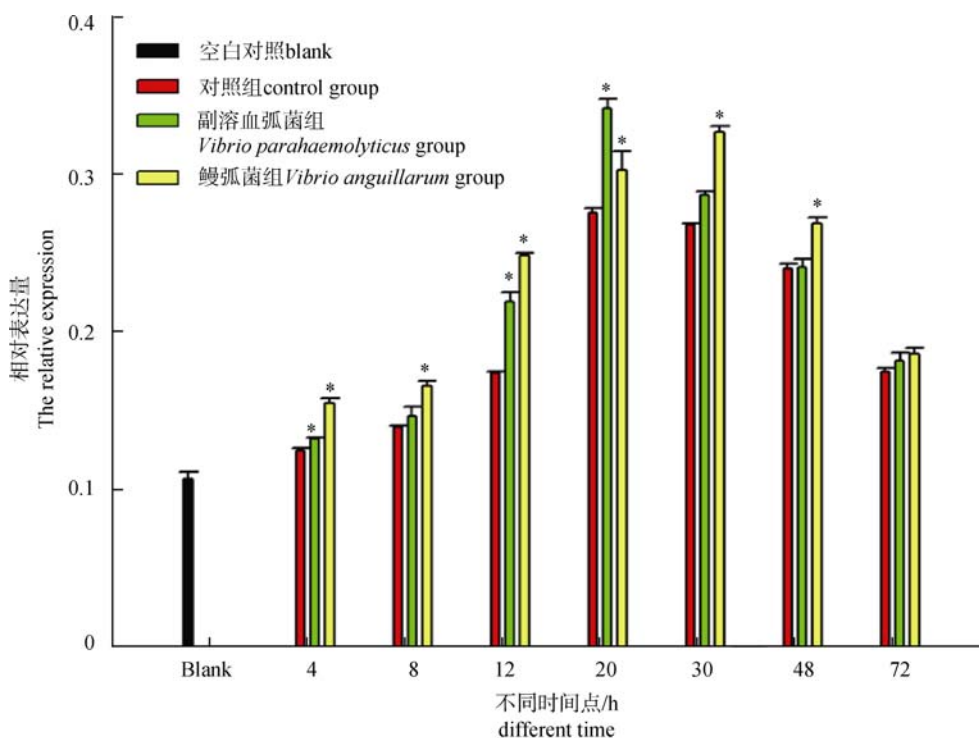


图 6 基于荧光定量 PCR 检测细菌诱导后不同时间点 *ScHsc70* 基因在肝中的表达水平

*表示在同一时间点处理组与对照组差异显著($P < 0.05$).

Fig.6 *ScHsc70* mRNA expression level in liver after bacterium induction at different time detected by qRT-PCR

* means significant difference between challenged group and control group at the same time($P < 0.05$).

究^[11-19]。为深入研究贝类不同 HSP70 基因的功能,有必要首先明确其所属类型。本研究获得了缢蛏 HSP70 家族中一个 HSC70 的完整 cDNA 序列,其具有 HSP70 家族典型的 3 个保守的签名序列 IDLGTTYS、IFDLGGGTFDVSIL 和 IVLVGGSTR IPKIQK 以及 C 末端的细胞质特异性调控基序 EEVD。Wu 等^[32]认为靠近 HSP70 家族基因 C 端是否含有多个 GGXP 四肽重复序列是区分组成型 HSC70 和诱导型 HSP70 两个亚家族的标志之一。基于氨基酸序列构建的缢蛏 *ScHsc70* 和其他双壳贝类 HSP70 家族的系统进化树显示,该系统树分为 A 和 B 两大支,缢蛏归属于 A 大支。A、B 两大支所有的 HSP70 家族蛋白的 C 末端区域比对结果显示,在 A 大支中,每个蛋白含有多个 GGXP 四肽重复序列,而在 B 大支中不存在 GGXP 四肽序列。另外,将已获得的同一物种的 *HSC70* 和 *HSP70* 基因编码的氨基酸序列进行比较发现,一般由 *HSC70* 基因编码的氨基酸序列比由 *HSP70*

基因编码的序列长^[13-14,35-38]。缢蛏 *ScHsc70* 基因编码 649 个氨基酸残基,其属于相对较长的一类。以上结果表明,本研究得到的 *ScHsc70* 基因属于组成型 HSC70 亚家族成员之一。

荧光定量 PCR 检测结果显示, *ScHsp70* mRNA 在健康缢蛏各组织中均有表达,而且在水管和肝中表达量相对较高。缢蛏具二条水管,它是体内和外界联系的唯一通道,一条是水和食物进入的进水管,而另一条是具有排水和泄殖功用的出水管,易受到外界的应激刺激,可能是导致 *ScHsp70* mRNA 表达量较高的原因。肝组织是无脊椎动物重要的免疫器官, *ScHsp70* mRNA 在肝中的高水平表达表明该基因有可能参与缢蛏的免疫防御过程。由于组成型 HSC70 亚家族包含多个成员, Ali 等^[39]克隆获得鲤(*Cyprinus carpio*)的 2 个 *HSC70* 基因(*hsc70-1*、*hsc70-2*),对它们的表达分析发现, *hsc70-1* 在肌肉中的表达量相对较高,而 *hsc70-2* 在肝中的表达量相对较高。 *ScHsp70*

mRNA 在肝中的高表达, 预示着本次获得的缢蛏 *HSC70* 基因可能是一个与鲤 *hsc70-2* 基因功能类似的组成型 HSC70 亚家族成员。有研究表明, HSP70 家族在应激及正常状况下都有表达, 而且此蛋白的合成主要在转录水平上进行调节^[34, 40]。本研究中缢蛏水管与斧足间, 外套膜与水管、肝、性腺间表达量存在着显著差异($P < 0.05$), 表明缢蛏 *ScHsc70* 基因具有组织特异性表达模式。

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^[41]。本研究结果显示, 在细菌感染后的第 4~72 小时, *ScHsp70* mRNA 在肝中的表达量均上调, 其中注射对照组和副溶血弧菌组在感染后的第 20 小时达到最大值, 然后逐渐下降; 而鳃弧菌组在感染后的第 30 小时达到最大值, 然后逐渐下降。同时, 在副溶血弧菌感染后的第 4、12、20 小时, 副溶血弧菌组与注射对照组的表达量间存在显著差异($P < 0.05$); 除在鳃弧菌感染后的第 72 小时外, 其余各时间点的检测结果都显示鳃弧菌组与注射对照组的表达量间存在显著差异($P < 0.05$)。此结果与前人在其他软体动物中的研究结果类似, 均具有明显的时间依赖性, 且呈现先升高后下降的趋势^[17, 20-21, 42-43]。

近年来, 由于养殖环境不断遭到破坏, 海洋动物病害频繁爆发^[44]。因此开展海洋动物免疫和应激反应机理研究正逐渐成为一个重要的研究领域^[18]。热休克蛋白被认为是最具有免疫耐受性的分子, 可产生针对不同病原体的交叉免疫反应, 起到阻止病原体的侵袭与繁殖的保护作用^[45]。本研究中发现, 副溶血弧菌和鳃弧菌均能使缢蛏 *ScHsc70* mRNA 表达上调, 表明该基因可能参与了对细菌感染的防御反应, 这为今后开展缢蛏的抗病选择育种提供了一定的理论依据。下一步尚需从蛋白水平研究 *ScHsc70* 基因的表达及功能。

参考文献:

[1] Stephen W, Carper, John J, et al. Heat shock proteins in thermo-tolerance and other cellular processes[J]. Cancer Res,

1987, 47(20): 5249-5255.

- [2] Zhang A Y, Zhou X F, Wang X Y, et al. Characterization of two heat shock proteins (Hsp70/Hsc70) from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): Evidence for their differential gene expression, protein synthesis and secretion in LPS-challenged peripheral blood lymphocytes[J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2011, 159(2): 109-114.
- [3] Boston R S, Viitanen P V, Vierling E. Molecular chaperones and protein folding in plant[J]. Plant Mol Biol, 1996, 32(1-2): 191-222.
- [4] Diamant S, Peres Ben-Zvi A, Bukau B, et al. Size-dependent disaggregation of stable protein aggregates by the DnaK chaperone machinery[J]. J Biol Chem, 2000, 275(21): 107-113.
- [5] Beere H I, Wolf B B, Cain K, et al. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome[J]. Nat Cell Biol, 2000, 2(8): 469-475.
- [6] Yin Y M, Qin Q L, Zhang W, et al. Overexpression of heat shock protein 70 and spontaneous cancer cell apoptosis in hepatocellular carcinoma[J]. Chin J Hepatol, 2001, 9(2): 84-85.
- [7] Hiratsuka M, Mora B N, Yano M, et al. Gene transfer of heat shock protein 70 protects lung grafts from ischemia-reperfusion injury[J]. Ann Thome Surg, 1999, 67(5): 1421-1427.
- [8] Schett G, Redlich K, Xu Q, et al. Enhanced expression of heat shock protein 70(HSP 70) and heat shock factor 1(HSF1) activation in rheumatoid arthritis synovial tissue. Differential regulation of hsp70 expression and hsf1 activation in synovial fibroblasts by proinflammatory cytokines, shear, stress, and antiinflammatory drugs[J]. J Clin Invest, 1998, 102(2): 302-311.
- [9] Chan J Y, Ou C C, Wang L L, et al. Heat shock protein 70 confers cardiovascular protection during endotoxemia via inhibition of nuclear factor-kappaB activation and inducible nitric oxide synthase expression in the rostral ventrolateral medulla[J]. Circulation, 2004, 110(23): 3560-3566.
- [10] 程培周. 皱纹盘鲍热休克蛋白 70 基因的克隆、表达及应用[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2006: 1-132.
- [11] Gourdon I, Gricourt L, Kellner K, et al. Characterization of a cDNA encoding a 72 kDa heat shock cognate protein (Hsc72)

- from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. DNA Seq, 2000, 11(3-4): 265-270.
- [12] Rathinam A V, Chen T T, Grossfeld R M. 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.
- [13] 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 Chaperones, 2003, 8(1): 76-85.
- [14] Boutet I, Tanguy A, Moraga D. Organization and nucleotide sequence of the European flat oyster *Ostrea edulis* heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (hsp70) genes[J]. Aquat Toxicol, 2003, 65(2): 221-225.
- [15] Piano A, Franzellitti S, Tinti F, et al. Sequencing and expression pattern of inducible heat shock gene products in the European flat oyster, *Ostrea edulis*[J]. Gene, 2005, 361: 119-126.
- [16] 吴龙涛, 宋林生, 胥炜, 等. 栉孔扇贝热休克蛋白 70 基因 cDNA 的克隆与分析[J]. 高技术通讯, 2003, 13(11): 75-79.
- [17] Song L S, Wu L T, Ni D J, et al. The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop(*Argopecten irradians*, Lamarck 1819) responding to bacteria challenge and naphthalin stress[J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 21(4): 335-345.
- [18] Luedeking A, Koehler A. Regulation of expression of multitoxinobiotic resistance(MXR) genes by environmental factors in the blue mussel *Mytilus edulis*[J]. Aquat Toxicol, 2004, 69(1): 1-10.
- [19] Kourtidis A, Drosopoulou E, Nikolaidis N, et al. Identification of several cytoplasmic HSP70 genes from the Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and their long-term evolution in Mollusca and Metazoa[J]. J Mol Evol, 2006, 62(4): 446-459.
- [20] Cellura C, Toubiana M, Parrinello N, et al. HSP70 gene expression in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes is triggered by moderate heat shock and *Vibrio anguillarum*, but not by *V. splendidus* or *Micrococcus lysodeikticus*[J]. Dev Comp Immunol, 2006, 30(11): 984-997.
- [21] Yue X, Liu B Z, Sun li, et al. Cloning and characterization of a hsp70 gene from Asiatic hard clam *Meretrix meretrix* which is involved in the immune response against bacterial infection[J]. Fish Shellfish Immunol, 2011, 30(3): 791-799.
- [22] 徐凤山, 张素萍. 中国海产双壳贝图志[M]. 北京: 科学出版社, 2008 : 211-213.
- [23] 王兴强, 曹梅, 阎斌伦. 缢蛏 *Sinonovacula constricta* (Lamarck) 养殖期间发病原因及防治对策[J]. 现代渔业信息, 2006, 21(5): 13-16.
- [24] 邱静, 谢李珍, 傅兴隆, 等. 缢蛏副溶血弧菌的分离与鉴定[J]. 安徽农学通报, 2010, 16(12): 46-47.
- [25] Wang H, Song L, Li C, et al. Cloning and characterization of a novel C-type lectin from Zhikong scallop *Chlamys farreri* [J]. Mol Immunol, 2007, 44(5): 722-731.
- [26] Luo T, Yang H, Li F, et al. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*[J]. Dev Comp Immunol, 2006, 30: 607-617.
- [27] Pan D, He N, Yang Z, et al. Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization[J]. Dev Comp Immunol, 2005, 29(2): 103-112.
- [28] Feng B B, Dong L L, Niu D H, et al. Identification of Immune Genes of the Agamaki Clam(*Sinonovacula constricta*) by Sequencing and Bioinformatic Analysis of ESTs[J]. Mar Biotechnol, 2010, 12: 282-291.
- [29] Gupta R S, Singh B. Phylogenetic analysis of 70 kD heat shock protein sequences suggests a chimeric origin for the eukaryotic cell nucleus[J]. Curr Biol, 1994, 4(12): 1104-1114.
- [30] Boorstein W R, Ziegelhoffer T, Craig E A. Molecular evolution of the HSP70 multigene family[J]. J Mol Evol, 1994, 38(1): 1-17.
- [31] 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.
- [32] Wu S J, Liu F H, Hu S M, et al. Different combinations of the heat-shock cognate protein 70 (hsc70) C-terminal functional groups are utilized to interact with distinct tetratricopeptide repeat-containing proteins[J]. Biochem J, 2001, 359(2): 419-426.

- [33] Hall T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. Nucl Acids Symp Ser, 1999, 41: 95-98.
- [34] 万文菊, 王纪亭, 石存斌, 等. 溶藻弧菌感染对剑尾鱼 HSP70 基因表达的影响[J]. 大连水产学院学报, 2007, 22(5): 330-334.
- [35] Tavaría M, Gabriele T, Kola I, et al. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family[J]. Cell Stress Chaperones, 1996, 1(1): 23-28.
- [36] Deane E E, Woo N Y. Cloning and characterization of the hsp70 multigene family from silver sea bream: modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 330(3): 776-783.
- [37] Liu J, Yang W J, Zhu X J, et al. Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Cell Stress Chaperones, 2004, 9(3): 313-323.
- [38] Ming J H, Xie J, Xu P, et al. Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 28(3): 407-418.
- [39] Ali K S, Dorgai L, Abraham M, et al. Tissue- and stressor-specific differential expression of two hsc70 genes in carp[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 307(3): 503-509.
- [40] Currie S, Tufts B. Synthesis of stress protein 70 (HSP70) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells[J]. J Exp Biol, 1997, 200(3): 607-614.
- [41] 黄桂菊, 曲妮妮, 喻达辉, 等. 合浦珠母贝热休克蛋白 hsp70 基因的克隆与表达分析[J]. 中国水产科学, 2007, 14(5): 727-732.
- [42] Wang Z L, Wu Z H, Jian J C, et al. Cloning and expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of pearl oyster (*Pinctada fucata*, Gould 1850) responding to bacterial challenge[J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 26(4): 639-645.
- [43] Cheng P, Liu X, Zhang G, et al. Cloning and expression analysis of a HSP70 gene from pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 22(1-2): 77-87.
- [44] Gao Q, Song L, Ni D, et al. cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 90 gene in the haemocytes of Zhikong scallop *Chlamys farreri*[J]. Comp Biochem Physiol B, 2007, 147(4): 704-715.
- [45] 刘思国, 王春来, 彭永刚, 等. 牛分支杆菌热休克蛋白 65 基因的分子克隆和表达[J]. 中国预防兽医学报, 2004, 26(5): 336-338.

Molecular characteristics and expression analysis of *ScHsc70* cDNA in agamaki clam (*Sinonovacula constricta*)

FENG Bingbing¹, NIU Donghong¹, ZHONG Yumin¹, CHEN Hui², LIN Guowen², LI Jiale^{1,3}

1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China;

2. Mindong Fisheries Research Institute, Ningde 352100, China;

3. Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Universities; College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Heat shock proteins consist of several families of highly conserved proteins that play an essential role in a number of cellular processes. Among the 70 kD family of heat shock proteins, heat shock cognate protein 70 kD (Hsc70) and inducible heat shock protein 70 kD (Hsp70) have been extensively studied in vertebrates and invertebrates. Several cDNAs encoding HSP70 have been described in molluscs, including the oyster (*Crassostrea gigas*), bay scallop (*Argopecten irradians*), Zhikong scallop (*Chlamys farreri*), mussel (*Mytilus galloprovincialis*), and Asiatic hard clam (*Meretrix meretrix*). Recent studies examining HSP70 expression in different species of mollusc have recognized the physiological and ecological importance of heat-shock gene expression in response to changing environments. We isolated an EST sequence with high homology with heat shock protein 70 gene from the cDNA library of *Sinonovacula constricta*. Then, the complete express sequence of this gene was obtained using PCR and 5'RACE. The cDNA of this gene was 2 335 bp, and consisted of a 76 bp 5' untranslated region (UTR), a 1 950 bp open reading frame (ORF) and a 309 bp 3' UTR. The translated protein consisted of 649 amino acids (70.89 kD) and its calculated isoelectric point was 5.28. Sequence analysis of the protein revealed that this gene contained three signature sequences of the heat shock protein 70 family (HSP70 family), two glycosylation sites and one ATP-GTP binding site. Four terapeptides of GGXP and a cytoplasm characteristic motif of EEVD were detected in the carboxyl terminal region of the deduced amino acid sequence. This HSP70 is a member of the HSC70 (constitutive genes) subfamily in the HSP70 family, and is designated as *ScHsc70*. Phylogenetic analysis suggested that the protein was most similar to those of *S. constricta*, *Laternula elliptica*, and *M. meretrix*. Quantitative reverse transcriptase (qRT-PCR) analyses revealed that *ScHsc70* mRNA was expressed constitutively in all the tissues tested. Expression was lowest in the mantle and highest in the water pipe and liver. Following challenge with *Vibrio parahaemolyticus* and *V. anguillarum*, *ScHsc70* mRNA expression first increased in the liver of *S. constricta* then decreased. Expression peaked after 20 and 30 h post-challenge with *V. parahaemolyticus* and *V. anguillarum*, respectively. There was a significant increase in *ScHsc70* mRNA in the liver of clams challenged with *V. parahaemolyticus* compared to the control group at 4, 12, and 30 h post-challenge. Similarly, there was a significant increase in *ScHsc70* mRNA levels in the liver of clams challenged with *V. anguillarum* 4, 8, 12, 20, 30, and 48 h post-challenge. Our results suggest that *ScHsc70* may play a role in the immune response of *S. constricta* to bacterial challenge.

Key words: *Sinonovacula constricta*; heat shock protein 70; sequence analysis; gene expression

Corresponding author: LI Jiale. E-mail: jlli2009@126.com, jlli@shou.edu.cn