

热应激对剑尾鱼 HSP70 家族两成员基因表达的影响

万文菊^{1,2,3}, 石存斌¹, 王纪亭², 柴同杰², 吴淑勤¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380; 2. 山东农业大学 动物科技学院, 山东 泰安 271018; 3. 泰山医学院, 山东 泰安 271000)

摘要:采用 RT-PCR 方法扩增实验动物剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)纯系 RR-B 的 HSP70 家族两个成员的 cDNA 片段,并将其克隆到 PMD18-T 载体中测序,将测序结果与 GenBank 中的核苷酸序列和推导的氨基酸序列进行同源性比较。同时利用 RT-PCR 半定量方法研究热应激时两个成员在剑尾鱼组织中的表达。通过克隆获得了剑尾鱼的 HSP70 家族两个新成员的 cDNA 片段,两序列均包含 HSP70 家族的特征性签名序列和热休克蛋白的定位序列;通过对克隆片段与已发表的青鳉(*Oryzias latipes*)等鱼类 HSP70 的核苷酸序列和其编码的氨基酸序列同源性比较,发现核苷酸序列同源性较高,成员一和成员二分别为 85%~89% 和 82%~99%;氨基酸序列同源性更高,成员一和成员二分别为 97%~99% 和 93%~99%。一般条件下,两成员在剑尾鱼肝脏、脾脏、肾脏和心脏中不表达,但热应激能刺激成员一在剑尾鱼脾脏中表达,成员二在肝脏、脾脏、肾脏和心脏中强烈表达,并可能在参与热应激保护方面起更大作用。[中国水产科学,2006,13(6):929-935]

关键词:HSP70; 热应激; 剑尾鱼; 克隆; 基因表达

中图分类号:Q959.475

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2006)06-0929-07

热应激蛋白(HSPs)是生物体内与抗逆相关的一类十分重要的蛋白,作为一种在进化过程中有高度保守性的应激蛋白,对维持机体的自身稳定性起着重要作用。除高温诱导外,许多损伤因素、应激刺激(如缺氧、重金属离子、病毒感染、DNA 损伤、自由基)都可以导致细胞发生热休克反应^[1-2],从而诱导热休克蛋白的合成^[3]。HSPs 是最保守的蛋白之一,如大肠杆菌的 HSP70 与人的 HSP70 有 50% 的同源性^[4]。近来研究表明,HSP70 不仅是分子伴侣,而且是细胞因子,在人的单核细胞中诱导强有力的前炎症反应^[5]。

剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)属花鳉科、剑尾鱼属,是一种热带淡水小型鱼类。其体形小、食性杂,便于在实验室内饲养管理,并且繁殖周期短、繁殖力强,可在较短时间内获得大量个体,符合实验动物培养对象的必要条件。中国水产科学研究院珠江水产研究所经过十几年对剑尾鱼水生实验动物化相关问题的研究,建立 5 个不同体征剑尾鱼培育系,其中 RR-B 系(红眼体红)已攻克“近交衰退”障碍渡过生殖难关,纯系培育到第 26 代,通过了全国水产原良种审定委员会的审定,并由农业部第 348 号公告颁布,剑尾

鱼是中国首个通过审定的鱼类实验动物,填补了国内无水生纯系实验动物的空白^[6]。实验证明,经过培育的水生实验动物剑尾鱼,在水环境污染监测、水中化学物质的生物积累、生物医学以及药物评价等多个研究领域扮演着重要角色^[7]。但是,有关剑尾鱼热应激基因及其蛋白的研究,目前尚未见报道。

本研究以剑尾鱼 RR-B 系标准化实验动物为研究对象,克隆剑尾鱼的两个 HSP70 家族成员 cDNA 的部分序列,并且在热应激对两成员在剑尾鱼组织中表达方面进行较详细的研究,旨在开展与抗逆相关的一些研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 剑尾鱼总 RNA 提取

剑尾鱼 RR-B 系,体长 5~7 cm,体质量 2.0~4.0 g,为中国水产科学研究院珠江水产研究所培育。根据有关研究证明,可诱导表达 HSP70 的温度与鱼类的可耐受的溫度直接相关^[8],经过本实验室实验确定 36℃ 为较佳的热应激温度。取鲜活健康的剑尾鱼(体质量约 3 g)在实验室内暂养 2 天后(水温约 25℃,气泵充气),将其放入 36℃、1.5 h 进行热应

收稿日期:2006-01-16; 修订日期:2006-04-07。

基金项目:国家公益研究专项资金项目(2004BIB1J029)。

作者简介:万文菊(1971-),女,博士研究生,研究方向:微生物和免疫。E-mail:wwenju2003@yahoo.com.cn

通讯作者:吴淑勤。E-mail:wushuqin001@21cn.com

激,然后在室温下(25 ℃)放置6 h。取出剑尾鱼,用0.1%的高锰酸钾消毒,再用75%的酒精棉球擦洗,置于无菌的托盘上,解剖鱼体取出脾脏,立即用于总RNA的提取。总RNA提取采用总RNA提取试剂盒(Promega公司)。提纯的RNA,通过琼脂糖电泳进行鉴定后,贮于-70 ℃冰箱,备用。

1.2 引物设计与RT-PCR分析

根据已发表的鱼的热休克蛋白70(HSP70) cDNA序列参考文献,设计成员一简并引物,上游引物(P1):5' TCA CAG TT(A,C)C CAG CCT AT(C)T TCA 3',下游引物(P2):5' GAC(G)GTG(A)TAG(A)AAGTCGAT(C)G(T)CCC 3',根据近缘动物新月鱼(*Xiphophorus maculatus*) (GenBank注册号:AB062115.1)设计成员二引物,上游引物(P3):5' CCTGGGCACTACCTACTCTT 3',下游引物(P4):5' ATGGTGCTGTTCTCTTGAT 3'。

RT-PCR反应按试剂盒(Takara公司)说明书中的操作步骤进行,首先以总RNA为模板在AMV逆转录酶作用下合成cDNA第一条链,然后取5 μL合成液进行第一轮PCR扩增,加入相应引物、1.5 U Taq酶、5 μL 5×PCR Buffer制成25 μL的反应体系。HSP70成员一的PCR扩增反应条件:94 ℃预变性4 min;然后进行35个循环反应,其温度循环条件为:94 ℃变性30 s,50.4 ℃ 30 s,72 ℃延伸35 s;循环结束后72 ℃再延伸8 min。成员二PCR扩增反应条件:94 ℃预变性4 min;然后进行35个循环反应,其温度循环条件为:94 ℃变性30 s,48.3 ℃ 30 s,72 ℃延伸2 min;循环结束后72 ℃再延伸8 min。取5 μL PCR产物,1.5%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增结果。

1.3 PCR产物的克隆与测序

按照Agarose Gel DNA purification Kit Ver. 2.0介绍的方法回收纯化PCR产物,1.5%琼脂糖凝胶电泳检测回收产物质量,从琼脂糖凝胶中回收PCR扩增产物,连接到PMD18-T载体上,转化DH5α大肠杆菌感受态细胞,涂布Amp/X-gal/IPTG/LB平板,挑取白色菌落进行培养,进行菌落PCR鉴定。选取2个重组子,送大连宝生物公司进行序列测定,用DNA分析软件VECTOR NTI 6.0和NCBI上BLAST程序进行序列分析。

1.4 热应激对HSP70家族两成员在剑尾鱼不同组织内的表达影响

取鲜活健康的剑尾鱼(体质量约3 g)在实验室

内暂养2天后(水温约25 ℃,气泵充气),将其放入36 ℃ 1.5 h进行热应激,然后在室温下(25 ℃)放置6 h。分别取热应激前后的剑尾鱼肝脏、脾脏、肾脏和心脏组织,提取总RNA,紫外分光光度仪测定RNA浓度,琼脂糖电泳证实RNA完整性。

取等量不同组织总RNA,利用RT-PCR试剂盒(Takara)合成第一链cDNA。因β-actin基因在各个物种及组织内的高度保守性,所以将β-actin在组织内的PCR扩增产物作为参照物。参照已发表的剑尾鱼β-actin的部分序列(DQ060278),设计了一对特异性引物:上游引物:5' TGAGCAGGAAATGGGAAC 3';下游引物:5' GACAGGGAAGCCAGGATG 3'。根据测序所得序列对HSP70两成员基因设计特异性引物:成员一:上游引物:5' TCACAGTACCAGCCTATTTCA 3',下游引物:5' GAGGTGTAGAAAGTCGACGCCC 3';成员二:上游引物:5' CCTGGGCACTACCTACTCTT 3',下游引物:5' ATGGTGCTGTTCTCTTGAT 3'。加入等量的cDNA(3 μL)模板,1倍的PCR缓冲液,采用严格一致的25 μL PCR反应体系,分别对HSP70成员一、成员二和β-actin进行扩增。两个成员扩增反应条件同1.2。β-actin扩增反应条件:94 ℃预变性4 min;然后进行35个循环反应,其温度循环条件为:94 ℃变性30 s,50.4 ℃ 30 s,72 ℃延伸35 s;循环结束后72 ℃再延伸8 min。

反应完成后,从各反应体系准确吸取8 μL PCR产物,同一1.5%琼脂糖凝胶进行电泳分离,在紫外灯光下观察、拍照。应用Glyko bandscan分析系统分别测定样本HSP70及β-actin阳性条带的总灰度,并计算出HSP70/β-actin比值。

2 结果

2.1 HSP70家族两成员的序列分析

经测序后获得的两成员核苷酸序列与相应的氨基酸序列如图1、图2所示(登录号:DQ231461和DQ337172),与其他已知鱼类HSP70序列同源性比较(表1、表2),绘制基因进化树(图3、图4)。通过对克隆片段与已发表的青鳉(*Oryzias latipes*)等鱼类HSP70的核苷酸序列和其编码的氨基酸序列比较,发现核苷酸序列同源性高,成员一和成员二分别为85%~89%和82%~99%;氨基酸序列同源性更高,成员一和成员二分别为97%~99%和93%~99%。使用蛋白质分析软件antheprot分析氨基酸

序列中的特征序列,发现本研究中扩增的 HSP70 成员一中包含 HSP70 的 1 个签名序列(Signature sequence)和 HSP70 的定位序列,在成员二中找到 2 个签名序列和 HSP70 的定位序列。即图 1 和图 2 方框标识的序列 IFDLGGGTFDVSI L,图 2 中 IVLVGGSTRIPKI Q K 即为签名序列。

图 1 和图 2 中的 KKDISDNKRAVRR 为推测的热休克蛋白核定位序列(bipartite nuclear targeting sequence)^[9]。根据以上 HSP70 家族所特有的特征氨基酸序列以及同源性比较,初步确认所获得两序列符合 HSP70 的特征,可能是剑尾鱼 HSP70 家族的成员。

表 1 剑尾鱼 HSP70 成员一核苷酸和氨基酸序列与其他已知鱼类 HSP70 的比对结果

Tab. 1 Comparison of nucleotide and amino acid sequences of HSP70 isoform 1 with other known fish

种类 Species	GenBank 注册号 Accession number	核苷酸相似性/% Nucleotide identity	GenBank 注册号 Accession number	氨基酸相似性/% Amino acid identity
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	D13669.1	85	D13669	99
牙鲈 <i>Paralichthys olivaceus</i>	AF053059	89	AB010871	99
川鲮 <i>Platichthys flesus</i>	AF187726	88	AF187726	99
虹鳉 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	AB196460.1	87	AB062281	98
黄颡鱼 <i>Rhabdosargus sarba</i>	AY436786.1	86	AY436787	98
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>			NM131397	97

表 2 剑尾鱼 HSP70 成员二核苷酸和氨基酸序列与其他已知部分鱼类 HSP70 的比对结果

Tab. 2 Comparison of nucleotide and amino acid sequences of HSP70 isoform 2 with other known fish

种类 Species	GenBank 注册号 Accession number	核苷酸相似性/% Nucleotide identity	GenBank 注册号 Accession number	氨基酸相似性/% Amino acid identity
新月鱼 <i>Xiphophorus maculatus</i>	AB062115.1	99	BAB72169.1	99
寡杜父鱼 <i>Oligocottus maculosus</i>	DQ013308.1	85		
虹鳉 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	AB196460.1	83	BAD90026.1	94
鲫 <i>Cyprinus carpio</i>	AY219845.1	82	AA043731.1	94
			AAP51388.1	93
牙鲈 <i>Paralichthys olivaceus</i>	AF053059	82	AAC33859.1	93

```

1  TCACAGTACCAGCCTATTTCAATGACTCCCAGCGTCAGGCCACGAAGGATGCTGGCACCA
   T V P A Y F N D S Q R Q A T K D A G T
61  TCTCTGGCCTCAATGTTTTGCGTATAATCAATGAACCGACTGCAGCTGCTATCGCCTATG
   I S G L N V L R I I N E P T A A A I A Y
121 GGCTGGACAAGAAAGTTGGGTCAGAG AGG AACGTGCTCATCTTTGATCTCGGTGGTGGA
   G L D K K V G S E R N V L I F D L G G G
181 CTTTGTATGTTCCATCTTG ACCATCGAGGATGGGATCTTTGAAGTGAAATCCACTGCTG
   T F D V S I L T I E D G I F E V K S T A
241 GAGAT ACT CAT CTA GGT GGG GAAGACTTTGACAACCGCATGGTTAACCACCTTCATTGCTG
   G D T H L G G E D F D N R M V N H F I A
301 AGTTCAAACGCAAGTACAAGAAGGACATCAGCGACAACAAG AGGGCAGTCCGCCGTCTGC
   E F K R K Y K K D I S D N K R A V R R L
361 GTACTGCTTGTGAGCGGGCA AAGCGCACCTGTCTTCCAGCACCCAGGCCAGCATTGAG A
   R T A C E R A K R T L S S S T Q A S I E
421 TCGACTCT CTGTATGAGGGCGTCTGACTTCTAC ACCT C
   I D S L Y E G V D F Y T

```

图 1 克隆的剑尾鱼 HSP70 成员一部分 cDNA 序列及推测的相应氨基酸序列

注:灰色阴影为引物;方框部分为 HSP70 特征性序列和定位序列。

Fig. 1 Partial HSP 70 isoform 1 cDNA sequence and deduced amino acid sequence

Note: Primer sequence is indicated by grey shadow. Position of HSP70 motif and targeting sequence are shown in boxes.

1 CCTGGGCACT ACCTACTCTT GTGTGGGAGTGTTCAGCAC GGGAAAGTTG AGATCATTGC
 L G T T Y S C V G V F Q H G K V E I I A
 61 TAATGACCAG GGGAAACAGGA CCACGCCAGTTATGTGGCC TTTACTGACA CAGAGAGGCT
 N D Q G N R T T P S Y V A F T D T E R L
 121 GATTGGAGAT GCAGCCAAGA ACCAGGTGGCCCTCAACCCC AACAACACCGTTTTTGATGC
 I G D A A K N Q V A L N P N N T V F D A
 181 AAAGCGGCTT ATTGGGCGTCGTTTTGACGATAGTATTGTCCAATCAGACATGAAACATTG
 K R L I G R R F D D S I V Q S D M K H W
 241 GCCCTTCACCATCATCAACG ATAGCTCGAGGCCCAAAGTG AAAAGTGGAGT ACAAAGGGGA
 P F T I I N D S S R P K V K V E Y K G E
 301 GACGAAGACCTTCTACCCAGAGGAGATCTCTCCATGGTGTCTGCTGAAGATGAAGGAGAT
 T K T F Y P E E I S S M V L L K M K E I
 361 TGCTGAGGCATACCTTGGCA AGACTATAACAAATGCCGTGGTGACTGTACCTGCCTACTT
 A E A Y L G K T I T N A V V T V P A Y F
 421 CAATGACTCTCAGCGTCAGGCCACCAAAGACGCTGGGACCATTCTGGGCTCAATGTTCT
 N D S Q R Q A T K D A G T I S G L N V L
 481 GCGTATCATT AACGAGCCAA CGGCTGCTGCCATTGCTTACGGTTTGGACA AAAAGGTCGG
 R I I N E P T A A A I A Y G L D K K V G
 541 ATGCGAGAAA AACGTCTCATCTTCGACCTGGGCGGCGGCACTTTCGACGTCTCCATCCT
 C E K N V L I F D L G G G T F D V S I L
 601 GACCATCGAGGACGGCATCTTTGAGGTGAAGTCCACGGCGGGCGACACCCACCTGGGCGG
 T I E D G I F E V K S T A G D T H L G G
 661 CGAGGACTTCGACAACCGCATGGTGAACCACTTCATCTCCGAGTTCAAGCGCAAGTACAA
 E D F D N R M V N H F I S E F K R K Y K
 721 GAAGGACATCAGCGACAACA AGAGGGCGGTGCGTGCCTGCGCACGGCCT GCGAGCGGGC
 K D I S D N K R A V R R L R T A C E R A
 781 CAAGCGCACGCTGTCTTCCAGCACGCAGGCCAGCATCGAG ATCGACTCCCTGTACGAGGG
 K R T L S S S T Q A S I E I D S L Y E G
 841 CATCGACTTC TACACGTCCA TCACCAGGGC GCGCTTTGAG GAGCTGAACG CGGACCTATT
 I D F Y T S I T R A R F E E L N A D L F
 901 CCGCGGAACGCTGGAGCCCGTGGAGAAGTCTCTCCGAGACGCCAAGATGGACAAGGCTCA
 R G T L E P V E K S L R D A K M D K A Q
 961 GATCCACGAG ATCGTTTGGTGGGAGGCTCGACCCGCATCCCAAGATCCAGAAGCTCCT
 I H E I V L V G G S T R I P K I Q K L L
 1021 GCAGGACTTCTTAACGGGA AGGAACCAACAAGAGCATT AACCTGACG AGGCGGTGGC
 Q D F F N G K E L N K S I N P D E A V A
 1081 GTACGGTGCAGCTGTCCAGGCGGCCATCTT GTGCGGAGAC AAATCCGAGATTGTTCAAGGA
 Y G A A V Q A A I L C G D K S E I V Q D
 1141 CCTGCTGCTG TTGGACGTCA CGCCCTTGTC TCTGGGCATC GAGACGGCAG GCGGAGTCAT
 L L L L D V T P L S L G I E T A G G V M
 1201 GACGGTGTCTG ATCAAGAGGA ACACCACCAT
 T V L I K R N T T

图2 克隆的剑尾鱼 HSP70 成员二部分 cDNA 序列及推测的相应氨基酸序列

注:灰色阴影为引物;方框部分显示 HSP 70 特征性序列和定位序列。

Fig. 2 Partial HSP70 Isoform 2 cDNA sequence and deduced amino acid sequence

Note: Primer sequence is indicated by grey shadow. Position of HSP70 motif and targeting sequence are shown in boxes.

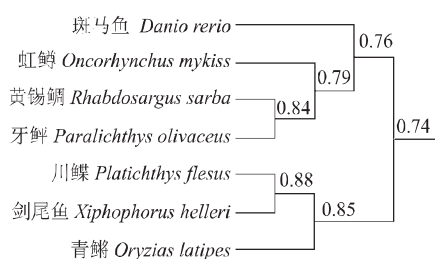


图3 HSP70 成员一与其他鱼类 HSP70 的基因进化树

Fig. 3 Homology tree for HSP70 Isoform 1

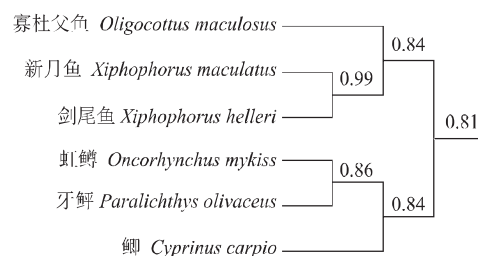


图4 HSP70 成员二与其他鱼类 HSP70 的基因进化树

Fig. 4 Homology tree for HSP70 Isoform 2

2.2 热应激下 HSP70 家族两成员在剑尾鱼组织内的表达

剑尾鱼 HSP70 两成员在不同组织包括肝脏、脾脏、心脏和肾脏的表达情况的电泳检测图如图 5 所示。正常情况下, HSP70 两成员基因在剑尾鱼上述

组织都不表达, 在热应激情况下, 成员一基因能够在脾脏中表达, 且与 β -actin 相对值只有 0.3, 在肝脏、心脏和肾脏中未见表达; 成员二基因在肝脏、脾脏、心脏和肾脏中均有强烈表达, 与 β -actin 相对值在 1.2 ~ 1.6。

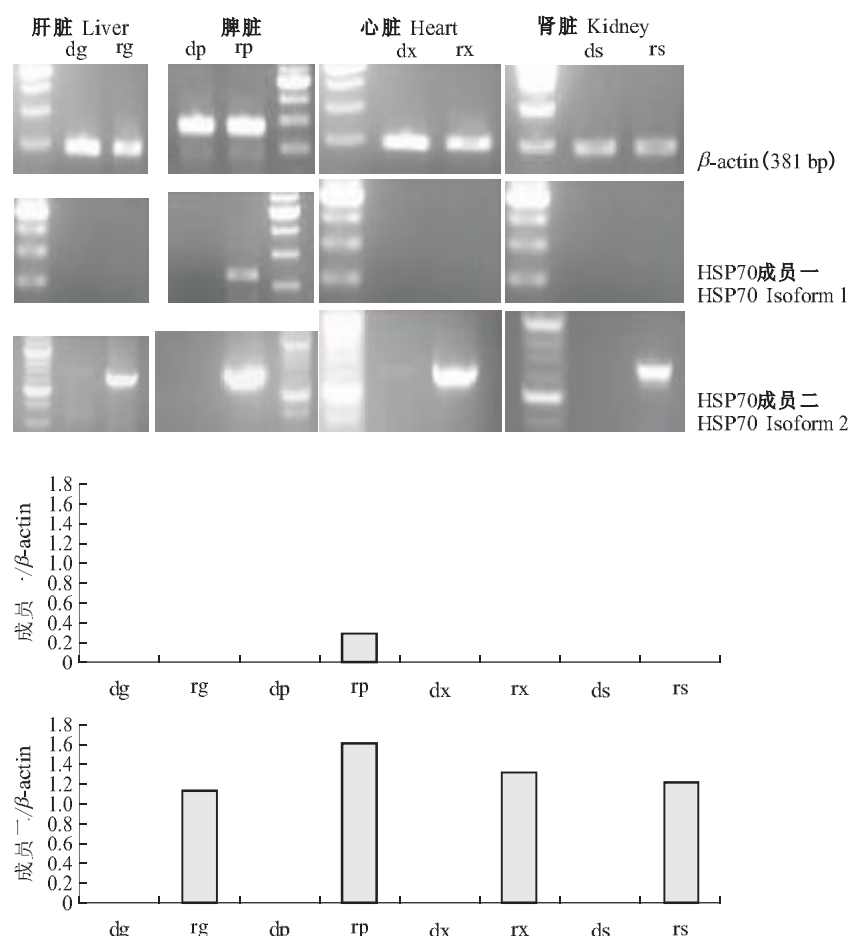


图5 HSP70 成员一和成员二在一般情况和热应激下在剑尾鱼肝脏、脾脏、心脏和肾脏中的表达
注: dg - 正常鱼肝脏样品; rg - 热应激后鱼肝脏样品; dp - 正常鱼脾脏样品; rp - 应激后鱼脾脏样品; dx - 正常鱼心脏样品; rx - 应激后鱼心脏样品; ds - 正常鱼肾脏样品; rs - 应激后鱼肾脏样品

Fig. 5 Expression of the two HSP70 genes in different tissues under basal and heat shock conditions

Note: dg - liver sample of normal fish; rg - liver sample of heat-shocked fish; dp - spleen sample of normal fish; rp - spleen sample of heat-shocked fish; dx - heart sample of normal fish; rx - heart sample of heat-shocked fish; ds - kidney sample of normal fish; rs - kidney sample of heat-shocked fish.

3 讨论

HSPs 是一类存在于所有生物体细胞包括鱼类^[10-11]内比较保守的蛋白, 目前主要根据分子量大小对 HSPs 进行分类, 其中对 HSP90、HSP70 和低分子量 HSPs (16 ~ 24 kD) 的研究较为广泛^[12], 有些

HSPs 的蛋白也产生组成性表达, 用于维持细胞的动态平衡^[13]。HSP70 作为分子伴侣协助新生多肽链折叠, 蛋白质复合体的装配, 以及调节、修护和降解变性的蛋白质方面起重要作用^[14]。

研究表明, HSP70 蛋白的合成主要在转录水平上进行调节^[15]。HSP70 家族是 HSPs 中含量最丰富

的一个家族,序列高度保守。在人类,HSP70 家族至少包括 4 种家族成员:HSP70、hsc70、grp78(BiP)和 mtHSP75。它们分别起着重要的作用^[16]。HSP70 家族是一类应激诱导表达的基因^[17],人类恶性乳腺癌和子宫肿瘤能刺激 HSP70 家族中部分成员的表达^[18]。哺乳动物 HSP70 家族的众多成员有的在一般情况下也能组成性表达,有的只能诱导表达^[19]。鱼类会对外界应激在细胞水平上产生反应,包括增加热应激蛋白在内的一系列蛋白的变化,但不同的组织与不同的热应激蛋白参与细胞应激反应不同^[20]。如 Ackerman 等发现弧菌感染虹鳟后,增加了 HSP70 蛋白在肝脏和头肾中的表达,在感染后第 5 天,肝脏内 HSP70 蛋白表达量最大,而在感染后第 4 天,头肾中 HSP70 蛋白表达量就达到最高^[21]。

本研究获得了剑尾鱼的两个 HSP70 家族成员的 cDNA 的部分序列。序列中均包含 HSP70 的一特征性序列。所获得的剑尾鱼两个 HSP70 序列与已知的其他鱼类 HSP70 序列经 BLAST 比对分析,发现与其他鱼类 HSP70cDNA 核苷酸和氨基酸序列都有较高同源性,尤其是氨基酸序列的同源性更高。在正常情况下,两个家族成员基因在剑尾鱼组织中不表现组成性表达,说明所克隆的两序列可能属于 HSP70,而不是 HSC70。与成员一比较,成员二更能强烈地被热应激所诱导,可能成员二在参与热应激保护方面起更大作用。标准化实验动物剑尾鱼 HSP70 的 cDNA 序列的获得,将有利于进一步开展 HSP70 的其他相关研究。

参考文献:

- [1] 谷文萍. 热休克蛋白 70 研究进展[J]. 国外医学神经病学神经外科学分册, 1999, 26(2): 57-59.
- [2] Polla B S. Heat shock proteins in host-parasite interactions[J]. Immunol Today, 1991, 12: A38-A41.
- [3] Ashburner M, Bonner J. The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock[J]. Cell, 1979, 17(2): 241-254.
- [4] Basu N, Todgham A, Eackerman P A. Heat shock protein genes and their functional significance in fish[J]. Gene, 2002, 295: 173-183.
- [5] Lepore D A, Hurley J V, Stewart A G, et al. Prior heat stress improves survival of ischemicreperfused skeletal muscle *in vivo*[J]. Muscle Nerve, 2000, 23: 1 847-1 855.
- [6] 吴淑勤, 黄志斌. 水生实验动物-剑尾鱼[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005. 4.
- [7] 潘厚军, 吴淑勤. 剑尾鱼在检测细菌毒力方面的应用[J]. 水产学报, 2000, 24(5): 467-471.
- [8] Amro M. Hamdoun phenotypic plasticity of HSP70 and HSP70 gene expression in the Pacific oyster(*Crassostrea gigas*): Implications for thermal limits and induction of thermal tolerance[J]. Biol Bull, 2003, 205: 160-169.
- [9] 吴龙涛, 宋林生. 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.
- [10] Feder M E, Hofmann G E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology[J]. Annu Rev Physiol, 1999, 61: 243-282.
- [11] Iwama G K, Thomas P T, Forsyth R B, et al. Heat shock protein expression in fish[J]. Rev Fish Biol, 1998, 8: 35-56.
- [12] Forreiter C, Nover L. Heat induced stress proteins and the concept of molecular chaperones[J]. J Biosci, 1998, 23: 287-302.
- [13] Bukau B, Horwich A L. The HSP70 and HSP60 chaperone machines[J]. Cell, 1998, 92: 351-366.
- [14] Glover J R, Lindquist S. HSP104, HSP70, and HSP40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins[J]. Cell, 1998, 94: 73-82.
- [15] Nagata K, Satoh M, Miller A D, et al. Involvement of Hsp47 in the folding and processing of procollagen in the endoplasmic reticulum[A]. Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins[M]. New York: Dekker, 1998, 10: 225-240.
- [16] Morimoto R I, Tissieres A, Georgopoulos C. Progress and perspectives on the biology of heat shock proteins and molecular chaperones[A]. The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. 1-30.
- [17] Jaattela M. Escaping cell death: survival proteins in cancer[J]. Exp Cell Res, 1999, 248: 30-43.
- [18] Jaattela M. Over-expression of HSP70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells[J]. Int J Cancer, 1995, 60: 689-693.
- [19] Morimoto R I. Stress proteins in biology and medicine[J]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.
- [20] Iwama G K, Thomas P T, Forsyth R B, et al. Heat shock protein expression in fish[J]. Rev Fish Biol Fish, 1998, 8: 35-56.
- [21] Ackerman P A, Iwama G K. Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to vibriosis[J]. J Aquat Anim Health, 2001, 13, 173-180.

Effects of heat shock on gene expression of two members of HSP70 in *Xiphophorus helleri*

WAN Wen-ju^{1,2,3}, SHI Cun-bin¹, WANG Ji-ting², CHAI Tong-jie², WU Shu-qin¹

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China; 2. College of Animal Science & Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; 3. Tai Shan Medical College, Tai'an 271000, China)

Abstract: Using RT-PCR, two cDNA partial clones encoding HSP70 protein of *Xiphophorus helleri* were isolated. Their expression was examined in the tissues of *Xiphophorus helleri* exposed to heat shock. The cDNA fragments were cloned into PMD18-T vector and sequenced subsequently. The nucleotide and amino acid sequence were compared with GenBank data. The results showed that the isolated cDNA fragments contained consensus HSP70 motif sequence and bipartite nuclear targeting sequence. Comparison of the nucleotide and deduced amino acid sequences to entries in the GenBank revealed that the cDNA clones could encode heat shock 70 kD protein. The isolated two cDNA clones nucleotide and amino acid sequence exhibited a high degree of homology to the sequences from other fish types. Compared with the published sequences of other fish in GenBank, the homologies of nucleic acids were 85% – 89% and 82% – 99% for Isoform 1 and Isoform 2 respectively. And the homologies of amino acid deduced from DNA sequences were 97% – 99% and 93% – 99%. mRNA signal for the two isoforms has not been found in *Xiphophorus helleri* under basal conditions; mRNA signal for Isoform 1 was induced in spleen and mRNA signal for Isoform 2 was not only induced in spleen but also in liver, heart and kidney more significantly after heat shock. The results showed that the two genes coded for subfamily of HSP70 proteins may be involved in different pattern of induction for heat shock. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(6): 929 – 935]

Key words: HSP70; heat shock; *Xiphophorus Helleri*; clones; gene expression

Corresponding author: WU Shu-qin. E-mail: wushuqin001@21cn.com

欢迎订阅 2007 年《水利渔业》

《水利渔业》是由水利部中国科学院水工程生态研究所主办的中文核心期刊。主要刊登水产研究探索、名特优新、增殖养殖、生态环境、营养饲料、病害防治、管理开发方面的科技论文, 适合广大科教、推广、生产和管理单位的读者订阅。本刊为双月刊, 大 16 开本, 2007 年每期页码增至 120 页, 国内外发行, 国际标准刊号 ISSN1003 – 1278, 国内统一刊号 CN42 – 1247/S, 邮发代号 38 – 76, 每期定价 10 元, 全年 60 元。全国各在邮局均可订阅。也可直接汇款到编辑部订阅。

编辑部地址: 武汉市雄楚大街 578 号

邮政编码: 430079

电话: 027 – 87189555

电子邮箱: scan@chinajournal.net.cn