

## 克氏原螯虾热休克蛋白 70 ku 类似物基因的 cDNA 分析

曾 勇<sup>1,2</sup>, 陆承平<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京 210095; 2. 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 荆州 434000)

**摘要:**根据已测序的克隆号 PCI246 基因序列设计 2 条引物, 用快速扩增 cDNA 末端技术扩增克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*) 70 ku 热休克蛋白同类物基因 cDNA 的 5 端片段和 3 端片段, 测序得到 1 184 bp 基因片段, 包含该基因的完整 3 端, GenBank 登录号 AY357302, 与 GenBank 序列号 AB016836 家蚕(*Bombyx mori*) 的 70 ku 热休克蛋白同类物 mRNA 的部分片段 83% 同源。和果蝇(*Drosophila melanogaster*) 的热休克蛋白同类物 3 的同源性最高 (GenBank 的登录号分别是 NP\_727 563, NP\_511 132, NP\_727 564, NP\_727 565), 为 85%。

**关键词:**全长 cDNA; 快速扩增 cDNA 末端; 同源性; 70 ku 热休克蛋白同类物  
中图分类号: Q75 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2006)06-0031-04

热休克蛋白 (HSP) 主要分为 HSP90 (83~90 ku), HSP70 (66~78 ku), HSP60 及小 HSP (15~39 ku) 等 4 个家族。HSP70 是 HSP 中最保守和最主要的一类, 在大多数生物中含量最多, 在细胞应激后最为显著, 对细胞损伤具有保护作用<sup>[1-3]</sup>。其生物学功能主要有分子伴侣作用及提高细胞对应激原的耐受能力。应用放线菌酮抑制 HSP70 的产生, 或向细胞内注射 HSP70 抗体, 细胞产生耐受的能力明显下降。且各种耐受现象之间具有交叉性, 即一种应激刺激诱导细胞产生的 HSP70, 不仅是细胞对该刺激的耐受性增加, 同时也增加了细胞对其它刺激的耐受性<sup>[4]</sup>。另外 HSP70 还参与抗原的加工、递呈等。

Gross 等<sup>[5]</sup>用表达序列标签法 (expressed sequence tag, EST) 在太平洋白对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的血淋巴细胞中发现了 HSP70 类似物。作者通过抑制性差减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH) 和 cDNA 芯片, 检测到克隆号 PCI246 的基因在接种对虾白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus WSSV) 的克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 中的表达量是对照组的 2.24 倍, 且与 GenBank 序列号 AB016836 家蚕 (*Bombyx mori*) 的 70 ku 热休克蛋白同类物 mRNA 的部分片段 78% 同源。鉴于 HSP70 在非特异免疫保护中的重要性, 作者采用快速扩增 cDNA 末端技术 (rapid amplification of cDNA end, RACE), 对该基因进行了分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 总 RNA 的提取

取毒克氏原螯虾淋巴的采集按文献<sup>[6]</sup>建立的方法进行。用 TriPure 分离液 (Roche 公司产品, Cat.

No. 1667165) 提取总 RNA, 步骤按说明书进行。

### 1.2 快速 cDNA 末端扩增

采用 Clontech 公司的 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Cat. No. K1811-1) 扩增目的基因的 5 端和 3 端。根据已测出的克隆号 PCI246 基因片段序列分别设计引物如下:

3'RACE 引物: 5'-AGG ATG CAG AGG TGT TTT CCG ATG AAG-3'

5'RACE 引物: 5'-CAG TGC TCC CTG TAG GTG GGG CAC C-3'

3'RACE 按试剂盒说明进行。5'RACE 使用 TaKaRa 公司的 GC buffer I 和 LATAq 酶, PCR 反应体系如下: GC buffered 25 μL, UPM 引物 (SMART™ RACE 试剂盒配) 5 μL, 5'RACE 引物 (10 μmol/L) 1 μL, dNTP (10 mmol/L) 1 μL, 5'RACE 模板 2.5 μL, LATAq 酶 0.5 μL, 水 15 μL。

PCR 反应条件 (MJ RESEARCH INC PT-100™ PCR 仪): 94℃ 5 s, 68℃ 10 s, 72℃ 2 min。共进行 25 个循环。

扩增片段连 pMD18-T 载体 (TaKaRa 公司), 导入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH 5α, 送上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司进行测序。

收稿日期: 2004-04-17; 修回日期: 2004-04-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170729); 瑞典国际科学基金资助项目 (A/33621)

作者简介: 曾勇 (1967), 男, 湖北荆州人, 副研究员, 博士生, 主要从事鱼虾病原及免疫的分子生物学研究, E-mail: zy110en@yahoo.com.cn; 陆承平, 通讯作者, E-mail: lucp@mail.njau.edu.cn

## 2 结果

克氏原螯虾 70 ku 热休克蛋白类似物的 cDNA 3'RACE 扩增得到一条约 600 bp 左右的条带, 如图 1 所示。5'RACE 也得到一条约 1 100 bp 左右的条带, 如图 2 所示。

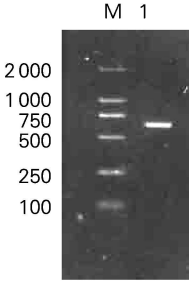


图 1 克氏原螯虾 70 ku 热休克蛋白同类物 cDNA 的 3'RACE 电泳图  
Fig. 1 Electrophoresis of the 3'RACE of 70 ku heat shock prote in cognate cDNA of crayfish



图 2 克氏原螯虾 70 ku 热休克蛋白同类物 cDNA 的 5'RACE 电泳图  
Fig. 2 Electrophoresis of the 5'RACE of 70 ku heat shock protein cognate cDNA of crayfish

由于 5'RACE 扩增的片段是由一条 5'RACE 引物扩出, 没有找到接头引物 (即 UPM 引物), 因此只得到克氏原螯虾 70 ku 热休克蛋白同类物的部分序列, 包括其完整的 3'端序列, GenBank 登录号为 AY 357302, 结果见图 3。

```

ACCAGTCACCAGGTCAGGATTGAAATGAATCCTCTTTGAAGGAGAAGACTTCTCTGAAACACTTAC
TCGAGCTAAATTTGAAGAATTGAACATGGATCTCTTCAGGTCAACAATGAAGCCTGTCCAGAAGGTGC
TTGAAGATTCTGACTTGCAGAAGAAGGAAATGACGAAATTGTATTGGTAGGCGGTCTACCCGATATCC
CAAAGATCCAGCAGTTGGTTAAAGAGTTCTTCAATGGTAAGGAGCCATCACGAGGTATTAATCCTGAT
GAGGCTGTAACGTATGGTGCTGCTGTGCAAGCTGGTGTATCTGGAGAAGATGACACTAATGACTT
GGTATTGTTGGATGTTAATCCCTTGACACTTGGTATTGAAACTGTTGGTGGGGTAATGACTAAACTCAT
CTCTCGTAACACTGTAATTCCTACAAGAAGTCTCAAATCTTCTCCACTGCTTCGGATAACCAACATAC
CGTTACCATCCAGGTATTTGAAGGAGAGCGACCAACGACAAAAGACAACACACTTGGCAAGTTT
GACTTGACTGGTATTCCACCTGCTCCACGTGGTGTGCCCAAATAGAAGTACTTTTGAATTTGATGCT
AATGGCATTCTCAGGTATCTGCAGAAGACAAGGGTACAGGCAACAAGGAAAAGATCGTTATTACAAA
TGACCAAAATCGTCTTACCCGAGAAGACATTGAACGTATGATAAAGGATGCAGAGGTGTTTGCCGATG
AAGACAAGAAATTAAGGAACGTGTTGAATCTAGAAATGAACCTAGAATCTTATGCCTACAGTTTGAAG
GACCAAGTTAATGACAAAGAGAACTTGGTGCAAAGCTTTCTGATGAAGACAAGAAAAGATTGAGG
AAGCTATTGACGAGAAGATTAAGTGGCTAGAAGACCATCCTGATGTAGATGCAGAAGATTACAAGACG
CAGAAAAAGGAGCTAGAAGATATTGTTACGCCAATTGTTGCCAAGTTGTACCAAGGTGCTGGTGGTGC
CCCACCTACAGGGAGCACTGATGAAGAATTTGACAAAGATGAATTTAAATATTTAGGTTATTGTGGGA
ATGTAACCTATTATTTGTTTAAAGTTGATGTTATTGGAAGGACATGTTTCATCATATTATCATGTATCACA
GGTATTACGCTAGATTTTCATCTCATGTTTGGTGGGTACCAATGCCATGTATGTATGCACAACCTCC
ATTCCAGTGTGATTGACTACAGGAAGAATGGTTTGTAAATAAAAGGTATAAGTAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

图 3 克氏原螯虾 70 ku 热休克蛋白同类物的 cDNA 序列  
Fig. 3 Sequence of the cDNA of 70 ku heat shock protein cognate of crayfish

克氏原螯虾 70 ku 热休克蛋白同类物基因长 1 284 bp, 在 NCBI 上用 blast 软件进行同源性比较发现它和家蚕 (*Bombyx mori*) 70 ku 热休克蛋白同类物基因的部分片段的同源性最高, 为 83%。GenBank 给出的相应氨基酸序列见图 4, 共编码 356 个氨基酸。在 NCBI 上用 blastp 软件进行同源性比较发现它和果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 的热休克蛋白同类物 3 的同源性最高 (GenBank 的登录号分别是 NP\_727563, NP\_511132, NP\_727564, NP\_727565), 为 85%。

TSHQVRIEIESFFEGEDFSETLRAKFEELNMDLFRSTMKPVQKVLSDQLQKKEIDEIVLVGGSTRIPKIQQ  
LVKEFFNGKEPSRGINPDEAVTYGAAVQAGVLSGEDDNDLVDVNLPLTLGIETVGGVMTKLISRNVIP  
TKKSQIFSTAASDNQHTVTIQVFEGERPPTKDNHILGKFDLTGIPPAPRGVQPQIEVTFEIDANGILQVSAEDKG  
TGNKEKIVITNDQNRLLTPEDIERMIKDAEVFADEDKLLKERVESRNELESYAYSCLKDQVNDKEKLGAKLSD  
EDKEKIEEAIDEKIKWLEDHPDVAEDYKTQKKELEDIVQPIVAKLYQGAGGAPPTGSTDEEFDKKEKEL

图 4 克氏原螯虾 70 ku 热休克蛋白同类物的氨基酸序列

Fig. 4 Amino acid sequence of the 70 ku heat shock protein cognate of crayfish

### 3 讨论

甲壳动物中关于热休克蛋白的免疫保护功能已有一些报道。Gross 等<sup>[5]</sup>在太平洋白对虾血淋巴细胞中发现了 HSP70 同类物,在大西洋白对虾血淋巴细胞中发现了 HSP82 同类物。HSP82 可以和类固醇激素受体作用,而调节其活性<sup>[7]</sup>。在大西洋白对虾血淋巴细胞中还鉴定到两种中等大小的 HSP, HSP28 是一种拯救蛋白(survival protein)可以保护细胞不致死亡<sup>[8]</sup>, HSP29 的功能还有待研究。

另一组为小分子的应激蛋白,它们仅在细胞遭受应激作用、其关键代谢途径和细胞结构需要保护时才出现,因此,可以作为检测对虾群体健康状况的生化指标。除具有保护功能外,还可以在病毒复制时帮助病毒蛋白折叠,并能中和某些病毒的毒性<sup>[5]</sup>。Gross 等<sup>[5]</sup>在对虾的肝胰脏中发现了 HSP10、HSP3、HSP5, HSP10 是钙调素结合蛋白,可以介导蛋白折叠,解救聚合的蛋白<sup>[9,10]</sup>。HSP3 是众多 HSP 基因的基本转录因子, HSP5 也是一个转录因子,调节转录的延伸,还在细胞的死亡过程中发挥作用<sup>[11,12]</sup>。

鉴于在 GenBank 中未检索到主要养殖对虾的相关基因。因此,本研究对克氏原螯虾 70 ku 热休克蛋白同类物基因的报道,为后续在虾类开展该基因功能的研究打下了基础。

#### 参考文献:

[1] Maio A D. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams[J]. **Shock**, 1999, **11**(1): F12.  
[2] Lindquist S, Craig E A. The Heat shock proteins[J]. **Annu Rev Genet**, 1988, **22**: 63-677.  
[3] Gilby K L, Amsstronng J N, Currie R W, et al. The effects of hypoxia ischemia on expression of cFos, cJun and Hsp70 in the young rat hippocampus[J]. **Brain Res Mol**

**Brain Res**, 1997, **48**(1): 87-96.  
[4] Sassahira M, Lowry T, Simon R P, et al. Epileptic tolerance: prior seizures protect against seizure induced neuronal injury[J]. **Neurosci Lett**, 1995, **185**(2): 95-101.  
[5] Gross P S, Bartlett T C, Browdy C L, et al. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus* [J]. **Dev Comp Immunol**, 2001, **25**, 565-577.  
[6] 魏静, 陆承平, 黄捷, 等. 克氏原螯虾的血淋巴细胞原代培养[J]. **畜牧与兽医**, 1999, **31**(5): 11-12.  
[7] Fliss A E, Benzeno S, Rao J, et al. Control of estrogen receptor ligand binding by Hsp90[J]. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 2000, **72**: 223-230.  
[8] Paul C, Arnigo A. Comparisons of the protective activities generated by two survival proteins: Bcl 2 and Hsp27 in L929 murine fibroblasts exposed to menadione or staurosporine[J]. **Exp Gerontol**, 2000, **35**: 757-766.  
[9] Yang T, Poovaiah B W. Arabidopsis chloroplast chaperonin 10 is a calmodulin binding protein[J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 2000, **275**: 601-607.  
[10] Ranson N A, White H E, Saibi H R. Charperonins [J]. **Biochem J**, 1998, **333**: 23-42.  
[11] Prandl R, Hinderhofer K, Eggers Schumacher G, et al. HSP3, a new heat shock factor from *Arabidopsis thaliana*, derepresses the heat shock response and confers thermotolerance when overexpressed in transgenic plants [J]. **Mol Gen Genet**, 1998, **258**: 269-278.  
[12] Andrusis E D, Guzman E, Doring P, et al. High resolution localization of drosophila spt5 and spt6 at heat shock genes in vivo: roles in promoter proximal pausing and transcription elongation[J]. **Genes Dev**, 2000, **14**: 2635-2649.

# Sequence analysis of 70 ku heat shock protein cognate cDNA in crayfish

ZENG Yong, LU Cheng-ping

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Yangtz River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Jingzhou 434000, China)

**Received:** Jan. , 17, 2004

**Key words:** complete sequence of cDNA; rapid amplification of cDNA ends; homology; 70 ku heat shock protein cognate

**Abstract:** According to the sequence of PCI246, two primers were designed. The 5'end and 3'end of 70 ku heat shock protein cognate cDNA in crayfish(*Procambarus clarkii*) were amplified respectively. A 1184 bp fragment was obtained with the completed sequence of 3'end of the gene. The GenBank accession number is AY357302. The nucleotide identity between this protein and heat shock protein cognate of *Bombyx mori* was 83%. And the amino acid identity between this protein and heat shock protein cognate 3 of *Drosophila melanogaster* was 85%.

( 本文编辑:张培新)