

温度选择对刺参群体在不同温度下生长及热休克蛋白表达的影响

刘广斌^{1,2}, 杨红生¹, 刘石林¹

(1.中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2.中国科学院 研究生院, 北京 100049)

摘要: 高温(26℃)培育刺参(*Apostichopus japonicus*)幼体获得选择群体, 生长至 1.03 g ± 1.30 g, 与对照组幼参在 18、20、22 和 24℃ 温度下培育。二者的成活率随着温度升高而降低, 而选择组幼参 24℃ 的成活率显著高于对照群体 ($P < 0.05$)。不同温度下的特定生长率之间没有差异。TRIzol 法提取刺参总 RNA, 获得刺参 HSP70 片断基因序列, 利用实时定量 PCR 方法检测, 选择群体 HSP70 mRNA 的表达量在正常温度和热激条件下都较对照组高, 但表达量升高的倍数相近, 选择组为 1.99 倍, 对照组为 2.07 倍。

关键词: 刺参(*Apostichopus japonicus*); 特定生长率; 选育; 荧光实时定量 PCR

中图分类号: Q816

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)07-0049-05

刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)自然分布于中国山东和江苏交界处平山岛以南海域, 是典型的温带种类^[1]。其生长的适宜温度为 5~20℃, 最适生长温度为 10~16℃^[2]。

刺参夏眠期较长, 约 100 d。在南方暂养历时约 160 d, 夏眠期失质量高达 50%^[3]。这在客观上限制了刺参养殖的进一步发展。刺参在日本九州的鹿儿岛和长崎等海域也有分布, 生长温度与浙江和福建两地相近^[4], 说明刺参这一物种也可以适应温度较高的环境, 具有南移至浙、闽沿海的可行性。而选择育种是获得优良养殖品种的传统方法, 应用广泛^[5, 6]。本实验在较高温度条件下培育刺参幼体, 并培育至幼参, 获得了选择群体。通过在不同温度下的生长与热休克蛋白表达, 分析该群体对温度的耐受能力, 旨在耐高温刺参品系的选育提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料和条件

1.1.1 实验动物

实验开始时 26℃ 高温选择的幼参规格为 1.03 g ± 1.30 g, 对照组幼参为 0.74 g ± 0.76 g。亲参采自山东和江苏交界的海州湾平山岛海域, 阴干流水刺激, 21 天采卵、受精。在自然温度(19.7 ± 0.5℃)孵化, 发育至初耳幼体(3d)移入控温水槽中, 温度为 26℃。饵料为牟氏角毛藻、三角褐指藻、杜氏盐藻, 按照 4 : 2 : 1 比例混合投喂。培育至完全变态后 5d 恢复

至自然水温培育, 变态率为 13.84% ± 2.42%, 对照组在自然水温条件下培育, 变态率为 42.18% ± 7.56%。幼体附着后以底栖硅藻为主要饵料, 并辅以 300 目滤过的鼠尾藻、马尾藻干粉和海带磨碎液。

稚参变色后投喂自行配制的人工饵料: 鼠尾藻粉、马尾藻粉、活性干海泥各 1/3, 添加 5% 的虾壳粉, 加适量水搅拌均匀凉干呈粉状。投喂量以幼参湿体质量的 5% 为基准, 根据摄食量和残饵量随时调整。饲料的主要化学成分见表 1。

表 1 实验饲料的化学成分

Tab.1 Feed composition

成分	水分	干物质	粗蛋白	粗脂肪	灰分
质量分	36.36	63.64 ±	5.04 ±	0.26 ±	72.20
数(%)	± 0.39	0.26	0.19	0.05	± 0.19

注: 粗蛋白、粗脂肪和灰分质量分数基于饲料的干质量所得

1.1.2 实验条件

实验用 PVC 水槽实用水体为 0.50 × 0.40 × 0.35 m³。每槽气石 1 个, 24 h 微充气。实验用水为砂滤的自然海水。

收稿日期: 2008-05-24; 修回日期: 2009-02-16

基金项目: 山东省农业良种工程项目

作者简介: 刘广斌(1972-), 男, 山东东营人, 博士, 研究方向: 水产养殖, 电话: 13625322860, E-mail: liuguangbin72@126.com

1.2 实验方法

1.2.1 温度选择群体的耐高温生长实验

实验对象为 26 温度选择的刺参。以同样亲本常温条件培育的幼参为对照。设 4 个养殖温度梯度: 18、20、22、24, 每处理设 3 个重复, 每个重复 8~9 头幼参。实验时间为 35 d。投喂饵料同上。每 2 d 换水 1/2, 每 6 d 吸底排污并全量换水。实验起始和结束时分别测定幼参的湿体质量。

1.2.2 刺参热休克蛋白表达检测方法

采用荧光实时定量 PCR 检测热激后 HSP70 基因的表达差异。

裂解法提取刺参呼吸树总 RNA, 反转所得 cDNA 为模板。采用 Premier 5.0 软件设计简并引物, 扩增得到 HSP70 和 β -actin 片段。连接、转化、测序后拼接, 获得大小为 1 005 bp 的 HSP70 有效片段和大小为 747 bp 的 β -actin 片段。同源性比对确定后, 根据已知片段设计并筛选适用于荧光实时定量 PCR 的特异引物。本实验中使用 ABI7500 荧光实时定量 PCR 仪。

1.2.3 选择群体热激后 HSP70mRNA 表达差异的实验

实验对象为 26 培育的幼参, 以相同亲本常温条件下培育的幼参作为对照。在室内自然水温为 12 时, 将幼参放入 20 水体中刺激 6、9、12 h, 选取 HSP70mRNA 表达最大值作为指标进行对比。

1.3 数据处理与统计分析

刺参的特定生长率(specific growth rate, SGR) R_{SG} 、成活率(survival rate, SR) R_S 的计算:

$$R_{SG}(\%) = 100(\ln W_t - \ln W_0) / T - 1$$

式中, W_0 、 W_t 表示开始和结束时测得的刺参幼参湿体质量(g), T 表示取样时间(d)。

$$R_S(\%) = 100 \times I_t / I_0$$

式中, I_t 、 I_0 表示在实验结束和开始时测得的实验水体中刺参幼参的个体数(头)。

应用 SPSS11.0 软件对数据进行统计分析。对数据进行方差分析, 并进行双因子方差分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 不同温度下选择群体的生长和成活率

18、20 培育温度下选择组与对照组幼参的特定生长率和成活率没有差异。22、24 培育温度下

选择组与对照组幼参的特定生长率也没有差异, 但对照组幼参在 24 培育温度下的成活率显著低于其他处理温度的幼参(图 1、图 2)。

选择组与对照组幼参的特定生长率随温度升高而降低的趋势相同, 而选择组幼参的成活率随温度升高而降低的趋势明显较对照组缓慢。

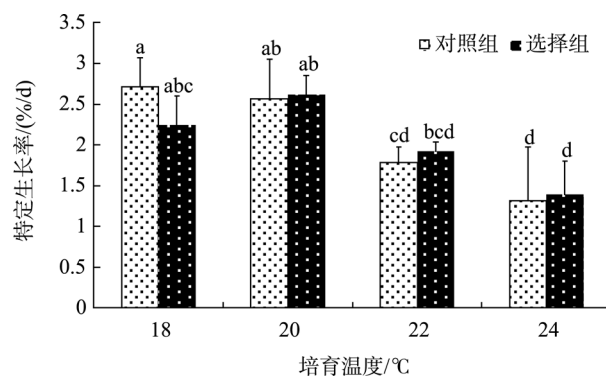


图 1 选择刺参群体幼参的特定生长率

Fig. 1 SGR of the thermal-chosen juveniles

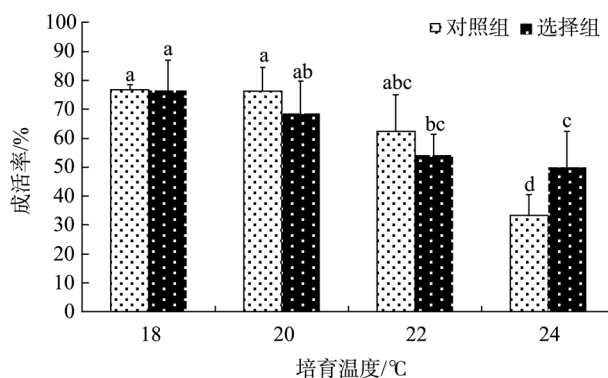


图 2 26 选择刺参群体幼参的成活率

Fig. 2 Survival rate of the thermal-chosen juveniles

2.2 选择群体热激后 HSP70mRNA 的表达差异

利用荧光实时定量 PCR 技术检测 HSP70 基因在热刺激后不同时间点相对于 β -actin 基因的表达。实验过程中, 热刺激对刺参 β -actin 基因的表达量没有明显的影响, 因此, β -actin 基因适宜作为定量 PCR 检测的内标。每次 PCR 反应结束后均进行熔解曲线分析, 确保产物的特异性扩增(图 3)。

由图 4 可以看出, 选择组幼参常温状态下的 HSP70mRNA 的表达远较对照组高, 热激条件下 HSP70mRNA 的表达也远高于对照组。两实验组幼参热休克蛋白表达量的增加倍数接近。

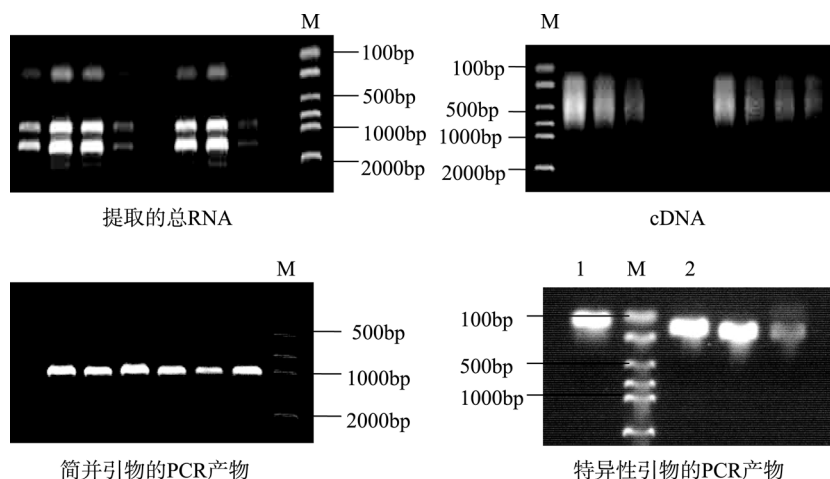


图3 刺参 HSP70 和 β -actin 基因的克隆

Fig. 3 Amplifications of HSP70 and β -actin cDNAs of *Apostichopus japonicus*

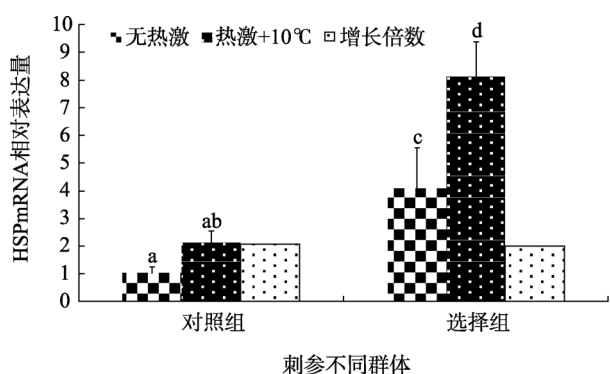


图4 选择群体热激后 HSP70mRNA 的表达差异

Fig. 4 Differential expressions of HSP70 mRNA after heat shock

3 讨论

同种生物广泛分布, 在适应不同环境的同时对温度产生不同的耐受力, 这在许多物种都有发现^[7]。因此可以选择具有潜在目的性状(耐高温)的群体或个体进行选育。陈叶福等^[8]从 381 个自然样品中筛选得到 1 株耐高温酵母属酵母(*Saccharomyces genus*) THFY-16, 能够在 45℃, 30%葡萄糖的培养基中生长, 并在高于普通发酵温度的 37℃ 发酵, 性能较好。Brett 等^[6]在高温条件下选育了虹鳟(*Salmo gairdneri* Richard)群体, 其体长较对照组长 11%, 体重增加 24%。本实验中选择组刺参在 24℃ 培育温度下的成活率显著高于对照组幼参在同等温度下的成活率, 说明经选择的群体对温度的耐受力有一定的提高, 而特定生长率在实验的温度范围与对照组相比并没有差异。

生物的热激反应是消耗能量的过程^[9,10], 而生物对温度的应激性可以通过其体内的热休克蛋白 HSP70 表达反映。HSP70 广泛分布于细胞的各个部分^[11], 参与所有细胞内蛋白质的合成、加工和调节, 可增加细胞对伤害性刺激的耐受性, 提高细胞的存活率, 具有明显的保护作用^[12]。Kazumi 等^[13]发现, 当潮间带杜父鱼(*Oligocottus maculosus*)体内 HSP70 贮存较多时, 机体具有更大的热耐受能力, 并能适应更大的温差变化。温度选择的幼参在 24℃ 温度下的成活率较未经选择的群体高, 有可能的原因是经过热激处理后机体内 HSPs 的累积增加了生物体的耐热性^[14,15]。但 Clegg 等^[16]研究发现, 热激处理后, 牡蛎鳃组织中的 HSP70 经过两周的恢复降回初始值。而本实验中选择组刺参在热激后常温养殖 18 周以上, 所以选择组的 HSP70mRNA 较高表达说明, 选择组刺参耐热性提高的更直接的原因可能是通过温度压力的选择, 自身合成 HSP70 能力较强且迅速的个体得以存活, 提高了群体的耐热性。

热休克蛋白的相关研究较多^[17~19]。但有关刺参的热休克蛋白研究较少, 只在蛋白表达水平进行了研究^[20]。本实验利用海胆、虾等无脊椎海洋生物的同源基因的保守区序列设计引物, 获得了刺参热休克蛋白 HSP70 基因的 cDNA 序列片段。经同源性比较, 该序列与已知的其他物种 HSP70 基因表现出高度同源性。

实验中发现, 体腔液难以活体抽取, 剖开体壁抽取时会带有其他组织; 肠在不同季节重量变化剧

烈, 内容物难以清除且耗时较长。这两种组织提取的 RNA 质量难以保证, 常有杂质影响。呼吸树易于获得, 且成分单一, 实验结果较好。因此, 应以呼吸树作为指标组织进行刺参 HSP70mRNA 的相关研究。

参考文献:

- [1] 隋锡林. 海参增养殖[M]. 北京: 农业出版社, 1988. 15-59.
- [2] Chen J X. Present status and prospects of sea cucumber industry in China[A]. Lovatelli A, Conand C, Purcell S, *et al.* Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management[C]. Rome: FAO, 2004. 25-38.
- [3] 孙建璋, 庄定根, 陈兰涛, 褚长建. 刺参南移养殖技术研究[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2006, 25(2): 148-153.
- [4] 廖玉麟. 我国的海参[J]. 生物学通报, 2001, 35(9): 1-3.
- [5] 张庆文, 刘萍, 王伟继, 孔杰, 王清印. 中国对虾抗病群体选育的初步研究[J]. 海洋水产研究, 2002, 23(2): 53-57.
- [6] Brett W M, Anthony R C, Greg B M. A comparison of the heat tolerance and growth of a selected and non-selected line of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Western Australia[J]. *Aquaculture*, 2004, 241: 655-665.
- [7] Wagner E J, Arndt R E, Brough M. Comparative tolerance of four stocks of cutthroat trout to extremes in temperature[J]. *Wes N Am Na*, 2001, 61: 434- 444.
- [8] 陈叶福, 王正祥, 王晨霞, 方慧英, 诸葛健. 耐高温酵母菌株的分离、鉴定及其酒精发酵初步研究[J]. 微生物学通报, 2003, 30: 24-27.
- [9] Deeming D C. Reasons for the dichotomy in the need for egg turning during incubation in birds and reptiles[A]. Deeming D C, Ferguson M W J. Its Effect on Embryonic Development in Birds and Reptiles [C]. Cambridge University Press, Cambridge, 1991. 307-323.
- [10] Villarreal H, Ocampo L. Effect of size and temperature on the oxygen consumption of the brown shrimp *Penaeus californiensis* (Holmes, 1900)[J]. *Comp Biochem Physiol*, 1993, 106 A(1): 97-101.
- [11] 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.
- [12] 曲凌云, 孙修勤, 相建海, 洪旭光, 张进兴. 热休克蛋白研究进展[J]. 海洋科学进展, 2004, 22(3): 385-391.
- [13] Kazumi N, George K I. The 70-kDa heat shock protein response in two intertidal sculpins, *Oligocottus maculosus* and *O. snyderi*: relationship of hsp70 and thermal tolerance[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2002, 133(1): 79-94.
- [14] Parsell D A, Lindquist S. Heat shock proteins and stress tolerance[A]. Morimoto R I, Tissieres A, Georgopoulos C, *et al.* The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones[C]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. 457-494.
- [15] Francoise A. Adjuvants for vaccines, a quest[J]. *International Immunopharmacology*, 2003, 3(8): 1 187-1 193.
- [16] Clegg J S, Uhlinger K R, Jackson S A. Induced thermotolerance and the heat shock protein- 70family in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1998, 7(1): 21.
- [17] Snyder M J, Girvetz E, Mulder E P. Induction of marine mollusc stress proteins by chemical or physical stress[J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2001, 41: 22-29.
- [18] Shinnick T M. Heat shock proteins as antigens of bacterial and parasitic pathogens[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1991, 167: 145-160.
- [19] 张其中, 邱马银, 吴信忠, 潘金培. 热休克诱导近江牡蛎对高温的耐受性[J]. 生态科学, 2005, 24(1): 35-37.
- [20] Dong Y W, Dong S L, Meng X L. Effects of thermal and osmotic stress on growth, osmoregulation and Hsp70 in sea cucumber(*Apostichopus japonicus* Selenka)[J]. *Aquaculture*, 2008, 276: 179-186.

Effect of temperature on growth and HSP70 mRNA expression of thermo-tolerant brood of *Apostichopus japonicus*

LIU Guang-bin^{1,2}, YANG Hong-sheng¹, LIU Shi-lin¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: May, 24, 2008

Key words: *Apostichopus japonicus* (Selenka); SGR; fluorescent real-time quantitative RT-PCR; selected breeding

Abstract: Under laboratory conditions, late auricularia of *Apostichopus japonicus* were reared at 26°C. Five days after the larvae completely metamorphosed, we transferred the juveniles, the so-called thermal-chosen brood, into sea water at natural temperature. This brood grew to 1.03 g±1.30 g. Comparative studies on the growth and different expression of HSP70 of this brood and the natural population were carried out. Data series like weight, density, and expression of HSP70 were recorded. Statistics showed that the survival rate of thermal-chosen group were significantly higher than the control group at 24°C ($P<0.05$). No significant differences of SGR and mRNA expressions of HSP70 were observed between the two groups.

(本文编辑: 梁德海)

(上接第 48 页)

GIS-based automatic extracting isohyets of the sandbar at the Yellow River estuary

HUANG Bing-hu¹, YANG Xiao-yang², ZHAO Jian¹, SUN Gen-yun¹

(1. College of Geo-resources and Information, China University of Petroleum, Qingdao 266555, China; 2. Institute of the Yellow River Estuarine Research, Dongying 257091, China)

Received: Jan., 3, 2010

Key words: GIS; the Yellow River Mouth; sandbar; isohyets; Kriging

Abstract: In order to interpolate monitoring points and to extract isohyets automatically, we analyzed isohyets extraction steps and the main idea based on ArcGIS Engine, and realized isohyets extraction of the Yellow River estuary Sandbar and applied it in the Yellow River estuary geographic information system.

(本文编辑: 刘珊珊)