

金乌贼热休克蛋白基因的挖掘及对低盐胁迫的响应

王兴强¹, 郑年昊¹, 崔春辉¹, 曹 梅¹, 沈 晔¹, 刘 莹¹, 张子文¹, 汤子威¹, 秦传新², 陈百尧³

(1. 江苏海洋大学 海洋科学与水产学院, 江苏 连云港 222005; 2. 中国水产科学研究院 南海水产研究所, 广东 广州 510300; 3. 连云港市农业农村局, 江苏 连云港 222005)

摘要: 热休克蛋白(heat shock proteins: HSPs)为动植物响应外界胁迫产生的一类蛋白质, 能有效改善机体对外界胁迫的适应能力。本研究基于先前获得的低盐胁迫金乌贼(*Sepia esculenta*)高通量转录组数据, 对与低盐胁迫密切相关的热休克蛋白(热休克蛋白家族和晶体蛋白(crystallin)家族)基因进行挖掘; 鉴于实时定量内参基因筛选, 同时挖掘出金乌贼肌动蛋白(actin)家族系列基因; 然后, 对肌动蛋白、热休克蛋白和晶体蛋白家族基因及其编码的氨基酸序列进行生物信息学分析并探究低盐胁迫对金乌贼热休克蛋白和晶体蛋白家族基因表达的影响。金乌贼肌动蛋白家族基因包括 *actin*、内收肌 *actin*、胞质 *actin*、*actin 1*、*actin II* 和 β *actin* 6 个成员, 热休克蛋白家族基因包括 *HSP β* 、小 *HSP*、*HSP 10*、*HSP 16*、*HSP 30*、*HSP 60*、*HSP 70*、*HSP 75*、*HSP 90 α* 、*HSP 90* 和 *HSP 90 β* 11 个成员, 金乌贼晶体蛋白家族基因包括 *S crystallin*、*S crystallin 6*、*S crystallin SL18* 和 *O crystallin* 4 个成员。氨基酸序列比对发现, 肌动蛋白家族 6 个基因共享甘氨酸、精氨酸、丝氨酸、异亮氨酸、苏氨酸和天冬氨酸等 13 个位点, 晶体蛋白家族 4 个基因共享苯丙氨酸、天冬酰胺、甘氨酸、天冬氨酸、脯氨酸、精氨酸、酪氨酸、丝氨酸和半胱氨酸等 17 个位点, 而热休克蛋白家族 *HSP β* 、小 *HSP*、*HSP 10*、*HSP 16* 和 *HSP 30* 5 个基因共享 1 个甘氨酸位点和 4 个保守位点, *HSP 60*、*HSP 70*、*HSP 75*、*HSP 90 α* 、*HSP 90* 和 *HSP 90 β* 6 个基因仅共享 2 个保守位点。实时定量结果发现, 低盐胁迫可以明显提高金乌贼 *HSP β* 、*HSP 16*、*HSP 30* 和 *HSP 70* 的基因表达, 而明显降低晶体蛋白家族基因的表达, 表明在低盐胁迫条件下, 金乌贼热休克蛋白家族基因通过自身的差异表达来提高机体对外界胁迫的适应防御能力。

关键词: 金乌贼(*Sepia esculenta*); 低盐胁迫; 肌动蛋白; 热休克蛋白; 晶体蛋白

中图分类号: Q768 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2021)03-0059-12

DOI: 10.11759/hyxx20200503003

发掘水生动物的优质功能基因是分子生物学研究的一个热点, 探究功能基因的表达模式是分子生物学的重要研究方向。热休克蛋白(heat shock proteins: HSPs)广泛存在于动植物及微生物间, 为受外界高温缺氧胁迫、化学刺激或紫外线污染等所产生的一类蛋白质, 能够阻止变性的蛋白聚集、协助变性的蛋白重新折叠或者溶解聚集的变性蛋白, 有效提高机体对外界胁迫的适应防御能力; 学者们先后克隆了合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)、企鵝珍珠贝(*Pteria penguin*)、香港巨牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)、太平洋牡蛎(*C. gigas*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)和脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)等水产养殖品种的热休克蛋白基因^[1-10]。根据热休克蛋白基

因高度保守且易受外界胁迫大量表达的特性, 可当作生物标记物用于环境监测。头足类和脊椎动物眼睛外观上非常相似, 均具有晶状体细胞, 可将普遍功能的蛋白质转化为晶体结构性蛋白即晶体蛋白(crystallin)并主要富集于眼睛晶状体中; 晶体蛋白和小热休克蛋白(small heat shock proteins: sHSPs)约有 90~100 个氨基酸残基同源, 一般也归类为热休克蛋白家族基因成员^[11-13]。基因表达研究需要一个稳定表达的管家基因

收稿日期: 2020-05-03; 修回日期: 2020-06-03

基金项目: 广东省渔业生态环境重点实验室开放基金资助项目(FEEL_2019_3); 连云港市海燕计划科研项目(KK19064)

[Foundation: Open Fund of Guangdong Key Laboratory of Fishery Ecological Environment, No. FEEL_2019_3; Scientific Research Project of Lianyungang Haiyan Plan, No.KK19064]

作者简介: 王兴强(1975—), 男, 教授, 博士, 主要从事养殖生态学方面的研究, E-mail: wangxingqiang@jou.edu.cn

作为内参,肌动蛋白(actin)是符合要求的优质管家基因,不同物种间高度保守且在不同组织细胞中表达量较高,常作为功能基因表达检测的内参基因;目前已从碱蓬(*Suaeda glauca*)、浙贝母(*Fritillaria thunbergii*)、鸢乌贼(*Sthenoteuthis oualaniensis*)和曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)等多种生物中成功克隆出肌动蛋白基因序列,其不同物种间的差异不超过 20%^[14-18]。

金乌贼(*Sepia esculenta*)在中国黄海中部均有分布,适盐范围 28~31,是中国重要的渔业资源;然而自上世纪末,环境的破坏和过度的捕捞已导致金乌贼资源急剧减少。在适宜盐度范围内,金乌贼耗氧率和呼吸代谢酶活性保持在较低水平;但在低盐条件下,金乌贼受精卵体积减少,孵化时间延长,孵化率明显降低;同时,金乌贼体内释放出大量活性氧,如不能及时消除,不断积累后会破坏细胞的原始动态平衡^[19]。目前我国金乌贼人工繁育技术尚处于起步阶段,生物信息学方面的研究也较少,金乌贼肌动蛋白、热休克蛋白和晶体蛋白等基因的研究尚未报道。本研究基于先前通过 RNA-seq 技术获得的低盐胁迫条件下(骤降 15 盐度,胁迫盐度为 15,胁迫周期 6 h)金乌贼高通量转录组数据,对与低盐胁迫密切相关的热休克蛋白(热休克蛋白家族和晶体蛋白家

族)基因进行挖掘,同时挖掘出金乌贼肌动蛋白家族系列基因,从分子水平探究肌动蛋白、热休克蛋白和晶体蛋白的进化水平及低盐胁迫对热休克蛋白和晶体蛋白基因表达的影响,以期阐明金乌贼应答低盐胁迫的分子调控特征,为金乌贼分子标记的开发提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 金乌贼家族基因核苷酸序列获取

金乌贼低盐胁迫试验、转录组测序等详细信息见文献[20]。对原始数据进行过滤,获得高质量测序数据。利用 Trinity 软件对高质量的待分析数据进行从头组装,获得 Unigene 注释文档。为了确定金乌贼肌动蛋白、热休克蛋白和晶体蛋白家族基因,搜索 Unigene 注释文档,获取系列基因,通过在线序列工具包(SMS)预测开放阅读框并翻译成蛋白质,通过 Pfam、SMART 和 NCBI 非冗余数据库比对确认所得开放阅读框是否正确,如果经过筛选后的肌动蛋白、热休克蛋白和晶体蛋白基因序列具有至少一个保守结构,则确定其为金乌贼基因家族成员并选择具有起始和终止密码子的序列进行对扩验证,对扩验证引物见表 1,热休克蛋白基因部分成员实时定量引物见表 2。

表 1 对扩验证引物

Tab. 1 Primers for amplification

基因名称	验证引物序列(5'~3')	基因名称	验证引物序列(5'~3')
<i>Am actin</i> F	ATGTGTGACGACGACGTTGC	<i>HSP β</i> F	ATGGATGACAACGAAGTAGCTG
<i>Am actin</i> R	TTAGAAACATTTGCGGTGAACGATG	<i>HSP β</i> R	CTAAAAACATTTTCTGTGAACGATTCC
<i>Cp actin</i> F	ATGGAAGAAGAGATCGCCG	<i>sHSP</i> F	ATGTGTGACGACGACGTTGC
<i>Cp actin</i> R	TTAGAAGCATTGCGGTGGA	<i>sHSP</i> R	TTAGAAACATTTGCGGTGAACGATG
<i>Actin II</i> F	ATGGAAGAAGAGATCGCCGCGCTGGT CATTG	<i>HSP 10</i> F	ATGGAAGAAGAGATCGCCG
<i>Actin II</i> R	TTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGA GGGG	<i>HSP 10</i> R	TTAGAAGCATTGCGGTGGA
<i>β actin</i> F	ATGGATGACAACGAAGTAGCTG	<i>HSP 16</i> F	ATGTCTCGCGAACTGATGATTC
<i>β actin</i> R	CTAAAAACATTTTCTGTGAACGATTCC	<i>HSP 16</i> R	TTAAGCTTTTCAATCGAGATCAGAC
<i>S crystallin</i> F	ATGCCTAACTACACCCTCCATTAC	<i>HSP 30</i> F	ATGTCTCTCTCCACACCTTCCACACTCCTG
<i>S crystallin</i> R	CTACCAACAAGTATTACAGCGGC	<i>HSP 30</i> R	TTACTCGACGGTAATCTTCTGCCCCCA
<i>S crystallin 6</i> F	ATGCCGATGTACTCTATACTATTTC	<i>HSP 70</i> F	ATGTCTAAAGCAGTCGGGATTGA
<i>S crystallin 6</i> R	TTACCAGTTGGTGGCTGCC	<i>HSP 70</i> R	TTAGTCAACTTCTTCAATTGTAGGGC
<i>S crystallin SL18</i> F	ATGCCCAAGTACACACTGTATTATT	<i>HSP 90</i> F	ATGGCTAAATGGGACCAAAGGGACC
<i>S crystallin SL18</i> R	TCAAAAAGTCGGTATAGTTTCTTAGAGT	<i>HSP 90</i> R	TTAGAACAAGTGGGACCAAAGGGACC
<i>O crystallin</i> F	ATGGAAGCCTTTAACAACCA	<i>HSP 90α</i> F	ATGGCTAAATGGGACCAAAGGGACC
<i>O crystallin</i> R	CTACATTCTAAAATGTTCTTGTAACCT	<i>HSP 90α</i> R	TTAGAACAAGTGGGACCAAAGGGACC

注: *Am actin*: 内收肌肌动蛋白基因; *Cp actin*: 胞质肌动蛋白基因; *HSP*: 热休克蛋白基因; *sHSP*: 小热休克蛋白基因,下同

表 2 实时定量引物

Tab. 2 Primers for real-time PCR

基因名称	验证引物序列(5'~3')	基因名称	验证引物序列(5'~3')
<i>β actin</i>	AACCTTCTCTTCTCGGCATGG	<i>HSP 90 F</i>	AACCAACAAGTGTTGCTGAAC
<i>β actin</i>	ACATTGTCGTACCACCGGAC	<i>HSP 90 R</i>	GCTTGGATTGCATGTCCTTGG
<i>HSP β F</i>	ACCTTACCGGATGGGACTGA	<i>S Crystallin F</i>	GGAGATGGACGGTGGCAATA
<i>HSP β R</i>	TATTGGCCGGAGATTCCACG	<i>S Crystallin R</i>	CACCTCCGAAGCCATAGTCG
<i>HSP 16 F</i>	TCACCGACAGCGATGGTAAC	<i>S Crystallin 6 F</i>	TTTATGGGTGACCAGATGATGC
<i>HSP 16 R</i>	ACACTTTCTTGCCTGGCGTA	<i>S Crystallin 6 R</i>	GGTAGTTGCTGAACAGGGACTG
<i>HSP 30 F</i>	CACCGGTCGACCAGAAATCA	<i>S Crystallin SL18 F</i>	GAAAGCACGCTGAAGACACG
<i>HSP 30 R</i>	GGAGTGCCGGAGTGGTATTC	<i>S Crystallin SL18 R</i>	CTCCAGGGCACAGTAGCACA
<i>HSP 70 F</i>	ACAAGATCAGCGAGGACGAC	<i>O Crystallin F</i>	GTTCAGGCCACCATCGTTATGT
<i>HSP 70 R</i>	TGAGGCCAGTTGGTTTTGGT	<i>O Crystallin R</i>	GGACACTTTCATCCCATTACAGC

1.2 金乌贼家族基因氨基酸序列分析

金乌贼肌动蛋白、热休克蛋白和晶体蛋白家族基因完整编码区分析使用 Lasergene 中的 Editseq 软件, 氨基酸特性分析使用 ProtPram, 氨基酸结构域分析使用 SMART, N 糖基化位点分析使用 NetNGlyc 1.0, 利用 Clustal X 多序列比对, 通过 Mega 7 构建进化树, 用自展法进行 1 000 次重复检测。

1.3 低盐胁迫试验

本次试验材料为孵化 30 d 左右的乌贼自繁幼体, 体质量 1.3 g±0.3 g, 幼体苗种培育盐度 30。人工育苗所用金乌贼亲体来自海州湾海域, 亲体暂养及育苗工作均在连云区大板桥试验基地育苗室中完成。(1) 盐度骤降 15(胁迫盐度为 15)和 10(胁迫盐度为 20)胁迫 3 h 后对照和低盐胁迫组分别取 5 只幼体, 液氮速冻; 每个处理分别设 3 个重复; 盐度骤降 5(胁迫盐度为 25)胁迫 3、6、9、12 和 20 h 后对照和低盐胁迫组分别取 5 只幼体, 液氮速冻; 每个处理分别设 3 个重复; (2) 盐度骤降 5(胁迫盐度为 25)胁迫 30、60 和 120 min 后对照和低盐胁迫组分别取 5 只幼体, 液氮速冻; 每个处理分别设 4 个重复。取金乌贼幼体在液氮中研磨成粉, 通过 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 检测合格后反转录备用。利用提取出的 cDNA 为模版进行基因对扩, 目的条带回收, T 载连接、转化、摇菌、涂平板和菌落 PCR 检测, 生工测序。

2 结果

2.1 金乌贼肌动蛋白家族基因序列分析

通过与 NCBI 中人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)和斑马鱼(*Danio rerio*) *actin* 基因序列比对

发现, 金乌贼肌动蛋白家族共有 *actin*、内收肌 *actin*、胞质 *actin*、*actin I*、*actin II* 和 *β actin* 6 个基因成员, 其中内收肌 *actin*、胞质 *actin*、*actin II* 和 *β actin* 4 个成员得到对扩验证(表 1, 表 3)。氨基酸序列分析发现, 金乌贼肌动蛋白家族基因翻译出氨基酸序列最短的为 *actin I*, 最长的为 *actin*。金乌贼肌动蛋白基因家族氨基酸序列的相对分子质量在 8 913~41 438, 最低的为 *actin I*, 最高的为 *actin*。金乌贼肌动蛋白基因家族的理论等电点在 9.51~9.87 左右。由图 1 可以看出, 6 个金乌贼肌动蛋白家族基因成员均具有 *actin* 结构域。通过金乌贼肌动蛋白家族基因氨基酸序列比对发现, 肌动蛋白家族 6 个基因成员共享 5 个甘氨酸(G)位点, 2 个精氨酸位点(R), 2 个丝氨酸位点(S), 2 个异亮氨酸位点(I), 1 个苏氨酸位点(T)和 1 个天冬氨酸位点(D)(图 2a)。通过 Clustal X 将金乌贼肌动蛋白家族基因与其他物种的 *actin* 基因进行多序列比对分析, 通过 Mega 7 构建系统进化树(图 3a), 发现金乌贼内收肌 *actin* 和胞质 *actin* 基因关系最近, 它们与 *actin II*、*β actin* 和 *actin I* 基因关系较近, 独占一个大的分支, 然后与其他物种 *actin* 基因聚在一起, 但以上 5 个成员与金乌贼 *actin* 基因关系较远。

2.2 金乌贼热休克蛋白家族基因序列分析

通过 NCBI 序列比对发现, 金乌贼热休克蛋白家族包括 *HSP β*、小 *HSP*、*HSP 10*、*HSP 16*、*HSP 30*、*HSP 60*、*HSP 70*、*HSP 75*、*HSP 90α*、*HSP 90* 和 *HSP 90β* 11 个基因成员, 其中 *HSP β*、小 *HSP*、*HSP 10*、*HSP 16*、*HSP 30*、*HSP 70*、*HSP 90α* 和 *HSP 90* 8 个成员得到对扩验证(表 1, 表 3)。氨基酸序列分析发现, 金乌贼热休克蛋白基因家族翻译出的氨基酸序列最短的为 *sHSP*, 最长的为 *HSP 90α*。金乌贼热

表 3 金乌贼基因家族核苷酸和氨基酸序列分析

Tab. 3 Nucleotide and amino acid sequence analysis of the gene family of *S. esculenta*

基因	碱基数(bp)	开放阅读框碱基数(bp)	(G+C)(%)	氨基酸数(个)	相对分子质量(Da)	理论等电点
<i>Actin</i>	1 639	1 113	39	370	41 438	9.87
<i>Am actin</i>	1 131	837	51	278	29 956	9.51
<i>Cp actin</i>	1 128	828	61	275	29 697	9.68
<i>Actin I</i>	315	252	49	83	8 913	9.51
<i>Actin II</i>	822	600	47	199	21 455	9.75
β actin	1 131	1 131	47	278	30 066	9.54
<i>S crystallin</i>	672	672	48	223	27 175	7.42
<i>S crystallin 6</i>	747	747	46	248	28 557	8.71
<i>S crystallin SL18</i>	918	918	45	305	35 989	4.99
<i>O crystallin</i>	549	549	45	182	21 053	8.65
<i>HSP β</i>	510	510	50	169	19 040	5.96
<i>sHSP</i>	96	96	54	31	3 354	6.28
<i>HSP 10</i>	297	297	45	98	10 820	8.75
<i>HSP 16</i>	516	516	42	171	19 771	6.86
<i>HSP 30</i>	459	459	57	152	17 391	8.71
<i>HSP 60</i>	1 656	1 656	43	551	59 059	5.47
<i>HSP 70</i>	1 950	1 950	42	649	71 344	5.33
<i>HSP 75</i>	1 269	987	45	328	47 895	7.05
<i>HSP 90α</i>	2 154	2 154	39	717	82 648	5.03
<i>HSP 90</i>	2 028	2 028	40	675	77 951	5.37
<i>HSP 90β</i>	1 259	831	51	276	46 279	10.24

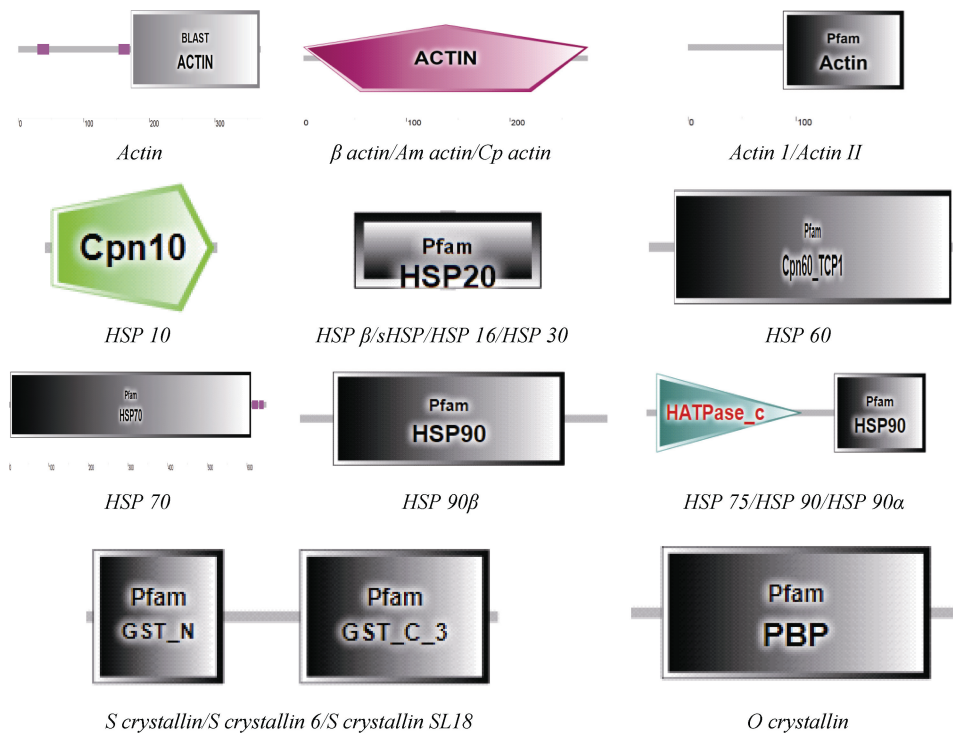


图 1 金乌贼基因家族结构域分析

Fig. 1 Domain analysis of the gene family of *S. esculenta*

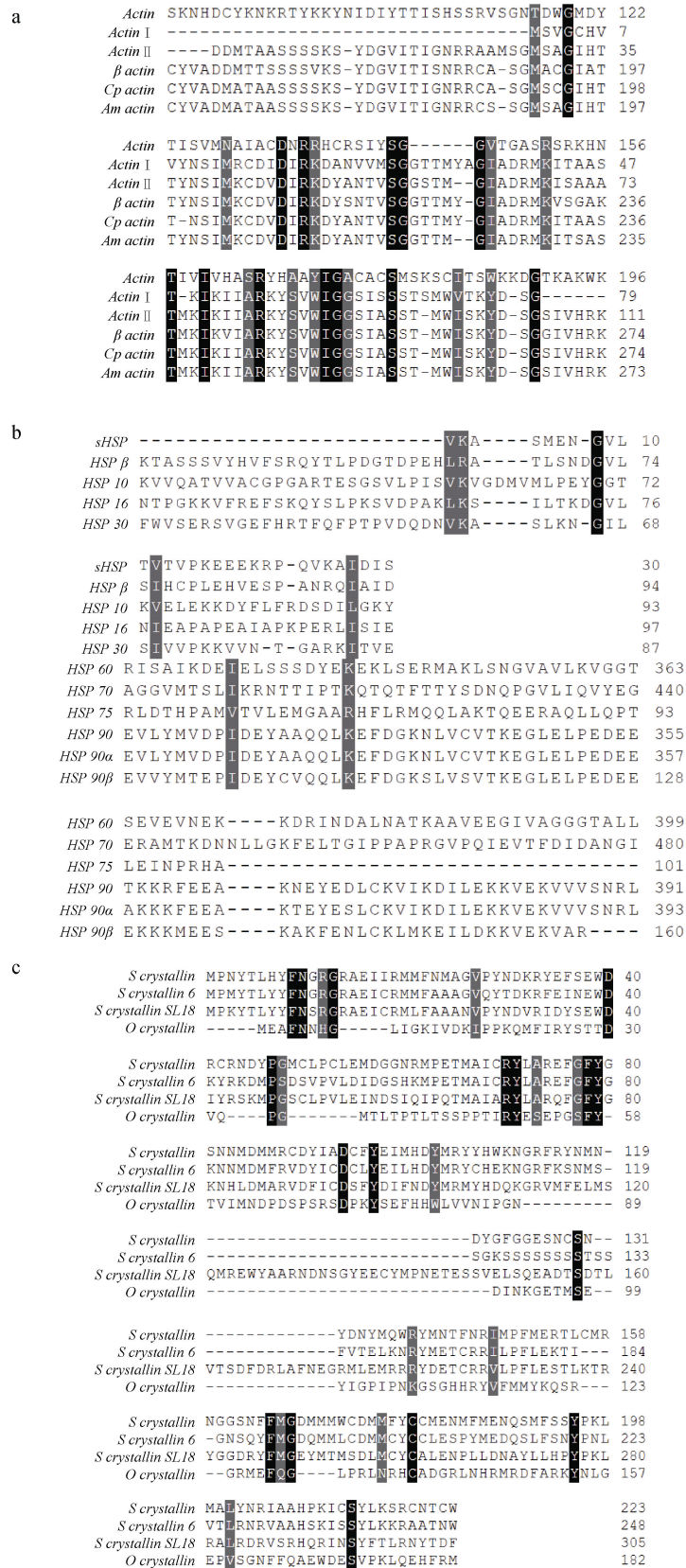


图 2 金乌贼肌动蛋白(a)、热休克蛋白(b)和晶体蛋白(c)家族基因多序列比对

Fig. 2 Multiple sequence alignment of the protein actin (a), HSP (b) and crystalline (c) gene family of *S. esculenta*

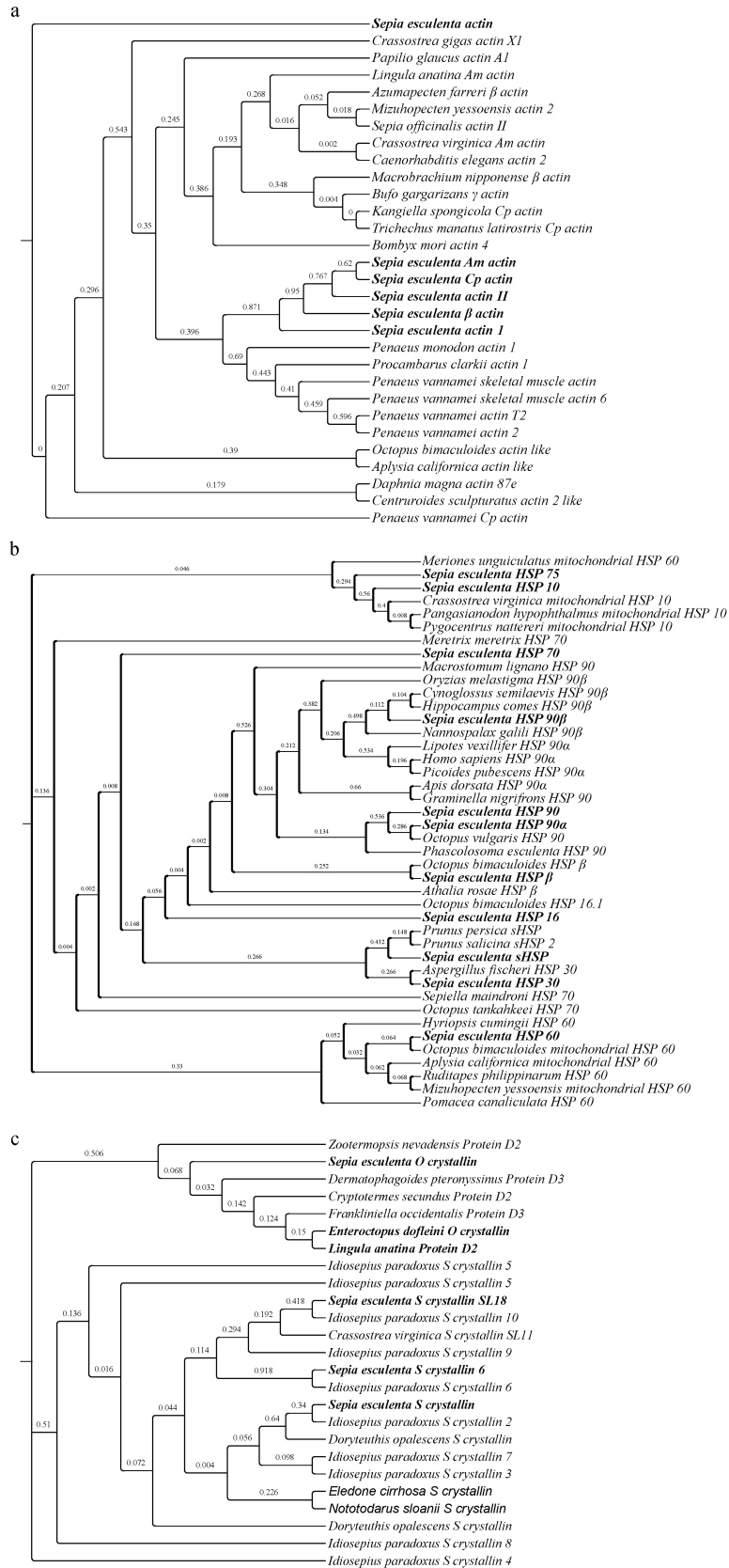


图 3 金乌贼肌动蛋白(a)、热休克蛋白(b)和晶体蛋白(c)家族基因系统进化树
 Fig. 3 Phylogenetic tree of the protein actin (a), HSP (b) and crystalline (c) gene family of *S. esculenta*

休克蛋白家族基因氨基酸序列的相对分子质量在 3 354~82 648, 金乌贼热休克蛋白家族基因的理论等电点在 5.03~10.24。由图 1 可以看出, 金乌贼 *HSP 10* 具有 Cpn 10 结构域, *HSP β* 、小 *HSP*、*HSP 16* 和 *HSP 30* 均具有 HSP 20 结构域, *HSP 60* 具有 Cpn 60_TCP1 结构域, *HSP 70* 具有 HSP 70 结构域, *HSP 90 β* 具有 HSP 90 结构域, *HSP 75*、*HSP 90* 和 *HSP 90 α* 均具有 HATPase_c HSP 90 结构域。通过金乌贼热休克蛋白家族基因氨基酸序列比对发现, *HSP β* 、小 *HSP*、*HSP 10*、*HSP 16* 和 *HSP 30* 共享 1 个甘氨酸(G)位点和 4 个保守位点, 而 *HSP 60*、*HSP 70*、*HSP 75*、*HSP 90 α* 、*HSP 90* 和 *HSP 90 β* 仅共享 2 个保守位点(图 2b)。通过 Clustal X 将金乌贼热休克蛋白家族基因与其他物种的 *HSP* 序列进行多重比较并通过 MAGA 7 软件构建进化树(图 3b), 发现金乌贼 *HSP 10* 与美洲牡蛎(*C. virginica*)、低眼无齿芒(*Pangasianodon hypophthalmus*)和红腹食人鱼(*Pygocentrus nattereri*) *HSP 10* 基因关系较近, 与金乌贼 *HSP 75* 及长爪沙鼠(*Meriones unguiculatus*) *HSP 60* 基因形成独立一支; 金乌贼 *HSP 60* 与三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)、海蜗牛(*Aplysia californica*)、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)、日本扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)和福寿螺(*Pomacea canaliculata*) *HSP 60* 基因关系较近, 形成独立一支; 金乌贼 *HSP 90 β* 与半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)、虎尾海马(*Hippocampus comes*)和鼯鼠(*Nannospalax galili*) *HSP 90 β* 基因关系较近, 形成独立一支; 金乌贼 *HSP 90*、*HSP 90 α* 与真蛸(*Octopus vulgaris*)和可口革囊星虫(*Phascolosoma esculenta*) *HSP 90* 基因关系较近, 形成独立一支; 金乌贼 *HSP β* 与加州双斑蛸(*O. bimaculoides*) *HSP β* 基因关系较近, 形成独立一支, 而金乌贼 *HSP 16* 与加州双斑蛸 *HSP 16.1* 基因关系较近, 金乌贼 *sHSP* 与水蜜桃(*Prunus persica*) *sHSP* 和李(*P. salicina*) *sHSP 2* 基因关系较近, 形成独立一支; 金乌贼 *HSP 30* 与费希尔曲霉(*Aspergillus fischeri*) *HSP 30* 基因关系较近, 形成独立一支; 金乌贼 *HSP 90* 与曼氏无针乌贼和嘉庚蛸(*O. tankahkeei*) *HSP 90* 基因关系较近。由此可见, 金乌贼热休克蛋白家族基因与以上品种具有高度相似性。

通过 NCBI 序列比对, 金乌贼晶体蛋白家族基因包括 *S crystallin*、*S crystallin 6*、*S crystallin SL18* 和

O crystallin 4 个成员, 均得到对扩验证(表 1)。晶体蛋白家族基因(C+G)含量在 45%~48%范围内。氨基酸序列分析发现, 金乌贼晶体蛋白家族基因翻译出的氨基酸序列最短的为 *O crystallin*, 含 182 个氨基酸残基; 最长的为 *S crystallin SL18*, 含 305 个氨基酸残基。金乌贼晶体蛋白家族基因氨基酸序列的相对分子质量在 21 053~35 989。金乌贼晶体蛋白家族基因的理论等电点在 4.99~8.71。由图 1 可以看出, 金乌贼 *S crystallin*、*S crystallin 6* 和 *S crystallin SL18* 均具有 GST_N GST_C_3 结构域, 而 *O crystallin* 具有 PBP 结构域。通过金乌贼晶体蛋白家族基因氨基酸序列比对发现, *S crystallin*、*S crystallin 6*、*S crystallin SL18* 和 *O crystallin* 4 共享 3 个苯丙氨酸(F)位点, 1 个天冬酰胺(N)位点, 2 个甘氨酸(G)位点, 2 个天冬氨酸(D)位点, 1 个脯氨酸(P)位点, 1 个精氨酸(R)位点, 4 个酪氨酸(Y)位点, 2 个丝氨酸(S)位点和 1 个半胱氨酸(C)位点(图 2c)。通过 Clustal X 将金乌贼晶体蛋白家族基因与其他物种的 *crystallin* 序列进行多重比较并通过 MAGA 7 软件构建进化树(图 3c), 发现金乌贼 *O crystallin* 与白蚁(*Zootermopsis nevadensis*)、尘螨(*Dermatophagoides pteronyssinus*)、基白蚁(*Cryptotermes secundus*)、西花蓟马(*Frankliniella occidentalis*)和海豆芽(*Lingula anatina*) D2 蛋白及北太平洋巨型章鱼(*Enteroctopus dofleini*) *O crystallin* 基因关系较近, 形成独立一支; 金乌贼 *S crystallin SL18* 与玄妙微鳍乌贼(*Idiosepius paradoxus*) *S crystallin 10*、美洲牡蛎 *S crystallin SL11* 和玄妙微鳍乌贼 *S crystallin 9* 基因关系较近, 形成独立一支; 金乌贼 *S crystallin 6* 与玄妙微鳍乌贼 *S crystallin 6* 基因关系较近, 形成独立一支; 金乌贼 *S crystallin* 与玄妙微鳍乌贼 *S crystallin 2* 和乳光枪乌贼(*Doryteuthis opalescens*) *S crystallin* 基因关系较近, 形成独立一支。由此可见, 金乌贼的蛋白 *crystallin* 家族基因与以上品种具有高度的相似性。

2.3 低盐胁迫对金乌贼热休克蛋白基因表达的影响

金乌贼热休克蛋白基因表达量与盐度的关系见表 4~表 6, 低盐胁迫可以明显提高金乌贼 *HSP β* 、*HSP 16*、*HSP 30* 和 *HSP 70* 的基因表达。在 15 盐度, 低盐胁迫 3 h 后显著提高金乌贼 *HSP β* 、*HSP 30* 和 *HSP 70* 的基因表达($P<0.05$), 而在 20 盐度, 低盐胁迫 3 h 后仅 *HSP 70* 基因表达显著提高($P<0.05$)。在

25 盐度,随着胁迫时间的延长, *HSP β*、*HSP 16* 和 *HSP 70* 基因在 6 h 得到显著表达($P<0.05$)。低盐胁迫明显降低晶体蛋白家族基因的表达,由表 5 可以看出,盐度 15 和 20 胁迫可以显著降低 *S crystallin* 的

基因表达($P<0.05$),而在 25 盐度,随着时间的延长, *S crystallin* 基因表达较对照组显著降低($P<0.05$)。由表 6 可以看出,急性盐度胁迫(2 h 内)可以显著降低晶体蛋白家族基因的表达量($P<0.05$)。

表 4 低盐胁迫对金乌贼热休克蛋白家族基因 Log2(相对基因表达量)的影响

Tab. 4 Effect of low salinity stress on log2 (relative gene expression) of the protein HSP gene family of *S. esculenta*

基因名称	盐度 30	盐度 15 胁迫 3 h	盐度 20 胁迫 3 h	盐度 25 胁迫 3 h	盐度 25 胁迫 6 h	盐度 25 胁迫 9 h	盐度 25 胁迫 12 h	盐度 25 胁迫 20 h
<i>HSP β</i>	0.00±1.13 ^c	2.82±2.39 ^a	1.92±1.01 ^c	1.58±0.19 ^c	2.38±1.02 ^{ab}	1.29±0.73 ^{bc}	1.26±0.04 ^{bc}	1.52±0.11 ^{bc}
<i>HSP 16</i>	0.00±1.94 ^b	0.93±0.33 ^b	0.20±0.85 ^b	0.25±1.66 ^b	2.94±0.93 ^a	0.44±0.31 ^b	0.53±1.29 ^b	0.35±1.70 ^b
<i>HSP 30</i>	0.00±1.36 ^b	1.91±0.60 ^a	1.55±0.43 ^{ab}	0.10±1.65 ^b	0.62±0.61 ^{ab}	0.45±1.20 ^b	0.64±0.97 ^{ab}	0.99±0.38 ^{ab}
<i>HSP 70</i>	0.00±2.54 ^d	4.98±2.94 ^a	3.88±1.27 ^b	2.08±0.63 ^d	3.69±2.18 ^c	3.01±0.45 ^{cd}	1.69±1.06 ^{1d}	2.61±0.92 ^{cd}

表 5 低盐胁迫对金乌贼 *S crystallin* 基因 Log2 的影响

Tab. 5 Effects of low salinity stress on log2 of the *S crystallin* gene of *S. esculenta*

盐度 30	盐度 15 胁迫 3 h	盐度 20 胁迫 3 h	盐度 25 胁迫 3 h	盐度 25 胁迫 6 h	盐度 25 胁迫 9 h	盐度 25 胁迫 12 h	盐度 25 胁迫 20 h
0.00±1.80 ^a	-5.15±5.96 ^c	-2.69±2.70 ^{bc}	-0.56±2.32 ^{ab}	-1.88±2.11 ^{bc}	-4.78±5.79 ^c	-4.46±5.91 ^c	-2.55±3.94 ^c

表 6 低盐胁迫对金乌贼晶体蛋白家族基因 Log2 的影响

Tab. 6 Effects of low salinity stress on log2 of the protein crystallin gene of *S. esculenta*

基因名称	低盐胁迫 0 min	低盐胁迫 30 min	低盐胁迫 60 min	低盐胁迫 120 min
<i>S crystallin</i>	0.00±0.31 ^a	-0.79±1.34 ^b	-4.63±5.29 ^c	-3.63±3.92 ^c
<i>S crystallin 6</i>	0.00±0.54 ^a	-1.21±1.99 ^b	-4.95±5.91 ^c	-4.19±4.66 ^c
<i>S crystallin SL18</i>	0.00±0.57 ^a	-1.12±1.92 ^b	-2.42±3.37 ^b	-1.60±1.97 ^b
<i>O crystallin</i>	0.00±0.34 ^a	-1.70±2.13 ^b	-5.05±5.77 ^c	-3.77±4.00 ^c

3 讨论

肌动蛋白在细胞中广泛存在,大致分为 6 种;其中 α 骨骼肌肌动蛋白、 α 心肌肌动蛋白、 α 平滑肌肌动蛋白和 γ 平滑肌肌动蛋白等 4 种具有肌肉组织特异性,剩下的 β 肌动蛋白和 γ 非肌肉肌动蛋白 2 种散布于各种组织中。 α 肌动蛋白是肌肉组织收缩的主要成分, β 肌动蛋白和 γ 肌动蛋白在大多数细胞类型中共存,常作为细胞骨架的组分和内部细胞运动的介质^[21-23]。通过金乌贼肌动蛋白家族基因氨基酸序列比对发现,6 个成员共享甘氨酸、精氨酸、丝氨酸、异亮氨酸、苏氨酸和天冬氨酸等 13 个位点(图 2a),表明肌动蛋白家族基因在物种进化上高度保守且行使相类似的功能,不易随着环境因子的改变或年龄的变化而发生改变,适合在金乌贼基因表达研究中作为内参基因。通过进化树分析发现,金乌贼 *actin* 基因与内收肌 *actin*、胞质 *actin*、*actin II*、 β *actin* 和 *actin 1* 基因关系较远,具体原因推测有 3: (1) *actin* 基因较

其他家族成员保守; (2) 内收肌 *actin*、胞质 *actin*、*actin II* 和 β *actin* 4 个基因成员得到对扩验证,而 *actin* 基因虽然进行了对扩,但没有出现对扩条带,可能与本基因拼接的精确度较低有关; (3) *actin* 基因碱基数 1 639 bp,较其他家族成员长,可能基因内部有重复序列,从而影响了进化树的精确度。本研究挖掘出的金乌贼肌动蛋白、热休克蛋白和晶体蛋白家族基因经 SMART 预测无明显信号肽与跨膜区域,没有信号肽的蛋白质不太可能暴露于 N 糖基化机制,所以肌动蛋白、热休克蛋白和晶体蛋白家族基因均无 N 糖基化位点,推测肌动蛋白、热休克蛋白和晶体蛋白家族蛋白在细胞质中富集且不属于膜蛋白,主要在细胞内发挥作用。

当机体在正常状态下,应激反应性热休克蛋白主要维持机体的正常生理功能;但当机体受到外部环境刺激时,热休克蛋白便开始大量诱导表达,提高细胞保护能力,来抵抗外部不良环境带来的影响,维持细胞内环境的稳定^[24]。根据分子

质量、序列同源性、结构和功能,热休克蛋白家族基因通常被命名为 *HSP 100*、*HSP 90*、*HSP 70*、*HSP 60*、*HSP 40* 和 *sHSP* 等,本研究挖掘出热休克蛋白和晶体蛋白两个家族,金乌贼热休克蛋白家族基因包括 *HSP β* 、小 *HSP*、*HSP 10*、*HSP 16*、*HSP 30*、*HSP 60*、*HSP 70*、*HSP 75*、*HSP 90 α* 、*HSP 90* 和 *HSP 90 β* 11 个成员,而晶体蛋白家族基因包括 *S crystallin*、*S crystallin 6*、*S crystallin SL18* 和 *O crystallin* 4 个成员。先前研究发现,热休克蛋白家族部分成员具有特有的 ATPase 活性,主要用于调节热休克蛋白与蛋白质底物的关联和离解。当 ATP 在结合状态下时,热休克蛋白对蛋白质底物的亲和力较低,但当热休克蛋白将 ATP 水解成 ADP 时,就会与蛋白质底物亲密结合^[5-6]。由图 1 可以看出,*HSP 75*、*HSP 90* 和 *HSP 90 α* 基因均具有 ATPase 结构域,因而推测可能具有 ATPase 的活性。

脊椎动物的晶体蛋白家族包含非常多样化的可溶性蛋白质,它们之间的结构几乎没有相似之处,譬如晶体蛋白 K 和晶体蛋白 L/Q 存在于所有脊椎动物物种中,而其他类群特异性晶体蛋白则局限于特定的物种或系统发育群;不过,晶体蛋白家族基因在水生动物中分布较窄,且主要集中在头足类^[25-27]。先前试验证明,晶体蛋白是头足类眼部晶状体中重要的功能蛋白,对胞质折射率、酶代谢和维持晶状体结构等方面起着重要作用^[28]。本研究挖掘出金乌贼 3 个 S 型 *crystallin* 和 1 个 O 型 *crystallin* 基因。一般来说,类群特异性晶体蛋白与代谢酶有关。蛋白 GST(谷胱甘肽硫转移酶, E.C.2.5.1.18)是一种解毒酶,在哺乳动物肝脏中含量较高,通过催化某些内源性或外来有害物质与谷胱甘肽的结合,从而达到解毒的目的^[29-30]。由图 1 可以看出,金乌贼 *S crystallin*、*S crystallin 6* 和 *S crystallin SL18* 基因均具有 GST 结构域;基于物种进化的原则,金乌贼 *S crystallin*、*S crystallin 6* 和 *S crystallin SL18* 可能具有酶的活性,以上 3 个基因可能来源于蛋白 GST 的基因复制和随后的突变碱基替换。虽然 *O crystallin* 基因不具有 GST 结构域,但氨基酸序列比对发现,晶体蛋白家族 4 个基因成员共享苯丙氨酸、天冬酰胺、甘氨酸、天冬氨酸、脯氨酸、精氨酸、酪氨酸、丝氨酸和半胱氨酸等 17 个位点;相对而言,热休克蛋白家族 *HSP β* 、小 *HSP*、*HSP 10*、*HSP 16* 和 *HSP 30* 5 个基因共享 1 个甘氨酸位点和 4 个保守位点, *HSP 60*、*HSP*

70、*HSP 75*、*HSP 90 α* 、*HSP 90* 和 *HSP 90 β* 6 个基因仅共享 2 个保守位点,表明在金乌贼中,晶体蛋白家族基因较热休克蛋白家族保守。先前,Varó^[31]等通过蛋白质组学方法分析摄食对章鱼的影响时鉴定出 43 种差异表达的蛋白质,其中包括蛋白 GST、热休克蛋白、晶体蛋白 S 等,作者认为上述蛋白质可以作为评估与营养压力相关的生物标志物。

本研究实时定量结果发现,低盐胁迫可以明显提高金乌贼 *HSP β* 、*HSP 16*、*HSP 30* 和 *HSP 70* 的基因表达,而明显降低晶体蛋白家族基因的表达,表明在低盐胁迫条件下,金乌贼热休克蛋白和晶体蛋白家族基因通过自身的差异表达来提高机体对外界胁迫的适应防御能力,因而本研究挖掘的热休克蛋白和晶体蛋白家族基因在研究金乌贼的抗环境胁迫方面有非常重要的意义,可为今后进行头足类低盐胁迫生理机制的探讨、分子标记的开发和关键基因的克隆等提供参考。除了头足类,学者们研究发现,低盐胁迫显著影响日本大眼蟹(*Macrophthalmus japonicus*)、虹鳟和仿刺参(*Apostichopus japonicus*)等热休克蛋白基因的表达^[32-34]。相对而言,关于低盐胁迫对晶体蛋白家族基因表达的影响,目前还未见相关报道。由前面讨论可知,热休克蛋白部分成员具有 ATPase 结构域,而晶体蛋白部分成员具有 GST 结构域,推测低盐胁迫可改变金乌贼 ATP 酶的活性,降低谷胱甘肽硫转移酶的解毒能力,有可能提高金乌贼对环境的敏感性。

参考文献:

- [1] Yoichiro H, Chihiro S, Ken K. Sulfatide-Hsp70 interaction promotes Hsp70 clustering and stabilizes binding to unfolded protein[J]. *Biomolecules*, 2015, 5(2): 958-973.
- [2] Nagata T, Sameshima M, Uchikawa T, et al. Molecular cloning and expression of the heat shock protein 70 gene in the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea*[J]. *Fisheries Science*, 2017, 83(2): 273-281.
- [3] 王亚男. 几种环境因子对马氏珠母贝生长、摄食及 Hsp70 基因表达量联合效应的研究[D]. 广州: 广东海洋大学, 2012.
Wang Yanan. Study on the combined effects of several environmental factors on the growth, feeding and Hsp70 gene expression of *Pinctada martensii*[D]. Guangzhou: Guangdong Ocean University, 2012.
- [4] 杨杰青, 沈新强, 蒋玫, 等. 盐度、pH 对文蛤肌肉、鳃、外套膜 HSP70 基因表达的影响[J]. *水产科学*,

- 2016, 35(4): 398-403.
- Yang Jieqing, Shen Xinqiang, Jiang Mei, et al. Effects of salinity and pH on HSP70 gene expression in muscle, gill and mantle of *Meretrix meretrix*[J]. Fisheries Science, 2016, 35(4): 398-403.
- [5] 吴圣楠, 隗黎丽, 李海军, 等. 三角帆蚌热休克蛋白 70 基因克隆及其表达分析[J]. 水生生物学报, 2017, 41(1): 50-55.
- Wu Shengnan, Kui Lili, Li Haijun, et al. Cloning and expression analysis of heat shock protein 70 gene of *Hyriopsis cumingii*[J]. Journal of aquatic biology, 2017, 41(1): 50-55.
- [6] 刘甜雨, 王清, 陈慕雁. 热刺激对栉孔扇贝免疫功能和热休克蛋白表达的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2017, 47(8): 31-43.
- Liu Tianyu, Wang Qing, Chen Muyan. Effect of heat stimulation on immune function and expression of heat shock protein of *Chlamys farreri*[J]. Journal of China Ocean University (Natural Science Edition), 2017, 47(8): 31-43.
- [7] 辛苑茹, 温海深, 李吉方, 等. 急性高温胁迫对虹鳟二倍体和三倍体幼鱼 hsp70 基因表达的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2019, 49(3): 129-137.
- Xin Yuanru, Wen Haishen, Li Jifang, et al. Effects of acute thermal stress on gene expression of heat shock protein in diploid and triploid juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Periodical of Ocean University of China (Natural Science Edition), 2019, 49(3): 129-137.
- [8] 郝甜甜, 王际英, 李宝山, 等. 饲料中添加糖萜素对大菱鲆幼鱼生长、免疫及热休克蛋白 70 含量的影响[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2014, 40(3): 338-347.
- Hao Tiantian, Wang Jiying, Li Baoshan, et al. Effect of dietary supplementation of sacchariterpenin on growth, immunity and heat shock protein 70 content of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.), 2014, 40(3): 338-347.
- [9] Arockiaraj J, Vanaraja P, Easwvaran S, et al. Gene expression and functional studies of small heat shock protein 37 (MrHSP37) from *Macrobrachium rosenbergii* challenged with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39: 6671-6682.
- [10] 韩俊英, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾热休克蛋白 HSP90 基因的原核表达与鉴定[J]. 渔业科学进展, 2011, 32(5): 44-50.
- Han Junying, Li Jian, Li Jitao, et al. High level prokaryotic expression and identification of heat shock protein 90 in *Exopalaemon carinicauda*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2011, 32(5): 44-50.
- [11] 刘鹏, 孙建明. β B2 晶体蛋白的功能及相关机制研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(4): 505-507.
- Liu Peng, Sun Jianming. Research progress on the function and related mechanism of β B2 crystal protein[J]. International Journal of laboratory medicine, 2017, 38(4): 505-507.
- [12] De J W W, Leunissen J A, Voorter C E. Evolution of the alpha-crystallin/small heat-shock protein family[J]. Molecular Biology and Evolution, 1993, 10(1): 103-126.
- [13] Chang H C, Lin T L, Chang G G. Molecular Basis for the Polymerization of Octopus Lens S-Crystallin[J]. Biophysical Journal, 2000, 78(4): 2070-2080.
- [14] 刘卫东, 赫崇波, 刘彤, 等. 虾夷扇贝肌动蛋白基因 cDNA 序列克隆与分析[J]. 水产科学, 2008, 10: 519-522.
- Liu Weidong, He Chongbo, Liu Tong, et al. Cloning and analysis of full-length cDNA of actin gene from *Patinopecten yessoensis*[J]. Fisheries Science, 2008, 10: 519-522.
- [15] 林群, 梁旭方, 王琳, 等. 近江牡蛎等 7 种养殖鱼虾贝类参照基因 β -肌动蛋白 cDNA 序列的克隆与比较分析[J]. 生态毒理学报, 2008, 3: 256-261.
- Lin Qun, Liang Xufang, Wang Lin, et al. Cloning and comparative analysis of the reference gene β -actin cDNA sequence of 7 kinds of cultured fish, shrimp and shellfish, such as oyster[J]. Journal of Ecotoxicology, 2008, 3: 256-261.
- [16] 李继姬, 郭宝英, 吴常文. 曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*) β -肌动蛋白基因的 cDNA 全长克隆与序列分析[J]. 海洋与湖沼, 2011, 42(6): 787-793.
- Li Jiji, Guo Baoying, Wu Changwen. Full length cloning and sequence analysis of β -actin gene of *Sepiella maindroni*[J]. Ocean and Limnology, 2011, 42(6): 787-793.
- [17] 郑国湾, 董胜张, 俞晓平. 外来入侵生物福寿螺 β -actin 基因片段的克隆及表达分析[J]. 中国计量学院学报, 2012, 23(2): 182-186.
- Zheng Guowan, Dong Shengzhang, Yu Xiaoping. Cloning and expression analysis of β -actin gene fragment of *Oncomelania Fukushima*[J]. Journal of China Metrology Institute, 2012, 23(2): 182-186.
- [18] 冯亚斌, 施鑫磊, 俞信光, 等. 浙贝母肌动蛋白基因的克隆及生物信息学分析[J]. 中成药, 2017, 39(1): 126-130.
- Feng Yabin, Shi Xinlei, Yu Xinguang, et al. Cloning and bioinformatics analysis of actin gene of *Fritillaria thunbergii*[J]. Chinese Patent Medicine, 2017, 39(1): 126-130.
- [19] 崔春辉, 王力, 王兴强, 等. 金乌贼人工养殖技术[J]. 现代农业科技, 2018, 14: 229-230.
- Cui Chunhui, Wang Li, Wang Xingqiang, et al. Artificial culture technology of *Sepia esculenta*[J]. Modern Agricultural Technology, 2018, 14: 229-230.
- [20] 王兴强, 曹梅, 崔春辉, 等. 低盐胁迫下金乌贼转录

- 组学分析[J]. 水产科学, 2020, 39(3): 369-380.
- Wang Xingqiang, Cao Mei, Cui Chunhui, et al. Transcriptome analysis of cuttlefish *Sepia esculenta* exposed to low salinity stress[J]. Fisheries Science, 2020, 39(3): 369-380.
- [21] 王卓, 张少斌, 马镒, 等. 植物肌动蛋白研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007, 10: 2860-2863.
- Wang Zhuo, Zhang Shaobin, Ma Di, et al. Research progress of plant actin[J]. Anhui Agricultural Science, 2007, 10: 2860-2863.
- [22] Kumar A, Crawford K, Close L, et al. Rescue of cardiac α -actin-deficient mice by enteric smooth muscle γ -actin[J]. Cell Biology, 1997, 94(9): 4406-4411.
- [23] David C B, Kimberly R S, John G E. Actin gene family evolution and the phylogeny of coleoid cephalopods (Mollusca: Cephalopoda)[J]. Mol Biol Evol, 2000, 9: 9.
- [24] 全佳, 王胜军, 肖秦华. 热休克蛋白及其在眼部疾病中作用的研究进展[J]. 国际眼科杂志, 2006, 6(1): 152-157.
- Tong Jia, Wang Shengjun, Xiao Qinhua. Heat shock protein and its role in ocular diseases[J]. International Journal of Ophthalmology, 2006, 6(1): 152-157.
- [25] Gopal-Srivastava R, Cvekl A, Piatigorsky J. Involvement of retinoic acid/retinoid receptors in the regulation of murine α B-crystallin/small heat shock protein gene expression in the lens[J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(28): 17954-17961.
- [26] Dijk M A M V, Sweers M A M, Jong W W D. The evolution of an alternatively spliced exon in the α A-crystallin gene[J]. Journal of Molecular Evolution, 2001, 52(6): 510-515.
- [27] Kozawa O, Matsuno H, Niwa M, et al. AlphaB-crystallin, a low-molecular-weight heat shock protein, acts as a regulator of platelet function[J]. Cell Stress and Chaperones, 2001, 6(1): 21-28.
- [28] Lin C W, Chiou S H. Facile cloning and sequencing of S-crystallin genes from octopus lenses based on polymerase chain reaction[J]. Biochemistry International, 1992, 27(1): 173-178.
- [29] Tomarev S I, Chung S, Piatigorsky J. Glutathione s-transferase and s-crystallins of cephalopods: evolution from active enzyme to lens-refractive proteins[J]. Journal of Molecular Evolution, 1995, 41(6): 1048-1056.
- [30] Tan W H, Cheng S C, Liu Y T, et al. Structure of a highly active cephalopod s-crystallin mutant: new molecular evidence for evolution from an active enzyme into lens-refractive protein[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 31176.
- [31] Varó I, Gabriel C, Francisco H, et al. Dietary effect on the proteome of the common octopus (*Octopus vulgaris*) paralarvae[J]. Frontiers in Physiology, 2017, 8: 309.
- [32] Park K, Kwak I. Salinity and bisphenol A alter cellular homeostasis and immune defense by heat shock proteins in the intertidal crab *Macrophthalmus japonicus*[J]. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2019, 229: 106381.
- [33] Niu C J, Rummer J L, Brauner C J, et al. Heat shock protein (Hsp70) induced by a mild heat shock slightly moderates plasma osmolarity increases upon salinity transfer in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2008, 148, 4: 437-444.
- [34] Meng X, Dong Y, Dong S, et al. Mortality of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka, exposed to acute salinity decrease and related physiological responses: Osmoregulation and heat shock protein expression[J]. Aquaculture, 2011, 316: 88-92.

Excavation of heat shock protein gene and its response to low salinity stress in *Sepia esculenta*

WANG Xing-qiang¹, ZHENG Nian-hao¹, CUI Chun-hui¹, CAO Mei¹, SHEN Ye¹,
LIU Ying¹, ZHANG Zi-wen¹, TANG Zi-wei¹, QIN Chuan-xin², CHEN Bai-yao³

(1. College of Marine Science and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China; 2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Guangzhou 510300, China; 3. Lianyungang Agricultural and Rural Bureau, Lianyungang 222005, China)

Received: May 3, 2020

Key words: *Sepia esculenta*; low salinity stress; actin; heat shock protein; crystalline

Abstract: Heat shock proteins (HSPs) are a kind of proteins that are produced by plants and animals in response to external stress. Moreover, they can effectively improve the adaptability of the body toward external stress. Based on the previously obtained high-throughput transcriptome data of *Sepia esculenta* under low salinity stress, we analyzed the protein HSPs (protein HSP family and crystallin family) genes closely related to low salinity stress in this study. In view of real-time quantitative internal reference gene screening, we determined the protein actin family genes of *S. esculenta*. Then, we analyzed the protein actins, HSPs, and crystallin family genes along with their encoded amino acid sequences via bioinformatics, and explored the effects of low salinity stress on the gene expression of protein HSPs and crystallin family of *S. esculenta*. The protein actin family genes of *S. esculenta* have *actin*, *adductor actin*, *cytoplasmic actin*, *actin 1*, *actin II*, and β *actin*. The protein HSP family genes have 11 members of *HSP β* , *small HSP*, *HSP 10*, *HSP 16*, *HSP 30*, *HSP 60*, *HSP 70*, *HSP 75*, *HSP 90 α* , *HSP 90*, and *HSP 90 β* . The protein crystallin family gene of *S. esculenta* has four members: *S crystallin*, *S crystallin 6*, *S crystallin SL18*, and *O crystallin*. The amino acid sequence alignment showed that the six genes of protein actin family shared 13 loci of glycine, arginine, serine, isoleucine, threonine, and aspartic acid, whereas the four genes of protein crystallin family shared 17 loci of phenylalanine, asparagine, glycine, aspartic acid, proline, arginine, tyrosine, serine, and cysteine. *HSP β* , *small HSP*, *HSP 10*, *HSP 16*, and *HSP 30* shared one glycine locus and four conserved loci, whereas *HSP 60*, *HSP 70*, *HSP 75*, *HSP 90 α* , *HSP 90*, and *HSP 90 β* only shared two conserved loci. The real-time quantitative results showed that under low salinity stress, the *HSP β* , *HSP16*, *HSP30* and *HSP70* gene expressions of *S. esculenta* were significantly increased, whereas the expression of protein crystallin family gene was significantly decreased, thereby indicating that the HSPs gene of *S. esculenta* could improve the adaptive defense ability to external stress via its own differential expression.

(本文编辑: 谭雪静)