

浙江枝吻纽虫(*Dendrorhynchus zhejiangensis*) 热休克蛋白 70 基因克隆与表达特征研究*

路雅丽¹ 李成华¹ 苏秀榕¹ 李太武^{1,2} 朱琳¹
张鹏¹ 李晔¹

(1. 宁波大学海洋学院 宁波 315211; 2. 宁波城市职业技术学院 宁波 315100)

摘要 采用同源克隆和 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)克隆了浙江枝吻纽虫热休克蛋白 70(DzHSP70)基因全长 cDNA 序列, 并利用荧光定量 PCR 方法, 分析了该基因在重金属胁迫下的表达特征。结果表明, DzHSP70cDNA 全长 2827bp, 包括 294bp 的 5'UTR、628bp 的 3'UTR 和编码 634 个氨基酸残基的 1905bp 的开放阅读框。HSP70 家族的 3 个签名序列以及细胞质特异性调控基序 EEVD 等特征元件在 DzHSP70 中高度保守。重金属离子 Fe³⁺、Pb²⁺和 Cd²⁺均可上调该基因的表达, 其中 Pb²⁺的毒理效应最强。研究结果表明 DzHSP70 可能参与了机体对于重金属的解毒过程。

关键词 浙江枝吻纽虫, 热休克蛋白 70, 实时荧光定量 PCR, 表达

中图分类号 Q346

浙江枝吻纽虫(*Dendrorhynchus zhejiangensis*), 属于纽形动物门(Nemertea)、无刺纲(Anopla)、异纽目(Heteronemertea)、纵沟虫科(Lineidae)、枝吻纽虫属(*Dendrorhynchus*), 是一类生活在浅海潮间带的无脊椎动物(吕慈仙等, 2008)。纽虫具有一个众所周知的特征——极强的再生能力, 在受到外界刺激的情况下, 纽虫的身体会自行断成几个部分, 并再次长成完整的个体(Sundberg *et al*, 2007)。另外, 纽虫对恶劣环境有很强的适应性, 也有极强的耐受饥饿能力。纽虫的这些独特的生理特征, 使其成为一类绝佳的生物研究模型。目前国内外对纽虫的研究很少, 虽然有关吻的结构、胚胎发育、再生现象及毒素的性质已有部分报道(Svetlana *et al*, 2004; Nadezhda *et al*, 2008), 但基于分子水平上对其这些独特的生理现象和抗逆特性解析的研究鲜有报道。

热休克蛋白(Heat shock proteins, HSPs), 又称为热应激蛋白, 是一种重要的内源性细胞的保护因子, 是进化上高度保守、功能上至关重要的一族蛋白, 并

且与生物抗逆性有关(明建华等, 2009)。HSP 广泛存在于生物界, 其化学结构和编码基因均具有高度保守性, 不仅具有分子伴侣的功能, 对生物体内新生肽的运输、折叠、组装、定位也有重要作用。HSP70 作为热休克蛋白家族的重要成员, 参与了宿主对外界刺激的应答和防御反应(Hendrick *et al*, 1993; Boston *et al*, 1996)。当机体遇到重金属胁迫等刺激时, HSP70 可通过防止蛋白的凝聚及变性, 维持细胞内环境稳定, 增强机体抗刺激及生存能力(Beckmann *et al*, 1990; Morimoto *et al*, 1992)。近年来, 随着环境污染的加剧, 水体污染也日趋严重, 水体中重金属污染现象时有发生。目前国内外对其它物种的 HSP70 有很多报道, 但对纽虫的 HSP70 的研究未见报道, 在基因水平上探讨纽虫重金属胁迫下表达模式的研究更少。本文以浙江枝吻纽虫为研究对象, 采用同源克隆和 RACE 技术克隆 HSP70 全长 cDNA 序列, 通过 Real Time PCR 分析该基因在不同重金属刺激下的表达模式, 为认识和掌握纽虫抗逆机制提供基础资料。

* 浙江省自然科学基金资助项目, Y3100480 号; 浙江省教育厅(理), Y200907951 号; 国家自然科学基金项目, 31272637 号。
路雅丽, E-mail: iuyali818@126.com

通讯作者: 李 晔, 讲师, E-mail: liye@nbu.edu.cn

收稿日期: 2011-12-31, 收修改稿日期: 2012-02-28

1 材料与amp;方法

1.1 材料

浙江枝吻纽虫(*Dendrorhynchus zhejiangensis*)采自浙江省奉化市湖头渡(29.6°N, 121.6°E)沿岸的池塘中, 带回实验室中充气暂养, 每天换水, 保持良好水质。

RNA 提取试剂盒(Promega 公司); *LATaq* DNA Polymerase (TaKaRa 公司); SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech 公司); GenClean 柱式琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(上海捷锐生物工程有限公司); SYBR Premix Ex *Taq*™ (TaKaRa 公司); 克隆质粒 pMD18-T; DH5 α 感受态细胞由实验室保存; 引物由上海生工生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 核心序列的获得 取浙江枝吻纽虫三条, 于液氮中充分研磨, 利用 Trizol (TaKaRa 公司)方法获得总 RNA。经琼脂糖凝胶电泳检测、定量后, 使用 M-MLV (Promega 公司)反应合成 cDNA, -20℃冷藏备用。

根据 GenBank 注册的文蛤(*Meretrix meretrix*, HQ256748.1)、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*, AF-144646.1)、刺参(*Apostichopus japonicus*, EU930813.1)、可口革囊星虫(*Phascolosoma esculenta*, EU416330.1)、斑节对虾(*Penaeus monodon*, BI784452.1)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*, EU857483.1)、鲍(*Haliotis discus hannai*, DQ324856.1)、线虫(*Caenorhabditis elegans*, M18540.1)、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*, AY-485262.1)、紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*, AY861684.1)的 HSP70 编码蛋白序列: 寻找保守的位点, 设计兼并引物 P1(5'-ACHGTNCCWGCHTAYTT YAAYGA-3')、P2(5'-GGHGGHGGNACHTTYGAYGT-3')、P3(5'-TANGCHACNGCYTCRTCIGG-3')和 P4(5'-YTTCTGNATYTTNGGIAT-3')扩增纽虫 HSP70 的核心序列片段。PCR 反应条件为 95℃ 5min; 94℃ 45s, 53℃ 45s, 72℃ 45s, 35 个循环; 最后 72℃ 10min。PCR 产物经 GenClean 柱式琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(上海捷锐生物工程有限公司)纯化回收后, 连接至 pMD18-T 载体, 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, PCR 筛选阳性克隆, 测序分析。

1.2.2 3'和 5'RACE 获得全长序列 根据得到的核心序列分别设计 3'RACE 引物 P5(5'-TGTGGAGA AGGCACTTCGTGATG-3')、P6(5'-TTTTCGACTTGG GAGGTGGAAC-3')和 5'RACE 引物 P7(5'-GCGGCA GCGTTGGTTCGTTTAT-3')、P8(5'-GCTGCTGCTG

AGTGAGCGTTTAG-3'), 按照 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 说明书分别扩增纽虫 HSP70 基因 3'和 5'端。

将同源克隆和 RACE 产物经序列拼接, 获得纽虫全长 cDNA。基于此序列基础上, 设计引物 P9(5'-ATGCCAGCTCCAGCAATTGGGA-3')和 P10(5'-TTA ATCGACTTCCTCAGA TAAT-3')验证得到的全长 cDNA 序列。PCR 程序为: 95℃ 5min; 94℃ 45s, 53℃ 45s, 72℃ 45s, 35 个循环; 72℃ 10min。

1.2.3 序列分析 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)和蛋白分析系统(<http://www.expasy.org/>)软件用于纽虫热休克蛋白 cDNA 和氨基酸序列分析。SMART 程序(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测蛋白结构域。Mega4 (<http://download.bioon.com.cn/list/list.php?keyword=mega>)构建系统进化树。ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)进行多序列比对。

1.2.4 重金属胁迫下纽虫 HSP70 表达 各取纽虫 20 条, 分别放入包含有终浓度为 10 μ mol/L 的 Fe³⁺、Pb²⁺、Cd²⁺水中, 于 25℃充气暂养。分别于放入后 0h、6h、12h、24h、36h、48h 取纽虫, 每次每种金属随机取 3 条, 液氮冻存储备用。每种金属刺激均以 0h 的纽虫作为对照。

用荧光定量 PCR 检测纽虫热休克蛋白 70 的表达差异。利用 P11(5'-GACTTGGGAGGTGGAAC TTT CG-3')和 P12(5'-CTGCTGCTGAGTGAGCGTTTAG-3')检测 DzHSP70 基因表达, P13(5'-GTATTGACTTGGC TGGTCGTGAT-3')和 P14(5'-CAGGCAATTCGTAGC TCTTCTCA-3')扩增 ACTIN 作为内参(陈蕾等, 2011)。PCR 循环条件: 预变性 5min、94℃变性 15s、60℃退火 15s、72℃延伸 20s, 共 40 个循环。PCR 反应结束后, 首先进行溶解曲线分析, 确认反应的特异性, 再用 Rotor-Gene 的软件进行 CT 值分析, 采用 2^{- Δ ACT}法(Livak *et al*, 2001)确定不同时段 DzHSP70 mRNA 的相对含量。

2 结果

2.1 HSP70 基因 cDNA 全长序列的克隆

同源克隆获得 700bp 的片段, 在此基础上, 设计基因特异性引物进行 RACE。5'RACE 得到 900bp 左右扩增产物; 3'RACE 获得 2200bp 左右扩增产物; 拼接上述三个片段最终获得了 2827bp 代表浙江枝吻纽虫 HSP70 基因全长 cDNA 序列(DzHSP70)。该序列已

登录 GenBank, 登录号为 JQ794804。

2.2 基因序列分析比对及基因进化分析

DzHSP70 cDNA 总长为 2827bp, 其中包括 5'非翻译区 294bp, 3'非翻译区 628bp[包括 poly(A)], 开放阅读框 1905bp, 编码 634 个氨基酸(图 1), 其分子量计算值为 69.7186kDa, 理论等电点为 5.96。氨基酸序列分析显示, DzHSP70 具有 HSP70 家族细胞质特征基序 EEVD(631—634aa), 用 Antheprot 软件从该序列中找到了 HSP70 家族的 3 个签名序列, 即 IDLGTTYs(8—15aa)、IFDLGGGTFDVSIL(196—209aa)和 VGGSTRIPKIQK(337—348aa)(图 1, 阴影部分)。

将推测的 DzHSP70 氨基酸序列在 NCBI 上进行 BLAST 检索分析, 发现该序列与其它生物的 HSP70 具有较高的同源性。利用 DNASTar 和 ClustalW 软件对该氨基酸序列近缘物种太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*, AF144646.1)、刺参(*Apostichopus japonicus*, EU93081)、可口革囊星虫(*Phascolosoma esculenta*, EU416330.1)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*, EU-857483.1)、线虫(*Caenorhabditis elegans*, M18540.1)、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*, AY485262.1)、美国螯虾(*Procambarus clarkia*, DQ301506.1)、光滑双脐螺(*Biomphalaria glabrata*, L44127.1)、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*, EF091692.2)、南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*, AY645906.1)等生物的 HSP70 氨基酸序列进行同源性比对(图 2)。结果表明: 浙江枝吻纽虫 HSP70 与线虫、刺参、光滑双脐螺、南美白对虾等的相似性都高达 90%以上。

利用 MEGA4 软件构建了 HSP70 叠代 1000 次的 Neighbor-Joining 系统进化树(图 3)。太平洋牡蛎、光滑双脐螺、美国螯虾等 HSP70 首先聚为一支, 然后与浙江枝吻纽虫和刺参的 HSP70 形成一个姊妹群; 该姊妹群与线虫聚为一支, 而 HSP26 和 HSP90 分别形成独立类群。表明本研究获得序列为浙江枝吻纽虫 HSP70 基因。

2.3 重金属刺激对 HSP70 表达量的影响

Fe³⁺、Pb²⁺、Cd²⁺三种重金属均可诱导 DzHSP70 的表达, 表达模式略有差异(图 4)。Fe³⁺刺激后 DzHSP70 的表达量在 12h 里逐渐上升, 在 12h 达到最高, 此时表达量为对照组的 7.75 倍; 随后, 该基因表达有明显下调; 表达量的最高峰出现在感染后 48h, 表达量达到对照组的 22.94 倍(图 4)。而 Cd²⁺刺激后 DzHSP70 的表达量呈现先下降后逐渐上升的趋势, 最高表达量同样出现在感染后 48h, 此时 DzHSP70 的

```

1 CATGGGGGAGAAGGTCGTAGAAAAACCTGGATGGAGACTTTGGTGTATAAAAGCTCTGCA
61 AACACAGGGTTGTGAGAATCGAATCGAATAAATTTACGAAGTGTGCTGAACAGACGA
121 AAGCTCTAAGGAGGATTCATCCTATTCCATAATTTGCATCGACTCCGCTTCCGCAAAAC
181 AAGCTCAGGAATTTCAAAAGACTTTTATTGACTTTTTACGGATCATACCCGGACTTCATCA
1
241 GTTGCCGTTTTTCGAGGATTATCACCAGAGTCTTTGCTATTTTTATAACAAGAAGATGCCA
3 APAIGIDLGTTYSCVGVFQH
301 GCTCCAGCAATGGGATTGATTTAGCCACAACCTACTCATGTGTGGTGTTCACGCAT
23 GKVKI IANDQGNRTTPSYVA
361 GGAAGGTAATAATTTGCCAACGACCAAGGAAACAGGACACCGCGATTTATGTCGCC
143 FTDTERLIGDAAK NQVAMNS
421 TTCAGGATACAGAGAGACTCATGGTGACGGCGGAAAAACCAAGTTGCCATGAACCTCC
63 KNTIFDARKRLIGGKFTDES
481 AAAAATACGATCTTCAGCCCAAGCTGTATCGGGGAAAAATTCACGGATGAATCTGTG
83 QKDKI KHWPFK VANDSNKPKL
541 CAGAAGGACATTAACACTGGCCTTCAAGTGGCAATGATTGGAACAAACCGAAATTTG
103 QVEYKGEIKTFAP EEA SSMV
121 CAAGTGAATCAAAGGGAAATTAACCATTCGCTCCCGAGGACCCAGCTCAATGGTG
603 LTKMKKETV KVDVA
661 TTGACAAAAATGAAAGAAATCTGCGAGCTTATTTGGGCAAAAAGTTAAGGACGCTGTC
143 ITVPAYFNDA QRLATKDA G
721 ATCACTGCCGGCTTATTTCAATGACGCTCAGAGACTTCCCAAAAGGACGCTGTGTA
163 IAGLNVLRRI NEPTA AALAY
781 ATGTGGATTAAATGTACTGAGGATAATAAACGAACCAACCGCTGCGCCCTTGGCATAT
183 GLDKNLSG EKNI LIFDLGGG
841 GGATAGACAAAAATCTCTCAGCGGAGAAGAAATTTTGATTTGCGACTGGGAGTGGGA
203 TFDVSI LTVDEGSLF EVRST
901 ACTTTCGATGTGCCATCCTGACTGTGATGAGGATCCCTGTTTGAAGTCAGATCCACA
221 AGDTHL GEDFDNR M VGHFV
961 GCCGGAGACCCATCTCGGAGGTGAGGACTTCGATAATAGAAATGGTGGGCTTTCGTCG
243 QEFKR KRYK D I SGNARALRR
1021 CAGGAATCAAAGAAATCAAAAAGGACATATCCGTAATGGCGGAGCAGCTGCGAGCT
263 LRTACERAKRPLSSSAAEASV
1081 CTGCGTACAGCCTGTGAACGGCTAAACGCCACTCAGCAGGACGGCCGAAGCCAGGCTC
283 EIDSLYEGIDFYTKISRAR
1141 GAAATCGACTCGTGTACGAAGAAATTTCTACAGCAAAATACAGGACAGAAATTC
303 EELCADLFRKLTLEPVEKALR
1201 GAAGAATGTGGCAGATTTTTCGGGAAGCCTTGGAGCCTGTGGAAAGGCATTCGT
323 DAKMDKRSIHEVVFVGGSTR
1261 GACCCAGATGGCAAGCGCAGCTTTCATGAGTCTGTTTTCGGAGGTTTACGAGA
343 IPKIQKML QKELNKS
1321 ATCCGAAAAATCCAGAAGATGCTCCAGGAATACATGGTGGAAAAAGAACTGAATAATCA
363 INPDEAVAYGAAYQAAILTGT
1381 ATCAACCCGGATGAAGCAGTTGCTATGTGGCGCTTCCAGGCTGCCATCAGACCGGG
383 SKDEAIKDVLLVDVTPLSLG
1441 AGTAAAGATGAAGCTATTAAGGATGCTGCTGGTTCAGCTACACCCCTTGTCTCGGT
403 IETAGGV MTRLV ERN QKIPY
1501 ATAGAGCCCGGTGGAGTGATGACAGACTCGTCAAGCAAGCAAGAAATTCCTTAC
423 KTSQIFTTYS D NQVA VTIQV
1561 AAGACCAGCAGATATTCACAATTTTCAGACAAACCCGCGCTCACCATTCAGGTT
443 FEGERAMTKDNNLLGTFDL S
1621 TTCAGGGTGAAGAGCCATGACGAAGCAACAACCTGCTGGGACATTCGATTTGTCC
463 GI PPA PRGVPKIEV SFDIDA
1681 GGAATACCCCAAGCAGCAGAGGTTGCCGAAATTTGAAGTCTCATTCGACATCGACCC
483 NGILNVS AKDSTGKSNKVT
1741 AATGGTCTGCAAGCTCAGCAAGATTCAGTACGGGTAAGAAAGTAAAGTAACTACT
503 ITNDKSR LSKADI DRMVADA
1801 ATTACAATGACAAGAGCAGATTTCAAGGCGACATCGACAGAATGGTTCGGACGCT
523 EKYREEDNRQRDRVQARN S L
1861 GAAAAATATCGAGAGGAGCAACAGACAGCGGGACCGGATTCAGCGGAGGAATGACCTA
543 E S L A F Q Y K T A V N E D G G K L S
1921 GAATCTCTGCATTTCAATACAAGACTGTGTGAACAGGATGGCGGAAAACGTGCTCA
563 EDRDIVNNKCN E V T Q W L D S
1981 GAAGACGGGACATTTGAAACAACAATGCAACAGAGTCCAGCAGTGGTTAGACTGAAAT
583 GLAEKEEYEHQTR E L E R V C S
2041 GGATAGCTGAGAAAGGAATATGAACATCAACCGGGATTTAGACGGGTGTGTTCA
603 PIMTKL HGGNAGHGQNTNRG
2101 CCAATCATGACCAAGTATGATGGTGGAAACCGCAGGACCGGACAAAACAAATCGGGGA
623 C S G N G P T V E E V D *
2161 TGTAGTGGAAATGGACCAACGGTGGAGGATGGATTTAGTAGGAAGTTGTCCTCAATA
2221 TTTTCGGAGACTGGGCTTAAACAGATTTTCTCCTACAAAGTCTCAAAAATATCAATTTT
2281 TTTTCAAAAACGAGTACTAGTATTTTATTTAGGGCCAGCATACCACAGCAAAAGAGT
2341 GACTCTAAGAAAATGATTTATTTGCTAGGATCTATTCAGATTTCTGTAATGACCTAGT
2401 TAATTTAGGCAATACCTTTCCATATAGGACCCAGTCCCACTTGGAAATGACATCTTCA
2461 CCTTATCCACTTTCGATTCAGAACTAAATATTTGGACTTAACTATATTTGCAATTTG
2521 ACCACAGTGGTCTGAAAATTTGACTACTAGGGTATGTCCAAACCTGCAATTCATATAAAA
2581 TGCAAGGAAAATGAACATCTGTATGCTTTAAAACCACTGGTGTGTAAGGAGTAAA
2641 AAGACATATAACTTAGACATGGACAATACGAAATGCTCTGACAGTAATTCGCAATTT
2701 ATACTGGGAGATGAGAAATTCGTTGATTTCCACCAATCACTTTGTCAGTCTTTGTGTA
2761 GAATGGGAATTAACACAATTTACTGTCTGTATAGCAAAAAA AAAAAAAAAAAAAA
2821 AAAAAA

```

图 1 浙江枝吻纽虫 HSP70 基因全长 cDNA 及推导的氨基酸序列

Fig.1 Full-length cDNA of *D. zhejiangensis* HSP70 and its deduced amino acid sequence
注: 方框部分为起始密码子和终止子; 阴影部分为 HSP70 家族签名序列和细胞质特异性调控基序 EEVD

<i>Biomphalaria glabrata</i>	MSGRNKAPAIGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAF
<i>Apostichopus japonicus</i>	MPGKGTSPAIGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAF
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	MA--KTGPAIGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAF
<i>Caenorhabditis elegans</i>	MS--KHN-AVGIDLGTTYSCVGVFMHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAF
<i>Dendrorhynchus-zhejiangensis</i>	MP---APAIGIDLGTTYSCVGVFQHGKVKI IANDQGNRTTPSYVAF ** :*:*****:*****:*****:*****
<i>Biomphalaria glabrata</i>	TDTERLVGDAAKNQAMNPSNTVYDAKRL IGRKFDDKTQNDMKHWP
<i>Apostichopus japonicus</i>	TDTERLIGDAAKNQVAMNPTNTIFDAKRL IGRSFSDTAVQSDMKNWP
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	TDTERLIGDAAKNQVAMNPNVTVFADKRL IGRKFDDATVQSDMKHWP
<i>Caenorhabditis elegans</i>	TDTERLIGDAAKNQVAMNPHNTVFDKRL IGRKFDDPAVQSDMKHWP
<i>Dendrorhynchus-zhejiangensis</i>	TDTERLIGDAAKNQVAMNSKNTIFDAKRL IGGKFTDESQKDIKHWP *****:*****:***: ** :*****: :*:* . ** :*:**
<i>Biomphalaria glabrata</i>	FKVVE-VDGRPKIQAEYRGENKLFAP EEISSMVLTKMKETA EAYLGQ
<i>Apostichopus japonicus</i>	FKVIN-KAGKPVLAQEHMNLKTFNPEEISSMVLTKMKETAESYLGQ
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	FTVVN-DASKPKVTVDYKGETKTFPEEISSMVLTKMKETA EAYLGK
<i>Caenorhabditis elegans</i>	FKVISAEGAKPKVQVEYKGENKIFTP EEISSMVLTKMKETA EAFLEP
<i>Dendrorhynchus-zhejiangensis</i>	FKVAN-DSNKPKLQVEYKGEIKTFAP EEASSMVLTKMKETVEAYLGQ *:* . :*: :. :. : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * .
<i>Biomphalaria glabrata</i>	KITDSVITVPAYFNDSQRQATKDAGAIAGLNVLRI INEPTAAALAYG
<i>Apostichopus japonicus</i>	KVTDVAVTVPAYFNDSQRQATKDAGV IAGLNVLRI INEPTAAALAYG
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	LVNNSVITVPAYFNDSQQATKDAGT ISGMNVLRI INEPTAAALAYG
<i>Caenorhabditis elegans</i>	TVKDVAVTVPTYFNDSQRQATKDAGAIAGLNVLRI INEPTAAALAYG
<i>Dendrorhynchus-zhejiangensis</i>	KVKDAVITVPAYFNDAQRLATKDAGV IAGLNVLRI INEPTAAALAYG . : . * . * * * * * : * : * * * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
<i>Biomphalaria glabrata</i>	LDKGHKGEKNLIFDLGGGTFDVSILTI DEGSMFEVKATAGDTHLGG
<i>Apostichopus japonicus</i>	LDKKLKGEQHLIFDLGGGTFDVSILCIDDG-MFEVKSTAGDTHLGG
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	LDKKGGERNVLIFDLGGGTFDVSILT IKDG-IFEVKSTSGDTHLGG
<i>Caenorhabditis elegans</i>	LDKKGHGERNVLIFDLGGGTFDVSILT IEDG-IFEVKSTAGDTHLGG
<i>Dendrorhynchus-zhejiangensis</i>	LDKNLSGEKNLIFDLGGGTFDVSILTVDEGSLFEVIRSTAGDTHLGG ***. ** :*:*****:*****:..* *****:*****
<i>Biomphalaria glabrata</i>	EDFDNRMVTHFVQEFKRKYKNDMSSNPRAIRRLQTACERAKRTLSSS
<i>Apostichopus japonicus</i>	EDFDNILDHFSAEFKRKHKKDITGNARALRRLRTASERAKRTLSSS
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	EDFDNRMVNHFIQEFKRKHKKDISENKRAVRLRLTACERAKRTLSSS
<i>Caenorhabditis elegans</i>	EDFDNRMVNHFCAEFKRKHKKDLASNPRALRRLRTACERANETLSSS
<i>Dendrorhynchus-zhejiangensis</i>	EDFDNRMVGHFVQEFKRKYKDISGNARALRRLRTACERAKRPLSSS *****: * * * * * . * * * * * . * * * * * : * * * * * : * * * * *
<i>Biomphalaria glabrata</i>	SEASIEIDSLYEGIDFYTKITRARFEELCGDLFRSTLQPVEALRDA
<i>Apostichopus japonicus</i>	AQANVEIDSLFEGVDFYTSITRARFEDLCSQDFRCKLEPVEKALIDA
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	TQASVEIDSLFEGVDFYTSITRARFEELNADLFRGTMPEVEKALRDA
<i>Caenorhabditis elegans</i>	CQASIEIDSLFEGIDFYTNITRARFEELCADLFRSTMPVEKSLRDA
<i>Dendrorhynchus-zhejiangensis</i>	AEASVEIDSLYEGIDFYTKISRARFEELCADLFRKTLPEVEKALRDA . * : * * * * * . * * * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
<i>Biomphalaria glabrata</i>	KLDKGKIDEVVLVGGSTRIPKVKQLLTDFFNGKELNKSINPDEAVAY
<i>Apostichopus japonicus</i>	KISKSAIDTIVLVGGSTRIPKIQKMLTDFNGKDLNKSINPDEAVAY

mRNA 为对照组的 4.56 倍(图 4)。而 Pb²⁺ 刺激后, DzHSP70 表达量急剧上升, 在 24h 时达到最高表达量, 约是对照组的 75.45 倍, 之后又呈下降趋势(图 4)。相同时间、相同浓度的刺激条件下, Pb²⁺ 刺激产生的表达量明显高于 Fe³⁺、Cd²⁺。

3 讨论

本研究采用同源克隆和 RACE 方法, 克隆了浙江枝吻纽虫 HSP70 (DzHSP70) cDNA 全序列, 该序列长 2827bp[包含 poly(A)], 其中包括 3'和 5'非翻译区和完整开放阅读框的编码区, 共编码 634 个氨基酸, 总分子量约为 69.72kDa, 理论等电点为 5.96。DzHSP70 推测的氨基酸序列含有 HSP70 家族的 3 个签名序列 IDLGTYS、IFDLGGGTFDVSIL 和 VLVGGSTRIP KIOK。另外, Dnak 特征基序 9—17aa (DLGTT-S-V)、非细胞器基序 299—305aa (RARFEEL)也同样存在(袁嘉恩等, 2008)。同源性分析表明, DzHSP70 氨基酸序列与其它物种的 HSP70 序列比同源性很高, 与线虫、紫贻贝、刺参、光滑双脐螺、南美白对虾等的相似性都高达 90%以上。系统进化分析揭示 DzHSP70 与其它物种的 HSP70 均为一支, 而 HSP26 和 HSP90 则分别形成独立类群。由此确定作者获得的序列为浙江枝吻纽虫 HSP70 基因序列。

研究发现: 环境胁迫因子(如水体 pH、温度、重金属等)变化诱导的生理效应可能经由氧化还原途径实现(Ryter *et al*, 2007; Assefa *et al*, 2005; Richier *et al*, 2006), 即环境胁迫因子造成生物体内有氧化代谢异常, 适量的活性氧对机体具有一定的保护作用, 但过量的活性氧可导致氧化胁迫(Franco *et al*, 2009), 引起机体氧化损伤。盛连喜等(2007)发现在 Cu²⁺ (100μg/L)胁迫下鲫鱼 HSP70 显著性表达, 而且 HSP70 合成是一种阈值反应。Clayton 等(2000)发现, 24h 的不同浓度铜胁迫研究中, 贻贝肌肉组织 HSP70 合成在达到较高水平时, 便趋于平稳,

接上页

与空白值仍然具有显著性差异。本研究表明, 纽虫在不同重金属刺激下 HSP70 的表达量有很大差别。Fe³⁺是生物体进行正常生理所必需的金属, 与机体某些酶的合成有关, 微量时有助于体内物质的合成; 当其在正常范围内, 随着时间的推移纽虫体内 HSP70 的合成也随之增加; 当其超过一定水平时, 为了维持纽虫机体的正常生理活动, HSP70 大量消耗, 此时 HSPs 的调控机制启动, 热休克转录因子(Heat shock transcription factor, HSF)首先被激活形成三聚体并转入核内, 之后与热休克元件(Heatshock element, HSE)结合, 启动热休克基因的转录(Morimoto, 1993), HSP70 mRNA 转录水平随之又出现明显增加。重金属 Pb²⁺刺激纽虫后, HSP70 的表达量呈先升高后降低的趋势, 重金属应激前期大量表达的 HSP70 可增强细胞对伤害性刺激的耐受性, 提高细胞的存活率, 保护机体不受或少受损害(Kabakov *et al.*, 2003); 应激后期 HSP70 mRNA 表达量呈下降趋势, 可能与获得对重金属的耐受力有关, 此时应激有所缓解。重金属 Cd²⁺刺激纽虫后, 6h 内 HSP70 的表达量低于对照组, 许多学者也研究报道了水生无脊椎动物有机体暴露在重金属溶液里, 机体内抗氧化酶能被重金属离子抑制这一现象(Wu *et al.*, 2005; Chandran *et al.*, 2005)。但是 Cd²⁺不能长时间抑制抗氧化酶, 一段时间后体内氧自由基增加, 引起机体氧化损伤, HSP70 表达量增加来维护机体的正常生理活动, 因此 HSP70 的表达量在 12—48h 内持续上升, 48h HSP70 的表达量约为对照组的 4.56 倍。本文研究表明, Fe³⁺、Cd²⁺、Pb²⁺三种重金属, 在相同浓度和相同刺激时间下, Pb²⁺的毒性是最强的。

近几年研究证实 HSPs 除具有分子伴侣活性外, 在高等生物细胞内还具有抗氧化的生物活性, 可以使机体内源性抗氧化剂的合成和释放增加; HSPs 与其结合物可以激活蛋白激酶 C, 增加蛋白



图 2 浙江枝吻纽虫 HSP70 与其它物种 HSP70 氨基酸序列比对分析
 Fig. 2 Alignment of the deduced amino acid sequences of *D. zhejiangensis* heat shock protein 70 (HSP70) with other orthologues

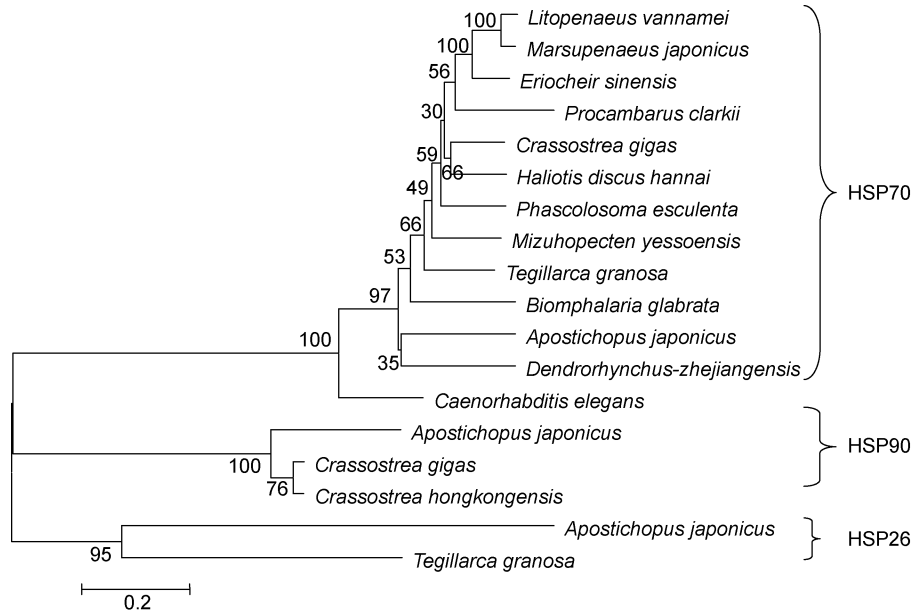


图 3 浙江枝吻纽虫 HSP70 的系统进化树

Fig.3 The phylogenetic tree of *D. zhejiangensis* HSP70

酶的活性, 促进转录激活因子(Activating Transcription Factor, ATF)水解刺激生成 SOD, 从而使细胞抗过氧化物的伤害(程维杰等, 2008)。对果蝇的研究发现, SOD mRNA 水平的增高与 HSP70 mRNA 表达的增高相一致(Niedwiecki *et al*, 1992)。细胞内 HSP70 家族基因表达水平增加, 可对抗 H₂O₂ 对细胞膜的损伤, 减少 Ca²⁺进入细胞, 从而保护细胞免受由活性氧族介导的 Ca²⁺内流引起的细胞毒性和细胞凋亡(Gullo *et al*, 2004), 也可抑制应激激酶激活及凋亡激活基因 p53 和 Bax 的表达, 抑制凋亡信号转导中的蛋白水解和抑制氧自由基的生成(赵钢等, 2006; 韩俊英等, 2011)。DeHSP70 是否具有上述高等生物 HSP70 相似

或相同的功能, 还需要进一步的研究证实, 这也是作者下一步的工作方向。

参 考 文 献

吕慈仙, 李太武, 江锦坡等, 2008. 浙江沿海最新发现一种枝吻类纽虫. 水产科学, 27(12): 652—654

陈 蕾, 李 晔, 李太武等, 2011. 浙江枝吻纽虫 (*Dendrorhynchus zhejiangensis*)凝溶胶蛋白和肌动蛋白基因的克隆与序列分析. 海洋与湖沼, 42(2): 193—200

明建华, 谢 骏, 徐 跑等, 2009. 团头鲂 HSP70 cDNA 的克隆、序列分析以及热应激对其 mRNA 表达的影响. 中国水产科学, 16(5): 635—648

赵 钢, 王学敏, 江 伟, 2006. 热应激反应对内毒素刺激中性粒细胞释放蛋白酶的影响. 临床麻醉学杂志, 22: 347—349

袁嘉恩, 许忠能, 雷腊梅等, 2008. 克隆与序列分析中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)HSP70 基因全长 ORF 的 RACE. 暨南大学学报: 自然科学版, 29: 516—521

盛连喜, 于文广, 徐镜波等, 2007. 温度、铜离子对鲤鱼血清 HSP70 合成的影响. 东北师大学报(自然科学版), 39(1): 108—113

韩俊英, 李 健, 2011. 脊尾白虾热休克蛋白 HSP70 基因的克隆及其表达分析. 水产学报, 35(8): 1130—1138

程维杰, 李秋玲等, 2008. 热休克蛋白 70(HSP70)研究进展. 畜牧兽医杂志, 27(6): 55—57

Assefa Z, Laethem A V, Garmyn M *et al*, 2005. Ultraviolet radiation induced apoptosis in keratinocytes: on the role of cytosolic factors. Biochim et Biophysica Acta: Reviews on Cancer, 1775(2): 90—106

Beckmann R P, Mizzen L E, Welch W J, 1990. Interaction of HSP70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. Science, 248(4957): 850—854

Boston R S, Viitanen P V, Vierling E, 1996. Molecular chaper-

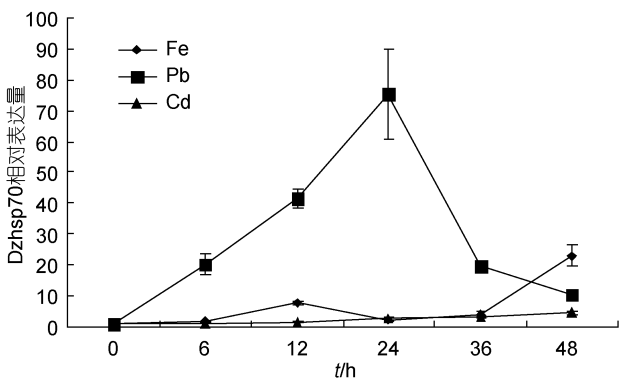


图 4 浙江枝吻纽虫 HSP70 mRNA 在重金属 Fe³⁺、Cd²⁺和 Pb²⁺刺激下的相对表达水平

Fig.4 Relative expression level of *D. zhejiangensis* HSP70 mRNA after heavy metals Fe³⁺, Cd²⁺ and Pb²⁺ exposure

- ones and protein folding in plants. *Plant Molecular Biology*, 32(1): 191—222
- Chandran R, Sivakuma A A, Mohandas S *et al*, 2005. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. *Comp Biochem Physiol C*, 140: 422—426
- Clayton M E, Roland Steinmann, Karl Fent, 2000. Different expression patterns of heat shock proteins hsp60 and hsp70 in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) exposed to copper and tributyltin. *Aquatic Toxicology*, 47: 213—226
- Franco R, Sanchez-olea R, Reyes E M *et al*, 2009. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: M é nage à Trois. *Mutation Research: Genetic Toxicology Environmental Mutagenesis*, 674(1—2): 3—22
- Gullo C A, Thoh G, 2004. Heat shock proteins: to present or not, that is the question. *Immunology Letters*, 94: 1—10
- Hendrick J P, Hartl F U, 1993. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 62(1): 349—384
- Kabakov A E, Budagova K R, Bryantsev A L *et al*, 2003. Heat shock protein 70 or heat shock protein 27 overexpressed in human endothelial cells during posthypoxic reoxygenation can protect from delayed apoptosis. *Cell Stress Chaper*, 8(4): 335—347
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Method*, 25: 402—408
- Morimoto R I, 1993. Cell in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science*, 259: 1409—1410
- Morimoto R I, Sarge K D, Abravaya K, 1992. Transcriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses. *Journal of Biological Chemistry*, 267(31): 21987—21990
- Nadezhda I Z, Chernyshev A V, 2008. Allozyme comparison of three nemertean species of the genus *Oerstedia* (Nemertea: Monostilifera) from the Sea of Japan. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36: 554—558
- Niedwiecki A, Reveiliaud I, Fleming J E, 1992. Changes in superoxide dismutase and catalyses in aging heat-shocked drosophila. *Free Radical Research Communications*, 17(6): 355—356
- Richier S, Sabourault C, Courtiade J *et al*, 2006. Oxidative stress and apoptotic events during thermal stress in the symbiotic sea anemone, *Anemonia viridis*. *FEBS Journal*, 273(18): 4186—4198
- Ryter S W, Kim H P, Hoetzel A *et al*, 2007. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 9(1): 49—89
- Sundberg P, Strand M, 2007. Annuloneurtes (phylum *Nemertea*): when segments do not count. *Biology Letters*, 3: 570—573
- Svetlana A M, Martindale M Q, Noreburg J L, 2004. Fundamental properties of the spiralian developmental program are displayed by the basal nemertean *Carinoma tremaphoros* (Palaeonemertea, Nemertea). *Developmental Biology*, 267: 342—360
- Wu J P, Chen H C, 2005. Metallothionein induction and heavy metal accumulation in white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to cadmium and zinc. *Comp Biochem Physiol C*, 140: 383—394

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF HEAT SHOCK PROTEIN 70 FROM *DENDRORHYNCHUS ZHEJIANGENSIS*

LU Ya-Li¹, LI Cheng-Hua¹, SU Xiu-Rong¹, LI Tai-Wu^{1,2},
ZHU Lin¹, ZHANG Peng¹, LI Ye¹

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo, 315211; 2. Ningbo City College of Vocational Technology, Ningbo, 315100)

Abstract With the approaches of homology cloning, RACE, the full-length HSP70 cDNA of *Dendrorhynchus zhejiangensis* was identified and characterized (denoted as DzHSP70) in the present study. Meanwhile, fluorescent real-time PCR was used to analyze varying degrees of induction of DzHSP70 mRNA expression in *D. zhejiangensis* exposed to heavy metals (Fe^{3+} , Pb^{2+} and Cd^{2+}). The results indicated the cDNA of DzHSP70 was of 2827bp, consisting of a 5'UTR of 294bp, a 3'UTR of 628bp, and a complete open reading frame of 1905bp encoding a polypeptide with 566 amino acid residues. The conserved motifs for HSP70 protein family including three signature sequences and a cytoplasm characteristic motif of EEVD were totally found in the deduced amino acid of DzHSP70. Three heavy metals Fe^{3+} , Pb^{2+} and Cd^{2+} all could be induced the expression of DzHSP70 at mRNA level, where Pb^{2+} displayed more toxic effect on worm than those of Fe^{3+} and Cd^{2+} . All our results indicated that DzHSP70 might be involved into mediating the process of heavy metals detoxification in worm.

Key words *Dendrorhynchus zhejiangensis*, Heat shock protein 70 (HSP70), Real-time fluorescent quantitative PCR, Expression