

# 魁蚶(*Scapharca broughtonii*)热休克蛋白 90(HSP90)基因的克隆及转录表达分析\*

郑利兵<sup>1,3</sup> 刘志鸿<sup>1,2</sup> 吴彪<sup>1,2</sup> 周丽青<sup>1</sup> 孙秀俊<sup>1</sup>  
杨爱国<sup>1</sup> 田吉腾<sup>1</sup> 董迎辉<sup>4</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛海洋科学与技术国家实验室 青岛 266273; 3. 厦门大学海洋与地球学院 厦门 361102; 4. 浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室 浙江万里学院 宁波 315100)

**摘要** 热休克蛋白 90(HSP90)作为一种研究的常规免疫基因,在许多物种都有过报道。本研究从构建的魁蚶转录组文库中筛选得到的 HSP90 基因部分序列为基础,通过 RACE 技术获得其 cDNA 全长序列(命名为 *SbHSP90*),以期明确魁蚶 HSP90 基因的结构特征、组织分布及其对病原菌刺激的免疫变化规律。序列和结构分析表明,该 cDNA 全长 2707bp,编码一个由 728 个氨基酸组成的多肽,该多肽含有 HSP90 家族共有的 5 个签名序列,C 端高度保守的 MEEVD 短肽序列和 ATPase 结构域;预测蛋白的分子量(Mw)为 83.72kDa,理论等电点(pI)为 4.85;预测该蛋白无信号肽,具有 4 个糖基化位点。同源性及系统分析表明,*SbHSP90* 基因与软体动物的 HSP90 相似性达到 83%以上,其中与长牡蛎(*Crassostrea gigas*)和海湾扇贝(*Argopecten irradians*)相似度最高达 86%,与甲壳动物 HSP90 的相似度都在 81%左右,与脊椎动物 HSP90- $\alpha$  和 HSP90- $\beta$  的同源性都很接近。实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)结果表明:*SbHSP90* mRNA 在魁蚶血细胞、斧足、鳃、外套膜、闭壳肌和肝胰腺和中均有表达,斧足中的表达量相对较高,而在肝胰腺中的表达量则相对较低;注射鳃弧菌后,相对于对照组,*SbHSP90* 基因在所检测的每个组织中 mRNA 水平上的表达量都显著上调( $P < 0.01$ ),而且具有显著的时间依赖性和瞬时表达趋势。

**关键词** 魁蚶;热休克蛋白 90;基因表达;免疫反应

中图分类号 Q75 doi: 10.11693/hyhz20170300071

魁蚶(*Scapharca broughtonii*)主要分布于渤海及黄海北部,具有很高的经济价值,是我国出口换汇率较高的水产品之一(齐忠彦,1998)。在过去十几年,海洋生态环境的恶化,加之过度捕捞,魁蚶的野生资源急剧下降(周丽青等,2013),人工养殖逐渐发展,为了防止像扇贝等其他贝类在人工养殖过程中发生的因疾病暴发引起巨大经济损失的现象发生,加强魁蚶的抗病及免疫机制的研究显得尤为重要。然而,有

关魁蚶分子免疫的研究报道还较少,作者曾做过一些常规免疫基因的相关研究,如:半乳糖凝集素(郑利兵等,2015)、锰超氧化物歧化酶(Zheng *et al.*, 2015)、铁蛋白(Zheng *et al.*, 2016)。

热休克蛋白(Heat shock protein, HSPs)是一类参与生物体抵御高温、缺氧、有机物污染和病原感染等环境胁迫且结构上高度保守的蛋白质。在正常生理状态下,HSPs 行使分子伴侣的功能,表达量较少;当出

\* 国家自然科学基金项目,31602142 号;中国水产科学研究院基本科研业务费项目,2017GH07 号;浙江省重中之重学科开放基金,KF2015007 号。郑利兵,博士研究生,E-mail: zhenglibing1988@hotmail.com

通讯作者:刘志鸿,研究员,E-mail: liuzh@ysfri.ac.cn;董迎辉,副研究员,E-mail: dongyinghui118@126.com

收稿日期:2017-03-24,收修改稿日期:2017-09-25

现外在胁迫时,其大量表达以使生物体能够抵抗伤害。作为机体内一种很重要的分子伴侣,HSPs 主要参与蛋白质的代谢过程,如正确折叠、变性蛋白的重折叠及帮助降解无法修复的损伤蛋白质等(Lindquist, 1986; Parsell *et al.*, 1993)。HSPs 家族种类较多,根据分子量大小将 HSPs 分为:HSP100 家族,HSP90 家族,HSP70 家族,HSP60 家族,HSP40 家族和小分子热休克蛋白家族(Lindquist *et al.*, 1988)。其中,HSP90 和 HSP70 的结构和功能是研究的较多的两类热休克蛋白。

HSP90 除具有 HSPs 共有的分子伴侣功能外,有研究报道其还参与到信号传导、细胞周期及机体免疫调节中(Nadeau *et al.*, 1993; Parsell *et al.*, 1993; Csermely *et al.*, 1998a, b); 在机体遭受环境胁迫状况下,HSP90 可对细胞和机体起重要的保护作用,但其功能尚未完全了解。其中 HSP90 对环境适应的作用也同样在一些水生动物做过验证(Tomanek *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 2000; Niu *et al.*, 2008)。关于软体动物 HSP90 的研究仅见少量的海洋经济贝类,如已对近江牡蛎 *Craassostrea hongkongensis* (陈晨, 2011)、栉孔扇贝 *Chlamys farreri* (Gao *et al.*, 2007)、紫贻贝 *Mytilus edulis* (Pantzartal *et al.*, 2009)、海湾扇贝 *Argopecten irradians* (Gao *et al.*, 2008)、太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas* (Choi *et al.*, 2008)、皱纹盘鲍 *Haliotis discus hanai* 的 HSP90 基因做过相关的分子研究。然而,对魁蚶 *Scapharca broughtonii* HSP90 (*SbHSP90*)基因的相关研究迄今未见报道。

本实验从魁蚶转录组文库中鉴定出热休克蛋白 HSP90 基因的 unigene 序列,利用 RACE 技术克隆了该基因的 cDNA 全长序列;分析其核酸、氨基酸序列及蛋白结构;利用 qRT-PCR 技术检测分析其组织分布特点、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染后其在不同组织中的转录差异,以期为魁蚶的免疫相关提供理论数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品来源

试验用魁蚶(壳长 55mm 左右)从青岛台东水产品市场挑选,于实验室条件下暂养在充气海水中一周(20°C),每天换两次水,期间投喂硅藻,实验处理前两天停止投喂。鳃弧菌为-80°C 保存的甘油菌进行活化。

### 1.2 *SbHSP90* 基因全长 cDNA 的获得

#### 1.2.1 RNA 提取和 cDNA 合成 异硫氰酸胍法提

取总 RNA:详细方法和步骤参照 Zheng 等(2015)。1.2% 琼脂糖检测总 RNA 完整性,核酸分析仪(Eppendorf)检测其纯度和浓度。

#### 1.2.2 RACE 模板的制备

根据 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 说明书利用 1.0μg 总 RNA 分别进行 3'端和 5'端 RACE 模板的制备,反应结束后,加入 100μL Tricine-EDTA Buffer 用以提供 cDNA 模板一个稳定的环境,并加以稀释。

#### 1.2.3 全长 cDNA 克隆及测序

通过已知序列利用 Primer Premier 5.0 设计 RACE 特异性引物 HSP90-5R/3F(表 1)。RACE 扩增体系为 50μL,内含 ddH<sub>2</sub>O 34.5μL, 10× LA buffer 5.0μL, dNTP Mix (10mmol/L) 1.0μL, UPM 5.0μL, HSP90-5R/3F 1.0μL, 3'(5') RACE cDNA 模板 2.5μL, LA Taq 1.0μL。反应程序为:94°C 30s, 68°C 30s, 72°C 3min, 30 个循环;巢式 PCR 利用 NUP 和巢氏引物进行扩增。1.2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物扩增条带,胶回收产物与 pMD18-T 连接,亚克隆至 *Escherich coli* Top10 感受态细胞,并挑阳性克隆进行测序。

#### 1.2.4 序列分析

DNASTar 软件对 cDNA 序列的开放阅读框进行搜索、氨基酸预测;ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>)预测 HSP90 蛋白的分子量(Mw)及等电点 pI;SignalIP 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalIP/>)预测 HSP90 蛋白 N 端信号肽;SMART (<http://www.expasy.ch/SMART>)预测分析 HSP90 蛋白功能域;BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)在线对 HSP90 核苷酸序列进行同源检索分析;MEGA 5.0 构建基于不同物种 HSP90 氨基酸序列的系统发育树。

### 1.3 *SbHSP90* 组织分布及对鳃弧菌刺激的免疫应答变化

#### 1.3.1 鳃弧菌感染实验

微量注射器向预先挑选并分组的魁蚶处理组个体前闭壳肌处注射 50μL 经 PBS (0.01mol/L, pH7.4)洗涤并悬浮的鳃弧菌菌悬液(OD<sub>600</sub>=0.4, 1OD=5×10<sup>8</sup> bacterium/mL),对照组注射同剂量的灭菌 PBS。分别在 0h、4h、8h、16h、24h、32h、64h 随机选取 3 个个体活体解剖取血淋巴(4°C, 800r/min, 15min)、外套膜、鳃、闭壳肌、肝胰腺、斧足,立即置于液氮中速冻。

#### 1.3.2 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

根据定量引物设计原则,Primer Premier 5.0 设计定量引物 Q-F/R(表 1),选取 β-actin 基因作为内参基因(Zheng *et al.*, 2015)。qRT-PCR 扩增(ABI 7500 PCR 仪)体系为

20 $\mu$ L, 包括: DEPC 水 6.0 $\mu$ L, SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (2 $\times$ ) 10 $\mu$ L, Q-F (10 $\mu$ mol/L) 0.8 $\mu$ L; Q-R (10 $\mu$ mol/L) 0.8 $\mu$ L, ROX Reference Dye II(50 $\times$ ) 0.4 $\mu$ L, cDNA 模板 2.0 $\mu$ L。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 30s; 95 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 34s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 1min, 95 $^{\circ}$ C 15s。实验设置 3 个平

行组, 每组两个重复。

**1.3.3 数据分析** 基于得到的  $C_T$  值, 利用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  方法(Livak *et al*, 2001)进行相对定量分析。根据每个样品的 3 个平行实验所得的数据计算相对表达量平均值和标准差。

表 1 *SbHSP90* 扩增所用引物序列  
Tab.1 The primers used in the cloning of *SbHSP90*

引物	序列 5'—3'
10 $\times$ Universal Primer A Mix (UPM)	Long, CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT; Short, CTAATACGACTCACTATAGGGC
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
HSP-5R	GGTCCAGATGGGTTTAGTTTTGTTTCAGT
HSP-5R-1	GTTATTCTTGGTCTCCACGACGACTCTA
HSP-3F	TAGTTATTTGTGTGGGTAAGGTGC
HSP-3F-1	TGAGGAAGTGAACAAAATAAACC
$\beta$ -actin-F	GGTTACACTTTCACCACCACAG
$\beta$ -actin-R	ACCGGAAGTTTCCATACCTAAGA
Q-F	AACCTCCCTTCTATCTTC
Q-R	GGTGGCATTTCATCTA
M13F	CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC
M13R	AGCGGATAACAATTTACACAGGA

## 2 结果

### 2.1 *SbHSP90* 基因 cDNA 序列分析

将扩增并测序的 5'-RACE、3'-RACE 序列及已知序列通过重叠序列拼接后得到魁蚶 HSP90 基因的全长 cDNA 序列, 命名为 *SbHSP90* (GenBank Accession No.KT362154)。 *SbHSP90* 基因的 cDNA 全长 2707bp, 包括 195bp 的 5'-端非编码区(UTR), 2187bp 的开放阅读框(ORF)和 325bp 的 3'-UTR; 3'-UTR 含有一个典型的 AATAAA 加尾信号、一个 poly(A)尾和三个 RNA 不稳定体(图 1)。 *SbHSP90* 编码一个由 728 个氨基酸组成的蛋白质, 预测的蛋白分子量  $M_w$  为 83.72kDa, 理论等电点 pI 为 4.85; HSP90 家族的功能序列标签同样保守的存在于 *SbHSP90* 编码的氨基酸序列中: FLRELISNASSDALDKIR (40—57), LGTIAKSGT (103—112), IGQFGVGFYSAYLVAD (127—143), IKLYVRRVFI (323—332), GVVDSEDLPLNISRE (349—364); 预测到 4 个潜在糖基化位点, 分别为第 5 位的 NQTM、第 47 位的 NSSD、第 286 位的 NKTK、第 392 位的 NISR; C 末端存在保守的 MEEVD 多肽结构; SMART 结构域预测, 该序列含有由 133 个 (36—169)氨基酸组成 ATP 酶结构域。

### 2.2 *SbHSP90* 同源性分析

在线 BLASTp 同源性分析结果显示 *SbHSP90* 编码的氨基酸与其他物种的 HSP90 氨基酸序列具有很高的同源性。与软体动物 HSP90 氨基酸序列相似性达 83%以上, 其中与长牡蛎 *Crassostrea gigas* 和海湾扇贝 *A. irradians* 相似度最高为 86%; 与甲壳动物 HSP90 的相似性都在 81%左右; 与所选脊椎动物 HSP90- $\alpha$  和 HSP90- $\beta$  的同源性很接近, 与人 *Homo sapiens* 的相似性均为 80%, 与牙鲈 *Paralichthys olivaceus* 的相似性为 79%, 与斑马鱼 *Danio rerio* HSP90- $\alpha$  的相似性为 78%, HSP90- $\beta$  的相似性为 80%。

DNAman 8.0 对 14 个代表物种 HSP90 的氨基酸序列进行了比对(图 2), 不同物种的 HSP90 氨基酸序列高度保守, 其家族的五个签名序列在所有比对物种中均存在, C 端的 MEEVD 短肽序列也极其保守。

关于 HSP90 的 Neighbor-joining 系统进化树的进化分析结果如图 3: 在 HSP90 分子进化树中可以分为脊椎动物、甲壳动物和软体动物三支。在脊椎动物聚类簇中, 分为 HSP90- $\alpha$  和 HSP90- $\beta$  亚支; 在软体动物一支中, *SbHSP90* 双壳类 HSP90 分子聚类后再与斧足类 HSP90 聚在一起。

```

1  ATTTATTTATGTTATATTTGAATAAAATAGCATAAGTATAGGCCCGTATTTTGATTTTGAGAAAAATTATAATTGTGCGTAGTTATTTGTGTTGGGTAA
M P
101 GGTGCTTCTCTTTTGTCAAGCGTGGTACAAGAACCGGCACGCTGCATAACATCACAGTACCATCAAGTATAACAACCTTAAGACAACATTTGTC
E E N Q T M D E G E V E T F A F Q A E I A Q L M S L I I N T F Y S
201 AGAAGAAAATCAGACCATGGATGAAGGAGAAGTTGAGACCTTTGCTTTCAGGCAGAGATTGCTCAGTTGATGAGCTTGATATCAACACTTCTACTCC
N K E I F L R E L I S N S S D A L D K I R Y E S L T D P S R L D S G
301 AACAAAGAAATCTTCTTAGAGAGTTGATATCCAATCTCTGATGCTTTAGACAAGATCCGATATGAAAGCTTGACAGATCCATCTCGTTTGGACAGTG
K D L Y I K I I P N K E D H T L T I I D T G I G M T K A D L V N N
401 GCAAAGACCTCTACATATAAAATATTCAAAACAAAGAAGTACACATTGACCATCATTGATACAGGAATTGGTATGACCAAGCTGACCTGGTCAACAA
L G T I A K S G T K A F M E A L Q A G A D I S M I G Q F G V G F Y
501 CTGGGTACCATCGTAAATCTGGTACAAAGGCTTTTATGGAAGCTTTACAGGCCGAGCCGACATCTCTATGATGGTCAGTTTGGTGTAGGTTTCTAC
S A Y L V A D R V V V E T K N N D D E Q Y I W E S S A G G S F T V R
601 TCTGCCTATTTGGTTGCTGATAGAGTCGTCGGAGACCAAGAATAACGACGATGAACAATACATCTGGGAATCCTCAGCTGGTGGATCTTTACTGTTC
S T N N P E L T R G T K I T L H I K E D Q T E Y I E E K R I K D V
701 GTTCGACCAACAATCCTGAATTGACACGTCGGAACAAAGATCACATCCACATCAAAGAAGATCAGACAGAATACATGAAGAAAAAGCTATCAAGGACGT
V K K H S Q F I G Y P I K L L V E K E R D K E V S D D E E E E E E
801 AGTTAAGAAACACAGTCAGTTTATGGCTATCCAATCAAATTTGTTGTTAGAGAAGAACCGACAAGGAAGTATCAGATGATGAGGAAGAAGAGGAAGAG
K K E E G D E E K K E D D E K P K V E D L D E D E D E E K K K D K
901 AAAAAGGAAGGTTGATGAGGAAAAGAAAGATGACGAGAAACCAAAAGTAGAGGACCTTGATGAAGACGAAGATGATGAAGAGAAGAAAGAGACA
K K K K K I K E K Y N E D E E L N K T K P I W T R N S D D I T T E
1001 AGAAAAAGAAAGAAAATCAGGAAAATACAATGAAGATGAGGAACGAAACAAAATAAACCATCTGGACCAGAAAATCTGACGATATTACTACAGA
E Y G E F Y K S L T N D W E D H L A V K H F S V E G Q L E F R A L
1101 GGAATATGGAGAATTTACAATCCCTTACAATGACTGGGAAGATCATTGGCTGTAAACACTTCTCTGTGGAGGACAGTTGGAATTCAGAGCACTC
L F V P R R A P F D L F E N K K K K N N I K L Y V R R V F I M D N C
1201 TTGTTTGTACCAAGGAGAGCTCCATTTGACTTGTGTTGAAAACAAAAGAAAATAACATCAAATTTGACGTAAAGAAGTATTATCATGGAACACT
E E L I P E Y L N F I K G V V D S E D L P L N I S R E M L Q Q S K
1301 GTGAGGAATGATCCAGAGTACTTGAATTTATTAAGGTGTTGATGATCTGAGGATCTACCTCTAACATTTCCAGAGAAAATGTCACACAGAGCAA
I L K V I R K N L V K K C L E L F E E I A E D K D N F K K F Y E Q
1401 AATCTGAAAGTCATCAGGAAAATTTAGTCAAGAAGTGTGGAATTTGTTGAGAAATGCTGAAGACAAAGATAACTCAAGAAATCTATGACAAA
F G K N I K L G I H E D S T N R K K L A D M L R Y H S S Q S G D E L
1501 TTTGAAAAAATATTAAGCTCGAATCCATGAAGACAGCACAACAGAAAGAAATTCGAGATATGTTACGTTACCCTCCACAATCTGGTATGATGAC
T S L K D Y V S R M K E N Q K C I Y Y I T G E S R D V V Q N S A F
1601 TGACATCATTGAAGGATTACGTGTCAGAAATGAAGAAAACGAAAATGCATTTACTACATCACAGGAGAAAGCAGAGATGTAGTACAGAACTCCGCTTT
V E R V K K R G M E V I Y M V D P I D E Y A V Q Q L K E Y D G K T
1701 TGTGAGAGAGTTAAAAAGGGGAATGGAAGTAATCTACATGGTTGACCCCATTTGATGAATACGACGATACAGCAGTTGAAGGAATACGATGAAAAACT
L T S V T K E G L D L P E D E D E K K Q F E E A K A Q L E G L C K T
1801 CTGACATCTGTGACAAAAGGATGAGACCTCCAGAAGATGAAGATGAGAAGAAACAATTTGAGGAAGCCAAAGCACAGTTAGAGGACTCTGTAATA
M K E I L D K K V E K V A V S N R L V T S P C C I V T S Q Y G W S
1901 CAATGAAAGAAATCTTGACAAAAGTAGAAAAGTCGCTGTATCAAACCGTTGGTAAACATCACCATGCTGATTTGTAACAAGTCAGTACGGTTGGTC
A N M E R I M K A Q A L R D S S T M G Y M A A K K H L E I N P D H
2001 TGCCAAATGGAAGAATCATGAAAGCACAAGCTCTACGAGATTCAGCACCATGGGTTATATGGCTGCAAAGAAACATCTTGAATCAACCTGACCAT
P I I T S L K E K V D A D K N D K S V K D L V L L L F E T S L L S S
2101 CCTATTATACATCTCTGAAAGAGAAAGTTGATGCTGACAAAACGACAAATCTGTTAAAGATTTGGTATGCTTCTGTTGAAACCTCCCTTCTATCTT
G F T L E E P G V H A S R I H R M I K L G L G I D E D D S G S P D
2201 CTGGATTACATAGAGGAACCGGTTACATGCCAGCAGAATCCACAGAATGATTAACCTGGACTTGGAAATGACGAGGATGACAGCGGATCTCTGTA
G P S E T V D E M P P L E G D E D D A S R (M E E V D)*
2301 CGGACCTTCAGAGCCGTAGATGAAATGCCACCATTTGGAAGGAGACGAGGATGACGCTTCCAGAATGGAAGAAGTTGA TAAATCAATTAATTTATAGAG
2401 ACTATGAAACACCGCAATACTTACAGAAAATGAAATTAAGACTGTGTGTAGTCAATCATTTTTAGTTGCTTAAATTAAGAGCAATTTATTTCA
2501 TTAAGACATTACCTTCAACAGAACTTATCATCGATGGACAGCGGACCATGCATTCGCTTAAATGACATTTCTTACTTTTCCAAGTTTAAATTT
2601 ACGTGATTTTTTTATTTTGGCATATGTTGTTAACGTGTCATTTGAGAAAAAAGAAAAACCTGCAATAAAAAAGAAAAATGTTTAAAA
2701 AAAAAA

```

图 1 *SbHSP90* 核苷酸序列及相对应的氨基酸序列

Fig.1 The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *SbHSP90*

注: *SbHSP90* 的五个标签序列用阴影标示, 糖基化位点加粗标示, 起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)分别加框标示, 加尾信号和多聚尾用下划线标示, RNA 不稳定模体用波浪线标示, 保守的短肽标签用椭圆标示

<i>S. broughtonii</i>	...MPEE NCTMD . . . EGEVETFAFCAEI ACLMSLI . . . I NTFYSNKEI . . . FLRELI SNSSCALDKI . . . RYESL TOPSKL DSGKDL YI KI I PNKED-TLTI I CTGI GATKADLVNN	103
<i>C. plicata</i>	...MPEP TPMD . . . EGEVETFAFCAEI ACLMSLI . . . I NTFYSNKEI . . . FLRELI SNASSCALDKI . . . RYESL TOPSKL DT GKDL YI KI I PDKNKTLTI CTGI GATKADLVNN	102
<i>M. galloprovincialis</i>	...MPEP ECTMD . . . EGEVETFAFCAEI ACLMSLI . . . I NTFYSNKEI . . . FLRELI SNSSCALDKI . . . RYESL TOPSKL DT GKDL ERI I I PDKNKTLTI CTGI GATKADLVNN	103
<i>A. irradians</i>	...MPE . . . NCAME . . . DGDVETFAFCAEI ACLMSLI . . . I NTFYSNKEI . . . FLRELI SNSSCALDKI . . . RYESL TOPSKL DSGKDL ERI I VPNDKNTLTI MCTGI GATKADLVNN	102
<i>A. farreri</i>	...MPEPE . . . GCAME . . . DGEVETFAFCAEI ACLMSLI . . . I NTFYSNKEI . . . FLRELI SNSSCALDKI . . . RYESL TOPSKL DSGKDL ERI I VPNDKNTLTI MCTGI GATKADLVNN	104
<i>C. gigas</i>	...MPE . . . PEHME . . . EGEVETFAFCAEI ACLMSLI . . . I NTFYSNKEI . . . FLRELI SNASSCALDKI . . . RYESL TOPSKL DSGKDL ERI I VPDKESKTLTI MCTGI GATKADLVNN	102
<i>C. ariakensis</i>	...MPE . . . PEHME . . . EGEVETFAFCAEI ACLMSLI . . . I NTFYSNKEI . . . FLRELI SNASSCALDKI . . . RYESL TOPSKL DSGKDL ERI I VPDKENKTLTI MCTGI GATKADLVNN	102
<i>H. discus hannai</i>	...MPEPEACME . . . EAEVETFAFCAEI ACLMSLI . . . I NTFYSNKEI . . . FLRELI SNSSCALDKI . . . RYESL TOPSKL DSGKDL ERI I VPDKENKTLTI MCTGI GATKADLVNN	104
<i>F. chinensis</i>	...MVEETWS . . . EEEVETFAFCAEI ACLMSLI . . . I NTFYSNKEI . . . FLRELI SNSSCALDKI . . . RYESL TOPSKL DSGKDL ERI I VPDKENKTLTI MCTGI GATKADLVNN	100
<i>S. maximus</i>	...MPEEMHC . . . EEEAETFAFCAEI ACLMSLI . . . I NTFYSNKEI . . . FLRELI SNASSCALDKI . . . RYESL TEFTKLT DSGKDL ERI I I PNKEERTLTI CTGI GATKADLVNN	101
<i>H. sapiens-α</i>	...MPEETCTCDQPMEEVEVETFAFCAEI ACLMSLI . . . I NTFYSNKEI . . . FLRELI SNSSCALDKI . . . RYESL TOPSKL DSGKDL ERI I I PNKCDRTLTI VCTGI GATKADLVNN	107
<i>H. sapiens-β</i>	...MPEEVHHC . . . EEEVETFAFCAEI ACLMSLI . . . I NTFYSNKEI . . . FLRELI SNASSCALDKI . . . RYESL TOPSKL DSGKDL ERI I I PNPCERTLTI VCTGI GATKADLVNN	102
Consensus		
<i>S. broughtonii</i>	CTI AKSGCTKAFMEALGACADI SM GCFGVGFYSAYLVA . . . RVVETKNNDDCEYI VESSAGGSFTVRSTN NPFLTRCTKI TLHI KEDCTEYI EEKRI KDVVKKHSQFI G	211
<i>C. plicata</i>	CTI AKSGCTKAFMEALGACADI SM GCFGVGFYSAYL ADRVT VESKHNDDCEYL VESSAGGSFTI KPCR GEPI TRCTRI I LFNKEDCSEYL EERRI KEVVKKHSQFI G	210
<i>M. galloprovincialis</i>	CTI AKSGCTKAFMEALGACADI SM GCFGVGFYSAYLVA . . . KVVTCTRNNDDEHYI VESAAGGSFTVKT VSGCESVGRCTKI TL YNKEDCTEYI EEKRI KEVVKKHSQFI G	212
<i>A. irradians</i>	CTI ARSGCTKAFMEALGACADI SM GCFGVGFYSAYLVA . . . KVVTCTRNNDDEHYI VESSAGGSFTVRSE DGSFNRCCTI TLHVKEDCAEYL EEEKVKKEI VKKHSQFI G	209
<i>A. farreri</i>	CTI ARSGCTKAFMEALGACADI SM GCFGVGFYSAYLVA . . . KVVTCTRNNDDEHYI VESSAGGSFTVRSE DGSFI LCTRI TLHVKEDCAEYL EEEKVKKEI VKKHSQFI G	211
<i>C. gigas</i>	CTI AKSGCTKAFMEALGACADI SM GCFGVGFYSAYLVA . . . RVVETKNNDDCEYI VESSAGGSFTVKTCS ENTI GRCTI TLFLKEDCTEYI EERRI KEVVKKHSQFI G	210
<i>C. ariakensis</i>	CTI AKSGCTKAFMEALGACADI SM GCFGVGFYSAYLVA . . . RVVETKNNDDCEYI VESSAGGSFTVKTCS ENTI GRCTI TLFLKEDCTEYI EERRI KEVVKKHSQFI G	210
<i>H. discus hannai</i>	CTI AKSGCTKAFMEALGACADI SM GCFGVGFYSAYLVA . . . RVVETKNNDDCEYI VESSAGGSFTI KNSN DFTLPRCTRI TLHVKEDCSEYL EERRI KEVVKKHSQFI G	212
<i>F. chinensis</i>	CTI AKSGCTKAFMEALGACADI SM GCFGVGFYSAYLVA . . . RVVETKNNDDCEYI VESSAGGSFTVRHCT GEPI GRCTI TLHVKEDCTEYI EERRI KEVVKKHSQFI G	208
<i>S. maximus</i>	CTI AKSGCTKAFMEALGACADI SM GCFGVGFYSAYLVA . . . RVVTI TKHNDDCEYAVESSAGGSFTVKVDS GEPVGRCTRI I LHLKEDQTEYI EERRI KEVVKKHSQFI G	209
<i>H. sapiens-α</i>	CTI AKSGCTKAFMEALGACADI SM GCFGVGFYSAYLVA . . . RVVTI TKHNDDCEYAVESSAGGSFTVTRCT GEPVGRCTKVI I LHLKEDQTEYI EERRI KEVVKKHSQFI G	215
<i>H. sapiens-β</i>	CTI AKSGCTKAFMEALGACADI SM GCFGVGFYSAYLVA . . . KVVTI TKHNDDCEYAVESSAGGSFTVRAOH GEPI GRCTKVI I LHLKEDQTEYI EERRI KEVVKKHSQFI G	210
Consensus		
<i>S. broughtonii</i>	YPI KLLVEKERDKEVSDDEEEEEEKKEED EKKEDDEKPKVEOL DEDEDEEKKK DKKKKKKI KEKYNEDEELNKTPI VT . . . RNSDDI TTEEYGEFYKSLT	312
<i>C. plicata</i>	YPI KLLVEKERDKEVSDDEEEEEEKKEED KEEDEE KPKVEOL DEGSDEEDKDK DKKKKKKI KEKY EDEELNKTPLVT . . . RNPDEI TKEAYGEFYKSLT	309
<i>M. galloprovincialis</i>	YPI KLLVEKERDKEVSDDEEEEEEKKEEDE . . . EKKDD KPKVEOL EEDDEDEDDK DKKKKKKI KEKY EDEELNKTPI VT . . . RNPDDI TCEEYGEFYKSLT	309
<i>A. irradians</i>	YPI KL CVEKERDKEVSDDEEEEEEKKEEDK AEKNEDE KPKVEOL DEEDDDDDDKS DKKKKKKI KEKY EDEELNKTPI VT . . . RNPDDI TCEEYGEFYKSLT	310
<i>A. farreri</i>	YPI KL CVEKERDKEVSDDEEEEEEKKEEDK AEKSEDD KPKVEOL DDEDDDD KSK DKKKKKKI KGKY EDEELNKTPI VT . . . RNPDDI TCEEYGEFYKSLT	309
<i>C. gigas</i>	YPI KLLVEKERDKEVSDDEEEEEEKKEEDK AEEKEED KPKVEOL DEEEDDD KSK DKKKKKKI KEKY EDEELNKTPI VT . . . RNPDDI TCEEYGEFYKSLT	308
<i>C. ariakensis</i>	YPI KLLVEKERDKEVSDDEEEEEEKKEEK AEEKEED KPKVEOL DEEEDDD KSK DKKKKKKI KEKY EDEELNKTPI VT . . . RNPDDI TCEEYGEFYKSLT	308
<i>H. discus hannai</i>	YPI KLLVEKERDKEVSDDEEEEEEKKEEK KEDENEKPKVEOL DEDEDEED NK DKKKKKKI KEKY EDEELNKTPLVT . . . RNPDDI TCEEYGEFYKSLT	312
<i>F. chinensis</i>	YPI KLLVEKERDKEVSDDEEEEEEKKEEK . . . EEEAEDPKPI EDVGEDEEDKDKDKKKKKI KEKY EDEELNKTPLVTRKPLVT RNPDDI SKEEYGEFYKSLT	311
<i>S. maximus</i>	YPI TL FVEKERDKEI SDDEAEEEEEKKEAEKKEEEDKPKPI EDVGSDEEEDSKDK DKKKKKKI KEKY DCEELNKTPI VT . . . RNPDDI TCEEYGEFYKSLT	311
<i>H. sapiens-α</i>	YPI TL FVEKERDKEI SDDEAEEEEEKKEAEKKEEEDKPKPI EDVGSDEEEDSKDK DKKKKKKI KEKY DCEELNKTPI VT . . . RNPDDI TCEEYGEFYKSLT	317
<i>H. sapiens-β</i>	YPI TL YL EKERKEI SDDEAEEEEEK . . . KEEEDKDEEEDKPKPI EDVGSDEEEDSGDK KKKKTKKI KEKY DCEELNKTPI VT . . . RNPDDI TCEEYGEFYKSLT	309
Consensus		
<i>S. broughtonii</i>	NDVVDH L AVKHF SVEGCL EFRAL F VPRRPFDF FENKKKKNI . . . KL YVRRVFI . . . VDNCEELI PEYL NFI KEVVDSEDL PLNI SREWL GCSI LKVI RKNL VKKCLEL FEE	421
<i>C. plicata</i>	NDVVDH L AVKHF SVEGCL EFRAL F VPKRPFDF FENKKKKNI . . . KL YVRRVFI . . . VDNCEELI PEYL NFI KEVVDSEDL PLNI SREWL GCSI LKVI RKNL VKKCLEL FDD	418
<i>M. galloprovincialis</i>	NDVVDH L AVKHF SVEGCL EFRAL F VPKRPFDF FENKKKKNI . . . KL YVRRVFI . . . VDNCEELI PEYL NFI KEVVDSEDL PLNI SREWL GCSI LKVI RKNL VKKCLEL FDD	418
<i>A. irradians</i>	NDVVDH L AVKHF SVEGCL EFRAL F VPRRPFDF FENKKKKNI . . . KL YVRRVFI . . . VDNCEELI PEYL NFI KEVVDSEDL PLNI SREWL GCSI LKVI RKNL VKKCLEL FDD	418
<i>A. farreri</i>	NDVVDH L AVKHF SVEGCL EFRAL F VPRRPFDF FENKKKKNI . . . KL YVRRVFI . . . VDNCEELI PEYL NFI KEVVDSEDL PLNI SREWL GCSI LKVI RKNL VKKCLEL FDD	419
<i>C. gigas</i>	NDVVER . . . PF GCEGCL EFRAL F I PRRAPDF FENKKKKNI . . . KL YVRRVFI . . . VDNCEELI PEYL NFI KEVVDSEDL PLNI SREWL GCSI LKVI RKNL VKKCLEL ELD	412
<i>C. ariakensis</i>	NDVVER . . . PF GCEGCL EFRAL F I PRRAPDF FENKKKKNI . . . KL YVRRVFI . . . VDNCEELI PEYL NFI KEVVDSEDL PLNI SREWL GCSI LKVI RKNL VKKCLEL ED	411
<i>H. discus hannai</i>	NDVVDH L AVKHF SVEGCL EFRAL F L PRRAPDF FENKKKKNI . . . KL YVRRVFI . . . VDNCEELI PEYL NFI KEVVDSEDL PLNI SREWL GCSI LKVI RKNL VKKCLEL FDD	421
<i>F. chinensis</i>	NDVVDH L AVKHF SVEGCL EFRAL F L PRRAPDF FENKKKKNI . . . KL YVRRVFI . . . VDNCEELI PEYL NFI KEVVDSEDL PLNI SREWL GCSI LKVI RKNL VKKCLEL FEE	420
<i>S. maximus</i>	NDVVDH L AVKHF SVEGCL EFRAL F I PRRAPDF FENKKKKNI . . . KL YVRRVFI . . . VDNCEELI PEYL NFI KEVVDSEDL PLNI SREWL GCSI LKVI RKNL VKKCLEL FGE	420
<i>H. sapiens-α</i>	NDVVDH L AVKHF SVEGCL EFRAL F VPRRPFDF FENKKKKNI . . . KL YVRRVFI . . . VDNCEELI PEYL NFI KEVVDSEDL PLNI SREWL GCSI LKVI RKNL VKKCLEL FTE	426
<i>H. sapiens-β</i>	NDVVDH L AVKHF SVEGCL EFRAL F I PRRAPDF FENKKKKNI . . . KL YVRRVFI . . . VDSCELI PEYL NFI KEVVDSEDL PLNI SREWL GCSI LKVI RKNL VKKCLEL FSE	418
Consensus		
<i>S. broughtonii</i>	I AEDKDNFKFYEFCGKNI KL GI HEDSTNRKLL ADL RYHSSGSD ETL SKDYVSRWKENGKCI YVI TGESRDVQNSAFVRRVKKRGM EVI YVDPDI DEYAVGCL KE	530
<i>C. plicata</i>	I AEDKDNFKFYEFCGKNI KL GI HEDSTNRKLL AEF RYFTSSGSD EASL KEYVSRWKENGKCI YVI TGENKEAVGNSAFVRRVKKRGEFI I YVDPDI DEYAVGCL KE	527
<i>M. galloprovincialis</i>	I AEDKDNFKFYEFCGKNI KL GI HEDSTNRKLL ADL RYFTSSGSD EASL KEYVSRWKENGKCI YVI TGESKDVQNSAFVRRVKKRGEFI I YVDPDI DEYAVGCL KE	527
<i>A. irradians</i>	I AEDKDNFKFYEFCGKNI KL GI HEDSTNRKLL ADL RYFTSSGSD EASL KEYVSRWKENGKCI YVI TGESREVVGSSAFVRRVKKRGEFI I YVDPDI DEYAVGCL KE	528
<i>A. farreri</i>	I AEDKDNFKFYEFCGKNI KL GI HEDSTNRKLL ADL RYFTSSGSD EASL KEYVSRWKENGKCI YVI TGESREVVGSSAFVRRVKKRGEFI I YVDPDI DEYAVGCL KE	528
<i>C. gigas</i>	I AEDKDNFKFYEFCGKNI KL GI HEDSTNRKLL ADL RYHSSGSD ETL SKDYVSRWKENGKCI YVI TGESREVVGSSAFVRRVKKRGM EVI YVDPDI DEYAVGCL KE	521
<i>C. ariakensis</i>	I AEDKDNFKFYEFCGKNI KL GI HEDSTNRKLL ADL RYHSSGSD ETL SKDYVSRWKENGKCI YVI TGESREVVGSSAFVRRVKKRGM EVI YVDPDI DEYAVGCL KE	520
<i>H. discus hannai</i>	I MEDKDNFKFYFCGKNI KL GI HEDSTNRKLL SELL RYFTSSGSD EASL KEYVSRWKENGKCI YVI TGESKDVQNSAFVRRVKKRGEFI I YVDPDI DEYAVGCL KE	530
<i>F. chinensis</i>	I VDDKDNFKFYFCGKNI KL GI HEDSTNRKLL AEF RYFTSSGSD EASL KEYVSRWKENGKCI YVI TGETREVCVNSAFVRRVKKRGEFI I YVDPDI DEYAVGCL KE	529
<i>S. maximus</i>	I AEDKDNFKFYEFCGKNI KL GI HEDSTNRKLL SELL RYHSSGSD ETL SKDYVSRWKENGKCI YVI TGESKDVQNSAFVRRVKKRGEFI I YVDPDI DEYAVGCL KE	529
<i>H. sapiens-α</i>	I AEDKDNFKFYEFCGKNI KL GI HEDSTNRKLL SELL RYFTSSGSD EASL KEYVSRWKENGKCI YVI TGETKDVQNSAFVRRVKKRGEFI I YVDPDI DEYAVGCL KE	535
<i>H. sapiens-β</i>	I AEDKDNFKFYEFCGKNI KL GI HEDSTNRKLL SELL RYFTSSGSD EASL KEYVSRWKENGKCI YVI TGESKDVQNSAFVRRVKKRGEFI I YVDPDI DEYAVGCL KE	527
Consensus		
<i>S. broughtonii</i>	YDGLKTLVSVTKEGLLPEDEEKKKFEAEAKL EELCKTKMKEI LDKKVEKVVSNRLVTSPCCI VTSYCVGSANWERI MKACALRDNSTMGYLAAKKHLIEI NPDHPI I T	639
<i>C. plicata</i>	YDGLKTLVSVTKEGLLPEDEEKKKFAEEKAKFEELCKTKMKEI LDKKVEKVVSNRLVTSPCCI VTSYCVGSANWERI MKACALRDNSTMGYLAAKKHLIEI NPDHPI I K	636
<i>M. galloprovincialis</i>	YDGLKTLVSVTKEGLLPEDEEKKKFEAEAEYELCKTKMKEI LDKKVEKVVSNRLVTSPCCI VTSYCVGSANWERI MKACALRDNSTMGYLAAKKHLIEI NPDHPI I K	636
<i>A. irradians</i>	YDGLKTLVSVTKEGLLPEDEEKKKFEAEAEYELCKTKMKEI LDKKVEKVVSNRLVTSPCCI VTSYCVGSANWERI MKACALRDNSTMGYLAAKKHLIEI NPDHPI I K	636
<i>A. farreri</i>	YDGLKTLVSVTKEGLLPEDEEKKKFEAEAEYELCKTKMKEI LDKKVEKVVSNRLVTSPCCI VTSYCVGSANWERI MKACALRDNSTMGYLAAKKHLIEI NPDHPI I K	637
<i>C. gigas</i>	YDGLKTLVSVTKEGLLPEDEEKKKFEAEAEYELCKTKMKEI LDKKVEKVVSNRLVTSPCCI VTSYCVGSANWERI MKACALRDNSTMGYLAAKKHLIEI NPDHPI I K	630
<i>C. ariakensis</i>	YDGLKTLVSVTKEGLLPEDEEKKKFEAEAEYELCKTKMKEI LDKKVEKVVSNRLVTSPCCI VTSYCVGSANWERI MKACALRDNSTMGYLAAKKHLIEI NPDHPI I K	629
<i>H. discus hannai</i>	YDGLKTLVSVTKEGLLPEDEEKKKFEAEAEYELCKTKMKEI LDKKVEKVVSNRLVTSPCCI VTSYCVGSANWERI MKACALRDNSTMGYLAAKKHLIEI NPDHPI I K	639
<i>F. chinensis</i>	YDGLKTLVSVTKEGLLPEDEEKKKFEAEAEYELCKTKMKEI LDKKVEKVVSNRLVTSPCCI VTSYCVGSANWERI MKACALRDNSTMGYLAAKKHLIEI NPDHPI I E	638
<i>S. maximus</i>	YDGLKTLVSVTKEGLLPEDEEKKKFEAEAEYELCKTKMKEI LDKKVEKVVSNRLVTSPCCI VTSYCVGSANWERI MKACALRDNSTMGYLAAKKHLIEI NPDHPI I E	638
<i>H. sapiens-α</i>	YDGLKTLVSVTKEGLLPEDEEKKKFEAEAEYELCKTKMKEI LDKKVEKVVSNRLVTSPCCI VTSYCVGSANWERI MKACALRDNSTMGYLAAKKHLIEI NPDHPI I E	644
<i>H. sapiens-β</i>	YDGLKTLVSVTKEGLLPEDEEKKKFEAEAEYELCKTKMKEI LDKKVEKVVSNRLVTSPCCI VTSYCVGSANWERI MKACALRDNSTMGYLAAKKHLIEI NPDHPI I E	636
Consensus		
<i>S. broughtonii</i>	SL KEKVCADKNDKSVKDLVLLFET SLLSGSFTLEPQVH-ASRI HRM KLGLGI DEDDSG SPDGPSETVDENPPLEGD EDCASRIVEVD	728
<i>C. plicata</i>	TL REKI CADKNDKAVKDLVLLFET SLLSGSFTLEPQVH-ASRI HRM KLGLGI DEEFACETVASTEDPPLEGD EDCASRIVEVD	726
<i>M. galloprovincialis</i>	SL KEKVCADKNDKAVKDLVLLFET SLLSGSFTLEPQVH-ASRI HRM KLGLGI DEED . . . VPVECATTEENPPLEGD EDCASRIVEVD	722
<i>A. irradians</i>	SL KEKATADKNDKAVKDLVLLFET SLLSGSFTLEPQVH-ASRI HRM KLGLGI DDDCAG ADT . . . EESTENPPLEGD EDCASRIVEVD	724
<i>A. farreri</i>	SL KEKAGLADKNDKAVKDLVLLFET SLLSGSFTLEPQVH-ASRI HRM KLGLGI DDDDSG APETSDENVEEPPLEGD EDCASRIVEVD	726
<i>C. gigas</i>	SL KDKAEADKNDKAVKDLVLLFET SLLSGSFTLEPQVH-ASRI HRM KLGLGI DEDE . . . TPETCEPVTEENPPLEGD EDCASRIVEVD	717
<i>C. ariakensis</i>	SL KEKAEADKNDKAVKDLVLLFET SLLSGSFTLEPQVH-ASRI HRM KLGLGI DEDE . . . TPETCEPVTEENPPLEGD EDCASRIVEVD	716
<i>H. discus hannai</i>	TL KEKACADKNDKAVKDLVLLFET SLLSGSFTLEPQVH-ASRI HRM KLGLGI DEEDI P . . . TPEAESTDENPPLEGD EDCASRIVEVD	728
<i>F. chinensis</i>	TL RCKACADKNDKAVKDLVLLFES SLLSGSFTLEPQVH-ASRI YRM KLGLGI DEECPAEAE . . . TLEEDPPLEGD EDCASRIVEVD	726
<i>S. maximus</i>	TL RCKACADKNDKAVKDLVLLFET SLLSGSFTLEPQVH-ASRI YRM KLGLGI DDDVPVEETTSAAPDEI PPLEGEGEDCASRIVEVD	729
<i>H. sapiens-α</i>	TL RCKAEADKNDKAVKDLVLLFET SLLSGSFTLEPQVH-ASRI YRM KLGLGI DEDDFTADCTS . . . AAVTEENPPLEGD . . . DCTSRIVEVD	732
<i>H. sapiens-β</i>	TL RCKAEADKNDKAVKDLVLLFET SLLSGSFTLEPQVH-ASRI YRM KLGLGI DEDEVAEAEEN . . . AAVDEI PPLEGD . . . EDCASRIVEVD	724
Consensus		

图 2 代表物种 HSP90 氨基酸多序列比对

Fig. 2 The multiple sequence alignment of HSP90 with DNAMAN 8.0

注: HSP90 家族的五个签名序列用方框标出, 保守基序 MEEVD 用椭圆标出, 各物种 GenBank 登录号为: 褶纹冠蚌 *Cristaria plicata* (ADN87332), 紫贻贝 *M. galloprovincialis* (CAJ85741), 长牡蛎 *C. gigas* (ABS18268), 海湾扇贝 *A. irradians* (ABS50431), 栉孔扇贝 *A. farreri* (AAR11781), 近江牡蛎 *C. ariakensis* (ADT63790), 皱纹盘鲍 *H. discus hannai* (ACX94847), 大菱鲆 *Scophthalmus maximus* (ABU50778), 中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis* (ABM92446), 人 *H. sapiens*- $\alpha$ , NP\_005339;  $\beta$ , NP\_031381

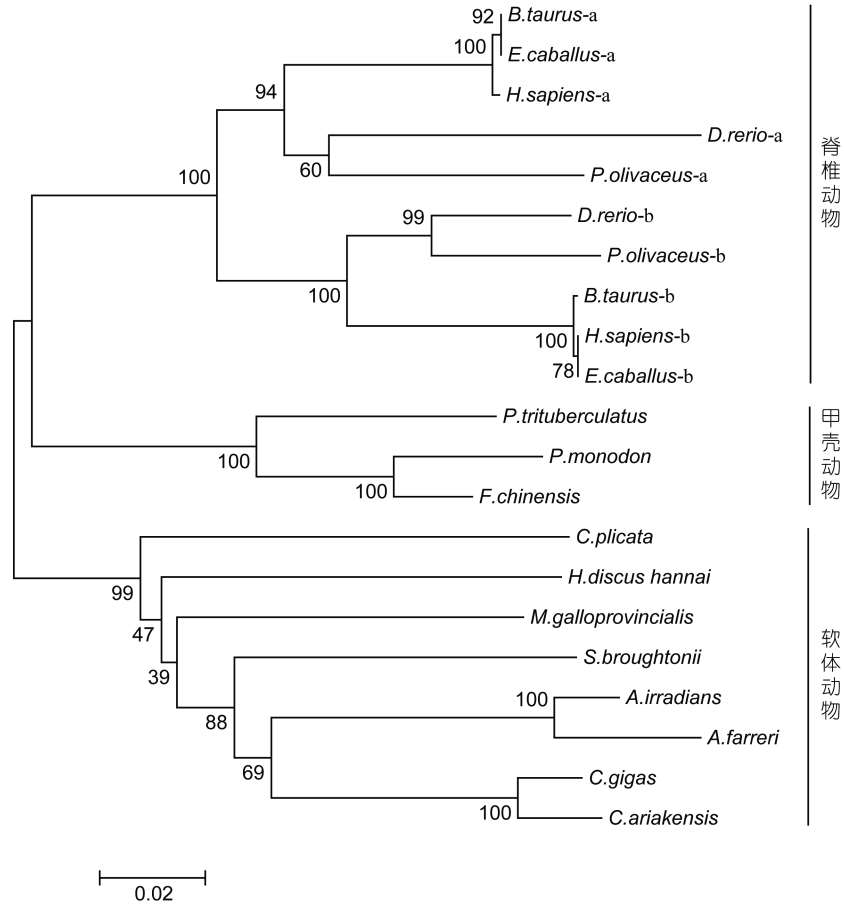


图3 HSP90 的 Neighbour-Joining 系统发育树

Fig.3 The phylogenetic tree of HSP90s

注: 来自不同物种 HSP90 的氨基酸序列的 GenBank 登录号如下: 人 *H. sapiens-α* (NP\_005339), *H. sapiens-β* (NP\_031381), 牛 *Bos taurus-α* (NP\_001012688), *B. taurus-β* (BAC82488), 马 *Equus caballus-α* (Q9GKX7), *E. caballus-β* (Q9GKX8), 斑马鱼 *D. rerio-α* (Q90474), *D. rerio-β* (O57521), 牙鲆 *P. olivaceus-α* (ABG56393), *P. olivaceus-β* (ABG56394), 三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* (ACQ90225), 斑节对虾 *Penaeus monodon* (ACO83357), 褶纹冠蚌 *C. plicata* (ADN87332); 紫贻贝 *M. galloprovincialis* (CAJ85741), 长牡蛎 *C. gigas* (ABS18268), 海湾扇贝 *A. irradians* (ABS50431), 栉孔扇贝 *A. farreri* (AAR11781); 近江牡蛎 *C. ariakensis* (ADT63790); 皱纹盘鲍 *H. discus hannai* (ACX94847), 中国对虾 *F. chinensis* (ABM92446)

2.3 *SbHSP90* 基因的组织表达

qRT-PCR 检测的组织分布结果(图 4)显示, *SbHSP90* 分布于魁蚶所检测的外套膜、鳃、肝胰腺、血细胞、斧足和闭壳肌各组织中。相比于肝胰腺, *SbHSP90* 在其他几种组织中表达量差异极显著, 且 *SbHSP90* 的表达量在除肝胰腺外的其他组织中彼此的表达量也呈极显著差异。斧足中的表达量明显地高于其他组织, 其次是血细胞。

2.4 *SbHSP90* 在鳃弧菌感染后的转录变化

*SbHSP90* 在鳃弧菌感染后上述 6 种组织中的免疫应激表达变化如图 5。结果显示: 鳃弧菌刺激后, 诱导了 *SbHSP90* 的转录变化, 其在 6 种组织中的表达

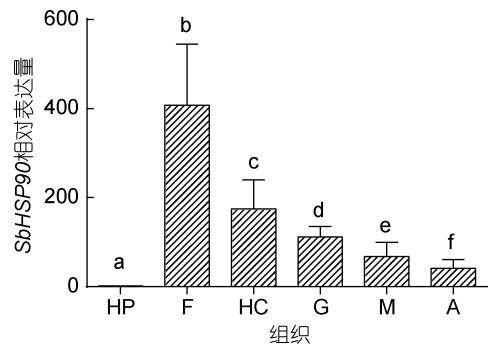


图4 魁蚶 *SbHSP90* 的组织表达

Fig.4 The tissue expression of *SbHSP90*  
注: F. 斧足; G. 鳃; M. 外套膜; HP. 肝胰腺; A. 闭壳肌; HC. 血细胞。标不同字母表示差异极显著( $P < 0.01$ )

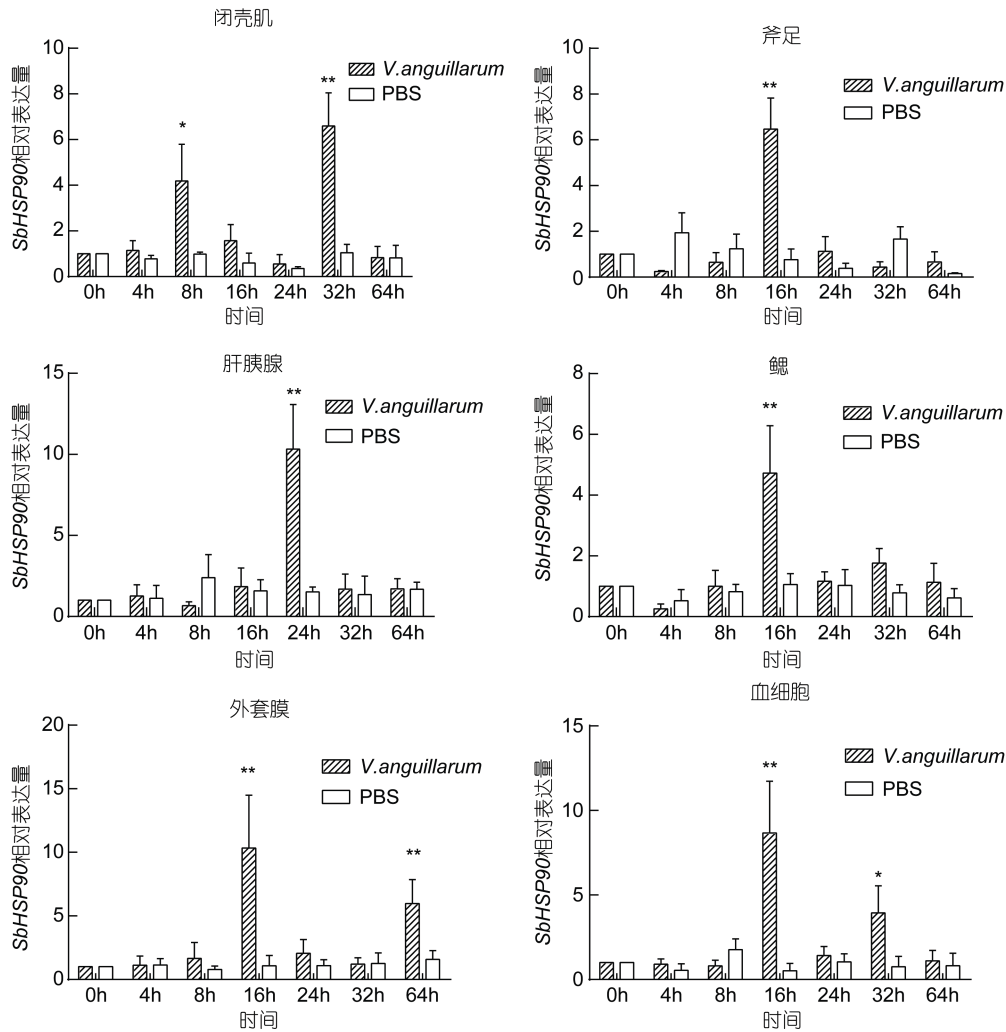


图5 鳃弧菌感染后 *SbHSP90* 的免疫应激变化

Fig.5 Change of *SbHSP90* mRNA expression in six tissues after *V. anguillarum* challenge

注: 与对照组相比, \*\*表示组间差异极显著( $P<0.01$ ), \*表示组间差异显著( $P<0.05$ )

都显著上调: 感染后 4h, *SbHSP90* 在各组织中的表达量无明显变化; 感染后 8h 在闭壳肌中的表达量达到最高值, 为对照组的 4.19 倍( $P<0.05$ ); 在斧足、鳃、外套膜和血细胞中, 于感染后 16h 其表达量到达最高值, 分别为对照组的 6.48 倍( $P<0.01$ )、4.72 倍( $P<0.01$ )、10.33 倍( $P<0.01$ )和 8.67 倍( $P<0.01$ ); 肝胰腺中是在感染后 24h 达到最高值, 为对照组的 9.83 倍( $P<0.01$ ); 随后, 各组织中的表达量开始回降; 然而, 在闭壳肌、血细胞及外套膜中 *SbHSP90* 的表达量分别于感染后 32h、64h 又一次出现表达高峰, 分别为对照组的 6.60 倍( $P<0.05$ )、3.94 倍( $P<0.01$ )和 5.97 倍( $P<0.05$ )。总之, 经鳃弧菌感染后, *SbHSP90* 的表达呈现出显著的时间依赖性, 并且在各组织中具有较明显的瞬时表达趋势。

### 3 讨论

HSP90 参与调节多种蛋白质在非应激条件下的生物活性, 包括参与保护细胞免受损伤甚至凋亡的信号通路、细胞内多种的信号通路的激活和调控 (Zhang *et al*, 2004; Brown *et al*, 2007)、免疫应答 (Basu *et al*, 2001) 以及生长、发育 (Deane *et al*, 2003)、凋亡等。本文以魁蚶转录组文库中注释到的 unigene 为基础, 利用 RACE 技术克隆得到了 HSP90 基因的 cDNA 全长序列, 并分析其核苷酸及氨基酸序列。*SbHSP90* 编码的由 728 个氨基酸残基组成的蛋白质具有 5 个保守的 HSP90 蛋白家族标签, 以及保守的 ATPase 功能位点, 其氨基酸序列的保守性说明成熟的 *SbHSP90* 很可能具有与高等动物 HSP90 蛋白的相似功能和活



性; C 末端的 MEEVD 短肽序列是所有胞质 HSP90 蛋白共同具有的特征(Gao *et al*, 2008), 也是 HSP90 与 HSP70 家族的一个唯一的共同特征(谢彦海, 2011), 该短肽间接调节 HSP90 与 HSP70 之间的联系, 使之形成一个多重分子伴侣复合体(Schenfler *et al*, 2000)。同源性分析结果显示 *SbHSP90* 编码的氨基酸与其它物种的 HSP90 氨基酸同源性都在 80%左右。HSP90 的序列比对、基因结构比对和同源性分析结果推测魁蚶 HSP90 很可能也是一个胞质蛋白, 但需要进一步的验证。

HSP90 不仅对非生物因素如重金属、缺氧等产生反应, 而且对来自病原生物(如细菌、病毒)感染能产生免疫反应, 进而引起基因和蛋白水平的表达变化(谢彦海, 2011)。用鳃弧菌(*V. anguillarum*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)刺激栉孔扇贝(*A. farreri*)和海湾扇贝(*A. irradians*), 发现两种菌对两种扇贝的 HSP90 都有正向调节作用, 于感染后 9h 达到表达高峰(Gao *et al*, 2008); 细菌刺激下, 褶纹冠蚌(*C. plicata*)HSP90 基因的表达量随刺激时间的增加发生显著变化, 于刺激后 12h 表达量最大, 随后于刺激后 48h 恢复到初始水平。qRT-PCR 分析结果显示 *SbHSP90* 在魁蚶所有的组织中均有表达, 这与其他物种 HSP90 的组织表达特点相似, 如皱纹盘鲍(*H. discus hannai*)(吴成龙, 2010)、中国对虾(*F. chinensis*)(栾伟, 2009)等; *SbHSP90* 在血细胞中表达量较高, 可能是由于 HSP90 作为血淋巴细胞重要的免疫防御作用能够诱导氧化胁迫(Yu, 1994)。在细菌感染后, 不同生物体 HSP90 具有相似的表达规律, 说明存在一种共同的调节 HSP90 基因表达的机制, 但 HSP90 的诱导机制及其在免疫过程中的作用仍未知。鳃弧菌刺激后, 魁蚶各组织中 HSP90 基因的表达具有很明显的时间依赖性和瞬时表达趋势, 在鳃、斧足、外套膜和血细胞中, 刺激后 16h *SbHSP90* 表达量到达最高值, 在闭壳肌和肝胰腺中分别于刺激后 8h、24h 表达量达到最高值。有研究指出, 宿主被细菌感染后机体自身的免疫细胞会产生活性氧杀灭病原菌, 同时也对宿主自身的正常细胞产生损伤, 进而造成自身蛋白的变性, 变性蛋白在细胞内的累积诱导 HSP90 的产生(Gao *et al*, 2008); 也有研究表明, 宿主细胞的 HSP90 能识别并结合细菌表面的 LPS, 使得细菌与某些免疫细胞结合(Erkeller-Yüksel *et al*, 1992; Huesea *et al*, 1998), 从而引起一系列的免疫反应清除异己成分(Trianiafilou *et al*, 2004)。*SbHSP90* 的表达量

达到表达高峰之后逐渐开始下降, 推测可能是因为感染的鳃弧菌在魁蚶体内大量繁殖, 降低了正常细胞的代谢能力; 抑或是少量鳃弧菌入侵细胞后, 被细胞启动的天然免疫过程抑杀。HSP90 的上调表达有助于机体适应自身生理功能的改变(Rungrassamee *et al*, 2010), 作为生物环境适应性的一个指标, 在一定意义上体现着生物适应能力的增强(夏西超等, 2012)。

## 4 结论

本研究成功克隆了魁蚶 HSP90 基因全长 cDNA 序列, 并分析了其核苷酸和氨基酸序列、蛋白结构和特点。qRT-PCR 检测的组织表达模式结果显示 *SbHSP90* 基因在所检测的外套膜、斧足、血细胞、肝胰腺、鳃和闭壳肌中都有表达, 表达量有差异; 鳃弧菌免疫刺激后的表达变化在不同组织中显示出明显的时间依赖性和瞬间表达趋势。总之, 实验结果显示细菌感染魁蚶后引起 *SbHSP90* 显著变化, 暗示 *SbHSP90* 参与魁蚶的免疫过程。

## 参 考 文 献

- 齐忠彦, 1996. 中国经济软体动物. 北京: 中国农业出版社
- 吴成龙, 2010. 皱纹盘鲍抗氧化基因的克隆及其在营养调控下表达的研究. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 1—155
- 陈 晨, 2011. 近江牡蛎 HSP90 基因及其对理化胁迫和病原菌感染的反应. 广州: 暨南大学硕士学位论文, 1—72
- 周丽青, 杨爱国, 王清印等, 2013. 魁蚶血细胞分类及其免疫功能初步分析. 水产学报, 37(4): 599—606
- 郑利兵, 吴 彪, 刘志鸿等, 2015. 魁蚶 (*Scapharca broughtonii*) 半乳糖凝集素(*SbGal*)基因 cDNA 的克隆及表达分析. 海洋与湖沼, 46(5): 1061—1070
- 夏西超, 杨 红, 王文锋等, 2012. 凡纳滨对虾热休克蛋白 90 基因 cDNA 全长克隆及表达分析, 31(11): 673—678
- 栾 伟, 2009. 中国明对虾重要分子伴侣蛋白基因的克隆及表达研究. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 1—143
- 谢彦海, 2011. 褶纹冠蚌热休克蛋白基因克隆与表达及 2 种淡水蚌的血细胞分析. 南昌: 南昌大学硕士学位论文, 1—134
- Basu S, Binder R J, Ramalingam T *et al*, 2001. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity*, 14(3): 303—313
- Brown M A, Zhu L, Schmidt C *et al*, 2007. Hsp90-From signal transduction to cell transformation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363(2): 241—246
- Choi Y K, Jo P G, Choi C Y, 2008. Cadmium affects the expression of heat shock Protein 90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 147(3): 286—292



- Csermely P, Schnaider T, Soti C *et al*, 1998b. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics*, 79(2): 129—168
- Csermely P, Schnaider T, Szántó I, 1998a. Possible nuclear functions of the major molecular chaperones of the eukaryotic cytoplasm, Hsp90. *Current Science*, 74(5): 442—445
- Deane E E, Woo N Y, 2003. Ontogeny of thyroid hormones, cortisol, hsp70 and hsp90 during silver sea bream larval development. *Life Sciences*, 72(7): 805—818
- Erkeller-Yüksel F M, Isenberg D A, Dhillon V B *et al*, 1992. Surface expression of the heat shock protein 90 by blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Autoimmunity*, 5(6): 803—814
- Gao Q, Song L S, Ni D J *et al*, 2007. cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 90 gene in the haemocytes of Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 147(4): 704—715
- Gao Q, Zhao J M, Song L S *et al*, 2008. Molecular cloning, characterization and expression of heat shock protein 90 gene in the haemocytes of bay scallop *Argopecten irradians*. *Fish & Shellfish Immunology*, 24(4): 379—385
- Huesea M, Goodwin A, Bhagwansingh A *et al*, 1998. Characterization of an acid-pH-inducible stress protein (hsp70), a putative sulfatide binding adhesin, from *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*, 66(9): 4061—4067
- Lindquist S, 1986. The heat-shock response. *Annual Review of Biochemistry*, 55(1): 1151—1191
- Lindquist S, Craig E, 1988. The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics*, 22(1): 631—677
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods*, 25(4): 402—408
- Nadeau K, Das A, Walsh C T, 1993. Hsp90 chaperonins possess ATPase activity and bind heat shock transcription factors and peptidyl prolyl isomerases. *Journal of Biological Chemistry*, 268(2): 1479—1487
- Niu C J, Rummer J L, Brauner C J *et al*, 2008. Heat shock protein (Hsp70) induced by a mild heat shock slightly moderates plasma osmolarity increases upon salinity transfer in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 148(4): 437—444
- Pan F, Zarate J M, Tremblay G C *et al*, 2000. Cloning and characterization of salmon hsp90 cDNA: upregulation by thermal and hyperosmotic stress. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 287(3): 199—212
- Pantartzl C N, Kourtidis A, Drosopoulou E *et al*, 2009. Isolation and characterization of two cytoplasmic hsp90s from *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca: Bivalvia) that contain a complex promoter with a p53 binding site. *Gene*, 431(1—2): 47—54
- Parsell D A, Lindquist S, 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual Review of Genetics*, 27(1): 437—496
- Rungrasamee W, Leelatanawit R, Jiravanichpaisal P *et al*, 2010. Expression and distribution of three heat shock protein genes under heat shock stress and under exposure to *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon*. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(10): 1082—1089
- Scheuffler C, Brinker A, Bourenkov G *et al*, 2000. Structure of TPR domain-Peptide complexes: critical elements in the assembly of the HSP70-HSP90 multichaperone machine. *Cell*, 101(2): 199—210
- Yu B P, 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews* 74(1): 139—162
- Zhang H, Burrows F, 2004. Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90. *Journal of Molecular Medicine*, 82(8): 488—499
- Zheng L B, Liu Z H, Wu B *et al*, 2016. Ferritin has an important immune function in the ark shell *Scapharca broughtonii*. *Developmental & Comparative Immunology*, 59: 15—24
- Zheng L B, Wu B, Liu Z H *et al*, 2015. A manganese Superoxide dismutase (MnSOD) from ark shell, *Scapharca broughtonii*: molecular characterization, expression and immune activity analysis. *Fish & Shellfish Immunology*, 45(2): 656—665

## COLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF HEAT SHOCK PROTEIN 90 FROM *SCAPHARCA BROUGHTONII* (*SBHSP90*)

ZHENG Li-Bing<sup>1,3</sup>, LIU Zhi-Hong<sup>1,2</sup>, WU Biao<sup>1,2</sup>, ZHOU Li-Qing<sup>1</sup>, SUN Xiu-Jun<sup>1</sup>,  
YANG Ai-Guo<sup>1</sup>, TIAN Ji-Teng<sup>1</sup>, DONG Ying-Hui<sup>4</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Process, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266273, China; 3. College of Ocean and Earth Science, Xiamen University, Xiamen 361102, China; 4. Zhejiang Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resources, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China)

**Abstract** As a molecular chaperone, HSP90 plays pivotal roles in protein process in a normal condition. However, it could be involved in the immune response to pathogens invasion in other abnormal conditions. In the present study, we cloned the full length cDNA of heat shock protein 90 from ark shell *Scapharca broughtonii* (designated *SbHSP90*) by rapid amplification of cDNA ends (RACE) mean with partial cDNA sequence selected from the transcriptome library. The full length cDNA of *SbHSP90* was 2707bp, containing 195bp of 5' untranslated region (UTR) of, 325bp of 3'-UTR, and 2187bp of open reading frame (ORF) encoding a peptide with 728 amino acids. It owned five signature sequences of HSP90 family, an ATPase domain, and a highly conserved short peptide MEEDV in the C-terminus. The predicted molecular weight (Mw) was 83.72kDa and the theoretical isoelectric point (pI) was 4.85. There was no a signal peptide in the N-terminus, and four glycosylation sites were predicted in the deduced amino acids. The sequence analysis showed that the identity of *SbHSP90* shared with mollusks was over 83%, crustacean was about 81%, and the identity with HSP90- $\alpha$  was similar to HSP90- $\beta$  from vertebrates. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) analysis detected that *SbHSP90* expressed in all examined tissues of *S. broughtonii*, including hemocytes, foot, adductor muscle, mantle, gill, and hepatopancreas, and the relative highest expression level was observed in foot. After challenged with *Vibrio anguillarum*, the relative mRNA expression level of *SbHSP90* was up-regulated significantly ( $P<0.01$ ), the times to reach maximum expression level and return to initial level were differ in different tissues. So *SbHSP90* showed obvious time dependence and instantaneous expression trends. All these data suggested that *SbHSP90* played a key role in innate immune process of ark shells.

**Key words** *Scapharca broughtonii*; HSP90; transcript expression; immune response