

# 刺参(*Apostichopus japonicus*)高温胁迫 应答基因应激表达特性的分析\*

孙国华<sup>1</sup> 吉成龙<sup>1,2</sup> 杨建敏<sup>1</sup> 王卫军<sup>1</sup> 任利华<sup>1</sup>

(1. 山东省海洋水产研究所 烟台 264006; 2. 中国科学院烟台海岸带研究所 烟台 264001)

**提要** 采用实时荧光定量 PCR 技术对刺参高温胁迫抑制性消减 cDNA 文库中 2 个上调表达差异基因 *hsp70* 和 *l(2)efl*, 2 个下调表达差异基因 *pcsk9* 和 *myp*, 在不同温度、不同胁迫时间以及不同组织中的应激表达特性进行了分析。在 15—30℃ 范围内, 温度越高 *hsp70* 和 *l(2)efl* 基因相对表达量越多; 而 *pcsk9*、*myp* 基因随着温度升高其表达量下降。在 30℃ 高温胁迫 0—3h 时间内, *hsp70* 表达量的变化最为显著, 表现为先升后降再升; *l(2)efl* 在 1h 后开始明显的上调表达, 在 2.5h 之后呈下降趋势; *pcsk9* 和 *myp* 基因表现为表达下调, 表达量最小值分别在 3h 和 2h。常温下 *hsp70*、*l(2)efl* 和 *pcsk9* 均在体壁中的表达量最高, 在呼吸树中表达量最少, *myp* 在消化道中表达量最高, 在纵肌中表达量最少; 高温胁迫后 *hsp70*、*l(2)efl* 均在呼吸树中上调表达量变化最显著; *pcsk9* 和 *myp* 分别在呼吸树和纵肌中下调表达量变化最显著。这 4 种基因通过表达产物量的变化或作为功能蛋白直接参与代谢调节, 或作为调节蛋白调控胁迫功能蛋白的表达及活性来提高刺参对高温胁迫的耐受能力。

**关键词** 刺参, 高温胁迫, 热休克蛋白 70, 类致死必需蛋白, 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9, 主要卵黄蛋白

**中图分类号** Q346

刺参(*Apostichopus japonicus*)属棘皮动物门、海参纲、楯手目、刺参科、仿刺参属, 主要分布在北纬 35°—44° 的广大西北太平洋沿岸, 包括黄、渤海海域, 俄罗斯东部沿岸, 日本和韩国沿岸, 是典型的温带物种。温度是影响刺参生长、繁殖的重要因子, 温度波动对刺参生理活动有着重要的影响(An *et al.*, 2007), 水温不仅影响刺参的摄食、代谢和生殖发育, 并且当水温升高到一定范围后, 刺参即进入停止摄食、活动减少的“夏眠”状态(Mitsukuri, 1903)。刺参对温度的适应具有特殊性和复杂性, 近年来许多学者对刺参温度生理适应机制进行了研究(Ji *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2008; An *et al.*, 2009), 但主要集中在生理生态方面。从分子基础角度探讨刺参对温度的响应研究还很

薄弱。

本研究从刺参响应环境温度变化的基因表达入手, 前期工作利用抑制性消减杂交技术成功构建了高温胁迫下正反 cDNA 差异消减文库(吉成龙等, 2011), 从基因组学角度探讨了高温胁迫下刺参转录组变化, 并筛选获得差异表达特异功能基因。本研究选取 2 个上调表达差异的基因: 热休克蛋白基因 *hsp70* 和类致死必需蛋白基因 *l(2)efl*, 2 个下调表达差异的基因: 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 基因 *pcsk9* 和主要卵黄蛋白基因 *myp*, 以刺参看家基因  $\beta$ -actin 为内参, 采用实时荧光定量 PCR 技术, 利用相对定量  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法对这 4 个基因在不同胁迫时间、不同温度下以及不同组织中的应激表达特性进行了分析, 结合

\* 山东省自然科学基金项目, ZR2011CM036 号; 山东省良种工程项目“速生抗病耐高温刺参良种选育”, 2008—2011; 山东省优秀中青年科学家奖励基金(博士基金)项目, 2008BS06004 号; 山东省现代农业产业技术体系刺参创新团队刺参育种岗位, 2012—2014。孙国华, 博士, 助理研究员, E-mail: sgh\_smile@163.com

通讯作者: 杨建敏, 博士, 研究员, E-mail: ladderup@126.com

收稿日期: 2012-04-17, 收修改稿日期: 2012-06-05

基因的功能探讨基因表达的时空变化, 以期为阐述刺参应答高温胁迫的机制提供分子基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

刺参样品为 18 月龄成参, 平均体长为 15.5cm, 取自山东蓬莱刺参养殖场, 挑选体态伸展结实、规格均一的个体在实验室养殖池暂养 7d。

### 1.2 温度胁迫处理

**1.2.1 不同胁迫温度** 设定 15、18、21、24、27、30 6 个温度, 分别用温控加热棒将 5 个水槽中海水加热到设定温度, 其中 15 为常温对照。随机挑选 10 只刺参迅速放到已预热至设定温度的水槽中, 高温胁迫 3h, 各组分别取出 6 只刺参解剖取其等量体壁、纵肌、消化道和呼吸树等组织并混合, 用液氮迅速冷冻后转移到 -80℃ 冰箱以备用。

**1.2.2 不同胁迫时间** 随机挑选 50 只刺参放到已预热至 30℃ 的水槽中并开始计时, 分别在 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3h 这 7 个时间点随机挑选出 6 只刺参, 取等量的体壁、纵肌、消化道和呼吸树等组织混合, 用液氮迅速冷冻后转移到 -80℃ 冰箱备用。

**1.2.3 不同组织** 随机挑选 10 只刺参迅速放到已预热至 30℃ 的水槽中, 作为高温处理组, 另随机挑选 10 只刺参到另一常温 15℃ 水槽中, 作为常温对照组, 其它养殖条件相同。处理 3h 后, 两组刺参各取出 6 只解剖取其体壁、纵肌、消化道和呼吸树等组织, 分别用液氮迅速冷冻后转移到 -80℃ 冰箱备用。

### 1.3 RNA 的提取与 cDNA 的合成

将组织在液氮中充分研磨, 加入适量 Trizol (Invitrogen) 提取总 RNA, 以 DNase (Promega) 消化基因

组污染, 紫外分光光度计分析测定并进行变性凝胶电泳, 检测总 RNA 的纯度及完整性。以 Oligo nucleotide 为反转录引物在 M-MLV 反转录酶(Promega) 作用下转录合成单链 cDNA。

### 1.4 引物的设计与筛选

根据 *hsp70*、*l(2)efl*、*pcsk9*、*myp* 和  $\beta$ -*actin* 的基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件结合 DNASTar 分析软件及 BLAST 程序, 设计荧光定量 PCR 引物, 如表 1 所示。

### 1.5 荧光定量 PCR

荧光定量 PCR 在 ABI PRISM7300 FAST Real-Time PCR 扩增仪上进行, 按照 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 使用说明, 采用 SYBR Green 嵌合荧光法进行实时定量 PCR 扩增反应。

PCR 反应体系为: SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (2×) 10.0μl, 上下游引物各 0.4μl (10mM), ROX Reference Dye (50×) 0.4μl, DNA 模板 2.0μl, 加 dH<sub>2</sub>O 至 20.0μl。反应条件: 95℃ 预变性 30s; 95℃ 变性 5s, 56℃ 退火 30s, 循环 40 次。

### 1.6 数据分析

每样品 3 个平行 PCR 反应, 检验扩增曲线和熔解曲线的结果是否吻合, 对各样品的 *Ct* 值求平均值。以刺参  $\beta$ -*actin* 为内参, 运用公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , 公式中  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{实验组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{对照组}$ , 计算目的基因的相对表达量。采用 SPSS11.5 软件进行数据统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 各基因扩增结果

对 4 个差异表达基因和  $\beta$ -*actin* 的 PCR 产物进行

表 1 刺参 5 种基因定量 PCR 引物序列及目的片段长度  
Tab.1 Quantitative PCR primers and product lengths of five genes in *A. japonicus*

基因	引物序列	目的片段长度(bp)
<i>hsp70</i>	F: TTCAACGATTCACAGCGACA R: CGAGATCAAAGATGAGGACGTGT	131
<i>l(2)efl</i>	F: TTGGTCTTGATGGCTGAACTGTCT R: GGTTGACTCTTCACTCGACGAAC	322
<i>myp</i>	F: TGTGAACGTCGAAGCCCCTGGATACT R: TAGGCGGATTATGGCATGATCTTAG	164
<i>pcsk9</i>	F: TTCCATTGAACAACGGCTAC R: GGTGACTGATTTGGCGACA	211
$\beta$ - <i>actin</i>	F: CGGGAAATCGTTCGTGACA R: AGGACAAAGTTGGCGTACA	262

熔解曲线分析, 结果呈现单一特异吸收峰。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测(图 1)显示每 PCR 反应扩增得到单一清晰的条带, 且其分子量大小与设计的一致, 无非特异扩增和引物二聚体, 证实所设计的引物和实时定量 PCR 反应过程的特异性, 保证了实验结果的准确性。

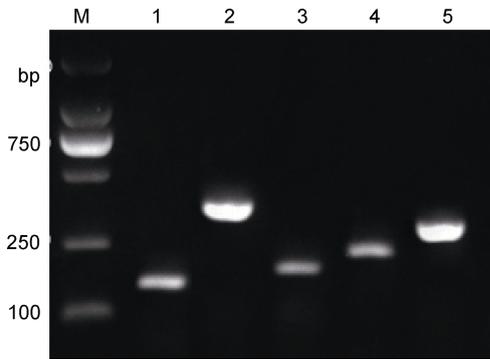


图 1 Real-time PCR 扩增产物电泳检测

Fig.1 Electrophoresis of real-time PCR products

注: M. DNA 分子量标准 DL2000; 1—5. *hsp70*、*l(2)efl*、*pcsk9*、*myp*、 *$\beta$ -actin* 的扩增产物

## 2.2 刺参高温胁迫应答基因在不同温度胁迫下的表达

以 15°C 条件下的目的基因表达量作基准为 1, 不同基因高温胁迫 3h 后相对表达量如图 2 所示: 较常温对照 15°C, *hsp70* 和 *l(2)efl* 基因在高温 18—30°C 均上调表达, 且温度越高基因相对表达量越多, 两者在温度达到 24°C 时表达量均显著上升, 30°C 时分别达到最大表达量 3.82 和 2.58。*pcsk9*、*myp* 基因在相同条件下均表现为下调表达, 随着温度升高其表达量下

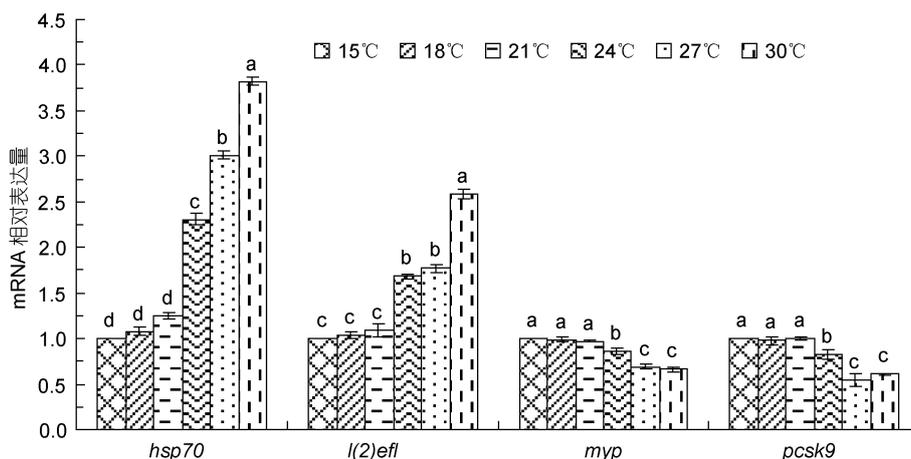


图 2 刺参热胁迫应答基因在不同温度下的表达

Fig.2 Expressions of heat stress responsive genes in *A. japonicus* under different temperatures

注: 标有不同字母的值之间差异显著( $P < 0.05$ )

降, *myp* 在 30°C 表达量为最低值 0.66, *pcsk9* 在 30°C 较 27°C 的表达量 0.54 略微上升, 但总体还是呈现下调表达。

## 2.3 刺参高温胁迫应答基因在不同胁迫时间下的表达

在 30°C 胁迫条件下, 检测在 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3h 时间点这 4 种基因的表达情况, 以 0h 时各基因的表达量为基准 1, 结果如图 3 所示, *hsp70* 和 *l(2)efl* 均表现为上调表达, 在 0—3h 内, 随着胁迫时间的延长, 表达量均呈上升趋势。其中以 *hsp70* 表达量的变化最为显著, 且表现为先升后降再升, 热处理 1h 时 *hsp70* 升至 2.17, 随后开始下降, 在 2h 时降为 1.23, 此时的表达量接近 0.5h 时的表达量, 之后又开始急剧上升, 3h 已升至最大值 4.15; *l(2)efl* 在 1h 后才开始明显的上调表达, 在 2.5h 时达到最大值 2.1, 之后出现下降趋势, 3h 表达量为 1.83。*pcsk9* 和 *myp* 基因表现为表达下调, 在 0—3h 时间内随着胁迫时间的延长, 表达量呈下降趋势; 胁迫过程中, *myp* 表达量最小值 0.56 出现在 3h, 而 *pcsk9* 的表达量最小值 0.5 则在 2h, 之后又表现为小范围的上调表达。

## 2.4 刺参胁迫应答基因在不同组织中的表达特性

实时荧光定量 PCR 检测了差异表达基因在常温和高温胁迫后的刺参体壁、纵肌、消化道和呼吸树中的表达量(图 4), 并对比了这些基因在高温胁迫前后表达量的变化(图 5)。常温条件下以体壁组织中基因的表达量作基准为 1, 4 种基因在刺参各组织中均有表达, 但表达量之间存在差异; *hsp70*、*l(2)efl* 和 *pcsk9* 均在体壁中的表达量最高, 在呼吸树中表达量最少, 分别为体壁的 0.61、0.58 和 0.38。*myp* 在消化道中表达量最高, 在纵肌中表达量最少。30°C 胁迫 3h 后, 以常温下各组织中基因的表达量为基准 1, 如图 5 所示: 高温胁迫后 *hsp70*、*l(2)efl* 在 4 个组织中均表现为上调表达, 两者均在呼吸树中表达量变化最显著; *pcsk9* 和 *myp* 在各组织中均表现为下调表达, 两者分别在呼吸树和纵肌中表达量变化最显著。

## 3 讨论

### 3.1 热休克蛋白 70 基因

热休克蛋白(Hsps)作为分子伴侣在生物应激状态下具有

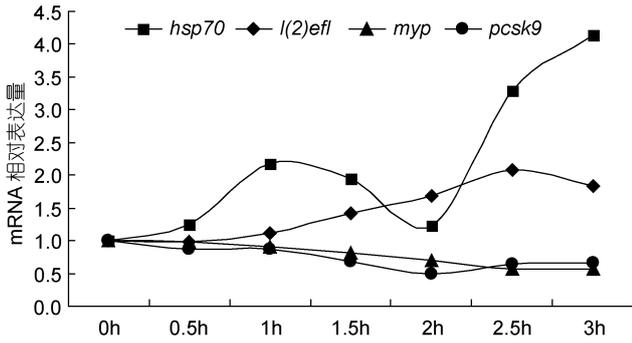


图3 刺参热胁迫应答基因在3h高温胁迫过程中的表达  
Fig.3 Expressions of heat stress responsive genes in *A. japonicus* during 3h heat stress

重要地位, 其中热休克蛋白 70 家族在应激反应中具有特殊的敏感性, 帮助需要折叠的蛋白质正确折叠, 加快正常蛋白质合成的恢复, 在细胞保护方面, Hsp70 表达的增加可以缓解细胞所受伤害, 增强机体对应激的抵抗力, 同时 Hsp70 在抗细胞凋亡、抗氧化和免疫反应中也起着重要作用(Osterloh *et al.*, 2008)。近年来研究发现, 当生物体处于环境胁迫状态下, 机体通过提高其热休克蛋白的表达量以适应环境的变化。生物体在受到有害物质胁迫后的第一个反应就是 Hsps 表达水平的提高, 而 Hsp70 诱导表达最明显, Hsp70 作为最保守最重要的一类热休克蛋白家族, 在生物的热应激反应中都经常高度的被诱导、广泛参与各种机体功能(Clegg *et al.*, 1998; Nakano *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2008a, b)。

本研究中, 刺参在受到高温胁迫后, *hsp70* 表现为上调表达, 在 15—30℃ 温度范围内, *hsp70* 随着温度的升高其表达量增多, 刺参耐热性通过 *hsp70* 的表达来实现。在 30℃ 热胁迫 3h 过程中, *hsp70* 的上调表达最明显, 在 1h 时即达到初始状态的

2.17 倍, 而之后的 1h 内出现了一定程度的下降, 分析可能前期上调表达翻译形成的 Hsp70 蛋白已经使得刺参机体对热应激产生了一定的耐受性, 但随着热胁迫的继续, 更多的蛋白受损或失活, 现有的 Hsp70 不足以维持细胞自身的稳定, 于是 2h 后出现了 *hsp70* 的急剧上调表达, 防止细胞进一步受损害。

热休克蛋白基因表达水平常表现出组织特异性。不同组织的结构功能差异导致了各组织对一种胁迫敏感性不同, 一个生物耐热限度可能主要受某个组织决定, 也可根据此特性用于推测鉴别组织(Hofmann *et al.*, 1996)。Das 等(2005)对鲤鱼 *hsp70* 的研究发现, *hsp70* 的表达存在组织特异性, 在热胁迫条件下, 鲤

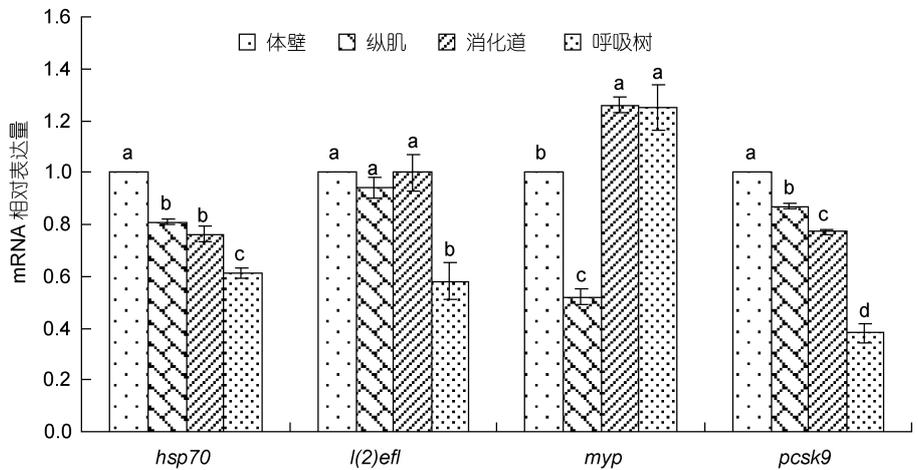


图4 刺参热胁迫应答基因在常温下的表达

Fig.4 Expressions of heat stress responsive genes in *A. japonicus* under room temperature

注: 标有不同字母的值之间差异显著( $P < 0.05$ )

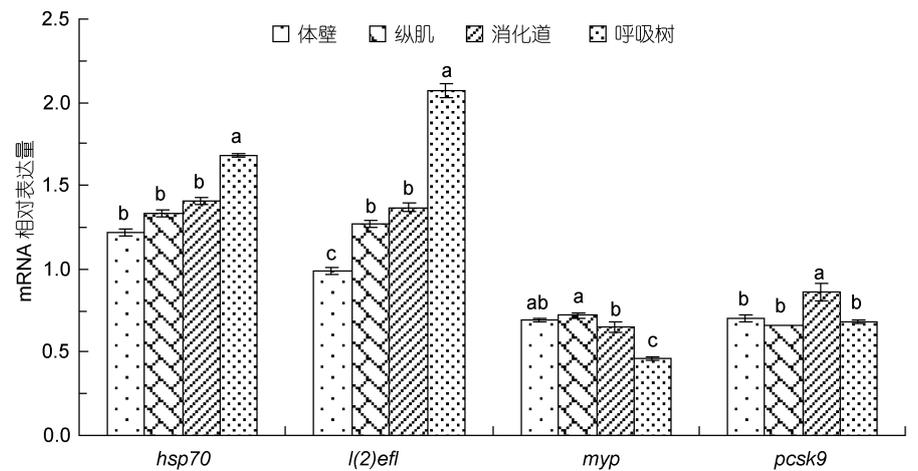


图5 刺参热胁迫应答基因高温胁迫后的表达

Fig.5 Expressions of heat stress responsive genes in *A. japonicus* after heat stress

注: 标有不同字母的值之间差异显著( $P < 0.05$ )

鱼肝脏中 *hsp70* 的表达量稳定增长,且表达量高于鳃和心脏组织。作者在研究中发现, *hsp70* 在常温组的刺参体壁中表达量最高,呼吸树中表达量最少,但热胁迫后 *hsp70* 在呼吸树中上调表达最显著,表现为常温时的 1.68 倍。刺参组织中 *hsp70* 对热胁迫的敏感程度高低依次为呼吸树、消化道、纵肌、体壁。Ji 等(2008)利用 western 方法比较了消化道和体壁 Hsp70 蛋白表达模式,也发现了刺参的消化道比体壁更易受到热胁迫的影响,消化道中 Hsp70 被强烈诱导,持续时间远超过体壁。

### 3.2 类致死必需蛋白基因

致死必需蛋白(Protein lethal (2) essential for life) 基因最早发现在果蝇体内,它的基因序列和小热休克蛋白基因有很高的同源性,其翻译出来的氨基酸序列和已知的其它小热休克蛋白高度同源(Kurzik-Dumke *et al.*, 1995)。sHsp 是目前研究相对比较少的一类热休克蛋白,与其它蛋白进行相互作用使信号转导、新陈代谢、转录、翻译等生命过程中的各种细胞蛋白保持稳定。此外 sHsp 还具有质膜维护、稳定细胞骨架等功能(夏佳音等, 2007)。在果蝇的研究中, *l(2)efl* 在果蝇胚胎发育以及幼体阶段一直都在表达,表现出小热休克蛋白的功能,主要与生物体的抗热性有关,并在一定程度保护细胞免遭凋亡(Morrow *et al.*, 2003)。刺参体内的 *l(2)efl* 报道尚属首次,类致死必需蛋白在刺参受到高温应激后,表现为上调表达,推测属于刺参小热休克蛋白,但功能需要进一步进行验证。

与同为热休克蛋白家族的 *hsp70* 基因相比较, *l(2)efl* 基因表达既有与之相同之处又有其自身的特点。在 15—30℃ 温度梯度范围内, *l(2)efl* 基因与 *hsp70* 一样随着温度的升高其表达量增多,且在 24℃ 时较 21℃ 表达上调差异显著。在 30℃ 的 3h 高温胁迫过程中, *l(2)efl* 的表达较滞后, *l(2)efl* 在 1h 后才开始明显的上调表达,而此时 *hsp70* 表达量为初始的 2.17 倍, *l(2)efl* 基因的上调表达在 2.5h 达到最高点,之后出现稍微下降趋势。 *hsp70* 在上调表达过程中也并不是持续增高,在 2h 左右存在一个低点,之后又急剧大量表达。常温条件下 *l(2)efl* 在体壁和消化道的表达量较丰富,而在高温胁迫后的呼吸树中其表达量变化最大,其应对高温的表达模式与 *hsp70* 类似,均表现为在热应激下消化道和呼吸树比体壁更容易被诱导上调表达,而且诱导表达程度比体壁要强烈。据 *l(2)efl* 在不同温度下所表现出的表达特点推测,它与热休

克蛋白 *hsp70* 一样在刺参热应激反应中被诱导大量表达以增强机体耐受性,减少机体所受的伤害,但在行使功能方面有其自身的特点。

### 3.3 主要卵黄蛋白基因

主要卵黄蛋白(Myp)这一名称最初是来自海胆,它是海胆卵中最丰富的一种蛋白,由于其类似卵黄蛋白原的特性,曾被划分到卵黄蛋白原一类(Shyu *et al.*, 1986),但后来研究发现与其它卵生动物不同,海胆的卵巢和精巢都有主要卵黄蛋白,而且其基因序列与其它动物的卵黄蛋白原几乎没有同源性,除此之外,海胆主要卵黄蛋白的 cDNA 序列与一些铁传递家族蛋白具有较高的同源性,即主要卵黄蛋白还是一种铁结合蛋白,具有铁离子传递的功能(Brooks *et al.*, 2002)。最近日本学者 Fujiwara 等(2010)在日本刺参体内也发现了主要卵黄蛋白,其氨基酸序列与海胆主要卵黄蛋白的有 30% 的同源性,研究发现它们除了在卵巢和睾丸外在其它所有组织和器官中均有表达。在作者的研究中, *myp* 基因在刺参体壁、消化道、呼吸树和纵肌中均有表达,与前述研究结果一致。除了作为一种运输蛋白,这种广泛表达的 Myp 是否还有其它的功能,目前尚不得知。

常温条件下, *myp* 在刺参体内以呼吸树和消化道中的含量最高,纵肌中含量最少。经高温胁迫后的刺参体内表现为下调表达,在呼吸树和消化道中的差异表达最显著,较体表的组织, *myp* 在体腔组织中表达量更多,应对高温胁迫也更敏感。从运输蛋白功能角度考虑,刺参高温胁迫后 *myp* 表现为下调表达,推测原因其一是由参与的转运活动因高温胁迫受抑制, *myp* 受上游调控因子的调节表达减少或转录后降解,减少这一代谢活动,节约能量用于维持生存必需的代谢活动;其二是通过表达 Myp 蛋白的量变化调节铁离子含量,来调控下游基因的表达以应对高温胁迫对刺参稳态的冲击。推测还需结合刺参高温胁迫后的生理生化指标来进行验证。

### 3.4 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 基因

Pcsk9 属于前蛋白转化酶家族,在人体内主要生物学功能是参与脂质代谢的调节,介导低密度脂蛋白受体降解,调节血浆 LDL 胆固醇水平(Poirier *et al.*, 2008; Grefhorst *et al.*, 2008),由不同位置碱基突变导致的功能获得型和功能缺失型突变产生截然不同的生物学效应(Lambert *et al.*, 2009)。Hochachka 等(2002)研究发现生物在遭受温度突变时会调整中间代谢,使得多种脂质的相对水平发生改变。在对金鱼热胁迫

的过程中, 金鱼肝组织中的脂质过氧化物含量显著增加(Lushchak *et al.*, 2006); 有研究发现刺参在热胁迫过程中, 酯酶 2 的表达显著提高, 热胁迫刺激了刺参体内的中间代谢适应机制来水解过多的脂质过氧化物(纪婷婷等, 2007)。pcsk9 作为刺参高温胁迫后下调表达的一种基因, 其功能很可能与刺参脂类代谢的调节有关, 其表达水平直接或间接影响酯酶的表达。

在 15—30℃ 温度梯度范围内, pcsk9 基因整体表现为下调表达, 在 27℃ 表达量较 21℃ 下调显著, 而 30℃ 时的表达量较 27℃ 时有所回升, 由 0.54 升至 0.61。在 30℃ 的 3h 高温胁迫过程中, pcsk9 从开始至 2h 时表现为较明显的下调表达, 之后表达量趋于稳定。pcsk9 在刺参各组织中的相对表达量以体壁最高、呼吸树为最低, 高温胁迫后在各组织中均表现为下调表达, 组织间差异不显著。pcsk9 作为刺参高温胁迫的应答基因, 其具体作用功能在刺参体内还无相关研究。它是否参与刺参脂类代谢的调节? 如果参与调节, 又是通过何种模式进行的? 后续还需要更深入地结合刺参的脂类代谢活动与 pcsk9 的表达特点进行研究分析, 以更进一步阐释 pcsk9 表达变化应对高温胁迫的分子机理。

#### 4 刺参高温胁迫应答分子机制及展望

胁迫应答是生物体对各种各样有害的环境胁迫因素和内在胁迫因素所做出的应答, 胁迫应答是一个非常复杂的过程, 目前关于胁迫应答机制在机体构造相对简单的植物中开展的较多, 植物在受到胁迫后, 细胞感知外界信号并通过一系列复杂的信号转导来激活特定转录调控因子, 进而与顺式作用元件结合并启动、调控目的基因的转录、表达过程, 提高植物耐受及抵抗逆境的能力(李书粉等, 2006)。在胁迫应答过程最终发挥作用的是应答基因的表达产物, 这些基因的表达产物主要分为两类: 直接参与代谢变化等生化应答过程以产生抗逆境效应的功能蛋白, 如代谢相关的酶类、抗性蛋白等; 和参与对逆境信号应答反应过程中基因表达调节和信号传导的调节蛋白, 包括转录因子、蛋白激酶等。

刺参应答高温胁迫同样是一个大量基因参与表达调控的复杂过程, 由于刺参的基础研究比较薄弱, 许多基因的功能尚不明确。本研究中除刺参 *hsp70* 之外, 其它 3 个基因研究的相关资料文献很少, *l(2)efl*、*pcsk9* 更是本研究首次发现并报道的刺参新基因。Hsp70 作为一种功能蛋白, 在高温胁迫过程中发挥分

子伴侣的作用以增强刺参机体的应激耐受性; 而 *l(2)efl*、*myp*、*pcsk9* 基因表达产物既有可能作为功能蛋白直接参与代谢调节, 也有可能作为调节蛋白通过调控胁迫蛋白的表达及其蛋白质活性来提高刺参对高温胁迫的耐受能力。本研究从前期构建的刺参高温胁迫消减 cDNA 文库部分关键基因入手, 根据这些基因的功能及参与的代谢、运输及信号传导过程, 作为研究高温胁迫分子机制的切入点, 分析细胞内生命活动的变化, 在此基础上应深入结合蛋白质组学、代谢组学及生理学研究, 以期阐释刺参应答高温胁迫的复杂机制。

#### 参 考 文 献

- 吉成龙, 孙国华, 杨建敏等, 2011. 刺参(*Apostichopus japonicus*)高温胁迫消减 cDNA 文库的构建与分析. 海洋与湖沼, 42(1): 60—66
- 纪婷婷, 董云伟, 董双林, 2007. 温度变化对刺参同工酶的影响. 中国海洋大学学报, 37(4): 586—590
- 李书粉, 孙富丛, 肖理慧等, 2006. 植物对非生物胁迫应答的转录因子及调控机制. 西北植物学报, 26(6): 1295—1300
- 夏佳音, 张耀洲, 2007. 小热休克蛋白的结构和功能. 中国生物化学与分子生物学报, 23(11): 911—915
- An Z H, Dong Y W, Dong S L *et al.*, 2007. Effects of high temperature and ration on the growth of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Aquaculture*, 272: 644—648
- An Z H, Dong Y W, Dong S L, 2009. A high-performance temperature control scheme: growth of sea cucumber *Apostichopus japonicus* at different modes of diel temperature fluctuation. *Aquaculture International*, 17(4): 459—467
- Brooks J M, Wessel G M, 2002. The major yolk protein in sea urchins is a transferrin-like, iron binding protein. *Developmental Biology*, 245(1): 1—12
- Clegg J, Jackson S A, Chert G *et al.*, 1998. Induced thermotolerance and the heat shock protein-70 family in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 7(1): 21—30
- Das P, Gupta A, Manna S K, 2005. Heat shock protein 70 expression in different tissues of *Cirrhinus mrigala* following heat stress. *Aquaculture Research*, 36(6): 525—529
- Dong Y W, Dong S L, Ji T T, 2008. Effect of different thermal regimes on growth and physiological performance of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka. *Aquaculture*, 275: 329—334
- Fujiwara A, Unuma T, Ohno K *et al.*, 2010. Molecular characterization of the major yolk protein of the Japanese common sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) and its expression profile during ovarian development. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 155: 34—40

- Grefhorst A, McNutt M C, Lagace T A *et al*, 2008. Plasma PCSK9 preferentially reduces liver LDL receptors in mice. *Journal of Lipid Research*, 49(6): 1303—1311
- Hochachka P W, Somero G N, 2002. *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. Oxford: Oxford University Press, 290—451
- Hofmann G E, Somero G N, 1996. Interspecific variation in thermal denaturation of proteins in the congeneric mussels *Mytilus trossulus* and *M. galloprovincialis*: evidence from the heat-shock response and protein ubiquitination. *Marine Biology*, 126: 65—75
- Ji T T, Dong Y W, Dong S L, 2008. Growth and physiological responses in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka: aestivation and temperature. *Aquaculture*, 283: 180—187
- Kurzik-Dumke U, Lohman E, 1995. Sequence of the new *Drosophila melanogaster* small heat-shock-related gene, lethal (2) essential for life [*l(2)efl*], at locus 59F4, 5. *Gene*, 154(2): 171—175
- Lambert G, Charlton F, Rye K A *et al*, 2009. Molecular basis of PCSK9 function. *Atherosclerosis*, 203(1): 1—7
- Lushchak V I, Bagnyukova T V, 2006. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissue. 1. Indices of oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143(1): 30—35
- Mitsukuri K, 1903. Notes on the habits and life history of *Stichopus japonicus* Selenka. *Annotation of Zoology of Japan*, 5: 1—21
- Morrow G, Tanguay R M, 2003. Heat shock proteins and aging in *Drosophila melanogaster*. *Cell & Developmental Biology*, 14(5): 291—299
- Nakano K, Iwama G, 2002. The 70-kDa heat shock protein response in two intertidal sculpins, *Oligocottus maculosus* and *Osnyderi*: relationship of *hsp70* and thermal tolerance. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 133(1): 79—94
- Osterloh A, Breloer M, 2008. Heat shock proteins: linking danger and pathogen recognition. *Medical Microbiology and Immunology*, 197(1): 1—8
- Poirier S, Mayer G, Benjannet S *et al*, 2008. The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2. *Journal of Biological Chemistry*, 283(4): 2363—2372
- Shyu A B, Raff R A, Blumenthal T, 1986. Expression of the vitellogenin gene in female and male sea urchin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83(11): 3865—3869

## EXPRESSION ANALYSIS OF HEAT STRESS RESPONSIVE GENES IN *APOSTICHOPUS JAPONICUS*

SUN Guo-Hua<sup>1</sup>, JI Cheng-Long<sup>1,2</sup>, YANG Jian-Min<sup>1</sup>, WANG Wei-Jun<sup>1</sup>, REN Li-Hua<sup>1</sup>

(1. Shandong Marine Fisheries Research Institute, Yantai, 264006; 2. Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai, 264001)

**Abstract** To analyze gene expression in response to environmental temperature changes in *Apostichopus japonicus*, two up-regulated genes *hsp70* and *l(2)efl*, and two down-regulated genes *myp* and *pcsk9* in suppression subtractive cDNA library of heat stress, were picked out to investigate under different stress time, different temperature and different tissue using real-time quantitative PCR. At 15—30°C, the higher the temperature, the more relative expression of *hsp70* and *l(2)efl* were. The genes of *myp* and *pcsk9* showed reduced expression under the same conditions. During 1—3h of heat stress of 30°C, *hsp70* changed significantly, representing a fluctuate pattern. *L(2)efl* significantly increased after 1h, and reached the maximum at 2.5h, then followed by a downward trend. The expression of *myp* and *pcsk9* reached minimum at 3h and 2h, respectively. Under room temperature, *hsp70*, *l(2)efl* and *pcsk9* had the highest expression in the body wall and the least in the respiratory tree, while the highest expression and least expression of *myp* were in the digestive tract and longitudinal muscle, respectively. After high temperature stress, *hsp70* and *l(2)efl* changed significantly in the respiratory tree, as *pcsk9* and *myp* varied most obviously in breathing trees and longitudinal muscle. Via variation of expression, the protein products of the four genes involved in the regulation of metabolism as function proteins, or control the expression and the activity of the stress proteins as regulatory proteins, in order to improve the heat stress tolerance of *A. japonicus*.

**Key words** *Apostichopus japonicus*, Heat stress, Heat shock protein 70, Protein lethal (2) essential for life, Major yolk protein, Protein convertase subtilisin/kesin type 9