

蚤状溞(*Daphnia pulex*)热休克蛋白 Hsp90 基因的克隆与表达分析*

陈 苹¹ 邱成功¹ 邹 秀¹ 周健恺¹ 徐善良¹ 王春琳¹
王丹丽¹ 赵云龙²

(1. 宁波大学海洋学院 宁波 315211; 2. 华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

摘要 利用 RACE 技术从蚤状溞(*Daphnia pulex*)中克隆到 Hsp90 基因 cDNA 全长为 2568bp, 开放阅读框为 2155bp, 编码 718 个氨基酸残基, Hsp90 蛋白中存在 GxxGxG、LxxLL 模块(亮氨酸拉链)和 C 末端的 MEEVD 序列。同源性比对结果显示蚤状溞 Hsp90 基因与日本对虾和刀额新对虾的同源性最高为 85%, 与其它甲壳纲物种的同源性保持在 79%及以上。进化分析发现, 蚤状溞 Hsp90 基因与剑水蚤、日本沼虾、红螯相手蟹等甲壳纲的亲缘关系最近。用 Real Time PCR 技术, 检测了 Hsp90 mRNA 在蚤状溞不同生殖状态下的表达水平: Hsp90 mRNA 在两性溞(带冬卵)中的表达量明显高于孤雌溞(带夏卵)($P < 0.05$), 且在冬卵中的表达量最低。推测 Hsp90 可能参与了蚤状溞的生殖转化调控。Hsp90 mRNA 在雄溞中的表达量是孤雌溞的 2.4 倍, 说明 Hsp90 可能参与了精子的形成过程。

关键词 蚤状溞; Hsp90; Real time-PCR; 生殖转化

中图分类号 Q346 doi: 10.11693/hyh20140200063

蚤状溞(*Daphnia pulex*)为一种常见的小型浮游动物, 属节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、鳃足亚纲(Branchiopoda)、枝角亚目(Cladocera)。枝角类营养丰富, 易培养, 繁殖周期短且繁殖量大, 是许多水生动物的优良天然活饵料。枝角类有两种生殖方式, 即孤雌生殖(parthenogenesis)和两性生殖(sexual reproduction)。外界条件适宜时枝角类行孤雌生殖(无性生殖), 当外界环境条件恶化时行两性生殖(有性生殖)。孤雌生殖有助于其种群的迅速发展, 而两性生殖形成的休眠卵(冬卵)能确保其渡过恶劣环境, 以维持种群的存在与延续, 但种群数量会在短期内迅速下降(Jiang *et al.*, 1979)。蚤状溞等枝角类能灵敏准确的判断外界环境的优良, 选择适应的生殖状态, 从而避免种群灭绝的危机。

热休克蛋白(heat shock protein, Hsp)是一类在生物进化过程中高度保守并广泛存在于原核及真核生

物中的蛋白。它是机体在应激情况下细胞内迅速合成的一组蛋白质, 由 Ritassa(1964)在 1962 年首次从果蝇中发现。到了 1974 年, Tissieres 等(1974)发现热休克反应中可以转录合成一组特殊蛋白, 而且伴随着这类蛋白的合成, 细胞的其它蛋白合成却受到抑制, 而且昆虫体内热激蛋白的表达量越高, 其耐热性就越强(Le *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2003)。除了高热之外, 多种应激原如重金属、饥饿、缺氧、缺血等都可以诱导 Hsp 的表达。根据分子重量和同源程度, 热休克蛋白分为 Hsp90s (83—99kDa)、Hsp70s (68—80kDa)、Hsp60s, 以及小 Hsp (25—28kDa) (Lindquist *et al.*, 1988), 其中 Hsp90 家族是较为重要的一族, 目前研究较多(徐明波等, 1991)。Hsp90 是一种 ATP 依赖的伴侣蛋白, 是真核生物中含量最丰富的胞质蛋白。Hsp90 广泛参与细胞的信号转导、激素应答及转录调控过程, 对细胞在生理、病理及应激条件下的生

*国家自然科学基金资助项目, 31172043 号; 浙江省自然科学基金资助项目, LY12C19003 号; 上海市科技创新行动计划项目, 12391900700 号; 宁波市创新团队项目, 2011B81003 号; 宁波大学胡岚优秀博士基金奖励。陈苹, E-mail: chenping19880130@126.com

通讯作者: 王丹丽, E-mail: wangdanli@nbu.edu.cn; 赵云龙, E-mail: ylzhao@bio.ecnu.edu.cn

收稿日期: 2012-10-23, 收修改稿日期: 2013-01-16

存发挥了重要作用。在细胞发生应激反应时, Hsp90 可以和那些由于环境刺激而使自身构象发生改变的蛋白相互作用, 保证蛋白进行适当的折叠并防止蛋白非特异性聚集, 所以 Hsp90 有可能通过环境的改变参与了枝角类的生殖转化调控。罗文等(2012)也推测到一些化学感应基因(CSP)和热激蛋白(HSP)基因在枝角类孤雌生殖中起到非常重要的作用。目前已经有多种甲壳纲动物包括虾(Wu *et al.*, 2008)、龙虾(Chang *et al.*, 1999; Spees *et al.*, 2002; Chang, 2005)、水蚤(Bond *et al.*, 1993; Kotov *et al.*, 2006; Soetaert *et al.*, 2006)、陆生十足类(Gusev *et al.*, 2006)对 Hsp90 基因进行研究, 而且有报道表明 Hsp90 参与甲壳纲的生理发育调控, 如对刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)Hsp90 的研究显示 Hsp90 能调解雌性激素的信号转导, 进而调解卵黄蛋白原的合成(Wu *et al.*, 2008)。对美洲海螯虾(*Homarus americanus*)进行渗透胁迫研究, 发现 Hsp90 mRNA 在腹部肌肉中的表达水平显著增加(Spees *et al.*, 2002); 对大型溞(*Daphnia magna*)的研究显示 Hsp90 是幼体发育的上调基因, 在大型溞的发育中起到积极作用(Soetaert *et al.*, 2006)。但是人们对于蚤状溞 Hsp90 基因知之甚少。本研究以蚤状溞为研究对象, 采用同源克隆和 RACE-PCR 的方法, 克隆了蚤状溞 Hsp90 的 cDNA 全长, 利用 Real-Time PCR 技术分析了 Hsp90 mRNA 在蚤状溞不同生殖状态下的表达水平, 旨在探索枝角类生殖转化的规律和分子机理。

1 材料与方法

1.1 实验材料

试验用蚤状溞由本实验室单克隆培养获得, 体长(3.2 ± 0.8)mm。挑选健康活力强的个体暂养于实验室玻璃培养箱内, 培养温度(25 ± 1)°C, 光周期为 14h 光照和 10h 黑暗。培养于“Banta 粪土培养液”(1.5g 兔子粪 + 2g 干稻草 + 10g 土壤 + 950mL 自来水经煮沸后取上清液), 并交叉投喂小球藻等单细胞藻类, 每天投喂饵料 1 次。雄溞的获得: 培养两周后, 当溞密度达到 3000 只/L 以上时, 缸内溞的生殖方式逐渐转为有性生殖, 雄溞出现。

提取总 RNA 的试剂盒为 Axygen 公司产品。反转录试剂盒(PrimeScript RT Master Mix Perfect Real Time Kit)为 TaKaRa 公司; Realtime-PCR 采用 TaKaRa 公司的 *Premix Ex Taq*TM Hot Start Version 试剂盒, 逆转录酶及其它主要试剂为 TaKaRa 公司产品。

3'RACE、5'RACE PCR 扩增使用 Clontech 公司的 SMARTerTM RACE cDNA Amplification 试剂盒。PCR 的扩增引物由上海桑尼生物公司合成, PCR 产物由上海 Invitrogen 生物公司克隆测序。

1.2 引物设计

从 GenBank 中获得已注册的迷糊酢蚤(*Daphnia ambigua*, ABI35828.1)、山形水蚤(*Daphnia* sp. Yamagata, ABI35815.1)、光滑水蚤(*Daphnia laevis*, ABI35823.1)和纹水蚤(*Daphnia dubia*, ABI35824.1)基因, 根据此序列, 运用 Vector NTI 11.0 软件找到 Hsp90 基因的保守区域, 在保守区域内设计出蚤状溞 Hsp90 基因的兼并引物 Hsp90-F/R, 进行 PCR 扩增, 获得一条长约 250bp 核心的片段, 再根据此部分片段设计 5'RACE 和 3'RACE 特异性引物 HSP-5'RACE 和 HSP-3'RACE 扩增出 DpHsp90 全长 cDNA 序列, 进一步设计出实时荧光定量 PCR 引物 Hsp90-YF 和 Hsp90-YR。基于蚤状溞内参基因 18S(AF014011.1)的 cDNA 序列设计内参基因序列引物 18S-F 和 18S-R, 用 1 对对内参基因引物 18S-F/R 和 1 对特异性引物 Hsp90-YF/YR 来检测蚤状溞不同生殖状态下 Hsp90 mRNA 的表达情况(引物见表 1)。

表 1 试验中用到的引物名称及序列
Tab.1 Oligonucleotide primers used in the experiments

Primer name	Primer sequence (5'—3')
HSP-F	ACCCYAGCAAAGTTGGACAG
HSP-R	AACCAGGTADGCMGAGTAGAA
HSP-5'RACE	CCAGGTAGGGAGAGTAGAAACCCACAC
HSP-3'RACE1	TGTCCCCAACAAGAATGACCGTACC
HSP-3'RACE2	ATCTGGACCCGCAATCCCGATGAC
HSP CDS 验证 F	AAATGGAAGCCGAAGCCGAG
HSP CDS 验证 R	GGGAGCAACGTAATGAAGTGAAG
Hsp90-YF	CGACGATCAAGAGCCCAATAAG
Hsp90-YR	TGAACCCGAAGCAGTTTGTGTG
18S-F	TTCACGGGTTGGTTGCCTG
18S-R	CGACGACCGAATAACAATAGAGC

M=A or C, K= G or T, R=A or G

1.3 蚤状溞总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

采用 RNA 提取试剂盒(RNA Extraction Kit, Axygen)分别提取孤雌幼溞、孤雌溞(带夏卵)、两性溞(带冬卵)、雄溞和休眠卵的总 RNA。用反转录试剂盒(PrimeScript RT Master Mix Perfect Real Time Kit)进行上述 RNA 反转录以得到 cDNA。37°C 反转录 15min, 85°C 5s 灭活反转录酶。合成的 cDNA 产物于

-20°C 保存或直接用于 PCR。

1.4 Hsp90 基因 cDNA 片段的克隆

以蚤状溞两性溞(带冬卵)cDNA 为模板, 采用兼并引物 HSP-F 和 HSP-R 进行 PCR 扩增, PCR 反应体系为 50 μ L, 优化后扩增条件: 94°C 预变性 3min; 94°C 变性 30s, 53°C 退火 30s, 72°C 延伸 1min, 35 个循环; 72°C 延伸 10min; 4°C 保存。PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 送上海 Invitrogen 生物公司克隆测序。

1.5 Hsp90 基因 cDNA 全长序列的获得

测序结果在 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中进行 BlastX 分析比对, 以上实验所得 Hsp90 部分序列与其它物种的 Hsp90 同源, 则根据测得的序列再设计 5'RACE 和 3'RACE 特异性引物 HSP-5'RACE 和 HSP-3'RACE 用于 RACE 扩增。采用 SMARTTM RACE cDNA 试剂盒(Clontech)进行 5'RACE 和 3'RACE 获得全长 cDNA。

1.6 生物信息学分析

用 Protparam 软件 (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) 进行蛋白理化特性预测, 核酸和蛋白序列相似性比较利用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 网站上的 BlastX 工具进行比对分析; 通过 NCBI 的 ORF Finder 进行开放阅读框分析并预测氨基酸序列; SignalP 程序分析信号肽; 采用 Clustal W 软件进行多序列比对分析。用 MEGA5.1 软件中的 N-Jn (neighbor-joining) 构建进化树。用自展法(Bootstrap)进行 1000 次重复检验。

1.7 实时荧光定量 PCR 分析

实验室设置 3 个 10L 玻璃钢, 每只缸接种密度 50 只/L 孤雌溞, 进行充气培养, 其它培养条件一样。当培养密度达到 3000 只/L 以上时进行采样, 从每只缸分别采孤雌幼溞、孤雌溞(带夏卵)、两性溞(带冬卵)、雄溞和休眠卵 5 种样本, 每种样本 3 个平行组。

首先优化模板浓度, 将各类模板稀释成 10、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ μ mol/L 八个浓度梯度, 分别用引物进行扩增, 以确定最佳模板浓度。另外对引物退火温度进行优化, 优化后反应条件如下: 95°C 预变性 30s; 95°C 变性 5s, 57°C 退火 30s, 72°C 30s, 40 个循环。每种生殖状态的样品设 3 次重复。反应结束后确定 Real-time PCR 的扩增曲线和溶解曲线, 数据采集和处理在 ABI StepOnePlusTM Instrument 上进行。

每种生殖状态下溞的样品进行 3 次重复。试验所得数据以平均值(Mean, M) \pm 标准差(Stdeva, SD)表示, 所测数据以 SPSS 14.0 软件进行数据统计分析, 采用

One-Way ANOVA 法进行显著性检验, 并用 Duncan 检验法进行多重比较。本实验根据 Livak 等(2001)的方法进行引物的效率检测, PCR 产物的溶解曲线没有杂峰, 显示产物特异性好。采用 2^{-Ct} 法分析处理 qRT-PCR 结果, Ct 定义为内标 18S Ct 值与目的基因(Hsp90)Ct 值的差值, 以孤雌幼溞对照组的表达量为 1。

2 结果

2.1 蚤状溞 Hsp90 基因 cDNA 全长的克隆

以蚤状溞 cDNA 全长为模版, 用兼并引物进行 PCR 扩增, 获得一条 250bp 片段, 经 Blast X 分析, 显示与已登录的迷糊酢蚤 *D. ambigua* (ABI35828.1)、山形水蚤 *D. sp. Yamagata* (ABI35815.1)、光滑水蚤 *D. laevis* (ABI35823.1) 和纹水蚤 *D. dubia* (ABI35824.1) Hsp90 基因的同源性都达到了 97% 以上, 表明该片段是 Hsp90 基因的一部分。以这段序列设计 5'RACE 和 3'RACE 引物分别进行 5'-RACE 和 3'-RACE, 测序后所得序列通过比对拼接得到了一条 2568bp 的全长蚤状溞 Hsp90 序列(GenBank 登录号: KC845247) (图 1)。为验证序列的可靠性, 重新设计 HSP-CDS-F、HSP-CDS-R 克隆 Dptra 全长序列, 结果与拼接结果一致, 证明完整 cDNA 克隆成功。将该溞 Hsp90 基因的全长 cDNA 序列命名为 *Daphnia pulex* Hsp90 (DpHsp90)。

2.2 蚤状溞 DpHsp90 蛋白序列特征分析

蚤状溞 Hsp90 全长核苷酸序列和推导出的氨基酸序列如图 1 所示, cDNA 全长为 2568bp, 包含了一个 164bp 的 5'-UTR 区域和一个 249bp 的 3'-UTR(非编码区)区域, 其中包括一个终止密码子(TGA)、多聚腺苷酸信号序列(ATTAAA)和 polyA 尾。2155bp 的开放阅读框(ORF)编码了 718 个氨基酸, 含有多个磷酸化位点(Casein kinase II phosphorylation site)和 N-糖基化位点(N-glycosylation site)。结构域分析显示 HSP90 在编码区存在 5 个该蛋白家族的特有的保守信号区: NKEIFLRELISNSSDALDKIR (34—54aa); LGTIKSGT (101—109aa); IGQFGVGFYSPYLVD (125—140aa); IKLYVRRVF (346—354aa); GVVDSLDLP LNISRE (372—386 aa); 一个 GxxGxG 序列, 一个 LxxLL 模块, 同时在 HSP90 羧基末端存在一个保守的 MEEVD 序列(714—718 aa), 这与已知的所有昆虫 HSP90 基因结构一致(Peter *et al*, 1998), 与细胞质 HSP90 羧基末端的保守基序相同。

```

1      GGACTACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGGACAGTCTTCAACC
61     GGGGATTGAGCGAAAGACATCGCATCTCCACACGGGAAAACTCCACGAGACCATACT
121    TGCAAACAATCTTGCTTTTGTAAATATCTTCTAAAGCAAATGCTGGAAGAGTTC
1      M P E E V Q
181    AAATGGAAGCGAAGCCGAGACTTTCGCATTCAGGCCGAGATTGCTCAGCTTATGAGCT
7      M E A E A E T F A F Q A E I A Q L M S L
241    TGATCATCAACACCTTCTACTCAAACAGGAAATCTTTCGCGTGAGTTGATCTCCAAC
27     I I N T F Y S N K E I F L R E L I S N S
301    CCTCAGATGCCCTAGACAAGATCCGTTATGAATCCCTGACTGACCTAGCAAGTTGGACA
47     S D A L D K I R Y E S L T D P S K L D S
361    GCGGAAGGATCTTGAATCAAGATTGTCACCAAGAAATGACCGTACCTTACTCTCA
67     G K D L E I K I V P N K N D R T L T L I
421    TTGATACTGGTATCGGCATGCCAAGGCTGATTGGTTAAACAATTTGGTACTATTGCCA
87     D T G I G M T K A D L V N N L G T I A K
481    AGTCTGGAACATAAGCTTTCATGGAAGCCCTCTCTGCCGGAGCTGACATCTCCATGATTG
107    S G T K A F M E A L S A G A D I S M I G
541    GTCAGTTTGGTGTGGGTTTCTACTCTCCCTACCTGGTTACCGACAAGGTGACAGTTCATT
127    Q F G V G F Y S P Y L V T D K V T V H S
601    CCAAGCACAATGATGATGAGCAGTATGTTGGGAATCGTCAGCTGGTGGTCTTCTACTA
147    K H N D D E Q Y V W E S S A G G S F T I
661    TCAAGCCTGATCATGGAGAACCATGGGTAGAGGAACCAAGATTGCTCCATTGGAAG
167    K P D H G E P M G R G T K I V L H L K E
721    AAGATCAATGGATTACCTAGAGGAGAAGAAAATCAAAGAGGTGTCAAGAAGCACTCAC
187    D Q M D Y L E E K K I K E V V K K H S Q
781    AGTTCAATGGCTACCAATCAAGCTTTTGGTTGAGAAGGAGCGGACAAGGAAGTGAGCG
207    F I G Y P I K L L V E K E R D K E V S D
841    ACGATGAAGCTGAGGAGGAAGAAAAGAAGGACGAGAATGAGGAGAAACCAAGGTCGAAG
227    D E A E E E E K K D E N E E K P K V E D
901    ATGTTGGTGAAGATGAGGAAGCCGACAAGAGGCTGGCAAGAAGAAGAAGAACCATCA
247    V G E D E E A D K E A G K K K K T I K
961    AGGAGAAATACTCTGTGATGAGGAACCTCAACAAGACCAAGCCATCTGGACCCGCAATC
267    E K Y S V D E E L N K T K P I W T R N P
1021   CCGATGACATCAGCCAGGAAGAATACGGAGAGTTCTACAAGTATTGACCAATGACTGGG
287    D D I S Q E E Y G E F Y K S L T N D W E
1081   AGGATCATCTGCCGTCAGCATTCTCTATTGAAGGCCAGCTCGAGTTCCGTGCTCTCC
307    D H L A V K H F S I E G Q L E F R A L L
1141   TCTTCGTCACGCCGCTCTCTTTCGATCTGTTGAGAACCAGCAAGCAGAAGAACCA
327    F V P R R A P F D L F E N R K Q K N H I
1201   TCAAGTTGATAGTCCCGGTGCTTTCATCATGAGCAACTGGCAGGAGCTCATCCCCGAGT
347    K L Y V R R V F I M D N C E E L I P E Y
1261   ACCTCAACTCATGAAGGGAGTCGTCGACTCTGAGGATCTTCTCTCAACATTCTCGTG
367    L N F M K G V V D S E D L P L N I S R E
1321   AAATGCTCCAGAAAACAAGATCTGAAGTCAATCGCAAGAACTGGTCAAGAAATGCA
387    M L Q Q N K I L K V I R K N L V K K C M
1381   TGGAACCTTCGAGGAGTTGGCTGAGGACAAGGAACTTAAAGAAGTTACGAACAAT
407    E L F E E L A E D K E N F K K F Y E Q F
1441   TCAGAAGAAGTGAAGTTGGGAGTCCATGAAGATTCTACCAACCGCAAGAAGATCGCTG
427    S K N L K L G V H E D S T N R K K I A D
1501   ACCTCATCCGTTACCACACTCCGCTTCTGGAGAAGATCAGGTTTCTTCAAGGAATAG
447    L I R Y H T S A S G E D Q V S F K E Y V
1561   TTTCTCGATGAAGGAGAACCAGAAGCACATCTACTACATACCGGTGAGAACAGAGATC
467    S R M K E N Q K H I Y Y I T G E N R D Q
1621   AAGTCAGCAACTCCTCCTCGTCGAGCGTGTCAAGAAGCGCGGATTGGAGGTGATCTTCA
487    V S N S S F V E R V K K R G L E V I F M
1681   TGACTGAGCCATGATGAGTACGTCGTCAGCAACTCAAGGAATACGATGGCAAGCAGC
507    T E P I D E Y V V Q Q L K E Y D G K Q L
1741   TCGTCTCAGTCACCAAGGAGGCTGGAACCTCCCGAAGATGATGAAGAAACCAAGAAAC
527    V S V T K E G L E L P E D D E E T K K R
1801   GCGAGAGCGACAAGGCTAAATTCGAGGCTCTTGCAAAATCATGAAGGATATCTTGACA
547    E S D K A K F E G L C K I M K D I L D K
1861   AGAAAGTCGAGAAGTTGTTGTTTCCAAACCGTCTGGTCGAGTCTCCCTGCTGTATCGTCA
567    K V E K V V V S N R L V E S P C C I V T
1921   CCTCCAGTACGGCTGGACAGCCAACATGGAGCGTATCATGAAGGCTCAGGCATTGAGGG
587    S Q Y G W T A N M E R I M K A Q A L R D
1981   ATACCTCCACCATGGGTTACATGGCCGCCAAGAAGCACTTGGAAATCAACCCCGACCATC
607    T S T M G Y M A A K K H L E I N P D H P
2041   CCATCATCGAAGCCCTGCGGTCAAAGCCGAGGCTGACAAGAACGACAAAGCCGTCAAGG
627    I I E A L R V K A E A D K N D K A V K D
2101   ATTTGGTCATGTTGCTGTTGAAACCTCTCTGCTGTCATCTGGTTTCCCTGGAAGAGC
647    L V M L L F E T S L L S S G F S L E E P
2161   CAGCCGTCATGCTTCTCGCATCTACCGCATGATCAAATTTGGGTTTGGGCATCGATGAAG
667    A V H A S R I Y R M I K L G L G I D E D
2221   ATGATGTCCTGCTGGTGGTGAAGAAAGCCAAAGCCGAAGAAGAGATGCCGCCGTTGGAGA
687    D V P A G G E E A K A E E E M P P L E N
2281   ATGACGAAGAAGATGCTTCTCGCATGGAGGAGTCGATTTAAACGCTGCAATTCCTGTTAT
707    D E E D A S R M E E V D
2341   TAAACACAAAACCTCAGTTTCTCAATTGTTCTTAATTCAGCGTTTTTGGCAACTGGAAT
2401   GAGGGCATTATGTAAGTCTTTTATGTTCTTAAATCATGGCTTCACTTCATTA
2461   CGTTGCTCCCTCATTCTGGTATTGTAATACTACGTGCTAAGTTGGAATTCAATACAA
2521   CCAATCGCGGTTTGCTATGTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 蚤状溞 Hsp90 基因的 cDNA 全长及推断氨基酸

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *D. pulex* Hsp90 cDNA
方框分别表示起始密码子(ATG)、终止密码子(TAA)和多聚腺苷酸信号序列(ATTAATA)。浅灰色阴影表示 Hsp90 的 5 个信号序列, 加粗下划线表示 GxxGxG、LxxLL 和 MEEVD 序列

2.3 蚤状溞 Hsp90 结构分析

DNAMAN 预测的 Hsp90 蛋白的等电点是 5.01, 相对分子质量为 82552.61。Hsp90 蛋白含有一个

HATPase_c 结构域(残基 36—149 位)、一个 Hsp90 蛋白结构域(残基 190—718 位)和一个 Mg²⁺结合位点(残基 45 位-天冬酰胺)(图 2)。

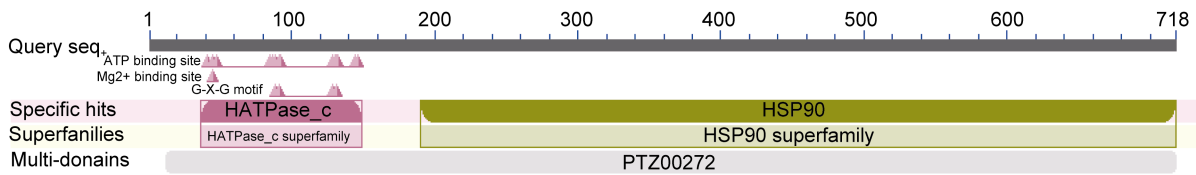


图 2 蚤状溞 Hsp90 蛋白结构域示意图

Fig.2 Hsp90 protein structure domain of *D. pulex*

2.4 蚤状溞 Hsp90 氨基酸序列同源性分析

利用 ClustalW 对蚤状溞 Hsp90 和 NCBI 中其它甲壳纲动物(共 14 种)Hsp90 的多序列比对见图 3。分析表明: 这些比对的序列之间的同源性较高。蚤状溞 Hsp90 与日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)和刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)的同源性最高为 85%, 与其它 11 个种类: 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、矮小拟镖剑水蚤(*Paracyclops nana*)、拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)、真宽水蚤(*Eurytemora affinis*)、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)、剑水蚤(*Tigriopus japonicus*)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)、红螯相手蟹(*Chiromantes haematocheir*)的同源性都在 79%以上。

利用 MEGA5.1 软件对 NCBI 中部分节肢动物的 Hsp90 基因序列进行了分子系统学分析, 在构建系统发生树的基础上研究了蚤状溞和其它种类 Hsp90 蛋白之间的进化关系(见图 4)。从进化树中, 可以看出蚤状溞 Hsp90 首先与剑水蚤(*T. japonicus*)、日本沼虾(*M. nipponense*)、红螯相手蟹(*C. haematocheir*)、拟穴青蟹(*S. paramamosain*)、中华绒螯蟹(*E. sinensis*)等甲壳纲聚为一类, 然后再与蛛形纲的肩突硬蜱(*Ixodes scapularis*)、龙骨三色蜆(*Opisthophthalmus carinatus*)聚为一亚群。昆虫纲的印度跳蚤(*Harpegnathos saltator*)、刺袖小蜂(*Quadrastichus erythrinae*)、褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)、白背飞虱(*Sogatella furcifera*)、中华稻蝗(*Oxya chinensis*)、豆荚草盲蝽(*Lygus hesperus*)等聚为另一亚群。

2.5 Hsp90 mRNA 在蚤状溞各生殖状态下的表达差异

Hsp90 基因在孤雌幼溞、孤雌溞(带夏卵)、两性溞(带冬卵)、雄溞和休眠卵(冬卵)中的表达差异如图 5

所示。从图 5 中可以看出: Hsp90 mRNA 在雄溞体中表达量最高, 其次为两性溞(带冬卵), 孤雌溞(带夏卵)次之, 在休眠卵中的表达量最低。Hsp90 mRNA 在两性溞(带冬卵)和雄溞中的表达量显著高于孤雌溞(带夏卵)和孤雌幼溞($P < 0.05$)。

3 讨论

Hsp90 蛋白家族是一类在生物进化过程中高度保守并广泛存在的分子伴侣, 在非应激和正常生理状态下占细胞蛋白总量的 1%—2%, 其具体功能尚未明确, 它能够识别并调节胞内基质的活性并在环境胁迫时发挥功能。为进一步了解 HSP90 基因特点, 本文获得蚤状溞 HSP90 cDNA 的完整序列, 2155bp 的开放阅读框(ORF)编码了 718 个氨基酸, 在蚤状溞基因组中定位于 scaffold_173:115844—118680 (GenBank accession: GL732695.1), 编码 718 氨基酸。通过氨基酸序列比对, 作者发现蚤状溞 Hsp90 与已知的甲壳纲具有共同的序列特征, 包含 HSP90 家族的 5 个特征信号序列(NKEIFLRELISNSSDALDKIR、IGQFGVGFYSAFLVAD、LGTIKSGT、IKLYVRRVFI 和 GVVDSEDLPLNISRE)(见图 1), 有研究表明, 植物、动物和真菌的 HSP90 家族中均存在这 5 条特征序列(Gupta, 1995), 大多数生物的这些 5 条特征序列几乎完全相同(Farcy *et al*, 2007; Li *et al*, 2009), 仅有少数生物存在个别氨基酸差异(Brunt *et al*, 2004)。这些信号特征可被 HOP (HSP70 and HSP90 organizing protein)的 TPR (Tetra-tricopeptide repeat)区段识别, 进而与热休克蛋白 70 构成分子伴侣复合体(Chen *et al*, 2005)。在同源性比对结果中还发现 GxxGxG、LxxLL 模块。GxxGxG 模块是 Hsp90 与 ATP 结合的结构基础(Prodromou *et al*, 1997), 它的存在对 Hsp90 功能的正常发挥具有重要作用; LxxLL 模块在 Hsp90

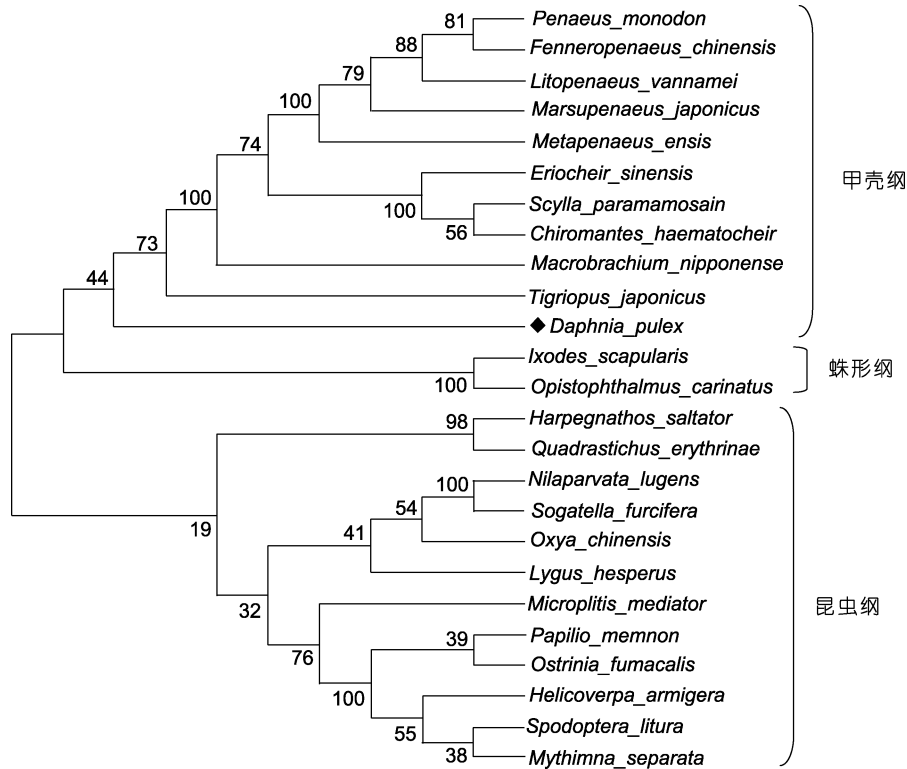


图 4 Hsp90 基因的进化树分析图
 Fig.4 Phylogenetic tree connecting the Hsp90 genes

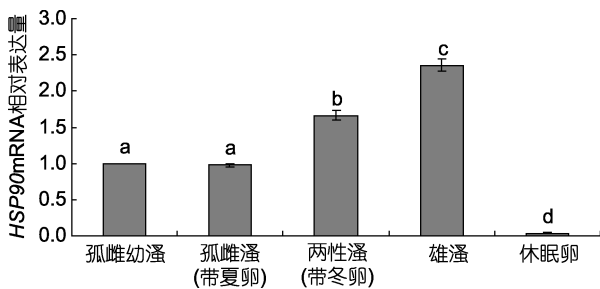


图 5 Hsp90 mRNA 在不同生殖状态下的表达水平
 Fig.5 The level of Hsp90 mRNA transcription of different reproductive modes

功能调控、基因转录方面发挥着重要的作用(Michael *et al*, 2005); 其 C 末端的 MEEVD 序列说明此 Hsp90 存在于细胞质中, 为胞质蛋白(Pelham, 1989; Gupta, 1995)。这些功能结构都存在于保守区(图 3), 与翟会芳等(2010)报道的甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)、张道伟等(2012)报道的白背飞虱(*Sogatella furcifera*)的 Hsp90 的功能保守结构一致。结构分析说明蚤状蚤 Hsp90 与其它物种 Hsp90 基因具有相似的功能。另外根据是否含有丰富的谷氨酰胺片段, Hsp90 可分为 Hsp90 和 Hsp90 (Hickey *et al*, 1989)。蚤状蚤 HSP90 不含有 Hsp90 所特有的磷酸化位点序列

TQTQDQ (Picard, 2002), 因此可以判定本文克隆的是 Hsp90 基因。

从系统发育树中, 作者发现节肢动物 Hsp90 明显分为两大类群, 甲壳纲和蛛形纲聚为一亚群, 昆虫纲聚为另一亚群, 说明节肢动物甲壳纲和蛛形纲的亲缘关系比较近。蚤状蚤 Hsp90 与剑水蚤、日本沼虾、红螯相手蟹等甲壳纲的亲缘关系最近; 其次与蛛形纲的肩突硬蜱、龙骨三色蜆相关联; 与印度跳蚁、刺桫桫小蜂、褐飞虱等昆虫纲动物在分子进化上距离相对较远。

为了验证 Hsp90 与枝角类的生殖转化是否有相关性, 本论文用 Real Time PCR 的方法检测了 Hsp90 mRNA 在蚤状蚤不同生殖状态下的表达水平。结果显示 Hsp90 在孤雌幼蚤和孤雌蚤中的表达量并无显著性差异, 这一结果说明 Hsp90 的表达与性成熟不相关。Hsp90 mRNA 在雄蚤中的表达量最高, 其次是两性蚤(带冬卵), 且在冬卵中的表达量最低。在相同环境条件下 Hsp90 mRNA 在雄蚤和两性蚤(带冬卵)中的表达量明显高于孤雌蚤(带夏卵), 这说明 Hsp90 可能与两性蚤(带冬卵)和雄蚤的形成有关, 两性蚤(带冬卵)和雄蚤是在高密度等环境恶化的条件下产生的,

高密度的应激条件诱导了 Hsp90 的表达, 保护两性溞和雄溞在环境胁迫条件下的发育生长, 从而也提高雄溞和两性溞(带冬卵)抵抗环境中由高密度引起的低溶氧、低 pH 和食物稀少的能力。关于大型溞 Hsp90 也有研究报道, 在环境压力条件下, Hsp90 在胚胎发育过程中起到积极作用, Hsp90 在环境压力条件下有保护胚胎细胞的作用(Sass *et al*, 1997; Feder *et al*, 1999; Lewis *et al*, 1999; Soetaert *et al*, 2006)。Hsp90 在蚤状溞冬卵中的表达量最低, 可能是因为冬卵处于休眠状态中, 新陈代谢非常缓慢(几乎停滞), 故 mRNA 的表达水平也低于其它四种生殖状态。本实验还发现, Hsp90 mRNA 在两性溞和雄溞中的表达也有显著差异($P < 0.05$), 在雄溞中的表达量明显高于两性溞, 这说明 Hsp90 可能参与了精子的形成过程。王枫(1997)也报道了 Hsp90 在草鱼的睾丸和脑中表达量最高。同样 Huang 等(1999)报道, 在精子冷冻的过程中, Hsp90 的含量急剧下降, 从而导致了精子活力下降; 另外 Huang 等(2000)也发现, 把 GA(一种 Hsp90 蛋白的特异性抑制剂)加入到精子稀释液中, 会导致精子活力下降。张莹(2011)也发现 Hsp90 与精子活力、顶体完整率和精子畸形率均有一定相关性。Fatima(2013)明确提出 Hsp90 能为精子的形成过程提供动力。以上研究表明 Hsp90 基因有可能在调控生殖转化上发挥作用。至于 Hsp90 基因在蚤状溞中的具体作用及其作用机理等问题, 作者将会通过 RNA 干扰、相关功能基因过量表达以及免疫组化技术等, 进行更深入的研究。

参 考 文 献

- 王 枫, 1997. 热休克蛋白与热耐力研究进展. 国外医学: 卫生学分册, 24(2): 65—67
- 张 莹, 2011. 热应激蛋白表达与种公牛精液品质相关性的研究. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 27—62
- 张道伟, 陈 静, 郭玉双, 2012. 白背飞虱 Hsp90 全长 cDNA 的克隆与特性分析. 黑龙江农业科学, 6: 13—18
- 罗 文, 曾文涛, 王东方等, 2012. 镉诱导隆线溞(*Daphnia carinata*)生殖转化基因差减 cDNA 文库的构建与分析. 海洋与湖沼, 43(4): 857—862
- 徐明波, 程素琦, 1991. 热休克蛋白 hsp90 家族研究进展. 国外医学: 分子生物学分册, 13(12): 70—73
- 翟会芳, 江幸福, 罗礼智, 2010. 甜菜夜蛾 Hsp90 基因克隆及高温胁迫下其表达量的变化. 昆虫学报, (001): 20—28
- Bond J A, Gonzalez C R M, Bradley B P, 1993. Age-dependent expression of proteins in the cladoceran *Daphnia magna* under normal and heat-stress conditions. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 106(4): 913—917
- Brunt S A, Silver J C, 2004. Molecular cloning and characterization of two different cDNAs encoding the molecular chaperone Hsp90 in the oomycete *Achlya ambisexualis*. Fungal Genetics and Biology, 41(2): 239—252
- Chang E S, 2005. Stressed-out lobsters: crustacean hyperglycemic hormone and stress proteins. Integrative and Comparative Biology, 45: 43—50
- Chang E S, Chang S A, Keller R *et al*, 1999. Quantification of stress in lobsters: crustacean hyperglycemic hormone, stress proteins, and gene expression. American Zoologist, 39: 487—495
- Chen B, Piel W H, Gui L *et al*, 2005. The HSP90 family of genes in the human genome: Insights into their divergence and evolution. Genomics, 86(6): 627—637
- Farcy E, Serpentine A, Fievet B *et al*, 2007. Identification of cDNAs encoding HSP70 and HSP90 in the abalone *Haliotis tuberculata*: Transcriptional induction in response to thermal stress in hemocyte primary culture. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 146(4): 540—550
- Fatima R, 2013. The molecular chaperone Hsp90 is required for actin dynamics during sperm individualization in *Drosophila*. American Journal of Molecular and Cellular Biology, 1: 27—51
- Feder M E, Hofmann G E, 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annual Review of Physiology, 61: 243—282
- Gupta R S, 1995. Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. Molecular Biology and Evolution, 12(6): 1063—1073
- Gusev O, Ziegler T A, Saigusa M, 2006. Expression and Structure of Stress Chaperon HSP90 in Terrestrial Decapods, Coenobita (Anomura: Coenobitidae) and Chiromantes (Brachyura: Sesarmidae). In: Asakura A, Lemaitre R, Tudge C C *et al* ed. Biology of Anomura II. Crust Res, 6: 103—113
- Hickey E, Brandon S E, Smale G *et al*, 1989. Sequence and regulation of a gene encoding a human 89-kilodalton heat shock protein. Molecular and Cellular Biology, 9(6): 2615—2626
- Huang S Y, Kuo Y H, Lee W C *et al*, 1999. Substantial decrease of heat-shock protein 90 precedes the decline of sperm motility during cooling of boar spermatozoa. Theriogenology, 51(5): 1007—1016
- Huang S Y, Kuo Y H, Tsou H L *et al*, 2000. The decline of porcine sperm motility by geldanamycin, a specific inhibitor of heat-shock protein 90 (Hsp90). Theriogenology, 53(5): 1177—1184
- Jiang X Z, Du N S, 1979. China Fauna. Arthropoda. Crustaceans. Freshwater Cladocerans. Science Press, 2: 11—35
- Kotov A A, Ishida S, Taylor D J, 2006. A new species in the *Daphnia curvirostris* (Crustacea: Cladocera) complex from the eastern Palearctic with molecular phylogenetic evidence for the independent origin of neckteeth. Journal of Plankton

- Research, 28: 1067—1079
- Le B E, Valenti P, Lucchetta P *et al*, 2001. Effects of mild heat shocks at young age on aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology*, 2: 155—164
- Lewis S, Handy R D, Coedi B *et al*, 1999. Stress proteins (HSP's): methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology*, 8(5): 351—368
- Li F H, Luan W, Zhang C S, Wang B *et al*, 2009. Cloning of cytoplasmic heat shock protein 90 (FcHSP90) from *Fenneropenaeus chinensis* and its expression response to heat shock and hypoxia. *Cell Stress and Chaperones*, 14(2): 161—172
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the 2^{-CT} methods. *Methods*, 25: 402—408
- Murphy C T, Mccarroll S A, Barmann C I *et al*, 2003. Genes that act downstream of DAF216 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 424: 277—283
- Pelham H R B, 1989. Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Annual Review of Cell Biology*, 5(1): 1—23
- Peter C, Tamas S, Csaba S, 1998. The 90-kDa molecular chaperone family: Structure, function and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacology Therapeutics*, 79(2): 129—168
- Picard D, 2002. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(10): 1640—1648
- Prodromou C, Roe S M, O'Brien R *et al*, 1997. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell*, 90: 65—75
- Ritassa F M, 1964. Experimental activation of specific puttloci in polytene chromosomes of *Drosophila*. *Experimental Cell Research*, 35: 601—607
- Sass J B, Krone P H, 1997. HSP90a gene expression may be a conserved feature of vertebrate somitogenesis. *Experimental Cell Research*, 233: 391—394
- Soetaert A, Moens L N, Van der Ven K *et al*, 2006. Molecular impact of propiconazole on *Daphnia magna* using a reproduction-related cDNA array. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 142(1): 66—76
- Spees J L, Chang S A, Mykles D L *et al*, 2002. Osmotic induction of stressresponsive gene expression in the lobster *Homarus americanus*. *The Biological Bulletin*, 203: 331—337
- Tisseres A, Mitchell A K, 1974. Some new proteins induced by temperature shock in *Drosophila*. *Journal of Molecular Biology*, 84: 389—398
- Wu L T, Chu K H, 2008. Characterization of heat shock protein 90 in the shrimp *Metapenaeus ensis*: evidence for its role in the regulation of vitellogenin synthesis. *Molecular Reproduction and Development*, 75: 952—959

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF A Hsp90 GENE IN *DAPHNIA PULEX*

CHEN Ping¹, QIU Cheng-Gong¹, ZOU Xiu¹, ZHOU Jian-Kai¹, XU Shan-Liang¹,
WANG Chun-Lin¹, WANG Dan-Li¹, ZHAO Yun-Long²

(1. School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract The full-length cDNA of a Hsp90 gene (DpHsp90) was cloned from cladoceran *Daphnia pulex* using rapid amplification of complementary DNA ends (RACE) method. The DpHsp90 cDNA is 2568bp in length; and it has a 2155-bp open reading frame that encodes a 718-amino-acid polypeptide containing GxxGxG, LxxLL module (leucine zipper) and C-terminal MEEVD sequence. In addition, DpHsp90 shared homology of up to 85% with *Marsupenaeus japonicus* and *Metapenaeus ensis*, and 79% with other crustacean species. Phylogenetic analysis revealed that DpHsp90 protein has a close genetic relationship with crustacea such as *Tigriopus japonicus*, *Macrobrachium nipponense*, *Chiromantes haematocheir* and so on. Results of qPCR (Real-time Quantitative PCR) show that the DpHsp90 expression was significantly higher ($P < 0.05$) in ephippial female (with winter eggs) than in parthenogenetic female (with summer eggs), and was the lowest in the resting egg. Therefore, Hsp90 was closely related to the reproduction conversion of *Daphnia pulex*. Meanwhile, Hsp90 mRNA expression in male was about 2.4 times higher than the parthenogenetic ones, indicating that Hsp90 may have been involved in the formation of sperm.

Key words *Daphnia pulex*; Hsp90; Real time-PCR; reproduction switching