

太平洋真宽水蚤(*Eurytemora pacifica*)热休克蛋白 70(HSP70)基因克隆及在金属胁迫下的表达分析*

李 彬 景 斐 武敏敏 张建设

(浙江海洋大学海洋科学与技术学院 国家海洋设施养殖工程技术研究中心 舟山 316022)

摘要 热休克蛋白 70(HSP70)是生物体内一种重要的机体与细胞保护性蛋白。本文利用 RT-PCR 以及 RACE 技术首次克隆获得太平洋真宽水蚤(*Eurytemora pacifica*)HSP70 简称 Ep.HSP70 cDNA 的全长序列, 序列全长为 2252bp (KY807149), 开放阅读框(ORF)长 1947bp, 编码 649 个氨基酸, 5'端 99bp, 3'端 206bp; 预测蛋白分子量为 70.81kDa, 等电点为 5.16, 为一种亲水性蛋白, 不存在信号肽及跨膜区, 含有丰富的 α 螺旋结构(37.60%), β 折叠(18.80%)。同源氨基酸序列比对发现, 与其他甲壳动物的同源基因保守性较高, 尤其是 HSP70 家族典型的结构位点序列在甲壳类动物中具有高度保守性。系统进化分析表明, 太平洋真宽水蚤和安氏伪镖水蚤(*Pseudodiaptomus annandalei*)进化关系最近, 桡足类种内同源性要高于虾蟹类, 与虾类同源性高于蟹类。荧光定量数据分析表明, 不同浓度铜、镉、锌胁迫下太平洋真宽水蚤 HSP70 基因表达水平具有显著的时间效应与浓度效应的特征, 三种金属对 Ep.HSP70 抑制效应呈现 Cu>Cd>Zn 的趋势。Ep.HSP70 基因的成功克隆及金属胁迫下的表达分析为深入研究 HSP70 蛋白生物学功能具有重要意义。

关键词 太平洋真宽水蚤; 热休克蛋白 70; 基因克隆; 金属胁迫; 表达分析

中图分类号 Q789; Q955 **doi:** 10.11693/hyhz20170400100

热休克蛋白又称热激蛋白, 在生物体内按照其分子量的大小基本上分成小分子的 HSP、HSP60、HSP70、HSP90 以及 HSP100 几种(陈曦, 2011)。其中 HSP70 基因(Mayer *et al*, 2005; Shu *et al*, 2011)在其结构上具有高度的保守性, 这种特殊的结构为其在启动转录之后能够快速产生成熟的 mRNA, 以便 HSP70 快速大量表达。HSP70 作为非特异性的细胞保护蛋白, 主要负责细胞内蛋白质的折叠, 多肽的合成, 保证蛋白质按照通路进行, 通过以 ATP 形式与未折叠疏水区相结合从而稳定蛋白未折叠下的稳定状态, 并通过有控制的释放帮助其折叠。目前来看, HSP70 功能的研究主要包括在参与细胞耐热和细胞保护、分子伴侣、抗细胞凋亡与抗氧化、以及肿瘤免疫几个方面。研究表明 HSP70 在机体面临氧化损伤时可以通过促

使机体内源性抗氧化剂的合成与释放增加, 从而使之具有抗氧化的活性, 并且其结合物可以激活蛋白激酶 C 来增强蛋白酶的活性, 从而起到促进 ATF 水解生成超氧化物歧化酶来使细胞抵御氧化伤害(陈兰英等, 2004; 任宝波等, 2005)。目前对 HSP70 已经相继在多种甲壳类动物中克隆, 同时 HSP70 基因在甲壳类动物面临不同环境胁迫下的表达也有了少量报道(Kim *et al*, 2014; Petkeviciute *et al*, 2015), 但桡足类 HSP70 基因克隆以及在重金属胁迫中的研究相对不足。

随着海洋环境污染监测要求的提高, 海洋生物标志物的研究逐渐兴盛开来, 有研究表明 HSP70 可以作为海洋环境监测与预警的有效生物标志物(Mayer *et al*, 2005; Dakappagari *et al*, 2010)。太平洋真

* 海洋科学浙江省重中之重学科开放课题资助, 20140104 号; 国家海洋局公益性行业科研专项, 201505025 号。李 彬, 硕士研究生, E-mail: 13957206952@163.com

通讯作者: 张建设, 副教授, E-mail: zhangjianshe@zjou.edu.cn

收稿日期: 2017-04-23, 收修改稿日期: 2017-05-22

宽水蚤作为我国近海海洋浮游生物的重要组成部分,在我国海洋生态环境监测与防控以及维持近海海洋生态系统平衡中发挥着举足轻重的作用,而目前对太平洋真宽水蚤 HSP70 基因的克隆与重金属胁迫下的表达研究尚未见报道。本研究以太平洋真宽水蚤为实验材料,通过 RACE 方法获得 HSP70 基因序列,利用生物学信息方法,鉴定太平洋真宽水蚤热休克蛋白 70 基因,从分子水平解析 Ep.HSP70 基因的基本结构和金属胁迫下表达特征。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用太平洋真宽水蚤采集自浙江省舟山市长峙岛附近海域,体长为 1.20—1.40mm,经解剖镜下筛选纯化,实验室暂养 7 天后取样实验,暂养条件:水温(20±0.5)℃,海水盐度 28,光暗周期 12h:12h,24 小时充氧,饵料为海水小球藻。实验时,选取子代中外观形态与附肢完整,生命活性强的健康的太平洋真宽水蚤的成体为实验对象;实验样品处理后,由液氮速冻后,置于-80℃保存。克隆材料为对照组太平

洋真宽水蚤,qRT-PCR 的实验材料为不同金属胁迫处理后的太平洋真宽水蚤的总 RNA,每个实验组下个体重复 3 次。

1.2 试剂

OMEGA Total RNA Kit II 购自美国 Omega 公司;PrimeScriptTMII 1st Strand cDNA Synthesis Kit 购自 TaKaRa 公司;3'-Full RACE Core Set with PrimeScriptTM RTases 试剂盒、pMDTM18-T Vector Cloning Kit 等购自 TaKaRa 公司;其它试剂均为国产分析纯试剂。实验引物由上海华大生物科技合成。

1.3 RACE 获得目的基因全长序列

根据已知桡足类 HSP70 全长序列设计简并引物获得太平洋真宽水蚤 Ep.HSP70 基因的中间片段,再采用 RACE 技术,设计 HSP70 基因特异性引物进行 5'cDNA 和 3'cDNA 末端的克隆。5'RACE 和 3'RACE 的操作按照 TaKaRa 的 RACE 试剂盒说明书进行,将获得的片段经分离纯化后链接到 pMD18-T 载体上,然后转化到 DH5 α 感受态细胞中,挑选阳性克隆送往上海美吉生物技术有限公司测序。实验所用引物见表 1。

表 1 本研究中普通 PCR 以及 RACE 所用引物
Tab.1 Primers used for the PCR and RACE in this study

基因	引物	引物序列(5'—3')	扩增长度(bp)	作用
HSP70	DP-HSP70.F	CTTAYGGGTTSGACAAGAA	496	Degenerated primer
	DP-HSP70.R	ATCTTGGGGATRCGRGTGG		
	5GSP1	TGTTCCCTTGATGTCTTCTTG	228	5'RACE
	5GSP2	TTGATGTCCTTCTTGTGCTTCCT	220	
	3GSP1	CAACGAGTTCAAGAGGAAGCACA	312	3'RACE
	3GSP2	AGAAGGACATCAAGGGGAACAAG	289	
	AP	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGG		Adaptor primer

1.4 太平洋真宽水蚤 Ep.HSP70 序列分析

用 DNAMAN 8.0 软件将测序结果进行拼接,得到太平洋真宽水蚤 HSP70 基因的全长 cDNA 序列。编码区及非编码区的预测利用 NCBI 在线网站 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfing.cgi>)来预测。分子量和等电点在 Expasy 网站(http://web.expasy.org/compute_pi/)进行分析,使用 SignalP 4.1 Server 网址为与 TMHMM Server v.2.0 分别对其进行信号肽以及跨膜区的预测;使用 Swissport 在线软件对 HSP70 基因的蛋白质结构进行预测分析 <http://swissmodel.expasy.org/>;用 SMS 在线序列处理工具包对 Ep.HSP70 基因氨基酸序列与其他物种进行同源性多

重比对,使用 MEGA6.0 以邻位相连法(Neighbor-joining)构建系统进化树。

1.5 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)表达分析

利用 Prime primer 5.0 软件在 HSP70 基因编码区范围内设计荧光定量 PCR 所需的特异性引物,内参引物为 18S rRNA,见表 2。实验所用引物由上海华大生物公司合成,采用 PAGE 纯化方式。样品经过三种重金属铜、镉、锌半致死浓度 LC₅₀(马桢红等,1999),以及 1/2LC₅₀、1/4LC₅₀、1/8LC₅₀ 以及 1/16LC₅₀ 暴露处理,提取总 RNA 后反转录得到 cDNA 模板进行荧光定量 PCR。目的基因与内参基因设置 3 个技术重复与 3 个实验重复。实验数据以未金属胁迫组太平洋真

表 2 研究中荧光定量 PCR 所用引物
Tab.2 Primers used for the qRT-PCR in this study

引物	引物序列(5'—3')	扩增长度(bp)	作用
HSP70 qRT-PCR F	CGTTGGCGGCAAACCTAA	155	qRT-PCR primer
HSP70 qRT-PCR R	CGGGAACAGTGACCACAGCA		
18S rRNA F	TGCATGGCCGTTCTTAGTTG	209	qRT-PCR control primer
18S rRNA R	TCAATTCAGTGTAGCGCGTG		

宽水蚤为对照, 排除每 3 个重复中差异较大的数据, 其余数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法(Livak *et al.*, 2001)进行 HSP70 基因相对表达分析, 数据分析采用 SPSS 22.0 进行单因素方差分析(张苏江等, 2003)以及显著性差异分析, 当 $P < 0.05$ 时为显著差异。

2 结果与分析

2.1 太平洋真宽水蚤 Ep.HSP70 全长的获得

以太平洋真宽水蚤 RNA 反转录后 cDNA 为模版, 以 DP-HSP70.F/R 为引物扩增获得 492bp 目的片段, 根据该终极那序列设计 RACE 引物, 采用 RACE 方法获得 HSP70 基因 863bp 的 5'端序列以及 1425bp 的 3'端序列(图 1)。

2.2 太平洋真宽水蚤 Ep.HSP70 cDNA 全长的序列特征

利用 DNAMAN 8.0 软件将扩增得到的长度分别为 492bp 的核心片段以及 863bp 的 3'RACE 和 1425bp 的 5'RACE 序列片段进行拼接, 得到太平洋真宽水蚤

Ep.HSP70 基因的 cDNA 序列全长(KY807149)为 2252bp, ORF 长 1947bp, 编码 649 个氨基酸(aa), 5'UTR 与 3'UTR 分别由 99bp、206bp 的核苷酸组成, 具有典型的 polyA 尾巴以及 AATAAA 加尾信号(图 2)。

2.3 太平洋真宽水蚤 Ep.HSP70 氨基酸序列比对以及同源性分析

使用在线分析软件 SMS 多重序列同源性比对, 将 Ep.HSP70 基因编码的氨基酸序列与目前已经公布的部分甲壳类的 HSP70 基因进行比对(图 3), 并通过 DNAMAN8.0 软件对所有序列与太平洋真宽水蚤 HSP70 蛋白序列之间的同源相似性进行计算(表 3)。结果显示, 太平洋真宽水蚤(*Eurytemora pacifica*)与安氏伪镖水蚤(*Pseudodiaptomus annandalei*)相似度最高为 92.14%, 与其他水蚤如日本虎斑猛水蚤(*Tigriopus japonicus*)相似度为 88.37%, 与矮小拟镖水蚤(*Paracyclops nana*)为 85.67%等, 表明 Ep.HSP70 基因为属于 HSP70 家族基因成员。

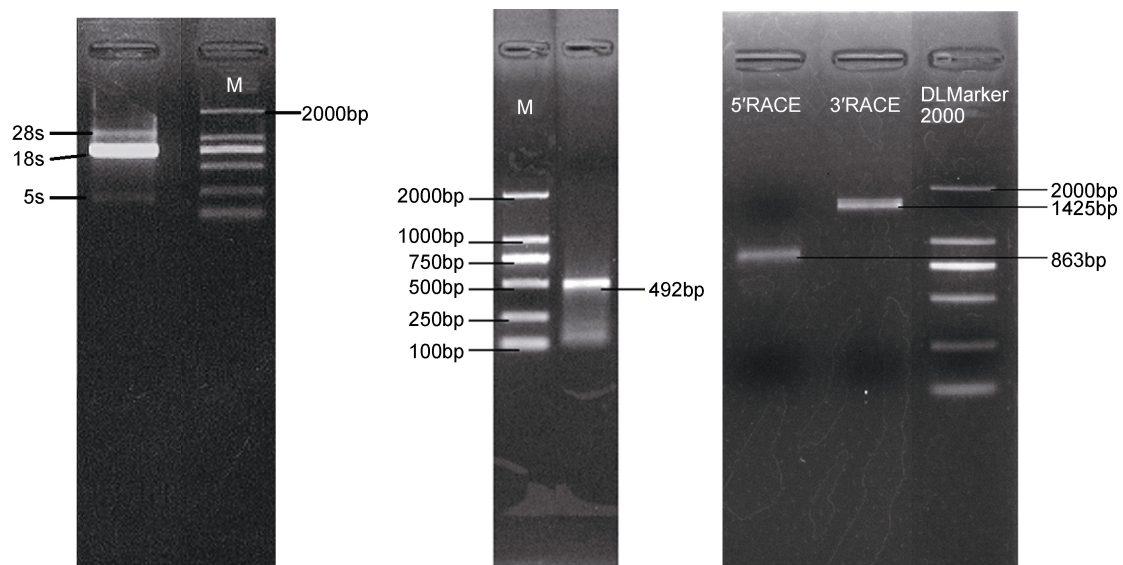


图 1 RNA、Ep.HSP70 核心片段以及 5'/3'RACE 电泳图片

Fig.1 The electrophoresis image of RNA, core sequences, and 5'/3'RACE of Ep.HSP70

```

1      GCGCGGGCCCGCTTCCATATCACGTGATCTCTACACAATCATCCTTCTTTTAGCAACTTCCATCCCGTACACAGCTC
79     TCGTAAACCTATCCAGCAAAATATGCGCAAGAAAGTCGCCGTAGGAATTGATCTTGGAAACCACTACTCTGCGTTGGA
1      M A K K V A V G I D L G T T Y S C V G
                                     HSP70 family signature 1
157    GTTTTCAGCACGGAAGGTTGAGATCATTGCCAATGATCAGGTAACCGAACAACCCCATCTTATGTCGCTTTTACC
20     V F Q H G K V E I I A N D Q G N R T T P S Y V A F T
235    GACACTGAGCGTCTCATCGAGACCCAGCCAAGAACCAGGTCGCCATCAACCCAGCAACACCATTTTCGACGCGAAG
46     D T E R L I G D P A K N Q V A I N P S N T I F D A K
313    CGTCTGATTGGTCGCGATTTTACCAGCGCCACCGTCAGAGCGACATGAAGCACTGGCCCTTCGATGTTATCAGCGTT
72     Q L I G R D F T D A T V Q S D M K H W P F D V I S V
391    GCGCGCAAACTAAGCTTGAAGTGAATAACAAGAAGAGACGTTTACCCCGAGGAGGTCTCCAGCATGGTTC
98     G G K P K L E V E Y K N E K K T F T P E E V S S M V
469    CTGACCAAGATGAAGGAGACCGCCGAGGCGCTACTTGGGTACCGACGTCAGGATGCTGTGGTCACTGTTCCCGCATAC
124    L T K M K E T A E A Y L G T D V K D A V V T V P A Y
                                     ATP-GTP binding site
547    TTCAACGACTCCAGAGACAGGCTACCAAGGATGCCGAGTTATCTCTGGGTGAACGTGCTCCGTATCATCAACGAA
150    F N D S Q R Q A T K D A G V I S G L N V L I N E
625    CCCACGCGCGCTGCCATCGCTACGGTCTGGACAAAAGAAGGCGCAGCGAGTGCAACGTCTCTATTTTCGATCTC
176    P T A A A I A Y G L D K K K G A A E C N V L I F D L
703    GCGGTTGGAACCTTCGACGTGCCATCTCACCATTGAGGAGGGAATCTTCGAAGTTAAGTCCACGCGCGAGACACC
202    G G G T F D V S I L T I E E G I F E V K S T A G D T
                                     HSP70 family signature 2
781    CATTTGGGAGGAGGACTTCGACAACAGAATGGTCGACCACTTCGTCAACGAGTTCAGAGGAAGCACAAGAAGGAC
228    H L G G E D F D N R M V D H F V N E F K R K H K K D
859    ATCAAGGGGAACAAGAGGGCGCTGAGGCGTCTGCGTACCGCCTGCGAGAGGGCGAAGCGTACCCTCTCTGCCAGTGGC
254    I K G N K R A L R R L R T A C E R A K R T L S A S A
                                     Bitartite nuclear localization signal
937    CAGGCCAACATTGAGATTGATCTCTCTCTCGAGGGAATTGATTCTACACCTCCATCACCAGGGCCAGGTTCCGAGGAG
280    Q A N I E I D S L F E G I D F Y T S I T R A R F E E
1015   CTCTGCTCAGACCTGTTCAAGGGCCACCTCGAGCCCGTCGAGAAGGCCATGAGGGATGCCAAGATGGACAAGCTCTCC
306    L C S D L F K G T L E P V E K A M R D A K M D K S S
1093   ATCAACGACATCGTCCTTGTGGGAGGATCTACCAGGATCCCAAGATCCAGAAGCTCCTCCAGGACTTCTTCAACGGC
332    I N D I V L V G G S T R I P K I Q K L L Q D F F N G
                                     HSP70 family signature 3
1171   AAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGATGAGGCGCTCGCTTACGGAGCAGCCGTCAGGCGCTATCCTCACCAGG
358    K E L N K S I N P D E A V A Y G A A V Q A A I L T G
1249   GACACCTCCGAGGCGCTCTCGACCTCTGCTTCTTGACGTCGCTCCCTGTCCCTCGGTATCGAGACCGCGGTGGC
384    D T S E A V S D L L L D V A P L S L G I E T A G G
1327   GTTATGACCTCCCTGATCAAGAGGAACACCACCATCCCCACCAAGCAGACCCAGACCTTCAACCACTACTCCGACAAC
410    V M T S L I K R N T T I P T K Q T Q T F T T Y S D N
1405   CAGCCCGCGCTCACCATCCAGGTGTACGAGGAGAGAGGGCCATGACCAAGGACAACCATCTCTGGGTAAAGTTCGAT
436    Q P A V T I Q V Y E G E R A M T K D N H L G K F D
1483   CTGACCGGAATCCCCCTGCACCCAGGGAGTGCCCCAGATCGAGGTACCTTCGACATTGATGCCAACGGTATCCTG
462    L T G I P P A P R G V P Q I E V T F D I D A N G I L
1561   AACGTGTCCGCTGCGACAAGTCCACCGAAGCAACAAGATCACTATCACCAACGATAAGGGCCGCTCTGTCCAAAG
488    N V S A C D K S T G K Q N K I T I T N D K G R L S K
1639   GAGGAGATCGAGCGCATGGTCAACGACGCGGAGAAAGTTCAGGCGAGATGACGAGAAGCAGAAGGAGAGGATCTCCGCC
514    E E I E R M V N D A E K F K A D D E K Q K E R I S A
1717   AAGAACGGACTCGAGTCTACTGCTTCAACATGAAGACCACCTCGAGGACGAGAAGTGAAGGACAAGATCATGAG
540    K N G L E S Y C F N M K T T I E D E K M K D K I T E
1795   GAGGACGGAAGAAGATCAACGACAAGTCCGAGGAGGCGATCAAGTGGCTGGATGCCAACGAGCTCGCTGAGGTTGAG
566    E D R K K I N D K C E E A I K W L D A N Q L A E V E
1873   GAGTTCACTGCTCAGCAGAAGGAGGTTGAGGTTGTTGCAACCAATCATACCAAGCTCTACCAAGGAGCCGGTGGT
592    E F T A Q Q K E V E G V C N P I I T K L Y Q G A G G
1951   ATGCCAGGAGGTATGCCCGATATGGGAGGTATGGGAGGTGCGCGCCGACGCTCCATCAAGCGAGGAGGTGCCCGACCT
618    M P G G M P D M G G M G G A A D A P S S A G G A G P
2029   ACCATCGAGGAGGTGCACTAACCACATGGAAGTCTATCAACTACGACGGGAAACTAACGGCATTCTTTTTCCAA
644    T I E E V D *
2107   AATTCAACTTGTCAACTTTAACCTTTATTAGAAAATTCAATAAAGTATAGCAAGATCATATGTGTATAATTAATGTTT
2185   TGTTAGCTAGGGTTAGAACGGATGATCTGACTATAAATCGGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图2 Ep.HSP70 cDNA 序列及编码氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of Ep.HSP70

注: 预测的开放阅读框中起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)用黑色线框标示出, HSP70 家族结构特征用下划线标注, “*”表示终止密码子

使用 MEGA 6.0 软件构建 NJ 系统进化树, 计算方法采用 Bootstrap 法(陈红等, 1997)重复计算 1000 次。NJ 系统进化树中所用物种名及 GenBank 的登录号等相关信息在表 4 列出。结果如图 4 所示, 太平洋真宽水蚤 HSP70 基因与安氏伪镖水蚤(*P. annandalei*)位于同一进化枝, 氨基酸序列相似度最高, 表明亲缘关系最近; 总体上, 桡足类(Copepods)与虾类

(Shrimps)系统进化发育树聚为一簇, 与蟹类的进化关系较远。

2.4 太平洋真宽水蚤 Ep.HSP70 基因的生物信息学分析

分析结果如下: 太平洋真宽水蚤 Ep.HSP70 基因编码蛋白包括 341 个亲水性氨基酸和 305 个疏水性氨基酸, 氨基酸疏水性最大为 2.64, 最小为-3.88, 平均

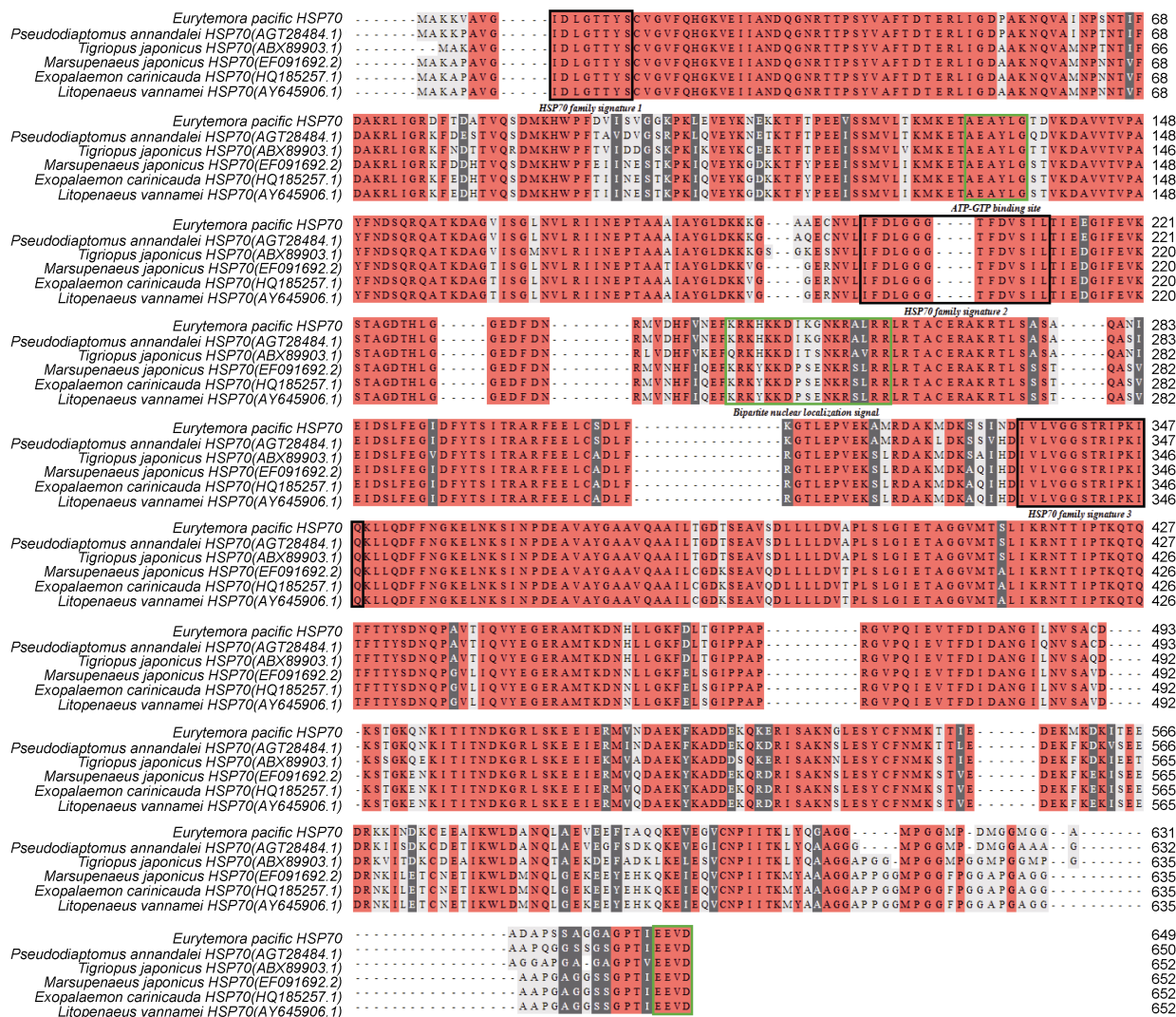


图 3 Ep.HSP70 基因氨基酸序列多重比对

Fig.3 Multiple sequence alignment of the deduced amino acid sequence of Ep.HSP70 gene

表 3 用于序列分析的 HSP70 家族基因

Tab.3 HSP70 family neuropeptide for sequence analysis

序列名称	GenBank 登录号	来源物种	同源性
太平洋真宽水蚤 HSP70	KY807149	<i>Eurytemora pacifica</i>	
安氏伪镖水蚤 HSP70	AGT28484.1	<i>Pseudodiaptomus annandalei</i>	92.14%
日本虎斑猛水蚤 HSP70	ABX89903.1	<i>Tigriopus japonicus</i>	88.37%
矮小拟镖水蚤 HSP70	ADV59560.1	<i>Paracyclopina nana</i>	85.67%
大型蚤 HSP70B	KZS19529.1	<i>Daphnia magna</i>	83.59%
晶磷虾 HSP70B	AIR72266.1	<i>Euphausia crystallorophias</i>	83.95%
北极磷虾 HSP70B	AQL57186.1	<i>Thysanoessa inermis</i>	85.34%
南极磷虾 HSP70B	AIR72271.1	<i>Euphausia superba</i>	83.93%
美洲螯龙虾 HSP70	ABA02165.1	<i>Homarus americanus</i>	84.26%
日本对虾 HSP70	ABK76338.1	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	83.80%
斑节对虾 HSP70	AAQ05768.1	<i>Penaeus monodon</i>	83.95%
凡纳滨对虾 HSP70	AAT46566.1	<i>Litopenaeus vannamei</i>	83.95%
脊尾白虾 HSP70	ADN78256.1	<i>Palaemon carinicauda</i>	83.95%
普通黄道蟹 HSP70	CAL68995.1	<i>Cancer pagurus</i>	79.06%
锯缘青蟹 HSP70	CAL68992.1	<i>Xantho incisus</i>	78.16%
泥蟹 HSP70	CAL68987.1	<i>Bythograea thermydron</i>	77.74%

表 4 *Ep.HSP70* 蛋白酶切位点分析表
Tab.4 The Restriction Sites analysis of *Ep.HSP70*

内切酶	酶切位点数
Arg-Cproteinase	25
Asp-N endopeptidase	50
Asp-Nendopeptidase+N-terminalGlu	100
BNPS-Skatole	2
CNBr	16
Caspase1	1
Chymotrypsin-highspecificity (C-termto[FYW], notbeforeP)	38
Chymotrypsin-lowspecificity (C-termto[FYWML], notbeforeP)	98
Clostripain	25
Enterokinase	2
Formicacid	50
Glutamylendopeptidase	50
Hydroxylamine	3
Iodosobenzoicacid	2
LysC	58
LysN	58
NTCB(2-nitro-5-thiocyanobenzoicacid)	8
Pepsin (pH1.3)	98
Pepsin (pH>2)	116
Proline-endopeptidase[*]	1
ProteinaseK	326
StaphylococcalpeptidaseI	42
Thermolysin	172
Trypsin	82

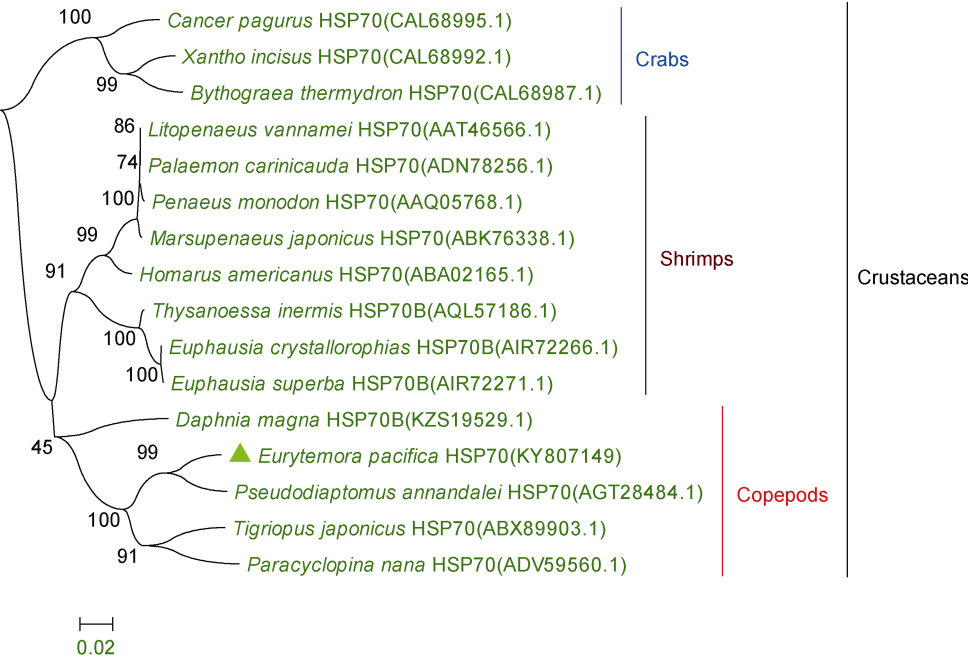


图 4 *Ep.HSP70* 的 NJ 系统进化树
Fig.4 Neighbor-Joining phylogenetic tree analysis of *Ep.HSP70*

亲水系数(GRAVY)-0.407, 亲水性氨基酸多于疏水性氨基酸, 为亲水性蛋白(图 5); 此外, 蛋白的消光系数为 $29380 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 脂肪系数 79.83, 带负电残基总数(Asp+Glu)为 100, 带正电残基总数(Arg+Lys)为 83。Compute pI/Mw 结果显示其等电点/理论蛋白分子质量(pI/Mw)为 5.16/70812.197; Peptide cutter 进行蛋白酶切位点分析结果如表 4 所示。SignalP 4.1 Server 对 HSP70

蛋白信号肽预测无信号肽结构(图 6), TMHMM 蛋白质跨膜区域预测结果显示该蛋白无跨膜区(图 7)。GOR 方法对蛋白二级结构分析显示该蛋白由 α -螺旋 23.74%, 延伸链 23.02%, 无规则卷曲 53.24%组成(图 8)。Swiss model 蛋白的 3D 立体结构分析结果如图 9 所示, 该蛋白具有明显的 11 个 α -螺旋以及 6 个 β -折叠结构组成(b、c、d), C 末端(MET1)以及 N 末端(GLU555)。

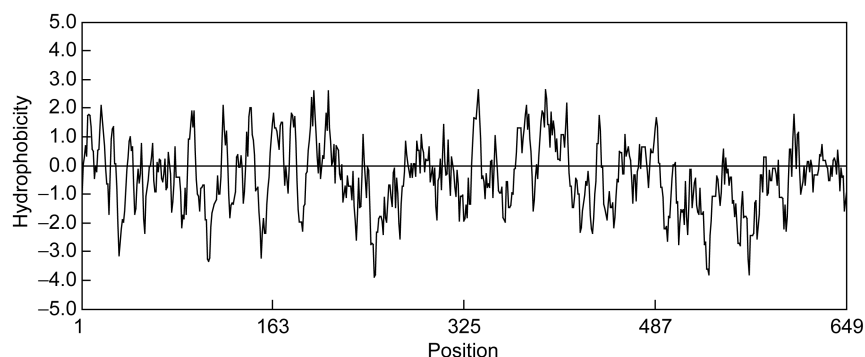


图 5 Ep.HSP70 氨基酸疏水性分析

Fig.5 Hydrophobic amino acid analysis of Ep.HSP70

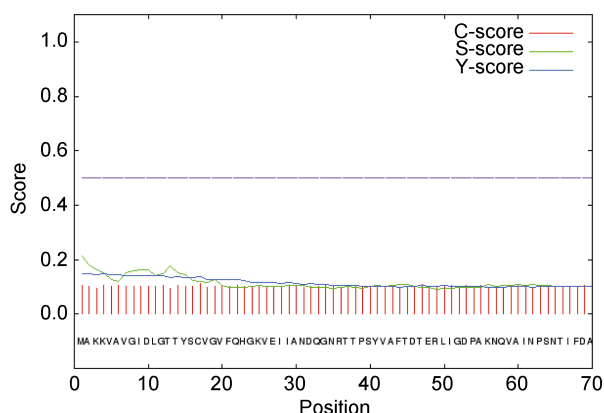


图 6 Ep.HSP70 信号肽预测结果

Fig.6 The signal peptide prediction of Ep.HSP70

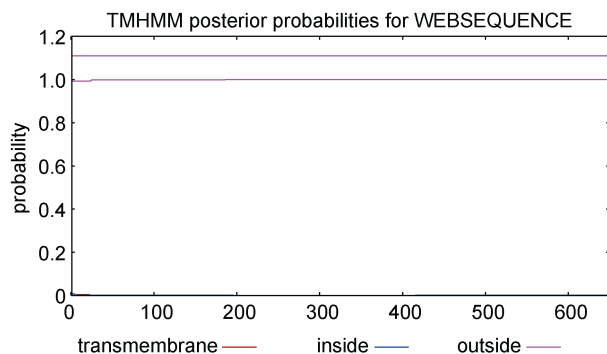


图 7 Ep.HSP70 氨基酸序列跨膜区预测结果

Fig.7 Transmembrane region analysis of Ep.HSP70 amino acid sequence

Swiss-PdbViewer4.0.4 蛋白功能位点模式(prosite patterns)分析显示存在 10 个蛋白翻译后修饰位点, PS00001N 糖基化位点 N-{P}-[ST]-{P}, PS00004 环磷酸鸟苷-环磷酸腺苷蛋白激酶 [RK](2)-x-[ST], PS00005 蛋白激酶 c 磷酸化位点 [ST]-x-[RK], PS00006 磷酸化位点 [ST]-x(2)-[DE], PS00007 酪氨酸激酶磷酸化位点 [RK]-x(2,3)-[DE]-x(2,3)-Y, PS00008 酰基化位点 G-{EDRKHPFYW}-x(2)-[STAGCN]-{P}, PS00342 微体 c 端靶信号 [STAGCN]-[RKH]-[LI VMAFY], 以及热休克蛋白 HSP70 家族信号 PS00297 [IV]-D-L-G-T-[ST]-x-[SC], PS00329 [LIVMF]-[LIVMFY]-[DN]-[LIVMFS]-G-[GSH]-[GS]-[AST]-x(3)-[ST]-[LIVM]-[LIVMFC], PS01036 [LIVMY]-x-[LIVMF]-x-G-G-x-[ST]-x-[LIVM]-P-x-[LIVM]-x-[DEQKRSTA]。蛋白结构域分析显示该蛋白具有 HSP70 家族结构特征: 9—16 位氨基酸 IDLGTTYS, 198—211 位氨基酸 IFDLGGGTF DVSIL, 335—349 位氨基酸 IVLVGGSTRIPKIQ, 131—136 位氨基酸处 AEAYLG 的 ATP/GTP 机构域, 247—275 位氨基酸处核信号位点序列 KRKHKKDI KGNKRA LRRLRTACERAKRTL, 646—649 位氨基酸处 HSP70 羧基末端保守区域 EEVD(图 2)。

2.5 太平洋真水蚤 Ep.HSP70 基因在重金属胁迫下的表达分析

通过 real time PCR 方法对 Ep.HSP70 基因在重金属铜镉锌胁迫下的表达情况进行检测, 以太平洋真

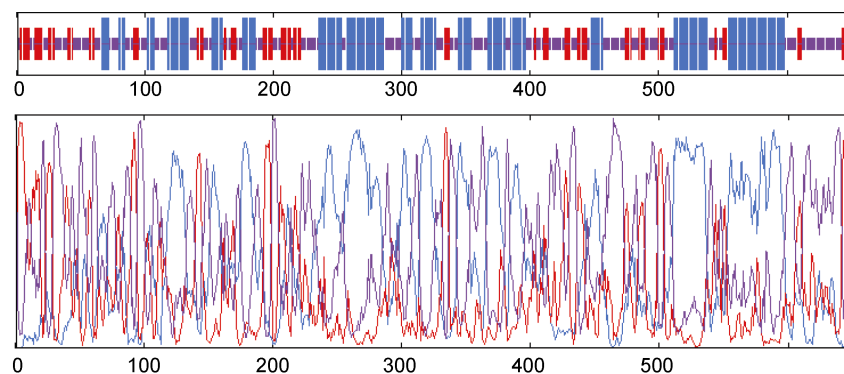


图 8 Ep.HSP70 蛋白质二级结构

Fig.8 Secondary structure model of Ep.HSP70

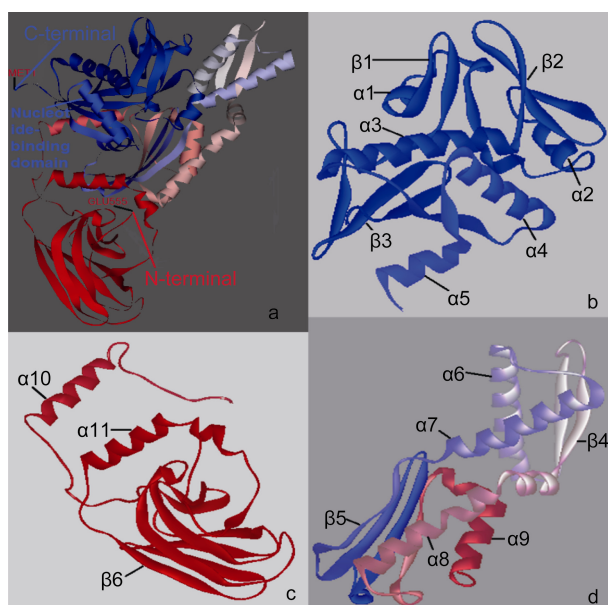


图 9 Ep.HSP70 蛋白质三级结构预测图

Fig.9 The 3-dimensional structures of Ep.HSP70 domain predicted by Cn3D-4.1

宽水蚤 18S rRNA 基因作为内参基因, 选取正常组下太平洋真宽水蚤的表达量作为参照, 每个处理下做了 3 个重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对表达量, 并用 SPSS 22.0 软件进行显著性分析。实验结果表明, Ep.HSP70 基因在三种重金属胁迫下均有表达, 但不同时间段以及不同浓度下的表达量高低有所不同(图 10, 图 11, 图 12), 24、48、96h 铜胁迫各浓度下, 48、120h 镉胁迫以及锌胁迫各时间具有显著差异 ($P<0.05$)。

分析结果如下: Ep.HSP70 基因 mRNA 表达水平铜胁迫下 24、48h 低量表达, 72h 上升至 96h 各浓度下达到峰值, 随后降低(图 10); 镉胁迫下, 与实验对照组相比, 24h 各浓度低量表达, 48h 的 1/16、1/8 及

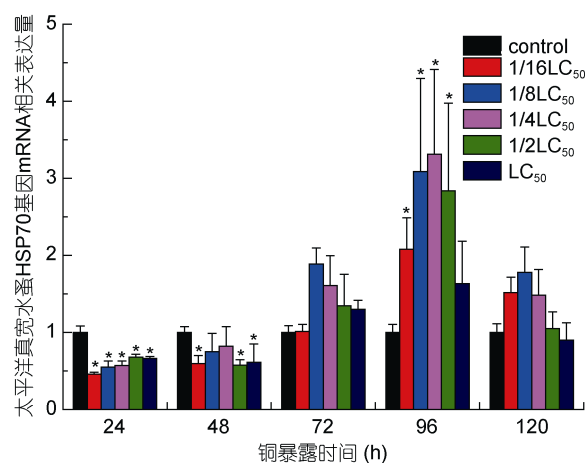


图 10 铜暴露下 Ep.HSP70 mRNA 表达量水平

Fig.10 The mRNA expression levels of Ep.HSP70 under Cu exposure

注: 星号表示差异显著 ($P<0.05$, $n=3$)

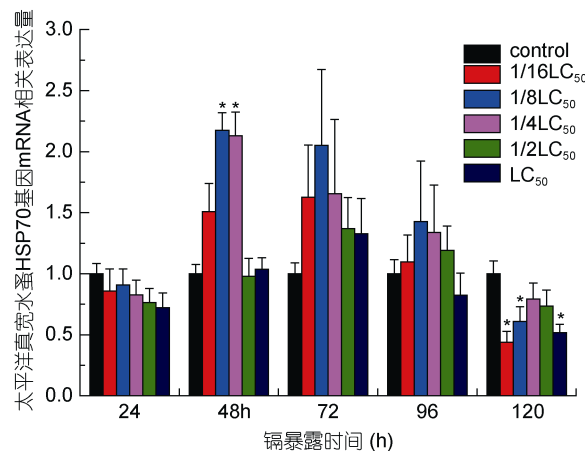


图 11 镉暴露下 Ep.HSP70 mRNA 表达量水平

Fig.11 The mRNA expression levels of Ep.HSP70 under Cd exposure

注: 星号表示差异显著 ($P<0.05$, $n=3$)

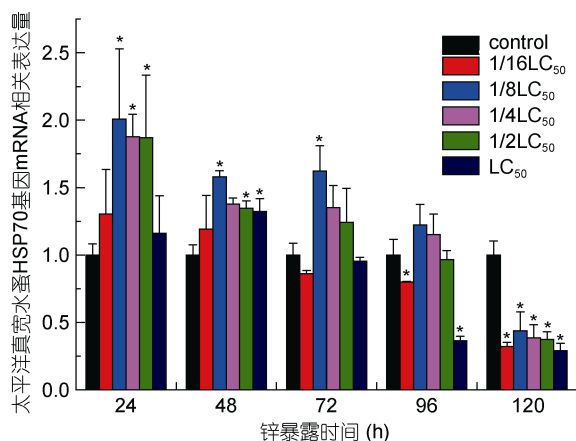


图 12 锌暴露下 Ep.HSP70 mRNA 表达量水平

Fig. 12 The mRNA expression levels of Ep.HSP70 under Zn exposure

注: 星号表示差异显著 ($P < 0.05$, $n = 3$)

1/4LC₅₀ 低浓度表达量峰值, 72h 的 1/2LC₅₀ 与 LC₅₀ 高浓度达到峰值(图 11)。锌胁迫下, 除半致死浓度 LC₅₀ 在 48h 表达量到达峰值外, 各浓度下基因表达量在 24h 达到峰值, 随后基因总体表达呈现下降趋势(图 12)。Ep.HSP70 基因在三种金属胁迫下表达结果表明: 铜对 HSP70 表达的抑制作用要明显的高于镉与锌; 金属胁迫下 Ep.HSP70 基因在低浓度下的表达量高于高浓度下的表达量, 高浓度组金属胁迫对基因的表达抑制性较强, 表明重金属离子对 Ep.HSP70 表达水平的抑制率高浓度高于低浓度; 金属胁迫下, 浓度效应与时间效应趋势明显。

3 讨论

HSP70 热休克蛋白是生物体保留下来的可用于对抗外界损害并能够进行自我保护的重要机制之一, 在应激的不利条件下, 提高细胞的抵抗力, 起到应激保护作用。克隆得到的 2252bp 的 Ep.HSP70 cDNA 序列, 氨基酸分析发现无跨膜结构与信号肽, 因此不属于细胞内分泌的蛋白, 但能有效促进细胞内分泌蛋白的表达, 充当分子伴侣参与相关功能免疫以及蛋白折叠表达。此外, 氨基酸序列中存在多个磷酸化的位点, 在细胞信号转导中起重要作用。保守结构域分析表明 Ep.HSP70 及其同源蛋白结构中均具有 HSP70 家族基因的保守签名序列以及结构特征, 包括 HSPA1-2_6-8-like_NBD 结构域以及 DNAK 结构域, ATP/GTP 结合位点, 核定位信号等, 其中核定位信号结构域富含赖氨酸和精氨酸, 为选择性的转运 HSP70s 进入核中而发挥其功能。其亲疏水性、等电

位点、信号肽预测、蛋白二级以及三维结构分析结果与其他相关 HSP70 研究结果相似(吴圣楠等, 2017)。螺旋结构的复杂性与多重折叠也说明了 HSP70 基因功能的多样性, 在参与细胞耐热和细胞保护、分子伴侣、抗细胞凋亡与抗氧化、以及肿瘤免疫几个方面发挥着重要作用(张静, 2007)。同源性分析表明 HSP70 作为生物体内相对保守的一类蛋白在各物种内广泛存在, 其与桡足类、虾蟹类等甲壳类中具有较高的相似性, 为 HSP70s 家族成员。系统进化显示整个 HSP70 系统发育树 Ep.HSP70 基因与十足目虾蟹类的 HSP70 分为两个大支, 三个小支。两大支中 MEGA 6.0 将虾类(Shrimps)与桡足类(Copepods)或分到一个大支, 将蟹类(Crabs)单独到一个分支, 从外观形态以及游泳形式来看虾类与桡足类的相似性较近一些, 而分子序列同源性上也相对较近(表 4)。

荧光定量 PCR 法(Heid *et al.*, 1996)对 Ep.HSP70 基因在金属胁迫下表达特异性分析发现, Ep.HSP70 基因的表达在不同的金属暴露下表达不同; 同种金属胁迫下, Ep.HSP70 表达量具有一定的时间效应与浓度效应表达模式。铜胁迫下, Ep.HSP70 表达在 96h 内成递增表达趋势, 并 96h 表达量达到峰值, 120h 表达量下降。其中在 24h 表达差异性显著($P < 0.05$)低于对照组的表达水平, 这可能是源于太平洋真宽水蚤初期机体受到重金属的暴露性损伤而导致机体内相关的蛋白功能受到抑制, 热休克蛋白无法短时间内高量表达所造成的(Jiang *et al.*, 2016), 镉暴露中表达规律几近一致; 锌暴露下 Ep.HSP70 基因在 24h 高量表达(Shu *et al.*, 2011)。这种差异性的与三种金属的生理毒性相关, 本实验前期半致死以及产卵孵化变化中结果显示的毒性强弱: Cu>Cd>Zn 具有一致性。而随后的表达量逐渐上升, 说明了在经受了一定时间的暴露后, Ep.HSP70 蛋白开始发挥其功能且表达量递增并在一定时间段内达到表达的最高值(Jiang *et al.*, 2016), 但由于海洋生物对不同重金属的耐受性不同以及海洋污染重金属生物毒性的大小也存在差异(Rhee *et al.*, 2009), 因此在本实验研究中, 铜离子对 Ep.HSP70 的抑制胁迫作用要强于镉离子与锌离子。此外, Ep.HSP70 最高表达量峰值出现在 1/8LC₅₀ 浓度下 Ep.HSP70 表达量从浓度 1/8LC₅₀ 开始降低, 在低浓度实验组中(即浓度低于 1/8LC₅₀ 时)表达量水平呈现上升态势; 在较高浓度实验组中, Ep.HSP70 表达量变化趋势呈现出随着浓度升高表达量逐渐降低的特点。因此推断, 在重金属暴露下 Ep.HSP70 表达量特点为:

在一定的浓度范围内, 重金属污染浓度越高, 应激和免疫相关基因的表达越高。然而, 当表达量在达到一定的表达峰值之后, 其基因的表达量不仅不会随着浓度升高不断上升, 反而会呈现下降趋势(Kim *et al.*, 2014)。HSP70 表达水平的上下波动变化反映了生物有机体提高自身对外来环境胁迫阈值与自我保护的机制需要, 也表明 HSP70 在抵御外界环境胁迫与机体调控中起着重要作用。此外, 鉴于生物体内 HSP70 对海洋重金属污染的敏感性与抗逆性, HSP70 被用作一种较为稳定而方便的海洋水环境监测的分子标志物(蔡中华等, 2012), 在海洋水体污染的监测与前期预防发挥重要作用。因此, 研究浮游桡足类太平洋真宽水蚤体内 HSP70 在海洋环境重金属暴露中的表达特征, 为海洋污染对浮游生物的总体影响提供较为准确的预测与判断, 为 HSP70 作为海洋污染监测的生物标志物理论提供支撑。

4 结论

本研究通过 RACE 技术首次克隆获得太平洋真宽水蚤 HSP70 基因全长 cDNA 序列, 并对其序列生物学特征进行了分析与探讨, 采用荧光定量 RT-PCR 技术检测了重金属胁迫下 HSP70 基因在太平洋真宽水蚤体内的差异表达, 研究结果为进一步探讨太平洋真宽水蚤 HSP70 蛋白相关功能性研究和 HSP70 家族其他基因的克隆奠定了基础, 为其他桡足类 HSP70 基因的研究及系统演化与分类系统提供借鉴; 同时为 HSP70 作为海洋水体污染监测与防控的有效生物标志物以及桡足类在海洋污染指示生物中的研究价值与研究意义等提供借鉴。

参 考 文 献

马桢红, 马良才, 1999. 生物测定中 LC₅₀ 或 LD₅₀ 的 Excell 运算方法. 医学动物防制, 15(11): 612—614
任宝波, 王玉艳, 王纯净等, 2005. HSP70 家族的分类及基因结构与功能. 动物医学进展, 26(1): 98—101
吴圣楠, 隗黎丽, 李海军等, 2017. 三角帆蚌热休克蛋白 70 基因克隆及其表达分析. 水生生物学报, 41(1): 50—55
张 静, 2007. 铅诱导热应激蛋白 70 基因表达的研究. 天津:

天津医科大学硕士学位论文
张苏江, 陈庆波, 2003. 数据统计分析软件 SPSS 的应用 (四)——广义因素方差分析 (GLM-General Factorial ANOVA). 畜牧与兽医, 35(8): 24—26
陈 红, 吴汇川, 1997. Bootstrap 方法及其应用. 青岛大学学报, 12(3): 78—83
陈 曦, 2011. 热休克蛋白及热休克蛋白 70 家族进化保守性的系统分析. 大连: 辽宁师范大学硕士学位论文
陈兰英, 朱泮民, 李冰冰等, 2004. HSP70 的结构、特性和功能研究进展. 平顶山工学院学报, 13(2): 41—43
蔡中华, 陈艳萍, 周 进等, 2012. 生物标志物(Biomarkers)在海洋环境监测中的研究与进展. 生命科学, 24(9): 1035—1048
Dakappagari N, Neely L, Tangri S *et al.*, 2010. An investigation into the potential use of serum Hsp70 as a novel tumour biomarker for Hsp90 inhibitors. Biomarkers, 15(1): 31—38
Heid C A, Stevens J, Livak K J *et al.*, 1996. Real time quantitative PCR. Genome Research, 6(10): 986—994
Jiang X Y, Guan X T, Yao L L *et al.*, 2016. Effects of single and joint subacute exposure of copper and cadmium on heat shock proteins in common carp (*Cyprinus carpio*). Biological Trace Element Research, 169(2): 374—381
Kim B M, Rhee J S, Jeong C B *et al.*, 2014. Heavy metals induce oxidative stress and trigger oxidative stress-mediated heat shock protein (*hsp*) modulation in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 166: 65—74
Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. Methods, 25(4): 402—408
Mayer M P, Bukau B, 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. Cellular and Molecular Life Sciences, 62(6): 670—684
Petkeviciute E, Kania P W, Skovgaard A, 2015. Genetic responses of the marine copepod *Acartia tonsa* (Dana) to heat shock and epibiont infestation. Aquaculture Reports, 2: 10—16
Rhee J S, Raisuddin S, Lee K W *et al.*, 2009. Heat shock protein (*Hsp*) gene responses of the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* to environmental toxicants. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 149(1): 104—112
Shu Y H, Du Y, Wang J W, 2011. Molecular characterization and expression patterns of *Spodoptera litura* heat shock protein 70/90, and their response to zinc stress. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 158(1): 102—110

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF HEAT SHOCK PROTEIN 70 GENE IN *EURYTEMORA PACIFICA* UNDER METAL STRESS

LI Bin, JING Fei, WU Min-Min, ZHANG Jian-She

(Marine Science College of Zhejiang Ocean University, National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Zhoushan 316022, China)

Abstract Heat shock protein 70 (HSP70) is an important protective protein in organism and cells. The full length sequences cDNA of HSP70 in *Eurytemora pacifica* (short named Ep.HSP70) was cloned for the first time using the RT-PCR and RACE techniques. The sequence length is 2252bp, the GenBank accession number is KY807149; the open reading frame (ORF) is 1947bp encoding 649 amino acids, the 5'terminal 99bp and the 3' terminal 206bp. The predicted protein molecular weight is 70.81kDa, isoelectric point is 5.16, and it is a hydrophilic protein with no signal peptide and transmembrane domain. In addition, it is rich in alpha helical structure (37.60%) and beta fold (18.80%). Multiple homologous amino acid sequence alignment showed high conservatism between Ep.HSP70 and others HSP70 of crustaceans; especially, the conserved signature sequences of HSP70 family are highly conserved in crustaceans. Phylogenetic analysis showed that the evolutionary relationships between *E. pacifica* and *Pseudodiaptomus annandalei* is the nearest than others, and the intraspecific homology of copepods is higher than shrimp and crab. Moreover, the homology with shrimps is higher than crabs. Fluorescent quantitative PCR showed that the expression level of Ep.HSP70 had significant time effect and concentration effect under different concentrations stresses of Cu, Cd and Zn. The order of inhibition effect of the three metals on Ep.HSP70 were Cu>Cd>Zn. The successful cloning of Ep.HSP70 gene and expression analysis under heavy metal stresses are of great significance for the further study on the biological function of HSP70 protein.

Key words *Eurytemora pacifica*; heat shock protein 70; gene cloning; metal stress; expression analysis