大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)热休克蛋白 SmHsp47相互作用蛋白 His-pull down 和质谱鉴定^{*}

朱春月^{1, 2, 3} 孙志宾^{2, 3} 马爱军^{2, 3} 刘志峰^{2, 3} 杨敬昆^{2, 3} 赵亭亭^{1, 2, 3}

 (1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展 重点实验室 山东省海洋渔业生物技术与遗传育种重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 青岛
266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生物学与生物技术功能实验室 青岛 266237)

摘要 首次克隆了大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)热休克蛋白 *SmHsp47* 基因。该基因 cDNA 序列 全长为 1 927 bp,其中开放阅读框长度为 1 218 bp,编码一条长度为 405 个氨基酸的多肽链。结果表 明,大菱鲆 *SmHsp47* 基因在肝脏、皮肤、鳃和肠等 4 个组织中都有表达,表达量最高的组织是肝脏, 表达量最低组织是鳃; 25 °C 处理 6 h 后 *Sm*Hsp47 在皮肤中的表达量增加 150 多倍。利用大肠杆菌原 核表达系统表达了 *Sm*Hsp47 的 his 标签融合蛋白,然后利用 His-pull down 技术捕获了 *Sm*Hsp47 的相 互作用蛋白质,通过质谱分析鉴定出 31 种候选蛋白,其中大部分蛋白为参与翻译后修饰,蛋白转换 及分子伴侣;此外还包括参与脂转运与代谢、能量产生与转换、细胞骨架、防御机制等过程的蛋白 质。从 31 种候选蛋白中进一步筛选出 3 种分值较高的蛋白:未知蛋白(uncharacterized protein, A0A6A4TFV0)、胎球蛋白 B (Fetuin B, A0A2U9C388)和胶原结合蛋白(collagen-binding protein, A0A2U9B608),可为后续的研究提供方向。

关键词 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*); *Sm*Hsp47; 蛋白相互作用; His-pull down 中图分类号 Q955; Q789; S965 doi: 10.11693/hyhz20201200331

热休克蛋白(heat shock protein, Hsp)是有机体受 到高温胁迫后大量合成的一类蛋白,普遍存在于各 类生物中(Feder *et al*, 1999)。热休克蛋白主要功能是 分子伴侣,具有多种功能,能够辅助新合成肽链正确 折叠、消除变性或者错误折叠的肽链,避免应激状态 下蛋白质的变性,减少因疏水基团暴露而导致的蛋 白质聚集等(田倪妮, 2014)。根据相对分子量、氨基 酸序列特征以及功能可以划分为如下几类: Hsp110、 Hsp90、Hsp70、Hsp60和小分子量HSP (Hsp47, Hsp27, Hsp22等)等(陈鹏宇等, 2020)。

Hsp47属于丝氨酸蛋白酶抑制剂(serine proteinase

inhibitor, Serpin)家族进化枝H (Serpin H), 具有丝氨酸蛋白酶抑制剂折叠和抑制剂环, 但不具备抑制活性(Hirayoshi *et al*, 1991)。Hsp47是一种内质网(ER)驻留的分子伴侣, 与其他分子伴侣(如Hsp60, Hsp70和Hsp90)具有广泛的底物特异性(Niwa *et al*, 2012)不同, 通常认为Hsp47特异识别前胶原蛋白, 对于胶原蛋白分子的成熟是必不可少的。已有研究表明, Hsp47在胶原蛋白合成途径中起两种作用:抑制原胶原的局部展开, 以及抑制三螺旋形成后的原胶原聚集(高辉等, 2020)。因此Hsp47在胶原蛋白的生物合成、结构装配以及分泌中发挥着重要作用。最近的研究表明, Hsp47

^{*} 财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系资助,CARS-47-G01号;山东省农业良种工程项目,2019LZGC013号; 青岛海洋科学与技术国家实验室"鳌山人才"培养计划项目,2017ASTCP-OS04号;中国水产科学研究院基本科研业务费项目, 2020TD25号;中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目,20603022021009号;烟台市科技计划项目, 2018ZDCX021号。朱春月,硕士研究生,E-mail:zhuchunyue1995@163.com

通信作者:马爱军,博士,研究员,博士生导师,E-mail: maaj@ysfri.ac.cn; 孙志宾, E-mail: sunzb@ysfri.ac.cn 收稿日期: 2020-12-12,收修改稿日期: 2021-02-19

还可以与多种蛋白相互作用,如:核心蛋白聚糖 (decorin)、纤维调节素(fibromodulin)和光蛋白聚糖 (lumican)等,进而促进这些蛋白的分泌(Ishikawa *et al*, 2018),以及与KDEL内质网蛋白驻留受体2(KDELR2) 相互作用(van Dijk *et al*, 2020)。

Hsp47在鱼类中的研究相对较少,已有研究发现 Hsp47可能在斑马鱼(Lele et al, 1997a; Murtha et al, 2003)、青鳉(Hirayama et al, 2006)、大西洋鳕(Hori et al, 2010)、硬头鳟(Narum et al, 2013)、虹鳟(Wang et al, 2016)、鲱形白鲑(Stefanovic et al, 2016)、斑尾小鲃 (Mahanty et al, 2017)、三刺鱼(Li et al, 2018)等鱼的高 温应激或热适应中发挥重要作用。这些研究都集中在 Hsp47基因在不同鱼类胁迫后的表达模式分析检测上, 而更进一步的功能研究未见报道、并且迄今未见对 大菱鲆Hsp47的研究报道。大菱鲆(Scophthalmus maximus)是我国北方沿海重要的经济鱼类,由于是冷 温性鱼类、其养殖业的进一步发展受到养殖环境温 度的严重影响。为减少不利环境因素对大菱鲆养殖产 业的影响、科研工作者开展了一些基础生理性研究、 分子标记辅助育种等研究, 其目的是提高大菱鲆的 优良种质, 解决生产实际问题(Yang et al, 2020; 高进 等, 2021)。本文克隆了大菱鲆SmHsp47基因cDNA全 长、检测了SmHsp47基因在大菱鲆肝脏、皮肤、肠和 鳃等组织中mRNA的表达水平以及在皮肤中温度胁 迫前后的诱导表达情况,获得了该基因的体外原核 重组表达蛋白、利用His-pull down技术、筛查与 SmHsp47具有相互作用的蛋白,有助于进一步了解温 度胁迫下SmHsp47在鱼体中发挥作用的机制、为大菱 鲆温度胁迫应答机制提供新的理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验用鱼

实验选用平均体重为(100.0±12.3) g 的大菱鲆幼 鱼,饲养于烟台开发区天源水产有限公司室内养殖 水泥池。实验用鱼先在水温(14.0±0.5) °C 的实验水池 内驯化暂养一周。驯化暂养和实验期间每天上午 9:00 投喂一次饵料,每天上午 10:00 换水 1 次,静水养殖 通气供氧。

1.2 试验方法

1.2.1 温度胁迫实验 随机挑选经过 1 周驯化的 大菱鲆幼鱼,将其分为 2 组:对照组(14 °C)和实验组 (25 °C)。升温方法参考 Ndong 等(2007),略有修改: 首先按照每 6 h 提升 1 °C 的速度将水温逐步从 14 °C 升至 20 °C,接着按每 12 h 提升 1 °C 的速度将水温从 20 °C 提升至 25 °C 为实验组。对照组和实验组分别 设制 3 个平行,每个平行组均随机投放 15 尾幼鱼。 在 25 °C 温度胁迫 6 h 后,在每个平行随机选取 3 尾 幼鱼,放置于下方为冰块的预冷解剖盘中迅速解剖, 取皮肤、肝脏、鳃、肠道等组织冻存于液氮中,用于 后续 mRNA 的提取。

1.2.2 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 提取方法 参照天根生化科技(北京)有限公司动物组织总 RNA 提取试剂盒(RNAprep pure Tissue Kit)说明书,提取 完成后利用 Thermo NanoDrop 2000 微量紫外分光光 度计检测 RNA 的含量和纯度,再用 1%琼脂糖凝胶电 泳检测 RNA 的完整度。使用北京全式金生物技术 (TransGen Biotech)有限公司反转录试剂盒 (TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix)合成 cDNA,存放于–20 °C 冰箱 保存。将提取的肝脏总 RNA,按照宝日医生物技术 (北京)有限公司 RACE 试剂盒(SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit)说明书分别合成用于 3'和 5' 末端 PCR 扩增的 RACE 模板, –20 °C 冰箱保存。

1.2.3 大菱鲆 *SmHsp47* 基因 cDNA 全长克隆 根据本实验室已有的 *Hsp47* 基因部分序列,利用 Primer Premier5.0 软件在保守区域设计引物 Hsp47-F 与Hsp47-R (表 1), 扩增大菱鲆 *SmHsp47* 基因的开放阅读框(ORF)序列。测序验证后,再依据获得的 ORF 序列设计 3'RACE 和 5'RACE 引物(表 1), 扩增得到 3'和 5'片段后,再进行测序验证,最终获得 *SmHsp47* 基因 cDNA 全长序列。

1.2.4 *SmHsp47* 基因的序列的生物信息学分析 分别利用软件 ORF Finder、EditSeq、ExPASy (compute_pi)、SignalP、SOPMA、SWISS-MODEL等 进行开放阅读框、氨基酸序列、分子量、信号肽、等 电点以及二/三级结构等生物信息学分析预测(唐启政 等, 2019);利用软件 DNAMAN 进行序列同源性比对 分析,从 GenBank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast. cgi)中获取其他鱼类 *Hsp47* 基因编码的氨基酸序列, 利用 MAGE 7.0 软件构建该其 NJ 系统进化树。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 根据 *SmHsp47* 基因 cDNA 全长设计引物 Hsp47-RTF 和 Hsp47-RTR (表 1), 以 β-actin 基因为内参,利用 ABI StepOnePlus 实时荧 光定量 PCR 仪检测大菱鲆 *SmHsp47* 基因的表达量。 反应程序为: 94 °C 30 s; 94 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循 环; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。利用 2^{-ΔΔCt} 法 计算 *SmHsp47* 基因的相对表达量,依据软件 SPSS 19 进行数据差异显著性统计分析。

	Tab.1 The primer name and the sequence		
引物名称	引物名称 引物序列(5'—3')		
Hsp47-F AACACACTCAGCACCAGGAC		由心性码	
Hsp47-R	Hsp47-R GTAATTTCACAACGCTAAGCC		
UPM(long)	long) CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT		
UPM(short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC	迪用51初	
RACE-F	GATTACGCCAAGCTTCCACGACGGGGGGAGATGAGGATGTT	DACE	
RACE-R	GTGAAGCCCAAGGGAGACAAGATGCG	KACE	
MPF	MPF CGCGGATCCATGGAGGACAGGAAGCTGAG		
MPR	CCCAAGCTTTAGCTCGTCGCGCATCTTGT	原核农区	
Hsp47-RTF	Hsp47-RTF ACAAGGAGAACCGCATCTTCGTG Hsp47-RTR GCCAAGTGTCCACCTGCTTCC		
Hsp47-RTR			
β-actF	β-actF GTGGAGCGATTTGTCTGGTT		
β-actR	CTCAATCTCGTGTGGGCTGAA	p-action	

表1 引物名称及序列

1.2.6 SmHsp47 基因成熟肽原核表达载体构建及表 达菌株转化 综合分析 SmHsp47 成熟肽编码区和 pET-28a 载体中的限制性内切酶位点,分别设计带有 BamH I和 Hind III 酶切位点序列的表达引物 MPF 和 MPR (表 1), 以 1.3.3 中提取的质粒作为模板进行 PCR 扩增, 经琼脂糖凝胶电泳分离后, 切取目的条带用试 剂盒回收。将目的条带与 BamH I 和 Hind III 双酶切后 纯化的 pET-28a 载体相连接, 将连接产物转化大肠杆 菌 Trans5 α 感受态细胞、在含终浓度为 100 μ g/mL 的卡 那霉素 LB 固体培养基平板上培养并挑选单克隆菌斑, 经 PCR 检测后,将符合条件的菌液送公司测序。将测 序结果正确的菌落扩大培养、提取质粒保存于-20°C 备用, 命名为 pET-28a-Hsp47。取 1 µL pET-28a-Hsp47 重组质粒转化到 50 μL 刚解冻的大肠杆菌 E. coil transettea (DE3)感受态细胞中,涂布在含终浓度为 100 ug/mL的卡那霉素LB固体培养基平板上、将平板以石 蜡膜封口后倒置于 37 °C 恒温培养箱中过夜培养,挑 取单菌落并进行 PCR 验证,保存阳性克隆菌株。

1.2.7 *Sm*Hsp47 重组蛋白诱导表达、纯化及复性 将目的菌液接种于含终浓度为 100 μ g/mL 的卡那霉 素 LB液体培养基中,接种比例按体积分数为1:100, 37 °C 200 r/min 震荡培养至菌液的 OD₆₀₀ 约为 0.6 时, 加入终浓度为 0.5 mm IPTG, 37 °C 200 r/min 震荡培养 过夜。随后在室温条件下,将菌液以 5 000 r/min 离心 10 min,弃掉上清,收集菌体。加入 30 mL 预冷的裂 解液重悬菌体,利用超声破碎仪裂解菌体。将超声破 碎后的菌体在 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 30 min, 分别收集上清和沉淀,沉淀即为包涵体。沉淀通过几 次重复的洗涤、离心过程进一步进行纯化。将洗涤后 的包涵体沉淀溶解于 20mL 溶解液中, 再转移到至 50 mL小烧杯中、放置于4 ℃条件下磁力搅拌器搅拌 过夜, 使包涵体充分溶解。随后在4°C下12000 r/min 离心 20 min, 去掉沉淀, 收集上清并用 0.22 μm 孔径 的滤膜去除细菌和杂质。得到的包涵体加入装有镍离 子螯合亲和层析树脂填料的柱壳中,反复上样四次 后、将柱壳堵口于4°C静置30min,使目的蛋白和填 料充分结合。然后分别用 30 mL 预冷的 20、30、 50 mmol/L 的咪唑溶液清洗杂蛋白、最后用 10 mL 预 冷的 250 mmol/L 咪唑溶液进行目的蛋白洗脱, 收集 流出溶液获得目的蛋白。SDS-PAGE 检测洗脱情况。 将收集的目的蛋白液体加到预先处理好的透析袋中、 透析袋用透析夹加紧两端。透析袋放入提前预冷的透 析液 I 中, 在 4 °C 条件下用磁力搅拌器搅拌, 透析 12 h。按照相同的方法、每隔 12 h 更换一次透析液、 直至完成透析液 VII 中的透析。为避免其他透析液成 分的残留,可以适当延长目的蛋白在透析液 VII 中的 透析时间。透析结束后、收集透析袋中的液体、于 4°C 条件下 12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清, 上 清即为复性后的大菱鲆 SmHsp47 蛋白, 随后采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。

1.2.8 大菱鲆鱼体总蛋白提取 将 100 mg 大菱鲆 组织剪切成小块,尽量去除脂肪组织和结缔组织等 非目的组织,加入适量的预冷的 1×PBS,在4°C条件 下 3 000 r/min 离心 3 min,弃掉上清,重复洗涤组织 块两次。将洗涤后的组织加入 1 mL 预冷的抽提试剂, 转移至玻璃匀浆器中在冰上均质 30—50 次直至组织 完全成匀质状液体无明显组织小块。放置在涡旋振荡 器上最大速度涡旋 10 s,然后在冰上放置 20 min,期 间取出振荡 3—5次,随后于4°C条件下12000 r/min 离心10 min去除组织或细胞碎片,收集上清,上清即 为大菱鲆组织活性总蛋白,分装并保存于-80°C,用 于后续实验。

1.2.9 His-pull down 实验及质谱鉴定 先将 1 mg SmHsp47 重组蛋白加入镍柱中 4 °C 堵口静置 30 min, 收集上样后溶液,再将 1 mg 鱼体总蛋白加入镍柱中, 4 °C 堵口孵育 30 min, 孵育完成后进行纯化。鱼体总 蛋白作空白对照,其他条件均相同。取样后进行 SDS-PAGE 检测,对比差异性条带。将差异条带切下 来送北京诺禾致源科技股份有限公司进行基于 Thermo Q Exactive 质谱仪的液相色谱-串联质谱法鉴 定样品中的肽段,进而鉴定蛋白种类。

2 结果

2.1 大菱鲆 SmHsp47 基因的 cDNA 克隆及序列分析 大菱鲆SmHsp47基因, GenBank登录号: MW115941。 其cDNA序列全长为1 927 bp, 包含一个1 218 bp开放阅 读框, 5'端非编码区核苷酸长度143 bp, 3'端非编码区长

度566 bp (图1)。SmHsp47基因ORF可编码一个长度

ACATGGGGTCTCGCACAGGATAT 23 AAAGAGCAGGCGAGAGGGGTCACATGAACACACTCAGCACCAGGACACAGCTCAACAGAG 83 GGAAAACCCCCCAGTGGATCTATCGCCAGGCTGCTACAGCTGCGTCGGGAGACGGACAGG 143 203 ATGCGGGCGACCCACGTCGCGGCTCTTTGCCTGCTGGCCCTCGTGGCCTCTGCGGAGGAC M R A T H V A A L C L L A L V A S A E D 1 AGGAAGCTGAGCAGCCACGCCATCGCGCTGGCCGACAACAGCGCCAACCTGGCCTTCAGC 263 R K L S S H A I A L A D N S A N L A F S 21 CTCTACCACAACATGGCCAAGGCCAAGGAGAGGGGGAGAACATCCTCATCTCCCCCGTCGTG 323 L Y H N M A K A K E T E N I L I S P V V 41 GTGGCCTCCTCGGGGATGGTGGCGCTCGGCGGGAAGGCCTCCACCGCCTCCAGGTC 383 61 V A S S L G M V A L G G K A S T A S Q V AAGGCCGTCCTGAGCGCGGACAGACTGCAGGACGAGCATCTGCACGCGGGACTGTCTGAG 443 81 KAVLSADRLQDEHLHAGLSE CTGCTCTCCGAGGTGAGCGACGCCAAGACGCGCAACACCACCTGGAAGATCAGCAGCCGC 503 101 L L S E V S D A K T R N T T W K I S S R CTCTACGGCCCGAGCTCCGTCTCCTTCGCCGACGACTTTGTGAAGAGCAGCAAGCGGCAC 563 LYGPSSVSFADDFVKSSKRH 121 TACAACTACGACCACTCCAAGGTGAACATCCGGGACAAGCGGAGCGCGGTGAACGCCATC 623 Y N Y D H S K V N I R D K R S A V N A I 141 AACGAGTGGGCGGCCAAGTCGACGGGCGGCAAGCTGCCCGAGGTCACCAAGGACGTGCAG 683 NEWAAKSTGGKLPEVTKDVQ 161 AACGCGGACGGCGCCACCATCGTCAACGCCATGTTCTTCAAGCCTCACTGGGAGGAGAAG 743 N A D G A T I V N A M F F K P H W E E K 181 TTTCACGAGAAAATGGTGGACAGCCGCGCTTTCCTGGTCACGCGCTCGTTCACCGTGGCG 803 FHEKMVDSRAFLVTRSFTVA 201 GTTCCCATGATGCATCGGACGGGTCTGTACGACTTCTACGAGGACAAGGAGAACCGCATC 863 V P M M H R T G L Y D F Y E D K E N R I 221 TTCGTGCTGAGCATGCCCCTGGGCCAGAAGCAGGCGTCCATGGTCCTCATCATGCCCTAC 923 F V L S M P L G Q K Q A S M V L I M P Y 241 CACCTGGAGTCCCTGGAGCGCCTGGAGAAGCTCCTGACCCGGAAGCAGGTGGACACTTGG983 H L E S L E R L E K L L T R K Q V D T W 261 CTCGCCAGGGCGGAGAACAGAGCCGTGGCCATCTCCCTTCCCAAGATCTCGCTGGAGGTC 1043 281 LARAENRAVAISLPKISLEV AGCCACAATCTGCAGAAACACCTGGCCGAGCTCGGCCTGACCGAGGCCGTGGACAAGGCC 1103 S H N L Q K H L A E L G L T E A V D K A 301 AAGGCCGACCTGTCCAACATCTCGGGCAAGAAGGACCTCTACCTCTCCAACGTGTTCCAC 1163 K A D L S N I S G K K D L Y L S N V F H 321 GCGTCCGCCCTGGAGCTGGACGTGGAGGGCAACCCGTACGACACGTCCATCTTCGGCACG1223 A S A L E L <u>D V E G N P Y D T S I F G T</u> 341 GAGAGGCTGAGGAACCCGCAGCTGTTCTACGTGGACCACCCCTTCGTCTTCCTGGTGAAG 1283 <u>E R L R N</u> P Q L F Y V D H P F V F L V K 361 GACAACCGCACCAACTCCGTCCTCTACATCGGCCGGGTGGTGAAGCCCAAGGGAGACAAG 1343 D N R T N S V L Y I G R V V K P K G D K 381 ATGCGCGACGAGCTATAATGTTGATGTCTGCGTCGGCTTAGCGTTGTGAAATTACGTCAG 1403 401 M R D E L *

974

GATTCTTGTGTTTGTGTGTGTGTGTGTGGGGGTTTTTTTT	1463
GCTGTTACCTCATGAGCACATTCCAATAAACAATCTGGGGACTGAATATCCGAGCTTGAC	1523
TGTTTTTCATCAAACCTTCCCAGGGAACGATGGCGTCATTCTGCCCGTAAACAAAC	1583
GTTGGCATCCCAAACAGCATGCTTATATTAAGTATGATCTCTTTTTTCTTCCCCCACCCC	1643
ACTTTTTTCTTCCCCAGGGTCCCCCCGGGGGGGGGGGTGTTTAAAAAAAA	1703
GCGCGCGCGCGTTTTTTTTTTTGCCCCCCACTCCCCCCCC	1763
TCCTGCTCTCCGCAGAAGGGGGGGGAAAAAACTGAGCCCCCTTTTTATTTTTTGGGGCCCCC	1823
CCCCCCAAACCCCCCCGCCCTTTTTTTTTTCCTCCCGGGGTTTTTTTT	1883
AGGTGGGGGATTTGGGGGAATAAAAAAAAGTGTTTTTTTT	1943
АААААААААААААААА	1961

图 1 大菱鲆 SmHsp47 cDNA 及其编码的氨基酸序列

Fig.1 The cDNA and deduced amino acids sequence of *Sm*Hsp47 from *S. maximus* 注: 起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA 均用粗下划线标出,信号肽与反应中心环(RCL)分别用青色和深青色阴影标出

为405个氨基酸残基的肽段,其预测分子质量为43.50 kDa,理论等电点为8.72,氨基端有信号肽序列长度 为18个氨基酸,羧基端带有内质网靶向序列(RDEL)。

2.2 大菱鲆 SmHsp47 蛋白的生物信息学分析

经 SOPMA 在线软件预测显示, *Sm*Hsp47 含有三 种二级结构, 其中 α 螺旋(alpha helix)占 44.44%, β 折 叠(extended strand)占 17.28%, 无规则卷曲(random coil)占 38.27%。如图 2 所示, 蓝线表示 α 螺旋, 红线 表示 β 折叠, 紫线表示无规则卷曲。

利用 SWISS-MODEL 分析软件根据同源蛋白建

模的方法构建蛋白质三维结构,推测出大菱鲆 SmHsp47蛋白的高级结构,如图3所示。

利用 DNAMAN 软件进行 SmHsp47 与其他鱼类 同源基因蛋白的多序列比对,其结果显示:大菱鲆与 狭鳞庸鲽和赤锯鳞鱼的 Hsp47 最为相似,相似度分别 为 89.54%、85.43%;与半滑舌鳎 Hsp47 相似度最低 为 76.73%。利用 MEGA7.0 以邻接法(Neighbor-Joining) 构建大菱鲆 SmHsp47 蛋白的系统进化树,结果显示, 大菱鲆 SmHsp47 与狭鳞庸鲽和赤锯鳞鱼 Hsp47 亲缘 关系最为接近(图 4)。



图 2 SmHsp47 蛋白质的二级结构预测 Fig.2 The secondary structure of SmHsp47 protein



图 3 SmHsp47 蛋白质的三级结构预测 Fig.3 The deduced tertiary structure of SmHsp47 subunit protein

2.3 大菱鲆 SmHsp47 基因的组织特异表达及温度胁 迫诱导表达分析 利用荧光实时定量 PCR 技术检测大菱鲆 SmHsp47 基因分别在肝脏、皮肤、肠和鳃等 4 个组织中的表达 情况(图 5),结果显示, *SmHsp47* 基因在上述 4 种组织 中均有表达,并且不同组织中的表达水平存在显著 差异。其在肝脏中表达水平最高(*P*<0.05),皮肤次之, 鳃和肠中较低。水温 25 °C 处理组在处理后 6 h 时 *SmHsp47* 在皮肤中的表达显著上调(图 6),为对照组 (14 °C)的 164.23±70.19 倍(*P*<0.05)。

2.4 大菱鲆 SmHsp47 蛋白的表达、纯化

以转化原核表达载体 pET-28a 空载的大肠杆菌细胞蛋白作为空白对照,以转化有 pET-28a-SmHsp47 载体的大肠杆菌在 ITPG 诱导前的细胞蛋白作为阴性对照,泳道 4 为细胞破碎液上清样,泳道 5 为细胞破碎液沉淀样,可以看出 SmHsp47 蛋白主要以包涵体形式存在,并且分子量大小符合预期值(图 7)。随后对SmHsp47 蛋白包涵体用镍离子树脂进行纯化,反复上样后,利用咪唑浓度梯度洗脱,洗脱浓度分别为



图 4 使用 NJ 构建的 Hsp47 的进化树

 Fig.4 The phylogenetic tree of Hsp47 constructed using the Neighbor-Joining method
注: Oreochromis niloticus: 尼罗罗非鱼; Oreochromis aureus: 奥尼罗非鱼; Maylandia zebra: 斑马拟丽鱼; Archocentrus centrarchus: 尼加 拉瓜湖始丽鱼; Mastacembelus armatus: 大刺鳅; Morone saxatilis: 条纹鲈; Labrus bergylta: 贝氏隆头鱼; Monopterus albus: 黄鳝;
Scophthalmus maximus: 大菱鲆; Hippoglossus stenolepis; 狭鳞庸鲽; Myripristis murdjan: 赤锯鳞鱼; Cynoglossus semilaevis: 半滑舌鳎;
Salarias fasciatus: 细纹凤鳚; Oryzias melastigma: 海洋青鳉鱼; Amphiprion ocellaris: 眼斑双锯鱼



图 5 大菱鲆 SmHsp47 基因在不同组织中的表达情况 Fig.5 The expression of the SmHsp47 gene in different tissues



图 6 大菱鲆 *SmHsp47* 基因在皮肤组织中 25 °C 胁迫 6 h 后的表达变化情况

Fig.6 The expression of *SmHsp47* gene in the skin after thermal stress for 6 h

20、30、50、250 mmol/L (图 8)。由结果可以看出 20 mmol/L 咪唑可以洗脱下来杂质蛋白和极少量目的 蛋白,含 250 mmol/L 咪唑的缓冲液可以洗脱下来大

量的目的蛋白,并且条带蛋白单一,可以得到比较纯的蛋白,显示出很好的洗脱效果。利用酶标仪和 BCA 蛋白定量试剂盒测得纯化后的蛋白质量浓度为 0.38 mg/mL。



图 7 SmHsp47 蛋白表达 SDS-PAGE 结果 Fig.7 SDS-PAGE result of SmHsp47 protein expression 注: M. 蛋白 Marker; 1. 全菌蛋白(pET-28a, 未诱导); 2. 全菌蛋白 (pET-28a-Hsp47, 未诱导); 3. 全菌蛋白(pET-28a-Hsp47, 诱导); 4. 细胞破碎液上清(pET-28a-Hsp47, 诱导); 5. 细胞破碎液沉淀 (pET-28a-Hsp47, 诱导); 黑色箭头指示位置为 SmHsp47 融合蛋白 目的条带

2.5 大菱鲆 SmHsp47 相互作用蛋白的 His-pull down 利用酶标仪和 BCA 蛋白定量试剂盒测得提取的 大菱鲆鱼体总蛋白质量浓度为 3 mg/mL。取 1 mg



图 8 SmHsp47 蛋白咪唑梯度洗脱 SDS-PAGE 结果 Fig.8 SDS-PAGE result of SmHsp47 protein after imidazole gradient elution 注: M. 蛋白 Marker; 1. 上样流穿溶液; 2. 20 mmol/L 咪唑洗脱液; 3. 30 mmol/L 咪唑洗脱液; 4. 50 mmol/L 咪唑洗脱液; 5. 250 mmol/L 咪唑洗脱液; 黑色箭头指示位置为 SmHsp47 融合蛋白目的条带

SmHsp47 重组蛋白和 1 mg 鱼体总蛋白混合孵育,获 得 his-Hsp47-鱼体总蛋白相互作用复合体,以鱼体总 蛋白作为空白对照。用 250 mmol/L 的咪唑洗脱出的 未加鱼体蛋白的 SmHsp47 重组蛋白作为阴性对照, 用 250 mmol/L 的咪唑洗脱液将捕获到的含有 his 标签 的蛋白复合体洗脱下来,并进行 SDS-PAGE 分离,结 果如图 9 所示。通过比较泳道 2 与泳道 3,发现泳道 3 中多出 1 条比较明显的条带,此条带中所含蛋白则



图 9 His-pull down 实验 SDS-PAGE 结果 Fig.9 The SDS-PAGE result of His-pull down experiment 注: M. 蛋白 maker; 1. 鱼体总蛋白; 2. SmHsp47 重组蛋白; 3. His-pull down 孵育后蛋白; 黑色箭头指示位置为获得的 SmHsp47 可能的相互作用蛋白条带

很可能与 Hsp47 具有相互作用。

2.6 大菱鲆 SmHsp47 相互作用蛋白的鉴定

将2.5中获得的差异蛋白条带切下后,经质谱分 析后共鉴定得到31种候选蛋白,具体信息如表2所 示。通过搜索COG数据库对鉴定到的肽段进行功能注 释,用于了解不同蛋白质的功能特性。从COG注释结 果(图10)可以看出,大部分蛋白为参与翻译后修饰, 蛋白转换,分子伴侣,此外,还包括参与能量产生与 转换、脂质转运与代谢、防御机制、一般功能预测等 过程的蛋白质。

蛋白编号		肽段数	特异性肽段数	分值
A0A2U9B8D8	Putative ADP/ATP translocase 2-like	1	1	2.89
A0A2U9BY38	Putative keratin type II cytoskeletal 8-like	3	2	10.92
A0A2U9BGS9	Putative intermediate filament protein ON3-like	2	1	7.02
A0A6A4TFV0	Uncharacterized protein	15	5	110.20
A0A6A4S4T0	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	1	1	2.43
A0A6A4RQE9	Uncharacterized protein	1	1	0.00
A0A6A4SK40	ATP synthase lipid-binding protein	1	1	3.83
A0A2U9B608	Collagen-binding protein	11	11	41.85
A0A6A4SWR2	EGF-like domain-containing protein	2	1	8.03
A0A6A4TS79	Integrase_H2C2 domain-containing protein	1	1	1.91
A0A6A4SKG7	PKS_ER domain-containing protein	1	1	0.00
A0A2U9B6J0	Histone H4	1	1	2.48
A0A6A4SXD0	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	1	1	4.35
A0A6A4S5Y4	60kDa chaperonin	1	1	1.69
A0A2U9BWC3	Putative membrane-associated guanylate kinase WW and PDZ domain-containing protein 2-like	1	1	3.41

表 2 大菱鲆 *Sm*Hsp47 相互作用候选蛋白鉴定结果 Tab.2 Identification of interactive candidate proteins with *Sm*Hsp47

				续表	
蛋白编号	· 蛋白描述		特异性肽段数	分值	
A0A2U9C388	Fetuin B	11	1	65.69	
A0A2U9CW74	Putative mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	1	1	0.00	
A0A6A4RNZ7	Elongation factor 1-alpha	1	1	2.23	
A0A2U9CHT8	Enoyl-CoA hydratase	1	1	0.00	
A0A2U9C5S5	Putative alpha-2-HS-glycoprotein-like	4	4	11.98	
A0A068F5K8	Hemopexin	2	2	5.34	
A0A2U9BRX5	Putative keratin type I cytoskeletal 14-like	2	2	5.05	
A0A6A4TKC5	Uncharacterized protein	4	3	7.83	
A0A6A4TD61	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	1	0.00	
A0A2U9AVE8	ATP synthase subunit beta	1	1	2.34	
A0A6A4TGX0	Uncharacterized protein	1	1	0.00	
A0A2U9CED1	Putative histone H1.5-like	1	1	1.60	
A0A2U9CV00	Heat shock protein HSP 90-alpha 1	1	1	1.79	
A0A6A4RMV6	SERPIN domain-containing protein	2	2	1.97	
A0A2U9CRB9	Alpha-type globin isoform 2	1	1	1.85	

注: 分值是对蛋白匹配度的打分, 是肽段分数的加和, 分数越高可信度越高



C: Energy production and conversion (3)

D: Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning (1)

F: Nucleotide transport and metabolism (1)

G: Carbohydrate transport and metabolism (1)

I: Lipid transport and metabolism (2)

J: Translation, ribosomal structure and biogenesis (1)

O: Posttranslational modification, protein turnover, chaperones (4)

P: Inorganic ion transport and metabolism (1)

Q: Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism (1)

R: General function prediction only (2)

T: Signal transduction mechanisms (1)

V: Defense mechanisms (2)

Z: Cytoskeleton (1)

图 10 COG 数据库注释结果

Fig.10 The COG database annotation results 注: 横坐标为注释的功能分类, 纵坐标为注释到相应功能的蛋白数目

然后根据蛋白的预测分子量(MW)、鉴定到的肽段数量(Peptides)、特有肽段数量(Unique Peptides)以

及得分值(Score)等参数对质谱鉴定结果进行了严格 筛选,结果见表 3。

Tab.3 The re-screened result of proteins interacted with SmHsp47					
蛋白编号	蛋白描述	分子量(kDa)	肽段数	特异性肽段数	分值
A0A6A4TFV0	Uncharacterized protein	73.9	15	5	110.20
A0A2U9C388	Fetuin B	45.8	11	1	65.69
A0A2U9B608	Collagen-binding protein	54.4	11	11	41.85

表 3 大菱鲆 SmHsp47 相互作用蛋白鉴定结果再筛选

注: 分值是对蛋白匹配度的打分, 是肽段分数的加和, 分数越高可信度越高

3 讨论

本研究中、基因 SmHsp47 在大菱鲆的肝脏、皮肤、 肠和鳃等 4 种组织中都有表达,养殖水温 14 °C 时 SmHsp47在肝脏中的表达量最高, 25°C处理6h后皮 肤中的表达量较 14 °C 急剧升高 150 多倍, 而肝脏中 的变化幅度很小(未展示)。鱼类的肝脏在鱼体中发挥 着不可替代的解毒等代谢功能, 还是具有重要吞噬 功能的免疫器官,并且几乎所有的凝血因子都由肝 脏制造、因此健康鱼类的肝脏一直保持着旺盛的自 我修复能力。有研究表明 Hsp70 在多种鱼类的肝脏中 发挥重要的作用,且表达水平明显受外界胁迫诱导 而升高(Forsyth et al, 1997; Eddie et al, 2004)。本研究 中 Hsp47 在正常条件下的肝脏组织中有极高的表达 水平,表明在大菱鲆中Hsp47也可能与其他热激蛋白 一样参与肝脏的各项重要机能,以发挥其对肝脏的 保护作用。目前 Hsp47 在鱼类皮肤中的作用还没有研 究, 已有研究发现 Hsp47 在斑马鱼胚胎发育期参与热 激应答反应,并且还有组织部位特异性(Pearson et al, 1996; Krone et al, 1997; Lele et al, 1997a, 1997b). 也参 与成熟斑马鱼的热应答反应,同样具有组织特异性 (Murtha et al, 2003)。研究还发现 Hsp47 基因在虹鳟 (Wang et al, 2016)及其性腺细胞系(Ojima et al, 2005)、 青鳉(Hirayama et al, 2006)、大西洋鳕(Hori et al, 2010)、硬头鳟(Narum et al, 2013)、鲱形白鲑(Stefanovic et al, 2016)、斑尾小鲃(Mahanty et al, 2017)、三刺鱼(Li et al, 2018)等鱼的高温应激或者不同地理群体的热适 应中发挥重要作用。因此可以推断、大菱鲆 SmHsp47 在高温胁迫后的皮肤组织中高表达,是其高温诱导表 达的组织特异性的一种表现,这种时空特异的诱导表 达对鱼体的高温应激具有重要意义。

本研究中构建了大菱鲆 SmHsp47 基因成熟肽不 包含羧基端内质网靶向序列片段的重组表达载体, 尝试了多个温度、摇床转速、IPTG 诱导浓度和时间 等诱导条件(未展示),始终得到的都是包涵体蛋白, 并且在本报道中提及的诱导条件下能够大量地表达 重组蛋白。因该基因的体外原核重组蛋白的表达未见 研究报道,猜测可能是由于人工诱导条件下蛋白快 速合成,蛋白本身又含有强疏水氨基酸残基,例如第 368 位的亮氨酸、第 370 位的酪氨酸(图 1),使得重组 蛋白在原核表达系统中不能正确折叠而形成包涵体。

胶原蛋白是哺乳动物中最丰富的蛋白质,约占 人体所有蛋白质的三分之一。迄今为止,已经鉴定出 29 种胶原蛋白(Söderhäll et al, 2007)。Hsp47 瞬时结 合到 ER 中的胶原蛋白上, 以 pH 依赖的方式在顺式 高尔基体或 ER-高尔基体中隔室(ERGIC)中解离、然 后通过其 RDEL 保留序列运回 ER(Satoh et al, 1996)。 Hsp47 可以识别三螺旋原胶原蛋白上的 Gly-Xaa-Arg 重复序列(Koide et al, 2002, 2006), 可以防止原胶原 蛋白的局部展开和/或聚集(Thomson et al, 2000)。小 鼠的 Hsp47 基因破坏由于基底膜受损和胶原原纤维 形成而导致胚胎致死率。在 Hsp47 基因敲除细胞中, I 型胶原三螺旋结构异常形成,可导致纤细。1型胶原 蛋白的分泌缓慢且合理,可在敲除Hsp47的成纤维细 胞的 ER 中产生前胶原蛋白的聚集体, 这些聚集体最 终会被自噬降解。Hsp47中的突变与成骨不全症有因 果关系(Sillence et al, 1979; Thomson et al, 2005; Drögemüller et al, 2009)。Hsp47 的表达与多种类型的 细胞和组织中的胶原蛋白表达密切相关。因此, Hsp47 代表了治疗胶原蛋白相关疾病(包括肝、肺和其他器 官纤维化)的有希望的靶标。关于 Hsp47 与胶原蛋白 关系的研究多应用于哺乳动物、对于鱼体两者之间 的作用于关系还知之甚少, 仅有的研究表明 Hsp47 在 斑马鱼鳍条再生过程中的骨骼生长和模式化中必不 可少(Bhadra et al, 2015), 而在鱼类热应激中 Hsp47 与胶原蛋白相互作用的生理学意义需要进行更深一 步的探讨。

胎球蛋白(fetuin)分为胎球蛋白-A (Fetuin-A) (基 因符号: AHSG/FETUA)和胎球蛋白-B (Fetuin-B) (FETUB), 以及富含组氨酸的糖蛋白(HRG)和激肽原 (KNG)、是胱抑素(半胱氨酸蛋白酶抑制剂)超家族的 3 型家族成员蛋白质(Lee et al, 2009; Jahnen-Dechent et al, 2011)。3 型家族成员均为分泌型和二硫键结合 型的多结构域糖蛋白、具有多个半胱氨酸蛋白酶抑 制剂结构域(Abrahamson, 1994)。胎球蛋白-A 最早分 离于 1944 年、因其在牛胎血中含量最高而被命名为 "胎球蛋白"(Pedersen, 1944)。在 2000 年发现了第二 种胎球蛋白、称为胎球蛋白-B。至此、将原来的"胎球 蛋白"被重命名为胎球蛋白-A (Olivier et al, 2000)。 Fetuin-B 蛋白大小大约 50-60 kDa, 主要在肝脏中表 达(Olivier et al, 2000; Denecke et al, 2003), 并分泌到 血液中,从而到达所有软组织。最近的研究表明 Fetuin-B 在皮肤鳞状细胞癌细胞中的过度表达导致 裸鼠体内肿瘤生长受到抑制(Hsu et al, 2004), 而且 Fetuin-B 缺陷小鼠表现出自发性肿瘤发生的趋势增 加(Dietzel et al, 2013), 有研究指出, 人体中的

Fetuin-B 对于受精是必不可少的(Jahnen-Dechent *et al*, 1997; Dietzel *et al*, 2013), 并且参与糖脂代谢过程。从本研究结果来看, Fetuin-B 与 Hsp47 之间也可能存在相互作用关系,提示 Fetuin-B 可能参与鱼体高温胁迫某些代谢过程,后续可再进一步展开深入研究探讨。

4 结论

本研究首次克隆了大菱鲆 SmHsp47 基因 cDNA 全长、研究发现 14 °C 时其在大菱鲆肝脏组织中具有 较高的表达量, 而在 25 °C 处理 6 h 后其在皮肤中的 表达量升高了150多倍;然后构建了大菱鲆 SmHsp47 基因的原核表达载体,获得了去掉信号肽和内质网 靶向序列的重组蛋白, 重组蛋白主要以包涵体形式 表达; 又通过 His-pull down 实验获得了 SmHsp47 可 能的相互作用蛋白、最后通过质谱分析得到 31 种可 能与 SmHsp47 蛋白发生互作的蛋白。通过严格筛选 得到 3 种最有可能的相互作用蛋白、分别为: 未知蛋 白(uncharacterized protein, A0A6A4TFV0)、胎球蛋白 B (Fetuin B, A0A2U9C388) 和胶原结合蛋白 (collagen-binding protein, A0A2U9B608)。本研究为 Hsp47 在鱼体中的作用研究提供了新的参考、也为大 菱鲆高温胁迫应答机制提供了新的理论基础和研究 方向。

参考文献

田倪妮, 2014. 慢性心力衰竭患者心肌 HSP47 的表达及其与纤 维化的相关性研究. 昆明: 昆明医科大学硕士学位论文

- 陈鹏宇,李德臣,吴 凡,2020. 家蚕热激蛋白的研究进展. 生命科学,32(2):155—161
- 高 进,杨润清,2021.大菱鲆体重和体尺性状联合GWAS分析.渔业科学进展,42(02):63—70
- 高 辉, 王艺琛, 张昌军等, 2020. 热休克蛋白 47 与哺乳动物 生殖. 生殖医学杂志, 29(10): 1393—1398
- 唐启政, 孙志宾, 王新安等, 2019. 大菱鲆(Scophthalmus maximus)蛋白质二硫键异构酶 SmPDIA3 的表达分析和功 能验证. 海洋与湖沼, 50(2): 409—419
- Abrahamson M, 1994. Cystatins. Methods in Enzymology, 244: 685-700
- Bhadra J, Iovine M K, 2015. Hsp47 mediates Cx43-dependent skeletal growth and patterning in the regenerating fin. Mechanisms of Development, 138: 364—374
- Denecke B, Gr\u00e4ber S, Sch\u00e4fer C et al, 2003. Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of fetuin-B and fetuin-A. Biochemical Journal, 376(Pt 1): 135-145
- Dietzel E, Wessling J, Floehr J *et al*, 2013. Fetuin-B, a liver-derived plasma protein is essential for fertilization. Developmental Cell, 25(1): 106–112

- Drögemüller C, Becker D, Brunner A *et al*, 2009. A missense mutation in the *SERPINH1* gene in dachshunds with osteogenesis imperfecta. PLoS Genetics, 5(7): e1000579
- Eddie E D, Jun L, Norman Y S W, 2004, Modulated heat shock protein expression during pathogenic *Vibrio alginolyticus* stress of sea bream. Diseases of Aquatic Organisms, 62(3): 205–215
- 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
- Forsyth R B, Candido E P M, Babich S L *et al*, 1997. Stress protein expression in coho salmon with bacterial kidney disease. Journal of Aquatic Animal Health, 9(1): 18–25
- Hirayama M, Mitani H, Watabe S, 2006. Temperature-dependent growth rates and gene expression patterns of various medaka *Oryzias latipes* cell lines derived from different populations. Journal of Comparative Physiology B, 176(4): 311–320
- Hirayoshi K, Kudo H, Takechi H *et al*, 1991. HSP47: a tissue-specific, transformation-sensitive, collagen-binding heat shock protein of chicken embryo fibroblasts. Molecular and Cellular Biology, 11(8): 4036–4044
- Hori T S, Gamperl A K, Afonso L O B et al, 2010. Heat-shock responsive genes identified and validated in Atlantic cod (Gadus morhua) liver, head kidney and skeletal muscle using genomic techniques. BMC Genomics, 11: 72
- Hsu S J, Nagase H, Balmain A, 2004. Identification of *Fetuin-B* as a member of a cystatin-like gene family on mouse chromosome 16 with tumor suppressor activity. Genome, 47(5): 931–946
- Ishikawa Y, Rubin K, Bächinger H P *et al*, 2018. The endoplasmic reticulum-resident collagen chaperone Hsp47 interacts with and promotes the secretion of decorin, fibromodulin, and lumican. Journal of Biological Chemistry, 293(35): 13707–13716
- Jahnen-Dechent W, Heiss A, Schäfer C *et al*, 2011. Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. Circulation Research, 108(12): 1494–1509
- Jahnen-Dechent W, Schinke T, Trindl A *et al*, 1997. Cloning and targeted deletion of the mouse fetuin gene. Journal of Biological Chemistry, 272(50): 31496—31503
- Koide T, Nishikawa Y, Asada S et al, 2006. Specific recognition of the collagen triple helix by chaperone HSP47. II. The HSP47-binding structural motif in collagens and related proteins. Journal of Biological Chemistry, 281(16): 11177—11185
- Koide T, Takahara Y, Asada S *et al*, 2002. Xaa-Arg-Gly triplets in the collagen triple helix are dominant binding sites for the molecular chaperone HSP47. Journal of Biological Chemistry, 277(8): 6178—6182
- Krone P H, Sass J B, Lele Z, 1997. Heat shock protein gene expression during embryonic development of the zebrafish. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 53(1): 122–129
- Lee C, Bongcam-Rudloff E, Sollner C *et al*, 2009. Type 3 cystatins; fetuins, kininogen and histidine-rich glycoprotein.

Frontiers in Bioscience, 14: 2911-2922

- Lele Z, Engel S, Krone P H, 1997a. Hsp47 and hsp70 gene expression is differentially regulated in a stress- and tissue-specific manner in zebrafish embryos. Developmental Genetics, 21(2): 123—133
- Lele Z, Krone P H, 1997b. Expression of genes encoding the collagen-binding heat shock protein (Hsp47) and type II collagen in developing zebrafish embryos. Mechanisms of Development, 61(1/2): 89–98
- Li J, Levitan B, Gomez-Jimenez S et al, 2018. Development of a gill assay library for ecological proteomics of threespine sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). Molecular & Cellular Proteomics, 17(11): 2146—2163
- Mahanty A, Purohit G K, Yadav R P et al, 2017. hsp90 and hsp47 appear to play an important role in minnow Puntius sophore for surviving in the hot spring run-off aquatic ecosystem. Fish Physiology and Biochemistry, 43(1): 89–102
- Murtha J M, Keller E T, 2003. Characterization of the heat shock response in mature zebrafish (*Danio rerio*). Experimental Gerontology, 38(6): 683—691
- Narum S R, Campbell N R, Meyer K A *et al*, 2013. Thermal adaptation and acclimation of ectotherms from differing aquatic climates. Molecular Ecology, 22(11): 3090—3097
- Ndong D, Chen Y Y, Lin Y H et al, 2007. The immune response of tilapia Oreochromis mossambicus and its susceptibility to Streptococcus iniae under stress in low and high temperatures. Fish & Shellfish Immunology, 22(6): 686-694
- Niwa T, Kanamori T, Ueda T *et al*, 2012. Global analysis of chaperone effects using a reconstituted cell-free translation system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(23): 8937–8942
- Ojima N, Yamashita M, Watabe S, 2005. Quantitative mRNA expression profiling of heat-shock protein families in rainbow trout cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 329(1): 51-57
- Olivier E, Soury E, Ruminy P et al, 2000. Fetuin-B, a second member of the fetuin family in mammals. Biochemical Journal, 350(Pt 2): 589—597
- Pearson D S, Kulyk W M, Kelly G M et al, 1996. Cloning and

characterization of a cDNA encoding the collagen-binding stress protein hsp47 in zebrafish. DNA and Cell Biology, 15(3): 263–272

- Pedersen K O, 1944. Fetuin, a new globulin isolated from serum. Nature, 154(3914): 575
- Satoh M, Hirayoshi K, Yokota S et al, 1996. Intracellular interaction of collagen-specific stress protein HSP47 with newly synthesized procollagen. Journal of Cell Biology, 133(2): 469–483
- Sillence D O, Senn A, Danks D M, 1979. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. Journal of Medical Genetics, 16(2): 101-116
- Söderhäll C, Marenholz I, Kerscher T et al, 2007. Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis. PLoS Biology, 5(9): e242, https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050242
- Stefanovic D I, Manzon L A, McDougall C S et al, 2016. Thermal stress and the heat shock response in embryonic and young of the year juvenile lake whitefish. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 193: 1—10
- Thomson C A, Ananthanarayanan V S, 2000. Structure-function studies on Hsp47: pH-dependent inhibition of collagen fibril formation *in vitro*. Biochemical Journal, 349(Pt 3): 877—883
- Thomson C A, Atkinson H M, Ananthanarayanan V S, 2005. Identification of small molecule chemical inhibitors of the collagen-specific chaperone Hsp47. Journal of Medicinal Chemistry, 48(5): 1 680—1 684
- van Dijk F S, Semler O, Etich J et al, 2020. Interaction between KDELR2 and HSP47 as a key determinant in osteogenesis imperfecta caused by bi-allelic variants in KDELR2. The American Journal of Human Genetics, 107(5): 989—999
- Wang Y N, Liu Z, Li Z et al, 2016. Effects of heat stress on respiratory burst, oxidative damage and SERPINH1 (HSP47) mRNA expression in rainbow trout Oncorhynchus mykiss. Fish Physiology and Biochemistry, 42(2): 701-710
- Yang S S, Zhao T T, Ma A J *et al*, 2020. Metabolic responses in *Scophthalmus maximus* kidney subjected to thermal stress. Fish & Shellfish Immunology, 103: 37–46, doi: 10.1016/ j.fsi.2020.04.003

IDENTIFICATION OF PROTEINS INTERACTION WITH SCOPHTHALMUS MAXIMUS HEAT SHOCK PROTEIN SmHsp47 BY HIS-PULL DOWN COMBINED WITH MASS SPECTROMETRY

ZHU Chun-Yue^{1, 2, 3}, SUN Zhi-Bin^{2, 3}, MA Ai-Jun^{2, 3}, LIU Zhi-Feng^{2, 3}, YANG Jing-Kun^{2, 3}, ZHAO Ting-Ting^{1, 2, 3}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shandong Key Laboratory of Marine Fisheries Biotechnology and Genetic Breeding; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao 266071, China; 3. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China)

Abstract We cloned the *Sm*Hsp47 gene of turbot *Scophthalmus maximus* using the RACE technique. The cDNA sequence of *Sm*Hsp47 is 1 927 bp in length and includes a 1 218 bp open reading frame encoding a 405 amino acid. The results show that SmHsp47 gene was expressed in liver, skin, intestines, and gills, with the highest expression in liver and the lowest in gill. The relative expression of *Sm*Hsp47 was increased by 150 times in 25 °C treatment group for 6 h. Using prokaryotic expression technology, the His tag fusion protein of *Sm*Hsp47 was expressed. The interactive proteins of *Sm*Hsp47 were captured in the His-pull down technology. By LC-MS/MS analysis, 31 candidate proteins were identified and most of them were involved in the modification after translation, protein conversion, and molecular partner, and also energy production and conversion, lipid transport and metabolism, carbohydrate transport and metabolism, defense mechanism, and cytoskeleton proteins. Three high-scored proteins were screened, i.e., uncharacterized protein (A0A6A4TFV0), Fetuin B (A0A2U9C388), and collagen-binding protein (A0A2U9B608), providing a reference for future studies in this regard.

Key words Scophthalmus maximus; SmHsp47; protein interaction; His-pull down technology