

宽体沙鳅(*Botia reevesae*)热休克蛋白 70 基因的克隆及表达分析*

覃川杰¹ 顾顺樟² 赵大显³ 陈立侨⁴ 李二超⁴ 齐泽民¹

(1. 内江师范学院生命科学学院 内江 641000; 2. 上海机场出入境检验检疫局 上海 201207;
3. 南昌大学生命科学与食品工程学院 南昌 330031; 4. 华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

提要 为深入分析热休克蛋白响应胁迫的分子机制, 实验以宽体沙鳅(*Botia reevesae*)为研究对象, 利用同源克隆和 cDNA 末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术克隆得到宽体沙鳅热休克蛋白 70(heat shock protein, BR-HSP70)的 cDNA 全长。结果发现, BR-HSP70 cDNA 全长为 2371bp, 包含 1947bp 的开放阅读框(opening reading frame, ORF), 102bp 5'-非编码区(untranslated region, UTR)和 322bp 3'-UTR 等。通过序列同源性比对发现, BR-HSP70 cDNA 与团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)和猪(*Sus scrofa*)的同源性分别为 98%及 83%, 且 ORF 编码的 649 个氨基酸中含有 HSP70 家族的特征信号标签、N-糖基化位点及 EEVD 等保守区域。结果表明, 克隆的 cDNA 为宽体沙鳅 HSP70 基因。实时荧光定量 PCR 分析发现, 氨氮胁迫和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)侵染均会显著上调宽体沙鳅鳃、肝脏及肾脏 HSP70 mRNA 的表达($P < 0.05$), 表明 HSP70 基因在宽体沙鳅应对环境胁迫中发挥了重要的抗应激作用。

关键词 宽体沙鳅; 热休克蛋白 70; 氨氮; 嗜水气单胞菌; 胁迫

中图分类号 Q953

氨氮是水环境中常见的一种污染物, 主要来源于生活、工农业污水及有机废物的分解(Randall *et al.*, 2002)。此外, 氨是硬骨鱼类氮代谢的主要终产物, 鱼类残饵、粪便等有机物的分解也会产生大量氨态氮(Hegazi *et al.*, 2010a)。因而养殖水环境中的氨氮含量很容易升高至不安全水平。Chen 等(1988)报道, 高密度精养水体的氨氮含量最高可达到 46mg/L。水环境中的氨以 NH_4^+ 和 NH_3 两种形式动态平衡存在, 其中 NH_3 是引起水体氨氮毒性的关键原因(Wicks *et al.*, 2002)。 NH_3 能直接损害鱼类的鳃组织, 并渗入血液循环中产生毒害作用, 严重影响鱼类的呼吸、消化等生理功能, 最终抑制鱼类的生长和存活(Da Silva *et al.*, 2009; 胡毅等, 2012)。水体中高水平的氨氮也会损伤

养殖鱼类的免疫器官, 降低其抗病能力, 增加疾病的易感性, 导致鱼类病害的发生(Liew *et al.*, 2013)。因而氨氮是集约化养殖鱼类的一种重要胁迫因子。

研究发现, 热、重金属、氧化损伤及病原侵染会诱导细胞表达和分泌热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)(Song *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2012), 根据分子量及等电点的差异可将 HSP 分为小分子 HSPs、HSP40、HSP60、HSP70、HSP90 和 HSP110 六个家族(Sorensen *et al.*, 2003)。其中, HSP70 家族存在于从细菌到人类的绝大多数生物中, 且进化上较为保守。HSP70 能帮助细胞内多肽的正确折叠、装配和转运, 且迅速修复或清除错误折叠、受损的蛋白或变性蛋白, 对细胞起修复和保护作用(Mads, 2007)。此外, 革兰氏

* 四川省教育厅项目, 11ZB025 号; 四川省科技厅项目, 2011NZ0075 号; 国家科技支撑计划课题资助项目, 2012BAD25B03 号; 国家自然科学基金项目, 31260642 号; 江西省自然(青年)科学基金, 20132BAB214015 号; 中国博士后科学基金第六批特别资助, 2013T60650 号; 内江师范学院大学生科研立项, 13NSD-77 号。覃川杰, 博士, 讲师, E-mail: qinchuanjie@126.com

通讯作者: 陈立侨, 博士, 教授, E-mail: lqchen@bio.ecnu.edu.cn; 齐泽民, 博士, 教授, E-mail: adslmobile@126.com

收稿日期: 2013-05-27, 收修改稿日期: 2013-07-29

阴性菌鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 及鲑肾杆菌 (*Renibacterium salmoninarum*) 也能诱导 HSP70 的表达 (Brown *et al.*, 1993; Deane *et al.*, 2004), 表明 HSP70 可能在抵抗疾病的感染中发挥了重要作用。

宽体沙鳅 (*Botia reevesae*) 属于鳅科、沙鳅属, 主要分布于长江上游及支流。由于较高的经济价值和日渐枯竭的自然资源量, 宽体沙鳅的人工繁殖和养殖逐渐兴起 (岳兴建等, 2011)。生产养殖中, 饵料、粪便的发酵分解及机体的氮代谢容易引起水体氨氮含量升高, 造成宽体沙鳅等鱼类的应激反应, 降低其抗应激的能力, 增加疾病的易感性 (Nakada *et al.*, 2007; Hegazi *et al.*, 2010a)。因此, 本研究克隆了宽体沙鳅 HSP70 cDNA, 分析了氨氮胁迫和嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 侵染对宽体沙鳅 HSP70 表达的影响, 为深入探讨氨氮胁迫后宽体沙鳅抗病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 宽体沙鳅由实验室收集和驯养 2 周, 选择健康、活力好的宽体沙鳅用于实验, 平均体重为 (15.00 ± 3.87)g。

1.1.2 试剂 RNAiso Plus、RNA LA PCR™ Kit、Taq DNA 聚合酶、Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0、pMD18-T Vector、TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0、PrimeScript® RT Reagent Kit with gDNA Eraser、*E. coli* DH5α 购自宝生物工程(大连)有限公司; FastStart Essential DNA Green Master 购于罗氏诊断产品(上海)有限公司; SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司; 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 第一条链的合成

将宽体沙鳅置于冰上麻醉后处死, 尽快取其肝脏, 液氮速冻后, 于 -80℃ 保存备用。取保存的肝脏, 剪碎加入 RNAiso Plus 试剂进行匀浆, 按照试剂说明提取总 RNA。以宽体沙鳅肝总 RNA 为模板, 按照 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 试剂盒方法, 合成 cDNA。

1.3 HSP70 基因 cDNA 片段的克隆

参照 GenBank 已登录的大西洋鲑 (*Salmo salar*, ACI33977.1)、猪 (*Sus scrofa*, NP_001230836.1)、鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*, ACJ03595.1) 和鲇 (*Silurus meridionalis*, ABN79589.1) HSP70 cDNA 序列,

设计并合成引物 HSP7-F (AAGATGAAGGARATTGC)、HSP7-R (GCATTGAGCTCCTCAAARCG), Y=C/T; S=C/G; R=A/G; N=A/C/G/T (上海生工)。以宽体沙鳅肝 cDNA 为模板 PCR 扩增, 反应体系为: 10 × PCR buffer, 2.5 μL; 10 mmol/L 的 dNTP Mixes, 0.5 μL; 10 μmol/L 的 HSP7-F, 1.0 μL; 10 μmol/L 的 HSP7-R, 1.0 μL; rTaq 酶, 0.3 μL; DEPC H₂O, 19.7 μL; 反应条件为: 94℃ 预变性 4min; 94℃ 30s, 50℃ 45s, 72℃ 60s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10min。预期 PCR 产物片段大小为 546bp。扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离检测, 用 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0 回收目的片段 PCR 产物, 与克隆载体 pMD18-T 连接, 然后转化感受态细胞 *E. coli* DH5α, 挑取阳性克隆送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.4 宽体沙鳅 HSP70 基因 5'端 cDNA 扩增

以宽体沙鳅肝总 RNA 为模板, 根据 5'-RACE System 试剂盒操作合成 cDNA。以宽体沙鳅 HSP70 cDNA 片段设计和合成基因特异性引物 H7-GSPA (5'-TTGAAGTAGGCAGGGACTGTGAC-3')。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 引物为 H7-GSPA 和 UPM5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAG AGT-3'。反应条件为: 94℃ 预变性 4min; 94℃ 60s, 62℃ 60s, 72℃ 60s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10min。PCR 产物的纯化、克隆和测序同 1.3。

1.5 宽体沙鳅 HSP70 基因 3'端 cDNA 扩增

以宽体沙鳅 HSP70 cDNA 片段设计和合成基因特异性引物 H7-GSPS (5'-CTGGCTTGAATGTTCTGCGTATC-3')。使用逆转录酶 SMARTScribe™ Reverse Transcriptase 和引物 3'-CDS primer A (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)₃₀VN-3') 对肝总 RNA 进行逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 引物为 H7-GSPS 和 UPM, 反应条件同前文 1.4, 克隆和测序同前文 1.3。

1.6 宽体沙鳅 HSP70 cDNA 序列与氨基酸序列的同源性分析

将测序所得宽体沙鳅 HSP70 cDNA 片断序列在 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 进行同源比较, 提交 NCBI 数据库后。根据所得到的 cDNA 序列推导宽体沙鳅 HSP70 氨基酸序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>), 通过 Motif Scan 程序 (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>) 分析蛋白质功能位点, 采用 Clustal W 多重序列比对分析氨基酸序列特点。

1.7 胁迫对宽体沙鳅 HSP70 表达的影响

驯养宽体沙鳅期间,水温(18 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, pH=7.27 \pm 0.4, 溶解氧含量 5.0mg/L 以上。试验前配置浓度为 1g/L 的氯化氨母液。实验设置三个处理组,分别为空白对照组(CP)、氨氮胁迫组[(7.21 \pm 0.10)mg/L NH_4Cl ; ACP]、嗜水气单胞菌注射侵染组(7.2×10^8 CFU/mL, 100 μL ; AEP), 每组三个平行, 每个平行 100 尾宽体沙鳅, 分别于 0h、3h、6h、12h、24h、48h 和 96h 于每个平行随机取 3 尾宽体沙鳅, 冰上解剖后取其鳃、肝脏、脾脏和肾脏, 磷酸缓冲液清洗三次后保存于 -80°C 。实验期间, 每 6h 用奈氏试剂法测定氨氮浓度, 及时用氯化氨母液调整养殖水体的氨氮浓度, 胁迫期间维持(7.21 \pm 0.10)mg/L 总氨氮。

提取宽体沙鳅组织的总 RNA 后, 按照 TaKaRa PrimeScript[®] RT reagent with gDNA Eraser 方法, 合成 cDNA 第一链。cDNA 稀释 10 倍后, 以基因特异性引物 F-HSP7s (5'-TTGAATGTTCTGCGTATC-3')和 F-HSP7a (5'-ACCCAAGTGAGTGTCTCC-3') 进行荧光定量 PCR (LightCycler[®] Nano Real-Time PCR System, USA)。PCR 扩增体系为: cDNA 模板 1 μL 、FastStart Essential DNA Green Master 10 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 2 μL 、DEPC 处理过的双蒸水 5 μL , 总体积 20 μL 。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10s、65 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30s, 共 45 个循环。每个样品设 3 个重复, 宽体沙鳅 β -actin(K β a 5'-AAGTCCA-GACGGAGGATGG-3', K β s 5'-CCCACACTGTGCC-ATCTAT-3')基因作为实时定量 PCR 的内参(覃川杰等, 2013)。

1.8 数据统计及分析

宽体沙鳅 HSP70 mRNA 相对表达水平用 Livak 等(2001)建立的 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算。目的基因相对表达量用平均值 \pm 标准差(mean \pm S.D.)表示, 数据分析采用 SPSS18.0 统计分析软件 Duncan 法进行多重比较, 当 $P < 0.05$ 时差异显著。

2 结果

2.1 宽体沙鳅 HSP70 基因全长序列特征

以宽体沙鳅肝脏 cDNA 为模板, 采用简并引物 HSP7-F 和 HSP7-R PCR 扩增, 得到 546bp 的 PCR 产物。根据克隆的宽体沙鳅 HSP70 cDNA 片段设计 1 对特异引物 H7-GSPA 和 H7-GSPS, 并利用 3'-RACE 和 5'-RACE 分别克隆得到 1776bp 和 554bp, 序列拼接得到宽体沙鳅 HSP70 全长 cDNA。HSP70 序列全

长 2371bp, 包括 102bp 5'-UTR, 1947bp 开放阅读框(open reading frame, ORF)和 322bp 的 3'-UTR(图 1), polyA 加尾信号为 AATAAAA 等。ORF 编码 649 氨基酸, 其中包括 29 个氨基酸组成的信号肽, 分子量为 71.217kDa。

多重序列比对分析表明, 宽体沙鳅 HSP70 基因与团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)、鲢(*H. molitrix*)、翘嘴鲌(*Culter ilishaeformis*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、猪(*S. scrofa*)的同源性分别为 98%、98%、96%、96%、83%。Motif Scan 分析得出, BR-HSP70 cDNA 包括 3 个 HSP70 家族特征序列(family signatures), 分别为 IVLVGGSTRIPKIQK (197—210)、IDLGTTYs (9—16)、IFDLGGGTFDVSIL (334—348)(图 1, 图 2)。BR-HSP70 cDNA 包括 6 个 N 糖基化位点(N-linked glycosylation sites), 分为位于 35、151、360、417、487 和 584; 8 个 N-豆蔻酰化位点(N-myristoylation sites)分为位于 8、81、162、190、402、615、624 和 633(图 1, 图 2)。BR-HSP70 cDNA 还包括双向核定位序列(bipartite nuclear targeting sequences)KRKHKKDISDNKRAVRRL、ATP/GTP-结合位点 A(P-loop)AEAYLGKT 及细胞质特异性调控基序 EEVD 等(图 1, 图 2)。由此可推断, 克隆到的 cDNA 为宽体沙鳅 HSP70 基因, 命名为 BR-HSP70, 将该 cDNA 序列提交 GenBank, 登录号为 KC788196。

2.2 氨氮和嗜水气单胞菌对宽体沙鳅 HSP70 mRNA 表达的影响

氨氮胁迫和嗜水气单胞菌侵染后, 鳃、肝脏和肾脏组 HSP70 mRNA 表达水平分别在 6—48、6—96h 和 6—96h 显著增加($P < 0.05$), 均呈现先上升后下降趋势(图 3a、b、d)。病菌侵染能显著诱导脾脏中 HSP70 mRNA 表达($P < 0.05$), 且在 6—24h 内呈现先上升后下降趋势(图 3c)。此外, 肝脏、脾脏和肾脏组 HSP70 mRNA 表达均在 12h 达到最高水平, 显著高于其它处理时间点($P < 0.05$), 而鳃组织 HSP70 mRNA 表达均在 24h 达到最高水平, 显著高于其它时间点($P < 0.05$)(图 3)。

3 讨论

由于氨是硬骨鱼类机体氮代谢的主要终产物, 加之水体中的残饵和粪便的分解, 氨容易在养殖环境中积累, 对养殖鱼类产生氨胁迫(da Silva *et al.*, 2009; 胡毅等, 2012)。随着水体中氨含量的增加, 鱼类血液和组织中氨水平也会随之升高, 对鱼类的鳃、

肝和肾脏等组织产生急性或者慢性的毒性作用, 导致鱼类组织器官的病变(Ching *et al*, 2009)。研究发现, 环境胁迫会诱导机体产生分子伴侣蛋白 HSP70, 帮助细胞内多肽的正确折叠、装配和转运, 迅速修复或清除错误折叠、受损蛋白或变性蛋白, 对细胞起修复

和保护作用, 从而能有效提高机体的耐受性和抗胁迫能力(Mads, 2007)。然而, 有关 HSP70 参与调节氮氮胁迫和病菌侵染的分子研究较为缺乏, 因此本研究克隆了宽体沙鳅 HSP70 cDNA, 分析了氮氮和病菌侵染胁迫诱导 HSP70 表达的规律。

1 CGCAGAGTACAT

13 GGGGTTCCTCAAGGCGCAAGGCGCGGCAGTCGTCAGCGTTCACGTTTCATTGGCATCTCATTTATTTGGATTGCTCCAGITTTGACAAC
 103 ATGTCTAAGGGACCAGCTGTTGGCATTGATCTCGGGACCACCTACTCCTGTGTGGGTGCTCTCCAGCACGGAAGTTGAAATCATTGCT
 M S K G P A V G I D L G T T Y S C V G V F Q H G K V E I I A
 193 AATGACCAAGGAAACAGAACCACTCCAAGCTATGTAGCATTACAGATTGCGAGAGATTGATTGGAGATGTGTGCTAAAAACCGGTGGCC
 N D Q G N R T T P S Y V A F T D C E R L I G D A A K N Q V A
 283 ATGAACCCCAACACAGTCTTTGATGCCAAGCGTCTGATTGGTCGCGAGTTTGTATGACGGCGTTGTTTCAGTCTGACATGAAGCACTGG
 M N P T N T V F D A K R L I G R R F D D G V V Q S D M K H W
 373 CCTTTCAATGTCATCAATGACAATTCCTGCCAAGGTCCAAGTTGAATACAAGGGTGAGACCAAGTCATTCTACCTGAGGAAGTCTCC
 P F N V I N D N S R P K V Q V E Y K G E T K S F Y P E E V S
 463 GTCAATGGTCTTACAAGATGAAGGAAATGTGTGAGGCTATCTGGGAAAGACCGTTTCCAATGCTGTGGTCACAGTCCCTGCCTACTTC
 V N G P Y K M K E I A E A Y L G K T V S N A V V T V P A Y F
 553 AACGACTCTCAGAGGCGAGCCACCAAGATGCTGTGACCTCTGCTGGTGAATGTTCTGCGTATCATCAATGAGCCACTGCTGTGCT
 N D S Q R Q A T K D A G T I S G L N V L R I N E P T A A A
 643 ATTGCCATATGGCTGGACAAAAAGGTTGGTGTGAGAGGAAATGTCCTTATTTTGA TCTTGTGGTGGCACCTTGTATGTGTCTATCCTC
 I A Y G L D K K V G A E R N V L I F D L G G G T F D V S I L
 733 ACCATTGAAGATGGCATCTTCGAGGTCAAATCTACTGCTGGAGACACTCACTTGGGTGGAGAGACTTTGACAACCCGATGGTGAACCAC
 T I E D G I F E V K S T A G D T H L G G E D F D N R M V N H
 823 TTCATTACAGATTTAAGCGCAAGCACAAGAAGGACATTAGTGACAACAAAAGACCGTTCGCGCTGCGCAGTGCCTGCGAGAGGGCT
 F I T E F [K R K H K K D I S D N K R A V R R I] R T A C G E R A
 913 AAGCGCACCTGTCTCCAGCACTCAGGCCAGTATTGAGATTGACTCCCTCTATGAGGGTATCGACTTATACATCCATCACCAGAGCC
 K R T L S S S T Q A S I E I D L Y E G I D F Y T S I T R A S
 1003 CGTTTTGAGGAGCTCAATGCCACCTGTTCCGTGGCACCTTGGACCCGTGTTGAGAAGTCCCTTCGTGATGCCAAGATGGACAAGGCTCAA
 R F E E L N A D L F R G T L D P V E K S L R D A K M D K A Q
 1093 ATTCATGACATTGCTCGTGGTGGTGGTTCCTCGCATCCCAAGATCCAGAAAATGCTCCAAGACTACTTTAACGGCAAAGAGCTCAAC
 I H D I V L V G G S T R I P K I Q K L L Q D Y F N G K E L N ...

1183 AAGAGCATCAATCTGATGAGGCTGTGCCTACGGAGCAGCTGTCCAGGCTGCCATCCTCTCCGGTGACAAGTCTGAGAACGTTGAGGA
 K S I N P D E A V A Y G A A V Q A A I L S G D K S E N V Q D
 1273 CTCTGGTCTGTGATGTCACCTCTCTCTTGGAAATGAGACCGCCGGTGGAGTCATGACTGTACTCATCAAACGTAACACCAACAATC
 L L L L D V T P L S L G I E T A G G V M T V L I K R N T T I
 1363 CCAACCAACAGACTCAGACTTTTACCACCTACTCTGACAACAGCCTGGTGTGCTCATTAGGCTCTATGAGGGTGGCGTGAATGACG
 P T K Q T Q T F T T Y S D N Q P G V L I Q V Y E G E R A M T
 1453 AAGGATAACAATGCTGGGCAAGTTGAGCTTACTGGAATCCCCCAGCACCTCGTGGGTTCCCCAGATTGAGGTACCTTTGACATT
 K D N N L L G K F E L T G I P P A P R G V P Q I E V T F D I
 1543 GATGCCAACGGCATTATGAATGTTTCAGCTGTCGATAAGAGCACTGGAAAGGAGAACAAGATCACAATCACAACGATAAGGGTCTGCTC
 D A N G I M N V S A V D K S T G K E N K I T I T N D K G R L
 1633 AGCAAGGAGGACATTGAACGCATGGTGCAGGAGGCTGAGAAATAC AAGGCTGAGGATGATGTGCAGCGTGACAAGGTGCTTCAAAGAA
 S K E D I E R M V Q E A E K Y K A E D D V Q R D K V S S K N
 1723 GGTCTGGAGTACATCGCTTCAACATGAAGTCAACTGTGGAAGATGAGAACTGACCGCAAGATCAGTATGAGGACAAACAGAAATC
 G L E S Y A F N M K S T V E D E K L N G K I S D E D K Q K I
 1813 CTTGACAAGTGAATGAAGTCACTAGTTGGCTTGACAAGAACCAGACTGCTGAGAGGGAAGAATTTGAGCATCAGCAGAAAGAGCTGGAG
 L D K C N E V I S W L D K N Q T A E R E E F E H Q Q K E L E
 1903 AAGGTGTGCAATCCAATCAACCAAACCTTATCAGAGTCTGGAGGCATGCCAGGTGGAATGCCTGATGGTATGCCCGGTGGCTTCCCA
 K V C N P I I T K L Y Q S A G G M P G G M P D G M P G G F P
 1993 GGGGCTGGCTCTGCTCCAGGAGGTGGATCTCTGGCCCAACATTGAGGAGGTTGATTAAGCCGTTCCAAAGCTACTGTGCTACCTCCAT
 G A G S A P G G G S S G P T I [E E V D] *
 2083 AGTAATGTTTACTGTTGCCCTCTGTAGTTGGACTCCTCTAAAATGTTACTTAATATTTATCATACTTCAATTTGAGAGATAGTGTG
 2173 CATTCTATAAAAAGGAAATAGGATATCATTTATTTCCAAACCACAGGAAACAAATTTTCAAGATAAATGACACAACCAATTTATCAATT
 2263 TGTGAAATGTTCAATTTCAAGACTTTTCCAAATGCCTTGGTGGTGTAGATGATCAATAAAATGATTACTTGTGCTGCTATTCCAAAA
 2353 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

图 1 宽体沙鳅 HSP70 cDNA 全长及推导的氨基酸序列

Fig.1 Full-length of cDNA and deduced acid sequences of HSP70 from *B. reevesae*

双下划线表示 ATP/GTP-结合位点区域, N-糖基化位点和 N-豆蔻酰基化位点分别用下划线和下划线标注, 双下划线表示 HSP70 家族特征区域, EEVD 位点和双向核定位序列分别用虚线框和方框表示, 虚线框表示 EEVD 区域。图 2 同

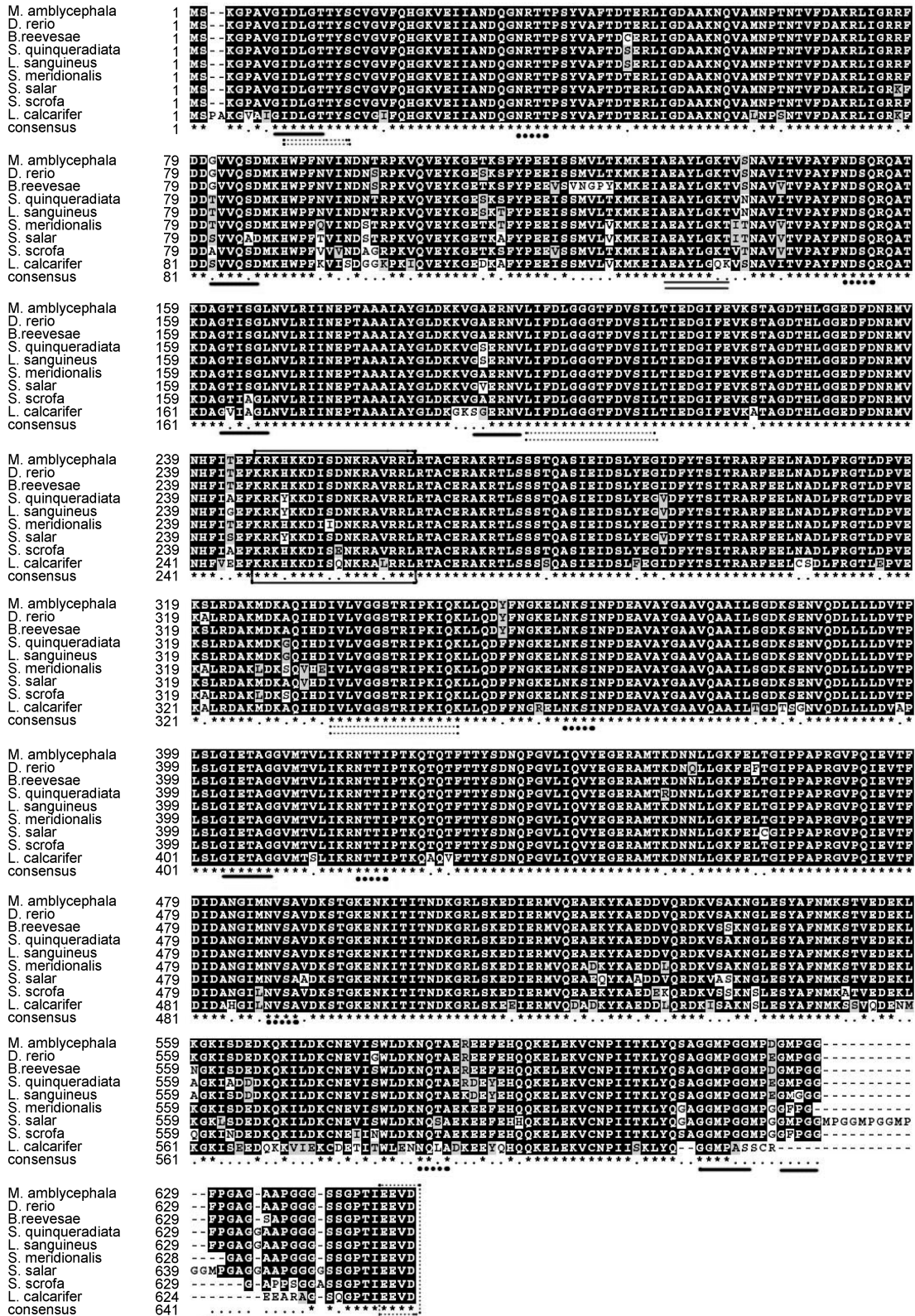


图 2 宽体沙鲈与其它动物的 HSP70 氨基酸的多重序列比对结果

Fig.2 Multiple alignment of amino acid sequences of HSP70 from *B. reevesae* and other species *Sus scrofa* (GenBank: NP_001230836.1), *Salmo tatar* (ACI33977.1), *Seriola quinqueradiata* (BAG82848.1), *Lutjanus sanguineus* (ADK88904.1), *Danio rerio* (AAQ97970.1), *Lates calcarifer* (AEH27544.1), *Megalobrama amblycephala* (ACC93993.2), *Silurus meridionalis* (ABN79589.1)

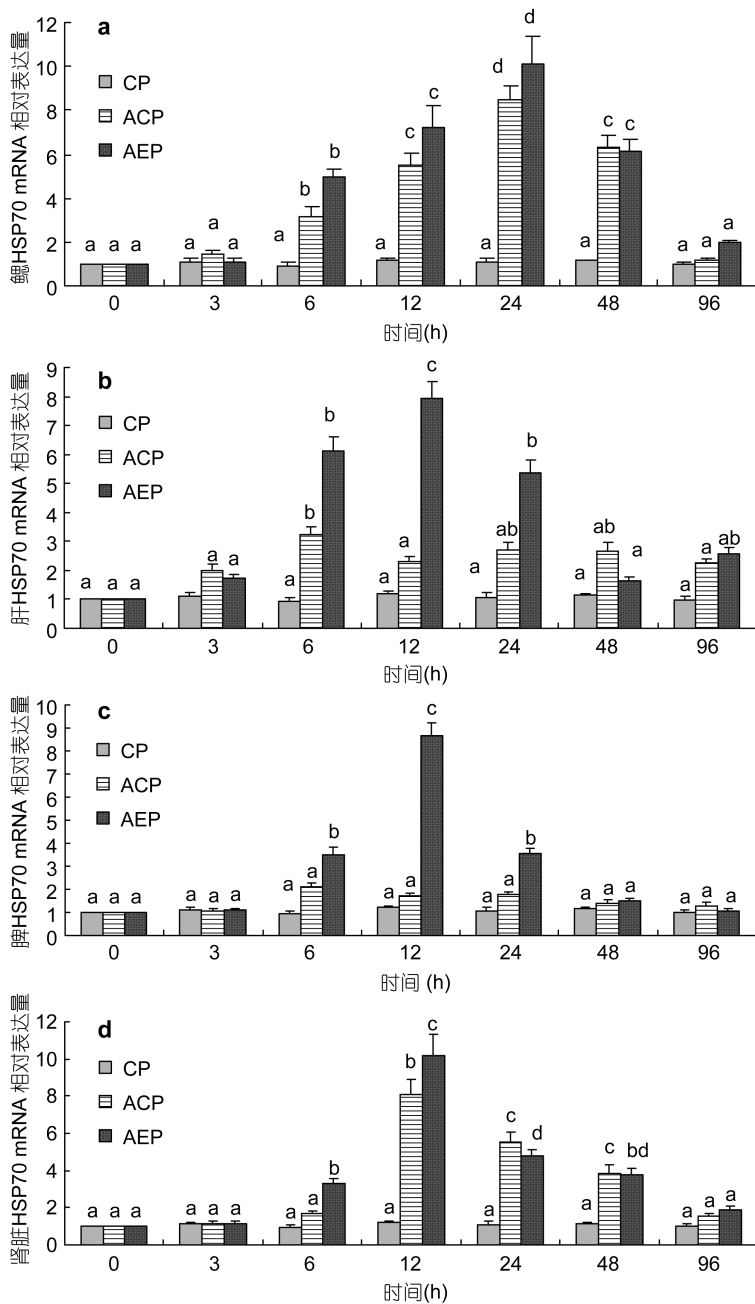


图3 氨氮胁迫和嗜水气单胞菌感染对 HSP70 mRNA 表达的影响 (平均值 \pm 标准误, $n=9$)

Fig.3 The effect of ammonia-N exposure and *A. hydrophila* challenge on HSP70 mRNA expression (mean \pm S.E.; $n=9$)

a. 鳃; b. 肝; c. 脾脏; d. 肾脏。图中同一处理不同时间点标注不同字母表示差异显著 ($P<0.05$); 反之表示差异不显著 ($P>0.05$)

多重序列比对分析表明, 宽体沙鳅 HSP70 基因与团头鲂、鲢等鱼类的同源性均为 98%。序列分析表明, BR-HSP70 含有 HSP70 家族的 3 个家族标签, 双向核定位序列和 ATP/GTP-结合位点 A 结构域(Song *et al*, 2006)。3 个家族标签的共同结构域模式分别为 [IV]-D-L-G-T-[ST]-x-[SC]、[LIVMF]-[LIVMFY]-[DN]-

[LIVM FS]-G-[GSH]-[GS]-[AST]-x(3)-[ST]-[LIVM]-[LIVMFC] 和 [LIVMY]-x-[LIVMF]-x-G-G-x-[ST]-x-[LIVM]-P-x-[LIVM]-x-[DEQKRS TA], 且从丽蝇蛹集金小蜂(*Nasonia vitripennis*)到智人(*Homo sapiens*)均高度保守(Song *et al*, 2006)。此外, BR-HSP70 还包含一个 GGMP 的四肽结构域。Deane 等(2005)认为在鱼类 HSP70 家族中, 碳端含有 1 个 GGMP 四肽序列的 HSP70 属于诱导性 HSP70, 而碳端含有多个 GGXP 四肽重复序列是组成型 HSP70。因 BR-HSP70 只含一个 GGMP 四肽序列, 表明 BR-HSP70 属于诱导性 HSP70。在多种真核生物中均发现 HSP70 碳末端具有高度保守的细胞质特异性调控基序 EEVD(Wu *et al*, 2003), 本研究克隆得到的 BR-HSP70 碳末端也含有该结构域。序列分析表明本研究克隆得到的 cDNA 为宽体沙鳅 HSP70, 且 HSP70 家族高度保守。

HSP70 是一类存在于所有生物体细胞内比较保守的基因, 冷热及重金属等非生物胁迫能诱导机体 HSP70 的大量表达, 对生物体的抗逆能力和环境适应能力具有重要的影响。Zhang 等(2012)研究发现, 在无胁迫时, 牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)组织中 HSP70 mRNA 表达水平低下, 而热刺激会刺激 HSP70 mRNA 表达显著上调($P<0.05$)。萘(naphthalin)胁迫、 Cu^{2+} 等也能诱导海湾扇贝血细胞及牡蛎的消化道和鳃组织显著地表达 HSP70 mRNA ($P<0.05$) (Song *et al*, 2006; Zhang *et al*, 2012)。本研究发现, 氨氮胁迫下, 宽体沙鳅鳃、肝及肾等组织中 HSP70 mRNA 表达显著上调($P<0.05$)。氨氮胁迫 6h 后, 鳃中 HSP70 mRNA 显著上升($P<0.05$), 其原因可能是鳃组织最先暴露于氨氮胁迫中, 最先受到损伤的组织。这种现象也存在于其它物种中, Cheng 等(2007)研究报道, 在热刺激的实验时间内, 太平洋鲍(*Haliotis discushannai*)鳃中 HSP70 mRNA 均高于肌肉组织。Benli 等(2008)推测, 氨胁迫导致鱼类鳃组织受损, 鳃上皮细胞发生病变, 出现细胞增生和肿大现象。此外, 由于水体中氨氮含量的升高, 鱼类血液总氨氮(total ammonia nitrogen, TAN)含量也会随之升高, 用 5mg/L 和 10mg/L TAN 暴露罗非鱼幼鱼, 罗非鱼血清中的 TAN 含量较正常养殖罗非鱼的含量增加了两倍

(Hegazi *et al*, 2010b)。血液中氨氮含量的增加会损伤鱼类内脏组织, 导致鱼类肝细胞肿大, 水肿变形, 肾脏充血肿大等, 因而氨氮胁迫也会损伤鱼类肝脏、肠道、脾脏等组织和器官; 而肝脏等器官会大量表达 HSP70, 消除氨氮的胁迫损伤。本研究发现, 氨氮暴露能诱导宽体沙鳅肝脏、脾脏和肾脏组织显著地表达 HSP70 mRNA ($P<0.05$)。Jing 等(2013)研究报道, 重金属胁迫也会导致金丝鱼(*Tanichthys albonubes*)肝脏 HSP70 mRNA 显著上升($P<0.05$)。上述研究表明氨氮胁迫不仅损伤鱼类的鳃等体表组织, 还会通过血氨作用于鱼类的肝脏、肾脏等组织。

作为应激蛋白, HSP70 不仅能维持细胞内环境稳定, 还有保护机体免受病原胁迫的作用。Nishimura 等(1997)研究报道, HSP70 能保护被霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)侵染的哺乳动物巨噬细胞免受肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF)介导的细胞死亡(Nishimura *et al*, 1997)。在水生动物中, 病原菌 *V. anguillarum* 侵染后, 太平洋鲍(Pacific abalone, *Haliotis discushannai*)的肌肉、鳃和海湾扇贝(bay scallop, *Argopecten irradians*)血淋巴细胞中会显著地表达 HSP70 mRNA ($P<0.05$) (Song *et al*, 2006; Cheng *et al*, 2007)。溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)侵染会显著上调海鲷(sea bream, *Sparus sarba*)和虹鳟(rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*) HSP70 mRNA 表达($P<0.05$) (Deane *et al*, 2004)。本实验也发现, 嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)能诱导宽体沙鳅肝脏、脾脏和肾脏组织中 HSP70 mRNA 显著表达($P<0.05$)。类似地, Wei 等(2012)研究发现, *V. anguillarum* 侵染能显著地诱导鳊(miiuy croaker, *Miichthys miiuy*)肝、脾和肾组织 Mini-HSP70 表达($P<0.05$)。上述研究表明, 肝脏、脾脏及肾脏等组织表达的 HSP70 在抵御外源病菌侵染中发挥了重要的作用。Song 等(2006)及 Encomio 等(2004)推测, 病原侵染机体后, 肝、脾脏和肾组织大量表达的 HSP70 是向免疫细胞传递的危险信号(danger signal), 可促进机体的免疫应答, 以保护细胞质组分免受多种多样的生物及非生物胁迫或损伤。

本研究结果表明, 氨氮胁迫和病菌侵染刺激下, 宽体沙鳅均可显著地表达 HSP70 mRNA, 保护机体免受环境胁迫的损伤。然而生产养殖中, 水体氨氮含量的升高往往会导致病原大量滋生。因此, 深入研究氨氮胁迫后, 病原侵染对宽体沙鳅及其它养殖鱼类 HSP70 等应激蛋白的表达影响, 有助于分析氨氮胁迫下疾病发生的分子机制。

参 考 文 献

- 岳兴建, 王 芳, 谢碧文等, 2011. 沱江流域宽体沙鳅的胚胎发育. 四川动物, 30(3): 390—398
- 胡 毅, 黄 云, 钟 蕾等, 2012. 氨氮胁迫对青鱼幼鱼鳃丝 Na^+/K^+ -ATP 酶、组织结构及血清部分生理生化指标的影响. 水产学报, 36(4): 538—548
- 覃川杰, 陈立侨, 岳兴建等, 2013. 宽体沙鳅(*Botia reevesae*) β -肌动蛋白基因的 cDNA 克隆与表达分析. 海洋与湖沼, 44(2): 396—402
- Benli A C K, Koksul G, Ozkul A, 2008. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): Effects on gill, liver and kidney histology. Chemosphere, 72(9): 1355—1358
- Brown D C, Bradley B P, Paynter K T, 1993. The physiological effects of protozoan parasitism on the eastern oyster, *Crassostrea virginica*: induction of stress proteins. J Shellfish Res, 12: 135—136
- Chen J C, Liu P C, Lin Y T, 1988. Super intensive culture of red-tailed shrimp *Penaeus penicillatus*. Journal of World Aquaculture Society, 19(3): 127—131
- Cheng P, Liu X, Zhang G *et al*, 2007. Cloning and expression analysis of a HSP70 gene from pacific abalone (*Haliotis discushannai*). Fish Shellfish Immunol, 22(1—2): 77—87
- Ching B Y, Chew S F, Wong W P *et al*, 2009. Environmental ammonia exposure induces oxidative stress in gills and brain of *Boleophthalmus boddarti* (mudskipper). Aquatic Toxicology, 95(3): 203—212
- Da Silva J M, Coimbra J, Wilson J M, 2009. Ammonia sensitivity of the glass eel (*Anguilla anguilla* L.): salinity dependence and the role of branchial sodium/potassium adenosine triphosphatase. Environ Toxicol Chem, 28(1): 141—147
- Deane E E, Li J, Woo N Y, 2004. Modulated heat shock protein expression during pathogenic *Vibrio alginolyticus* stress of sea bream. Dis Aquat Organ, 62: 205—215
- Deane E E, Woo N Y S, 2005. Cloning and characterization of the hsp70 multigene family from silver sea bream: Modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation. Biochem Biophys Res Commun, 330(3): 776—783
- Encomio V G, Chu F L, 2004. Characterization of heat shock protein expression and induced thermotolerance in *P. marinus* parasitized eastern oysters: lab and field studies. J Shellfish Res, 23: 289—290
- Hegazi M M, Attia Z I, Ashour O A, 2010a. Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure. Aquatic Toxicology, 99(2): 118—125
- Hegazi M M, Attia Z I, Hegazi Ma M *et al*, 2010b. Metabolic consequences of chronic sublethal ammonia exposure at cellular and subcellular levels in Nile tilapia brain. Aquaculture, 299(1—4): 149—156

- Jing J, Liu H C, Chen H H *et al*, 2013. Acute effect of copper and cadmium exposure on the expression of heat shock protein 70 in the Cyprinidae fish *Tanichthys albonubes*. *Chemosphere*, 91(8): 1113—1122
- Liew H J, Sinh A K, Nawata C M *et al*, 2013. Differential responses in ammonia excretion, sodium fluxes and gill permeability explain different sensitivities to acute high environmental ammonia in three freshwater teleosts. *Aquatic Toxicology*, 126: 63—76
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4): 402—408
- Mads D, 2007. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Letters*, 581: 3702—3710
- Nishimura H, Emoto M, Kimura K *et al*, 1997. Hsp70 protects macrophages infected with *Salmonella choleraesuis* against TNF-alpha-induced cell death. *Cell Stress Chaperones*, 2(1): 50—59
- Randall D J, Tsui T K N, 2002. Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin*, 45: 17—23
- Song L, Wu L, Ni D *et al*, 2006. The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819) responding to bacteria challenge and naphthalin stress. *Fish Shellfish Immunol*, 21(4): 335—345
- Sorensen J G, Kristensen T N, Loeschcke V, 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol Lett*, 6(11): 1025—1037
- Wei T, Sun Y N, Shi G *et al*, 2012. Characterization and SNP variation analysis of a HSP70 gene from miiuy croaker and its expression as related to bacterial challenge and heat shock. *Fish & Shellfish Immunology*, 33(3): 632—640
- Wicks B J, Randall D J, 2002. The effect of sub-lethal ammonia exposure on fed and unfed rainbow trout: the role of glutamine in regulation of ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 132(2): 275—285
- Wu L, Song L, Xu W, 2003. Identification and cloning of heat shock protein 70 gene from scallop *Chlamys farreri*. *High Technol Lett*, 13: 75—79
- Zhang Z, Zhang Q, 2012. Molecular cloning, characterization and expression of heat shock protein 70 gene from the oyster *Crassostrea hongkongensis* responding to thermal stress and exposure of Cu^{2+} and malachite green. *Gene*, 497(2): 172—180

THE CLONING AND EXPRESSION OF HEAT SHOCK PROTEIN 70 cDNA IN *BOTIA REEVESAE*

QIN Chuan-Jie¹, GU Shun-Zhang², ZHAO Da-Xian³, CHEN Li-Qiao⁴,
LI Er-Chao⁴, QI Ze-Min¹

(1. School of Life Science, Neijiang Normal University, Neijiang, 641000; 2. Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai, 201207; 3. School of Life Science and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang, 330031; 4. College of Life Science, East China Normal University, Shanghai, 200062)

Abstract We investigated the effect of pathogenic bacterial challenge and acute sublethal ammonia-N exposure on heat shock protein 70 (HSP70) expression in *Botia reevesae*. Results show that the HSP70 cDNA in *B. reevesae* is 2371bp, containing an open reading frame at 1947bp, a 102bp 5'-untranslated region (UTR), a 322bp 3'-UTR, and five common putative functional domains. By sequence comparisons, we found that the deduced amino acid sequence of the HSP70 had an overall identity of 98%, and 83% to that of *Megalobrama amblycephala* and *Sus scrofa*, respectively. Real time quantitative PCR analysis showed the HSP70 mRNA expression levels was significantly ($P < 0.05$) up-regulated in gill, liver, spleen, and kidney by *Aeromonas hydrophila* challenge or under ammonia-N exposure. It is believed that *B. reevesae* HSP70 is involved in the resistance to pathogenic bacteria stress.

Key words *Botia reevesae*; heat shock protein 70; ammonia-N; *Aeromonas hydrophila*; stress