

doi: 10.7541/2014.134

三角帆蚌热休克蛋白 60 基因克隆及其表达分析

吴圣楠¹ 刘大伟² 刘毅¹ 胡宝庆² 张建强¹ 王艳¹ 王婷¹

(1. 江西师范大学生命科学学院, 南昌 330022; 2. 南昌大学生命科学与食品工程学院, 南昌 330031)

摘要: 利用 3'RACE 技术, 对高通量转录组测序所得三角帆蚌 HSP60 基因(*hcHSP60*)长片段(2629 bp)进行了 3'末端克隆, 经拼接得到 *hcHSP60* cDNA 全长序列。采用多种分子生物学软件对 *hcHSP60* cDNA 全长序列进行了特征分析, 并采用 RT-PCR 技术检测了其组织分布及经冷热应激后的表达变化。结果显示, *hcHSP60* cDNA 全长为 2807 bp, 其中开放阅读框为 1707 bp, 编码 568 个氨基酸, 预测分子量大小为 61.04 ku, pH 7.0 时的理论等电点为 5.63。序列中不存在信号肽与跨膜结构。氨基酸序列保守性分析表明, *hcHSP60* 氨基酸序列与光滑双脐螺 HSP60 同源性最高(达 82%), 而与牙鲆、白云金丝鱼 HSP60 的同源性最低(为 75%)。RT-PCR 检测结果表明, *hcHSP60* 在肝胰腺中的表达水平最高, 而在血液中的表达水平最低。30℃ 与 35℃ 水温处理三角帆蚌 4h 后, 各组织中 *hcHSP60* 表达水平明显上升, 表明 *hcHSP60* 可能在三角帆蚌耐热应激反应中起着重要作用。

关键词: 三角帆蚌; 热休克蛋白 60; 序列分析; 表达

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2014)05-0897-06

热休克蛋白(Heat shock proteins, HSPs)是生物体在受到物理或化学刺激时发生应激反应所产生的一类蛋白质, 又名应激蛋白。根据分子量的不同, 可以将 HSPs 分为 HSP90、HSP70、HSP60 及小分子量 HSP 等若干家族^[1]。HSPs 首次从热激果蝇幼虫唾液腺部位分离得到^[2]。HSPs 分子在正常状态下能帮助新生肽链折叠, 而在应激状态下, HSPs 被大量诱导, 其分子伴侣作用变大, 当细胞受到各种刺激时, 蛋白质肽链由折叠变成延伸, 空间构型也发生改变, 进而与突变蛋白结合, 使后者解离, 并通过多肽折叠、复性以维持细胞自稳定, 从而防止细胞受损^[3, 4]。

HSP60 分子是 HSPs 家族中最为保守的分子伴侣蛋白, 大多数成员为组成型表达蛋白^[5]。HSP60 在真核生物中主要存在于线粒体中, 蛋白 N-末端有一个线粒体定位序列, 能够引导 HSP60 进入线粒体中^[6]。HSP60 基因如发生突变, 会导致线粒体功能障碍^[7]。HSP60 在细胞生命活动中占据着非常重要的地位, 当机体处于应激状态时, HSP60 被大量合成,

进入循环系统, 协助变性蛋白恢复其天然结构^[8]。迄今除了研究最多的细菌 HSP60, 还在赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)^[9]、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)^[10]、草鱼(*Ctenopharynxodon idellus*)^[11]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[12]等物种中克隆出 HSP60 全长序列, 并对它们的基因结构、功能和组织表达进行了研究, 而针对软体动物 HSP60 的研究则尚不多见。

三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)是我国特有的淡水育珠蚌, 用其培育的珍珠质量上佳, 近年淡水育珠蚌培育珍珠开始发展^[13]。但日益严重的病害给我国淡水育珠产业造成了重大经济损失。HSPs 是生物体内的重要抗感染和抗逆蛋白分子, 对三角帆蚌 HSPs 的深入研究有助于我国淡水育珠产业的健康发展。本研究利用 3'RACE 技术, 对高通量转录组测序所得三角帆蚌 HSP60 基因(*hcHSP60*)长片段(2629 bp)进行了 3'末端克隆, 经拼接得到 *hcHSP60* cDNA 全长序列, 采用多种分子生物学软件对其进

收稿日期: 2013-08-11; 修订日期: 2014-03-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060359); 江西省自然科学基金(20122BAB204017)资助

作者简介: 吴圣楠(1992—), 女, 江西鹰潭人; 硕士研究生; 主要从事分子免疫学研究。E-mail: wusn2013@163.com

通信作者: 刘毅, E-mail: yiliusan@sina.com

行特征分析, 并采用 RT-PCR 技术检测了其在多种组织中的表达分布及在冷热应激后的变化情况。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用三角帆蚌购自南昌市人民公园菜市场, 体长约 10—15 cm。购回实验室后, 立即用自来水将蚌壳上的淤泥仔细刷洗干净, 置于盛有曝气自来水的水族箱(100 cm×60 cm×45 cm)中暂养, 箱中水量不宜过多, 以刚刚淹没蚌体为佳。每天用曝气自来水换水 1 至 2 次, 充气泵充气饲养, 暂养 1 周确认蚌体健康无病之后方开始实验。

1.2 核酸提取与 cDNA 模板合成

采用 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂盒提取总 RNA, 操作过程中(包括组织总 RNA 提取以及应用 RNA 的所有相关实验)所用离心管及枪头都经 1 g/L 焦碳酸二乙酯(Diethylpyrocarbonate, DEPC)水处理过夜, 琉璃器皿及金属器械经 180℃ 高温烘烤 6h 以上使 RNase 彻底失活。RNA 的具体提取参考试剂盒的说明书进行。cDNA 合成按 SMART cDNA Syn-

thesis Kit 操作手册进行。

1.3 *hcHSP60* cDNA 全长获得

始自 *hcHSP60* cDNA 5'末端的 1 条长段序列(2629 bp)由转录组高通量测序结果获得, 转录组测序工作由北京贝瑞和康生物技术有限公司完成。依据此序列, 采用 Clontech 公司的 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒获得该基因的 3'端序列。扩增时共设计 2 条引物: HSP60-F1 与 HSP60-F2。首先使用逆转录酶 SMARTScribe™ Reverse Transcriptase 和引物 3' CDS primer A 对总 RNA 进行逆转录合成 cDNA, 再使用引物 HSP60-F1 和 UPM (Long 引物和 Short 引物按 1:3 比例混匀所得), 以上面合成的 cDNA 为模板进行第一轮 PCR 扩增; 将第一轮 PCR 扩增产物稀释 50 倍, 然后用引物 HSP60-F2 和 UPM 进行第二轮 PCR 扩增, 将第二轮 PCR 产物进行电泳并对目的条带进行切胶回收纯化, 纯化后的 PCR 产物与 pMD18-T 进行连接, 转化后挑取阳性克隆测序, 最后进行全长序列拼接, 得到 *hcHSP60* cDNA 全长序列。用于 *hcHSP60* 基因扩增与表达的引物见表 1。

表 1 *hcHSP60* 基因扩增与表达所用引物
Tab. 1 Primers used in amplification and expression of *hcHSP60*

引物 Primers	用途 Application	序列 Sequence (5'-3')
Long	RACE	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
Short	RACE	CTAATACGAC TCACTATAGGGC
HSP60-F1	3'- RACE	ACACCTTGGGTTTCATCTCTACGGCTC
HSP60-F2	3'- RACE	CTGAGTTCACAGACAAGAGTATGGTAGG
β-actinF	RT-PCR	ACGGATAACACAAGGAAAGGAAAC
β-actinR	RT-PCR	ATGGATGGAAACACGGCTCT
HSP60F	RT-PCR	CATTTGGCACCCTGTTTAT
HSP60R	RT-PCR	TATCACATTCGACCCTTT

1.4 *hcHSP60* 基因序列分析与系统进化树构建

利用 ExPASy(<http://expasy.pku.edu.com>) 上软件分析 *hcHSP60* 氨基酸序列与开放阅读框(ORF); 采用 NCBI BLASTp 进行序列同源基因搜索; 利用 SignalP 4.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测分析信号肽, 用 TMHMM 软件预测跨膜区; 利用 ClustalW 1.83 软件比较 *hcHSP60* 与其他物种 HSP60 氨基酸序列同源性; 采用 Mega 4.0 软件的邻接法(N-J 法)构建基于氨基酸序列的系统进化树, 并采用自展法(Bootstrap Method)对其可靠性进行分析验证(1000 个假重复数)。用于氨基酸比对和进

化树构建的基因名称及其 GenBank 序列登录号见表 2。

1.5 *hcHSP60* 在不同组织中的表达

从暂养蚌的水族箱中选取 3 个蚌, 取血液、鳃、肝胰腺、外套膜及肌肉等 5 种组织, 用 Trizol 法提取总 RNA, 用紫外分光仪(UV-5100)测定浓度并统一稀释至 100 ng/μL, 各取 2 μL 反转录成 cDNA, 利用 RT-PCR 法检测室温下(20℃)*hcHSP60* 在三角帆蚌不同组织中的表达, 引物见表 1。PCR 扩增条件: 94℃ 5min; 94℃ 30s, 58℃ 30s, 72℃ 90s, 40 循环; 72℃ 10min。产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

表 2 用于氨基酸序列比对及进化树构建的 60 基因登录号
Tab. 2 Genes of HSP60 used for multiple alignments and construction of phylogenetic tree

物种名 Species	蛋白 Protein	登录号 Accession No.
光滑双脐螺 <i>Biomphalaria glabrata</i>	HSP60	ACL00842.1
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	HSP60	NP_001012934.1
灰仓鼠 <i>Cricetulus griseus</i>	HSP60	XP_003504389.1
小家鼠 <i>Mus musculus</i>	HSP60	AAI06113.1
火鸡 <i>Meleagris gallopavo</i>	HSP60	XP_003207490.1
家猫 <i>Felis catus</i>	HSP60	XP_003991044.1
海象 <i>Odobenus rosmarus divergens</i>	HSP60	XP_004393550.1
狢猴 <i>Callithrix jacchus</i>	HSP60	XP_002749639.1
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	HSP60	XP_003456322.1
大熊猫 <i>Ailuropoda melanoleuca</i>	HSP60	XP_002920071.1
赤点石斑鱼 <i>Epinephelus akaara</i>	HSP60	ADM73510.1
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	HSP60	ABB76381.1
白云金丝鱼 <i>Tanichthys albonubes</i>	HSP60	ADK27679.1

1.6 *hcHSP60* 在冷热应激后的表达变化

将蚌分成 7 组(每组放置 3 个), 分别置于 5℃、10℃、15℃、20℃、25℃、30℃及 35℃等 7 种水温, 放置 4h 后分别取其血液、鳃、肝胰腺、外套膜及肌肉等组织, Trizol 法提取各组织的总 RNA, 利用 RT-PCR 法检测 *hcHSP60* 在不同组织中的表达变化, PCR 扩增条件同 1.5。

通过 Quantity One 软件计算目的条带和 β -actin 条带的光密度比值, 结果使用 SPSS20.0 软件中的单因素方差分析法(One-way ANOVA)进行统计分析, $P<0.05$ 为显著性差异。

2 结果

2.1 *hcHSP60* cDNA 全长及推导的氨基酸序列特征

以三角帆蚌血液组织总 RNA 为模板, 通过 3' RACE-PCR 扩增, 获得长度为 178 bp 扩增片段, 序列拼接获得的 *hcHSP60* 基因 cDNA 全长为 2807 bp (GenBank 登录号: KF941200), 其中 5'端非翻译区 69 bp, 3'端非翻译区 1031 bp, 有典型的加尾信号(AATAAA)和 PolyA 尾巴。该基因开放阅读框为 1707 bp, 编码 568 个氨基酸, 预测分子量大小为 61.04 ku, pH 7.0 时的理论等电点为 5.63。多重比对结果证明 *hcHSP60* 符合 HSP60s 所有特征。使用 SignalP 4.0 预测 *hcHSP60* 无信号肽, TMHMM 预测 *hcHSP60* 无跨膜区。

2.2 序列同源性

利用 Clustal X1.8 和 GeneDoc 软件对 13 个物种

的 HSP60 氨基酸序列进行了同源比对(表 2)。*hcHSP60* 氨基酸序列与光滑双脐螺(*Biomphalaria glabrata*) HSP60 的同源性最高, 达 82%; 与牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)与白云金丝鱼(*Tanichthys albonubes*) HSP60 的同源性最低, 为 75%。

2.3 HSP60 系统进化树

应用 Mega4.0 软件按邻接法构建了 HSP60 系统进化树(图 1)。结果显示, 所列物种分为 4 个分支, 其

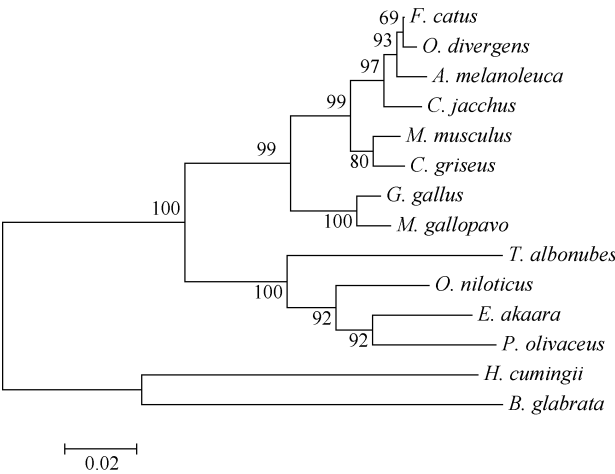


图 1 HSP60 系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of HSP60 gene
使用 Clustal X 1.83 软件进行序列比对, MEGA 4.0 按邻接法构建系统进化树。结点处数值代表 1000 评估的自举检验置信度。HSP60 氨基酸序列登录号详见表 2

Full-length amino acid sequences were aligned using Clustal X 1.83 and a phylogenetic tree was constructed using Neighbor-Joining algorithm with MEGA 4.0 (1000 bootstrap). The GenBank accession numbers of HSP60 are shown in Tab. 2

中, *hcHSP60* 与光滑双脐螺 *HSP60* 在一个分支上, 表明在所选的物种中, *hcHSP60* 与光滑双脐螺 *HSP60* 之间的分子进化地位最近。

2.4 *hcHSP60* 组织表达

提取室温条件下(20℃)的三角帆蚌血液、鳃、肝胰腺、外套膜及肌肉等 5 种组织总 RNA, 经逆转录得到 cDNA, 利用 RT-PCR, 分别扩增得到长度为 141 bp 的 *hcHSP60* 片段和长度为 145 bp 的 β -actin 片段(图 2)。从图 4 可以看出, *hcHSP60* 在各个组织中均有表达, 以肝胰腺中的表达水平最高, 其次为肌肉、外套膜及鳃, 而在血液中的表达最低。

2.5 冷热应激后的 *hcHSP60* 表达变化

由图 3 可以看出, 经 30℃ 或 35℃ 刺激 4h 后, 各组织中 *hcHSP60* 的表达水平明显高于其他几种温度下的表达。其中, 血液 *hcHSP60* 表达峰值出现于 35℃, 而其他 4 种组织中的 *hcHSP60* 表达峰值皆出现于 30℃。

3 讨论

HSP60 广泛存在于原核生物和真核生物中, 是 *HSPs* 家族中最为保守的细胞保护作用之伴侣蛋白分子^[5]。不同物种的 *HSP60* 基因结构非常保守, 赤点石斑鱼 *HSP60* 基因编码 578 个氨基酸^[7], 三疣梭子蟹的 *HSP60* 基因编码 577 个氨基酸^[10]。本研究所克隆 *hcHSP60* 开放阅读框编码 568 个氨基酸, 蛋白质分子量为 61 ku, 等电点为 5.63。氨基酸序列比对显示 *hcHSP60* 和其他物种 *HSP60* 氨基酸序列有较高的

相似性, 都在 70% 以上, 与光滑双脐螺 *HSP60* 相似性高达 82%。系统进化分析表明 *hcHSP60* 与同属软体动物的光滑双脐螺聚为一支, 表明本研究所克隆的 *hcHSP60* 确为热休克蛋白 60 家族成员。

hcHSP60 作为 *HSP60* 家族中的一员, 含有 *HSP60* 家族信号位点(AAVEEGIVPGGG), 而其序列中不存在信号肽, 说明它不是分泌蛋白。依据

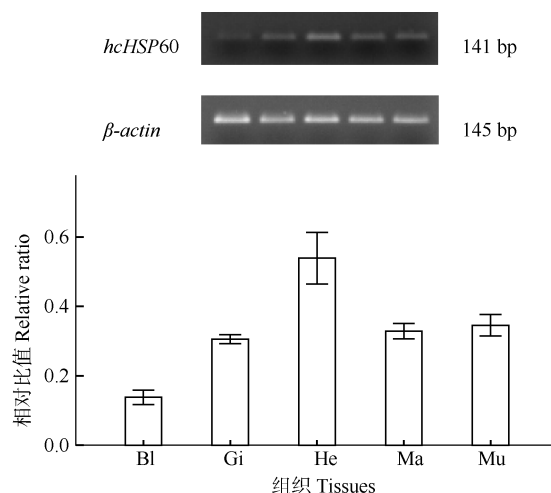


图 2 *hcHSP60* 在三角帆蚌不同组织中的表达

Fig. 2 The expression of *hcHSP60* in different tissues of *H. cumingii* RT-PCR 法检测 *hcHSP60* 在血液(BI)、鳃(Gi)、肝胰腺(He)、外套膜(Mt)及肌肉(Mu)5 种组织中的表达, 以 β -actin 作内参, 结果用特异基因与内参基因之间的条带亮度相对比值进行统计分析 ($n=3$)

RT-PCR was performed to detect the expression of *hcHSP60* in 5 different tissues including blood (BI), gill (Gi), hepatopancreas (He), mantle (Ma) and muscle (Mu). β -actin was used as an internal control to normalize the samples. Data are presented as mean $\pm$ SD ($n=3$)

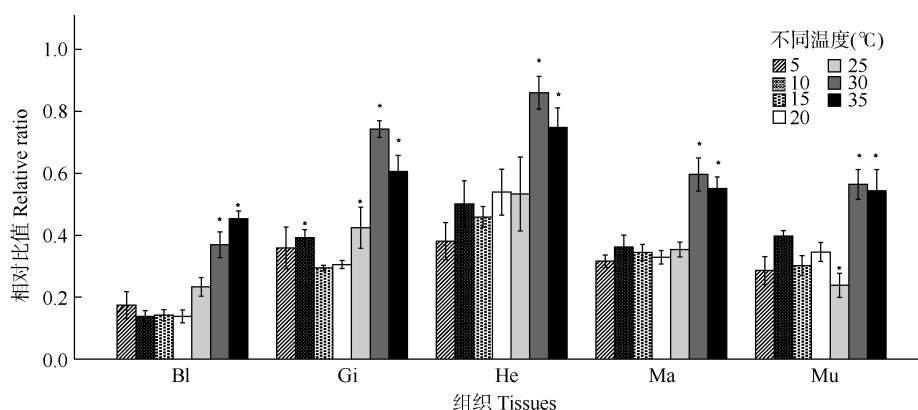


图 3 *hcHSP60* 基因在冷热应激后的表达

Fig. 3 The expression of *hcHSP60* under different water temperature

RT-PCR 法检测经 5℃、10℃、15℃、20℃、25℃、30℃及 35℃刺激 4h 后, *hcHSP60* 基因在血液(BI)、鳃(Gi)、肝胰腺(He)、外套膜(Mt)及肌肉(Mu)5 种组织中的表达变化情况。以 β -actin 作内参, 结果用特异基因与内参基因之间的相对比值进行统计分析 ($n=3$)

RT-PCR was performed to detect the expression of *hcHSP60* in 5 different tissues of *H. cumingii* under 5℃, 10℃, 15℃, 20℃, 25℃, 30℃ and 35℃, including blood (BI), gill (Gi), hepatopancreas (He), mantle (Ma) and muscle (Mu). β -actin was used as an internal control to normalize the samples. Data are presented as mean $\pm$ SD ($n=3$)

hcHSP60 含有 ATP/ADP 结合位点(D G V T V A K), 基质结合位点(E G M K F D R G Y I S P Y), 线粒体定位序列(A A V E E G I V P G G G)等事实, 表明其作用位点也存在于细胞线粒体中^[14]。*hcHSP60* 氨基酸序列中有 1 个典型的 C 末端 GGM 重复序列(GGMGGGM), 还有多个磷酸化位点和 N-型天冬酰胺糖基化位点。有研究表明 HSP60 能借助上述位点激活免疫相关因子 IL-8、IL-12、IL-15、B7、MLP、MZP 和 NO 等, 通过发动天然免疫反应来抵御细菌的入侵^[15, 16]。

HSP60 广泛存在与各种生物体内, 而不同生物体 HSP60 在不同组织中的表达水平各异。赤点石斑鱼 HSP60 在肝、肠、鳃、头肾、胃、脑、脾中均有表达, 以脑中的表达量最高^[9]。三疣梭子蟹 HSP60 在肝、心、腹肌、触角腺、鳃、肠、附肢肌肉中皆有表达, 以触角腺和肠中的表达量最高^[10]。而本研究则发现 *hcHSP60* 在三角帆蚌的血液、肝胰腺、鳃、外套膜及肌肉中均有表达, 而以肝胰腺中的表达水平最高。推测肝胰腺在三角帆蚌保护机体细胞及其损伤修复方面起重要作用。

HSPs 是一类应激蛋白, 可通过传递自身“危险信号”, 触发免疫细胞的免疫应激反应。多种应激因子, 如重金属、细菌、热休克都能诱导 HSPs 的表达。褶纹冠蚌在热刺激后, 其 HSP70 在组织中的表达量明显提高, 以鳃组织中的表达量增加最多, 血淋巴次之, 而肌肉的表达量增加最少^[17]。极端嗜热菌 (*Pyrococcus furiosus*) 能生活在 98℃ 的高温下, 最主要的 HSPs 分子为 HSP60 及 HSP20, 表明 HSP60 在提高细菌耐热能力方面起着重要作用^[18, 19]。本研究的结果表明, 在相对较高水温(30℃ 与 35℃)下放置 4h 后, 三角帆蚌各组织中 *hcHSP60* 表达量明显升高, 表明 *hcHSP60* 在抗热应激反应中起着重要作用。有研究表明, 冷应激可引起鸡肝脏 HSP60 表达显著增加^[20]、福寿螺个别组织 HSP60 急剧上升^[21], 而本文用较低水温(5℃、10℃及 15℃)处理 4h 后, 发现各组织中 *hcHSP60* 的表达与 20℃ 或 25℃ 处理组之间相比并无明显变化, 零度及零度以下水温应激能否刺激 *hcHSP60* 的表达上调, 有待于进一步的研究。

参考文献:

[1] Morimoto R I. Cell in stress: transcriptional activation of heat shock genes [J]. *Science*, 1993, **259**(5100): 1409—1410

[2] Tissieres A, Mitchell H K, Tracy U M. Protein Synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1974, **84**(3): 389—398

[3] Robert J. Evolution of heat shock proteins and immunity [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2003, **27**(6-7): 449—464

[4] Tsan M F, Gao B. Cytokine function of heat shock proteins [J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2004, **86**(4): 739—744

[5] Hutchison E G, Tichelaar W, Hofhaus G, *et al*. Identification and electron microscopic analysis of a chaperonin oligomer from *Neurospora crassa* mitochondria [J]. *The EMBO Journal*, 1989, **8**(5): 1485—1490

[6] Li L, Nan P, Zhai S, *et al*. Molecular cloning, characterization, and expression of hsp60 in caudal fin regeneration of *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2014, **387**(1-2): 143—150

[7] Deocaris C C, Kaul S C, Wadhwa R. On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60 [J]. *Cell & Stress Chaperones*, 2006, **11**(2): 116—128

[8] Soltys B J, Gupta R S. Immunoelectron microscopic localization of the 60-kDa heat shock chaperonin protein (HSP60) in mammalian cells [J]. *Experimental Cell Research*, 1996, **222**(1): 16—17

[9] Qu M, Shi X F. Cloning of HSP60 gene from *Epinephelus akaara* and its express characterization before and after vibronic stressed [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2011, **33**(1): 111—119 [曲朦, 施晓峰. 赤点石斑鱼 HSP60 基因克隆及弧菌应激前后的组织表达特性分析. 海洋学报, 2011, **33**(1): 111—119]

[10] Qin Y. Correlation research of salinity adaptivity of heat shock protein *Portunus trituberculatus* HSP60 and HSP90α [D]. Shanghai Ocean University, 2012 [覃烨. 三疣梭子蟹热休克蛋白 HSP60 和 HSP90α 的盐度适应相关性研究. 上海海洋大学, 2012]

[11] Xu X Y, Shen Y B. Molecular cloning, characterization and expression patterns of HSP60 in the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, **31**(6): 864—870

[12] Zhou J, Wang W N, He W Y, *et al*. Expression of HSP60 and HSP70 in white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to bacterial challenge [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2010, **103**(3): 170—178

[13] He X J, Shi Z Y, Chen X W, *et al*. Effect pearl-nucleus-inserting operation in visceral mass on haemocytes in *Hyriopsis cumingii* lea [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(2): 410—417 [何秀娟, 施志仪, 陈晓武, 等. 内脏团插核术刺激对三角帆蚌血细胞的影响. 水生生物学报, 2010, **34**(2): 410—417]

[14] Fenton W A, Kashi Y, *et al*. Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release [J]. *Nature*,

- 1994, **371**: 614—619
- [15] Quintana F J, Cohen I R. The HSP60 immune system network [J]. *Trends in Immunology*, 2011, **32**(2): 89—95
- [16] Tsan M F, Gao B. Heat shock proteins and immune system [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2009, **85**(6): 905—910
- [17] Xie Y H, Hu B Q, Wen C G. Cloning and expression analysis of HSP70 gene from *Cristaria plicata* [J]. *Journal of Nanchang University (Natural Science)*, 2011, **35**(5): 457—463 [谢彦海, 胡宝庆, 文春根. 褶皱冠蚌热休克蛋白 HSP70 基因的克隆及表达研究. 南昌大学学报(理科版), 2011, **35**(5): 457—463]
- [18] Laksanalamai P, Maeder D L, Robb F T. Regulation and Mechanism of Action of the Small Heat Shock Protein from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, **183**(17): 5198—5202
- [19] Kanai T, Takedomi S, Fujiwara S, *et al.* Identification of the Phr-dependent heat shock regulon in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* [J]. *Journal of Biochemistry*, 2010, **147**(3): 361—370
- [20] Zhang Z W. Effect of cold stress on lipid metabolism and inflammatory factors in chicken liver [D]. Northeast Agricultural University, 2012 [张子威. 冷应激对鸡肝脏脂肪代谢与炎症因子的影响. 东北农业大学, 2012]
- [21] Zhen G W. Molecular characteristics of HSPs genes and their expression patterns in the golden apple snails, *Pomacea canaliculata* [D]. China Jiliang University, 2012 [郑国湾. 外来生物福寿螺热休克蛋白的克隆与其表达差异的研究. 中国计量学院, 2012]

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF HEAT SHOCK PROTEIN 60 GENE FROM *HYRIOPSIS CUMINGII*

WU Sheng-Nan¹, LIU Da-Wei², LIU Yi¹, HU Bao-Qing², ZHANG Jian-Qiang¹, WANG Yan¹ and WANG Ting¹

(1. College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China;

2. School of Life Sciences and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract: Heat shock protein 60 (HSP60) is an important molecular chaperone protein that mainly exists in the mitochondria of organism. In the present study, the cDNA sequence of *Hyriopsis cumingii* HSP60 (*hcHSP60*) was cloned by 3' rapid amplification of cDNA ends methods (3'-RACE) based on a long chain sequence of *hcHSP60* (2629 bp) and was determined by high flux sequencing for transcriptome of *H. cumingii* blood cells, and its expression in the different tissues was detected by using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Results showed that the full-length cDNA of *hcHSP60* was 2807 bp that contains an open reading frame of 1707 bp, encoding a protein of 568 amino acid residues with 61.04 ku of predicted molecular weight and 5.63 of the theoretical isoelectric point, which was predicted to have no signal peptide and transmembrane helices. The deduced amino acid sequence of *hcHSP60* shares the highest identity (82%) with HSP60 of *Biomphalaria glabrata*, and the phylogenetic analysis demonstrated that they were clustered in a same clade. The results of RT-PCR indicated that *hcHSP60* was constitutively expressed in all 5 examined tissues of *H. cumingii* with the highest expression in hepatopancreas. The expression of *hcHSP60* in all detected tissues was up-regulated obviously by higher water temperature, suggesting that it may play an important role in the stress response against heat.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; Heat shock protein 60; Sequence analysis; Expression