

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00547

大菱鲆组成型热休克蛋白 70 的全长 cDNA 克隆及表达分析

贾爱荣 王传娟 张晓华

(中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003)

摘要: 根据感染哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)的大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)的差减 cDNA 文库中 *hsp70* EST 序列设计引物, 用 RACE 方法首次克隆到长 2188 bp 的大菱鲆 HSC70 (Heat-shock cognate protein 70)全长 cDNA 序列, 包括 1956 bp 的开放阅读框及 5'和 3'非翻译区。在预测的 651 个氨基酸序列中发现了 Dnak 特征性基序, 胞质 HSP70 特征基序以及四肽简并重复序列。与其他真核生物 HSP70 家族成员进行同源性比较, 发现大菱鲆 HSC70 与牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) HSC71、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) HSC71、人(*Homo sapiens*) HSC70、家鼠(*Mus musculus*) HSC70、烟草天蛾(*Manduca sexta*) HSC70 的氨基酸相似性分别是 97%, 95%, 94%, 93%, 86%, 表现出较高的保守性。表达分析显示, *hsc70* mRNA 在大菱鲆正常肝脏、鳃、肠、脾脏、头肾、肾等组织中以不同的水平存在, 呈组成型表达; 被哈维氏弧菌感染后, 大菱鲆肝脏和脾脏组织 *hsc70* mRNA 表达水平分别在 24h 和 12h 出现上调(2.5-fold 和 1.6-fold); 注射生理盐水组与未注射组之间差异不显著。

关键词: 大菱鲆; 哈维氏弧菌; HSC70; 基因表达; RACE; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2010)03-0547-07

热休克蛋白(Heat shock proteins, HSPs)是生物体在不利环境因素刺激下应激合成的一组特殊的蛋白质, 是进化上高度保守、功能上至关重要的一族蛋白, 它广泛存在于从低等原核生物到高等哺乳动物的整个生物界^[1]。在正常生理条件下, 许多 HSPs 具有组成型表达, 主要行使分子伴侣功能, 并参与蛋白质代谢、细胞周期调控、细胞凋亡等重要的生命活动^[2-4]。当有机体受到环境、生理或病理胁迫时, 诱导 HSPs 高表达的热休克应答是一种普遍存在的生物学现象^[5-7]。在多数情况下, 由于刺激原及宿主细胞的不同, 使得受诱导表达的热休克蛋白也不同^[8]。HSC70 (heat-shock cognate protein 70, HSC71)是组成型表达的 HSP70, 分子量约为 70 kD^[9,10], 在许多细胞活动中发挥着重要的作用, 例如: 参与细胞质中的蛋白质折叠; 向内质网、线粒体和叶绿体转运蛋白质; 运输受体及被膜小泡

等^[11-13]。近来的研究表明, 在被病原感染的细胞中, 细胞表面的 HSC70 可以呈递抗原, 增强细胞的内摄作用, 而且这种作用可以被 HSC70 抗体抑制^[14,15]。尽管 HSC70 的作用机理有待进一步研究, 但其在免疫中的应用前景无疑是诱人的。

随着海水养殖业的逐步发展, 病害问题也日益突出, 鱼类的病害问题成为限制海水鱼类养殖业可持续发展的主要因素之一。大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)是最有经济价值的海水养殖种类之一, 疾病的影响却严重限制了其水产养殖业的经济效益, 而哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)是其重要病原菌之一。长期以来, 对鱼类疾病的防治主要是使用疫苗, 但是由于免疫效果不稳定, 以及免疫机制、安全性问题在理论上还没有解决, 因此大大限制了疫苗的推广应用。抗病育种可能是解决鱼类疾病的最彻底的策略。利用免疫抗病基因进行抗病育种是一种有效

收稿日期: 2009-02-20; 修订日期: 2009-12-18

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目(108082); 中国科学院实验海洋生物学重点实验室资助

作者简介: 贾爱荣(1981—), 女, 汉族, 山东聊城人; 海洋生物学博士; 主要从事海水养殖鱼类病害研究。E-mail: jiaairong_701@yahoo.com.cn

通讯作者: 张晓华, 女, 教授; E-mail: xhzhang@ouc.edu.cn

的尝试途径,因此必须对免疫抗病相关基因进行全面深入的了解^[16-18]。在以往研究中,用哈维氏弧菌感染大菱鲆,从大菱鲆头肾和脾的差减 cDNA 文库中获得一段 *hsp70* 的 EST 序列。鉴于 HSP70 在应激反应中的作用,对大菱鲆热休克蛋白及其功能的研究显得尤为重要。本文报道了从大菱鲆中首次克隆的一种 HSC70 的 cDNA 完整序列,并研究了哈维氏弧菌感染对 *hsc70* 基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物 大菱鲆购自青岛胶南卓越养殖场,体长为(13±1) cm,体重为(45±2) g。于实验室暂养一周无异常后使用(水温 16—20℃,气泵充气)。

菌株和质粒 哈维氏弧菌菌株 VIB645 及大肠杆菌菌株 JM109 由本实验室保存; pUCm-T 载体购自上海生物工程技术服务有限公司。

1.2 方法

总 RNA 的提取 取大菱鲆脾脏 50 mg,使用 Trizol Reagent (Invitrogen)提取总 RNA,方法参见试剂说明。提纯的 RNA 经琼脂糖电泳检测 RNA 的完整性,用紫外分光光度仪测定浓度。将定量后的 RNA 置于冰箱(-80℃)中储存。

全长 cDNA 的克隆和序列测定 首先按照 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)的操纵流程,各取 2 μg 总 RNA 进行反转录合成 5'-RACE-Ready cDNA 和 3'-RACE-Ready cDNA。根据本实验室已经构建的大菱鲆差减 cDNA 文库中 *hsp70* 的 EST 序列设计基因特异性引物。5'-RACE 引物: gsp1 (5'-CAAAGCGAGCCCTGGTGATGGAG-3'), 3'-RACE 引物: gsp2 (5'-AGGACATCAGCGACAACAAGAGAGC-3'), 所设计的引物由上海生物工程技术服务有限公司合成,使用浓度均为 10 μmol/L。随后,采用试剂盒中提供的通用引物混合物(Universal primer mix, UPM)和 gsp1, gsp2 分别进行 5'和 3'-RACE 扩增^[19]。向 50 μL PCR 反应体系中加入以下试剂: 34.5 μL 去离子水、5 μL 10×Advantage 2 PCR 缓冲液、1 μL dNTP (10 mmol/L)、1 μL 50×Advantage 2 Polymerase Mix、5 μL UPM (10×)、1 μL gsp1 或 gsp2 (10 μmol/L)和 2.5 μL 5'-RACE-Ready cDNA。Touchdown PCR 的扩增条件为: 94℃ 4min; 5× (94℃ 30s, 72℃ 2.5min); 5×

(94℃ 30s, 70℃ 30s, 72℃ 2.5min); 25× (94℃ 30s, 68℃ 30s, 72℃ 2.5min); 72℃ 10min。将获得的扩增序列连接到 pUCm-T 载体,转化大肠杆菌 JM109,挑取阳性克隆送上海生工测序。

HSC70 的同源性分析及分子进化分析 将已知的 EST 序列和通过 5'及 3'-RACE 获得的序列片段进行拼接得到 HSC70 的全长 cDNA 序列。将该序列用 BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)进行同源性分析,同时将推测的氨基酸序列用 BLASTP 作序列比对及同源性分析。利用 ProtParam (<http://cn.expasy.org/tolls/ProtParam>), PHD (<http://www.predictprotein.org>)和 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>)程序分别对蛋白质的初级结构、二级结构和三级结构进行分析。将大菱鲆 HSC70 的氨基酸序列和其他物种 HSC70 及 HSP70 氨基酸序列进行 ClustalW 比对,利用 Mega3.1 软件绘制 HSP70 蛋白的系统发生树并进行 1000 次的 bootstraps 值验证。

感染实验 将哈维氏弧菌 VIB645 在 2216E 固体培养基中 28℃ 培养约 12h,用灭菌生理盐水洗下菌苔,调整菌液浓度为 3×10^7 cfu/mL。用微量注射器于大菱鲆腹腔注射 0.15 mL 菌液,共注射 35 尾。阴性对照组(4 尾)注射等量的生理盐水。未注射大菱鲆(4 尾)作为空白对照。观察记录 36h 内鱼的发病和死亡情况。分别取哈维氏弧菌感染后 4、8、12、24、36h 的活鱼(每组 4 尾),注射生理盐水 8h 后的阴性对照组以及空白对照组的鱼进行解剖,取头肾、肾、心脏、肝脏、肠、肌肉、脾和鳃组织,冻于液氮 10min,然后-80℃保存待用。

***hsc70* 基因的时空表达分析** 将大菱鲆每个亚组中 4 尾鱼的相同组织等量混合,提取总 RNA,并用无 RNase 的 DNaseI 处理,以去除残留的痕量 DNA 污染。使用 M-MLV 反转录酶(Promega)将 2 μg RNA 利用 PolyA 引物反转录成一链 cDNA 并用无菌去离子水稀释 4 倍,-20℃保存。利用 *hsc70* 基因特异性引物 *hsc*-RTS (5'-CGCCCTGGAGTCGTATGCTTTC-3')和 *hsc*-RTA (5'-GCCAGCCGATGACCTCGTTGC-3'),检测 *hsc70* mRNA 在大菱鲆不同组织以及感染哈维氏弧菌后在不同时间的组织表达,扩增产物为 122 bp。利用 ABI 7500 序列检测系统(Applied Biosystems, USA)进行实时荧光定量 PCR 反应。20 μL 体系: 1× SYBR Green Realtime PCR

Master Mix (TOYOBO), 各 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 的特异性引物(hsc-RTS 和 hsc-RTA), 10 ng 的 cDNA 模板。实时定量 PCR 的反应条件如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1min, 共进行 40 个循环, 每个延伸步骤后进行荧光信号检测。反应结束后的分解步骤(95 $^{\circ}\text{C}$ 15s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 15s) 用于绘制溶解曲线对目的片段是否进行特异性扩增进行评估。采用 $\beta\text{-actin}$ 基因作为实时定量 PCR 的内参, 根据大菱鲆 $\beta\text{-actin}$ 的基因序列设计引物 actin-RTS (5'-TGAACCCCAAAGCCAACAGG-3')和 actin-RTA (5'-CAGAGGCATACAGGGACAGCAC-3'), 扩增产物长 108bp。荧光定量反应中每个样本都设置 4 个平行。

数据分析 利用 $\text{Fold} = 2^{-\Delta\Delta C_T [20]}$ 计算基因的相对表达量, 其意义是: 实验组目的基因的表达相对于对照组的倍数。此处以内参基因 $\beta\text{-actin}$ 均一化样品, $\Delta\Delta C_T = [Ct_{\text{目的基因 (待测样品)}} - Ct_{\text{内参基因 (待测样品)}}] - [Ct_{\text{目的基因 (对照样品)}} - Ct_{\text{内参基因 (对照样品)}}]$ 。在组织表达和时间表达中, 分别选择肌肉组织和注射生理盐水的组织为对照样品, 并设定其基因拷贝的相对倍数为 1。采用 SPSS 13.0 统计软件中的 one-way ANOVA 程序的 Duncan's 检验法分析各组数据的差异显著与否及标准误。

2 结 果

2.1 大菱鲆 hsc70 基因的克隆

从感染哈维氏弧菌的大菱鲆的头肾和脾的差减 cDNA 文库中得到了一段长 111 bp 的 hsp70 的 EST 序列^[20]。将此 EST 序列和通过 5'及 3'-RACE 获得的序列进行拼接得到 2188 bp 的全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号: EF191027)。其中 5'非翻译区 (5'-UTR) 138 bp, 3'非翻译区 (3'-UTR) 94 bp, 开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 1956 bp, 由此推测出相应的 651 个氨基酸。将该核苷酸及氨基酸序列提交 GenBank 进行 BLAST 比对, 结果显示该序列均与其他物种的 HSC70 蛋白具有较高的同源性, 由此可推断在本实验中获得的 cDNA 序列为编码大菱鲆 HSC70 蛋白(组成型热休克蛋白)的全长 cDNA 序列。

2.2 大菱鲆 HSC70 基本物理化学参数的分析

应用 ExPASy Molecular Biology Server 上的 ProtParam 程序对蛋白质基本物理化学参数分析显

示, 大菱鲆 HSC70 分子量为 71225.3, 理论等电点为 5.27, 负电荷残基 (Asp+Glu) 总数 96 个, 正电荷残基 (Arg+Lys) 总数 81, 富含甘氨酸 (8.9 %)、赖氨酸 (7.8 %)、缬氨酸 (7.7 %)、谷氨酸 (7.4 %)、丙氨酸 (7.2 %) 等, 而色氨酸含量较低, 只有 0.3 %。

2.3 大菱鲆 HSC70 氨基酸序列特征及与其他物种多序列比较

应用 PHD 及 SWISS-MODEL 程序对氨基酸序列的分析显示, 大菱鲆 HSC70 含有 Dnak 特征基序 DLGTT-S-V (10—18 残基)、胞质 HSP70 特征基序 EEVD (648—651 残基) 以及靠近 C 端的 GGMP 4 肽筒并重复序列 (615—630 残基)。N 端 ATP 酶结构域 (1—386 残基, 其中 131—138 残基为 ATP/GTP 结合位点基序), 约 45 kD, 由 4 个 α 螺旋形成一个裂缝; 底物肽结合结构域 (384—543 残基), 约 18 kD, 由 4 个反向平行的 β 折叠和一个 α 螺旋构成; C 端结构域 (542—651 残基), 约 10 kD, 主要由 α 螺旋构成。整个分子的保守性 N 端最高, 到 C 端保守性降低。

根据 hsc70 cDNA 的 BlastX 搜索结果, 选择 5 条有充分研究的序列与大菱鲆的 hsc70 cDNA 所推导多肽进行 ClustalW 多序列比对分析。结果显示, 它与牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) HSC71 (GenBank 登录号: BAD05136)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) HSC71 (GenBank 登录号: AAB21658)、人 (*Homo sapiens*) HSC70 (GenBank 登录号: CAA68445)、家鼠 (*Mus musculus*) HSC70 (GenBank 登录号: AAA37869)、烟草天蛾 (*Manduca sexta*) HSC70 (GenBank 登录号: AAF09496) 的氨基酸相似性分别是 97%, 95%, 94%, 93%, 86%。

对上述 5 条同源性序列以及大菱鲆、斑马鱼 (*Danio rerio*, GenBank 登录号: AAB03704)、大西洋鲑 (*Salmo salar*, GenBank 登录号: ACI33977)、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*, GenBank 登录号: AAH41201)、红原鸡 (*Gallus gallus*, GenBank 登录号: NP_990334) 的 HSC70 序列和牙鲆 (GenBank 登录号: BAA31697)、虹鳟 (GenBank 登录号: ACI34374)、大西洋鲑 (GenBank 登录号: BAD83574)、斑马鱼 (GenBank 登录号: AAH56709)、罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*, GenBank 登录号: CAA04673)、非洲爪蟾 (GenBank 登录号: AAH78115)、人 (GenBank 登录号: AAD21817) 的 HSP70 序列进行 N-J 聚类分析。在分子系统树中,

HSC70 与 HSP70 序列各自聚为一支, 大菱鲆 HSC70 与鱼类 HSC70 聚为一簇, 而且各物种的 HSC70 的分子进化地位与其他生物学分类一致, 因而得到的种系发生树反映了上述物种进化关系的远近(图 1)。

2.4 大菱鲆 *hsc70* 基因在正常组织中的表达分析

为了研究 *hsc70* 在正常大菱鲆体内是否表达以及是否具有组织特异性, 提取正常大菱鲆的各组织, 用实时荧光定量 PCR 进行表达分析。结果显示从这

些正常组织中都可以扩增到预期的特异产物, 说明该基因可以在非应激条件下在上述组织中呈组成型表达。在大菱鲆肝脏中 *hsc70* mRNA 的表达量最高 (45.4-fold), 其次在鳃和肠中存在较强表达(分别为 17.9-fold 和 12.8-fold), 在脾脏、肾和头肾中也有表达(4.6-fold, 4.5-fold 和 4.3-fold), 并且与肌肉和心脏中的表达也具有显著差异($P < 0.05$), 在心脏中的表达与肌肉中的表达无显著差异($P = 1$, 图 2)。

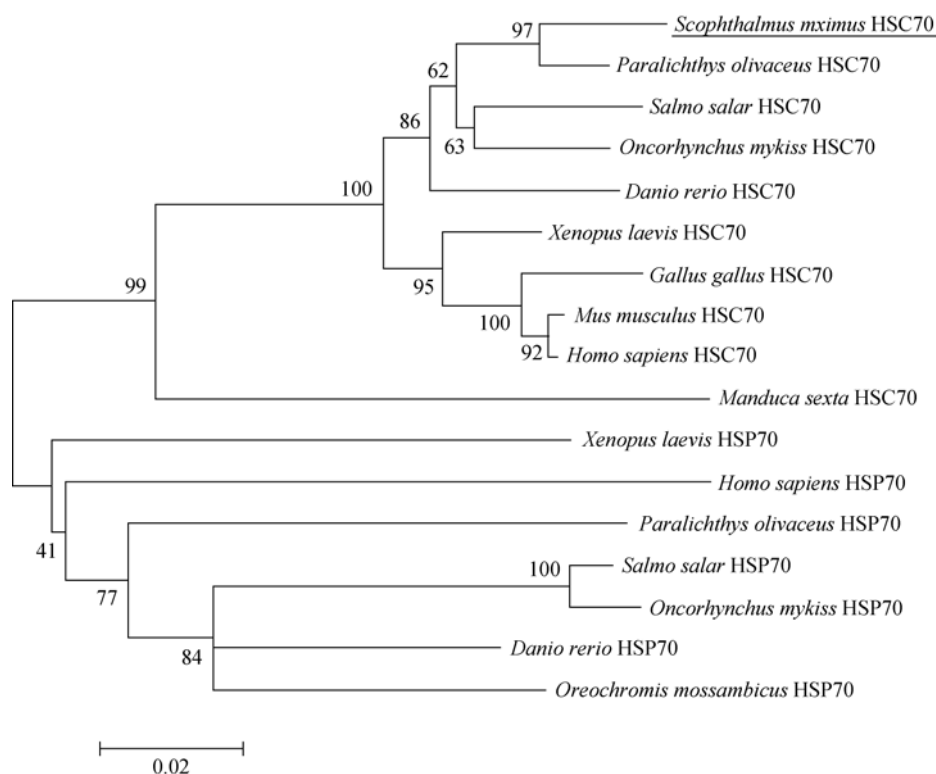


图 1 HSP70 家族同源蛋白氨基酸序列 N-J 分子系统树

Fig. 1 A phylogenetic tree of HSP70 family members constructed with Neighbor-Joining method
置信度为 1000; 大菱鲆 HSC70 用横线标出

Numbers at branch nodes represent the confidence level of 1000 bootstrap replications. Turbot HSC70 is underlined

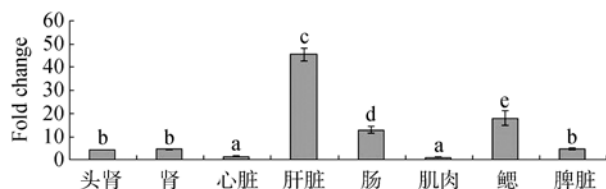


图 2 *hsc70* 基因在大菱鲆各组织中的表达分析

Fig. 2 Quantitative analyses of the expression profiles *hsc70* gene in different tissues

头肾 Head kidney; 肾 Kidney; 心脏 Heart; 肝脏 Liver; 肠 Intestine; 肌肉 Muscle; 鳃 Gill; 脾脏 Spleen; 标记同样字母的组间无显著性差异 Groups marked with the same letters are not statistically different

2.5 大菱鲆感染细菌后肝脏和脾脏组织 *hsc70* 基因的表达分析

为了了解哈维氏弧菌对大菱鲆 *hsc70* 表达的影响, 我们对感染哈维氏弧菌后的大菱鲆肝脏和脾脏组织的 *hsc70* mRNA 水平进行了测定。在感染后的不同时间点, 用实时荧光定量 PCR 对大菱鲆两种组织中的 *hsc70* mRNA 进行检测, 以注射生理盐水组为对照, 对各时间点的表达进行相对定量分析。数据分析结果显示, 在两种组织中, 注射生理盐水组与未注射组之间差异不显著($P > 0.05$); 在肝脏组织中, 感染后第 4h、8h、12h 的 *hsc70* mRNA 表达量与对

照组无显著差异($P > 0.05$), 第 24h 基因的表达量上升至峰值(2.5-fold, $P < 0.05$), 36h 表达开始出现下降, 近于对照水平($P > 0.05$); 脾脏中, *hsc70* mRNA 表达量在感染后 4h、8h 与对照组无显著差异($P > 0.05$), 在 12h 表达量急速上升到达峰值(1.6-fold, $P < 0.05$), 并维持相同的表达水平到 36h (图 3)。

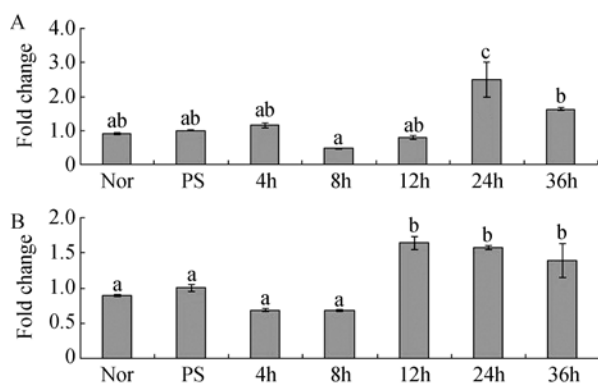


图 3 *hsc70* 基因在大菱鲆感染后不同时间的相关组织表达分析

Fig. 3 Expression profiles of the *hsc70* gene in different tissues of turbot using real-time PCR at different times after challenged with *V. harveyi*

A. 肝脏组织表达; B. 肾脏组织表达; Nor. 未注射组; PS. 注射生理盐水组; 标记同样字母的组间无显著性差异

A. head kidney; B. spleen; Nor. non-injected fish; PS. physiological saline -injected fish; Groups marked with the same letters are not statistically different

3 讨 论

为了从分子水平上阐明大菱鲆病害发生及病害抵抗的机制, 本实验室开展了对大菱鲆病害防治的研究, 特别瞄准了与免疫及抗病相关的功能分子、多肽和基因研究。在前期研究中, 我们应用抑制性消减杂交技术, 获得了哈维氏弧菌感染大菱鲆后的差减 cDNA 文库, 得到 49 条与免疫相关的 EST 序列, 其中包含免疫基因 *MHC class Ia* 和 *hsp70* 以及多种调控蛋白, 例如 Src-家族、小 GTP 结合蛋白和组织蛋白酶等^[21]。HSP70 家族是 HSPs 中含量最丰富的一个家族, 序列高度保守, 现已有大量研究表明 HSP70 与生物的热耐受、免疫、病原感染及环境适应密切相关^[22]。

本研究获得了大菱鲆 HSP70 家族中一个 HSC70 的完整 cDNA 序列。该序列靠近 C 端处具有一段简并重复的 GGMP 4 肽序列, 在 C 末端有高度保守的细胞质特异性 EEDV 调控基序^[23-25], 说明它是一种细胞质 HSP70。将所获得的序列与已知的其他物种

HSP70 家族成员的序列经 BLAST 比对分析, 发现该序列与其他物种 HSC70 cDNA 核苷酸和氨基酸序列都有较高同源性, 尤其是氨基酸序列的同源性更高, 由此初步判断本实验中得到的 HSP70 为组成型热休克蛋白(HSC70)。

研究表明, HSP70 家族在应激及正常状况下都有表达, 而且此蛋白的合成主要在转录水平上进行调节^[22, 26], 荧光定量 PCR 可以检测 HSC70 在转录水平上的表达。在大菱鲆各组织中均有 *hsc70* mRNA 的表达, 再次证实了本实验克隆得到的为组成型 HSP70。实验证明 *hsc70* mRNA 在肝脏中表达量最高, 容易检测。在前人的研究中也多选取肝脏作为检测组织, 用于研究鱼体被感染后 HSP70 的表达变化, 如银大马哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)、虹鳟及剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)的感染实验^[22, 27, 28]。

在细菌感染实验中, 设置了注射生理盐水的对照组和不注射的空白组。结果表明, 注射生理盐水未引起 *hsc70* 基因的表达变化, 说明注射操作不会诱导 HSC70 表达。在感染前期, *hsc70* mRNA 表达水平在肝脏和脾脏中都没有显著变化。在肝脏中, 直到感染后 24h 表达出现上升, 随后在 36h 下降到初始水平。脾脏中, 感染 12h 后表达量上升并维持到 36h。Wu, et al.^[29]的研究也表明太平洋白虾(*Litopenaeus vannamei*)在热休克处理后, HSC70 表达量的上升幅度较小, 并且在不同组织中出现上调表达的时间是不同的。*hsc70* mRNA 在肝脏和脾脏的表达到达峰值时, 分别为 2.5-fold 和 1.6-fold, 这与 Deane^[9]的研究类似。平鲷(*Sparus sarba*)在经过热休克处理后, 组成型 *hsp70* (*hsc70*)的表达增加了 1.7-fold, 诱导型 *hsp70* (*hsp70*)的表达增加了 6.7-fold^[9]。有研究还表明, 大部分真核生物 mRNA 在细胞处于应激环境下, mRNA 的拼接受到抑制, 这使得大部分基因的表达降低, 而一般情况下不具内含子的 *hsp70* 可以优先翻译, 使 HSP70 在细胞内迅速选择性地积聚^[30, 31]。据研究, *hsc70* 含有内含子^[32], 因而其 mRNA 的拼接在应激条件下可能会受到抑制, 从而影响了 HSC70 的翻译表达。根据 Watanabe^[14]及 Xu^[15]等的研究, HSC70 的增加可以介导或辅助抗原的呈递, 促进病原对细胞的侵染, 而使用 siRNA 或 HSC70 抗体即可抑制病原侵染。由此可以推断, 本实验中 HSC70 的上调表达可能与细菌的侵染过程相关。

参考文献:

- [1] Jiao C Z, Wang Z Z, Li F H, *et al.* cDNA cloning, sequencing and expression analysis of heat-shock cognate protein 70 gene (HSC70) from shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2004, **49**(21): 2178—2186 [焦传珍, 王在照, 李富花, 等. 编码中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 一种组成型热休克蛋白 70(HSC70)的 cDNA 克隆、测序及其表达分析. 科学通报, 2004, **49**(21): 2178—2186]
- [2] Hightower L E. Heat shock, stress proteins, chaperones and proteotoxicity [J]. *Cell*, 1991, **66**(2): 191—197
- [3] Hendrick J P, Hartl F. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1993, **62**: 349—384
- [4] Welch W J. How cells respond to stress [J]. *Scientific American*, 1993, **269**: 56—64
- [5] Krebs R A, Feder M E. Natural variation in the expression of the heat-shock protein HSP70 in a population of *Drosophila melanogaster* and its correlation with tolerance of ecologically relevant thermal stress [J]. *Evolution*, 1997, **51**(1): 173—179
- [6] Krebs R A, Feder M E. Tissue special variation in HSP70 expression and thermal damage in *Drosophila melanogaster* larvae [J]. *Journal of Experimental Biology*, 1997, **200**: 2007—2015
- [7] Agarraberes F A, Terlecky S R, Dice J F. An intralysosomal HSP70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation [J]. *Journal of Cell Biology*, 1997, **137**(4): 825—834
- [8] Mayer M P. Recruitment of Hsp70 chaperones: a crucial part of viral survival strategies [J]. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*, 2005, **153**: 1—46
- [9] Deane E E, Woo N Y S. Cloning and characterization of the hsp70 multigene family from silver sea bream: Modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, **330**: 776—783
- [10] Juliann G K, George C T. Heat shock protein 70 kDa : Molecular biology , biochemistry and physiology [J]. *Pharmacology and Therapeutics*, 1998, **80**(2): 183—201
- [11] Yasuko S, Chuzo I, Yukiko I, *et al.* 71-kilodalton heat shock cognate protein acts as a cellular receptor for syncytium formation induced by human T-cell lymphotropic virus type 1[J]. *Journal of Virology*, 1998, **72**: 535—541
- [12] Cripe T P, Delos S E, Estes P A, *et al.* *In vivo* and *in vitro* association of hsc70 with polyomavirus capsid proteins [J]. *Journal of Virology*, 1995, **69**: 7807—7813
- [13] Guerrero C A, Bouyssounade D, Zárate S, *et al.* Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry [J]. *Journal of Virology*, 2002, **76**: 4096—4102
- [14] Watanabe K, Tachibana M, Tanaka S, *et al.* Heat shock cognate protein 70 contributes to *Brucella* invasion into trophoblast giant cells that cause infectious abortion [J]. *BMC Microbiology*, 2008, **8**: 212
- [15] Xu H, Yan F, Deng X, *et al.* The interaction of white spot syndrome virus envelope protein VP28 with shrimp Hsc70 is specific and ATP-dependent [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2009, **26**: 414—421
- [16] Chen L X, Zhang X W, Xiao T Y, *et al.* Expression of Hu-IFN- α gene in transgenic grass carp [J]. *Journal of Hunan Agricultural University*, 2001, **27**(3): 177—178 [陈立祥, 张学文, 肖调义, 等. 人 α -干扰素基因在转基因草鱼中的表达. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2001, **27**(3): 177—178]
- [17] Zhang Y B, Zhang Q Y, Gui J F. Interferon system and identification of interferon system genes in fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(3): 317—322 [张义兵, 张奇亚, 桂建芳. 鱼类的干扰素系统和干扰素系统基因的鉴定. 水生生物学报, 2004, **28**(3): 317—322]
- [18] Liu Y, Wei L L, Li L, *et al.* Effect of formalin inactivated *flavobacterium columnare* on expression of immune related genes in grass carp, *ctenopharyngodon idellus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(6): 794—801 [刘毅, 隗黎丽, 李莉, 等. 福尔马林灭活柱状黄杆菌对草鱼免疫相关基因表达的影响. 水生生物学报, 2008, **32**(6): 794—801]
- [19] Jia A, Zhang X H. Molecular cloning, characterization and expression analysis of cathepsin D gene from turbot *Scophthalmus maximus* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2009, **26**(4): 606—613
- [20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402—408
- [21] Wang C, Zhang X-H, Jia A, *et al.* Identification of immune-related genes from kidney and spleen of turbot (*Scophthalmus maximus*) by suppression subtractive hybridization following challenge with *Vibrio harveyi* [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2008, **31**(7): 505—514
- [22] Wan W J, Wang J T, Shi C B, *et al.* Gene expression of HSP70 in green swordtail *Xiphophorus helleri* exposed to *Vibrio alginolyticus* [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2007, **22**(5): 330—334 [万文菊, 王纪亭, 石存斌, 等. 溶藻弧菌感染对剑尾鱼 HSP70 基因表达的影响. 大连水产学院学报, 2007, **22**(5): 330—334]
- [23] Demand J, Luders J, Hohfeld J. The carboxy-terminal domain of HSC70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1998, **18**(4): 2023—2028
- [24] Freeman B C, Myers M P, Schumacher R, *et al.* Identification of a regulatory motif in HSP70 that affects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ-1 [J]. *EMBO Journal*, 1995, **14**(10): 2281—2292
- [25] Vayssier M, Leguerhier F, Fabien J F, *et al.* Cloning and

- analysis of a *Trichinella britovi* gene encoding a cytoplasmic heat shock protein of 72 kD [J]. *Parasitology*, 1999, **119**: 81—93
- [26] Currie S, Tufts B. Synthesis of stress protein 70 (HSP70) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells [J]. *Journal of Experimental Biology*, 1997, **200**(3): 607—614
- [27] Forsyth R B, Candido E P M, Babich S L, et al. Stress protein expression in coho salmon with bacterial kidney disease [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1997, **9**(1): 18—25
- [28] Ackerman P A, Iwama G K. Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to vibriosis [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2001, **13**(2): 173—180
- [29] Wu R, Sun L, Lei M, et al. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (HSC70) in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Molecular Biology*, 2008, **42**: 265—274
- [30] Yost H J, Lindquist S. RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis [J]. *Cell*, 1986, **45**(2): 185—193
- [31] Yost H J, Lindquist S. Heat shock proteins affect RNA processing during the heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1991, **11**(2): 1062—1068
- [32] Chuang K, Ho S, Song Y. Cloning and expression analysis of heat shock cognate 70 gene promoter in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. *Gene*, 2007, **405**: 10—18

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF A HSC70 GENE FROM TURBOT

JIA Ai-Rong, WANG Chuan-Juan and ZHANG Xiao-Hua

(Department of Marine Biology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Disruption of normal cellular processes can cause the rapid and increased synthesis of a group of proteins belonging to the heat shock proteins (HSPs). Of all the HSPs, HSP70 has been widely studied as a biomarker of stress, and the major inducing factor for HSP70 up-regulation is the occurrence of damaged cellular protein. HSC70 (heat-shock cognate protein 70) is a constitutively expressed member of the 70 kD class of HSP70, which plays key roles in the cell as molecular chaperone and involves in a number of cellular processes. HSC70 has been shown to be involved in protein folding in the cytoplasm, protein import into the endoplasmic reticulum, mitochondria, chloroplasts, or trafficking of the receptors and coated vesicles and so on. In previous study, suppression subtractive hybridization (SSH) was used to investigate the response of turbot (*Scophthalmus maximus*) to *Vibrio harveyi*, using a cDNA library constructed from kidney and spleen of artificially infected turbot, and several immune-related genes were identified, including a *hsp70* gene. In the present study, the complete cDNA sequence of turbot HSC70 was obtained using the method of RACE. The full length *hsc70* cDNA of 2188 bp contained a 138 bp 5'-untranslated region (5'-UTR), a 1956 bp open reading frame (ORF) encoding 651 amino acids, and a 94 bp 3'-untranslated region (3'-UTR). The specific motif of Dnak (DLGTT-S-V, 10—18 aa), EEVD (648—651 aa) and GGMP repeated tetra-peptide (615—630 aa) were found in the deduced amino acid sequence of turbot HSC70. Compared with the members of HSC70 from other organisms, turbot HSC70 had 97%, 95%, 94%, 93% and 86% identity with HSC70 from flounder (*Paralichthys olivaceus*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), human (*Homo sapiens*), mouse (*Mus musculus*) and tobacco (*Manduca sexta*) respectively. The overall topology of the phylogenetic tree showed that the turbot HSC70 and HSC70s from other fish formed one cluster. Quantitative real-time PCR demonstrated that *hsc70* mRNA expressed constitutively in all of the test tissues, and the lowest expression level of turbot *hsc70* mRNA was detected in muscle, the highest expression level was in liver by 45.4-fold. After the injection of physiological saline, the *hsc70* mRNA expression levels in liver and spleen had no significant changes compared to those of non-injected turbot ($P>0.05$). This suggested that the injection itself had no influence on the expression of *hsc70*. After turbot were challenged with *V. harveyi*, the expression levels of *hsc70* mRNA were up-regulated in liver (2.5-fold) and spleen (1.6-fold) at 24h and 12h, respectively ($P<0.05$). The results provided a preliminary foundation for the further functional research of turbot HSC70.

Key words: Turbot; *Vibrio harveyi*; HSC70; Gene expression; RACE; Quantitative real-time PCR