

克氏原螯虾一种诱导型 HSP70 基因克隆及分析

孙 勇¹ 章 力² 李慕婵¹ 吴 任¹ 雷腊梅¹ 谢数涛¹

(1. 暨南大学生命科学技术学院水生生物研究所, 广州 510632; 2. 西南大学生命科学学院水产科学重庆市市级重点实验室, 重庆 400715)

摘要:克氏原螯虾是我国淡水虾类养殖的重要品种,具有很强的抵御各种环境胁迫和各种刺激的能力。本文以该虾为对象,通过基因克隆以及从基因水平探讨 HSP70s 与环境应激之间的关系,为深入研究水生无脊椎动物 HSP70s 功能提供基础。采用 RT-PCR 和 RACE 方法从克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 心脏组织中克隆得到一种 HSP70 cDNA (scHSP70),其全长为 2271bp,包括 1902bp 的完整编码序列、142bp 的 5' 及 221bp 的 3' 端非翻译区, GenBank 登陆号 DQ301506。基因组 DNA 扩增表明该基因仅由一个外显子组成。根据 cDNA 序列推导出 scHSP70 由 635 个氨基酸组成,分子量为 69.6kD,理论等电点为 5.34。该序列存在真核细胞 HSP70 家族的三个特征标签。SWISS-MODEL 蛋白三维结构预测显示 scHSP70 在 N 端形成 ATP 酶结构域,在近 C 端形成底物肽结合结构域。克氏原螯虾在系统发生树上的进化地位与传统分类学相一致。半定量 RT-PCR 实验表明,scHSP70 有广泛的组织分布,在心脏中表达量最高,在血液中最少。热激后该基因大量表达,说明该基因是一种诱导型 HSP70。这为从蛋白水平研究克氏原螯虾 HSP70 与环境应激之间的关系提供基础。

关键词:克氏原螯虾;诱导型;热休克蛋白 70;心脏

中图分类号:Q781 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2009)04-0627-09

热休克蛋白 (Heat shock proteins, HSPs) 是广泛存在于真核和原核细胞中一类非常保守的蛋白质,分为很多家族,其中 HSP70 家族是最重要的,也是功能最复杂的一类蛋白,它主要以“分子伴侣”的形式协助新生多肽的折叠、转运以及变性蛋白的修复和重折叠等,而且它在细胞保护、抗凋亡以及免疫治疗等方面也发挥着重要的功能^[1]。目前, HSP70s 研究主要集中在脊椎动物。而对于无脊椎动物,特别是水生无脊椎动物 HSP70s 的研究比较少,这主要体现在 HSP70s 基因信息量少以及 EST 数据库少,所以很难开展其 HSP70s 的功能研究以及从基因水平探讨 HSP70s 与环境应激之间的关系,这无疑给水生无脊椎动物 HSP70s 深入研究带来了障碍^[2]。

本研究以克氏原螯虾为实验对象,进行 HSP70 的研究,为今后开展有关提高虾类自身免疫力和抵御各种病原侵害^[3]、开发安全高产的水产品提供重要的理论和现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料 克氏原螯虾购自广州市黄沙水产市场,

体重约 60 g,于实验室水族箱中暂养两周,水温保持在 20℃ 左右。待其状态稳定后用于实验。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 用 Trizol 提取虾组织总 RNA,具体操作按照说明书进行。血细胞总 RNA 提取步骤参照文献 [4] 方法。提取的 RNA 用 50μL DEPC 处理的水溶解,甲醛变性电泳测定 RNA 完整性,紫外分光光度计测定含量,置 -80℃ 冰箱保存,备用。

1.2.2 克氏原螯虾 HSP70 的克隆 克氏原螯虾 HSP70 cDNA 的克隆:克氏原螯虾 HSP70 的简并引物根据本实验室克隆得到的蓝蟹 HSP70 序列 (DQ663760,另文发表),结合 GenBank 中已有的罗氏沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) (AY466497)、斑节对虾 (*Penaeus monodon*) (AF474375) 和凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) (AY645906) HSP70 保守序列设计。所有引物 (表 1)。

35℃ 下热休克虾 2h,然后室温恢复 1.5h,取其心脏组织立即放入液氮,提取总 RNA。经 RQ1

收稿日期: 2007-10-29;修订日期: 2009-01-16

基金项目:暨南大学人才科研启动基金项目 (No. 51204019) 资助

作者简介:孙勇 (1978—),男,汉族,安徽淮南人;硕士研究生;主要从事虾类分子生物学及免疫学研究。E-mail: sunyong0501@126.com

通讯作者:谢数涛, E-mail: xieshutao@yahoo.com.cn

表 1 克隆克氏原螯虾 *scHSP70* cDNA 序列所用引物

Tab. 1 Primers used for cloning *scHSP70* cDNA of the red swamp crayfish

引物名称 Name	引物序列 Sequence(5' 3')
P-F1	GGCCATGAATCCAAACAACAC
P-R1	GGCTCGCTCTCCCTCATACAC
P-R2	CAGCAGCGGTGGGTTCGTTG
P-F2	TCTGAAGGGCGTGAAAGGATGT
Oligo (dT) ₁₇ -adapter (OAP)	GGCCACGCGTCGACTAGTACT ₁₇
Abridged anchor primer(AAP)	GGCCACGCGTCGACTAGTACG ₁₇
Adapter primer(AP)	GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Oligo (dT) ₁₇	TTTTTTTTTTTTTTTTTT
P-F3	GGTGTGTGGTGGGAGGGTCTA
-actinF	AGTAGCCGCCCTGGTGTGATAGC
-actinR	TTCTCCAATGTCGTCCCACT
P-F	GGTGAA TACAA TGGCGGATC
P-R	TGCACGGCAATTCAGTAGAC

RNase-Free DNase (Promega, USA)处理总 RNA,然后用 ReverTra Ace 逆转录酶、Oligo (dT)₁₇ 作为引物合成第一链 cDNA。以得到的第一链 cDNA 作为模板,用简并引物 P-F1 和 P-R1 扩增克氏原螯虾 *HSP70* 中间部分序列,反应条件为预变性 94℃ 4 min,变性 94℃ 30 s,退火 58℃ 30 s,延伸 72℃ 80 s, 35 个循环后 72℃ 延伸 10 min,电泳检测。QIAquick Gel Extraction Kit 回收目的片段,产物与 pMD18-T Vector 连接,并转化大肠杆菌 DH5 感受态细胞,蓝白斑筛选阳性克隆并经 PCR 验证。测序工作由上海英骏公司完成。根据测序结果,设计基因特异性引物 P-F2 与 P-R2,结合三条接头引物 OAP、AAP、AP 进行克氏原螯虾 *HSP70* cDNA 5' 和 3' 末端序列 (RACE) 的扩增。

5' RACE:按前述方法合成用于 5' RACE 的第一链 cDNA,纯化后在末端转移酶作用下加 Poly (C) 尾,采用引物 AAP 和 P-R1 进行第一轮 PCR,产物适当稀释后用引物 AP 和 P-R2 进行套式 PCR。3' RACE:采用引物 OAP 逆转录合成第一链 cDNA,用引物 P-F1 和 AP 以进行第一轮 PCR,产物适当稀释后,用引物 P-F2 和 AP 进行半套式 PCR。PCR 反应体系为 25 μL,反应为预变性 94℃ 4 min,变性 94℃ 30 s,退火 58—60℃ 30 s,延伸 72℃ 90 s, 35 个循环后 72℃ 延伸 10 min。电泳检测,目的片段按前述方法经亚克隆后测序。

基因组中全长扩增及测序:采用 Dneasy Tissue

Kit 提取克氏原螯虾肌肉组织基因组 DNA,去离子水溶解。采用 P-F 和 P-R 引物进行基因组 *scHSP70* 全长基因扩增,条件同上,扩增产物经亚克隆后测序。

1.2.3 克氏原螯虾 *scHSP70* mRNA 在不同组织的相对表达量 热休克 2 h 后, *scHSP70* mRNA 在不同组织的表达变化:热休克虾 2 h,室温恢复 1.5 h,活体解剖取其心脏、肌肉、血液、消化腺、触角腺、精巢、肠 7 种材料,另取未经热休克的虾作为对照组,立即提取总 RNA。DNase 酶处理,逆转录合成第一链 cDNA,利用引物 P-F3 和 P-R1、-actinF 和 -actinR 分别扩增 *scHSP70* (343 bp) 和 -actin (240 bp) 片段^[5]。

预实验确定 *scHSP70* 和 -actin 合适的循环圈数均为 26 圈。然后各自在上述线性增长圈数内扩增 *scHSP70* 和 -actin,反应条件为预变性 94℃ 4 min,变性 94℃ 30 s,退火 59℃ 30 s,延伸 72℃ 30 s,取 5 μL PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,用 B D-RAD 公司凝胶成像系统进行成像,用配套软件 Quantity One 对 *scHSP70* 和 -actin 产物进行光密度分析,并计算 *scHSP70* 和 -actin 的光密度比值,评估各组织 *scHSP70* 相对表达水平。

心脏与鳃组织热休克后 *scHSP70* 转录表达随时间梯度的变化:在 35℃ 下 (预实验测定该温度约为亚致死温度) 分别热休克虾 1、2、4、6、8 h,室温水池中恢复 1.5 h,取其心脏组织,另取未经热休克的虾作为对照组,立即提取总 RNA,半定量 RT-PCR 检测 *scHSP70* 转录水平,方法同上。

1.3 数据分析 用 3 个平行重复实验的平均值 ± 标准差表示克氏原螯虾 *scHSP70* mRNA 表达量,数据分析用 SPSS 软件包 LSD 法进行多重比较,当 $p < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结 果

2.1 克氏原螯虾 *scHSP70* cDNA 克隆

克氏原螯虾 *scHSP70* cDNA 用同源引物 P-F1 与 P-R1 进行 PCR 扩增,在 1200 bp 附近处有一条清晰的条带,与预计的产物片段大小相近。3' RACE 扩增得到一条约 1000 bp 的条带。5' RACE 扩增得到一条约 700 bp 的条带。采用 DNAMAN 生物软件进行序列拼接,获得了该基因的全长 cDNA 序列。基因组扩增表明,该基因没有内含子。利用软件 BLAST 在 GenBank 中与所登陆的核酸序列进行同源性比较分析,发现最相近的序列均为 *HSP70* 基

因,说明得到的是克氏原螯虾 HSP70序列。该序列 GenBank 登陆号 DQ301506。

如图 1所示, scHSP70序列全长 2271bp, 5'UTR 为 142bp, 3'UTR 为 221bp, GC 含量为 49.9%。起始密码子(ATG)位于 143bp, 终止密码子(TAG)在 2048 位置,在 poly(A)尾上游未发现加尾信号(AA TAAA)。其开放阅读框(ORF)为 1902bp,可编码 635个氨基酸残基组成的蛋白质,推测的分子量为 69.611kD,等电点为 5.50。该序列含有三个结构域:ATP酶结构域(约 44kD, 1—384aa)、底物肽结合结构域(约 18kD, 385—545aa)、C 末端结构域(10kD, 546—635aa)。该序列存在真核细胞 HSP70 家族的三个特征序列标签:7—15(GDLGTTYS)、200—207(DLGGTFD)、335—349(LVLVGGSTRIPKQK)。另外,根据 scHSP70 氨基酸序列的 291—296位置上无原核热休克蛋白的特征序列(GPKH),可推断该基因为真核 HSP70 家族的一种胞质 HSP70成员^[6]。另外在 scHSP70中还发现 4个真核细胞特征基序:由 AEA YLGQK(130—137 残基)组成的 ATP-GTP 结合位点,由 RARFEEL 组成的(300—306 残基)非细胞器基序,由 KKDLG-GNKRAVRRL(251—264 残基)和 AVRRLRTACER-AKRIL(260—275 残基)组成的核定位信号标签,由 GPTVEED(628—635 残基)组成的胞质 HSP70 C 端特征基序^[7]。该蛋白序列在 C 末端缺失 GMP 或 GGGAP 简并重复序列,该重复序列一般出现在组成型 HSC70 中。氨基酸组成分析表明,该序列含有 96 个带正电荷氨基酸残基(天冬氨酸和谷氨酸),84 个负电荷氨基酸残基(精氨酸和赖氨酸)。含量最高的氨基酸分别为甘氨酸(8.5%)、丙氨酸(8.5%)、谷氨酰胺(8.5%)和赖氨酸(8.0%),色氨酸含量最低(0.5%)。

根据 scHSP70 cDNA 的 BlastX 搜索结果,选择 4 条同源性较高且充分研究的序列与克氏原螯虾的 scHSP70 cDNA 推导的蛋白序列进行 Clustal W 多序列比对分析(图 2),它与罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*, AY466497)、果蝇(*Drosophila melanogaster*, AF295952)、家鼠(*Mus musculus*, M35021)、人(*Homo sapiens*, M11717)的氨基酸相似性分别为 78.7%、73.2%、79.2%、79.7%。含有 ATP 酶结构域和底物肽结合结构域的 N 末端序列(1—545aa)序列保守性明显高于 C 末端序列。但是罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的 HSP70(AY466497)在 N 末端存在约 60 个氨基酸残基的缺失。从序列比

对图中可以看出,所有 HSP70 氨基酸序列的 C 末端均以 EEVD 序列结尾。

从 HSP70 氨基酸序列系统发生树(图 3)可以看出,各个物种的 HSC70 聚成一个大分支。其中甲壳类 HSC70 处在一个单独的分支。中国对虾、斑节对虾和南美白对虾聚在一起,按传统分类归于对虾属(*Penaeus*)。这个分支与刀额新对虾的 HSC70 归于一个较大的分支,按传统分类应该为对虾科(Penaeidae)。前人的研究显示克氏原螯虾与美国龙虾亲缘关系最近,同属于螯虾总科(Astacoidea)。而在 HSC70 分支中,美国龙虾、蓝蟹、Marbled crab 聚成一个分支,说明克氏原螯虾在进化上与蟹类亲缘关系近,这与传统的分类结果相一致。但是,克氏原螯虾的 HSP70 在系统树中位于 HSC70 分支之外,与已经报道的罗氏沼虾的诱导型的 HSP70 聚成一个分支,表明克隆得到的可能是克氏原螯虾的一种诱导型的 HSP70 基因。

采用 SWISS-MODEL 软件对克氏原螯虾 scHSP70 进行三维结构预测,显示整个结构由 2 个结构域组成,N 末端结构域为 ATP 酶结构域(ATPase domain),大小约 44kD,具有 ATP 酶活性,由 4 个亚域构成 2 个叶状结构,叶状结构之间形成一个很深的裂缝。C 末端为底物肽结合结构域(Peptide binding domain),大小约 18kD,其保守性低于 ATP 酶结构域,具有结合底物肽的功能,包括 4 对反向平行并构成紧密三明治结构的 α 折叠以及一个螺旋。

2.2 克氏原螯虾 scHSP70 mRNA 的诱导表达

从图 4 可知,热休克前,在克氏原螯虾 7 种组织中 scHSP70 mRNA 表达量都相对较低,在一些组织中,如血细胞、精巢中几乎不表达。在经过 2h 热休克后,表达量均大幅增加($p < 0.05$),说明克隆得到的是诱导型的 HSP70。此外,热休克前后心脏中该 HSP70 的表达在 7 种组织中是最高的,表明心脏组织在虾类的应激反应中发挥重要的作用。

图 5 中显示,心脏和鳃组织在经过 1h 的热休克,HSP70 的表达量已经有明显地提高,说明这种 HSP70 基因在应激条件下,能够快速启动转录和翻译,从而起到对细胞的保护作用。而且,这种表达量随着热休克时间的延长,呈现增强的趋势,说明这种 HSP70 对细胞的保护作用是一种持续性的保护。在 0—8h 的热休克时间里,心脏始终比鳃的表达量要高,说明心脏在虾类的应激反应中可能发挥很重要的作用。

1 GAAGACACAAGTGTCAACCATTCAGTGTCAAGCACCTCTTAACACACGTGTCCATTGGCGAGGAGAAGTAACGGAGACTTGTCAATCT
91 TACAATTAAC TCCCGACTACACCAACTGTAAAGAAAGCCTGGTGAATACAATGGCGGATCCAGTAATTGGCATCGACTGGGCACGACG
1 M A D P V I G I D L G T T
signature-1
181 TACTCGTGGTGGGCGTGTTCAGCAGGGCAAGGTGGAGATCATCGCCAACGACAGGGCAACAGGACCACGCCCTTCGTACGTGCGCCCTC
14 Y S C V G V F Q Q G K V E I I A N D Q G N R T T P S Y V A L
271 ACGACACAGAAGACTCATTGGCGATGCAGCCAAGAACCAGAAGGCCCTCAACCCAGCAACACAATCTTTGATGCCAACGACTCATC
44 T D T E R L I G D A A K N Q T A L N P S N T I F D A K R L I
361 GGCCGTAAGTTCAATGACCAACCGTGCAGAACGACAAGAAACATTGGCCCTTTGACGTGGTCCGACAGCAACGGCAAACCCAAAATACAG
74 G R K F N D P T V Q N D K K H W P F D V V D S N G K P K I Q
451 GTTGAATACAAGGGAGAGAGAAAGACTTTCAACCCCGAGGAGATCTCGTCCATGGTGTGACCAAGATGAAGGAGACGGCAGAAGCGTAT
104 V E Y K G E R K T F N P E E I S S M V L T K M K E T A E A Y
541 CTGGGCCAGAAAGTGAAGGACGCGTCATCAGTTCCCGCTACTTCAAAGACTCTCAGCGTCAGGCCACCAAGACGCGAGGTGTCATC
134 L G Q K V K D A V I T V P A Y F N D S Q R Q A T K D A G V I
ATP/GTP binding site
631 GCCGACTGAACGTTCTCGCATCATCAACGAACCCACCGCTGCTGCAATTGCTTATGGGCTTGACAAAAAGTAGGCGGTAGAGGAGAA
164 A G L N V L R I N E P T A A I A G L D K K V G G R G E
721 CGTAATGTTTTGATCTTCGACCTCGGCGCGGAACCTTCGATGTGTCGATCCTTAGCATCGATGAAGGCGTCTTCGAGGTAAAGTCTACT
194 R N V L I F D L G G G T F D V S I L S I D E G V F E V K S T
signature-2
811 GCCGGAGATACTCACTTGGGCGGGAAGATTTTGACAACAGAATGGTGAACCACTTCAAACAAGAGTTCAGAGAAAATACAAGAAAGAT
224 A G D T H L G G E D F D N R M V N H F K Q E F Q R K Y K K D
901 TTAGGTGGCAATAAACGAGCTGTTCTGCTGACTGAGAACTGCCTCGAGAGAGCCAAACGAACCTTTTCATCTCCACTCAGGCCAGCGTG
254 L G G N K R A V R R L R T A C E R A K R T L S S S S T Q A S V
nuclear localization signal
991 GAGATCGACTCTCTGTTTCGAGGGTATTGACTATTACACGTCCATCACCCGCGCCAGGTTTGAAGAGCTGTGTTAGACCTCTTCGAGGG
284 E I D S L F E G I D Y Y T S I T R A R F E E L C S D L F R G
1081 AACTAGAGCCAGTGGAGAAGGCTTTGAGAGACGCAAGATAGACAAAGCTGGCATCCATGAAGTGGTGTGGTGGGAGGGTCTACCCGC
314 T L E P V E K A L R D A K I D K A G I H E L V L V G G S T R
1171 ATCCCAAAGATACAAAATTTGCTGCAAGACTTATTCAACGGAAAGAACTCAACAAATCAATCAACCCAGACGAGGCGGTGGCCTACGGT
344 I P K I Q K L L Q D L F N G K E L N K S I N P D E A V A Y G
signature-3
1261 GCTGCCGTACAAGCGCCATCCTACACGGAGAACAGTCTGAGGGCGTGAAGGATGTTCTCTGCTGGACGTGGCGCCTCTGTGCTGGGT
374 A A V Q A A I L H G D Q S E G V K D V L L L D V A P L S L G
1351 ATAGAGACAGCAGGTGGAGTGATGACAGCTCTCATCAAACGCAACACAACCATCCCAACCAAGCAACAGCAAGTATTCACCACGTATTCT
404 I E T A G G V M T A L I K R N T T I P T K Q Q Q V F T T Y S
1441 GACAACAGCCAGGTGTGTGATCCAGGTGTATGAAGGAGAGCGGACATGACAAAAGACAACAATCTTTGGGCAAGTTTGAAATTGAGT
434 D N Q P G V L I Q V Y E G E R A M T K D N N L L G K F E L S
1531 GGCAATCCCTCCCGACCTCGCGGAGTGCCTCAGATCGAAGTAACTTCGACATCGATGCTAATGGCATCCTTAACGTATCTGCGGCCGAC
464 G I P P A P R G V P Q I E V T F D I D A N G I L N V S A A D
1621 AAGTCGACCGGCAAGGAGAACAGATCACCATCACCATGACAAGGGTCGCTTAGTAAAGAAGAGATAGAGAGAATGGTAAACGAAGCA
494 K S T G K E N K I T I T N D K G R L S K E E I E R M V N E A
1711 GAGAAATACACGAAGACGACGCAACAAACGAGAAAGAGTGAAGCAAGAACCCTTAGAGGCTCTGTGCTTCAGCATCAAGTCGGCA
524 E K Y H E D D A K Q R E R V E A K N R L E A L C F S I K S A
1801 GTCTCTGAACCTTCAGTTGGCGACAACTCTCAGCGGAGGAGAGATCCGTCGAGGAGAAAGCTCAAGAACTCTCAACTGGCTGGAC
554 V S E P S V G D K L S A E E K R S V E E K A Q E T L N W L D
1891 GCCAACAGCTGGCAGAGAAGGAGGAATACGAGCACCATGAGGAGTTGGAGAGAGTGTGGCGTCTCTGCCCAGCAAGGTGCATGGG
584 A N Q L A E K E E Y E H Q M K E L E R V W R P L A S K V H G
1981 CAGGGGCGCGGAGGCGGAGGAGCTTCGCTAGCTCGGACCCACAGTCGAGGAGGTGACTAGACATACAGCTGAGAATGCTA
614 Q G A G G G Q G G A S A S S G P T V E E V D *
2071 CCTGAAAGTGTTCATTGTTTCATGTTATTTGTTTAAATGCTACTAGTAATTGCCGTGCATGTTTATGTAATAAAGGAAAAACAAGTGT
2161 TGTTTTGTAATATCTTACAAATATTTGTTATATGTAAACCATGGGTATGATTTTTCTATTACAATGCCAAGCATAAAAA
2251 AAAAAAAAAAAAAAAAAA

图 1 克氏原螯虾热休克蛋白基因核酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *scHSP70* cDNA

scHSP70 signatures-1, -2, -3, and the nuclear localization signal sequences are underlined, and the putative ATP-GTP binding site is boxed. The potential nonorganellar eukaryotic consensus motif is underlined with dots, and the cytoplasmic motif carboxyl terminal region (GPVIEEVD) is in bold.

The stop codon is marked with an asterisk

Crayfish Hsp70	-MADPVIIGIDLGTTYSVGVFQGGKVEIILANDQGNRTTPSYVALTDTERLIGDAAKNQALNPENTIFDAKRLIGRKFN	79
Prawn Hsp70	-----M..N..V.N.....D.	20
Fruit fly Hsp70	--M.A.....Y.H.....F..S.....P...V.M..R..V.....YD.	77
Mouse Hsp70	MAKNIA.....H.....F.....V...Q..V.....G.	80
Human Hsp70	MAKAAAV.....H.....F.....V...Q..V.....G.	80
Crayfish Hsp70	PTVQNDKKHWPFDVVDNSNGKPKIQVEYKGERKTFNPEEISSMVLTKMKETAAYLGQKVKDAVITVPAYFNDSQRQATKD	159
Prawn Hsp70	...S.M....T..SEG...MK..F..T.....KT.....C.....	100
Fruit fly Hsp70	.KIAE.M....K..SDG....G.....S.R.A.....ESIT.....	157
Mouse Hsp70	AV..S.M....Q..NDGD...V..N....SRS.F.....I.....HP.TN.....	160
Human Hsp70	.V..S.M....Q..INDGD...V..S....T.A.Y.....I.....YP.TN.....	160
Crayfish Hsp70	AGVIAGLNLVRIINEPTAAALAYGLDKKVGGRGERNVLI FDLGGGTFDVSILSISDEG-VFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRM	238
Prawn Hsp70	.A.....L...K.....I.V.....A.....	179
Fruit fly Hsp70	.H.....L.....NL--K.....T...SL...R.....L	235
Mouse Hsp70RTG--K.....T..D.-I...A.....L	237
Human Hsp70RTG--K.....T..D.-I...A.....L	237
Crayfish Hsp70	VNHFKQEFQRKYKDLGCKRAVRRLRTACERAKRTLSSSTQASVEIDSLFEGIDYYTSITRARFEELCSDLFRGTLEPV	318
Prawn Hsp70	.H..V.....TT...I.....I.....F.....D.....	259
Fruit fly Hsp70	.T.LAE..K.....RS.P..L....A.....E.TI...A...Q.F..KVS.....A...N..Q..	315
Mouse Hsp70	.S..VE..K..H..ISQ.....L.....F.....	317
Human Hsp70	...VE..K..H..ISQ.....L.....F.....S.....	317
Crayfish Hsp70	EKALRDADKIDKAGIHELVLVGGSTRI PKIQKLQDLFNGKELNKSINPDEAVAYGAAVQAAILHGDQSEGVDVLLLDVA	398
Prawn Hsp70L..GS.A.I.....F.....G..R.....	339
Fruit fly Hsp70	...N...M..GQ..DI.....V.S...EF.H..N..L.....S...GKIQ...V...	395
Mouse Hsp70M...Q..D.....V....P...RD.....M..K..N.Q.L.....	397
Human Hsp70L...Q..D.....V....P...RD.....G.....M..K..N.Q.L.....	397
Crayfish Hsp70	PLSLGIETAGGVMTALIKRNTITPTKQQQVFTTYSQDQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELSGIPPAPRGVPQIEVT	478
Prawn Hsp70I...A.....P.....	419
Fruit fly Hsp70K..E..CR..C..TKT.S.....S.....A..T.D.....	475
Mouse Hsp70L.....S.....T.T.....R.....R.....	477
Human Hsp70L.....S.....T.I.....R.....	476
Crayfish Hsp70	FDIDANGILNVEAADKSTGKENKITITNDEGRLSKEEIERMVNEAEKYHEDDAKQRRERVEAKNRLEALCFSIKSAVSEPS	558
Prawn Hsp70V.....K...DV.R.K.E.D.....SV.Y.....CD..	499
Fruit fly Hsp70	..L.....KEM...AKN...K.....QA..D.....ADE.E.H.Q..ITSR.A..SYV.NV.QS.EQAP	555
Mouse Hsp70T.T....A.....Q...R.KAE.EV..D..A...A..SYA.NM...EDEG	557
Human Hsp70T.T....A.....Q...KAE.EV...S...A..SYA.NM...EDEG	556
Crayfish Hsp70	VGDKL SAEKRSVEEKAQETLNWLDANQLAEKEEYEHQMKELERVWRPLAS-----KVHQGA-GGGQGGASASSG-	628
Prawn Hsp70	.A....D...C..Q..E...R..E.....F.Y..N...K.....G-YA.NA.YLG.T.G	570
Fruit fly Hsp70	A...DEAD.N..LD.CN..IR...S.TT....FD.K.E..T.HCS.IMTKMHQGGAGAAG.P..NC.Q.A.GFGGYSG	634
Mouse Hsp70	LKG..EAD.KK.LD.C..VIS...S.T..D...FV.KRE...CS.II.GLYQG--AGAP.A.G-F.A.APPKGA..S	634
Human Hsp70	LKG.I.EAD.KK.LD.C..VIS....T...D.F..KR...Q.CN.II.GLYQG--AGGP.P.G-F.A..P-KGG..S	632
Crayfish Hsp70	-PTVEEVD	635
Prawn Hsp70	-.....	577
Fruit fly Hsp70	-.....	641
Mouse Hsp70	G..I...	642
Human Hsp70	G..I...	640

图 2 克氏原螯虾热休克蛋白氨基酸序列及同源序列的比较

Fig. 2 Multiple alignment of scHSP70 deduced amino acid sequence (GenBank accession number. DQ301506) with inducible HSP70 cloned from other species. Residues are numbered along the right margin. Identity is indicated by dots, and gaps are shown by dashes

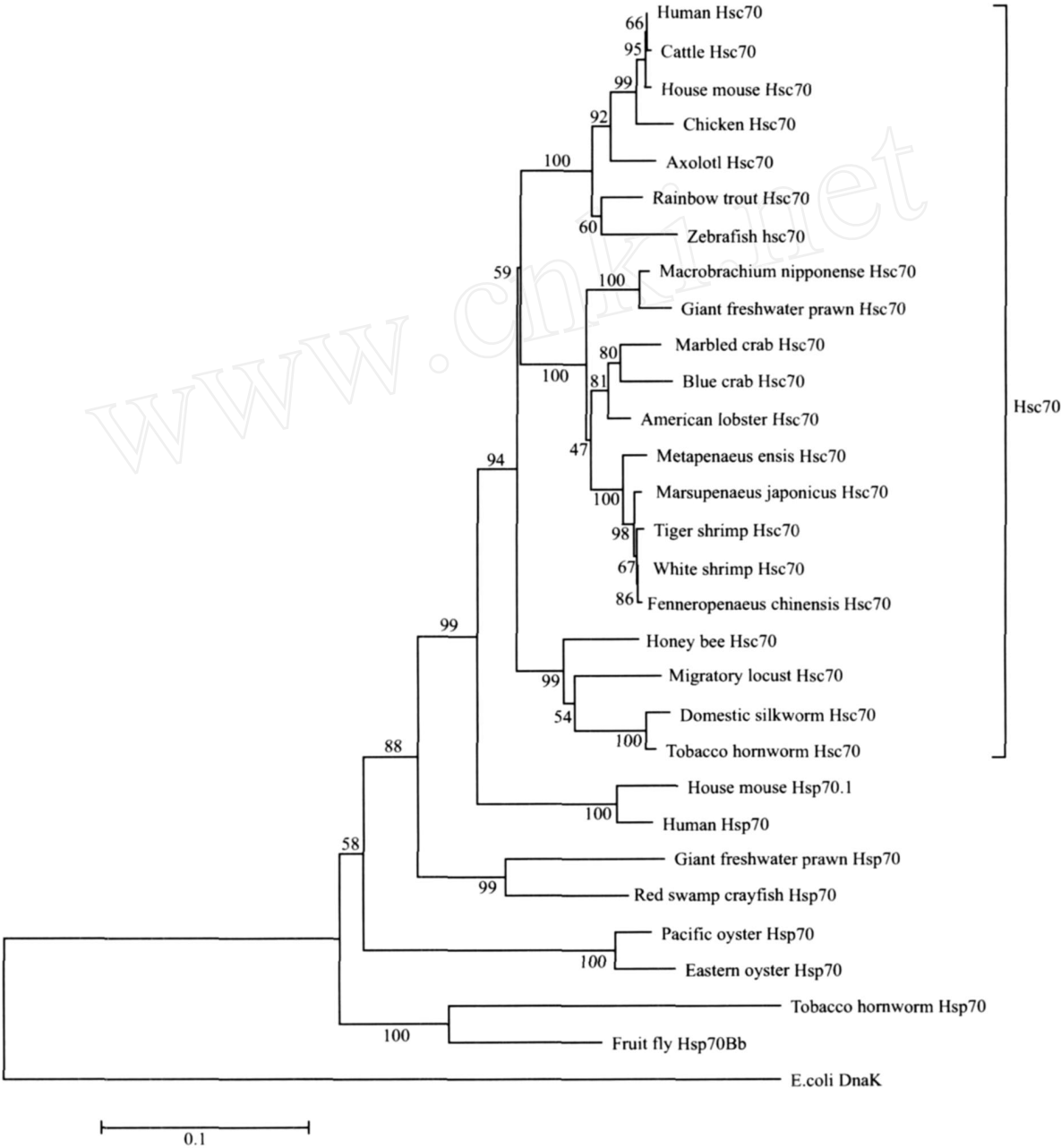


图 3 热休克蛋白氨基酸序列系统发生树

Fig. 3 Phylogenetic tree showing the relationship of red swamp crayfish HSP70 amino acid sequence to other HSP70 family members from a variety of species

Sequences used in the tree are Human HSC70 (P11142), Cattle HSC70 (BC105182.1), House mouse HSC70 (M19141), Chicken HSC70 (AJ004940.1), Axolotl HSC70 (AY029210.1), Rainbow trout HSC70 (AAB21658), Zebrafish HSC70 (L77146.1), *Macrobrachium nipponense* HSC70 (DQ660140), Giant freshwater prawn HSC70 (AY466445), Marbled crab (DQ173922), Blue crab_HSC70 (DQ663760), American lobster (DQ173923), *Metapenaeus ensis* HSC70 (DQ486134), *Marsupenaeus japonicus* HSC70 (EF091692), Tiger shrimp HSC70 (AF474375), White shrimp HSC70 (AY645906), *Fenneropenaeus chinensis* HSC70 (AY748350.1), Honey bee (XM_392933.2), Migratory locust (AY299637.3), Domestic silkworm HSC70 (AB084922.1), Tobacco hornworm HSC70 (AF194819), House mouse HSP70 (M35021), Human HSP70 (M11717), Giant freshwater prawn HSP70 (AY466497), Red swamp crayfish HSP70 (DQ301506), Pacific oyster HSP70 (AB122064), Eastern oyster HSP (AJ271444), Tobacco hornworm HSP (AY220911), Fruit fly HSP70 (AF295952), *E. coli* DnaK (BAB96589). The distance is the proportion of amino acid sites at which 2 sequences are different. Bootstrap values are given in percent

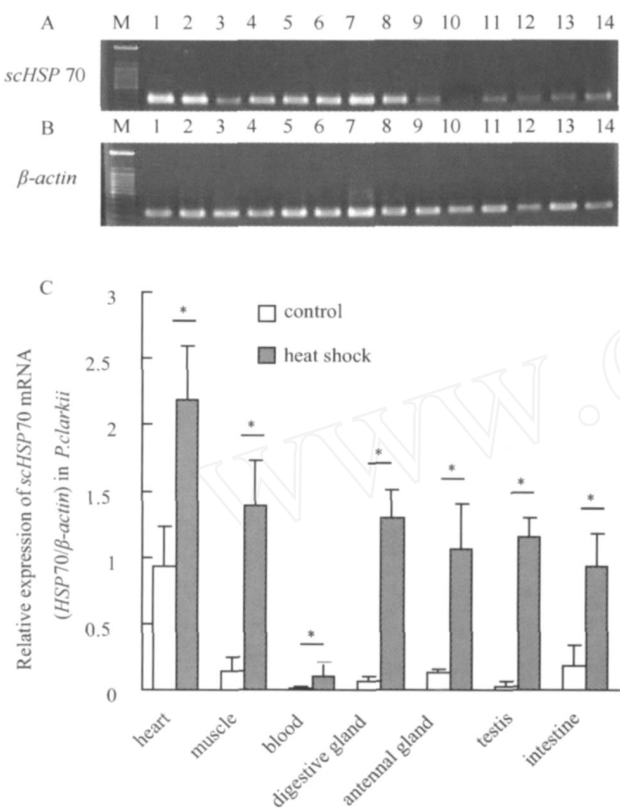


图 4 克氏原螯虾热休克 2h 后组织 *scHSP70* 表达量的变化

Fig. 4 Semi-quantitative RT-PCR analysis of *scHSP70* mRNA expression in the different tissues of the crayfish in response to 2h heat shock. β -actin fragment was used as control. (A) 1-7 lanes stand for tissues of heat shock treatment for 2h. 8-14 lanes stand for controls. 1, 8: heart; 2, 9: muscle; 3, 10: hemocytes; 4, 11: digestive gland; 5, 12: antennal gland; 6, 13: testis; 7, 14: intestine, respectively. (B) β -actin fragment was detected corresponding to the same samples from A as an internal control. M: 100 bp DNA ladder marker. (C) Densitometric analyses of the mRNA levels of *scHSP70*. Significant difference between heat-shock and control subject in each tissue type is marked by asterisks (*, $p < 0.05$)

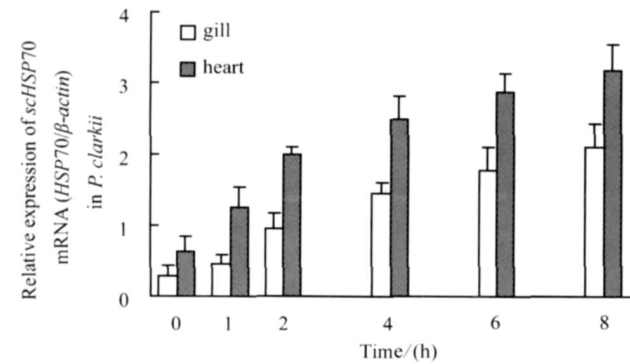


图 5 不同热休克时间心脏和鳃组织中 *scHSP70* mRNA 的变化

Fig. 5 The *scHSP70* mRNA expression levels of heart and gill tissues from red swamp crayfish after different heat-shock time

3 讨 论

热休克蛋白,是一组在结构上高度保守的多肽,广泛存在于自然界原核、真核细胞中,正常情况下与应激条件下都发挥重要的生理功能。大量的体内研究 (*in vivo*) 资料表明,热休克蛋白能够保护细胞、组织及动物体经受随之而来的在通常情况下能够致死的热伤害以及其他有害刺激如缺氧、缺血再灌注等。*HSP70* 的高表达能够保护人单核细胞免受过氧化氢引起的毒害^[8]及凋亡^[9]、人 A-431 细胞免受氰化钠伤害^[10]。用抑制 *HSP70* 表达的试剂处理细胞,细胞的保护作用受到影响,细胞保护作用的出现滞后于 *HSP70* 的合成^[11],说明细胞的保护作用源于 *HSP70* 的表达。用热休克以外的方法诱导 *HSP70* 的蛋白表达,同样起着对细胞的保护作用,比如用雌激素处理乳腺癌细胞 T47-D。转 *HSP70* 基因的细胞能够抵抗多种有害试剂的伤害^[9]。抑制 *HSP70* 的表达会降低细胞的活力,向成纤维细胞显微注射 *HSP70* 的抗体,会增加细胞对亚致死温度的敏感性^[12]。

目前我国虾类养殖中,病害时有发生^[13],为了要提高养殖虾蟹的产品品质和安全性,除改善水质环境、合理使用药物外,还必须从根本上提高养殖虾蟹的免疫机能。为了达到这一目的,一方面是筛选抗病能力强的虾蟹苗种,另一方面则是设法提高养殖虾蟹自身的免疫能力。因此对虾类免疫学进行深入研究是目前养殖虾类疾病防治的当务之急。*HSP70* 作为虾蟹体内在应激下高效表达的一类蛋白,与虾类应付和适应经常变化的生活环境密切相关。因此,深入研究 *HSP70*,有助于揭示 WSSV 等疾病爆发的分子机制,提高虾类的免疫力,增强虾类抵抗各种不良环境能力,为推出安全、高产和高质量的水产品提供有效的保障。

本文采用 RT-PCR 和 RACE 相结合的方法,从 35 热休克的克氏原螯虾的心脏组织克隆得到全长 2271bp 的 *HSP70* 基因 (*scHSP70*),编码 635 个氨基酸,推测其蛋白分子量为 70kD,理论等电点为 5.34。*scHSP70* 蛋白序列缺失 GCMP,该重复序列存在与否可以用于区分诱导型的 *HSP70* 以及组成型的 *HSC70*^[14,15],从而表明获得的可能为克氏原螯虾诱导型 *HSP70* 基因。基因组扩增显示该基因不含有内含子。在 *HSP70* 的家族中,内含子总是出现在组成型 *HSP70*s 基因中,而不出现在诱导型 *HSP70*s 基因中。这种缺失使得在应激条件下能够快速转录和合成 *HSP70* 蛋白,发挥对细胞的保护作用。蛋白氨

氨基酸序列进化树分析显示, scHSP70与罗氏沼虾一种诱导型 HSP70处在一个单独的分支。scHSP70热诱导表达实验也发现,对虾进行 35 热休克 2h后,各种组织 scHSP70 mRNA 表达量均显著提高,从而表明本文克隆得到的是一种诱导型 HSP70。

scHSP70氨基酸序列存在真核细胞 HSP70家族的三个特征标签以及真核细胞特征基序,并且该序列以 EEVD 短肽结尾。HSP70 家族可以分为 GRP170/Lhsp、HSP110、Dnak 三个主要亚族^[16-18],各亚族蛋白在其 ATP结合位点上有各自的特征性基序^[19]。克隆得到的克氏原螯虾 scHSP70,ATP结合位点的特征性基序为 DLGTT-S-V (9—17),符合 Dnak亚族的特点,可以确认 scHSP70属于 Dnak亚族。EEVD这 4个氨基酸残基在绝大多数物种的 HSP70s序列中都是相同的,被认为是 HSP70s和 HSP90s的典型胞内定位标记^[6,20]。Demand, *et al.*通过去除 HSP70的 EEVD尾端,发现该变异体失去与 Hop、HSP24转录因子的结合能力,同样结果出现在 C端 α -helix亚结构域的缺失^[13]。

目前本实验室正在进行克氏原螯虾组成型热休克蛋白 HSC70的克隆以及原核表达实验。深入开展热休克蛋白研究,进一步揭示 HSPs在细胞生理过程中的作用和机理,将对水产养殖业的发展起重要的促进作用。

参考文献:

- [1] Morimoto R I, Santoro M G. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacological targets for cytoprotection [J]. *Nat Biotechnol*, 1998, **16**: 833—838
- [2] Liu J, Yang W J, Zhu X J, *et al*. Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2004, **9**(3): 313—323
- [3] Jin C X, Pan L Q. Preliminary studies physiological adaptive mechanism *procambarus clarkii* osmoregulation under different ambient salinities [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **6**: 110—115 [金彩霞, 潘鲁青. 盐度变化对克氏原螯虾渗透调节影响机制的初步研究. 水生生物学报, 2008, **6**: 110—115]
- [4] Lo W Y, Liu K F, Liao I C, *et al*. Cloning and molecular characterization of heat shock cognate 70 from tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2004, **9**: 332—343
- [5] Jiao C Z, Wang Z Z, Li F H, *et al*. Cloning, sequencing and expression analysis of cDNA encoding a constitutive heat shock protein 70 (HSC70) in *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2004, **49**: 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**(27): 2178—2186]
- [6] Karlin S, Brocchieri L. Heat shock protein 70 family: multiple sequence comparisons, function, and evolution [J]. *J Mol Evol*, 1998, **47**: 565—577
- [7] Boorstein W R, Ziegelhoffer T, Craig E A. Molecular evolution of the HSP70 multigene family [J]. *J Mol Evol*, 1994, **38**: 1—17
- [8] Polla B S, Kantengwa S, Francis D, *et al*. Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(13): 6458—6463
- [9] Samali A, Cotter T G. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis [J]. *Exp Cell Res*, 1996, **223**: 163—170
- [10] Kiang J G, Wang X D, Ding X Z, *et al*. Heat shock inhibits the hypoxia-induced effects on iodide uptake, signal transduction, and cell viability in rat thyroid FRTL-5 cells [J]. *Thyroid*, 1996c, **6**: 475—483
- [11] Kiang J G, Ding X Z and McClain D E. Thermotolerance attenuates heat-induced increase in $[Ca^{2+}]$ and HSP-72 synthesis but not heat-induced intracellular acidification in human A-431 cells [J]. *J Invest Med*, 1996a, **44**: 53—63
- [12] Riabowol K T, Mizzen L A, Welch W J. Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against HSP70 [J]. *Science*, 1988, **242**: 433—436
- [13] Xie Z X, Pang Y S, Deng X W, *et al*. Study on the detection of white spot syndrome virus and taura syndrome virus by multiplex PCR [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **5**: 125—127 [谢芝勋, 庞耀珊, 邓显文, 等. 二温式多重 PCR 检测对虾白斑综合征病毒和桃拉病毒的研究. 水生生物学报, 2005, **5**: 125—127]
- [14] Demand Z Z, Luders J and Hohfeld J. The carboxy-terminal domain of HSC70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors [J]. *Mol Cell Biol*, 1998, **18**(4): 2023—2028
- [15] Kiang J G, Tsokos G C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology [J]. *Pharmacol Ther*, 1998, **80**(2): 183—201
- [16] Kuwabara K, Matsumoto M, Ikeda J, *et al*. Purification and characterization protein (ORP150), from cultured rat astrocytes and its expression in ischemic mouse brain [J]. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 5025—5032
- [17] Lee Y D, Easton D, Murawski M, *et al*. Identification of a major subfamily of large HSP70-like proteins through the cloning of the mammalian 110-kDa heat shock protein [J]. *J Bio Chem*, 1995, **270**: 15725—15733
- [18] Schmid V A, Brown B E, Miller D. Heat shock protein (HSP70) expression in the tropical reef coral *Goniopora djiboutiensis* [J]. *J Therm Biol*, 1997, **22**: 11—19
- [19] Craven R A, Tyson J R, Stirling C J. A novel subfamily of HSP70 in the endoplasmic reticulum [J]. *Trends Cell Biol*, 1997, **7**: 277—282
- [20] Boorstein W R, Ziegelhoffer T, Craig E A. Molecular evolution of the HSP70 multigene family [J]. *J Mol Evol*, 1994, **38**: 1—17

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF AN INDUCIBLE HEAT SHOCK PROTEIN 70 GENE FROM RED SWAMP CRAYFISH, *PROCAMBARUS CLARKII*

SUN Yong¹, ZHANG Li², LIMu-Chan¹, WU Ren¹, LEI La-Mei¹ and XIE Shu-Tao¹

(1. Research Center of Hydrobiology, College of Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632;

2. Key Laboratory of Aquatic Science of Chongqing, School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715)

Abstract: Red swamp crayfish, *Procambarus clarkia*, with advantages of easy cultivation and availability, can live in various tough environments, so intrigued researchers pay attention to its ecology, toxicology, physiology and immunology. We studied an inducible cDNA encoding HSP70 in *P. clarkia* which would contribute to extensive researches of HSP70s and environmental stresses. An inducible heat shock protein 70 (HSP70) cDNA was cloned from red swamp crayfish by RT-PCR and RACE, which named scHSP70. The full-length cDNA of the scHSP70 was 2271bp, consisting of a partial 5'-terminal untranslated region (UTR) of 142bp, a 3'-terminal UTR of 221bp, an open reading frame of 1902bp (ORF) and a poly (A) tail and GenBank No. DQ301506. The gene contained only one exon according to amplification of scHSP70 from genomic DNA. The scHSP70 cDNA encoded a polypeptide of 635 amino acids. Based on phylogenetic analysis, the gene was clustered with inducible HSP70 family members from other species. The evolution relationship was consisted with traditional classification. Semi-quantitative PCR was employed to assess the temporal expression of scHSP70 mRNA levels from heat-shock treated and unstressed crayfish. Challenge of the red swamp crayfish with 2h heat shock resulted in dramatic increases in the expression of HSP70 mRNA levels in all tissues, heart, muscle, hemocytes, digestive gland, antennal gland, testis and intestine, among which, the highest expression was found in heart. However, under normal conditions, the expressions of HSP70 mRNA level were much lower in all tissues compared to treated ones, especially in haemocytes. The upregulated mRNA expression of the HSP70 in the crayfish following heat shock indicates that scHSP70 gene is inducible. These stress proteins provide invaluable information in stress response in the crayfish.

Key words: *Procambarus clarkia*; Inducible; HSP70; Heart