

黄颡鱼 HSC70 基因及其组织表达分析

张 娟¹ 张其中^{1,2} 张占会¹ 崔 森¹

(1. 暨南大学水生生物研究所, 广州 510632; 2. 水产科学重庆市市级重点实验室, 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715)

摘要:热休克蛋白 70 (HSP70) 与生物体的抗胁迫能力密切相关。本文采用 RACE (Rapid amplification of cDNA ends) 技术, 从黄颡鱼 *Pelteobagrus fulvidraco* 克隆到一种组成型热休克蛋白 (HSC70) 基因及其 cDNA。该 cDNA 全长 2245bp, 包括 5 非编码区 82bp, 3 非编码区 225bp, 开放阅读框 (ORF) 1938bp, 编码 645 个氨基酸组成的蛋白质。黄颡鱼 HSC70 基因含有 8 个内含子, 与人、鼠、虹鳟和花斑溪鲮的 HSC70 基因内含子数目相同, 位置相似。其中, 最长内含子 (873bp) 位于 5 端非编码区, 其余内含子 (长度在 80—251bp 之间不等) 均在编码区以内。黄颡鱼 HSC70 基因编码的氨基酸序列与南方鲇的相似度最高, 达 96.13%, 与欧洲银鲫和团头鲂的相似度分别为 94.45% 和 94.14%。RT-PCR 检测显示, 正常情况下黄颡鱼 HSC70 在血细胞、心脏、肝、头肾、脾、鳃、肌肉和脑中均有表达, 但表达量在鳃中最高, 肌肉中最低; 统计结果显示, 热激后 HSC70 在血细胞、肝、头肾和脑中的表达量显著上升 ($p < 0.05$), 而在其余组织中热激前后的表达差异不显著 ($p > 0.05$)。

关键词: HSC70 基因; 克隆; 组织表达; 黄颡鱼

中图分类号: Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)03-0426-09

热休克蛋白 (Heat Shock Proteins, HSPs), 也叫热激蛋白, 是生物体在受到外界环境胁迫因子 (如高温、低温、缺氧、病原入侵、污染和饥饿等) 刺激下所产生的一类对细胞起保护和修复作用的特殊蛋白^[1,2]。而 HSP70 是热激蛋白中的一个家族, 该家族蛋白由两类基因所编码, 即环境诱导型的 HSP70 基因和组成型的 HSC70 基因, 前者在正常细胞内表达量极低, 经外界刺激诱导后表达量显著增加; 后者在正常细胞内即有表达, 经外界刺激后其表达量有不同程度上升^[3]。这些蛋白作为“分子伴侣”, 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、受损的蛋白或变性蛋白, 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应激能力^[2,4,5]。

黄颡鱼 *Pelteobagrus fulvidraco* 俗称黄骨鱼, 肉质鲜美, 营养价值高, 现已集约化大规模养殖, 然而这种高密度养殖方式让其面临拥挤胁迫和其他更频繁的刺激, 易引起病害发生^[6], 黄颡鱼自身的抗应激能力成为决定其在养殖过程中成活率高低的要因

素之一。HSC70 基因作为一种重要的看家基因^[2], 与生物体的抗逆抗应激能力密切相关, 影响机体的存活能力^[4,7]和生长速率^[8]。目前, 在鱼类中, 已有虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[9]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[10]、青鳉 (*Oryzias latipes*)^[11]、黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*)^[3] 和南方鲇 (*Silurus meridionalis*)^[12] 等十几种鱼的 HSC70 cDNA 全序列得到克隆, 在鲇形目中仅报道了鲇科鱼类南方鲇的 HSC70 cDNA 序列。本文首次报道鲇形目鲿科黄颡鱼 HSC70 基因及其 cDNA 全序列, 以及该基因的组织表达分布, 为进一步阐明黄颡鱼 HSC70 的多种功能, 特别是在抗逆和抗病中的作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物、载体和宿主菌 在养殖场购买健康无损伤的黄颡鱼作为实验动物, 体长为 (13.71 ± 1.74) cm, 实验前在曝气自来水中充气驯养 5d。pMD 18-T Vector 购自大连 TaKaRa 公司。大肠杆菌

收稿日期: 2008-11-14; 修订日期: 2009-03-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (40576056); 广东省自然科学基金项目 (04300664, 07300378); 中国博士后科学基金一等资助金 (20070420144) 资助

作者简介: 张娟 (1984—), 女, 汉族, 湖南湘潭人; 硕士; 研究方向为水生动物分子生物学。E-mail: zhangjuantx@126.com

通讯作者: 张其中, E-mail: zqz666@sina.com; Tel: 020-35891381

DH5α由本实验室保存。

1.1.2 试剂 逆转录酶 M-MLV 购自 Promega 公司。rTaq DNA 聚合酶、TdT加尾酶、dNTPs和 DL 2000 Marker购自大连 TaKaRa公司。凝胶纯化试剂盒 E. Z. N. A.™ Gel Extraction Kit, 购自 Omega 公司。Trizol 购自 Invitrogen 公司。引物合成及测序均委托上海 Sangon 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 提取和第一链 cDNA 的合成 取黄颡鱼新鲜鳃组织,按 Trizol 说明书提取总 RNA,电泳检测完整性,核酸定量仪检测其浓度和纯度,保证其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1.8—2.0。以总 RNA (约 2μg) 为模板,以 Oligo dT₁₈ 为引物,按照逆转录酶 M-MLV 说明书合成第一链 cDNA。

1.2.2 *HSC70* cDNA 中间片段序列的获得 根据 GenBank 中南方鲇 *HSC70* cDNA 序列 (登录号 EF406131) 和斑点叉 8 尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) *HSP70* cDNA 序列 (登录号 U22460), 设计两对引物 (P1、P2 和 P3、P4) (表 1) 扩增黄颡鱼 *HSC70* cDNA 中间片段 (图 1 A)。以第一链 cDNA 为模板,PCR 反应总体积均为 25μL,各含: 2.5μL 10×反应缓冲液, 0.5μL 上、下游引物 (各 10μmol/L), 0.5μL dNTPs (10mmol/L), Taq 酶 1.25U, 模板量 1μL, 以 dd H₂O 补足体积 (以下 PCR 反应体系均同此)。扩增程序均为: 94℃预变性 3min; 94℃变性 30s, 50℃

退火 35s, 72℃延伸 1min, 35个循环;最后 72℃延伸 10min。分别将两个 PCR 产物切胶纯化回收后,连接到 pMD 18-T 载体,转化大肠杆菌 DH5α感受态细胞,经鉴定后将阳性克隆送上海 Sangon 公司测序。

表 1 黄颡鱼 *HSC70* 基因克隆和表达所用引物

Tab. 1 The primers used for <i>HSC70</i> gene cloning and expression in yellow catfish		
引物 Primer	引物序列 Sequence (5'→3')	
UP-dT	CGGCA GTGGTA TCAACGCA GACTACT (18)	
UP-dG	CGGCA GTGGTA TCAACGCA GATACG (10)	
P1	GCCAGCA TTGAGA TTGAC	
P2	GGTGA TGA TTGGGTACAG	
P3	CACACCCA GTTA TGTTCCT	
P4	CCA TTGAA GAA GTCTCTGTAGAA G	
S1	TGGGTAT TTGA GACGGCGGGAGGAGT	
S2	TGA GCCAA TGGTCCA GGA GGCA GAG	
A1	CACTCCTCCC GCCGTCTCAA TACCC	
A2	CGAAA TCCTCACCACCCAGATG	
A3	TCGTGACGGTCTTTCCAAGATATG	
SD1	GAGA TTGTGCA TCACGCTGAC	
AD2	AACTGGGTGTGGTCCGATTAC	
SD3	GAAA GGACCA GAAC TCTAAAAAG	
AD4	CACCAAA GAAAA CAAACGGAC	
HSC1	AGAGCACGGGCAAGGAGAAC	
18SF	CCTGA GAAACGGCTACCACA TCC	
18SR	AGCAACTTTAA TATACGCTATTGGAG	

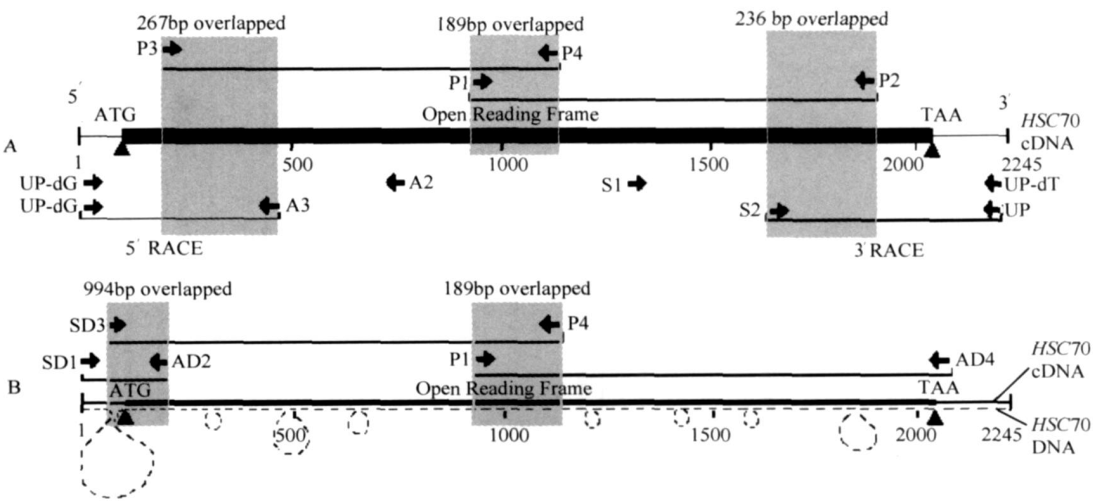


图 1 黄颡鱼 *HSC70* cDNA (A) 及其基因 (B) PCR 扩增所用引物的位置及克隆示意图

Fig. 1 Schematic diagram of yellow catfish *HSC70* cDNA (A) and *HSC70* gene (B) showing locations of primers for polymerase chain reaction (PCR) and strategy of the gene cloning

图中箭头表示引物,箭头之间的线段表示 PCR 扩增片段;图 B 中虚线的直线部分表示 *HSC70* 基因外显子,曲线部分则为内含子
Arrowheads represent primers; Lines between arrowheads indicate amplification products with PCR; *HSC70* gene exon sequences were showed with straight broken lines while introns were showed with curve broken lines

1.2.3 3'RACE和5'RACE 3'RACE:根据已获得的中间序列,设计合成引物 S1和 S2(表 1),分别与通用接头引物 UP-dT(表 1)进行槽式 PCR(图 1 A)。第一轮 PCR 扩增程序为:94℃预变性 3min;94℃变性 45s,58℃退火 35s,72℃延伸 90s,5个循环;94℃变性 30s,66℃退火 35s,72℃延伸 1min,30个循环;最后 72℃延伸 10min。第二轮 PCR 扩增程序与中间片段扩增相同,仅退火温度改为 64℃。5'RACE:在已获得的中间片段内,设计合成三条引物 A1、A2和 A3(表 1)。逆转时以 A1代替 Oligo dT₁₈,所得 cDNA用 TdT进行末端加 C,以加尾后的 cDNA作模板,用 A2和 A3分别与通用接头引物 UP-dG进行槽式 PCR(图 1 A)。扩增程序与中间片段扩增相同,仅退火温度不同(第一轮 PCR 为 64℃,第二轮为 59℃)。回收 3'RACE和 5'RACE的第二轮 PCR 产物,连接、转化、克隆和测序同 1.2.2。

1.2.4 HSC70基因的克隆 用常规高盐法从黄颡鱼肌肉中提取基因组 DNA。在获取 HSC70 cDNA 序列全长后,设计合成引物 SD1、AD2、SD3和 AD4(表 1、图 1B)。用 SD1与 AD2扩增 HSC70基因的前段部分,SD3与 P4扩增其中间部分,P1与 AD4则扩增其后段部分(图 1B)。扩增程序均为:94℃预变性 5min;94℃变性 45s,53℃退火 40s,72℃延伸 1.5min,35个循环;最后 72℃延伸 10min。选取片段较大的 PCR 产物进行切胶、克隆和测序(同 1.2.2)。

1.2.5 RT-PCR半定量检测黄颡鱼 HSC70的表达 将 10尾黄颡鱼分成两组,每组 5尾鱼,先暂养 5d,一组一直饲养于正常水温(26±1)℃中作对照,另一组置于(36±1)℃水中热激 1h,热激后于正常水温(26±1)℃中恢复 3h后,快速取各组黄颡鱼的血、心脏、肝、脾、头肾、鳃、肌肉和脑各组织器官,分别装在冻存管中于液氮中速冻,以 2μg总 RNA为模板,以 Oligo dT₁₈和随机引物六聚体为混合引物进行逆转录(方法同 1.2.1)。在获取了 HSC70基因及其 cDNA序列的基础上,跨最后一个内含子(图 1)设计合成两条半定量引物 HSC1和 AD4(表 1)用于扩增 HSC70 cDNA 序列,扩增产物为 522bp;以 18S rRNA 作内参基因,合成两条用于扩增 18S rRNA 的半定量引物 18SF和 18SR(表 1),预计扩增产物约为 221bp。通过摸索最适退火温度、模板量和循环数后,确定两 PCR 的反应体系同 1.2.2(HSC70扩增的模板为原液 cDNA,18S rRNA 则为原液 cDNA 1/10的稀释液)。扩增程序为:94℃预变性 3min;

94℃变性 30s,57℃退火 30s,72℃延伸 30s,HSC70 34个循环,18S rRNA 23个循环;最后 72℃延伸 10min。各取 5μL PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶上电泳检测,计算二者的积分光密度比值。每种组织取 3个重复实验数据,用 Excel中的 STDEV 函数计算标准差,用 SPSS 13.0 统计分析软件进行配对样品 *t* 检验,双尾法评估热激前后 HSC70 的相对表达量差异是否显著($p < 0.05$ 判定为差异显著)

2 结果

2.1 HSC70基因及其 cDNA 的克隆和序列分析

运用 DNAMAN 软件,将中间片段、3'RACE和 5'RACE 测序所得序列进行比对拼接,即得到黄颡鱼 70 kD 热休克蛋白基因 cDNA 全长序列(图 2)。该序列全长 2245bp,5 非编码区 82个核苷酸,3 非编码区 225个核苷酸,poly(A)尾上游 2200bp 处为真核细胞加尾信号(AA TAA),其开放阅读框(ORF)为 1938bp,编码 645个氨基酸组成的蛋白质,其理论 pI/Mw 为 5.49/70838.07。通过分析氨基酸序列发现,该蛋白含有 HSP70 家族的三个标签序列,分别位于氨基酸序列的 9—18(DLGTTY-SCV),197—210(IFDLGGGTEDVSL)和 334—348(MLVGGSTRIPKQK)上,同时存在真核生物胞质 HSP70 特征序列(EEVD)(glu-glu-val-as)及靠近 C 端的 GMP 四肽筒并重复序列。采用 SWISS-MODEL 对其进行三维结构预测,推测该序列含有由 1—386 残基组成 44 kD 的 ATP 酶结构域,384—543 残基组成 18 kD 的底物肽结合结构域,542—645 残基组成的 10 kD 的 C 端结构域。在获得全长 cDNA 的基础上,进一步从基因组 DNA 中克隆到该基因序列,与 cDNA 比对发现该基因含有 8 个内含子,其中最大的内含子,即第一个内含子(873bp)位于 5 非编码区,在第一个内含子中发现一类似 HSE 核心结构序列(gaataatgcagaa tttccagaa),其余内含子均位于编码区内(图 2),长度分别为:82bp、251bp、91bp、80bp、80bp、84bp 和 233bp。

2.2 黄颡鱼与其他物种的 HSC70 氨基酸序列比较分析

用 NCBI 的 Blast X 在线(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)对黄颡鱼 70 kD 热休克蛋白 cDNA 所推导的多肽进行同源检索,取 12 条代表不同分类地位物种的 HSC70 氨基酸全序列与该多肽进行相似性比对。结果显示:它与南方鳊(*S. meridionalis*)的相似性最高,达到 96.13%;其次为欧

表 2 黄颡鱼与其他物种的 HSC70 氨基酸相似性比对结果

Tab. 2 Similarity of HSC70 amino acid sequences between yellow catfish and other species

物种名及登录号 Name and GenBank No.	相似性 Similarity (%)	物种名及登录号 Name and GenBank No.	相似性 Similarity (%)
南方鲇 Southem catfish (EF406131)	96.13	鸡 Chicken (AJ004940)	93.03
欧洲银鲫 Silver crucial (AAO43731)	94.45	大菱鲆 Turbot (EU099574)	92.01
团头鲂 Wuchang bream (EU623471)	94.14	黑鲷 Black porgy (AY762969)	92.00
人 Human (AF352832)	94.12	虹鳟 Rainbow trout (P08108)	91.75
斑马鱼 Zebrafish (Y11413)	93.53	果蝇 Fruit fly (DROHSC4A)	82.80
非洲爪蟾 African clawed frog (NM_001086599)	93.38	巴西副球孢子菌 <i>Paracoccidioides brasiliensi</i> (AAB62884)	52.59

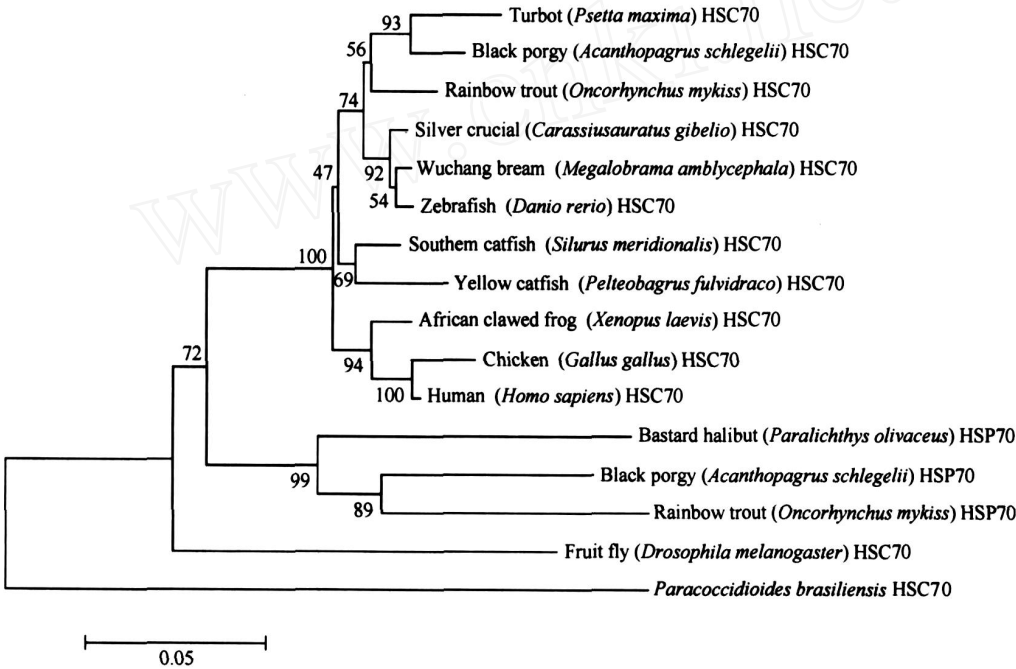


图 3 利用 Clustal X 1.83 和 Mega 4.0 构建的不同物种 HSC70 和 HSP70 氨基酸序列系统发生树

Fig. 3 Phylogenetic tree of HSC70 and HSP70 amino acid sequences with Clustal X 1.83 and Mega 4.0

枝上节点旁数字表示 Bootstrap 验证重复 10000 次后的置信度

The number at each node of branch indicates the percentage of bootstrapping after 10000 replications

2.3 HSC70 在各组织的表达量

非热休克情况下,黄颡鱼各组织内的 HSC70 和内参 18S rRNA 的 RT-PCR 结果 (图 4A),结果显示 HSC70 在所检测组织内都有表达,在鳃组织内的表达量最高,在肌肉内的表达量最少,表现出 HSC70 表达既具有组织普遍性又有特异性。热激后黄颡鱼不同组织内的 HSC70 表达量上升程度不同,其中脑的表达量上升最显著 (图 4B)。统计分析结果表明,热激后 HSC70 的相对表达量在血细胞、肝、头肾和脑中显著高于非热激相应组织或器官的表达量 ($p < 0.05$),其余组织中 HSC70 的相对表达量在热激前后差异不显著 ($p > 0.05$) (图 5)。

3 讨论

3.1 黄颡鱼 70kD 热休克蛋白的类型及其基因序列特点

本实验从黄颡鱼体内成功克隆到一条全长 2245bp 的 70kD 热休克蛋白 cDNA 序列,编码 645 个氨基酸。该氨基酸序列存在 HSP70 家族成员的三个特征性标签序列 (DLGTTYSCV、IFDLGGGTFD-VSL 和 MLVGGSTRIPKQK),说明本次克隆的是 HSP70 家族成员基因的 cDNA 序列。从氨基酸比对 (表 2) 和系统进化树 (图 3) 可以看出,本次克隆推导得到的氨基酸序列与南方鲇 HSC70 氨基酸同源

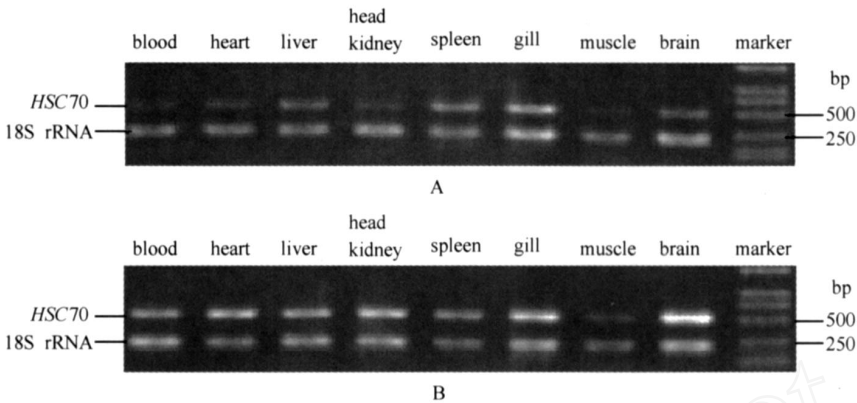


图4 黄颡鱼正常组(A)和热激组(B)中 *HSC70* 和内参 18S rRNA 在不同组织或器官中的 RT-PCR 结果
Fig.4 RT-PCR results of *HSC70* and 18S rRNA in eight tissues or organs of control (A) and heat-shocked (B) yellow catfish

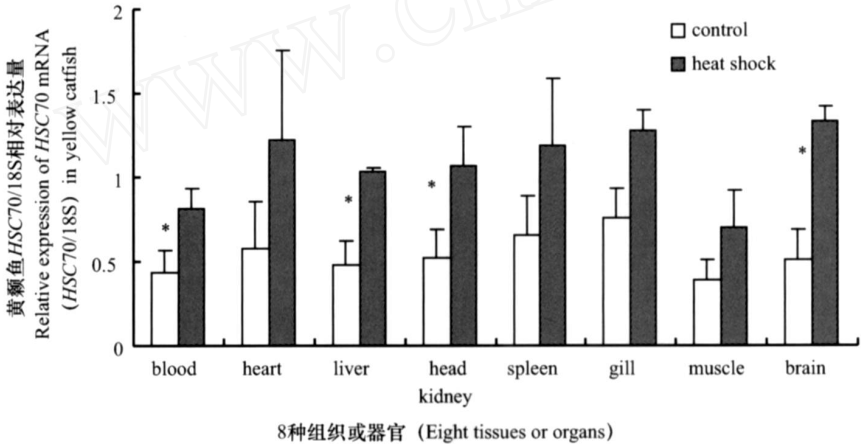


图5 热休克前后黄颡鱼 8 种器官或组织 *HSC70* mRNA 相对表达量
Fig.5 Relative expression of *HSC70* mRNA in 8 organs or tissues in control and heat-shocked yellow catfish
* 表示热激前后 *HSC70* mRNA 相对表达量差异显著 ($p < 0.05$)
The asterisks indicate the values which were significantly different from control ($p < 0.05$)

性最高,与包括其他鱼类在内的脊椎动物的 *HSC70* 序列聚成一支,而牙鲆、黑鲷、虹鳟的 *HSP70* 聚成另外一支,进一步说明本次克隆的是一种 *HSC70* cDNA 序列。另外,RT-PCR 的结果显示在非热激条件下,该基因在各组织或器官中均有不同程度的组成性表达,这一特点再次证明本次所克隆的确实是 *HSC70* cDNA。在绝大多数真核生物细胞质 *HSP70* 家族序列中,C 端具有一高度保守的 EEVD 调控基序和靠近 C 端的 GGMP 四肽筒并重复序列^[13-15],本次克隆的序列具有上述特点,说明它是一种细胞质 *HSC70*。此外,从该氨基酸序列中发现有 Dnak 亚族特征性基序 DLGTT-S-V^[16],提示该序列是一种 Dnak 类型的 *HSC70* 蛋白。

通过在基因组中对 *HSC70* 基因进行 PCR 扩增,发现该序列含有 8 个内含子,这与人^[17]、鼠^[18]、虹

鳟^[9]和花斑溪鲮 (*Rivulus marmoratus*)^[19] 的 *HSC70* 内含子数目相同,而且各相应内含子基本上处于相同的位置(虽然相应内含子长度不一定相同)。Chuang, *et al.* 通过比较各物种 *HSC70* 内含子数目发现 *HSC70* 内含子数目在脊椎动物中保守而在无脊椎动物中多变^[20]。另外,黄颡鱼的第一个内含子最长且出现在 5 端非编码区,这种情况同人、鼠、虹鳟、花斑溪鲮以及斑节对虾 (*Penaeus monodon*)^[20] 的 *HSC70* 类似。一般认为,对基因表达具有显著调节功能的内含子通常位于基因 5 端区域^[21],基因第一个内含子对该基因的精确表达具有重要调控作用^[22,23];在染色体中,富含 A、T 的区段对于基因转录表达具有重要的调节功能^[24],且这种富含 A、T 的区段使得基因组 DNA 双链解链变得容易,是变温动物在低温下生存的一种选择优势^[25]。在 *HSP* 基

因中,热激应答元件 (*Heat shock response element, HSE*)通过与热激因子 (*Heat shock factor, HSF*)特异结合调控 *HSP* 基因的转录,其核心结构序列为 *CnnGAAnnTTCnnG*^[26]。黄颡鱼 *HSC70* 第一个内含子处于基因 5 端,富含 A、T 碱基 (A、T 含量 65.86%),且存在一个类似 HSE 核心结构序列: *gaatatgCaGAA tgTTCaGaa*。因此,推测黄颡鱼 *HSC70* 第一个内含子极有可能调控黄颡鱼 *HSC70* 的转录表达。

3.2 *HSC70* 表达的组织特异性

了解基因在不同环境条件及各种组织中的表达分布是研究特定基因功能的最基本方法^[27]。本次实验通过 RT-PCR 半定量法在对照组 (非热激) 黄颡鱼不同组织中均检测到了 *HSC70* 的表达,且在各组织内的表达水平不同,其表达具有组织特异性。*HSC70* 的这种组织特异性表达在斑马鱼^[10]、鲤 (*Cyprinus carpio*)^[28] 和虹鳟^[29] 中均有报道:如 Santacruz 发现当斑马鱼胚胎发育到原肠期后期时,在中枢神经系统和一些体节中,*HSC70* 表达开始具有组织特异性 (这也意味着 *HSC70* 在胚胎发育过程中可能扮演着某一重要角色);此外,Ali 在鲤体内克隆到 2 种 *HSC70*,发现 *HSC70* 表达具有组织特异性。在本实验对照组中,*HSC70* 在鳃组织中表达量最高,在肌肉组织中最低,这可能是鳃作为一种呼吸和滤食器官,直接与诸多外界因子接触,并频繁受到刺激所致。而无论在对照组还是热激组中,肌肉中的 *HSC70* 均表现出较低表达,其主要原因可能在于肌肉中低的蛋白周转率^[29]。

3.3 *HSC70* 表达的热诱导性

研究长髯鰕虎鱼 (*Gillichthys mirabilis*) 发现 *HSC70* ATP 酶在 10—15℃ 温度变化范围内的酶活性最敏感,而在 15—25℃ 变化范围内最不敏感^[30]。所以,本文用高于对照组 10℃ 来对黄颡鱼进行热激实验。在热激过程中,随着越来越多的受损、错误折叠或变性蛋白的产生,需要越来越多的 *HSP70* 家族蛋白作为“分子伴侣”参与机体保护和修复过程,从而诱发 *HSP70* 的表达上调^[1]。在本实验结果中,热激后 *HSC70* 基因相对表达量在黄颡鱼血细胞、肝、头肾和脑组织中均明显上升,说明其表达在某些组织内能够被热激所诱导。与此结果类似的报道较多,如黑鲷的成纤维原细胞系被热激后,热激组的 *HSC70* 表达与对照组的表达差异显著 ($p < 0.05$)^[3];斑马鱼胚胎受热激后,*HSC70* mRNA 被诱导上升^[10];鲤的两种 *HSC70* 表达在热激过的肌肉

组织中均有所上升^[28];在热激过的两种鲮鱼的细胞系中也发现了 *HSC70* mRNA 有微量上升^[11]。但是,也有部分相反的报道,如花斑溪鲮中 *HSC71* 的表达并不受热诱导上调^[19];虹鳟肝实质细胞中 *HSC70* 的表达也未受重金属和热刺激而发生显著变化^[29]。由此可见,不同鱼类 *HSC70* 的热诱导性存在差异。

在本实验中,黄颡鱼不同组织内 *HSC70* 的热诱导性也不一致。热激后 *HSC70* 的相对表达量在血细胞、肝、头肾和脑中显著上升,其中脑的表达量上升最显著。这可能是因为热休克时,易引起某些组织缺氧缺血,*HSC70* 在细胞保护,尤其是神经细胞保护过程中发挥了重要作用^[31]。但是,*HSC70* 在抗热激和其他胁迫因子中的具体作用机制,有待进一步结合基因表达的转录水平和蛋白翻译水平进行研究分析,尤其需要阐明 *HSC70* 蛋白在黄颡鱼应对不同类型胁迫因子中的作用。

参考文献:

- [1] Kiang J G, Tsokos G C. Heat shock protein 70 kD: Molecular Biology, Biochemistry and Physiology [J]. *Pharmacology and Therapeutics*, 1998, **80** (2): 183—201
- [2] Mads D. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions [J]. *FEBS Letters*, 2007, **581**: 3702—3710
- [3] Deane E E, Woo N Y S. Impact of heavy metals and organochlorines on hsp70 and hsc70 gene expression in black sea bream fibroblasts [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, **79**: 9—15
- [4] Jaattela M. Heat shock proteins as cellular lifeguards [J]. *Ann Med*, 1999, **31**: 261—271
- [5] Hartl F U. Molecular chaperones in cellular protein folding [J]. *Nature*, 1996, **381**: 571—579
- [6] Li A H. Effects of crowding stress on plasma cortisol, glucose and liver ascorbic acid in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1997, **21** (4): 384—386 [李爱华. 拥挤胁迫对草鱼血浆皮质醇、血糖及肝脏中抗坏血酸含量的影响. 水生生物学报, 1997, **21** (4): 384—386]
- [7] Riabokow K T, Mizzen L A and Welch W J. Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70 [J]. *Science*, 1988, **242**: 433—436
- [8] Rohde M, Daugaard M, Jensen M H, et al. Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms [J]. *Genes Dev*, 2005, **19**: 570—582
- [9] Zafarullah M, Wisniewski J, Shworak N W, et al. Molecular cloning and characterization of a constitutively expressed heat-shock-cognate hsc71 gene from rainbow trout [J]. *Eur J Biochem*, 1992, **204**: 893—900
- [10] Santacruz H, Vriz S, Angelier N. Molecular characterization of a heat shock cognate cDNA of zebrafish, hsc70, and developmental expression of the corresponding transcripts [J]. *Dev Genet*,

- 1997, **21**: 223—233
- [11] Arai A, Naruse K, Mitani H, *et al* Cloning and characterization of cDNAs for 70-kD heat-shock proteins (Hsp70) from two fish species of the genus *Oryzias* [J]. *Jpn J. Genet*, 1995, **70** (3): 423—433
- [12] Shan H, Zhou G Q, Zhang Q Z Cloning and sequence analysis of heat shock cognate 70 (HSC70) from *Silurus meridionalis* Chen [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2007, **16** (4): 310—316 [单红, 周国勤, 张其中. 南方鲇 HSC70 cDNA的克隆及序列分析. 上海水产大学学报, 2007, **16** (4): 310—316]
- [13] Schmid D, Baici A, Gehring H, *et al* Kinetics of molecular chaperone action [J]. *Science*, 1994, **263**: 971—973
- [14] Demand J, Lu ders J, Hohfeld J. The carboxy-terminal domain of HSC70 provides binding sites for a distinct set of chaperone co-factors [J]. *Mol Cell Biol*, 1998, **18**: 2023—2028
- [15] Freeman B C, Myers P M, Schumacher R, *et al* Identification of a regulatory motif in HSP70 that affects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ-1 [J]. *EMBO J.*, 1995, **14**: 2281—2292
- [16] 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
- [17] Dworniczak B, Mirault M E. Structure and expression of a human gene coding for a 71 kD heat shock 'cognate' protein [J]. *Nucleic Acid Res*, 1987, **15**: 5181—5197
- [18] Hunt C R, Parsiana A J, Goswami P C, *et al* Characterization and expression of the mouse HSC70 gene [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, **1444**: 315—325
- [19] Park J H, Lee J T, Yoon S, *et al* Genomic cloning of the HSC71 gene in the hermaphroditic teleost *Rivulus marmoratus* and analysis of its expression in skeletal muscle: identification of a novel muscle-preferred regulatory element [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29**: 3041—3050
- [20] Chuang K H, Ho S H, Song Y L. Cloning and expression analysis of heat shock cognate 70 gene promoter in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. *Gene*, 2007, **405**: 10—18
- [21] Rose A B. Requirements for intron-mediated enhancement of gene expression in *Arabidopsis* [J]. *RNA*, 2002, **8**: 1444—1453
- [22] Kelly B B, Hedlund E, Kim C, *et al* A tyrosine hydroxylase-yellow fluorescent protein knock-in reporter system labeling dopaminergic neurons reveals potential regulatory role for the first intron of the rodent tyrosine hydroxylase gene [J]. *Neuroscience*, 2006, **142** (2): 343—354
- [23] Zhou X L, Wu H L. A cis-regulatory enhancer element of the nodal gene is present in its first intron [J]. *Acta Genetica Sinica*, 1999, **26** (1): 15—21 [周迅蕾, 吴鹤龄. Nodal基因的第一内含子中存在着顺式调控增强子元件. 遗传学报, 1999, **26** (1): 15—21]
- [24] Sun N E, Sun D X, Zhu D X. Molecular Genetics [M]. Nanjing: Nanjing University Press 1990, 7 [孙乃恩, 孙东旭, 朱德煦. 分子遗传学. 南京: 南京大学出版社. 1990, 7]
- [25] Du Q Y, Chang Z J, Chen Y. Comparison of β globin gene in three fishes of cyprinoid [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29** (1): 86—90 [杜启艳, 常重杰, 陈颖. 3种鲤科鱼 β 珠蛋白基因的比较研究. 水生生物学报, 2005, **29** (1): 86—90]
- [26] Amin J, Ananthan J and Voelmy R. Key features of heat shock regulatory elements [J]. *Mol Cell Biol*, 1988, **8**: 3761—3769
- [27] 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** (22): 2385—2393
- [28] Ali K S A. Tissue- and stressor-specific differential expression of two HSC70 genes in carp [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, **307**: 503—509
- [29] Boone A N, Vijayan M M. Constitutive heat shock protein 70 (HSC70) expression in rainbow trout hepatocytes: Effect of heat shock and heavy metal exposure [J]. *Comp Biochem Physiol C*, 2002, **132**: 223—233
- [30] Place S P, Hofmann G E. Temperature interactions of the molecular chaperone HSC70 from the eurythermal marine goby *Gillichthys mirabilis* [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2001, **204** (15): 2675—2682
- [31] Ma B, Zhang J J, Liu G T. Hsp70 and neuroprotection [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2008, **24** (8): 984—987 [马波, 张建军, 刘耕陶. 热休克蛋白与神经保护. 中国药理学通报, 2008, **24** (8): 984—987]

HSC70 GENE AND ITS TISSUE EXPRESSION ANALYSIS IN YELLOW CATFISH

ZHANG Juan¹, ZHANG Qi-Zhong^{1,2}, ZHANG Zhan-Hui¹ and CUI Miao¹

(1. Hydrobiology Institute of Jinan University, Guangzhou 510632; 2. Key laboratory of Aquatic science of Chongqing, Key Laboratory Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region (Ministry of Education), Chongqing 400715)

Abstract: Heat shock protein 70 (HSP70s) act as a role of chaperone and play a key function in cytoprotection and cytopair, including protein assembly, correct folding, and membrane translocation, it also enhance the organisms' immunity and endurance to stressors. Yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) is an important cultured species in China. In order to illuminate molecular mechanism of the HSP70 family members in the catfish against stressors and diseases, it is necessary to clone the gene and cDNA sequence of HSP70 family members in the first instance. Therefore, the gene and its cDNA of a HSP70 family member were cloned in yellow catfish, and mRNA expression of the gene was studied in various tissues and organs of the catfish under heat-treated or unstressed condition.

A full length cDNA of 2245 bp was cloned in the gill of yellow catfish with RACE (rapid amplification of cDNA ends) technique. The cDNA contained an open reading frame (ORF) of 1938 bp, 5' untranslated region of 82 bp and 3' untranslated region of 225 bp. The deduced 645 amino acid sequence contained HSP70s' characteristic motifs (Fig. 2), and it indicated that the cDNA belonged to the family of heat shock protein 70. Carried out alignment with other organisms' HSC70 amino acid sequences, the deduced amino acid sequence from the cDNA showed the highest similarity (96.13%) with HSC70 amino acid sequence of Southern catfish (*Silurus meridionalis*). The phylogenetic tree (Fig. 3) showed that 70 kD heat shock protein of yellow catfish clustered together with other vertebrates' HSC70s but not HSP70s. What mentioned above suggested that the sequence we cloned was a kind of heat shock cognate 70 (HSC70). Furthermore, its constitutive expression in unstressed tissue cells by RT-PCR detection (Fig. 4) confirmed that the sequence we cloned was HSC70 cDNA. Subsequently, the catfish HSC70 gene was cloned by PCR amplification in the fish genome DNA. Eight introns were found in the HSC70 gene, and the longest intron (873bp) was located in 5' untranslated region and the others (length between 80 and 251bp) in ORF region (Fig. 2). The introns with same number and similar location were found in the HSC70 genes of human (*Homo sapiens*), mouse (*Mus musculus*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and hemaphysoid teleost (*Rivulus marmoratus*).

In order to elucidate the HSC70 mRNA expression in different tissues or organs of yellow catfish under heat-treated or unstressed condition, ten catfish were divided into two groups randomly, one (control group) was unstressed and the catfish were cultured in water temperature of $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$, the other (the heat shock group) was heat-treated at $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ for 1h, and then recovered in normal water temperature $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$ for 3h. Semi-quantitative RT-PCR method was employed to analyze the HSC70 mRNA expression in different tissues or organs, viz., blood cell, heart, liver, head kidney, spleen, gill, muscle and brain. The results were as follows: in control group, HSC70 mRNA expressed constitutively in eight tissues or organs of the unstressed catfish, and the mRNA transcripts were various in the detected tissues or organs and the highest in gill (Fig. 5); in the heat shock group, HSC70 mRNA expression significantly increased in blood cells, liver, head kidney and brain ($p < 0.05$), but did not significantly in the other four detected tissues or organs (heart, spleen, gill and muscle) ($p > 0.05$).

The data above indicate that the HSC70 gene and its cDNA of yellow catfish have been cloned, and the gene expressed constitutively and could be induced by heat shock in various tissues and organs.

Key words: HSC70 gene; Clone; Tissue expression; Yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)