

何珊, 梁旭方, 李观贵, 等. 2009 鲢鱼、草鱼和尼罗罗非鱼热休克蛋白 70 基因 cDNA 全序列的克隆与分析 [J]. 环境科学学报, 29(11): 2324 – 2330

He S Liang X F, Li G G, *et al*. 2009. Cloning and analysis of the full-length cDNA sequences of the heat shock protein 70 gene from silver carp grass carp and Nile tilapia [J]. Acta Scientiae Circumstantiae 29(11): 2324 – 2330

鲢鱼、草鱼和尼罗罗非鱼热休克蛋白 70 基因 cDNA 全序列的克隆与分析

何珊, 梁旭方^{*}, 李观贵, 王琳, 郁颖

暨南大学生命科学技术学院, 广州 510632
收稿日期: 2009-03-16 修回日期: 2009-05-08 录用日期: 2009-09-15

摘要: 采用 RT-PCR 技术和 RACE 技术分别从淡水食毒藻鱼类鲢鱼 (*Hypophthalmichthys molitrix*)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis nilotica*) 及草食性鱼类草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 肝脏扩增出热休克蛋白 70 (HSP70) cDNA 全序列, 并与其它鱼类、两栖类和哺乳类动物的 HSP70 氨基酸进行了同源性比较. 结果表明, 鲢鱼、草鱼和尼罗罗非鱼肝脏 HSP70 基因 cDNA 全长分别为 2356 bp、2348 bp 和 2242 bp 分别编码 649、649 和 638 个氨基酸. 鲢鱼、草鱼和尼罗罗非鱼 HSP70 与其它鱼类、两栖类和哺乳类动物 HSP70 氨基酸同源性均较高, 表明其在进化上高度保守, 且承担着重要的生理功能. 构建系统进化树发现, 鲢鱼、草鱼与其它鲤科鱼类斑马鱼、银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 的 HSP70 氨基酸同源性较高, 处于同一进化树枝; 而尼罗罗非鱼 HSP70 未与其它鲈形目鱼类, 如鲷科鱼类聚为一枝, 而是占据一个独立的树枝, 这与克隆得到的鲢鱼、草鱼肝脏 HSP70 基因可能为结构型 HSP70 而尼罗罗非鱼肝脏 HSP70 基因可能为诱导型 HSP70 的结果相一致.

关键词: 热休克蛋白 70; 基因克隆; 序列分析; 鲢鱼; 草鱼; 尼罗罗非鱼

文章编号: 0253-2468(2009)11-2324-07 中图分类号: X171 文献标识码: A

Cloning and analysis of the full-length cDNA sequences of the heat shock protein 70 gene from silver carp grass carp and Nile tilapia

HE Shan, LIANG Xu fang^{*}, LI Guangji, WANG Lin, YU Ying

College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632
Received 16 March 2009 **received in revised form** 8 May 2009; **accepted** 15 September 2009

Abstract Heat shock protein 70 (HSP70) full-length cDNAs were cloned from the liver of two phytophagivorous freshwater fish, silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and Nile tilapia (*Oreochromis nilotica*), and one herbivorous fish grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) using RT-PCR and RACE. Sequence analysis revealed that the silver carp grass carp and Nile tilapia HSP70 cDNAs were 2356, 2348, and 2242 bp in length and contained an open-reading frame (ORF) of 1950 bp (encoding a polypeptide of 649 amino acids), 1950 bp (encoding a polypeptide of 649 amino acids), 1917 bp (encoding a polypeptide of 638 amino acids), respectively. Silver carp grass carp and Nile tilapia HSP70 sequences are highly homologous to other fish amphibian and mammals HSP70 which suggests that they play a role in fundamental cellular processes. Results of the phylogenetic analysis revealed that silver carp and grass carp HSP70 formed a cluster with other cyprinid fishes such as zebrafish and silver prussian carp, but Nile tilapia HSP70 formed a distinct cluster. This is consistent with the result that the cloned silver carp and grass carp HSP70 may belong to heat shock cognate 70 whereas the cloned Nile tilapia HSP70 may be classified as inducible heat shock protein 70.

Keywords heat shock protein 70 gene cloning sequence analysis silver carp grass carp Nile tilapia

1 引言 (Introduction)

热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 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, 在应激条件下能够维持细胞必需的蛋白质空间构象, 保护细胞生命活动; 在蛋白质折叠、跨膜运

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 30670367); 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (No. 2009CB118702); 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (No. 2007AA09Z437); 广东省科技计划项目 (No. 2007B020701002)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30670367), the National Basic Research Program of China (No. 2009CB118702), the National High-Tech Research and Development Program of China (No. 2007AA09Z437) and the Project of Science and Technology of Guangdong Province (No. 2007B020701002)

作者简介: 何珊 (1985—), 女; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: tliangx@jnu.edu.cn

Biography: HE Shan (1985—), female; * **Corresponding author;** E-mail: tliangx@jnu.edu.cn

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

输、转运、细胞骨架及核骨架稳定等方面发挥重要作用, 被称为“分子伴侣”(孔垂辉等, 2007). 现已检测到数十种 HSPs, 根据 HSPs 分子量及等电点不同将其分为 6 个家系, 包括小分子 HSPs, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 和 HSP110. 其中, HSP70 家族除在某些古细菌外的绝大多数物种中普遍存在且含量最多, 进化上高度保守, 如大肠杆菌的 HSP70 与人的 HSP70 有 50% 的同源性 (Basu *et al*, 2002).

HSP70 赋予细胞保护作用, 在应激条件下维持细胞必需的蛋白质空间构象, 对抗包括高热、低氧、缺血、紫外线、重金属离子、DNA 损伤、环境毒物等引起的损伤 (Bond *et al*, 1987). 最新研究表明, HSP70 与细胞的抗氧化能力有关, 由此引发了通过 HSP70 途径来提高抗氧化能力的研究 (孔垂辉等, 2007).

随着水体富营养化加剧, 藻类所引起的水污染问题已越来越引起人们的关注, 淡水藻类污染已成为一个全球性的环境卫生问题 (Krienitz *et al*, 2003). 这些藻所产生的毒素, 根据其毒作用的不同分为 3 类: 多肽肝毒素、生物硷类神经毒素及脂多糖内毒素 (汤钊猷等, 1989), 其中, 肝毒素出现最广泛且具有强促癌作用, 人们尤为关注 (Sivonen *et al*, 1990). 肝脏是藻毒素去毒与致毒的靶器官, 藻毒素可引起肝细胞产生大量的活性氧分子 (reactive oxygen species, ROS), 对机体产生氧胁迫. 相关研究表明, 不同鱼类对藻毒素的毒性敏感程度可能是由这些鱼类肝脏各自的藻毒素代谢基因与肝脏细胞抗坏死、抗凋亡基因等表达水平决定的, 当然也与这些鱼类接触藻毒素的程度 (例如是否摄食有毒藻) 有关 (Liang *et al*, 2007). 除了已被广泛研究的可溶性谷胱甘肽 S 转移酶 (soluble glutathione S-transferase, GST) (也称为微囊藻毒素去毒酶) (Wang *et al*, 2006; Liao *et al*, 2006), 热休克蛋白 70 (HSP70) 在鱼类藻毒素去毒过程中起着重要作用.

鲢鱼 (*Hypophthalmichthys molitrix*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis nilotica*) 为淡水主养鱼类, 这 3 种鱼类处于水体的不同层次, 食性不一, 因此, 它们接触藻毒素的几率亦不同, 从而也进化出不同的耐受能力. 本研究通过 RT-PCR 和 RACE 技术首次获得鲢鱼、草鱼、尼罗罗非鱼 HSP70 cDNA 的全序列, 可为进一步获得此基

因的侧翼调控序列, 深入探讨鱼类藻毒素去毒相关基因的表达调控机制提供新信息. 同时, 为进一步比较研究草鱼、鲢鱼、尼罗罗非鱼等对富营养化水体不同敏感性鱼类中 HSP70 基因表达和抗毒性的不同奠定了基础, 并进一步阐述 HSP70 在环境、水质监测中的重要意义和应用前景.

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 实验用鱼

鲢鱼 (10 00 g)、草鱼 (8 55 g)、尼罗罗非鱼 (9.06 g) 于广东省番禺淡水鱼类养殖场捕得.

2.2 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成

从鲢鱼、草鱼、尼罗罗非鱼快速分离肝脏组织, 总 RNA 的提取与纯化按 Promega 公司的 SV Total RNA Isolation System 试剂盒推荐方法进行. cDNA 第一链的合成使用 TaKaRa RNA LA PCRTM Kit (AMV) Ver 1.1 试剂盒, 以鲢鱼、草鱼、尼罗罗非鱼肝脏总 RNA 为模板, oligo(dT)₂₀ 为反转录引物, 操作按试剂盒推荐方法进行.

2.3 鲢鱼、草鱼、尼罗罗非鱼肝脏 HSP70 cDNA 核心片段的克隆

根据已知脊椎动物 HSP70 氨基酸及核苷酸序列的保守区域设计合成下述 4 个正向或反向简并引物, 分别为引物 HSP7001F 与 HSP7003R, HSP7002F 与 HSP7004R (表 1). 以上述 cDNA 为模板, 用 Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa) 进行 PCR 扩增, 扩增条件为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 保持 1 min, 40 °C 保持 1 min, 72 °C 保持 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min.

2.4 鲢鱼、草鱼、尼罗罗非鱼 HSP70 基因 5' 端 cDNA 扩增

根据克隆得到的鲢鱼、草鱼、尼罗罗非鱼 HSP70 基因 cDNA 核心序列及 5'-FullRACE Core Set 试剂盒 (TaKaRa) 要求, 设计 6 个 5'-RACE 下游引物, 分别为 S-HSP705'S1, G-HSP705'S1, N-HSP705'S1 和 S-HSP705'S2, G-HSP705'S2, N-HSP705'S2 (表 1), 上游引物由试剂盒提供. 5'-RACE 的操作按试剂盒推荐方法进行. 取 1 μL 总 RNA (约 1 μg), 以试剂盒提供的 5'-RACE CDS Primer A, SMART II TM A Oligonucleotide 为引物, 合成 cDNA 第一链后, 用 TE Buffer 稀释 10 倍备用. 首次 PCR 反应体系为 10 倍稀释产物 2.5 μL, 10 × PCR buffer 5 μL, dNTP (10 mmol L⁻¹ each) 1 μL, PowerScript Reverse Tran-

scriptase酶 1 μL, 以及 S α HSP705'S1, G α HSP705'S1, N HSP705'S1引物 1 μL, 试剂盒提供的 10×Universal Primer A Mix (UPM) 引物 5 μL, 加 dH₂O 至 50 μL. PCR 反应条件为: 94 ℃ 预变性 3 min, 94 ℃ 1 min, 50 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 30 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 5 min. 取首次扩增产物 1 μL, 用试剂盒提供的 Nested Universal Primer (NUP) 引物和 S α HSP705'S2, G α HSP705'S2, N HSP705'S2 引物进行二次 PCR 扩增, 扩增条件为: 94 ℃ 预变性 3 min, 94 ℃ 1 min, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 5 min.

2.5 鲢鱼、草鱼、尼罗罗非鱼 HSP70 基因 3'端 cDNA 扩增

根据已克隆的鲢鱼、草鱼、尼罗罗非鱼 HSP70 基因 cDNA 核心片段序列和 3'-FullRACE Core Set 试剂盒 (TaKaRa) 要求设计 6 个 3'-RACE 上游引物, 分别为 S α HSP703'A1, G α HSP703'A1, N HSP703'A1 和 S α HSP703'A2, G α HSP703'A2, N HSP703'A2 (表 1), 下游引物由试剂盒提供. 3'RACE 的操作参照 3'-FullRACE Core Set 试剂盒 (TaKaRa) 推荐方法进行. 首先以试剂盒提供的 oligo dT-3 sites adaptor primer 为引物进行反转录反应, 然后以 S α HSP703'A1, G α HSP703'A1, N HSP703'A1 和试剂盒提供的 3 sites adaptor primer 为引物进行首次 PCR 反应, 反应条件为: 94 ℃ 预变性 3 min, 94 ℃ 1 min, 50 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 5 min. 二次 PCR 所用引物为 S α HSP703'A2, G α HSP703'A2, N HSP703'A2 和 3 sites adaptor primer. PCR 反应条件与 5'RACE 二次 PCR 相同.

2.6 PCR 产物的克隆及测序

PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳纯化, H. Q. & Q. PCR 酶反应产物纯化试剂盒 (U-gene) 回收后, 克隆至 pMD 19-T 载体 (TaKaRa), 转化感受态 *E. coli* DH5 α , 并利用 M13 正反向引物, 通过 PCR 反应检测得到阳性克隆, 阳性克隆由博亚公司进行测序.

2.7 序列分析与系统树构建

对测序结果进行分析整理得到鲢鱼、草鱼、尼罗罗非鱼 HSP70 基因 cDNA 全长序列, 推测得到其氨基酸序列, 并分别与 NCBI 网站 GenBank 上发表的各种生物 HSP70 氨基酸序列一起, 用 BLAST 和 VectorNTI suite 6.0 软件进行序列分析. 采用 Mega 4 软件采用邻接法构建系统树, 1000 次重复计算自展分析值.

表 1 HSP70 基因 PCR 引物

Table 1 PCR primer sequences for cloning of HSP70 gene from Fish	
Name of primer	Sequence of primer
HSP7001F	5'-GGCAAAGTGG (A/G) ATCATGCGCCAA (T/C) GA (T/C) CA (A/G)-3'
HSP7002F	5'-GTCATCACAGTCCCAGCCTACTT (T/C) AA (T/C) GA (T/C)-3'
HSP7003R	5'-GATGTCCTTCTTGTCCTCCT (T/C) TT (A/G) AA (T/C) TC-3'
HSP7004R	5'-TTTGCTCAGCCTG CCCTT (A/G) TC (A/G) TT (A/G/T/C) GT-3'
S α HSP705'S1	5'-GAACAACGCCATCATCAA-3'
S α HSP705'S2	5'-TCGCA GCATCTCCA ATCAATC-3'
G α HSP705'S1	5'-ATTCTCTCAGCACCA ACCT-3'
G α HSP705'S2	5'-TGATG ATACGCAGAA CA-3'
O α HSP705'S1	5'-GTCAGCACCATGGAGGAGAT-3'
O α HSP705'S2	5'-ATGGCAA CCTGA TTCTTGG-3'
S α HSP703'A1	5'-CCACCATCCCA ACCAAA CA-3'
S α HSP703'A2	5'-TCACCTTTGA CATTGATG CG-3'
G α HSP703'A1	5'-AGGTTTATGA GGGCGAGC-3'
G α HSP703'A2	5'-GATAAG AGCACTGGCAAAGAG-3'
O α HSP703'A1	5'-ACCAA GCA GCCCAGACCT-3'
O α HSP703'A2	5'-TGAA CGTGTCTGCGGTGA-3'

3 结果 (Results)

3.1 鲢鱼、草鱼、尼罗罗非鱼肝脏 HSP70 cDNA 全序列的克隆与分析

分别以鲢鱼、草鱼、尼罗罗非鱼肝脏 cDNA 为模板, 用简并引物 HSP7001F 和 HSP7003R 与 HSP7002F 和 HSP7004R 进行 PCR 扩增, 各得到 2 个预期大小的 PCR 产物. 将 PCR 产物电泳纯化、回收后克隆至 pMD 19-T 载体. 用 M13 正、反向引物进行双向测序, 拼接后分别得到鲢鱼 1467 bp, 草鱼 1110 bp, 尼罗罗非鱼 1467 bp 的 cDNA 片段.

根据克隆的鲢鱼、草鱼、尼罗罗非鱼肝脏 HSP70 cDNA 核心片段设计 12 个特异引物, 利用 5'RACE 和 3'RACE 技术分别从鲢鱼、草鱼、尼罗罗非鱼肝脏获得 6 个预期片段大小的 PCR 产物. 通过序列拼接, 确定鲢鱼 HSP70 cDNA 全长为 2356 bp, 其中, 5'非翻译区 (5'-UTR) 为 84 bp, 3'非翻译区 (3'-UTR) 为 322 bp, 开放阅读框 (ORF) 为 1950 bp, 编码 649 个氨基酸, 推测分子量为 71.2 kDa, 等电点 (pI) 为 5.13, polyA 加尾信号为 AATAAAA (GenBank 号: EU816594). 草鱼 HSP70 cDNA 全长为 2348 bp, 其中, 5'非翻译区 (5'-UTR) 为 91 bp, 3'非翻译区 (3'-UTR) 为 307 bp, 开放阅读框 (ORF) 为 1950 bp, 编码 649 个氨基酸, 推测分子量为 71.2 kDa, 等电点 (pI) 为 5.13, polyA 加尾信号为 AATAAAA (GenBank 号: EU816595). 尼罗罗非鱼

HSP70 cDNA 全长为 2242 bp 其中, 5'非翻译区 (5'-UTR) 为 100 bp 3'非翻译区 (3'-UTR) 为 225 bp 开放阅读框 (ORF) 为 1917 bp 编码 638 个氨基酸, 推测分子量为 70.2 kDa 等电点 (pI) 为 5.08, polyA 加尾信号为 ATTAAG (GenBank 号: EU816596)。

3.2 鲢鱼、草鱼、尼罗罗非鱼 HSP70 氨基酸序列的同源性分析

应用 Vector NTI suite 6.0 软件, 比较克隆得到的鲢鱼、草鱼、尼罗罗非鱼 HSP70 氨基酸全序列与其它鱼类、两栖类、鸟类、哺乳类之间的同源性 (图 1)。

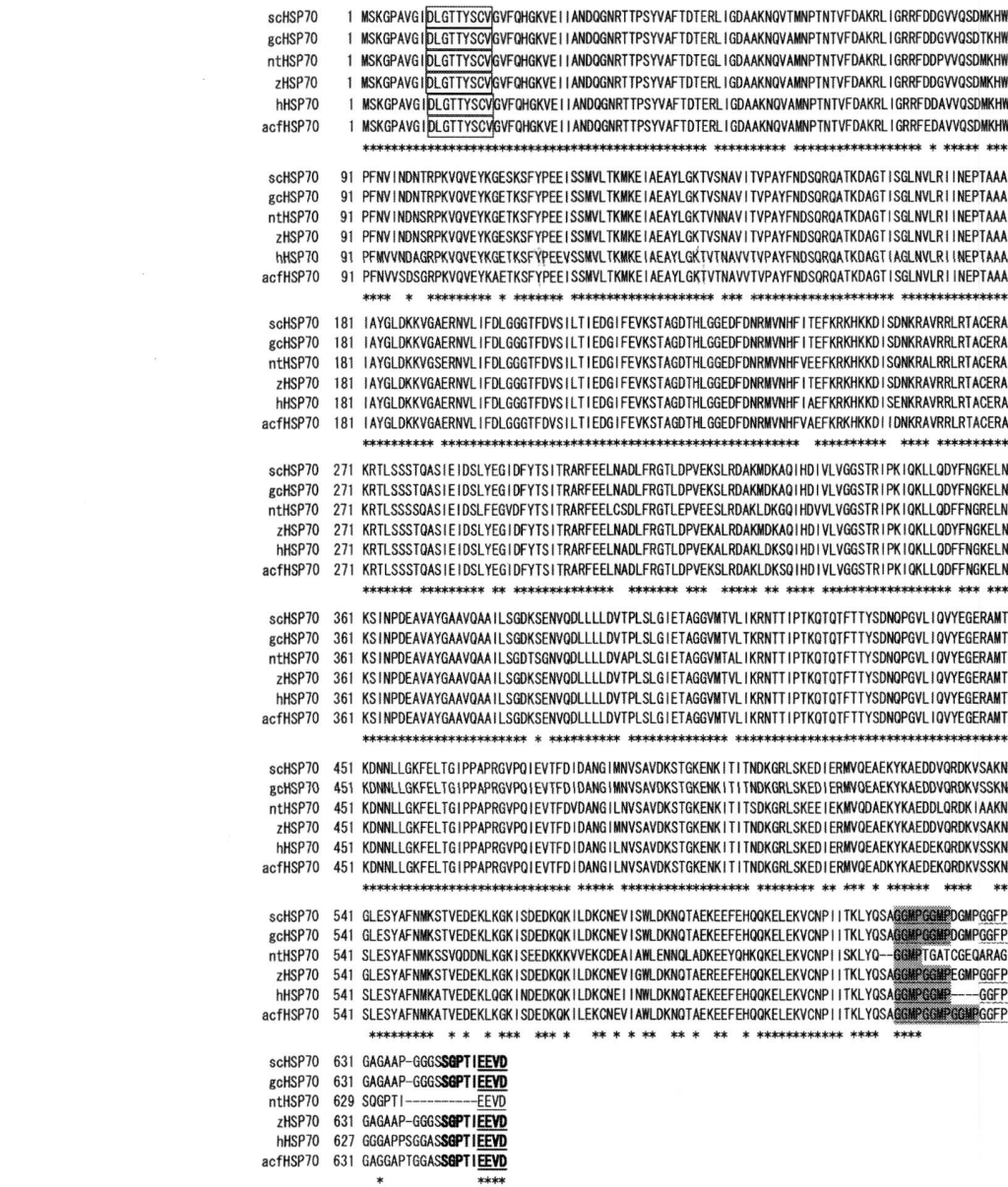


图 1 鲢鱼、草鱼、尼罗罗非鱼 HSP70 与其他脊椎动物 HSP70 基因氨基酸序列同源性比较 (“-”表示比较时必要的氨基酸缺口; “*”表示保守的氨基酸残基; 方框代表 DnaK 特征基序; 下划线代表胞质 HSP70 特征基序; 阴影代表简并重复的四肽; 黑体表示末端标记九肽; 波浪线表示重复的 GGXP 基序)

Fig. 1 A alignment of the deduced amino acid sequences of silver carp grass carp and Nile tilapia heat shock protein 70 (HSP70) with the sequences of other vertebrates (Amino acid sequences were obtained from GenBank as follows: silver carp HSP70 (scHSP70); grass carp HSP70 (gcHSP70); Nile tilapia HSP70 (ntHSP70); zebrafish HSP70 (zHSP70, GenBank AAH63228); human HSP70 (hHSP70, GenBank AAH16179); African clawed frog (acHSP70, GenBank NP_001080068). Dashes indicate the amino acid gaps that were necessary to align these sequences. The conserved residues in all sequences are indicated by asterisk (*). The DnaK-specific sequence motifs are boxed. The cytosolic HSP70-specific motifs are underlined. The degenerate repeats of tetrapeptide GGMP are darkened. The signature nonapeptides SGPTIEEVD are boldfaced. Wave lines show the unique repeat GGXP motifs.)

鲢鱼、草鱼 HSP70 与斑马鱼、非洲爪蟾、人的 HSP70 氨基酸同源性分别为 99%、93%、95%。尼罗罗非鱼 HSP70 与斑马鱼、非洲爪蟾、人的 HSP70 氨基酸同源性分别为 90%、86%、89%。不同物种 HSP70 基因 cDNA 核苷酸序列存在一定差异,但氨基酸序列并未受到影响,表明 HSP70 在进化上高度保守,且承担着重要的生理功能。

3.3 鲢鱼、草鱼、尼罗罗非鱼 HSP70 系统进化分析

HSP70 广泛存在于自然界中,在所有的真核生物和多数原核生物中都有发现,表明它在基本的细胞过程中起着重要的作用。以本试验成功克隆的鲢鱼、草鱼、尼罗罗非鱼 HSP70 氨基酸序列和各种生物 HSP70 的已知氨基酸序列 (来自 GenBank) 一起用邻接法构建系统树 (图 2)。结果显示,鲢鱼、草鱼

与其它鲤科鱼类斑马鱼、银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 的 HSP70 氨基酸同源性较高,处于同一进化树分枝;平鲷 (*Rhabdosargus sarb*)、黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 等海水鱼 HSP70 处于邻近的进化树分枝,且与鲤科鱼 HSP70 共同聚为一类,在进化上占据独立的分枝;人、大鼠、小鼠 HSP70 处于同一个进化树分枝,并与鸟类 (*Coturnix japonica*)、两栖类 (*Xenopus laevis*) HSP70 聚在一起,推测这些都应归为 HSP70 而尼罗罗非鱼 HSP70 不与其它鲈形目鱼类 (如鲷科鱼类) 聚为一枝,而是占据一个独立的分枝,这与特征结构域序列分析推测的结果相一致,鲢鱼、草鱼肝脏 HSP70 基因可能为结构型 HSP70 而尼罗罗非鱼肝脏 HSP70 基因可能为诱导型 HSP70

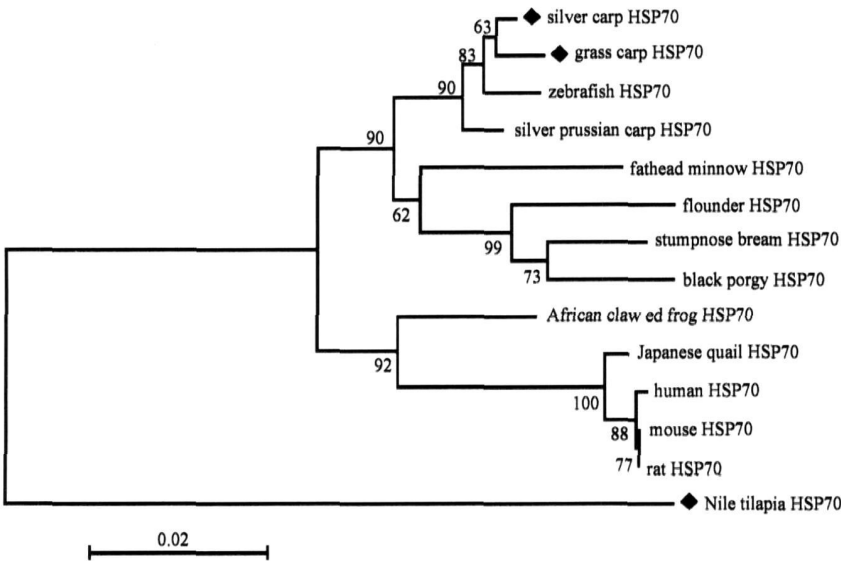


图 2 用邻接法构建的鲢鱼、草鱼、尼罗罗非鱼和其它生物 HSP70 基因系统进化树 (采用 Mega 4 软件构建系统树, 1000 次重复计算自展分析值;比例尺 = 0.02 表示物种间的进化距离; ◆表示本实验克隆得到的 HSP70)

Fig 2 A neighbor-joining tree for the silver carp, grass carp, Nile tilapia HSP70 with other species (The tree was constructed by the neighbor-joining bootstrap using the Mega 4 software. Numbers are bootstrap values for 1000 trials. Bar = 0.02, the bar indicates the evolutionary distance between the groups. Silver carp, grass carp, Nile tilapia HSP70 are highlighted by black diamond)

4 讨论 (Discussion)

本研究采用 RT-PCR 技术和 RACE 技术分别从淡水食毒藻鱼类鲢鱼、尼罗罗非鱼及草食性鱼类草鱼肝脏扩增出热休克蛋白 70 (HSP70) cDNA 全序列。鲢鱼、草鱼和尼罗罗非鱼肝脏 HSP70 基因 cDNA 全长分别为 2356 bp、2348 bp 和 2242 bp 分别编码 649、649 和 638 个氨基酸。氨基酸序列分析表明,克隆的鲢鱼、草鱼、尼罗罗非鱼 HSP70 存在 Dnak 特征基序 (Dnak-specific sequence motif) DLGTT-SV (10

~ 18), 胞质 HSP70 特征基序 (cytosolic HSP70-specific motif) EEVD (646~ 649), 简并重复的四肽 (the degenerate repeats of tetrapeptide) GGMP (615~ 622)。HSP70 氨基酸的一级结构可分为 3 个功能域: 即近 N 端有分子量约为 44 kDa 在结构上高度保守的氨基酸序列 (1~ 383), 其具有 ATPase 活性区, 比羧基端部分具有更高的保守性, 且与不同生物 HSP70 所共有的生化特性有关; 紧接着为分子量 18 kDa 大小相对保守的氨基酸序列 (384~ 544), 这是多肽的结合部位; 近 C 端有分子量约为 10 kDa 结构

多变的氨基酸序列 (545~649) (图 1)。当遇到错误折叠或没有折叠的蛋白时, ATPase 被激活, HSP70 会通过肽结合区域与这些蛋白结合, 阻止蛋白-蛋白的非正常聚集, 保护各种酶免受热损伤。

鲢鱼、草鱼肝脏 HSP70 基因 cDNA 序列较尼罗罗非鱼略长, 并且在鲢鱼、草鱼肝脏 HSP70 基因 cDNA 序列中存在一系列重复的 GGXP 基序和一个末端标记九肽 SGPTIEEVD (图 1)。由此可以推测克隆得到的鲢鱼、草鱼肝脏 HSP70 基因可能为结构型 HSP70 (heat shock cognate 70), 而尼罗罗非鱼肝脏 HSP70 基因可能为诱导型 HSP70 (inducible heat shock protein 70) (Graser *et al.*, 1998; Zafarullah *et al.*, 1992; Sai-Ali *et al.*, 2003; Luft *et al.*, 1996; Molina *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 1999; Kothary *et al.*, 1984; Lele *et al.*, 1997)。本研究分别以鲢鱼、草鱼、尼罗罗非鱼肝脏 cDNA 为模板, 用简并引物 HSP7001F/HSP7003R 与 HSP7002F/HSP7004R 进行 PCR 扩增, 克隆得到 3 种鱼 HSP70 基因序列。其中, 鲢鱼、草鱼肝脏 HSP70 基因为结构型 HSP70, 尼罗罗非鱼肝脏 HSP70 基因为诱导型 HSP70。推测可能在鲢鱼、草鱼肝脏中结构型 HSP70 的表达量高于诱导型 HSP70, 而在尼罗罗非鱼肝脏中诱导型 HSP70 的表达量高于结构型 HSP70。这可能是尼罗罗非鱼对富营养化水体、藻毒素具有高耐受性的原因之一。

鲢鱼、尼罗罗非鱼、草鱼食性不同, 鲢鱼生活在水体的中上层, 为典型滤食性鱼类, 食物以浮游植物为主; 尼罗罗非鱼可吞食、消化有毒藻。鲢鱼、尼罗罗非鱼均适于在富营养化水体生活, 它们接触到藻毒素的几率、浓度均较大, 长期的自然选择必然会使它们对藻毒素的耐受性得到很大的提高, 因此, 它们对藻毒素的耐受能力也会相应增强。草鱼通常喜栖息于水体的中下层或靠水草多的地方, 是比较典型的草食性鱼类, 因此, 其接触藻毒素的几率很小。已有实验证实不同种鱼对藻毒素耐受性的不同可能与它们体内去毒相关基因表达量的差异有关 (Wang *et al.*, 2006; Liao *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2007), 据此推测草鱼、鲢鱼、尼罗罗非鱼肝脏 HSP70 的表达量可能存在差异, 这也与鲢鱼、尼罗罗非鱼大量摄入藻毒素, 在鱼体内引发产生过量的过氧化物相适应。HSP 可以抑制 NADH 氧化酶 (自由基产生的关键酶), 减少自由基的产生 (孔垂辉等, 2007), 可增加机体内源性抗氧化剂的合成和

释放。同时, HSP 与其结合物可以激活蛋白激酶 C, 增强蛋白酶活性, 促进 ATP 水解, 刺激生成过氧化物歧化酶 (SOD) 等, 将氧自由基歧化, 消除自由基, 从而使细胞抵抗过氧化物的伤害, 得以维护其生物学特性 (Bernelli-Zazzera *et al.*, 1992)。HSP70 还在抗富营养化、藻毒素去毒过程中扮演了重要的角色, 这一观点已得到大量的实验支持。Jayaraj 等 (2006) 研究证实, 给予小鼠一定剂量的微囊藻毒素后, HSP70 转录表达的增强。Kinder 等 (2007) 以有毒的海底沉积物处理鱼细胞系实验亦发现, 实验组细胞系中 HSP70 含量增加。因此, 本研究认为鲢鱼、尼罗罗非鱼对富营养化水体、藻毒素的强耐受能力, 很可能与 HSP70 基因的表达水平有关。

HSP70 家族在正常细胞中含量较低, 呈基础表达, 而在各种有害应激状态时, 其合成量显著增加 (Nadeau *et al.*, 2001)。因此, HSP70 在环境、水质监测中有广阔的应用前景, 可通过检测水体中鱼类体内 HSP70 基因表达的变化来指示其富营养化程度。本研究对鲢鱼、草鱼、尼罗罗非鱼 HSP70 基因 cDNA 全序列的克隆与分子进化分析, 为进一步获得此基因的侧翼调控序列, 深入研究鱼类 HSP70 基因的表达调控机制, 以及进一步比较研究草鱼、鲢鱼、尼罗罗非鱼等对富营养化水体不同敏感性鱼类中 HSP70 基因表达的不同, 抗毒性的不同奠定了基础。同时, 对进一步阐述 HSP70 在环境、水质监测中的重要意义和应用前景提供新信息。

责任作者简介: 梁旭方, 男, 教授, 博士生导师。研究方向: 鱼类功能基因比较研究。E-mail: tliangx@jnu.edu.cn, Tel: 020-85221497。

参考文献 (References):

- Basu N, Todgham A E, Ackerman P A, *et al.* 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish [J]. *Gene*, 295: 173-183.
- Bernelli-Zazzera A, Cairo G, Schiaffonati L, *et al.* 1992. Stress proteins and reperfusion stress in the liver [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 663: 120-124.
- Bond U, Schlesinger M J. 1987. Heat shock proteins and development [J]. *Adv Genet*, 24(1): 1-19.
- Graser R T, Mahan-Dragic D, Vincek V. 1998. Cloning and characterization of a 70 kD heat shock cognate (hsc70) [J]. *Genetica*, 98: 273-276.
- Jayaraj R, Anand T, Lakshmana Rao P V. 2006. Activity and gene expression profile of certain antioxidant enzymes to microcystin-LR induced oxidative stress in mice [J]. *Toxicology*, 220: 136-146.

- Kinder A, Sierts-Hennemann A, Biselli S, *et al*. 2007 Expression of heat shock protein 70 in a permanent cell line (EPC) exposed to sediment extracts from the North Sea and the Baltic Sea [J]. *Marine Environmental Research*, 63: 506—515
- Kothary R K, Burgess E A, Candido E P M. 1984 The heat shock protein phenomenon in cultured cells of rainbow trout hsp70 mRNA synthesis and turnover [J]. *Biochim Biophys Acta*, 783: 137—143
- Krienitz L, Ballot A, Kotut K, *et al*. 2003 Contribution of hot spring cyanobacteria to the misterious deaths of lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 43: 141—148
- 孔垂辉, 徐玉明. 2007. HSP70和肝脏抗氧化能力 [J]. *北京体育大学学报*, 30(5): 656—658
- Kong C H, Xu Y M. 2007. HSP70 and the antioxidant ability of liver [J]. *Journal of Beijing Sport University*, 30(5): 656—658 (in Chinese)
- Lele Z, Engel S, Krone P H. 1997. Hsp47 and Hsp70 gene expression is differentially regulated in a stress and tissue specific manner in zebrafish embryos [J]. *Dev Genet*, 21: 123—133
- Liao W Q, Liang X F, Wang L, *et al*. 2006. Molecular cloning and characterization of alpha-class glutathione S-transferase gene from the liver of silver carp, bighead carp, and other major Chinese freshwater fishes [J]. *J Biochem Molecular Toxicology*, 20(3): 114—126
- Liang X F, Li G G, He S, *et al*. 2007. Transcriptional responses of alpha- and rho-class glutathione S-transferase genes in the liver of three freshwater fishes intraperitoneally injected with microcystin-LR: relationship of inducible expression and tolerance [J]. *J Biochem Molecular Toxicology*, 21(5): 289—298
- Lin E H, Brenner S. 1999 Short range linkage relationships, genomic organization and sequence comparisons of a cluster of five hsp70 genes in *Fugu rubripes* [J]. *Cell Molecular Life Sci*, 55: 668—678
- Luft J C, Wilson M R, Bly J E, *et al*. 1996 Identification and characterization of a heat shock protein 70 family member in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 113: 169—174
- Molina A, Bimar F, Muller F, *et al*. 2000. Cloning and expression analysis of an inducible HSP70 gene from tilapia fish [J]. *FEBS Lett*, 474: 5—10
- Nadeau D, Comeau S, Plante I, *et al*. 2001. Evaluation for Hsp70 as a biomarker of effect of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris* [J]. *Cell Stress Chaperones*, 6(2): 153—163
- Sait-Ali K, Dongai L, Abraham M, *et al*. 2003 Tissue and stressor specific differential expression of two hsc70 genes in carp [J]. *Biochem Biophys Res*, 307: 503—509
- Sivonen K, Niemela S, Lepisto L, *et al*. 1990. Toxic cyanobacterial (blue-green algae) in Finnish fresh and coastal waters [J]. *Hydrobiologia*, 190: 267—275
- 汤钊猷, 余业勤. 1989. 原发性肝癌 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 30—37
- Tang Z Y, Yu Y Q. 1989. Primary Liver Cancer [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 30—37 (in Chinese)
- Wang L, Liang X F, Liao W Q, *et al*. 2006. Structural and functional characterization of microcystin detoxification-related liver genes in a phytoplanktivorous fish, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 144(3): 216—227
- Zafarullah M, Wisniewski J, Shworak N W, *et al*. 1992. Molecular cloning and characterization of a constitutively expressed heat shock cognate hsc71 gene from rainbow trout [J]. *Eur J Biochem*, 204: 893—900