

李国勇,许抗抗,杨文佳,等. 中国大鲵热激蛋白基因 *Hsp90* 的克隆及极端温度胁迫下的表达研究[J]. 江苏农业科学,2019,47(24):34-39.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.24.008

中国大鲵热激蛋白基因 *Hsp90* 的克隆及极端温度胁迫下的表达研究

李国勇,许抗抗,杨文佳,骆建林,曹宇,李灿

(贵阳学院大学科技园/贵州省山地珍稀动物与经济昆虫重点实验室,贵州贵阳 550005)

摘要:旨在克隆中国大鲵热激蛋白 90 基因(heat shock protein 90,简称 *Hsp90*),并探讨该基因在低温、高温胁迫下的响应机制及其分子机制,分析 *Hsp90* 基因与中国大鲵对温度胁迫的关系。利用中国大鲵皮肤转录组测序获得的热激蛋白基因部分序列,克隆获得中国大鲵热激蛋白基因家族中 *Hsp90B1*、*Hsp90A1* 基因的 cDNA 全长序列,分别将其命名为 *CgHsp901*、*CgHsp902*,其中 *CgHsp901* 基因的开放阅读框大小为 2 388 bp,编码 795 个氨基酸;*CgHsp902* 的开放阅读框大小为 2 184 bp,编码 727 个氨基酸。2 个基因的理论分子量都为 90 ku,等电点分别为 4.81、5.32。用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测这 2 个基因在中国大鲵心脏、肝脏、胃、胰腺、肌肉、皮肤和肠道 7 个不同组织中在低温、高温胁迫下 mRNA 表达量的差异。结果表明,在低温(0、5℃)、高温(20、25℃)下胁迫 24、48 h 后,2 个基因在大鲵皮肤、肌肉和心脏组织中的表达量整体表现为显著上调的趋势,低温时 2 个基因在肠道、胰腺、胃中的表达量出现下调,高温时则上调,但差异不显著。结果说明,*CgHsp901*、*CgHsp902* 基因在大鲵抵抗高温、低温胁迫的过程中起着重要作用

关键词:大鲵;HSP90;高温胁迫;RT-PCR;表达模式

中图分类号:S917 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)24-0034-06

热激蛋白(heat shock protein,简称 Hsp)是细胞或生物体在受到外界环境的刺激(例如高温、干旱、饥饿、病原体侵入、重金属离子等)诱导后产生的一类应激性蛋白,它广泛存在于动物、植物和微生物体内^[1-2]。Hsp 可以促进蛋白质的正确折叠和组装,阻止变性蛋白聚体,从而将变性蛋白降解或重折叠,在维持生物体正常的生理代谢活动中起着重要作用。根据分子量大小、同源性和分子能可将热激蛋白分为 6 个家族,即 Hsp10、Hsp90、Hsp70、Hsp60、Hsp40 和分子量小 Hsp 等^[3]。

Hsp90 蛋白的分子量约为 82~90 ku,它是生物体内最丰富的蛋白质之一,在正常情况下约占胞质蛋白的 1%~2%。Hsp90 家族高度保守,其蛋白质包含 3 个结构域:*N*-端保守 ATP(腺嘌呤核苷三磷酸)结合结构域、中间结构域和 *C*-端多肽结合结构域。Hsp90 具有多种生物学功能,它不仅参与热害、干旱、高盐等胁迫响应,还可以参与组装、稳定和激活转录因子、激素受体以及蛋白激酶等关键信号蛋白^[4]。目前,

关于 *HSP90* 基因的研究多集中于昆虫,已有多种昆虫的 *Hsp90* 基因被克隆鉴定。研究发现,这些基因在应对极端温度、重金属离子以及杀虫剂等各类非生物逆境胁迫中发挥着关键作用^[5-11]。

中国大鲵(*Andrias davidianus*)俗称娃娃鱼,属于两栖纲(Amphibia)有尾目(Caudata)隐鳃鲵科(Cryptobranchidae)大鲵属(*Andrias*),是现存个体最大的两栖动物,为中国珍稀、濒危物种,是国家二级保护动物,已被列入濒危野生动植物种国际贸易公约(简称 CITES 公约)附录 I 中^[12-15]。由于大鲵具有极高的营养价值、经济价值和科研价值,其养殖在中国华中、西南及西北等地区迅速发展,并逐步形成了适度规模化的地方优势特色。但是受到近几年来全球气候变暖的影响,极端天气也频繁出现,对大鲵免疫系统的正常运行产生了严重影响,从而导致大鲵疾病的频发。

本研究以高温、低温 2 种极端温度胁迫下的大鲵为研究对象,分别克隆获得 *CgHsp901*、*CgHsp902* 这个 2 个基因的全长序列,分析不同组织中这 2 个基因的表达变化,试图了解该基因在大鲵应对极端温度胁迫中所发挥的作用,为深入开展大鲵繁殖与疾病预防研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料准备与高温处理

大鲵幼体来源于贵州省大鲵养殖基地,挑选平均体质量为 250~300 g 的幼体大鲵,用长 25 cm、宽 10 cm、高 13 cm 的塑料盆饲养在温度分别为 0、5、15、20、25℃的人工培养箱中,每个温度梯度饲养 1 盆共 4 尾幼体大鲵,饲养时间分别为 24、48 h。为了模拟大鲵的洞穴生存环境,培养箱内不开光照

收稿日期:2018-09-17

基金项目:贵州省科学技术联合基金(编号:黔科合 LH 字[2015]7311);贵州省大鲵可持续利用协同创新中心;贵州省山地珍稀动物与经济昆虫重点实验室;贵州省高层次人才培养计划[编号:黔科合人才(2016)4020 号];贵州省一流学科建设项目贵阳学院生态学科建设项目(编号:黔教科研发[2017]85 号);贵州省大鲵深加工技术开发产学研基地(编号:黔教合 KY 字[2014]231)。

作者简介:李国勇(1984—),男,江西吉安人,博士,讲师,主要从事分子生物学研究。E-mail:ligy0925@163.com。

通信作者:李灿,博士,教授,主要从事大鲵繁育及产业化研究。E-mail:lican790108@163.com。

灯,试验重复 3 遍。处理完成后,统计各温度下大鲵幼体的存活率,对大鲵的心脏、肝脏、胃、脾、肌肉、皮肤和肠道 7 个不同组织进行取样。样品取出后马上放入液氮中冻存,然后置于 -81°C 冰箱中保存备用。

1.2 主要试剂

TRIzol 试剂 (TRIzol Regent, Invitrogen 公司); 反转录试剂盒 (PrimeScript RT Reagent Kit, TaKaRa 公司); *Taq* 酶 (TaKaRa 公司); 胶回收试剂盒 (Gel Extraction Kit, Omega 公司); 载体 (pCEM-T EasyVector, Promega 公司); 感受态细胞 DH5 α (北京全式金公司); qPCR 试剂 (Go*Taq* qPCR Master Mix, Promega 公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 大鲵幼体组织总 RNA 的提取及第一链 cDNA 的合成

根据 TRIzol 试剂盒说明书提取大鲵幼体组织的总 RNA, 用

琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 核酸蛋白浓度测定仪检测总 RNA 的完整性和浓度。取 $1\text{ }\mu\text{g}$ 总 RNA, 按照反转录试剂盒的操作说明合成第一链 cDNA, 稀释 2 倍后保存于 -20°C 冰箱备用。

1.3.2 *Hsp90* 基因全长 cDNA 的克隆

根据贵州省山地珍稀动物与经济昆虫省级重点实验室前期测定的大鲵转录组数据, 利用 NCBI (美国国立生物技术信息中心) 站点的 ORF (开放阅读框) Finder 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/or-fig.cgi>) 对所获得的 *Hsp90* 基因进行分析, 发现 1 个具有完整开放阅读框的 cDNA 序列, 用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物 (表 1) 进行 PCR 扩增。RT-PCR 反应体系如下: $2.5\text{ }\mu\text{L}$ $10\times$ PCR 缓冲液, $2.5\text{ }\mu\text{L}$ MgCl_2 , $2\text{ }\mu\text{L}$ dNTPs, 各 $1\text{ }\mu\text{L}$ 上下游引物, $1.0\text{ }\mu\text{L}$ cDNA, $0.25\text{ }\mu\text{L}$ *Taq* 酶以及 $15\text{ }\mu\text{L}$ ddH_2O 。

表 1 引物相关信息

名称	引物序列 (5'→3')	类型
q - <i>CgHsp901</i> - F	GAACCATTCGCCAAGCTCTGGT	<i>CgHsp901</i> 基因定量 PCR 引物
q - <i>CgHsp901</i> - R	GGGTGTCATTGTTGTGCTTG	
q - <i>CgHsp902</i> - F	CAGAGACCTTTGCCTTCCAG	
q - <i>CgHsp902</i> - R	TAGGGTACGCTCTTGTCTGGT	
<i>CgHsp901</i> - F	CCGCCAAGATGCCAGAGGAAGTA	<i>CgHsp901</i> 基因 ORF 验证引物
<i>CgHsp901</i> - R	CACAATGTCAGGCTACGGTCAAG	
<i>CgHsp902</i> - F	GTGCTCTTGTGCGAGTCAGTATG	
<i>CgHsp902</i> - R	AGTCTGGTAAGCCTGTGCCTTCA	
q - <i>EF1α</i> - F	AAAGTGAAAGCGAGCAGAGC	内参基因引物
q - <i>EF1α</i> - R	TGGACACAGGGATTTCATCA	

扩增条件如下: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 30 s, 56°C 退火 30 s, 72°C 延伸 2.5 min, 35 个循环; 72°C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 利用 Gel Extraction Mini Kit 回收目的条带并连接至 pGEM-T Easy 载体上, 再将其转化到 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞中, 经蓝白斑筛选和 PCR 鉴定后进行测序验证。本试验中所用引物和 DNA 测序由成都擎科生物技术有限公司完成。

1.3.3 序列分析

利用 DNAMAN 6.0 (Lynnon Biosoft) 对测序结果进行编辑和分析, 并采用 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>) 工具进行同源性比对分析。利用在线数据库 Prosite (<http://prosite.expasy.org/>) 分析保守区域。利用 ProtParam (<http://web.expasy.org/>) 和 NetNGlyc 1.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 推测该氨基酸序列的理化性质和 N-糖基化位点。

1.3.4 *Hsp90* 基因在温度胁迫下的相对表达量

采用实时定量 PCR 技术检测不同温度胁迫后幼体大鲵 *Hsp90* 基因的相对表达量。根据“1.1”节的方法, 用不同温度处理大鲵, 分别取 7 个组织, 提取总 RNA 并反转录合成 cDNA 用于实时定量 PCR, 每个处理设 4 次重复。使用在线软件 Primer 3.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) 设计定量 PCR 引物, 内参基因选取 *EF1 α* 基因, 引物序列信息见表 1。PCR 反应体系如下: $10\text{ }\mu\text{L}$ Go *Taq* qPCR Master Mix, $1\text{ }\mu\text{L}$ cDNA, $7\text{ }\mu\text{L}$ nuclease-free water (去核酸酶的水) 和各 $1\text{ }\mu\text{L}$ 上下游引物, 混匀, 轻微离心, 放入 CFX96TM Real-Time System 实时定量 PCR 仪 (Bio-Rad) 中进行扩增, 反应条件如下: 95°C 预变性 2 min;

95°C 变性 15 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 共 40 个循环; 于 $60\sim 95^{\circ}\text{C}$ 进行熔解曲线分析以保证反应的特异性。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算目的基因的相对表达量^[16]。

1.4 数据分析

采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析, 应用单因素方差分析 (ANOVA) 对不同温度胁迫后大鲵幼体的存活率及其体内 *Hsp90* 基因的相对表达量进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 中国大鲵 *CgHsp901*、*CgHsp902* 基因的 cDNA 克隆及序列分析

采用 RT-PCR 技术, 从中国大鲵体内克隆了热激蛋白 90 基因, 命名为 *CgHsp901*、*CgHsp902*。*CgHsp901* 基因 cDNA 全长为 2 619 bp, 开放阅读框为 2 388 bp, 编码 795 个氨基酸; *CgHsp902* 基因 cDNA 全长 3 024 bp, 开放阅读框为 2 184 bp, 编码 727 个氨基酸。2 个基因都具有 *Hsp90* 家族特有的标签序列, 与其他两栖动物等物种的 *Hsp90* 有较高的同源性。2 个基因的理论分子量都为 90 ku, 等电点分别为 4.81、5.32。由 *CgHsp901* 推导的氨基酸序列包含 *Hsp90* 家族的 4 个签名序列: 第 95 ~ 124 位的 NKEIFLRELISNSSDALDKIR、第 161 ~ 169 位的 LGTIAKSGT、第 403 ~ 412 位的 IKLYVRRVFI、第 429 ~ 433 位的 GVVDSDDLPLNISRE (图 1)。由 *CgHsp902* 推导的氨基酸序列包含 *Hsp90* 家族的 5 个签名序列: 第 39 ~ 59 位的 NKEIFLRELISNSSDALDKIR、第 106 ~ 114 位的 LGTIAKSGT、第 129 ~ 145 位的 MIGQFGVGFYSAYLVAE、第

```

1   GTCTGTATTAAAGAAAGTGAAGGGCCAGGAGGATCTTCTTCTCTGACACAGGTTCTCGGGTTGGTAGGAA
76  GGGCGCACGGCGATTCCCGCCCCCGGTGTCGCGCTGCGGAACGATGAGACAGGCGTGGCGCTCGCGTTGTGC
26                                     M R Q A W A L A L C
151 TGCGCTCTCCTGGCATTGCGATCCGTTGCGAGCTGAAGATGATGTGGATGGTACCGTGGAAAGATGACCTTGGGAAA
51  C A L L A F A S V R A E D D V D G T V E D D L G K
226 AGCAGAGATGGCTCCCGACAGATGATGAAGTTGTTAGCAGGAGGAGGAAGCTATTCAGTTAGATTGGATTAAC
76  S R D G S R T D D E V V S R E E E A I Q L D G L N
301 GCTGCCCAATAAAAGAGATCCGAGAGAAATCTGAAAAATATGCATTTACGGCAGAAGTCAACAGAAATGATGAAG
101  A A Q I K E I R E K S E K Y A F Q A E V N R M M K
376 CTCATTATCAACTCGTTGTACAAAATAAGGAGATTTTCTTGAGAGAGTTGATCTCAATGCTTCAGATGCTCTT
126  L I I N S L Y K N K E I F L R E L I K S N A S I D A L
451 GATAAGATTAGACTAATTTCTTGACTGATGAGCATGCCCTTGCTGATAACGAAGAAGTACCATTAAAAATTAAG
151  D K I R L I S L T D E H A L A D N E E L T I K I K
526 TGTGATAAAGAGAAGAACATGCTACATGTCACACTGGTGTGCGCATGACCAAGGATGAATTAATTAAGAAC
176  C D K E K N M L H V T D T G V G M T K D E L I K N
601 CTGGGAACCATTGCCAAGTCTGGTACAAGCGAATTTCTTAAATAAGATAACGGATGTGAGGACGATGACCGAGTCA
201  L G T I A K S G T S E F L N K I T D V Q D D S Q S
676 TCCTCAGAGTTAATGGGCAGTTTGGTGTGGTTTCTACTCTGCCTTCTGTTAGCTGACCGTGTATTATTGTCACA
226  S S E L I G Q F G V G F Y S A F L V A D R V I V T
751 TCCAAGCACACAATGACACCAACATCTGGGAGTCCAATGAGTTCTCTGTGATTGAAGACCCCTCGT
251  S K H N N D T Q H I W E S N S N E F S V I E D P R
826 GCGGACTCTTTGGGAAGAGGCACTACTATAACCCTTGCTTGAAGGAGGAGGCTCTGACTATCTAGAAGTGGAG
276  G D S L G R G T T I T L V L K E E A S D Y L E L E
901 ACTGTTAAAAACCTTGTGAAGAAATCTCGCAGTTTATCAACTTCCCCATATATGTCTGGAGCAGCAAGACTGAG
301  T V K N L V K K Y S Q F I N F P I Y V W S K T E
976 ACTGTAGAAAGCCTATTGACGAAGAGGAAGCTAAGAAGAGACTGATGAAGAAGCAGCTGTTGAAGGAAGAT
326  T V E E P I D E E E A K E E T D E E A A V E E E D
1051 GAAGAGAAAAAGCCAAAACCAAAAAGGTTGAGAAAACAGTCTGGGATTGGGAACCTATGAATGATATCAAAACA
351  E E K K P K T K K V E K T V W D W E L M N D I K P
1126 ATTTGGCAACGACCGAAGGAGGTAGAAGAGGATGAATACAAAGCATTTTACAAATCATTTTCAAAGGAAAGT
376  I W Q R P A K E V E D E Y K A F Y K S F S K E S
1201 GATGATCCCATGGGTCACATCCACTTCACTGCTGAAGGAGAGGTCACATTCAAATCTATCTGTTTCATTCCGAGC
401  D D P M G H I H F T A E G E V T F K S I L F I P S
1276 TCTGCTCTCGCGTCTTTTCGATGAATATGGTTCCAAAAAAGTGACTTTATTAAGCTGTACGTCGCGAGAGTT
426  S A P R L F D E Y G S K K S D F I K S P V R V
1351 TTCATTACTGACGACTTCCATGACATGATGCCAAAGTACCTTAATTCGTCAAAGCGTGTGTTGATTCTGATGAT
451  F I T D D F H D M M P K Y L N F V K G V V D S D D
1426 CTGCCTCTGAATGTGTCTCGTGAGACCCCTACAGCAGCACAACTGCTCAAGGTATTAGAAAAGAAATTTGGTGC
476  L P L N V S R E T L Q Q H K L L K V I R K K L V R
1501 AAAACCTTCGACATGATAAAAAGATTGCTGAAGACAAGTACAATGATAAGTTCTGGAAGAATTTGGTACAAT
501  K T L D M I K K I A E D K Y N D K F W K E F G T N
1576 GTGAAACTTGGTGTGATTGAGGACCACTCAACCGTACCCGTTGGCTAAGCTCCTTAGATTCCAGTCTTCAAAC
526  V K L G V I E D H S N R T R L A K L L R F Q S S N
651 TCTAGTGAACCTACCAGTCTGGAGCAGTATGTAGAGAGAATGAAGGAAAAGCAGGACAAAATCTACTTTTGGCT
551  S E L T S L E Q Y V E R M K E K Q D K I Y F M A
1726 GGAACCAAGCAAGAAAGAGGTGGAATCCCTCTCCCTTCTGTTGAGCGCTTCTGAAAAGGGCTATGAAGTATATT
576  G T S K K E V E S S P F V E R L L K K G Y E V I F
1801 CTGATTGAGCCTGTGATGAATATTGCATTACGGCTCTTCCAGAATTTGATGGAAGAGGTTCCAGAATGTGGCC
601  L I E P V D E Y C I Q A L P E F D G K R F Q N V A
1876 AAGGAAGGTGTAAGTTTGATGAAAGTGAGAAAACCAAGAGTCTCGTGAAGCCTTAGAAAAGGAGTATGAACCA
626  K E G V K F D E S E K T K E S R E A L E K E Y E P
1951 CTGCTCAACTGGATGAAGGACAAGTCTGAAAGACAAGATCGAGAAAGCTGTAGTTTCCCAACGCTTAACAGA
651  L L N W M K D K S L K D K I E K A V V S Q R L T D
2026 TCTCCCTGTGCTCTTGTGGCAAGTCAATATGGATGGTCTGGAATATGGAAGAATCATGAAAGCTCAAGCGTAC
676  S P C A L V A S Q Y G W S G N M E R I M K A Q A Y
2101 CAAACTGGCAAGGACATCTCCACAACTACTATGCTAGCCAGAAGAAAACACTTGAAATTAATCTAGACATCCC
701  Q T G K D I S T N Y Y A S Q K K T L E I N P R H P
2176 CTAATGAAGGATATGCTCAGACGAGTTAAGGAAAAGGAAGATGATCAAACCGTGTGGATCTGGCAGTGGTCTA
726  L M K D M L R R V K E K E D D Q T V L A V V L
2251 TTTGAAACTGCAACGATAAGGTCAAGGATCAATTGCAAGACACCAAGAATATGGAGACCGAATAGAAAGAATG
751  F E T A T I R S G Y Q L Q D T K E Y G D R I E R M
2326 CTTGACTCAGTTTGAACATTGACCTTGACGCAAAGGTTGAGGAGGAGCAGAAGAAGAACAGCTGATGATGGA
776  L R L S L N I D L D A K V E E E P E E E P A D D G
2401 GAACCAGACGAAGAAGATTAGATGGAAGCGGAGGCGAGCAGGCTGAAGCAAAACAGACCACACAGACACG
801  E P D E E E L D M E A E G E Q A E A K P D H T D T
2476 CAGGAATCCACAGATGTGAAGGATGAATTGTAA
826  Q E S T D V K D E L *

```

起始密码子为 ATG；用 “*” 标记且加粗的为终止密码子；单下划线为 HSP90 家族签名序列；糖基化位点用方框表示。图 2 同

图1 大鲵 *CgHsp901* 基因的 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

336 ~ 345 位的 IKLYVRRVFI、第 362 ~ 376 位的 GVVDSLDPLNISRE,以及氨基酸 C-末端尾基序 MEEVD (图 2)。利用 NetNGlyc 1.0 server 进行分析可知,CgHsp901 存在 5 个 N-糖基化位点,分别为 N143、N253、N477、N543 和

N548;而 CgHsp902 存在 4 个 N-糖基化位点,分别为 N150、N386、N492 和 N717。

2.2 2 个基因在不同温度胁迫下的应激表达

利用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)检测这 2 个基因在

```

1      AAAGCCAACGCCGTCTGCAGACCCAAGATGCCTGAAGAGTCTAAGAAAGACCTACCAATG
1      M P E E S K K D L P M
61     GAGGATGAAGAGGCAGAGACCTTTGCCTTCCAGGCTGAAATAGCTCAATTGATGTCTTTG
21     E D E E A E T F A F Q A E I A Q L M S L
121    ATCATCAACACTTTCTATTCCAACAAAGAGATTTTGTAGGGAGCTTATTCCAACCTCT
41     I I N T F Y S N K E I F L R E L I S N S
181    TCTGATGCACTGGATAAAATTCGCTATGAGAGCTTGACTGACCAAGCAAAATGGATTCT
61     S D A L D K I R Y E S L T D P S K L D S
241    GGAAAAGAGTTGAAGATTGATCTCATTCCAAACCAGCAAGAGCGTACCCTAACCAATTATA
81     G K E L K I D L I P N Q Q E R T L T I I
301    GATACTGGTATTGGCATGACCAAGCCGACCTAATCAATAATTTGGGTACCATTCGAAAA
101    D T G I G M T K A D L I N N L G T I A K
361    TCGGGAACCAAGCATTTCATGGAGGCATTGCAGGCCGGTGACAGATATCTCTATGATTGGA
121    S G T K A F M E A L Q A G A D I S M I G
421    CAGTTTGGTGTGCGTTTCTATTCTGCATATCTGGTTGCTGAGAAGTAACCTGATCACC
141    Q F G V G F Y S A Y L V A E K V T V I T
481    AAGCACAATGATGATGAGCAGTATGCCTGGGAGTCCTCAGCTGGAGGGTCATTCACTGT
161    K H N D D E Q Y A W E S S A G S F T V
541    CGAACTGATGCTGGTGAACCTCTGGCCGAGGTACCAAGGTTATCTCGCACTTAAAGGAA
181    R T D A G E P L A R G T K V I L H L K E
601    GATCAACACAGATATTAGAGGAAAGGAGAAATCAAGAAATTTGAGAGAAACACTCCAG
201    D Q T E Y L E E R R I K E I V K K H S Q
661    TTCATTGGTTATCCAATAACCCTTTGTGGAGAAGGAGCGTAACAAGGAGGTGAGTGAT
221    F I G Y P I T L F V E K E R N K E S G D
721    GATGAAGCAGAAGAAGAAAAAGAAGACCAAGAAAAAGAGAGACTGAGGAGAGGCCA
241    D E A E E E E K E D Q E K E K T E E K P
781    GATATTGAGGATTTGGCTCTGATGAGGAAGAGGATGAAAAAGCTGGAAGCAAAAGAAA
261    D I E D V G S D E E E D E K A G S K K K
841    ACCAAGAAAATTAAGGAAAAATACATTGATCAAGAAGAACTCAACAAAACCAAGCCTATT
281    T K K I K E K Y I D Q E E L N K T I
901    TGGACCAAGGAATCCAGATGATATTACCAATGAAGAGTATGGAGAATTCTACAAAAGTCTA
301    W T R N P D D I T N E E Y G E F Y K S L
961    ACAAATGACTGGGAAGATCATTGGCAGTGAAACACTTCTCTGTTGAAGGCCAGTTGGAA
321    T N D W E D H L A V K H F S V E G Q L E
1021   TTCAGAGCTCTGCTTTTGGCCCAAGGCGTGCTCCATTGACCTATTGAAAACAGAAAG
341   F R A L L F A P R R A P F D L F E M V S
1081   AAGAAGATAACATTAAGCTGTATGTCGTAGAGTGTTATTATGGACAATTGCGAGGAG
361   K K N N I K L Y V R R V F I M D N C E E
1141   CTAATCCCTGAATACTTGAACCTCATGCGAGGTGTAGTGAGCTGAGGACCTACCGCTA
381   L I P E Y L N F M R G V V D S E D L P L
1201   AACATTCCCGTGAGATGCTGCAGCAGAGCAAGATTCTGAAAGTCATCAGAAGAACAATA
401   N T S R E M L Q Q S K I L K V I R K N I
1261   GTTAAAAAGTGCTTAGAACTTTTCACTGAACCTAACAGAGGATAAAGACAACCTACAGAAAG
421   V K K C L E L F T E L T E D K D N Y R K
1321   TTCTATGAGCAGTTCTCTAAAAACATTAAAGCTTGGAAATTCATGAAGATTCACAGAAATCGT
441   F Y E Q F S K N I K L G I H E D S Q N R
1381   AAAAACTTTCAGAGTTGCTCCGATTCCATACATCAGCCTCTGGTGATGAAATGGTGTCT
461   K K L S E L L R F H T S A S G D E M V S
1441   CTTACAGATTATGTATCGCGTGTGAAGGAAAACCAAAACACATTTACTACATCACTGGC
481   L T D Y V S R V K E N Q K H I Y Y I T G
1501   GAAACCGGGATCAGGTGTCTCACTCTGCCTTTGTGGAGCGACTGAGGAAACGTCGGTTG
501   E T R D Q V S H S A F V E R L R K R G L
1561   GAGGTTATTACATGACTGAACCCATTGATGAATATTGTGTGAGCAACTTAAGGAATTT
521   E V I Y M T E P I D E Y C V Q Q L K E F
1621   GATGGGAAAACCTTGGTGCTGTAACTAAAGAGGGTTGGAGCTTCTGAAGACGAAGAG
541   D G K T L V S V T K E G L E L P E D E E
1681   GAAAAAAGAGCTAGAGGAGAAAAAGCAAAAGTACGAAAGCTGTGTGTAAGTAATGAAA
561   E K K K L E E K K A K Y E S L C K V M K
1741   GATATCCTTGAAAAGAAAGTTGAAAAGGTGGTTGATCAACACAGATTAGTAGAGTCGCCA
581   D I L E K K V E K V V V S N R L V S P
1801   TGTGTATTGTGACAAGCACTTATGGATGGACTGCAATATGGAAGAATAATGAAGGCA
601   C C I V T S T Y G W T A N M E R I M K A
1861   CAGGCACCTCGAGACAACCTACGATGGGCTACATGGCAGCAAAAAACACTTAGAAATC
621   Q A L R D N S T M G Y M A A K K H L E I
1921   AACTCTGAGCATTCTATCATTGAGACTCTTAGACAGAAAGCAGAAGCAGATAAAATGAC
641   N S E H S I I E T L R Q K A E A D K N D
1981   AAATCTGTGAAGGACTGGTAATTCTACTGTATGAGACAGCACTCTTGTCATCTGGCTTT
661   K S V K D L V I L L Y E T A L L S S G F
2041   TCACCTGAGGATCCACAACTCATGCTAACCGAATTACAGGATGATCAAACTGGGATTA
681   S L E D P Q T H A N R I Y R M I K L G L
2101   GGTATTGATGAAGATGATGTTCCCATGGAAGATACTACCGAGTGACAGAGGACATCCCT
701   G I D E D D V P M E D T T Q V T E D I P
2161   CCCTTAGAAGGCGATGAAGAGGATTCTTCGCGGATGGAGGAAGTGGACTGA
721   P L E G D E E D S S R M E E V D *

```

双下划线标注的为胞质特征序列

图2 大鲵 *CgHsp902* 基因的 cDNA 序列及由其推导的氨基酸序列

中国大鲵心脏、肝脏、胃、胰腺、肌肉、皮肤和肠道 7 个不同组织中低温(0、5℃)和高温(20、25℃)胁迫下 mRNA 表达量的差异,结果显示,大鲵幼体经低温处理 24、48 h 后, *CgHsp901* mRNA 的相对表达量在肠道、胰腺、胃和肝脏中不高,甚至在胰腺和肝脏中的部分表达量显著下调(图 3、图 4)。但在皮肤、肌肉和心脏组织中, *CgHsp901* mRNA 的相对表达量整体上显著升高。0℃处理 24 h 后, *CgHsp901* mRNA 在皮肤中的相对表达量是同温度下肠道、胰腺中表达量的 400 倍,是肝脏组织中表达量的 40 倍;肌肉、心脏组织中 *CgHsp901* mRNA 的相对表达量同样升高,但是只有对照组的 1~2 倍。当处理温

度升高到 5℃后, *CgHsp901* mRNA 在皮肤、肌肉和心脏组织中的表达量较 0℃处理时显著下降。

另外,当大鲵幼体处于 20、25℃高温胁迫时,该基因在大部分组织中的 mRNA 相对表达量都上调。其中在 25℃高温处理后,其在肌肉、胃、皮肤、心脏和肝脏中的表达量显著上调。另外,对图 3、图 4 比较可以看出,随着处理时间的延长, *CgHsp901* 基因的 mRNA 相对表达量没有明显升高,说明处理时间长短不影响 *CgHsp901* 基因的表达。以上结果说明,高温、低温胁迫能够显著诱导 *CgHsp901* 基因在大鲵体内表达,且 mRNA 表达量与胁迫程度成正比。

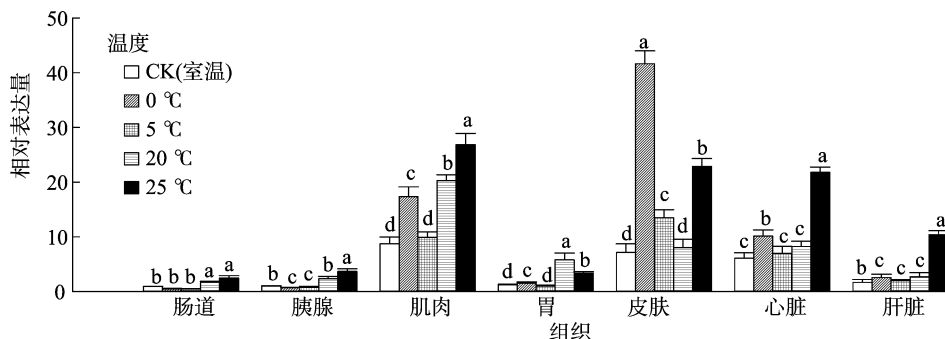


图3 24 h 不同温度处理后 *CgHsp901* 基因在大鲵各组织中的相对表达量

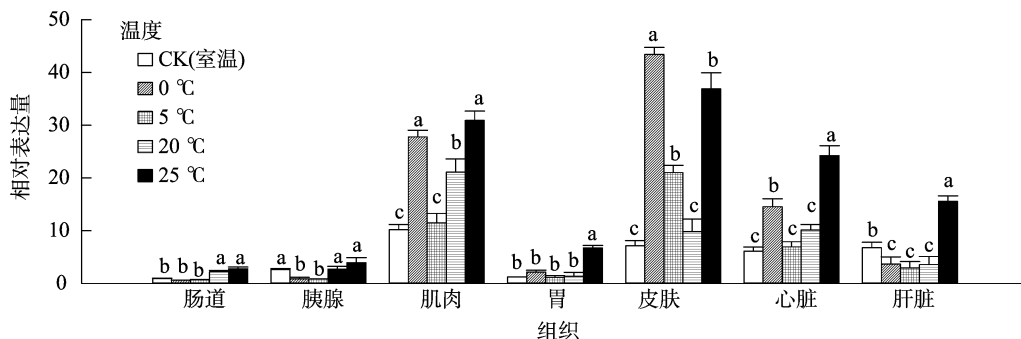


图4 不同温度处理 48 h 后 *CgHsp901* 基因在大鲵各组织中的相对表达量

本研究对 *CgHsp902* 基因同样进行了低温(0、5℃)和高温(20、25℃)胁迫处理,结果显示, *CgHsp902* 基因在肠道、胰腺和胃组织中的相对表达量明显低于其在肌肉、皮肤、心脏和肝脏组织中的表达量。与 *CgHsp901* 基因一样, *CgHsp902* 基因在低温、高温胁迫下在皮肤、肌肉、心脏和肝脏中的 mRNA 相对表达量整体表现为显著升高,而且表达量比 *CgHsp901* 基因高(图 5、图 6)。这同样说明,高温、低温胁迫能够显著诱导 *CgHsp901* 基因在大鲵体内的表达,且 mRNA 表达量与胁

迫程度成正比。

3 讨论

大鲵喜栖息于山涧水深、水质清凉、泥潭水流急湍及岩石空洞较多的山溪中,对温度变化非常敏感,栖息地气候温凉湿润,年平均气温为 12~17℃,最冷月平均气温 2℃以上,最热月平均气温在 27℃以下,低温和高温暴露都可能造成其感染病菌,甚至死亡,从而影响种群发展^[12]。本试验发现,在 0、

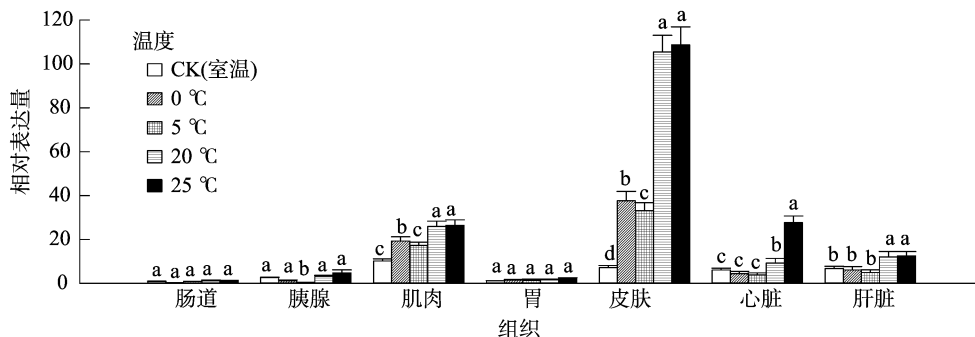


图5 不同温度处理 24 h 后 *CgHsp902* 基因在大鲵各组织中的相对表达量

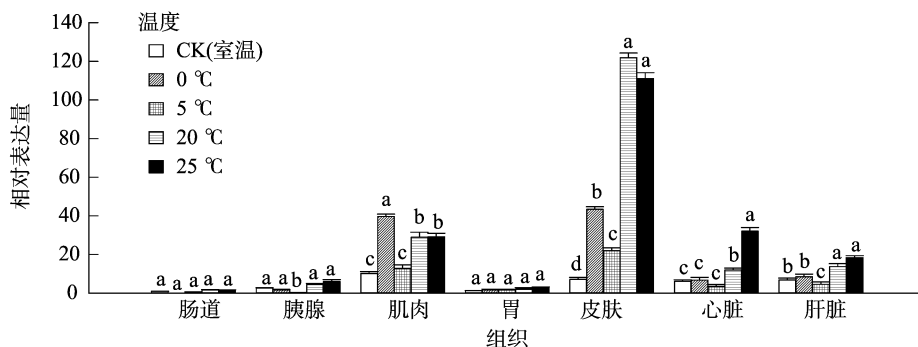


图6 不同温度处理 48 h 后 *CgHsp902* 基因在大鲈各组织中的相对表达量

5 °C 的低温及 20、25 °C 高温下分别处理 24、48 h 后,并未发现大鲈死亡。在温度胁迫下大鲈只是将胃中内容物吐出,低温时不吃不动,高温时则到处游荡。从这个结果可以看出,大鲈对短时低温或高温环境有较强的适应性。

热激蛋白可以分为组成型热激蛋白和诱导型热激蛋白。组成型热激蛋白在正常生理条件下的细胞中就大量存在,高温等刺激不会诱导其大量表达,大多与维持细胞基本生理功能和形态建成密切相关,而诱导型热激蛋白在正常生理条件下不存在或表达量低,但在高温等逆境刺激下能被强烈诱导表达,具有保护细胞的功能。热激蛋白 90 在海洋鱼类适应海水温度变化以及体内外渗透压变化等不利条件方面起着重要的作用。热激蛋白不仅是热胁迫时大量表达的蛋白,也是其他环境胁迫时大量表达的蛋白,如低温、干旱、高渗透压及重金属等环境因素都能促使生物体表达热激蛋白。在很多昆虫种类中,Hsp90 得到了大量的研究。然而有关大鲈热激蛋白方面的研究很少,关于大鲈 Hsp90 的热激蛋白基因家族中 *Hsp90B1*、*Hsp90AA1* 基因的研究几乎未见报道。本试验利用 RT-PCR 技术克隆了大鲈的 *Hsp90* cDNA 片段,为进一步明确低温和高温胁迫与 *Hsp90* 基因表达量之间的相互关系奠定了基础。本试验克隆出的 *CgHsp901*、*CgHsp902* 在正常条件下检测到少量存在于肌肉、皮肤、心脏和肝脏中,而当大鲈在 0 °C 或 25 °C 下胁迫 24、48 h 后,2 个基因在皮肤中的表达量与对照组相比分别上升了 5、20 倍,说明这 2 个基因诱导表达的都是诱导型热激蛋白。而大鲈在低温、高温的长时间胁迫下能够全部存活,很可能是皮肤中 *CgHsp901*、*CgHsp902* 基因上调,在抵抗低温和高温胁迫过程中发挥了重要作用,也可以说明在遇到温度胁迫时皮肤是抵御其影响的第一道屏障。另外肌肉、心脏和肝脏组织在低温和高温胁迫下 *CgHsp901*、*CgHsp902* 基因的相对表达量也高于对照组,并且它们的平均值都显著高于肠道、胃和胰腺组织中的相对表达量。这说明前三者在应对温度胁迫的时候也发挥了一定的作用,而后面 3 个组织则不起作用。

参考文献:

- [1] Carper S W, Duff J J, Gerner E W. Heat shock protein in thermotolerance and other cellular processes[J]. *Cancer Research*, 1987, 47(20): 5249 - 5255.
- [2] Feder M E, Hofmann G E. Heat - shock proteins, molecular

chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology[J]. *Annual Review of Physiology*, 1999, 61(1): 243 - 282.

- [3] Sorensen J G, Kristensen T N, Loeschcke V. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins[J]. *Ecology Letters*, 2010, 6(11): 1025 - 1037.
- [4] Gupta R S. Phylogenetic analysis of the 90 kDa heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1995, 12(6): 1063 - 1073.
- [5] Pearl L H, Prodromou C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2006, 75: 271 - 294.
- [6] Yonehara M, Minami Y, Kawata Y, et al. Heat - induced chaperone activity of HSP90[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(5): 2641 - 2645.
- [7] Emelyanov V V. Phylogenetic relationships of organellar Hsp90 homologs reveal fundamental differences to organellar Hsp70 and Hsp60 evolution[J]. *Gene*, 2002, 299(12): 125 - 133.
- [8] 申建茹, 李明福, 陈乃中, 等. 苹果蠹蛾热激蛋白 *Hsp90* 基因的克隆及热胁迫下的表达分析[J]. *昆虫学报*, 2011, 54(11): 1236 - 1248.
- [9] 翟会芳, 江幸福, 罗礼智. 甜菜夜蛾 *HSP90* 基因克隆及高温胁迫下其表达量的变化[J]. *昆虫学报*, 2010, 53(1): 20 - 28.
- [10] 蒋 健, 李祥瑞, 张云慧, 等. 马铃薯甲虫热激蛋白基因 *Ld - hsp90* 的克隆及温度胁迫下的表达[J]. *植物保护学报*, 2013, 40(5): 399 - 406.
- [11] 陈 芳, 陆永跃. 温度胁迫下棉花粉蚜热激蛋白基因的表达分析[J]. *昆虫学报*, 2014, 57(11): 1253 - 1264.
- [12] 殷梦光, 曹 宇, 李 灿. 中国大鲈资源现状及保护对策[J]. *贵州农业科学*, 2014, 42(11): 197 - 202.
- [13] 陈德来, 周天林, 石国玺, 等. 陇东 - 六盘地区首次发现中国大鲈[J]. *四川动物*, 2017, 36(1): 58.
- [14] 雷 越. 湖南中国大鲈资源、驯养及产业化的调查研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2015.
- [15] 高 宇, 刘鉴毅, 张婷婷, 等. 养殖中国大鲈在增殖放流前野化训练初探[J]. *经济动物学报*, 2017, 21(3): 155 - 163.
- [16] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402 - 408.