

卵形鲳鲅 (*Trachinotus ovatus*) 热休克蛋白 HSP30 基因的克隆与组织表达

肖梓颖, 王一帆, 梁雪茹, 黄郁葱* (广东海洋大学水产学院/广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室暨水产经济动物病害控制广东省普通高等学校重点实验室, 广东湛江 524088)

摘要 [目的] 获得卵形鲳鲅 (*Trachinotus ovatus*) HSP30 基因并探讨其组织表达。[方法] 采用 RACE 的方法从卵形鲳鲅脾组织克隆 HSP30 基因的 cDNA 全序列, 并用荧光定量 PCR 分析在健康鱼及哈维氏弧菌感染后 HSP30 基因的组织表达。[结果] HSP30 基因 cDNA 序列全长 913 bp, 包含 5' 非编码区 (5'UTR) 89 bp、3' 非编码区 (3'UTR) 188 bp, 开放阅读框 (ORF) 636 bp, 编码 211 个氨基酸。预测其氨基酸序列成熟肽的蛋白分子质量为 24.1 kD, 理论等电点为 5.62。HSP30 包括 N-末端序列 (NTS)、 α -晶状体蛋白结构域 (ACD)、C-末端序列 (CTS) 和 C-末端延伸 (CTE)。系统进化分析结果显示卵形鲳鲅 HSP30 与高体鲷 (*Seriola dumerili*) HSP30 聚为一支。卵形鲳鲅 HSP30 基因在各组织中均有不同程度的表达, 其中肝组织中表达量最高, 其次为皮肤、肌肉、脾、心、肾, 其他组织的表达量较低。哈维氏弧菌感染卵形鲳鲅后, 肝、脾和肾组织中 HSP30 基因 mRNA 表达量均升高, 肝组织中变化最显著。[结论] 成功克隆了卵形鲳鲅 HSP30 基因, 为进一步揭示卵形鲳鲅 HSP30 的抗菌免疫应答机制提供了理论依据。

关键词 卵形鲳鲅; 热休克蛋白; HSP30; 基因克隆; 组织表达

中图分类号 S917.4 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)02-0081-06

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.02.024

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Cloning and Tissue Expression of HSP30 Gene from *Trachinotus ovatus*

XIAO Zi-ying, WANG Yi-fan, LIANG Xue-ru et al (Fisheries College of Guangdong Ocean University/Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals of Guangdong&Key Laboratory of Control for Diseases of Aquatic Economic Animals of Guangdong Higher Education Institute, Zhanjiang, Guangdong 524088)

Abstract [Objective] To obtain the HSP30 gene of *Trachinotus ovatus* and to study its tissue expression. [Method] The full length cDNA sequence of the HSP30 gene was cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE) from the spleen of *T. ovatus*, and its expression profiles in tissues of the health fish and the fish infected with *Vibrio harveyi* were also analyzed by quantitative real time PCR (qRT-PCR). [Result] The total cDNA sequence of *T. ovatus* HSP30 was 913 bp, including 5' UTR of 89 bp, 3' UTR of 188 bp, and an open reading frame (ORF) of 636 bp encoding 211 amino acids with molecule mass of 24.1 kD and PI of 5.62. The predicted HSP30 protein included an N-terminal sequence (NTS), an α -crystallin domain (ACD), a C-terminal sequence (CTS) and a C-terminal extension (CTE) in structure. Phylogenetic analysis showed that *T. ovatus* was clustered closely with *Seriola dumerili*. The qRT-PCR analysis showed that *T. ovatus* HSP30 gene expressed in all examined tissues with the highest levels in liver, moderate levels in skin, muscle, spleen, heart, kidney, low levels in other tissues. The mRNA expression levels of HSP30 were significantly up-regulated in the liver, spleen and kidney tissues, especially in the liver. [Conclusion] The HSP30 gene of *T. ovatus* was successfully cloned, which will provide a theoretical basis for further elucidating the mechanism of anti-bacterial immune response of *T. ovatus* HSP30.

Key words *Trachinotus ovatus*; Heat shock protein; HSP30; Gene cloning; Tissue expression

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs) 是一类结构高度保守的应激反应伴侣蛋白, 可响应各种应激而合成, 参与各种细胞过程, 如蛋白质折叠、蛋白质运输以及蛋白质复合物组装/拆卸和降解, 维持细胞的稳态^[1]。很多研究都表明 HSP 还参与炎症、免疫、细胞分化、抗氧化、抗辐射以及抗癌细胞增殖等生物学功能^[2-3]。根据 HSP 分子、结构和功能, 分为 6 个家族, 包括小分子 HSP (sHSP)、HSP40、HSP60、HSP70、HSP90 和大分子 HSP^[2]。HSP 分子量大小为 10~110 kD。此外, 它们的特定部位和生理作用会根据其大小在细胞内发生变化。HSP30 为 sHSP 家族的重要成员, 其蛋白结构包括 N-末端序列 (N-terminal sequences, NTS)、 α -晶状体蛋白结构域 (α -crystallin domain, ACD)、C-末端序列 (C-terminal sequences, CTS) 和 C-末端延伸 (C-terminal extension, CTE), 在目前已发现的非哺乳动物和原核生物中具有高度的保守性。HSP30 具有 sHSP 家族的类似功能, 通过形成寡

聚体(分子量 100~800 kD) 发挥其分子伴侣作用, 防止错误折叠并加快蛋白质的重新折叠和复性^[4]。

目前已有两栖动物^[5] 和鸟类^[6] 中 HSP30 的研究报道, 尤其是非洲爪蟾 (*Xenopus tropicalis*) HSP30 的研究较为深入, 而鱼类 HSP30 的研究相对较少, 目前中华鲟 (*Acipenser sinensis*)^[7]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[8]、金鱼 (*Carassius auratus*)^[9] 和斑马鱼 (*Danio rerio*)^[10] 的 HSP30 基因已得到克隆鉴定, 研究表明鱼类的 HSP30 在热应激和刺激下, 参与应激反应和保持内稳态的平衡^[11-12]。卵形鲳鲅 (*Trachinotus ovatus*) 是我国南方沿海地区近岸和深远海养殖的重要经济鱼种, 然而集约化养殖规模的不断扩大和养殖环境日趋恶化, 各种病害频繁暴发^[13-14], 导致巨大的经济损失, 成为制约其产业发展壮大的瓶颈。最近研究发现, HSP30 还参与抗病毒免疫反应^[15]。目前鲜见卵形鲳鲅 HSP30 基因的研究报道。该研究运用 RACE 方法克隆卵形鲳鲅 HSP30 基因 cDNA 全长序列, 应用实时荧光定量 PCR (quantitative Real-Time PCR, qRT-PCR) 检测 HSP30 基因在健康卵形鲳鲅及哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 感染后卵形鲳鲅组织中的诱导表达, 以期为进一步研究该基因在先天免疫中的功能提供理论依据。

基金项目 广东省大学生创新创业训练计划项目 (CXXL2018052); 广东省自然科学基金项目 (2016A030313748); 南方海洋科学与广东实验室(湛江)项目 (ZJW-2019-06)。

作者简介 肖梓颖(1997—), 女, 广东广州人, 从事水产动物病害防治研究。* 通信作者, 副教授, 博士, 从事水产动物免疫学及病害控制研究。

收稿日期 2020-06-15

1 材料与方法

1.1 材料 试验用健康卵形鲳鲆(平均体重约 100 g)购自湛江某深海养殖网箱,哈维氏弧菌强毒株 TOZJ1705 由实验室分离自患病卵形鲳鲆并冻干保存。总 RNA 抽提试剂盒(EasyPure® RNA Kit)、组织基因组提取试剂盒(EasyPure® Marine Animal Genomic DNA Kit)和反转录试剂盒(EasyScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix)购自北京全式金公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒(GeneJET)购自 Thermo 公司;SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 等购自 TaKaRa 公司;实时荧光定量试剂盒(SYBR® Select Master Mix)购自 ABI 公司。

1.2 哈维氏弧菌感染及样品采集 将哈维氏弧菌强毒株 TOZJ1705 接种于 TSB(1.5% NaCl)培养基中,28 ℃ 振荡培养 10 h,用平板计数法计数菌液浓度,将哈维氏弧菌菌液用生理盐水调整其浓度为 1.2×10^8 CFU/mL。将试验鱼分成 2 组,感染组每尾鱼腹腔注射哈维氏弧菌菌液 0.1 mL,对照组注射等量无菌生理盐水,于感染后的 0、3、6、12、24、48 和 72 h 分别采集肝、脾和肌肉组织,每个时间点采集 5 尾卵形鲳鲆,组织用液氮固定后保存于-80 ℃。收集的组织主要用于 qRT-PCR 分析。同时取 5 尾健康鱼的鳃、肝、脾、肾、肠、肌肉和皮肤等组织立即置于液氮中,用于 cDNA 全长克隆和组织分布分析。

1.3 总 RNA 提取和 cDNA 一链合成 参考说明书分别提取卵形鲳鲆各组织总 RNA。1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性,紫外分光光度法检测其纯度和浓度。参考说明书合成 cDNA 第一链,置于-40 ℃ 保存备用。另取肝、脾组织的总 RNA,按 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 说明书分别合成用于 3'与 5' RACE 的 cDNA,置于-80 ℃ 保存备用。参考说明书分别提取卵形鲳鲆组织 DNA。

1.4 3'RACE、5'RACE 和基因扩增 根据转录组测序获得的 HSP30 基因部分 mRNA 设计 HSP30 全长 cDNA 的 3'RACE 和 5'RACE 特异引物(表 1)。3'HSP30F1、5'HSP30R1 分别与引物 UPM Mix 进行 3'与 5' RACE 第一轮 touch-down PCR 扩增。反应条件为 94 ℃ 4 min,94 ℃ 30 s,68 ℃ 1 min,5 个循环;94 ℃ 30 s,65 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,5 个循环;94 ℃ 30 s,62 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,25 个循环,72 ℃ 延伸 6 min,16 ℃ 保存。将第一轮 PCR 产物稀释 10 倍为第二轮 PCR 的模板,分别将 3'HSP30F2、5'HSP30R2 与引物 NUP 进行第二轮 PCR 扩增,反应条件为 94 ℃ 4 min,94 ℃ 30 s,65 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min 35 个循环,72 ℃ 延伸 6 min,16 ℃ 保存。PCR 反应产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,扩增产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行回收,回收产物与 pMD-18T 载体连接并转化 DH5α 感受态,阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。根据获得 cDNA 全序列,设计 1 对基因特异引物 HSP30-F/HSP30-R,以基因组 DNA 为模板,扩增 HSP30 全长基因序列,方法与 3'RACE 第二轮 PCR 扩增、产物回收及克隆测序相同。

1.5 生物学信息分析 使用在线 Blast 程序进行序列同源性

比对和相似性分析;使用 Genetyx 6.0 和 Protparam 推导开放阅读框(open reading frame, ORF)、分子量(M_w)和理论等电点(pI)等;SignalP 4.0 Server 和 TMHMM Server 2.0 分别预测信号肽和跨膜结构域;PSITE 预测氨基酸的功能位点分布;运用 SMART 分析蛋白质功能结构域;采用 SOPMA 预测蛋白二级结构;采用 SWISS-MODEL 预测蛋白质三维结构;使用 ClustalX 2.1 及 MEGA 10.0 软件以邻位相连法(Neighbor-Joining)构建系统进化树,自检数为 1 000。

表 1 试验所用的引物序列
Table 1 Sequence of primer used in experiment

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'—3')	用途 Use
3'HSP30F1	CTCATGGATTCCAGTCTGCCCTCA	3'RACE-PCR
3'HSP30F2	TGTCAGCGCAGGTGGGCAGGAA	
5'HSP30R1	CAGCAGGTGACGGCTTCAGGGTT	5'RACE-PCR
5'HSP30R2	TCTGGGGAAGCCCTTGAGTGTCTC	
reHSP30F	CAAACCTCAACACAAATCTCTGG	qRT-PCR
reHSP30R	TCCCGTCTCTCTGCTTCTTCTC	
β-actinF	AGCCACACAACACCTCTTCC	ORF 扩增
β-actinR	TCCTCACATTCACACCGCC	
HSP30F	ATGCTGTGCTCTCATGGATTCCA	
HSP30R	TCAGTGCATGTGTTTCAGGTTCTGT	

1.6 qRT-PCR 和数据统计与分析 根据 HSP30 基因 ORF 设计特异引物 reHSP30F 和 reHSP30R(表 1),以 β-actin 为内参基因,利用 ABI7300 实时荧光定量 PCR 仪对卵形鲳鲆 HSP30 基因的表达量进行分析,每个样本设 3 个重复。qRT-PCR 反应条件为 94 ℃ 3 min,94 ℃ 20 s,60 ℃ 20 s,60 ℃ 30 s,40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算卵形鲳鲆 HSP30 cDNA 的相对表达量^[16],应用 SPSS 21.0 软件对数据进行 ANOVA 单因素方差分析和 Tukey HSD 多重比较。

2 结果与分析

2.1 cDNA 克隆与氨基酸序列分析 卵形鲳鲆 HSP30 基因 cDNA 序列全长 913 bp(图 1),包含 89 bp 5'非编码区(untranslated region, UTR),188 bp 3' UTR,636 bp ORF,推导编码 211 个氨基酸,预测其理论分子量为 24.1 kD,等电点为 5.62。SignalP 4.0 Server 分析显示 HSP30 蛋白氨基酸序列不含信号肽,TMHMM Server 2.0 预测显示该蛋白氨基酸序列不存在跨膜结构域。该蛋白氨基酸序列含有一个典型的 HSP 家族所有的特征基序,PSITE 蛋白氨基酸序列含有 1 个 N-糖基化位点,5 个蛋白激酶 C 磷酸化位点,7 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点,1 个酰胺化位点,1 个 CAAX box,2 个微体 C-末端定位信号序列,1 个亮氨酸拉链结构。PSORT II 预测结果显示在细胞中细胞核、细胞质、线粒体和细胞骨架分布的概率分别为 60.9%、21.7%、13.0% 和 4.3%。根据获得的 HSP30 全长 cDNA 序列,设计一对基因特异性引物 HSP30F 和 HSP30R,以卵形鲳鲆基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物经琼脂糖凝胶及测序鉴定,所得序列与在 cDNA 模板中扩增的结果完全一致,表明卵形鲳鲆 HSP30 基因无内含子。

```

CAACACAAGCAACACAGAAGAGGAGAAACAGACACTTGAACAGTGTTCATCACACAACAAGAGGACTCAACACCA 75
AACACACACTGAAGATGCTGTGCTCTCATGGATTCCAGTCTGCCCTCAGTCCAGTCAAGTTCTACTGGCTGTAC 150
      M L C S H G F Q S A L S P V S F Y W P V
GCAGTCTGTGCCAGAGGTCAAACCTCTGTCTTACCAGCAGCATCTACTGCAGAGAACTACAGGAGCTGTGCA 225
R S L W P E V K P L L Y Q Q H L L Q R N L Q E L C
GCAGTCTGGAGCTGATGGACAACTTCAACACAACATCCTGGAGGAGGCAAGCCTTTCCGAGCAGCGTGGCCG 300
S S L E L M D K L Q H N I L E E A K P F R S S V A
TGCAGCCAGTCTCCTACCAGCTGGAGAAAGAGGGAGAGCACTTGAAGCTGACTCTGGACACTCAAGGCTTTTCCC 375
V Q P V S Y Q L E K E G E H L K L T L D T Q G F S
CAGAGGAGCTGTCTGTGTCAGGAGGTGGGAGGAGCTGAGAGTCAGCGGAAGACAGAGAAGAGCAGGAGGACG 450
P E E L S V R Q V G R K L R V S G K T E K K Q E D
GGAAAGGCTCCTACTCTTACAGACTCCAGGAGTTCAGACAGGAGTTTGATCTGCCTGAAGGCTGAACCTGAA 525
G K G S Y S Y R L Q E F R Q E F D L P E G L N P E
CCGTCACCTGTGCTGCCCGGAGAGGAGCTCCACATCCAGGAGCCAGAGCTCCATGTGCTGAGGAGGCTG 600
A V T C C L A P D G K L H I Q A A R A P C A E E A
AGAGAGAGCTGACTATCAAGAGGAGCTTGAGGAGAGAAACCCAGCAGAGTGTGTGTTACACACAGAAGGAGCA 675
E R E L T I K R S L E E K T Q Q S V C S H T E G S
GCACAGAGACAGACAACAGCACACAGCAGCAACCTGAACACATGCATGATCACACTGTGTTGTGCAATGACA 750
S T E T D N S T Q H E P E H M H *
AATATTTTATATGGATGAATGATGATCACAATATCTTTGTATGTTGTGTGTACAACATGAACATGGTTAAATA 825
ATGTATTTCAACCAATCATTATTTCTTTGTAAGTTTCTTAACTTCTTTGACACAAAAA 900
AAAAA 913
    
```

注:ACD 结构域用灰度表示

Note: ACD domain was highlighted in gray

图 1 卵形鲳鲆 HSP30 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig.1 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of HSP30 from *T.ovatus*

2.2 蛋白结构分析 卵形鲳鲆 HSP30 基因 cDNA 编码 211 个氨基酸残基中,有 24 个碱性氨基酸(K,R),占氨基酸总数的 11.37%;32 个酸性氨基酸(D,E),占氨基酸总数的 15.2%。亲疏水性的平均值为-0.738,表明该蛋白为亲水性蛋白。应用 SOPMA 在线软件对 HSP30 蛋白进行二级结构分析,结果显示,HSP30 蛋白分子二级结构中的 α -螺旋占 34.12%, β -

转角占 4.74%,无规卷曲占 46.92%,延伸链占 14.22%(图 2)。将卵形鲳鲆 HSP30 氨基酸序列提交至 SWISS-MODEL 程序,自动搜索同源蛋白 4yl9.1.A 作模板,得到 HSP30 三级结构模型(图 3),结果显示卵形鲳鲆 HSP30 空间结构包括 5 个 α -螺旋,16 个 β -折叠。

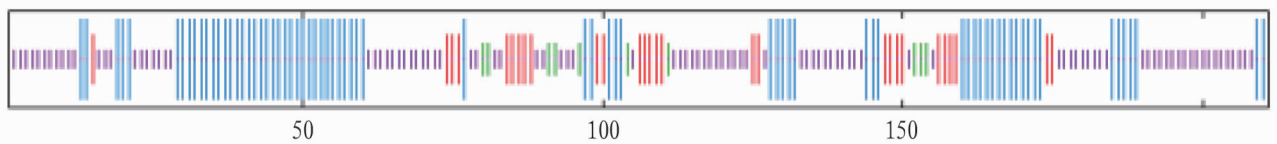


图 2 HSP30 蛋白二级结构

Fig.2 Secondary structure of HSP30 protein

2.3 氨基酸同源性比较及系统进化分析 利用 NCBI 的 Blastp 软件将卵形鲳鲆 HSP30 蛋白氨基酸序列与 GenBank 数据库中其他物种的 HSP30 蛋白氨基酸序列进行同源性比对,结果发现卵形鲳鲆 HSP30 蛋白与高体鲷 (*Seriola dumerili*) 同源率为 93.33%,与斑马鱼、短吻鳄 (*Alligator mississippiensis*)、棕鸟 (*Sturnus vulgaris*)、原鸡 (*Gallus gallus*)、中华鲟和爪蟾 HSP30 蛋白分子的同源性较低,分别为 57.30%、37.67%、32.50%、31.29%、30.86%和 30.69%。氨基酸序列比对发现,鱼类、两栖类、爬行类和鸟类的 HSP30 蛋白分子均由 N-末端序列(NTS)、 α -晶状体蛋白结构域(ACD)、C-末端序列(CTS)和 C-末端延伸(CTE)组成,其中 ACD 较为保守(图 4)。ACD 中的丝氨酸磷酸化位点在卵形鲳鲆、斑马鱼、中华鲟、爪蟾和短吻鳄氨基酸序列中均存在,而在原鸡、棕鸟氨基

酸序列中未发现此位点。CTS 中的 I-X-I 基序存在于非洲爪蟾、斑马鱼和短吻鳄氨基酸序列中,中华鲟序列中为 V-P-I,在卵形鲳鲆和原鸡中均未发现此基序。利用 MEGA 10.0 的 Neighbor-Joining 法构建的 HSP30 蛋白分子系统进化树显示(图 5),卵形鲳鲆与同属鲳形目的高体鲷聚成一簇,然后再与其他鱼类聚成一个大的分支,两栖类和爬行类及鸟类形成独立的进化分支,与 Blastp 结果相一致。

2.4 HSP30 mRNA 组织表达分布 应用 qRT-PCR 检测了 HSP30 基因 mRNA 在卵形鲳鲆各组织中的分布,以脑组织的 mRNA 表达量为基准,结果显示在脾、肾、肠、鳃、肝、心、肌肉和皮肤组织中均有不同程度的表达,其中肝组织中表达量最高,其次为皮肤、肌肉、肾、心,其他组织中的表达量较低(图 6)。

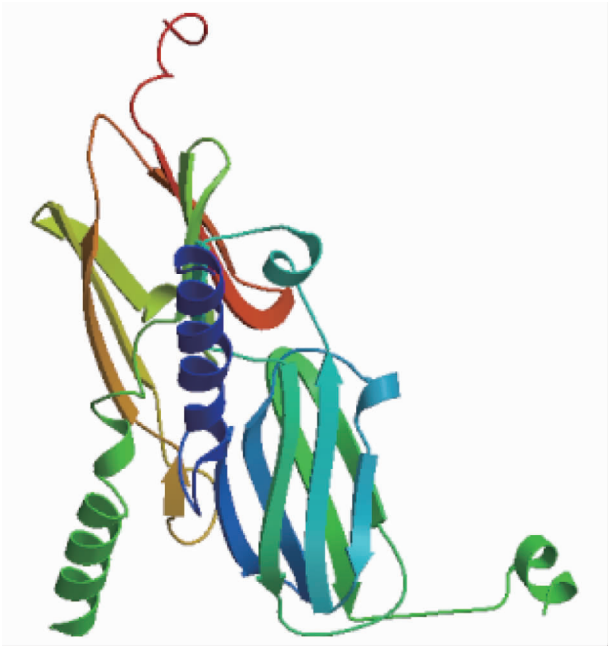


图3 HSP30 蛋白三级结构
Fig.3 Tertiary structure of HSP30 protein

*****NTS*****				
<i>X. laevis</i>	---MFPLSLVQPSHSPLCPCSPALTLWPATR---	LIFGHLEDDILS-MRNDMERRMQRVNEACRLLSKDTEMRRIT--DQNR	74	
<i>A. mississippiensis</i>	---MSSLLQPS-----PAN---	IFEQMASDLQR-QVEAMDRLSHAVFHAQPLLWLEPAGQGEP--RQDG	55	
<i>S. vulgaris</i>	---MLCRMHLAPFASS-----SLASRLGTVR--	TLWPHAETIFTE-LQQEMEKAREFMSSEFQLLSNHGAI--	62	
<i>G. gallus</i>	---MLCRMHLAPFASS-----SLATRLGTVR--	TLWPHAETIFSE-LQQEMEKARQFMSSFEQLLSHGPIA--	62	
<i>A. sinensis</i>	MMQSLASETHFSTGSSQRFLDQPRMRLWPLSRHEMKFDFEFKDFMRRRTNSMDKVQDFVSRFHEDFSDDFMETIMHGPVLSR		83	
<i>D. rerio</i>	---MLCPSTFQPHLSPFMDFHWPVRSWLPETR--	PLFFQFEQEMMR-HMQEMRHNMEFMERLHQRIFDEIDHVS-----	68	
<i>T. ovatus</i>	---MLCSHGFSQALSP-VSFYWPVRSWLPPEVK--	PLLYQ-QHLLQR-NLQELCSSLELMDKLLQHNILEAKPFR-----	66	
*****ACD				
<i>X. laevis</i>	QSRE-SEGTSPTNSGKDGKDFELTLNVRD	SPHELT	TVTKQRRVIVTGKHERKSDTEDGNYFHEYREWKEAREALPESVNPEQV	156
<i>A. mississippiensis</i>	VAQAGVTEQEPEFGGRQDKFELRMDVAGFS	PEELTVRQEGRKVTVTGRREKQSPGEDGGSFQEYLELHREMLLPTGLDVEAV		138
<i>S. vulgaris</i>	---EKAPSTMTLTQSGDGFSVCQDVKNFAPEQLSVKVVGRKVVVLVGQKETQNVDEKGSFSYKYEVLRKREWDVPEEVDAAEL			142
<i>G. gallus</i>	---EQAPSSSAAPAGSGEGFSVCQDVKNFAPEQLSVKVVGRKVVVLVGQKETQNTDEKGSFSYKYEVLRKREWDVPEEVDAAEL			142
<i>A. sinensis</i>	VAEPSTVSVIKVRELDPKDKFELALDVRD	FSLEDLTVKL	VGRKLVITGVKQGQKTS-----KEFTKEIDLPRHTNLPEL	157
<i>D. rerio</i>	-PMTTFKPISFQLGKEGS-HYALTLDTQDFS	PEELAVKQVGRKLRVSGKTEKKQDDGKGSYSYRCQEFGRQFEDLPEGVNPESV		149
<i>T. ovatus</i>	-SSVAVQPVSQLEKEGE-HLKLTLDTQGFSP	PEELSVRQVGRKLRVSGKTEKKQEDGKGSYSYRLQEFGRQFEDLPEGLNPEAV		147
-----CTS-----CTE				
<i>X. laevis</i>	<u>VC</u> SLSKNGHLHIQAPRLALPPAPETPIPI	SMDTAPRDAQELPPDAQTSNAEGDQKVD-----	213	
<i>A. mississippiensis</i>	<u>TC</u> SLCSDGQLRIEAPRLALQRAEGKAIPISVQAGEGATQGD	TAKEKEKELGREEESSGSQET---	199	
<i>S. vulgaris</i>	<u>TC</u> SLSKDGQLRIEAPKALPAAPERNVPIQVSPAAPQTGP	ASEDGATNKAQA-----	194	
<i>G. gallus</i>	<u>TC</u> SPVPGGSCASRP-----PGWPCRLLLRGVCP	PSR-----	172	
<i>A. sinensis</i>	<u>TC</u> SLTTDGLLKIEAPPLKQPEAAERTVPIRFR	TSNLNVPVSN	SQKKGEDSAEKAA-----	211
<i>D. rerio</i>	<u>SC</u> SLN-NGQLQIQAPREGNTVSNERNVITYTPAVKNPALQ	NSEPENQAVEA	EAEN-----	205
<i>T. ovatus</i>	<u>TC</u> CLAPDGKLIHQAAAPCAEEARELTIKRSLEETQQSVCS	HTEGSSSTETD	NSQTQHEPEHMH	211

注:ACD 用单下划线标示,CTE 以双下划线标示,NTS 用重叠的阴影星号标示,CTS 用上虚线标示,CTS 中 IXI 基序与二聚体/低聚物的形成有关,用粗体标示。ACD 中的丝氨酸是一个潜在的 MAPKAPK-2 磷酸化位点,以黑体显示并带有阴影

Note:The underlined amino acids indicated the α -crystallin domains (ACD),while the C-terminal extension (CTE) was shown in bold with a double underline.The N-terminal sequence (NTS) had overlying shaded asterisks while the cterminal sequence (CTS) had overlying shaded hyphens.The IXI motif shown in bold in the CTS was involved in dimer/oligomer formation.The serine in the ACD was a potential MAPKAPK-2 phosphorylation site, which was shown in bold with shading

图4 卵形鲳鲹与其他物种 HSP30 氨基酸多重序列比对
Fig.4 Multiple alignments of HSP30 amino acid sequences of *T.ovatus* and other species

结构域可能以底物特异性方式参与靶蛋白结合^[20]。小分子热休克蛋白基因的 ACD 中的丝氨酸是潜在的 MAPKAPK-2 磷酸化位点^[16],在两栖类、爬行类、鱼类中均存在,而在鸟类

2.5 哈维氏弧菌感染后 HSP30 mRNA 的表达分析 应用 qRT-PCR 检测了哈维氏弧菌感染卵形鲳鲹 0、3、6、12、24、48 和 72 h 后 HSP30 mRNA 在卵形鲳鲹肝、脾和肾组织中的表达变化。如图 7 所示,肝、脾和肾组织中 HSP30 mRNA 的表达量分别在 3、3 和 6 h 达到最高,显著高于对照组 ($P<0.01$),然后开始下降,于感染后 48 h 再次上升到较高水平 ($P<0.01$),然后缓慢降低,72 h 仍高于对照组。

3 讨论

该研究成功克隆了卵形鲳鲹 HSP30 基因 cDNA 全序列,发现基因序列中不含内含子,与爪蟾^[4]、美洲牛蛙 (*Rana catesbeiana*)^[17]、中华鲟^[7]、斑马鱼^[10] 的研究结果相一致,而且在许多不同的 HSP 基因中均已存在^[4]。这种不存在内含子的初级转录本不必经过剪接即可产生成熟的 mRNA 进行翻译,使它们能够有效表达小分子热激蛋白,从而保证了小分子热休克蛋白对应激源的快速响应;而在含有内含子的热休克蛋白(如 HSP90)中,由于高温的极端压力可以使剪接机器失活从而抑制了热休克蛋白的表达^[18]。HSP30 蛋白氨基酸序列分析结果表明 HSP30 分子含有保守的 CTS 和 ACD,而 NTS 和 CTE 保守性较差^[19]。HSP30 中的 NTS、ACD 和 CTS

中不存在。在大多数非哺乳动物脊椎动物 CTS 中都存在 I-X-I 基序,与二聚体或更大的寡聚复合物缔合的相邻单体的 ACD 中 $\beta 4$ -和 $\beta 8$ -链之间形成的疏水沟结合^[6]。在青蛙、斑

马鱼和鳄鱼 HSP30 中为 I-P-1,而在中华鲟和棕鸟 HSP30 中为 V-P-I,其中 V 为保守氨基酸取代,而该研究中卵形鲳鲆缺失了此基序。棕鸟 ACD 中丝氨酸磷酸化位点以及卵形

鲳鲆 I-X-I 基序的缺失表明 HSP30 在不同物种间可能具有不同的功能,需要进一步研究加以阐明。

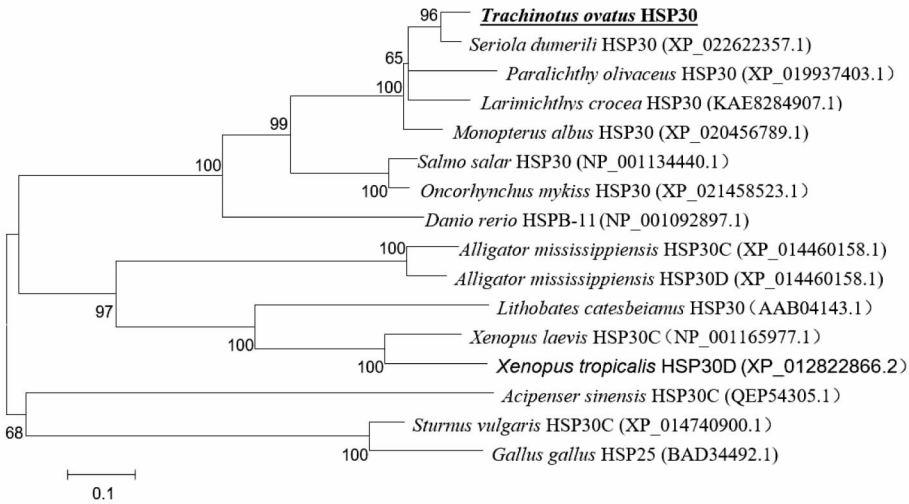
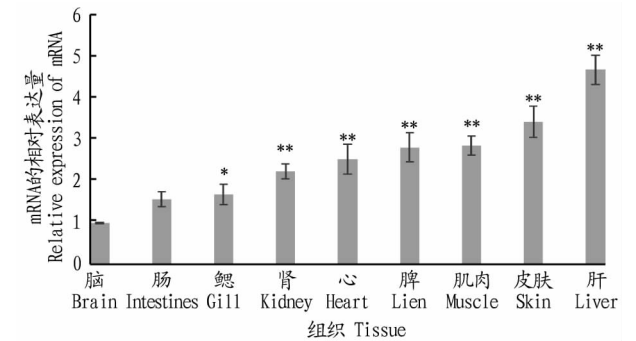


图5 卵形鲳鲆与其他脊椎动物 HSP30 分子系统进化树

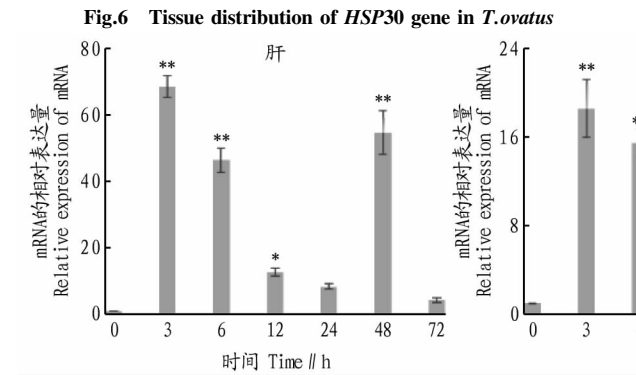
Fig.5 Molecular phylogenetic tree of *T.ovatus* and other vertebrate HSP30



注: * 表示试验组与同期对照组相比差异显著($P<0.05$), ** 表示试验组与同期对照组相比差异极显著($P<0.01$)

Note: * Indicated that the experimental group was significantly different from the control group in the same period ($P<0.05$), ** Indicated that the experimental group was extremely significantly different from the control group in the same period ($P<0.01$)

图6 卵形鲳鲆 HSP30 基因的组织分布

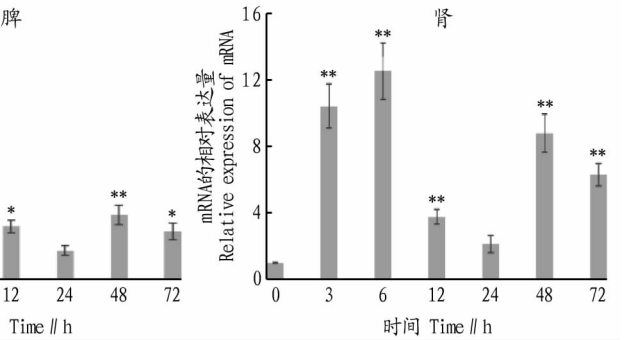


注: * 表示试验组与同期对照组相比差异显著($P<0.05$), ** 表示试验组与同期对照组相比差异极显著($P<0.01$)

Note: * Indicated that the experimental group was significantly different from the control group in the same period ($P<0.05$), ** Indicated that the experimental group was extremely significantly different from the control group in the same period ($P<0.01$)

非洲爪蟾的 HSP30 mRNA 在肾中表达量最高,在肝、肠和肺组织中表达量较低^[21]。中华鲟 HSP30 基因在皮肤中的表达水平明显高于其他组织^[7],卵形鲳鲆中各组织均有不同程度的表达,肝组织中表达量最高,表明 HSP30 基因在不同物种中组织表达分布存在差异。

当机体受到环境中各种物理、化学和生物等因素刺激时产生应激反馈,mRNA 转录合成热休克蛋白,帮助机体应对外界刺激对机体的伤害^[4]。据报道,虹鳟从 10 ℃ 转移到 25 ℃ 水环境中并保持 3 h,发现 HSP30 mRNA 有不同程度的上调表达^[8]。另外,大西洋鲑鱼(*Salmo salar*)从 15 ℃ 转移到 26 ℃ 水环境 30 min 后鳃组织可检测到 HSP30 mRNA 的积累^[11]。此外,研究发现细菌和病毒感染会增加鱼 HSP30 mRNA 的表达。斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)感染柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)后,鳃组织中的 HSP30 mRNA 表达量升高^[22]。最近,有研究表明,神经坏死病毒(NNV)感染尖吻鲈上皮细胞后,HSP30 mRNA 的相对表达量增加了



注: * 表示试验组与同期对照组相比差异显著($P<0.05$), ** 表示试验组与同期对照组相比差异极显著($P<0.01$)

Note: * Indicated that the experimental group was significantly different from the control group in the same period ($P<0.05$), ** Indicated that the experimental group was extremely significantly different from the control group in the same period ($P<0.01$)

图7 哈维弧菌感染后 HSP30 mRNA 在卵形鲳鲆组织中的表达水平

Fig.7 Expression profiles of HSP30 mRNA in tissues of *T.ovatus* after infection with *V.harveyi*

1 000 倍以上^[15]。该研究中,在感染的最初几个小时内肝脏、肾脏和脾脏中的 *HSP30*mRNA 上调表达,随后恢复到基础表达水平,2 d 后表达量再次升高,与嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染了露斯塔野鲮(*Labeo rohita*)的研究结果较为相似^[23]。究其原因,可能是在细菌或病毒感染期间,未折叠的细菌、病毒或宿主蛋白可能会增加,这可能会触发 HSF1 途径,导致 *HSP30* 和其他应激诱导的 HSP 积累^[4],仍需要更多的研究加以证实。

参考文献

- [1] ZININGA T, RAMATSUI L, SHONHAI A. Heat shock proteins as immunomodulators[J]. *Molecules*, 2018, 23(11): 2846–2863.
- [2] BOLHASSANI A, AGI E. Heat shock proteins in infection[J]. *Clinica chimica acta*, 2019, 498: 90–100.
- [3] DAS J K, XIONG X F, REN X C, et al. Heat shock proteins in cancer immunotherapy[J]. *Journal of oncology*, 2019, 2019: 1–9.
- [4] HEIKKILÄ J J. The expression and function of hsp30-like small heat shock protein genes in amphibians, birds, fish, and reptiles[J]. *Comparative biochemistry and physiology. Part A: Molecular & integrative physiology*, 2017, 203: 179–192.
- [5] KRONE P H, SNOW A, ALI A, et al. Comparison of regulatory and structural regions of the *Xenopus laevis* small heat-shock protein-encoding gene family[J]. *Gene*, 1992, 110(2): 159–166.
- [6] KATOH Y, FUJIMOTO M, NAKAMURA K, et al. Hsp25, a member of the Hsp30 family, promotes inclusion formation in response to stress[J]. *FEBS Letters*, 2004, 565(1/2/3): 28–32.
- [7] 司凯歌, 江南, 张海耿, 等. 中华鲟热休克蛋白 *hsp30* 基因 cDNA 的克隆及其在高温胁迫下的表达分析[J]. *淡水渔业*, 2019, 49(6): 20–26.
- [8] CURRIE S, MOYES C D, TUFIS B L. The effects of heat shock and acclimation temperature on hsp70 and hsp30 mRNA expression in rainbow trout: *in vivo* and *in vitro* comparisons[J]. *Journal of fish biology*, 2000, 56(2): 398–408.
- [9] KONDO H, HARANO R, NAKAYA M, et al. Characterization of goldfish heat shock protein-30 induced upon severe heat shock in cultured cells[J]. *Cell stress & chaperones*, 2004, 9(4): 350–358.
- [10] ELICKER K S, HUTSON L D. Genome-wide analysis and expression profiling of the small heat shock proteins in zebrafish[J]. *Gene*, 2007, 403(1/2): 60–69.
- [11] ZARATE J, BRADLEY T M. Heat shock proteins are not sensitive indicators of hatchery stress in salmon[J]. *Aquaculture*, 2003, 223(1/2/3/4): 175–187.
- [12] TOMALTY K M H, MEEK M H, STEPHENS M R, et al. Transcriptional response to acute thermal exposure in juvenile chinook salmon determined by RNAseq[J]. *Genes | Genomes | Genetics*, 2015, 5(7): 1335–1349.
- [13] CAI X H, PENG Y H, WANG Z C, et al. Characterization and identification of streptococci from golden pompano in China[J]. *Diseases of aquatic organisms*, 2016, 119(3): 207–217.
- [14] 蔡小辉, 文雪, 徐力文, 等. 卵形鲳鲹一例疑似神经性病毒病的初步分析[J]. *水产科学*, 2012, 31(10): 597–601.
- [15] LIU P, WANG L, KWANG J, et al. Transcriptome analysis of genes responding to NNV infection in Asian seabass epithelial cells[J]. *Fish & shellfish immunology*, 2016, 54: 342–352.
- [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.
- [17] HELBING C, GALLIMORE C, ATKINSON B G. Characterization of a *Rana catesbeiana* hsp30 gene and its expression in the liver of this amphibian during both spontaneous and thyroid hormone-induced metamorphosis[J]. *Developmental genetics*, 1996, 18(3): 223–233.
- [18] 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.
- [19] FERNANDO P, HEIKKILÄ J J. Functional characterization of *Xenopus* small heat shock protein, Hsp30C: The carboxyl end is required for stability and chaperone activity[J]. *Cell stress & chaperones*, 2000, 5(2): 148–159.
- [20] TREWEEK T M, MEEHAN S, ECROYD H, et al. Small heat-shock proteins: Important players in regulating cellular proteostasis[J]. *Cellular and molecular life sciences*, 2015, 72(3): 429–451.
- [21] HASLBECK M, VIERLING E. A first line of stress defense: Small heat shock proteins and their function in protein homeostasis[J]. *Journal of molecular biology*, 2015, 427(7): 1537–1548.
- [22] XIE Y J, SONG L, WENG Z H, et al. Hsp90, Hsp60 and sHsp families of heat shock protein genes in channel catfish and their expression after bacterial infections[J]. *Fish & shellfish immunology*, 2015, 44(2): 642–651.
- [23] DAS S, MOHAPATRA A, SAHOO P K. Expression analysis of heat shock protein genes during *Aeromonas hydrophila* infection in rohu, *Labeo rohita*, with special reference to molecular characterization of Grp78[J]. *Cell stress & chaperones*, 2015, 20(1): 73–84.

(上接第 74 页)

义;草食性动物的股骨与食肉动物的股骨存在着明显的差别,可用于分类和鉴别;股骨的形态特征与动物活动方式存在一定的关系,如大转子的位置、股骨颈、股骨下端宽高比等。

参考文献

- [1] 苏亚. 太行山猕猴肢骨形态学研究[D]. 北京: 中国地质大学(北京), 2012.
- [2] 潘汝亮, 王红, JABLONSKI N G. 金丝猴长骨的异速生长研究[J]. *动物学研究*, 1989, 10(1): 23–30.
- [3] 彭一良, 李艳杰. 浅析动物骨骼的起源及其在生物进化上的意义[J]. *黑龙江农垦师专学报*, 2002(2): 85–87.
- [4] 杨奇森, 夏霖, 马勇, 等. 兽类头骨测量标准: 基本量度[J]. *动物学杂志*, 2005, 40(3): 50–56.
- [5] 杨奇森, 夏霖, 冯祚建, 等. 兽类头骨测量标准 V: 食虫目、翼手目[J]. *动物学杂志*, 2007, 42(2): 56–62.
- [6] 夏霖, 杨奇森, 冯祚建, 等. 兽类头骨测量标准 II: 奇蹄目、偶蹄目、食肉目[J]. *动物学杂志*, 2005, 40(6): 67–73.
- [7] 夏霖, 杨奇森, 马勇, 等. 兽类头骨测量标准 III: 啮齿目、兔形目[J]. *动物学杂志*, 2006, 41(5): 68–71.
- [8] 夏霖, 杨奇森, 全国强, 等. 兽类头骨测量标准 IV: 树鼩目、灵长目[J]. *动物学杂志*, 2007, 42(1): 79–83.
- [9] 汪松. 小型兽阴茎骨 (Os penis) 的处置方法[J]. *动物学杂志*, 1963(3): 135–136.
- [10] 刘少英. 应用阴茎骨形态指标划分黑腹绒鼠年龄的研究[J]. *兽类学报*, 1994, 14(4): 281–285.
- [11] 卢慧卿. 虎骨、豹骨、熊骨组织的鉴别研究[J]. *药科学报*, 1982, 17(5): 365–377.
- [12] 赵仁庚, 丁振成. 假虎骨假豹骨的又一经验鉴别方法[J]. *中国药学报*, 1988(5): 283.
- [13] 黄可佳. 哈尔滨阎家岗遗址动物骨骼圈状堆积的初步研究[J]. *考古学报*, 2008(1): 1–14.
- [14] 朱诚, 马春梅, 李中轩, 等. 重庆忠县中坝遗址出土的动物骨骼揭示的动物多样性及环境变化特征[J]. *科学通报*, 2008, 53(S1): 66–76.
- [15] 格罗莫娃 B. 哺乳动物大型管状骨检索表[M]. 刘后贻, 译. 北京: 科学出版社, 1960.
- [16] CHRISTIANSEN P. Scaling of mammalian long bones: Small and large mammals compared[J]. *Journal of zoology*, 1999, 247(3): 333–348.
- [17] 周牧萱. 动物考古研究的科学化——读《考古遗址出土动物骨骼测量指南》[J]. *华夏考古*, 2009(4): 132–135.
- [18] 安格拉·冯登德里施. 考古遗址出土动物骨骼测量指南[M]. 马萧林, 侯彦峰, 译. 北京: 科学出版社, 2007.
- [19] 伊丽莎白·施密德. 动物骨骼图谱[M]. 李天元, 译. 武汉: 中国地质大学出版社, 1992.