

# 杂交鲟和匙吻鲟

# 克隆与序列分析

高宇 袁改玲\* \* 李大鹏 陈昌福

华中农业大学水产学院, 武汉 430070

**摘要** 采用 RT-PCR 法从杂交鲟 (*Huso huso* × *Acipenser schrencki*) 和匙吻鲟 (*Polyodon spathula*) 肝脏 RNA 克隆获得 HSP70 基因的全长 cDNA (HSP70 cDNA)。所测定的 HSP70 cDNA 序列与 NCBI/GenBank 上登载的鲫 (GenBank No. DQ872648) 同源性最高, 杂交鲟和匙吻鲟分别达 96% 和 98%, 杂交鲟 HSP70 序列为 382 bp, 匙吻鲟为 334 bp。将杂交鲟和匙吻鲟与其它脊椎动物 HSP70 氨基酸序列用 DNASTAR 软件进行相似性比较, 鱼类与哺乳动物、两栖类非洲爪蟾之间 HSP70 氨基酸序列相似性平均值分别为 86.2% 和 86.8%。鱼类之间的氨基酸序列相似性较大, 平均为 93.8%, 表现出较高的保守性。以 HSP70 核苷酸序列为分子标记, 用 MEGA4 软件中最大简约法 (MP) 构建了 12 个物种 HSP70 系统发育树, 识别出 3 个大的单系类群: 杂交鲟、匙吻鲟、团头鲂、鲫、鲤、斑马鱼聚为类群一 (bootstrap 96); 虹鳟和大西洋鲑聚为类群二 (bootstrap 100); 人类和褐家鼠类聚为类群三 (bootstrap 89)。

**关键词** 热应激蛋白 HSP70; 杂交鲟; 匙吻鲟; 克隆; 序列分析

**中图分类号** Q 959.46+3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)01-0085-05

热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 又称为应激蛋白, 是生物细胞 (包括原核细胞及真核细胞) 在受热、生物应激、理化因素等应激原刺激后, 发生热休克反应时所产生的一类在生物进化中最保守并由热休克基因所编码的伴随细胞蛋白<sup>[1]</sup>。目前已发现在环境胁迫因子 (如高温、重金属和微生物感染等) 的刺激下, 其表达量显著增加<sup>[2]</sup>。由于 HSP 在进化过程中的高度保守性, 作为一种有效的分子标记, 不少学者通过 HSP 序列分析研究分子流行病和系统进化之间的关系。热休克蛋白根据其同源性及分子质量大小可分为 3 个主要家族: HSP90 (85 ~ 90 ku)、HSP70 (68 ~ 73 ku) 和小分子质量热休克蛋白<sup>[3]</sup>。其中以 HSP70 最为保守, 研究的也最广泛<sup>[4]</sup>。

杂交鲟 (hybrid sturgeon) 和匙吻鲟 (*Polyodon spathula*) 是大型的经济鱼类, 其适应性强、生长迅速<sup>[5]</sup>。但是, 近年来鲟的病害频频发生, 严重威胁了鲟养殖业的发展。本研究中, 笔者选择 HSPs 家族中 HSP70 基因, 以杂交鲟、匙吻鲟为研究材料, 采用

RT-PCR 方法从其肝脏总 RNA 中克隆热休克蛋白 HSP70 cDNA 序列, 推导其编码的氨基酸序列。通过查阅 NCBI/GenBank 中已登录的其它动物的 HSP70 氨基酸序列, 比较分析不同物种的 HSP70 氨基酸序列特征, 以期为鲟机体抗逆、应激反应的深入研究提供依据。

## 材料与方法

### 供试鱼

供试鱼为人工杂交培育的杂交鲟 (*Huso huso* × *Acipenser schrencki*), 由中国水产科学研究院长江水产研究所提供; 匙吻鲟 (*Polyodon spathula*) 取自湖北省麻城市浮桥水库。

### 试剂

T<sub>4</sub> DNA 连接酶、EcoR、TRIZOL、pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自 Axygen Biosciences 公司; X-gal、IPTG、DNA Marker DL2000、RT-PCR、PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司 (大连); TOP10 感受态细胞购自北京

收稿日期: 2009-06-08; 修回日期: 2009-12-28

\* 国家自然科学基金项目 (30970529) 和家畜疫病病原生物学国家重点实验室 (中国农业科学院兰州兽医研究所) 开放课题资助

\* \* 通讯作者。E-mail: yuangailing@mail.hzau.edu.cn

高宇, 男, 1985年生, 硕士研究生。研究方向: 水生动物免疫与疾病。E-mail: gaoyu\_8848@webmail.hzau.edu.cn

优博奥生物科技有限公司;胰化蛋白胨(bacto-tryptone)、酵母提取物(bacto-yeast extract)购自 OX-ROID 公司。

### 法提取总

试验用的玻璃器皿经 150 ℃ 烘烤 4 h。塑料器皿经 0.1% DEPC(diethylpyrocarbonate, 焦碳酸二乙酯)水浸泡过夜,双蒸水冲洗,高温高压灭菌后 37 ℃ 烘干。金属用具经 1 mol/L 的 NaOH 浸泡 2 h,经 0.01% 的 DEPC 水彻底冲洗后,37 ℃ 烘干。各试剂用无 RNase 的 0.1% DEPC 处理后的水配置。从活体中取出肝脏组织,迅速置于液氮生物容器中,取出后加入 1 mL TRIzol 试剂,用匀浆器冰上研磨,具体抽提步骤按 TRIzol Reagent 说明书进行。

### 引物设计

根据已发表和登录在 NCBI/GenBank 中热休克蛋白 HSP70 基因的保守性区域,用 Primer 5.0 软件在 cDNA 序列 ORF 的上下游区域,设计 1 对 HSP70 特异引物:

GF:5'-CACGGCTGGA GACACTCA -3';GR:  
5'-CTTCTGGA TCTTTGGGA TT -3

引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 第 1 条链的合成及 PCR 扩增

取 15 μL 的总 RNA 作为模板,采用 TaKaRa PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒中提供的 Oligo dT Primer 和 PrimeScript™ RTase 逆转录酶在 40 μL 体系中合成第 1 条 cDNA 链。以 2 μL cDNA 为模板,采用引物 GF 和 GR 进行 PCR 扩增。扩增体系按照 TaKaRa PCR Amplification Kit 试剂盒中说明书进行。PCR 产物在 5 V/cm 的条件下经 1% 琼脂糖凝胶电泳 30 min,切胶后,按 Axygen Biosciences 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒说明书回收和纯化 PCR 产物。

### 产物克隆与测序

按照说明书操作步骤,将 PCR 产物连接到 Promega 公司的 pGEM-T easy 载体上,然后转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞,在含有 Amp<sup>r</sup>/IPTG/X-Gal 的平板上进行蓝白斑筛选。挑取白斑,扩大培养,经酶切和 PCR 鉴定后,将阳性克隆送往上海生工生物工程技术有限公司测序。

### 序列分析及系统进化树构建

在 GenBank 中查询所有已登录物种的 HSP70 cDNA 序列,用 DNAstar 软件包中的 EditSeq 软件编辑序列,推导 ORF 区所编码的氨基酸序列,并用 Megalign 软件进行氨基酸序列分析。用 Clustal W 法计算序列之间的成对距离,比较序列之间的相似度。同时,以 HSP70 核苷酸序列为分子标记,用 MEGA4 软件中最大简约法(MP)构建 12 个物种 HSP70 系统发育树,用自展法(Bootstrap)进行 1 000 次重复,获得一致系统树,并用一致性指数(consistency index, CI)来衡量分析结果的可靠性。

## 结果与分析

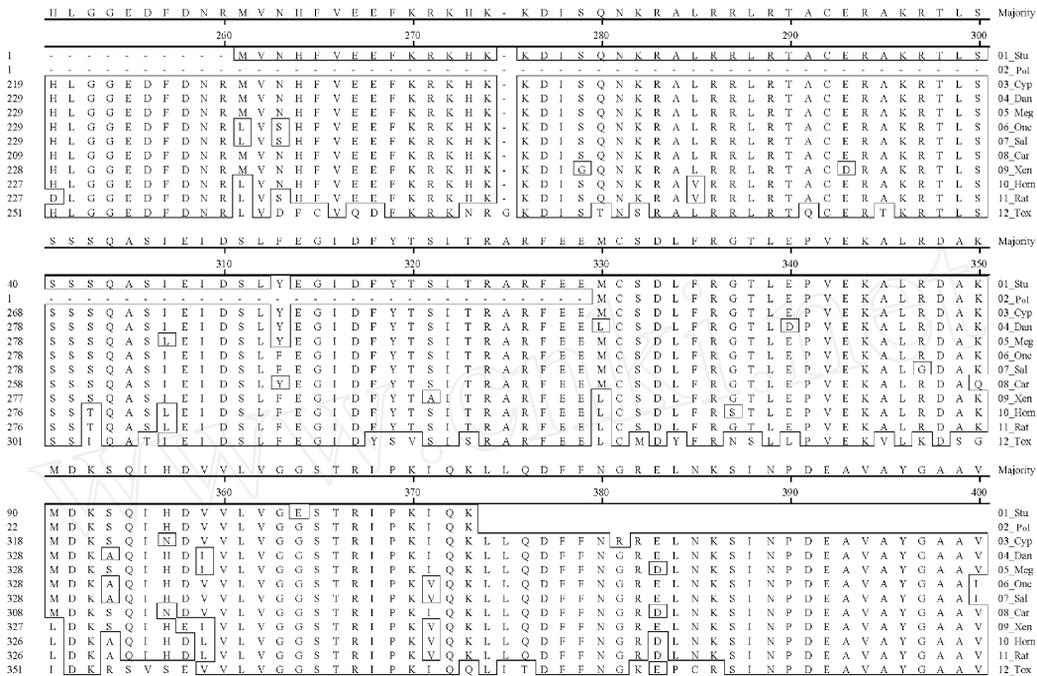
### 基因核酸及其编码氨基酸序列的比较

通过 DNA marker 估计,PCR 扩增的产物约为 350 bp。产物测序后,杂交鲟 HSP70 序列为 382 bp,匙吻鲟为 334 bp。其中已将匙吻鲟 HSP70 序列提交至 NCBI/GenBank,登录号为 GQ244412。通过 NCBI 中 BLAST 查找 GenBank 中已登录的同源序列,结果显示试验获得的序列与 HSP70 cDNA 序列之间具有很高的同源性,其中与鲫(GenBank No. DQ872648)同源性最高,杂交鲟和匙吻鲟分别达 96% 和 98%(图 1)。

用 Megalign 软件,通过 Clustal W 方法比较的不同物种之间氨基酸序列相似度见图 2。可以看出,不同分类阶元动物之间的 HSP70 氨基酸序列相似度总体较高,虹鳟和大西洋鲑的相似度最高(为 98.3%),匙吻鲟和刚地弓形虫的相似度最低(仅为 61.4%),从而证明了 HSP70 是作为生物进化最保守的成分。本次试验克隆得到的杂交鲟(Stu)和匙吻鲟(Pol)的 HSP70 氨基酸的序列相似度达 97.7%,鱼类与哺乳动物、两栖类非洲爪蟾之间 HSP70 氨基酸序列相似度平均值分别为 86.2% 和 86.8%。鱼类之间的氨基酸序列相似度较大,平均为 93.8%。这一结果与图 3 核苷酸系统发育树是一致的。

### 以核苷酸序列构建系统发育树

12 个物种 HSP70 核苷酸序列对齐后,以核苷酸序列为分子标记,用 MEGA4 软件包中的最大简约法(MP)构建了 12 个物种 HSP70 系统发育树(图 3),其中以刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)



Stu:杂交鲟 Hybrid sturgeon; Pol:匙吻鲟 *Polyodon spathula*, ACS70960; Cyp:鲤 *Cyprinus carpio*, AAM81603; Dan:斑马鱼 *Danio rerio*, AAF70445; Meg:团头鲂 *Megalobrama amblycephala*, ACG63706; Onc:虹鳟 *Oncorhynchus mykiss*, BAD83574; Sal:大西洋鲑 *Salmo salar*, ACI34374; Car:鲫 *Carassius auratus*, BAC67184; Xen:非洲爪蟾 *Xenopus laevis*, NP\_001121147; Hom:人类 *Homo sapiens*, ABD48956; Rat:褐家鼠 *Rattus norvegicus*, AAA17441; Tox:刚地弓形虫 *Toxoplasma gondii*, BAB20284.

图 1 12 个物种 HSP70 氨基酸序列比较

Fig. 1 The alignment of HSP70 amino acid sequence for 12 species

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	97.7	98.2	95.5	97.3	94.6	93.8	97.3	91.1	89.3	89.3	67.0	1	01_Stu
2	2.3	97.7	90.9	97.7	95.5	93.2	95.5	88.6	86.4	88.6	61.4	2	02_Pol
3	1.8	2.3	93.6	94.6	89.3	89.5	95.9	85.4	85.1	85.1	72.5	3	03_Cyp
4	4.6	9.7	6.7	93.6	89.3	89.3	93.6	85.4	84.8	84.7	71.2	4	04_Dan
5	2.7	2.3	5.6	6.7	91.1	91.4	95.5	86.5	86.1	86.2	71.1	5	05_Meg
6	5.6	4.7	11.6	11.6	9.5	98.3	89.7	85.8	85.0	85.0	70.2	6	06_Onc
7	6.5	7.2	11.4	11.6	9.1	1.7	89.9	85.9	85.2	85.5	70.7	7	07_Sal
8	2.7	4.7	4.2	6.7	4.6	11.1	10.9	86.0	86.6	86.2	72.7	8	08_Car
9	9.5	12.4	16.3	16.2	14.9	15.8	15.6	15.6	85.3	85.2	70.7	9	09_Xen
10	11.6	15.1	16.7	17.0	15.5	16.8	16.6	14.8	16.4	96.4	73.5	10	10_Hom
11	11.6	12.4	16.7	17.2	15.3	16.8	16.2	15.4	16.6	3.7	72.4	11	11_Rat
12	43.4	53.8	34.2	36.3	36.5	38.0	37.2	33.9	37.2	32.8	34.4	12	12_Tox
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

相似度 Percent identity/%

图中物种缩写同图 1。The same abbreviations of species in Fig. 1.

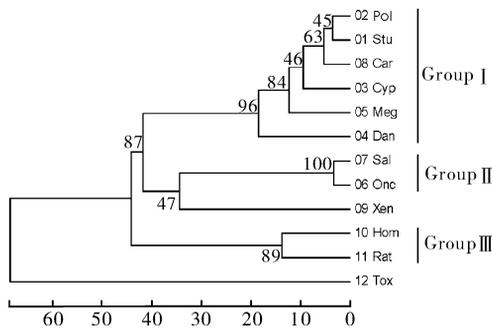
图 2 依据氨基酸序列采用 Clustal W 方法计算的 12 个物种 HSP70 相似度

Fig. 2 Amino acid sequence identity of HSP70 from 12 species, using Clustal W method

为外群,我们可以识别出 3 个单系类群:杂交鲟、匙吻鲟、团头鲂、鲫、鲤、斑马鱼聚类为类群一 (bootstrap 96);虹鳟和大西洋鲑聚类为类群二 (bootstrap 100);人类和褐家鼠类聚类为类群三 (bootstrap 89)。

### 讨论

目前鲟科鱼类的养殖主要以集约化工厂化养殖为主,而且我国是世界上主要的鲟养殖国,随着人工养殖密度的增大,养殖环境中高温、盐度、pH、重金



Stu:杂交鲟 Hybrid sturgeon; Pol:匙吻鲟 *Polyodon spathula*, GQ244412; Cyp:鲤 *Cyprinus carpio*, AY120894; Dan:斑马鱼 *Danio rerio*, AF210640; Meg:团头鲂 *Megalobrama amblycephala*, EU884290; Onc:虹鳟 *Oncorhynchus mykiss*, AB176854; Sal:大西洋鲑 *Salmo salar*, BT046112; Car:鲫 *Carassius auratus*, AB092839; Xen:非洲爪蟾 *Xenopus laevis*, NM\_001127675; Hom:人类 *Homo sapiens*, DQ388429; Rat:褐家鼠 *Rattus norvegicus*, L16764; Tox:刚地弓形虫 *Toxoplasma gondii*, AB019539.

图 3 用最大简约法(MP)构建的 12 个物种 HSP70 核苷酸序列系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on HSP70 nucleotide sequences using MP method

属污染、细菌感染等可作为各种应激反应的胁迫因子<sup>[6-10]</sup>。而目前研究普遍认为热休克蛋白与生物的胁迫有着极为密切的联系<sup>[11-14]</sup>。Cruz 等人的研究表明多环芳香烃等化学药物和污染水域的沉积物能够诱导美洲牡蛎 (*Crassostrea virginica*) 大量表达 HSP70, 从而表明 HSP70 参与机体对不良环境的抵御, 维持防御系统的稳定<sup>[15]</sup>。Kilemade 等认为, 热休克蛋白 70 的表达量直接与水生环境中毒素的含量有明显的关系, 可以将水生生物体内 HSP70 的表达量作为水生环境毒性的指标<sup>[16]</sup>。

本研究从杂交鲟和匙吻鲟抗逆、抗病相关因子入手, 选取与生物机体抗逆密切相关的热休克蛋白 70 进行分离与克隆。根据氨基酸序列比对结果、氨基酸序列相似度分析, 建立核苷酸系统发育树, 可以确定获得了热休克蛋白 70 家族成员的 cDNA 序列。从 GenBank 查找已登录的其它物种 HSP70 序列, 获得了人、鼠(哺乳类)、鲫、鲤、团头鲂、斑马鱼、虹鳟、大西洋鲑(鱼类)、两栖类的非洲爪蟾以及刚地弓形虫的 HSP70 cDNA 及氨基酸序列信息(GenBank 登录号见图 1), 用 Megalign 软件将已知的 HSP70 氨基酸序列对齐(图 1)。哺乳类 ORF 区均是 1 926 bp, 编码 641 个氨基酸。非洲爪蟾的 ORF 区是 1 941 bp, 编码 647 个氨基酸。鱼类和哺乳类

氨基酸序列最显著的差异是第 285 位、303 位和 351 位分别由 V(缬氨酸)、T(苏氨酸)和 L(亮氨酸)代替鱼类和两栖类的 L(亮氨酸)、S(丝氨酸)和 M(甲硫氨酸)氨基酸残基。非洲爪蟾第 279、293、321、358 位分别为 G、D、A 和 E(甘氨酸、天冬氨酸、丙氨酸和谷氨酸)氨基酸残基。杂交鲟在第 364 位由 E(谷氨酸)代替了其他物种的 G(甘氨酸)氨基酸残基, 鲤、鲫在第 357 位均为酸性 N(天冬酰胺), 除刚地弓形虫是 S(丝氨酸)外, 其他物种为碱性 H(组氨酸)氨基酸残基。氨基酸多序列比对的结果表明, 杂交鲟和匙吻鲟 HSP70 与其他物种的 HSP70 具有很高的同源性。系统发育树的结果表明, 杂交鲟和匙吻鲟 HSP70 序列与鲫的亲缘关系最近。由此说明我们获得的 cDNA 序列有可能是 HSP70 进化过程中最保守的一段。这对于进一步克隆和研究鲟科鱼类其它 HSP 基因具有重要的价值, 也为深入研究鲟科鱼类 HSP 基因的组织差异、诱导差异表达机制等奠定基础。

## 参 考 文 献

- [1] 钟文英, 普雄明. 热休克蛋白的分子生物学研究进展[J]. 医学综述, 2005, 11(2): 148-150.
- [2] KIANG J G, TSO KOS G C. Heat shock protein 70 kD molecular biology, biochemistry and physiology[J]. Pharmacology and Therapeutics, 1998, 80: 183-201.
- [3] BASU N, TODGHAMA A E, ACKERMAN P A. Heat shock protein genes and their functional significance in fish[J]. Gene, 2002, 295: 173-183.
- [4] 祝璟琳, 王国良. 鱼类 HSP70 研究进展[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2007, 20(4): 446-450.
- [5] 朱爱民, 梁银钪, 黄道明, 等. 匙吻鲟仔稚鱼摄食特性研究[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(6): 755-758.
- [6] 董云伟, 董双林, 纪婷婷. 水生动物热休克蛋白研究进展[J]. 中国海洋大学学报, 2008, 38(1): 39-44.
- [7] 关海红, 潘伟志, 蔺玉华, 等. 4 种重金属对松浦鲤生长及组织的影响[J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(1): 68-73.
- [8] FORSYTH R B, CANDIDO P M. Stress protein expression in coho salmon with bacterial kidney disease [J]. Aquatic Animal Health, 1997, 9: 18-25.
- [9] 万文菊, 王纪亭, 石存斌, 等. 溶藻弧菌感染对剑尾鱼 HSP70 基因表达的影响[J]. 大连水产学院学报, 2007, 22(5): 330-334.
- [10] 聂芬, 李大鹏, 石小涛, 等. 拥挤胁迫对史氏鲟溶菌酶及补体水平的影响[J]. 水生生物学报, 2006, 31(4): 581-584.
- [11] KAUFMANN S H E. Heat shock proteins and the immune response[J]. Immunol Today, 1990, 11(4): 129.
- [12] MOSSER D D, CARON A W, BOURGET L, et al. Role of hu-

- man heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1997, 17(9):5317-5327.
- [13] WHEELER D S, WONG H R. The heat shock response and acute lung injury[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2007, 42(1):1-14.
- [14] LINDQUIST S, CRAIG E A. The heat-shock proteins[J]. *Annual Review of Genetics*, 1988, 22:631-677.
- [15] CRUZ-RODRIGUEZ L A, CHU F L. Heat-shock protein (HSP70) response in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to PAHs sorbed to suspended artificial clay particles and to suspended field contaminated sediments[J]. *Aquatic Toxicology*, 2002, 30; 60(3/4):157-168.
- [16] KILEMADE M, MOTHERSILL C. Heat shock protein 70 levels in rainbow trout primary epidermal cultures in response to 2, 4-dichloroaniline exposure: a novel *in vitro* aquatic toxicity marker[J]. *Environmental Toxicology*, 2001, 16(3):253-259.

## Cloning and Sequence Analysis of HSP70 cDNA from Hybrid Sturgeon and Paddle Fish ( *Polyodon spathula* )

GAO Yu YUAN Gai-ling LI Da-peng CHEN Chang-fu

*College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

**Abstract** The heat shock protein 70 (HSP70) complete cDNAs were cloned from hybrid sturgeon ( *Huso huso* × *Acipenser schrencki* ) and *Polyodon spathula*. The results of the hybrid sturgeon and *Polyodon spathula* 's sequence showed that this nucleotide sequence of HSP70 gene has 96 % and 98 % identity with the *Carassius auratus* (GenBank No. DQ872648.1) sequence published by NCBI/ GenBank. The full length cDNA (HSP70 cDNA) from hybrid sturgeon and *Polyodon spathula* were 382 bp and 334 bp long, respectively. Compared with other vertebrates ' amino acid sequence of HSP70 by DNASTAR software, the sequence similarity was 86.2 % between fish and mammals, and 86.8 % between fish and amphibian, respectively. The sequence similarity was high among different fish species, and the average value was 93.8 %, which shows a higher conservatism. Phylogenetic tree was constructed for 12 species based on HSP70 amino acid sequences using MP (maximum parsimony) method. Three major clusters were recognized: cluster one consisted of hybrid sturgeon, *Polyodon spathula*, *Megalobrama amblycephala*, *Carassius auratus*, *Cyprinus carpio* and *Danio rerio* (bootstrap 96); cluster two consisted of *Oncorhynchus mykiss* and *Salmo salar* (bootstrap 100); and cluster three consisted of *Homo sapiens* and *Rattus norvegicus* (bootstrap 89).

**Key words** heat shock protein 70; hybrid sturgeon; *Polyodon spathula*; clones; sequence analysis

(责任编辑:边书京)