

温度和病原菌感染对大黄鱼热激蛋白90基因表达的影响

林天势 薛良义* 孙爱飞 朱艺峰

(宁波大学海洋学院, 宁波 315211)

摘要 热激蛋白(heat shock protein, HSP)是进化上非常保守的蛋白质家族之一, 普遍存在于各种生物体中, 在多种生理活动中起到重要作用。该实验克隆了大黄鱼HSP90基因, 并分析了温度和病原菌感染对其表达的影响。克隆到的大黄鱼HSP90序列长3 930 nt, 含4个外显子和3个内含子, 其中编码区2 178 nt, 编码725个氨基酸。同源性分析发现, 大黄鱼HSP90基因序列和其它鱼类的同源性在90%以上。在不同水温下, HSP90基因在不同组织中的表达量变化不同, 心、肠和脑等组织在29 °C时表达量最高, 而肌肉、脾和肝等组织在24 °C时表达量最高。用病原菌感染大黄鱼, 感染48 h后, 鳃、心、脾、肠、肾和脑组织HSP90的表达量明显上升; 发病时(感染7天后), 受检的9种组织中HSP90的表达量都比未感染时明显增加。

关键词 大黄鱼; 热激蛋白90; 温度; 病菌感染; 基因表达

热激蛋白(heat shock protein, HSP)是指细胞在应激原特别是高温环境下诱导生成的一类蛋白质, 广泛分布于生物体内, 是一族高度保守的蛋白分子。HSP参与生物体内多种生理活动过程, 具有作为分子伴侣^[1]、抑制细胞凋亡^[2-3]和提高生物体的耐热性^[4-5]等功能, 可以在逆境中起到保护生物体的作用。此外, 近年的研究表明, HSP90在斑马鱼胚胎骨骼肌纤维的装配过程中起着重要作用^[6]。

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)属于石首鱼科(Sciaenidae)、黄鱼属(*Pseudosciaena*), 主要分布于我国的东海、南海以及黄海南部, 是我国重要的海洋经济鱼类之一^[7-8]。野生大黄鱼由于受到海洋环境破坏的影响, 种群数量锐减, 而养殖大黄鱼繁殖几代之后整体品质变差, 出现性早熟、生长速度减慢、抗逆能力变差、肉质发生变化以及亲本鱼个体减小等现象, 严重影响大黄鱼的经济价值。因此, 有必要加强大黄鱼的相关生物学研究。

鉴于HSP90蛋白复合物在生物体抗病方面也起着重要作用^[9], 我们在得到大黄鱼HSP90 EST序列^[10]基础上, 克隆了大黄鱼HSP90基因, 并分析了不同温度以及病原菌感染对大黄鱼HSP90基因表达的影响, 以期为大黄鱼抗逆能力方面的研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

样品采集: 大黄鱼样品体重为200 g左右, 采自浙江象山宁波海湾水产苗种繁育中心。

实验试剂: Taq DNA聚合酶、pMD18-T Vector试剂盒、PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit、UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒等均购自大连宝生物工程有限公司; Trizol、氯仿、酒精、RNA保存液等DNA和RNA提取试剂均购自上海生工生物工程有限公司; 引物合成及测序由上海英俊生物技术有限公司完成; SMART™ RACE试剂盒购自美国Clontech公司。

1.2 实验方法

1.2.1 大黄鱼HSP90基因序列的克隆 根据大黄鱼肌肉cDNA文库中得到的HSP90 EST序列设计引物R1, 根据斑马鱼(AF068772.1)、舌齿鲈(AY395632.1)、斜带石斑鱼(FJ644278.1)和三刺鱼(BT028559.1)HSP90序列的比对结果设计引物F1(表1), 扩增范围为起始

收稿日期: 2012-01-15 接受日期: 2012-03-28

国家自然科学基金(No.30871916)、浙江省科技厅项目(No.2011C22087)、宁波市科技局项目(No.2011C1105)和宁波大学学科基金(No. XK110092)资助项目

*通讯作者。Tel: 0574-87600165, E-mail: xueliangyi@nbu.edu.cn

表1 大黄鱼HSP90基因克隆和半定量检测相关引物
Table 1 Primers used for cloning and semi-quantitative analysis of HSP90 in *Larimichthys crocea*

引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Sequence
F-1	CAA GAT GCC TGA AGA AAT GCA
R-1	GCG GAT GAC CTT CAG GAT CTT
F-2	CAA GAT GCC TGA AGA AAT GCA
R-2	GCG GAT GAC CTT CAG GAT CTT
F-3	ATC TCC AGA GAA ATG CTG CAG
R-3	ACT TCT TCC ATG CGT GAA GCA
F-4	ACA TCA AGC TGG GAA TCC ACG
R-4	TCA TGA GCT TGC AGA GGC TCT
5Rgsp1	CAA GGT AGG CGG AGT AGA AAC CCA CAC
5Rgsp2	TGA GGG TCA GGG TGC GGT CAT CTT TG
β -actin-F	CCA GAT CAT GTT CGA GAC CTT C
β -actin-R	GAA CCT CTC ATT GCC AAT GGT G

密码子到3'非编码区。以肌肉组织cDNA为模板, 反应程序系为: 预变性94 °C, 3 min; 变性94 °C, 30 s; 退火54 °C, 30 s; 延伸72 °C 1 min, 循环32次; 最后延伸72 °C, 5 min; 4 °C保存。琼脂糖凝胶电泳检测后将PCR产物割胶回收, 与pMD-18T Vector连接, 转化到DH5 α 感受态细胞中, 再在Amp⁺的LB琼脂平板上培养, 挑取阳性克隆测序。

在得到HSP90 cDNA序列后, 设计两对引物F-2与R-2和F-3与R-3, 以大黄鱼基因组DNA为模板, 克隆该基因的内含子, 反应程序为: 预变性94 °C, 3 min; 变性94 °C, 30 s; 退火52 °C, 1 min; 延伸72 °C, 2 min, 循环34次。最后延伸72 °C, 10 min; 4 °C保存。PCR产物回收、质粒连接、转化等克隆步骤同cDNA序列克隆, 再将以DNA为模板获得的大黄鱼HSP90基因序列与cDNA序列进行比对。

1.2.2 5'非编码区序列的克隆 根据已获得的cDNA核心序列设计两条基因特异性引物5Rgsp1和5Rgsp2。以5'-RACE-Ready cDNA为模板, 用试剂盒自带引物UPM和NUP分别与5Rgsp1和5Rgsp2进行两轮PCR扩增反应。5'-RACE-Ready cDNA的合成、PCR反应体系及操作均按SMARTTM RACE试剂盒说明书进行, PCR产物的回收、克隆和测序等步骤同上。

1.2.3 组织特异性表达 用Trizol法提取大黄鱼肝、肠、肾、心、脾、鳃、脑、眼、肌肉等9种组织的总RNA, 用PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒合成cDNA第一链。根据得到的大黄鱼HSP90基因序列, 跨内含子设计一对引物F-4和R-4进行半定量检测, 反应程序为: 预变性94 °C, 3 min;

变性94 °C, 30 s; 退火58 °C, 30 s; 延伸72 °C, 1 min, 循环32次。最后延伸72 °C, 5 min; 4 °C保存。同时以 β -actin作为内参, 设计一对引物 β -actin-F和 β -actin-R, 程序同上。

温度对大黄鱼HSP90基因表达的影响: 在3个体积为1 m³的水池中, 每个水池放养大黄鱼5尾, 水温分别为19 °C、24 °C和29 °C。48 h后, 分别取大黄鱼肠、肝、肾、脾、心、鳃、脑、眼和肌肉9种组织, 提取总RNA及检测组织特异性表达。

病原菌对大黄鱼HSP90基因表达的影响: 在3个水温为19 °C、体积为1 m³的水池中, 每个水池放养大黄鱼5尾, 1号池为对照, 2和3号的大黄鱼每尾腹腔注射0.4 mL浓度为1 $\times$ 10⁷ cfu/mL的恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*), 充气, 隔天换水, 换水量为1/3。在注射后48 h、7 d(已患白色结节病)分别取大黄鱼肠、肝、肾、脾、心、鳃、脑、眼和肌肉9种组织, 提取总RNA及检测组织特异性表达。

生物信息学分析: 使用NCBI数据库中Blast程序对序列进行比对分析, 用BioXM 2.6进行蛋白质分子量和等电点预测, 用ScanProsite在线工具(www.expasy.ch/prosite)进行功能位点预测, 用MEGA4.0软件构建系统进化树和计算遗传距离, 用Primer premier 5.0软件设计引物, 用Quantity One软件对琼脂糖凝胶电泳图进行分析, 分析结果用SPSS软件进行差异性分析。

2 结果

2.1 大黄鱼HSP90基因序列

克隆到大黄鱼HSP90基因序列3 930 nt, 包括4个外显子和3个内含子, 外显子和内含子的边界符合“GT...AG”特征。其中ExonI 1 392 nt, IntronI 552 nt, ExonII 153 nt, IntronII 102 nt, ExonIII 264 nt, IntronIII 538 nt, ExonIV 929 nt, ORF有2 178 nt, 共编码725个氨基酸(图1), 序列已提交GenBank, 序列号为JF440970。

2.2 大黄鱼HSP90氨基酸序列分析

依据完整的开放阅读框预测的HSP90蛋白由725个氨基酸组成, 理论等电点为4.64, 理论分子量为83.32 kDa。经BLAST比对, 与鲈鱼的HSP90序列相似性达94%, 与斜带石斑鱼的HSP90达93%, 与其它鱼类的相似性都在80%以上。用ScanProsite在线工具对HSP90基因推断的蛋白质序列进行功能位点

```

1                               cctttccatttccttgcgtcagag
25   agcagaagggacaacatattggttgcatTTTTATTCAAGATAAGTCAACGAAATAACAAG
85   ATGCCCTGAAGAAATGCACCAAGAGGAGGAGGCTGAGACCTTTGCCCTTCCAGGCAGAGATC
    M P E E M H Q E E E A E T F A F Q A E I      20
145  GCTCAGCTGATGTCCTTGATCATCAACACCTTCTATTCCAACAAAGAGATCTTCCTCAGG
    A Q L M S L I I N T F Y S N K E I F L R      40
205  GAGTTGATCTCCAACGCCTCTGATGCTTTGGACAAAATCCGCTACGAAAGCCTGACTGAG
    E L I S N A S D A L D K I R Y E S L T E      60
265  CCCACAAAGCTGGACAGCGGCAAGGATCTGAAAATTGACATCATCCCCAACAAAGATGAC
    P T K L D S G K D L K I D I I P N K D D      80
325  CGCACCTGACCCTCATCGACACTGGAATCGGCATGACCAAGCCGACCTGATCAATAAC
    R T L T L I D T G I G M T K A D L I N N      100
385  CTGGGTACCATCGCCAAGTCTGGCACCAAGGCCTTCATGGAGGCCCTGCAGGCTGGAGCT
    L G T I A K S G T K A F M E A L Q A G A      120
445  GATATCTCTATGATCGGTTCAGTTCGGTGTGGGTTTCTACTCCGCCTACCTTGTTGCCGAG
    D I S M I G Q F G V G F Y S A Y L V A E      140
505  AAGGTGGTCGTCATCACTAAACACAACGATGATGAGCAGTACGCCTGGGAGTCTCTGCT
    K V V V I T K H N D D E Q Y A W E S S A      160
565  GGAGGTTCTTTACCGTCAAAGTTGACAGCGGTGAGCCCATCGGCCGTGGAACCAAGATC
    G G S F T V K V D S G E P I G R G T K I      180
625  ATCTGCACCTGAAGGAGGACCAGACAGAGTACATTGAAGAGAAGAGGGTCAAGGAAATC
    I L H L K E D Q T E Y I E E K R V K E I      200
685  GTCAAGAAGCACTCTCAGTTCATTGGCTACCCCATCACCTGTTTGTGGAGAAGGAGCGC
    V K K H S Q F I G Y P I T L F V E K E R      220
745  GACAAAGGAGATCAGCGACGACGAGGCAGAGGAGGAAAGGGCCGAGAAGGAAGAGAAGGAG
    D K E I S D D E A E E E R A E K E E K E      240
805  GAAGGTGAGGACAAGCCAAAGATCGAGGACGTGGGTTTCAGACGATGAGGAGGACTCCAAA
    E G E D K P K I E D V G S D D E E D S K      260
865  GACAAAGGACAAGAAGAAGAAAAAGAAGATCAAGGAGAAGTACATCGACCAGGAGGAGCTG
    D K D K K K K K I K E K Y I D Q E E L      280
925  AACAAAGCAAGCCCATCTGGACCAGGAACCTGACGACATCACAAACGAGGAGTACGGC
    N K T K P I W T R N P D D I T N E E Y G      300
985  GAGTTCTACAAGAGTCTCACCAATGACTGGGAGGATCACCTGGCTGTCAAGCACTTCTCC
    E F Y K S L T N D W E D H L A V K H F S      320
1045 GTGGAGGGTCAGCTTGAGTTCGCGCCCTGCTCTTCATTCCCCGCCGTGCACCTTTCGAC
    V E G Q L E F R A L L F I P R P A P F D      340
1105 CTCTTTGAGAACAAGAAAAAGAATAACATCAAGCTGTACGTCAGGAGAGTCTTTATC
    L F E N K K K K N N I K L Y V R R V F I      360
1165 ATGGACAACCTGCGAGGAGCTCATCCCCGAGTACCTGAACCTCGTCCGTGGTGTGGTGAC
    M D N C E E L I P E Y L N F V R G V V D      380
1225 TCTGAGGATCTGCCCTCAACATCTCCAGAGAAATGTGTCAGCAGAGCAAGATCTGAAG
    S E D L P L N I S R E M L Q Q S K I L K      400
1285 GTCATCCGCAAGAACATCGTCAAGAAAGTGTCTGGAGCTCTTCGCCGAACCTGGCCGAGGAC
    V I R K N I V K K C L E L F A E L A E D      420
1345 AAGGAGAACTACAAGAAGTTCTACGAAGGGTTCTCCAAGAACATCAAGGtacttaaaacg
    K E N Y K K F Y E G F S K N I K      436
1405 agtgcagtgtgcatttcattttgtcttttaaaatcttttaaggttttaaatccaagttcc
1465 tccataacgcactccttgtgtcttcagtgcatctccatggattcataaggttgaccttct
1525 ttttaaaactagtggttgctgtagcctctagctttccaaggcagtattgcttcttttctt
1585 ggcaacttaatatgtaatacttaattgctgacaactcagccttcgcatggtcatatgtag
1645 ttaagtgtactacacttggtccagtgcttatacgccttagtatagtcacttagtgtagt
1705 tagtaactcatttcctgtcctatagaggaggggggtgatttgatagacccccattgtg
1765 tgaacctttttatcttgatcaggacaaagattattttgggtttacaactaagtgtaaat
1825 gctctggagggatggcgtctagttacaggagtcacagcaacgttaacatgaagagtactc
1885 tgtgtgtggttcttcttttaaatgggtttgtaatgacaattcgatatcgtctgtctgtag
1945 CTGGGAATCCACGAGGACTCTCAAAACCGCAAGAAGCTGTCTGAGCTGCTGCGCTACCAC
    L G I H E D S Q N R K K L S E L L R Y H      456

```

续图1

2005	AGCTCCCAGTCTGGAGATGAGACGACCTCCCTCACAGAGTACCTGACCCGCATGAAGGAA	
	S S Q S G D E T T S L T E Y L T R M K E	476
2065	AACCAGAAAGTCCATCTACTACATCACTGGTGAGctcgtcccttgaaaagatttttctga	
	N Q K S I Y Y I T G E	487
2125	ttcctcattgacctccaaagtaaaagttttaagcgcgcaactgttttaaccgtcattttc	
2185	ttaatttttaggtgagAGCAAGGATCAGGTTGCCAACTCCGCCTTCGTCGAGCGCGTCCGC	
	S K D Q V A N S A F V E R V R	502
2245	AAGCGTGGCTTCGAGGTCTGTACATGACAGAGCCCATTGACGAGTACTGCGTCCAGCAG	
	K R G F E V L Y M T E P I D E Y C V Q Q	522
2305	TTGAAGGAGTTTGACGGCAAGAGCCTGGTGTCTGTCCAAAGAGGGCCTGGAGCTCCCA	
	L K E F D G K S L V S V T K E G L E L P	542
2365	GAGGACGAGGAGGAGAAGAAAAAGATGGAGGAGGACAAGGCCAAGTTCGAGAGCCTCTGC	
	E D E E E K K K M E E D K A K F E S L C	562
2425	AAGCTCATGAAGGAGATCCTTGACAAGAAAGTGGAGAAAGctcggtaacctgacgagcga	
	K L M K E I L D K K V E K	575
2485	agcttcacgttgacctcagtttctcttcgtactgcaggatttaggttcttatgagttcaa	
2545	gacttgcagttgacggtgttttgtttgtaacaggtgtcctaactggtcctaagttgtat	
2605	tctggtgagttttatacagatgtaaggaggcccccttctttgtgtgcaatgaatgagtt	
2665	tctgacctgtgattggttccagactggagatgtaaagtgaagaaccgtttgaaaagtgtg	
2725	acctaacagatgcctgtttttatttgtatttgaacagaatgtgaaactaaaaattgaca	
2785	tgaagtgaacagagttattgagactgcgttggttcttcgttagacatttatggtgtgacat	
2845	tgacgatcggttgcccttggttatgtctggtgtgttgagctaactgactgtgtgcatgct	
2905	ttttattaacttgactttttaaaactgcttcagcctgctgtcaacaccatgcatgtggtg	
2965	tttaagtcttaacgccgtgttcgactgtctctaccagGTGACTGTGTCTAACAGACTGGT	
	V T V S N R L V	583
3025	GTCTTCACCCCTGCTGCATTGTGACGAGCACTTACGGCTGGACGGCCAACATGGAGAGGAT	
	S S P C C I V T S T Y G W T A N M E R I	603
3085	CATGAAGGCCAGGCACTCAGGGACAACCTCCACCATGGGCTACATGATGGCGAAGAAGCA	
	M K A Q A L R D N S T M G Y M M A K K H	623
3145	CCTGGAGATCAACCCCGACCACCCCATCGTGGAGACTCTCAGGCAGAAGGCAGATGCCGA	
	L E I N P D H P I V E T L R Q K A D A D	643
3205	CAAGAACGACAAGGCTGTGAAGGATCTCGTCATCCTGCTGTTTCGAAACCGCCCTGCTGTC	
	K N D K A V K D L V I L L F E T A L L S	663
3265	CTCGGGCTTCTCCCTGGACGACCCACAGACCCACTCCAACCGCATCTACAGAATGATCAA	
	S G F S L D D P Q T H S N R I Y R M I K	683
3325	GCTCGGACTGGGCATCGATGACGACGATGTTCCACAGAGGAGGCGTCACCACAGCCGT	
	L G L G I D D D D V P T E E A V T T A V	703
3385	CCCAGATGAGATCCCTCCCCTAGAAGGCGACGGTGACGACGATGCTTCACGCATGGAAGA	
	P D E I P P L E G D G D D D A S R <u>M E E</u>	723
3445	AGTCGATTAAacaaaccgccccgccaccctcagattttctaacacttagcctcacttttc	
	<u>V D</u> *	725
3505	aattgttcaccttaaaaaaaaaactgcagtaactgcaaaacaaaatagtcattcatgttg	
3565	tgtggtggaccagtgtgtcttgtgtgtgagcattactctgcaagacctttttaagaaaa	
3625	gcagtttttggtttttgcgttcatggtgacagcacatatgttttaacgagtacccgtgttg	
3685	cactgagtttaaatgttggagtggttttgaaaatgtgtgaacatgggaatggtacattcc	
3745	attatcagatcaggtctggtggagggttcggggacgttctgctcatgtgcaacatctgca	
3805	cgctgcatggagagagaggactgtatgattcctttgcctgagtccaggctgtctgtattc	
3865	caagtcttgttttgcaaaaattaatgatgtatcacatcacgagactgggacagacaagatca	
3925	tacagc	

外显子编码区用大写字母表示, 5'及3'非编码区、内含子序列用小写字母表示, 氨基酸用单个大写字母表示, 起始密码子用粗体标记, *表示终止密码子, HSP90家族保守信号区用单下划线标出, 核定位信号用双下划线表示, C末端保守序列用方框框出。

Coding sequences of exons were shown in capital letters, and UTR and introns in small letters. The deduced amino acid sequence was shown by single capital letter code of amino acids below the nucleotide sequence. Initiation codon is indicated in bold. Termination codon was indicated by an asterisk. HSP90 family signatures were shown by single underline. Nuclear localization signal was shown by double underline. Carboxyl terminal consensus sequences (MEEVD) was showed in box.

图1 大黄鱼HSP90基因核苷酸及推断的氨基酸序列

Fig.1 DNA and the deduced amino acid sequences of *Larimichthys crocea* HSP90

预测, 结果显示HSP90存在6类33个位点(表2), 功能性位点丰富。

2.3 大黄鱼HSP90基因系统进化分析

用MEGA 4.0中的Pairwise distance程序, 采用Poisson correction模型校正, 计算多个物种间HSP90的遗传距离, 用MEGA 4.0软件对不同物种的HSP90序列进行聚类分析, 构建进化树(图2)。比对的物种包括密西西比鳄、牛、中华蟾蜍、斑马鱼、鲈鱼、斜

带石斑鱼、野马、三刺鱼、金目鲈、红笛鲷等。

结果显示大黄鱼与真鲷的遗传距离最近, 只有0.035, 与泥塘幼鱼笛、金目鲈、舌齿鲈等的遗传距离也较小, 在0.049左右, 而与哺乳类的遗传距离就比较大, 达到0.204。系统进化树形成两个分支, 哺乳类、鸟类及爬行类形成一个分支, 鱼类形成另一个分支。在鱼类分支中, 大黄鱼与真鲷、舌齿鲈聚在一起, 与斑马鱼、虹鳟等相距较远。

表2 HSP90功能性位点预测
Table 2 The prediction results of HSP90 functional sites

功能位点	位置
Functional site	Position
cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site	202-205; 447-450
Tyrosine kinase phosphorylation site	147-154; 447-455; 503-510
Casein kinase II phosphorylation site	33-36; 57-60; 62-65; 66-69; 84-87; 93-96; 225-228; 253-256; 295-298; 460-463; 466-469; 667-670; 719-722
Protein kinase C phosphorylation site	33-35; 66-68; 165-167; 579-581; 635-637; 675-677
N-glycosylation site	45-48; 281-284; 387-390; 612-615
N-myristoylation site	89-94; 91-96; 119-124; 161-166; 377-382

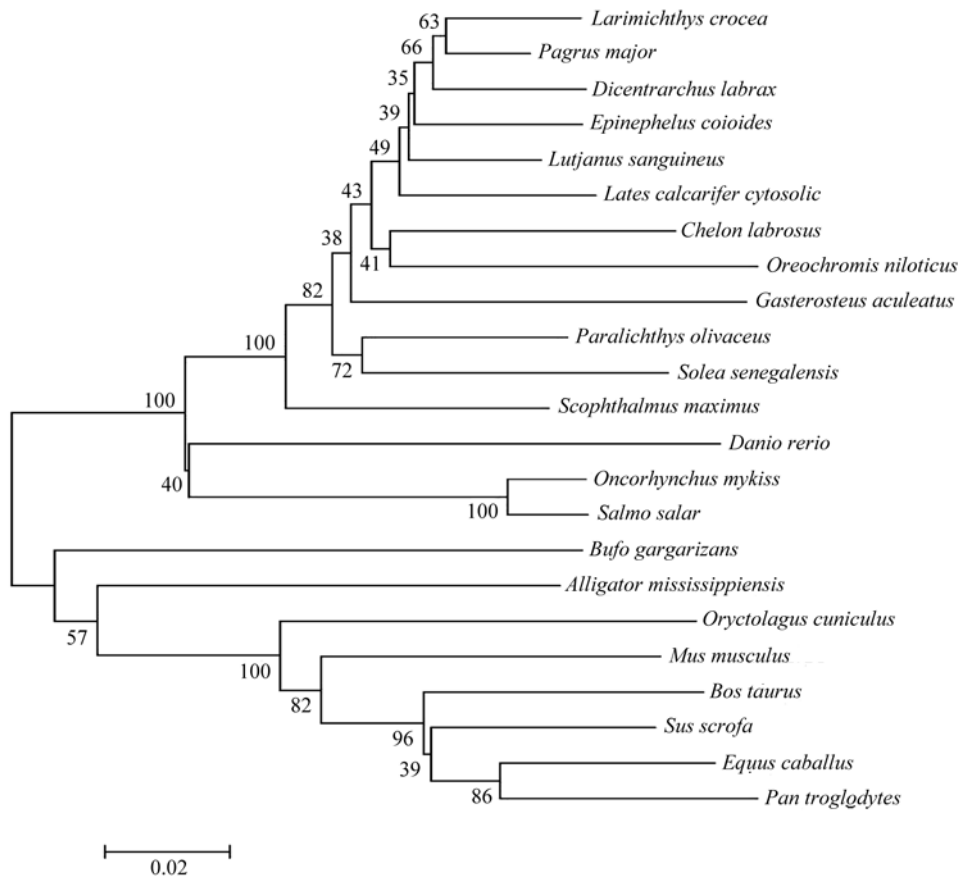


图2 基于HSP90氨基酸序列构建的NJ树(数字表示bootstrap值)
Fig.2 The neighbor joining (NJ) consensus tree constructed based on HSP90 amin acid sequences (numbers indicate the bootstrap value)

2.4 温度对大黄鱼HSP90基因的表达情况

水温19℃时, 大黄鱼HSP90基因在除肌肉外的各组织中都有明显的表达, 其中脾、心、肝、肾和鳃的表达量较高, 肠、眼和脑表达稍弱(图3)。水温24℃时, HSP90基因在脾和肝脏中的相对表达量最高, 其次是鳃、肾和肌肉, 在心、肠、眼和脑中的相对表达量比较低(图4)。水温29℃时, HSP90基因在各组织中的表达都较为明显, 在心 and 肾中的相对表达量最高, 在鳃、脾、肝、肠和脑中次之, 在肌肉和眼中最少(图5)。

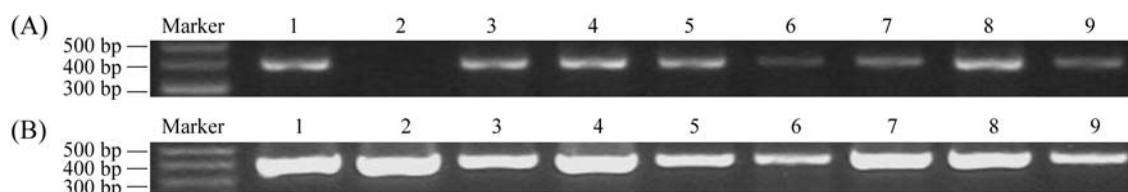
将大黄鱼不同组织中HSP90基因的表达量进行半定量分析, 结果表明, 在不同水温下, HSP90基因在不同组织中的表达量变化不同(图6), 心、肠和脑等组织在29℃时表达量最高, 而肌肉、脾和肝等组

织在24℃时表达量最高。鳃、肌肉、肝、肠和肾组织在水温24℃和29℃条件下, HSP90基因表达量要明显高于水温19℃时的表达量。

2.5 病原菌感染对大黄鱼HSP90基因表达的影响

用恶臭假单胞菌感染大黄鱼48 h后, HSP90基因在鳃、心、脾、肠、肾和脑组织中都有表达, 且表达量较大, 在肝、眼和肌肉中没有检测到明显的表达(图7)。同样条件下病原菌感染大黄鱼7 d(发病)后HSP90基因在几乎各组织中都有很强的表达, 且组织间的差异相对缩小(图8)。

将大黄鱼在病原菌刺激不同时间后各组织中HSP90基因的表达量和正常情况下的表达量进行半定量分析。结果显示, 病原菌刺激时间不同, 大黄鱼各组织内HSP90基因表达的水平不同, 病原体刺激

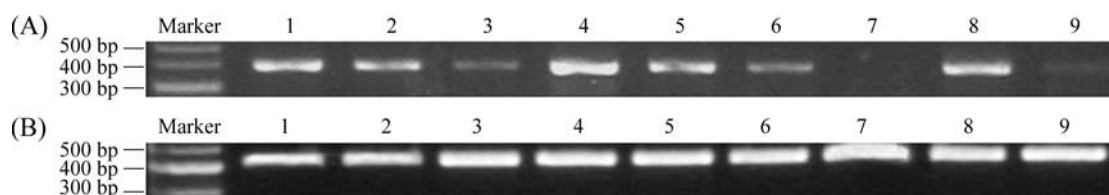


泳道1到9分别代表鳃、肌、心、脾、肝、肠、眼、肾和脑组织。

Lines from 1 to 9 represent gill, skeletal muscle, heart, spleen, liver, intestines, eyes, kidney and brain tissues, respectively.

图3 水温19℃时大黄鱼HSP90基因(A)和 β -actin基因(B)在各组织中的表达

Fig.3 Expression of HSP90 in various tissues of *Larimichthys crocea* at 19℃

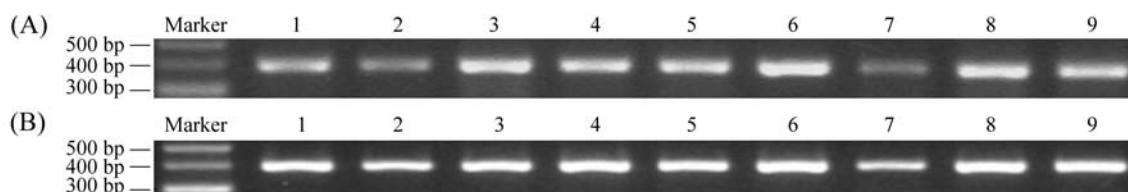


泳道1到9分别代表鳃、肌、心、脾、肝、肠、眼、肾和脑组织。

Lines from 1 to 9 represent gill, skeletal muscle, heart, spleen, liver, intestines, eyes, kidney and brain tissues, respectively.

图4 水温24℃时大黄鱼HSP90基因(A)和 β -actin基因(B)在各组织中的表达

Fig.4 Expression of HSP90 in various tissues of *Larimichthys crocea* at 24℃

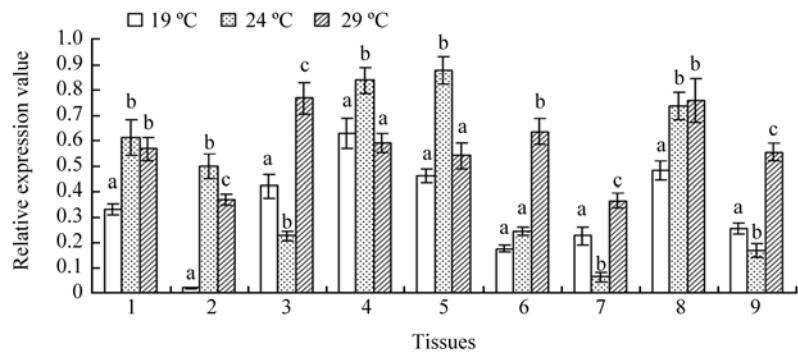


泳道1到9分别代表鳃、肌、心、脾、肝、肠、眼、肾和脑组织。

Lines from 1 to 9 represent gill, skeletal muscle, heart, spleen, liver, intestines, eyes, kidney and brain tissues, respectively.

图5 水温29℃时大黄鱼HSP90基因(A)和 β -actin基因(B)在各组织中的表达

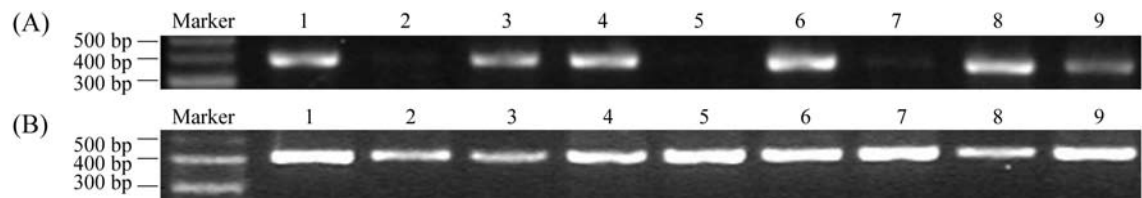
Fig.5 Expression of HSP90 in various tissues of *Larimichthys crocea* at 29℃



1到9分别代表鳃、肌、心、脾、肝、肠、眼、肾和脑组织。不同字母表示差异显著($P<0.05$)。
1 to 9 represent gill, skeletal muscle, heart, spleen, liver, intestines, eyes, kidney and brain tissues, respectively. Different letters represent significant differences ($P<0.05$).

图6 大黄鱼在三种水温下各组织HSP90的相对表达量

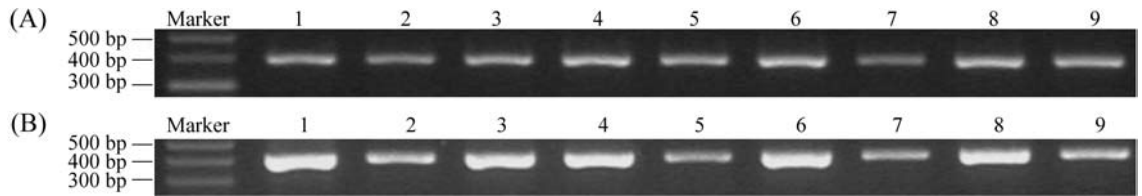
Fig.6 The relative value of HSP90 expression in various tissues of *Larimichthys crocea* at three water temperatures



泳道从1到9分别代表鳃、肌、心、脾、肝、肠、眼、肾、脑组织。
Lines from 1 to 9 represent gill, skeletal muscle, heart, spleen, liver, intestines, eyes, kidney and brain tissues, respectively.

图7 水温19 °C下病原菌感染48 h后大黄鱼HSP90基因(A)和β-actin基因(B)在各组织中的表达

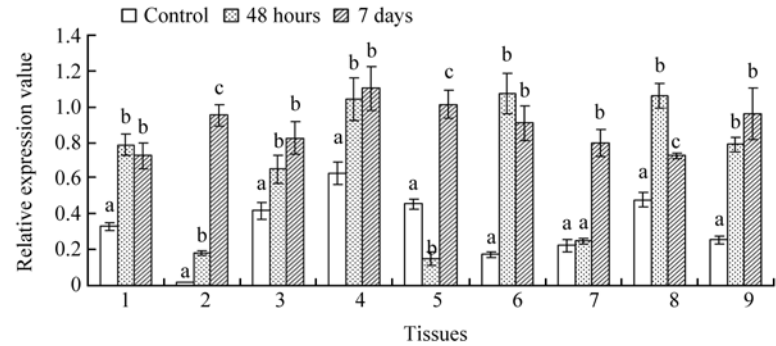
Fig.7 Expression of HSP90 in various tissues of *Larimichthys crocea* at 19 °C after 48 h of injecting pathogen



泳道从1到9分别代表鳃、肌、心、脾、肝、肠、眼、肾、脑组织。
Lines from 1 to 9 represent gill, skeletal muscle, heart, spleen, liver, intestines, eyes, kidney and brain tissues, respectively.

图8 水温19 °C下大黄鱼感染病原菌7 d后HSP90基因(A)和β-actin基因(B)在各组织中的表达

Fig.8 Expression of HSP90 in various tissues of *Larimichthys crocea* at 19 °C after 7 days of injecting pathogen



1到9分别代表鳃、肌、心、脾、肝、肠、眼、肾、脑组织。不同字母表示差异显著($P<0.05$)。
1 to 9 represent gill, skeletal muscle, heart, spleen, liver, intestines, eyes, kidney and brain tissues, respectively. Different letters represent significant differences ($P<0.05$).

图9 19 °C水温下感染致病菌不同时间HSP90基因在不同组织中的相对表达量

Fig.9 The relative value of HSP90 expression in various tissues of *Larimichthys crocea* after infecting pathogen in different times at 19 °C

48 h和7 d后的HSP90基因的相对表达量都较高, 比正常情况下的相对表达量高出2~3倍左右(图9)。

3 讨论

常见的HSP90家族成员包括HSP90 α 、HSP90 β 和gp96等^[11], 其家族内的同源性非常高, 达80%以上^[12]。目前已报道从牙鲆、鳊鱼、虹鳟、真鲷等^[13]中克隆出HSP90 α 和HSP90 β 两种亚型, 且两种亚型的功能相似, 我们获得的大黄鱼HSP90, 与其他鱼类的HSP90 β 亚型同源性达到88%以上。推断的氨基酸序列为725个, 与已报道的其它鱼类HSP90氨基酸序列长度一致。

HSP90通常是以二聚体形式存在的疏水性蛋白, 包括三个高度保守的结构域: N端结构域, 中间结合结构域及C末端结构域。其活性受ATP调节, ATP的结合位点在N端结构域, C端是结合底物蛋白的寡聚化结构域。HSP90发挥其功能必须要在C端形成二聚体, 所以所有真核生物的HSP90在C末端有一段保守的五肽结构MEEVD, 可以被含TPR结构域的辅助因子识别并结合^[14-15], 本实验得到的大黄鱼HSP90也含有此五肽结构。

Langer等^[16]发现, 在HSP90中有两个核定位信号(nuclear localization signal, NLS), 应激时可使隐藏的NLS激活, HSP90核转位显著增强, 且高度集中于核膜, 与维持核内外物质的运输等功能有关。本实验得到的大黄鱼HSP90, 其序列中有一段RRAPFDLFENKKKK核定位信号序列, 与已发现的核定位信号序列一致。大黄鱼HSP90含有五段HSP90家族保守信号区(图1), 与HSP90家族的保守信号区完全一致。氨基酸功能位点预测得到其功能位点尤其各种磷酸化位点非常多, 这和其他物种的HSP90相似, 这可能与热激蛋白的多种功能有关。

HSPs是生物适应环境温度变化非常重要的媒介, 能调节生物适应不同的环境温度, 例如通过热激果蝇发现其耐热程度能与HSP的表达成正相关^[4], 鱼类中也已发现HSP的表达与耐热性的出现有直接的时空关系^[17], 且在热激消失后HSP还能保持一段时间, 可知其对生物长期适应高温环境有重要作用。热激时通常会导致生物体内新生多肽的聚集, 甚至导致蛋白变性, 而HSP作为分子伴侣的功能可以阻止蛋白聚集及帮助蛋白的复性从而使细胞获得耐热性。

本实验中, 正常环境下大黄鱼心脏组织中的HSP90表达量在一个较高水平, 这和Jillian等^[18]在成熟虹鳟鱼中的结果一致。Kai等^[19]检测到HSP90在大马哈鱼的鳃组织中表达量较低, 在肌肉组织中表达较高, 这和本实验在大黄鱼中检测到的结果相反, 而Manuel等^[20]发现HSP90在比目鱼除肌肉外的脑、肾、心、鳃、肝、脾中都有表达, 与本实验结果一致。说明不同鱼类HSP90的表达模式存在差异。本实验中热激后大黄鱼大部分组织的HSP90表达量明显随着温度的增高而增加, 但当温度达到一定值时, 其表达量并不随温度的升高而增加。Ramesh等^[21]对鳊鱼进行+6 °C和+12 °C的热激后, 肝脏中的表达量显著增加, 但+6 °C比+12 °C表达量更高一些, 这和本实验得到的在肝脏中的变化结果一致。本实验中, 大黄鱼眼、脑等组织+5 °C热激后HSP90表达量反而下降, 但+10 °C热激后表达量明显增强, 这种现象在其他鱼类中未见报道, 其机理有待进一步研究。本实验的数据是半定量分析的结果, 以HSP90对肌动蛋白基因表达量的比来表示, 可能与HSP90转录水平的变化不完全一致。但总体而言热激后HSP90在心、脾、肝和肾等内脏组织中的表达比眼、肌肉等组织中更强, 可推测对热应激时HSP90在内脏组织中起着比较重要的作用。

饥饿胁迫及皮质醇处理都能诱导鱼类HSP90的表达^[22-23], 而免疫反应时HSP90表达尤为强烈。HSP可以作为抗原分子的载体, 并协同参与对抗原受体的加工、运输, 以确保抗原受体的正确合成, 直接或间接地参与抗原呈递^[24], 如gp96能和免疫球蛋白的L链和H链结合, 尤其易于和氧化状态的L链结合^[25], 且热激蛋白家族能诱导生物机体产生免疫反应^[26]。在鱼类肌肉组织, 除了表达与肌肉发生、分化相关的蛋白质外, 与免疫相关的基因也有较高的表达^[27-28], 本实验中, 在病原菌刺激下, 肌肉组织HSP90的表达量显著上升。Fu等^[29]用*V. alginolyticus*感染近江牡蛎后发现在其血细胞中HSP90表达量在8~36 h平稳上升, 而本实验的结果也显示病原菌刺激大黄鱼能显著诱导大黄鱼各组织内HSP90的表达, 且能稳定在一个较高水平, 随着刺激时间的延长, 大部分组织的表达量明显提高, 这和鳃弧菌感染大菱鲆胚胎细胞系后HSP90表达量急剧增加一致^[30]。斜带石斑鱼感染病毒后, 其眼组织中HSP90的表达量增加了3倍^[31], 本实验的结果与此相似, 在病原菌感染后, 多种组织

HSP90表达量比正常组织要高2~3倍, 表达量的变化比温度刺激更加显著, 因而可推测HSP90在参与大黄鱼疾病的免疫方面有着重要作用。

参考文献 (References)

- Wegele H, Muller L, Buchner J. Hsp70 and Hsp90—a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2004; 151: 1-44.
- Kalmar B, Greensmith L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61(4): 310-8.
- Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304(3): 505-12.
- Dahlgaard J, Loeschcke V, Michalak P, Justesen J. Induced the thermotolerance and associated expression of the heat shock protein HSP70 in adult *Drosophila melanogaster*. *Functional Ecology* 1998; 12(5): 786-93.
- Roberts D, Hofmann G, Somero G. Heat shock protein expression in *Mytilus californianus*: Acclimatization (seasonal and tidal height comparison) and acclimation effects. *Biol Bull* 1997; 192: 309-20.
- Du J, Li H, Bian Y, Zhong Y. Heat-shock protein 90 α 1 is required for organized myofibril assembly in skeletal muscles of zebrafish embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(2): 554-9.
- Jian J, Wu Z. Effects of traditional Chinese medicine on nonspecific immunity and disease resistance of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson). *Aquaculture* 2003; 218(1-4): 1-9.
- Ma H, Cahu C, Zambonino J, Yu H, Duan Q, Le G, *et al.* Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Aquaculture* 2005; 245(1/2/3/4): 239-48.
- Sangster TA, Queitsch C. The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Curr Opin Plant Biol* 2005; 8(1): 86-92.
- 黄伟, 薛良义, 李婷, 杨斌. 大黄鱼肌肉组织cDNA文库的构建及EST分析. 台湾海峡(Huang Wei, Xue Liangyi, Li Ting, Yang Bin. Construction of a full length cDNA library from the skeletal muscle of *Larimichthys crocea* and its EST analysis. *J. Oceanography in Taiwan Strait* 2010; 29(2): 189-95.
- Lindquist S. The heat shock proteins. *Annu Rev Genet*, 1988; 22: 631-770.
- Krishna P, Gloor G. The Hsp90 family of protein in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperon* 2001; 6(3): 238-246.
- Palmisano N, Winton R, Dickhoff W. Tissue specific induction of Hsp90 mRNA and plasma cortisol response in chinook salmon following heat shock, seawater challenge, and handling challenge. *Mar Biotechnol* 2000; 2(4): 329-38.
- Jackson SE, Queitsch C, Toft D. Hsp90: From structure to phenotype. *Nat Stru Mol Biol* 2004; 11(12): 1152-6.
- Terasawa K, Minami M, Minami Y. Constantly updated knowledge of Hsp90. *J Bio chem* 2005; 137(4): 443-7.
- Langer T, Rosmus S, Fasold H. Intracellular localization of the 90 kDa heat shock protein (HSP90 α) determined by expression of a EGFP-HSP90 α -fusion protein in unstressed and heat stressed 3T3 cells. *Cell Biol Int* 2003; 27(1): 47-52.
- Mosser D, Van J, Bols C. Induction and decay of thermotolerance in rainbow trout fibroblasts. *Cell Phys* 1987; 132(1): 155-60.
- Jillian R, Stephanie F, Amanda C. Development-dependent differences in intracellular localization of stress proteins (hsps) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, following heat shock. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 2006; 1(2): 238-52.
- Eder KJ, Leutenegger CM, Köhler HR, Werner I. Effects of neurotoxic insecticides on heat-shock proteins and cytokine transcription in *Chinook salmon*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2009; 72(1): 182-90.
- Manchado M, Salas-Leiton E, Infante C, Ponce M, Asensio E, Crespo A, *et al.* Molecular characterization, gene expression and transcriptional regulation of cytosolic HSP90 genes in the flatfish *Senegalese sole*. *Gene* 2008; 416(1/2): 77-84.
- Sathiyaa R, Campbell T, Vijayan MM. Cortisol modulates HSP90 mRNA expression in primary cultures of trout hepatocytes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2001; 129 (2/3): 679-85.
- Cara JB, Aluru N, Moyano FJ, Vijayan MM. Food-deprivation induces HSP70 and HSP90 protein expression in larval gilthead sea bream and rainbow trout. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2005; 142(4): 426-31.
- Celi M, Vazzana M, Sanfratello MA, Parrinello N. Elevated cortisol modulates Hsp70 and Hsp90 gene expression and protein in sea bass head kidney and isolated leukocytes. *Gen Comp Endocrinol* 2012; 175(3): 424-31.
- Panjwani N, Akbari O, Garcia S, Brazil M, Stockinger B. The HSC73 molecular chaperone: Involvement in MHC class II antigen presentation. *Immunol* 1999; 163(4): 1936-42.
- 范云霞. 热休克蛋白与免疫应答. 国外医学与免疫学分册(Fan Yunxia. Heat shock protein and immune response. *Foreign Medical Sciences Section of Immunology*) 2001; 24(2): 62-4.
- Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70 and calreticulin. *Immunity* 2001; 14(3): 303-13.
- 张建社, 夏新界, 褚武英, 陈定根, 符贵红, 刘榛, 等. 基于异源cDNA基因芯片杂交的鳊鱼肌肉组织表达谱初步分析. 水生生物学报(Zhang Jianshe, Xia Xinjie, Chu Wuying, Chen Dinggen, Fu Guihong, Liu Zhen, *et al.* Gene expression profiles of the muscle tissues of the mandarin fish, *Siniperca chuatsi* L. with zebrafish cDNA microarray. *Acta Hydrobiologica Sinica*) 2009; 33(1): 46-53.
- Chu W, Fu G, Chen J, Chen D, Meng T, Zhou R, *et al.* Gene expression profiling in muscle tissue of the commercially important teleost, *Siniperca chuatsi* L.. *Aquaculture Inter* 2010; 18(4): 667-78.
- Fu D, Chen J, Zhang Y, Yu Z. Cloning and expression of a heat shock protein (HSP) 90 gene in the haemocytes of *Crassostrea hongkongensis* under osmotic stress and bacterial challenge. *Fish Shellfish Immun* 2011; 31(1): 118-25.
- 王婷婷, 陈松林, 孟亮, 刘洋. 大菱鲆热休克蛋白90基因cDNA的克隆及其表达特征. 渔业科学进展(Wang Tingting, Chen Songlin, Meng Liang, Liu Yang. Molecular cloning and expression of heat shock protein 90 gene cDNA from turbot *Psetta maxima*. *Progress in Fishery Sciences*) 2010; 31(2): 51-9.
- Chen YM, Kuo CE, Wang TY, Shie PS, Wang WC, Huang SL, *et al.* Cloning of an orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* heat shock protein90AB (HSP90AB) and characterization of its expression in response to nodavirus. *Fish Shellfish Immun* 2010; 28(5/6): 895-904.

Effect of Temperature and Pathogen on HSP90 Expression in *Larimichthys crocea*

Lin Tianshi, Xue Liangyi*, Sun Aifei, Zhu Yifeng

(College of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract Heat shock proteins (HSPs) existed in various organisms as a conserved protein family, and participated in many complex physiological processes. We cloned HSP90 gene and analysed the effect of temperature and pathogenic bacteria on its expression in *Larimichthys crocea*. The cloned HSP90 was 3 930 nt, including four exons and three introns. The open reading frame (ORF) was 2 178 nt encoding a polypeptide of 725 amino acids. Homology analysis showed that the deduced amino acid sequence of *Larimichthys crocea* HSP90 shared more than 90% identity with other fish. Under the different temperatures, HSP90 showed different expression patterns in the various tissues of *Larimichthys crocea*. HSP90 in heart, intestine and brain tissues had the strongest expression at 29 °C, whereas HSP90 in skeletal muscle, spleen and liver tissues exhibited the strongest expression at 24 °C. *Larimichthys crocea* was infected by intraperitoneal injection of pathogenic bacteria *Pseudomonas putida*. HSP90 expression in gill, heart, spleen, intestine, kidney and brain tissues increased significantly after 48 h of injection. HSP90 expression in all examined nine tissues of the diseased fish was significantly higher than the control after 7 days of injection.

Key words *Larimichthys crocea*; HSP90; temperature; pathogenic infection; gene expression

Received: January 15, 2012 Accepted: March 28, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30871916), the Science and Technology Department of Zhejiang Province (No.2011C22087), the Ningbo Science and Technology Bureau (No.2011C10001) and the Research Grant of Ningbo University (No. XKI10092)

*Corresponding author. Tel: 86-574-87600165, E-mail: xueliangyi@nbu.edu.cn