

脊尾白虾热休克蛋白 HSP90 基因的原核表达与鉴定

韩俊英^{1,2} 李 健^{2*} 李吉涛² 陈 萍² 李 华¹

(¹大连海洋大学, 116023)

(²农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 将脊尾白虾热休克蛋白 90 基因克隆到原核表达载体 pET-30a 中, 经酶切验证和 DNA 测序鉴定后, 将重组质粒转化表达宿主大肠杆菌 Rosetta, 优化温度、时间、IPTG 和 OD₆₀₀ 表达条件进行诱导表达, 收集菌液, 进行 SDS-PAGE 和质谱检测, 并用 Quantity one 软件分析蛋白表达水平。结果表明, 成功构建了含脊尾白虾 HSP90 基因的重组表达载体 pET-30a-HSP90, 表达目的蛋白相对分子量为 82.7 kD, 为 HSP90 蛋白。通过条件优化认为重组菌株 Rosetta/pET-30a-HSP90 的最佳诱导温度为 37 °C, 最佳 IPTG 浓度为 1.0 mmol/L, 最佳诱导时机和诱导时间分别为 0.58 h、7 h。

关键词 脊尾白虾 热休克蛋白 90 原核表达

中图分类号 S945.1; Q959.223.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)05-0044-08

High level prokaryotic expression and identification of heat shock protein 90 in *Exopalaemon carinicauda*

HAN Jun-ying^{1,2} LI Jian^{2*} LI Ji-tao² CHEN Ping² LI Hua¹

(¹Dalian Ocean University, 116023)

(²Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT The aim of this study was to set up a high level prokaryotic expression of heat shock protein 90 (HSP90) of *Exopalaemon carinicauda* in *E. coli* Rosetta. The HSP90 gene of *E. carinicauda* was cloned into prokaryotic expression vector pET-30a, which was confirmed by double-endonuclease digestion and DNA sequencing. The recombinant vector was transformed into *E. coli* Rosetta and was induced to express under different temperatures, durations, IPTG concentrations and OD₆₀₀. The expressed product was identified by SDS-PAGE and an 82.7 kD protein (determined by mass spectrometry) was found. The expression level varied under different conditions. The optimal expression was achieved under induction conditions of 1 mmol/L IPTG, 37 °C, OD₆₀₀ = 0.58, and 7 h.

KEY WORDS *Exopalaemon carinicauda* Heat shock protein 90 (HSP90)
Prokaryotic expression

公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-042, 200803012)、国家虾产业技术体系(CARS-47)和科技部农业科技成果转化资金项目(2010GB23260589)共同资助

收稿日期:2010-12-16;接受日期:2011-03-31

作者简介:韩俊英(1984-),女,硕士,主要从事海洋生物功能基因研究。E-mail: hanxue84828321@hotmail.com, Tel:(0532)85826690

热休克蛋白 90(Heat Shock Protein 90, HSP90)是热休克蛋白家族中高度保守且功能复杂的一类。它主要以“分子伴侣”形式协助新生多肽的折叠、转运以及变性蛋白的修复和重折叠等,而且在细胞保护、抗凋亡以及免疫治疗等方面有独特复杂的生物学功能(曲凌云等 2004)。鉴于已知 HSP90 的众多功能和不断阐明的 HSP90 与机体各种损伤、感染等的关系,HSP90 作为抗癌药物的分子靶点受到广泛关注(陈奕等 2004),并成为肿瘤学的研究热点,在疾病诊治方面具有重要潜能。目前关于海洋生物中 HSP90 的功能尚未完全了解,但有一点可以肯定,即在病原侵染、环境胁迫等条件下,HSP90 可对细胞和机体起重要的保护作用。目前,已对某些甲壳动物的 HSP90 基因序列和表达特征进行了研究,如中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis*、斑节对虾 *Penaeus monodon*、刀额新对虾 *Metapenaeus ensis*、三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* 和中华绒螯蟹 *Eriocheir sinensis*(Li *et al.* 2008; Rungrassamee *et al.* 2010; Wu *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2009; Yue *et al.* 2010; Li *et al.* 2008)。然而,对脊尾白虾 *Exopalaemon carinicauda* HSP90 的研究迄今未见报道。

脊尾白虾是中国黄、渤海地区重要的经济虾类(陈卫平 2005),因其体积小、饲养方便、繁殖速度快等优良特性,有望发展成为研究甲壳动物的模式生物。同时,脊尾白虾在环境适应性和抵抗病原生物方面具有其独特的优势。研究脊尾白虾 HSP90 基因可以进一步了解 HSP90 在甲壳动物环境适应和应激防护方面的作用,从分子水平上阐述其作用机理。

本研究通过构建含有脊尾白虾 HSP90 基因的重组表达质粒,导入大肠杆菌以实现脊尾白虾重组 HSP90 蛋白的高效表达,为进一步研究该蛋白的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用脊尾白虾于 2010 年 9 月取自山东省昌邑市海丰水产养殖有限责任公司。原核融合表达载体 pET-30a 由本实验室保存;表达宿主菌 Rosetta 购自上海今迈生物科技有限公司。

1.2 编码 HSP90 基因成熟肽 cDNA 的克隆和验证

按 Chen 等(2010)的方法利用 Trizol 试剂提取脊尾白虾肝胰腺中的总 RNA,并反转录成 cDNA。依据 HSP90 基因成熟肽 cDNA 序列、原核表达手册及表达载体 pET-30a 的特征,设计引物 HSP90-30a F:5'-GG-GAATTCCATATGATGCCTGAAGACATGAAC-3'(下划线部分为 *Nde* I 酶切位点);HSP90-30a R:5'-ATAGTTTAGCGCCGCGTCAACTTCCTC-3'(下划线部分为 *Not* I 酶切位点)。

PCR 反应体系:cDNA,1.0 μ l;10 \times LA Buffer II (Mg²⁺),2.5 μ l;dNTP Mixture(各 2.5mmol/L),2.0 μ l;30a F(10mmol/L),1.0 μ l;30a R(10mmol/L),1.0 μ l; TaKaRa LA *Taq*(5U/ μ l),0.25 μ l,ddH₂O 补足 25 μ l。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 变性 5min,1 个循环;95 $^{\circ}$ C 变性 1min,60 $^{\circ}$ C 退火 1.5min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10min,1 个循环。PCR 产物切胶回收后连接到 pEASYTM-T1 载体,转化 Trans1-T1 感受态细胞,然后通过 PCR 筛选阳性克隆并测序验证。

1.3 重组表达载体 pET-30a-HSP90 构建及鉴定

参照原核表达手册,将含有脊尾白虾 HSP90 基因的质粒 pEASYTM-T1-HSP90 和 pET-30a 载体进行双酶切,回收载体酶切大片段与质粒 DNA 酶切大片段,在 T4 连接酶作用下进行连接得到重组载体 pET-30a-HSP90,酶切、连接体系见表 1。于网站 <http://www.doe-mbi.ucla.edu/~sumchan/caltor.html> 对脊尾白虾 HSP90 开放阅读框中 *E. coli* 稀有密码子进行分析,以备选择合适的宿主菌。将构建好的表达载体转化 Top10 感受态细胞,涂布含有 30 μ g/ml Kan 和 34 μ g/ml Cam 的 LB 平板,过夜培养,挑取阳性克隆,质粒抽提,进行酶切验证和测序。

1.4 重组蛋白的诱导表达

取酶切和测序鉴定正确的阳性克隆质粒转化表达宿主菌 Rosetta,将转化产物接入含 30 μ g/ml Kan 和 34

表 1 构建 pET-30a-HSP90 载体所用双酶切体系和酶切产物连接体系

Table 1 The double-digestion and ligation system for construction of expressing vector pET-30a-HSP90

双酶切体系 Double-digestion system		酶切产物连接体系 Ligation system	
质粒 DNA DNA plasmid	30 μ l	酶切后的 pET-30a Digested pET-30a	2.4 μ l
<i>Not</i> I	5 μ l	酶切后质粒 DNA Digested DNA plasmid	4.8 μ l
10 \times Buffer O	5 μ l	10 \times T4 DNA ligase buffer	2.0 μ l
<i>Nde</i> I	5 μ l	T4 DNA 连接酶 T4 DNA ligase	0.8 μ l
ddH ₂ O	5 μ l		
共 50 μ l 体系 (37 $^{\circ}$ C 酶切 12~16h)		共 10 μ l 体系 (16 $^{\circ}$ C 连接过夜)	

μ g/ml Cam 的 10 ml LB 中, 200 r/min, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

将过夜培养的菌液以 1 : 100 (体积比) 接入新的含 30 μ g/ml Kan 和 34 μ g/ml Cam 的 LB 中进行扩大培养, 200 r/min, 37 $^{\circ}$ C 培养 2~3 h, 待其 OD₆₀₀ 达到 0.5~0.7 时, 取 1ml 菌液做空白对照, 剩余菌液中加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG, 诱导 6 h, 收集 1 ml 菌液, 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 1 min, 去上清液, 然后将沉淀作为样品保存于 -20 $^{\circ}$ C, 备用。

1.5 表达产物的初步分析

将所取样品中分别加入 100 μ l 8 mol/L 的尿素, 室温裂解 10 min 后, 按照 5 : 1 (体积比) 加入 5 \times SDS 上样缓冲溶液重悬, 100 $^{\circ}$ C 煮 10 min, 冷却后 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进行 SDS-PAGE 分析。

1.6 重组菌株原核表达条件优化

1.6.1 IPTG 浓度的优化

将扩大培养的菌液在 OD₆₀₀ 达到 0.5 时均分为 7 份, 分别加入终浓度为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L 的 IPTG, 37 $^{\circ}$ C 诱导 6 h, 取样进行 SDS-PAGE 分析。

1.6.2 菌液浓度的优化

将扩大培养的菌液在 OD₆₀₀ 达到 0.20、0.29、0.40、0.48、0.58、0.68、0.77、0.90 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 37 $^{\circ}$ C 诱导 6 h 后, 分别取样进行 SDS-PAGE 分析。

1.6.3 诱导时间的优化

将扩大培养的菌液在 OD₆₀₀ 达到 0.5 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 37 $^{\circ}$ C 诱导 1、2、3、4、5、6、7、8、24 h 后, 分别取样进行 SDS-PAGE 分析。

1.6.4 诱导温度的优化

将扩大培养的菌液在 OD₆₀₀ 达到 0.5 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 于 25、28、31、34、37 $^{\circ}$ C 分别诱导 6 h, 取样进行 SDS-PAGE 分析。

1.7 重组蛋白的质谱分析及蛋白含量测定

将 SDS-PAGE 胶上的目的条带切下, 送复旦大学蛋白质组学研究室采用 MALDI-TOF-MS 法进行质谱分析。

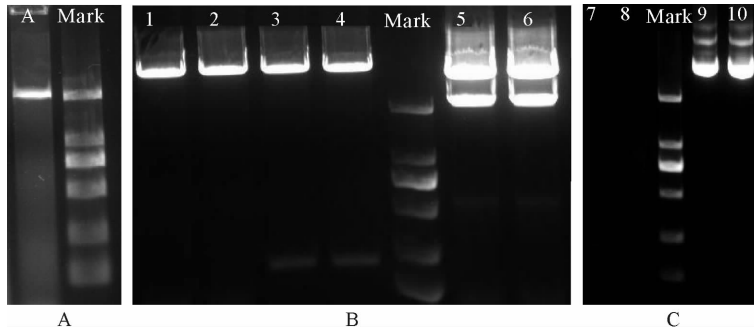
依据 Bradford (1976) 的方法进行总蛋白含量的测定, 根据 SDS-PAGE 电泳结果并用 Quantity one 软件分析目的蛋白的含量。

2 结果

2.1 脊尾白虾 HSP90 基因原核表达载体构建及鉴定

用引物 HSP90-30aF\30aR 序列, 分别以脊尾白虾 cDNA 和重组质粒 pET-30a-HSP90 为模板, 都扩增出约 2 200 bp 的片段, 与预期大小相符 (图 1-A、图 1-C), 送样测序结果与 GenBank 中脊尾白虾 HSP90 ORF 结

果一致。重组质粒 pET-30a-HSP90 经 *Nde* I 和 *Not* I 双酶切验证,结果与预期一致(图 1-B),表明开放阅读框正确,载体构建成功。



注:Mark; DNA Marker DL2000; A: HSP90 基因 cDNA ORF 片段;1,2: pET-30a 质粒;3,4: pET-30a 双酶切;5,6: pET-30a-HSP90 双酶切;7,8:空白对照;9,10:pET-30a-HSP90 双酶切后 PCR 检测
Note: Mark; DNA Marker DL2000; A: PCR amplification of HSP90 gene ORF;1,2:Plasmid pET-30a;3,4: Plasmid pET-30a digested with *Not* I/*Nde* I;5,6: pET-30a-HSP90 digested with *Not* I/*Nde* I;7,8:Blank control;9,10: PCR amplification of digested pET-30a-HSP90

图 1 重组质粒限制酶切分析及脊尾白虾 HSP90 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 Restriction analysis of recombinant plasmid and PCR amplification of HSP90 gene of *E. carinicauda*

2.2 脊尾白虾 HSP90 基因在 *E. coli* 中的重组表达

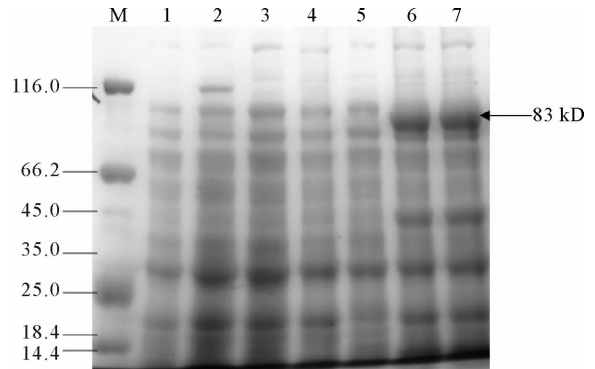
对 HSP90 开放阅读框进行稀有密码子分析,发现 HSP90 ORF 中含有三联稀有密码子,推测其会影响该基因在大肠杆菌中的表达,故选用 Rosetta 作为宿主菌株。将重组质粒 pET-30a-HSP90 转染表达宿主菌 Rosetta 感受态细胞并经 IPTG 诱导后,宿主菌的蛋白表达图谱发生了改变,在分子量约 82.7kD 处的位置出现了一条特异的蛋白谱带(图 2),所以初步推断该蛋白谱带为重组的 HSP90 蛋白。

2.3 重组表达条件的优化

通过不同的 IPTG 浓度、诱导时机、诱导时间以及诱导温度的优化,发现它们对重组载体的原核表达都有影响。通过对表达产物和蛋白含量的分析(图 3),认为重组菌株 Rosetta/pET-30a-HSP90 的最佳诱导温度为 37℃,最佳 IPTG 浓度为 1.0mmol/L,最佳诱导时机及诱导时间分别为 0.58 h 和 7 h。

2.4 重组 HSP90 蛋白的质谱鉴定

质谱检测结果显示,所切下蛋白谱带中有 16 个肽段与脊尾白虾 HSP90 基因推导氨基酸序列完全匹配,这 16 个匹配肽段在脊尾白虾 HSP90 推导氨基酸序列中的位置见图 4。由此可见,上述蛋白谱带就是重组表达的脊尾白虾 HSP90。



注:M: 蛋白 Marker; 1: Rosetta 菌株未诱导; 2: Rosetta 菌株诱导 6h; 3: pET-30a 未诱导; 4: pET-30a 诱导 6h; 5: Rosetta/pET-30a-HSP90 未诱导; 6~7: Rosetta/pET-30a-HSP90 诱导 6h
Note: M: Protein marker; 1:Uninduced Rosetta; 2: Rosetta induced for 6h; 3: Uninduced Rosetta/pET-30a; 4: Rosetta/pET-30a induced for 6h; 5: Uninduced Rosetta/pET-30a-HSP90; 6~7: Rosetta/pET-30a-HSP90 induced for 6h

图 2 脊尾白虾重组 HSP90 基因在 *E. Coli* 表达的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of *E. carinicauda* recombinant HSP90 expressed in *E. coli*

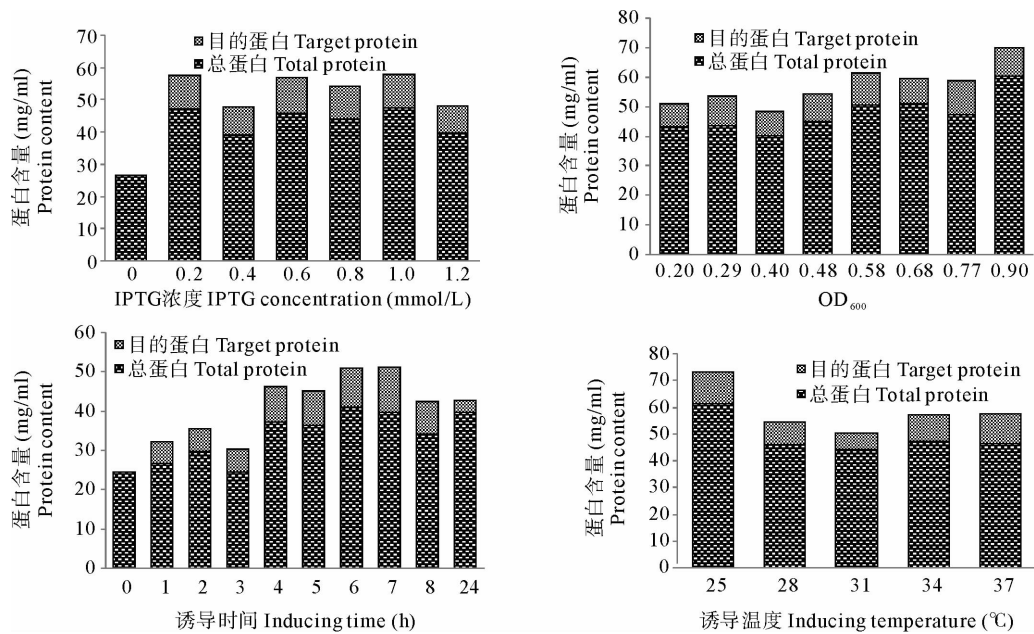


图 3 不同诱导条件下脊尾白虾重组 HSP90 蛋白含量变化

Fig. 3 Analysis of *E. carinicauda* recombinant HSP90 induced under different conditions

3 讨论

目前广泛用于外源基因表达的系统有两类：一是原核表达系统，如 *E. coli* 表达系统；另一类是真核表达系统，如哺乳动物表达系统、昆虫细胞表达系统等。原核表达体系具有操作简便、成本低、表达效率高、产物稳定且易鉴定等优点，在基因表达技术中占有重要的地位，是生物技术研究的重要工具(尹长城等 2002)。在原核蛋白表达过程中，要构建一个合适的原核表达体系，需要综合考虑三大因素，即表达载体、宿主菌株和表达诱导条件(田丽红等 2010)。

有研究表明，当外源基因中含有较多在大肠杆菌中低频使用的稀有密码子时，外源蛋白合成速率就会受到影响(Sung *et al.* 1991)。在 mRNA 中多个稀有密码子串联成簇的出现可能导致翻译的提前终止，甚至翻译错误或跳跃翻译，最终导致原核表达水平过低或表达产物不完全，而 Rosetta 菌株适合用于表达那些含有 *E. coli* 稀有密码子基因的目的蛋白(Sorensen *et al.* 1989; Blake *et al.* 1984; 刘礼宾等 2006)。本研究中因脊尾白虾 HSP90 基因稀有密码子出现频率较高，且存在三联体稀有密码子，故选用了 Rosetta 菌株作为重组质粒表达菌株。pET-30a 是 pET 载体系列之一，含不被大肠杆菌 RNA 聚合酶识别的 T7 强启动子，高拷贝，蛋白表达总量明显(李 薇等 2010)。使用大肠杆菌启动子系统(如 *tac*、*lac*、*trc*、*pl*)可使低表达的基因在 pET 系列载体中稳定克隆和表达(张俊河等 2007; 吴 任等 2006)。所以本实验只着重于原核表达条件的优化。

岳盈盈等(2010)实现了风疹病毒包膜糖蛋白 E1 的原核表达并对其表达条件进行了优化，发现诱导温度、IPTG 浓度及表达时间均对重组蛋白有较大的影响，这与本研究结果一致。本研究中 37 °C 时目的蛋白含量最高，这与吴 任等(2006)和苏友禄等(2009)的研究结果一致。有报道指出，0.1~1.0 mmol/L 范围内的 IPTG 均适于重组蛋白诱导表达(吴 任等 2006)。本研究中随着 IPTG 浓度的增加，目的蛋白占菌体总蛋白的比例增加不明显，在 IPTG 浓度为 1 mmol/L 时目的蛋白的含量达到最高值，所以本研究将诱导浓度定为 1 mmol/L。随着菌液 OD₆₀₀ 值不断增大，菌体总蛋白的含量略有增加的趋势，但目的蛋白在 OD₆₀₀ 为 0.58 时达到最高值。菌液经 IPTG 诱导的前 7h 之内，目的蛋白的表达量随着诱导时间的增加而增加，而后随着时间的推移逐渐减少。可能与细菌生长到平台期或死亡期后菌体自溶释放蛋白酶降解一部分蛋白质有关。本研究通过优化原核表达条件，认为重组菌株 Rosetta/pET-30a-HSP90 的最佳诱导温度为 37 °C，最佳 IPTG 浓度为 1.0 mmol/L，最佳诱导时机及诱导时间分别为 0.58 h 和 7 h。

质谱检测 SDS-PAGE 胶上 83kD 位置附近出现的特异条带结果显示,所测氨基酸序列与脊尾白虾 HSP90 基因推导的氨基酸序列一致,说明表达蛋白就是脊尾白虾的 HSP90 蛋白,证明该基因在 Rosetta 菌株中获得了成功表达。在对基因工程表达的动物蛋白检测中,比较传统的方法是 Western blot 和 Elisa 检测,蛋白质谱鉴定是一种新兴的检测技术。采用质谱检测操作简便,敏感度高,结果准确可靠,该法具有广阔的发展前景。

HSP90 为组成型表达的蛋白,包括 α 和 β 两种分子,是 HSP 家族中为数不多的含有内含子的成员之一。HSP90 作为特异分子伴侣与类固醇激素受体及信号传导途径中的酪氨酸蛋白激酶及丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶等分子结合,调节它们的生物活性,防止蛋白质的变性和聚集(曲凌云等 2004),在 DNA 的复制、转录、细胞骨架功能、细胞内的信号转导等过程中发挥重要作用。有关海洋动物 HSP90 功能方面的研究已经成为现在的研究热点。Gao 等(2008 年)研究发现,经 G^- 和 G^+ 菌刺激后的海湾扇贝 *Argopecten irradians* 中 HSP90 基因的表达量均明显升高。Zhang 等(2009 年)研究发现,不同的环境条件下三疣梭子蟹的 HSP90 基因表达量也不相同。Gao 等(2007)研究发现,重金属也可以引起栉孔扇贝 *Chlamys far-*

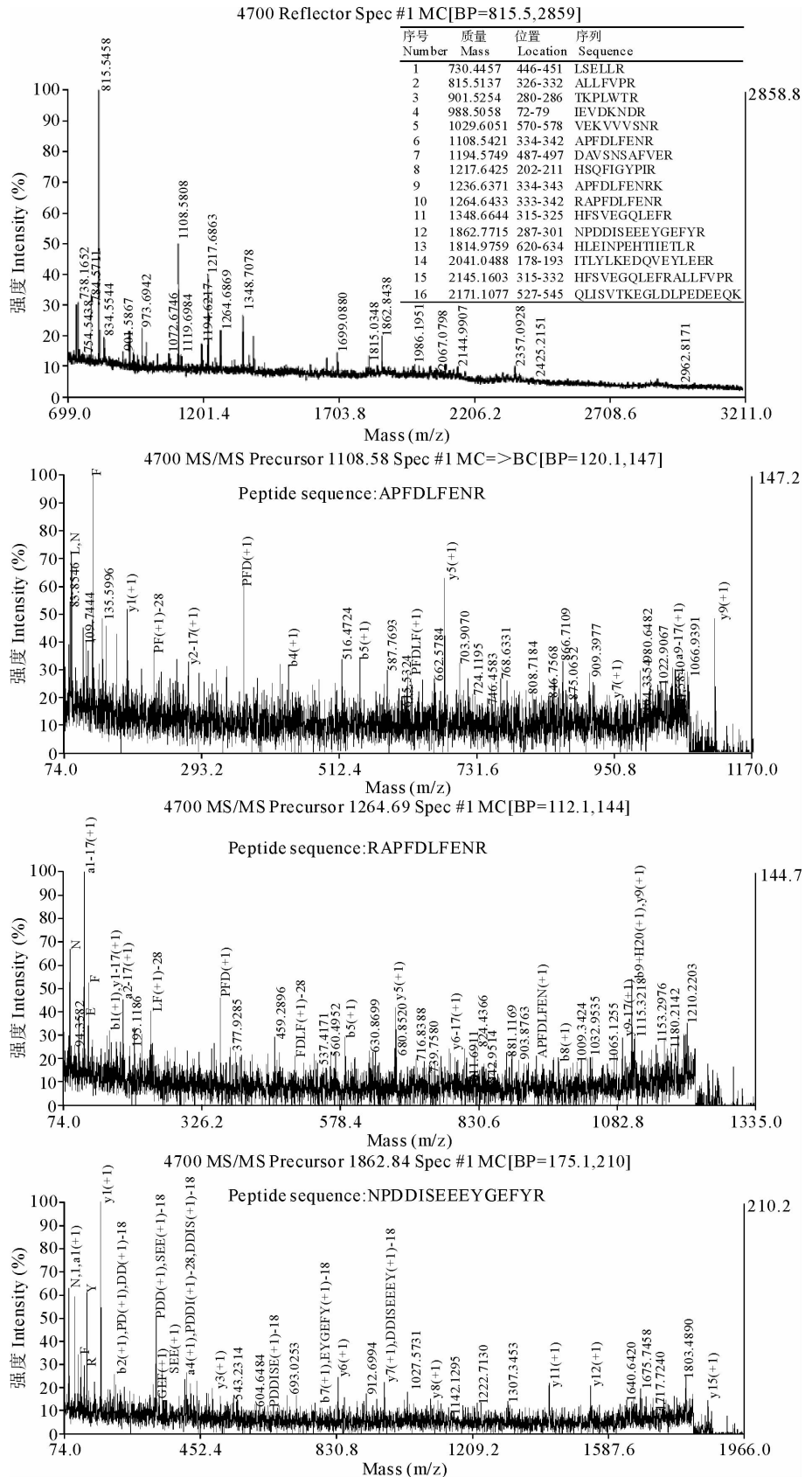


图 4 脊尾白虾重组 HSP90 目的条带质谱分析结果及匹配序列
Fig. 4 The mass spectrometric analysis of *E. carinicauda* recombinant HSP90 and result of sequence matching

eri HSP90 基因的高表达。关于海洋生物 HSP90 基因的功能还有很多尚未发现,因此对该基因的研究具有重要的意义。

目前关于海洋生物 HSP90 基因的原核表达研究甚少,原核表达可获得大量具有生物学活性的重组蛋白,并且可以为进一步研究其功能奠定基础。本研究中成功获得了含脊尾白虾 HSP90 基因的重组蛋白,这可为后续工作如纯化蛋白、获得大量纯化蛋白、抗体制备等提供前提条件,为进一步更深入地研究其功能、作用机制等奠定基础。

参 考 文 献

- 尹长城,黄 华. 2002. 大肠杆菌表达系统. 北京:北京医科大学出版社,166~168
- 田丽红,华育平. 2010. 虎源猫泛白细胞减少症病毒 VP2 基因主要抗原表位区的原核表达和蛋白纯化. 东北林业大学学报,38(6):97~100
- 刘礼兵,刘 云,何华庆,李永辉,徐琪寿. 2006. qa-3 稀有密码子和 mRNA 结构改造及其在大肠杆菌中的高效表达. 生物工程学报,22(2):198~203
- 曲凌云,孙修勤,相建海,洪旭光,张进兴. 2004. 热休克蛋白研究进展. 海洋科学进展,22(3):385~391
- 陈 奕,丁 健. 2004. 热休克蛋白 90——癌症治疗的新靶点. 癌症,23(8):968~974
- 陈卫平. 2005. 不同温度、盐度下脊尾白虾 *Exopalaemon carinicauda* (Holthuis) 早期胚胎和幼体发育的观察研究. 现代渔业信息,20(5):23~26
- 李 薇,张其中,张占会,崔 森,姚占娟,何毛贤. 2010. 近江牡蛎热休克蛋白 70 基因的原核表达研究. 中国水产科学,17(3):424~430
- 苏友禄,冯 娟,孙秀秀,郭志勋,闫云峰,黄剑南. 2009. 赤点石斑鱼神经坏死病毒 MCP 基因原核表达条件优化. 安徽农业科学,37(6):2 422~2 424,2 429
- 吴 任,谢数涛,孙 勇,颜六青,张其中. 2006. 凡纳滨对虾热休克蛋白 70 的原核高效表达. 中国水产科学,13(2):305~309
- 张俊河,胥玉玺,王天云,杨保胜. 2007. 盐藻 14-3-3 蛋白基因原核表达条件的优化. 新乡医学院学报,24(1):1~3
- 岳盈盈,李 鹏,李志会,宋楠楠,赵元昊,纪 璇,孟 红. 2010. 风疹病毒包膜糖蛋白 E1 的原核表达及条件优化. 山东医药,50(3):18~19
- Blake, R. D., and Hinds, P. W. 1984. Analysis of the codon bias in *E. coli* sequences. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 2(3): 593~606
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. Anal. Biochem. 72(1-2): 248~254
- Chen, P., Li, J. T., Li, J., Liu, P., Gao, B. Q., and Wang, Q. Y. 2010. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase gene in swimming crab *Portunus trituberculatus*. Fish & Shellfish Immunology, 28(1): 106~112
- Gao, Q., Zhao, J. M., Song, L. S., Qiu, L. M., Yu, Y. D., Zhang, H., and Ni, D. J. 2008. Molecular cloning, characterization and expression of heat shock protein 90 gene in the haemocytes of bay scallop *Argopecten irradians*. Fish & Shellfish Immunology, 24(4): 379~385
- Gao, Q., Song, L. S., Ni, D. J., Wu, L. T., Zhang, H., and Chang, Y. Q. 2007. cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 90 gene in the haemocytes of Zhikong scallop *Chlamys farreri*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 147(4): 704~715
- Li, C., Zhao, J., Song, L., Mu, C., Zhang, H., Gai, Y., Qiu, L., Yu, Y., Ni, D., and Xing, K. 2008. Molecular cloning, genomic organization and functional analysis of an antilipoplysaccharide factor from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. Dev. Comp. Immunol. 32(7): 784~794
- Li, F. H., Luan, W., Zhang, C. S., Zhang, J. Q., Wang, B., Xie, Y. S., Li S. H., and Xiang, J. H. 2008. Cloning of cytoplasmic heat shock protein 90 (FhHSP90) from *Fenneropenaeus chinensis* and its expression response to heat shock and hypoxia. Cell Stress and Chaperones, 14(2): 161~172
- Li, P., Zha, J., Zhang, Z. H., Huang, H., Sun, H. Y., Song, D. X., and Zhou, K. Y. 2009. Molecular cloning, mRNA expression, and characterization of HSP90 gene from Chinese mitten crab *Eriocheir japonica sinensis*. Comparative Biochemistry and Physiology, 153(3): 229~235
- Rungrasamee, W., Leelatanawit, R., Jiravanichpaisal, P., Klinbunga, S., and Karoonuthaisiri, N. 2010. Expression and distribution of three heat shock protein genes under heat shock stress and under exposure to *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon*. Dev. Comp. Immunol. doi:10.1016/j.dci.2010.05.012
- Sorensen, M. A., Kurland, C. G., and Pedersen, S. 1989. Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli*. Journal of Molecular Biology, 207(2): 365~377
- Sung, W. L., Zahab, D. M., Barbier, J. R., Watson, D., Yaguchi, M., Neugebauer, W., and Willick, G. E. 1991. Specific degenerate codons enhanced selective expression of human parathyroid hormone in *Escherichia coli*. Journal of Biology Chemistry, 266(5): 2 831~2 835
- Wu, L. T., and Chu, K. H. 2008. Characterization of heat shock protein 90 in the shrimp *Metapenaeus ensis*: evidence for its role in the regulation of vitellogenin synthesis. Mol. Reprod. Dev. 75(5): 952~959
- Yue, F., Pan, L. Q., Xie, P., Zheng, D. B., and Li, J. 2010. Immune responses and expression of immune-related genes in swimming crab *Portunus trituberculatus* exposed to elevated ambient ammonia-N stress. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 157(3): 246~251
- Zhang, X. Y., Zhang, M. Z., Zheng, C. J., Liu, J., and Hu, H. J. 2009. Identification of two hsp90 genes from the marine crab, *Portunus trituberculatus* and their specific expression profiles under different environmental conditions. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 150(4): 465~473