

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20230821001

http://www.yykxjz.cn/

边雪琼, 任宪云, 王君霞, 贾少婷, 郭建军, 赵旷诚, 刘萍, 李健, 李吉涛. 日本对虾热休克蛋白基因家族的鉴定及在发育时期的表达. 渔业科学进展, 2024, 45(6): 119–132

BIAN X Q, REN X Y, WANG J X, JIA S T, GUO J J, ZHAO K C, LIU P, LI J, LI J T. Genome-wide identification of the HSP gene family in *Penaeus japonicus* and their expression characteristics during development stages. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(6): 119–132

日本对虾热休克蛋白基因家族的鉴定 及在发育时期的表达*

边雪琼^{1,2,3} 任宪云^{2,3} 王君霞⁴ 贾少婷^{2,3} 郭建军⁴
赵旷诚^{2,3,5} 刘萍^{2,3} 李健^{2,3} 李吉涛^{2,3①}

(1. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306;

2. 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071;

3. 青岛海洋科技中心海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266237;

4. 日照市海洋与渔业研究院 山东 日照 276800; 5. 江苏海洋大学 江苏 连云港 222005)

摘要 热休克蛋白(HSPs)是一类广泛存在于原核和真核生物细胞的亚细胞区室中具有高度保守性的蛋白质,具有参与蛋白质折叠、蛋白质修复和免疫等多种功能,在机体生长发育过程中发挥重要作用。为进一步研究日本对虾(*Penaeus japonicus*) hsp 基因家族特征及在胚胎发育时期的表达特征,本研究通过生物信息学技术对日本对虾 hsp 进行鉴定,并对其结构域、基因结构、染色体定位、编码蛋白的理化性质和在胚胎不同发育时期的表达特征进行分析,鉴别出 15 个 *Pjhsp* 基因,包括 1 个 *Pjhsp10*、2 个 *Pjhsp20*、2 个 *Pjhsp40*、1 个 *Pjhsp60*、6 个 *Pjhsp70* 和 3 个 *Pjhsp90*,其中,7 个蛋白的理化性质较稳定,不稳定系数小于 40;亚细胞定位结果显示,7 个 *PjHSP* 定位到细胞质,2 个定位到细胞核,2 个定位到细胞外基质,2 个定位到内质网,2 个定位到线粒体。*Pjhsp* 基因家族中 *Pjhsp40*-15.349、*Pjhsp70*-39.287 和 *Pjhsp70*-1.298 等在胚胎时期大量表达;*Pjhsp20*、*Pjhsp70*-3.662、*Pjhsp70*-15.369、*Pjhsp70*-32.916 和 *Pjhsp90*-12.759 等在幼体发育时期大量表达。本研究明确了日本对虾 hsp 家族的基因特征、系统进化关系及其在发育时期的表达规律,丰富了日本对虾 hsp 家族的基础信息,为进一步探讨该家族在日本对虾生长发育中的作用提供了参考。

关键词 日本对虾;热休克蛋白;发育时期;表达规律

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)06-0119-14

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs),又称热应激蛋白,根据其分子量,可分为 HSP100、HSP90、HSP70、HSP60 和小分子热休克蛋白(sHSPs) 5 个主要

家族(Jee, 2016)。Ritossa (1962)首次在果蝇(*Drosophila melanogaster*)中发现 HSP,随着进一步研究,发现其广泛存在于从细菌到哺乳动物等体内(Baringou *et al*,

* 山东省农业良种工程项目(2023LZGC020)、2023 年青岛市海洋科技创新专项海洋产业关键技术攻关项目(23-1-3-hygg-21-hy)、中国水产科学研究院基本科研业务费(20603022022021; 20603022023003)、国家虾蟹产业技术体系(CARS-48)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2023TD50)共同资助。边雪琼, Email: bxq20123@163.com

① 通信作者: 李吉涛, 研究员, Email: lij@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2023-08-21, 收修改稿日期: 2023-09-15

2016; Qiu *et al*, 2023; Salway *et al*, 2011; Wu *et al*, 2022)。研究发现, HSPs 在早期胚胎发育和生殖细胞成熟过程中发挥重要作用, 可能与生长发育过程中细胞的增殖、形态变化和细胞凋亡有关(Rupik *et al*, 2011; Wang *et al*, 2016)。Dmhsp70-A 和 Dmhsp70-B 在大型蚤(*Daphnia magna*)无性生殖胚胎发育过程中表现出相似的变化趋势, 在有性生殖胚胎发育过程中则完全不同, 但均处于较高的表达水平(Chen *et al*, 2021); Li 等(2022)利用 RNAi 技术研究 hsp70 对丰年虫(*Artemia salina*)幼体的保护作用, 结果显示, 与具有 hsp70 的幼体相比, 敲除 hsp70 的幼体存活率显著下降; Takahashi 等(2010)研究发现, hsp 参与果蝇的发育; hsp70 在黄条鲷(*Seriola quinquerad*)胚胎发育各阶段均表达, 且在原肠期显著上调直至孵化出膜达到峰值(方璐等, 2023); hsp90 在鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)原肠期及以后时期均维持在较高水平(Wang *et al*, 2015); hsp90 在光裸星虫卵母细胞不同发育时期表达, 且在卵黄旺盛合成前期和外排卵母细胞期显著高表达(周丹等, 2020)。

日本对虾(*Penaeus japonicus*), 又称日本囊对虾, 其分布极广, 在中国沿海、日本、东南亚及红海等均有分布, 是中国、日本和东南亚等国家重要的商业虾种之一。据 2023 年中国渔业统计年鉴数据, 我国日本对虾海水养殖面积达 2.1 万 hm^2 , 2022 年日本对虾海水养殖总产量达 4.6 万 t (农业农村部渔业渔政管理局, 2023)。已有相关研究表明, hsp 在日本对虾中广泛存在, 且在生长发育中发挥重要作用, 如 hsp10 和 hsp60 在日本对虾各组织中均有表达且 hsp60 在早期发育阶段表达具有显著差异, 进一步研究发现, HSP10 与热休克因子(HSF)间存在互相作用(Zheng *et al*, 2018、2020a、2020b)。以上研究都是基于单个基因, 但基于 hsp 家族在日本对虾生长发育中较为系统的研究尚未报道。目前, 本实验室已完成日本对虾基因组测序工作(Ren *et al*, 2022), 为解析 hsp 在日本对虾生长发育的分子机制提供了基础数据。

本研究拟通过生物信息学方法对日本对虾 hsp 基因家族进行鉴定和分析, 并分析其在日本对虾发育时期的表达规律。通过生物信息学方法在日本对虾全基因组中鉴定出 hsp 基因家族的 15 个成员, 分析它们的基因结构、基序组成、染色体定位和系统进化特征, 并利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)技术研究日本对虾 hsp 基因家族在胚胎发育不同时期的表达规律, 旨在为探讨 hsp 在日本对虾生长发育中的作用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 Pjhsps 基因家族成员的鉴定及蛋白特征分析

日本对虾基因组数据来自本实验室(Ren *et al*, 2022), 同时在 Ensembl 和 NCBI 数据库中分别下载人(*Homo sapiens*)、狗(*Canis lupus familiaris*)、果蝇、小鼠(*Mus musculus*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)、刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)、脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)、克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)已发表的 HSP 蛋白序列作为参考。使用 TBtools 软件(Chen *et al*, 2020)从日本对虾基因组中进行 CDS 序列提取并翻译为蛋白序列, 使用 TBtools 软件的 BLASTP 程序对日本对虾基因组进行多序列比对, 筛选出 hsp 基因家族成员。利用 ExPASy (<https://www.expasy.org/>) (Gasteiger *et al*, 2005)网站的 ProtParam 程序预测 HSP 的分子量、等电点、不稳定系数和亲水性平均系数等分子特征, 利用 PSORT 网站(<https://psort.hgc.jp/form2.html>)(Nakai *et al*, 2019)对 HSP 进行亚细胞定位。

1.2 PjHSP 的系统发育分析

使用 MEGA 11 (Tamura *et al*, 2021)软件中的 ClustalW 分别对 PjHSP 和上述物种中已鉴定的 HSP 蛋白序列进行多序列比对, 基于相邻连接法(neighbor-joining, NJ)构建系统发育树, bootstrap 检测重复 500 次。使用在线网站 ChiPlot (<https://www.chiplot.online/index.html>)(Xie *et al*, 2023)对发育树进行优化和展示。

1.3 Pjhsps 基因特征分析

为分析日本对虾 hsp 的基因结构, 使用 TBtools 软件(Chen *et al*, 2020)从日本对虾基因组注释文件中提取 hsp 基因的结构信息, 使用 GSDS 网站(<http://gsds.gaHSPo-lab.org/>)(Hu *et al*, 2015)绘制基因结构图。

使用 MEME Suite 网站(<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)(Bailey *et al*, 2015)对 HSP 蛋白序列的保守基序进行预测分析。设置每个序列 0 或 1 个基序, 最大基序数为 30 个, 最佳基序宽度为 30~100 个氨基酸。

使用 NCBI Batch Web CD-Search Tool 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrps>

b.cgi) (Marchler-Bauer *et al*, 2010)预测 HSP 保守结构域。使用 TBtools 软件对其进行可视化处理, 并对 *Pjhs*p 家族成员进行染色体定位和可视化处理(Chen *et al*, 2020)。

1.4 样品采集

实验用日本对虾亲虾来自台湾澎湖群体。挑选性腺发育Ⅳ期或以上亲虾培育产卵, 取卵进行镜检和取样。日本对虾发育分期参照 Hudinaga (1942)的研究, 合子期(MZ)、囊胚期(B)、原肠期(G)、肢芽期(LB)和膜内无节期(IN)均用 200 目纱网过滤后取 30 颗卵, 无节幼体 I 期(N1)、蚤状幼体 I 期(Z1)、糠虾 I 期(M1)和仔虾 I 期(P1)均用 80 目纱网过滤后取 15 尾。所有样品置于 2 mL 冻存管后迅速放入液氮罐中, 后转入 -80 ℃冰箱保存, 用于后期 RNA 的提取。

1.5 *Pjhs*p 在日本对虾发育不同时期的表达分析

采用 Trizol 法提取 RNA, 使用分光光度计和琼脂凝胶电泳检测 RNA 纯度和质量。使用 HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)(诺唯赞)合成 cDNA。利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物(表 1), EF1- α 为内参基因, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。使用 ChamQ SYBR Color qPCMaster Mix (诺唯赞)进行 qRT-PCR 检测 *Pjhs*p 在日本对虾发育不同时期的表达量。反应体系 20 μ L: 10 μ L 2 $\times$ ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix、0.4 μ L 50 $\times$ ROX Reference Dye 1、0.4 μ L 上游引物、0.4 μ L 下游引物、2 μ L 模板和 6.8 μ L ddH₂O。反应程序: 95 ℃预变性 30 s; 95 ℃变性 10 s, 60 ℃退火 30 s, 循环 40 次; 溶解曲线: 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 60 s, 95 ℃ 15 s。

1.6 数据分析

采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak *et al*, 2001)方法计算基因相对表达量。结果用平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示。用 SPSS 26.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan 多重比较, 显著性水平设为 $P<0.05$ 。GraphPad Prism 软件制作折线图。

2 结果

2.1 *Pjhs*p 基因家族成员的鉴定及蛋白特征分析

日本对虾基因组中共鉴定出 15 个 *hs*p 基因家族成员, 根据保守结构域分析, 对其进行初步分类, 将其分为 *Pjhs*p10、*Pjhs*p20、*Pjhs*p40、*Pjhs*p60、*Pjhs*p70 和 *Pjhs*p90 6 个基因家族。各家族成员的基因 ID、蛋白名称、蛋白序列长度和分子量大小等信息如表 2 所

示。*PjHSP* 蛋白序列长度为 102~795 个氨基酸, 分子量范围为 10.95~91.48 kDa, 其中, *PjHSP*90-25.279 最长, 为 795 aa; *PjHSP*10-19.517 最短, 为 102 aa。蛋白质等电点范围为 4.54~9.33, 其中, *PjHSP*20-1.821 等电点最小, *PjHSP*70-15.369 等电点最大。蛋白质不稳定系数大于 40 的包括 *PjHSP*20-1.748、*PjHSP*20-1.821、*PjHSP*40-21.13、*PjHSP*70-15.369、*PjHSP*70-1.298、*PjHSP*90-12.759、*PjHSP*90-25.279 和 *PjHSP*90-31.274, 其他小于 40。蛋白疏水性计算分析表明, 除了 *PjHSP*10-19.517 有疏水性, 其他蛋白均有一定程度的亲水性。亚细胞定位结果显示, 细胞质中有 7 个, 细胞核中有 2 个, 细胞外基质中有 2 个, 内质网中有 2 个, 线粒体中有 2 个。

表 1 实验所用引物序列
Tab.1 Sequence of primers used in this study

引物名称 Prime name	引物序列 Primer sequence (5'~3')
PjHSP10-19.517	GAAGTCGGTAGCCAAGGTCC TTTGTGCCGCCAAACTCA
PjHSP20-1.748	TTTCGGGTCCGCAAGAGCA ATCGGTGTGCTTCCATCC
PjHSP20-1.821	TTTCCTCTTCCCGAGCCT CTTGAATCAGCAGTTGCCTTA
PjHSP40-21.13	TTCGACTACACCTTCCCAACG GGCTGAGATGATGTGCGAGA
PjHSP40-15.349	ACTCAGAAGTCCAGTGCGGTG GAAGTTCCCAAATTCGTTGTC
PjHSP60-19.518	GGATGTGCGCAGAACGATGTCTAG CGAGGTACTTCGATGGAATGATTAA
PjHSP70-39.287	CTGGCTCGACGTTACTCCTTTATCTC AATACCTGTGATTTGCGAGTG
PjHSP70-15.369	TCGAGCTGACAGGCATCC TCCTCGGAGCGGTATTTCT
PjHSP70-3.662	ACAAGTCCATCAACCCAGACG ATTGTGGTATTGCGTTTAATGAGGG
PjHSP70-1.298	GGAAGTACGTCTGGGTGGAA CAAGCGAATCGGTCAA
PjHSP70-29.326	TTCAGGCTGGCGTTTCTGT TACCAAGGGTCAAGGGGTTTC
PjHSP70-32.916	ACTGCTGGAGGTGTGATGACTG GAGTAGGTGGTGAAGGTCTGAGTC
PjHSP90-12.759	TTCTACACCTCCGCTTCCG GTATGGGGTCAGTCATGTAGATG
PjHSP90-25.279	AAACTACAGGAGTCGGAGAATG CACGAGGATCTTCGACAACTGA
PjHSP90-31.274	ATAATGCCGAGGGCGGTCTG ATGGGTCTCAAGGCGAGGTG
EF1- α	GGAAGTGGAGGCAGGACC AGCCACCGTTTGCTTCAT

表 2 *Pjhsp* 基因家族蛋白质组成和理化性质
Tab.2 Protein composition and physicochemical properties of *Pjhsp* gene family

基因 ID Gene ID	基因名称 Gene name	蛋白 长度 Protein length	分子大小 Mol. weight /kDa	等电点 pI	不稳定 系数 Instability index	疏水性 Grand average of hydropathicity	亚细胞定位 Localization
evm.model.Hic_asm_19.517	<i>Pjhsp10-19.517</i>	102	10.95	7.97	19.85	0.10	细胞质 Cytoplasm
evm.model.Hic_asm_1.748	<i>Pjhsp20-1.748</i>	344	39.45	6.03	43.08	-0.85	细胞核 Nucleus
evm.model.Hic_asm_1.821	<i>Pjhsp20-1.821</i>	134	14.85	4.54	66.92	-0.33	细胞核 Nucleus
evm.model.Hic_asm_21.13	<i>Pjhsp40-21.13</i>	263	29.71	9.19	47.34	-0.89	细胞质 Cytoplasm
evm.model.Hic_asm_15.349	<i>Pjhsp40-15.349</i>	233	26.20	6.07	34.41	-0.74	细胞外基质 ECM
evm.model.Hic_asm_19.518	<i>Pjhsp60-19.518</i>	558	58.68	5.41	28.72	-0.04	线粒体 Mitochondrion
evm.model.Hic_asm_39.287	<i>Pjhsp70-39.287</i>	680	73.87	5.58	30.36	-0.41	线粒体 Mitochondrion
evm.model.Hic_asm_15.369	<i>Pjhsp70-15.369</i>	633	70.36	9.33	42.21	-0.64	细胞质 Cytoplasm
evm.model.Hic_asm_3.662	<i>Pjhsp70-3.662</i>	639	70.27	5.64	33.70	-0.48	细胞质 Cytoplasm
evm.model.Hic_asm_1.298	<i>Pjhsp70-1.298</i>	629	69.93	5.57	46.40	-0.34	细胞外基质 ECM
evm.model.Hic_asm_29.326	<i>Pjhsp70-29.326</i>	654	72.46	4.97	28.29	-0.49	内质网 ER
evm.model.Hic_asm_32.916	<i>Pjhsp70-32.916</i>	652	71.54	5.29	39.57	-0.47	细胞质 Cytoplasm
evm.model.Hic_asm_12.759	<i>Pjhsp90-12.759</i>	563	65.40	5.40	43.56	-0.66	细胞质 Cytoplasm
evm.model.Hic_asm_25.279	<i>Pjhsp90-25.279</i>	795	91.48	4.74	45.46	-0.68	内质网 ER
evm.model.Hic_asm_31.274	<i>Pjhsp90-31.274</i>	539	60.98	5.38	42.70	-0.34	细胞质 Cytoplasm

2.2 系统发育分析

基于日本对虾、凡纳滨对虾、斑节对虾、中国对虾、克氏原螯虾、刀额新对虾、脊尾白虾、三疣梭子蟹、中华绒螯蟹、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)、黑腹果蝇、斑马鱼、小鼠、二化螟(*Chilo suppressalis*)、沙葱茭叶甲(*Galeruca daurica*)和麦红吸浆虫(*Sitodiplosis mosellana*)中已鉴定的 HSP 建立系统发育树(图 1)。发育树主要分为 3 大支,其中,HSP10、HSP20 和 HSP60 家族聚为一支,HSP40 和 HSP90 蛋白家族聚为一支,HSP70 家族单独聚为一支。在 HSP10 家族中,PjHSP10-19.527 与斑节对虾、中国对虾和凡纳滨对虾等 HSP10 聚为一支;在 HSP20 家族中,PjHSP20-1.748 与 PjHSP20-1.821 单独聚为一支;在 HSP40 家族中,PjHSP40-21.13 和 PjHSP40-15.349 单独聚为一支;在 HSP60 家族中,PjHSP60-19.518 与中国对虾和凡纳滨对虾 HSP60 聚为一支;在 HSP70 家族中,PjHSP70-32.916 与日本对虾 HSP70 聚为一支,然后与斑节对虾和脊尾白虾 HSP70 聚为一支,最后分别与 PjHSP70-15.369、PjHSP70-3.662、PjHSP70-29.326、PjHSP70-39.287 和 PjHSP70-1.298 聚为一大支;在 HSP90 家族中,PjHSP90-25.279 先与凡纳滨对虾和斑马鱼 HSP90 聚为一支,然后与

PjHSP90-12.729 和 PjHSP90-31.274 聚为一支。

2.3 基因结构特征分析

图 2 所示为 *Pjhsp* 基因家族 15 个成员的基因结构示意图。不同的基因在染色体上长度不同,且内含子长度及数量均存在差异,其中,*Pjhsp90-25.279* 内含子数量最多(14 个),其次是 *Pjhsp70-39.287*,含 13 个内含子,*Pjhsp70-15.369* 和 *Pjhsp70-32.916* 中未发现内含子。

Motif 分析显示(表 3 和图 3),蛋白序列长度在 30~100 个氨基酸之间,同一 HSP 蛋白家族中 motif 排列顺序和数量相似,不同家族间 motif 差异较大。其中,motif 12、motif 15、motif 17、motif 25 和 motif 28 分别由 2 个家族共有,其他 motif 均具有家族特异性。*PjHSP10-19.517* 中未发现 motif;*PjHSP20* 家族和 *PjHSP40* 家族均有 4 个 motif;*PjHSP60* 家族有 3 个 motif;*PjHSP70* 家族和 *PjHSP90* 家族均有 12 个 motif。

结构域分析显示(图 3),*PjHSP10-19.517* 含有 cpn10 结构域;*PjHSP20-1.748* 和 *PjHSP20-1.821* 含有 metazoan ACD 结构域;*PjHSP40-21.13* 和 *PjHSP40-15.349* 含有 DnaJ bact superfamily 结构域;*PjHSP60-19.518* 含有 GroEL 结构域;*PjHSP70-15.369*、*PjHSP70-32.916*、*PjHSP70-3.662* 和 *PjHSP70-29.326* 含有

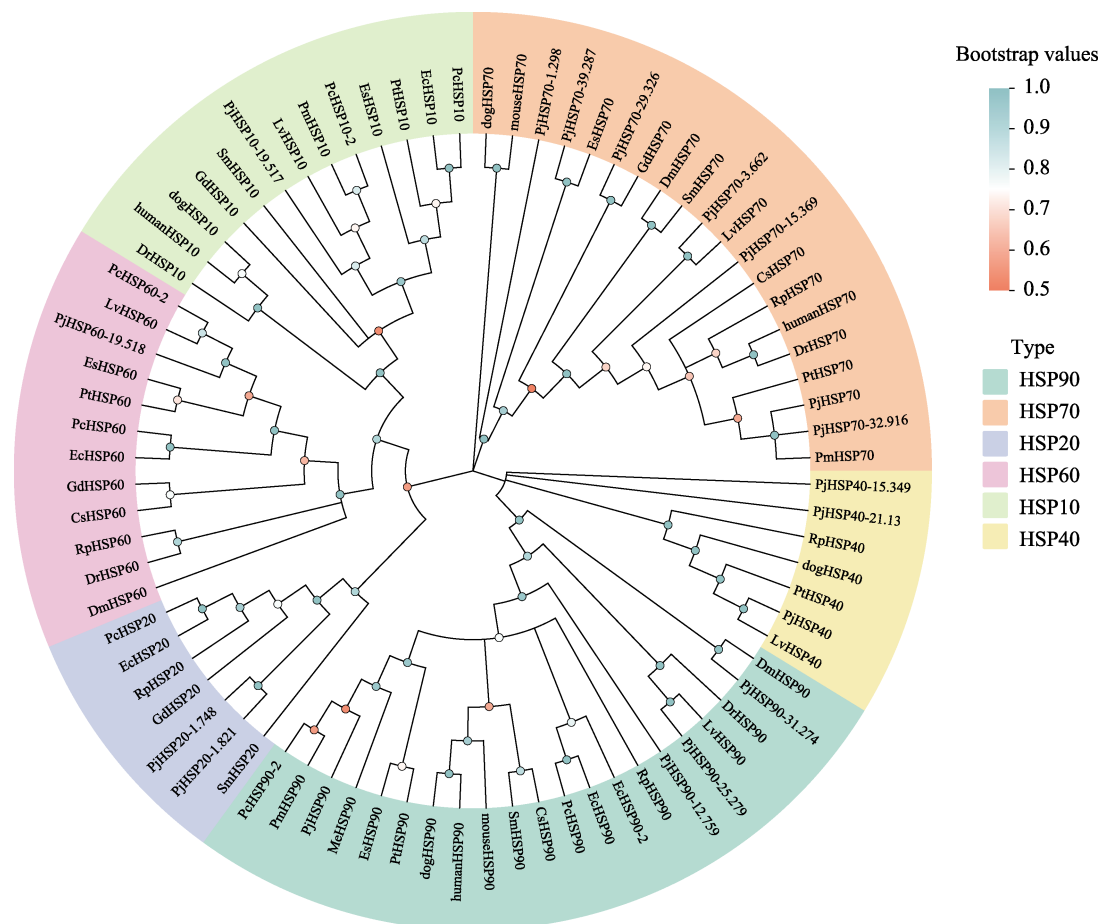
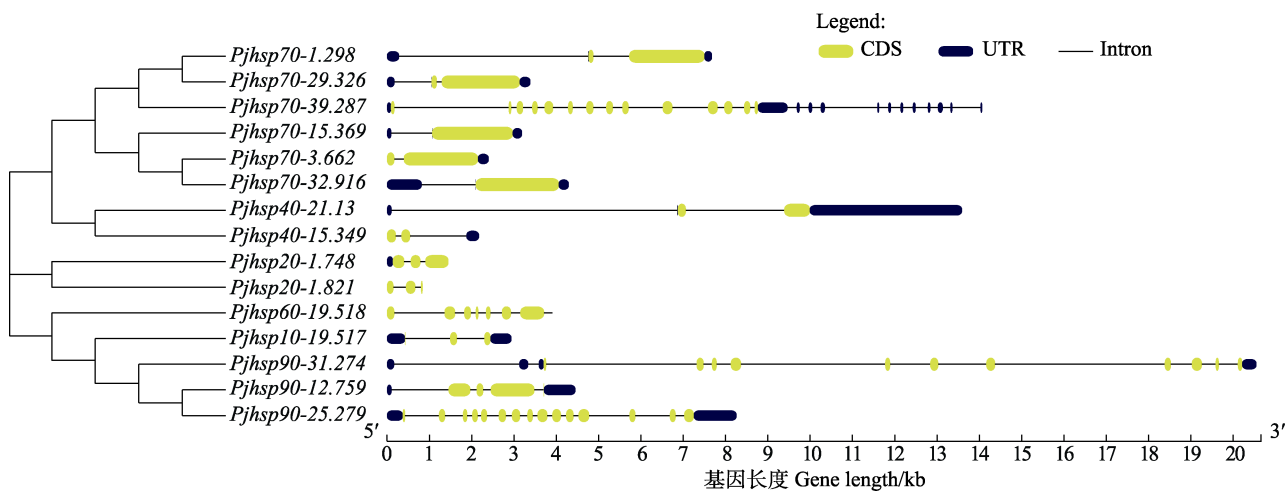


图 1 16 个物种 HSP 系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of HSP among sixteen species

Pj: 日本对虾; Lv: 凡纳滨对虾; Pm: 斑节对虾; Fc: 中国对虾; Pc: 克氏原螯虾; Me: 刀额新对虾; Ec: 脊尾白虾; Pt: 三疣梭子蟹; Es: 中华绒螯蟹; Rp: 菲律宾蛤仔; Dm: 黑腹果蝇; Dr: 斑马鱼; mouse: 小鼠; Cs: 二化螟; Gd: 沙葱莢叶甲; Sm: 麦红吸浆虫; dog: 狗; human: 人。

Pj: *Penaeus japonicus*; Lv: *Litopenaeus vannamei*; Pm: *Penaeus monodon*; Fc: *Fenneropenaeus chinensis*; Pc: *Procambarus clarkia*; Me: *Metapenaeus ensis*; Ec: *Exopalamon carinicauda*; Pt: *Portunus trituberculatus*; Es: *Eriocheir sinensis*; Rp: *Ruditapes philippinarum*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Dr: *Danio rerio*; Mouse: *Mus musculus*; Cs: *Chilo suppressalis*; Gd: *Galeruca daurica*; Sm: *Sitodiplosis mosellana*; dog: *Canis lupus familiaris*; human: *Homo sapiens*.

图 2 *PjhsP* 基因结构Fig.2 Gene structure of *PjhsP* gene family

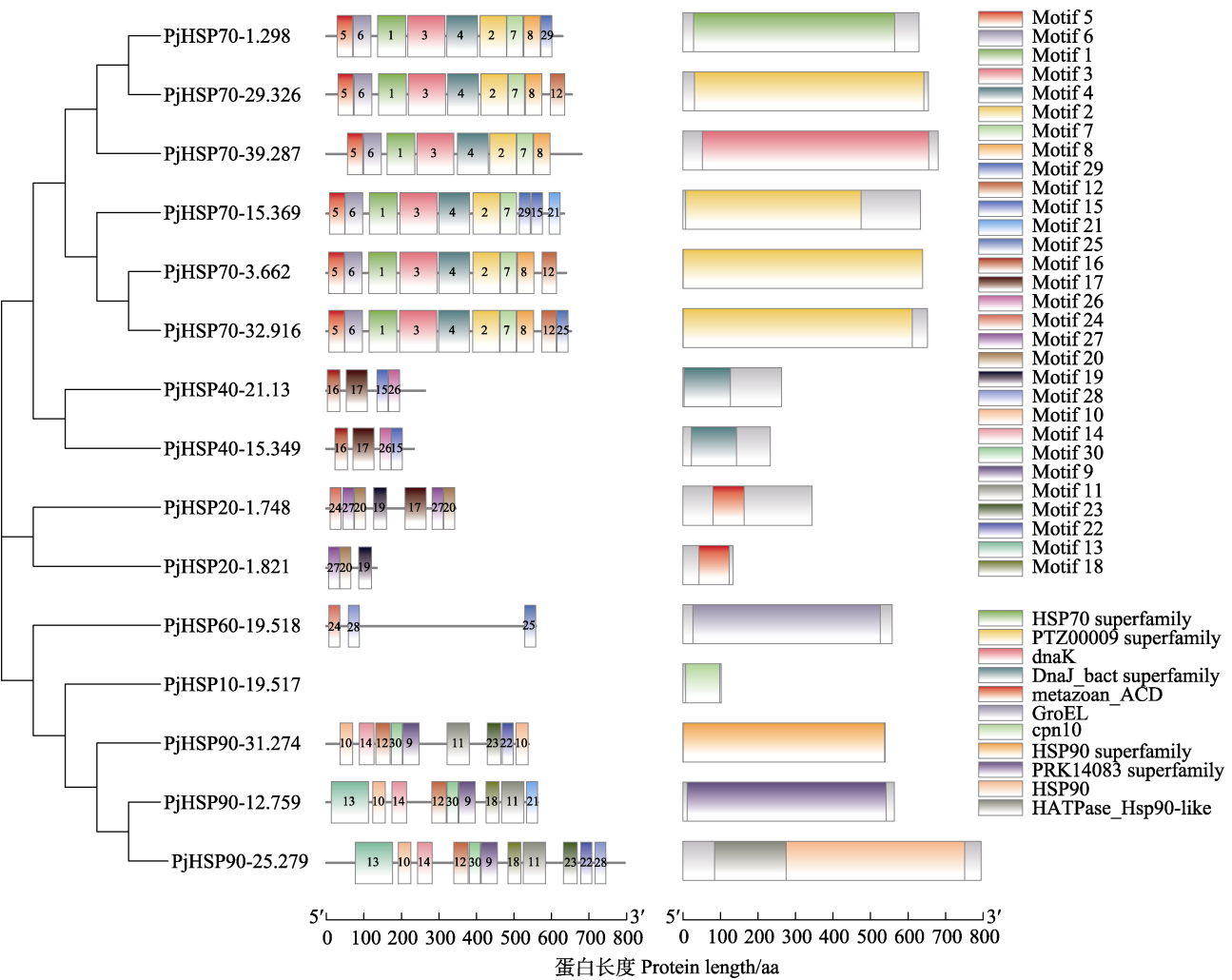


图 3 PjHSP 家族蛋白基序和结构域
Fig.3 Motifs and domains of PjHSP family

表 3 PjHSP 家族蛋白基序信息
Tab.3 Protein motif information of PjHSP family

基序 Motif	蛋白序列 Protein sequence	氨基酸数目 No. of amino acids	基因个数 No. of genes
motif 1	FYP EEISAMVLIKMKETAEAYLGSTVKDAVVTVPAYFNDSQRQATKD AGTIAGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKK	75	6
motif 2	DLLLLDVTPLSLGIETAGGVMTALIKRNTTIPTKKSQIFSTYSDNQPG VLIQVYEGERPMTKDNLLGKFEL	72	6
motif 3	IFDLGGGTFDVSILTIEDGVFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFIQ EFKRKYKDLKSKBRALRLRTACEKAKRTLSSST	82	6
motif 4	RARFEELCSDLFRGTLEPVEKALRDAKLDKAZIHDIVLVGGSTRIPKI QKLLQDFFNKGELNKSINPDEAVAYGAAVQAAILC	83	6
motif 5	IGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDDG	42	6
motif 6	RLIGDAAKNQVATNPNTVFDAKRLIGRKFDKSKVSQSDMKHWPFKIIN	48	6
motif 7	GIPPAPRGVPQIEVTFDIDANGILRVSAVDKGTGKEEKITITND	44	6
motif 8	GRLSKEEIERMVKDAEKYAEEDKKQKERIEAKNNLESYCYDLKST	45	5
motif 9	LYVRRVFIMDDAEDJPDWLNFLKGVVDSEDLPLNISRELLQQN	44	3
motif 10	IGQFGVGFYSAFLVADKVVVTSKHNDGQHIWES	34	3
motif 11	LPEYVGRMKENQKHIYYJAGPSREAVENSPFVERLKKKGFEVLYLTE PIDEYAIQQLPEF	60	3

续表 3

基序 Motif	蛋白序列 Protein sequence	氨基酸数目 No. of amino acids	基因个数 No. of genes
motif 12	NBEKPKWDDNQEIEKEEYEEFYKELEQVWEPJTKLHY	39	6
motif 13	VFQAEINRLMKLIINSFYRNKEIFLRELISNASDALDKIRLESITDKD KJENCKELAIRIEADKDNRIFHIDSGIGMTKADLVNNTI	89	2
motif 14	RGTKITLHLKEDDREFLEDRTIKDIVKKYSQFIGYPIKLW	40	3
motif 15	PHDDHHRRRRQAQGRGPGRPQAHHLQQQR	30	3
motif 16	DYYEVLJNRSASDREIKKAFRKLALKWHPDKNP	34	2
motif 17	YEVLSDEKKKKYYDHFHGKAGFSDGSGPGPGGWHTHVPARHHGD FFRDDDFDGEFPBF	57	3
motif 18	KFWDEFKNIKLGIEDSANRKKLAELLKFMSSAS	35	2
motif 19	SVSRKSFRRRFLFPKQVMDAIRSVLSCDGILTIT	35	2
motif 20	ENQRPTFSEDNQCHKIMLDVQDFMEGGVRF	30	2
motif 21	VPKEGAREGWQPDRHRDVRRGRRCWRGCAR	30	2
motif 22	RYLLQKKQLEINPRHPLIKELNRRRED DPR	30	2
motif 23	CWKVEVGPREEHPCVLVVEEFGWAGNFQKIQFSQVP	37	2
motif 24	LLRLPIARRGRRFCDA RFYDKDKDFGSEVR	30	2
motif 25	GEEPPGGMGGGGGGGGPGGGGGAGGAGGMM	30	2
motif 26	IDDFGGRGGGGFGAGAFGPFDEFDGGGGG	30	2
motif 27	LEAPDPWEDDDFHRSDRJGLRNFEERNLW	30	2
motif 28	RNMIEQSWGSGKILKDGVHFAKAVEEKDK	30	2
motif 29	GGRGDGERGREICRRGRDREENVAZEQPR	30	2
motif 30	EGZLEFKALLFVPERQPFELFEKRGQKNDN	30	3

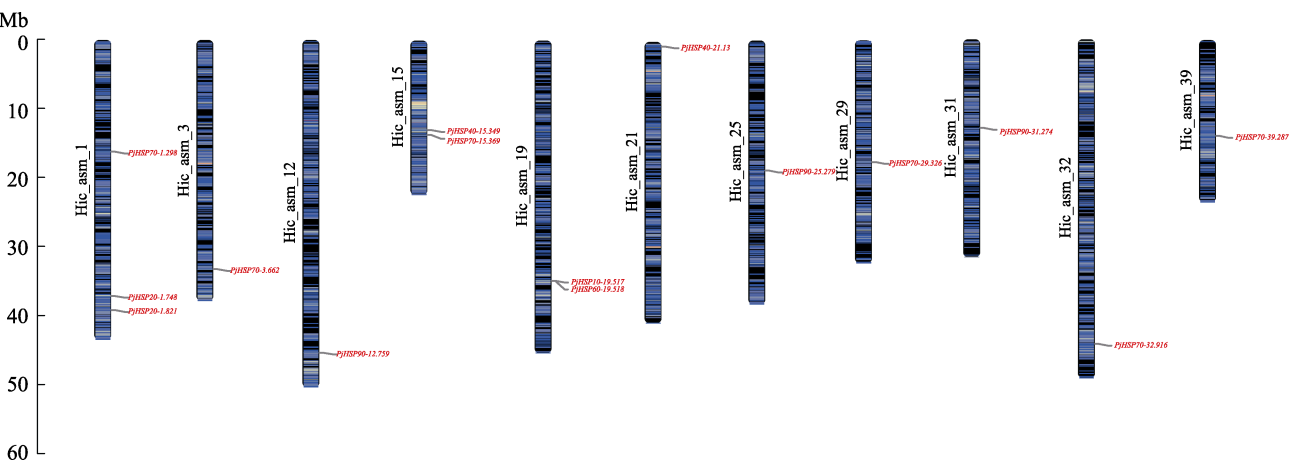


图 4 *Pjhsr* 基因家族染色体分布
Fig.4 Chromosome location of *Pjhsr* gene family

PTZ00009 superfamily 结构域, PjHSP70-39.287 含有 dnaK 结构域, PjHSP70-1.298 含有 HSP70 superfamily 结构域; PjHSP90-31.274 含有 HSP90 superfamily 结构域, PjHSP90-12.759 含有 PRK14083 superfamily 结构域, PjHSP90-25.279 含有 HATpase_HSP90-like 结构域和 HSP90 结构域。

2.4 染色体定位

Pjhsr 基因家族的 15 个基因定位在 11 条染色体上(图 4), 其中, *Pjhsr*70-1.298、*Pjhsr*20-1.748 和 *Pjhsr*20-1.821 定位在第 1 条染色体上; *Pjhsr*70-3.662 定位在第 3 条染色体上; *Pjhsr*90-12.759 定位在第 12

条染色体上; *Pjhsp40-15.349* 和 *Pjhsp70-15.369* 定位在第 15 条染色体上; *Pjhsp10-19.517* 定位在第 19 条染色体上; *Pjhsp40-21.13* 定位在第 21 条染色体上; *Pjhsp60-19.518* 定位在第 19 条染色体上; *Pjhsp90-25.279* 定位在第 25 条染色体上; *Pjhsp70-29.326* 定位在第 29 条染色体上; *Pjhsp90-31.274* 定位在第 31 条染色体上; *Pjhsp70-32.916* 定位在第 32 条染色体上; *Pjhsp70-39.287* 定位在第 39 条染色体上。

2.5 日本对虾发育不同时期 *Pjhsp* 表达分析

Pjhsp 在胚胎发育所有时期均有表达。*Pjhsp10-19.517* 在胚胎发育过程中的表达水平如图 5A 所示, 其在合子期至囊胚期表达显著下调($P<0.05$), 囊胚期至仔虾 I 期表达水平相对稳定, 在合子期达到峰值, 仔虾 I 期最低。

Pjhsp20-1.748 在胚胎发育过程中的表达水平如图 5B 所示, 其表达量在肢芽期最低且在其之前时期表达水平无显著变化($P>0.05$), 随后显著上调($P<0.05$), 在糠虾 I 期达到峰值。*Pjhsp20-1.821* 在胚胎发育过程中表达水平如图 5C 所示, 其在合子期表达量最低, 直至无节幼体 I 期之前表达相对稳定, 无显著性变化($P>0.05$), 随后表达显著上调($P<0.05$), 在糠虾 I 期达到峰值。

Pjhsp40-15.349 在胚胎发育过程中的表达水平如图 5D 所示, 其表达水平在发育前期变化较显著, 与合子期相比, 囊胚期表达显著上调($P<0.05$), 且在囊胚期达到峰值, 随后显著下调($P>0.05$), 在发育后期表达水平相对稳定。*Pjhsp40-21.13* 在胚胎发育过程中的表达水平如图 5E 所示, 其表达水平在合子期和囊胚期无显著差异($P>0.05$); 在原肠期比囊胚期的表达显著上调($P<0.05$); 在肢芽期、膜内无节期、无节幼体 I 期和蚤状幼体 I 期较稳定, 无显著差异($P>0.05$), 随后其表达显著上调, 在仔虾 I 期达到最高。

Pjhsp60-19.518 在胚胎发育过程中的表达水平如图 5F 所示, 其表达水平合子期达到峰值, 在合子期至原肠期显著下调($P<0.05$), 随后至仔虾 I 期表达水平相对稳定, 在蚤状幼体 I 期达到最低。

Pjhsp70-1.298 和 *Pjhsp70-3.662* 在胚胎发育过程中的表达水平如图 5G、I 所示, 整体变化趋势相似, 均在发育中后期大量表达。其中, *Pjhsp70-1.298* 表达水平在膜内无节期达到峰值, 在囊胚期最低; *Pjhsp70-3.662* 在肢芽期达到最高, 在仔虾 I 期最低。*Pjhsp70-39.287* 和 *Pjhsp70-32.916* 在胚胎发育过程中的表达水平如图 5H、K 所示, 表达水平变化趋势较相似, 不同的是, *Pjhsp70-39.287* 在发育前期表达水

平较高, 在囊胚期达到最高, *Pjhsp70-32.916* 在发育中后期表达较高, 在膜内无节期达到最高; *Pjhsp70-15.369* 在胚胎发育过程中的表达水平如图 5J 所示, 在合子期至无节幼体 I 期表达无显著差异($P>0.05$), 随后显著上调($P<0.05$), 在糠虾 I 期达到峰值; *Pjhsp70-29.326* 在胚胎发育过程中表达水平如图 5L 所示, 在合子期表达最高, 随后显著下调($P<0.05$), 在囊胚期至蚤状幼体 I 期无显著变化($P>0.05$), 随后显著上调($P<0.05$), 在糠虾 I 期达到较高表达水平, 最后在仔虾 I 期显著下调($P<0.05$)。

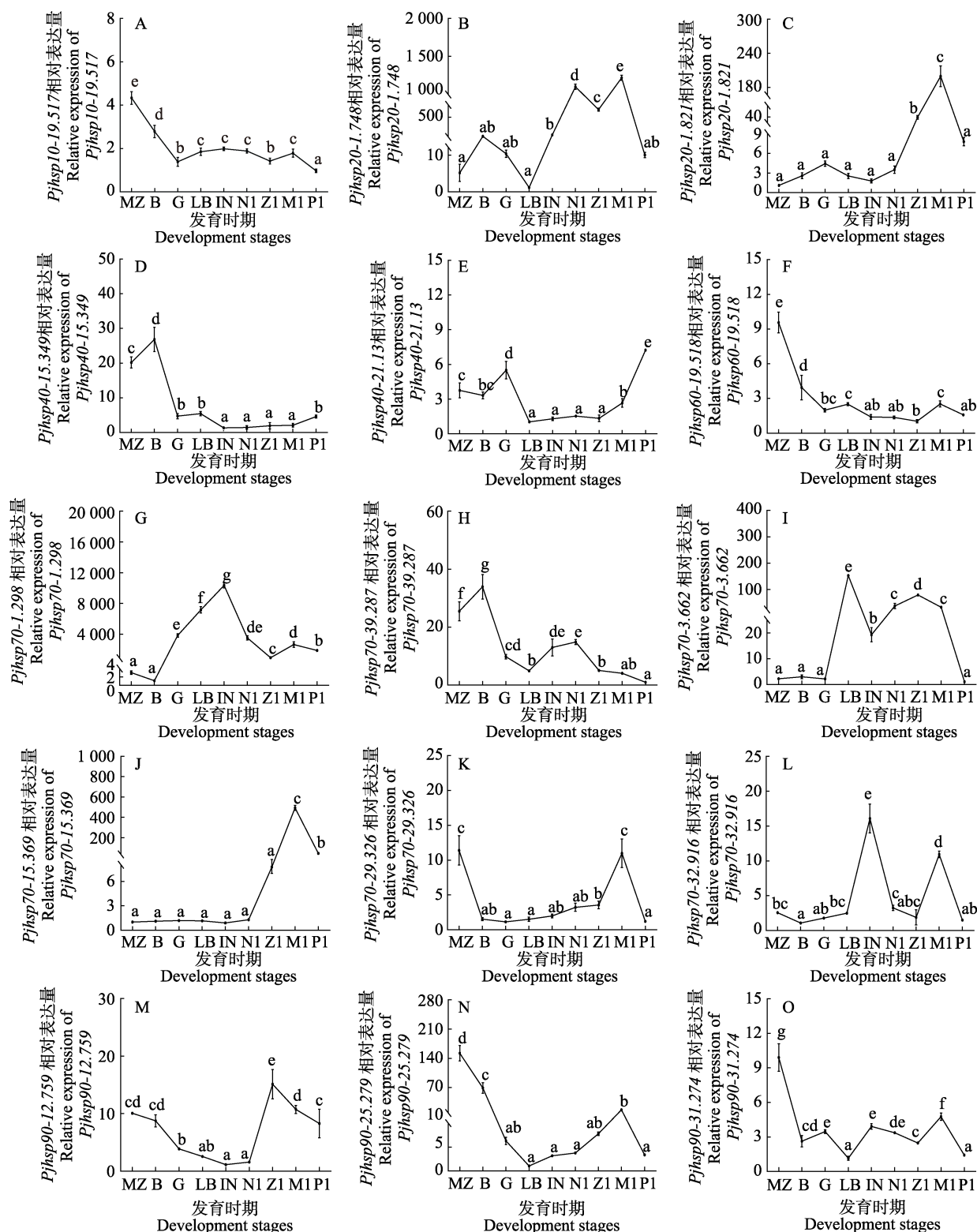
Pjhsp90-12.759 和 *Pjhsp90-25.279* 在胚胎发育过程中表达水平如图 5M、N 所示, 整体变化趋势相似, 从合子期表达下调($P<0.05$), 其中, *Pjhsp90-25.279* 在该时期表达最高, 随后分别在膜内无节期和肢芽期降至最低, 而后显著上调($P<0.05$), *Pjhsp90-12.759* 在蚤状幼体 I 期达到最高; *Pjhsp90-31.274* 在胚胎发育过程中的表达水平如图 5O 所示, 在合子期表达最高, 随后显著下调($P<0.05$), 小范围内波动变化, 在肢芽期表达最低。

3 讨论

3.1 *Pjhsp* 基因家族成员鉴定及特征分析

hsp 基因家族在亚洲长角甲虫(*Anoplophora glabripennis*)(Xu *et al.*, 2022)、猛水蚤(Harpacticoid)和剑水蚤(Cyclopoid) (Park *et al.*, 2021)等中已经报道。在甲壳动物中多数是基于单个 *hsp* 的基因特征分析及其在环境胁迫下的表达分析, 研究 *hsp* 基因家族的相关报道较少(Sergio *et al.*, 2020; Wisarut *et al.*, 2021; Kifayatullah *et al.*, 2023)。本研究在日本对虾基因组中共鉴定出 15 个 *Pjhsp* 基因家族成员, 包括 3 个 *hsp90*、6 个 *hsp70*、1 个 *hsp60*、2 个 *hsp40*、2 个 *hsp20* 和 1 个 *hsp10* 家族成员。

等电点与蛋白本身所含酸性氨基酸和碱性氨基酸的数量有关, 不同蛋白质因其氨基酸残基组成不同, 等电点也不同。本研究中, 多数 *PjHSP* 等电点 <7 , 证明其可能为酸类蛋白(吴斌, 2003; 吴松锋, 2005)。亚细胞定位发现, *PjHSP* 多数存在于细胞质中, 但在细胞区域如内质网、线粒体和细胞核中也存在, 相似的结果在马氏沼虾(*Macrobrachium malcolmsonii*)(Muthuswamy *et al.*, 2018)、黄鳝(*Monopterus albus*)(杨文林等, 2023)和多种十足类(Baringou *et al.*, 2016) *hsp* 基因家族分析中有报道。多数 *PjHSP* 首先与斑节对虾、凡纳滨对虾和中国对虾等 *HSP* 聚类, 之后与其他物种 *HSP* 聚类, 与传统分类地位关系一致。Motif

图 5 *Pjhsps* 在日本对虾不同发育时期表达水平Fig.5 Expression of *Pjhsps* during development stages of *P. japonicus*

MZ: 合子期; B: 囊胚期; G: 原肠期; LB: 肢芽期; IN: 膜内无节幼体期; N1: 无节幼体 I 期; Z1: 溞状幼体 I 期; M1: 糠虾 I 期; P1: 仔虾 I 期。不同字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

MZ: Maternal to zygotic; B: Blastocyst; G: Gastrula; LB: Limb buds; IN: Intramebranous nauplius; N1: Stage 1 of nautilus; Z1: Stage 1 of zoea; M1: Stage 1 of mysis; P1: Stage 1 of post larvae.

Significant differences between groups at $P < 0.05$ are indicated by different letters. The same below.

分析表明,在 HSP90、HSP70、HSP40 和 HSP20 蛋白家族中存在相同的 motif,例如, HSP90 家族共有 motif 9、motif 10、motif 11、motif 12、motif 14 和 motif 30。说明 *hsp* 基因家族具有高度保守性,但在一些家族中无 motif 存在,如 HSP10 家族,因此,不同的家族间功能存在较大差异。

研究表明,一些结构域在 HSPs 分子伴侣方面发挥重要作用。例如 *cpn10* 结构域,其可与 ATP 结合,且 *cpn10* 结构域可自我组装形成圆柱形复合物,把错误折叠的蛋白隔离在中间,在大分子 HSPs 下进行折叠(Lissin *et al.*, 1992); *metazoan ACD* 结构域,其与多个亚基可形成具有活性的低聚复合物,以不依赖 ATP 的形式与错误折叠的蛋白质相结合,将其隔离在低聚复合物中,并通过依赖 ATP 型大分子 HSP 促进错误折叠蛋白的重新折叠,保证其空间结构的稳定性(Liu *et al.*, 2015); *DnaJ bact superfamily* (HSP40)结构域,通过 J 结构域可与 HSP70 结合,作为辅助伴侣分子完成蛋白的正确折叠(何颖慧等, 2022); *GroEL* 结构域可与其共伴侣分子 HSP10 形成一个中间具有空腔的复合物,为蛋白质的重新折叠提供空间(付青贤等, 2019)。本研究中, *PjHSP* 蛋白家族均含有相应的结构域,表明 HSP 在分子伴侣方面发挥重要作用。

3.2 *Pjhsp* 在日本对虾发育时期的表达分析

研究表明, *hsp* 在生物体发育过程中广泛表达,并表现出复杂的变化趋势。Zheng 等(2018)研究发现, *hsp60* 在日本对虾早期发育时期的表达具有显著差异。Iryani 等(2020)研究发现, *hsp70* 在丰年虫幼体发育过程中保护机体免受环境应激。Yang 等(2019)研究发现, *hsp* 在烟草甲(*Lasioderma serricorne*)幼虫和成虫期间的表达具有显著差异。本研究中, 15 个 *Pjhsp* 在合子期至仔虾 I 期均有表达,表明 *hsp* 在日本对虾的早期发育中发挥重要作用。此外,不同基因家族变化趋势也不尽相同,如 *Pjhsp10-19.517* 与 *Pjhsp60-19.518* 的变化趋势相似,在胚胎发育时期大量表达,幼体发育时期显著下调,与 Zheng 等(2018)在日本对虾中 *hsp60* 在不同发育时期的表达的结果相似。相关研究表明, HSP60 与 HSP10 互为分子伴侣,可完成对目的蛋白的正确折叠(Okamoto *et al.*, 2015),这与本研究中 *Pjhsp60-19.518* 及 *Pjhsp10-19.517* 发育时期中的变化趋势一致。

Pjhsp 在日本对虾发育时期的变化趋势可能因为如下原因。首先,日本对虾在胚胎发育过程中经历变态,该过程需要大量合成蛋白质, HSP 作为分子伴侣参与蛋白的组装与正确折叠等过程。 *Pjhsp40*、

Pjhsp70-39.287 和 *Pjhsp70-1.298* 等基因在胚胎时期大量表达,满足胚胎对大量蛋白质的需求。其次, Liang 等(2020)发现,脊尾白虾中 *hsp90* 通过调控卵黄蛋白原的转录,间接调控胚胎发育过程中营养物质的供给,在胚胎发育过程中发挥重要作用。卵黄蛋白原作为卵黄蛋白的前体,几乎存在于所有卵生生物中,为胚胎发育提供营养(Pan *et al.*, 2019)。本研究中, *hsp90* 基因家族表达水平在合子期至肢芽期期间相对较高,推测 *hsp90* 基因家族在日本对虾胚胎发育时期显著上调表达,通过调控卵黄蛋白原的转录,满足胚胎对大量卵黄蛋白的需求,因此,日本对虾幼体表现出比胚胎时期更高的 *hsp90* 表达水平。最后,据报道,幼体时期与胚胎时期相比,其对环境应激更敏感(Lavarias *et al.*, 2022)。因此,幼体易受水体环境影响造成机体应激,从而上调 *hsp* 表达,保护机体免受环境应激的危害;此外,日本对虾自无节幼体之后由内源性营养转变为外源性进食,而后者易受到病原体 and 异生素的影响,因此, *Pjhsp90-12.759*、*Pjhsp70-3.662*、*Pjhsp70-15.369*、*Pjhsp70-32.916* 和 *Pjhsp20* 等在幼体时期上调表达可以保护幼体免受病原体和外源毒物的危害(Dai *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2022)。

4 结 论

综上所述,从日本对虾基因组中共鉴定出 15 个 *hsp*,其中 7 个 HSP 蛋白理化性质较稳定,不稳定系数小于 40;亚细胞定位结果显示, 7 个 HSP 蛋白定位到细胞质,其余分别定位在细胞核、细胞外基质、内质网和线粒体。通过 qRT-PCR 技术分析 *Pjhsp* 在发育不同时期的表达规律,结果表明,在日本对虾发育不同时期 *hsp* 均有表达,推测其在信号传导和调节细胞周期中发挥重要作用;部分 *hsp* 如 *Pjhsp40*、*Pjhsp70-39.287* 和 *Pjhsp70-1.298* 等基因在胚胎时期大量表达,推测其通过发挥分子伴侣作用满足胚胎对大量蛋白质的需求并调控卵黄蛋白原的转录满足胚胎对卵黄蛋白的需求;部分 *hsp* 如 *Pjhsp90-12.759* 和 *Pjhsp70-3.662* 等基因在幼体时期大量表达,推测其通过协同免疫作用保护机体免受环境压力和病原生物等的侵害。

参 考 文 献

- BAILEY T L, JOHNSON J, GRANT C E, *et al.* The MEME suite. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(1): 39–49
BARINGOU S, ROUAULT J D, KOKEN M, *et al.* Diversity of cytosolic HSP70 heat shock protein from decapods and their

- phylogenetic placement within Arthropoda. *Gene*, 2016, 591(1): 97–107
- Bureau of Fisheries Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook, Beijing: China Agriculture Press, 2022 [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴, 北京: 中国农业出版社, 2022]
- CHEN C, CHEN H, ZHANG Y, *et al.* TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194–1202
- CHEN L, GOMEZ R, WEISS L C. Distinct gene expression patterns of two heat shock protein 70 members during development, diapause, and temperature stress in the freshwater crustacean *Daphnia magna*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: e692517
- DAI L S, KAUSAR S, GUL I, *et al.* Molecular characterization of a heat shock protein 21 (HSP21) from red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* in response to immune stimulation. *Developmental and Comparative Immunology*, 2020, 111: e103755
- FANG L, XU Y J, CUI A J, *et al.* Molecular cloning and temporal expression pattern of *hsp70* gene during the early life stages of *Seriola aureovittata*. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(4): 55–63 [方璐, 徐永江, 崔爱君, 等. 黄条鲷*hsp70* 基因克隆及其在早期生长发育过程中的表达调控特性. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 55–63]
- FU Q X, YE Q Y. Research progress of heat shock protein 60 in nervous system diseases. *Journal of International Neurology and Neurosurgery*, 2019, 46(3): 341–345 [付青贤, 叶钦勇. 热休克蛋白 60 在神经系统疾病作用的研究进展. 国际神经病学神经外科学杂志, 2019, 46(3): 341–345]
- GASTEIGER E, HOOGLAND C, GATTIKER A, *et al.* Protein identification and analysis tools on the ExpASY server. Humana Press, 2005, 571–607
- HE Y H, WANG Z P. Molecular chaperone HSP40/DNAJ protein family and its role in neurodegenerative diseases. *Journal of Zhejiang University (Medical Sciences)*, 2022, 51: 640–646 [何颖慧, 王志萍. 分子伴侣 HSP40/DNAJ 蛋白家族及其在神经退行性疾病中的作用. 浙江大学学报(医学版), 2022, 51(5): 640–646]
- HU B, JIN J, GUO A Y, *et al.* GSDB 2.0: An upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2015, 31(8): 1296–1297
- HUDINAGA M. Reproduction, development and rearing of *Penaeus japonicus* bate. *Journal of Zoology*, 1942, 20(1): 305–389
- IRYANI M T M, MACRAE T H, SORGELOOS P, *et al.* RNA interference of HSP70 in *Artemia franciscana* nauplii and its effect on morphology, growth, survival and immune response. *Aquaculture*, 2020, 520: e735012
- JEE H. Size dependent classification of heat shock proteins: A mini-review. *Journal of Exercise Rehabilitation*, 2016, 12(4): 255–259
- KIFAYATULLAH M, GOLARA K, PAVEL K, *et al.* Heat shock proteins adaptive responses to environmental stressors and implications in health management of decapods. *Aquaculture*, 2023, 30: e101564
- KUMAR V, ROY S, BEHERA BK, *et al.* Heat shock proteins (HSPs) in cellular homeostasis: A promising tool for health management in crustacean aquaculture. *Life (Basel)*, 2022, 12(11): e1777
- LAVARIAS S M L, ARRIGHETTI F, LANDRO S M, *et al.* Sensitivity of embryos and larvae of the freshwater prawn *Macrobrachium borellii* to the latest generation pesticide spirotetramat. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 248: e114257
- LI Q, IRYANI M T M, LV A, *et al.* Effects of heat shock protein 70 knockdown on the tolerance of the brine shrimp *Artemia franciscana* to aquaculture-related stressors: Implications for aquatic animal health and production. *Aquaculture*, 2022, 550: e737872
- LIANG J P, ZHANG W L, LI H, *et al.* Abundances of vitellogenin and heat shock protein 90 during ovarian and embryonic development of *Exopalaemon carinicauda*. *Animal Reproduction Science*, 2020, 223: e106633
- LISSIN N M, SEDELNIKOVA S E, RYAZANTSEV S N. Crystallization of the cpn60/cpn10 complex ('holo-chaperonin') from *Thermus thermophilus*. *FEBS Letters*, 1992, 311(1): 22–24
- LIU L, CHEN J, YANG B, *et al.* Crystal structure and function of an unusual dimeric HSP20.1 provide insight into the thermal protection mechanism of small heat shock proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 458(2): 429–434
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- MARCHLER-BAUER A, LU S, ANDERSON J B, *et al.* CDD: A conserved domain database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Research*, 2010, 39(1): 225–229
- MUTHUSWAMY K, SHANMUGAM PREMA D, KRISHNAN V, *et al.* Differential intracellular localization of HSP70 in the gill and heart tissue of fresh water prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during thermal stress. *Molecular Biology Reports*, 2018, 45: 1321–1329
- NAKAI K, IMAI K. Prediction of protein localization encyclopedia of bioinformatics and computational biology. Oxford: Academic Press, 2019, 53–59
- OKAMOTO T, ISHIDA R, YAMAMOTO H, *et al.* Functional structure and physiological functions of mammalian wild-type HSP60. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2015, 586: 10–19
- PAN X, LIU Y, ZHOU K, *et al.* Tissue expression and bioinformatics analysis of the vitellogenin gene of Asian arowana (*Scleropages formosus*). *Journal of Applied*

- Ichthyology, 2019, 35: 970–977
- PARK J C, LEE J S. Genome-wide identification of heat shock proteins in harpacticoid, cyclopoid, and calanoid copepods: Potential application in marine ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin*, 2021, 169: e112545
- QIU Y, OZTURK S, CUI X, *et al.* Increased heat tolerance and transcriptome analysis of *Salmonella enterica* Enteritidis PT 30 heat-shocked at 42 °C. *Food Research International*, 2023, 167: e112636
- REN X, LÜ J, LIU M, *et al.* A chromosome-level genome of the Kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) provides insights into its evolution and cold-resistance mechanism. *Genomics*, 2022, 114(3): e110373
- RITOSSA F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *drosophila*. *Experientia*, 1962, 18, 571–573
- RUPIK W, JASIK K, BEMBENEK J, *et al.* The expression patterns of heat shock genes and proteins and their role during vertebrate's development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2011, 159(4): 349–366
- SALWAY K D, GALLAGHER E J, PAGE M M, *et al.* Higher levels of heat shock proteins in longer-lived mammals and birds. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2011, 132(6): 287–297
- SERGIO A U, SALVADOR E L, MARÍA T S, *et al.* *Litopenaeus vannamei* oxygen consumption and HSP gene expression at cyclic conditions of hyperthermia and hypoxia. *Journal of Thermal Biology*, 2020, 92: e102666
- TAKAHASHI K H, RAKO L, TAKANO-SHIMIZU T, *et al.* Effects of small HSP genes on developmental stability and microenvironmental canalization. *Bmc Evolutionary Biology*, 2010, 10: e284
- TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(7): 3022–3027
- WANG P F, ZENG S, XU P, *et al.* Two HSP90 genes in mandarin fish *Siniperca chuatsi*: Identification, characterization and their specific expression profiles during embryogenesis and under stresses. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2016, 42(4): 1123–1136
- WANG P, XU P, ZENG S, *et al.* Comparative analysis of sequence feature and expression of two heat shock cognate 70 genes in mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Gene*, 2015, 560(2): 226–236
- WISARUT J, PREMRUETHAI S, ANCHALEE T. Structure, gene expression, and putative functions of crustacean heat shock proteins in innate immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 2021, 115: e103875
- WU B. Study of enzyme properties in immobilized cells and molecular accessibility of protein. Master's Thesis of Wuhan University, 2003 [吴斌. 固定化细胞酶性质及蛋白质分子可及性研究. 武汉大学硕士研究生学位论文, 2003]
- WU J, GAO T, HU J, *et al.* Research advances in function and regulation mechanisms of plant small heat shock proteins (sHSPs) under environmental stresses. *Science of the Total Environment*, 2022, 825: e154054
- WU S F. Basic bioinformatic studies of proteomic expression profile and multi-modality distribution of pI values in whole proteome. Doctoral Dissertation of Chinese People's Liberation Army Academy of Military Medical Science, 2005 [吴松峰. 蛋白质组表达谱基本生物信息学研究及全蛋白质组等电点分布研究. 中国人民解放军军事医学科学院博士研究生学位论文, 2005]
- XIE J, CHEN Y, CAI G, *et al.* Tree visualization by one table (TBtools): A web application for visualizing, modifying and annotating phylogenetic trees. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(1): 587–592
- XU Y B, SHI F M, LI Y R, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of the HSP gene superfamily in Asian long-horned beetle (*Anoplophora glabripennis*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 200: 583–592
- YANG W J, XU K K, CAO Y, *et al.* Identification and expression analysis of four small heat shock protein genes in cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* (Fabricius). *Insects*, 2019, 10(5): e139
- YANG W L, WEI H B, YANG D Q. Bioinformatics analysis of physical and chemical properties and molecular structure of *Monopterus albus* HSP70. *Northern Chinese Fisheries*, 2023, 42(4): 247–253 [杨文林, 魏红波, 杨代勤. 黄鳝 HSP70 理化性质和分子结构的生物信息学分析, 黑龙江水产, 2023, 42(4): 247–253]
- ZHENG J B, LI L, DONG H, *et al.* Molecular cloning of heat shock protein 60 from *Marsupenaeus japonicus* and its expression profiles at early developmental stages and response to heat stress. *Aquaculture*, 2018, 49: 301–312
- ZHENG J B, MAO Y, SU Y, *et al.* Cross talk between heat shock protein 10 and a heat shock factor identified from *Marsupenaeus japonicus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020a, 147: 1041–1052
- ZHENG J B, WANG P, MAO Y, *et al.* Full-length transcriptome analysis provides new insights into the innate immune system of *Marsupenaeus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2020b, 106: 283–295
- ZHOU D, SU Y L, ZHONG R Z, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of HSP90 of peanut worm *Sipunculus nudus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(5): 150–159 [周丹, 苏泳霖, 钟如卓, 等. 光裸星虫 Hsp90 基因的全长克隆及其在全组织和卵母细胞中的表达分析. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 150–159]

Genome-Wide Identification of the HSP Gene Family in *Penaeus japonicus* and Their Expression Characteristics During Development Stages

BIAN Xueqiong^{1,2,3}, REN Xianyun^{2,3}, WANG Junxia⁴, JIA Shaoting^{2,3}, GUO Jianjun⁴,
ZHAO Kuangcheng^{2,3,5}, LIU Ping^{2,3}, LI Jian^{2,3}, LI Jitao^{2,3①}

(1. National Experimental Teaching Demonstration Center of Aquatic Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266237, China; 4. Rizhao Ocean and Fishery Research Institute, Rizhao 276800, China; 5. Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China)

Abstract Heat shock proteins (HSPs), also known as heat stress proteins, can be divided into five main families, including HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, and small heat shock proteins (sHSPs), according to their molecular weight. Further studies have shown that HSPs represent a class of highly conserved proteins that widely exist in the subcellular compartments of prokaryotic and eukaryotic cells. They have many functions, such as protein folding, repair, and immunity, and play important roles in organism growth and development. For example, *Dmhsp70-A* and *Dmhsp70-B* showed similar trends in the development of asexual embryos in *Daphnia magna*. However, they exhibited different trends in the development of sexual embryos despite high expression in both embryo types. *Penaeus japonicus* is one of the most important commercial shrimp species in China, Japan, and Southeast Asian countries. Relevant studies have shown that *hsp* genes widely exist in *P. japonicus* and play important roles in growth and development. For example, *hsp10* and *hsp60* were expressed in all tissues of *P. japonicus*, and the differential expression of *hsp60* was identified in the early development stages. However, previous studies were based on single genes, and more systematic studies based on the role of the *hsp* gene family in the growth and development of *P. japonicus* have not been published. Our laboratory has completed the genome sequence of *P. japonicus*, which provides basic data for analyzing the molecular mechanism of *hsp* in the growth and development of *P. japonicus*. To further study the characteristics of the *hsp* gene family in *P. japonicus* and the expression characteristics of *hsp* genes during different development stages, the *hsp* gene family of *P. japonicus* was identified and analyzed using bioinformatics methods, and variation in its expression during the development of *P. japonicus* was measured using reverse transcription and quantitative real-time (RT-qPCR). Fifteen members of the *hsp* gene family were identified from the whole genome of *P. japonicus* via bioinformatics analysis, and their gene structures, motif compositions, chromosome localizations, and phylogenetic characteristics were analyzed. The expression of *hsp* genes in maternal-to-zygotic cells, blastocysts, gastrulae, limb buds, intramembranous nauplii, stage 1 nauplii, stage 1 zoeae, stage 1 mysids, and stage 1 post-larval juveniles of *P. japonicus* was measured using qPCR. A total of 15 *hsp* genes were identified, including 1 *hsp10*, 2 *hsp20*, 2 *hsp40*, 1 *hsp60*, 6 *hsp70*, and 3 *hsp90* genes. The physicochemical properties of seven proteins were stable, with instability coefficients less than 40. Subcellular localization results showed that most of the *hsp* gene family members were located in the cytoplasm, as seven *hsp* genes were localized to the cytoplasm, two to the nucleus, two to the extracellular region, two to the endoplasmic reticulum, and two to the

① Corresponding author: LI Jitao, Email: lijiao@ysfri.ac.cn

mitochondria. Isoelectric point (pI) is related to the number and proportion of acidic and basic amino acids contained in a protein. Most HSPs exhibited a pI <7, suggesting they were acidic proteins. The 15 *hsp* genes were located on 11 chromosomes. Phylogenetic tree analysis showed that most of the HSP family members were first clustered with HSP family members from species such as *Penaeus monodon*, *Litopenaeus vannamei*, and *Fenneropenaeus chinensis* and then with HSP family members of other species, which was consistent with the traditional taxonomic status. A few HSP family members were clustered first with HSP family members from *Eriocheir sinensis*, *D. melanogaster*, and other insects, and then with HSP family members from other species. Motif analysis showed that the *hsp* gene family was highly conserved; however, the functions of different families were quite different. Structural domain analysis showed that the HSP family included cpn10-, metazoan ACD-, DnaJ bact superfamily-, GroEL-, PTZ00009 superfamily-, dnaK-, HSP70 superfamily-, HSP90 superfamily-, PRK14083 superfamily-, and HATpase_HSP90-like domains. Each gene family contained corresponding domains and was important in molecular chaperone processes. *hsp* genes were expressed in different developmental stages of *P. japonicus* and played important roles in growth and development. The trend of *Pjhsp10-19.517* was similar to that of *Pjhsp60-19.518*, which was highly expressed during embryonic development and significantly downregulated during larval development. This is consistent with the conclusion of previous studies that HSP60 and HSP10 are molecular chaperones for each other to ensure the correct folding of the target protein. The *hsp* genes such as *Pjhsp40-15.349*, *Pjhsp70-39.287*, *Pjhsp70-1.298*, and *Pjhsp90* were highly expressed in the embryonic period; *Pjhsp20*, *Pjhsp70-3.662*, *Pjhsp70-15.369*, *Pjhsp70-32.916*, and *Pjhsp90-12.759* were highly expressed during the larval period. The *hsp* genes expressed at high levels during the embryonic period satisfy the high protein requirements of embryos by playing the role of molecular chaperone and regulating the transcription of vitellogenin to meet the embryonic need for vitellin. The *hsp* genes expressed at high levels during the larval period protect the body from environmental pressure, pathogens, and xenobiotics through a synergistic immune effect. The authors believe that *hsp* genes play important roles in the growth and development of *P. japonicus*, and the specific pathways and mechanisms should be further studied. This study provides basic data for further investigations of the role of *hsp* genes in the growth and development of *P. japonicus*.

Key words *Penaeus japonicus*; Heat shock protein; Developmental stage; Expression pattern