

大菱鲆热休克蛋白 90 基因 cDNA 的克隆及其表达特征

王婷婷^{1,2} 陈松林^{2*} 孟亮² 刘洋²

(¹ 中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003)

(² 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 从大菱鲆脾脏 cDNA 文库中筛选到 HSP90, 采用基因克隆方法获得含有 1 个 97bp 的 5'UTR、2 190bp 的开放阅读框和 501bp 的 3'UTR 的全长 cDNA 序列。整个开放阅读框编码 729 个氨基酸, 包含 HSP90 家族 5 个保守信号区。与其他物种已知序列同源比对的结果显示, 此编码氨基酸更接近于热休克蛋白 90 β 亚型(HSP90 β), 与牙鲆 HSP90 β 的同源性高达 96.6%。RT-PCR 分析表明, 在胚胎发育初期就能检测到 HSP90, 其表达量伴随着胚胎发育, 先增加后减少, 在尾芽期达到最高。HSP90 在健康大菱鲆各供试组织中均有表达。经鳃弧菌感染处理后, 在胚胎细胞中也有 HSP90 的强烈表达。结果显示, 大菱鲆 HSP90 cDNA 序列为 HSP90 β , 是一种组成型表达的基因, 其在维持正常生理机能、胚胎发育和应激中发挥重要的作用。

关键词 HSP90 大菱鲆 cDNA 感染

中图分类号 S917.4;S785 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)02-0051-09

Molecular cloning and expression of heat shock protein 90 gene cDNA from turbot *Psetta maxima*

WANG Ting-ting^{1,2} CHEN Song-lin^{2*} MENG Liang² LIU Yang²

(¹ College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(² Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT Heat shock protein 90 (HSP90), functioning as a molecular chaperone in protein biosynthesis, plays an important role in signal transduction, immune response and embryogenesis. We have recently isolated the cDNA encoding HSP90 from turbot *Psetta maxima* spleen cDNA library. The full-length cDNA of the HSP90 contains 97bp 5' terminal UTR, 501bp 3' terminal UTR and 2,190bp open reading frame for a protein of 729 amino acid residues. Comparison of amino acid sequence revealed the presence of five classical HSP90 signature sequences in turbot HSP90. The deduced amino acid sequence of turbot HSP90 exhibited higher homology with HSP90 β isoform. HSP90 transcripts were found to be expressed in all tested normal physiological tissues (intestine, kidney, gill, skin, liver, spleen, head kidney, gonad,

国家 973 计划项目(2004CB117403)、国家自然科学基金项目(30671623)、国家 863 项目(2006AA10A402)和山东省泰山学者工程专项经费共同资助

* 通讯作者。E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

收稿日期:2009-03-03;接受日期:2009-05-15

作者简介:王婷婷(1984-),女,硕士研究生,主要从事水产生物技术研究。E-mail: cindy-1126@163.com, Tel:13589274742

brain, muscle and heart) and could also be detected in the earlier embryonic stage. The level of HSP90 mRNA in embryos gradually increased during embryogenesis and reached the maximum at tail-bud stage. Challenge of turbot embryonic cell line (TEC) with pathogenic bacteria, *Vibrio anguillarum*, elevated HSP90 mRNA levels dramatically. These results demonstrated that this turbot HSP90 cDNA sequence was the constitutive expressed HSP90 β isoform, and it may be involved in embryogenesis and cellular protection events under normal and stress condition.

KEY WORDS HSP90 Turbot *Psetta maxima* cDNA Infection

热休克蛋白 90(Heat Shock Protein 90, HSP90),是近年来被深入并广泛研究的一组蛋白。它作为蛋白成熟过程中的分子伴侣,可保证蛋白正确构象、纠正突变蛋白的错误折叠,维持甾体激素类受体、激酶、中心体等的结构,参与细胞周期调节、机体免疫调节和信号传导,在配子和胚胎发育以及机体衰老过程中具有重要的生理功能(Wiech *et al.* 1992;Holley *et al.* 1995;Lange *et al.* 2000;Pandey *et al.* 2000)。HSP90 家族主要由 HSP90 和 grp96 组成。其中 HSP90 包括 HSP90 α 和 HSP90 β ,二者由 5 亿年前的基因复制产生(Moore *et al.* 1989;Krone *et al.* 1994;Csermely *et al.* 1998)。

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 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,已对某些鱼类的 HSP90 基因序列、蛋白功能、胚胎发育和进化中的作用进行了研究,如斑马鱼 *Danio rerio*、虾虎鱼 *Genus gillichthys*、鲫鱼 *Carassius auratus*、大马哈鱼 *Oncorhynchus tshawytscha*、鲤鱼 *Cyprinus carpio* 和牙鲆 *Paralichthys olivaceus*(Connolly *et al.* 2008;Dietz *et al.* 1992;Wang *et al.* 2007;Palmisano *et al.* 1999;Hermesz *et al.* 2001;Kono *et al.* 2001)。然而,对大菱鲆 *Psetta maxima* HSP90 基因的研究迄今未见报道。

大菱鲆属于鲆科 Bothidae、菱鲆属 *Scophthalmus*,自然分布于欧洲各主要海区,20 世纪 90 年代初引入我国。该鱼种肉质好,生长速度快,适应低水温生活,已成为我国重要的经济海水养殖鱼类。但由于养殖生态环境的破坏,鱼类疾病频繁暴发,给大菱鲆养殖业造成了巨大经济损失。虽然抗生素的使用可以一定程度减少细菌病的暴发,但过多使用会增加病原菌的抗药性,药物残留亦会造成环境污染。热休克蛋白的产生,体现了生物对环境的适应。因此,利用分子生物学技术提高 HSP90 基因的表达,提高鱼苗的成活率,增强鱼类自身对环境应激的防护和对不同环境的适应能力是很有必要的。深入开展鱼类热休克蛋白研究,可进一步揭示其在生理过程中的作用,以及与其他因素在时空上综合保护细胞和机体的机理,其研究成果不仅体现在学术上,还将在实践中对大菱鲆养殖业的发展起促进作用。

本实验从大菱鲆脾脏 cDNA 文库中鉴定出热休克蛋白基因 HSP90,克隆了该基因的 cDNA 序列并分析了基因结构;同时构建了系统发生树,将大菱鲆 HSP90 序列和其他已知 HSP90 序列进行了聚类分析;利用 RT-PCR 技术检验并分析了其在大菱鲆健康组织、胚胎不同发育阶段及感染大菱鲆胚胎细胞(TEC)中的表达(刘洋等 2007)。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用健康大菱鲆购自青岛南山水产品市场,体重 200~500 g。取大菱鲆肝脏、脾脏、肠、头肾、肾、鳃、性腺、肌肉、心脏、脑和皮肤,迅速放入液氮中冻存,后保存于-80℃备用。在中国水产科学研究院黄海水产研究所海阳市养殖基地,保存不同发育时期的大菱鲆胚胎(16 细胞期,囊胚期,原肠期,尾芽期,体节期,心跳期,出膜前期和仔鱼期),液氮中速冻后,保存于-80℃下备用。

1.2 RNA提取和 tHSP90 cDNA 序列克隆

从大菱鲆肝脏组织中利用 TRIzol (Invitrogen) 按照 Chen 等(2004)的方法提取总 RNA。利用 BD Smart-tTM RACE cDNA 扩增试剂盒 (Clontech) 合成 RACE-Ready-cDNA, -20 °C 冰箱保存备用。

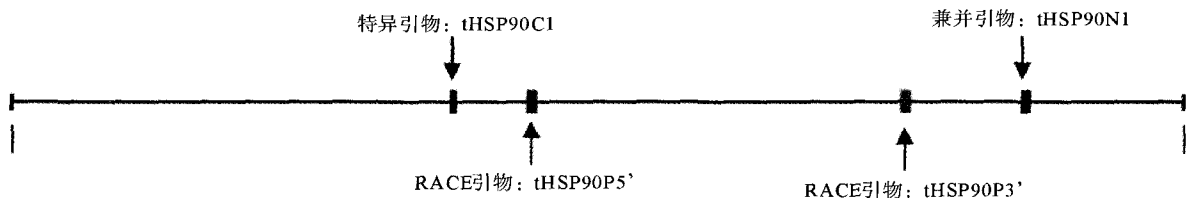
采用 BLAST 2.0 对已构建的大菱鲆脾脏 cDNA 文库进行 EST (Expressed Sequence Tag) 分析, 得到部分 HSP90 序列。参照此序列和其他鱼类的 HSP90 序列, 分别设计 1 个特异引物 tHSP90C1 和 1 个兼并引物 tHSP90N1, 用于扩增部分 HSP90 序列(表 1)。使用 Qiaex II gel extraction kit (Qiagen) 分离纯化 PCR 扩增得到的片段, 然后克隆到 pMD18-T 载体 (Takara) 中, 在大肠杆菌 (DH5 α) 中扩繁。根据蓝白斑原理挑选阳性克隆, 采用菌液 PCR 法检测后, 测序。

根据得到的序列设计合成 1 对特异引物: tHSP90P5' 和 tHSP90P3', 分别用来扩增 5' 末端 (5'-RACE) 和 3' 末端 (3'-RACE) (表 1, 表 2)。RACE 通用引物使用了 BD 公司的 Long primer 和 Short primer。Touchdown PCR 反应如下: 94 °C 2 min; 94 °C 5 s, 72 °C 3 min, 5 个循环; 94 °C 5 s, 70 °C 10 s, 72 °C 3 min, 10 个循环; 94 °C 5 s, 66 °C 10 s, 72 °C 3 min, 20 个循环; 72 °C 10 min。扩增得到的片段克隆到 pMD18-T 载体后, 进行测序。

表 1 试验所用的引物序列
Table 1 Primer sequences used in this study

引物 Primer ID	引物序列 Primer sequence
tHSP90C1	5'-ACGCAAGAGCAAACTGGTCCAC-3'
tHSP90N1	5'-GAGGAWCACCTGGCTGTCAAGCA-3' (W=A/T)
tHSP90P5'	5'-CCTCGGAGTCAACCACACCACGGACAAAAG-3'
tHSP90P3'	5'-ACGACCCTCAGACCCACTCCAACCGCAT-3'
Long primer	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
Short primer	5'-CTAATACGACTCACT ATAGGGC-3'
tG90N	5'-GTGAGACCCTTCCGAGCCGT-3'
tG90C	5'-ACGCAAGAGCAAACTGGTCCACC-3'
TactinN	5'-AGGTGATGAAGCCCAGAGCA-3'
TactinC	5'-GCAGTGGTGGTGAAGGAGTAG-3'

表 2 克隆引物位置
Table 2 Location of clone primers



1.3 序列和系统发生分析

利用 DNASTAR 5.0 编辑和分析实验用 DNA 序列和蛋白序列, 用 PROFsec program 软件预测分析氨基酸序列 (<http://www.predictprotein.org>); 用 CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1994) 进行多序列比较; 用 MEGA3.0 (Kumar *et al.* 2004) 构建系统发生树; 计算方法为邻位相联法 (Neighbor-joining, NJ), NJ 树的可靠性用自展内部分支法评定, 重复 1 000 次 (刘洋等 2007)。

1.4 病原菌感染

感染用大菱鲂胚胎细胞,为本实验室已保存的大菱鲂胚胎细胞系(TEC line)(Chen *et al.* 2005)。在感染前 24h,将大菱鲂胚胎细胞培养于 25 cm² 的培养瓶中,24 h 后更换新培养基,然后加入鳃弧菌 *Vibrio anguillarum* (2216E 培养基,28 °C 培养)至终浓度 2.9×10^8 CFU。在感染后 0、6、12、24、48 和 96 h 离心收集大菱鲂胚胎细胞,同时取正常胚胎细胞作对照,利用 TRIzol 提取总 RNA,并保存于 -20 °C 下备用,重复试验 3 次。

1.5 HSP90 表达分析

使用 TRIzol 试剂,提取健康大菱鲂的组织、胚胎和胚胎细胞总 RNA。用核酸测定仪测定 260 和 280 nm 时的吸收值,确定提取 RNA 的纯度,按 $1OD_{260\text{ nm}} = 40 \mu\text{g RNA}$ 计算 RNA 的产率,同时电泳检测 RNA 样品的质量。分别取 2 μg 各样品总 RNA,利用 M-MLV 反转录酶 (Promega) 合成 cDNA。两条特异引物 tG90N 和 tG90C(表 1,表 2)以合成第一链 cDNA 为模板,应用 RT-PCR 半定量检测方法分析 HSP90 基因的表达特点。将特异引物肌动蛋白 TactinN 和 TactinC(表 1,表 2)扩增的 β -actin 基因片段作为内参,并在相同条件下对 HSP90 表达特异片段和内参基因片段进行扩增。PCR 反应程序如下:94 °C 2 min;94 °C 30 s,62 °C 30 s,72 °C 1 min,24~28 个循环(HSP90 在健康大菱鲂组织的表达分析为 24 个循环,在胚胎不同发育期和被感染胚胎细胞中的表达分析为 28 个循环);72 °C 10 min。

2 结果

2.1 大菱鲂 HSP90 的 cDNA 克隆和鉴定

利用从大菱鲂脾脏 cDNA 文库中获得的 HSP90 cDNA 序列和其他鱼类 HSP90 序列设计的特异及同源引物,扩增得到 1 364bp 的 cDNA 片段。经 BLAST 分析为 HSP90 基因。根据所得的片段设计基因特异引物进行 RACE-PCR,分别扩增得到了未知的 5'和 3'序列。扩增产物克隆、测序后,经 Dnaman 分析去除重叠序列和接头序列后得到 2 788bp 的全长 cDNA 序列(GenBank accession No.:EU099575)(图 1)。由图 1 可见,大菱鲂的 HSP90 cDNA 系由 2 190bp 编码区、97bp 的 5'UTR 区和 501bp 的 3'UTR 区组成,并且含有加尾信号 ATTTAAA 和 Poly A 尾巴。

2.2 HSP90 氨基酸序列及系统发生分析

大菱鲂 HSP90 cDNA 的开放阅读框编码 729 个氨基酸,蛋白质预测分子量约为 83.8 kD,等电点为 4.8。经软件分析,氨基酸序列包含 HSP90 家族的 5 个保守信号区(NKEIFLRELISN[S/A]SDALDKIR, LGTIA [K/R]SGT, IGQFGVGFYSA[Y/F]LVA[E/D], IKLYVRRVFI, GVVDS[E/D]DLPLN[I/V]SRE)和 C 末端一致序列 MEEVD(图 1)。采用 DNASTAR 5.0 分析大菱鲂 HSP90 氨基酸序列与其他物种 HSP90 氨基酸序列的相似性,发现其与已知的 HSP90 β 亲缘关系较近。其中,与牙鲆 HSP90 β 亲缘关系最近、同源性高达 96.6%;与虹鳟、大西洋鲑和斑马鱼的亲缘关系次之、同源性分别为 93.9%、92.9% 和 92.4%;与鼠、人和鸡的同源性分别为 89.4%、89.1% 和 87.4%;而与 HSP90 α 亲缘关系较远,如与牙鲆、斑马鱼和墨西哥脂鲤的同源性分别为 86.7%、82.8% 和 82.8%(表 3)。基于氨基酸序列,利用邻位相联法(Neighbor-joining method)构建系统发生树(图 2),结果同样显示了大菱鲂的 HSP90 基因更接近于 β 型基因,同时显示同一种属的进化距离较近。

2.3 HSP90 在健康大菱鲂组织中的表达分析

采用 RT-PCR 半定量分析了 HSP90 在健康大菱鲂 11 种组织(肝脏、脾脏、肠、头肾、肾、鳃、性腺、肌肉、心脏、脑和皮肤)中的表达。结果发现,HSP90 在这些组织中均有表达(图 3)。

```

1      ACGCGGGGCCCTTCCATTTCCTCGCTCAGAGAGCAAGAGGGGACTGTACTTTGGTTCGCAATTTAAATTCAGAAAAAGTCACC
85     GAAATAAGTAAAGATGCCTGAAGAATGCACCAAGAGGAGGAGGCTGAGACCTTTGCCTCCAGGCAGAGATCGCTCAGCTGAT
      M P E E M H Q E E E A E T F A F Q A E I A Q L M
169    GTCCCTGATCATCAACACTTTCTACTCTAACAAAGAGATCTTCTCAGGGAATTGATCTCCAACCGCTCTGTATGCTTTGGATAA
      S L I I N T F Y S N K E I F L R E L I S N A S D A L D K
                                     HSP90 Family Signature 1
253    AATCCGCTATGAAAGCCTGACTGAGCCCACCAAGCTTGATAGTGGCAAGATCTGAAATCGAGATCATCCCCAACAAAGAGGA
I R Y E S L T E P T K L D S G K D L K I E I I P N K E E
337    ACGCACCTGACCTCATCGACACTGGAATCGGCAATGACCAAGCCGGAACCTGATCAACAACCTGGGAACCTCCAGGCTCGG
      R T L T L I D T G I G M T K A D L I N N L G T I A K S G
                                     HSP90 Family Signature 2
421    CACCAAGGCCTTATGAGGCGCCGTCAGGCTGGAGCTGACATCTCCATGATCGGTTCAGTTGGCGTGGGTTTCTACTCCGCTCA
I K A F M E A L Q A G A D I S M I G Q F G V G F Y S A Y
                                     HSP90 Family Signature 3
505    CCTCGTTGCCGAAAAGGGTGACTGTATCACCAACACAAACGATGATGAGCAGTACGCAATGGAGTCCCTCTGCCGAGGGTCCCT
L V A E R V T V I T K H N D D E Q Y A W E S S A G G S F
589    CACAGTCAAGGTTGACAGCGCGGAGCCTATGGGCGGTGGAACAAGGATCATCTGCACCTGAAGGAGGACCGCTGGAGTACAT
      T V K V D S G E P M G R G T R I I L H L K E D Q L E Y I
673    TGAGGAGAAGAGAGTCAAGGAGATGTCAAGAAGCACTGCAGTTCATCGGCTACCCATCCCTGTTTGTGGAGAAGGAGCG
      E E K R V K E I V K K H S Q F I G Y P I T L F V E K A E R
757    CGACAAGGATGACGACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
      D K E I S D D E A E E E K E E K A E K E E G E D
841    CAAGCCAAAGATCGAAGATGTGGCTCGGACGACGAGGAGGACTCCAAAGACAAGGACAAGAAGAAGAAGAAGATCAAGGA
      K P K I E D V G S D D E E D S K D K D K K K K K I K E
925    GAAGTACATCGACGAGGAGGAGCTGAACAAGACCAAGCCATCTGGACGAGAACCCCGACGACATCAACAGGAGGAGTACCG
      K Y I D Q E L N K T P I W T I R N P D I T N E Y G
1009   CGAGTTCTAC AAGAGTCTGACCAACGACTGGGAGGATCACCTGGCTGTCAAGCAC TCTCTGTTGGAGGGCCAGCTCGAGTTCCG
      E F Y K S L T N D W E D H L A V K H F S V E G Q L E F R
1093   TGCCTCCTCTTCATCCCCCGCGCTCCCTTCGACCTCTTTGAGAACAAGAAGAAGAAGAACAACATCAAGCTGTACCTCAG
      A L L F I P R R A P F D L F E N K K K K N N I K L Y V R
                                     HSP90 Family Signature 4
1177   GAGGGTCTTCTATCATGGACAACTGTGAGGAGCTCATCCAGAGTACCTGAACTTTGTCCGTGGTGGTGTGACTCCGAGGATCT
R V F I M D N C E E L I P E Y L N F V R B V V D S E D L
                                     HSP90 Family
1261   GCCCCAACATCTCCAGAGAAATGCTGCAGCAGAGCAAGATCCTCAAGTCAITCGCAAGAACATCGTCAAGAAGTGTCTGGA
P L N I S R E M L Q Q S K I L K V I R K N I V K K C L E
      Signature 5
1345   GCTCTTTGGTGGCTGCTGAGACAAGGAGAACTACAAGAGTTCTACTGAGGGTTTCTCCAAGAACATCAAGCTCCGTATCCA
      L F G E L A E D K E N Y K K F Y E G F S K N I K L G I H
1429   CGAGGATCCCAAAACCGTAAGAAGCTCTCCGAGCTGTGCGTTACCAAAAGCTCCAGTCTGGGACGAGACGACCTCCCTCAC
      E D S Q N R K K L S E L L R Y Q S S Q S G D E T T S L T
1513   AGAATACCTGTCCGCAATGAAGGAAAACCAAGATCTACTACTACATCAACCGGTGAAGCAAGGATCAGGTGGCCAACTCCGG
      E Y L S R M K E N Q K S I Y Y I T G E S K D Q V A N S A
1597   CTTCGTGGAGCGGTTCGCAAGCGCGGCTTCGAGGTTCTGTACATGACGAGCCATCCGACGAGTATGCGCTCCAGCAGCTGAA
      F V E R V R K R F E V L Y M T E P I D E Y C V Q L K
1681   GGAGTTCGACCGTAAGACCTGGTGTGGTCAACCAAGGAGGCTGGAGCTGCCGAGGACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
      E F D G K S L V S V T K E G L E L P E D E E E K K K M E
1765   GGAGGACAAGGCAAGTTTCAGAGCCTTGCAAGCTCATGAAGGAGATCCTGGACAAAAAAGTGGAGAAAGGTGACCGGTGCCAA
      E D K K A K F E S L C K L M K E I L D K K V E K V T V S N
1849   CAGACTGGCTCTCCGCTGCTGACGAGTACCGGTTGACGAGTACCGGTTGACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
      R L A S S P C C I V T S T Y G W T A N M E R I M K Q A
1933   GCTCAGGGAACAACCTCCACATGGGTTACATGATGGCCAAAGCAAGCAGCTGGAGATCAACCCCGACCATCCCATCTGGAAAACGCT
      L R D N S T M G Y M M A K K H L E I N P D H P I V E T L
2017   CCGGCAGAAAGGCGGACCGCAGCAAGAAGCAAGCGGTAAGGACCTGGTCACTCTGCTGTGAGACCGCCCTGCTGTCC
      R Q K A D A D K N D K A V K D L V I L L F E T A L L S S
2101   GGGCTTCCCTGGACGACCTCAGACCACTCCAACCGCATCTACAGAATGATCAAACTCGGACTGGGTATCGACGATGACGA
      G F S L D D P Q T H S N R I Y R M I K L G L G I D D D D
2185   CGTTCCCGTGGAGGAGACACTTCCGAGCCGTCACGACGAGATCCCTCCCTAGAGGCGCAAGGAGGAGGATGACGCTTCCAG
      V P V E E T S A A V P D E I P P L E G E G E D D A S R
2269   CATGGAAAGATTGATTAATCGACCGGCCCTGCTCCAGATTTTAAACACTTTAGCCCTCACTTTCAATTCTTGATCTTA
M E E V D *
      MEEVD Consensus Sequence
2353   AAAAAAAAAAGCGGAGTAAATGCAA ACAAATAGTCAATCATGTTTGTGGTGGACCAAGTGTGCTCTTGGCTCCGGAGCATT
2437   TACICTGCAAAAGCCCCCTTTAAGAAAAGCGATTTTGGTCTTCTGCTGTAATAAGTTCATGGTGACAGACCAITTTGTTCAI
2521   CAAAGTACCCTGTGCACTGAGITTTAAATGTCGAGTGGTAAACATGTGAACACGGGAATGTACTATCCAGTATCGGGTCTG
2605   GAGGGTTCGGGGAGGTTCTGCTCATGTGCAACACTGACCGCTGATGAGAGAGGACTGTATGATCTCTTTGCTGAGTCCAG
2689   GCTTGTCTGTAITCCAAGTCGCTTTTGTGTTGCAAAAAATTAAGATGTAATACCTTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA
2773   AAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

注:碱基序列在上,对应的氨基酸序列在其下方。转录起始密码(ATG),终止密码(TAA)及加尾信号(ATTTAA)用下划线标出。HSP90 家族保守信号区用阴影标出,C 末端一致序列 MEEVD 用方框标出

Note: Nucleotides are indicated above and numbered to the left of each lane. Corresponding deduced amino acids are indicated below. Start codon (ATG), stop codon (TAA) and the ploy (A) + signal sequence ATTTAA are underlined. HSP90 family signatures are boxed and shadowed. Carboxyl terminal consensus sequences (MEEVD) is showed in box

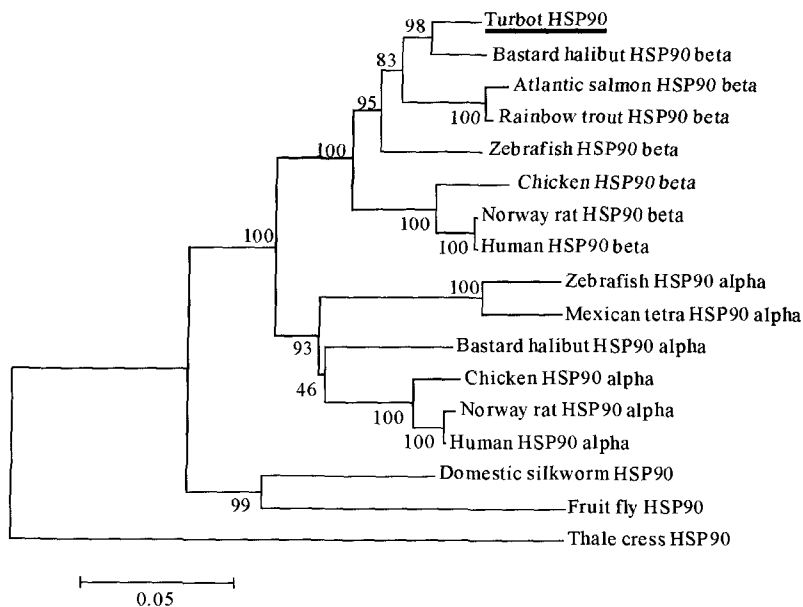
图 1 大菱鲆 HSP90cDNA 序列全长以及由此推测的氨基酸序列

Fig. 1 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of turbot heat shock protein 90 gene

表 3 基于 CLUSTAL W 进行的大菱鲂 HSP90 推测氨基酸序列与其他物种已知序列相似性比对结果
Table 3 Percentage of identity between deduced amino acids of turbot HSP90 and those of HSP90 alpha and/or HSP90 beta proteins of other species based on CLUSTAL W

种类 Species	Hsp90	氨基酸序列相似性 Amino acid sequence similarity (% of identity)
斑马鱼 Zebrafish <i>Danio rerio</i>	alpha	82.8
	beta	92.4
虹鳟鱼 Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	beta	93.9
牙鲆 Bastard halibut <i>Paralichthys olivaceus</i>	alpha	86.1
	beta	96.6
大西洋鲑 Atlantic salmon <i>Salmo salar</i>	beta	92.9
墨西哥丽脂鲤 Mexican tetra <i>Astyanax mexicanus</i>	alpha	82.8
家蚕 Domestic silkworm <i>Bombyx mori</i>		82.1
果蝇 Fruit fly <i>Drosophila melanogaster</i>		78.8
原鸡 Chicken <i>Gallus gallus</i>	alpha	85.7
	beta	87.4
挪威鼠 Norway rat <i>Rattus norvegicus</i>	alpha	85.7
	beta	89.4
人类 Human <i>Homo sapiens</i>	alpha	86.1
	beta	89.1
拟南芥 Thale cress <i>Arabidopsis thaliana</i>		69.9

注:相似性比对所需序列从 GenBank 中下载获得,它们的序列号如下:斑马鱼 *Danio rerio*, BC075757 (HSP90 α), AF068772 (HSP90 β);墨西哥丽脂鲤 *Astyanax mexicanus*, AY222612 (HSP90 α);大西洋鲑 *Salmo salar*, AF135117 (HSP90 β);牙鲆 *Paralichthys olivaceus*, ABG56393 (HSP90 α), ABG56394 (HSP90 β);虹鳟鱼 *Oncorhynchus mykiss*, AB196458 (HSP90 β);果蝇 *Drosophila melanogaster*, CAA27435;家蚕 *Bombyx mori*, BAB41209;原鸡 *Gallus gallus*, P11501 (HSP90 α), CAA49704 (HSP90 β);挪威鼠 *Rattus norvegicus*, NP_786937 (HSP90 α), P34058 (HSP90 β);人类 *Homo sapiens*, NP_005339 (HSP90 α), NP_031381 (HSP90 β)

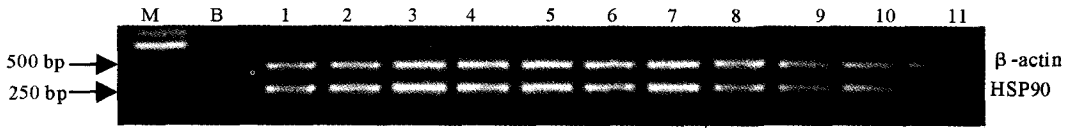


注:位于分支节点的数字表示置信度,重复次数为 1 000。大菱鲂 HSP90 用下划线标出

Note: The bottom scale was bootstrap values obtained after 1 000 resampling efforts and refers to percentage divergence. The relative genetic distances are indicated by the scale bar and the branch lengths. Turbot HSP90 is underlined

图 2 基于蛋白序列的系统发生树

Fig. 2 Phylogenetic analysis of HSP90 family of different organisms based on amino acid sequence



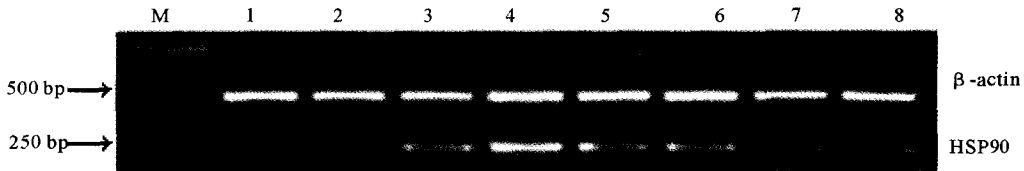
注: M 为分子量标准; B 为空白对照; 1~11 为肝脏、脾脏、肠、头肾、肾、鳃、性腺、肌肉、心脏、脑和皮肤
 Note: M: DL2000 marker; B: Blank control; 1: Liver; 2: Spleen; 3: Intestine; 4: Head kidney; 5: Kidney; 6: Gill; 7: Gonad; 8: Muscle; 9: Heart; 10: Brain; 11: Skin

图 3 大菱鲆 HSP90 在正常组织中的 RT-PCR 表达分析

Fig. 3 Analysis of HSP90 gene expression in various tissues of adult turbot using RT-PCR

2.4 HSP90 在大菱鲆胚胎不同发育时期的表达分析

利用 RT-PCR 分析了 HSP90 在大菱鲆胚胎不同发育时期(16 细胞期、囊胚期、原肠期、尾芽期、体节期、心跳期、出膜前期和仔鱼期)的表达状况。结果表明, HSP90 在胚胎 8 个不同发育时期中均有表达, 且伴随着胚胎发育, HSP90 的表达量逐渐增加, 在尾芽期达到高峰, 随后表达量下降(图 4)。



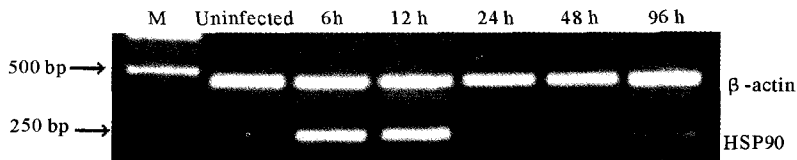
注: M 为分子量标准; 1~8 为 16 细胞期、囊胚期、原肠期、尾芽期、体节期、心跳期、出膜前期和仔鱼期
 Note: M: DL2000 DNA marker; 1: 16~32 cells stage; 2: Blastula stage; 3: Gastrula stage; 4: Tail-bud stage; 5: Somites stage; 6: Heart-beating stage; 7: Pre-hatching stage; 8: Larva stage

图 4 大菱鲆 HSP90 在胚胎不同发育时期的 RT-PCR 表达分析

Fig. 4 Analysis of HSP90 gene expression at different embryonic stages

2.5 HSP90 在感染大菱鲆 TEC 细胞中的表达分析

鳃弧菌感染 TEC 细胞后, HSP90 呈现了明显的诱导表达趋势(图 5)。在感染前, TEC 细胞内仅检测到微弱的 HSP90 表达, 感染后 6 h 检测到了强烈的表达, 并且在感染后 6~12 h, HSP90 保持着强烈的表达趋势, 随后急剧下降。



注: M 为分子量标准; 鳃弧菌感染的不同时期在图上方标出
 Note: M: DL2 000 DNA marker; different infection times are labelled above

图 5 HSP90 鳃弧菌感染大菱鲆 TEC 细胞中的 RT-PCR 表达分析

Fig. 5 Expression of HSP90 gene in turbot embryonic cell line after infection

3 讨论

据文献报道(Sreedhar *et al.* 2004), 作为真核细胞中广泛存在的分子伴侣 HSP90, 在非应激和正常生理状态下占细胞蛋白总量的 1%~2%, 是近年来又一个研究热点。HSP90 α 和 HSP90 β 是存在于细胞质中的

HSP90 家族重要成员。前者可被高度诱导表达,在细胞生长、凋亡等细胞周期中发挥重要调节作用;后者为组成型表达,亦可被诱导表达,参与维持细胞结构以及细胞分化、防御等生理功能的正常进行。为进一步了解鱼类 HSP90 β 的基因特点及其在胚胎发育中的作用,本试验分离并获得大菱鲂 HSP90 cDNA 的完整序列并对其在不同组织和胚胎发育时期中的表达做了深入研究。

在大菱鲂 1 364bp 的全长 cDNA 序列中,开放阅读框编码的 729 个氨基酸包含 HSP90 家族的 5 个信号序列和 ATP 结合域。C 末端一致序列 EEVD 可被 HOP(HSP70 and HSP90 organizing protein)的 TPR (Tetra-tricopeptide repeat) domain 识别,进而与热休克蛋白 70 构成分子伴侣复合体。序列相似性分析表明,大菱鲂 HSP90 序列与其他已知物种的 HSP90 序列具有极高的相似性(大于 70%)。基于 NJ 法构建的系统发生树进一步显示此序列与各物种 HSP90 β 序列聚在一起,亲缘关系较近。此外,大菱鲂 HSP90 氨基酸序列 N 末端缺少 HSP90 α 亚型特有的磷酸化位点序列 QTQDQ。这些结果表明,作者克隆所得到的大菱鲂 HSP90 cDNA 序列为 HSP90 β 亚型。

利用 RT-PCR 方法对大菱鲂正常生理状态下的肝脏、脾脏、肠、头肾、肾、鳃、性腺、肌肉、心脏、脑和皮肤中 HSP90 基因的表达进行分析,虽然表达量略有差异,但在所有供检组织中均有表达。Hermesz 等(2001)利用 Northern blot 方法,在非应激状态下鲤鱼的脑、肝脏和肾中都检测到了 HSP90 β 表达,但仅在脑中检测到了 HSP90 α 的微弱表达。大菱鲂 HSP90 在所有受检组织中均检测到表达,这进一步证明了此克隆序列为组成型表达的 HSP90 β 亚型。作为重要的分子伴侣分子,HSP90 β 亚型起着管家作用,在生物体内控制着多种蛋白质的活动、运输和更新。

据文献,HSP90 在动物胚胎发育过程中起着非常重要的作用。如 HSP90 α 通过激活转录因子 myoD 参与肌肉发育(Sass *et al.* 1997;Du *et al.* 2008),HSP90 β 则与神经系统、视网膜和骨的发育有关(Csermely *et al.* 1998)。在哺乳动物胚胎发育过程中,HSP90 β 亚型可诱导滋养层分化、参与胎盘发育。Voss 等(2000)利用基因敲除技术使小鼠胚胎的 HSP90 β 基因失活,发现其胚胎出现异常生长,母体和胎儿间的物质交换被阻断。但是在鱼类中,对 HSP90 β 的研究仍处于探索阶段。本文分析了大菱鲂 HSP90 β 在胚胎发育不同时期的表达情况,在尾芽期检测到强烈表达。大菱鲂尾芽发育期的主要特征为尾端突出、尾芽形成和脑明显分化(雷霖霖等 2003)。根据 HSP90 β 在尾芽期的高表达结果,可推测 HSP90 β 在神经系统、脊索等的发育中发挥重要作用,这与已知的 HSP90 β 在胚胎发育过程中的功能相一致,但具体的调控机制、作用方式等还需要进一步研究。在鳃弧菌感染的 TEC 细胞中,感染后 6 h HSP90 β 即被检测到强烈表达,表现出了迅速的应答,表明 HSP90 β 虽然为组成型表达,但在外界应激状态下亦可被诱导表达。Krone 等(1994)在热应激后的斑马鱼原肠胚期和体节发育中期也观察到了 HSP90 β 的高诱导表达。在感染 12 h 后,HSP90 β 表达量大幅下降,表明细胞进入应激状态后,HSP90 β 行使的调节功能开始下降,这与其作为管家蛋白的作用相一致。可以看出,HSP90 β 在防御应激中发挥着一定的作用。

总而言之,本文首次报道了大菱鲂热休克蛋白 90,它与已报道的 HSP90 β 有着共同的结构特征。此外,表达分析表明该 HSP90 β 在大菱鲂的胚胎发育和防御应激中起着重要作用。作者将进一步进行其功能分析,深入研究其作用机制,期望为大菱鲂育种和病害防治提供更多的理论基础。

参 考 文 献

- 王贤丽,张玉喜,孟亮,陈松林. 2009. 大菱鲂 T 淋巴细胞酪氨酸激酶(LCK)基因全长 cDNA 的克隆及表达分析. 中国水产科学,16(5):660~667
- 刘洋,陈松林,孟亮,张玉喜. 2007. 大菱鲂一种 CXC 趋化因子的克隆及其表达特征. 高技术通讯,12:1 295~1 300
- 刘洋,陈松林,孟亮,张玉喜. 2007. 大菱鲂 1 个 CXCL10 样趋化因子的克隆鉴定与表达分析. 中国水产科学,14(4):554~562
- 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
- 雷霖霖,马爱军,刘新富,门强. 2003. 大菱鲂 *Scophthalmus maximus* L. 胚胎及仔稚幼鱼发育研究. 海洋与湖沼,34(1):9~18
- Chen, S. L., Xu, M. Y., Hu, S. N. *et al.* 2004. Analysis of immune-relevant genes expressed in red bream (*Chrysophrys major*) spleen. *Aquaculture*, 240: 115~130
- Chen, S. L., Ren, G. C., Sha, Z. X. *et al.* 2005. Development and characterization of a continuous embryonic cell line from turbot (*Scophthal-*

- mus maximus*). *Aquaculture*, 249: 63~68
- Connolly, M. H., and Hall, B. K. 2008. Embryonic heat shock reveals latent HSP90 translation in zebrafish (*Danio rerio*). *Int. J. Dev. Biol.* 52(1): 71~79
- Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohászka, Z., and Nardai, G. 1998. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol. Ther.* 79(2): 129~168
- Dietz, T. J., and Somero, G. N. 1992. The threshold induction temperature of the 90-kDa heat shock protein is subject to acclimatization in eurythermal goby fishes (*genus Gillichthys*). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89(8): 3 389~3 393
- Du, S. J., Li, H., Bian, Y., and Zhong, Y. 2008. Heat-shock protein 90alpha1 is required for organized myofibril assembly in skeletal muscles of zebrafish embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105(2): 554~559
- Hermesz, E., Abrahám, M., and Nemcsók, J. 2001. Identification of two HSP90 genes in carp. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 129(4): 397~407
- Holley, S. J., and Yamamoto, K. R. 1995. A role for HSP90 in retinoid receptor signal transduction. *Mol. Biol. Cell*, 6: 1 833~1 842
- Kono, T., and Sakai, M. 2001. The analysis of expressed genes in the kidney of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, injected with the immunostimulant peptidoglycan. *Fish Shellfish Immunol.* 11(4): 357~366
- Krone, P. H., and Sass, J. B. 1994. HSP 90- α and HSP 90-beta genes are present in the zebra fish and are differentially regulated in developing embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204(2): 746~752
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. *et al.* 2004. MEGA3.0: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefing in Bioinformatics*, 5: 150~163
- Lange, B. M., Bachi, A., Wilm, M., and Gonzalez, C. 2000. HSP90 is a core centrosomal component and is required at different stages of the centrosome cycle in *Drosophila* and vertebrates. *EMBO J.* 19: 1 252~1 262
- Moore, S. K., Kozak, C., Robinson, E. A., Ullrich, S. J., and Appella, E. 1989. Marine 86- and 84-kDa heat shock proteins, cDNA sequences, chromosome assignments, and evolutionary origin. *Biol. Chem.* 264: 5 343~5 351
- Palmisano, A. N., Winton, J. R., and Dickhoff, W. W. 1999. Sequence features and phylogenetic analysis of the stress protein HSP90alpha in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*), a poikilothermic vertebrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258(3): 784~791
- Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Srinivasula, S. M., Kumar, V., Weichselbaum, R., Nalin, C., Alnemri, E. S., Kufe, D., and Kharbanda, S. 2000. Negative regulation of cytochrome C-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J.* 19: 4 310~4 322
- Sass, J. B., and Krone, P. H. 1997. HSP90alpha gene expression may be a conserved feature of vertebrate somitogenesis. *Exp. Cell Res.* 233: 391~394
- Sreedhar, A. S., Kalmár, É., Csermely, P., and Shen, Y. F. 2004. HSP90 isoforms: Functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett.* 526:11~15
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4 673~ 4 680
- Voss, A. K., Thomas, T., and Gruss, P. 2000. Mice lacking HSP90 beta fail to develop a placental labyrinth. *Development*, 127: 1~11
- Wang, J., Wei, Y., Li, X., Cao, H., Xu, M., and Dai, J. 2007. The identification of heat shock protein genes in goldfish (*Carassius auratus*) and their expression in a complex environment in Gaobeidian Lake, Beijing, China. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 145(3): 350~362
- Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, R., and Jakob, U. 1992. HSP90 chaperones protein folding *in vitro*. *Nature*, 358: 169~170