

## 脊尾白虾热休克蛋白 HSP70 基因的克隆及其表达分析

韩俊英<sup>1,2</sup>, 李健<sup>1\*</sup>, 李吉涛<sup>1</sup>, 常志强<sup>1</sup>, 陈萍<sup>1</sup>, 李华<sup>2</sup>

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

2. 大连海洋大学生命科学与技术学院,辽宁 大连 116023)

**摘要:**克隆了脊尾白虾热休克蛋白基因全长 cDNA,并进行了序列分析。该基因由 2 250 bp 的碱基组成,开放阅读框长 1 959 bp,编码由 652 个氨基酸组成的蛋白,基因两翼分别存在 83 bp(5'端)和 208 bp(3'端)的非翻译区,将该基因命名为 *Ec-HSP70*。与其它物种 HSP70s 氨基酸序列进行同源性比较发现,与甲壳动物的同源性都在 90% 以上,表明该蛋白属于热休克蛋白 HSP70 家族。聚类分析表明,脊尾白虾热休克蛋白氨基酸序列与中国明对虾和凡纳滨对虾紧密聚为一支,之后聚类顺序依次为斑节对虾、日本囊对虾、刀额新对虾等。通过荧光定量 RT-PCR 对该基因在肝胰腺、肌肉的表达分析表明,温度、pH 和氨氮胁迫都可以引起该基因的高表达,而且肝胰腺中的高表达时间相对肌肉中出现的较早。试验结果表明,温度、pH 和氨氮胁迫对脊尾白虾 HSP70 基因表达有一定的诱导效果,但胁迫的时间过长则抑制其表达,肝胰腺对胁迫比肌肉较敏感。

**关键词:**脊尾白虾;热休克蛋白 70;基因克隆;表达分析

**中图分类号:**Q 786; S 917.4

**文献标志码:**A

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)隶属于甲壳纲(Crustacea),十足目(Decapoda),游泳亚目(Natantia),长臂虾科(Palaemonidae),白虾属(*Exopalaemon*)。它是一种中型虾类,生活范围广,一般为近岸广盐广温种,其繁殖能力很强,一年可以多次育苗<sup>[1]</sup>。脊尾白虾是我国近海重要经济虾类,其产量仅次于中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)和中国毛虾(*Acetes chinensis*),具有较高的经济价值。

热应激蛋白(heat shock proteins, HSPs)又名热休克蛋白,是生物体内与抗逆相关的一类十分重要的蛋白,除高温诱导外,许多损伤因素、应急刺激(如缺氧、重金属离子、病毒感染、DNA 损伤、自由基)作用后,都可以导致细胞发生热休克反应<sup>[2-3]</sup>诱导热休克蛋白的合成<sup>[4]</sup>。研究表明, HSP70 与生物的环境适应能力密切相关<sup>[5-8]</sup>,关于甲壳动物 HSP70 基因已经在中国明对虾、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、中华绒螯蟹

(*Eriocheir sinensis*)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)等方面有过报道,而在脊尾白虾上关于 HSP70 方面的研究还未见报道。

氨态氮是虾类生长环境中最常见的毒性物质,虾类在氨态氮浓度不断升高的环境中,其抗病力逐渐下降,对病原体易感性提高,疾病易发生<sup>[9]</sup>。pH 是虾类养殖环境中重要的环境因子,常因大量换水、阴天暴雨和浮游植物优势种群的突然改变或消失等因素影响而变化,水体 pH 升高或降低也会直接影响虾类的生长与繁殖<sup>[10]</sup>。本研究克隆了脊尾白虾热休克蛋白 HSP70 基因,并采用常规急性实验方法,研究了温度、pH 和氨氮胁迫对脊尾白虾组织中的 HSP70 基因表达水平的影响,以期了解其抗逆机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

TaKaRa Taq<sup>TM</sup>, dNTP Mixture, Cloned

收稿日期:2010-12-16 修回日期:2011-04-06

资助项目:公益性行业(农业)科研专项(200803012,201103034);国家虾产业技术体系(nycytx-46)

通讯作者:李健, E-mail:lijian@ysfri.ac.cn

Ribonuclease Inhibitor, SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II, DEPC 水, Oligo(dT)<sub>18</sub>, M-MLV, pMD18-T 载体, Top10 感受态, 胶回收纯化试剂盒, DNA Marker 购自 TaKaRa 公司; Trizol Reagent 购自 Invitrogen; SMART<sup>™</sup> RACE cDNA Amplification Kit Advantage<sup>®</sup> PCR Kit & Polymerase Mix 购自 Clontech 公司; 寡聚核苷酸引物由上海生工生物有限公司合成。

健康脊尾白虾来自于胶州宝荣水产科技发展有限公司, 体长(4.21 ± 0.36) cm, 体质量(1.27 ± 0.37) g, 饲养于 200 L 的 PVC 桶中, 并于实验前暂养一周, 养殖水温为 18 °C, 盐度为 16, pH 为 8.2, 连续充气, 暂养期间每天换水 1/3, 并投喂配合饲料。

## 1.2 实验方法

**实验处理及分组** 温度实验: 将 90 尾暂养的脊尾白虾(每桶 10 尾)分为 3 组, 设对照组、高温组和低温组, 每组 3 个平行。对照组水温为 18 °C, 高温组水温由 18 °C 逐渐上调到 28 °C 处理 4 h, 低温组水温逐渐下调到 8 °C 处理 4 h, 各桶随机挑选 8 尾脊尾白虾, 取其肝胰腺和肌肉, 保存于液氮中。

**pH 实验:** 将暂养的脊尾白虾(每桶 25 尾)分为 5 组, 设对照组和 pH 刺激组, 每种梯度设 3 个平行。对照组 pH 8.2, 刺激组 pH 分别为 7.2、7.7、8.7、9.2, 各 pH 用 1.0 mol/L 的 NaOH 溶液和 1.0 mol/L 的 HCl 溶液来调节, 实验期间各处理组 pH 的变动幅度为 ±0.1, 不投饵不换水, 分别于胁迫后 0.5、1、2、4、8、12、24 h, 从各桶随机挑选 3 尾脊尾白虾, 取其肝胰腺和肌肉, 保存于液氮中。

**氨氮实验:** 将暂养的脊尾白虾(每桶 25 尾)分为 4 组, 设对照组和氨氮刺激组, 每种梯度设 3 个平行。对照组未加 NH<sub>4</sub>Cl, 刺激组分别加入 40、80、120 mg/L 的 NH<sub>4</sub>Cl。实验期间不投饵不换水, 分别于 0.5、1、2、4、8、12、24 h, 各桶随机挑选 3 尾脊尾白虾, 取其肝胰腺和肌肉, 保存于液氮中。

**脊尾白虾总 RNA 的提取** 分离不同组织, 液氮研磨组织样品, 每 0.05 g 组织中加入 1 mL Trizol, 提取脊尾白虾肝胰腺中的总 RNA, 提取的总 RNA 用紫外分光光度计进行定量检测, 然后进行 MOPS 琼脂糖凝胶电泳, 确认 RNA 完整性后, 并反转录成 cDNA, 方法按参考文献[11]进行, 用

于克隆和荧光定量 PCR 检测。利用 SMART<sup>™</sup> RACE cDNA Amplification Kit 反转录合成 cDNA 第一链, 用做基因 3' 和 5' 端序列快速扩增的模板。

引物的设计与 HSP70 基因片段的克隆参考 GenBank 公布的中国明对虾(AY748350)、凡纳滨对虾(AY645906)和日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)(AF474375) HSP70 的基因序列, 采用 Clustal X 软件进行比对后, 找出保守区域设计简并性引物(表 1)。

表 1 实验中所用的引物序列  
Tab. 1 Primer sequences used in this study

引物名称 primer	引物序列(5'-3') sequence
HSP70 R1	TCGCCTTCACAGACACMGAGC
HSP70 F1	GGGTCACGTCCAACAGCAAC
HSP70 3'race1	ACCATCATCAACGAGAGCACAAAGCCA
HSP70 3'race2	GTCCCGTGGCACCTTGGAGCCCGTAGA
HSP70 5'race1	CAGCCTCGGACTTGTCACCGCACAGAAT
HSP70 5'race2	CTCCTTGCCGTTGAAGAAGTCCT
HSP70 HF	GGACCTGTTGCTGTTGGACG
HSP70 HR	TTGGTGGGGATGGTGGTGT
18S HF	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA
18S HR	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT

以脊尾白虾的 cDNA 为模板, HSP70 F1/R1 为引物采用 25 μL PCR 反应体系进行 HSP70 基因 cDNA 片段的扩增, 在 PCR 管中分别加入: TaKaRa Taq (5 U/μL), 0.125 μL; 10 × PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> Free), 2.5 μL; MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L), 1.5 μL; dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L), 2.0 μL; 模板 cDNA, 1.25 ng; 引物 1 (10 μmol/L), 1.0 μL; 引物 2 (10 μmol/L), 1.0 μL; ddH<sub>2</sub>O 补足 25 μL, 置于 PCR 仪中进行扩增。PCR 扩增程序为 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保温。取 PCR 扩增产物 2 μL 在 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳验证扩增结果后, 按琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒操作说明纯化回收 PCR 特异性扩增产物, 并连接至 pMD-18T 载体, 重组质粒转化至大肠杆菌 Top10, 阳性克隆经菌落 PCR 初步鉴定后由北京六合华大基因科技股份有限公司双向测序。

5'RACE 和 3'RACE 以获得的 HSP70 基因片段为模板设计用于 3' 和 5' 端 RACE 所需的引物(表 1)。以 SMART<sup>™</sup> RACE cDNA Amplification Kit 反转录合成的 cDNA 第一链为

模板,分别用引物 HSP70 3' race1/2 和 HSP70 5' race1/2 与 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 所带的通用引物配对,并完全按照 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 推荐的反应体系和反应条件进行 HSP70 基因 3' 和 5' 端基因序列的扩增。PCR 扩增产物的纯化、克隆、测序与 HSP70 基因片段的克隆所述相同。

**序列的拼接与生物信息学分析** 利用 DNASTar 软件中的 SeqMan 程序对测序结果进行载体序列的去除和拼接。将所得序列提交至 NCBI BLAST 程序中进行序列比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>),利用 DNASTar 软件中的 EdiSeq 程序进行开放阅读框 (ORF) 的预测与氨基酸翻译。对推导出的蛋白序列通过 ProtParam 软件 (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 进行蛋白理化特性预测。使用 InterPro Scan 软件 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>) 进行蛋白质功能结构域分析。使用 Clustal X<sup>[12]</sup> 对脊尾白虾及其它物种的 HSP70 氨基酸序列进行多重比对,然后用 MEGA 4.0 软件<sup>[13]</sup> 构建 NJ 系统树。

**HSP70 基因的表达分析** 以获得的基因序列为模板,利用 Primer 5.0 软件设计一对特异引物 HSP70 HF/HR (表 1),对不同温度、pH 和氨氮胁迫的脊尾白虾的肌肉和肝胰腺中 HSP70 基因的表达进行检测,并根据 GenBank 中脊尾白虾的 18S 序列 (GQ369794) 设计一对内参引物 18S HF/HR (表 1)。荧光定量 PCR (ddCt 法) 扩增体系为 20  $\mu$ L, 包括: SYBR® Premix Ex Taq™ II (2 $\times$ ), 10  $\mu$ L; PCR Forward Primer (10  $\mu$ mol/L), 0.8  $\mu$ L; PCR Reverse Primer (10  $\mu$ mol/L), 0.8  $\mu$ L; ROX Reference Dye II (50 $\times$ ) \* 3, 0.4  $\mu$ L; cDNA 模板, 2.0  $\mu$ L; DEPC 水, 6.0  $\mu$ L。反应程序为 95  $^{\circ}$ C 30 s; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 1 min, 95  $^{\circ}$ C 15 s。将荧光定量 PCR 检测结果导出, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup> 法, 用 SPSS 11.0 软件进行分析。

## 2 结果

### 2.1 脊尾白虾 HSP70 基因全长 cDNA 序列的克隆与序列分析

以脊尾白虾 cDNA 为模板, 利用简并引物 HSP70 F1 和 HSP70 R1 扩增获得了一条长约 1 068 bp 的特异性条带, 与预期大小相同 (图 1-

a)。以 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 反转录合成的 cDNA 第一链为模板, 用引物 HSP70 3' race1/2 和 HSP70 5' race1/2 分别与 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 所带的通用引物配对, 分别获得了一条长约 1 240 bp 和 1 300 bp 的特异性条带 (图 1-b, c)。

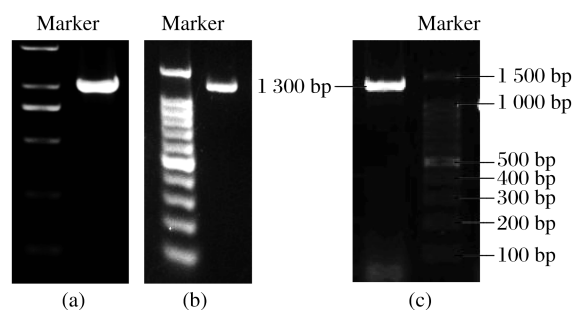


图 1 脊尾白虾 HSP70 基因 cDNA 扩增结果

Marker. DNA 标准; (a) HSP70 基因 cDNA 中间片段; (b) HSP70 基因 cDNA 5'RACE 产物; (c) HSP70 基因 cDNA 3'RACE 产物。

Fig. 1 The amplification result of *E. carinicauda* heat shock protein 70 gene cDNA sequence

Marker. DNA ladder; (a) cDNA fragment of *E. carinicauda* HSP70 gene; (b) 5' RACE result of *E. carinicauda* HSP70 gene; (c) 3' RACE result of *E. carinicauda* HSP70 gene.

将所得片段克隆测序并去除冗余序列后, 用 DNASTar 软件中的 SeqMan 程序进行电子拼接, 获得一条长约 2 250 bp 的基因序列。将该序列在 NCBI BLAST 进行序列比对发现, 该基因序列与其他生物的 HSP70 基因序列的同源性都在 90% 以上。该基因序列已在 GenBank 注册, 登录号为 HQ185257。

根据 kozak 规则和 DNASTar 软件中的 EdiSeq 程序对该基因进一步分析, 显示该基因的开放式阅读框 (ORF) 长度为 1 959 bp, 其两翼分别存在 83 bp (5'端) 和 208 bp (3'端) 的非翻译区, 在该基因的 poly (A) 尾前存在一个加尾序列 AATAAA (图 2)。

### 2.2 编码蛋白组成和结构分析

利用 DNASTar 软件中的 EdiSeq 程序将该基因编码序列翻译为相应的氨基酸序列, 发现该基因编码一个由 652 个氨基酸残基组成的蛋白质, 其分子量为 71.52 ku, 理论等电点为 5.34。通过 InterPro Scan 软件对该蛋白进行结构域分析发现, 该蛋白第 9 ~ 16、197 ~ 210 和 334 ~ 348 位氨基酸残基间具有 HSP70 家族的特征序列 (图 2)。

```

1  GATACCAGCC GGAGACCGAG AAGAGAGCAG ACCTGTTACA ATTAGCTCAT TGGACTATTI AAAAATATCT AAAAATAGAT AAA ATG GCA AAG GCA 95
96  CCA GCT GTC GGT ATT GAT CTG GGA ACC ACC TAC TCC TCC GTC GGT GTC TTC CAG CAT GGC AAG GTC GAA ATC ATC GCC 173
   P A V G I D L G T T Y S C V G V F Q H G K V E I I A
174  AAC GAC CAG GGG AAC CGC ACC ACG CCC TCC TAC GTC GGC TTC ACA GAC ACC GAG GGT CTG ATT GGT GAC GGC GCC AAG 251
   N D Q G N R T T P S Y V A F T D T E R L I G D A A K
252  AAC CAG GTC GCG ATG AAC CCC AAC ACT GTA TTE GAC GCG AAG CGA CTC ATC GGC CGC AAA TTC GAA GAC CAC ACA 329
   N Q V A M N P N H T V F D A K R L I G R K F E D H T
330  GTC CAG AGC GAT GTC AAG CAT TGG CCC TTC ACC ATC ATC AAC GAG AGC ACA AAG GCA AAG ATC CAG GTA GAG TAC AAG 407
   V Q S D M K H W P F T I I N E S T K P K I Q V E Y K
408  GGA GAC AAG AAG ACC TTT TAC GGA GAA GAG ATC TCC TCG ATG GTC CTC ATC AAA ATG AAG GAG ACC GGC GAG GCT TAC 485
   G D K K T F Y P E E I S S M V L I K M K E T A E A Y
486  CTG GGA TCA ACA GTC AAG GAG GCT GTA GTC ACT GTC CCT GCT TAC TTC AAC GAT TCT CAG CGC CAG GGC ACC AAG GAC 563
   L G S T V K D A V V T V P A Y F N D S Q E Q A T K D
564  GCT GGA ACC ATC TGG GGT CTT AAT GTC GTC GGT ATC ATT AAC GAA CCC ACC GCT GCT GCC ATC GCT TAC GGC CTC GAC 641
   A G T I S G L N Y L R I I H E P T A A A I A Y G L D
642  AAA AAG GTC GGC GGT GAG CGC AAT GTC TTG ATC TTC GAT CTT GGC GGT GGT ACC TTC GAT GTC TCC ATC CTT ACC ATC 719
   K K V G G E R N V L I F D L G G G T F D V S I L T I
720  GAG GAT GGT ATC TTC GAG GTC AAG TCA ACA GCT GGT GAC ACT CAC TTG GGC GGT GAA GAC TTC GAC AAC CGC ATG GTC 797
   E D G I F E V K S T A G D T H L G G E D F D N R M V
798  AAC CAC TTC ATC CAG GAA TTC AAG CGC AAG TAC AAG AAG GAC CCA AGT GAG AAC AAG CGC TCC CTG GTC CGC CTG CGT 875
   N H F I Q E F K R K V K K D P S E N K R S L R R L R
876  ACC GCC TGT GAG CGT GCG AAG CGC ACC CTG TCT TCC TCG ACA CAG GCC AGT GTC GAG ATC GAC TCC CTC TTC GAA GGT 953
   T A C E R A K R T L S S S T Q A S V E I D S L F E G
954  ATC GAT TTC TAC ACC TCC ATC ACT CGT GCT CGC TTC GAG GAG CTG TGC GCC CAT CTG TTG CGT GGC ACC TTG GAG CCC 1031
   I D F V T S I T R A R F E E E C A D L F R G T L E P
1032  GTA GAG AAG TCC CTC GGT GAT GGC AAG ATG GAC AAG GCC CAG ATC CAC GAC ATC GTC CTT GTC GGA GGA TCC ACC CGT 1109
   V E K S L R D A K M D K A Q I H D I V L V G G S T R
1110  ATC CCT AAG ATC CAG AAG CTC CTG CAG GAC TTC TTC AAC GGC AAG GAG CTG AAC AAG TCC ATC AAC CCC GAT GAG GCT 1187
   I P K I Q K L L Q D F F N G K E L N K S I N P D E A
1188  GTC GCC TAC GGT GCC GCT GTC CAG GGC ACC ATT CTG TGC GGT GAC AAG TCC GAG GCT GTC CAG GAC CTG TTG CTG TTG 1265
   V A Y G A A V Q A A I L C G D K S E A V Q D L L L L
1266  GAT GTC ACC CCC TTG TCC CTG GGT ATC GAG ACT GGC GGC GGT GTC ATG ACT GGC CTC ATC AAG GGT AAC ACC ACC ATC 1343
   D V T P L S L G I E T A G G V M T A L I K R N T T I
1344  CCC ACC AAG CAG ACT CAG ACC TTC ACC ACC TAC TCT AAC CAG CCA GGT GTC CTT ATT CAG GTC TAC GAG GGA GAG 1421
   P T K Q T Q T F T V S D N Q P G V L I Q V Y E G E
1422  GGT GTC ACC AAG GAC AAC AAC CTC CTG GGT AAG TTC GAG CTG AGT GGC ATC CCA CTT GCT GGT GGC GTC CTT 1499
   R A M T K D N H N L L G K F E L S G I P P A P R G V P
1500  CAG ATC GAG GTC ACC TTC GAC ATC GAC GGC AAC GGT ATC CTG AAC GTA TCC GGC GTC GTC GAC AAG TCT ACT GGC AAG GAG 1577
   Q I E V T F D I D A N G I L N V S A V D K S T G K E
1578  AAC AAG ATT ACC ATC ACC AAC GAC AAG GGT GGC CTC TCC AAG GAG GAG ATC GAG CGC ATG GTC CAG GAC GGC GAG AAG 1655
   N K I T I T N D K G R L S K E E I E R M V Q D A E K
1656  TAC AAG GCT GAC GAT GAG AAG CAG AAG GAC CGT ATT TCT ACC AAG AAC TCC CTG GAG TCT TAC TGC TTC AAC ATG AAG 1733
   Y K A D D E K Q R D R I S A K N S L E S Y C F N M K
1734  TCA ACA GTT GAG GAC GAG AAG TTC AAG GAG AAG ATT TCT GAA GAG GAC CGC AAC AAG ATT TTG GAG ACC TCC AAC GAG 1811
   S T V E D E K F K E K I S E E D R N K I L E T C N E
1812  ACT ATC AAG TGG CTG GAC ATG AAC CAG CTT GGC GAG AAG GAA GAG TAT GAG CAC AAG CAG AAG GAG ATC GAG CAG GTC 1889
   T I K W L D M N Q L G E K E E Y E H K Q K E I E Q V
1890  TGC AAC CCC ATC ATT ACC AAG ATG TAC GCT GCT GGT GGT GCT CCT CCA GGT GGC ATG CCC GGC GGC TTC CCA GGT 1967
   C N P I I T K M Y A A A G G A P P G G M P G G F P G
1968  GGT GCC CCA GGT GCT GGC GGT GCT GGC CCT GGT GCT GGT GGT TCC TCC GGA CCC ACC ATC GAG GAA GTC GAT TAA 2042
   G A P G A G G A A P G A G G S S G P T I E E V D *
2043  ACAGTCTCT CACGCTACT AGTCTCATG TGAATGTC ATGCAATG ACCCATGTA GATCATTCCG CATTITATIT ATGATGTTGG TGGCATGTC 2142
2143  CATTGGCAGA CTTACATIT GCAAGTTTTC AGTAAACCAT TCCAAGAACT TGTAAACCGA ATAAAAAAAA ACAGGAAACC AAAAAAAA AAAAAAAA 2242
2243  AAAAAAA

```

图 2 脊尾白虾 *Ec*-HSP70 的 cDNA 核苷酸序列及其预测的氨基酸序列

[ATG]和[TGA]分别表示起始密码子和终止密码子,下划线碱基是 PCR 引物所在的位置。

Fig. 2 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *E. carinicauda* heat shock protein 70 gene

[ATG] is a start codon, [TGA] is a stop codon. PCR primer sequences are underlined.

2.3 编码蛋白序列比对以及进化树构建

通过 NCBI BLAST 软件对该基因编码的氨基酸序列进行在线搜索比对,该序列与凡纳滨对虾 (ABP01681)和中国明对虾(AAW71958)的同源性最高,都为 99.8%,与斑节对虾 (*Penaeus monodon*) (AAQ05768)的同源性为 99.7%,日本囊对虾 (ABK76338)为 99.5%、刀额新对虾 (*Metapenaeus ensis*) (ABF20530)为 98.1%,与大西洋喷口盲虾 (*Rimicaris exoculata*) (ACL30943)、锯缘青蟹 (ABF85672)、日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) (ABG45886)、罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) (AAS45710)、美洲螯龙虾 (*Homarus americanus*) (ABA02165)、中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) (ACF98297)、云斑厚纹蟹 (*Pachygrapsus marmoratus*) (ABA02164)、红星梭子蟹 (CAL68993)、

拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) (ACE79213)、三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) (CAL68993)、蓝蟹 (*Callinectes sapidus*) (ABF83606)的相似性依次为 92.7%, 92.9%, 95.2%, 93.9%, 96.1%, 94.6%, 91.5%, 93.7%, 91.5%, 94.1%。进化树分析表明,该序列与中国明对虾紧密聚为一支,之后聚类顺序依次为凡纳滨对虾、斑节对虾和日本囊对虾、刀额新对虾等(图3)。

利用 DNAMAN 软件对该基因编码的氨基酸序列与中国明对虾、凡纳滨对虾、斑节对虾、日本囊对虾和刀额新对虾氨基酸序列进行比对,发现所有比对蛋白高度保守,其序列特征分别为 GIDLGTTYSCV, DLGGGTFD, RARFEEL, IVLVGGSTRIPKIQK, GPTIEEVD(图4)。

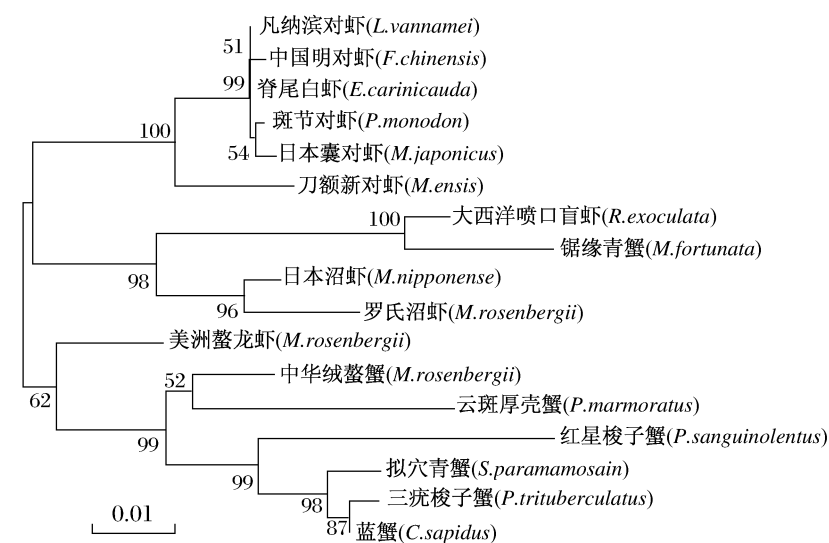


图3 利用 MEGA 4.0 软件构建的基于 HSP70s 氨基酸序列的 NJ 系统树  
 Fig.3 NJ tree based on HSP70s amino acid sequences using MEGA 4.0

中国明对虾	MAKAPAVGIDLGTTYSVGVFQHGKVEIILANDQGNRTTTPSVAFVTDTERLIGDAAMQVAMNPNNTVFDARLIGRKFEDHTVQSDMKHWPFTIINESTR	100
凡纳滨对虾	MAKAPAVGIDLGTTYSVGVFQHGKVEIILANDQGNRTTTPSVAFVTDTERLIGDAAMQVAMNPNNTVFDARLIGRKFEDHTVQSDMKHWPFTIINESTR	100
脊尾白虾	MAKAPAVGIDLGTTYSVGVFQHGKVEIILANDQGNRTTTPSVAFVTDTERLIGDAAMQVAMNPNNTVFDARLIGRKFEDHTVQSDMKHWPFTIINESTR	100
斑节对虾	MAKAPAVGIDLGTTYSVGVFQHGKVEIILANDQGNRTTTPSVAFVTDTERLIGDAAMQVAMNPNNTVFDARLIGRKFEDHTVQSDMKHWPFTIINESTR	100
日本囊对虾	MAKAPAVGIDLGTTYSVGVFQHGKVEIILANDQGNRTTTPSVAFVTDTERLIGDAAMQVAMNPNNTVFDARLIGRKFEDHTVQSDMKHWPFTIINESTR	100
刀额新对虾	MSKASAVGIDLGTTYSVGVFQHGKVEIILANDQGNRTTTPSVAFVTDTERLIGDAAMQVAMNPNNTVFDARLIGRKFEDHTVQSDMKHWPFTIINESTR	100
Consensus	m Ka avgidlgcttysvgyvfhgkveiilandqgnrttppsvafvtdterligndaamqvamnnpntvfdarlligrkfedhtvqsdmnhwfpftinestr	
中国明对虾	PKIQVEYKDKKTFYPEEISSMVLKHKETAAYLGSVTKDAVVTVPAYFNDSQPQATKADAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGGERNVLIIFDL	200
凡纳滨对虾	PKIQVEYKDKKTFYPEEISSMVLKHKETAAYLGSVTKDAVVTVPAYFNDSQPQATKADAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGGERNVLIIFDL	200
脊尾白虾	PKIQVEYKDKKTFYPEEISSMVLKHKETAAYLGSVTKDAVVTVPAYFNDSQPQATKADAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGGERNVLIIFDL	200
斑节对虾	PKIQVEYKDKKTFYPEEISSMVLKHKETAAYLGSVTKDAVVTVPAYFNDSQPQATKADAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGGERNVLIIFDL	200
日本囊对虾	PKIQVEYKDKKTFYPEEISSMVLKHKETAAYLGSVTKDAVVTVPAYFNDSQPQATKADAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGGERNVLIIFDL	200
刀额新对虾	PKIQVEYKDKKTFYPEEISSMVLKHKETAAYLGSVTKDAVVTVPAYFNDSQPQATKADAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGGERNVLIIFDL	200
Consensus	pkIQVEYKDKKTFYPEEISSMVLKHKETAAYLGSVTKDAVVTVPAYFNDSQPQATKADAGTISGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDKKVGGERNVLIIFDL	
中国明对虾	GGGTFDVSLLTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDRNHNHVF IQEFKRYKDDPSNKRSLRRLRTACERAKRTLSSTQASVEIDSLFEGIDFYTSITRA	300
凡纳滨对虾	GGGTFDVSLLTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDRNHNHVF IQEFKRYKDDPSNKRSLRRLRTACERAKRTLSSTQASVEIDSLFEGIDFYTSITRA	300
脊尾白虾	GGGTFDVSLLTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDRNHNHVF IQEFKRYKDDPSNKRSLRRLRTACERAKRTLSSTQASVEIDSLFEGIDFYTSITRA	300
斑节对虾	GGGTFDVSLLTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDRNHNHVF IQEFKRYKDDPSNKRSLRRLRTACERAKRTLSSTQASVEIDSLFEGIDFYTSITRA	300
日本囊对虾	GGGTFDVSLLTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDRNHNHVF IQEFKRYKDDPSNKRSLRRLRTACERAKRTLSSTQASVEIDSLFEGIDFYTSITRA	300
刀额新对虾	GGGTFDVSLLTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDRNHNHVF IQEFKRYKDDPSNKRSLRRLRTACERAKRTLSSTQASVEIDSLFEGIDFYTSITRA	300
Consensus	gggtdfvslltiedgifevktagdthlggedfdrnvnvhfIQEFKRYKDDPSNKRSLRRLRTACERAKRTLSSTQASVEIDSLFEGIDFYTSITRA	
中国明对虾	RFEELCADLFRGTLPEVKSRLDAKNDKAQIHDVILVGGSTRIPKIQRLQDFPFGKELNKSINPDEAVYGAQVAAIICGDKSEAVQDLLLLDVTPLS	400
凡纳滨对虾	RFEELCADLFRGTLPEVKSRLDAKNDKAQIHDVILVGGSTRIPKIQRLQDFPFGKELNKSINPDEAVYGAQVAAIICGDKSEAVQDLLLLDVTPLS	400
脊尾白虾	RFEELCADLFRGTLPEVKSRLDAKNDKAQIHDVILVGGSTRIPKIQRLQDFPFGKELNKSINPDEAVYGAQVAAIICGDKSEAVQDLLLLDVTPLS	400
斑节对虾	RFEELCADLFRGTLPEVKSRLDAKNDKAQIHDVILVGGSTRIPKIQRLQDFPFGKELNKSINPDEAVYGAQVAAIICGDKSEAVQDLLLLDVTPLS	400
日本囊对虾	RFEELCADLFRGTLPEVKSRLDAKNDKAQIHDVILVGGSTRIPKIQRLQDFPFGKELNKSINPDEAVYGAQVAAIICGDKSEAVQDLLLLDVTPLS	400
刀额新对虾	RFEELCADLFRGTLPEVKSRLDAKNDKAQIHDVILVGGSTRIPKIQRLQDFPFGKELNKSINPDEAVYGAQVAAIICGDKSEAVQDLLLLDVTPLS	400
Consensus	rfeelcadlfrgtlpevksrlrdakndkaqihdvlvvgstripkiqrlldqdfpfgkelnksinpdeavaygaavqaaicgdkseavqdllldvtpls	
中国明对虾	LGIEAGGVMTALIKRNTTIPKQQTQFTTYSNDQPVLIQVYGERAMTKDNNLLGKFLSGIPFAPRGVQIEVTFPIDANGILNVAVDKSTGKRNK	500
凡纳滨对虾	LGIEAGGVMTALIKRNTTIPKQQTQFTTYSNDQPVLIQVYGERAMTKDNNLLGKFLSGIPFAPRGVQIEVTFPIDANGILNVAVDKSTGKRNK	500
脊尾白虾	LGIEAGGVMTALIKRNTTIPKQQTQFTTYSNDQPVLIQVYGERAMTKDNNLLGKFLSGIPFAPRGVQIEVTFPIDANGILNVAVDKSTGKRNK	500
斑节对虾	LGIEAGGVMTALIKRNTTIPKQQTQFTTYSNDQPVLIQVYGERAMTKDNNLLGKFLSGIPFAPRGVQIEVTFPIDANGILNVAVDKSTGKRNK	500
日本囊对虾	LGIEAGGVMTALIKRNTTIPKQQTQFTTYSNDQPVLIQVYGERAMTKDNNLLGKFLSGIPFAPRGVQIEVTFPIDANGILNVAVDKSTGKRNK	500
刀额新对虾	LGIEAGGVMTALIKRNTTIPKQQTQFTTYSNDQPVLIQVYGERAMTKDNNLLGKFLSGIPFAPRGVQIEVTFPIDANGILNVAVDKSTGKRNK	500
Consensus	lgietagvmtaliktnttptkqqtqfttysndqpvliqvYgeramtkdnnllgkflsgippaprgvqvievtfpidangilnvasvdkstgkrenk	
中国明对虾	ITITNDGRSLKSEEIERHVQDAEKYKADDEKQDRISAKNSLESYCFNMKSTVEDEFKKEISEEDRNKILETCNETIKULDNNQGEKEEYEHKQKEIE	600
凡纳滨对虾	ITITNDGRSLKSEEIERHVQDAEKYKADDEKQDRISAKNSLESYCFNMKSTVEDEFKKEISEEDRNKILETCNETIKULDNNQGEKEEYEHKQKEIE	600
脊尾白虾	ITITNDGRSLKSEEIERHVQDAEKYKADDEKQDRISAKNSLESYCFNMKSTVEDEFKKEISEEDRNKILETCNETIKULDNNQGEKEEYEHKQKEIE	600
斑节对虾	ITITNDGRSLKSEEIERHVQDAEKYKADDEKQDRISAKNSLESYCFNMKSTVEDEFKKEISEEDRNKILETCNETIKULDNNQGEKEEYEHKQKEIE	600
日本囊对虾	ITITNDGRSLKSEEIERHVQDAEKYKADDEKQDRISAKNSLESYCFNMKSTVEDEFKKEISEEDRNKILETCNETIKULDNNQGEKEEYEHKQKEIE	600
刀额新对虾	ITITNDGRSLKSEEIERHVQDAEKYKADDEKQDRISAKNSLESYCFNMKSTVEDEFKKEISEEDRNKILETCNETIKULDNNQGEKEEYEHKQKEIE	600
Consensus	ititndgrslskeeierhvqdaekykaddeqdrisaknslesycfnmkstvedefkkeiseedrnkiletcnetikuldnnqgekeeyehkqkeie	
中国明对虾	QVCNPIITKNYAAAGGAPPGGPPGGAPGAGGAAPGAGGSSOPTIEEVD	652
凡纳滨对虾	QVCNPIITKNYAAAGGAPPGGPPGGAPGAGGAAPGAGGSSOPTIEEVD	652
脊尾白虾	QVCNPIITKNYAAAGGAPPGGPPGGAPGAGGAAPGAGGSSOPTIEEVD	652
斑节对虾	QVCNPIITKNYAAAGGAPPGGPPGGAPGAGGAAPGAGGSSOPTIEEVD	652
日本囊对虾	QVCNPIITKNYAAAGGAPPGGPPGGAPGAGGAAPGAGGSSOPTIEEVD	652
刀额新对虾	QVCNPIITKNYAAAGGAPPGGPPGGAPGAGGAAPGAGGSSOPTIEEVD	648
Consensus	qvcnpiitkny aagg ppgppgg g apg g gsgoptieevd	

图4 脊尾白虾 *Ec*-HSP70 氨基酸序列与其它物种 HSP70s 氨基酸序列比较  
 Fig.4 Amino acid sequence alignment of *E. carinicauda Ec*-HSP70 with different animals' HSP70s

2.4 脊尾白虾 HSP70 基因的表达分析

如图 5 所示,高温或低温处理后,脊尾白虾的肝胰腺和肌肉中的 HSP70 都明显升高,且显著地

高于对照组 ( $P < 0.05$ )。如图 6 和图 7 所示, pH、氯化铵刺激后,肝胰腺和肌肉组织 HSP70 表现出具有显著差异的时间依赖性和瞬时表达趋势,

总体表现为先降低再升高最后降低的趋势;pH、氯化铵刺激后,肝胰腺中 HSP70 都显著低于对照组( $P < 0.05$ ),2 h 开始明显高于对照组,分别在 2 h 和 4 h 达到最高值,然后表达值开始回落,在 8~12 h 基本回落到初始水平,随后又显著低于对照组( $P < 0.05$ )。而肌肉中的 HSP70 表达有一定的滞后性,在 8 h 时表达量达到最高值,pH 刺激组 24 h 回落到刺激前的水平,NH<sub>4</sub>Cl 刺激组 24 h 还显著高于对照组( $P < 0.05$ ),回落到刺激前水平可能还要更长时间。

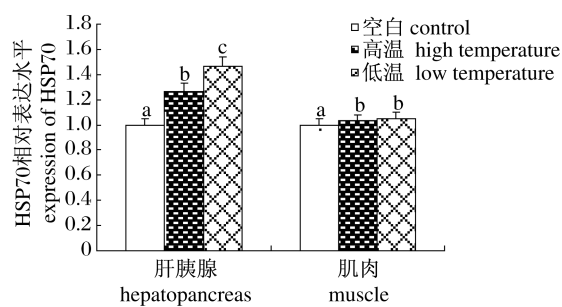


图5 不同温度刺激脊尾白虾 HSP70 表达情况  
Fig. 5 Expression of HSP70 gene in *E. carinicauda* after the heat/cold shock condition

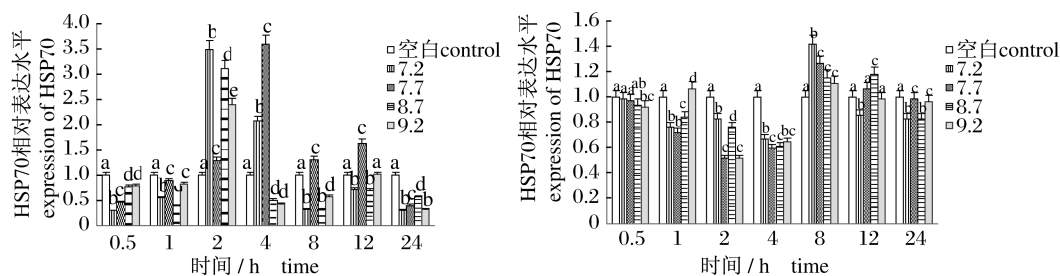


图6 不同 pH 刺激脊尾白虾后肝胰腺和肌肉 HSP70 表达情况  
Fig. 6 Expression of HSP70 gene in *E. carinicauda* hepatopancreas and muscle after different pH treatments at different time

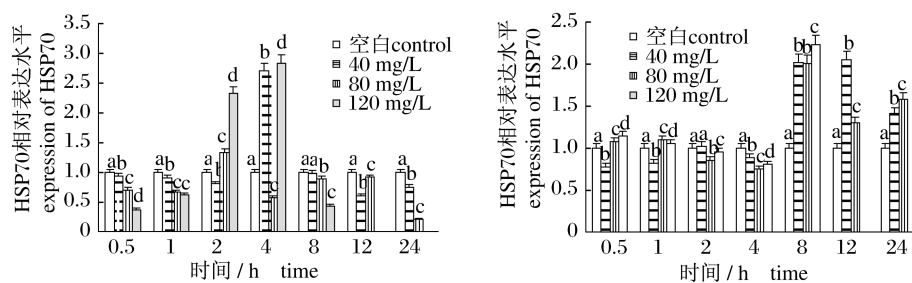


图7 不同氨氮刺激脊尾白虾后肝胰腺和肌肉 HSP70 表达情况  
Fig. 7 Expression of HSP70 gene in *E. carinicauda* hepatopancreas and muscle after different NH<sub>4</sub>Cl treatments at different time

### 3 讨论

自 1962 年 RITOSSA 等首次观察到热休克反应,近 50 年来,世界各地的学者对脊椎动物 HSP70 的基因序列、结构、基因功能、蛋白质三维结构以及进化关系等方面开展了广泛而深入的研究,而对无脊椎动物 HSP70 的研究相对滞后。HSP70 家族作为分子伴侣在应激状态下占有重要地位,在进化上高度保守,具有一个普遍的结构:N 端分子量 45 ku 大小,具有 ATPase 活性的功能

结构域;C 端分子量为 25 ku 大小的多肽底物结合域<sup>[14]</sup>。本研究克隆的 HSP70 基因经氨基酸序列分析显示,该序列与 LIU 等<sup>[15]</sup>发现的罗氏沼虾 Mar-HSC70 氨基酸序列很相似,同样具有 HSP70 家族的 3 个标签序列。另外还发现具有与袁嘉恩等<sup>[16]</sup>研究的中华绒螯蟹 HSP70 基因相同的特征基序,如 Dnak 特征基序 10~18 aa (DLGTT-S-V);非细胞器基序 299~305 aa (RARFEEL);胞质 HSP70 C 端特征基序 645~652 (GPTIEEVD)。将该基因编码的氨基酸序列与其他甲壳动物的

HSP70 氨基酸序列比对发现,其相似性都在 90% 以上。由此确定本研究获得的序列为脊尾白虾 HSP70 基因序列。

一些研究认为,环境胁迫因子(如水体 pH、温度、盐度、氨氮等)变化诱导的生理效应可能经由氧化还原途径实现<sup>[17-19]</sup>,即环境胁迫因子造成生物体内有氧代谢异常,适量的活性氧对机体具有一定的保护作用,但过量的活性氧可导致氧化胁迫<sup>[20]</sup>,引起机体氧化损伤<sup>[21]</sup>。HSP70 可抑制产生氧自由基的关键酶即烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶,通过反馈抑制作用减少氧自由基的产生,还可提高内源性过氧化酶如超氧化物歧化酶(super oxide dismutate, SOD)水平,从而加快氧自由基的清除<sup>[22]</sup>。研究还发现, SOD mRNA 水平的增高与 HSP70 mRNA 表达的增高相一致<sup>[23]</sup>。细胞内 HSP70 家族基因表达水平增加,可对抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对细胞膜的损伤,减少 Ca<sup>2+</sup> 进入细胞,从而保护细胞免受由活性氧族介导的 Ca<sup>2+</sup> 内流引起的细胞毒性和细胞凋亡<sup>[24]</sup>,也可抑制应激激酶激活及凋亡激活基因 p53 和 Bax 的表达,抑制凋亡信号转导中的蛋白水解和抑制氧自由基的生成<sup>[25]</sup>。

本研究发现,脊尾白虾 HSP70 基因表达存在组织差异性和时间依赖性,肝胰腺中 HSP70 基因的表达明显高于肌肉,这可能与不同组织的功能定位有关,由于活性氧物质伴随代谢过程而产生,因此代谢强度越大,产生的活性氧越多,肝胰腺作为营养物质的代谢中心,需要更强的抗氧化系统清除肝胰腺中的多余活性氧<sup>[26]</sup>。据报道,活性氧过度积累可破坏细胞电子传递链、线粒体膜电位及 ATP 能量产生,进而导致细胞的呼吸障碍,严重时甚至引起细胞的凋亡或者坏死,机体抗氧化能力明显降低<sup>[27-28]</sup>。本试验中脊尾白虾在胁迫时间超过 24 h 左右时,肝胰腺中 HSP70 基因表达明显的低于正常水平,可能是由于氧化损伤,使得机体的抗氧化能力明显降低。本研究中肝胰腺中 HSP70 基因的高表达出现的比肌肉中早,可能的原因是肝胰腺对环境(温度、pH 和氨氮)胁迫较肌肉更为敏感。

近年来的研究发现, HSP70 表达水平的高低对生物体的抗逆能力和环境适应能力具有重要的影响。CRUZ-RODRIGUEZ 等<sup>[29]</sup>用多环芳香烃等化学药物和污染水域的沉积物刺激美洲牡蛎,

发现其体内 HSP70 大量表达,从而表明 HSP70 可参与机体对不良环境的抵御,维持细胞内环境的稳定。NAKANO 等<sup>[30]</sup>利用 2 种潮间杜父鱼(*Oligocottus maculosus* and *O. snyderi*)进行研究表明,当机体内 HSP70 储存较多时,机体具有更大的热耐受能力,能够适应更大的温差变化,淡水海绵(*Ephydatia fluviatilis*)受亚致死热刺激后,也表现出对化学污染物有很强的抵抗力。黄桂菊等<sup>[31]</sup>发现合浦珠母贝在高盐胁迫下,各组织的 HSP70 mRNA 表达均显著增加。本研究中脊尾白虾受温度、pH、氨氮胁迫后组织中的 HSP70 表达明显增强,再次说明 HSP70 与生物体适应环境的能力有关,也说明 HSP70 可能增强其对不良环境的抵抗力。

#### 参考文献:

- [1] 刘瑞玉. 中国北部经济虾类[M]. 北京:中国农业出版社,1995:48-49.
- [2] 谷文萍. 热休克蛋白 70 研究进展[J]. 国外医学·神经病学神经外科学分册,1999,26(2):57-59.
- [3] POLLA B S. Heat shock proteins in host-parasite interactions[J]. Parasitology Today, 1991, 7(3):38-41.
- [4] AAHBURNE R M, BONNER J J. The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock[J]. Cell, 1979, 17(2):241-254.
- [5] KIANG J G, TSOKOS G C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology [J]. Pharmacol & Therapeutics, 1998, 80(2):183-201.
- [6] BASU N, TODGHAMA A E, ACKERMAN P A, et al. Heat shock protein genes and their functional significance in fish[J]. Gene, 2002, 295:173-183.
- [7] MORIMOTO R I, SANTORO M G. Stress-inducible responses and heat shock proteins: New pharmacological targets for cytoprotection [J]. Nature Biotechnology, 1998, 16:833-838.
- [8] PARSELL D A, LINDQUIST S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: Degradation and reactivation of damaged proteins [J]. Genetics, 1993, 27:437-496.
- [9] 哈承旭, 刘萍, 何玉英, 等. 氯化铵对“黄海 1 号”中国对虾免疫相关酶类的影响[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(1):34-40.
- [10] 董双林, 堵南山, 赖伟. pH 值和 Ca<sup>2+</sup> 浓度对日本沼虾生长和能量收支的影响[J]. 水产学报, 1994, 18

- (2):118-123.
- [11] CHEN P, LI J T. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase gene in swimming crab *Portunus trituberculatus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28(1):106-112
- [12] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAK F J, *et al.* The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24):4876-4882.
- [13] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: an integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Brief Bioinformatics*, 2004, 5(2):150-163.
- [14] 吴任, 谢数涛, 孙勇, 等. 凡纳滨对虾热休克蛋白 70 的原核高效表达 [J]. *中国水产科学*, 2006, 13(2):305-309.
- [15] LIU J, YANG W J, ZHU X J, *et al.* Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2004, 9:313-323.
- [16] 袁嘉恩, 许忠能, 雷腊梅, 等. 克隆与序列分析中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) HSP70 基因全长 ORF 的 RACE [J]. *暨南大学学报: 自然科学版*, 2008, 29:516-521.
- [17] RYTER S W, KIM H P, HOETZEL A, *et al.* Mechanisms of cell death in oxidative stress [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(1):49-89.
- [18] ASSEFA Z, LAETHEM A V, GARMYN M, *et al.* Ultraviolet radiation induced apoptosis in keratinocytes: on the role of cytosolic factors [J]. *Biochim et Biophysica Acta: Reviews on Cancer*, 2005, 1775(2):90-106.
- [19] RICHIER S, SABOURAULT C, COURTIADÉ J, *et al.* Oxidative stress and apoptotic events during thermal stress in the symbiotic sea anemone, *Anemonia viridis* [J]. *FEBS Journal*, 2006, 273(18):4186-4198.
- [20] FRANCO R, SÁNCHEZ-OLEA R, REYES E M, *et al.* Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois [J]. *Mutation Research: Genetic Toxicology Environmental Mutagenesis*, 2009, 674(1-2):3-22.
- [21] RANBY B, RABEK J J. Singlet oxygen [M]. New York: In Wiley, 1978:331.
- [22] 张红波, 万亚涛, 王莲哲, 等. 在细胞应激反应中 HSP70 的保护与调节作用 [J]. *中国实用医药*, 2009, 14(4):228-229.
- [23] NIEDWIECKI A, REVEILLAUD I, FLEMING J E. Changes in superoxide dismutase and catalases in aging heat-shocked drosophila [J]. *Free Radical Research Communications*, 1992, 17(6):355-356.
- [24] GULLO C A, TEOH G. Heat shock proteins: to present or not, that is the question [J]. *Immunology Letters*, 2004, 94:1-10.
- [25] 赵钢, 王学敏, 江伟, 等. 热应激反应对内毒素刺激中性粒细胞释放蛋白酶的影响 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2006, 22:347-349.
- [26] 周俊, 王维娜. pH 值的变化对南美白对虾组织中抗氧化酶基因表达的影响 [C] // 第六届世界华人虾蟹养殖研讨会论文摘要集. 广州: 广东省科学技术协会科技交流部, 2008.
- [27] DANDAPAT J, CHAINY G B N, RAO K J. Lipid peroxidation and antioxidant defence status during larval development and metamorphosis of giant prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2003, 136(3):221-233.
- [28] OTT M, GOGVADZE V, ORRENIUS S, *et al.* Mitochondria, oxidative stress and cell death [J]. *Apoptosis*, 2007, 12(5):913-922.
- [29] CRUZ-RODRIGUEZ L A, CHU F E. Heat shock protein (HSP70) response in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to PAHs sorbed to suspended artificial clay particles and to suspended field contaminated sediments [J]. *Aquatic Toxicology*, 2002, 60(34):157-168.
- [30] NAKANO K, IWAMAA G K. The 70-kDa heat shock protein response in two intertidal sculpins, *Oligocottus maculosus* and *O. snyderi*: relationship of hsp70 and thermal tolerance [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2002, 133(1):79-94.
- [31] 黄桂菊, 曲妮妮, 喻达辉, 等. 合浦珠母贝热休克蛋白 HSP70 基因的克隆与表达分析 [J]. *中国水产科学*, 2007, 14(5):726-732.



## Cloning and expression of heat shock protein 70 (HSP70) of *Exopalaemon carinicauda*

HAN Jun-ying<sup>1,2</sup>, LI Jian<sup>1\*</sup>, LI Ji-tao<sup>1</sup>, CHANG Zhi-qiang<sup>1</sup>, CHEN Ping<sup>1</sup>, LI Hua<sup>2</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Life Science & Technology, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

**Abstract:** In this study, full-length cDNA sequence of heat shock protein 70 (HSP70) was isolated from hepatopancreas of *Exopalaemon carinicauda*, which was named *Ec*-HSP70. The full-length cDNA sequence of heat shock protein 70 is 2 250 bp, which contains a 83 bp 5'-UTR (untranslated region), 208 bp 3'-UTR (untranslated region), and 1 959 bp open reading frame (ORF) that encodes 652 amino acid residues. There are three HSP70 family signatures between 8–15, 199–206 and 334–348 amino acids residues of *Ec*-HSP70, and these sequences are highly conserved in *Fenneropenaeus chinensis*, *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus monodon*, *Marsupenaeus japonicus*, *Metapenaeus ensis*. The phylogenetic analysis based on amino acid sequence shows that *Ec*-HSP70 has the highest similarity (99.8%) with HSP70 of *L. vannamei* and *F. chinensis*, and has above 90% similarities with other crustacean species, indicating that this protein is one of heat shock protein HSP70 family members. The expression of the gene in hepatopancreas and muscle was analyzed by quantitative Real-time PCR, the result shows that the expression of HSP70 gene was higher in hepatopancreas and muscle after stimulation with the temperature, pH and NH<sub>4</sub>Cl. The higher expression time of *Ec*-HSP70 cDNA in hepatopancreas was earlier than in muscle. HSP70 mRNA expressions were inhibited with longer stress time. Hepatopancreas were more sensitive than muscle to the temperature, pH and NH<sub>4</sub>Cl stresses.

**Key words:** *Exopalaemon carinicauda*; heat shock protein 70 (HSP70); gene cloning; expression

**Corresponding author:** LI Jian. E-mail: lijian@ysfri.ac.cn