

## 真蛸热休克蛋白 90 基因 (*HSP90*) 的克隆及表达

孙田田, 苏永全, 洪婧妮, 邬阳, 张曼, 毛勇\*

(厦门大学海洋与地球学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 为深入了解真蛸热应激响应机制, 实验以真蛸的应激蛋白为研究对象, 借助同源扩增和 cDNA 末端快速扩增 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 技术获得真蛸热休克蛋白 90 (*HSP90*) 的 cDNA 全序列 (2 709 bp), 它包含 119 bp 的 5' 非编码区 (untranslated regions, UTR)、454 bp 的 3'UTR 和 2 136 bp 的开放阅读框 (opening reading frame, ORF), ORF 共编码 711 个氨基酸, 推算其分子量为 81.5 ku, 理论等电点为 5.09。同源分析显示, 所推导的氨基酸序列高度保守, 并且含有 *HSP90* 家族特有的 5 个保守信号序列区域。实时荧光定量 PCR 分析表明, 该基因在所有选取的组织中均有表达, 肝组织中表达量最高。

**关键词:** 真蛸; 热休克蛋白 90; 克隆; 实时荧光定量 PCR

**中图分类号:** Q 786; S 917.4

**文献标志码:** A

真蛸 (*Octopus vulgaris*) 别名母猪章、章鱼、八爪鱼, 隶属于软体动物门 (Mollusca), 头足纲 (Cephalopods), 八腕目 (Octopoda), 蛸科 (章鱼科, Octopodidae), 蛸亚科 (章鱼亚科, Octopodinae), 蛸属 (章鱼属, *Octopus*), 属世界暖水性种, 广泛分布于日本以南太平洋、印度洋、大西洋和地中海海域<sup>[1-2]</sup>, 在我国主要分布于舟山群岛以南的浙、闽、粤、琼、桂近海区域。它属于软体动物中一个很古老的类群, 但其闭管式循环的消化系统、高度发达的大脑和灵敏的运动能力却显示其具备较高的进化地位。真蛸肉质鲜美, 营养丰富, 生命周期短, 生长速度快<sup>[3]</sup>, 在浙、闽、粤已成为一种极具养殖潜力的新兴物种。Vaz-Pires 等<sup>[4]</sup>报道真蛸的适温范围狭窄, 为 16 ~ 21 °C, 极易产生高温或低温应激死亡。另外, 它在低盐、重金属污染、敌害攻击、病原菌侵染等应激条件下会产生非常独特的应激响应, 如瞬间喷墨、自断其腕、体色骤变、体表大量分泌粘液等<sup>[5]</sup>, 这些应激反应虽有利于其摆脱逆境损害, 但对其正常生长也影响明显。因此, 阐明真蛸独特的应激响应机制, 对于提高真蛸应激耐受、促进真蛸产业健康发展具有重要意义。

热休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs) 是一

组功能极为重要、结构高度保守的分子伴侣家族, *HSP90* 是热休克蛋白家族中的重要成员<sup>[6-7]</sup>, 广泛存在于从低等原核生物到高等哺乳动物中, *HSP90* 在胚胎初期就已明显表达<sup>[8]</sup>, 并在受到外界温度、盐度、重金属、病原菌侵染等环境刺激时及时产生热耐受来抵御外界刺激, 增强自身抵抗力, 降低外界应激对自身造成的伤害<sup>[9]</sup>, 是一类重要的应激相关因子。Manchado 等<sup>[10]</sup>指出 *HSP90* 存在  $\alpha$ 、 $\beta$  两种亚型, 其中  $\alpha$  亚型属诱导型表达 (inducible form),  $\beta$  亚型属组成型表达 (constitutive form)。目前, 尚未发现头足类 *HSP* 基因家族的公开报道, 缺乏对于无脊椎动物中高智力物种真蛸应激相关基因进化规律的深入认识, 也限制了对真蛸热应激响应机制的探索了解。

本实验以头足类真蛸为研究对象, 利用本实验室构建的真蛸转录组数据库, 筛查出 *HSP90* 同源片段, 进而克隆获得 *HSP90* 的 cDNA 全序列和基因序列, 开展真蛸 *HSP90* 的结构分析和功能预测, 借助 *HSP90* 氨基酸序列对真蛸在生物界的进化地位进行探索研究, 并利用 RT-PCR 技术分析真蛸 *HSP90* 的组织表达谱, 为后续的进化免疫学研究奠定理论基础, 也为探索真蛸的应激机制提

收稿日期: 2012-01-07 修回日期: 2012-02-18

资助项目: 国家海洋公益性行业科研专项 (201005013); 国家科技支撑计划 (2011BAD13B08)

通讯作者: 毛勇, E-mail: maoyong@xmu.edu.cn

供了重要的基因资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用真蛸取自福建霞浦野生群体,共选取10只真蛸样品暂养于2.5 m × 2 m × 1.5 m 水泥池,上面盖黑布避光。实验样品平均体质量300 g,均为雌性未成熟个体,在这一时期个体基因表达均处于正常状态,组织表达分析选取5头真蛸进行平行实验,实验样本遵循随机抽取的原则。

非液氮型样品 RNA 保存液 (RNAfixer) 购自北京百泰克生物技术有限公司; RNAiso Plus、PrimeScript Reverse Transcriptase、SYBR Premix Taq<sup>TM</sup> II (Tli RNaseH Plus)、pMD19-T Vector、Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)、TaKaRa LA Taq、dATP、TaKaRa Ex Taq、Genome Walking Kit、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II (Tli RNaseH Plus) 均购自宝生物工程(大连)有限公司; DNA 纯化通用试剂盒、高效感受态细胞制备试剂盒购自厦门鹭隆生物有限公司; 其它常用试

剂耗材购自厦门太阳马生物有限公司。

### 1.2 引物设计

从真蛸转录组数据库中筛选与 HSP90 基因高度相似的 unigene 片段作为模板,利用引物设计软件 Primer Premier 5.0<sup>[11]</sup> 和分析软件 Oligo 6.0 遵循引物设计原则<sup>[12]</sup> 进行设计,以其它物种 HSP90 cDNA 的高度保守区做模板设计简并引物,并利用所得中间片段分别设计 3'RACE 和 5'RACE 巢式引物,内参基因  $\beta$ -actin 参考文献 [13],所有引物如下表 1 所示,均由南京金斯瑞生物科技有限公司(Genscript)合成。

### 1.3 实验方法

取健康真蛸个体的肝、鳃、鳃心、唾液腺、脑、性腺、心、血迅速置于非液氮型样品 RNA 保存液中,置 4 °C 过夜后放 -20 °C 保存。取腕部肌肉保存于酒精中,用于基因组 DNA 提取。

总 RNA 提取和模板制备 使用 RNA 提取液 RNAiso Plus 按照说明书要求提取各个组织总 RNA,取 3  $\mu$ L RNA 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,并利用 ND-1000 超微量紫外分光光度计测 OD 值。

表 1 本实验所用的主要引物  
Tab.1 Primers used in the study

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence	用途 usage
1F23	GGAGGATAAGACAGCCTATGAAG	3'RACE
1F66	AAGACAGCCTATGAAGGATTAT	3'RACE
RA	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC	RACE
Oligo dT-RA	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30VN	反转录/RACE
2F	TGACTAACGATTGGGAGGAA	cDNA/DNA 中间片段扩增
2R	TAGTGACAATACAGCAGGGAGA	cDNA/DNA 中间片段扩增
3F	ATTGCHCAGYTGATGAGYTTGAT	cDNA/DNA 中间片段扩增
3R	AGCCCGGAAGTCCAGTTGACCT	cDNA/DNA 中间片段扩增
1R347	GCAGAATAGAAACCGACACCAAAC	5'RACE
2R208	CAGTATCAATAATGGTCAATGTGTT	5'RACE
5BY1R311	CGACACCAAACGACCAATCATAGA	5'步移
5BY2R168	AATGTGTTATCCTCCTTGTGGGG	5'步移
5BY3R69	AGAGCATCAGAAGAGTTAGAAATCA	5'步移
3BY1F5	CTTTGGTCTTGGTTTGGATGAA	3'步移
3BY2F79	CATTAGAGGGAGATGATGATTT	3'步移
3BY3F295	TGAAAACAACTCTCCATTGCTTGT	3'步移
ORF-F	ATGTCTGAAGTTGAAGGAGAAGT	ORF/DNA 扩增
ORF-R	ATCATCTCCCTCTAATGCTGGC	ORF/DNA 扩增
RT-F	CATTGACTAACGATTGGGAGGAAC	实时荧光定量 PCR
RT-R	TAAATACTCGGCGTACATACAAC	实时荧光定量 PCR
$\beta$ -actin-F	TGATGGCCAAGTTATCACCA	RT-PCR 内参基因
$\beta$ -actin-R	TGGTCTCATGGATACCAGCA	RT-PCR 内参基因

注:简并碱基对照,H=A/T/C;Y=C/T。

Notes:Standard code for mixed base sites,H=A/T/C;Y=C/T.

取 RNA 样品 5  $\mu\text{L}$  置于 RNase-free 离心管中,依次加入引物 oligo dT-RA 2  $\mu\text{L}$ ,70  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min,冰上骤冷 2 min 以上,再依次加入以下试剂,10  $\times$  buffer 4  $\mu\text{L}$ 、dNTP (10 mmol/L) 2  $\mu\text{L}$ 、PrimeScript Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 、DEPC(diethyl-pyrocabonate)水 6  $\mu\text{L}$ ,总体积达 20  $\mu\text{L}$ ,混合均匀后 42  $^{\circ}\text{C}$  孵育 90 min 反转录,94  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min,所得产物即为 cDNA 第一条链模板,该模板可直接用作 3'RACE。

5'端 RACE 模板的制备是首先对合成的 cDNA 第一链模板进行去 RNA 处理,体系为 cDNA 第一链模板 20  $\mu\text{L}$ ,5  $\times$  Hybrid Degeneration Buffer 3  $\mu\text{L}$ ,RNase H(60 U/ $\mu\text{L}$ )0.5  $\mu\text{L}$ ,DEPC 水 6.5  $\mu\text{L}$  至总体积达 30  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$  1 h,65  $^{\circ}\text{C}$  20 min。然后进行同聚化加尾 polyA,对 30  $\mu\text{L}$  体系进行酒精沉淀(3 倍体积)至少 0.5 h,在出现较多沉淀后 12 000 r/min 离心 10 min,倒掉上清液吸干残余液体,自然晾干后加入 20  $\mu\text{L}$  DDW(double distill water)充分溶解沉淀,并依次加入下列配制反应液:dATP(100 mmol/L)1  $\mu\text{L}$ ,5  $\times$  TdT buffer 10  $\mu\text{L}$ ,0.1% BSA 5  $\mu\text{L}$ ,TdT 酶(14 U/ $\mu\text{L}$ )1  $\mu\text{L}$ ,DDW 13  $\mu\text{L}$  至总体积达 50  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$  1 h,70  $^{\circ}\text{C}$  5 min,所得产物即为 5'RACE 模板。

真蛸 *HSP90* cDNA 克隆 分别利用简并引物 2F/2R、3F/3R 进行真蛸 *HSP90* 的中间片段扩增,PCR 反应体系:DDW40.5  $\mu\text{L}$ ,10  $\times$  buffer 5  $\mu\text{L}$ ,dNTP(10 mmol/L each)1  $\mu\text{L}$ ,每个引物分别 1  $\mu\text{L}$ ,Ex *Taq* 酶(2.5 U/ $\mu\text{L}$ )0.5  $\mu\text{L}$ ,稀释 20 倍的肝 cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ ,总体积达 50  $\mu\text{L}$ ,PCR 反应程序:94  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  45 s,55  $^{\circ}\text{C}$  1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  45 s,30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min,10  $^{\circ}\text{C}$  延伸。参照分子克隆实验指南,PCR 产物经检测证实为目的产物大小后通过 2% 琼脂糖凝胶电泳回收目的条带,并将纯化产物连接至 pMD19-T 载体后转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞于液体 LB 培养液培养,菌液涂布于 LB 固体平板并倒置 37  $^{\circ}\text{C}$  培养,挑取阳性克隆测序即可获得目的片段序列。

利用 3'RACE 的巢式引物依次进行 3'末端序列的扩增,PCR 反应体系:DDW40.5  $\mu\text{L}$ ,10  $\times$  buffer 5  $\mu\text{L}$ ,dNTP(10 mmol/L each)1  $\mu\text{L}$ ,RA(20 nmol/L),巢式引物 F23/F66 1  $\mu\text{L}$ ,Ex *Taq* 酶(2.5 U/ $\mu\text{L}$ )0.5  $\mu\text{L}$ ,cDNA 第一链模板/第一轮巢式 PCR 稀释产物 1  $\mu\text{L}$ ,总体积达 50  $\mu\text{L}$ ,按照

不同的引物设置适当的退火温度来进行扩增,第二轮巢式 PCR 产物通过 2% 琼脂糖凝胶电泳回收目的条带,如上步骤进行克隆测序,所得即为 3'末端序列。

5'端扩增利用巢式引物 4R347、4R208 和 Oligo dT-RA、RA,与同聚化加尾的 5'模板进行 5'末端的巢式扩增,操作步骤同上所述。

基因组扩增 利用简并引物 2F/2R、3F/3R 来扩增 *HSP90* 基因组 DNA,再分别利用扩增 5'和 3'的巢式特异性引物 5BY1R311/5BY2R168/5BY3R69、3BYF5/3BYF79/3BYF295 与 Genome Walking Kit 中的随机引物结合使用,依据试剂盒说明依次进行两个末端片段的步移扩增,扩增 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后回收目的条带,同上步骤进行克隆测序,分别获取基因组 5'和 3'末端序列。

同上述步骤,利用引物 ORF-F/ORF-R 分别对 cDNA 及 DNA 重新扩增,验证拼接所得 cDNA 和 DNA 基因序列的准确性。

实时荧光定量 PCR RT-PCR 目的基因引物采用 Primer 5.0 设计,设计原则跨一个内含子,以避免模板中 DNA 杂质对扩增结果产生干扰,内参基因  $\beta$ -actin 从文献[13]中选择,RT-PCR 模板首先进行 RNA 定量,通过 ND-1000 紫外分光光度计检测总 RNA 浓度,并根据 RNA 总浓度适量地添加模板,分别制备肝、鳃、鳃心、后唾液腺、脑、心、性腺、血等实时定量 PCR 的 cDNA 模板,每一反转录管的 RNA 总量相同且满足  $\leq 1 \mu\text{g}$ 。

实时荧光定量 PCR 按照 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex *Taq*<sup>™</sup> II (Tli RNaseH Plus)说明书要求,在 Rotor-Gene 2000 上进行,其中每个样品的目的基因和内参基因分别进行 3 次重复,PCR 反应体系:SYBR 10  $\mu\text{L}$ ,引物 F 0.8  $\mu\text{L}$ ,引物 R 0.8  $\mu\text{L}$ ,DDW 16.4  $\mu\text{L}$ ,反应体系总体积为 20  $\mu\text{L}$ 。反应程序采用两步法程序:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s; 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s,55  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  50 s,40 循环,采集荧光信号; Melt 72 ~ 95  $^{\circ}\text{C}$  获得熔解曲线。

经准确定量的 cDNA 模板利用 EASY Dilution 稀释 5 个梯度的标准品,每个梯度以 10 为单位,并以此为模板制作目的基因和内参基因标准曲线。

真蛸 *HSP90* 序列的数据处理利用 利用

VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) 去除测序结果中的载体序列。利用 DNASTar 中的 EditSeq 对所得片段以及 5'、3' 序列进行拼接和重叠序列的去除, 最终获得真蛭 *HSP90* 的 cDNA 和 DNA 基因序列。利用 Spidey (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/spideyweb.cgi>) 进行基因序列与 cDNA 序列的比对分析, 确定基因序列中内含子与外显子的位置。利用 GenBank 中 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对所得的 cDNA 序列与 GenBank 核酸数据库及蛋白质数据库进行比对分析, 寻求与真蛭 *HSP90* 高度同源的核酸序列和氨基酸序列。利用 Clustalx 对核苷酸序列和氨基酸序列分别进行多重序列比对分析。利用 DNASTar 确定 cDNA 中 ORF 区域并推导出相应氨基酸序列。利用 ExPasy 中的 ProtParam 程序 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 统计真蛭 *HSP90* 蛋白中各种氨基酸含量并预测其理论分子量和等电点。利用在线分析软件 SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行 *HSP90* 蛋白的信号肽分析。利用 SMART 服务器 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 进行 *HSP90* 蛋白序列的功能结构域分析。利用 MEGA 4.0 软件的邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统发育树, 分支置信度采用自展法 (Bootstrap analysis, BP) 重复检验 1 000 次。

## 2 结果

### 2.1 真蛭总 RNA 及基因组 DNA 提取

提取的真蛭肝总 RNA 样品利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 (图 1), 并用 ND-1000 超微量紫外分光光度计测 OD 值, 其中,  $OD_{260}/OD_{280}$  值为 1.93, 样品浓度为  $269.0 \text{ ng}/\mu\text{L}$ , 检测结果表明该 RNA 提取质量好, 满足 5'、3' RACE 扩增对模板的需求。

### 2.2 真蛭 *HSP90* 基因序列分析

真蛭 *HSP90* 的 cDNA 全序列 (GenBank 登录号 GN825731), 长度 2 709 bp (图 2), 全序列中 GC 含量占 39.04%, AT 含量占 60.96%。其中包含 5' UTR 119 bp, 3' UTR 454 bp, 开放阅读框 (ORF) 长 2 136 bp。获得 DNA 序列长度 3 459 bp, 该基因包含 6 个外显子和 5 个内含子, 其中每个内含子都符合典型的 GT-AG 序列特征。

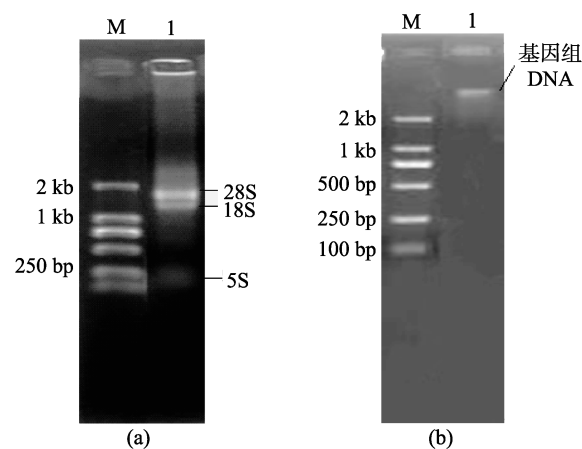


图 1 真蛭总 RNA 及总 DNA 完整性检测电泳图  
(a) M. DS2000 Marker, 1. 真蛭总 RNA; (b) M. DS2000 Marker, 1. 真蛭总 DNA。

Fig. 1 The agarose gel electrophoresis pattern of total RNA and DNA from *O. vulgaris*

(a) M. DS2000 Marker, 1. total RNA of *O. vulgaris*; (b) M. DS2000 Marker, 1. total DNA of *O. vulgaris*.

### 2.3 真蛭 *HSP90* 蛋白的信号肽预测和功能结构域分析

利用 SignalP 3.0 对真蛭 *HSP90* 进行信号肽预测其中第 21 位氨基酸位置为 C 值最高点示最可能剪切位点和 S 值最高点示最可能信号肽区域, 第 29 位氨基酸位置为 Y 值最高点示最可能综合剪切位点, Y 值并不为 S 值的陡峭位置和具最高 C 值的综合位点 (图 3-a), 故推断真蛭 *HSP90* 多肽 N 端并不存在信号肽, 为非分泌蛋白 (non-secretory protein)。

利用 SMART 服务器分析该蛋白的功能结构域, 在靠近 N 端处有一个 *HSP90* 保守结构域, 是 ATP 结合部位, 具内源 ATP 酶活性, 其它两个区域 (第 222 氨基酸位置和第 528 氨基酸位置) 通过与其它已知序列比对也显示为高度保守 (图 3-b), 预测该区域在 *HSP90* 的功能发挥过程中起重要作用。

### 2.4 真蛭 *HSP90* 氨基酸序列和系统发生分析

借助 DNASTar 软件包中 EditSeq 预测氨基酸序列, 显示开放阅读框共编码 711 个氨基酸 (图 2), 并通过软件 ProtParam 分析得出该蛋白理论分子量 81.5 ku, 等电点 5.09, 不稳定指数 (II) 为 39.66, 显示该蛋白是稳定存在的; 脂肪族指数为 80.06, 预示该蛋白具有较高的耐热性, GRAVY 值为 -0.658, 正值表明该蛋白为疏水蛋白, 负值则说明该蛋白为亲水蛋白, 因此, *HSP90* 结果显



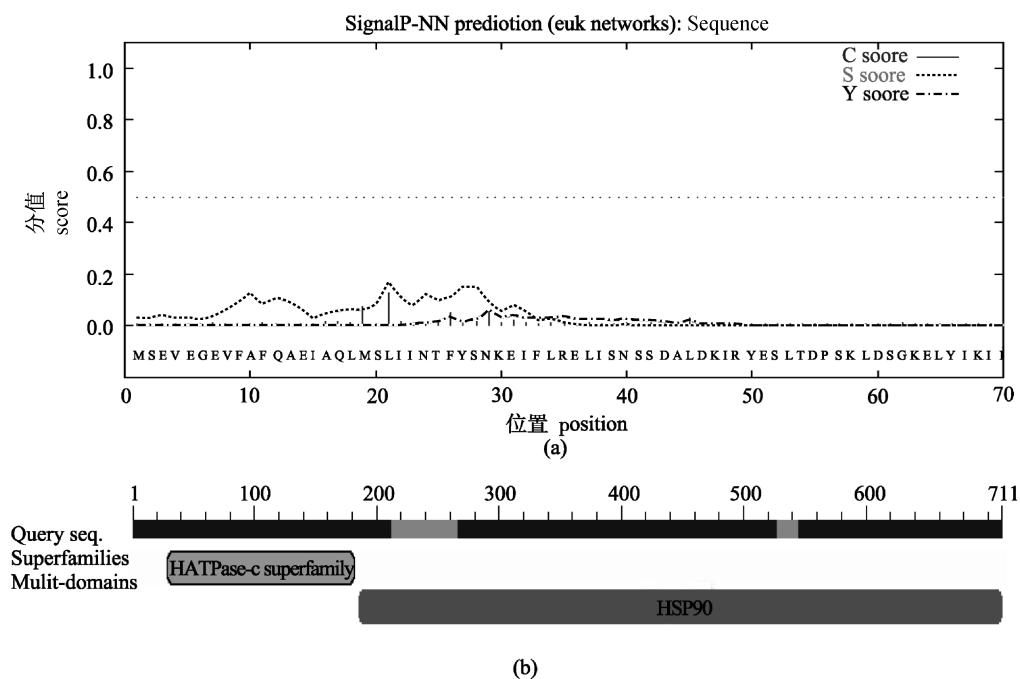


图3 真蛸 HSP90 蛋白的信号肽预测及功能结构域分析

(a) C 值. 剪切位点值; S 值. 信号肽区域值; Y 值. 综合剪切位点值。(b) 红框标示位置表示 HSP90 保守结构域, 青绿框标示位置为另外两个保守结构域。

Fig. 3 Signal peptide prediction and functional domain analysis of HSP90 from *O. vulgaris*

(a) C score. cleavage site score; S score. signal peptide score; Y score. multiple cleavage site score. (b) the red box indicated the conserved domain of HSP90, the green boxes indicated the other two conserved domains.

示其为亲水蛋白, 并得到该氨基酸分子式为  $C_{3603}H_{5725}N_{939}O_{1150}S_{28}$ 。不同物种间 HSP90 氨基酸序列多重比对显示该基因同样存在 HSP90 家族最保守的 5 个信号序列区<sup>[14]</sup>。HSP90 在胞质体内存在两种不同的  $\alpha$ 、 $\beta$  亚型, 同源比对发现该蛋白接近  $\alpha$  亚型, 因此推测该蛋白属于 HSP90 家族  $\alpha$  亚型。

利用 BLAST 获得不同物种 HSP90 的氨基酸序列, 使用 MEGA 4.0 软件中基于距离的 NJ 法构建系统进化树, 分支置信度采用自展法 (Bootstrap, BP 法) 重复检验 1 000 次, 获得如下聚类树 (图 4), 其中真蛸明显地先与褶纹冠蚌 (*Cristaria plicata*) (84%)、长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) (77%)、海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) (82%)、栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) (80%) 等软体动物贝类聚合在一起, 并与其它物种也存在很高的同源性, 充分显示了该基因的高度保守性, 表

明该基因在不同物种中发挥重要作用, 真蛸与软体动物明显聚为一类, 并相对其它物种独立分支, 该基因的分子进化地位在一定程度上也反映了真蛸的实际生物学分类地位, 与真蛸的实际生物学分类地位基本一致。

## 2.5 真蛸 HSP90 在不同组织中的表达

将目的基因 HSP90 和内参基因  $\beta$ -actin 的 cDNA 标准品以 10 为单位稀释 6 个梯度, 制作标准曲线, 结果显示两者的溶解曲线都属单一峰, 其中标准曲线相关系数均满足  $R^2 > 0.998$ , PCR 扩增效率 E 值分别为 0.99 和 1.04, 均接近 1.0, 适合作为标准曲线。通过实时荧光定量 PCR 对 HSP90 在真蛸肝、鳃、鳃心、后唾液腺、脑、心、性腺、血 8 个组织中进行表达量分析, 结果显示, HSP90 在肝中表达量最高, 脑和雌性腺中次之 (图 5)。

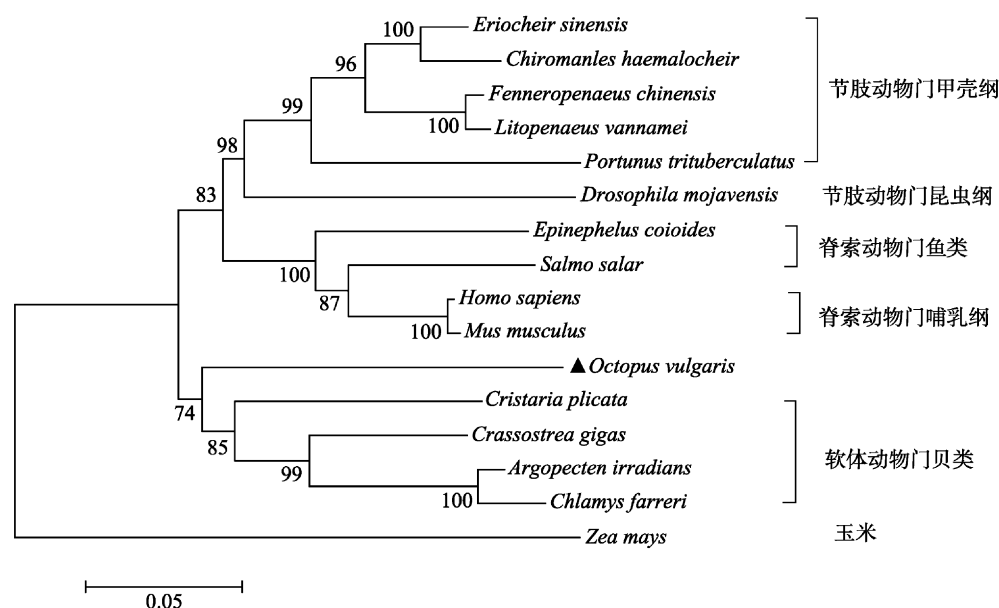


图 4 基于 *HSP90* 氨基酸序列构建的 NJ 系统发育树

线长表示遗传距离;分支点的数字表示置信度,是 1000 次重复计算的结果;黑色三角(▲)标示真蛭所在位置。

Fig. 4 The Neighbor-Joining (NJ) phylogenetic tree constructed based on *HSP90* amino acid sequences

The scale bar under the tree represented the amino acids substitution rate, and the bootstrap values (%) of 1000 replicates were listed at the nodes. The dark solid triangle (▲) marked where *O. vulgaris* located.

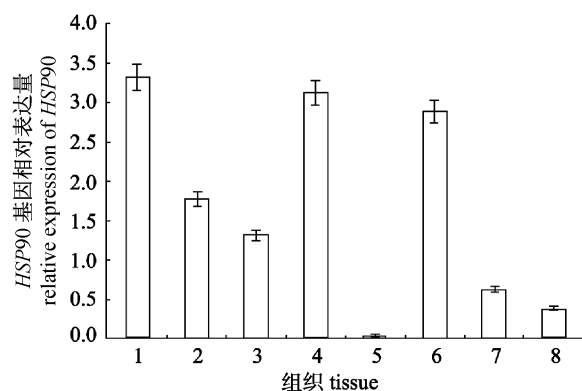


图 5 RT-PCR 检测真蛭 *HSP90* 基因在不同组织中的相对表达量

1. 肝; 2. 鳃; 3. 后唾液腺; 4. 脑; 5. 心; 6. 性腺; 7. 鳃心; 8. 血。

Fig. 5 Relative expression of *O. vulgaris* *HSP90* in different tissues with RT-PCR

1. liver; 2. gill; 3. salivary gland; 4. brain; 5. heart; 6. gonad; 7. branchial heart; 8. blood.

### 3 讨论

本实验基于真蛭转录组中注释获得 *HSP90* 的中间片段,通过 RACE 和步移扩增,成功扩增真蛭 *HSP90* 基因的 cDNA 全长和基因全序列。

Manuel 等<sup>[10]</sup>指出 *HSP90* 家族存在  $\alpha$ 、 $\beta$  两种亚型, $\alpha$  亚型可被高度诱导表达,在细胞生长、凋亡等细胞周期中发挥重要调节作用; $\beta$  亚型主要参与维持细胞结构、细胞分化、防御等过程来维护其正常生理功能<sup>[15]</sup>,这两种亚型之间在核苷酸和氨基酸序列上高度相似,存在着 5 个高度保守的结构域<sup>[14]</sup>,这 5 个保守结构域的氨基酸残基在不同物种中高度相似,因此推断它们的功能也相似。但是,大部分无脊椎动物仅拥有一个 *HSP90* 基因<sup>[16]</sup>,同源分析显示,本研究所获基因序列与 *HSP90 $\alpha$  亚型高度相似,推断本研究所得真蛭的 *HSP90* 更接近于  $\alpha$  型基因。真蛭中 *HSP90* 氨基酸序列不含信号肽,为非分泌蛋白,推断其一般在细胞质内游离核糖体上合成后,经滑面内质网加工而成,不进行蛋白转运。系统进化树中,软体动物门的物种聚为一个分支,而甲壳纲、昆虫纲、哺乳类、鱼类等另外聚为一个大的分支与软体动物门明显地分开,这证实了借助 *HSP90* 氨基酸序列对物种所进行的分子进化研究与生物界对这些物种的生物学分类地位基本吻合。*

热休克蛋白作为重要的抗逆相关蛋白,在生物体遭受外界刺激时,表达量会迅速提高。三疣

梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 中 HSP90 在各组织均有不同表达,但在不同的环境条件应激下, HSP90 迅速大量表达<sup>[17]</sup>;栉孔扇贝 HSP90 表达量在受到弧菌感染 6 h 后达到峰值,48 h 后恢复原有表达量<sup>[16]</sup>,预示着扇贝 HSP90 参与了重要免疫防御功能。本研究结果显示,真蛸 HSP90 在肝组织中含量最高,在脑和性腺中次之。肝作为一个重要的免疫器官,参与代谢与免疫相关的生理调节,真蛸 HSP90 $\alpha$  在肝中的大量表达,预示着头足类肝组织可能在与应激相关的免疫应答中扮演着重要角色。另外,真蛸脑 HSP90 表达量也很高,这是否与复杂的脑神经系统相关尚需进一步验证。Zhang 等<sup>[17]</sup>发现三疣梭子蟹卵巢中存在高表达量 HSP90,并在热、冷以及重金属应激时表达量迅速变化;王婷婷等<sup>[8]</sup>通过 RT-PCR 分析发现,在胚胎初期就有 HSP90 表达,其表达量随着胚胎发育先增后减并在尾牙期表达量达到最高,真蛸性腺中 HSP90 的高表达量为研究性腺的发育及后期繁殖时期的应激保护带来了重要的启示和相关基因信息。

Steiner 等<sup>[18]</sup>利用 18S rDNA 对软体动物的 48 个种类进行系统进化研究,并通过其形态学特征(突出的背腹部轴线、多触手)均显示头足纲和原始软体动物掘足纲(Scaphopoda)的共源性状并无分支。Takuwa-Kuroda 等<sup>[19]</sup>报道真蛸在无脊椎动物中属最聪明的,并首次从无脊椎动物真蛸中获取脊椎动物特有的加压素/催产素家族蛋白;Iwakoshi-Ukena 等<sup>[20]</sup>从真蛸脑中纯化得到脊椎动物 GnRH 类似物,并研究了其在真蛸中所发挥的复杂的生理作用;Yekutieli 等<sup>[21]</sup>发现真蛸存在一个高度复杂的神经系统,且只有三分之一存在于脑部,其余三分之二神经元遍布真蛸各个腕控制整体活动;Wells<sup>[22]</sup>早在 1980 年指出软体动物门物种的循环系统几乎均为开管式循环系统,但头足类真蛸却属闭管式循环系统,这种循环系统多存在于哺乳动物中。以上报道通过对真蛸不同生理结构的研究,在一定程度上反映了真蛸的进化地位,它虽然起源较早,但其进化程度远超出一般软体动物,对真蛸的系统进化研究有助于更深入地挖掘它的潜在利用价值。

#### 参考文献:

[1] 董正之. 中国动物志 软体动物门 头足纲[M]. 北京:科学出版社,1988.

- [2] 马之明,徐实怀,贾晓平. 蛸类渔业概况及增养殖研究现状与展望[J]. 南方水产,2008,4(5):69-73.
- [3] 王晓晴,章俊. 一九九四年和一九九五年夏季浙江渔场头足类资源量评估[J]. 浙江水产学院学报,1998,17(2):96-101.
- [4] Vaz-Pires P, Seixas P, Barbosa A. Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797): A review[J]. Aquaculture, 2004, 238(1/4):221-238.
- [5] 徐实怀,马之明,贾晓平. 人工养殖条件下真蛸的生物学特性及胚胎发育[J]. 南方水产,2009,5(2):63-68.
- [6] Nover L, Charf K D. Heat stress proteins and transcription factors[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 1997, 53:80-103.
- [7] Wandinger S K, Richter K, Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery [J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(27):18473-18477.
- [8] 王婷婷,陈松林,孟亮,等. 大菱鲆热休克蛋白 90 基因 cDNA 的克隆及其表达特征[J]. 渔业科学进展, 2010, 31(2):51-59.
- [9] Feder M E, Hofmann G E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology [J]. Annual Review of Physiology, 1999, 61:243-282.
- [10] Manchado M, Salas-Leiton E, Infante C, et al. Molecular characterization, gene expression and transcriptional regulation of cytosolic HSP90 genes in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup) [J]. Gene, 2008, 416(1-2):77-84.
- [11] 任亮,朱宝芹,张轶博,等. 利用软件 Primer Premier 5.0 进行 PCR 引物设计的研究[J]. 锦州医学院学报, 2004, 25(6):43-46.
- [12] 郑仲承. 寡核苷酸的优化设计[J]. 生命的化学, 2001, 21(3):254-256.
- [13] Sirakov M, Zarrella I, Borra M, et al. Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative RT-PCR studies in the brain of the Cephalopod Mollusc *Octopus vulgaris* [J]. BMC Molecular Biology, 2009, 10:70.
- [14] Gupta R S, Singh B. Phylogenetic analysis of 70 kD heat shock protein sequences suggests a chimeric origin for the eukaryotic cell nucleus [J]. Current Biology, 1994, 4(12):1104-1114.
- [15] 张俊玲,施志仪,程琦,等. 牙鲆变态中两种 HSP90 基因的不同表达及其与甲状腺激素的关系[J]. 水产学报, 2010, 34(10):1478-1485.
- [16] Gao Q, Zhao J, Song L, et al. Molecular cloning,



- characterization and expression of heat shock protein 90 gene in the haemocytes of bay scallop *Argopecten irradians*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*,2008,24(4):379-385.
- [17] Zhang X Y,Zhang M,Zheng C, *et al.* Identification of two hsp90 genes from the marine crab, *Portunus trituberculatus* and their specific expression profiles under different environmental conditions [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2009, 150:465-473.
- [18] Steiner G, Dreyer H. Molecular phylogeny of Scaphopoda (Mollusca) inferred from 18S rDNA sequences; support for a Scaphopoda-Cephalopoda clade[J]. *Zoologica Scripta*,2003,32:343-356.
- [19] Takuwa-Kuroda K, Iwakoshi-Ukena E, Kanda A, *et al.* Octopus, which owns the most advanced brain in invertebrates, has two members of vasopressin/oxytocin superfamily as in vertebrates [J]. *Regulatory Peptides*,2003,115(2):139-149.
- [20] Iwakoshi-Ukena E, Ukena K, Takuwa-Kuroda K, *et al.* Expression and distribution of octopus gonadotropin rele-asing hormone in the central nervous system and peripheral organs of the octopus (*Octopus vulgaris*) by *in situ* hybridization and immunohistochemistry [J]. *The Journal of Comparative Neurology*,2004,477(3):310-323.
- [21] Yekutieli Y, Sagiv-Zohar R, Aharonov R, *et al.* Dynamic model of the octopus arm. I. Biomechanics of the octopus reaching movement [J]. *Journal of Neurophysiology*,2005,94(2):1443-1458.
- [22] Wells R A. Activity pattern as a mechanism of predator avoidance in two species of acmaeid limpet [J]. *Experimental Marine Biology and Ecology*, 1980,48(2):151-168.

## Molecular cloning and feature analysis of heat shock protein 90 (*HSP90*) from *Octopus vulgaris*

SUN Tian-tian, SU Yong-quan, HONG Jing-ni, WU Yang, ZHANG Man, MAO Yong\*

(College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** *Octopus vulgaris*, which owns a number of unique stress protection mechanisms is considered to be the most intelligent species of all invertebrates. A 2 709 bp full-length cDNA sequence of heat shock protein 90 (*HSP90*) gene from *O. vulgaris* was obtained by homologous amplification and rapid amplification of cDNA ends (RACE). It consisted of a 119 bp 5' untranslated region (UTR), a 2 136 bp open reading frame (ORF) and a 454 bp 3' UTR. The inferred amino acids sequence was composed of 711 amino acids, whose molecular weight and isoelectric point were 81.5 ku and 5.09, respectively. Homologous analysis showed the inferred amino acids sequence was highly conserved and contained five classical *HSP90* signature sequences. Real-time quantitative PCR (RT-PCR) results displayed *HSP90* expressed in every tissues chosen, with the most in liver. This study which was the first time to obtain *HSP90* gene from Cephalopod played an important role in studying stress mechanisms on the most intelligent invertebrate.

**Key words:** *Octopus vulgaris*; heat shock protein 90 (*HSP90*); molecular cloning; real-time quantitative PCR

**Corresponding author:** MAO Yong. E-mail: maoyong@xmu.edu.cn