

克隆与序列分析中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) HSP70 基因全长 ORF 的 RACE

袁嘉恩, 许忠能, 雷腊梅, 李慕婵, 韩博平, 谢数涛

(暨南大学水生生物研究所, 广东 广州 510632)

[摘要] 采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)及 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术克隆中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的 Hsp70 基因并进行序列分析. 以中华绒螯蟹卵组织 cDNA 为模板, 克隆测序后拼接得到一条长 2 429 bp 的 cDNA 序列, 序列分析表明其覆盖了完整编码区, 编码 649 个氨基酸. 经 antheptrot 分析发现 2 个 Hsp70 基因的签名序列: IFDLGGCTFDVSIL, IVLVGGSTRIPKIQK; Dnak 特征基序 DLGTT-S-V; 非细胞器基序: RARFEEL; 核定位信号标签: KKDPSESKRALRRL; 胞质 Hsp70 特征基序 GPTIEEVD. 经 BLASTn 和 BLASTx 软件分析, 该编码区核苷酸序列与凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)的相似性分别为 85.30% 和 84.89%. 根据核苷酸序列所推导出的 Hsp70 氨基酸序列, 其与斑节对虾、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的相似性分别为 93.23% 和 93.40%. 本研究克隆了中华绒螯蟹的 Hsp70 基因, 为进一步深入研究锯缘青蟹的抗逆机理及其遗传改良奠定了基础.

[关键词] Hsp70 基因; cDNA 末端快速扩增; 逆转录聚合酶链反应; 中华绒螯蟹

[中图分类号] Q915.819+.6 [文献标识码] A [文章编号] 1000-9965(2008)05-0516-06

RACE clone and sequence analysis of Hsp70 gene ORF of *Eriocheir sinensis*

YUAN Jia-en, XU Zhong-neng, LEI La-mei, LI Mu-chan, HAN bo-ping, XIE Shu-tao

(Institution of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) were employed to clone the Hsp70 gene using cDNA of the ovum of *Eriocheir sinensis* as template. A DNA fragment of 2429 bp was cloned and sequencing analysis indicated that it carried an entire open reading frame and encoded a protein of 649 amino acid residues. By the analyse of antheptrot, two signature sequences of HSP70 family-IFDLGGCTFDVSIL and IVLVGGSTRIPKIQK, Dnak sequence-DLGTT-S-V, the non-organellar motif-RARFEEL, bipartite nuclear localization signal-KK-DPSESKRALRRL, and C-terminal four amino acids of Hsp70-EEVD were detected in the predicted amino acid sequence. With BLASTn and BLASTx from GenBank, the open reading frame of the Hsp70 gene sequence of *Eriocheir sinensis* has 85.30% identity with the Hsp70 cDNA sequence of *Litopenaeus vannamei*, and 84.89% identity with *Penaeus monodon*. Under the alignment of Hsp70 amino acids deduced from DNA sequences, there is 93.23% identity between *Eriocheir sinensis* and *Penaeus monodon*, and 93.40% identity between *Eriocheir sinensis* and *Macrobrachium rosenbergii*. The Hsp70 gene of *Eriocheir sinensis* was cloned successfully.

[收稿日期] 2008-03-04

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(04300664)

[作者简介] 袁嘉恩(1980-),男,硕士研究生,研究方向:蟹类免疫.通讯作者:谢数涛,tstxie@jnu.edu.cn

[Key words] Hsp70 gene; Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR); rapid amplification of cDNA ends (RACE); *Eriocheir sinensis*

热休克蛋白(heat shock protein, Hsp)是一类对环境刺激反应极为敏感的蛋白,有修复或减轻有害刺激对机体的作用^[1]。Hsp70 是热休克蛋白家族中最保守、最重要的一类蛋白,广泛参与细胞保护,在环境胁迫因子,如高温、低氧、病原入侵、重金属、饥饿等的刺激下,Hsp70 表达量有显著增加^[2-3]。热休克蛋白的高表达能介导生物体增强对环境胁迫因子的抵抗力,对机体维持正常的新陈代谢和细胞结构的完整性有十分重要作用^[3]。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards)是我国重要的淡水蟹类,2004 年全国产量达 41.5×10^5 t,总产值超过 200 亿,具有很高的经济价值^[4-5]。近年来,由于工业废水直接排放,周边农田的化肥、农药残余使水体逐渐富营养化,重金属盐污染日趋严重。养殖水质的恶化导致弧菌病和真菌性疾病频发,严重威胁中华绒螯蟹的养殖经营。传统的抗生素治疗方式容易产生一系列的不良后果^[5]。因此提高中华绒螯蟹自身抵抗能力,诱导其内部抗逆、抗病机制的增强是应对水质恶化,保证中华绒螯蟹产量质量的重要途径。

但目前中华绒螯蟹热休克蛋白方面的研究很薄弱,因此本实验通过 RACE(cDNA 末端快速扩增)和 RT-PCR 技术扩增并分析其 Hsp70 基因的全长编码区序列(Genebank 登陆号 bankit1108441),为 Hsp70 基因与对中华绒螯蟹机体抗逆、应激反应的深入研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 中华绒螯蟹总 RNA 的提取

中华绒螯蟹购自广州黄沙水产批发市场,体长约 10 cm,质量约 150 g,实验室暂养 2 d(25 ℃ 恒温)。解剖,活体取 100 mg 卵组织放液氮中速冻,用 Trizol(invitrogen 公司)试剂提取总 RNA。提取的 RNA 通过琼脂糖电泳进行鉴定后贮于 -80 ℃ 冰箱备用。

1.2 引物设计与 RT-PCR

根据 GenBank 中凡纳滨对虾 Hsp70 基因 cDNA 序列(登录号 AY645906),用 oligo 6.0 软件设计引

物,引物序列如表 1 所示。

逆转录反应使用 TOYOBO 公司的 ReverTra Ace 试剂盒,合成第一链 cDNA,适量 DEPC(diethylpyrocarbonate,焦碳酸二乙酯)水完全溶解, -20 ℃ 冰箱保存。取 1 μL 合成液,引物 Bf 和 Cf 进行 PCR,预期扩增基因中间片段约 1.1 kb。50 μL PCR 反应体系中含 dNTPs 各 200 μmol · L⁻¹,上、下游引物各 100 pmol · L⁻¹,Taq 酶 2.5 U,进行 PCR 扩增,反应程序见表 2。

表 1 实验中所用的引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')
Bf	GGCCGATAATCCAAGCAACAC
Cf	GGCAGCATCTCCCTCATCCAC
P1	CAGGGCCCAGATTTATGACGT
P2	TGCCCTGATCAAACGTCACAG
Oligo(dT) ₁₇ -adapter	GGCCACGCGTGCAGTAGTACT ₁₇
Oligo(dG) ₁₆	GGCCACGCGTGCAGTAGTACG ₁₆
P3	GGCGATGGCTACGTCAATGAA
P4	TCACCGCACTCTATCTTATAT

1.3 5'RACE 和 3'RACE PCR

采用 TaKaRa 公司 RNase H 酶和 TdT 酶,分别对第一链 cDNA 纯化处理和加尾反应。5'RACE 第一轮使用引物 P3 和 OdG₁₆,第二轮使用 P4 和 OdG₁₆。3'RACE 第一轮使用引物 P1 和接头引物 OdT₁₇,第二轮使用引物 P2 和接头引物 OdT₁₇。5'RACE 和 3'RACE 的 PCR 反应体系与 RT-PCR 相同,反应程序见表 2。

表 2 实验中各 PCR 反应程序

类型	预变性	解旋	退火	延伸	循环数 /个	循环结束 后延伸
RT-PCR	95 ℃/5 min	95 ℃/20 s	61 ℃/40 s	72 ℃/1 min	30	72 ℃/10 min
3'RACE	95 ℃/5 min	95 ℃/30 s	59 ℃/40 s	72 ℃/1 min 40 s	35	72 ℃/10 min
5'RACE	95 ℃/5 min	95 ℃/30 s	61 ℃/40 s	72 ℃/1 min 50 s	35	72 ℃/10 min

1.4 PCR 产物的连接克隆和测序

所有 PCR 产物经体积分数 1% 琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果,用 Qiagen 公司的 QIA quick gel extraction kit 回收纯化。采用 T-A 克隆的方法,把 PCR 产物克隆到 TaKaRa 的 Pmd18-T 载体。经鉴定后,

阳性克隆产物经广州拓普公司用进行双向测序。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取和 RT-PCR 及 RACE

总 RNA 提取结果如图 1。以 RT-PCR 扩增基因中间片断,产物电泳结果如图 2; 5'RACE 结果如图 3; 3'RACE 结果如图 4。由图可知,扩增片段大小分别约在 1100、650 和 900 kb 左右,与预期扩增片段大小相近。

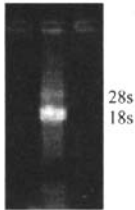
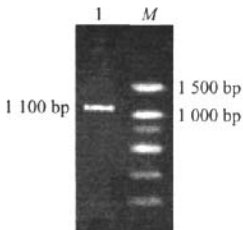
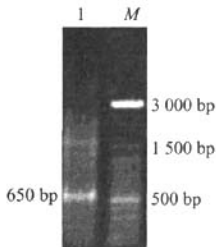


图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳



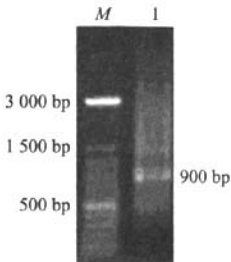
M: 标准分子质量; 1: cDNA 中间片段扩增产物

图 2 中华绒螯蟹 Hsp70 基因 cDNA 中间片段 RT-PCR 扩增



M: 标准分子质量; 1: 5'RACE 扩增产物

图 3 中华绒螯蟹 Hsp70 cDNA 片段的 5'RACE 扩增



M: 标准分子质量; 1: 3'RACE 扩增产物

图 4 中华绒螯蟹 Hsp70 cDNA 片段的 3'RACE 扩增

2.2 核苷酸序列分析

用软件 DNAMAN 分析测序结果,发现该序列含有一个长 1 947 bp 的开放阅读框,分布于 105 ~ 2 052 bp. 利用 BLASTn 软件分析,发现该开放阅读框的核苷酸序列与凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 和珠鸡 (*Numida meleagris*) 的 Hsp70 基因序列的相似性分别是 85.25%、84.84%、73.16% 和 72.05%。

GenBank 中甲壳纲动物的 Hsp70 基因有海水物种凡纳滨对虾,斑节对虾和淡水物种罗氏沼虾 (*M. rosenbergii*) 等几种. 对比它们的 Hsp70 基因编码区发现,两种海水对虾和亲缘关系较近的罗氏沼虾的 Hsp70 核苷酸序列之间存在明显差异,但中华绒螯蟹和罗氏沼虾的相似性却较高一些(见表 3),提示物种的生长环境和物种间亲缘关系可能都对甲壳纲动物 Hsp70 的核苷酸的分子进化都存在着影响。

表 3 甲壳纲四个物种 Hsp70 核苷酸序列之间的相似性 %

物种	<i>E. sinensis</i>	<i>M. rosenbergii</i>	<i>L. vannamei</i>	<i>P. monodon</i>
<i>E. sinensis</i>		79.16	85.25	84.84
<i>M. rosenbergii</i>	79.16		77.90	77.69
<i>L. vannamei</i>	85.25	77.90		97.35
<i>P. monodon</i>	84.84	77.69	97.35	

2.3 氨基酸序列分析

用软件 DNAMAN 分析,发现该开放阅读框共编码 648 个氨基酸,总分子质量约 70.97 ku,理论等电点 5.3。

利用 BLASTx 软件在 GenBank 中搜索,得到 3 条和中华绒螯蟹相似性最高的甲壳类动物氨基酸序列,分别为凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*)。经多序列比对分析,中华绒螯蟹与凡纳滨对虾、斑节对虾和罗氏沼虾的 Hsp70 氨基酸序列相似性分别为 93.71%、93.23% 和 92.40%,具体结果见图 5。

用蛋白质软件 antheptot 分析中华绒螯蟹 Hsp70 基因,发现 2 个 Hsp70 家族的签名序列:(197-210) IFDLGGGTFDVSIL ([LIVMF]-[LIVMFY]-[DN]-[LIVMFS]-G-[GSH]-[CS]-[AST]-x(3)-[ST]-[LIVM]-[LIVMFC]); (334-348) IVLVGGSTRIP-

KIQK([LIVMY]-x-[LIVMF]-x-G-G-x-[ST]-[LS]-[LIVM]-P-x-[LIVM]-x-[DEQKRSTA])[^{2]}, Dnak 特征基序(9-16)DLGTT-S-V,如图6。另外,根据 HSP70 氨基酸序列 291-296 位置上无原核热休克蛋白的特征序列(GPKH),可推断该基因为真核 HSP70 家族的一种胞质 Hsp70 成员。另外发现 4 个真核细胞特征基序:由 AEAYLGTT(131-138)组成的 ATP-GTP 结合位点;由 KKDPSESKRALRRL(250-263)组成的核定位信号标签;由 RARFEEL(299-305)组成的非细胞器基序,由 GPTIEVD(642-649)组成的胞质 Hsp70 C 端特征基序序列,这个保守的末端氨基酸存在于绝大多数真核生物的 Hsp70 中,是一种细胞质特异性调控基序,它影响 ATP 酶结构域的活性和与底物结合的活力,在热休克状态

下调 Hsp70 mRNA 的转录量^[3]。

中华绒螯蟹与凡纳滨对虾和罗氏沼虾的 Hsp70 基因的氨基酸序列的相似性分别为 93.71% 和 92.40%,证明 Hsp70 氨基酸序列的高度保守性。对于中华绒螯蟹,凡纳滨对虾和罗氏沼虾而言,虽然出现许多的核苷酸点突变,但大部分的变异仍属于简并密码子间的差异,未造成氨基酸序列的变化,这对维持热休克蛋白的结构功能有着十分重要意义^[4-5]。如图7,利用 ClustalX1.83 和 Mega3.0 构建 HSP70 与 HSC70 基因氨基酸序列系统发生树,其中甲壳类 HSP70 处在一个单独的分支,说明了通过凡纳滨对虾对虾的 Hsp70 基因序列设计引物来扩增中华绒螯蟹 Hsp70 基因序列是可行的,同时也验证热休克蛋白家族在生物体内具有重要的作用。

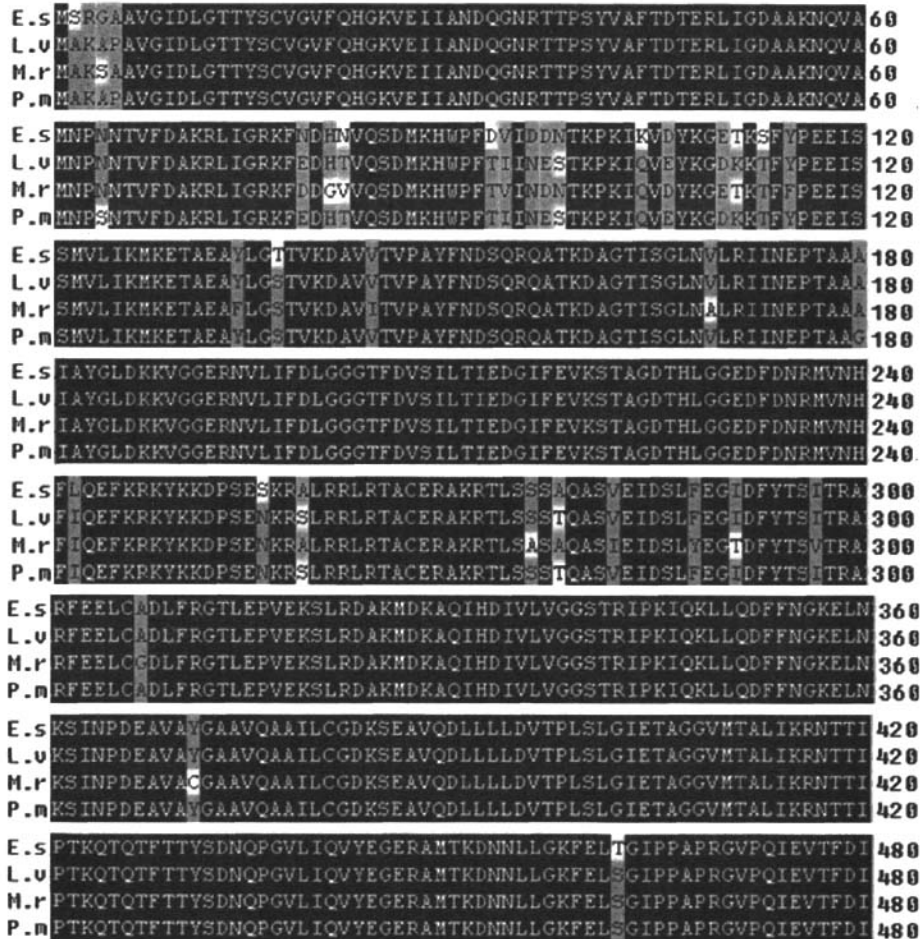


图5 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)和斑节对虾(*Penaeus monodon*)的 Hsp70 氨基酸序列的比较

对其他胁迫因子的耐受性也同样增加^[14~16]。

近年来,水生生物热休克蛋白的研究已经有相当的进展:预处理处理的波罗的海贻贝(*Mytilus edulis*)可对铜产生抗性,并高表达 Hsp70^[12];淡水海绵(*Ephydatia fluviatilis*)受亚致死热刺激后,表现出对化学污染物有很强的抵抗力^[13];通过亚致死温度处理凡纳滨对虾,常温恢复 2 h 后,注射致死剂量的 WSSV,存活时间明显高于未经亚致死温度应激的对照组^[11]。Hsp70 基因是中华绒螯蟹重要的内源性细胞保护因子,具有重大的理论和应用价值^[17]。中华绒螯蟹 Hsp70 基因全长 cDNA 序列的获得,将有利于进一步开展 Hsp70 其他相关研究。

[参考文献]

- [1] CHRISTIANS E S, YAN L J, BENJAMIN I. Heat shock factor 1 and heat shock proteins: critical partners in protection against acute cell injury[J]. Crit Care Med, 2002, 30: S43 - S50.
- [2] RAVAUX J, TOULLEC J Y, LEGER N, et al. First hsp70 from two hydrothermal vent shrimps, *Mirocaris fortunata* and *Rimicaris exoculata*: Characterization and sequence analysis[J]. Gene, 2007, 386: 162 - 172.
- [3] CARPENTER C M, HOFMANN G E. Expression of 70 kDa heat shock proteins in antarctic and New Zealand notothenioid fish[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2000, 125: 229 - 238.
- [4] 李晓鲁, 彭毅志. 热激蛋白 70 与热应激反应[J]. 生命的化学, 2002, 22(2): 145 - 147.
- [5] REZAIE S, BAN J, MILDNER M, et al. Characterization of a cDNA clone, encoding a 70 kDa heat shock protein from the dermatophyte pathogen *Trichophyton rubrum* [J]. Gene, 2000, 241(1): 27 - 33.
- [6] 费志良, 周刚, 秦钦, 等. 不同生态环境下中华绒螯蟹的油脂品质研究[J]. 南京师范大学报, 2006, 29(4): 105 - 110.
- [7] 柏如法, 周刚, 李跃华, 等. 中华绒螯蟹种质特性研究[J]. 水产养殖, 2006, 27(5): 16 - 19.
- [8] 潘红玺, 吉磊. 阳澄湖若干水质资料的分析与评价[J]. 湖泊科学, 1997, (9)2: 188 - 191.
- [9] 马为民, 魏兰珍, 王全喜. 阳澄湖中华绒螯蟹及当前它所面临的问题[J]. 自然杂志, 2002, 24(5): 294 - 296.
- [10] BLANK M, BASTROP R, JURSS K, et al. Stress protein response in two sibling species of *Marenzelleria* (Polychaeta: Spionidae): Is there an influence of acclimation salinity[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2006, 144: 451 - 462.
- [11] WU R, SUN Y, LEI L M, et al. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (HSC70) in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 18: 297 - 310.
- [12] Tedengren M, Olsson B, Reimer O, et al. Heat pretreatment increases cadmium resistance and HSP 70 levels in Baltic Sea mussels[J]. Aquatic Toxicol, 1999, 48: 1 - 12.
- [13] MUELLER W E G, KOZIOL C, KURELEC B, et al. Combinatory effects of temperature stress and nonionic organic pollutants on stress protein (HSP70) gene expression in the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis* [J]. Environ Toxicol Chem, 1995, 14: 1 203 - 1 208.
- [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] RICHTER L C, GOLDBAUM O. Stress proteins in neural cells: functional roles in health and disease[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2003, 60: 337 - 349.
- [16] CARPENTER C M, HOFMAN G E. Expression of 70 kDa heat shock proteins in antarctic and New Zealand notothenioid fish[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2000, 125: 229 - 238.
- [17] BOTTON M L, POGOTZELSKA M, SMORAL L, et al. Thermal biology of horseshoe crab embryos and larvae: A role for heat shock proteins[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2006, 336: 65 - 73.

[责任编辑:黄建军]