

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220311003

http://www.yykxjz.cn/

方璐, 徐永江, 崔爱君, 姜燕, 王滨, 周鹤庭, 柳学周. 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

FANG L, XU Y J, CUI A J, JIANG Y, WANG B, ZHOU H T, LIU X Z. 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

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*

方璐^{1,2} 徐永江^{2①} 崔爱君² 姜燕² 王滨² 周鹤庭^{1,2} 柳学周²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所
青岛海洋科学与技术试点国家实验室深蓝渔业工程联合实验室 山东 青岛 266071)

摘要 热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)在鱼类的应激与免疫反应中发挥重要的生理调控作用, HSP70 是该家族的重要成员。为探讨热休克蛋白在大洋性经济鱼类黄条鲷(*Seriola aureovittata*)生长发育中的生理作用, 本研究克隆获得了黄条鲷 *hsp70* 基因的全长 cDNA 序列, 并采用定量 PCR 技术测定了其组织分布及在早期生长发育过程中的表达特征。结果显示, 黄条鲷 *hsp70* 基因的 cDNA 序列全长为 2 332 bp, 其中, 5'-UTR 长度为 187 bp, ORF 长度为 1 920 bp, 3'-UTR 长度为 225 bp, 编码 639 个氨基酸, 蛋白质分子量为 70.1 kDa, 等电点为 5.16。黄条鲷 *hsp70* mRNA 的组织表达具有性别二态性差异, 其中, 在雌性鳃、心、脾脏和卵巢组织中显著高表达($P<0.05$), 且以卵巢中表达量最高; 雄性垂体、鳃、头肾和精巢组织显著高表达($P<0.05$), 且以鳃中表达量最高。胚胎发育过程的表达检测显示, 在卵裂前的受精卵中可检测到 *hsp70* 的表达, 表明其具有亲本遗传的特性。同时, 在胚胎发育过程的各个时期都可检测到 *hsp70* mRNA 的表达, 且在低囊胚期之前的各发育阶段一直保持较低表达水平, 在原肠前期开始显著上调表达($P<0.05$), 其后保持相对较高表达水平, 至胚胎孵化出膜期达峰值。在仔稚幼鱼中, *hsp70* mRNA 在初孵仔鱼和 1 d 仔鱼中高表达, 其后在 4 d 仔鱼中显著降低($P<0.05$), 其后显著上调表达, 至 15 d 仔鱼达峰值, 其后在 20 d 仔鱼显著下降, 并在 25 d 后稚鱼和幼鱼中保持相对较低表达水平。研究结果可为深入认识黄条鲷 *hsp70* 基因的结构特征、发生发育及其早期生长发育阶段的表达调控功能提供依据。

关键词 黄条鲷; *hsp70*; 基因克隆; 表达调控; 早期生活史

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)04-0055-09

黄条鲷(*Seriola aureovittata*)是一种在全球水域广泛分布的暖温性中上层掠食性长距离洄游鱼类, 我国沿海均有分布(张春霖, 1955; 刘静等, 2015)。黄条鲷

体型大、游泳速度快, 肉质鲜美、营养丰富、生食口感可媲美三文鱼, 经济价值较高。2017 年以来, 中国水产科学研究院黄海水产研究所突破了黄条鲷苗

* 国家重点研发计划项目(2022YFD2401102)、青岛海洋科学与技术试点国家实验室“十四五”重大项目(2022QNLM30001-1)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD47)、农业农村部财政专项-海洋渔业生物资源收集与保藏项目、财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系(CARS-47)共同资助。方璐, E-mail: 342245529@qq.com

① 通信作者: 徐永江, 研究员, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2022-03-11, 收修改稿日期: 2022-03-31

种培育关键技术,然而,黄条鲮在苗种早期培育阶段,对水温、光照、营养等条件的应答较为敏感,导致苗种在早期因应激而批量死亡的问题较为突出,直接导致苗种早期培育成活率低。因此,有必要认识黄条鲮早期生长发育对环境因子胁迫的生理应答机制,为建立稳定的苗种培育技术提供理论依据。

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是一类具有高度保守结构的分子伴侣,广泛存在于细菌、哺乳动物和植物中,在应对环境压力等方面发挥着关键作用(Hartl, 1996)。根据分子量大小和氨基酸序列同源性,热休克蛋白一般分为5个主要家族:HSP100、HSP90、HSP70、HSP60和低分子量HSP(Surajit *et al.*, 2011)。HSP70是热休克蛋白家族中最为重要的一员,具有分子伴侣、保护DNA、增强细胞耐受能力等生物学功能,特别是在高温下,HSP70能协助变性蛋白复性、保护生物体免受损伤(Heredia, 2008; Deane, 2006; Rosic *et al.*, 2011)。在水产生物中,对HSP70的研究较为广泛,主要集中在其应对环境胁迫适应的蛋白稳态和细胞修复方面(Hangzo *et al.*, 2016; Abha *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2021);在鱼类早期生长发育方面研究较少,对鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)和斑马鱼(*Danio rerio*)的研究发现,*hsp70*参与晶状体的形成过程(王鹏飞, 2014; Evans *et al.*, 2005)。本研究采用RACE法(rapid-amplification of cDNA ends)克隆获得了黄条鲮*hsp70*基因的cDNA序列,并揭示了其组织表达特性,探明了其在胚胎和仔稚幼鱼生长发育过程中的差异表达调控特性,旨在为开发黄条鲮生长发育应答环境胁迫的应激消减调控技术提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用1龄黄条鲮取自大连富谷食品有限公司,全长为(44.0±3.5) cm,体重为(822.5±212.9) g。用MS-222(80 mg/L)的麻醉鱼,快速解剖取出脑、垂体、鳃、心、肝、脾、肾、头肾、胃、肠、肌肉和性腺,置于液氮中保存,带回实验室后转移到-80℃冰箱保存备用。

2020年的黄条鲮繁殖和苗种培育季节,在大连富谷食品有限公司采集了17个不同发育时期的胚胎样品,包括受精卵、2细胞期、4细胞期、8细胞期、16细胞期、32细胞期、64细胞期、多细胞期、桑葚胚期、高囊胚期、低囊胚期、原肠早期、原肠后期、神经胚期、胚体包被1/2期、胚体包被2/3期和破膜

孵化期;采集了仔稚幼鱼样品:孵化出膜后1、4、7、10、15、20、25、30、40、50、60 d样品。将样品贮存于液氮中带回实验室,转移至-80℃冰箱中保存。

1.2 总RNA提取和cDNA第一链合成

取黄条鲮成鱼不同组织样品各约20 mg,按照TRIzol试剂(TaKaRa, 日本)说明书进行RNA提取。总RNA以NanoDrop2000C(Thermo, 美国)分光光度计测定浓度,取高质量RNA用于反转录。以SMARTer[®] RACE 5'/3' kit(TaKaRa, 日本)合成5'及3'-RACE cDNA第1链,用于*hsp70*基因全长克隆。以PrimeScript[™] II 1st strand cDNA synthesis kit(TaKaRa, 日本)合成cDNA第1链,用于*hsp70* mRNA组织表达特性分析。反转录操作按照说明书进行。

1.3 黄条鲮*hsp70*基因核心片段克隆

以脑组织cDNA为模板,设计3对引物(HSP70 F1、HSP70 R1; HSP70 F2、HSP70 R2; HSP70 F3、HSP70 R3)(表1),使用重组Taq DNA聚合酶混合物(TaKaRa, 日本)进行扩增,分别对*hsp70*基因核心片段进行PCR扩增。3次PCR体系均为25 μL: 0.2 μL TaKaRa Ex Taq、2.5 μL 10× Taq Buffer、2.0 μL dNTP Mix (2.5 μmol/L)、0.5 μL 模板、1.0 μL 正向引物(HSP70 F1、HSP70F2、HSP70F3)、1.0 μL 反向引物(HSP70 R1、HSP70R2、HSP70R3)、17.8 μL ddH₂O。PCR条件:95℃预变性10 min;95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,共38个循环;最后72℃延伸5 min。将产物利用1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测,目的条带产物利用SteadyPure DNA凝胶回收试剂盒(AG, 中国)回收,回收产物连接到pEASY-T1 simple载体(TransGene Biotech, 中国),后转入Transl-T1 Phage Resistant 感受态细胞(TransGene Biotech, 中国),摇菌培养1 h后,涂布于含有氨苄的固体培养基,37℃过夜培养;挑单克隆菌落于含有氨苄的LB液体培养基中,37℃下200 r/min振荡2 h,菌液PCR验证后,将筛选出的阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.4 黄条鲮*hsp70*基因5'端和3'端序列扩增

根据获得的*hsp70*基因核心片段设计RACE引物(表1)。使用Smart RACE Advantage 2 PCR试剂盒(TaKaRa, 日本)进行扩增。第1次PCR体系:17.5 μL RNase free H₂O、2 μL Buffer、2 μL 50× dNTP mix、0.5 μL 50× Advantage 2 polymerase mix、1 μL cDNA、1 μL 引物(HSP70 3'F1和HSP70 5'R1)(表1)和1 μL

表 1 黄条鲮 *hsp70* 基因克隆及定量表达所用引物
Tab.1 The primer used for cloning and quantitative expression of *S. aureovittata hsp70*

| 引物名称 Primer name | 引物序列 Primer sequence (5'~3') | 目的 Purpose |
|------------------|---|-------------------|
| HSP70 F1 | CAACGCAGTCGTCACAG | Partial CDS |
| HSP70 R1 | CGATGCCCTCAAACAGA | |
| HSP70 F2 | AAGGACATCAGCCAGAACA | |
| HSP70 R2 | TTCTGGACTTTGGGGATT | |
| HSP70 F3 | GCTGTGCTCCGACCTGT | |
| HSP70 R3 | GCCAGGCGATGGTCTCA | |
| HSP70 3'F1 | GAGGCTCCACCCGAATC | 3'RACE, 1st PCR |
| HSP70 3'F2 | GGAGTCCTACGCCTTCAACA | 3'RACE, 2nd PCR |
| HSP70 5'R1 | GTGATGGAGGTGTAGAAGTCG | 5'RACE, 1st PCR |
| HSP70 5'R2 | CTGGGACTGTGACGACTGC | 5'RACE, 2nd PCR |
| UPM (long) | CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT | Universal primers |
| UPM (short) | CTAATACGACTCACTATAGGGC | |
| q-HSP70 F | ACCTTCGACGTGTCCATCCT | qPCR |
| q-HSP70 R | TGGCTGATGTCCTTCTTGTGTT | |
| 18S F | TACCACATCCAAAGAAGGCA | |
| 18S R | TCGATCCCGAGATCCAACCTA | |

UPM (long), 共 25 μ L。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 5 min, 38 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min; 12 $^{\circ}$ C 保存。以第 1 次 PCR 的产物稀释 10 倍为模板, 进行巢式 PCR 扩增, 反应体系: 16.5 μ L ddH₂O、2 μ L Buffer、2 μ L 50 \times dNTP mix、0.5 μ L 50 \times Advantage 2 polymerase mix、2 μ L cDNA、1 μ L UPM (short)和 1 μ L 引物(HSP70 3'F2 和 HSP70 5'R2) (表 1), 共 25 μ L。PCR 扩增条件同第 1 次 PCR。PCR 产物于 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测后, 对目的条带进行胶回收、载体连接、转化、筛选阳性克隆并测序。

1.5 黄条鲮 *hsp70* 基因的定量表达检测

根据黄条鲮 *hsp70* cDNA 序列设计定量引物, 以 18S rRNA 为内参。使用 Light Cycler 96 Real-time PCR 仪(Roche, 瑞士), 使用 SYBR[®] Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit II 试剂盒(AG, 中国), 在黄条鲮不同组织、胚胎和仔稚幼鱼中扩增检测。PCR 体系为 20 μ L: 2 \times SYBR[®] Green Pro Taq HS Premix II 10 μ L、ddH₂O 7.4 μ L、cDNA 模板 1 μ L、引物(10 μ mol/L)各 0.8 μ L。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法计算 *hsp70* 基因的表达量。

1.6 数据处理及分析

通过软件 SignalP 5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测黄条鲮 *hsp70* 基因的信号肽, 利用 ExPASy (www.expasy.org/tools/protparam.

<http://www.expasy.org/tools/protparam>.html)预测蛋白结构和分子量等。使用软件 DNAMAN 6.0 (LynnonBiosoft, 美国)将得到的 *hsp70* 基因 cDNA 序列片段进行拼接, 得到完整的 cDNA 序列; 使用 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)进行结构域的预测; 通过 SWISS-MODEL 自动化蛋白质建模服务器 ProMod II 程序估计三级蛋白质结构 (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>); 采用 MEGA 7.0 软件进行同源序列比对, 应用邻接法构建氨基酸的系统进化树, 1 000 次重复计算自展值。采用 SPSS 26.0 软件(IBM, 美国)进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 通过 Duncan 统计比较各个基因在不同组织和不同发育阶段的相对表达水平的差异, 显著性水平 *P* 设置为 0.05, 当 *P*<0.05 时认为差异显著。

2 结果

2.1 黄条鲮 *hsp70* 的序列全长和结构特征

黄条鲮 *hsp70* 基因的 cDNA 全长为 2 332 bp, 其中, 5'-UTR 长度为 187 bp, ORF 长度为 1 920 bp, 3'-UTR 长度为 225 bp, 编码氨基酸 639 个, 蛋白质分子量为 70.1 kDa, 等电点为 5.16 (图 1)。序列中存在非细胞器特征的基序 RARFEEL 和位于 C-端的细胞质定位特征基序 EEVD。拥有 3 个典型的 HSP70 家族标签基序 IDLGTYS、IFDLGGTFDVSIL 和 IVLVGGSTRIPKIQK。

应用 SWISS-MODEL 软件中 ProMod II 程序对获

得的黄条鲮 *hsp70* 空间结构进行预测(图 2)。结果显示, *hsp70* 空间结构由 3 部分组成: ATP 酶结合结构域、底物多肽结构域和 C 端结构域。其中, ATP 酶结

合结构域是由 4 个亚域构成的 2 个叶状结构;底物多肽结构域具有结合底物多肽的功能, 由 2 个亚域组成, 它们之间由螺旋结构相连。

```

1 aggctgagttctatagcactcactatagggcaagcagtggtatcaacgcagagtacatggggaggagcacagagagaagactacaagaag
91 aagaagaagcagcggagagagggacacaacacatcaggaacctcttcaactatcttctcatctttcaacgagagacaccaattcaaacc
181 aaccaagATGTTCTGCAGCTAAAGGTGTAGCGATCGGCATCGACCTGGCCACCACTACTCCTGTGTGGGGTTTCCAGCACGAAAAGT
1 M S A A K G V A I G I D L G T T Y S C V G V F Q H G K V
271 AGAAATCATCGCCAACGACCAGGGCAACAGGACCACCCAGCTATGTGGCCTTCACTGACACAGAGAGACTGATTGGTGACGCAGCCAA
29 E I I A 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
361 GAACCAGGTGGCTCTGAACCCAGCAACCCGTGTTGATGCCAAGAGACTGATTGGAAGAAAGTTTGATGATGCAGTGGTGCAGGCTGA
59 N Q V A L N P S N T V F D A K R L I G R K F D D A V V Q A D
451 CATGAAGCACTGGCCCTTCAAGTGGTTTCAGATGGAGGGAAGCCCAAAGTTCAGGTGGGTACAAAGGGGAGGACAAAAGCTTTCAACCC
89 M K H W P F K V V S D G G K P K V Q V A Y K G E D K A F N P
541 TGAGGAGATTTCTCCATGGTCTGGTGAAGATGAAGGAGATCGTGAAGCCTACCTCGGCCACAAGGTGTCCAACGCAGTGTGCACAGT
119 E E I S S M V L V K M K E I A E A Y L G H K V S N A V V T V
631 CCCAGCGTACTTCAACGACTCCAGCGACAGGCGACTAAAGACGCGGGCGTCATCGCAGGACTTAACGCTCTGAGGATCATCAACGAGCC
149 P A Y F N D S Q R Q A T K D A G V I A G L N V L R I I N E P
721 GACGGCGCGCCATCGCGTACGGTCTGGACAAAGGCAAGTCAAGGAGACGTAACGCTCTGATCTTTGACCTGGGCGGAGGACCTTCGA
179 T A A A I A Y G L D K G K S G E R N V L I F D L G G G T F D
811 CGTGTCCATCTGACAATCGAAGACGGGATCTTTGAGGTCAAATCCACGGCCGGGGGACTCACCTGGGCGGAGAGGACTTTGACAACCG
209 V S I L T I E D G I F E V K S T A G D T H L G G E D F D N R
901 CATGGTCAACCACTTTGTTGAGGAGTTCAAGAGGAAACACAAGAAGGACATCAGCCAGAACAAGAGCCCTGAGGAGGCTGCGCACAGC
239 M V N H F V E E F K R K H K K D I S Q N K R A L R L R T A
991 TTGTGAGAGGGCCAAGAGGACGTGTCTCCAGCTCCAGGCCAGCATCGAGATCGATTCTGTGTTGAGGCGATCGACTTCTACACCTC
269 C E R A K R T L S S S S Q A S I E I D S L F E G I D F Y T S
1081 CATCACCAGGGCTCGCTTCGAGGAGTGTGCTCCGACCTGTTCAAGGGAACATTAGATCCGGTGGAGAAAGCCCTGAGGGACGCCAAAAT
299 I T R A R F E E L C S D L F R G T L D P V E K A L R D A K M
1171 GGACAAGGCGCAGATCCAGCAGATCGTCTGGTGGGAGGCTCCACCCGAATCCCAAAGTCCAGAACTCTGCAGGATTTCTTCAACGG
329 D K A Q I H D I V L V G G S T R I P K I Q K L L Q D F F N G
1261 TAGAGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCAGATGAGGCGGTGGCTTACGGCGCCCGCTCCAGGCCGCCATTCTCTCAGGTGATACCTCTGG
359 R E L N K S I N P D E A V A Y G A A V Q A A I L S G D T S G
1351 CAACGTTCAGACCTGTGTGTGAGCAGTGGCCCTGTGCTCCGTTGGGTATCGAGACAGCGGGAGGAGTCATGACATCCCTGATTAAGG
389 N V Q D L L L L D V A P L S L G I E T A G G V M T S L I K R
1441 CAACACCACCATCCCACTAAACAACCCAGGTCTTACCACCTACTCTGACAACCAGCCCGGGTCTCATCCAGGTGTACGAAGGGGA
419 N T T I P T K Q T Q V F T T Y S D N Q P G V L I Q V Y E G E
1531 AAGGCCATGACCAAGGACAACAACCTGCTGGCAAGTTGAGCTGACAGGAATCCACCTGCTCCACGAGGGTCCACAGATCGAGGT
449 R A M T K D N N L L G K F E L T G I P P A P R G V P Q I E V
1621 CACGTCGACGTAGACGCCAACGGCATTTTGAACGTATCTCGGTGGACAAAAGCACCAGGAAAGAGAACAAAGTACCCATCACCAACGA
479 T F D V D A N G I L N V S A V D K S T G K E N K I T I T N D
1711 CAAGGGCCGACTGAGCAAAGAAGAGATCGAGAGGATGGTGCAGGACCGGACAAGTACAAAGCTGAGGACGACCTTACAGGGGACAAAAT
509 K G R L S K E E I E R M V Q D A D K Y K A E D D L Q R D K I
1801 CTCTGCCAAGAACTCGTGGAGTCTACGCTTCAACATGAAGAGCAGCGTGCAGGACGAGAACCTGAAGGGCAAAATGAGTGAGGAGGA
539 S A K N S L E S Y A F N M K S S V Q D E N L K G M S E E E
1891 GCAGAAGAAGTGGTTGAGAAGTGTGATGAGACCATCGCTGGTGGGAGAACAACCAGCTGGTGTATAAAGACGAGTATCAACACAAGCA
569 Q K K V V E K C D E T I A W L E N N Q L A D K D E Y Q H K Q
1981 GAAAGAGCTGGAGAAAGTGTGCAACCCATCATCAGCAAGTTGATCAGGGAGGAATGCCTGAAGGTAAGTGTGGAGAGCAGGCACAAGC
599 K E L E K V C N P I I S K L Y Q G G M P E G N C G E Q A Q A
2071 CGGCTCCAGGGGCCACTATTGAGGAGGTGGACTAAagtgcccttaatatggactctgtgatcactgtaacaataacgttatacctca
629 G S Q G P T I E E V D *
2161 tgtttgtgggtttttgttccagacatttatatgttttaacttaacaatcaagaaattataagaactgaccatatttttacaaagttgcat
2251 tgctggactttgcaatgaagataaaatgtgaatacatcttaattgtttgtttgtttcaataaaataacttgaatcaccaaa

```

图 1 黄条鲮 *hsp70* 基因全长 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig.1 The complete cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *S. aureovittata hsp70*

ORF 用大写字母表示, 5'-UTR 和 3'-UTR 用小写字母表示。起始密码子加框显示, 终止密码子以星号标注。

阴影部分为 *hsp70* 家族保守基序。

The ORF domain is indicated with uppercase letters, and the 5'-UTR domain and 3'-UTR domain are indicated with lowercase letters. The start codon is boxed and the stop codon is indicated with asterisk.

The conservative motif domains of *hsp70* gene are shown in shadow.



图 2 预测的黄条鲮 HSP70 三级结构
Fig.2 The predicted tertiary structure of HSP70 of *S. aureovittata*

2.2 氨基酸序列同源性比较和系统进化分析

对黄条鲮和其他脊椎动物的 *hsp70* 基因的氨基酸序列进行同源序列比对(表 2), 并绘制了基于氨基酸序列的 NJ 系统进化树(图 3)。结果显示, 黄条鲮与同为鲈形目(Perciformes)的长背鲮(*S. lalandi dorsalis*)的 *hsp70* 同源性最高, 达 99.5%, 其次为高体鲮(*Seriola dumerili*), 达 98.9%, 与鲤形目(Cypriniformes)和鲑形目(Salmoniformes)的亲缘关系较远, 与哺乳纲其他动

物的亲缘关系更远。系统进化分析表明, 我国黄条鲮 HSP70 与长背鲮和高体鲮 HSP70 聚为一个小分支, 与其他鲤形目和鲑形目鱼类聚为大分支, 表明鲈科(Carangidae)鱼类 *hsp* 基因的进化亲缘关系最为接近。

2.3 黄条鲮 *hsp70* mRNA 的组织表达特性

检测了 *hsp70* 基因在雌雄成鱼组织中的表达, 发现各组织中均可检测到 *hsp70* 基因 mRNA 表达(图 4), 雌鱼中以卵巢组织表达水平最高, 其次为鳃、心、脾脏, 在肾脏和垂体等其他组织中低表达; 雄鱼中以鳃组织 *hsp70* mRNA 表达水平显著高于其他组织, 其次在垂体、头肾和精巢中也显著高表达, 在脾脏等其他组织中相对低表达, 表明 *hsp70* 基因在黄条鲮成鱼的组织表达模式和生理功能各不相同, 具有明显的性别二态性。

2.4 黄条鲮 *hsp70* 基因 mRNA 在胚胎发育过程中的表达特性

本研究发现, 在未卵裂前的受精卵中可检测到 *hsp70* 的表达, 表明其具有亲本遗传的特性。在胚胎发育过程的各个时期都可检测到 *hsp70* mRNA 的表达, 在低囊胚前各发育阶段, *hsp70* mRNA 一直保持较低表达水平, 在原肠前期开始显著上调表达, 其后保持相对较高表达水平至胚胎孵化出膜期达峰值 ($P < 0.05$)(图 5)。

表 2 黄条鲮与其他脊椎动物 *hsp70* 基因氨基酸序列同源性分析/%

Tab.2 Homology analysis of amino acid sequences of *hsp70* gene of *S. aureovittata* and other vertebrates %

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|
| 1 | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 86.1 | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 90.1 | 85.4 | | | | | | | | | | | |
| 4 | 86.5 | 83.6 | 83.8 | | | | | | | | | | |
| 5 | 90.0 | 89.8 | 86.0 | 85.2 | | | | | | | | | |
| 6 | 88.1 | 83.9 | 86.3 | 85.5 | 85.3 | | | | | | | | |
| 7 | 86.4 | 84.7 | 85.1 | 95.5 | 86.2 | 85.6 | | | | | | | |
| 8 | 81.1 | 76.7 | 79.0 | 82.7 | 79.1 | 80.5 | 83.3 | | | | | | |
| 9 | 91.7 | 85.7 | 89.3 | 85.1 | 89.4 | 86.7 | 85.6 | 80.7 | | | | | |
| 10 | 86.5 | 96.0 | 85.5 | 83.3 | 88.9 | 83.7 | 84.1 | 76.3 | 85.9 | | | | |
| 11 | 91.5 | 85.7 | 88.1 | 86.0 | 89.8 | 85.9 | 86.0 | 80.0 | 94.2 | 86.3 | | | |
| 12 | 91.9 | 85.4 | 88.5 | 86.2 | 89.5 | 86.2 | 85.7 | 80.9 | 94.4 | 86.3 | 98.4 | | |
| 13 | 92.0 | 85.7 | 88.5 | 86.0 | 89.8 | 86.4 | 86.0 | 80.4 | 94.7 | 86.3 | 99.5 | 98.9 | |

注: 1. 团头鲂; 2. 加州鲈; 3. 大黄鱼; 4. 小鼠; 5. 斜带石斑鱼; 6. 爪蟾; 7. 牛; 8. 猪; 9. 罗非鱼; 10. 虹鳟; 11. 长背鲮; 12. 高体鲮; 13. 黄条鲮。

Note: 1. *Megalobrama amblycephala*; 2. *Micropterus salmoides*; 3. *Larimichthys crocea*; 4. *Mus musculus*; 5. *Epinephelus coioides*; 6. *Xenopus laevis*; 7. *Bos indicus*; 8. *Sus scrofa*; 9. *Oreochromis mossambicus*; 10. *Oncorhynchus mykiss*; 11. *Seriola lalandi dorsalis*; 12. *Seriola dumerili*; 13. *Seriola aureovittata*.

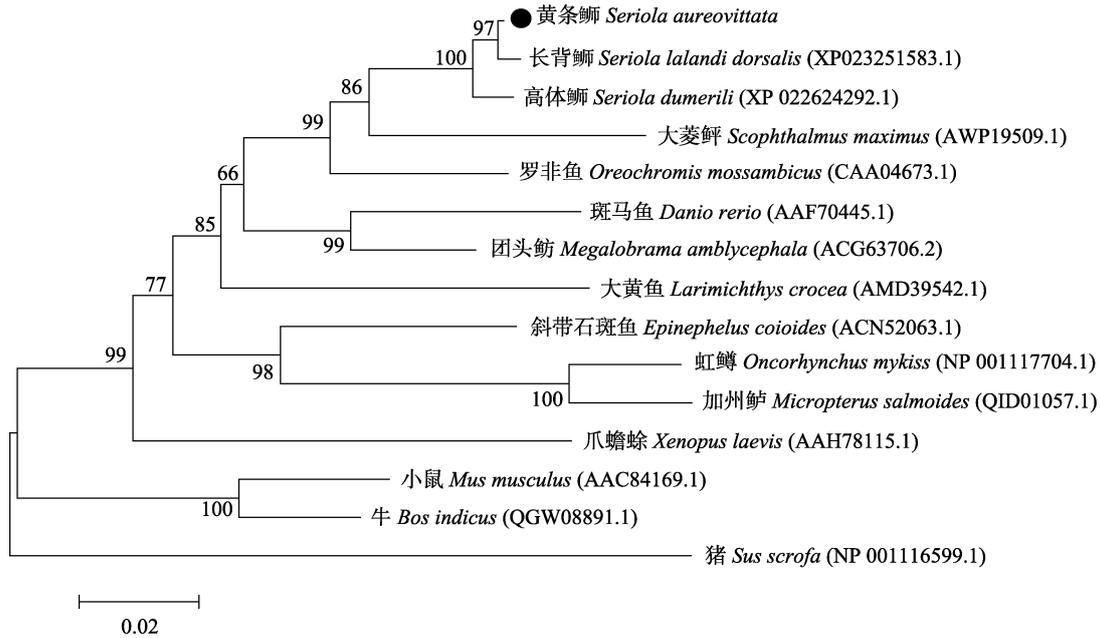


图3 黄条鲷HSP70与其他脊椎动物的NJ系统进化树

Fig.3 The phylogenetic tree of HSP70 of *S. aureovittata* and other vertebrates by neighbor-joining method

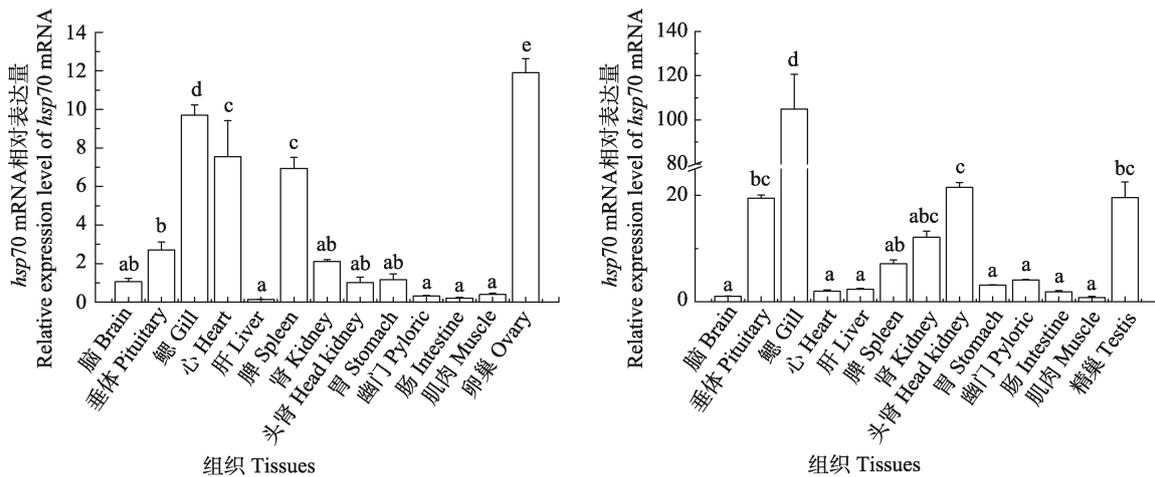


图4 黄条鲷 *hsp70* 基因在雌性(左)和雄性(右)中的组织表达分布特性

Fig.4 The differential spatial expression patterns of *hsp70* mRNA in female (left) and male (right) *S. aureovittata*

2.5 黄条鲷 *hsp70* 在仔稚幼鱼生长发育过程中的表达特性

检测了 *hsp70* mRNA 在仔稚幼鱼生长发育过程中的表达变化(图 6)。结果显示, *hsp70* mRNA 在 1 d 仔鱼中高表达,在 4 d 仔鱼中显著降低($P < 0.05$),自 7 d 仔鱼开始显著上调表达至 15 d 仔鱼达峰值($P < 0.05$),在 20 d 仔鱼中显著下降($P < 0.05$),并在 25 d 稚鱼及其后均保持相对较低表达水平。

3 讨论

有关 *hsp* 基因家族的研究始于 20 世纪发现了果

蝇(*Drosophila*)的 HSP 蛋白(Ritossa, 1962),其后各种 HSP 家族的功能因子的结构与功能研究逐步深入。HSP70 家族是进化最为保守也是研究最为广泛的 HSPs (Sun *et al*, 2021)。本研究通过同源克隆和 RACE 方法获得了黄条鲷 *hsp70* 基因的全长 cDNA 序列,揭示了其结构特征、系统进化地位以及在胚胎和仔稚幼鱼生长发育过程中的表达调控特性,为鱼类 *hsp70* 基因的生理功能研究添加了新的基础资料。

HSP 家族基因序列高度保守,无论在脊椎动物还是无脊椎动物的不同种属之间均有很高相似性,因此,先前研究认为这些蛋白具有相似的功能(Gething *et al*, 1992)。目前,已有数十种鱼类的 *hsp70* 基因的

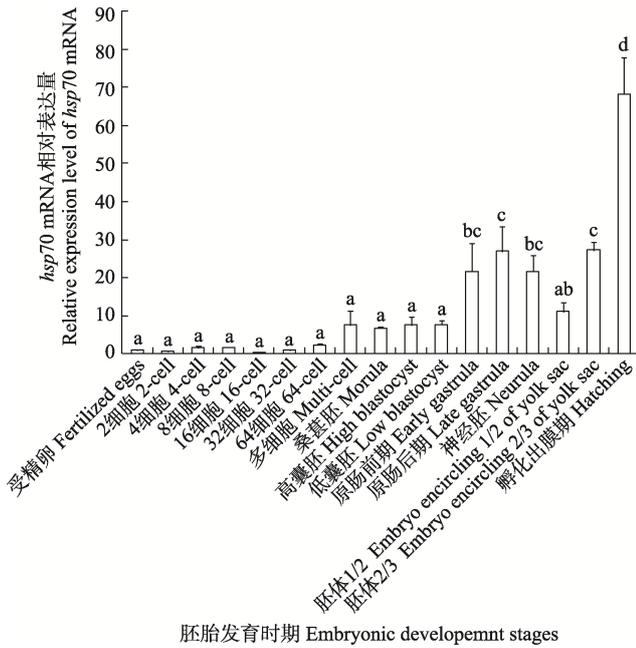


图 5 黄条鲮胚胎发育过程中 *hsp70* mRNA 表达特性
Fig.5 The temporal expression pattern of *hsp70* mRNA of *S. aureovittata* during embryonic development

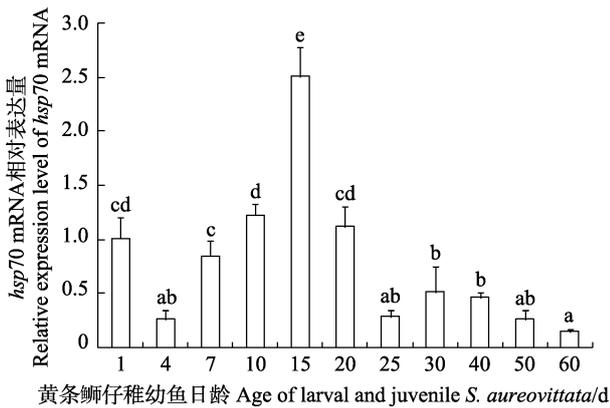


图 6 黄条鲮仔稚鱼生长发育过程中 *hsp70* mRNA 表达水平变化
Fig.6 The temporal expression pattern of *hsp70* mRNA of *S. aureovittata* larvae and juveniles

结构和组织表达特性公开报道(Rosic *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2020)。本研究发现, 黄条鲮 *hsp70* 基因具有真核生物 *hsp70* 家族的典型结构特征, 包括 3 个功能结构域和 3 个典型的 *hsp70* 家族标签基序; 存在非细胞器基序 RARFEEL, 说明它定位于胞质中, 进一步验证了鱼类 *hsp70* 基因的结构保守特性(Sun *et al.*, 2021)。在组织表达特性方面, 对杂交黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco* ♀ × *P. vachelli* ♂) 的研究表明, *hsp70* 基因主要在肝脏中表达, 其次为脑、鳃和肌肉(朱凌威等, 2021)。在草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)中, *hsp70* 基因主要在脑中表达, 其次为肝胰脏、鳃和肌肉(林亚秋等, 2009)。而淞江鲈

(*Trachidermus fasciatus*) *hsp70* 基因主要在鳃中最高表达, 其次为脑、肌肉和肝脏(刘庆全, 2013)。在鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)中, 以卵巢、肠道和头肾中的表达水平较高(王鹏飞, 2014)。本研究中, 雌性黄条鲮卵巢中 *hsp70* 基因表达最高, 其次为鳃、心和脾脏, 而雄性黄条鲮中鳃组织 *hsp70* 基因显著高表达, 其次为垂体、头肾和精巢, 与其他已报道的鱼类有一定的差异, 表明 *hsp70* 基因的组织表达特性具有典型的物种特异性。更有趣的是, 黄条鲮 *hsp70* 基因的组织表达也具有较为明显的性别二态性, 其具体的生物学意义和生理学功能有待于进一步深入解析。

先前研究表明, 热休克蛋白在动物胚胎发育过程中也起着非常重要的生理作用, 除了作为分子伴侣维持胞内蛋白稳态以外, 还参与组织或器官的形态建成, HSPs 在胚胎发育中的表达具有发育阶段依赖性和组织特异性(Rupik *et al.*, 2011)。但有关 *hsp70* 对水生生物胚胎发育的调控作用及机制研究报道较少, 对斑马鱼(*Danio rerio*)的研究表明, 在卵母细胞发生过程中可检测到 *hsp70* 基因表达, 且与胚胎发育过程中晶状体和脑等器官的发生发育密切相关(Evans *et al.*, 2005、2007)。本研究中, 黄条鲮未发生卵裂的受精卵中检测到 *hsp70* mRNA 的表达, 表明其具有亲本遗传的特性, 这与斑马鱼中 *hsp70* 参与卵母细胞发育过程的结果类似(Rupik *et al.*, 2011), 但黄条鲮 *hsp70* 基因主要来自母本还是父本或者父母本双方, 有待于进一步在性腺分化发育过程中的表达检测来验证。另外, 在黄条鲮胚胎发育各阶段均可检测到 *hsp70* 基因的转录表达, 在原肠前期开始显著上调表达直至胚胎孵化出膜期达峰值, 该结果与鳊鱼 *hsp70* 在胚胎发育过程中的表达模式相似(王鹏飞, 2014)。在黄条鲮胚胎发育过程中, 自原肠期原口关闭后, 胚体形成, 其后视囊和晶体等器官相继发生和发育(徐永江等, 2019), *hsp70* 的这种特定发育期的高表达模式表明其可能参与了黄条鲮胚胎发育阶段器官形成发育的调控, 具体的作用及机制有待于进一步研究确证。

在黄条鲮仔稚鱼生长发育阶段, *hsp70* 在 1 d 仔鱼中高表达, 这与亲本遗传有关。其后, 在 4 d 仔鱼中显著下调表达, 这一时期是黄条鲮开口由内源性营养向外源性营养过渡的关键时期, 仔鱼初次接触到外源性营养供给, 可能会造成一定的生理适应性的改变, 而 *hsp70* 的下调表达特性也表明其可能参与了内外营养转化过程的生理适应调控。黄条鲮 7 d 仔鱼已完全积极地摄食外源营养, 鳔已充气, 10~15 d 仔鱼消化系统发育完全、生长加速, 且 15 d 仔鱼尾椎开始完全准备进入变态期(徐永江等, 2019), 这一时期

hsp70 的高表达可能提示其在黄条鲮变态前期摄食与生长发育过程中起着重要的生理调控作用, 具体的途径与机制有待于深入研究。黄条鲮 20 d 仔鱼进入变态期, 至 25 d 变态完成进入稚鱼期, 此时的苗种各种表观器官发育更为完善且生长更为迅速, 而 *hsp70* 显著下调表达, 表明其在变态期和变态完成后的调控作用发生变化。下一步, 本实验室将借助基因敲降等手段深入探究黄条鲮胚胎发育过程中 *hsp70* 基因对器官发生发育的调控作用与生理机制。

参 考 文 献

- ABHA G, ANKUSH B, KAZUE H. HSP70 and HSP90 in neurodegenerative diseases. *Neuroscience Letters*, 2020, 716: 134678
- DEANE E E, WOO N Y S. Impact of heavy metals and organochlorines on *hsp70* and *hsc70* gene expression in black sea bream fibroblasts. *Aquatic Toxicology*, 2006, 79(1): 9–15
- EVANS T G, YAMAMOTO Y, JEFFERY W R, *et al.* Zebrafish Hsp70 is required for embryonic lens formation. *Cell Stress Chaperones*, 2005, 101: 66–78
- EVANS T G, BELAK Z, OVSENEK N, *et al.* Heat shock factor 1 is required for constitutive Hsp70 expression and normal lens development in embryonic zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2007, 146(1): 131–140
- GETHING M J, SAMBROOK J. Protein folding in the cell. *Nature*, 1992, 355: 33–45
- HARTL F U. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 1996, 381(6583): 571–579
- HEREDIA P. Heat shock protein (HSP70) RNA expression differs among rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) clonal lines. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 149(4): 552–556
- HANGZO H, BANERJEE B, SAHA S, *et al.* Ammonia stress under high environmental ammonia induces Hsp70 and Hsp90 in the mud eel, *Monopterus albus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2016, 43: 77–88
- LIN Y Q, ZHEN Y C, JI H. Partial sequence cloning of HSP70 gene and differences in tissue expression in grass carp. *Freshwater Fisheries*, 2009, 39(4): 67–71 [林亚秋, 郑玉才, 吉红. 草鱼 HSP70 基因 cDNA 部分序列克隆及其组织表达差异. *淡水渔业*, 2009, 39(4): 67–71]
- LIU J, CHEN Y X, MA L. Yellow Sea and Bohai Sea fish atlas. Beijing: Science Press, 2015, 172 [刘静, 陈咏霞, 马琳. 黄渤海鱼类图志. 北京: 科学出版社, 2015, 172]
- LIU Q Q. A preliminary study on the cloning and expression of the full sequence of *Trachidermus fasciatus* Heckel HSP70. Master's Thesis of Fudan University, 2013, 25–27 [刘庆全. 淞江鲈(*Trachidermus fasciatus* Heckel) HSP70 全序列的克隆及其表达的初步研究. 复旦大学硕士研究生学位论文, 2013, 25–27]
- MA F, LUO L. Genome-wide identification of Hsp70/110 genes in rainbow trout and their regulated expression in response to heat stress. *PeerJ*, 2020, 8: e10022
- RITOSSA F. A new pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 1962, 18: 571–573
- ROSIC N N, PERNICE M, DOVE S, *et al.* Gene expression profiles of cytosolic heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 from symbiotic dinoflagellates in response to thermal stress: Possible implications for coral bleaching. *Cell Stress and Chaperones*, 2011, 16(1): 69–80
- 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
- SUN Y, WEN H, TIAN Y, *et al.* HSP90 and HSP70 families in *Lateolabrax maculatus*: Genome-wide identification, molecular characterization, and expression profiles in response to various environmental stressors. *Frontiers in Physiology*, 2021, 12: 784803
- SURAJIT S, DHRUBA S, RENU Y, *et al.* Heat shock proteins: Molecules with assorted functions. *Frontiers in Biology*, 2011, 6(4): 312–327
- WANG P F. Cloning and expression of heat shock proteins and hypoxic reaction genes in *Siniperca chuatsi*. Doctoral Dissertation of Sun Yat-Sen University, 2014 [王鹏飞. 鳊热休克蛋白和低氧反应基因的克隆和表达研究. 中山大学博士研究生学位论文, 2014]
- XU Y J, ZHANG Z R, LIU X Z, *et al.* Early growth and development characteristics of *Seriola lalandi*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(1): 172–182 [徐永江, 张正荣, 柳学周, 等. 黄条鲮早期生长发育特征. *中国水产科学*, 2019, 26(1): 172–182]
- ZHANG C L. Fish survey report of the Yellow Sea and Bohai Sea. Beijing: Science Press, 1955, 116–119 [张春霖. 黄渤海鱼类调查报告. 北京: 科学出版社, 1955, 116–119]
- ZHU L W, ZHANG C Y, LIU Z, *et al.* Cloning, expression and tissue expression of the core sequence of *hsp70* gene in *Pelteobagrus fulvidraco* and its tissue expression under high temperature stress. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 47–55 [朱凌威, 张朝阳, 刘钊, 等. 杂交黄颡鱼 *hsp70* 基因核心序列的克隆、表达及其在高温应激下的组织表达. *渔业科学进展*, 2021, 42(1): 47–55]

(编辑 冯小花)

Molecular Cloning and Temporal Expression Pattern of *hsp70* Gene During the Early Life Stages of *Seriola aureovittata*

FANG Lu^{1,2}, XU Yongjiang^{2①}, CUI Aijun², JIANG Yan², WANG Bin², ZHOU Heting^{1,2}, LIU Xuezhou²

(1. School of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Joint Laboratory for Deep Blue Fishery Engineering of Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China)

Abstract *Seriola aureovittata* is a long-distance migratory oceanic species belonging to the Carangidae family; it is also known as yellowtail kingfish. It inhabits temperate and subtropical marine waters worldwide. We reached a significant breakthrough in *S. aureovittata* seedlings production in 2017, enabling current massively juvenile rearing in China, which became a promising candidate for the farming industry, especially for the rapidly growing open ocean aquaculture. However, sudden larvae death caused by environmental changes-related stresses during the early life stages of *S. aureovittata* leads to great losses. Thus, exploring the physiological mechanism of larvae responses to environmental stresses during seedlings' production under artificial breeding conditions is urgently needed. Heat shock proteins (HSPs) play an important function in the physiological regulation of stress and immune responses in vertebrates, including fish. HSP70 is a member of the HSPs family studied in dozens of fish species, with physiological roles in protein homeostasis, DNA protection, and stress tolerance enhancement, among others. To investigate the possible physiological effects of HSPs on early growth and development of *S. aureovittata*, we cloned and obtained the full-length cDNA sequence of the *hsp70* gene. Furthermore, the structure and spatial and temporal expression patterns of *hsp70* during embryonic development, larval and juvenile growth and development of *S. aureovittata* were determined. The results showed that the full-length cDNA sequence of the *hsp70* gene contains 2 332 bp, wherein the 5'-UTR is 187 bp, the ORF is 1 920 bp, and the 3'-UTR is 225 bp in length. A 639 amino acids protein with a molecular weight of 70.1 kDa is encoded by *hsp70*. The *hsp70* spatial expression exhibited a sex dimorphism pattern, with significantly high expression levels in the gill, heart, spleen, and ovary in females, whereas in males, the significantly high expression levels were found in the pituitary, gill, head kidney, and testis. Notably, the highest *hsp70* expression levels were observed in the ovary of females and the testis of males. During the *S. aureovittata* embryonic development, the *hsp70* mRNA was detected in fertilized eggs before cleavage, indicating that *hsp70* is parentally inherited. Additionally, the *hsp70* mRNA could be detected at all stages of embryonic development, wherein the lowest expression levels were observed before the low blastula stage, with a significant increase at the early gastrula stage maintained until the hatching stage. The high levels of *hsp70* mRNA were detected in one-day-old larva, which decreased in four-day-old larva, followed by an increase in 15-day-old larva. Remarkably, the *hsp70* mRNA level once again decreased in 20-day-old larva, maintaining an average level until 60-day-old juveniles. The results from the present study may provide insights into the origin and physiological function of *hsp70* during the early life stages of *S. aureovittata*.

Key words *Seriola aureovittata*; *hsp70*; Gene cloning; Expression and regulation; Early life stages

① Corresponding author: XU Yongjiang, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn