

研究报告

Research Report

缢蛏 *HSP90* 基因的鉴定及其在不同盐度下的表达分析

叶博¹ 李燕¹ 牛东红^{1,2,3*} 李家乐^{1,2,3}

1 上海海洋大学,水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室,上海,201306; 2 上海海洋大学,水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心,上海,201306; 3 上海海洋大学,水产科学国家级实验教学示范中心,上海,201306

* 通信作者, dhniu@shou.edu.cn

摘 要 HSP90 是一种高度保守的特异性蛋白,在增强动物对逆环境的适应能力方面发挥重要作用。本研究从缢蛏(*Sinonovacula constricta*)转录组文库中筛选出热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, HSP90)的一条同源序列,通过 RACE 技术获得其 cDNA 全长序列,命名为 *ScHSP90*。序列分析表明,该基因 cDNA 全长 3 070 bp,包括 428 bp 的 5' 非翻译区,461 bp 的 3' 非翻译区和 2 181 bp 开放阅读框,编码一个由 726 个氨基酸组成的多肽。该多肽含有 HSP90 家族共有的 5 个签名序列和 C 端高度保守的 MEEVD 短肽序列。同源性及系统分析表明,*ScHSP90* 编码的氨基酸与其他物种的 HSP90 氨基酸序列具有很高的同源性,其中与软体动物 HSP90 氨基酸序列相似性达 80%以上。荧光定量 RT-qPCR 检测分析表明:*ScHSP90* 基因在成体各组织中均有表达,在水管和肝胰腺中表达量相对较高,在不同盐度条件下的急性实验中,经盐度 30 ppt 和 35 ppt 处理后 *ScHSP90* 基因表达水平极显著升高($P<0.01$),且盐度越高上调越明显,表明 *ScHSP90* 基因参与了机体适应逆环境的过程。本研究为进一步研究 HSP90 基因功能以及开展贝类抗逆选育提供一定的理论参考。

关键词 缢蛏; *HSP90*; 盐度; 基因表达

Identification of *HSP90* gene in *Sinonovacula constricta* and Its Expression Analysis at Different Salinity Concentration

Ye Bo¹ Li Yan¹ Niu Donghong^{1,2,3*} Li Jiale^{1,2,3}

1 Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306; 2 Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306; 3 National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306

* Corresponding author, dhniu@shou.edu.cn

DOI: 10.13417/j.gab.040.002414

Abstract Heat shock protein 90 (HSP90) is a highly conserved specific protein that plays an important role in enhancing the animal's ability to adapt to adverse environments. In the present study, we obtained *HSP90* sequence from the transcriptome of *Sinonovacula constricta* and cloned the full length cDNA, named as *ScHSP90*. The full length of *ScHSP90* cDNA was 3 070 bp, including a 428 bp 5' UTR, a 461 bp 3' UTR and a 2 181 bp ORF encoding a polypeptide of 726 amino acids. It contained five signature sequences of HSP90 family and a highly conserved short peptide MEEVD in the C-terminus. The sequence analysis showed that the amino acid sequence similarity with the mollusc HSP90 was more than 80%. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis showed that *ScHSP90* could be expressed in all examined tissues and the relative higher expression level was observed in siphon and hemolymph. After the acute treatments of different salinity concentration, the expression of *ScHSP90* gene significantly increased at salinity 30 ppt or 35 ppt ($P<0.01$), and the expression increased following the salinity concentration

基金项目 本研究由国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项(2019YFD090040)和国家自然科学基金项目(31472278)共同资助

引用格式 :Ye B., Li Y., Niu D.H., and Li J.L., 2021, Identification of *HSP90* gene in *Sinonovacula constricta* and its expression analysis at different salinity concentration, *Jiyinzuxue yu Yingyong Shengwuxue* (Genomics and Applied Biology), 40(7-8 combined issue): 2414-2421. (叶博, 李燕, 牛东红, 李家乐, 2021, 缢蛏 *HSP90* 基因的鉴定及其在不同盐度下的表达分析, 基因组学与应用生物学, 40 (第 7-8 期合刊): 2414-2421.)

increasing. It is speculated that the *ScHSP90* gene could be involved in the process of adapting the adverse environment. It provides a theoretical reference for further study of *HSP90* gene function and breeding of shellfish.

Keywords *Sinonovacula constricta*; *HSP90*; Salinity; Gene expression

盐度是影响海洋生物存活、生长的重要环境因子(唐保军等, 2017)。由于自然环境的恶化以及人类活动等影响, 使沿海、河口附近的海水盐度变化幅度大。当前, 沿海附近的潮间带、滩涂以及河口附近分布或养殖着大量海水经济贝类, 但盐度的急剧变化可能对海水经济贝类的生存和生长造成不同程度的影响(Gagnaire et al., 2006; Carregosa et al., 2014)。盐度胁迫会影响机体内的渗透压平衡, 进而导致蛋白合成的紊乱、损伤(Yancey et al., 1982; Diehl, 1986; 于姗姗等, 2012)。

热休克蛋白又叫应激蛋白, 普遍存在细胞生物中, 是一类高度保守的蛋白质。热休克蛋白在提高细胞对外界不良环境刺激的适应性及维护细胞自身稳定等方面具有很重要的生物学性能 (Lindquist and Craig, 1988; Rungrasamee et al., 2010)。依其分子量的大小分为 HSP90 (分子量 83~90 kD)、HSP70 (分子量 66~78 kD)、HSP60 和小分子量 HSP 四个家族(夏西超等, 2012)。HSP90 是 HSP 家族中很重要的成员, 作为一种高度保守和广泛存在的蛋白质, 它能帮助机体调节应激反应, 对生物的生存起着至关重要的作用 (Lindquist and Craig, 1988; Hartl, 1996)。在细胞发生应激反应时, HSP90 表达水平显著升高, 使机体能够抵抗不利应激源的侵袭, 维持细胞的稳态和存活, 增强动物对环境刺激的适应能力(Pearl and Prodromou, 2006)。因此, 在环境胁迫下, HSP90 对细胞和机体起着至关重要的保护作用(韩俊英等, 2011)。目前有关 HSP90 在海水贝类中的研究仅见于栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) (Gao et al., 2007)、海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) (Gao et al., 2008)、紫贻贝 (*Mytilus edulis*) (Pantartz et al., 2009)、近江牡蛎 (*Crassostrea hongkongensis*) (陈晨, 2011)、皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hanai*) (Cheng et al., 2007) 和文蛤 (*Meretrix meretrix*) (Yue et al., 2011) 等。

缢蛏 (*Sinonovacula constricta*) 俗名蛏子, 属软体动物门 (mollusk phylum) 瓣鳃纲 (Lamellibranchia) 真瓣鳃目 (True lamellibranchia) 竹蛏科 (Solenidae), 在中国沿海地区分布广泛, 是中国四大年产量海水经济贝类之一。缢蛏是一种典型的滩涂贝类, 其生存活动范围有限, 当生存环境的盐度发生剧烈变化时, 其生存、生长就会受到严重的影响(林笔水和吴天明, 1990)。因此, 基于 *HSP90* 在抗逆抗病中的重要作用

(Pan et al., 2000) 本研究获得了缢蛏 *HSP90* 基因 cDNA 全长, 利用实时荧光定量 PCR 分析该基因的表达特征以及不同盐度下该基因的表达, 以期为进一步研究 *HSP90* 基因功能以及开展贝类抗逆选育提供一定的理论参考。

1 结果与分析

1.1 *ScHSP90* 基因 cDNA 序列分析

缢蛏 *HSP90* 基因的 cDNA 全长为 3 070 bp (GenBank 登录号: MN262637), 包括 2 181 bp 的开放阅读框, 5' 非编码区 (UTR) 共 428 bp, 3' 非编码区 (UTR) 共 461 bp, 命名为 *ScHSP90*。与 HSP90 家族类似, 该基因含有 5 个保守的功能序列标签: NKEI FLRELISNASDALDKIR (第 35~55 位), LGTIKSGT (第 102~110 位), IGQFGVGFYSAYLVAD (第 126~141 位), IKLYVRR VFI (第 354~363 位), GVVDSED LPLNISRE (第 379~394 位), 3'-UTR 含有一个典型的 AATAAA 加尾信号、一个 poly(A) 尾, C 端为保守的 MEEVD 结构(图 1)。*ScHSP90* 编码一个由 726 个氨基酸组成的蛋白质, 预测的蛋白分子量 M_w 为 82.97 kD, 理论等电点 pI 为 4.78。

1.2 *ScHSP90* 同源性分析

同源性分析结果显示, *ScHSP90* 编码的氨基酸与其他物种的 HSP90 氨基酸序列具有很高的同源性, 与脊椎动物 HSP90 的相似度都在 76% 左右; 与软体动物 HSP90 氨基酸序列相似性达 80% 以上, 其中与河蚬 (*Corbicula fluminea*) 相似度最高为 87.77% (表 1)。

对缢蛏 *HSP90* 与其他物种 HSP90 氨基酸序列进行系统进化分析, 结果显示, HSP90 分子进化树可以分为脊椎动物、无脊椎动物和软体动物三支。缢蛏 *HSP90* 与软体动物类南极蛤 (*Laternula elliptica*)、波纹巴菲蛤 (*Paphia undulata*)、河蚬的亲缘关系最近, 与昆虫 HSP90 同源关系较远, 与脊椎动物 HSP90 同源关系则最远(图 2)。

1.3 *ScHSP90* 基因的组织表达

RT-qPCR 检测的组织表达结果显示, *ScHSP90* 广泛分布于缢蛏各组织(水管、鳃、血、外套膜、肝胰腺、斧足和性腺)中。*ScHSP90* 基因在水管和肝胰腺中

tcgggttcgatttctaataataaactgcttcggcggaacatgctggaataatccaagacga
gaatattccagaattttacgttcacgttcgggtgaaggttccagattaacgcgactactgat
ataaaagaatcgtaagtcgcatatctgttaaaagaatccagatcgacagctaaagagcta
tatacgctgctgacattaagaattgttttatttataaaacaatcagtgtagcagaag
ttttgtgttgactacaactctgatttatttgaatttctgcaaaagtgttaagtaaat
aaatcggaataattttctacgcgactactatttgggtctctggaacggtggttttac
tcagaagaagcgcacgggttgacgctgcaacatctattatagctgcatgttaacttaatt
acatcaaa
ATGCTCTGAACAACAAACCTGGATGAAGGGGAGGTGAAACCTTCGCAITTCAGGCCGAA
M P E Q Q T V D S E D L P L N I S R E M L Q Q S K 20
ATTGCTCAGTTGATGACTTGATTATTAACACATCTTACTCAACAAAGAAATCTTCTTG
I A Q L M S L I I N T F Y S N K E I F L 40
AGAGAATTGATATCTAACGCATCCGATGCTCTGGACAGATCCGTTATGAAAGTCTCACA
R E L I S N A S D A L D K I R Y E S L T 60
GATCCATCAAAATGGAATCTGGCAAGGAGTGTACATCAAGATCGTCCAGACCGTGAA
D P S K L D S G K E L Y I K I V P D R E 80
TACAACACACTGACCTCATTGACACTGGTATTGGAATGACCAAGGCAGACTTGGTTAAC
Y N T L T L I D T G I G M T K A D L V N 100
AACCTGGGTACCAITTCGAAGTCTGGAAACCAAGGCTTCATGGAAGCCCTGCAGGCTGGA
N L G T I A K S G T K A F M E A L Q A G 120
GCCGACATCTCTGATGATTGGTCAGTTTGGTGGGTTTCTACTCTGCTACCTAGTAGCA
A D I S M I G Q F G V G F Y S A Y L V A 140
GACAAGGTGTCTGTCATCTCCAAGAACATGATGATGAGGTCTACCTCTGGGAGTCTGCT
D K V S V I S K N N D D E V Y L W E S A 160
GCCGCGGATCTTTTACTGTCTCAAGCAGATTTCAGACTTCGCGCTGGAGCTGTGATCCCAA
A G G S F T V K Q I S D F G L E R G T Q 180
ATTACCTCTGACATCAAGGAGGACCAAGCTGAGTACCTGGAGGAGAGAGAAITTAAGAG
I T L H I K E D Q A E Y L E E K R I K E 200
GTGGTGAACAAACACAGCCAGTTTATCGGTACCCCAATTAAGTAGTCTGCGAAAGAG
V V N K H S Q F I G Y P I K L V C E K E 220
AGGACAAGGAGGTCTTCAGATGATGAAGAGGAGGAGAAAGAGAGAGAGATGATGAT
R D K E V S D D E E E E K K E E K D G D 240
GAGGAGAAGATGAGGATGACAAGCCCAAGGTAGAGGATTTGGAGGAGACGAGGATGGT
E E K N E D D K P K V E D L E E D E D G 260
GATGATGACAAGAAAGACAAGAAAGAAAGAAAGATCAAGGAAAGTACCAAGGATGAG
D D D K K D K K K K K K I K E K Y Q D E 280
GAAGAACTGAAACAAACCAAGCCCTGTGGACCCGTAACCCGACGATATCACACAGGAA
E E L N K T K P L W T R N P D D I T Q E 300
GAATATGAGAGTTCTATAAATCTCTGACCAAGATTTGGAGGACCAATTTAGCTGTGAAG
E Y G E F Y K S L T N D W E D H L A V K 320
CACTTCTCTGTGTAAGGACAGCTCGAGTTCGGGGCCCTACTCTTATCCCAAGAGGGCT
H F S V E G Q L E F G A L L F I P K R A 340
CCAATTGACATGCTCGAGAACAAAAAGAAAGAAATAACATCAAAATTGTATGTACGACGA
P F D M L E N K K K K N N I K L Y V R R 360
GTGTTTATCATGGCAACTGTGAGGAACCTCAITTCGAGTACCTCAACTTTGTTAAGGGT
V F I M D N C E E L I P E Y L N F V K G 380

GTAGTAGACTCTGAGGATCTACCAGTGAACATCTCCAGAGAAATGCTTCAACAGAGCAAG
V V D S E D L P L N I S R E M L Q Q S K 400
ATCCTGGAAGGTITATCAGAAAGAACCTGGTCAAGAAAGTGCAATTGAGCTGATTGAAGAGATT
I L K V I R K N L V K K C I E L I E E I 420
TCAGAAAGAAAGATAACTACAAGAAAGCTGTATGAGCAGTTTGGCCAAAGATCTGAAGCTT
S E D K D N Y K K L Y E Q F A K N L K L 440
GGAATCCATGAAGACAGCACAAACAGAAAGAGATTGCAAGGCTTCTGCTATCTACTACCC
G I H E D S T N R K K I A G F L L Y Y T 460
TCCCAAGTCTGGCAGCAGATGGCTTCATTGAAGGATTACGTTTCCAGGATGAAGGAGAAT
S Q S G D E M A S L K D Y V S R M K E N 480
CAGAAAGACATCTACTACATTACAGGTGAAACTAAAGAGCAGTACCACCTCAGCATTT
Q K D I Y Y I T G E T K E A V T T S A F 500
GTTGAGCGAGTATCGGTGAGGCTTTGAGGTGCTTACATGACAGACCCCATAGATGAG
V E R V I G R G F E V Y M T D P I D E 520
TATGCTGTCCAGCAGCTCAAGGATGATGAGCAAGAACTGGTCTGCTCACCAGGAGG
Y A V Q Q L K E Y D G K N L V C V T K E 540
GGTCTGGAGCTGCCAGAAAGATGAGGAGATGAAAAAGAGTTTGAAGAACAGAAAGCTGAC
G L E L P E D E E M K K K F E E Q K A D 560
TTTGAGGGATTGTGCAAGTGATGAAGGAAATCTTGACCAAGAAAGTTGAAAAGGTGACA
F E G L C K C M K E I L D K K V E K V T 580
GTATCAACCGACTAGTCAAGTCTCCATGCTGATTGTGACTGCTCAGTACGAGTGGTCT
V S N R L V S S P C C I V T G Q Y G W S 600
GCCAACATGGAAGGATCATGAAGGCCAGGCATTACGAGACTCCAGCACCATGGGCTAT
A N M E R I M K A Q A L R D S S T M G Y 620
ATGGCTGCCAAGAAAGACCTAGAATTAACCTGATCAITTCATCATGAAGGCACTCAAG
M A A K K N L E I N P D H S I M K A L K 640
GACAAGGTGACAGCTGACAAGAACGACAGTGGTCAAGGATCTGGTCTTCTTATGAT
D K V T A D K N D K S V K D L V L M Y 660
AAAACAGCCCTCTTGCCTCGGGCTTTTCCCTCGAGGACCCAGCCACGACACCAACAGA
K T A L L A S G F S L E D P A T H T N R 680
ATCAACAGATGATCAAACTGGGTCTTGTATTGACGAGGATGATGTTGCTTCCCGAG
I N R M I K L G L G I D E D D V A V P E 700
GCCGCTGAGGCTAGCAGAGGATATGCCGCACTAGAAGGTGATGATGATGATGCTCT
A G E A S T E D M P P L E G D D D D A S 720
AGAATGAGGAAGTGGATTAAGtcgtagaagtgatcaaaagacttgatagtgacccttt
R M E E V D * 726
atcgcatccctcaatactcttgggtcgccgaccacacgctaccatcatcgagctccata
atcggtgtgtagtagatgttgggttattgtacaattgtgcatcatgttgaacctgttt
ttacaacattgagggccaatcatttcataacatttttcacgatggatgattgctgcaat
tgctgtgttcattgttcattgaatgttggcaccactgtctcttgggaagcatctcaat
agcttaagttgccattttaaaccattgcattgaattgttgggttttgataaggttacat
gatacactgtgactgtgattgttcaatctgtgatttttttcagttttatttagtagtgtt
tgtttcaaaaaagcaaaaaacatttaaaataaaacatgtaaaactacttaaaaaaaaaa
aa

图 1 *ScHSP90* 核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

注: 加框: *ScHSP90* 的起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA); 下画线: 加尾信号和多聚尾; 灰色: 保守的短肽标签; 双下画线: C 端为保守的 MEEVD 结构

Figure 1 The nucleotide sequence *ScHSP90* and its encoded amino acid sequence

Note: Box: The start codon (ATG) and stop codon (TAA) of *ScHSP90*; Underline: The tail signal and the poly tail; Grey: The conservative short peptide labels; Double underline: The C-terminal MEEVD structure

表 1 HSP90 氨基酸序列的同源性分析

Table 1 Identity analysis of amino acid sequence of HSP90

物种(登录号)	相同性(%)	物种(登录号)	相同性(%)
Species (Accession)	Identity (%)	Species (Accession)	Identity (%)
香鱼(KY073361.1)	74.89	虾夷扇贝(MF196912.1)	81.38
<i>Plecoglossus altivelis</i> (KY073361.1)		<i>Mizuhopecten yessoensis</i> (MF196912.1)	
红树林鲷鱼(HQ213895.1)	75.59	魁蚶(KT362154.1)	81.73
<i>Kryptolebias marmoratus</i> (HQ213895.1)		<i>Scapharca broughtonii</i> (KT362154.1)	
牙鲆(KY856948.1)	76.08	高贵海扇蛤(MH985699.1)	81.93
<i>Paralichthys olivaceus</i> (KY856948.1)		<i>Mimachlamys nobilis</i> (MH985699.1)	
小贯小绿叶蝉(KF730250.1)	76.19	南极蛤(EU831278.1)	82.72
<i>Empoasca onukii</i> (KF730250.1)		<i>Laternula elliptica</i> (EU831278.1)	
大西洋牙鲆(KY856947.1)	76.27	波纹巴菲蛤(JX885710.1)	86.23
<i>Paralichthys dentatus</i> (KY856947.1)		<i>Paphia undulata</i> (JX885710.1)	
近江牡蛎(HM171376.1)	80.30	河蚬(KT781099.1)	87.77
<i>Crassostrea hongkongensis</i> (HM171376.1)		<i>Corbicula fluminea</i> (KT781099.1)	

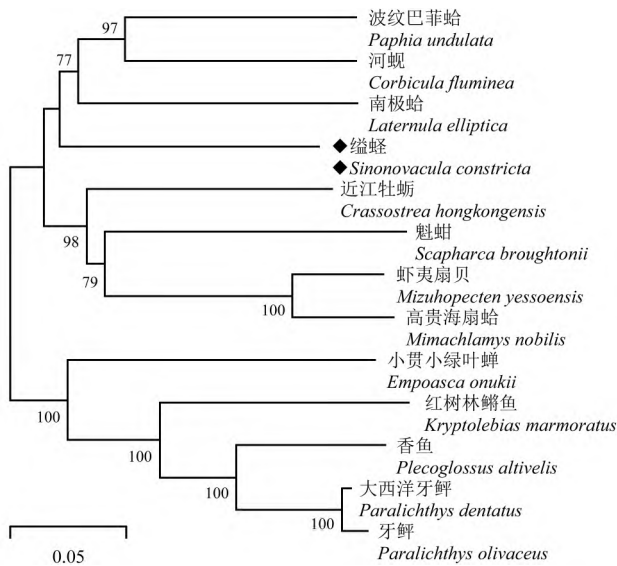


图2 HSP90 的 NJ 系统进化树
Figure 2 Neighbour-Joining phylogenetic tree of HSP90
的表达量相对较高(图 3)。

1.4 ScHSP90 在不同盐度下的表达水平

经不同盐度(25 ppt, 30 ppt 和 35 ppt)处理后, 荧光定量 PCR 检测结果表明, 在盐度 30 ppt 和 35 ppt

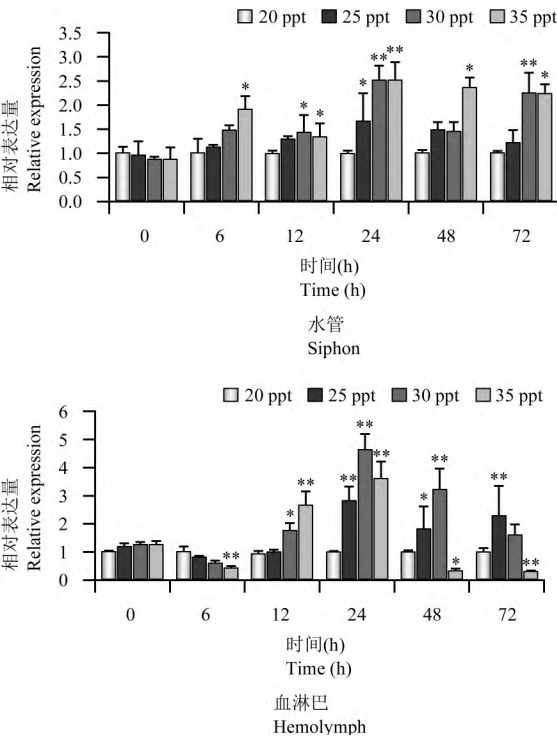


图4 各组织 ScHSP90 在不同盐度下的时空表达水平

注: *: 在同一时间点处理组与对照组差异显著 ($P<0.05$); **: 在同一时间点处理组与对照组差异极显著 ($P<0.01$)

Figure 4 Expression level of temporal and spatial of ScHSP90 in different tissues under different salinity

Note: *: Significant difference between challenged group and control group at the same time ($P<0.05$); **: Extremely significant difference between challenged group and control group at the same time ($P<0.01$)

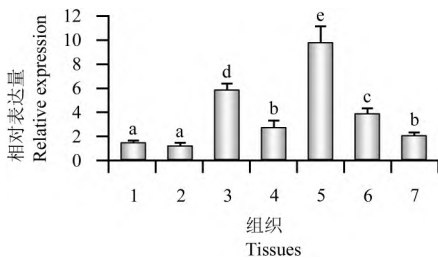
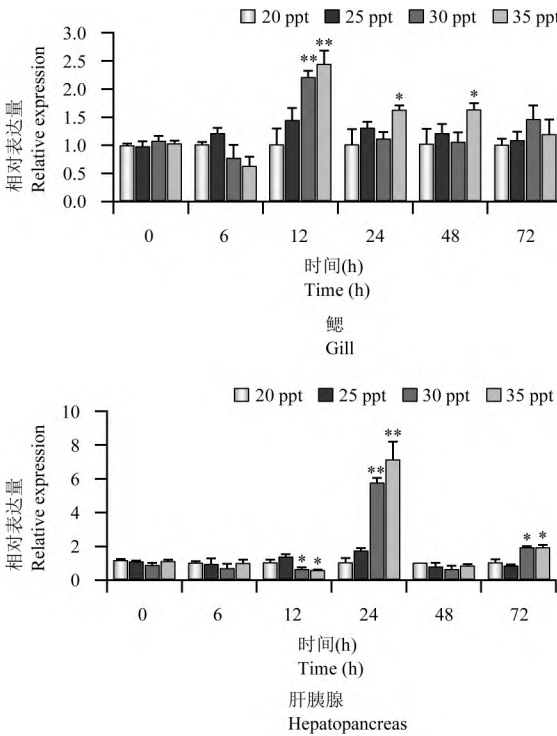


图3 缢蛏 ScHSP90 的组织表达
注: 1: 外套膜; 2: 血淋巴; 3: 肝胰腺; 4: 性腺; 5: 水管; 6: 斧足; 7: 鳃; 不同字母: 差异显著 ($P<0.05$); 相同字母: 差异不显著 ($P>0.05$)
Figure 3 The expression of ScHSP90 in tissues of Sinonovacula constricta
Note: 1: Mantle; 2: Hemolymph; 3: hepatopancreas; 4: Gonad; 5: Siphon; 6: Muscle foot; 7: Gill; Different letters: Significant differences ($P<0.05$); The same letters: Insignificant differences ($P>0.05$)

条件下, 在水管、鳃、血淋巴和肝胰腺中, ScHSP90 表达量在 12 h 或 24 h 极显著上调 ($P<0.01$); 且随着盐度的升高, ScHSP90 表达量呈不同程度的上升趋势 (图 4)。

2 讨论

HSP90 是一类在增强动物对环境应激的适应能



力上发挥作用的高度保守的蛋白质(Feder and Hofmann, 1999; Krishna and Gloor, 2001; Jackson et al., 2004)。而渗透休克是一种生理应激, 热休克蛋白诱导在其中起着重要作用(Sun et al., 2012)。水生动物广泛地通过生成热休克蛋白对盐度胁迫起反应, 通过与其他蛋白之间的相互作用有助于维持机体内环境的稳态, 从而增强机体对盐度变化的适应能力(Werner, 2004)。本实验采用 RACE 技术从缢蛏中获得 *ScHSP90* 全长 cDNA 序列, 其具有 HSP90 家族典型的 5 个保守的标签序列 NKEIFLRELISNASDALDKIR, LGTIKSGT, IGQFGVGFYSAYLVAD, IKLYVRRVFI, GVVDSEDLPLNISRE 以及 C 末端保守的 MEEVD 短肽序列。MEEVD 短肽序列是 HSP90 家族的细胞质定位信号(Gao et al., 2008), 通过氨基酸序列比对分析发现, *ScHSP90* 基因编码的氨基酸序列与其他海洋无脊椎动物的 HSP90 具有很高的同源性, 说明 *ScHSP90* 是比较保守的 HSP90 家族基因。

缢蛏 *ScHSP90* 在其机体各组织中广泛表达, 与皱纹盘鲍(*H. discus hannai*)、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)等物种 HSP90 的组织表达特点类似(Li et al., 2009; Zhang et al., 2011)。经荧光定量 PCR 检测显示, 与其他组织相比, 该基因在水管和肝胰腺中的表达量相对较高。缢蛏体内有两条水管, 是其体内与外界联系的唯一路径, 水管的伸缩活动容易受外界环境的损伤和刺激(杜蕴超等, 2018), 推测这可能是导致 *ScHSP90* 在水管中相对表达量偏高的原因之一, 肝胰腺是海洋无脊椎动物的重要免疫器官(孙田田等, 2012), 参与机体的各项免疫反应, 在肝胰腺中 *ScHSP90* 有高水平表达, 推测该基因可能参与缢蛏的免疫应激过程。

HSP90 可以通过和多种蛋白的相互作用来保护细胞免受损伤(Morimoto and Santoro, 1998; Ranford and Henderson, 2002)。盐度胁迫会诱导热休克蛋白基因表达合成热休克蛋白, 修复细胞功能损伤, 从而增强机体本身适应不良环境胁迫的能力(Morimoto and Santoro, 1998; Feder and Hofmann, 1999; Deane et al., 2002)。有研究结果表明, HSP90 具有维持细胞内稳态的作用, 与环境胁迫、压力和盐度处理后的持续时间密切相关(Sun et al., 2012)。本研究中, 随着胁迫时间的延长, 各盐度所检测的组织 *ScHSP90* 表达量呈现先升高后降低的趋势, 即呈现类似正态分布的曲线。各组织中 *ScHSP90* 的表达量随着盐度的增大而增大, 呈现出一种“高盐度下的高表达水平”响应模式。这与沈盘绿等(2014)在脊尾白虾(*Exopalaem-*

on carinicauda)蚤状幼体中的研究结果相似 *HSP90* 的表达量在高盐度下高水平表达(Sun et al., 2012)。也有研究发现不同盐度胁迫影响中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)幼体 *HSP90* 基因表达, 在高盐胁迫下 *HSP90* 表达水平均显著高于对照组(Sun et al., 2012)。

在本研究中, 25 ppt 处理组中缢蛏的 *HSP90* 基因表达量比较稳定, 随着处理时间的延长略有增加, 但不显著($P>0.05$), 说明小幅度的盐度变化对缢蛏的 *HSP90* 基因表达量影响不大; 而 30 ppt 和 35 ppt 处理组, 在盐度处理 12 h 后, 鳃组织 *ScHSP90* 表达量达到最高值, 在肝胰腺、水管和血淋巴中于盐度处理 24 h 后表达量也达到最高值, 且均显著高于对照组, 推测 30 ppt 和 35 ppt 已高于缢蛏适宜盐度, 并引起其机体内相应生理生化变化, 推测缢蛏可能通过调节 *HSP90* 基因的表达来抵御不良环境的胁迫。

为了抵抗或适应不良环境的胁迫, *HSP90* 基因需要大量的表达, 从而起到维持细胞体内环境的稳定作用(Iwama et al., 1998), 但表达量维持在高水平的时间较短, 随着时间的推移, *ScHSP90* 的表达量逐渐趋于平稳, 推测机体可能通过自身的调节作用, 使机体逐渐适应外界环境的胁迫。*HSP90* 基因在生物受到盐度异常变化时起到了很重要的调节作用, *HSP90* 的上调表达使机体有助于适应自身生理功能的转变(Rungrassamee et al., 2010), 从而增强了机体本身对不良环境的适应能力, 而且作为生物适应不良环境胁迫的指标(Feder and Hofmann, 1999), 在一定程度上体现着生物适应能力的增强(夏西超等, 2012)。在本研究中, *ScHSP90* 基因在盐度胁迫下表达量出现明显上调, 可推测 *ScHSP90* 基因的上调表达是缢蛏适应不良环境刺激的生理机制之一, 为开展贝类抗逆育种提供了一定的数据参考。

3 材料与方法

3.1 样本的处理与采集

实验用缢蛏采自于浙江宁海养殖基地, 平均壳长为 (3.61 ± 0.14) cm, 放入装有经海水晶调制而成的人工海水的水族箱中暂养 7 d (盐度为 20 ppt), 水温控制在 $(25\pm0.5)^{\circ}\text{C}$, 连续充气, 每天换水两次, 期间投喂硅藻, 实验前一天停止投喂。随机选取 9 个个体解剖获得外套膜、肝胰腺、足、性腺、血淋巴、鳃、水管 7 个组织, 液氮速冻, 保存于 -80°C , 用于 *HSP90* 基因克隆以及组织表达模式的检测。随机挑选健康活力强的缢蛏, 设置 4 个不同盐度梯度组, 每组设置 3 个

重复,分别为 20 ppt (对照组)、25 ppt、30 ppt、35 ppt,开展不同盐度条件下的急性实验。实验持续 72 h,分别在 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 各时间点选取 9 个个体收集水管、肝胰腺、鳃、血淋巴 4 个组织,液氮速冻,保存于 -80 ℃。

3.2 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成

各样本组织经液氮研磨后,利用 RNA 提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)提取每个样本的总 RNA,每三个 RNA 样本等量混合成一个样本组,并使用 Prime Script™ First-strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒(TaKaRa 公司)按说明书步骤逆转录合成 cDNA,所得 cDNA 作为荧光定量 PCR 的模板,-20 ℃ 保存备用。

3.3 *ScHSP90* 基因序列全长的获取

在缢蛏转录组文库中检索获得 *HSP90* 片段的部分序列,根据该部分序列设计上、下游引物并进行扩

增(表 2),由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。通过验证已知序列,检测的结果在 NCBI 网站上比对准确后,利用 Primer Premier 5.0 软件设计 3'-RACE 和 5'-RACE 的特异性引物(表 2),进行 3' 和 5' 末端扩增。RACE 扩增体系为 50 μL,内含 ddH₂O 34.5 μL,10×LA buffer 5.0 μL,dNTP Mix (10 mmol/L) 1.0 μL,UPM 5.0 μL,HSP90-5R/3F 1.0 μL,3' (5') RACE cDNA 模板 2.5 μL,LA *Taq* 1.0 μL。反应程序为 94 ℃ 30 s,68 ℃ 30 s,72 ℃ 3 min,35 个循环。扩增产物经 1% Agarose M 电泳检测后进行割胶回收(康宁生命科学(吴江)有限公司),按照说明书方法进行纯化,把回收到的产物与 PGEMT-easy 载体(普洛麦格(北京)生物技术有限公司)进行连接,转入到 DH5α 感受态细胞(生工生物工程(上海)股份有限公司)中培养(过夜),挑选条带大小符合预期的菌液送交上海生工生物工程有限公司测序,拼接获得 *ScHSP90* 基因的 cDNA 全长。

表 2 本研究所用引物序列

Table 2 Sequences of primers used in the study

引物名称	序列(5'-3')	用途
Primer name	Sequence (5'-3')	Amplification Target
ScHSP90-1-F	GCTATATACGCTGCTGACATTAAGA	基因验证
		Genetic verification
ScHSP90-1-R	TCACAGTTGTCCATGATAAACACTC	基因验证
		Genetic verification
ScHSP90-2-F	AACAAAGCCCCTGTGGAC	基因验证
		Genetic verification
ScHSP90-2-R	CAGCAATCATCCATCGTG	基因验证
		Genetic verification
ScHSP90-5'-1	GGGTTACGGGTCCACAGGGGC	5' 端扩增
		5'-RACE
ScHSP90-5'-2	TGTGTTGTATTACGGTCTGGGACG	5' 端扩增
		5'-RACE
ScHSP90-3'-1	TCTTGGAAGCATCTCATTAGC	3' 端扩增
		3'-RACE
ScHSP90-3'-2	AGGACCCAGCCACGCACA	3' 端扩增
		3'-RACE
ScHSP90-Q-F	AGCTGAGTACCTGGAGGAGA	实时荧光定量
		RT-PCR
ScHSP90-Q-R	CCTCTACCTGGGCTTGTC	实时荧光定量
		RT-PCR
18s-F	TCGGTCTATTGCGTTGGTTTT	内参
		Internal reference
18s-R	CAGTTGGCATCGTTTATGGTCA	内参
		Internal reference

3.4 生物信息学分析

用 DNASTar 软件包中的 SeqMan 软件对 *ScHSP90* 基因进行序列拼接。通过 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 在线查找 *ScHSP90* 的开放阅读框。使用 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 在线分析 *ScHSP90* 和同源物种的亲缘关系。通过 ProtParam (<https://web.expasy.org/prot-param/>) 在线预测物理参数。使用 Mega 7.0 软件构建系统进化树。使用 SPSS 5.0 软件和 Sigma Plot 12.0 (Canada Company) 软件对分析数据。

3.5 实时荧光定量 PCR

根据 *ScHSP90* 基因序列设计 RT-qPCR 引物为 *ScHSP90*-Q-F 和 *ScHSP90*-Q-R (表 2)。以 *18S rRNA* 为内参, RT-qPCR 使用 SYBR premix Ex Taq™ 试剂盒 (TaKaRa 公司) 在 CFX96 荧光定量 PCR 仪 (伯乐生命医学产品(上海)有限公司) 进行荧光定量检测。反应体系 (20 μ L) 为 2 $\times$ SYBR Green Master (Roche 公司) 10 μ L, 引物各 0.8 μ L, cDNA 模板 1.6 μ L, ddH₂O 6.8 μ L。反应程序 95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 39 个循环, 随后进行溶解曲线检测。通过 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 方法对实验所得数据分析基因的相对表达量, 并通过 Sigmaplt 软件作图并分析显著性 ($P < 0.05$)。

作者贡献

牛东红是本研究的实验设计者和实验研究的执行人, 完成数据分析, 论文初稿的写作; 牛东红、叶博和李燕参与实验设计和试验结果分析; 李家乐是项目的构思者及负责人, 指导实验设计、数据分析、论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项 (2019YFD090040) 和国家自然科学基金项目 (31472278) 共同资助。

参考文献

- Carregosa V., Figueira E., Gil A.M., Pereira S., Pinto J., Soares A.M.V.M., and Freitas R., 2014, Tolerance of *Venerupis philippinarum* to salinity: osmotic and metabolic aspects, *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 171 (3): 36-43.
- Chen C., 2011, Characterization and mRNA expression of the heat shock protein 90 gene in the oyster (*Crassostrea hong-*

- kongensis*) stressed by physical and chemical substances and challenged by a bacterial pathogen species, Thesis for M.S., Jinan University, Supervisor: Chang Q.Z., pp.15-59. (陈晨, 2011, 近江牡蛎 *HSP90* 基因及其对理化胁迫和病原菌感染的反应, 硕士学位论文, 暨南大学, 导师: 张其中, pp. 15-59.)
- Cheng P.Z., Liu X., Zhang G.F., and He J.G., 2007, Cloning and expression analysis of a *HSP70* gene from Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*), *Fish Shellfish Immunol.*, 22(1-2): 77-87.
- Deane E.E., Kelly S.P., Luk J.C.Y., and Woo N.Y.S., 2002, Chronic salinity adaptation modulates hepatic heat shock protein and insulin-like growth factor I expression in black sea bream, *Marine Biotechnol.*, 4(2): 193-205.
- Diehl W.J., 1986, Osmoregulation in echinoderms, *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.*, 84(2): 199-205.
- Du Y.C., Xie S.M., He S.Y., Niu D.H., and Li J.L., 2018, Dopamine receptor genes of *Sinonovacula constricta* and its functions in damage healing of tissue, *Redai Haiyang Xuebao (Journal of Tropical Oceanography)*, 37(3): 45-54. (杜蕴超, 谢淑媚, 何圣耀, 牛东红, 李家乐, 2018, 缢蛏多巴胺受体基因及其在损伤修复中的作用, *热带海洋学报*, 37(3): 45-54.)
- Feder M.E., and Hofmann G.E., 1999, Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology, *Annu. Rev. Physiol.*, 61(1): 243-282.
- Gagnaire B., Frouin H., Moreau K., Thomas-Guyon H., and Renault T., 2006, Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), *Fish Shellfish Immunol.*, 20(4): 536-547.
- Gao Q., Song L.S., Ni D.J., Wu L.T., Zhang H., and Chang Y.Q., 2007, cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 90 gene in the haemocytes of Zhikong scallop *Chlamys farreri*, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 147(4): 704-715.
- Gao Q., Zhao J.M., Song L.S., Qiu L.M., Yu Y.D., Zhang H., and Ni D.J., 2008, Molecular cloning, characterization and expression of heat shock protein 90 gene in the haemocytes of bay scallop *Argopecten irradians*, *Fish Shellfish Immunol.*, 24(4): 379-385.
- Han J.Y., Li J., Li J.T., Chen J.T., and Li H., 2011, High level prokaryotic expression and identification of heat shock protein 90 in *Exopalaemon carinicauda*, *Yuye Kexue Jinzhan (Marine Fisheries Research)*, 32(5): 44-50. (韩俊英, 李健, 李吉涛, 陈吉涛, 李华, 2011, 脊尾白虾热休克蛋白 HSP90 基因的原核表达与鉴定, *渔业科学进展*, 32(5): 44-50.)
- Hartl F.U., 1996, Molecular chaperones in cellular protein folding, *Nature*, 381(6583): 571-579.
- Iwama G.K., Thomas P.T., Forsyth R.B., and Vijayan M.M., 1998, Heat shock protein expression in fish, *Rev. Fish Biol. Fish-*

- er., 8(1): 35-56.
- Jackson S.E., Queitsch C., and Toft D., 2004, Hsp90: from structure to phenotype, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11(12): 1152-1155.
- Krishna P., and Gloor G., 2001, The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*, *Cell Stress Chaperones*, 6(3): 238-246.
- Li F.G., Luan W., Zhang C.S., Zhang J.Q., Wang B., Xie Y.S., Li S.H., and Xiang J.H., 2009, Cloning of cytoplasmic heat shock protein 90 (*FcHSP90*) from *Fenneropenaeus chinensis* and its expression response to heat shock and hypoxia, *Cell Stress Chaperones*, 14(2):161-172.
- Lin B.S., and Wu T.M., 1990, Temperature and salinity in relating to the survival, growth and development of the larvae and spat of *Sinonovacula constricta*, *Shuichan Xuebao* (Journal of Fisheries of China), 14(3): 171-178. (林笔水, 吴天明, 1990 温度与盐度和缢蛏幼体生存、生长及发育的关系, 水产学报, 14(3): 171-178.)
- Lindquist S., and Craig E.A., 1988, The heat-shock proteins, *Ann. Rev. Genet.*, 22(3): 631-677.
- Morimoto R.I., and Santoro M.G., 1998, Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection, *Nat. Biotechnol.*, 16(9): 833-838.
- Pan F., Zarate J.M., Tremblay G.C., and Bradley T.M., 2000, Cloning and characterization of salmon *HSP90* cDNA: upregulation by thermal and hyperosmotic stress, *J. Exp. Zool.*, 287(3): 199-212.
- Pantartz C.N., Kourtidis A., Drosopoulou E., Yiangou M., and Scouras Z.G., 2009, Isolation and characterization of two cytoplasmic *hsp90s* from *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca: Bivalvia) that contain a complex promoter with a p53 binding site, *Gene*, 431(1-2): 47-54.
- Pearl L.H., and Prodromou C., 2006, Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery, *Annu. Rev. Biochem.*, 75(75): 271-294.
- Ranford J.C., and Henderson B., 2002, Chaperonins in disease: mechanisms, models, and treatments, *Mol. Pathol.*, 55(4): 209-213.
- Rungrassamee W., Leelatanawit R., Jiravanichpaisal P., Kinbunga S., and Karoonuthaisiri N., 2010, Expression and distribution of three heat shock protein genes under heat shock stress and under exposure to *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon*, *Dev. Comp. Immunol.*, 34(10): 1082-1089.
- Shen A.L., Jiang K.J., and Shen X.Q., 2014, Effects of salinity on the mRNA expression of *Na⁺/K⁺-ATPase* and *HSP* in the ridgetail white prawn, *Exopalaemon carinicauda*, *Haiyang Huanjing Kexue* (Marine Environmental Science), 33(5): 693-698. (沈盎绿, 蒋科技, 沈新强, 2014, 盐度对脊尾白虾蚤状幼体 *Na⁺/K⁺-ATPase* 和 *HSP* 基因表达的影响, 海洋环境科学, 33(5): 693-698.)
- Sun M., Jiang K., Zhang F., Zhang D., Shen A., Jiang M., Shen X., and Ma L., 2012, Effects of various salinities on *Na⁺-K⁺-ATPase*, *Hsp70* and *Hsp90* expression profiles in juvenile mitten crabs, *Eriocheir sinensis*, *Genet. Mol. Res.*, 11(2): 978-986.
- Sun T.T., Su Y.Q., Hong J.N., Wu Y., Zhang M., and Mao Y., 2012, Molecular cloning and feature analysis of heat shock protein 90 (*HSP90*) from *Octopus vulgaris*, *Shuichan Xuebao* (Journal of Fisheries of China), 36(9): 1367-1375. (孙田田, 苏永全, 洪婧妮, 邹阳, 张曼, 毛勇, 2012, 真蛸热休克蛋白 90 基因 (*HSP90*) 的克隆及表达, 水产学报, 36(9): 1367-1375.)
- Tang B.J., Zou X., and Yin F., 2017, Effects of acute hyperosmotic stress on metabolic rates and immune-related enzymatic activities in clam (*Trachycardium flavum*), *Yue Kexue Jinzhan* (Progress in Fishery Sciences), 38(2): 143-150. (唐保军, 邹雄, 尹飞, 2017, 高盐胁迫对黄边糙鸟蛤 (*Trachycardium flavum*) 呼吸排泄和免疫酶活性的影响, 渔业科学进展, 38(2): 143-150.)
- Werner I., 2004, The influence of salinity on the heat-shock protein response of *Potamocorbula amurensis* (Bivalvia), *Mar. Environ. Res.*, 58(2-5): 803-807.
- Xia X.C., Yang H., Wang W.F., Li X., and Ning Q.J., 2012, Molecular cloning and expression of heat protein 90 (*HSP90*) gene in pacific white leg Shrimp *Litopenaeus vannamei*, *Shuichan Kexue* (Fisheries Science), 31(11): 673-678. (夏西超, 杨洪, 王文锋, 李昕, 宁黔冀, 2012, 凡纳滨对虾热休克蛋白 90 基因 cDNA 全长克隆及表达分析, 水产科学, 31(11): 673-678.)
- Yancey P.H., Clark M.E., Hand S.C., Bowlus R.D., and Somero G.N., 1982, Living with water stress: evolution of osmolyte systems, *Science*, 217(4566): 1214-1222.
- Yu S.S., Wang Q.L., Meng X.L., Dong Y.W., and Dong S.L., 2012, Effect of salinity fluctuation on the expression of *hsp70* and *hsp90s* genes in sea cucumber, *Apostichopus japonicus* selenka, *Zhongguo Haiyang Daxue Xuebao* (Periodical of Ocean University of China), 42(9): 22-27. (于姗姗, 王青林, 孟宪亮, 董云伟, 董双林, 2012, 盐度骤变对仿刺参 *hsp70* 及 *hsp90* 基因表达的影响, 中国海洋大学学报, 42(9): 22-27.)
- Yue X., Liu B.Z., Sun L., and Tang B.J., 2011, Cloning and characterization of a *hsp70* gene from Asiatic hard clam *Meretrix meretrix* which is involved in the immune response against bacterial infection, *Fish Shellfish Immunol.*, 30(3): 791-799.
- Zhang W.B., Wu C.L., Mai K.S., Chen Q.Y., and Xu W., 2011, Molecular cloning, characterization and expression analysis of heat shock protein 90 from pacific abalone, *Haliotis discus hannai* Ino in response to dietary selenium, *Fish Shellfish Immunol.*, 30(1): 280-286.

(责任编辑 蹇慧)