

文章编号: 1004-7271(2007)04-0310-07

## 南方鲇 *Hsc70* cDNA 的克隆及序列分析

单红<sup>1,2</sup>, 周国勤<sup>1</sup>, 张其中<sup>2,3</sup>

1. 南京市水产科学研究所, 江苏 南京 210036;
2. 西南大学生命科学学院, 重庆 400715;
3. 暨南大学水生生物研究所, 广东 广州 510632)

**摘要:**采用 RT-PCR 法和 SMART RACE (rapid amplification of cDNA ends) 技术从南方鲇肝脏 RNA 克隆获得 *Hsc70* 基因的全长 cDNA (*scHsc70* cDNA)。此 cDNA 全长 2384 bp, 其中, 5' 非编码区 194 bp, 3' 非编码区 249 bp, 编码区域 (coding sequence, CDS) 长度为 1941 bp。根据编码序列推导出相应的 646 个氨基酸, 与其他脊椎动物 *Hsc70* 序列进行同源性比较, 发现南方鲇 *Hsc70* 与欧洲银鲫 (*Carassius auratus gibelio*)、鲮鱼 (*Pimephales promelas*)、人 (*Homo sapien*) 和鸡 (*Gallus gallus*) 的 *Hsc70* 相似性分别为 96.0%、95.5%、94.9% 和 93.8%, 表现出较高的保守性。序列分析发现 *scHsc70* cDNA 编码的氨基酸序列中含有 2 个 HSP70 家族的特征模体并具有 Dnak 特征性基序 (DLGTT-S-V)。南方鲇 *Hsc70* 基因的克隆为进一步深入研究南方鲇抗逆机理以及指导南方鲇的遗传选育和遗传改良都具有重要的理论意义。

**关键词:** 南方鲇; *Hsc70*; 序列对比; 基因结构

中图分类号: S 917 文献标识码: A

## Cloning and sequence analysis of heat shock cognate 70 (*Hsc70*) from *Silurus meridionalis* Chen

SHAN Hong<sup>1,2</sup>, ZHOU Guo-qin<sup>1</sup>, ZHANG Qi-zhong<sup>2,3</sup>

1. Nanjing Fishery Science Institute, Nanjing 210036, China;
2. College of Life Science, Southwest China University, Chongqing 400715, China;
3. Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** The full length cDNA that encodes *Silurus meridionalis* Chen heat shock cognate 70 (*Hsc70*) was cloned from liver RNA with RT-PCR and SMART RACE (Rapid amplification of cDNA ends). The length cDNA (*scHsc70* cDNA) of 2384 basepairs (bp) contained 5' untranslated region of 194 bp, 3' untranslated region of 249 bp and an open reading frame of 1941 bp. When the deduced 646 amino acids sequence of *scHsc70* was compared with those from other vertebrates *Hsc70* genes, the results showed 96.0%, 95.5%, 94.9% and 93.8% similarity with *Hsc70* from *Carassius auratus gibelio*, *Pimephales promelas*, *Homo sapien* and *Gallus gallus*, respectively. Sequence analysis also showed that *scHsc70* cDNA contained two signature sequences belonging to HSP70 family and one feature sequence (DLGTT-S-V) belonging to Dnak subfamily. Molecular cloning of *scHsc70* cDNA could be used in the study of the anti-stress mechanism in southern catfish and the genetic breeding or improvement.

收稿日期: 2006-09-04

基金项目: 重庆市重大科技攻关项目 (CSTC, 2005 AB1009)

作者简介: 单红 (1980-), 女, 江苏南京人, 硕士, 研究方向为水生生物疾病及分子免疫学。E-mail: jiangxue0011@sina.com

**Key words:** *Silurus meridionalis* Chen; *Hsc70*; alignment; gene structure

细胞在受热或其他不良因素刺激下,发生应激反应,诱导产生热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs),根据其同源性及分子量大小可分为3个主要家族:*Hsp90*(85~90 ku)、*Hsp70*(68~73 ku)和小分子量热休克蛋白<sup>[1]</sup>。其中,*Hsc70*(70 ku heat shock cognate)蛋白是70 ku热休克蛋白家族的重要成员之一,在正常情况下就有表达,在环境胁迫因子(如高温、重金属和微生物感染等)的刺激下,其表达量显著增加<sup>[2]</sup>。*Hsc70*蛋白作为分子伴侣在蛋白质拆叠形成正确空间构象以及在变性蛋白质复性和清除细胞内永久变性蛋白中起着十分重要的作用,在蛋白质运输和抗感染中也发挥了关键作用<sup>[2-4]</sup>。因此,它是生物体抗逆和抗感染的重要分子。本实验以广泛分布于我国长江流域的重要经济鱼类南方鲇(*Silurus meridionalis* Chen)为实验对象,研究该鱼与抗逆、抗病密切相关的*Hsc70*蛋白基因,无疑对研究和控制南方鲇的应激发病以及养殖业的健康发展具有科学意义。本文首次报道了南方鲇*Hsc70*蛋白基因的cDNA全长序列。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物、PCR引物和酶

以南方鲇(*S. meridionalis*)作为实验动物。所有的南方鲇均为本实验室购买的寸片南方鲇小塘饲养而得。实验所用PCR引物由上海Sangon公司合成;所用酶除特别注明外均由TaKaRa生产。

### 1.2 南方鲇*Hsc70* cDNA中间片段序列的获得

#### 1.2.1 总RNA提取

按TRizol产品说明书提取肝脏总RNA。电泳分析RNA质量,核酸蛋白定量仪测定浓度和纯度,保证 $OD_{260}/OD_{280} = 1.8 \sim 2.0$ 。

#### 1.2.2 基因PCR扩增

以总RNA为模板,Oligo(dT)为引物,按照Superscript II逆转录酶(Invitrogen公司)操作说明合成第一链cDNA后,以此为模板进行PCR扩增,两端引物分别为简并引物F1和R1(序列见表1)。扩增条件为:94℃变性1 min,53℃退火1 min,72℃延伸1 min,共进行30个循环,预计获得的片段大小约为980 bp。

### 1.3 南方鲇*Hsc70* cDNA 3'端和5'端序列的扩增

根据已得到的中间片段核苷酸序列,结合Primer Premier 5.0和Oligo 6.0等软件设计基因特异性引物RACE F1,RACE F2,RACE F3和RACE R1,RACE R2,RACE R3(引物序列见表1),按照SMART RACE READY cDNA kit(TaKaRa公司)操作说明扩增获得3'末端和5'末端序列。扩增条件如下:94℃预变性3 min;94℃变性30 s,68℃延伸3 min,循环30圈;最后72℃延伸10 min。

### 1.4 目的片段的克隆及序列测定

将目的片段回收纯化并与pMD-18T载体(TaKaRa公司)相连,转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞,PCR及EcoR I和Hind III双酶切鉴定,筛选阳性重组子,送上海Sangon公司测序(ABI PRISMTM 377全自动荧光测序仪)。

### 1.5 全序列分析

将中间片段、3'和5'RACE片段序列信息进行拼接,设计用于扩增全长*Hsc70* cDNA的引物5'UTR和3'UTR(序列见表1)。用合成的第一链cDNA作为模板扩增全长cDNA,测序后校正3'和5'末端序列,最终得到南方鲇*Hsc70*全长cDNA(sc*Hsc70*cDNA)。采用DNAsis软件进行最大开放阅读框翻译出相应氨基酸序列;用Dnastar及GeneDoc软件进行核苷酸序列和氨基酸序列分析,用Blast X程序对氨基酸序列在Internet上进行同源检索,用ExpASY Molecular Biology Server上的ProtParam对蛋白质基本物

理化学参数进行分析。

表 1 本研究所用引物名称及序列  
Tab. 1 Primer names and sequences used in this study

引物名称	引物序列
F1	5'-(GC)(GC)AGGT(GT)GAATACAAAGG-3'
R1	5'-T(GA)GT(GA)AA(AG)GTCTGGGT(CT)T-3'
gf- $\beta$ -actin-FW	5'-GACGAGGCCAGAGCAAGAGAGG-3'
gf- $\beta$ -actin-RV	5'-CTGCTTGCTGATCCACATCTGCT-3'
CDS III	5'-ATTCTAGAGCCGAGGCGCCGACATG-d(T)30N-1N-3' (N = A, G, C, or T; N-1 = A, G, or C)
SMART IV	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGACTGCCATTACGCCGGG-3'
L1	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
UP	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
NUP	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
RACE F1	5'-CCGTACACTGTCCTCTAGCACTCAGG-3'
RACE F2	5'-TTCGTGATGCTAAGCTGGACAAGTCCC-3'
RACE F3	5'-TGAGACCGCCGGAGGAGTGATGACTG-3'
RACE R1	5'-CGAGCCCTGGTATGGAGGTGTAGAAG-3'
RACE R2	5'-CACGGCCCTCTTGTGTCGATGATGT-3'
RACE R3	5'-CCGCCGAGATCGAAGATGAGGACGT-3'
5'UTR	5'-ATAGGGTAATCACTGGTATCAACG-3'
3'UTR	5'-CGTTGTGAATAGAAATTTGAAGATC-3'

## 1.6 进化树的构建和分析

进化树以斑马鱼 *Hsp90* 基因作为外类群,由 Clustal 软件采用邻接法绘制,读树软件为 NJPLOT,编辑进化树采用 Acrobat Distiller 和 Illustrator 7.0 软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 南方鲇 *Hsc70* 完整 cDNA 的克隆和序列分析

为了克隆南方鲇 *Hsc70*cDNA,依据已知其他动物 *Hsc70* 氨基酸序列保守区,设计出简并引物 F1 和 R1。以肝脏 cDNA 为模板,经 30 个热循环扩增出一条约 1.0 kb DNA 主带(图 1-a),与预期片段大小一致。将此 PCR 片段纯化后克隆、测序,确认其大小为 980 bp;经 Blast 查询,证实此克隆片段为热休克蛋白 70cDNA 部分同源分子。

为进一步克隆出 *scHsc70* cDNA3'端序列,设计基因特异引物 RACE F1, RACE F2 和 RACE F3,以第一链 cDNA 为模板,按照 SMART RACE READY cDNA kit 说明书与通用引物 CDS III 进行半巢式 PCR,扩增出约 0.9 kbDNA 片段(图 1-b),经克隆和 DNA 序列分析,确认此克隆片段为 *scHsc70* cDNA3'端序列,其大小为 902 bp。

最后,用基因特异引物 RACE R1, RACE R2 和 RACE R3,以第一链 cDNA 为模板,按照 SMART RACE READY cDNA kit 说明书与通用引物 UP 和 NUP 进行巢式 PCR,扩增出 502 bp 片段(图 1-c),经克隆和 DNA 序列分析,证实此克隆片段为南方鲇 *Hsc70* cDNA5'端。

通过三次扩增与克隆,并由 End to End PCR 扩增出全长 cDNA(图 1-d),进一步验证 RACE 的结果,从而成功获得 *scHsc70* 全长 cDNA(图 2)。获得的 *scHsc70* cDNA 全长为 2384 bp,5'非编码区 194 个核苷酸,3'非编码区 249 个核苷酸,编码区域(CDS)长度为 1941 个核苷酸,可以编码 646 个氨基酸,其分子量计算值为 70.9 ku,理论等电点为 5.37,负电荷残基(Asp + Glu)总数 95 个,正电荷残基(Arg + Lys)总数 82 个。在 poly(A)上游 8 个核苷酸处有一真核细胞保守性序列 AATAAA,此序列为进行 mRNA 前体 3'端剪切和加多聚腺苷酸信号位点<sup>[5-7]</sup>。使用蛋白质分析软件 antheprot 分析氨基酸序列中的特征

序列,找到了 2 个 Hsp70 家族的签名序列(Signature Sequence)、Dnak 特征基序 DLGTT-S-V(第 9-18 个氨基酸残基)以及胞质 Hsp70 特征基序 EEVD(第 643-646 个氨基酸残基)和靠近 C 端的 GGMP4 肽简并重复序列(第 615-622 个氨基酸残基),图 2 中的 IFDLGGGTFDVSIL ([LIVMF]-[LIVMFY]-[DN]-[LIVMFS]-G-[GSH]-[GS]-[AST]-x(3)-[ST]-[LIVM]-[LIVMFC])和 IVLVGGSTRIPKIQK ([LIVMY]-x-[LIVMF]-x-G-G-x-[ST]-x-[LIVM]-P-x-[LIVM]-x-[DEQKRSTA])即为所找到的 2 个签名序列,括号中为相应的模体(motif)序列。整个分子的保守性 N 端最高,到 C 端保守性降低。根据这些 HSP70 家族所特有的特征氨基酸序列,确定所获得序列符合 HSP70 的特征,是南方鲇热休克蛋白 70 家族成员。

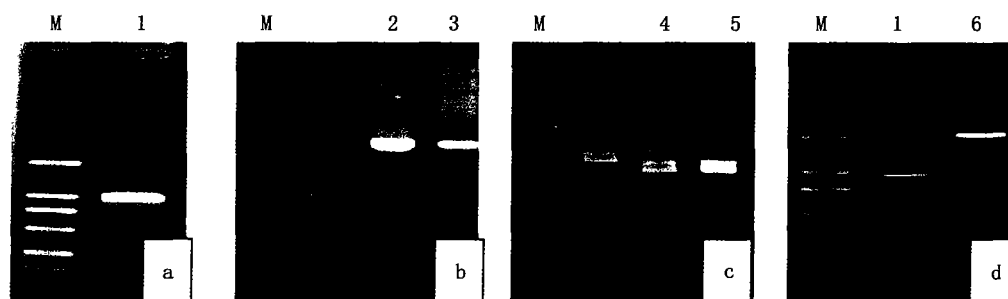


图 1 南方鲇 *Hsc70* 蛋白基因 cDNA 扩增电泳图谱

Fig. 1 Amplification of cDNA of 70 ku heat shock cognated protein (*Hsc70*) gene in *S. meridionalis*

M. DL2000 分子标准; a. *Hsc70* cDNA 中间片段扩增结果; b. 3'端巢式 PCR; c. 5'端巢式 PCR;  
d. *Hsc70* 全长扩增结果; 1. 中间片段; 2~5. RACE 获得的目标片段; 6. *Hsc70* 全长

## 2.2 不同动物 *Hsc70* 蛋白质序列的比较

所得序列经 Blast 分析,与其他物种 *Hsc70* 的氨基酸序列用 Dnastar 和 Clustal 进行多序列比对(表 2),发现南方鲇 *Hsc70* 与欧洲银鲫(*Carassius auratus gibelio*, AA043731) *Hsc70* 相似性最高,为 96.0%,其次为鲮鱼(*Pimephales promelas*, AAS46619),95.5%,即使和人(*Homo sapien*),牛(*Bos taurus*),鸡(*Gallus gallus*)的 *Hsc70* 相似性也非常高,分别达到了 94.9%,94.1%和 93.8%(表 2)。不同物种的 *Hsc70* 在 N 端不是很保守,而 C 端的保守性很强,所有的签名序列位点都是高保守的,甚至是等同的。以斑马鱼 *Hsp90* 基因为外类群,对各种脊椎动物 *Hsp70* 同源蛋白氨基酸序列进行 N-J 聚类分析,得到了种系发生树(图 3),可以看出,本实验获得的南方鲇序列与其他 14 种脊椎动物的 *Hsc70* 序列聚在一起,而虹鳟、日本青鳉、罗非鱼、金鱼的 *Hsp70* 序列聚为另一支,这不仅反应了各物种进化关系的远近,也进一步确认了所克隆的序列确为南方鲇组成型 70 ku 热休克蛋白(*Hsc70*)基因。

表 2 依据氨基酸序列采用 clustal V 方法计算的各种动物 *Hsc70* 同源性

Tab. 2 Amino acid sequence identity of *Hsc70*, using clustal V method( percent identity) %

相似性	非洲爪蟾	牙鲮	牛	沟鲇	鸡	鲤	鲮鱼	金鱼	家鼠	人	日本青鳉	虹鳟	欧洲银鲫	斑马鱼
南方鲇	94.9	94.4	94.1	92.3	93.8	94.4	95.5	94.0	94.9	94.9	89.0	94.4	96.0	94.7

注:1. 非洲爪蟾(*Xenopus laevis*); 2. 牙鲮(*Paralichthys olivaceus*); 3. 牛(*Bos taurus*); 4. 沟鲇(*Ictalurus punctatus*); 5. 鸡(*Gallus gallus*); 6. 鲤(*Cyprinus carpio*); 7. 鲮鱼(*Pimephales promelas*); 8. 金鱼(*Carassius auratus*); 9. 家鼠(*Mus musculus*); 10. 人(*Homo sapiens*); 11. 日本青鳉(*Oryzias latipes*); 12. 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*); 13. 欧洲银鲫(*Carassius auratus gibelio*); 14. 斑马鱼(*Danio rerio*); 15. 南方鲇(*Silurus meridionalis*)

1			CC CCC CGA GAT CCG	14	
15	AAG AAG AGG AGG TCT AAT AAG ACT CCC CAT AGG GTA ATC AGT GGT ATC AAC GCA GAG TGG			74	5'UTR
75	CCA TTA CGG CCG GGG GTG GTA CTG TGG TCG AGG ACA TTG CTA GTG ACA CGA GTC AAC ATG			134	
135	CCA TGA GAA AGC AGC AGA AAA GGG GGA GTT TTA TAA AAG AGT AAT CAG GCA GCG AAA AGC			154	
195	ATG TCG AAG GGA CCA GCA GTT GGA ATT GAC CTC GGC ACC ACA TAC TCG TGT GTG GGC GTC			254	
(1)	M S K Q P A V G I D L G T T Y S C V Q V			(20)	
255	TTT CAG CAT GGC AAA GTG GAA ATC ATT GCC AAC GAC CAG GGT AAT CGG ACC ACA CCC AGT			314	
(21)	F Q H G K V E I I A N D Q G N R T T P S			(40)	
315	TAT GTT GCC TTC ACC GAC ACT GAG AGA CTG ATT GGG GAT GCT GCC AAA AAT CAG GTC GGT			374	
(41)	Y V A F T D T E R L I G D A A K N Q V A			(60)	
375	ATG AAT CCC ACC AAC ACA GTG TTC GAT GCG AAA AGG CTG ATT GGA CGG AGA TTT GAC GAT			434	
(61)	M N P T N T V F D A K R L I G R R F D D			(80)	
435	ACA GTT GTT CAG TCG GAC ATG AAG CAC TGG CCG TTC CAA GTA ATC AAT GAT TCC ACA CGG			494	
(81)	T V V Q S D M K H W P F Q V I N D S T R			(100)	
495	CCT AAA GTC CAG GIS GAA TAC AAA GGA GAG ACC AAA ACC TTT TAT CCA GAG GAG ATC TCC			554	FI
(101)	P K V Q V E Y K G E T K T F Y P E E I S			(120)	
555	TCA ATG GTG CTT GTA AAG ATG AAA GAA ATT GCT GAA GCA TAC CTT GGA AAG ACC ATA ACG			614	
(121)	S M V L V K M K E I A E A Y L G K T I T			(140)	
615	AAT GCA GTG GTT ACA GTA CCI GCA TAT TTT AAT GAC TCT CAG CCG CAA GCT ACT AAA GAT			674	
(141)	N A V V T V P A Y F N D S Q R Q A T K D			(160)	
675	GCA GGG ACC ATT TCC GGG CTA AAT GTA CTT CCG ATC ATC AAT GAA CCA ACT GCA GCT GCT			734	
(161)	A G T I S G L N V L R I I N E P T A A A			(180)	
735	ATT GCT TAT GGT CTG GAC AAG AAA GTG GGC GCC GAA GCA AAG GTC CTC ATC TTC GAT CTC			794	RACE R3
(181)	I A Y G L D K K V G A E R N V L I F D L			(200)	
795	GGC GGG GGA ACT TTC GAC GTG TCC ATC CTC ACT ATC GAA GAC GGA ATC TTC GAA GTG AAG			854	
(201)	G G G T F D V S I L T I E D G I F E V K			(220)	
855	TCC ACA GCT GGG GAC ACC CAT CTG GGC GGC GAG GAT TTC GAC AAC CGC ATG GTC AAT CAC			914	
(221)	S T A G D T H L G G E D F D N R M V N H			(240)	
915	TTC ATC ACC GAT TTT AAG CCG AAG CAC AAG AAG GAC ATC ATC GAC AAC AAG AGG GCC GTG			974	RACE R2
(241)	F I T E F K R K H K K D I E D N K R A V			(260)	
975	CGA GGT CTG GCG ACC GCC TGC GAG GGA GCC AAG CGT ACA CIG TCC TCT AGC ACT CAG GCC			1034	RACE F1
(261)	R R L R T A C E R A K R T L S S S T G A			(280)	
1035	AGC ATC GAG ATC GAC TCT CTC TAC GAG GGC ATT GAG TTC TAC ACC TCC ATC ACC AGG GGT			1094	RACE R1
(281)	S I E I D S L Y E G I D F Y T S I T R A			(300)	
1095	GCT TTC GAA GAG CTG AAT GCC GAC CIG TTC CGT GGC ACC TTG GAC CCC GTT GAG AAA CGG			1154	
(301)	R F E E L N A D L F R G T L D P V E K A			(320)	
1155	CCT GGT GAT GCT AAG CTG GAC AAG TCC CAA GTC CAC GAG ATT GTC CTG GTC GGC GGT TCT			1214	RACE F2
(321)	L R D A K L D K S Q V H E I V L V G Q S			(340)	
1215	ACC CGA ATC CCA AAG ATT CAG AAG CTT CTG CAG GAT TTC TTT AAT GGA AAA GAA CTC AAC			1274	
(341)	T R I P K I Q K L L Q D F F N G K E L N			(360)	
1275	AAG ACC ATT AAT CCT GAT GAG GCT GTC GCG TAT GGT GCA GCT GTC CAG GCA GCC ATT TTG			1334	
(361)	K S I N P D E A V A Y G A A V Q A A I L			(380)	
1335	TCA GGA GAC AAG TCA GAA AAT GTT CAG GAC CTG CTG TTA TTG GAC GTC ACT CCT CTG TCA			1394	
(381)	S G D K S E N V Q D L L L L D V T P L S			(400)	
1395	CTG GGT ATT GAG ACC GCC GGA GGA GTG ATG ACT GTC CTG ATT AAA CCG AAC ACC ACT ATC			1454	RACE F3
(401)	L G I E T A G G V M T V L I K R N T T I			(420)	
1455	CCG ACT AAG CAA ACC CAG ACC TTT ACC ACT TAT TCA GAC AAT CAA CCT GGT GTG CTC ATT			1514	RI
(421)	P T K Q T F T F T T Y S D N Q P G V L I			(440)	
1515	CAG GTG TAT GAG GGT GAA AGA GCC ATG ACT AAG GAC AAC AAT CCG CTT GGA AAG TTT GAG			1574	
(441)	Q V Y E G E R A M T K D N N L L G K F E			(460)	
1575	TTG ACA GGA ATT CCT CCT GCA CCA CGA GGT GTT CCT CAG ATC GAG GTA ACC TTT GAC ATC			1634	
(461)	L T G I P P A P R G V P Q I E V T F D I			(480)	
1635	GAC GGC AAT GGT ATC ATG AAC GTT TCC GCA GTG GAC AAG AGC ACG GGC AAG GAG AAC AAG			1694	
(481)	D A N G I M N V S A V D K S T G K E N K			(500)	
1695	ATC ACC ATT ACC AAT GAC AAA GGT CGT CTA AGC AAG GAG GAC ATT GAG CGA ATG GTC CAG			1754	
(501)	I T I T N D K G R L S K E D I E R H V Q			(520)	
1755	GAA GCG GAT AAA TAC AAA GCT GAG GAT GAC CTT CAG CGA GAC AAA GTA TCC GCA AAG AAT			1814	
(521)	E A D K Y K A E D D L Q R D K V S A K N			(540)	
1815	GGC CTT GAG TCT TAC GCT TTC AAC ATG AAG TCC ACT GTC GAG GAT GAG AAA CTG AAA GGS			1874	
(541)	G L E S Y A F N M K S T V E D E K L K G			(560)	
1875	AAG ATC AGC GAC GAG GAC AAA CAG AAG ATT CTG GAT AAG TGC AAT GAG GTT ATC AGC TGG			1934	
(561)	K I S D E D K Q K I L D K C N E V I S W			(580)	
1935	CTG GAC AAG AAC CAG ACT GCT GAG AAA GAA GAG TTT GAG CAT CAG CAG AAG GAG CTG GAG			1994	
(581)	L D K N Q T A E K E E F E H Q Q K E L E			(600)	
1995	AAG GTG TCC AAC CCC ATC ATC ACC AAG CTG TAC CAG GGT GCG GGT GGC ATG CCA GGC GGG			2054	
(601)	K V C N P I I T K L Y Q G A G G M P G G			(620)	
2055	ATG CCT GGG GGA TTC CCT GGG GGC GGT GCT GCA CCT GGA GGT GGA TCT TCT GGA CCA			2114	
(621)	M P G G F P G G A G A A P G G G S S G P			(640)	
2115	ACT ATT GAG GAA GTT GAT TAA AAT GTT CCA AAA TGA TCT TCA AAT TTC TAT TCA CAA CCG			2174	3'UTR
(641)	T I E E V D *			(646)	
2175	AAT TTA TTT TTS GTG GCA TGT TTC TAA ACA CAC TTA ACA CCA TGT ATT TGA GGT GTT TTT			2234	
2235	TTT TTT TTT TTT TGT GAA AAA AAA ACA CCC GGT CTT TTT CTC AAG AAA AGA GTG TTT ATA			2294	
2295	TCT TCA CAA AAA AAA CGT TGT GTT GTC GGA GAA AAA AAA AAA AAA AAA AAT ATG TGG CSC			2354	
2355	GCG CGC TCC CCC CTA TAA TAA AAA AAA			2394	

图2 南方鲈 *Hsc70* cDNA 和氨基酸全序列。Fig. 2 Full length cDNA and amino-acid sequence of scHsc70 in *S. meridionalis*.

图中红色核苷酸表示起始密码子和终止密码子;引物位置用蓝色下划线标明;灰色背景的序列为 HSP70 特征序列;下划线标明的阴影部分表示加尾信号。

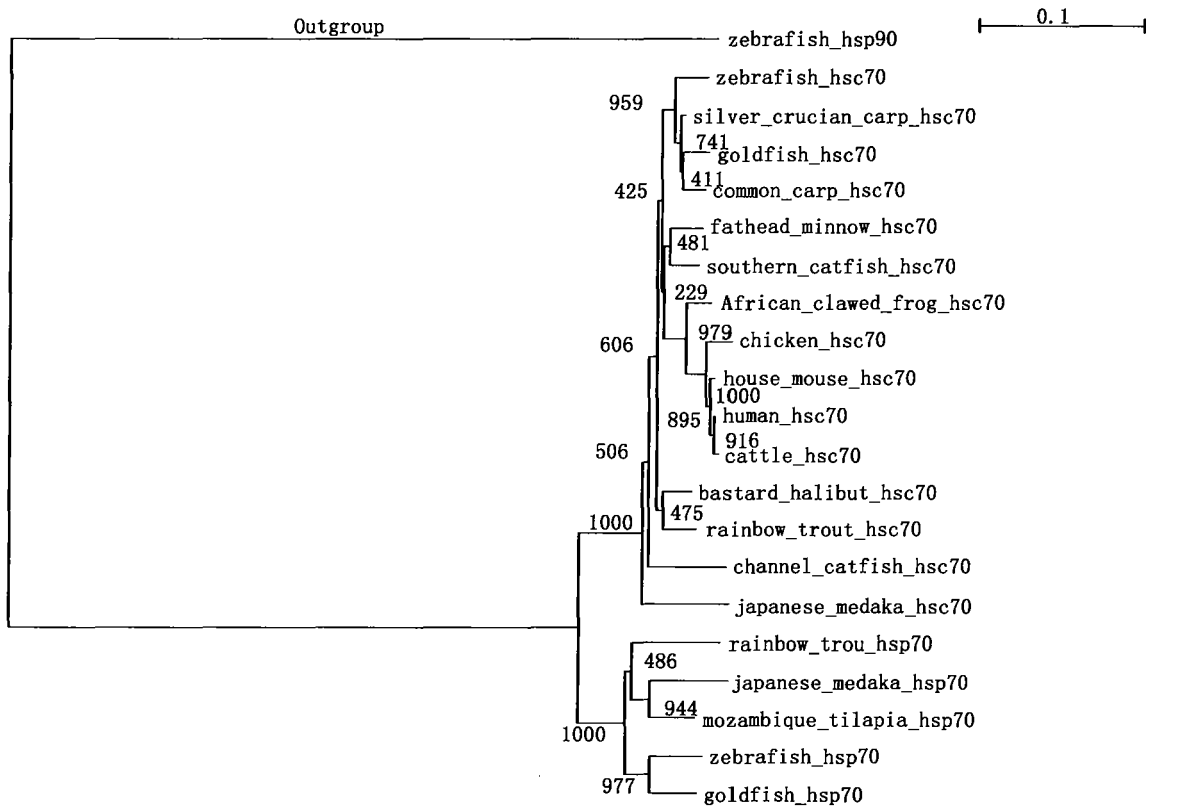


图 3 HSP70 同源蛋白氨基酸序列 Clustal 程序 N-J 种系发生树

Fig. 3 N-J Phylogenetic tree of homologous HSP70 sequences by Clustal program

(节点处数字为 1 000 次自引导值中该节点存在的百分数)

zebrafish; 斑马鱼 (*Danio rerio*); silver crucian carp; 欧洲银鲫 (*Carassius auratus gibelio*); goldfish; 金鱼 (*Carassius auratus*); common carp; 鲤 (*Cyprinus carpio*); fathead minnow; 鲮鱼 (*Pimephales promelas*); southern catfish; 南方鲇 (*Silurus meridionalis*); African clawed frog; 非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*); chicken; 鸡 (*Gallus gallus*); house mouse; 家鼠 (*Mus musculus*); human; 人 (*Homo sapiens*); cattle; 牛 (*Bos taurus*); bastard halibut; 牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*); rainbow trout; 虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*); channel catfish; 沟鲇 (*Ictalurus punctatus*); Japanese medaka; 日本青鳉 (*Oryzias latipes*); Mozambique tilapia; 莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)

### 3 讨论

南方鲇 (*S. meridionalis*) 作为我国长江流域重要经济鱼类, 由于生长快, 肉质鲜美而备受人们青睐, 随着人工养殖密度的增大, 其病害时有发生, 特别是在幼鱼时期, 给研究和生产带来诸多不利, 究其原因则有可能是养殖环境中物理和化学条件的改变 (如高温、盐度、pH、重金属污染、细菌感染等) 影响到机体的免疫防御体系, 表现为一些重要的生理生化指标的变化<sup>[8]</sup>, 使得外界病原可以入侵机体发生感染, 或者原来携带的病原得以大量繁殖, 从而引起病害的发生。因此, 从机体本身的免疫防御功能入手, 克隆一些与免疫防御密切相关的基因, 研究这些基因的表达调控规律, 探讨如何提高机体的抗逆能力, 增强其抵御病原微生物的能力, 以摆脱病害的困扰是非常重要的。作为一种重要的内源性细胞保护因子, 南方鲇 *Hsc70* 蛋白基因 cDNA 的克隆具有重大的理论和应用价值。

SMART RACE 技术是一种基于 PCR 原理由已知的部分 cDNA 序列来获得完整 cDNA 5' 端和 3' 端的方法。该方法利用 MMLVRT 的突变体能够在逆转录结束时, 行使末端转移酶的功能在其 3' 末端加 3 ~ 5 个 C 碱基的特点, 使用基因特异性引物与试剂盒引物共同扩增完整的 5' 端和 3' 端部分片段, 是一种方便、有效的由已知序列扩增未知序列的方法<sup>[9]</sup>。本研究采用 RT-PCR 法和 SMART RACE 法, 经三步克

隆获得了完整的南方鲷热休克蛋白 70cDNA (*scHsc70* cDNA) 序列, 该序列全长 2384 bp, 具有完整的阅读框、起始子和终止子。对该序列进行分析推导出完整的蛋白质序列, 并对其结构特征进行了分析。发现 *scHsc70* 具有 Dnak 特征性基序 (DLGTT-S-V) 和 2 个签名序列, 提示它是一种 Dnak 类型的 HSP70。此外, 真核生物细胞质 HSP70 家族在靠近 C 端具有一段简并重复的 GGMP4 肽序列<sup>[14]</sup>, 在 C 末端是高度保守的细胞质特异性 EEDV 调控基序<sup>[10-12]</sup>, *scHsc70* 具有上述特点, 说明它是一种细胞质 HSP70; 从多序列比对的结果表明 *scHsc70* 与其他物种的 *Hsc70* 相似性很高且具有相同的结构特征, N-J 种系发生树分析亦显示, 实验获得的 *scHsc70*cDNA 序列与各物种的 *Hsc70* 聚在一类而与 *Hsp70* 相分离, 进一步证明克隆的序列是南方鲷组成型热休克蛋白 *Hsc70*。

南方鲷热休克蛋白 70 基因的克隆成功, 为进一步深入研究 *Hsc70* 介导的生物抗逆能力, 探索 *Hsc70* 实现其多种功能的作用途径和机理打下了基础。通过对 *Hsc70* 基因表达调控规律的研究还可以探讨南方鲷的免疫防御机理, 分析南方鲷病害发生的可能原因, 探索提高机体免疫防御能力, 筛选和培育抗病优良养殖品种。同时跟踪分析南方鲷 *Hsc70* 基因的表达情况还可以检测养殖环境物理化学条件的变化, 更好的指导养殖生产。

#### 参考文献:

- [1] Basu N, Todghama A E, Ackerman P A. Heat shock protein genes and their functional significance in fish[J]. *Gene*, 2002, 295: 173 - 183.
- [2] Kiang J G, Tsokos G C. Heat shock protein 70 ku molecular biology, biochemistry and physiology[J]. *Pharmacology and Therapeutics*, 1998, 80: 183 - 201.
- [3] Healy A M, Mariethoz E, Pizurki L, et al. Heat shock proteins in cellular defense mechanisms and immunity[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1992, 21: 319 - 330.
- [4] Drew B, Miller D, Toop T, et al. Identification of expressed Hsp's in blacklip abalone (*Haliotis rubra* Leach) during heat and salinity stress[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2001, 20: 695 - 703.
- [5] Proudfoot N. Poly(A) signals[J]. *Cell*, 1997, 64: 621 - 632.
- [6] Boelens W C, Jansen E J, van Venrooij W J. The human U1 snRNP-specific U1A protein inhibits polyadenylation of its own Pre-mRNA [J]. *Cell*, 1993, 72: 881 - 892.
- [7] Chen F, MooDonnld C C, Wilusz J. Cleavage site determinants in the mammalian polyadenylation signal[J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 2604 - 2610.
- [8] 单红, 张其中, 刘强平, 等. 灭活菌苗免疫的南方鲷外周血液细胞免疫指标的变化[J]. *中国水产科学*, 2005, 12(3): 275 - 280.
- [9] Frohman M A, Dush M K, Martin G R. Rapid production of full length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 85(23): 8998 - 9002.
- [10] Demand J, Lu ders J, Hohfeld J. The carboxy-terminal domain of HSC70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors [J]. *Mol Cell Biol*, 1998, 18: 2023 - 2028.
- [11] Freeman B C, Myers P M, Schumacher R. Identification of a regulatory motif in HSP70 that affects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ-1[J]. *EMBO J*, 1995, 14: 2281 - 2292.
- [12] Vayssier M, Leguerhier F, Fabien J F. Cloning and analysis of a *Trichinella britovi* gene encoding a cytoplasmic heat shock protein of 72 ku[J]. *Parasitology*, 1999, 119: 81 - 93.