

文章编号: 1674-5566(2009)04-0391-07

奥尼杂交罗非鱼及其亲本热休克蛋白 Hsp70 基因 cDNA 序列克隆与比较分析

李莉萍, 陈明, 唐章生, 张永德, 陈忠,
唐瞻杨, 曾兰, 黄姻, 林勇
(广西水产研究所, 广西南宁 530021)

摘要: 为探讨杂交罗非鱼抗应激遗传能力及其与亲本之间关系, 采用 RT-PCR 方法克隆了奥尼杂交罗非鱼及其亲本热休克蛋白 Hsp70 基因完整编码区 (code sequences, CDS) 的 cDNA 序列。序列分析结果表明: 杂交奥尼罗非鱼及其父本奥利亚罗非鱼和母本尼罗罗非鱼热休克蛋白 Hsp70 基因 CDS 均为 1923 bp 编码 640 个氨基酸, 含有 84 个碱性氨基酸, 95 个酸性氨基酸, 理论等电点为 5.462。通过 antherot 分析发现 Hsp70 家族的 3 个签名序列分别为 DLGTYIY, FDLGGGTFD, VVLYGGSIRIPKQK, 核定位信号标签: KRKHKKD, EQNKRALRR, Dantk 特征基序 DLGTT-SV, 胞质 Hsp70 特征基序 EEVD, 靠近 C 端的 GGMP4 肽序列, 另有 2 个糖基化位点 NKS 和 NVSA。奥尼杂交罗非鱼与其亲本 Hsp70 的序列比对发现, 奥尼杂交罗非鱼 Hsp70 的核苷酸 (100%) 和氨基酸序列 (99.8%) 与父本奥利亚罗非鱼基本一致, 与母本尼罗罗非鱼有 2 个氨基酸不同, 5 个核苷酸突变位点; 与母本尼罗罗非鱼、莫桑比克罗非鱼、青鳉、牙鲆氨基酸序列同源性分别为 99.5%、99.4%、93.1%、83.9%。系统发育树分析表明奥尼杂交罗非鱼与父本奥利亚罗非鱼距离最近, 与母本尼罗罗非鱼距离远, 该结果与传统杂交罗非鱼偏父本遗传结论相符。

关键词: 罗非鱼; Hsp70 基因; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: S917 **文献标识码:** A

Cloning and comparison analysis of heat shock protein 70 gene cDNA sequence from *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*

LILi Ping, CHEN Ming, TANG Zhang sheng, ZHANG Yong de, CHEN Zhong,
TANG Zhan Yang, ZENG Lan, HUANG Yin, LIN Yong
(Guangxi Institute of Fisheries, Nanning 530021, China)

Abstract: Hybrid is the main and general method for getting high male of tilapia at present. In this study, we designed to find the relationships of anti-stress between *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus* and their parents. The code sequences of heat shock protein 70 gene (Hsp70) were amplified and cloned from *O. niloticus* × *O. aureus* and their parents by RT-PCR. The sequence analysis showed that their CDS sequences were 1923 bp encoding 640 amino acids with 84 strongly basic (+), 95 strongly acidic (-) and

收稿日期: 2008-10-29

基金项目: 广西自然科学基金 (No. 0731036); 公益性行业 (农业) 科研专项 (3-49)

作者简介: 李莉萍 (1979-), 女, 壮族, 广西南宁人, 助理研究员, 硕士, 主要从事水生生物遗传育种研究。E-mail: pinglili2000@163.com

通讯作者: 林勇, E-mail: linyong2005@126.com

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

isoelectric point of 5.462. The CDS have three signature sequences of Hsp70 family: DLGTTYSFDLGGGTFD and VVLVGGSTRIPKQK, the sequence of bipartite nuclear targeting KRKHKKDISQNKRAIRR, the sequence of Dank subfamily DLGTY-SV, the sequence of cytoplasm EEVD, four peptide sequence GGMP closely C-extreme and two glycosylation site NKSI and NVSA by antheptot. The analysis also revealed the Hsp70 sequence of *O. niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂ was similar to *O. aureus* in nucleotides (100%) and amino acids (99.8%), but different in 2 amino acids and 5 nucleotides to *O. niloticus*. The amino acids sequence of *O. niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂ showed 99.5%, 99.4%, 93.1%, 83.9% identity with *O. niloticus*, *O. mossambicus*, *O. ryzias* kotypes and *Paralichthys olivaceus* respectively. The results of phylogenetic analysis indicated that the Hsp70 sequence of *O. niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂ was very close to *O. aureus* and far away from *O. niloticus*. It was consistent with the *O. niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂ inheriting from *O. aureus*.

Key words: *Oreochromis niloticus* ♀ × *Oreochromis aureus* ♂; Hsp70 gene clone sequence analysis

罗非鱼的全雄单性控制对于罗非鱼养殖有着十分重要的意义,采用控制罗非鱼性别的方法,进行罗非鱼全雄单性养殖,可有效控制其过度繁殖,提高养殖效率^[1-2]。种间杂交是目前国内外生产高雄性罗非鱼中采用最广泛的一种简单技术^[3]。目前,在生产中应用最广的组合是尼罗罗非鱼 ♀ × 奥利亚罗非鱼 ♂,其 F₁代也称为奥尼鱼,生长速度高于父本和母本,抗温、抗盐、抗病能力相对母本也有所提高,但其后代中也发现有抗温、抗盐、抗病等抗应激能力弱个体,影响养殖效果^[4]。目前研究表明,热休克蛋白是动物机体抗应激保护蛋白,其中 Hsp70蛋白是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(如温度、盐度、缺氧、渗透压和微生物感染等)的刺激下,其表达量显著增加^[5-7]。Hsp70蛋白作为分子伴侣在蛋白质折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,是生物体抗逆和抗感染的重要分子^[8-11]。本研究采用 RT-PCR方法对奥尼杂交罗非鱼及其父本奥利亚罗非鱼和母本尼罗罗非鱼热休克蛋白 Hsp70基因完整编码区序列进行克隆及序列比较分析,为了解杂交罗非鱼的抗逆性、基因遗传以及指导奥尼罗非鱼的遗传改良提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼

奥尼杂交罗非鱼(雌性和雄性)、母本埃及尼罗罗非鱼和父本美国奥利亚罗非鱼共4组罗非鱼均来源于国家级广西南宁罗非鱼良种鱼场,每组均挑选0.5 kg规格罗非鱼3尾。

1.1.2 试剂及 PCR引物

总 RNA提取试剂 Trizol Reagent 购于 Invitrogen公司, RT-PCR试剂盒、质粒提取和胶回收试剂盒由 Takara公司提供, pGEM-T Easy Vector 载体连接试剂盒购自 Promega公司,其余均为国产分析纯试剂。DH5 菌株由本实验室保存。所有引物合成及序列测定均由大连宝生物工程有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 热应激处理

试验鱼在 500 L 大水槽内暂养 1 周后(水温约 25 °C,气泵充气),将其放入 39 °C 水温下 10 min 进行热应激,然后在室温下放置 6 h^[12]。

1.2.2 总 RNA 抽提

用 75% 酒精棉球对试验鱼表面擦洗消毒,置于无菌托盘上,用肝素钠溶液润洗后 5 mL 注射器进行尾静脉采血 0.3 mL,取血液 0.2 mL(约 2.0 × 10⁷ 个血细胞)加入 1 mL Trizol 试剂,剧烈震荡至液体完全透明,室温作用 5 min 加入 0.2 mL 氯仿剧烈震荡 30 s 后室温作用 5 min,4 °C, 12 000 g × 15 min 小心

吸取上层水相, 加入 0.5 ml 异丙醇 -20 °C 沉淀 30 min, 4 °C, 12 000 g × 10 min 弃上清, 加 1 mL 75% 乙醇 4 °C, 7 500 g × 5 min 洗涤沉淀两次; 室温干燥 15 min, 加适量 DEPC 水溶解 (55 °C 水浴助溶 5 min)。核酸蛋白测定仪测量 OD 值和变性电泳检测其完整性。

1.2.3 引物设计

根据已发表的莫桑比克罗非鱼的 H₉₇₀ cDNA 序列, 设计引物, 上游引物: 5'-CGGACGAATTCTCTGCGCTAAAGGTGTA-3', 下游引物: 5'-ACTCACCGCGGGTCCACCTCCTCAATAGT-3', 分别引入 EcoRI 和 SmaI 两个酶切位点, 并加上 5 个保护碱基, 理论扩增片段大小为 1 945 bp, 包括 H₉₇₀ 基因的完整编码区。

1.2.4 RT-PCR 扩增及克隆

RT-PCR 反应按 Takara RNA PCR Kit (AMV) Ver 3.0 试剂盒说明书中的操作步骤进行。反转录合成第一链: 以提取的总 RNA 为模板进行反转录, 反应体系为 10 μL 即 H₂O 2.25 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μL, 10× AMV 反转录酶缓冲液 1 μL, dNTP (10 mmol/L) 1 μL, 反转录通用引物 (25 μmol/L) 1 μL, 反转录酶 (5 U/L) 0.5 μL, RNA 酶抑制剂 (40 U/μL) 0.25 μL, RNA 模板 2 μL, 混匀。反转录反应条件为 30 °C 下保温 10 min, 42 °C 下退火反应 30 min, 95 °C 下灭活反转录酶 5 min, 5 °C 下冷却 5 min。PCR 扩增目的基因: PCR 扩增反应体系 (总体积 50 μL): 模板 4 μL, 25 pmol/μL 的引物各 1 μL, 10× LA PCR Buffer 5 μL, dNTP mixture 1 μL, Taq DNA 聚合酶 0.25 μL, 加 ddH₂O 至 50 μL。扩增条件为 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 1 min, 55.6 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 共进行 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。预计获得的片段大小约为 1 945 bp。取 5 μL PCR 产物在含溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 用 UVP 公司的凝胶成像系统观察。H₉₇₀ 基因克隆: 按照 Takara 公司 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver 2.0 介绍的方法回收纯化 PCR 产物, 连接到 pMD18-T 载体中, 转化 DH5α 大肠杆菌感受态细胞, 涂布于 Amp^r/X-gal/PIG/1B 平板, 挑取白色菌落进行培养。按碱裂解法制备少量质粒 DNA, 用 EcoRI 和 SmaI 酶切进行鉴定。

1.2.5 序列测定及分析

每份克隆样品选取 5 个重组子, 送大连宝生物公司进行序列双向测定。用 DNA 分析软件 VECTOR NTI 6.0, DNASTAR, NCBI 上 BLAST 程序进行序列分析, 在同一克隆样品不同重组子同一位点如果出现测序结果不一致, 就选择频率高的结果进行序列分析。

2 结果

2.1 总 RNA 的提取

提取的 4 组罗非鱼共 12 份总 RNA 经核酸蛋白测定仪检测, 其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值均在 1.92 ~ 2.0 之间, RNA 浓度在 1 200 ~ 2 700 μg/mL 之间; 随机挑选 2 份经变性电泳检测, 28 S 和 18 S RNA 带型清晰可见, 28 S:18 S 比值在 2.0 以上 (图 1), 说明提取的总 RNA 质量好、纯度高, 没有被降解, 可满足试验要求。

2.2 RT-PCR 扩增及测序

通过 RT-PCR, 4 组罗非鱼共 12 份样品 cDNA 经 35 个热循环均扩增出一条约 2.0 kb DNA 条带 (图 2), 与预期片段大小一致。将此 PCR 片段纯化后克隆、测序, 确认所有样品大小均为 1 923 bp (去除酶

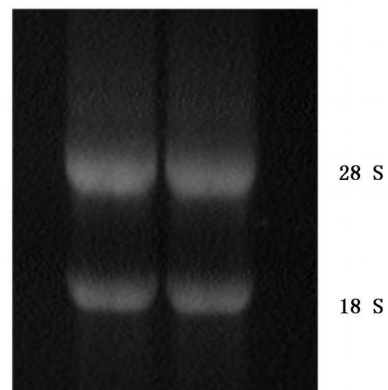
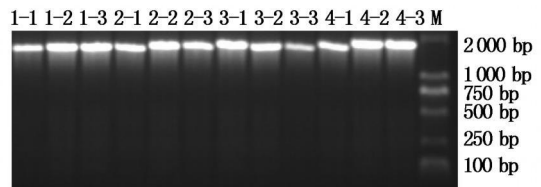


图 1 总 RNA 甲醛变性电泳结果
Fig 1 Analysis of total RNA on formaldehyde denatured agarose gel

切位点和保护性碱基);所有序列经 BLAST分析,与其他物种的 H₉₇₀基因序列表现出极高同源性。12份样品 H₉₇₀基因 cDNA编码的氨基酸序列与其他鱼类的 H₉₇₀氨基酸序列比对的 E值均为 0.0(表 1),核苷酸比对的 E值也远小于 0.0,从而推测获得的序列很可能是所检测罗非鱼 H₉₇₀基因完整编码区 cDNA序列。



M: Marker DL2000; 1-1, 1-2, 1-3为奥利亚罗非鱼; 2-1, 2-2, 2-3为尼罗罗非鱼; 3-1, 3-2, 3-3为雄性奥尼罗非鱼; 4-1, 4-2, 4-3为雌性奥尼罗非鱼

图 2 H₉₇₀基因 PCR扩增结果

Fig. 2 The PCR result of H₉₇₀ gene

2.3 核苷酸和氨基酸序列的特征分析

经测序后分别获得了雌性杂交奥尼罗非鱼和雄性杂交奥尼罗非鱼、母本尼罗罗非鱼及父本奥利亚罗非鱼 H₉₇₀完整编码区 cDNA序列。雌、雄奥尼罗非鱼和父本奥利亚罗非鱼序列完全一致(奥尼罗非鱼序列已经登陆 GenBank 登录号为 FJ575325)与母本尼罗罗非鱼有 5 个核苷酸不同,分别是 126(C/T)、468(G/A)、696(A/T)、889(A/G)、1204(T/C)和 2 个氨基酸不同,分别是 297(T/A) 402(S/P)。奥尼罗非鱼和父本奥利亚罗非鱼 H₉₇₀基因相对分子质量为 70 293.52,均含有 84 个碱性氨基酸,95 个酸性氨基酸,理论等电点为 5.462。其中,尼罗罗非鱼 H₉₇₀基因相对分子质量为 70 273.53,含有 84 个碱性氨基酸,95 个酸性氨基酸,理论等电点为 5.462。使用蛋白质分析软件 AnthonPro 分析氨基酸序列的特征,发现 3 个 H₉₇₀家族的签名序列: IDLGTIYS₁₁₋₁₈ [M]-D-L-G-T₁ ST₁-X₁ SC₁), FDIGGGIFD₁₉₉₋₂₀₈ [LIMF]₁-[LIMFY]₁-[DN]₁-[LIMFS]₁-G₁[GSH]₁-[GS]₁-[AST]₁-X₁(3)-[ST]₁-[LMM]₁-[LIMFC]₁), VVLVGGSRIRIK₃₃₆₋₃₅₀ [LIMY]₁-X₁[LIMF]₁-X-G-G-X₁[ST]₁-X₁[LMM]₁-P-X₁[LIM]₁-X₁[DEQKRST]₁)^[13-15], 括号中为氨基酸位点及相应的模体(motif)序列。同时找到 Dank 特征基序 DLGIT-SV₍₁₂₋₂₀₎, 非细胞器基序: RARFEEL₍₃₀₁₋₃₀₇₎, 胞质 H₉₇₀特征基序 EEVD₁₆₋₁₇ (637-640)及靠近 C 端的 GGMP₄肽序列;另外推测其核定位序列(bipartite nuclear targeting sequence)^[18]为: KRKHKKDISQNKRALRR₍₂₄₈₋₂₆₄₎;根据所获得的序列符合 H₉₇₀家族所特有的特征性氨基酸序列,因此确认是所检测罗非鱼 H₉₇₀基因完整编码区 cDNA序列(图 3)。

表 1 奥尼罗非鱼 H₉₇₀基因核苷酸和氨基酸序列与其他鱼类比对结果

Tab. 1 Comparison of nucleotide and amino acid sequence of H₉₇₀ in *O. niloticus* × *O. aureus* with other fish

物种	GenBank 注册号	核苷酸相似性 (%)	BLASTIN E-Value	GenBank 注册号	核苷酸相似性 (%)	BLASTIN* E-Value
美国奥利亚罗非鱼 <i>O. aureus</i> USA	FJ575326	100	0		99.8	0
埃及尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i> EGYPT	FJ207463	99.7	0	AC25099.1	99.5	0
莫桑比克罗非鱼 <i>O. mossambicus</i>	AF01312.1	99.4	0	CAA04673.1	99.4	0
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	AF286875	91.1	0	AAF91485.1	93.1	0
剑尾鱼 <i>Xiphophorus maculatus</i>	AB062114	89.9	0	BAB72168.1	91.9	0
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	BQ056709	82.2	0	AAH56709.1	90.6	0
黄锡鲷 <i>Rhabdosargus sarba</i>	AY36787	84.6	0	AAR97294.1	90.0	0
鲫 <i>Carassius auratus</i>	AB092839	82.0	0	BAC67184.1	90.0	0
虹鳉 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	AB176855	89.2	0	BAD83574.1	89.2	0
牙鲮 <i>Paralichthys olivaceus</i>	AF053059	73.7	0	AAC33859.1	83.9	0

注: *所用的打分矩阵为 BLOSUM62,其余参数为默认值

2.4 序列同源性分析

将奥尼罗非鱼 H₉₇₀基因完整编码区 cDNA序列与其它鱼类 H₉₇₀基因的氨基酸序列用 ClustalX 1.81 进行比对,发现奥尼罗非鱼的 H₉₇₀序列与父本奥利亚罗非鱼同源性为 99.8%,与母本尼罗罗非鱼和莫桑比克罗非鱼同源性分别为 99.5%和 99.4%,其次为青鳉(93.1%)、剑尾鱼(91.9%)、斑马鱼(90.6%)、鲫(90.0%)和黄锡鲷(90.0%),而与虹鳉(89.2%)和牙鲮(83.9%)相似

性较低。核苷酸和氨基酸水平的全序列比对结果(表 1)。同时序列比对分析发现所有的签名序列位点都高度保守,甚至等同。

```

ATGTCTGCAGCTAAAGGTGTAGCGATCGGCATCGACCTGGGCACCACCTACTCTGTGTGGGGTTTTCCAACATGGG
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
AAAGTAGAAATCATCGCCAACGACCAGGGCAATAGGACCACCCCAAGTATGTGGCC TTCACAGACACCGAGAGGCTC
ATTGGGGACGCAGCCAAGAACCAGGTGGCTCTGAACCCAGCAACACTGTGTTTGATGCCAAGAGGCTGATTGGAAGA
AAGTTTGATGAACCTGTGGTGCAGGCGGACATGAAGCACTGGCCCTTCAAGGTGATTCAGACGGAGGGAAGCCAAA
ATCAGAGTGGAGTACAAAGGGGAGGACAAGGCC TTCTACCCGAGGAGATCTCTCCATGGTCTGGTGAAGATGAAG
IGAGATCGCAGAGCCCTACCTGGGCCAAAAGGTGTCCAACGCTGTCATCACGGTCCCGGCGTACTTCAACGACTCCCA
CGACAGGCCACTAAAGACGCGGGCGTATCGGGCCCTCAACGTCCTGAGGATCATCAACGAGCCACGCGGCCGCC
ATCGCCTACGGTCTGGACAAAGCAAGTCAGGCGAGAGGAACGTCCTGATCTTTGACCTGGGTGGGGCACCTTCGAC
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
GTGTCCATCTGACCATTGAAGACGGCATCTTTGAGGTGAAGTCCACGCGGAGACACCCACCTGGGCGGAGGAGAC
TTTGACAACCGCATGGTGAACCACTTTGTGGAGGAGTCAAGAGGAAGCACAGAAGGACATCAGCCAGAACAAGAGA
F D N R M V N H F V E E F K R K H K K D I S Q N K R
GCCTTGAGGAGGCTGCGCACAGCTTGTGAGAGGGCCAAGAGGACCCTGTCCTCCAGCTCCAGGCCAGCATCGAGATC
A L R R L R T A C E R A K R T L S S S S Q A S I E I
GACTCTCTGTTGAGGGCGTCGACTTCTACCTCCATCACCAGGGCTCGCTTTGAGGAGCTGTGCTCCGACCTGTTC
D S L F E G V D F Y T S I T R A R F E E L C S D L F
AGGGAACTTGAGCCGGTGGAGAAATCCCTGAGGGACGCCAACTGGACAAGGGCAGATCCACGACGTCGCTCTG
R G T L E P V E K S L R D A K L D K G Q I H D V V L
GTGGGAGGCTCCACCGAATCCCCAAAATCCAGAAGCTGCTGCAGGACTTTTCAACGCGCGGAGCTGAACAAGAGC
V G G S T R I P K I Q K L L Q D F F N G R E L N K S
ATCAACCCGACGAGGCCGTGGCTTACGGCGCCCGTCCAGGCCCATCTCTCGGGGACACCTCCGGAACGTT
I N P D E A V A Y G A A V Q A A I L S G D T S G N V
CAGGACCTGCTGCTGCTGGAGCTGGCGCCTCTGTCCTGGGTATCGAGACGGCCGAGGGGTATGACGGCCCTGATC
Q D L L L L D V A P L S L G I E T A G G V M T A L I
AAACGCAACACCACCATCCCCACCAAGCAGACCCAGACCTTACCACCTACTCCGACAACCAGCCCGGCTTCTGATC
CAGGTCTACGAAGGAGAGAGCCATGACCAAGGACAACAACCTGCTGGGCAAGTTTGAGCTGACGGGGATCCCGCC
GCCCCACGAGGCGTCCCGCAGATCGAGGTCACCTTCGACGTCGATGCCAACGGCATTTTGAATGTGTCTGCGGTGGAC
A P R G V P Q I E V T F D V D A N G I L N V S A V D
AAGAGCACCGGCAAAGAGAACAAGATCACCATACCAACGATAAGGGCCGACTGAGCAAAGAAGAGATCGAGAGGATG
GTGCAGGACGCAGAGAAATACAAAGCCGAGGACGACCTTACAGGGACAAAATCGCCGCAAGAACTCCCTGGAGTCC
TACGCCTTCAACATGAAGAGCAGCGTGCAGGACGACAACCTGAAGGGCAAATCAGCGAGGAGACAAGAAGAAGTG
GTGGAGAAATGTGACGAGACCATCGCCTGGCTGGAGAACAACCAGCTGGCTGATAAAGAGGAGTACCAACAAGCAG
AAAGAGCTGGAGAAAGTGTGCAACCCATCATCAGCAAGCTGTATCAGGGAGGGATGCCACTGGTGTACCTGTGGA
K E L E K V C N P I I S K L Y Q G G M P T G A T C G
GAGCAGGCACGAGCCGCTCCAGGGGCCACTATTGAGGAGGTGGACTAA
E Q A R A G S Q G P T I E E V D

```

图 3 奥尼杂交罗非鱼 H_{sp70} 基因的核苷酸序列和推测的氨基酸序列

Fig 3 The nucleotide and predicted amino acid sequences of H_{sp70} gene from *O. niloticus* × *O. aureus* ♂
下划线部分表示特征序列; 阴影部分表示糖基化位点; 字母边框表示突变核苷酸和氨基酸

2.5 系统进化树分析

Mega 1.0 系统进化树表明雄性奥尼罗非鱼和雌性奥尼罗非鱼、美国奥利亚罗非鱼、埃及尼罗罗非鱼、莫桑比克罗非鱼最为接近, 构成 1 个进化分支, 再与青鳉、剑尾鱼、黄锡鲷、虹鳟、鲫、斑马鱼等鱼类聚为 1 个大的进化分支; 而牙鲮则独自另聚为 1 个分支(图 4)。

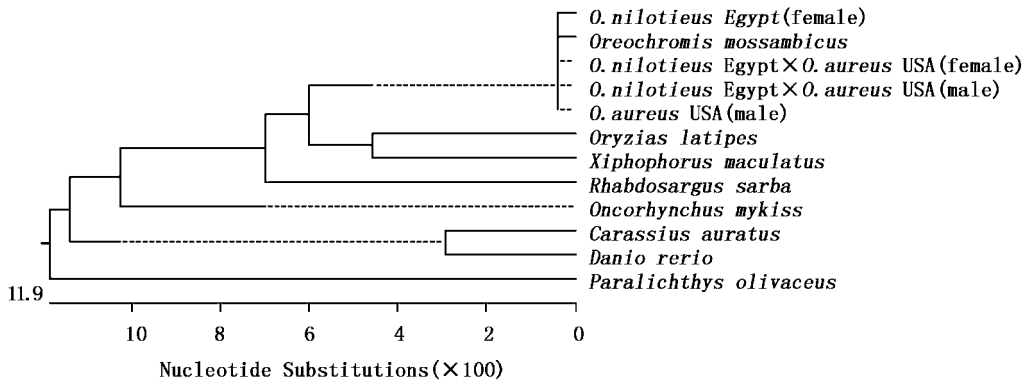


图 4 奥尼杂交罗非鱼与其他鱼类 Hsp70 基因系统进化树

Fig 4 The Phylogenetic tree of Hsp70 gene in *O. niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂ and other fish

3 讨论

热休克蛋白 70 为动物体内一种重要的应激因子, 目前关于 Hsp70 的性质、功能和测定方法方面的研究较多^[19-22]。由于栖息环境的特殊性, 水生生物 Hsp70 的诱导有其特殊的生物学意义, 但关于水生生物 Hsp70 方面的研究较少, 且只着重于介绍其调控机制方面^[23]。对罗非鱼 Hsp70 的研究才刚刚起步。

本研究根据已发表的莫桑比克罗非鱼的 Hsp70 基因 cDNA 序列设计引物, 经 PCR 扩增、克隆测序得到奥尼杂交罗非鱼和其亲本 Hsp70 基因完整编码区 cDNA 序列。该序列含有 3 个 Hsp70 家族的签名序列; DNA 特征基序 DIGTT-S-V; 非细胞器基序: RARFEEL; 胞质 Hsp70 特征基序 EEVQ; 靠近 C 端的 GGMP4 肽序列; 2 个糖基化位点 NKS 和 NVSA 与 前人对 Hsp70 基因研究结果一致^[24]。氨基酸序列比对发现, 奥尼杂交罗非鱼与父本奥利亚罗非鱼同源性达到 99.8%, 与母本尼罗罗非鱼同源性为 99.5%, 系统进化树也表明奥尼杂交罗非鱼与父本奥利亚罗非鱼最接近, 这些结果都有力证明奥尼杂交罗非鱼更多遗传父本奥利亚罗非鱼 Hsp70 基因, 与母本尼罗罗非鱼距离远一些。由于 Hsp70 基因是一类存在于所有生物体细胞内比较保守的蛋白, 在受到环境胁迫后能够大量表达, 对生物体的抗逆能力和环境适应能力具有重要的影响, 同时 Hsp70 作为分子伴侣在协助新生多肽链折叠、蛋白质复合体的装配以及调节、修护和降解变性的蛋白质方面起着重要作用。在实际生产中, 奥利亚罗非鱼抗寒、抗病、抗逆能力都比尼罗罗非鱼强, 其子代奥尼杂交鱼抗寒能力则介于双亲奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼之间, 子代中出现了抗温、抗盐、抗病等抗应激能力较弱的个体, 一方面可能与其父母本遗传变异有关, 另一方面也与养殖过程中养殖条件恶劣, 营养不良, 管理水平差等因素有关, 使该杂交鱼抗逆能力下降。因此, Hsp70 表达水平的高低可以作为评价奥尼罗非鱼应激程度、应激能力、健康状况和环境质量的指标。在此基础上, 今后可进一步开展 Hsp70 的其它相关研究, 例如, 通过选留 Hsp70 表达量高的亲本进行选择育种, 使其子代罗非鱼具有更高环境适应能力, 提高抗应激水平; 同时可以通过日常生产中给予多次不同程度刺激, 使其适应外界环境, 进一步提高奥尼杂交鱼抗应激能力。

参考文献:

- [1] 楼允东. 鱼类性别控制研究的进展 [J]. 上海水产大学学报, 1992 (3): 168-173.
- [2] 刘良国, 赵俊, 崔森. 鱼类的性别决定与人工控制 [J]. 水产科学, 2003, 22(2): 42-45
- [3] 杨景峰, 徐桂珠. 罗非鱼全雄控制技术研究进展 [J]. 内蒙古民族大学学报 (自然科学版), 2003 18(4): 318-322
- [4] 王楚松, 夏德全, 胡玫, 等. 奥尼鱼 (*S. nilotica* ♀ × *S. aurea* ♂) 杂种优势的利用 [J]. 淡水渔业, 1989 6: 14-15.
- [5] Riessa FA. New Puffing Pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila* [J]. *Experientia* 1962 18: 571-573

- [6] Tissieres A, Mitchell H K, Tracy U M. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster* relation to chromosome puffs [J]. *J Mol Biol* 1974, 84: 389—398
- [7] Sorensen J G, Kristensen T N, Loeschcke V. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins [J]. *Ecol Lett* 2000, 6: 1025—1037
- [8] Ellis R J. *The Chaperonins* [M]. New York: Academic Press, 1996
- [9] Feige U, Morimoto R I, Yahara J, et al. Stress-inducible cellular responses [M]. Berlin, Germany: Birkhäuser Verlag, 1996
- [10] Gehrig M J. Molecular chaperones: clasping the prize [J]. *Curr Biol*, 1996, 6: 1573—1576
- [11] Hartl F U. Molecular chaperones in protein folding [J]. *Nature*, 1996, 381: 571—580
- [12] Piana A, Asirli C, Caselli F, et al. Hsp70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*: a commercially important oyster in Europe [J]. *Cell Stress Chap* 2002, 7(3): 250—257
- [13] Boue J, Tangy A, Monaga D. Organization and nucleotide sequence of the European flat oyster *Ostrea edulis* heat shock cognate70 (hsc70) and heat shock protein70 (H Φ 70) genes [J]. *Aquat Toxicol* 2003, 66: 221—225
- [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]. *Curr Biol* 1994, 4: 1104—1114
- [15] Boorstein W R, Zieglerhofer T, Craig E A. Molecular evolution of the Hsp70 multigene family [J]. *J Mol Evol* 1994, 38: 1—17.
- [16] 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 [J]. *EMBO J* 1995, 4: 2281—2292
- [17] Vayssier M, Leguerhier F, Fabien J F. Cloning and analysis of a *Trichinella britovi* gene encoding a cytoplasmic heat shock protein of 72 kD [J]. *Parasitology* 1999, 119: 81—93.
- [18] Kapoor M, Curje C A, Runham C. The Hsp70 gene family of *Neurospora crassa*: cloning, sequence analysis, expression, and genetic mapping of the major stress-inducible member [J]. *Journal of Bacteriology* 1995, 177(1): 212—221.
- [19] Bukau B, Horwich A. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines [J]. *Cell* 1998, 92: 351—366
- [20] Lewis S, Handly R D, Cordi B, et al. Stress proteins (Hsp Φ): Methods of detection and their use as an environmental biomarker [J]. *Ecotoxicology* 1999, 8: 351—368
- [21] Feder J H, Hofmann G E. Heat shock protein, molecular chaperones and the stress responses: evolutionary and ecological physiology [J]. *Annu Rev Physiol* 1999, 61: 243—282
- [22] Hochachka P W, Somero G N. *Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution* [M]. US: Oxford University Press, 2002
- [23] Basu N, Todgham A F, Ackerman P A, et al. Heat shock protein genes and their functional significance in fish [J]. *Genet* 2002, 295: 173—183
- [24] 吴龙涛, 宋林生, 胥 炜. 栉孔扇贝热休克蛋白 70基因 cDNA的克隆与分析 [J]. *高技术通讯*, 2003, 13(11): 75—79.