

文章编号: 1674 - 5566(2015)05 - 0668 - 10

## 南极独角雪冰鱼 *HSP90 $\beta$* 基因 cDNA 序列克隆及其原核表达

刘秀荣<sup>1</sup>, 王丛丛<sup>1,2</sup>, 许强华<sup>1,2,3,4,5</sup>

(1. 上海海洋大学 海洋科学学院, 上海 201306; 2. 大洋渔业资源可持续开发省部共建教育部重点实验室, 上海 201306; 3. 农业部大洋渔业资源环境科学观测试验站, 上海 201306; 4. 国家远洋渔业工程技术研究中心, 上海 201306; 5. 远洋渔业协同创新中心, 上海 201306)

**摘要:** 为研究南极鱼类 HSP90 $\beta$  蛋白与低温适应的相关性, 本研究克隆获得了南极独角雪冰鱼 (*Chionodraco hamatus*, CH) 热休克蛋白 *HSP90 $\beta$*  基因的完整开放阅读框, 并以尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*, ON) HSP90 $\beta$  蛋白为对照, 进行低温胁迫下的原核表达研究。结果表明: 克隆获得的独角雪冰鱼 *HSP90 $\beta$*  基因编码区全长为 2 184 bp, 推定编码 728 个氨基酸。多重序列比对显示, 独角雪冰鱼 HSP90 $\beta$  与其他鱼类 HSP90 $\beta$  的氨基酸序列同源性在 87% 以上; 蛋白结构域分析发现, 独角雪冰鱼 HSP90 $\beta$  具有 HSP90 家族的保守信号区, 其重要功能位点的氨基酸残基非常保守。构建 pET28-CH-*HSP90 $\beta$*  和 pET28-ON-*HSP90 $\beta$*  重组表达载体, 观察 4 °C 低温胁迫 8 h 和 12 h 后, HSP90 $\beta$  蛋白对大肠杆菌生存能力的影响。结果显示: *C. hamatus*-*HSP90 $\beta$*  组的大肠杆菌存活率显著高于 *O. niloticus*-*HSP90 $\beta$*  组和空载体 pET28a 对照组, 这表明南极冰鱼 HSP90 $\beta$  在低温条件下具有更加显著的细胞保护功能。由此推测 HSP90 $\beta$  蛋白参与了南极冰鱼低温适应的生理过程。

**研究亮点:** HSP90 作为一种分子伴侣, 在生物的抗逆性方面发挥重要的生物学功能, 目前有关南极冰鱼 *HSP90 $\beta$*  的克隆与表达研究还未见报道。本研究从独角雪冰鱼中克隆 *HSP90 $\beta$*  基因的开放阅读框全长, 分析其编码的蛋白质结构、性质, 并研究其在低温胁迫下对大肠杆菌细胞的保护功能, 为后续进一步研究 *HSP90 $\beta$*  基因在南极鱼低温适应过程中的功能提供理论依据。

**关键词:** 热激蛋白 90 $\beta$ ; 南极冰鱼; 保守信号区; 低温适应; 细胞存活率  
**中图分类号:** Q 71  
**文献标志码:** A

热休克蛋白 (Heat Shock Proteins, HSPs) 是生物体在环境高温、物理、化学、生物应激原等的刺激下诱导生成的一组蛋白质, 此外, 缺血、寒冷、饥饿、感染、细胞因子等机体内环境的变化也能够诱导 HSPs 的生成<sup>[1-2]</sup>。热休克蛋白是一组分子伴侣蛋白, 广泛存在于从原核到真核生物的各种生物体内, 在细胞生长、发育和调节过程中发挥着重要的生物学功能。根据分子量的大小, HSPs 分为 HSP110、90、70、60、47、32 等类型<sup>[3]</sup>。

HSP90 是 HSPs 家族的重要成员之一, 在进化过程中高度保守, 在多种生物体中都有表

达<sup>[4]</sup>。HSP90 可以分为 5 个亚家族: 细胞质 HSP90、内质网 Grp94、线粒体 TRAP1、叶绿体 HSP90 和细菌 HtpG<sup>[5]</sup>。研究表明, 人类的 HSP90 主要存在 5 种亚型, 其中 HSP90 $\alpha$  和 HSP90 $\beta$  这两种亚型位于胞质内<sup>[6]</sup>。HSP90 参与细胞周期调控、细胞存活、激素等许多信号通路, 对于维持细胞的内稳态发挥着关键作用<sup>[5]</sup>。27.5 °C 热激西伯利亚鲟 1 h, 其脑、鳃、脾脏的 HSP70 表达量升高<sup>[7]</sup>。9 °C 冷应激处理吉富罗非鱼 12 h 后, Hsp70 mRNA 水平显著升高<sup>[8]</sup>。在水生动植物中, HSP90 参与冷激和热激的耐受、高盐和低盐

收稿日期: 2015-04-04 修回日期: 2015-05-14

基金项目: 国家自然科学基金重大研究计划培育项目(91131006); 上海市教委科研创新项目曙光计划(13SG51); 教育部科学技术研究项目(213013A)

作者简介: 刘秀荣(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋科学和分子生物学。E-mail: opxrliu@126.com

通信作者: 许强华, E-mail: qhxu@shou.edu.cn

的耐受、疾病防御等过程。高温处理三疣梭子蟹,其肌肉和肝胰腺中 *ptHSP90-1* 积累;低温刺激三疣梭子蟹,其肝胰腺和鳃中的 *HSP90* 转录水平升高<sup>[9]</sup>。条斑紫菜在 0℃ 和 10℃ 的低温胁迫下,*HSP90* 被诱导表达,且温度越低,*HSP90* 表达量越高<sup>[10]</sup>。

鲈形目的南极鱼亚目鱼类是南大洋动物群的主要部分,南极大陆的分离使南冰洋成为地球上最寒冷、最稳定的一片水域。在适应低温的进化过程中,许多南极鱼的蛋白质家族都发生了功能适应性进化,包括伴侣蛋白<sup>[11]</sup>、热休克蛋白<sup>[12-13]</sup>、血红素蛋白<sup>[14-15]</sup>、微管蛋白<sup>[16]</sup>和抗冻蛋白<sup>[17-18]</sup>等,同时会导致增强耐热性和促进短期环境温度变化的适应性等一些功能的丧失。4℃ 条件下培养 21 d 后的伯氏肩孔南极鱼 (*Trematomus bernacchii*),鳃、肌肉和脑中的 *HSP70* 亚型数量和 *HSPs* 水平增加,这可能是诱导型基因的构成性表达,该研究还发现,与温带南极鱼相比,南极的南极鱼具有较少的 *HSP70* 亚型<sup>[19-20]</sup>。CHEN 等对南极犬牙鱼的转录组分析发现,*HSP90 $\beta$*  和 *HSP70* 基因表达显著上调<sup>[21]</sup>。

独角雪冰鱼 (*Chionodraco hamatus*) 隶属于鲈形目、南极鱼亚目,鳕冰鱼科,长期生活在南极深海水域中。*HSP90* 作为一种应激蛋白和分子伴侣,在生物耐受各种逆境胁迫方面发挥重要的生物学功能。本研究从南极独角雪冰鱼中克隆 *HSP90 $\beta$*  基因的 CDS 区,分析其蛋白质的结构、性质,并研究其在低温胁迫下对大肠杆菌的细胞保护功能,为后续进一步研究 *HSP90 $\beta$*  基因在南极鱼低温适应过程中的功能提供理论基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

独角雪冰鱼 (*Chionodraco hamatus*, CH) 由雪龙号科考人员采样于南极埃默里冰架。尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*, ON) 采集于上海浦东新区南汇水产养殖场。

### 1.2 主要试剂

Trizol Reagent 和抗体购自 Life Technologies,反转录试剂盒和 PCR 相关试剂均为 TaKaRa 公司产品,pBLUE-T 载体购自北京艾德莱生物科技有限公司,质粒小提试剂盒由上海生工生物技术有限公司提供,限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 来

自 NEB。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 总 RNA 提取和反转录

取约 100 mg 独角雪冰鱼的鳃组织,利用 Trizol Reagent (Invitrogen)、饱和酚、氯仿等提取总 RNA。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,紫外分光光度计测定 RNA 浓度及纯度。以 2  $\mu$ g 的 RNA 为模板,Oligo (dT) 为反转录引物,反转录得到第一链 cDNA。用同样的方法提取罗非鱼鳃的 RNA,反转录得到 cDNA。

#### 1.3.2 *HSP90 $\beta$* ORF 克隆

根据 NCBI 上已登录的尖吻鲈的 *HSP90 $\beta$*  的 CDS 序列设计上下游引物 *HSP90 $\beta$ \_F1* (5'-CGGAATTCAGATGCCTGAAGAAATGCACC-3'),*HSP90 $\beta$ \_R1* (5'-CCGCTCGAGTTAATCGACTTCTTCCATGCG-3') 扩增独角雪冰鱼 *HSP90 $\beta$*  基因的开放阅读框序列。根据 NCBI 数据库中的尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) *HSP90 $\beta$*  的 CDS 序列设计引物 *HSP90 $\beta$ \_F2* (5'-CGGAATTCATGCCTGAAGAAATGCACCA-3'),*HSP90 $\beta$ \_R2* (5'-CCGCTCGAGTTAATCCAC TTCTTCCATGCG -3') 扩增尼罗罗非鱼 *HSP90 $\beta$*  的开放阅读框全长序列。

以反转录的 cDNA 为模板,PCR 反应体系为 Taq 酶: 0.25  $\mu$ L, DNA 模板 1  $\mu$ L, 10  $\times$  PCR buffer: 2.5  $\mu$ L, dNTPs: 2  $\mu$ L, 引物: 各 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O: 至 25  $\mu$ L。PCR 反应程序为: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 60℃ 45 s, 72℃ 2 min, 35 个循环; 72℃ 10 min。以 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳后,胶回收 PCR 片段,连接 pBLUE-T 载体,转化 *E. coli* Top10 细胞,蓝白斑筛选,挑取单克隆进行菌液 PCR,将阳性克隆的菌液送至上海生工生物工程有限公司测序。

#### 1.3.3 氨基酸基本特征和系统进化分析

测序所得核苷酸结果在 Genbank 数据库 Blast,进行同源序列搜索比对,用 DNASTAR 软件找出开放阅读框,同时使用 ExPASy 分子生物学序列分析工具包括翻译、评估 pI/MW 和 Blast 分析推导氨基酸序列,根据 SMART 软件推测其保守结构域。使用 MEGA 6.06 构建系统进化树。

#### 1.3.4 原核表达载体构建及重组质粒诱导表达

将测序正确的独角雪冰鱼和尼罗罗非鱼的 pBLUE-T-*HSP90 $\beta$*  质粒进行 *EcoR* I 和 *Xho* I 双

酶切,胶回收 *HSP90 $\beta$*  目的片段,连接 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后的 *pET28a*(+)载体,转化至 *E. coli* Top10 细胞中,用含有卡那霉素抗性的平板筛选,将连接成功的 *pET28-HSP90 $\beta$*  重组质粒转化至大肠杆菌表达菌株 DE3 (BL21) 细胞中培养。挑取含有 *pET28-HSP90 $\beta$*  重组质粒的单克隆于含有卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 °C 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.4 ~ 0.6,加入 IPTG 至浓度为 0.2 mmol/L,37 °C 继续培养。分别在加入 IPTG 后的 2、4、6、8、10、12 h 收集 500  $\mu$ L 菌液,4 °C、11 304 r/min 离心 1 min 后加入 60  $\mu$ L PBS 重悬细胞,加入 SDS 上样缓冲液和  $\beta$ -巯基乙醇煮沸 10 min,进行 SDS-PAGE 电泳,检测重组质粒 *pET28-HSP90 $\beta$*  蛋白表达的变化。取诱导表达 12 h 的蛋白,Western Blotting 验证表达蛋白是否为目的蛋白。

### 1.3.5 低温胁迫下大肠杆菌生长状况

分别挑取含有 *pET28a*(+)空载体质粒、*pET28-CH-Hsp90* 和 *pET28-ON-Hsp90* 重组质粒的单菌落于装有 20 mL LB 液体培养基(含 50  $\mu$ g/mL 的卡那霉素)的锥形瓶中,37 °C 培养至 OD<sub>600</sub> = 0.4 ~ 0.6,加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG,37 °C 继续培养 12 h。测定 OD<sub>600</sub>,将实验组和对照组菌液稀释至 OD<sub>600</sub> = 1.0 后,再将菌液稀释 10<sup>-5</sup> 倍,取 100  $\mu$ L 涂布到含有卡那霉素的 LB 平板上,将涂好菌液的平板放到 4 °C 冰箱低温处理,分别在处理 0、4、8、12 h 后取出平板,转移到 37 °C 培养箱培养 20 h,计数每个平板上长出的单克隆的个数,每个时间点做 3 个平行,实验重复 3 次<sup>[22]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 独角雪冰鱼 *HSP90 $\beta$* 基因的克隆

提取独角雪冰鱼鳃组织的 RNA,琼脂糖凝胶电泳可见 28S 和 18S rRNA 条带明显(图 1a),表明提取的 RNA 可以用于后续实验。反转录得到 cDNA,PCR 扩增,得到 1 条约 2 200 bp 的 DNA 片段(图 1b),回收该片段之后与克隆载体 pBLUE-T 连接转化至大肠杆菌细胞 DH5 $\alpha$ ,菌液 PCR 鉴定(图 1c),将阳性克隆送至上海生工生物有限公司测序,测序得到的独角雪冰鱼 *HSP90 $\beta$*  基因的开放阅读框全长为 2 184 bp,测序结果在 NCBI 数据库上的比对结果显示,独角雪冰鱼 *HSP90 $\beta$*  全长 cDNA 序列与鳊鱼(gb:JQ929760)的 *HSP90 $\beta$*  CDS

序列相似性为 92%,与点带石斑鱼(gb:FJ644278)和鲈鱼(gb:AY395632)的序列相似性为 91%。

### 2.2 独角雪冰鱼 *HSP90 $\beta$* 结构域和进化分析

测序得到的独角雪冰鱼 *HSP90 $\beta$*  的开放阅读框全长为 2 184 bp,通过 ORF 软件分析预测得到的蛋白质具有 728 个氨基酸(图 2)。利用 <http://www.expasy.org/tools/> 网站对南极冰鱼 *HSP90 $\beta$*  基因编码的氨基酸序列进行分析,得到 *HSP90 $\beta$*  蛋白的分子量约为 83.7287 ku;理论等电点 pI 为 4.9;负电荷残基(Asp + Glu) 151 个,正电荷残基(Arg + Lys) 109 个;不稳定系数(Instability index)为 42.24,表明该蛋白状态不稳定;脂肪系数为 79.42。该蛋白质由 20 种氨基酸组成,其中 Glu、Lys、Leu 含量最为丰富,Cys 和 Trp 含量最少。

根据 OBERMANN 等<sup>[23-24]</sup> 的研究,将 *HSP90* 蛋白序列分成 5 个结构域(图 2):N-端结构域 [NTD(CH *HSP90 $\beta$* ) 1 - 235]、带电荷结构域 1 (Charged domain 1, 236 - 267)、中间结构域 (MTD, 268 - 613)、带电荷结构域 2 (Charged domain 2, 614 - 624) 和 C-端结构域 (CTD, 625 - 728)。对独角雪冰鱼和尼罗罗非鱼的 *HSP90 $\beta$*  氨基酸序列进行分析,发现都含有 *HSP90* 家族的 5 个保守信号区(图 2,分别标记为 I-V): (NKEIFLREL [I/V] SNASDALDKIR, L [S/G] TIAKSGT, IGQFGVGFYSAYL [V/C] AF, [I/V] KLYVRRVF, GVVDSEDLPLNISRE 和 C 末端保守序列 MEEVD)。根据 SMART 软件推测,第 34 ~ 188 个氨基酸残基处具有 HATPase (histidine kinase-like ATPases) 活性(图 2)。第 511 ~ 660 个氨基酸残基(CH *HSP90 $\beta$* ) 形成 4-螺旋细胞因子,第 218 ~ 261 个氨基酸残基区域富含谷氨酸(图 2)。

序列比对发现,一些非常重要的 *HSP90 $\beta$*  功能位点的氨基酸残基非常保守,例如 E41(ATP 水解),D87(ATP 结合),E89、E126、E129、E131、E177(GA、p23 结合),K106(GA 结合),R393、Q397(ATPase 活性),F362(结构域间的相互作用),S225、S256(被酪蛋白激酶 II 磷酸化)(图 2)。独角雪冰鱼(CH)和尼罗罗非鱼(ON)的 *HSP90 $\beta$*  蛋白有 32 处位点差异,其中在 ATP 结合区有 8 个氨基酸不同(图 2)。

将推导出的氨基酸序列与 NCBI 上已登录的其他物种的 *HSP90 $\beta$*  序列进行相似性比对发现, 南极冰鱼 *HSP90 $\beta$*  与革首南极鱼 (*Notothenia coriiceps*) (ref|XP\_010774807) 的蛋白同源性高达 99%, 与斑马鱼 (ref|NP\_571385)、罗非鱼 (ref|XP\_005475052) 的蛋白相似度为 90%, 与人类 (ref|NP\_031381) 的蛋白相似度为 87% (图 2)。

用软件 MEGA 6.0 对不同物种的 *HSP90 $\beta$*  序列进行分析, 构建进化树, 比对的物种包括革首南极鱼、青鳉、罗非鱼、斑马鱼、团头鲂、鸡、野猪、人等。其中, 独角雪冰鱼与革首南极鱼的遗传距离最近, 只有 0.001, 与人的遗传距离为 0.110, 与鸡的遗传距离最远, 达到 0.126。系统进化树形成两个大分支, 哺乳类、鸟类聚为一支, 鱼类为另一支。在鱼类分支中, 独角雪冰鱼与革首南极鱼、点带石斑鱼聚在一起, 与虹鳟、斑马鱼相距较远 (图 3)。

### 2.3 表达载体构建及重组质粒的诱导表达

用 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切 pBLUE-T-*HSP90 $\beta$*

质粒, T4 DNA 连接酶连接双酶切后的 pET28a (+) 质粒 (图 1d), 转化 DH5 $\alpha$  后菌液 PCR 鉴定 (图 1e), 提取 pET28-CH-Hsp90 和 pET28-ON-Hsp90 重组质粒, 并转化到表达菌株 *E. coli* DE3 (BL21) 中, 双酶切鉴定 (图 1f)。在 37 °C 条件下, 诱导表达空载 pET28a (+) 质粒、pET28-CH-Hsp90 和 pET28-ON-Hsp90 重组质粒, 分别在加入诱导剂后的 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 时收集菌体, 离心, 用 PBS 重悬细胞, 做 SDS-PAGE 电泳, 用考马斯亮蓝染色 (图 4a)。预测的 *HSP90 $\beta$*  蛋白的分子量是 83.7287 ku, pET28a 载体的 T7 启动子起始密码子到 *EcoRI* 酶切位点的氨基酸序列分子量为 3.84 ku, 所以目的蛋白分子量约为 87.57 ku。图中过表达的蛋白条带在 100 ku 与 75 ku 之间, 与预测结果相符。加入 IPTG 后, 随着时间增加, 蛋白表达量逐渐增加, 实验组独角雪冰鱼和尼罗罗非鱼重组质粒表达量明显多于空载体对照。Western Blotting 结果表明表达的蛋白是 *HSP90 $\beta$*  蛋白 (图 4b)。

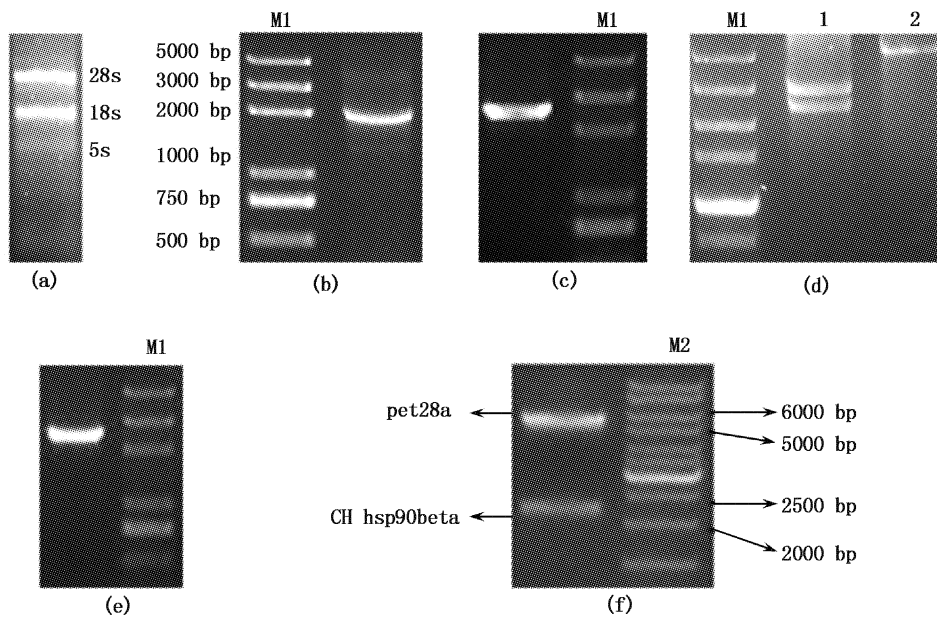


图 1 独角雪冰鱼 pET28-*HSP90 $\beta$*  表达载体构建及重组质粒的酶切鉴定

Fig. 1 Construction of *C. hamatus* pET28-*HSP90 $\beta$*  and screening for recombinant clones

(a). 独角雪冰鱼总 RNA; (b). *HSP90 $\beta$*  PCR 片段; (c). pBLUE-T-*HSP90 $\beta$*  阳性菌液 PCR 验证; (d). pET28a(+) 双酶切前后比较: 1. pET28a(+) 双酶切产物; 2. pET28a(+) 质粒; (e). pET28-*HSP90 $\beta$*  阳性菌液 PCR 验证; (f). pET28-*HSP90 $\beta$*  重组质粒酶切鉴定 (pET28a; 5330bp, *C. hamatus HSP90 $\beta$* ; 2200bp); M1. DL5000; M2. SM0331。

(a). Total RNA of *C. hamatus*; (b). *HSP90 $\beta$*  PCR segment; (c). Screening for pBLUE-T-*HSP90 $\beta$*  recombinant clones by PCR; (d). Comparison between pET28a(+) digested and non-digested; 1. pET28a(+) digested with *EcoRI* and *XhoI*; 2. pET28a(+) vector; (e). Screening for pET28-*HSP90 $\beta$*  recombinant clones by PCR; (f). pET28-*HSP90 $\beta$*  digested with *EcoRI* and *XhoI*; M1. DL5000; M2. SM0331.

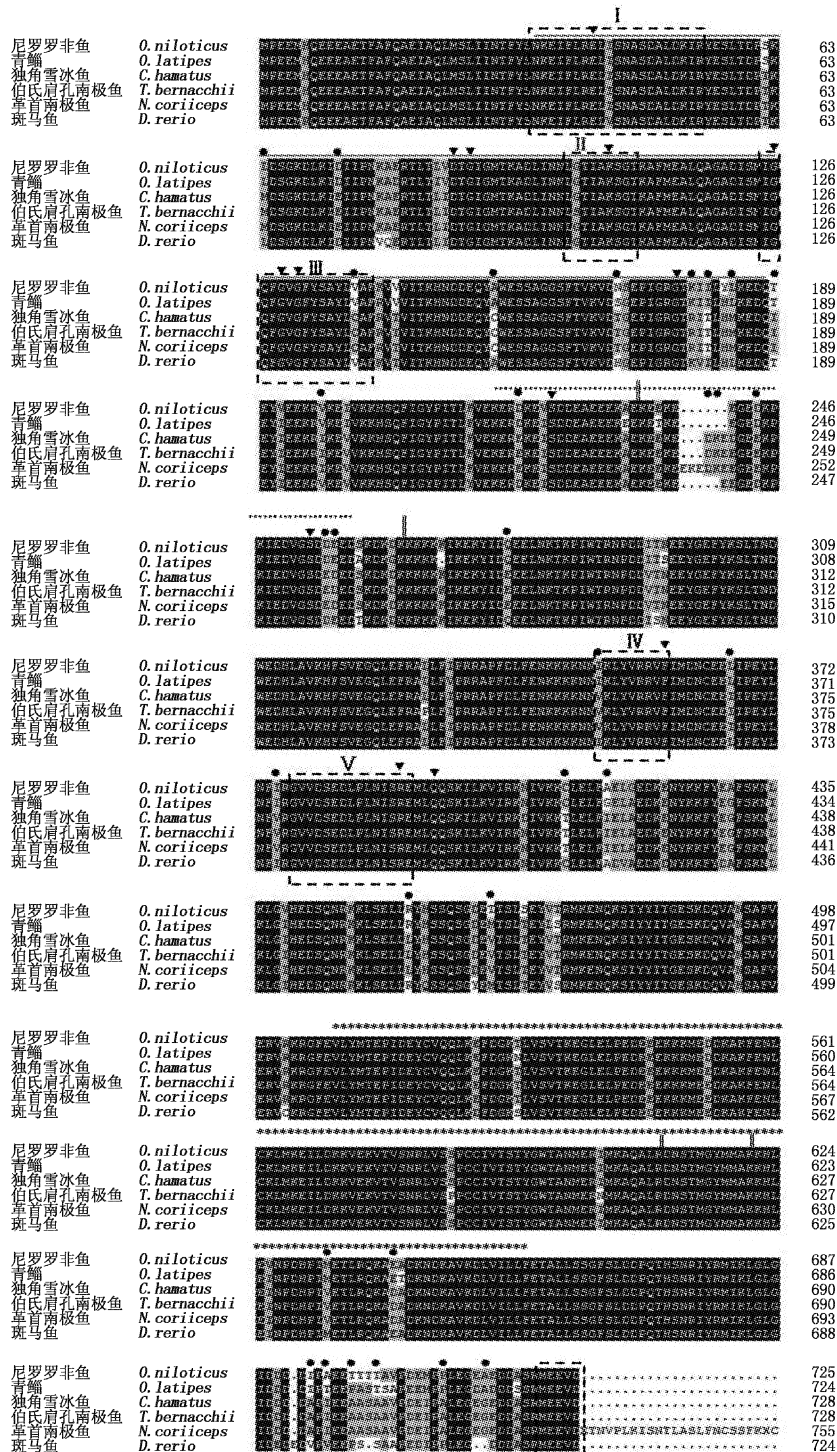


图2 HSP90β 氨基酸序列多重比对及保守结构域和功能位点分析

Fig.2 Alignment of HSP90β amino acid sequences and analysis of conservative domain structure and functional sites

虚线框表示 HSP90 家族保守信号区 ( I - V ),单划线表示 HSP90β\_HATPase 结构域 (第 34 - 188 个氨基酸残基), \* 表示螺旋结构, ... 表示富含谷氨酰胺区域,黑三角标注非常重要的 HSP90β 功能位点,黑点标注独角雪冰鱼和尼罗罗非鱼氨基酸位点差异,“|”五个不同的结构域的分界。

Dashed box said conserved signal area, “single line” for the HSP90β\_HATPase domain (34 - 188th amino acid residues), “\*” stands for four-helical cytokine, “...” donates Glutamic acid-rich region, “▼” for the functionally important residues experimentally identified, “●” shows differences between *Chionodraco hamatus* and *Oreochromis niloticus*, five different regions are separated by “|”.

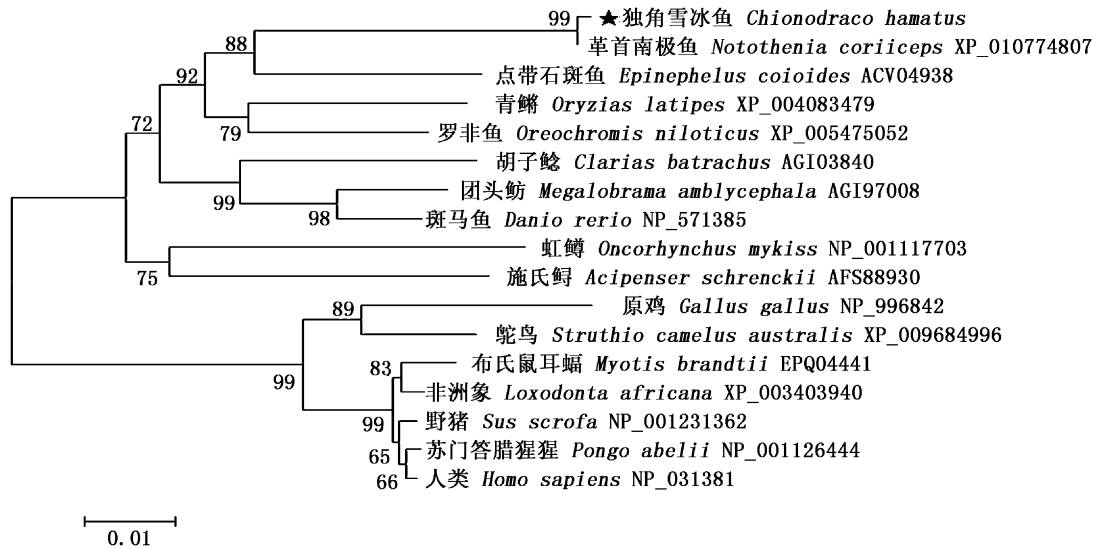


图3 *HSP90 $\beta$*  氨基酸序列构建的 NJ 树

Fig. 3 The neighbor joining (NJ) consensus tree constructed based on *HSP90 $\beta$*  amino acid sequences

各分支上的数字为自引导值(重复 500 次)。

Numbers on the branches are the bootstrap values obtained from 500 replicates.

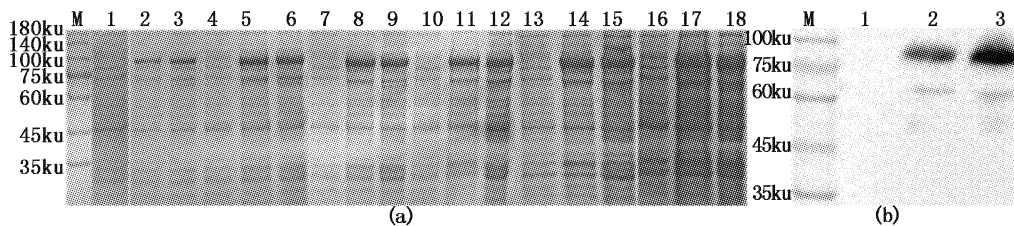


图4 重组质粒 pET28-*HSP90 $\beta$*  在 *E. coli* BL21 (DE3) 中的表达

Fig. 4 Expression of pET28-*HSP90 $\beta$*  in *E. coli* BL21 (DE3)

(a). 1, 4, 7, 10, 13, 16 分别为加入 IPTG 后 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h 的阴性对照(空载 pET28a); 2, 5, 8, 11, 14, 17 分别为相对应的独角雪冰鱼 pET28-*HSP90 $\beta$* ; 3, 6, 9, 12, 15, 18 分别为不同时间的尼罗罗非鱼 pET28-*HSP90 $\beta$* 。

(b). Western blotting, 1. pET28a 空载体; 2. 独角雪冰鱼 pET28-*HSP90 $\beta$* ; 3. 尼罗罗非鱼 pET28-*HSP90 $\beta$* ; M: RM013。

(a). 1, 4, 7, 10, 13, 16: negative control of different time (2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, respectively); 2, 5, 8, 11, 14, 17: *C. hamatus* pET28-*HSP90 $\beta$*  of different time (2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, respectively); 3, 6, 9, 12, 15, 18: *Oreochromis niloticus* pET28-*HSP90 $\beta$*  of different time (2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, respectively)。

(b). Western blotting, 1. pET28a vector; 2. *C. hamatus* pET28-*HSP90 $\beta$* ; 3. *O. niloticus* pET28-*HSP90 $\beta$*  M: Protein Marker RM013。

## 2.4 低温胁迫下大肠杆菌生长状况

将 4 °C 处理 0、4、8、12 h 的平板转移到 37 °C 培养箱培养 20 h, 计数每个平板上长出的单克隆的个数。低温处理 4 h 时, 三者数量上没有显著性差异, 当低温处理时间延长至 8 h 和 12 h 时, *C. hamatus*-*HSP90 $\beta$*  组的大肠杆菌细胞存活率高于其余两组, 出现了显著性差异。在 4 °C 处理 8 h 条件下, *C. hamatus*-*HSP90 $\beta$*  组和 *O. niloticus*-*HSP90 $\beta$*  组, *C. hamatus*-*HSP90 $\beta$*  组和 pET28a 空载对照组 (control) 都存在显著性差异, 其中 *C. hamatus*-*HSP90 $\beta$*  组和 control 组存在极显著差异 ( $P < 0.01$ , 图 5)。4 °C 处理 12 h, *C. hamatus*-*HSP90 $\beta$*  组和 *O. niloticus*-*HSP90 $\beta$*  组, *C. hamatus*-

*HSP90 $\beta$*  组和 pET28a 空载对照组 (control) 均存在极显著性差异 ( $P < 0.01$ , 图 5)。

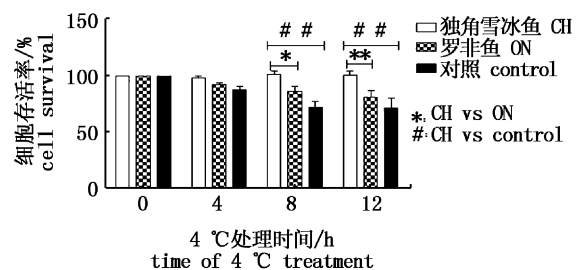


图5 低温处理大肠杆菌细胞存活率

Fig. 5 Viability of *E. coli* BL21 transformant for pET28-*HSP90 $\beta$*  subjected to 4 °C treatment

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

### 3 讨论

本研究克隆了独角雪冰鱼 *HSP90 $\beta$*  基因的开放阅读框全长,其氨基酸序列与其他鱼类的 *HSP90* 具有较高的同源性,说明 *C. hamatus* 的 *HSP90 $\beta$*  具有较高的保守性。对 *C. hamatus* 的 *HSP90 $\beta$*  的氨基酸序列进行结构域分析发现,其含有 *HSP90* 的 5 个保守信号区,第 34 ~ 188 个氨基酸残基处具有 HATPase 活性,同时一些负责 ATP 结合和水解、重要的底物结合、结构域间相互作用和被酪蛋白激酶磷酸化的重要功能位点的氨基酸残基非常保守。

生活在不同环境中的生物,其耐低温的机制不尽相同,当极地生物长期生活在极端寒冷的南极水域,海水温度低于其体液冰点,但这些生物体内不结冰,避免了结冰对组织的损伤,这种耐低温机制称为过冷机制<sup>[25]</sup>。南极鱼的血清中的糖蛋白能够降低体液的冰点,是一种生物抗冻剂<sup>[25]</sup>。冬鲈血清中的抗冻多肽含有 8 种氨基酸,其中 60% 为丙氨酸<sup>[26]</sup>。抗冻糖蛋白的组成单元为糖三肽,其中三肽为丙氨酸-丙氨酸-苏氨酸。本研究中,通过六种鱼的氨基酸序列比对发现,南极鱼与非南极鱼的 *HSP90 $\beta$*  蛋白有 32 个位点差异,其中有 5 个位点在南极鱼中由丙氨酸取代其他氨基酸,有 3 个位点由苏氨酸代替其他氨基酸,可以推测南极鱼的 *HSP90 $\beta$*  蛋白通过增加丙氨酸和苏氨酸的数量来增强该蛋白的抗冻能力。床疣杜父鱼 (*Myoxocephalus verrucosus*) 血清中的抗冻多肽含有较多的非极性氨基酸<sup>[27]</sup>。在南极鱼与非南极鱼的 *HSP90 $\beta$*  蛋白差异位点中,有 5 个位点处的氨基酸由其他氨基酸替换为非极性的异亮氨酸,可以推测南极鱼通过增加非极性氨基酸的数量来提高 *HSP90 $\beta$*  蛋白的抗冻能力。但是在海渡鸦 (*Hemipterus americanus*) 的抗冻多肽分子中却只含有少量的丙氨酸,但含有大量的甘氨酸和芳香族氨基酸。每一类生物的抗低温机制不尽相同,南极鱼 *HSP90* 蛋白如何通过氨基酸序列变化和蛋白空间结构的改变来适应南极环境,其低温适应的具体机制还有待于进一步研究。

非胁迫状态下,*HSP90* 约占大多数组织细胞总蛋白的 1% ~ 2%,当受到外界不利条件刺激时,在细胞中的表达量上升,约占到细胞蛋白的

4% ~ 6%,对细胞起到修复和保护的作用<sup>[28]</sup>。过量表达番茄叶绿体中的 sHSPs,番茄的冷害症状轻于未表达的番茄,提高了植物的抗寒性<sup>[29]</sup>,这说明 HSP 在提高植物抗冷害方面的重要作用。赵风云<sup>[30]</sup>用转化含有草鱼 *HSP90* ATPase 的 cDNA 质粒的大肠杆菌做 4℃ 低温胁迫实验,发现经过低温处理 2 ~ 10 d 的实验组大肠杆菌细胞存活率高于空载对照组。本研究的实验结果中,4℃ 低温处理大肠杆菌 8 h 和 12 h,相对于空载和罗非鱼对照组,*C. hamatus-HSP90 $\beta$*  显著提高了低温下大肠杆菌细胞的存活率,表明 *C. hamatus-HSP90 $\beta$*  同样具有低温胁迫下的细胞保护功能。

许多南极物种即使存在一些基因<sup>[31]</sup>和转录本,但是这些分子却不能表达,伯氏肩孔南极鱼 (*Trematomus bernacchii*)<sup>[12]</sup> 和窄体南极鱼 (*Notothenia angustata*)<sup>[32]</sup> 经过高温诱导后无热休克反应,HOFMANN 等<sup>[33]</sup>的研究表明其热休克反应的缺失是由于诱导型 *HSP70* 的组成型表达,所以南极鱼 *HSP* 基因家族的表达模式可能发生了改变以适应这种接近零度的低温环境。本研究中,低温处理 4 h 条件下,*C. hamatus-HSP90 $\beta$*  组与 *O. niloticus-HSP90 $\beta$*  和空载 pET28a (control) 组没有显著性差异;低温处理 8 h,*C. hamatus-HSP90 $\beta$*  组与其他两组都出现显著性差异,其中 *C. hamatus-HSP90 $\beta$*  组与空载 pET28a (control) 组之间存在极显著性差异 ( $P < 0.01$ );4℃ 处理 12 h,*C. hamatus-HSP90 $\beta$*  组与 *O. niloticus-HSP90 $\beta$*  和空载 pET28a (control) 组均存在极显著性差异 ( $P < 0.01$ )。随着低温处理时间的延长,细胞存活率的差异越来越大,且 *C. hamatus-HSP90 $\beta$*  对细胞存活率的影响明显高于 *O. niloticus-HSP90 $\beta$* ,与热带鱼类相比,*C. hamatus-HSP90 $\beta$*  可能更加具有低温环境的适应性。

目前,南极鱼 *HSP* 的研究大多是高温 (+4℃) 刺激活体样本后,观察其转录组水平 *HSPs* 的表达量变化或者表达的 *HSP* 亚型数量的变化,以研究其热休克反应缺失的机制和低温适应性进化的分子机制<sup>[34-35]</sup>。6℃ 热激真裸南极鱼 (*Harpagifer antarcticus*) 2 ~ 48 h 过程中,*HSP70*、*HSC70* 和 *GRP78* 基因的表达都下调,其中 *GRP78* 基因的下调高达 100 倍,这提示真裸南极鱼可能已丧失了热休克反应能力<sup>[36]</sup>。本项研究首次克隆了独角雪冰鱼的 *HSP90 $\beta$*  基因的开放阅读框全

长,用软件推测其氨基酸序列,并对其氨基酸序列特点和保守结构域进行分析。大肠杆菌的低温胁迫实验以尼罗罗非鱼和空载体为对照,说明 *C. hamatus-HSP90 $\beta$*  可能更加具有低温环境的适应性,这为后续进一步研究 *HSP90 $\beta$*  基因在南极鱼低温适应过程中的功能打下了基础。但是生物低温适应的具体机制不尽相同,HSPs 参与低温适应的具体分子机制还有待于进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 陈主初. 病理生理学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2001: 191-194.  
CHEN Z C. Pathologic physiology[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001:191-194.
- [2] 冯冰冰, 牛东红, 钟玉民, 等. 缢蛏 ScHsc70 cDNA 的分子特性和表达分析[J]. 中国水产科学, 2012, 19(1): 33-44.  
FENG B B, NIU D H, ZHONG Y M, et al. Molecular characteristics and expression analysis of ScHsc70 cDNA in agamaki clam (*Sinonovacula constricta*) [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(1): 33-44.
- [3] VOS M J, HAGEMAN J, CARRA S, et al. Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families [J]. Biochemistry, 2008, 47(27): 7001-7011.
- [4] REBBE N F, HICKMAN W S, LEY T J, et al. Nucleotide sequence and regulation of a human 90-kDa heat shock protein gene [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(25): 15006-15011.
- [5] JACKSON S E. Hsp90: structure and function [C]. Topics in Current Chemistry, 2013, 328: 155-240.
- [6] 李艳光, 曹富民. HSP90 的功能及 HSP90 抑制剂的研究进展[J]. 食管外科电子杂志, 2013, 1(4): 168-172.  
LI Y G, CAO F M. Research progress on the function of HSP90 and inhibitor of HSP90 [J]. Electronic Journal of Esophageal Surgery, 2013, 1(4): 168-172.
- [7] 田照辉, 徐绍刚, 王巍, 等. 急性热应激对西伯利亚鲟 HSP70 mRNA 表达、血清皮质醇和非特异性免疫的影响[J]. 水生生物学报, 2013, 37(2): 344-350.  
TIAN Z H, XU S G, WANG W, et al. Effects of acute thermal stress on hsp70 mrna, physiology and nonspecific immunity in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(2): 344-350.
- [8] 刘波, 王美垚, 谢骏, 等. 低温应激对吉富罗非鱼血清生化指标及肝脏 HSP70 基因表达的影响[J]. 生态学报, 2011, 31(17): 4866-4873.  
LIU B, WANG M Y, XIE J, et al. Effects of acute cold stress on serum biochemical and immune parameters and liver HSP70 gene expression in GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Acta Ecologica Sinica, 2011, 31(17): 4866-4873.
- [9] ZHANG X Y, ZHANG M Z, ZHENG C J, et al. Identification of two hsp90 genes from the marine crab, *Portunus triuberculatus* and their specific expression profiles under different environmental conditions [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2009, 150(4): 465-473.
- [10] PARKES G. Fishes of the southern ocean [J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 1992, 2(4): 344-345.
- [11] PUCCIARELLI S, PARKER S K, DETRICK III H W, et al. Characterization of the cytoplasmic chaperonin containing TCP-1 from the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* [J]. Extremophiles, 2006, 10(6): 537-549.
- [12] HOFMANN G, BUCKLEY B A, AIRAKSINEN S, et al. Heat-shock protein expression is absent in the antarctic fish *Trematomus bernacchii* (family Nototheniidae) [J]. The Journal of Experimental Biology, 2000, 203(15): 2331-2339.
- [13] PLACE S P, ZIPPAY M L, HOFMANN G E. Constitutive roles for inducible genes: evidence for the alteration in expression of the inducible hsp70 gene in Antarctic notothenioid fishes [J]. American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2004, 287(2): 429-436.
- [14] O'BRIEN K M, SIDELL B D. The interplay among cardiac ultrastructure, metabolism and the expression of oxygen-binding proteins in Antarctic fishes [J]. The Journal of Experimental Biology, 2000, 203(8): 1287-1297.
- [15] SIDELL B D, O'BRIEN K M. When bad things happen to good fish: the loss of hemoglobin and myoglobin expression in Antarctic icefishes [J]. The Journal of Experimental Biology, 2006, 209(10): 1791-1802.
- [16] DETRICK III H W, PARKER S K, WILLIAMS JR R C, et al. Cold adaptation of microtubule assembly and dynamics-Structural interpretation of primary sequence changes present in the alpha- and beta-tubulins of antarctic fishes [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(47): 37038-37047.
- [17] DEVRIES A L, CHENG C H C. Antifreeze proteins and organismal freezing avoidance in polar fishes [J]. Fish Physiology Series, 2005, 22: 155-201.
- [18] CHENG C H C, CZIKO P A, EVAN C W. Nonhepatic origin of notothenioid antifreeze reveals pancreatic synthesis as common mechanism in polar fish freezing avoidance [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(27): 10491-10496.
- [19] FEDER M E, HOFMANN G E. Heat shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology [J]. Annual Review of Physiology, 1999, 61: 243-282.
- [20] PLACE S P, HOFMANN G E. Temperature interactions of the molecular chaperone Hsc70 from the eurythermal marine



- goby Gillichthys mirabilis* [J]. The Journal of Experimental Biology, 2004, 204: 2675 – 2682.
- [21] CHEN Z Z, CHENG C H C, ZHANG J F, et al. Transcriptomic and genomic evolution under constant cold in Antarctic notothenioid fish [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(35): 12944 – 12949.
- [22] MIOT M, REIDY M, DOYLE S M, et al. Species-specific collaboration of heat shock proteins (Hsp) 70 and 100 in thermotolerance and protein disaggregation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(17): 6915 – 6920.
- [23] OBERMANN W M J, SONDERMANN H, RUSSO A A, et al. In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis [J]. The Journal of Cell Biology, 1998, 143(3): 901 – 910.
- [24] CHEN B, ZHONG D B, MONTEIRO A. Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms [J]. BMC Genomics, 2006, 7: 156.
- [25] 陶云霞, 袁绍颀. 动物抗低温机制的研究 [J]. 生物工程进展, 1990, 15(1): 26 – 30.  
TAO Y X, YUAN S Y. Anti low temperature mechanism of animal [J]. Progress in Biological Engineering, 1990, 15(1): 26 – 30.
- [26] FLETCHER G L, IDLER D R, VAISIUS A, et al. Hormonal regulation of antifreeze protein gene expression in winter flounder [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1989, 7(1/6): 387 – 393.
- [27] REISMAN H M, FLETCHER G L, KAO M H, et al. Antifreeze proteins in the grubby sculpin, *Myoxocephalus aeneus* and the tomcod, *Microgadus tomcod*: comparisons of seasonal cycles [J]. Environmental Biology of Fishes, 1987, 18(4): 295 – 301.
- [28] PRATT W B. The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors [J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1998, 217(4): 420 – 431.
- [29] 王丽, 赵春梅, 王义菊, 等. 过量表达叶绿体小分子热激蛋白提高番茄的抗寒性 [J]. 植物生理与分子生物学报, WANG L, ZHAO C M, WANG Y J, et al. Overexpression of chloroplast-localized small molecular heat-shock protein enhances chilling tolerance in tomato plant [J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2005, 31(2): 167 – 174.
- [30] 赵风云. 草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) Hsp90、Wap65 基因的克隆、表达特性及功能分析 [D]. 南昌: 南昌大学, 2011: 1 – 43.  
ZHAO F Y. Cloning, expression characteristics and functional analysis of Hsp90 and Wap65 genes from grass carp [D]. Nanchang: Nanchang University, 2011: 1 – 43.
- [31] COCCA E, RATNAYAKE-LECAMWASAM M, PARKER S K, et al. Do the hemoglobinless icefishes have globin genes? [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 1997, 118(4): 1027 – 1030.
- [32] HOFMANN G E, LUND S G, PLACE S P, et al. Some like it hot, some like it cold: the heat shock response is found in New Zealand but not Antarctic notothenioid fishes [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2005, 316(1): 79 – 89.
- [33] PLACE S P, HOFMANN G E. Constitutive expression of a stress-inducible heat shock protein gene, hsp70, in phylogenetically distant Antarctic fish [J]. Polar Biology, 2005, 28(4): 261 – 267.
- [34] BUCKLEY B A, SOMERO G N. cDNA microarray analysis reveals the capacity of the cold-adapted Antarctic fish *Trematomus bernacchii* to alter gene expression in response to heat stress [J]. Polar Biology, 2009, 32(3): 403 – 415.
- [35] HUTH T J, PLACE S P. De novo assembly and characterization of tissue specific transcriptomes in the emerald notothen, *Trematomus bernacchii* [J]. BMC Genomics, 2013, 14: 805.
- [36] CLARK M S, FRASER K P P, BURNS G, et al. The HSP70 heat shock response in the Antarctic fish *Harpagifer antarcticus* [J]. Polar Biology, 2008, 31(2): 171 – 180.

## Cloning and prokaryotic expression of *HSP90 $\beta$* cDNA sequence of an Antarctic icefish *Chionodraco hamatus*

LIU Xiurong<sup>1</sup>, WANG Congcong<sup>1,2</sup>, XU Qianghua<sup>1,2,3,4,5</sup>

(1. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Ocean Fisheries Resources, Ministry of Education, Shanghai 201306, China; 3. Scientific Observing and Experimental Station of Oceanic Fishery Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China; 4. National Engineering Research Center for Oceanic Fisheries, Shanghai 201306, China; 5. Collaborative Innovation Center for Distant-water Fisheries, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In order to testify the correlations between Antarctic fish *HSP90 $\beta$*  protein and coldness adaptation, we cloned the complete open reading frame of the *HSP90 $\beta$*  gene from an Antarctic icefish, *Chionodraco hamatus* and investigated the prokaryotic expression of *C. hamatus-HSP90 $\beta$*  protein under cold stresses. As a control, the ORF of *Oreochromis niloticus HSP90 $\beta$*  was also cloned. Results showed that the coding region of *C. hamatus HSP90 $\beta$*  gene is 2184 bp in length, encoding 728 amino acids. Multiple sequence alignment results showed that *C. hamatus HSP90 $\beta$*  shared more than 87% identities with other fishes. Protein domain analysis showed that *C. hamatus HSP90 $\beta$*  possessed the conserved domain of the HSP90 family, and showed highly conserved in the important functional site. Recombinant pET28-CH-HSP90 and pET28-ON-HSP90 prokaryotic expression plasmids were constructed and expressed in *Escherichia coli* to testify the function of *C. hamatus HSP90 $\beta$*  under 4°C stress. Results showed that the survival rate of *C. hamatus-HSP90 $\beta$*  group was significantly higher than that of the *O. niloticus-HSP90 $\beta$*  and the control group. Our results indicated that *C. hamatus HSP90 $\beta$*  protein possessed more remarkable protective effects against cold stress and *HSP90 $\beta$*  protein might be involved in cold adaptation physiological process in *C. hamatus*.

**Key words:** *HSP90 $\beta$* ; Antarctic icefish; conserved domain; cold adaptation; survival rate of cells