

# 澳洲宝石鲈热休克蛋白 90- $\beta$ 基因(*HSP90- $\beta$* )的 cDNA 克隆与表达\*

高淞泽, 孙彩云, 吴金英, 叶航宇, 李文笙

(中山大学生命科学院/水生经济动物研究所暨广东省水生经济动物良种繁育重点实验室/  
广东省重要经济鱼类健康养殖工程技术研究中心, 广东 广州 510275)

**摘要:** 热休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs) 在鱼类的应激与免疫反应中起着重要的作用, HSP90- $\beta$  是该家族的重要成员。为了探讨澳洲宝石鲈 (*Scortum barcoo*) HSP90- $\beta$  在免疫应答中的作用, 本研究首次克隆得到了澳洲宝石鲈 HSP90- $\beta$  的全长 cDNA 序列。该序列长 2 708 bp, 其中 5' UTR 长 86 bp, 3' UTR 长 444 bp, ORF 长 2 178 bp, 编码 725 个氨基酸, 相对分子质量约为 83 200, 具有 5 个 HSP90 家族的特征序列, 没有信号肽序列和跨膜结构域, 与其他鱼类 HSP90- $\beta$  氨基酸的序列一致性皆超过 90%。正常情况下, 澳洲宝石鲈 HSP90- $\beta$  mRNA 主要在肝脏表达。而感染无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 后, 其在肝组织中的表达呈先降低后增加的趋势, 在脾脏、头肾和脑组织则呈先上升后下降的趋势。这些结果表明澳洲宝石鲈 HSP90- $\beta$  可能参与了无乳链球菌感染引发的免疫反应。

**关键词:** 澳洲宝石鲈; HSP90- $\beta$ ; 分子克隆; 表达

**中图分类号:** Q17 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2020) 04-0007-12

## Molecular cloning and expression analysis of heat shock protein 90- $\beta$ cDNA in jade perch (*Scortum barcoo*)

GAO Songze, SUN Caiyun, WU Jinying, YE Hangyu, LI Wensheng

(Institute of Aquatic Economic Animals and Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic  
Animals / Guangdong Provincial Engineering Technology Research Center for Healthy Breeding of  
Important Economic Fish / School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** Heat shock proteins (HSPs) play important roles in fish stress and immune response, and HSP90- $\beta$  is an important member of the HSPs family. In the present study, to investigate the possible role of HSP90- $\beta$  in the immune response, the full-length cDNA sequence of HSP90- $\beta$  was first cloned from jade perch (*Scortum barcoo*). The size of the full-length cDNA of jade perch HSP90- $\beta$  is 2 708 bp, of which 5' UTR is 86 bp, 3' UTR is 444 bp, and ORF is 2 178 bp, which encodes 725 amino acids. The molecular weight of jade perch HSP90- $\beta$  is predicted as 83 200. And this protein owns five characteristic sequences of the HSP90 family. Moreover, it has no signal peptide and transmembrane domain. Phylogenetic analysis showed that the amino acid sequence identity of jade perch HSP90- $\beta$  is more than 90% with those of other fishes. Under normal circumstances, the HSP90- $\beta$  mRNA of jade perch is main-

\* 收稿日期: 2019-10-29

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金项目; 国家特色鱼淡水鱼产业技术体系 (CARS-46); 现代农业人才支撑计划项目 (2016-2020)

作者简介: 高淞泽 (1993年生), 男; 研究方向: 鱼类生理和鱼类免疫学; E-mail: gaosz@mail2.sysu.edu.cn

通信作者: 吴金英 (1963年生), 女; 研究方向: 鱼类生理和鱼类免疫学; E-mail: lsswjy@mail.sysu.edu.cn

ly expressed in the liver. After infection with *Streptococcus agalactiae*, the *HSP90-β* mRNA expression decreased first and then increased in liver. Differently, it increased first and then decreased in spleen, head kidney and brain. This result suggests that the *HSP90-β* may be involved in the immune response elicited by *S. agalactiae* infection in jade perch.

**Key words:** *Scortum barcoo*; *HSP90-β*; molecular cloning; expression analysis

热休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs) 广泛存在于细菌, 哺乳动物和植物中, 是一类高度保守的应激蛋白, 在应对环境压力等方面发挥着关键作用<sup>[1-2]</sup>。根据表观相对分子质量, HSPs 可分为几个家族: HSP110, HSP90, HSP70, HSP60 和低相对分子质量 HSP<sup>[3-4]</sup>。在所有 HSP 家族中, HSP90 是一种高度保守、蕴含量丰富的细胞蛋白, 占非应激条件下大多数组织中总细胞蛋白的 1% ~ 2%<sup>[5]</sup>。HSP90 主要在细胞质中表达, 分为 HSP90- $\alpha$  (诱导型) 和 HSP90- $\beta$  (组成型) 两种<sup>[6]</sup>。其中 HSP90- $\beta$  的 N 末端缺乏富含谷氨酰胺的序列 (QTQDQ), 并且相对分子质量大于 HSP90- $\alpha$ 。有研究指出这两种蛋白有着不同的分子伴侣功能<sup>[7]</sup>。HSP90 在细胞增殖、分化和凋亡等多种细胞过程中发挥着关键作用<sup>[8]</sup>。通过活性的改变它可以调节蛋白质折叠, 诱导多种恶性肿瘤和神经系统疾病状态下错误折叠及突变蛋白质的水解<sup>[9-12]</sup>。目前, HSP90 抑制剂已在肿瘤化疗领域进行了人体临床试验<sup>[10]</sup>。HSP90 还参与免疫反应, 它是主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) I 类和 II 类分子进行抗原加工和呈递的调节剂<sup>[13-14]</sup>。对 MHC I 类分子途径的研究表明, HSP90- $\alpha$  可指导抗原加工或选择表位用于呈递<sup>[15]</sup>。而在 MHC II 类分子途径中, HSP90- $\alpha$  和 HSP90- $\beta$  均参与谷氨酸脱羧酶 (glutamate decarboxylase, GAD) 抗原的呈递, 并调节 T 细胞对自身和潜在外来抗原反应的发展进程<sup>[6]</sup>。另外, HSP90 具可诱导性, 热休克<sup>[16-17]</sup>、细菌感染<sup>[18]</sup> 和重金属<sup>[19]</sup> 等刺激均可诱导、调节 HSP90 的表达。

水体环境是一个复杂多变的系统, 水生动物通常面临热休克、细菌、病毒和缺氧等各种环境压力<sup>[20]</sup>。而 HSP90 有助于水生动物抵抗各种环境压力, 以适应复杂多变的环境。这在海湾扇贝 (*Argopecten irradians*)<sup>[21]</sup>、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)<sup>[22]</sup>、塞内加尔鲷 (*Solea soled*)<sup>[23]</sup>、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[24]</sup>、宽体沙鳅 (*Botia reevesae*)<sup>[25]</sup> 和鲢鱼 (*Müchthys miiuy*)<sup>[26]</sup> 中已有相关报道。然而, 硬骨鱼类 HSP90 基因的功能研究仍然

有限, 有待于进一步丰富和完善。澳洲宝石鲈 (*Scortum barcoo*) 隶属于鲈形目 (Perciformes)、鲷科 (Terapontidae)、革鲷属 (*Scortum*), 原产于澳大利亚的艾尔湖, 是澳大利亚众多石鲈之一。因其生长速度快, 抗病能力强, 耐低氧, 肉质鲜嫩口感好, 经济效益高, 于 2004 年被成功引入我国<sup>[27]</sup>。澳洲宝石鲈非常适合在循环水产养殖系统 (recirculating aquaculture system, RAS) 中集约化养殖, 因而极具养殖推广价值<sup>[28]</sup>。然而, 养殖的集约化和养殖规模的扩大给病原体的传播提供了便利, 澳洲宝石鲈出现的病害也越来越多。例如, 由海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*)<sup>[29]</sup> 引起的出血性败血症, 爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*)<sup>[30]</sup> 引起的爱德华氏菌病, 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)<sup>[31]</sup> 引起的体表溃烂病等。近年来, 澳洲宝石鲈也开始出现无乳链球菌感染<sup>[32]</sup>, 但其疾病防治等方面的研究却鲜有报道, 免疫相关基因的研究仍然空白。

为了探究澳洲宝石鲈 HSP90- $\beta$  在细菌引起的免疫反应中的作用, 我们运用 cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE), 首次从澳洲宝石鲈的肝脏中克隆得到了 HSP90- $\beta$  的全长 cDNA 序列; 将其氨基酸序列与其他鱼类、两栖类、鸟类, 以及哺乳动物进行了同源性分析, 并构建了分子系统树; 分析了澳洲宝石鲈 HSP90- $\beta$  mRNA 在不同组织的表达情况, 以及无乳链球菌感染后其在不同时间段、不同组织的表达差异, 为进一步研究 HSP90- $\beta$  的功能及在免疫方面的应用提供了参考资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验鱼

实验所用的澳洲宝石鲈购于广东海洋与水产高科技园, 体质量 (76±16) g。实验前于 120 L 塑料缸中暂养, 水温 24 ~ 26 °C, 持续充气, 每日定时饱食性投喂 2 次, 并换水 1/3 体积。3 周后, 选取健康的澳洲宝石鲈进行实验。

## 1.2 澳洲宝石鲈 *HSP90- $\beta$* 的克隆

实验材料为健康澳洲宝石鲈。40 °C水温热激4 h后取肝脏组织, 依照 TRNzol Universal 总RNA 提取试剂 (天根, 中国) 说明书提取肝脏总RNA, 使用超微量分光光度计 NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, 美国) 检测其浓度, 并通过  $w=1\%$  琼脂糖凝胶电泳检验其完整性。使用逆转录试剂盒 FSQ-101 (TOYOBO, 日本) 进行逆转录PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)。反应条件为 37 °C, 15 min; 50 °C, 5 min; 4 °C, 5 min。

在NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) 中查找鲈形目鱼类 *HSP90- $\beta$*  的编码序列, 并用 DNAssist (2.2) 进行序列比对。找出保守序列, 并参照简并引物替换表设计简并引物, 使用高保

真酶 KOD One PCR Master Mix-Blue (TOYOBO, 日本) 进行PCR。反应条件为 95 °C, 1 min, 1个循环; 98 °C, 10 s, 1个循环; (98 °C, 10 s; 55 °C, 30 s; 68 °C, 5 s), 40个循环; 68 °C, 5 min, 1个循环; 4 °C,  $\infty$ 。将PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳, 并将目的条带切胶回收, 经测序得到核心片段序列, 并参照该序列设计RACE引物。使用TdT转移酶法进行RACE, 引物AP用于3' RACE模板的制作, 引物AAP用于5' RACE模板的制作。将5' RACE、3' RACE扩增得到的序列与NCBI数据库序列进行比对, 确认得到目的序列后, 将其与核心片段序列拼接得到完整的cDNA序列, 并从该序列上设计引物扩增得到完整的CDS。引物详见表1。

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in the study

Primers	Sequence (5'-3')	Function
AUAP	GGCCACGCGTGCAGTAGTAC	通用引物
AAP	GGCCACGCGTGCAGTAGTAC (G) <sub>10</sub>	制作5' RACE模板
AP	GGCCACGCGTGCAGTAGTAC (T) <sub>16</sub>	制作3' RACE模板
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	获得 <i>HSP90-<math>\beta</math></i> 核心片段
HSP90-38F-1 232 bp	GGAGYTGAACAAGACCAA	获得 <i>HSP90-<math>\beta</math></i> 核心片段
HSP90-38R-1 232 bp	TRCCCAGTCCRAGTTTGA	获得 <i>HSP90-<math>\beta</math></i> 核心片段
HSP90-3'-1 580-2 030 (450 bp)	GAGTTTGATGGCAAGAGCCTGGT	获得 <i>HSP90-<math>\beta</math></i> 3' RACE片段
5' 901-1040	TGAGAAGTGCTTGACAGCCAGGTGAT	获得 <i>HSP90-<math>\beta</math></i> 5' RACE片段
90 ORF F 2 700	TTTTCCATTTCCCTGCGTCAGA	获得 <i>HSP90-<math>\beta</math></i> ORF
90 ORF R 2 700	CATATGTGCTGTCACCATGAAC	获得 <i>HSP90-<math>\beta</math></i> ORF
HSP90 3-F-230	CTTTGTCCGTGGTGTGGTGG	检测 <i>HSP90-<math>\beta</math></i> 的表达
HSP90 3-R-230	AGAGCTTCTTGGCGTTTTGA	检测 <i>HSP90-<math>\beta</math></i> 的表达
$\beta$ -actin 3 F	TGCTGTCCCTGTATGCCTCTGG	$\beta$ -actin 内参基因定量检测
$\beta$ -actin 3 R	TGATGTCACGCACGATTTCCCT	$\beta$ -actin 内参基因定量检测

## 1.3 序列分析及分子系统树的构建

将所得cDNA序列导入ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), 点击“submit”, 得到预期的ORF的氨基酸序列。将氨基酸序列导入ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>), 点击“Compute parameters”, 即可得到检测序列表达蛋白的相对分子质量、理论等电点 (PI)、不稳定系数等基本信息; 导入SignalP-5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), 选择“Organism group : Eukarya”和“Output format :

Long output”, 点击“submit”即可预测该蛋白是否含有信号肽; 导入TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), 选择“Output format : Extensive, with graphics”, 点击“submit”, 预测该蛋白是否含有跨膜结构; 导入NetN-Glyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 和 NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>), 分别对该蛋白的糖基化位点和磷酸化位点进行预测。登录 <http://smart.embl-heidelberg.de/>, 在“Protein sequence”

框中输入澳洲宝石鲈 HSP90- $\beta$  氨基酸序列, 勾选“HMMER searches of the SMART database occur by default. You may also find”下的“PFAM domains”选项, 点击“Sequence SMART”进行结构域分析。在 NCBI 上搜索其他物种的 HSP90 氨基酸序列, 保存为 FASTA 文件。打开 DNAMAN 7.0.2.176, 选择“Sequence”菜单下子菜单“Alignment”中的“Multiple Sequence Alignment”选项。点击新弹出窗口中的“File”按钮, 导入要进行序列比对的 FASTA 文件, 选择序列下方的“Protein”选项。依次单击“下一步”, 完成序列比对。其中涉及到的蛋白质详细信息见表 2。将 FASTA 文件导入 MEGAX 采用邻接法 (neighbor-joining method, NJ) 构建系统进化树。

#### 1.4 组织分布

在 NCBI 中查找鱼类  $\beta$ -actin 基因序列进行序列比对, 设计简并引物克隆得澳洲宝石鲈  $\beta$ -actin 基因的部分序列, 并从该序列上设计用来做荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 的引物 (见表 1)。根据已获得的澳洲宝石鲈 HSP90- $\beta$  cDNA 序列设计并合成用于荧光定量 PCR 的引物 (见表 1)。进行荧光定量 PCR 实验所用的仪器为高通量实时荧光定量 PCR 仪 LightCycler480 (Roche, 美国), 反应条件为: 95  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s, 一个循环; (95  $^{\circ}\text{C}$ , 5 s; 60  $^{\circ}\text{C}$ , 10 s; 72  $^{\circ}\text{C}$ , 15 s), 40 个循环; 融解曲线分析 (melting curve analysis)。分别取 6 条澳洲宝石鲈的心、肝、脾、肠、胃、肾、肌肉、皮肤、头肾、脑、鳃组织, 使用 TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂 (天根, 中国) 提取总 RNA, 并使用 ReverTra Ace qPCR Rt Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, 日本) 进行反转录, 使用 SYBR Green I (TOYOBO, 日本) 于高通量实时荧光定量 PCR 仪 LightCycler480 (Roche, 美国) 上完成 qPCR。处理和取样前, 用丁香酚麻醉。取样过程中所用到的塑料容器皆经过无 RNase 处理, 取样金属器械经 180  $^{\circ}\text{C}$  处理 4 h 以上。

#### 1.5 无乳链球菌感染实验

实验所用无乳链球菌由中山大学生命科学学院李安兴教授惠赠。实验前, 挑取无乳链球菌单菌落于 5 mL 脑心浸液肉汤 (brain heart infusion broth, BHI) 液体培养基中, 30  $^{\circ}\text{C}$ , 200 r/min 条件下培养 24 h。然后按照 1:100 的比例扩培, 即 1 mL 菌液加入 99 mL BHI 培养基, 30  $^{\circ}\text{C}$ , 200 r/min 条件下培养 12 h。用分光光度计检测菌液的  $A$  为

0.6~0.8 时, 3 000  $\times\text{g}$  离心 5 min, 去上清液。用 PBS (pH 7.4) 重悬菌体, 3 000  $\times\text{g}$  离心 5 min, 重复该步骤 2 次。以 1/10 体系的 PBS (pH 7.4) 重悬菌体, 并进行梯度稀释, 涂板记录菌落个数, 进而估计菌液浓度。参照预实验测得的半数致死量 (median lethal dose, LD<sub>50</sub>) 上限 8.0 $\times$ 10<sup>7</sup> CFU/kg, 用无菌 PBS (pH 7.4) 将菌液浓度调整为 7.0 $\times$ 10<sup>7</sup> CFU/mL 用于正式无乳链球菌感染实验。将澳洲宝石鲈随机分组, 其中无乳链球菌感染组 (S 组) 120 尾, PBS 对照组 (P 组) 60 尾。S 组澳洲宝石鲈按照 1  $\mu\text{L/g}$  体质量的标准腹腔注射无乳链球菌菌液 (7.0 $\times$ 10<sup>7</sup> CFU/mL), P 组样本按照 1  $\mu\text{L/g}$  体质量的标准腹腔注射无菌 PBS。注射结束后, 将澳洲宝石鲈养在 120 L 塑料缸中, 每日投喂 2 次。水体持续充气, 每日更换 1/3 体积。水温保持在 24~26  $^{\circ}\text{C}$ 。选取注射后 6、12、24、48、72、96、120 和 144 h 这 8 个时间节点, 每个节点取 6 尾鱼的肝、脾、头肾和脑 4 个组织, 用于后续的 RNA 提取、RT-PCR 和 qPCR 实验。

#### 1.6 数据处理及作图方法

qPCR 数据分析, 以  $\beta$ -actin 为内参, 采用的数据统计方法为 2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup> 。组织分布实验, 以 HSP90- $\beta$  mRNA 在脾脏处的表达水平为基准将数据归一化, 使用 GraphPad Prism 8.0.1 (224) 进行数据的处理 (单因素方差分析) 及作图。无乳链球菌感染实验, 以对照组 HSP90- $\beta$  mRNA 的表达水平为基准将数据归一化, 使用 GraphPad Prism 8.0.1 (224) 进行数据的处理 (双因素方差分析) 及作图。

## 2 结果

### 2.1 澳洲宝石鲈 HSP90- $\beta$ 序列分析

澳洲宝石鲈 HSP90- $\beta$  的全长 cDNA 为 2 708 bp, 其中 5' 非编码区 (5' untranslated region, 5' UTR) 长 86 bp, 3' 非编码区 (3' untranslated region, 3' UTR) 为 444 bp, 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 为 2 178 bp, 编码 725 个氨基酸, 预测相对分子质量约为 83 200, 理论等电点为 4.91, 不稳定系数为 40.42。澳洲宝石鲈 HSP90- $\beta$  的氨基酸序列含有 5 个 HSP90 家族的特征序列 (NKEIFLRELISN [S/A] SDALDKIR, LGTIA [K/R] SGT, IGQFGVGFYSA [Y/F] LVA [E/D], IKLYVRRVFI 和 GVVDS [E/D] DLPLN [I/V] SRE), 但没有信号肽序列和跨膜结构域 (图 1)。

澳洲宝石鲈 HSP90- $\beta$  氨基酸序列在 <http://>

```

1      CCTTTCCATTTCCCTGCGTCAGAGCAGAAGGGATAACACATTGGTAGCATTTTTTTTCAAGAAAAATCAACGGATAAACAAG
87      ATGCCTGAAGAAATGCACCAAGAGGAGGGCTGAGACCTTCGCCTTCCAGCGGGAGATCGCTCAGTGATGCCCTGATTATCAACACCTTCTATCCAACAAGAGATCTCCTCAGG
1      M P E E M H Q E E E A E T F A F Q A E I A Q L M S L I I N T F Y S N K E I F L R
206    GAGTTGATCTCAACGCCTCTGATGCTCTGGACAAAATTCGCTATGAAAGCCTGACTGACCCACCAAGCTGGACAGTGGCAAGGATCTGAAAATTGACATCATCCCCAACAAAGCTGAC
41      E L I S N A S D A L D K I R Y E S L T D P T K L D S G K D L K I D I I P N K A D
326    CGCACCTGACCTCATCGATACTGGAATCGGCATGACCAAGCCGACCTGATTAACAACCTGGGTACCATCGCCAAGTCTGGCACCAAGCCTTCATGGAGGCCCTGCAGGCTGGAGCT
81      R T L T L I D T G I G M T K A D L I N N L G T I A K S G T K A F M E A L Q A G A
446    GACATTTCATGATTGGTCAITTTGGTGGGTTTCTACTCTGCTACTAGTTGCCGAGAAAGTTGTGTACTACTAAACACAAGATGATGAGCAGTATGCCTGGGAGTCTCTGCT
121    D I S M I G Q F G V G F Y S A Y L V A E K V V V V I T K H N D D E Q Y A W E S S A
566    GGAGGTTCTTCAAGTCAAGGTCGACAGCGCGGAGCCATTGGTGTGGAACAAGATCATCTGCACCTGAAGGAGGACGACGAGTACATTGAGGAGAAGGATCAAGGAAAT
161    G G S F T V K V D S G E P I G R G T K I I L H L K E D Q T E Y I E E K R I K E I
686    GTCAGAAGCCTCCAGTTCATCGCTACCCCTACCCCTGTTGTGGAGAAGGCGGACAGAAGGATCAGCGACGAGGACGAGGAGGAAAAGGCTGAGAAGATGAGAAAGAG
201    V K K H S Q F I G Y P I T L F V E K E R D K E I S D D E A E E E K A E K D E K E
806    GACGCGGAGGACAAGCAAGATTGAGGACGTTGGGCTCAGATGATGAGGAGGACTCTAAAGCAAGGACAAGAAGAACAAGAAGATCAAGGAGAAGTACATTACCAGGAGGAGCTG
241    D G E D K P K I E D V G S D D E E D S K D K D K K K T K K I K E K Y I D Q E E L
926    AACAGACCAAGCCCATCTGGACCGGAACCCAGACGACATCACAACAGGAGTACGGCGAGTCTACAAGAGTCTGACCAAGCAGCTGGGAGGATCACCTGGCTGTCAAGCAGTCTCAA
281    N K T K P I W T R N P D D I T N E E Y G E F Y K S L T N D W E D H L A V K H F S
1 046  GTGAGGGTCAGTGGAGTTCCGCGCCCTGCTTTCATTCCCGCGGGCACCTTTTGACTCTTTGAGAACAAGAAAAGAACAACATCAAGCTGACCTCAGGAGAGCTTCATC
321    V E G Q L E F R A L L F I P R R A P F D L F E N K K K N N I K L Y V R R V F I
1 166  ATGGACACTGTGAAGAGCTCATCCAGAGTACCTGAACCTTTGTCGCTGGTGTGGTGGACTCCGAGGACCTGCCCTCAACATCTCCAGAGAGATGTGCGACGAGCAAGATCTCAA
361    M D N C E E L I P E Y L N F V R G V V D S E D L P L N I S R E M L Q Q S K I L K
1 286  GTCATTGCAAGAACATCGTCAAGAAGTGTCTGGAGCTCTTCGCTGAACCTGGTGGAGGACAGGAGACTACAAGAAGTCTATGAAGTTTCTCTAAGAACATCAAGCTGGCATCCAC
401    V I R K N I V K K C L E L F A E L A E D K E N Y K K F Y E G F S K N I K L G I H
1 406  GAGGACTCTAAAACCGCAAGAAGCTCTCTGAGCTGCTGCGCTACCACAGTCCAGTCTGGAGATGAGACCACTCCCTCACAGAGTACCTGACCGCATGAAGAAAACCGAGAAATCC
441    E D S Q N R K K L S E L L R Y H S S Q S G D E T T S L T E Y L T R M K E N Q K S
1 526  ATCTACTACACTGTTGAGAGCAAGGATCAGTGGCCAACTCTGCCTTCGTCGAGCGCGTCCGCAAGCTGGCTTCGAGGTTCTGTACATGACAGACCCATTGACGAGTACTGTGTC
481    I Y Y I T G E S K D Q V A N S A F V E R V R K R G F E V L Y M T E P I D E Y C V
1 646  CAGCAGTTGAAGGATTTGATGGCAAGAGCTGCTCTGTCAACAAAGAGGCTGGAGCTGCCAGGAGCAGGAGGAGAAGAAAAGATGGAGGAGGATAAGGCCAGGTTTGAAGC
521    Q Q L K E F D G K S L V S V T K E G L E L P E D E E E K K K M E E D K A R F E S
1 766  CTCTGAAGCTCATGAAGGATCTCGACAAGAAAGTGAGAAAGGTGACAGTGTCCAACAGACTGGTGTCTCACCTGCTGCATTGTGACCAGCACTACGGCTGGACGGCCAAACATG
561    L C K L M K E I L D K K V E K V T V S N R L V S S P C C I V T S T Y G W T A N M
1 866  GAGAGGATCATGAAGGCCAGGCACTCAGGACAACTCCACCATGGGCTACATGATGGCAAGAAGCACCTGGAGATCAACCTGACCAACCCATCTGGAGACTCTCAGGCAAGAAGCA
601    E R I M K A Q A L R D N S T M G Y M M A K K H L E I N P D H P I V E T L R Q K A
2 006  GAAGCTGATAAGAAGCACAAGGCCGTGAAAGACCTCGTCACTCTGCTGTTCGAAACCCCTGCTGCTCAGGCTTCTACTAGACACCTCAGACCCACTCCAACCGCATCTACAGA
641    E A D K N D K A V K D L V I L L F E T A L L S S G F S L D D P Q T H S N R I Y R
2 126  ATGATCAAACCTGGACTGGGTATCGACGACGATGACCTCCACAGAGGAGCCCTTACATCCGTCOCAGATGAGATTCTCCCTAGAAAGCCGATGTTGACGACGATGTTCAACG
681    M I K L G L G I D D D V P T E E A T S T S V P D E I P P L E G D G D D D A S R
2 246  ATGGAAGAAGTCGATTA
721    M E E V D *
2 265  ACCAACCCCTCTCCAGATTCTCAACACTTTAGCCTCACTTTTCAATTGTTTCACTCTTAAACTGCAAGTAACTGCAAAAACAATAGTCATTATGTTGTGTGGTGGACGGTGTGCTCT
2 385  TGTGCCAGAGCATTACTCTGCAAGACCCCTTTAAGAAAAGCAGTTTGGTGTTCGCTTTCATGGTGACAGCACATATGTTTTAATGAGTACCTGTTGCACTGAGTTTAAATGTTGGA
2 505  GTGTTAAAGCTGTAACATGGGAATGGTACATTCCATTATCAGATCAGGCTGGGGAGGTTGGGACGTTCTGCTCATGTGCACACTGCACGCTGCATGGAGAGGAGCTGTATGATT
2 625  CTTTGCCTGAGTCCAGCCTGTCTGATCCAGCCTGTTGCAAAATTAAGCTGGATGCGGAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA

```

图 1 澳洲宝石鲈 *HSP90-β* cDNA 的核苷酸及氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and amino acid sequences of jade perch *HSP90-β* cDNA

粗线表示 HSP90 家族特征序列, 阴影表示磷酸化位点, 加粗字体为糖基化位点, 波浪线标示为起始密码子, 点式下划线表示终止密码子, 加粗斜体表示 "GxxGxG" 基序, 下划线表示 ployA 加尾信号

Bold lines indicate the HSP90 family characteristic sequences. The shade indicates the phosphorylation site. The bold font is the glycosylation site. The wavy line is indicated as the start codon, and the dotted underline indicates the stop codon. The bold font indicates the "GxxGxG" motif, the underscore indicates polyadenylation signal

smart. embl-heidelberg. de/中的结构域分析结果 (图2) 显示, 该序列包含一段长519个氨基酸残基的序列 (190~708, 519 AA) 符合HSP90蛋白家族特征。

## 2.2 同源性及进化树分析

澳洲宝石鲈与其他物种HSP90- $\beta$ 的氨基酸序列同源性分析结果如表2所示。澳洲宝石鲈与其他鱼类HSP90- $\beta$ 的氨基酸序列一致性皆在90%以上, 与鲢鱼的一致程度最高, 达到97.68%; 与小体鲟 (*Acipenser ruthenus*) 的一致程度最低, 为92.08%。

与其他鱼类的一致性分别为: 高体鲃鱼 (*Seriola dumerili*), 97.54%; 翘嘴鲌 (*Siniperca chuatsi*), 97.40%; 欧洲狼鲈 (*Dicentrarchus labrax*), 96.99%; 斑马鱼 (*Danio rerio*), 92.90%。除此之外, 其与两栖动物、鸟类, 乃至哺乳动物的一致性也较高: 非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*), 90.71%; 褐家鼠 (*Rattus norvegicus*), 90.03%; 智人 (*Homo sapiens*), 89.89%; 红原鸡 (*Gallus gallus*), 88.39%。可见HSP90- $\beta$ 在进化上非常保守, 不同物种的HSP90- $\beta$ 相似程度很高。

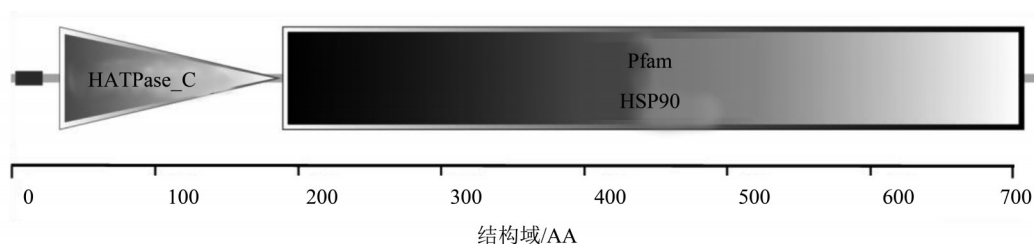


图2 澳洲宝石鲈HSP90- $\beta$ 结构域分析

Fig. 2 Analysis of the structure domain of jade perch HSP90- $\beta$

表2 澳洲宝石鲈HSP90- $\beta$ 氨基酸序列同源性分析

Table 2 Analysis of amino acid sequence homology of jade perch HSP90- $\beta$

Protein	Species	Identity/%
SbHSP90- $\beta$	澳洲宝石鲈 <i>Scortum barcoo</i>	—
MmHSP90- $\beta$	鲢鱼 <i>Miichthys miiuy</i> (AFK32353.1)	97.68
SdHSP90- $\beta$	高体鲃鱼 <i>Seriola dumerili</i> (XP_022619895.1)	97.54
ScHSP90- $\beta$	翘嘴鲌 <i>Siniperca chuatsi</i> (AJP74821.1)	97.40
DIHSP90- $\beta$	欧洲狼鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i> (AAQ95586.1)	96.99
DrHSP90- $\beta$	斑马鱼 <i>Danio rerio</i> (AAB96969.1)	92.90
ArHSP90- $\beta$	小体鲟 <i>Acipenser ruthenus</i> (AFA25806.1)	92.08
XlHSP90- $\beta$	非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i> (AAV41061.1)	90.71
RnHSP90- $\beta$	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i> (NP_001004082.3)	90.03
HsHSP90- $\beta$	智人 <i>Homo sapiens</i> (NP_001358167.1)	89.89
GgHSP90- $\beta$	红原鸡 <i>Gallus gallus</i> (NP_996842.1)	88.39

从系统发育进化树 (图3) 来看, 所有的 $\alpha$ 亚型蛋白和 $\beta$ 亚型蛋白各自归为一支, 其中鱼纲动物的HSP90- $\beta$ 单独聚为一支, 两栖纲、鸟纲、哺乳纲动物的HSP90- $\beta$ 各自聚为一支。澳洲宝石鲈HSP90- $\beta$ 与鲈形目红笛鲷 (*Lutjanus sanguineus*) 的亲缘关系最近, 翘嘴鲌次之, 与鲟形目史氏鲟 (*Acipenser schrencki*) 的亲缘关系较远, 与两栖纲、鸟纲、哺乳纲其他动物的亲缘关系更远。

## 2.3 澳洲宝石鲈HSP90- $\beta$ 在不同组织中的表达状况

如图4所示, 以澳洲宝石鲈HSP90- $\beta$  mRNA在脾脏处的表达水平为基准将数据归一化, 可见澳洲宝石鲈HSP90- $\beta$  mRNA在肝脏处高表达 (表达量为脾脏的11.37倍), 其次在肠组织处较高表达 (表达量为脾脏的5.83倍), 在心、肾、肌肉、皮肤、头肾、脑和鳃中低表达 (表达量为脾脏的1.79~3.02倍), 而在脾脏、胃组织表达较少。

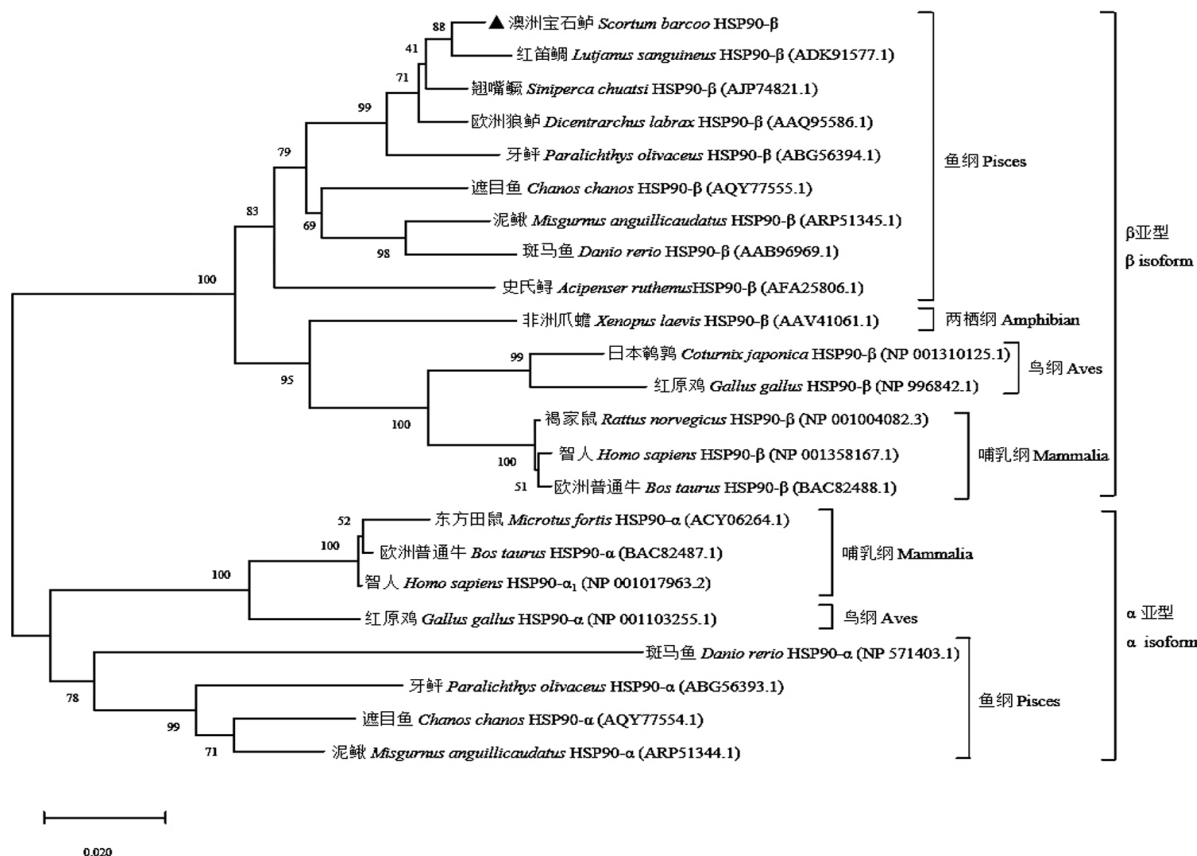


图3 澳洲宝石鲈与其他物种的HSP90-β氨基酸序列进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of HSP90-β amino acid sequences of jade perch and other species  
 澳洲宝石鲈在进化树上用“▲”标示出来。比例尺表示每个碱基的代替率，节点上的数字表示置信度  
 The jade perch is marked with “▲” on the evolutionary tree. The scale indicates the replacement rate for each base, and the number on the node indicates the confidence

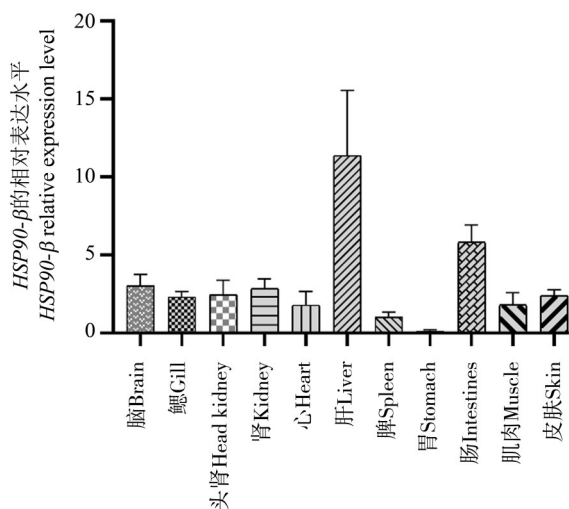


图4 澳洲宝石鲈HSP90-β mRNA在各组织的分布  
 Fig. 4 Expression of jade perch HSP90-β mRNA in various tissues

#### 2.4 感染无乳链球菌后澳洲宝石鲈HSP90-β mRNA在不同组织中的表达状况

在探索HSP90-β mRNA在澳洲宝石鲈感染无乳链球菌后表达量变化中,发现感染无乳链球菌后第6~96 h,澳洲宝石鲈的肝组织中HSP90-β mRNA表达水平持续降低,随后表达水平升高,但表达量仍然显著低于对照组;感染后第12~144 h澳洲宝石鲈HSP90-β mRNA的表达水平降低显著,在这7个时间点处的表达量分别为对照组的0.63、0.43、0.41、0.40、0.18、0.43和0.44倍(图5A)。如图5B所示,感染无乳链球菌后第6~24 h,澳洲宝石鲈的脑组织中HSP90-β mRNA表达水平呈下降趋势,但均未达显著性差异;随后表达增加,至感染后第72 h表达量增加显著,为对照组的1.40倍;尔后表达量下降,至感染后第96 h达到最低值,表达量为对照组的0.91倍;随后

*HSP90-β* mRNA 表达量再次增加, 至感染后第 120 h 达到峰值, 表达量为对照组的 1.13 倍。总体而言, 感染无乳链球菌后澳洲宝石鲈的脑组织中 *HSP90-β* mRNA 表达水平呈先下降, 后上升, 再下降, 再上升的趋势, 且在感染后第 72 h 表达量显著增加。

如图 6A 所示, 感染无乳链球菌后第 24 h 时, 澳洲宝石鲈的脾脏组织中 *HSP90-β* mRNA 表达水平显著升高, 为对照组的 1.90 倍; 随后表达水平在感染后第 48 h 显著下降, 达到最低值, 表达量为对照组的 0.60 倍; 尔后 *HSP90-β* mRNA 表达水平再次升高, 至感染后第 120 h 达到峰值, 表达量为对照组的 1.01 倍, 未达到显著差异。澳洲宝石鲈的脾脏组织中 *HSP90-β* mRNA 表达水平整体呈

现先上升, 后下降, 再趋于正常表达的趋势。如图 6B 所示, 感染无乳链球菌后第 6~12 h, 澳洲宝石鲈的头肾组织中 *HSP90-β* mRNA 表达水平下降, 随后表达水平升高, 至感染后第 24 h 达到峰值, 表达量为对照组的 1.25 倍, 但未达到显著差异; 随后 *HSP90-β* mRNA 表达水平再次下降, 至感染后第 72 h 表达水平显著降低, 表达量为对照组的 0.69 倍; 尔后 *HSP90-β* mRNA 表达水平再次升高, 至感染后第 96 h 达到峰值, 表达量与对照组相同; 至感染后第 144 h 澳洲宝石鲈的头肾组织中 *HSP90-β* mRNA 表达水平再次显著降低, 表达量为对照组的 0.57 倍。澳洲宝石鲈的头肾组织中 *HSP90-β* mRNA 表达水平整体呈现先下降, 后升高, 再下降, 再升高, 再下降的趋势。

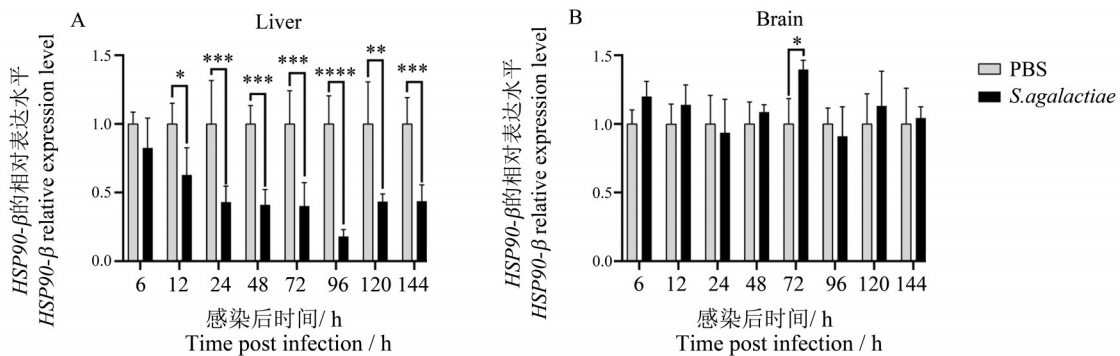


图 5 注射无乳链球菌后澳洲宝石鲈 *HSP90-β* mRNA 在肝、脑组织的表达状况

Fig. 5 Expression of jade perch *HSP90-β* mRNA in tissue of liver and brain after injection of *S. agalactiae*

显著性差异表示为: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

Significant differences were expressed as: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

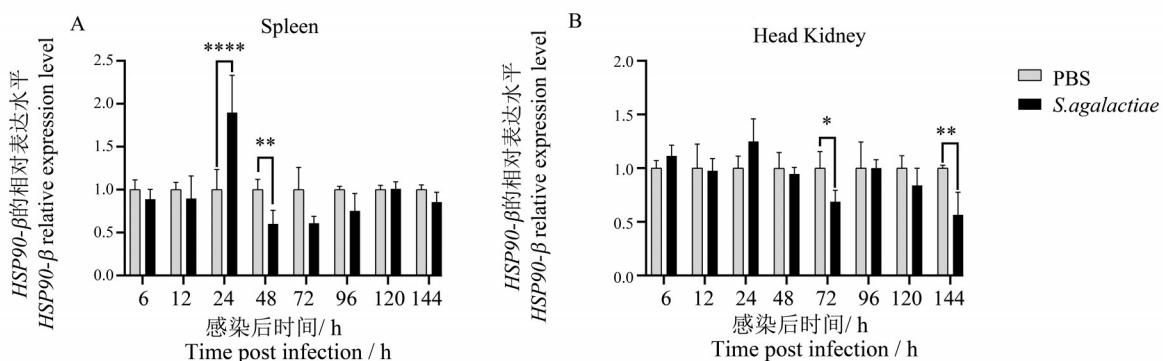


图 6 注射无乳链球菌后澳洲宝石鲈 *HSP90-β* mRNA 在脾、头肾组织的表达状况

Fig. 6 Expression of jade perch *HSP90-β* mRNA in tissue of spleen and head kidney after injection of *S. agalactiae*

显著性差异表示为: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

Significant differences were expressed as: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

## 3 讨论

### 3.1 澳洲宝石鲈 *HSP90- $\beta$* 氨基酸序列分析

热休克蛋白 (HSPs) 在鱼类的应激与免疫反应中起着重要的作用, 而 *HSP90* 是热休克蛋白家族的重要成员。目前, 已有鲤鱼<sup>[22]</sup>、塞内加尔鲷<sup>[23]</sup>、虹鳟<sup>[24]</sup>、宽体沙鳅<sup>[25]</sup> 和鲢鱼<sup>[26]</sup> 等多种硬骨鱼类的 *HSP90* 基因被克隆和分析。目前的研究发现, 除了按蚊 (*Anopheles albimanus*) 含有两种 *HSP90* 外, 其他无脊椎动物中只有一种 *HSP90*。但在脊椎动物中存在两种 *HSP90* (*HSP90- $\alpha$*  和 *HSP90- $\beta$* ) 的胞质异构体, 其差异在于, 通常 *HSP90- $\beta$*  亚型的氨基酸序列 N-末端不具 QTQDQ 序列<sup>[7]</sup>。而在本研究中, 未发现澳洲宝石鲈 *HSP90- $\beta$*  氨基酸序列的 N 末端存在 QTQDQ 序列。澳洲宝石鲈 *HSP90- $\beta$*  氨基酸序列中有 5 个保守的 *HSP90* 家族特征 (NKEIFLRELISN [S/A] SDALDKIR, LGTIA [K/R] SGT, IGQFGVGFYSA [Y/F] LVA [E/D], IKLYVRRVFI 和 GVVDS [E/D] DLPLN [I/V] SRE), 亦含有所有胞质 *HSP90* 蛋白 C 末端共同有的 EEVD 结构域特征, 以及对结合 ATP 至关重要的保守 ATP 结合结构域 “GxxGxG” 基序<sup>[21, 33-34]</sup> (图 1)。同源性分析结果显示, 澳洲宝石鲈 *HSP90- $\beta$*  氨基酸序列与其他鱼类的 *HSP90- $\beta$*  氨基酸序列一致性皆在 90% 以上; 与两栖动物、鸟类, 乃至哺乳动物 *HSP90- $\beta$*  氨基酸序列的一致性也较高, 皆在 88% 以上。从系统发育进化树来看, 澳洲宝石鲈 *HSP90- $\beta$*  与其他鱼类聚为一支。与鲈形目的红笛鲷的亲缘关系最近, 翘嘴鲌次之, 与软骨硬鳞亚纲鲟形目史氏鲟的亲缘关系较远, 与两栖纲、鸟纲、哺乳纲其他动物的亲缘关系更远 (图 3)。综上所述, 结构分析、同源性分析, 以及分子系统树的结果支持我们得到的澳洲宝石鲈 *HSP90- $\beta$*  属于 *HSP90* 家族的  $\beta$  亚型, 而且该基因在不同物种中高度保守。

### 3.2 澳洲宝石鲈 *HSP90- $\beta$* mRNA 组织表达分析

从表达分布来看, 澳洲宝石鲈 *HSP90- $\beta$*  mRNA 高表达于肝脏, 较高表达于肠, 在心、肾、肌肉、皮肤、头肾、脑和鳃中低表达, 而在脾脏、胃组织表达甚少 (图 4)。这与在宽体沙鳅、鲢鱼和团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)<sup>[35]</sup> 中的表达有相似之处。宽体沙鳅<sup>[25]</sup> *HSP90- $\beta$*  mRNA 主要在肝脏、鳃、脾和肾组织中表达, 并且这些组织中的表达水平显著高于所分析的其他组织 ( $P < 0.05$ )。鲢鱼<sup>[26]</sup> *HSP90- $\beta$*  mRNA 在肝组织中表达水平最高,

在鳍、脑、脾、鳃和肌肉中适度地表达, 在肠、肾、心脏和眼中表达较弱。上述几种鱼的 *HSP90- $\beta$*  mRNA 都在肝组织中较高表达, 这可能与肝脏代谢活动活跃, 参与解毒等功能有关。而团头鲂 *HSP90- $\beta$*  mRNA 主要在血细胞中表达, 其次是脾脏、肠和脑, 再次为肝脏、肾, 在心脏和肌肉组织中表达较少, 在鳃中几乎无表达<sup>[35]</sup>, 这可能是由于 *HSP90* 在不同物种的不同组织存在表达差异。

### 3.3 感染无乳链球菌后澳洲宝石鲈 *HSP90- $\beta$* 组织表达分析

从组织表达分析结果来看, 澳洲宝石鲈 *HSP90- $\beta$*  mRNA 高表达于肝组织。而鱼类的脾脏和头肾组织与鱼类的免疫密切相关。且有研究表明, 感染无乳链球菌的垂死病鱼 100% 出现脑组织被感染的状况<sup>[35]</sup>。因此, 本实验研究了感染无乳链球菌后澳洲宝石鲈 *HSP90- $\beta$*  mRNA 在肝脏、脾脏、头肾和脑组织的表达状况。实验结果显示, 澳洲宝石鲈 *HSP90- $\beta$*  mRNA 在肝组织中的表达水平整体低于对照组, 大体呈现先降低后增加的趋势 (图 5A)。说明无乳链球菌感染可能会抑制澳洲宝石鲈 *HSP90- $\beta$*  mRNA 在肝组织中的表达。在脑组织中 *HSP90- $\beta$*  mRNA 的表达有波动, 并于感染后第 72 h 表达水平显著升高, 达到峰值, 表达量为对照组的 1.40 倍 (图 5B)。可推测, 此时无乳链球菌已入侵并感染这些鱼的脑组织。感染无乳链球菌后第 24 h, 澳洲宝石鲈的脾脏组织中 *HSP90- $\beta$*  mRNA 表达水平显著升高, 表达量为对照组的 1.90 倍。表达水平整体呈现先上升, 后下降, 再趋于正常表达的趋势 (图 6A)。澳洲宝石鲈的头肾组织中 *HSP90- $\beta$*  mRNA 表达水平整体呈现先下降, 后升高, 再下降, 再升高, 再下降的趋势 (图 6B)。

这些结果与细菌感染后宽体沙鳅、鲢鱼和团头鲂中 *HSP90- $\beta$*  mRNA 的表达有相似之处, 亦有不同。感染嗜水气单胞菌后, 宽体沙鳅<sup>[25]</sup> *HSP90- $\beta$*  mRNA 在肝组织的表达水平呈现先上升后下降的趋势, 其中第 6~96 h 表达水平显著升高, 与本实验结果不同; 在肾组织中的表达水平亦呈现先上升后下降的趋势, 其中第 12 h 达到峰值, 但不显著。感染鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 后, 鲢鱼<sup>[26]</sup> *HSP90- $\beta$*  mRNA 在肝组织的表达水平呈现先下降后上升的趋势, 但整体显著降低, 与本实验结果大体相同; 在脾脏的表达水平呈现先下降后上升, 再下降, 再上升的趋势, 其中第 12、24 和

72 h 显著上升, 达到峰值; 在肾组织的表达水平波动, 整体显著降低。在细菌感染后, 澳洲宝石鲈和鳊鱼的 *HSP90-β* mRNA 在肝组织中的表达有显著下降的趋势, 且在观察时间范围内并未恢复到正常水平, 与宽体沙鳅的表达不同。这可能是由于前两者的细菌感染浓度太高, 造成了肝组织的严重损害; 也可能因为前两者同属于鲈形目, 而后者属于鲤形目, 存在种属间的表达差异。感染嗜水气单胞菌后的第 4 h, 团头鲂<sup>[35]</sup> 肝脏组织 *HSP90-β* mRNA 的表达量升高显著, 随即在感染后的第 24~120 h 表达量下降至对照组之下。团头鲂感染嗜水气单胞菌后第 24~120 h 肝脏组织 *HSP90-β* mRNA 的表达水平波动, 但表达量下降至对照组之下, 与澳洲宝石鲈感染无乳链球菌后第 6~144 h, 以及鳊鱼<sup>[26]</sup> 感染鳃弧菌后第 6~72 h 肝脏组织 *HSP90-β* mRNA 的表达变化相似。感染嗜水气单胞菌后, 团头鲂脾脏和头肾组织 *HSP90-β* mRNA 的表达水平皆整体呈现先升高后下降, 再升高的趋势, 这也与本实验澳洲宝石鲈感染无乳链球菌的结果相似。在哺乳动物细胞中, HSP90 可以破坏 NOD2-SGT-1 复合物, 并通过 NF-κB 诱导促炎性细胞因子的产生<sup>[36]</sup>, 而剧烈的炎症反应会对机体造成损伤, 因而免疫相关基因的表达一般会先上

调后下调。据此可以推测在无乳链球菌感染澳洲宝石鲈, 以及鳃弧菌感染鳊鱼<sup>[26]</sup> 后的第 6 h 之前, 它们肝脏组织的 *HSP90-β* mRNA 表达水平也可能出现过显著升高的过程。细菌感染后, 澳洲宝石鲈、宽体沙鳅、鳊鱼以及团头鲂不同组织 *HSP90-β* mRNA 表达水平的波动变化可能也是机体协调免疫反应既抵抗病菌入侵, 又保护机体免受炎症侵害的结果。整体而言, 无乳链球菌感染导致了澳洲宝石鲈肝脏、脾脏、头肾和脑组织 *HSP90-β* mRNA 表达水平的波动变化, 这表明澳洲宝石鲈 *HSP90-β* 可能参与了无乳链球菌感染引发的免疫反应。

随着养殖规模的逐渐扩大和养殖的高度集约化, 澳洲宝石鲈的养殖面临着无乳链球菌病原的威胁。而 2011 年暴发的大规模罗非鱼链球菌病造成的经济损失高达 4 亿美元<sup>[37]</sup>, 这为澳洲宝石鲈的健康养殖和继续推广敲响了警钟。近年来有研究发现, HSP90 作为疫苗免疫佐剂在提高疫苗免疫效果方面有一定效果<sup>[38]</sup>。本研究开展了澳洲宝石鲈 *HSP90-β* 基因克隆、生物信息学分析及功能初探工作, 丰富了鱼类 HSP90 在免疫领域的研究, 为免疫佐剂开发提供了一定的理论基础, 对于相关病害防治研究的推进有一定意义。

#### 参考文献:

- [1] HARTL F U. Molecular chaperones in cellular protein folding[J]. *Nature*, 1996, 381(6583): 571-579.
- [2] LINDQUIST S, CRAIG E A. The heat-shock proteins [J]. *Annual Review of Genetics*, 1988, 22 (3) : 631-677.
- [3] GEORGOPOULOS C, WELCH W J. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones[J]. *Annual Review of Cell Biology*, 1993, 9(1):601-634.
- [4] BASU N, TODGHAM A E, ACKERMAN P A, et al. Heat shock protein genes and their functional significance in fish[J]. *Gene*, 2002, 295(2):173-183.
- [5] BUCHNER J. HSP90 & Co. - a holding for folding[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1999, 24 (4) : 136-141.
- [6] HOULIHAN J L, METZLER J J, BLUM J S. HSP90α and HSP90β isoforms selectively modulate MHC class II antigen presentation in B cells[J]. *Journal of Immunology*, 2009, 182(12):7451-7458.
- [7] LEES-MILLER S P, ANDERSON C W. The human double-stranded DNA-activated protein kinase phosphorylates the 90-kDa heat-shock protein, HSP90 alpha at two NH2-terminal threonine residues[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(29):17275-17280.
- [8] SREEDHAR A S, KALMÁR E, CSERMELY P, et al. HSP90 isoforms: functions, expression and clinical importance[J]. *FEBS Letters*, 2004, 562(1/2/3):11-15.
- [9] WAZA M, ADACHI H, KATSUNO M, et al. 17-AAG, an HSP90 inhibitor, ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration [J]. *Nature Medicine*, 2005, 11(10):1088-1095.
- [10] SHARP S, WORKMAN P. Inhibitors of the HSP90 molecular chaperone: current status[J]. *Advances in Cancer Research*. 2006, 95:323-348.
- [11] WAZA M, ADACHI H, KATSUNO M, et al. Alleviat-

- ing neurodegeneration by an anticancer agent: an HSP90 inhibitor (17-AAG) [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2006, 1086:21-34.
- [12] RUSSO C D, POLAK P E, MERCADO P R, et al. The heat-shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin suppresses glial inflammatory responses and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2006, 99(5):1351-1362.
- [13] BAE J, MITSIADES C, TAI Y T, et al. Phenotypic and functional effects of heat shock protein 90 inhibition on dendritic cell [J]. *The Journal of Immunology*, 2007, 178(12):7730-7737.
- [14] RAJAGOPAL D, BAL V, MAYOR S, et al. A role for the HSP90 molecular chaperone family in antigen presentation to T lymphocytes via major histocompatibility complex class II molecules [J]. *European Journal of Immunology*, 2006, 36(4):828-841.
- [15] KUNISAWA J, SHASTRI N. HSP90 $\alpha$  chaperones large C-terminally extended proteolytic intermediates in the MHC class I antigen processing pathway [J]. *Immunity*, 2006, 24(5):523-534.
- [16] FARCY E, SERPENTINI A, FIÉVET B, et al. Identification of cDNAs encoding HSP70 and HSP90 in the abalone *Haliotis tuberculata*: Transcriptional induction in response to thermal stress in hemocyte primary culture [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 146(4):540-550.
- [17] JIANG S G, QIU L H, ZHOU F L, et al. Molecular cloning and expression analysis of a heat shock protein (HSP90) gene from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. *Molecular Biology Reports*, 2009, 36(1):127-134.
- [18] YOUNG R A. Stress proteins and immunology [J]. *Annual Review of Immunology*, 1990, 8:401-420.
- [19] IVANINA A V, TAYLOR C, SOKOLOVA I M. Effects of elevated temperature and cadmium exposure on stress protein response in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, 91(3):245-254.
- [20] LI F H, LUAN W, ZHANG C S, et al. Cloning of cytoplasmic heat shock protein 90 (FcHSP90) from *Fenneropenaeus chinensis* and its expression response to heat shock and hypoxia [J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2009, 14(2):161-172.
- [21] GAO Q, ZHAO J M, SONG L S, et al. Molecular cloning, characterization and expression of heat shock protein 90 gene in the haemocytes of bay scallop *Argopecten irradians* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, 24(4):379-385.
- [22] HERMESZ E, ABRAHÁM M, NEMCSÓK J. Identification of two HSP90 genes in carp [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology and Pharmacology*, 2001, 129(4):397-407.
- [23] MANCHADO M, SALAS-LEITON E, INFANTE C, et al. Molecular characterization, gene expression and transcriptional regulation of cytosolic HSP90 genes in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup) [J]. *Gene*, 2008, 416(1/2):77-84.
- [24] CARA J B, ALURU N, MOYANO F J, et al. Food-deprivation induces HSP70 and HSP90 protein expression in larval gilthead sea bream and rainbow trout [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology. B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 142(4):426-431.
- [25] QIN C, SHAO T, DUAN H. The cloning of a heat shock protein 90 $\beta$  gene and expression analysis in *Botia reevesae* after ammonia-N exposure and *Aeromonas hydrophila* challenge [J]. *Aquaculture Reports*, 2016, 3:159-165.
- [26] WEI T, GAO Y H, WANG R X, et al. A heat shock protein 90  $\beta$  isoform involved in immune response to bacteria challenge and heat shock from *Miichthys miiuy* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 35(2):429-437.
- [27] CHEN K C, MA L S, SHI Y, et al. Genetic diversity analysis of cultured populations of jade perch (*Scortum barcoo*) in China using AFLP markers [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2011, 5(4):455-461.
- [28] 刘艳红, 罗国芝, 孙佩英, 等. 在闭合循环水产养殖系统中养殖高体革鲂的效果 [J]. *上海水产大学学报*, 2003, 12(2):130-134.
- LIU Y H, LUO G Z, SUN P Y, et al. The culture ef-

- fects of *Scortum barcoo* in recirculating system [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2003, 12 (2): 130-134.
- [29] 邱军强, 杨先乐, 李怡, 等. 高体革鲷链球菌出血性败血症病原与组织病理的初步研究[J]. 上海水产大学学报, 2004, 13 (2): 115-120.
- QIU J Q, YANG X L, LI Y, et al. Preliminary study on the pathogen and histopathology of haemorrhagic blood poisoning in *Scortum barcoo* [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2004, 13 (2): 115-120.
- [30] 叶旭红, 林先贵, 王一鸣. 养殖澳洲宝石鱼迟缓爱德华氏菌的分离鉴定及致病基因的检测[J]. 淡水渔业, 2010, 40 (1): 50-54.
- YE X H, LIN X G, WANG Y M. Identification and detection of virulence gene of the pathogenic bacteria *Edwardsiella tarda* in cultured *Scortum barcoo* [J]. Freshwater Fisheries, 2010, 40 (1): 50-54.
- [31] 罗琳, 马志宏, 李铁梁. 澳洲宝石鲈细菌性疾病防治技术[J]. 科学养鱼, 2009, 6 (1): 55-56.
- LUO L, MA Z H, LI L T. Prevention and control technology of bacterial diseases of *Scortum barcoo* [J]. Scientific Fish Farming, 2009, 6 (1): 55-56.
- [32] HUANG M Z, LI J, PAN Z C, et al. Isolation, identification and drug susceptibility analysis of *Streptococcus agalactiae* in *Scortum barcoo* [J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2014, 41 (10): 247-251.
- [33] LI J T, HAN J Y, CHEN P, et al. Cloning of a heat shock protein 90 (HSP90) gene and expression analysis in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda* [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2012, 32(6): 1191-1197.
- [34] PRODROMOU C, ROE S M, O'BRIEN R, et al. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the HSP90 molecular chaperone [J]. Cell, 1997, 90(1):65-75.
- [35] DING Z J, WU J J, SU L N, et al. Expression of heat shock protein 90 genes during early development and infection in *Megalobrama amblycephala* and evidence for adaptive evolution in teleost [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2013, 41(4):683-693.
- [36] JANAGAMA H K, CIRILLO J D. HSP90 plays a role in host-bacterial interactions: insight gained from *Acanthamoeba castellanii* [M]. Moonlighting Cell Stress Proteins in Microbial Infections, Berlin: Springer, 2013: 237-248.
- [37] LIU L, LI Y W, HE R Z, et al. Outbreak of *Streptococcus agalactiae* infection in barcoo grunter, *Scortum barcoo* (McCulloch and Waite), in an intensive fish farm in China [J]. Journal of Fish Diseases, 2014, 37(12): 1067-1072.
- [38] 金晔, 袁海延, 王好, 等. 鲤HSP90作为锦鲤疱疹病毒核酸疫苗免疫佐剂的效果研究[J]. 大连海洋大学学报, 2018, 33 (2): 175-180.
- JIN Y, YUAN H Y, WANG H, et al. Immune effect of carp HSP90 as an adjuvant of koi herpesvirus nucleic acid vaccine [J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2018, 33 (2): 175-180.

(责任编辑 张 冰)