



## 齐口裂腹鱼 *Hsp60* cDNA 克隆及其在无乳链球菌感染中的 mRNA 表达

陈德芳<sup>1</sup>, 芦路<sup>1</sup>, 蒲云丹<sup>1</sup>, 瞿炼石<sup>2</sup>, 刘博<sup>2</sup>,  
黄小丽<sup>1</sup>, 欧阳萍<sup>3</sup>, 李志琼<sup>1</sup>, 耿毅<sup>3\*</sup>

(1. 四川农业大学动物科技学院, 四川成都 611130;

2. 雅安市渔业发展中心, 四川雅安 625000;

3. 四川农业大学动物医学院, 四川成都 611130)

**摘要:** 为探究齐口裂腹鱼热休克蛋白 60 基因 (*SpHsp60*) cDNA 序列的分子特征和在细菌感染中的响应情况, 实验利用 RACE 技术克隆获得了 2 277 bp 的 *SpHsp60* cDNA 序列, 预测编码 575 个氨基酸, 其与脊椎动物具有较高的保守性。齐口裂腹鱼的组织表达模式分析显示, *SpHsp60* 在肝胰脏中表达量最高, 血液次之, 而在皮肤、肌肉和肠道中表达量低。无乳链球菌感染过程中, 血液、肝胰脏、中肾和脾脏的 *SpHsp60* mRNA 表达量在感染后 6 h 发生显著变化, 提示组织中 *SpHsp60* 能快速响应感染。肝胰脏和中肾在感染后 6~72 h 表达量变化均显著高于对照组, 而脾脏则显著低于对照组。研究表明, *SpHsp60* 可能通过快速响应参与齐口裂腹鱼对抗细菌感染的过程, 研究为肝胰脏和中肾组织中 *Hsp60* mRNA 表达量作为齐口裂腹鱼感染无乳链球菌的危险信号分子提供基础数据。

**关键词:** 齐口裂腹鱼; *Hsp60*; 无乳链球菌; 克隆; 感染

中图分类号: Q 785; S 941.42

文献标志码: A

热休克蛋白 (heat shock protein, Hsp) 是一种普遍存在且高度保守的应激蛋白, 其表达量变化与鱼类健康状态存在关联<sup>[1]</sup>。其中, Hsp60 分子量大小约为 60 ku, 是热休克蛋白家族成员, 其主要分布在真核细胞的线粒体中<sup>[2]</sup>, 在应激状态或细胞损伤时, 过表达的 Hsp60 可作为一种危险信号分子, 经模式识别受体如 Toll-样受体 4 (Toll-like receptor, TLR4), 诱导机体的保护性免疫应答<sup>[3]</sup>。鱼类在天然水体中受到环境污染、天然毒素和微生物感染等多种风险胁迫, *Hsp60* mRNA 表达水平在印度野鲮 (*Labeo rohita*) 胁迫<sup>[4]</sup>、乌鳢 (*Channa argus*) 热应激<sup>[5]</sup>、丝囊霉菌 (*Aphanomyces invadans*) 感染线鳢 (*C. striata*)<sup>[6]</sup>、罗氏沼虾 (*Mac-*

*robriachium rosenbergii*) 白斑综合症病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 感染<sup>[7]</sup> 时均表现出显著上调响应。细菌感染是水生动物的常见疾病, *Hsp60* mRNA 表达量在哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 感染罗氏沼虾<sup>[7]</sup> 或嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 感染线鳢<sup>[6]</sup> 后 6 h 出现显著上调, 然而牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*) 感染副乳房链球菌 (*Streptococcus parauberis*) 后, 肾脏中 *Hsp60* 在急性期 (6 h) 和后期 (120 h) 表达量下降, 在感染中期 (72 h) 表达量上升但未达到显著水平<sup>[8]</sup>。因此, 危险信号分子 *Hsp60* 在细菌感染中的响应规律值得关注。

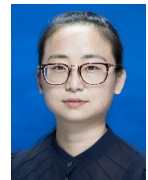
齐口裂腹鱼 (*Schizothorax prenanti*) 俗称雅鱼,

收稿日期: 2021-02-19 修回日期: 2021-04-13

资助项目: 四川省重点科研项目 (2018NZ0007); 四川省淡水鱼产业技术体系创新团队建设项目 (SCCXTD-15); 雅安市市校合作项目 (21SXHZ0016)

第一作者: 陈德芳 (照片), 从事水产动物病害研究, E-mail: chendf\_sicau@126.com

通信作者: 耿毅, 从事兽医病理学与水生动物疾病学研究, E-mail: gengyisicau@126.com



隶属鲤科 (Cyprinidae) 裂腹鱼属 (*Schizothorax*), 是雅安市“三雅”文化的重要组成。齐口裂腹鱼既是裂腹鱼中主要的养殖经济对象, 也是长江上游增殖放流的重要品种, 鱼苗鱼种的健康状况评价和感染早期预警是目前关注的热点。齐口裂腹鱼 *Hsp90*<sup>[9]</sup> 和 *Hsp70*<sup>[10]</sup> 研究提示, 热休克蛋白可作为早期危险信号参与响应细菌感染和热胁迫, 而齐口裂腹鱼 *Hsp60* 的研究未见报道。无乳链球菌 (*S. agalactiae*) 是危害齐口裂腹鱼的重要病原, 感染典型临床症状为眼球外突和体表皮下脓肿, 早期感染不易察觉<sup>[11]</sup>。本研究通过快速扩增 cDNA 末端技术 (RACE) 克隆齐口裂腹鱼 *Hsp60* 序列, 利用实时荧光定量 PCR 技术 (qRT-PCR) 检测 *Hsp60* 在不同组织中的表达分布和无乳链球菌感染后不同时间点组织中的 *Hsp60* 的表达变化, 为 *Hsp60* 作为细菌感染的危险信号分子提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验对象

体质量为 (45±3) g 的健康齐口裂腹鱼 85 尾, 暂养于 40 cm×60 cm×100 cm 鱼缸, 水源为经曝气处理后的自来水, 水质符合渔业水质标准 (GB

11607—89), 水温 (23±1) °C, 每天按体质量 2% 投喂商业饵料。动物暂养 1 周后用于正式实验, 解剖前采用 MS-222 过麻醉处理。

### 1.2 *SpHsp60* cDNA 克隆

根据 GenBank 上鲤科鱼类 *Hsp60* cDNA 序列比对的保守区域, 以斑马鱼 *Hsp60* 序列 (BC044557) 设计保守区域扩增引物, 基于扩增的 *Hsp60* 保守区域测序结果, 设计 *Hsp60* 5'端和 3'端 RACE 引物, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 序列见表 1。采用 RNAiso Plus kit (TaKaRa, 日本) 提取齐口裂腹鱼的脾脏、鳃和中肾组织总 RNA, 用 1% 的琼脂凝胶电泳检测 RNA 质量, 用核酸检测仪测定总 RNA 浓度, -80 °C 保存。采用 PrimeScript™ Reagent Kit (TaKaRa, 日本) 将 RNA 反转录为 cDNA 作为克隆模板。参照 Pu 等<sup>[9]</sup> 的方法, 通过 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (TaKaRa, 日本) 进行 cDNA 扩增, 纯化的 PCR 产物连接到 pMD19-T 载体 (TaKaRa, 日本), 转入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α, 挑选阳性克隆提取质粒, 送样测序。

### 1.3 *SpHsp60* 序列分析

采用 SeqMan 拼接 3'端扩增序列、5'端扩增

表 1 齐口裂腹鱼 *Hsp60* 克隆和 qRT-PCR 引物

Tab. 1 The primers used for *SpHsp60* clone and qRT-PCR

引物名称 primers name	引物序列 (5'-3') primer sequences	退火温度/°C annealing temperatures
<b>保守区域 conservative region</b>		
Hsp60-1F	AAGATGGGGTCACAGTTGCT	58.0
Hsp60-1R	ACCAGAGGTTTGCGATGC	
<b>RACE扩增 RACE amplification</b>		
Hsp60-3'F1	CCGTGCTATTGCCAAGGAGGGAT	64.0
Hsp60-5'R1	GCTGGCACGATGCTCTGTACGCTG	
Hsp60-3'F2	GCCAACCAGCATCGCAAACCTCT	64.0
Hsp60-5'R2	AATCCCTCCTTGCAATAGCACGG	
UPM-long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	70.0 → 68.0 → 66.0
UPM-short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
<b>荧光定量 qRT-PCR</b>		
β-actin-F	CGAGCTGTCTTCCCATCCA	60.0
β-actin-R	TCACCAACGTAGCTGTCTTTCTG	
18S rRNA-F	ACCACCCACAGAATCGAGAAA	58.0
18S rRNA-R	GCCTGCGGCTTAATTTGACT	
Hsp60-F	AGGGATTGACACCATCAGC	58.0
Hsp60-R	CGGCTTGAGAGTTTCTTGA	

序列和保守区域序列, 获得的完整 cDNA 序列进行 NCBI Blast 比对, 通过 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 查找 *SpHsp60* 核酸序列的开放阅读框, 采用在线软件 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测氨基酸序列的分子量和等电点, 通过 Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/cluster/>) 程序进行多序列比对分析, 以 Motifscan ([http://myhits.isb.sib.ch/cgi-bin/motif\\_scan](http://myhits.isb.sib.ch/cgi-bin/motif_scan)) 程序进行特征性模序查找和结构域的预测, 采用 MEGA 6.0 邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建 *SpHsp60* 氨基酸序列系统发育树。

#### 1.4 *SpHsp60* 组织表达分析

MS-222 麻醉后, 采集 5 尾齐口裂腹鱼的全血置于血细胞裂解液中, 采用血液总 RNA 提取试剂盒 (BIKW) 提取血液总 RNA。分别采集鳃、脑、心脏、肝胰脏、脾脏、中肾、皮肤、肌肉和肠道组织于 RNA/DNA 保护剂中, 按“*SpHsp60* cDNA 克隆”中的方法提取组织总 RNA 并检测质量, 然后反转录 cDNA 用于 mRNA 表达量检测。

#### 1.5 无乳链球菌感染实验

80 尾齐口裂腹鱼随机分成实验组和对照组, 每组设 2 个重复缸, 每缸 20 尾鱼。实验组腹腔注射 0.1 mL  $1.5 \times 10^7$  CFU/mL 的无乳链球菌 GY101 株, 对照组注射等量的磷酸盐缓冲溶液 (PBS)。在攻毒前及攻毒后的 6、24、72 和 120 h 时分别采集 8 尾鱼的血液、肝胰脏、脾脏和中肾组织样品, 按前述方法提取总 RNA, 反转录 cDNA 用于 mRNA 表达量检测。

#### 1.6 qRT-PCR 检测

采用 Step One Plus™ 实时荧光定量 PCR 系统进行荧光定量, 检测样品中 *SpHsp60* 的 mRNA 表达量。基因引物见表 1, 以齐口裂腹鱼  $\beta$ -actin 和 18S rRNA<sup>[12]</sup> 作为内参基因, 对每个组织样品的 cDNA 量进行归一。参考 Wang 等<sup>[13]</sup> 的方法, 采用 SYBR premix Ex Taq™ (TaKaRa, 日本) 对样品进行定量检测, 每个样品进行 3 个技术重复, 结果采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行分析。

#### 1.7 数据分析

实验数据用平均值±标准误 (mean±SE) 表示。实验数据通过 SPSS 19.0 软件进行处理, 数据用单因素方差分析,  $P < 0.05$  即达到显著水平。

## 2 结果

### 2.1 *SpHsp60* cDNA 序列和预测氨基酸序列分析

通过 PCR 技术扩增获得 *SpHsp60* 保守区域片段 593 bp, 以 RACE 技术对其 5' 端和 3' 端扩增, 将扩增产物克隆并测序。测序所得到的序列通过 SeqMan 软件进行拼接, 得到齐口裂腹鱼 *SpHsp60* 全长 2 277 bp 的 cDNA 序列, 包括 1 728 bp 的开放阅读框、61 bp 的 5'-UTR 和 488 bp 的 3'-UTR, 其中包括 ploy A 结构; 预测编码 575 个氨基酸, 分子质量为 61.22 ku, 理论等电点为 5.48。氨基酸序列结构预测显示, *SpHsp60* 含有保守的 ATP/ADP 结合位点和  $Mg^{2+}$  结合位点 (ATP 结合位点 1: DGVTVAK, ATP 结合位点 2: ATRAAVEEGIVLGGG), 底物结合位点 (EGMKFDRGYISPY) 和 3' 端典型的 GGM 重复模序 (图 1)。

*SpHsp60* 氨基酸序列与硬骨鱼类、两栖类、禽类及哺乳动物共 13 种脊椎动物的氨基酸多序列比对分析显示, *SpHsp60* 氨基酸序列与鲫 (*Carassius auratus*) Hsp60 氨基酸序列一致性最高, 达 95.0%; 与草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 一致性为 94.9%, 与非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 一致性最低, 仅为 83.7%。系统发育树显示, *SpHsp60* 与硬骨鱼的 Hsp60 聚为一簇, 哺乳类同禽类和两栖类聚为一支。其中齐口裂腹鱼 Hsp60 与鲫 Hsp60 进化关系最为接近 (图 2)。将 Hsp60 的氨基酸序列建立蛋白质空间结构模型, 发现齐口裂腹鱼与人类 (*Homo sapiens*)、小鼠 (*Mus musculus*)、原鸡 (*Gallus gallus*)、非洲爪蟾的 Hsp60 的蛋白空间结构高度保守。

### 2.2 *SpHsp60* 的组织表达分析

通过 qRT-PCR 对 *SpHsp60* 在齐口裂腹鱼各组织中的表达量进行检测, 结果显示, *SpHsp60* mRNA 普遍存在于检测的 11 个组织中。其中肝胰脏的 *SpHsp60* mRNA 表达量最高, 其次是血液和鳃组织, 三者相对表达量均显著高于其他组织 ( $P < 0.05$ )。而在皮肤、肌肉和肠道组织中的表达量较低 (图 3)。

### 2.3 无乳链球菌感染试验

在无乳链球菌感染齐口裂腹鱼后 6 h, 血液中 *SpHsp60* mRNA 表达量达到峰值, 随后迅速下降, 且在 72 和 120 h 时显著低于对照组。在感染

```

-61 TCAGTCTGCTGTACTGACGGATACGTGCATCCCTTCATTACCTCCAGATCACTCTGCAAA
1 ATGCTGCGTTTACCAGTGAATGAAAAGATGAGGCCAGTGCAGGGCGCTGGCCCCACACCTGACCCGTGCATAT
1 M L R L P S V M K K M R P V C R A L A P H L T R A Y
79 GCCAAGGAGTCAAGTTGGAGCAGATGCCCGTCCCTCATGCTCCAGGGTGTGACCTGCTGGCTGATACTGTGGCC
27 A K E V K F G A D A R A L M L Q G V D L L A D T V A
157 GTCACCATGGGACCAAGGGTGCACCGTTATCATTGAGCAGAGCTGGGAAGCCCTAAAGTACCAAAGATGGTGTG
53 V T M G P K G R T V I I E Q S W G S P K V T K D G V
235 ACAGTTGCCAAAAGTATCGACTTGAAGGATAAGTATAAGAATCGGGGCCAGGCTGGTACAGGACGTGGCCAACAAC
79 T V A K S I D L K D K Y K N I G A R L V Q D V A N N
313 ACAAATGAGGAGGCTGGAGATGGCACCACAACCGCCACAGTTTGGCCCGTGCTATTGCCAAGGAGGGATTGACACC
105 T N E E A G D G T T T A T V L A R A I A K E G F D T
391 ATCAGCAAAGGCGCAACCTGTGGAGATCCGTAGAGAGTCAATGTTGGCGGTGAGGAAGTCAATCAACTCAAGT
131 I S K G A N P V E I R R G V M L A V E E V I N E L K
469 AAACCTCTCAAGCCGGTCAACACCCAGAGAAATTGCCAGGTGGCCACTATTCTGCCAATGGAGACACTGAAGTT
157 K L S K P V T T P E E I A Q V A T I S A N G D T E V
547 GGTAACATCATCTCCAATGCTATGAAGAAAGTGGGCCGCAAGGGTGTATTACAGTGAAGGATGTTAAACCCCTACAT
183 G N I I S N A M K K V G R K G V I T V K D G K T L H
625 GATGAGCTTGAGATCATGAGGGCATGAAGTTCGACCGTGGCTACATTTCTCTTACTTCATCAACTCAGCTAAAGGC
209 D E L E I I E G M K F D R G Y I S P Y F I N S A K G
703 CAGAAGTGTGAGTTCCAGGATGCTTACCTACTCTGAGTGAGAAGAAGATCTCCAGCGTACAGAGCATCGTCCAGCA
235 Q K C E F Q D A Y L L L S E K K I S S V Q S I V P A
781 CTGGAAATGCCAACCCAGCATCGCAAACCTCTGGTGATCATCGCTGAAGATGTGGACGGAGAAGCAGCATCAGCATATG
261 L E I A N Q H R K P L V I I A E D V D G E A L S T M
859 GTCCTCAACAGGTTGAAGTTGGACTTCAGGTCGTTGCAGTCAAGGCTCCAGGATTCGGGGACAACAGGAAAAGCCAG
287 V L N R L K V G L Q V V A V K A P G F G D N R K S Q
937 CTGCAGGATTTGGCAATTCCTACTGGAGGCACGGTGTGGTGTGATGCTGTGGGTTGGCCATTGAGGATATCCAG
313 L Q D L A I S T G G T V F G D D A V G L A I E D I Q
1 015 GCACATGACTTTGCCAGAGTCGGCGAGGTCATTGTGACAAAGGATGACACTATGCTCCTCAAAGGCCGTGGTATCCA
339 A H D F A R V G E V I V T K D D T M L L K G R G D P
1 039 GCAACCATTTGAGAAGCGTGAATGAGATCGCTGAACAGCTGGAGAGCACAAACAGTGACTACGAGAAGGAGAAATC
365 A T I E K R V N E I A E Q L E S T N S D Y E K E K L
1 171 AACGAGCGTCTGGCCAAGCTCTCTGATGGAGTGGCTGTGATTACGGTTGGAGGAACAAGTGACGTTGAAGTGAATGAG
391 N E R L A K L S D G V A V I T V G G T S D V E V N E
1 249 AAGAAGGACCGTGTCACTGATGCGTGAATGCCACTCGAGTGTGTGGAGGAGGAATCGTCTTGGAGGAGGATGT
417 K K D R V T D A L N A T R A A V E E G I V L G G G C
1 327 GCCCTGCTGCGCTGCATCCCAGCCCTGGACAACATCAAGCCAGCCAATGATGATCAGAAGATTGGTATCGACATTATT
443 A L L R C I P A L D N I K P A N D D Q K I G I D I I
1 405 CGCAGAGCGCTTCTGATTCAGCAATGACTATTGCCAAGAATGCAGGAGTTGAGGGCTCTCTGGTGGTGGAAAGATC
469 R R A L R I P A M T I A K N A G V E G S L V V E K I
1 483 TTGCAGAGCGCTCCAGAGATTGGATACGATGCCATGAATGGAGAATATGTCAACATGGTCGAAAGAGGCATTATTGAC
495 L Q S A P E I G Y D A M N G E Y V N M V E R G I I D
1 561 CCCACAAAGGTTGTGAGGACTGCACCGTAGATGCTGCAGGTGTGCATCTCTGCTGTACTGCTGAAGCCGTTGTG
521 P T K V V R T A P L D A A G V A S L L S T A E A V V
1 639 ACCGAGATACCAAAGGAGGAGAAGGACATGCCGGCTGGAGGAATGGGTGGAATGGGAGGCATGGGTGGCATGGGAGGC
547 T E I P K E E K D M P A G G M G G M G G M G G M G G
1 717 ATGGGATTTAAAACCGATCTGCACTGACTTTAGTGAAAAGGGTGTGGGCAGGGACATGATTTGCCCTCCCTTTCGA
573 M G F *
1 795 CTTGAAAAAACCCTGCCAAATTGAGTGTGGTGGTCTGATCATGGAGCAAAAGAAATGGACCTTACAGCCTCCCATCC
1 873 TTCCACCGCTATGTTCAATCTTATCTCTACTCATGGCTGAAGATGCACCCCTACCGCTTTAAGACAGGTTCTTGA
1 951 TAATGTGACCAGGGGAGTCTGTCTGCCTTTGTTCTATAACATTTGTGCTCACCATGTTAATGGGAAGTGCATTTA
2 029 ACATATTGCATACTGTATGCTGTGTGTTGTACGAATGTCATTTGTGCGTATAGCTGTTTTGAAATCAGACCATCTGT
2 107 AGGGGCTTTAAAAGCCAGATGTTCAAGTAAAGTTTGTCTCATGAGCAAGAGAGTAGTAGGAACTTTGACCAGTTGT
2 185 ATCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2226

```

图 1 齐口裂腹鱼 *SpHsp60* 全长 cDNA 序列及预测氨基酸序列

单横线表示 ATP/ADP 结合位点, 双横线表示  $Mg^{2+}$  连接位点, 虚线表示底物结合位点, 黑色方框表示 GGM 重复模序, 星号 (\*) 表示终止密码子

Fig. 1 Fully length cDNA sequence and deduced amino acid sequences of *SpHsp60*

ATP/ADP binding segments appear as single-lined,  $Mg^{2+}$  binding segment appears as double-lined, substrate-binding sites appear as dashed line, conserved GGM repeats at the C-terminal appear as black box, \* means as termination codon

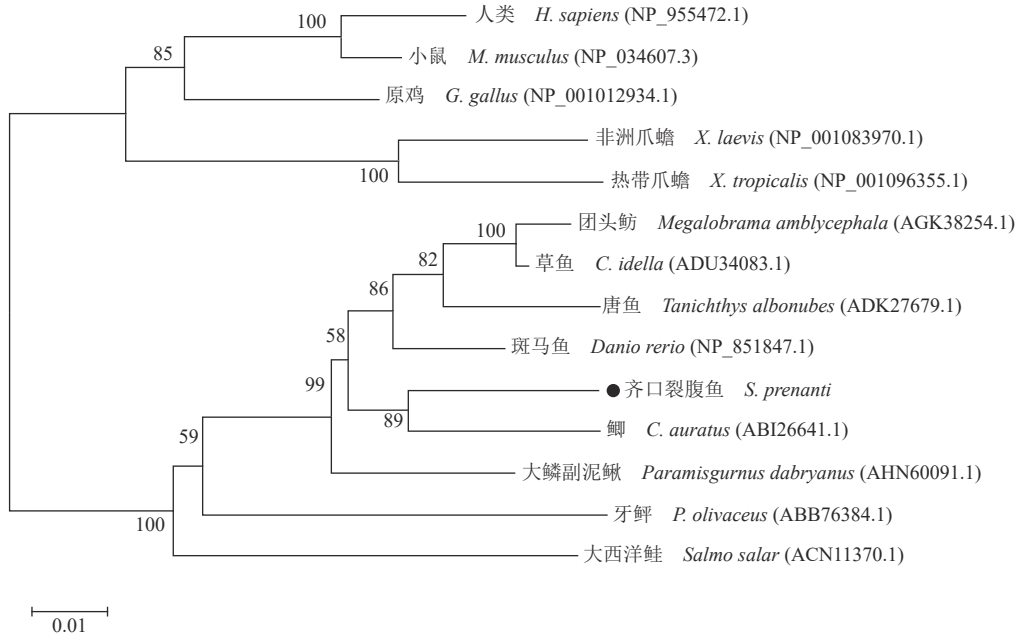


图2 Hsp60 氨基酸序列系统进化分析

比例尺表示每个残基的替代率，位于节点上的数字表示置信度，重复次数为 1000，SpHsp60 用●标出

Fig. 2 Phylogenetic analysis of Hsp60 amino acid sequence

Scale bar indicates the substitution rate per residue, numbers at nodes indicate the bootstrap value obtained after 1 000 resampling efforts and refers to percentage divergence, and the SpHsp60 is indicated by “●”

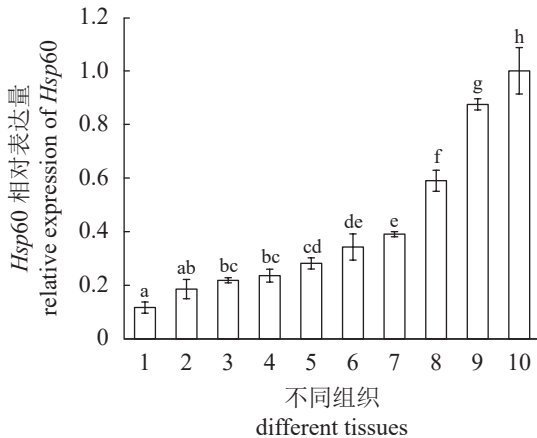


图3 齐口裂腹鱼 Hsp60 的组织分布

1. 皮肤, 2. 肌肉, 3. 肠, 4. 中肾, 5. 脾脏, 6. 脑, 7. 心脏, 8. 鳃, 9. 肝胰脏, 10. 血液; 不同字母表示差异显著 (P<0.05); n=5

Fig. 3 Tissue distribution of Hsp60 mRNA in S. prenanti

1. skin, 2. muscle, 3. intestinal, 4. trunk kidney, 5. spleen, 6. brain, 7. heart, 8. gill, 9. hepatopancreas, 10. blood; different letters mean significant difference (P<0.05); n=5

后 6 h, 肝胰脏和中肾中 SpHsp60 mRNA 表达量显著升高, 分别在感染后 24 和 6 h 达到峰值, 且 6~72 h 其表达量均显著高于对照组, 直到感染后 120 h 降至对照组水平。脾脏组织在感染后 6~72 h 时,

SpHsp60 mRNA 表达量均显著低于对照组 (图 4)。在检测的组织中, 血液、中肾和肝胰脏随着感染时间的延长, 均呈现出表达量先上升后下降的变化趋势, 其中血液表现为急性期 (6 h) 瞬时上调响应, 中肾和肝胰脏的则表现出持续 (6~72 h) 上调变化; 而脾脏组织则持续性 (6~72 h) 下调变化。

### 3 讨论

Hsp60 是热休克蛋白中的一种, 在维持线粒体功能对抗应激损伤中起着重要作用。本研究中克隆获得了齐口裂腹鱼 Hsp60 序列, 其氨基酸序列与已报道氨基酸序列的脊椎动物表现出较高的保守性。SpHsp60 氨基酸序列含有 2 个 ATP 结合位点、1 个 Mg<sup>2+</sup>结合位点和 1 个底物结合位点, 其中 1 个 ATP 结合位点的 AAVEEGIVLGGG 模序为线粒体模序, 其尾部为极其保守的连续甘氨酸 GGG 序列, 是 ATP 结合的重要辅助因子<sup>[14]</sup>。此外, SpHsp60 C 末端具有 GGM 重复序列。Hsp60 的 GGM 重复序列有轻度的疏水性, 突出到 Hsp60 蛋白的中空腔中, 使 Hsp60 蛋白的中空腔壁带有负电荷, 而带有负电荷的腔壁的排斥作用是蛋白快速折叠维持空间构象所必须的<sup>[15]</sup>。多序列比对和

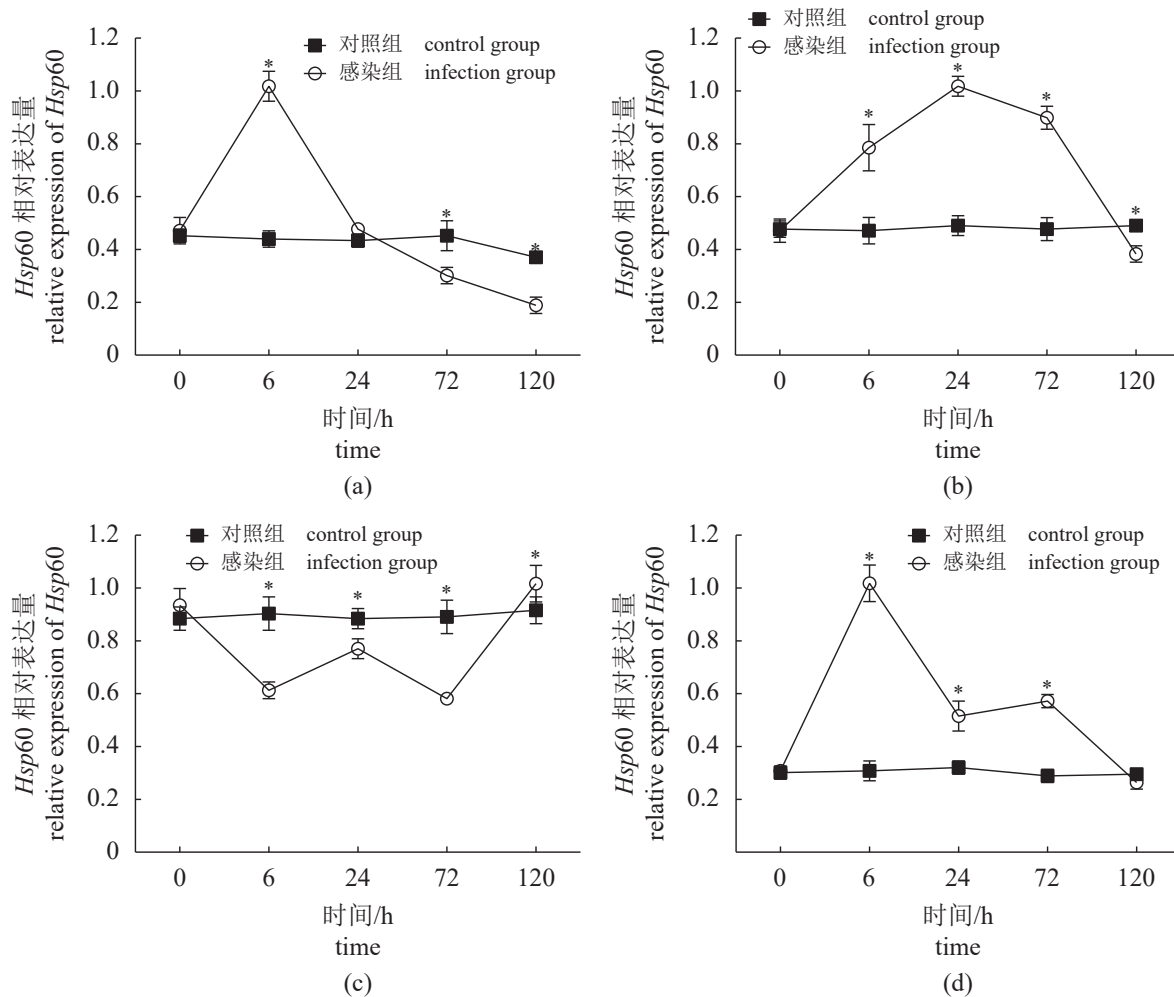


图4 齐口裂腹鱼 *Hsp60* mRNA 在血液 (a)、肝胰腺 (b)、脾脏 (c) 和中肾 (d) 中的表达量变化

\*表示在同一时间点实验组与对照组的表达量有显著差异 ( $P < 0.05$ ),  $n=8$

Fig. 4 Expression change of *Hsp60* mRNA in blood(a), hepatopancreas(b), spleen(c) and trunk kidney(d) of *S. prenanti*

\*means infection group expression level compared with control group has significant difference at the same times ( $P < 0.05$ ),  $n=8$

系统发育树分析显示, SpHsp60 与其他脊椎动物 Hsp60 有高度的氨基酸一致性 (83.7%~95.0%), SpHsp60 与硬骨鱼类 Hsp60 聚为一支。高度保守的结构提示, 本实验克隆获得的 SpHsp60 基因序列与其他鱼类的 Hsp60 可能具有相似的功能。

SpHsp60 广泛分布于齐口裂腹鱼的多个组织和器官, 这与 Hsp60 在线鳢<sup>[6]</sup>、翘嘴红鲌 (*Erythroculter ilishaeformis*)<sup>[16]</sup>、草鱼<sup>[17]</sup>、团头鲂<sup>[18]</sup>、赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*)<sup>[19]</sup> 和唐鱼<sup>[20]</sup> 中组织分布的结果相似。但 Hsp60 各组织中的本底表达存在宿主差异, 唐鱼中 Hsp60 mRNA 在肝胰腺中表达量最高, 其次为肌肉和肠道, 而鳃中的表达量最低<sup>[20]</sup>。草鱼中, 其表达量在血液中最高, 其次为肝胰腺和脑, 中肾的表达量最低<sup>[17]</sup>。线鳢中

Hsp60 表达量在脾脏最高, 其次是肾和肝脏, 肌肉中的表达量最低<sup>[6]</sup>。本研究中, SpHsp60 mRNA 在齐口裂腹鱼肝胰腺、血液和鳃组织中表达量较高, 皮肤中的表达量最低。在正常生理条件下, HSP60 的主要功能是作为线粒体分子伴侣维持其结构和功能的稳定性, 还可以作为抗原参与免疫调节<sup>[21]</sup>。本研究结果显示, SpHsp60 在线粒体丰富的肝胰腺中表达量最高, 提示 Hsp60 可能在更多需要 ATP 供能的代谢旺盛的组织中高表达。

无乳链球菌是危害齐口裂腹鱼的重要病原, 其可经血液蔓延扩散至全身, 最终引起水肿和败血症的病理表征<sup>[11]</sup>。无乳链球菌进入血液循环后, 能通过荚膜多糖与血清补体 C3b 结合, 将活化状态的 C3b 转化为抑制状态, 从而逃避宿主非特异

性免疫清除<sup>[22]</sup>,也可通过荚膜多糖逃避巨噬细胞的吞噬清除,进而对内脏组织器官造成损伤。细菌入侵时,还伴随着宿主活性氧产生和细胞病变,进而导致线粒体中未折叠蛋白积聚。Hsp60可利用ATP结合和水解对应激状态下的受损蛋白进行重折叠和修复<sup>[23]</sup>。因此,在抵抗病原体的免疫应答中Hsp60的上调表达,有助于维持细胞结构的完整性。已有研究显示,金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)<sup>[24]</sup>、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)<sup>[24]</sup>、哈维氏弧菌<sup>[7]</sup>、嗜水气单胞菌<sup>[17]</sup>、柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)<sup>[25]</sup>等均能诱导水生动物Hsp60的表达量变化,且多呈先升高后下降的变化趋势。本研究发现,齐口裂腹鱼血液、肝胰脏和中肾中的*SpHsp60* mRNA的变化在无乳链球菌感染后观察6h均显著上调响应感染刺激,整体呈先升高后下降的变化趋势,与其他鱼类研究结果相似。

值得注意的是,血液中的表达量在6h后出现迅速下降,肝胰脏和中肾中的表达量虽有下降趋势,但仍显著高于对照组,直到感染后120h恢复。研究认为,胞浆Hsp60可与caspase-3相互作用,增加应激耐受性,维持细胞稳态;但过度积聚的Hsp60也会加速caspase-3的激活,诱导细胞色素C的释放,促进细胞凋亡<sup>[26]</sup>。血液是维持体内平衡、免疫防御功能和物质运输的重要组织,是无乳链球菌引起全身性感染的重要通道。感染6h后,血液中*SpHsp60* mRNA的急剧下降,提示血细胞在对抗无乳链球菌感染中的溃败。齐口裂腹鱼血液中的*Hsp70*和*Hsp90* mRNA水平在无乳链球菌感染后表现出相同的变化趋势,感染后6h时上调表达来抵抗病原微生物的感染,24h时急剧下调。在脾脏组织中,感染无乳链球菌后*SpHsp60*表现为显著性下调,这与嗜水气单胞菌<sup>[17]</sup>和哈维氏弧菌<sup>[19]</sup>感染后,*Hsp60*在脾脏中的表达变化存在差异,但与无乳链球菌感染后齐口裂腹鱼*Hsp70*的表达量变化一致。细胞结构完整是Hsp60表达的前提,脾脏是无乳链球菌损伤的靶组织,感染引起脾脏严重坏死性结节<sup>[27]</sup>。推测感染引起脾脏的严重病理学变化可能是*SpHsp60*表达量显著下降的原因。而无乳链球菌腹腔感染,细菌首先在脾脏检出,随后才是肝胰脏和肾脏组织,肝胰脏和肾脏组织病变较脾脏病变滞后<sup>[28]</sup>。本研究中*SpHsp60*在肝胰脏和中肾中表达量的变化,在无乳链球菌感染6h后显著上调,并且在120h时回复到正常水平。结果分析认为,细胞

中Hsp60的表达量可能与病原入侵过程和病理损伤程度存在关联。此外,前期研究显示,无乳链球菌感染后,齐口裂腹鱼中肾组织中*Hsp70*和*Hsp90*表达量与*SpHsp60*均显著上调,这一结果提示中肾可以作为无乳链球菌感染后,热休克蛋白表达响应的重要监测组织。

本实验所得*SpHsp60*氨基酸序列在进化上具有较高的保守性,*SpHsp60*在被检测组织中普遍表达并且能够快速参与无乳链球菌感染的免疫响应,其中肝胰脏和中肾*SpHsp60*在6~72h呈持续显著上调,本研究为*SpHsp60*作为危险信号分子在齐口裂腹鱼细菌性疾病中作用提供基础数据。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] Roberts R J, Agius C, Saliba C, *et al.* Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2010, 33(10): 789-801.
- [2] Soltys B J, Gupta R S. Cell surface localization of the 60 kDa heat shock chaperonin protein (hsp60) in mammalian cells[J]. *Cell Biology International*, 1997, 21(5): 315-320.
- [3] Ohashi K, Burkart V, Flohé S, *et al.* Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex[J]. *The Journal of Immunology*, 2000, 164(2): 558-561.
- [4] Banerjee S, Mitra T, Purohit G K, *et al.* Immunomodulatory effect of arsenic on cytokine and HSP gene expression in *Labeo rohita* fingerlings[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 44(1): 43-49.
- [5] Zhou A G, Xie S L, Wang Z L, *et al.* HSP60 expression profile under different extreme temperature stress in albino northern snakehead, *Channa argus*[J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2018, 23(4): 791-796.
- [6] Sathyamoorthy A, Chaurasia M K, Arasu M V, *et al.* Differences in structure and changes in gene regulation of murrel molecular chaperone HSP family during epizootic ulcerative syndrome (EUS) infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 60: 129-140.
- [7] Chaurasia M K, Nizam F, Ravichandran G, *et al.* Molecular importance of prawn large heat shock proteins 60, 70 and 90[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 48: 228-238.
- [8] Cha I S, Kwon J, Park S B, *et al.* Heat shock protein profiles on the protein and gene expression levels in olive

- flounder kidney infected with *Streptococcus parauberis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(6): 1455-1462.
- [9] Pu Y D, Zhu J Y, Wang H, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of *Hsp90* in *Schizothorax prenanti*[J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2016, 21(6): 983-991.
- [10] Peng S, Liu J X, Pu Y D, *et al.* Heat shock protein 70 gene of ya-fish (*Schizothorax prenanti*) responses to thermal stress and bacterial challenges[J]. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 2018, 70: 1517-1525.
- [11] Geng Y, Wang K Y, Huang X L, *et al.* *Streptococcus agalactiae*, an emerging pathogen for cultured ya-fish, *Schizothorax prenanti*, in China[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2012, 59(4): 369-375.
- [12] Lin F J, Zhou C W, Chen H, *et al.* Molecular characterization, tissue distribution and feeding related changes of NUCB2A/nesfatin-1 in ya-fish (*Schizothorax prenanti*)[J]. *Gene*, 2014, 536(2): 238-246.
- [13] Wang E L, Wang K Y, Chen D F, *et al.* Evaluation and selection of appropriate reference genes for Real-time quantitative PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during vaccination and infection[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(5): 9998-10015.
- [14] Brocchieri L, Karlin S. Conservation among HSP60 sequences in relation to structure, function, and evolution[J]. *Protein Science*, 2000, 9(3): 476-486.
- [15] Tang Y C, Chang H C, Roeben A, *et al.* Structural features of the GroEL-GroES nano-cage required for rapid folding of encapsulated protein[J]. *Cell*, 2006, 125(5): 903-914.
- [16] 戴东, 杨雨虹. 翘嘴红鲂热休克蛋白 60 的基因克隆及其表达特征分析 [J]. *浙江海洋学院学报 (自然科学版)*, 2016, 35(2): 105-112.
- Dai D, Yang Y H. Molecular cloning, characterization and expression analysis of heat shock protein 60 in *Erythroculter ilishaeformis*[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition)*, 2016, 35(2): 105-112 (in Chinese).
- [17] Xu X Y, Shen Y B, Fu J J, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression patterns of HSP60 in the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(6): 864-870.
- [18] Song C Y, Cui Y T, Liu B, *et al.* HSP60 and HSP90 $\beta$  from blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*: molecular cloning, characterization, and comparative response to intermittent thermal stress and *Aeromonas hydrophila* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 74: 119-132.
- [19] 曲朦, 施晓峰, 张之文, 等. 赤点石斑鱼 *HSP60* 基因克隆及弧菌应激前后的组织表达特性分析 [J]. *海洋学报*, 2011, 33(1): 111-120.
- Qu M, Shi X F, Zhang Z W, *et al.* Cloning of *HSP60* gene from *Epinephelus akaara* and its express characterization before and after vibronic stressed[J]. 2011, 33(1): 111-120 (in Chinese).
- [20] 刘海超, 陈辉辉, 覃剑晖, 等. 唐鱼热休克蛋白60基因 cDNA 克隆及表达[J]. *华中农业大学学报*, 2011, 30(5): 635-639.
- Liu H C, Chen H H, Qin J H, *et al.* Cloning and expression of heat shock protein 60 cDNA of *Tanichtys albonubes*[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2011, 30(5): 635-639 (in Chinese).
- [21] Chatterjee S, Burns T F. Targeting heat shock proteins in cancer: a promising therapeutic approach[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(9): 1978.
- [22] Chaffin D O, McKinnon K, Rubens C E. CpsK of *Streptococcus agalactiae* exhibits alpha2, 3-sialyltransferase activity in *Haemophilus ducreyi*[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 45(1): 109-122.
- [23] Dahl J U, Gray M J, Jakob U. Protein quality control under oxidative stress conditions[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2015, 427(7): 1549-1563.
- [24] Zhou J, Wang W N, He W Y, *et al.* Expression of HSP60 and HSP70 in white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to bacterial challenge[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2010, 103(3): 170-178.
- [25] Xie Y J, Song L, Weng Z H, *et al.* Hsp90, Hsp60 and sHsp families of heat shock protein genes in channel catfish and their expression after bacterial infections[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 44(2): 642-651.
- [26] Wu J M, Liu T, Rios Z, *et al.* Heat shock proteins and cancer[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2017, 38(3): 226-256.
- [27] 贺扬. 感染无乳链球菌尼罗罗非鱼脾脏的病理学研究 [D]. 成都: 四川农业大学, 2017.
- He Y. Histopathology of the spleen in Nile tilapia infected by *Streptococcus agalactiae*[D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [28] 黄锦炉. 罗非鱼无乳链球菌病原学、病理学及 *cpsE* 基因的原核表达研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2012.
- Huang J L. Study on etiology, pathology of tilapia *Streptococcus agalactiae* disease and on the prokaryotic expression of *cpsE* gene[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2012 (in Chinese).



## Cloning and mRNA expression analysis of *Schizothorax prenanti* Hsp60 in *Streptococcus agalactiae* infection

CHEN Defang<sup>1</sup>, LU Lu<sup>1</sup>, PU Yundan<sup>1</sup>, QU Lianshi<sup>2</sup>, LIU Bo<sup>2</sup>,  
HUANG Xiaoli<sup>1</sup>, OUYANG Ping<sup>3</sup>, LI Zhiqiong<sup>1</sup>, GENG Yi<sup>3\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. Fisheries Development Center of Ya'an, Ya'an 625000, China;

3. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

**Abstract:** Heat shock protein (HSP) is a ubiquitous and highly conserved stress protein, and its expression changes are associated with the health status of fish. Hsp60 is a member of the heat shock protein family with a molecular weight of about 60 ku, which is mainly distributed in mitochondria of eukaryotic cells. Hsp60 was up-regulated during stress or cell injury and recognized by pattern recognition receptors as a danger signaling molecule. Previous studies showed that cytoplasmic Hsp60 could interact with caspase-3 to increase stress tolerance and maintain cell homeostasis. However, excessive accumulation of Hsp60 can also accelerate the activation of caspase-3, induce the release of cytochrome C and promote cell apoptosis. Hsp60 can refold and repair damaged proteins under stress by ATP binding and hydrolysis. Therefore, it is very important to study the function of Hsp60 in fish during bacterial infection. Fish in natural water are threatened by environmental pollution, natural toxins and microbial infection, and bacterial infection was a common disease. *Schizothorax prenanti* is a unique sub-cold-water economic fish in China and an essential variety of proliferation and release in the Yangtze River's upper reaches. *S. prenanti* is a special economic animal with high content of umami amino acids and good content and ratio of amino acids and fatty acids. In recent years, the techniques of artificial domestication and breeding have been relatively mature, but the specific immune system is poor. *Streptococcus agalactiae* is an important pathogen that harms *S. prenanti* and the typical clinical symptoms of infection are exophthalmic protrusion and subcutaneous abscess on the body surface. However, the early infection of *S. agalactiae* is not easy to detect. As an important pathogen, *S. agalactiae* can spread to the whole body through blood and eventually cause pathological manifestations of edema and sepsis. After entering the blood circulation, *S. agalactiae* can bind with serum complement C3b through polysaccharide, transforming the activated C3b into an inhibited state to avoid non-specific immune clearance of the host. Besides, *S. agalactiae* can also avoid phagocytosis and clearance of macrophages through polysaccharide in the capsule, thus causing damage to the visceral tissues and organs. In this study, the molecular characteristics and response to bacterial infection were investigated to explore *S. prenanti* Heat shock protein 60 (SpHsp60). The 2 277 bp *SpHsp60* cDNA sequence was cloned using RACE technology, which encoded 575 amino acids and had relatively conserved spatial conformation with vertebrates. Then, the analysis of tissue expression pattern showed that the expression level of *SpHsp60* was the highest in hepatopancreas, followed by blood, and the lowest in skin, muscle, and intestines. Furthermore, the mRNA expression of *SpHsp60* in blood, hepatopancreas, trunk kidney and spleen had significant differences in 6 h after *S. agalactiae* infection. Compared with the control group, the mRNA expression of SpHsp60 in hepatopancreas and trunk kidney expression significantly increased from 6 h to 72 h post-infection, while those in the spleen were significantly decreased. Our results suggested that *SpHsp60* could play an early warning role in bacterial infection, providing primary data for Hsp60 mRNA expression in hepatopancreas and trunk kidney as a warning signal for *S. agalactiae* infection in *S. prenanti*.

**Key words:** *Schizothorax prenanti*; Hsp60; *Streptococcus agalactiae*; clone; infection

**Corresponding author:** GENG Yi. E-mail: gengyisicau@126.com

**Funding projects:** Key Research Projects of Sichuan (2018NZ0007); Sichuan Freshwater Fish Industry Technology System Innovation Team Construction Project (SCCXTD-15); the Cooperation Project of Ya'an City (21SXHZ0016)