

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190416001

http://www.yykxjz.cn/

周丹, 苏泳霖, 钟如卓, 郭志诚, 邬婧, 郑哲, 王庆恒. 光裸星虫 *Hsp90* 基因的全长克隆及其在全组织和卵母细胞中的表达分析. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 150–159

Zhou D, Su YL, Zhong RZ, Guo ZC, Wu J, Zheng Z, Wang QH. Molecular cloning and expression analysis of *HSP90* of peanut worm *Sipunculus nudus*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 150–159

## 光裸星虫 *Hsp90* 基因的全长克隆 及其在全组织和卵母细胞中的表达分析\*

周丹 苏泳霖 钟如卓 郭志诚 邬婧 郑哲<sup>①</sup> 王庆恒

(广东海洋大学水产学院 湛江 524025)

**摘要** 热休克蛋白 *Hsp90* 在蛋白质正确折叠、胞内物质运输、细胞增殖调控、配子发生等过程中发挥重要的作用。本研究利用 RACE 技术克隆获得了光裸星虫热休克蛋白 *Hsp90* (*SnHsp90*) cDNA 全长序列。*SnHsp90* 全长 3110 bp, 其中, 3'UTR 为 582 bp, 5'UTR 为 72 bp, 开放阅读框为 2456 bp, 编码 818 个氨基酸。序列分析结果显示, *SnHsp90* 蛋白具有 1 个信号肽, 存在 B 型 *Hsp90* 的 3 个标签序列 FLREL、IGQFGVGFYS、LPLNVSRE 以及保守模块 GxxGxG, 表明 *SnHsp90* 属于 *Hsp90B* 亚族。与其他物种的 *Hsp90* 氨基酸序列比对发现, *SnHsp90* 与鸭嘴海豆芽 (*Lingula anatine*) *Hsp90* 相似度最高, 为 77.72%。三维结构建模发现, *Hsp90* 在不同物种之间的空间构象具有较高保守性。系统进化树分析显示, *SnHsp90* 先与小头虫 (*Capitella teleta*)、水蛭 (*Helobdella robusta*) 等环节动物的 *Hsp90* 聚为一支, 再与鸭嘴海豆芽等其他无脊椎动物聚为一大支, 而脊椎动物聚为另一大支, 表明 *SnHsp90* 与小头虫 *Hsp90* 亲缘关系最近。RT-PCR 结果显示, *SnHsp90* 在光裸星虫的体壁、收吻肌、肾管等组织中均有表达。*SnHsp90* 也可在卵母细胞不同发育时期表达, 其中, 在卵黄旺盛合成前期 (Egg2) 和外排卵母细胞期 (Egg6) 显著高表达 ( $P < 0.05$ ), 暗示, *SnHsp90* 可能参与到光裸星虫卵母细胞的蛋白质正确折叠、卵黄合成与环境抗逆等过程。研究结果为进一步探究光裸星虫卵母细胞发育的分子机制积累了基础资料。

**关键词** 光裸星虫; 热休克蛋白 *Hsp90*; 基因克隆; 表达分析; 卵母细胞

**中图分类号** Q959.19 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)05-0018-10

热休克蛋白 (Heat shock proteins, Hsps) 是目前研究最为广泛的应激蛋白之一, 可在各种环境胁迫下诱导大量表达; 在正常环境条件下, 细胞内也存在丰富的 Hsps; 根据分子量大小, Hsps 可以分为 *Hsp110s*、*Hsp90s*、*Hsp70s*、*Hsp60s* 和小分子量 Hsps 等多个家

族 (Lindquist *et al*, 1988)。其中, *Hsp90* 是一类进化上高度保守的重要细胞内伴侣蛋白, 在正常情况约占细胞溶质蛋白总量的 1%~2% (Lai *et al*, 1984), 具有辅助蛋白质正确折叠、胞内物质运输、细胞增殖调控等重要功能 (McClellan *et al*, 2007)。此外, *Hsp90* 在配子

\* 广东省科技计划 (2016A020209010; 2017A030303075) 和广东海洋大学大学生创新创业训练计划项目 (CXXL2018049) 共同资助 [This work was supported by Science and Technology Plan of Guangdong Province (2016A020209010; 2017A030303075), and Guangdong Ocean University Undergraduates Innovation and Entrepreneurship Training Program (CXXL2018049)]. 周丹, E-mail: 1334285134@qq.com

<sup>①</sup> 通讯作者: 郑哲, E-mail: haidazhengzhe@163.com

收稿日期: 2019-04-16, 收修改稿日期: 2019-06-04

发生中也具有重要功能。例如, 非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)卵母细胞的 *Hsp90* 可通过磷酸化稳定 c-Mos 蛋白, 并依赖丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径影响成熟促进因子(Maturation-promoting Factor, MPF)的合成(朱建安, 2007)。在刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)卵母细胞中, *Hsp90* 与雌激素受体(Estrogen receptor, ER)共同作用, 激活或增强卵黄蛋白原(Vitellogenin, Vg)等靶基因的转录(Wu *et al.*, 2008)。

光裸星虫(*Sipunculus nudus*)又名裸体方格星虫, 俗称沙虫, 主要栖息于暖水性海滨潮间带, 在我国华南沿海资源量较为丰富(李凤鲁等, 1990; Li *et al.*, 2017), 其味道鲜美, 含有大量谷氨酸、天冬氨酸等呈味氨基酸, 具有很高的市场价值(罗少杰等, 2016)。近年来, 光裸星虫逐渐成为广东湛江、广西北海等北部湾沿岸地区养殖新热点, 但苗种短缺制约了产业发展。目前, 关于光裸星虫繁殖生物学研究主要在形态学方面, 尚未开展分子机制研究。如, 王庆恒等(2017)报道了光裸星虫卵子发生的超微结构, 建立了卵母细胞粒径、超微结构和发育阶段的对应关系; 张家炜等(2018a)观察了光裸星虫胚胎和幼体发育的超微结构。光裸星虫体腔液中有大量生殖细胞游离发育, 但直接解剖获取的卵母细胞不具备受精能力。解析卵母细胞成熟机制, 有助于建立卵母细胞体外促熟技术, 从而提高光裸星虫苗种产量, 促进产业发展。作者所在课题组已构建了不同发育阶段卵子的转录组文库, 分析表明, *Hsp90* 在卵母细胞中表达量较高, 可能在卵母细胞发育过程中起着重要作用(未发表)。

本研究通过 RACE 技术获得 *SnHsp90* 的 cDNA 全长, 并对其序列结构、不同组织及不同卵子发育时期的表达模式进行分析, 以探究 *SnHsp90* 在光裸星虫卵母细胞发育中的作用, 为认识光裸星虫卵母细胞发育的分子机制积累基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用光裸星虫于 2018 年 6 月采集自广东省湛江市草潭镇潮间带, 取钻沙有力、体壁无伤的雌性虫体用于实验, 体重为(12.92±1.68) g。

灭菌海水清洗虫体表面砂砾后, 用 2 ml 注射器抽取少量体腔液, 镜检分辨雌雄。取 30 尾雌虫, 每尾抽取 2 ml 体腔液, 分别置于 5 ml 离心管中冰浴静置 5 min, 卵母细胞沉降到管底, 上层悬浮液中则含有各类血细胞、卵原细胞等。弃悬浮液, 在沉淀中加入 RNA Later 吹打混匀, 冰浴静置 5 min, 弃上清液,

再次加入 RNA Later 吹打混匀。将获得的卵母细胞悬浮液全部置于 50 ml 烧杯中混合, 逐次使用 100、150 和 300 目的细胞筛进行分级分离, 结合王庆恒等(2017)工作, 获得的各级卵母细胞的直径及发育时期分别为: Egg1 (<48 μm, 卵黄形成初期)、Egg2 (48~108 μm, 卵黄旺盛合成前期)、Egg3 (108~150 μm, 卵黄旺盛合成后期)和 Egg4 (>150 μm, 成熟期)(图 1)。

解剖雌虫, 如果肾管充盈, 即用过滤海水清洗肾管表面, 将肾管游离端轻轻放入 2 ml 离心管中, 用解剖针刺破肾管收集卵母细胞, 加入 RNA Later 吹打混匀。本研究共获得 30 尾雌虫肾管中的卵母细胞, 混合后作为样品 Egg5 (肾管发育时期)。另取 30 尾雌虫, 阴干刺激后放入过滤海水中促使排卵, 用 100 目筛绢网捞取水体中的外排卵母细胞, 加入 RNA Later 吹打混匀作为样品 Egg6 (外排卵母细胞)。

解剖取 9 尾雌虫取体壁(M)、肠道(I)、收吻肌(Rm)、肾管(Ne)组织以及体腔液细胞(Co), 液氮速冻, 并转移至-80℃冰箱保存, 用于 RNA 提取。

### 1.2 *SnHsp90* 基因全长 cDNA 克隆

总 RNA 提取及第一链 cDNA 合成参照赖卓欣等(2019)的方法进行。根据本课题组前期光裸星虫转录组数据中 *Hsp90* 的部分序列, 利用 Primer premier 6.0 软件设计引物(表 1)。

采用巢式 PCR 扩增 *SnHsp90* 3'UTR 和 5'UTR, PCR 产物利用 1%琼脂糖电泳检测, 产物与载体 pMD18-T 连接, 连接产物转化至 DH5α 感受态细胞, 并在固体氨苄选择培养基上培养 12 h。挑取阳性单克隆菌落进行 PCR 检测, 合格后送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

### 1.3 *SnHsp90* 序列分析

利用 DNAMAN 8 对测序结果进行拼接, 获得 *SnHsp90* 全长。采用 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>)预测 *SnHsp90* 的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)以及蛋白质氨基酸序列。利用 ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)进行理化性质及二级结构预测。ProtComp 9.0(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=protcompan&group=programs&subgroup=proloc>)进行蛋白亚细胞定位。NCBI Blast 在线分析工具(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行序列同源性、一致性分析。Phyler2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>)预测蛋白三级结构。smart 进行保守结构域预测 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)。MEME (<http://meme-suite.org/index.html>)进行 motif 挖掘。使用 Mega X 构建生物系统进化树。

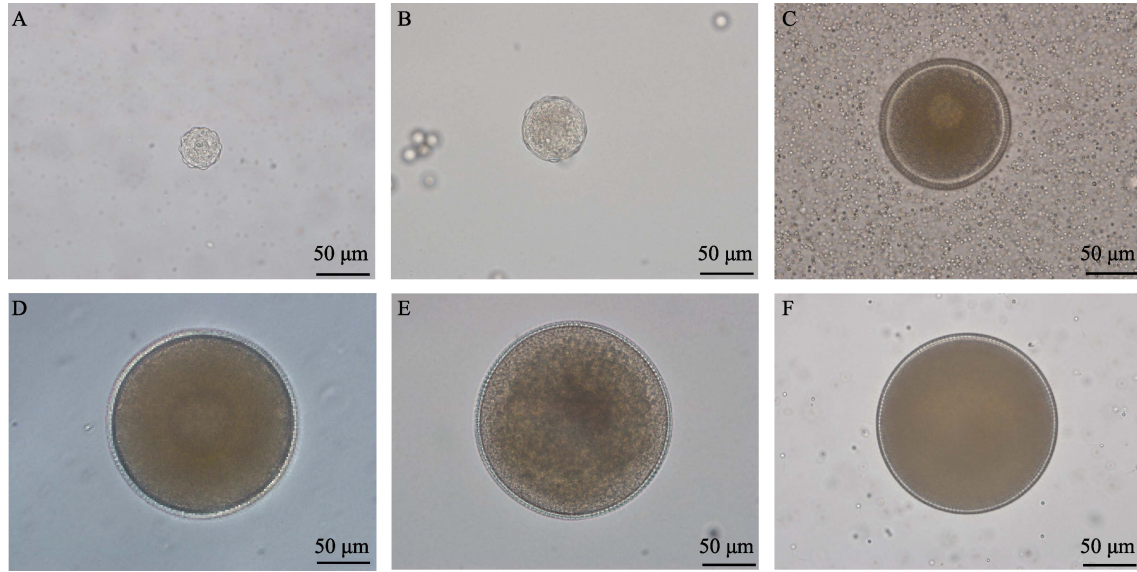


图1 光裸星虫不同时期卵母细胞形态

Fig.1 Oocytes of *S. nudus* at different developmental stages

A: 卵黄形成初期(Egg1); B: 卵黄旺盛合成前期(Egg2); C: 卵黄旺盛合成后期(Egg3);  
D: 成熟期(Egg4); E: 肾管发育时期 (Egg5); F: 外排卵母细胞(Egg6)。图8同

A: Oocyte in beginning of yolk synthesis; B: Oocyte in early stage of vigorous yolk synthesis; C: Oocyte in late stage of vigorous yolk synthesis; D: Oocyte in mature stage; E: Oocytes in the nephridioduct; F: Excretive oocyte. The same as Fig.8

表1 *SnHsp90* 基因克隆及荧光定量的引物序列Tab.1 Primer sequence used in the cloning and real-time PCR of *SnHsp90* gene

引物 Primers	序列 Sequence (5'~3')	用途 Usage
5'-outer	CTCCTTCTGCTCCTCCTCATC	5'RACE
5'-inner	GCTCTTCTGTTGCTGATAATGC	5'RACE
3'-outer	ACTCTCCGCTCTGGCTACT	3'RACE
3'-inner	GGAAGAGGAGGCTGGAGATG	3'RACE
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	菌落 PCR Colony PCR
M13-R	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	菌落 PCR Colony PCR
qPCR-S	CTCTGATGACCTGCCACTGAA	荧光定量 Fluorescent quantitation
qPCR-A	TGTGCTCCTGCTTCTCCTTC	荧光定量 Fluorescent quantitation
60S-S	GACGAGACCAAGGCTACCAT	荧光定量(内参) Fluorescent quantitation (internal reference)
60S-A	TCAACAGAGACACGAGGAAGT	荧光定量(内参) Fluorescent quantitation (internal reference)

#### 1.4 *SnHsp90* 差异表达分析

分别以 *TBP*(张家炜等, 2018b)和 *60s-L7*(筛选过程未发表)基因作为内参基因, 检测 *SnHsp90* 在成体不同组织及在不同发育时期卵母细胞的表达水平。反应体系: 上下游引物各 0.4  $\mu$ l, SYBR<sup>®</sup> Select Master Mix 5  $\mu$ l, cDNA 模板 0.4  $\mu$ l, 灭菌水 3.8  $\mu$ l。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火延伸 1 min, 共 40 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 *SnHsp90* 的相对表达量。通过 IBM SPSS Statistics 22 进行显著性分析(置信水平取 95%)。

## 2 结果与分析

### 2.1 *SnHsp90* 基因克隆及氨基酸序列

本研究利用 RACE 技术克隆获得光裸星虫 *SnHsp90* 基因 cDNA 序列, 全长 3110 bp, 其中, 5' UTR 为 72 bp; 3' UTR 为 582 bp, 开放式阅读框(ORF)长度为 2456 bp, 编码 818 个氨基酸。*SnHsp90* 同时具有 B 型 Hsp90(Hsp90B)的 3 个特征序列(FLREL、IGQFVGVFY、LPLNVSRE)以及保守模块“GxxGxG”(图 2)。



## 2.2 SnHsp90 蛋白质理化分析

利用 ProtParam 预测得到 SnHsp90 的理论分子量为 93.839 kDa, 等电点为 4.75, 负电荷残基 178 个, 正电荷残基 114 个。结果显示, 其脂溶指数(Aliphatic index)为 77.98, 总平均亲水性(Grand average of hydropathy, GRAVY)为-0.752, 属于亲水性蛋白。使用 SOPMA 软件对 SnHsp90 二级结构进行预测, 发现  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -转角和延伸链分别占整体的 55.87%、4.28% 和 12.59%。细胞亚定位预测结果显示, SnHsp90 定位于内质网上。结构域分析显示, 不同物种的 Hsp90 都含有信号肽、组氨酸激酶结构域(HATPase-c Domain)和热休克蛋白结构域(Hsp90 Domain)(图 3), 可见 Hsp90 蛋白在结构域上具有高度保守性。

## 2.3 Hsp90 蛋白序列分析

对来源于鸭嘴海豆芽(*Lingula anatine*, XP\_023932276.1)、小头虫(*Capitella teleta*, ELU00023.1)、福寿螺(*Pomacea canaliculata*, XP\_025107756.1)、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*, BAF63637.1)、水蛭(*Helobdella robusta*, XP\_009019107.1)、猫头鹰帽贝(*Lottia gigantean*, XP\_009065664.1)、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*, OWF41993.1)、白氏文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*, XP\_019627224.1)、棘冠海星(*Acanthaster planci*, XP\_022100344.1)、斑马拟丽鱼(*Maylandia zebra*, XP\_004567801.1)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*, XP\_003443932.1)、杂色鲮(*Cyprinodon variegatus*, XP\_015232211.1)、隆头蛛

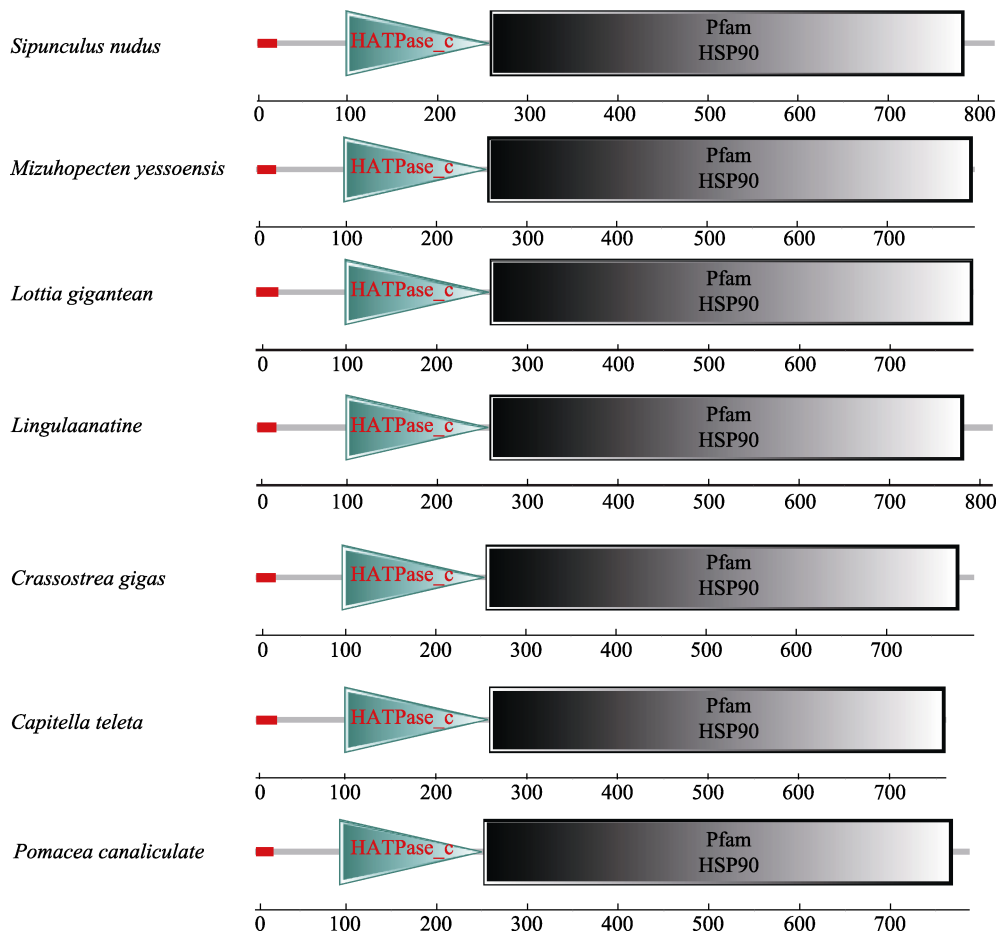


图3 不同物种 Hsp90 蛋白的结构域

Fig.3 The domains of of Hsp90 proteins of different species

红色部分为信号肽; 绿色三角 HATPase\_c 结构域; 黑色矩形为 Hsp90 结构域; 各物种 *hsp90* 基因序列登录号: 虾夷扇贝 OWF41993.1; 猫头鹰帽贝 XP\_009065664.1; 鸭嘴海豆芽 XP\_023932276.1; 太平洋牡蛎 BAF63637.1; 小头虫 ELU00023.1; 福寿螺 XP\_025107756.1

Red section is signal peptide; green triangle is HATPase\_c domain; black rectangle is Hsp90 domain; The *hsp90* GenBank accession numbers of each species are following: *Mizuhopecten yessoensis*, OWF41993.1; *Lottia gigantean*, XP\_009065664.1; *Lingula anatine*, XP\_023932276.1; *Crassostrea gigas*, BAF63637.1; *Capitella teleta*, ELU00023.1; *Pomacea canaliculata*, XP\_025107756.1

(*Stegodyphus mimosarum*, KFM57735.1)、银大马哈鱼 (*Oncorhynchus kisutch*, XP\_020311813.1)、大弹涂鱼 (*Boleophthalmus pectinirostris*, XP\_020790709.1) 的 *Hsp90* 蛋白与光裸星虫 *Hsp90* 序列进行 motif 分析, 结果表明, 各物种 *Hsp90* 蛋白序列保守性较高(图 4)。

其中, 光裸星虫 *Hsp90* 与鸭嘴海豆芽的相似性最高, 为 77.72%; 与大弹涂鱼的相似性最低, 为 69.18%。对不同物种的 *Hsp90* 蛋白序列进行 Motif 分析, 发现这些物种均具有 Motif (1~10), 且相对位置一致, 进一步表明 *Hsp90* 蛋白在序列上的保守性。

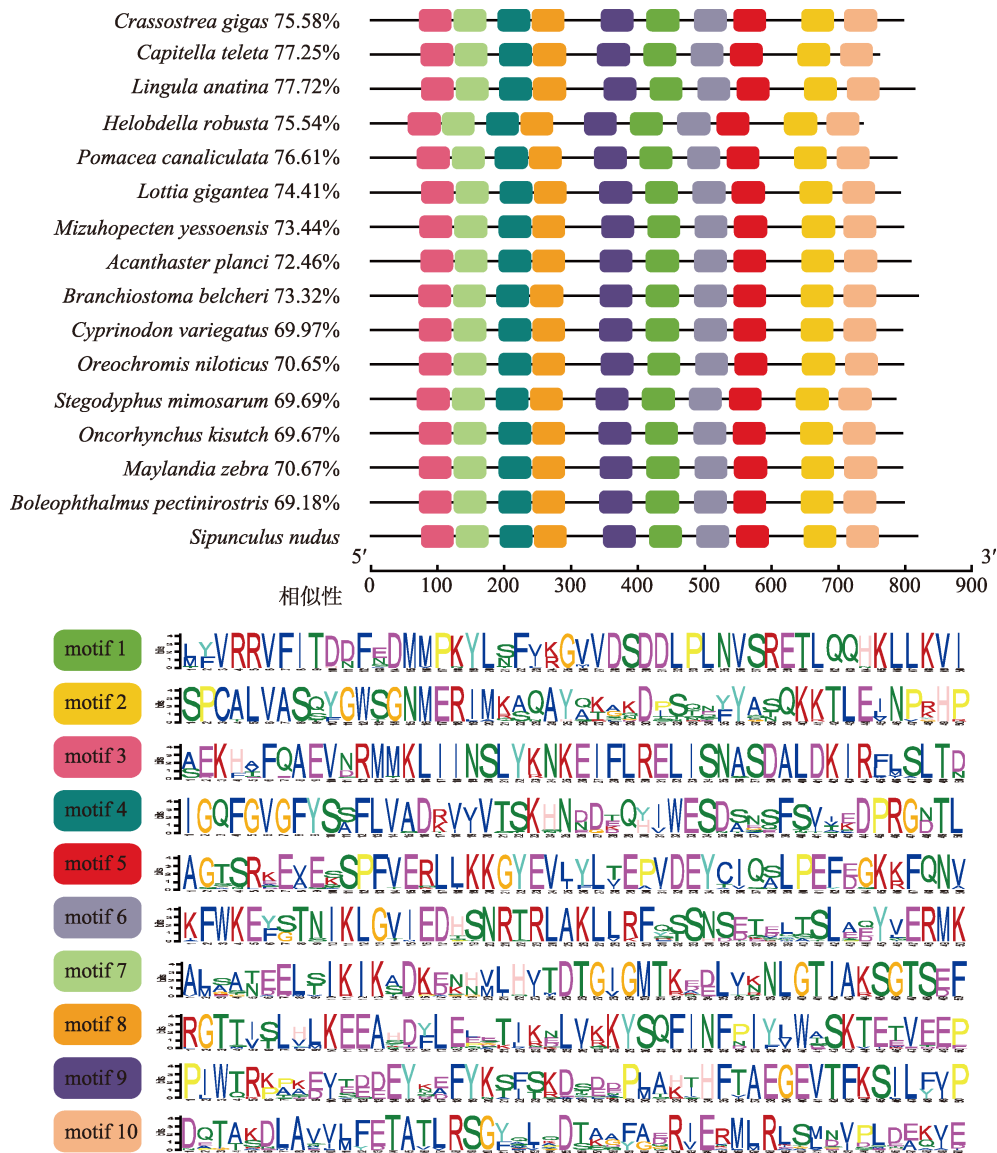


图 4 *Hsp90* 氨基酸序列 Motif 分析  
Fig.4 Motif analysis of amino acid sequence of *Hsp90*

对来自小头虫、鸭嘴海豆芽、水蛭的 *Hsp90* 和 Sn*Hsp90* 进行三级结构预测, 结果发现, 光裸星虫与鸭嘴海豆芽、小头虫、水蛭 *Hsp90* 在三级结构上相似性很高(图 5), 说明 *Hsp90* 蛋白的三级结构非常保守。

#### 2.4 Sn*Hsp90* 系统发育分析

利用最大似然法(Maximum likelihood), 选择光裸星虫、太平洋牡蛎、福寿螺、猫头鹰帽贝、虾夷扇

贝、鸭嘴海豆芽、小头虫、水蛭、白氏文昌鱼、杂色鲮、尼罗罗非鱼、斑马拟丽鱼、大弹涂鱼以及银大马哈鱼的 *Hsp90* 蛋白序列构建系统进化发育树。结果显示, *Hsp90* 系统发育树可分为无脊椎动物和脊椎动物两大支, 在无脊椎动物中, 光裸星虫 *Hsp90* 与水蛭、小头虫等环节动物聚为一支, 再与鸭嘴海豆芽、太平洋牡蛎、虾夷扇贝等软体动物聚为一支(图 6)。系统发育树聚类结果与传统分类学结果一致。

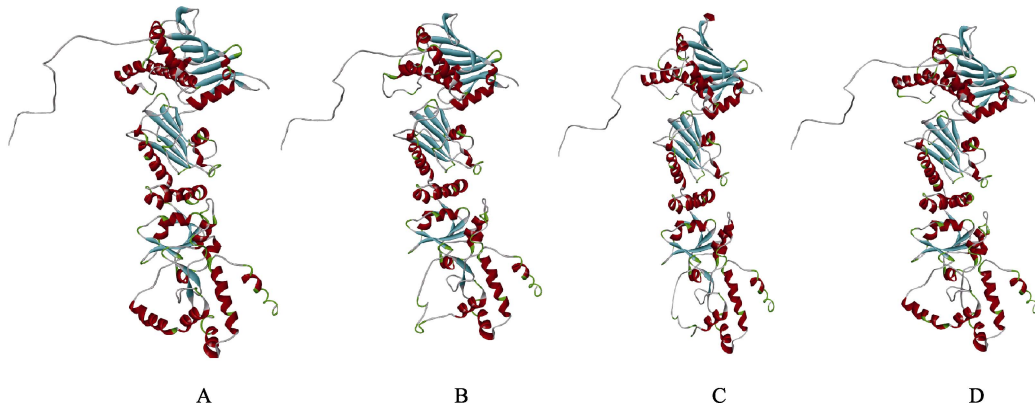


图 5 光裸星虫(A)、鸭嘴海豆芽(B)、小头虫(C)和水蛭(D)Hsp90 蛋白分子结构

Fig.5 The spatial structure of Hsp90 protein molecules of *S. nudus* (A), *L. anatina* (B), *C. teleta*(C) and *H. robusta* (D)

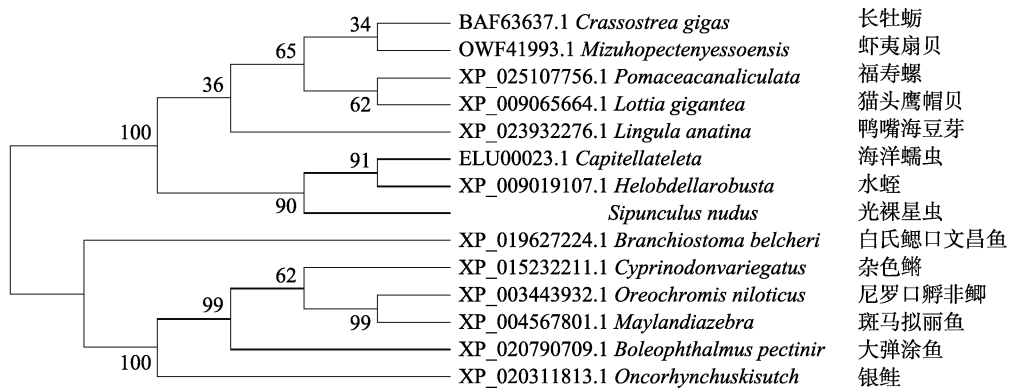


图 6 Hsp90 蛋白质聚类分析

Fig.6 Protein cluster analysis of Hsp90

2.5 SnHsp90 表达模式分析

利用 qRT-PCR 对 *SnHsp90* 进行不同组织的表达模式分析, 结果显示, *SnHsp90* 在光裸星虫的各个组

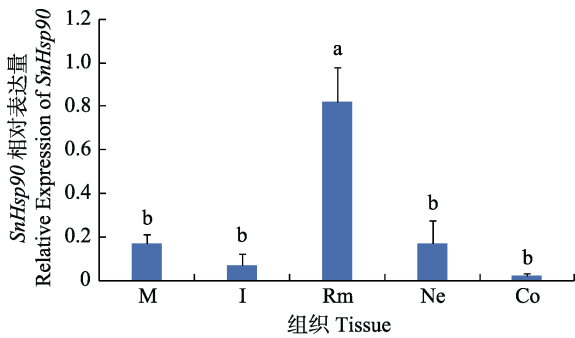


图 7 光裸星虫 *SnHsp90* 在不同组织中的相对表达量  
Fig.7 Relative expression of *SnHsp90* in different tissues

M: 体壁; I: 肠; Rm: 收吻肌; Ne: 肾管; Co: 体腔液细胞。  
不同字母代表差异性显著( $P < 0.05$ ), 下同  
M: Body wall; I: Intestine; Rm: Rhynchonellida muscle; Ne: Nephridioduct; Co: Coelomic cell. Different letters mean significant difference ( $P < 0.05$ ). The same as below

织中均有表达, 且收吻肌中表达量最高, 差异显著 ( $P < 0.05$ ) (图 7)。

如图 8 所示, *SnHsp90* 在不同发育时期卵母细胞中均有表达。其中, 在 Egg6 的表达量显著高于其他时期 ( $P < 0.05$ ), Egg2 表达量显著高于 Egg1 和 Egg3~5 ( $P < 0.05$ )。

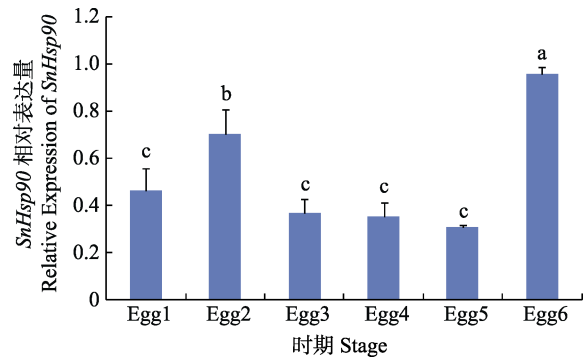


图 8 *SnHsp90* 在不同时期卵母细胞中的相对表达量  
Fig.8 Relative expression of *SnHsp90* in oocytes at different periods

### 3 讨论

生殖细胞发生是水产动物繁殖生物学研究的重要内容。近年来,通过构建不同发育时期性腺的转录组文库,已发掘了大量与水产动物繁殖相关的关键基因。例如,袁静(2013)比较分析了 5~180 日龄尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)性腺转录组,发现雌雄性腺特异表达的基因分别为 69 个和 259 个。林睿涓(2017)利用七彩神仙鱼(*Symphysodon haraldi*)性腺转录组文库,筛选出 12 个与性别决定、性腺发育和性激素调控相关的重要功能基因。本课题组前期构建了光裸星虫卵母细胞的转录组文库,分析发现 *Hsp90* 在各时期卵母细胞均具有较高的表达水平(未发表),暗示着其在卵母细胞或胚胎发育中承担着重要作用。本研究通过分析 *SnHsp90* 的序列特征及表达模式,探索其在卵母细胞发育中可能具有的功能。

*Hsp90* 家族可分为 *Hsp90A*、*Hsp90B*、TNF 受体相关因子(TNF receptor associated factors, TRAP)、*Hsp90C*、高温蛋白 G (High-temperature protein G, HTPG) 5 个亚家族,其中, *Hsp90B* 定位于真核生物内质网中,含有信号肽结构,序列上同时存在“FLREL”、“IGQFGVGFYS”及“LPLNVSRE”3 个标签序列(Chen *et al*, 2006)。本研究利用 RACE 方法克隆获得 *SnHsp90* cDNA 全长序列,显示 *SnHsp90* 具有信号肽结构,且存在 *Hsp90B* 亚家族的上述 3 个特征序列标签,可见本研究克隆所得的 *SnHsp90* 属于 *Hsp90B* 亚家族。一般来说, *Hsp90B* 亚家族的 C 末端具有内质网定位序列“KDEL”。然而,有研究指出,该序列在 *Hsp90B* 中并不保守,其 K 位点和 D 位点会发生一定的变化(Gupta, 1995; Chen *et al*, 2006)。这与本研究发现的 *SnHsp90* 氨基酸序列 C 末端序列为“HTEL”的结果一致。

对软体动物、棘皮动物、脊椎动物等 16 个物种进行 motif 搜索,发现不同物种间搜索出来的 motif 类型、数目以及排列顺序上均一致;光裸星虫、鸭嘴海豆芽、小头虫和水蛭同源 *Hsp90* 在三维结构上高度相似。以上结果均说明了 *Hsp90* 在二级和三级序列上均具有较高的保守性。

*Hsp90B* 也称为葡萄糖调节的蛋白(Glucose regulated protein 94 kDa, Grp94) (Gupta, 1995; Chen *et al*, 2006),作为分子伴侣时,有助于蛋白质的正确折叠以及防止错误折叠蛋白的积累(Young *et al*, 2001; Mamipour *et al*, 2017; Krüger *et al*, 2019);参与免疫球蛋白、Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)和某些整合蛋白(Integrin)的折叠、组装和转运等过程(Melnick

*et al*, 1992; Yang *et al*, 2007)。本研究中, *SnHsp90* 在收吻肌、体壁、肠等组织中均有表达,提示该基因广泛参与了各组织的生理活动。在收吻肌的参与下,光裸星虫的吻可快速伸缩进行摄食和钻穴。在频繁的强力伸缩过程中,收吻肌的细胞可能发生损伤, *SnHsp90* 在收吻肌中的表达量显著高于其他组织,推测与细胞的损伤修复有关。

卵母细胞发育过程中,核糖体、内质网、高尔基体等细胞器大量增殖,积累大量酶、蛋白质、mRNA 等物质。本研究显示, *SnHsp90* 在光裸星虫各时期卵母细胞中均有较高表达,有利于快速合成蛋白的正确折叠,与卵母细胞旺盛的转录和翻译活动相一致。有研究显示, *Hsp90* 可与 Greatwall 激酶结合,影响生殖细胞的细胞周期进程(Yamamoto *et al*, 2014)。在刀额新对虾中, *Hsp90* 与雌激素受体结合,介导雌激素信号转导过程,开启靶基因如卵黄蛋白原的转录(Wu *et al*, 2008)。光裸星虫卵母细胞 Egg2 处于卵黄旺盛合成前期,卵黄快速积累(王庆恒等, 2017),本研究显示,光裸星虫 *SnHsp90* 在该时期显著高表达( $P < 0.05$ ),暗示 *SnHsp90* 的表达可能与卵黄合成之间存在相关性,与刀额新对虾的研究结果相似。

*Hsp90* 在水生生物应激和抗逆过程中具有重要作用。例如, *Hsp90B* 在莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)耐盐群体的细胞中表达上调,可能在盐度耐受方面起作用(Sitthitsarn *et al*, 2017);三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)具有 2 个 *Hsp90* 基因,对胁迫条件可产生不同的响应,例如,热处理导致 *Hsp90-1* 的表达量显著上调,而 *Hsp90-2* 则显著下调(Zhang *et al*, 2009);氨氮胁迫下,中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)鳃、肝胰腺、肌肉和血细胞的 *Hsp90* 表达量均在短时间内明显上调,有利于防止分子氨对组织细胞的损伤(王芸等, 2013)。本研究中, Egg6 是经肾管排放到水体中的卵母细胞,需要应对体内外渗透压、pH、离子浓度等环境因子的重大改变, *SnHsp90* 在 Egg6 时期表达量最高,暗示 *SnHsp90* 的高表达可能与卵母细胞应对环境变化密切相关。

### 参 考 文 献

- Chen B, Zhong D, Antónia M. Comparative genomics and evolution of the *Hsp90* family of genes across all kingdoms of organisms. *BMC Genomics*, 2006, 7(1): 156–156
- Gupta RS. Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. *Molecular Biology and Evolution*, 1995, 12(6): 1063–1073



- Krüger K, Thomas R, Carsten Z, *et al.* Role of heat shock proteins 70/90 in exercise physiology, exercise immunology and their diagnostic potential in sports. *Journal of Applied Physiology*, 2019, 126(4): 916–927
- Lai BT, Chin NW, Stanek AE, *et al.* Quantitation and intracellular localization of the 85K heat shock protein by using monoclonal and polyclonal antibodies. *Molecular and Cellular Biology*, 1984, 4(12): 2802–2810
- Lai ZX, Liu Y, Wang QH, *et al.* cDNA cloning of FBP gene in *Pinctada fucata martensii* and its response to temperature stress. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(2): 106–114 [赖卓欣, 刘雅, 王庆恒, 等. 马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*) FBP 基因的克隆及其对温度胁迫的响应. *渔业科学进展*, 2019, 40(2): 106–114]
- Li FL, Kong QL, Shi GT, *et al.* Studies on the genus *Sipunculus* (Sipuncula) of the China coasts. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1990, 20(1): 93–99 [李凤鲁, 孔庆兰, 史贵田, 等. 中国沿海方格星虫属(星虫动物门)的研究. *青岛海洋大学学报*, 1990, 20(1): 93–99]
- Li J, Xie X, Zhu C, *et al.* Edible peanut worm (*Sipunculus nudus*) in the Beibu Gulf: Resource, aquaculture, ecological impact and counterplan. *Journal of Ocean University of China*, 2017, 16(5): 823–830
- Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics*, 1988, 22(3): 631–677
- Lin RJ. Gonad transcriptome of discus fish (*Symphysodon haraldi*) and expression of *vasa* gene. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2017 [林睿涓. 七彩神仙鱼(*Symphysodon haraldi*)性腺转录组分析及 *vasa* 基因的时空表达. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2017]
- Luo SJ, Yang CY, Wang QH, *et al.* Nutrition components analysis and evaluation on four wild populations of peanut worm *Sipunculus nudus*. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2016, 36(1): 25–30 [罗少杰, 杨创业, 王庆恒, 等. 光裸星虫 4 个野生群体的营养成分分析与品质评价. *广东海洋大学学报*, 2016, 36(1): 25–30]
- Mamipour M, Yousefi M, Hasanzadeh M. An overview on molecular chaperones enhancing solubility of expressed recombinant proteins with correct folding. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 102: 367–375
- McClellan AJ, Xia Y, Deutschbauer AM, *et al.* Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. *Cell*, 2007, 131(1): 121–135
- Melnick J, Aviel S, Argon Y. The endoplasmic reticulum stress protein GRP94, in addition to BiP, associates with unassembled immunoglobulin chains. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(30): 21303–21306
- Sithtisarn S, Yokthongwattana K, Mahong B, *et al.* Comparative proteomic analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* control and a salinity-tolerant strain revealed a differential protein expression pattern. *Planta*, 2017, 246(5): 843–856
- Wang Y, Li J, Zhang Z, *et al.* Effects of pH and ammonia-N stresses on *HSP90* gene expression of *Fenneropenaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(5): 43–50 [王芸, 李健, 张喆, 等. pH、氨氮胁迫对中国对虾 *HSP90* 基因表达的影响. *渔业科学进展*, 2013, 34(5): 43–50]
- Wang QH, Zhang JW, Hao RJ, *et al.* Ultrastructure of oogenesis in coelomic fluid of *Sipunculus nudus*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2017, 48(1): 57–66 [王庆恒, 张家炜, 郝瑞娟, 等. 光裸星虫体腔液中卵母细胞发生的超微结构. *海洋与湖沼*, 2017, 48(1): 57–66]
- Wu LT, Chu KH. Characterization of heat shock protein 90 in the shrimp *Metapenaeus ensis*: Evidence for its role in the regulation of vitellogenin synthesis. *Molecular Reproduction and Development*, 2008, 75(5): 952–959
- Yamamoto TM, Wang L, Fisher LA, *et al.* Regulation of Greatwall kinase by protein stabilization and nuclear localization. *Cell Cycle*, 2014, 13(22): 3565–3575
- Yang Y, Liu B, Dai J, *et al.* Heat shock protein gp96 is a master chaperone for Toll-like receptors and is important in the innate function of macrophages. *Immunity*, 2007, 26(2): 215–226
- Young JC, Moarefi I, Hartl FU. Hsp90: A specialized but essential protein-folding tool. *Journal of Cell Biology*, 2001, 154(2): 267–273
- Yuan J. Characterization of gonadal transcriptomes from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and bioinformatic analysis of *Fox* gene family. Master's Thesis of Southwest University, 2013 [袁静. 尼罗罗非鱼性腺发育过程的转录组学研究及 *Fox* 家族生物信息学分析. 西南大学硕士研究生学位论文, 2013]
- Zhang JW, Hao RJ, Wang QH, *et al.* Microscopic and ultrastructural observations of embryonic and larval development in *Sipunculus nudus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018a, 25(5): 976–987 [张家炜, 郝瑞娟, 王庆恒, 等. 光裸星虫胚胎和幼体发育的显微和超微结构. *中国水产科学*, 2018a, 25(5): 976–987]
- Zhang JW, Zheng Z, Wang QH, *et al.* Screening of reference genes for real-time PCR in whole tissue from *Sipunculus nudus*. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2018b, 38(1): 7–13 [张家炜, 郑哲, 王庆恒, 等. 光裸星虫全组织荧光定量 PCR 分析中内参基因的筛选. *广东海洋大学学报*, 2018b, 38(1): 7–13]
- Zhang XY, Zhang MZ, Zheng CJ, *et al.* Identification of two hsp90 genes from the marine crab, *Portunus trituberculatus* and their specific expression profiles under different environmental conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2009, 150(4): 465–473
- Zhu JA. The effects of injecting c-mos siRNA on maturation, fertilization and development of porcine oocyte. Institute of Biotechnology Ilan University, 2007 [朱建安. 注射 c-mos siRNA 对猪卵母细胞成熟, 受精及发育的影响. 宜兰大学生物技术研究所, 2007]

## Molecular Cloning and Expression Analysis of *HSP90* of Peanut Worm *Sipunculus nudus*

ZHOU Dan, SU Yonglin, ZHONG Ruzhuo, GUO Zhicheng,  
WU Jing, ZHENG Zhe<sup>①</sup>, WANG Qingheng  
(Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025)

**Abstract** Heat shock protein 90 (Hsp90) plays important roles in correct protein folding, intracellular material transport, cell proliferation regulation, and gametogenesis. In this study, the full-length cDNA of *Hsp90* (*SnHsp90*) of *Sipunculus nudus* was cloned using RACE technology. The results showed that *SnHsp90* is 3110 bp in length, including a 3' UTR of 582 bp and a 5' UTR of 72 bp. The open reading frame is 2456 bp in length and it encodes 818 amino acids. Sequence analysis showed that SnHsp90 has a signal peptide, with three tag sequences FLREL, IGQFGVGFYS, and LPLNVSRE and a conserved module, GxGxG, of type B Hsp90, thereby indicating that SnHsp90 belongs to the Hsp90B subgroup. Compared with other species, SnHsp90 showed the highest similarity (77.72%) with the Hsp90 of duck-billed bean sprouts. Three-dimensional structural modeling showed that the spatial conformation of Hsp90 among different species is highly conserved. Phylogenetic tree analysis showed that SnHsp90 was clustered into one branch of Hsp90 of annelids such as *Capitella teleta* and *Helobdella robusta*. The Hsp90 of all invertebrates was clustered into one branch, whereas that of the vertebrates was clustered into another branch, thus suggesting that SnHsp90 is closely related to the Hsp90 of *Capitella teleta*. RT-PCR results showed that *SnHsp90* was expressed in different tissues of *S. nudus*, such as those of the body wall, muscles, and kidney tubes. *SnHsp90* can also be expressed at different developmental stages of oocytes, and it is significantly expressed in Egg2 (oocyte in early stage of vigorous yolk synthesis) and Egg6 (excretive oocyte) ( $P < 0.05$ ). This result suggests the involvement of SnHsp90 in correct protein folding, yolk synthesis, and environmental stress resistance of *S. nudus*. The above results provide a basis for further exploration of the developmental mechanism of *Sipunculus nudus* oocytes.

**Key words** *Sipunculus nudus*; Oocyte; *HSP90*; Gene cloning; Expression analysis

① Corresponding author: ZHENG Zhe, E-mail: haidazhengzhe@163.com