

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20191028003

http://www.yykxjz.cn/

朱凌威, 张朝阳, 刘钊, 李良玉, 唐洪, 赵仲孟, 陈雨薇, 武佳韵, 黄小丽, 杨世勇. 杂交黄颡鱼 *hsp70* 基因核心序列的克隆、表达及其在高温应激下的组织表达. 渔业科学进展, 2021, 42(1): 47-55

Zhu LW, Zhang CY, Liu Z, Li LY, Tang H, Zhao ZM, Chen YW, Wu JY, Huang XL, Yang SY. Cloning, expression of *hsp70* core cDNA and the effects of heat stress on its tissue expression in *Pelteobagrus fulvidraco* ♀×*P. vachelli* ♂. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(1): 47-55

杂交黄颡鱼 *hsp70* 基因核心序列的克隆、表达 及其在高温应激下的组织表达*

朱凌威^{1#} 张朝阳^{1#} 刘 钊¹ 李良玉^{3①} 唐 洪³ 赵仲孟¹
陈雨薇¹ 武佳韵² 黄小丽¹ 杨世勇^{1①}

(1. 四川农业大学动物科技学院 成都 611130; 2. 四川农业大学生命科学学院 雅安 625014;
3. 成都市农林科学院水产研究所 成都 611130)

摘要 热休克蛋白 70(Heat Shock Protein 70, HSP70)与生物体抗逆抗胁迫能力密切相关, 其在生物体内发挥着十分重要的作用。本研究以杂交黄颡鱼(黄颡鱼 *Pelteobagrus fulvidraco* ♀×瓦氏黄颡鱼 *P. vachelli* ♂)为对象, 得到 735 bp 的 *hsp70* cDNA 核心序列, 并进行了生物信息学分析; 运用实时荧光定量 PCR 方法检测 *hsp70* 基因 mRNA 在不同组织中的相对表达量。结果显示, *hsp70* 基因在肝脏、鳃、脑、肌肉 4 个组织中均有表达, 其中, 正常条件下, 在肝脏的表达量显著高于在脑、鳃和肌肉的表达量($P<0.05$); 在 20℃(常温组)、25℃、28℃和 31℃ 4 个温度条件下, 杂交黄颡鱼 *hsp70* 基因在肝脏、鳃、脑和肌肉组织中的表达量总体上随温度升高呈上升趋势, 其中, 28℃和 31℃下, *hsp70* 基因在鳃中的表达量显著高于其他组织($P<0.05$), 表明鳃为杂交黄颡鱼温度应激的敏感组织, 可能是作为呼吸代谢重要器官的鳃在温度急剧变化情况下的一种机体保护策略。

关键词 高温应激; 黄颡鱼; *hsp70* 基因; 组织表达

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)01-0047-09

温度是鱼类生长发育过程中重要的环境因子, 鱼类作为变温水生脊椎动物, 温度对其生长、代谢以及其他生理活动都具有重要影响(Elliott, 1995)。应激反

应是鱼类受到一个或多个外界环境因素的不良刺激作用所产生的非特异性反应(王国强等, 2009)。温度应激会对鱼类生长(杨健等, 2007; 张雅芝等, 2009)、

* 2020年农业农村部农业重大技术协同推广计划试点四川省稻渔综合种养关键技术集成与推广应用项目(川农函[2020]184号)、四川省科技厅应用基础研究项目(2019YJ0515)、四川省大学生创新训练项目(201610626056)和四川农业大学双支计划项目(1921993244)共同资助 [This work was jointly supported by Key Technology Integration and Promotion and Application Project of the Rice-Fish Integrated Culture Technology in Sichuan Province of the Major Agricultural Technology Synergy Promotion Plan of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs in 2020 (川农函[2020]184号), the Applied Basic Research from Technological Office of Sichuan Province (2019YJ0515), Sichuan Provincial Innovative Training Program for College Students (201610626056) and the Double Supporting Project of Sichuan Agricultural University (1921993244)]

#共同第一作者: 朱凌威, E-mail: zhulingwei408500@126.com; 张朝阳, E-mail: zcy27219542@163.com

① 通讯作者: 李良玉, E-mail: liliangyu507@163.com; 杨世勇, E-mail: yangshiyong@sicau.edu.cn

收稿日期: 2019-10-28, 收修改稿日期: 2019-12-31

行为(陈松波, 2004; Goyer *et al*, 2014)、生殖(张亚晨, 2015)、免疫(Morvan *et al*, 1996; 何福林等, 2007)等造成影响, 从而引起鱼类一系列生理生化指标的改变, 如虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)在水温 14℃~23℃下, 红细胞数量随温度的升高而减少(向建国, 2008); 22℃下急性温度胁迫银鲌(*Pampus argenteus*)幼鱼 48 h, 其胃蛋白酶和胰蛋白酶的活力无显著变化($P>0.05$), 而二者在 32℃下的活力显著上升($P<0.05$) (施兆鸿等, 2016)。热休克蛋白 70 (Heat Shock Protein 70, HSP70) 是鱼类温度应激中最重要的生理生化指标之一。

HSP70 是热休克蛋白(Heat Shock Proteins, HSPs) 家族中最为重要的一员, 分子量约为 70 kDa。遗传学家 Ritossa 首次在果蝇(*Drosophila*)唾液腺中发现热休克蛋白(Ritossa, 1962); 除热休克外, 细胞在低温、缺氧、重金属、营养缺乏等其他应激条件下, 也有 HSPs 生成, 因此, 又被称为应激蛋白(Stress Protein, SP) (钟文英等, 2005)。HSP70 是目前鱼类中研究最广泛的一类热休克蛋白, 许多鱼类的 *hsp70* 基因序列已报道, 如罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*) (Molina *et al*, 2000)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*) (林亚秋等, 2009)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*) (明建华等, 2009)、达氏鳢(*Huso dauricus*) (Peng *et al*, 2016)等。HSP70 具有重要的生物学功能, 如分子伴侣功能、保护遗传物质 DNA、增强细胞耐受能力等。作为分子伴侣, 在高温下, HSP70 能协助变性蛋白复性(Heredia, 2008)、保护生物体免受损伤(Deane *et al*, 2006; Rosic *et al*, 2011)。

杂交黄颡鱼(黄颡鱼 *Pelteobagrus fulvidraco* ♀ × 瓦氏黄颡鱼 *Pelteobagrus vachelli* ♂)“黄优 1 号”是由华中农业大学等多家育种单位共同研发、经全国水产原种和良种审定委员会审定通过的我国淡水养殖鱼类新品种(品种登记号 GS-02-001-2018), 其在相同养殖条件下, 与母本黄颡鱼相比, 1 龄鱼生长速度平均提高 143.4%; 与父本瓦氏黄颡鱼相比, 品质和市场接

受度提高。目前, 尽管在国内已开展关于杂交黄颡鱼杂交育种及杂种鉴定等初步研究工作(王卫民, 2003; 唐忠林等, 2016; 巩高瑞等, 2017; 张佳佳等, 2017), 但在抗逆方面的研究相对较少。本研究对杂交黄颡鱼 *hsp70* 基因进行克隆、生物信息学分析、组织表达的同时, 探究了温度应激对 *hsp70* 基因组织表达的影响, 为其抗逆、抗病选育奠定理论基础, 也为其健康高效养殖提供一定的理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

选取健康无病、规格整齐的杂交黄颡鱼 30 尾, 体长为(13.88±1.03) cm, 采集于四川省眉山市东坡区缘通特种水产养殖场。

30 尾鱼随机分为 4 组, 每组 6 尾, 4 组鱼均暂养于 48 cm×34 cm×25 cm 的养殖箱中, 水深 20 cm。设置 4 个温度梯度, 分别为 20℃(常温组)、25℃、28℃和 31℃, 采用控温器控温(±0.5℃), 处理 3 h 后麻醉, 迅速取各组的肝脏、鳃、脑和肌肉, 液氮速冻, -80℃超低温冰箱保存。

1.2 *hsp70* 基因核心序列的克隆

参照 Total RNA Kit II (Omega) 提取杂交黄颡鱼总 RNA。1% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 (Thermo) 检测 RNA 的完整性、浓度和纯度。参照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa) 的步骤进行 cDNA 的合成。

根据 GenBank 中黄颡鱼的 *hsp70* cDNA 序列(登录号: KR673401.1), 设计引物(表 1)扩增杂交黄颡鱼 *hsp70* 基因核心序列。以杂交黄颡鱼 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 体系参照 2×TSINGKE® Master Mix (TSINGKE)。回收与纯化、测序, 获得杂交黄颡鱼 *hsp70* 基因核心序列。

表 1 本实验所用的引物序列
Tab.1 The primers used in the experiment

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'~3')	扩增目标 Amplification target	产物大小 Product size (bp)
HSP70-F	GCTTGGATGTGGATGGG	核心序列 Core sequence	735
HSP70-R	GAGGGATAATGATGCGGC	核心序列 Core sequence	
HSP70-qPCR-F	AGCAAAGCCACCCACCAAGA	qPCR	101
HSP70-qPCR-R	TCCAGCCCACCATCAGCAAG	qPCR	
actin-F	GGATTCGCTGGAGATGATG	qPCR	219
actin-R	TCGTTGTAGAAGGTGTGATG	qPCR	
18S-F	CCTGAGAAACGGCTACCACATCC	qPCR	221
18S-R	AGCAACTTTAATATACGCTATTGCAG	qPCR	

表 2 杂交黄颡鱼 *hsp70* 基因核苷酸与氨基酸同源性分析

Tab.2 Homology analysis of nucleotide and amino acid sequences of *hsp70* gene in the hybrid of *P. fulvidraco* ♀ × *P. vachelli* ♂ (%)

Sequence	Pf♀ × Pv♂ HSP70	Pf HSP70	Ph HSP70	Ip HSP70	Pn HSP70	Am HSP70	Sg HSP70
Pf♀ × Pv♂ HSP70		99.6	95.0	95.4	91.3	90.5	87.6
Pf HSP70	99.7		95.5	95.9	91.7	90.9	88.0
Ph HSP70	93.1	93.2		98.3	94.6	94.6	90.5
Ip HSP70	91.1	91.3	95.2		95.9	95.0	91.3
Pn HSP70	86.6	86.7	89.2	88.4		94.6	92.6
Am HSP70	86.5	86.5	89.4	87.9	91.8		93.0
Sg HSP70	80.2	79.8	81.3	81.7	83.6	82.9	

注：左下部分为核苷酸同源性，右上部分为氨基酸同源性；表中的简写由物种拉丁名首字母构成，如 *Pelteobagrus fulvidraco* 为 Pf，图 2 同。同源性分析所用的物种、核苷酸与氨基酸的登录号依次如下：黄颡鱼：XM_027142774.1，ANA95811.1；低眼无齿鲢：XM_026936442.1，XP_026792243.1；斑点叉尾鲷：XM_017472403.1，XP_017327892.1；纳氏臀点脂鲤：XM_017699660.1，XP_017555149.1；墨西哥丽脂鲤：XM_007242038.3，XP_007242100.2；滇池金线鲃：XM_016269488.1，XP_016124974.1

Note: The lower left hand part of the table shows the homology of nucleotide, and the upper right hand part of the table shows the homology of amino acid. The abbreviations in the table are acronyms of the scientific name of the species, for example, Pf stands for *Pelteobagrus fulvidraco*. The same as Fig.2. Species and Accession numbers of nucleotide and amino acid sequences used in the Homology analysis respectively are as follows: *Pelteobagrus fulvidraco*, XM_027142774.1, ANA95811.1; *Pangasianodon hypophthalmus*, XM_026936442.1, XP_026792243.1; *Ictalurus punctatus*, XM_017472403.1, XP_017327892.1; *Pygocentrus nattereri*, XM_017699660.1, XP_017555149.1; *Astyanax mexicanus*, XM_007242038.3, XP_007242100.2; *Sinocyclocheilus graham*, XM_016269488.1, XP_016124974.1

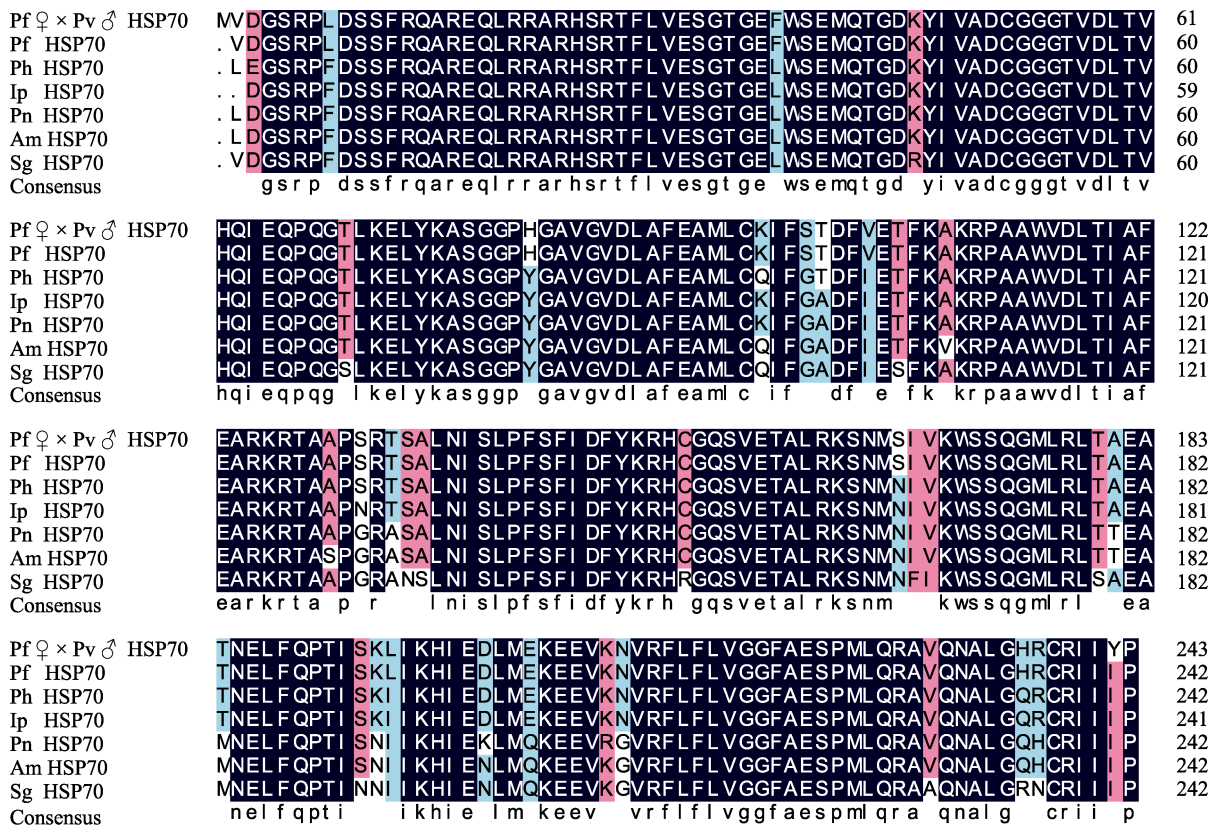


图 2 *hsp70* 基因氨基酸序列比对

Fig.2 Alignment of amino acid sequences of *hsp70* gene

2.3 *hsp70* 基因组织表达

以 β -actin 和 18S rRNA 为双内参基因, qPCR 分析 *hsp70* 基因在 20℃ (常温组) 杂交黄颡鱼不同组织中的相对表达量。结果显示(图 3), *hsp70* 基因在杂交黄颡鱼肝脏、鳃、脑、肌肉 4 个组织均有表达, 其表达量由高到低依次为肝脏、脑、鳃、肌肉。肝脏与脑、鳃、肌肉的表达量均差异显著 ($P < 0.05$), 脑与鳃、肌肉的表达量差异显著 ($P < 0.05$), 鳃与肌肉的表达量差异不显著 ($P > 0.05$)。

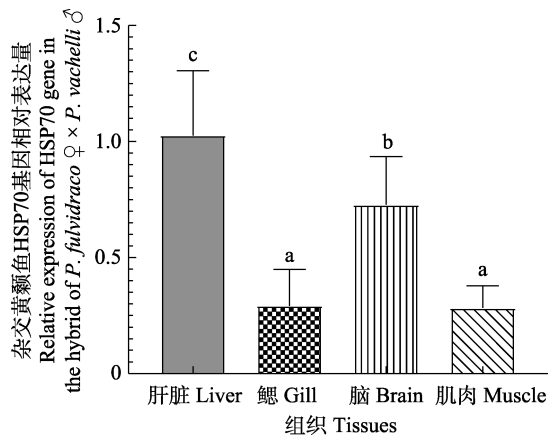


图 3 杂交黄颡鱼 *hsp70* 基因在不同组织中的相对表达量
Fig.3 Relative expression of *hsp70* gene in different tissues of the hybrid of *P. fulvidraco* ♀ × *P. vachelli* ♂

图中不同字母表示在不同组织间的表达差异 ($P < 0.05$)
Different letters in the figure represent differences in expression between different tissues ($P < 0.05$)

2.4 *hsp70* 基因在温度应激下组织表达分析

温度应激实验 qPCR 结果显示(图 4), 25℃、28℃ 和 31℃ 下, *hsp70* 基因的表达量由高到低依次均为鳃、肝脏、脑、肌肉, 且 28℃、31℃ 下 *hsp70* 基因于鳃中的表达量与肝脏、脑、肌肉中的表达量差异显著 ($P < 0.05$); 而 25℃ 下, *hsp70* 基因于鳃中的表达量与肝脏中的表达量差异不显著 ($P > 0.05$), 但与脑、肌肉中的表达量差异显著 ($P < 0.05$)。

肝脏中 *hsp70* 基因的表达量随温度的升高先上升后下降, 28℃ 时达到最大值, 表达量显著高于 20℃、25℃ 和 31℃ 下的表达量 ($P < 0.05$); 鳃中, *hsp70* 基因的表达量随温度的升高而不断上升, 31℃ 时达到最大值, 28℃ 和 31℃ 下的表达量显著高于 20℃ 和 25℃ 下的表达量 ($P < 0.05$), 说明温度应激对杂交黄颡鱼 *hsp70* 基因在鳃中的表达量影响大; 脑中, *hsp70* 基因的表达量随温度的升高先上升后下降, 28℃ 时达到最大值, 且 28℃ 下的表达量与 20℃、25℃ 和 31℃ 下的表

达量差异显著 ($P < 0.05$); 肌肉组织中, *hsp70* 基因的表达量随温度的升高逐渐上升, 31℃ 时达到最大值, 31℃ 下的表达量与 20℃、25℃ 和 28℃ 下的表达量差异显著 ($P < 0.05$)。

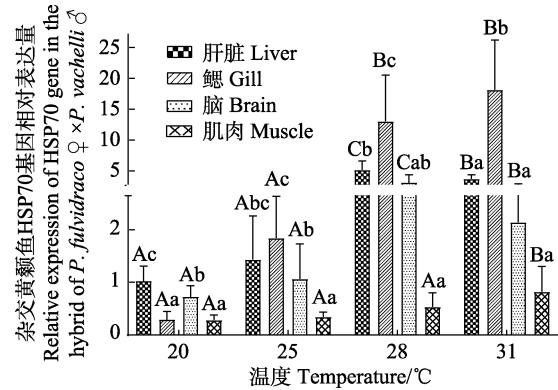


图 4 不同温度下杂交黄颡鱼 *hsp70* 基因在不同组织中的相对表达量

Fig.4 Relative expression of *hsp70* gene in different tissues of the hybrid of *P. fulvidraco* ♀ × *P. vachelli* ♂ at different temperatures

不同小写字母代表同一温度不同组织间的表达差异 ($P < 0.05$), 不同大写字母代表同一组织不同温度下的表达差异 ($P < 0.05$)

Different lowercase letters in the figure represent differences in expression between different tissues at the same temperature ($P < 0.05$), and different uppercase letters represent differences in expression at different temperatures of the same tissue ($P < 0.05$)

3 讨论

鱼类是变温脊椎动物, 温度的日变化和季节变化对鱼的生命过程有重要影响, 水环境的其他因素(如重金属、缺氧、细菌感染等)也影响着鱼类的分布和生理状态, 而这些因素与它们体内热休克蛋白的数量和表达程度息息相关。HSPs 在生物界普遍存在, 在同一生物体的不同组织内均有表达(曲凌云等, 2004)。本研究通过 qPCR 的方法检测了 *hsp70* 在杂交黄颡鱼不同组织中的相对表达量, 结果表明(图 3), *hsp70* 基因在肝脏、鳃、脑、肌肉具有明显的组织特异性, 肝脏中的表达量显著高于脑、鳃、肌肉中的表达量, 这可能与肝脏在动物消化、代谢、免疫、内环境的调节等方面都具有十分重要的作用有关。*hsp70* 的组织特异性表达在草鱼(林亚秋等, 2009)、淞江鲈 (*Trachidermus fasciatus*) (刘庆全, 2013)、达氏鳢 (Peng et al, 2016) 中均有报道, 但相对表达量和组织间表达水平存在差异: 如草鱼的组织间的表达量由高到低依次为脑、肝胰脏、鳃、肌肉, 且脑与肝胰脏、鳃、

肌肉的表达量差异显著($P < 0.05$) (林亚秋等, 2009); 淞江鲈 *hsp70* 基因在鳃、脑、肌肉、肝脏中的表达量依次递减(刘庆全, 2013)。可能原因有物种的差异性及实验温度设置的不同, 温度变化对 *hsp70* 在不同的组织中会产生不同的响应(Peng *et al.*, 2016; 王云彪, 2008; 万文菊, 2006)。

温度应激实验研究不同温度下杂交黄颡鱼 *hsp70* 基因在不同组织中的表达水平。20℃~31℃, 随着温度的升高, *hsp70* 基因在不同组织中均呈先上升趋势, 表明 *hsp70* 基因在保护机体免受损害中发挥作用, 其中, 鳃和肌肉中的表达量呈持续上升的趋势; 而在肝脏和脑中的表达量呈先上升后下降的趋势, 28℃到达峰值。鳃、肌肉和肝脏中的变化趋势与草鱼 *hsp70* 对温度响应的变化(周鑫等, 2013)趋势一致。脑中的变化趋势与鲤鱼(*Cyprinus carpio*)的应激实验中 10℃~28℃的变化趋势(王云彪, 2008)一致, 均呈不断上升的趋势。此外, 西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)进行急性热应激, 鱼体从 17.5℃迅速转至 27.5℃后, *hsp70* 于鳃和脑中的表达量均呈上升趋势(田照辉等, 2013), 这也与本研究结果相符。

hsp70 具有广泛的运用前景, 可作为生物指标诊断鱼类的生理状态(Dunlap *et al.*, 1997; Vijayan *et al.*, 1997)、生物标记物与水环境监测(De, 1996; 沈骅等, 2004), 而作为生物标志物在生理学上的合理性即是基于 HSP70 家族的诱导模式, 即细胞内 HSP70 表达水平可作为机体“温度计”的功能(Ge *et al.*, 2002)。HSP70 对温度极为敏感, 已被用作分子标记分析生物对温度等环境变化的响应(Mukhopadhyay *et al.*, 2010)。研究表明, 急性温度应激会显著改变尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)幼鱼肝脏 HSP70 的表达, 其表达量基本呈先上升后下降的趋势(强俊等, 2012); 而银鲫(*Carassius auratus gibelio*)热应激 2 h 后, 肝脏中 *hsp70* 表达量达到最高($P < 0.01$) (周朝伟, 2018)。*hsp70* 在不同组织对温度应激的响应不同, 本研究中, 杂交黄颡鱼的鳃组织对温度的响应最为敏感, 鳃为杂交黄颡鱼温度应激的敏感组织, 可能是鳃作为鱼类呼吸代谢的重要器官, *hsp70* 表达量升高是鱼类在温度急剧变化情况下的一种机体保护策略。*hsp70* 基因家族存在亚型 *hsc70* 基因, 目前国内有开展黄颡鱼 HSC70 表达(张娟, 2009)的相关研究, 25℃下 HSC70 在所检测的组织中均有表达, 且表达量在鳃中最高, 在肌肉中最低, 这与杂交黄颡鱼在 25℃下 HSP70 的组织表达结果一致, 进一步表明 HSP70 基因家族对黄颡鱼的鳃在温度应激下产生的免疫应答对机体保护具有重要作用。

研究表明, 氧限制的热耐受性理论(Oxygen- and capacity-limited thermal tolerance, OCLTT) (Pörtner *et al.*, 2001、2008)可适用于淡水广温性鱼类(周鑫等, 2013), 根据该理论: 当环境温度超过生物体最适温度时, 有氧代谢会下降, 随着温度进一步上升, 将导致有氧代谢丧失, 转变为无氧代谢, 氧自由基和变性蛋白相应增加, 影响免疫应答及诱导热休克蛋白的表达。由于热休克蛋白的表达需要消耗能量, 其只能提供短期保护(Pörtner *et al.*, 2001、2007)。基于 *hsp70* 的表达量, 后期可开展杂交黄颡鱼耗氧率和半致死温度的实验, 以确定杂交黄颡鱼的生理临界温度。这将为杂交黄颡鱼抗逆、抗病选育奠定理论基础, 也为其健康高效养殖提供理论指导。

致谢: 感谢四川农业大学生命科学学院杜小刚副教授和李云坤博士研究生, 感谢四川农业大学动物科技学院银龙硕士、张月硕士、张松培硕士和苗懿硕士研究生, 感谢四川大学生命科学学院黎树博士研究生及眉山伟继水产种业科技有限公司张继业总经理等在实验过程中给予的指导和帮助!

参 考 文 献

- Chen SB. Study on feeding rhythm and respiratory metabolism of common carp at different temperature. Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2004, 1-70 [陈松波. 不同温度条件下鲤鱼摄食节律与呼吸代谢的研究. 东北农业大学硕士研究生学位论文, 2004, 1-70]
- De PD. Heat-shock proteins as biomarkers of pollution. *Human and Experimental Toxicology*, 1996, 15(4): 279-285
- Deane EE, Woo NY. Impact of heavy metals and organochlorines on *hsp70* and *hsc70* gene expression in black sea bream fibroblasts. *Aquatic Toxicology*, 2006, 79(1): 9-15
- Dunlap DY, Matsumura F. Development of broad spectrum antibodies to heat shock protein 70s as biomarkers for detection of multiple stress by pollutants and environmental factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1997, 37(3): 238-244
- Elliott JA. A comparison of thermal polygons for British freshwater teleosts. *Freshwater Forum*, 1995, 5(3): 178-184
- Feng MH, Chen P, Lei W, *et al.* Full-length cDNA cloning and the effect of dietary Vitamin D₃ on tissue expression of major histocompatibility complex- II in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(5): 992-999 [冯美惠, 陈沛, 雷文, 等. 黄颡鱼 MHC class II 基因全长的克隆及饲料维生素 D₃ 对其组织表达的影响. 水生生物学报, 2017, 41(5): 992-999]
- Ge H, Ba B. Thermal acclimation changes DNA-binding activity of heat shock factor 1 (HSF1) in the goby *Gillichthys mirabilis*: Implications for plasticity in the heat-shock

- response in natural populations. *Journal of Experimental Biology*, 2002, 205(20): 3231–3240
- Gong GR, Zhang J, Dan C, *et al.* Identification of *Pelteobagrus fulvidraco*, *Pelteobagrus vachelli* and their interspecific hybrid by DNA markers. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(2): 321–325 [巩高瑞, 张晋, 丹成, 等. 应用 DNA 分子标记鉴定黄颡鱼、瓦氏黄颡鱼及其杂交种的研究. *水生生物学报*, 2017, 41(2): 321–325]
- Goyer K, Bertolo A, Pepino M, *et al.* Effects of lake warming on behavioural thermoregulatory tactics in a cold-water stenothermic fish. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92514
- He FL, Xiang JG, Li CJ, *et al.* Preliminary study on the effect of water temperature on hematology indices of rainbow trout. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(3): 363–369 [何福林, 向建国, 李常健, 等. 水温对虹鳟血液学指标影响的初步研究. *水生生物学报*, 2007, 31(3): 363–369]
- Heredia P. Heat shock protein (HSP70) RNA expression differs among rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) clonal lines. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 149(4): 552–556
- Lin YQ, Zheng YC, Ji H. Cloning of HSP70 partial cDNA sequence and its tissue differential expression in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Freshwater Fisheries*, 2009, 39(4): 67–71 [林亚秋, 郑玉才, 吉红. 草鱼 HSP70 基因 cDNA 部分序列克隆及其组织表达差异. *淡水渔业*, 2009, 39(4): 67–71]
- Liu QQ. A preliminary study of roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus* Heckel) HSP70 sequence cloning and expression. Master's Thesis of Fudan University, 2013, 25–27 [刘庆全. 淞江鲈(*Trachidermus fasciatus* Heckel)HSP70 全序列的克隆及其表达的初步研究. 复旦大学硕士研究生学位论文, 2013, 25–27]
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- Ming JH, Xie J, Liu B, *et al.* Cloning, sequence analysis of HSP70 cDNA and effects of heat stress on its mRNA expression in *Megalobrama amblycephala*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(5): 635–648 [明建华, 谢骏, 刘波, 等. 团头鲂 Hsp70 cDNA 的克隆、序列分析以及热应激对其 mRNA 表达的影响. *中国水产科学*, 2009, 16(5): 635–648]
- Molina A, Biemar F, Muller F, *et al.* Cloning and expression analysis of an inducible HSP70 gene from tilapia fish. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 2000, 474(1): 5–10
- Morvan CL, Deschaux P, Troutaud D. Effects and mechanisms of environmental temperature on carp (*Cyprinus carpio*) anti-DNP antibody response and non-specific cytotoxic cell activity: A kinetic study. *Developmental and Comparative Immunology*, 1996, 20(5): 331–340
- Mukhopadhyay I, Nazir A, Saxena D, *et al.* Heat shock response: Hsp70 in environmental monitoring. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2010, 17(5): 249–254
- Peng G, Zhao W, Shi Z, *et al.* Cloning HSP70 and HSP90 genes of kaluga (*Huso dauricus*) and the effects of temperature and salinity stress on their gene expression. *Cell Stress and Chaperones*, 2016, 21(2): 349–359
- Portner HO, Berdal B, Blust R, *et al.* Climate effects on growth performance, fecundity and recruitment in marine fish: Developing a hypothesis for cause and effect relationships in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and common eelpout (*Zoarces viviparus*). *Continental Shelf Research*, 2001, 21(18–19): 1975–1997
- Portner HO, Farrell AP. Physiology and climate change. *Science*, 2008, 322(5902): 690–692
- Portner HO, Knust R. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science*, 2007, 315(5808): 95–97
- Qiang J, Yang H, Wang H, *et al.* The effect of acute temperature stress on biochemical indices and expression of liver HSP70 mRNA in Gift Nile Tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*). *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012(5): 943–953 [强俊, 杨弘, 王辉, 等. 急性温度应激对吉富品系尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 幼鱼生化指标和肝脏 HSP70 mRNA 表达的影响. *海洋与湖沼*, 2012(5): 943–953]
- Qu LY, Sun XQ, Xiang JH, *et al.* Advances in study on heat shock protein. *Advances in Marine Science*, 2004, 22(3): 385–391 [曲凌云, 孙修勤, 相建海, 等. 热休克蛋白研究进展. *海洋科学进展*, 2004, 22(3): 385–391]
- Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 1962, 18(12): 571–573
- Rosic NN, Pernice M, Dove S, *et al.* Gene expression profiles of cytosolic heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 from symbiotic dinoflagellates in response to thermal stress: Possible implications for coral bleaching. *Cell Stress and Chaperones*, 2011, 16(1): 69–80
- Shen H, Wang XR, Zhang JF, *et al.* Application of the stress protein (HSP70) as the biomarker in studying zinc and copper, and the joint toxicity to fish liver. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2004, 24(5): 895–899 [沈骅, 王晓蓉, 张景飞. 应用应激蛋白 HSP70 作为生物标志物研究锌、铜及其联合毒性对鲫鱼肝脏的影响. *环境科学学报*, 2004, 24(5): 895–899]
- Shi ZH, Xie MM, Peng SM, *et al.* Effects of temperature stress on activities of digestive enzymes and serum biochemical indices of *Pampus argenteus* juveniles. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 30–37 [施兆鸿, 谢明媚, 彭士明, 等. 温度胁迫对银鲳 (*Pampus argenteus*) 幼鱼消化酶活性及血清生化指标的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 30–37]
- Tang ZL, Zhou GQ, Mao JQ, *et al.* Large-scale hybridization of *Pelteobagrus fulvidraco* and *Pelteobagrus vachelli*. *Jiangsu*

- Agricultural Science, 2016, 44(10): 303–305 [唐忠林, 周国勤, 茆健强, 等. 黄颡鱼与瓦氏黄颡鱼的规模化杂交繁殖. 江苏农业科学, 2016, 44(10): 303–305]
- Tian ZH, Xu SG, Wang W, *et al.* Effects of acute thermal stress on HSP70 mRNA, physiology and nonspecific immunity in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(2): 344–350 [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. 水生生物学报, 2013, 37(2): 344–350]
- Vijayan M, Kennedy C, Forsyth R, *et al.* Handling stress does not affect the expression of hepatic heat shock protein 70 and conjugation enzymes in rainbow trout treated with β -naphthoflavone. *Life Sciences*, 1997, 61(2): 117–127
- Wang GQ, Wang W. Research progress in the effect of the stress response on fish. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2009, 37(24): 11579–11580 [王国强, 王雯. 应激反应对鱼类影响的研究进展. 安徽农业科学, 2009, 37(24): 11579–11580]
- Wang WJ. Molecular cloning of two members of HSP70 and their transcriptional regulation responding to *Vibrio alginolyticus* infection and immunization in *Xiphophorus helleri*. Doctoral Dissertation of Shandong Agricultural University, 2006, 48–54 [王文菊. 剑尾鱼 HSP70 家族两成员的分子克隆及溶藻弧菌感染与免疫对其基因的诱导表达. 山东农业大学博士研究生学位论文, 2006, 48–54]
- Wang WM. Preliminary studies in crossbreeding of *Pelteobagrus fulvidraco* and *P.vachelli*. Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2003, 1–25 [王卫民. 黄颡鱼与瓦氏黄颡鱼杂交育种初步研究. 华中农业大学博士研究生学位论文, 2003, 1–25]
- Wang YB. Tissue-specific expression and response of Hsp70 in *Cyprinus carpio* under heat stress. Doctoral Dissertation of Northeast Normal University, 2008, 52–62 [王云彪. 热影响下鲤鱼 Hsp70 组织特异性表达和应激反应. 东北师范大学博士研究生学位论文, 2008, 52–62]
- Xiang JG. Physiological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to increased water temperature: A preliminary study. Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2008, 20–24 [向建国. 虹鳟对水温应激反应的初步研究. 湖南农业大学硕士研究生学位论文, 2008, 20–24]
- Yang J, Chen G, Huang JS, *et al.* Effects of temperature and salinity on the growth and activities of antioxidant enzymes of *Cobia (Rachycentron canadum)* juveniles. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2007, 27(4): 25–29 [杨健, 陈刚, 黄建盛, 等. 温度和盐度对军曹鱼幼鱼生长与抗氧化酶活性的影响. 广东海洋大学学报, 2007, 27(4): 25–29]
- Zhang J, Zhang QZ, Zhang ZH, *et al.* HSC70 gene and its tissue expression analysis in yellow catfish. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, 33(3): 426–434 [张娟, 张其中, 张占会, 等. 黄颡鱼 HSC70 基因及其组织表达分析. 水生生物学报, 2009, 33(3): 426–434]
- Zhang JJ, Zhang GS, Zhang HY, *et al.* Analysis of karyotype and nutrient composition of parents and their hybrid progeny of *Pelteobagrus fulvidraco* (♀)×*Pelteobagrus vachelli* (♂). *Marine Fisheries*, 2017, 39(2): 149–161 [张佳佳, 张国松, 张宏叶, 等. 黄颡鱼(♀)×瓦氏黄颡鱼(♂)双亲及其杂交子代核型和营养成分分析. 海洋渔业, 2017, 39(2): 149–161]
- Zhang YC. Effect of acute temperature stress on hematological physiology and reproductive endocrine functions of gestational ovoviviparous black rockfish, *Sebastes schlegelii*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2015, 37–60 [张亚晨. 急性温度胁迫对妊娠期许氏平鲷血液生理和生殖内分泌机能的影响. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2015, 37–60]
- Zhang YZ, Liu DE, Fang QS, *et al.* Effects of temperature and salinity on growth and survival rate of young *Epinephelus coioides*. *Journal of Jimei University (Natural Science)*, 2009, 14(1): 8–13 [张雅芝, 刘冬娥, 方琼珊, 等. 温度和盐度对斜带石斑鱼幼鱼生长与存活的影响. 集美大学学报(自然科学版), 2009, 14(1): 8–13]
- Zhong WY, Pu XM. Advances in molecular biology research of heat shock proteins. *Medical Recapitulate*, 2005, 11(2): 148–150 [钟文英, 普雄明. 热休克蛋白的分子生物学研究进展. 医学综述, 2005, 11(2): 148–150]
- Zhou CW, Hu XW, Lei L, *et al.* Effects of heat stress on biochemical indices and HSP70 mRNA expression in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(6): 65–71 [周朝伟, 胡续雯, 雷骆, 等. 热应激对银鲫生化指标和 HSP70 mRNA 表达的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 65–71]
- Zhou X, Dong YW, Wang F, *et al.* Effect of rapid temperature change on expression of hsp70 and hsp90 in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(2): 216–221 [周鑫, 董云伟, 王芳, 等. 草鱼 hsp70 和 hsp90 对温度急性变化的响应. 水产学报, 2013, 37(2): 216–221]

(编辑 冯小花)

Cloning, Expression of *hsp70* Core cDNA and the Effects of Heat Stress on Its Tissue Expression in *Pelteobagrus fulvidraco* ♀ × *P. vachelli* ♂

ZHU Lingwei^{1#}, ZHANG Chaoyang^{1#}, LIU Zhao¹, LI Liangyu^{3①}, TANG Hong³, ZHAO Zhongmeng¹, CHEN Yuwei¹, WU Jiayun², HUANG Xiaoli¹, YANG Shiyong^{1①}

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

2. College of Life Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014;

3. Fisheries Research Institute, Chengdu Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Chengdu 611130)

Abstract Heat shock protein 70 (HSP70) is closely related to the stress resistance and anti-stress ability of organisms, where it plays a crucial role. In the present study, a 735 bp core cDNA sequence of the *hsp70* gene isolated from the liver tissue of *Pelteobagrus fulvidraco* ♀ × *P. vachelli* ♂ was amplified using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and the bioinformatics was analyzed. The relative mRNA expression of the *hsp70* gene in different tissues was tested using quantitative real-time PCR (qPCR), which revealed that *hsp70* mRNA was found in all tested tissues, including liver, gill, brain, and muscle, and *hsp70* mRNA expression levels in liver tissue were significantly different from that in brain, gill, and muscle tissue ($P < 0.05$). At 20°C (control), 25°C, 28°C, and 31°C, the *hsp70* gene expression in liver, gill, brain, muscle tissue generally increased with increasing temperature. The *hsp70* gene expression level in gill tissue at 28°C and 31°C was significantly higher than that in other tissues ($P < 0.05$), which indicated that gill tissue was sensitive to heat stress in the hybrid. It was suggested that this may be an organism protection strategy for gill tissue, which is important for respiratory metabolism under extreme changes in temperature.

Key words Heat stress; *Pelteobagrus fulvidraco*; *hsp70* gene; Tissue expression

① Corresponding author: LI Liangyu, E-mail: liliangyu507@163.com; YANG Shiyong, E-mail: yangshiyong@sicau.edu.cn