

热休克及菌胁迫对厚壳贻贝 *HSP70* 基因表达的影响

刘慧慧, 李云娟, 何建瑜, 吴 炯, 吴常文*

(浙江海洋学院海洋科学与技术学院, 国家海洋设施养殖工程技术研究中心, 浙江 舟山 316022)

摘要: 70 ku 的热激蛋白(HSP70)具有细胞内分子伴侣和细胞外免疫调节功能,是受到热激、重金属、干旱、疾病、寄生虫感染等条件胁迫后产生的诱导蛋白。本实验利用同源克隆法,获得厚壳贻贝 *HSP70* 基因 1 700 bp 的核心序列,BLAST 比对和系统进化分析显示,该序列与已知的双壳贝类相应分子高度同源,其中与紫贻贝 *HSP70* 基因相似性高达 96%,在进化树中两者位于同一分支。37 °C 热激后,厚壳贻贝肝胰腺和鳃中 *HSP70* 基因的表达快速上调,2 h 即达到对照组 30 倍,随后持续上升,肝胰腺中最高表达量达到对照组 100 倍,说明厚壳贻贝 *HSP70* 分子为典型的热诱导蛋白。鉴于大肠杆菌及枯草芽孢杆菌是水体中常见微生物,进一步利用实时荧光定量 PCR 技术检测上述两种细菌感染后,*HSP70* 基因在厚壳贻贝鳃和肝胰腺中的表达水平,结果显示,两种细菌均可引起厚壳贻贝鳃和肝胰腺的 *HSP70* 基因表达上升,但大肠杆菌诱导效应显著,8 h 时表达量达到最高,鳃为对照组的 4 倍,肝胰腺为 4.5 倍,随后逐渐下降,到 48 h 已恢复到原始水平;枯草芽孢杆菌刺激后,肝胰腺组织中最高表达量在刺激后 6 h 约为对照组 2.5 倍,与注射 PBS 的效果相差不大,鳃组织的响应较肝胰腺组织明显,表达量缓慢升高,8 h 达到最高,为对照组 4 倍,随后迅速下降,直至生理水平。研究表明,厚壳贻贝 *HSP70* 分子在调节环境胁迫及宿主免疫防御中具有重要功能。

关键词: 厚壳贻贝; 热激蛋白 *HSP70*; 热休克; 大肠杆菌; 枯草芽孢杆菌

中图分类号: Q 786; S 968.3

文献标志码: A

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是生物体抵御环境胁迫的有效因子之一^[1],其中 *HSP70* 为热休克蛋白家族中进化上最为保守的一类,包括 *HSP70A*、*HSP70B*、*GRP78* (葡萄糖调节蛋白, glucose regulated protein) 和 *HSC70* (热激同源蛋白, heat shock cognate) 等 4 类分子,在生物体中充当分子伴侣的角色,起到稳定和复性变性蛋白^[2]、调节蛋白质折叠和运输^[3]、使热激因子(heat shock factor, HSF)处于非活动状态^[4]、调节细胞凋亡以及协助细胞增殖^[5] 等功能,被称为应对环境胁迫的经典反应蛋白,其含量高低对生物机体的损伤程度具有一定的指示作用。

厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 俗称青口、海

红,隶属于瓣鳃纲(Lamellibranchia)、贻贝目(Mytiloida)、贻贝科(Mytilidae)、贻贝属(*Mytilus*),在我国分布广泛,向北延伸至辽宁大连,向南延伸至云南,其中以浙江沿海产量最高,已发展为当地重要的养殖贝类品种^[6]。但近年来,随着沿海城市工业化进程的加速,海洋污染日趋严重^[7],使厚壳贻贝繁殖的周边海域水质、环境因子持续恶化,生境污染加剧。厚壳贻贝作为一种典型的潮间带生物,由于其对环境污染物(如病原微生物、重金属等)具有很强的耐受性和积累作用,且有研究表明该种贝类体内某些分子对污染物反应灵敏,因此常被用作环境指示生物来监测海区环境的变化^[6]。大肠杆菌(*Escherichia coli*)为一种普遍存在于生

收稿日期:2015-02-11 修回日期:2015-04-25

资助项目:国家科技支撑计划(2011BAD13B08);浙江省自然科学基金(LY14C190004号);浙江海洋学院科研启动项目(Q1416)

通信作者:吴常文, E-mail: wucw88@126.com

物体肠道、土壤、水体中的革兰氏阴性菌,在水体中的含量直接影响了水生生物的生长及卫生情况,只有其在养殖水域中含量少于 14 个/100 mL 的养殖贝类才能直接进入市场^[8]。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是水体中另一优势菌种,为典型的革兰氏阳性菌,其分布范围与大肠杆菌相似,但具有净化水体的作用,能分解有机物,促进优良单细胞藻类的生长,分泌生长调节因子,刺激贝类产生免疫反应等功能^[9]。因此,为研究两种水体常见菌对厚壳贻贝机体免疫防御的影响,本实验克隆厚壳贻贝 *HSP70* 基因,并以其鳃和肝胰腺中 *HSP70* 为分子标记,监测大肠杆菌和枯草芽孢杆菌刺激下 *HSP70* 基因的表达情况,以为厚壳贻贝的大规模健康养殖及正确运用其 *HSP70* 分子作为环境污染预警分子提供指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用厚壳贻贝壳长 9 ~ 12 cm,壳宽 4 ~ 6 cm,于 2013 年 10 月购自于浙江省舟山市水产品市场,于 25 °C 洁净海水中暂养一周,每天换新鲜海水,定期投喂微绿球藻(*Nannochloris oculata*)和小球藻(*Chlorella vulgaris*)。实验所用大肠杆菌和枯草芽孢杆菌为本实验室保存菌种。

1.2 实验方法

实验样品的处理

热激实验:以 37 °C 热激厚壳贻贝 1 h,分别于处理后第 0、2、4、6、8、12、24、48 h 采集厚壳贻贝(每个时间点随机取 3 只)肝胰腺及鳃组织各 50 ~ 100 mg,用于提取总 RNA。

菌感染实验:试验用大肠杆菌及枯草芽孢杆菌分别接种于 LB 培养基中,37 °C 培养 4 h(OD = 0.4 ~ 0.6),5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,分别重悬于灭菌的 PBS (pH 7.4),调菌浓度至 OD₆₀₀ = 0.4,取菌液 100 μL,从实验贻贝后闭壳肌注射,分别于感染后 0、2、4、6、8、12、24、48 h 采集贻贝的肝胰腺和鳃组织各 50 ~ 100 mg,用于提取总 RNA。

总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 总 RNA 提取按 TaKaRa 公司的 Trizol Total RNA 提取试剂盒推荐方法进行,产物以 1.5% 非变性琼脂糖电泳检测,并置于紫外分光光度计(Bio-Rad,

USA)下检测其 A₂₆₀/A₂₈₀ 值。以 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 试剂盒(反转录试剂盒, TaKaRa 公司)对所提取的 RNA 进行反转录,获得相应 cDNA。

厚壳贻贝 *HSP70* 基因克隆 根据已知双壳类紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*, AY861684.1)、栉孔扇贝(*Chlamys farrer*, AY206871.1)、文蛤(*Meretrix meretrix*, HQ256748.1)、翡翠贻贝(*Perna viridis*, DQ988328.1)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*, AF144646.1)、缢蛏(*Sinonovacula constricta*, JF748730.1)的 *HSP70* 基因序列,以 Primer 5.0 软件,设计得到兼并性引物 *HSP70*-F、*HSP70*-R(表 1),以厚壳贻贝肝胰腺 cDNA 为模板,扩增 *HSP70* 分子,20 μL 扩增反应体系:10 × buffer 2 μL, dNTPs 0.4 μL, *HSP70*-F 0.8 μL, *HSP70*-R 0.8 μL, ddH₂O 13 μL, Taq 酶(TaKaRa) 0.4 μL,模板 cDNA 0.6 μL。PCR 扩增条件:95 °C 预变性 4 min,94 °C 变性 1 min,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 60 s,循环 35 次;最后 72 °C 延伸 10 min。以 DL 2000 Marker 为标记,1.5% 琼脂糖电泳检测 PCR 产物,选取与预期大小一致的约 1700 bp 的条带,用琼脂糖胶纯化试剂盒(天根生化科技有限公司)纯化后,送上海英潍捷基生物公司测序。

厚壳贻贝 *HSP70* 基因克隆序列分析 以 DNASTAR 7.0 将双向测序获得的 cDNA 序列进行拼接,进一步以 BLAST(<http://www.Ncbi.Nlm.Nih.gov/BLAST/>)和 Clustal X 1.8 进行序列比对分析;通过 MEGA 5.2 软件,利用 Neighbor-Joining 算法建立进化树,重复 1 000 次计算 Bootstrap 值,对厚壳贻贝 *HSP70* 分子进行系统进化分析。

厚壳贻贝 *HSP70* 基因表达实时荧光定量 PCR 检测 根据 *HSP70* 基因测序结果设计荧光定量 PCR 引物 Mc*HSP70*-F、Mc*HSP70*-R(表 1),以 β -actin 为内参,分析大肠杆菌和枯草芽孢杆菌感染条件下厚壳贻贝 *HSP70* 基因表达特征。实验所用模板根据 A₂₆₀/A₂₈₀ 值,按统一标准稀释至一定浓度,20 μL PCR 扩增反应体系:Mc*HSP70*-F/0.8 μL, Mc*HSP70*-R 0.8 μL, 2 × SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa) 10 μL, cDNA 0.8 μL, ddH₂O 7.6 μL。采用两步法进行扩增,即 95 °C 预变性 1 min,95 °C 变性 10 s,

65 °C 延伸 45 s, 共 40 个循环, 结束后, 从 55 °C 缓慢升温到 95 °C, 制备熔解曲线。每次反应都设置阴性对照和无模板对照, 每个反应 3 个重复孔。

数据处理 *HSP70* 基因的相对表达量按 PFAFFL 分析后, 以 Sigma Plot 10.0 软件建立柱状图, 并以 SPSS v19.0.0 进行单因子显著性差异分析 (One-Way ANOVA) 和 *t* 检验。

表 1 厚壳贻贝 *HSP70* 基因克隆及荧光定量所用的引物序列

Tab.1 Primer sequences for *HSP70* cloning and real-time quantitative PCR in *M. coruscus*

引物名称 primer name	引物序列 primer sequences
HSP70-F	5'-GATYTKGGWACHACATAYTCCTG-3'
HSP70-R	5'-ACTCCYTCMARYTCYTTCTGTT-3'
McHSP70-F	5'-GAAATTGTCTTAGTAGGTGGATC-3'
McHSP70-R	5'-CAGGCTGGTTGTCGGAGTAAGT-3'
β -actin-F	5'-ATGAAACCACCTACAACAGT-3'
β -actin-R	5'-TAGACCCACCAATCCAGACG-3'

表 2 厚壳贻贝 *HSP70* 基因序列 BLAST 结果

Tab.2 BLAST of *HSP70* in *M. coruscus*

物种 species	基因类型 genotype	基因长度/bp gene length	相似度/% similarity	序列号 sequence number
紫贻贝 <i>Mytilus galloprovincialis</i>	HSP70	2 396	96	AY861684.1
翡翠贻贝 <i>Perna viridis</i>	HSP70	2 406	83	DQ988328.1
文蛤 <i>Meretrix meretrix</i>	HSP70	2 292	80	HQ256748.1
长牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	HSC71	2 265	79	AB122064.1
栉孔扇贝 <i>Chlamys farreri</i>	HSP70	2 573	78	AY206871.1

选取来源不同的 *HSP70* 基因序列, 利用 MEGA 5.2 构建进化树 (图 2), 不同纲类的物种分别成簇, 说明在生物进化过程中, *HSP70* 分子的基因变异较为明显。在软体动物分支中, 厚壳贻贝与紫贻贝首先聚在一起, 再与其他双壳贝类聚类。相对于哺乳动物、鸟类、鱼类等脊椎动物, 贝类 *HSP70* 与节肢动物具有更近的亲缘关系, 上述进化树所表现的进化关系与传统的分类方法一致, 亦说明本次实验获得序列为 *HSP70* 分子, 与 BLAST 比对结果一致。

2.2 热激条件下厚壳贻贝 *HSP70* 基因的表达分析

HSP70 和内参 β -actin 的扩增曲线均呈“S”

2 结果

2.1 厚壳贻贝 *HSP70* 基因序列及分析

以反转录得到的肝胰腺 cDNA 为模板 (总 RNA 浓度, $A_{260}/A_{280} = 1.83$), 以兼并性引物扩增得到约 1 700 bp 的特异性条带, 与预期分子量大小接近 (图 1), 测序后通过 BLAST 比对发现, 目标基因与 5 种贝类的 *HSP70* 基因相似性较高 (表 2), 并与紫贻贝的 *HSP70* 基因最为相近, 相似度达 96%, 说明所得序列为厚壳贻贝 *HSP70* 分子。

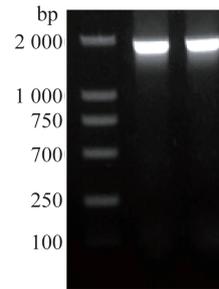


图 1 厚壳贻贝 *HSP70* 扩增产物电泳图谱

Fig.1 The gel electrophoresis pattern of *HSP70* PCR product in *M. coruscus*

形, 复孔间扩增曲线重叠, 指数区明显、基线平整, 阴性对照和无模板对照均无扩增, 熔解曲线为单一峰, 扩增效率达 $100\% \pm 5\%$, 说明 RT-PCR 反应体系良好, 无非特异性扩增, 确保了相对定量结果的准确性^[10]。实验结果显示, 厚壳贻贝肝胰腺和鳃组织 *HSP70* 基因表达在热刺激后呈明显上升趋势, 2 h 即为对照组的 30 倍, 并在随后 6 ~ 48 h 内一直维持较高水平, 其中肝胰腺组织 *HSP70* 表达受热诱导更明显, 在 6 ~ 24 h 超过对照组 100 倍, 鳃组织则在 6 ~ 12 h 表现为较高水平表达 (图 3)。

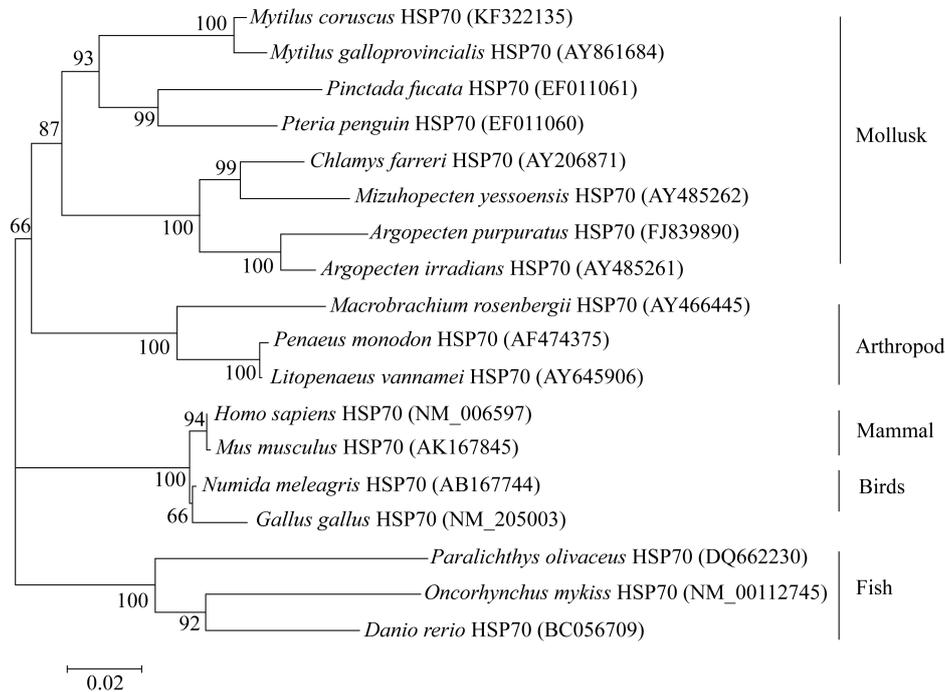


图 2 厚壳贻贝 *HSP70* 基因与其他物种之间的进化分析

Fig. 2 Phylogenetic tree depicting the relationship of *M. coruscus* *HSP70* with other species

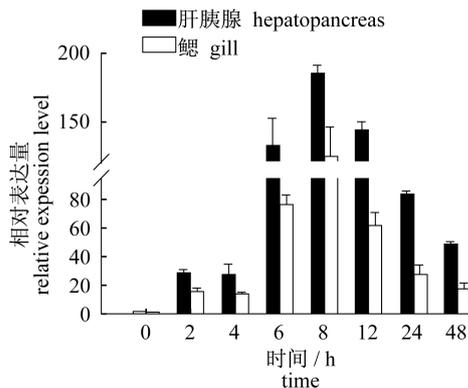


图 3 热激后厚壳贻贝肝胰腺和鳃组织内 *HSP70* 基因的表达分析

Fig. 3 Analysis of *HSP70* expression in hepatopancreas and gills of *M. coruscus* after heat shock

2.3 菌感染后厚壳贻贝 *HSP70* 基因的表达分析

菌感染条件下,肝胰腺和鳃组织中 *HSP70* 基因的表达均有一定的变化,但厚壳贻贝 *HSP70* 基因针对大肠杆菌的诱导效应明显,对枯草芽孢杆菌响应较弱。大肠杆菌胁迫后,*HSP70* 基因表达呈明显的时间依赖型效应:肝胰腺组织中,*HSP70* 基因表达量随着时间的延长逐渐升高,到 8 h 时,达到最高,为对照组的 4 倍;鳃组织中,其表达效应与肝胰腺类似,但 8 h 的最高表达量略高于肝胰腺组织,约为对照组的 4.5 倍,随后逐渐下降,到 48 h 已恢复到原始水

平。枯草芽孢杆菌刺激后,厚壳贻贝 *HSP70* 基因的表达量略有变化,肝胰腺组织中最高表达量在刺激后 6 h,约为对照组 2.5 倍,与注射 PBS 的效果相差不多;鳃组织的响应效果较肝胰腺组织明显,随着时间延长表达量缓慢升高,8 h 达到最高,为对照组 4 倍,随后迅速下降,直至生理水平(图 5)。

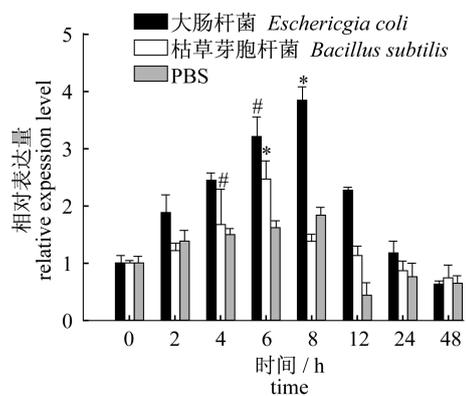


图 4 菌刺激实验中肝胰腺组织内 *HSP70* 基因的表达分析

“*”表示显著 ($P < 0.05$), “#”表示极显著 ($P < 0.01$), 下同

Fig. 4 Analysis of expression of *HSP70* in hepatopancreas after bacterial infection

The asterisks above the bars represent statistically significant differences from the control samples, “*” at $P < 0.05$, “#” at $P < 0.01$. The same below

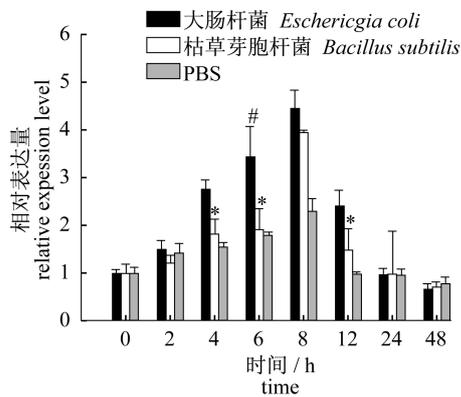


图5 菌刺激实验中鳃组织内 *HSP70* 基因的表达分析

Fig. 5 Analysis of expression of *HSP70* in gills after bacterial infection

3 讨论

3.1 厚壳贻贝 *HSP70* 基因序列分析

热激蛋白 *HSP70* 具有细胞内分子伴侣和细胞外免疫调节功能^[11],是受到热激、重金属、干旱、疾病、寄生虫感染等条件胁迫后产生的诱导蛋白,目前已有多种海洋经济贝类的 *HSP70* 被克隆和研究,如海湾扇贝 (*Argopecten irradians*)^[11]、栉孔扇贝^[12]、紫贻贝^[13]、长牡蛎等,本实验用兼并性引物扩增得到厚壳贻贝 *HSP70* 分子核心序列,通过 BLAST 比对显示,该分子与其他双壳贝类 *HSP70* 分子高度相似,如与紫贻贝同源性高达 96%,与翡翠贻贝相似性为 83%,因此认为所得到的序列为厚壳贻贝 *HSP70* 分子。为了揭示其系统发育地位,采用 Neighbor-Joining 方法构建 *HSP70* 分子的系统进化树,结果显示,厚壳贻贝与紫贻贝首先聚在一个进化分支,进一步与翡翠贻贝等其他的软体动物聚类,其所在的无脊椎动物进化支与脊椎动物分支明显,该进化关系与传统的分类方法一致。*HSP70* 作为一种重要的胁迫诱导蛋白,常被用作环境污染的指示标记物,其表达水平在一定程度上可以有效地反映生物体受环境毒物的损害程度,该特征在海洋双壳贝类中表现明显^[11]。本研究从厚壳贻贝中克隆出的该基因核心序列,还有待于通过扩增基因全长确定其结构特征,并找到调控位点,为进一步利用该基因评估厚壳贻贝等海洋经济贝类的养殖水体污染状况奠定基础。

3.2 热激条件下厚壳贻贝 *HSP70* 基因的表达分析

HSP70 作为“分子伴侣”可结合细胞内变性

或新合成的异常蛋白,限制变性蛋白聚合或将其修复,不能修复的将其降解,并重新激活某些酶的活性,以维持细胞的功能和生存,抵抗某些环境因素引起的细胞凋亡,延长细胞的存活^[2]。多数生物体的 *HSP70* 分子在接近致死温度胁迫下,表达量会上升,起到保护生物体维持生活力的作用,本实验得到相似的结果,厚壳贻贝肝胰腺和鳃中的 *HSP70* 热激后表达上升明显(如图 3),8 h 时达到最高,随后缓慢下降,到实验结束时仍高于生理水平,说明厚壳贻贝 *HSP70* 是受热诱导型热激蛋白,因缺乏内含子序列^[14],当受到高温刺激时,其 mRNA 不需要经过剪切拼接等加工过程优先表达,与新生蛋白及受热诱导影响而伸展的蛋白结合,防止它们产生聚合并催化上述蛋白重新折叠成原来的状态^[15],以利于其及时发挥对机体(细胞)的保护作用^[14],这也是生物热耐受的分子机制之一。另外,在整个热应激过程中,诱导型 *HSP70* mRNA 的合成会显著增加,且诱导水平依应激强度和持续时间的长短而异,但这种诱导表达一般认为是短期的^[16],因此,本实验后期厚壳贻贝 *HSP70* 表达亦逐渐下降,地中海贻贝在 35 °C 热激后,消化腺 *HSP70* mRNA 的含量亦呈先升高后降低的模式,该特征可能与生物体获得对高温的耐受力有关,此时应激已有所缓解^[17]。

3.3 菌感染后厚壳贻贝 *HSP70* 基因的表达分析

厚壳贻贝与其他海洋贝类一样,在其生活的环境中存在大量不同种类的微生物及病原菌,但这些微生物不一定会导致贝类感染或造成危害,主要原因是贝类本身具有一套比较完善的防御系统,能抵御外来病原菌的侵袭,热休克蛋白 *HSP70* 就是其中重要的免疫防御分子,其作为生物进化过程中最为保守的蛋白之一,在真核生物和原核生物中的同源性高达 50%,具有很强的免疫耐受性,病原菌往往是 *HSP70* 分子重要的免疫反应靶物质,同时该分子在维持细胞代谢平衡以及保护机体免受病原体损伤中具有重要功能^[14]。本研究表明,大肠杆菌(革兰氏阴性菌)和枯草芽孢杆菌(革兰氏阳性菌)刺激均能引起厚壳贻贝肝胰腺和鳃 *HSP70* 基因表达上升,说明厚壳贻贝 *HSP70* 是典型的诱导型蛋白,对细菌的入侵起到重要的免疫防御作用,可能细菌进入生物机体后释放了某些细胞毒素,促使胞内细胞因子合成与分泌,产生变异蛋白或多肽链碎片,这些异常蛋白

与厚壳贻贝细胞内游离的 HSP70 结合,诱导了细胞内 HSP70 基因的高效率表达^[18]。

厚壳贻贝 HSP70 对两种菌感染的响应具有一定差别,大肠杆菌感染条件下,厚壳贻贝肝胰腺和鳃中 HSP70 基因表达量始终高于革兰氏阳性菌——枯草芽孢杆菌的胁迫效应,尤其肝胰腺中两者差别明显,说明大肠杆菌作为一种致病性微生物,可能对厚壳贻贝具有更强的毒力效应,而枯草芽孢杆菌作为一种水体净化剂,可以迅速分解水环境中的有机物,促进硫化物和亚硝酸盐的氧化,能有效地改善水体各项化学指标,起到改善水质的作用^[19],由此推断枯草芽孢杆菌对胁迫效应相对较弱,其胁迫过程中产生的 HSP70 分子表达水平提高,一方面可能是注射时机械损伤引起的;另一方面是当该菌以高浓度条件进入机体时,仍可以引起厚壳贻贝机体的免疫应答。该结果提示水产从业者,在使用枯草芽孢杆菌作为新型微生物制剂修复水体时亦要注意投菌量,使其能有效地改善养殖水体水质,保持养殖环境稳定,成为良好的水体微生态调控剂。

参考文献:

- [1] Mizrahi T, Heller J, Goldenberg S, *et al.* Heat shock proteins and resistance to desiccation in congeneric land snails [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2010, 15 (4) : 351 - 363.
- [2] Mayer M P, Bukau B. HSP70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, 62 (6) : 670 - 684.
- [3] Hartl F U, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein [J]. *Science*, 2002, 295 : 1852 - 1858.
- [4] Abravaya K, Myers M P, Murphy S P, *et al.* The human heat shock protein hsp70 interacts with HSF, the transcription factor that regulates heat shock gene expression [J]. *Genes & Development*, 1992, 6 (7) : 1153 - 1164.
- [5] Beere H M, Green D R. Stress management-heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis [J]. *Trends in Cell Biology*, 2001, 11 (1) : 6 - 10.
- [6] Liu H H, He J Y, Zhao R T, *et al.* Molecular expression pattern of glutathione S-transferase gene in *Mytilus coruscus* exposed to heavy metals [J]. *Oceanologia at Limnologia Sinica*, 2014, 45 (2) : 274 - 280. [刘慧慧, 何建瑜, 赵荣涛, 等. 重金属胁迫下厚壳贻贝谷胱甘肽 S-转移酶基因表达分析. 海洋与湖沼, 2014, 45 (2) : 274 - 280.]
- [7] Silvia F, Elena F. Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 336 : 1157 - 1163.
- [8] Xu J, Qiao Q L, Cai Q L, *et al.* Relationship between aquaculture water and *E. coli* content in bivalve shellfish [J]. *Modern Fisheries Information*, 2004, 20 (4) : 16 - 19. [徐捷, 乔庆林, 蔡友琼, 等. 养殖水体与贝类体内大肠杆菌含量的关系研究. 现代渔业信息, 2004, 20 (4) : 16 - 19.]
- [9] Basurto-Cadena M G, Vázquez-Arista M, García-Jiménez J, *et al.* Isolation of a new mexican strain of *Bacillus subtilis* with antifungal and antibacterial activities [J]. *Scientific World Journal*, 2012 : 384 - 978.
- [10] Cheng P Z, Liu X, Zhang G F, *et al.* Real-time PCR analysis of HSP70 gene expression in response to heat shock [J]. *Marine Science*, 2007, 31 (10) : 77 - 81. [程培周, 刘晓, 张国范, 等. 荧光定量 PCR 方法分析皱纹盘鲍 HSP70 在环境胁迫下的表达. 海洋科学, 2007, 31 (10) : 77 - 81.]
- [11] Reina C P, Nabet B Y, Young P D, *et al.* Basal and stress-induced Hsp70 are modulated by ataxin-3 [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2012, 17 (6) : 729 - 742.
- [12] Wu L, Song L, Xu W, *et al.* Identification and cloning of heat shock protein 70 gene from scallop *Chlamys farreri* [J]. *High Technol Lett*, 2003, 13 : 75 - 79.
- [13] Anestis A, Lazou A, Pörtner H O, *et al.* Behavioral, metabolic, and molecular stress responses of marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* during long-term acclimation at increasing ambient temperature [J]. *American Journal of Physiology-regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 2007, 293 (2) : R911 - 921.
- [14] Encomio V G, Chu F L. Characterization of heat shock protein expression and induced thermotolerance in *P. marinus* parasitized eastern oysters: Lab and field studies [J]. *Journal of Shellfish Research*, 2004, 23 : 289 - 290.
- [15] Welch W J. Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease [J]. *Physiological Reviews*, 1992, 72 (4) : 1063 - 1081.
- [16] Clark M S, Fraser K P, Peck L S. Antarctic marine molluscs do have an HSP70 heat shock response [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2008, 13 (1) : 39 - 49.

- [17] Franzellitti S, Fabbri E. Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 336 (4): 1157 - 1163.
- [18] Clark M S, Peck L S. Triggers of the HSP70 stress response: Environmental responses and laboratory manipulation in an Antarctic marine invertebrate (*Nacella concinna*) [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2009, 14(6): 649 - 660.
- [19] Chen S Z, Hu Y Y. Use of *Bacillus subtilis* in purification of slightly-polluted water [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2011, 31(8): 1594 - 1601. [陈尚智,胡勇有. 枯草芽孢杆菌对微污染水体的净化作用. *环境科学学报*, 2011, 31(8): 1594 - 1601.]

Expression of *HSP70* in *Mytilus coruscus* under stress of thermal shock and bacteria

LIU Huihui, LI Yunjuan, HE Jianyu, WU Jiong, WU Changwen*

(National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Marine Science and Technology Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract: The 70 ku HSPs are responsible for intracellular chaperone and extracellular immunoregulation, which play crucial roles in protecting cells against environmental stresses, such as heat shock, heavy metals, drought, disease and parasitization. In this research partial cDNA sequence of HSP70 was cloned from *Mytilus coruscus*. BLAST analysis and phylogenetic relationship strongly suggested that this sequence was a member of HSP70 family and highly homologous with other known HSP70 of bivalve, especially with *Mytilus galloprovincialis* (96%), and they gathered into the same branch in the evolutionary tree. In heat shock of 37 °C, the expression of HSP70 in gill and hepatopancreas was up-regulated rapidly and was 30 times higher than that of control mussels after 2 h. Then the expression increased as time went on, and reached the maximum peak approximately 100-fold in hepatopancreas, which showed that HSP70 of *M. coruscus* was thermal induced protein. The mRNA of HSP70 in hepatopancreas and gills after infection by *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, which were common microorganisms in water, was detected based on RT-PCR analysis. The temporal expression of HSP70 mRNA was upregulated, especially in the group of *E. coli* challenge. The maximum level in hepatopancreas and gills appeared at 8 h post-injection with 4.0-fold in gills and 4.5-fold in hepatopancreas, and then dropped back to the original level at 48 h post-injection. In *Bacillus subtilis* infection, the transcripts of HSP70 in hepatopancreas was induced to the highest at 6 h after post-injection with 2.5-fold, which was similar to the effect of PBS injection. In gills the mRNA of HSP70 increased slowly to the highest at 8 h with 4-fold, then decreased quickly, and returned gradually to physiological level at the end of this experiment. All these results indicated that HSP70 in *M. coruscus* played a significant role in regulating the environmental stress and immune response.

Key words: *Mytilus coruscus*; HSP70; thermal shock; *Escherichia coli*; *Bacillus subtilis*

Corresponding author: WU Changwen. E-mail: wucw88@126.com