

大鲵热应激同源蛋白 70 基因 cDNA 克隆及表达分析

孟彦^{1,2}, 肖汉兵^{1*}, 田海峰¹, 胡乔木¹

(1.中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223; 2.中国水产科学研究院淡水渔业中心, 江苏 无锡 214081)

摘要:结合同源克隆和 RACE 技术克隆大鲵热应激同源蛋白 70 基因(*hsc70*) cDNA 序列全长, 通过半定量 PCR 方法分析其在大鲵肾脏、脑、肺、皮肤、肝脏、肾脏、脾脏、心脏、肌肉和垂体组织的表达特点。结果表明: 大鲵 *hsc70* 基因 cDNA 全长为 2 284 bp(GenBank 登录号为 HM998289), 其中 3'端和 5'端非翻译区分别为 87 bp(1~87) 和 253 bp(2 032~2 284), 中间序列即编码区长为 1 944 bp(88~2 031), 编码 647 个氨基酸(AA); 其核苷酸序列与其他物种相似性最高达 83.5%, 而编码的氨基酸序列则相对保守, 与钝口螈的相似性达 94%; 根据其编码的 AA 序列构建进化树, 结果大鲵 *hsc70* 首先与两栖类物种聚为一类, 不同来源的 *hsc70* 基因与分类地位相似的物种分别聚类; 半定量 PCR 结果表明, *hsc70* 基因在大鲵的 10 种组织中都以较高的水平表达, 但存在组织差异, 在肾脏、脑、肺、皮肤、肝脏、胃、脾脏中表达量相对较高, 在心脏中表达量次之, 在肌肉和垂体中表达较低。

关键词: 大鲵; 热应激同源蛋白 70; 克隆; 序列分析; 表达特征

中图分类号: S947.3

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2014)05-0530-06

Cloning and expression analysis of heat shock cognate protein 70 gene in Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*)

MENG Yan^{1,2}, XIAO Han-bing^{1*}, TIAN Hai-feng¹, HU Qiao-mu¹

(1.Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Wuhan 430223, China; 2.Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fisheries Science, Wuxi, Jiangsu 214081, China)

Abstract: Combined the homology-based cloning and rapid-amplification of cDNA ends (RACE) method, the complete cDNA sequence of the heat shock cognate 70 gene was obtained. The semi-quantitative RT-PCR was used to detect the gene expression in 10 tissues of Chinese giant salamander. The results showed that the full-length cDNA of heat shock cognate 70 gene was 2 284 bp(GenBank accession number HM998289), which contained 87 bp 3'-untranslated region and 253 bp 5'-untranslated region. The open reading frame (ORF), encoded 647 amino acids was 1 944 bp in length. The sequence similarity of nucleocides is 83.5% with other species, but the amino acid is conserved relatively, which showed similarity of 94% with *Ambystoma mexicanum*. The phylogeny genetic analysis was constructed based on the amino acid of heat shock cognate 70 gene. The results showed the *hsc70* gene of Chinese giant salamander clustered with other amphibians firstly. And it indicated the gene evolution is corresponding with their status of the species origin. According to the analysis of semi-quantitative RT-PCR, although high expression of this gene could detect in 10 tissues, there is different expression quantity among them. The expression in kidney, brain, lung, skin, liver, stomach and spleen is relatively high, followed by heart, and the expression in muscle and pituitarium was low.

Key words: *Andrias davidianus*; heat shock cognate 70; cloning and expression analysis

收稿日期: 2014-04-11

基金项目: 中央级科研院所基本科研业务费(2013JBFZ02); 公益性行业专项(201203086-03)

作者简介: 孟彦(1979—), 女, 陕西西安人, 助理研究员, 博士, 主要从事珍稀水生动物遗传育种研究, mengy@yfi.ac.cn; *通信作者, xhb@yfi.ac.cn

热休克/应激蛋白(heat shock/stress proteins, HSPs)是广泛存在于原核和真核生物细胞中的一类与机体应激反应相关的蛋白质。该蛋白在正常生理机能下有组成型表达,在受热或其他外界环境因子(重金属、病原体、一氧化氮、激素、微生物和抗体)刺激下可被诱导表达^[1]。根据同源性和相对分子质量大小,HSPs可以分为HSP110、HSP90、HSP70等不同家族,其中HSP70指相对分子质量约为70 000的家族,是最保守、最主要的一类HSPs,它主要可以分为2种:一种是诱导型HSP70,正常状态下在细胞中不表达或少量表达,但在热应激或其他应激原刺激下表达量迅速增加;另一种为组成型HSC70(heat shock cognate 70),又称热休克同源蛋白,其通常在细胞内有组成型表达,并且能被外界刺激所诱导^[2]。通常情况下,HSC70以分子伴侣形式参与蛋白折叠、运转,多肽组装,恢复错误折叠等生命过程^[3]。随着研究的深入,更多结果表明HSC70还可以作为一种激活因子,介导机体的免疫识别系统,能将结合的多肽递呈给主要组织相容性复合物(MHC)激活细胞毒性T细胞产生免疫反应^[4],在生物体抗逆和抗感染方面有重要作用^[1]。基于对其功能的逐步认知,多种水生动物的*hsc70*基因被克隆,比如青鳉、南方鲇、黄颡鱼、大菱鲂和泥鳅等,而且开展了对其抗逆和抗感染作用的相关研究^[1]。

大鲵(*Andrias davidianus*)是中国重要的水生野生动物,也是新兴的名优养殖水产品。大鲵分子生物学的相关研究较少,尤其是功能基因方面,仅见少数关于免疫和生长相关基因的研究^[5-7]。笔者对大鲵*hsc70*基因cDNA全长进行克隆、对其序列进行进化分析,同时研究其在大鲵不同组织中的表达特征,以期为进一步探讨大鲵*hsc70*可能在免疫机理及应用等方面的作用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 供试大鲵

3尾变态后健康大鲵来源于中国水产科学研究院长江水产研究所实验基地,实验室内暂养14 d后用MS-222(Sigma)进行麻醉取样。取肾脏、脑、肺、

皮肤、肝脏、胃、脾脏、心脏、肌肉和垂体组织,置于液氮中保存。所有操作按照中国动物保护协会的标准执行。

1.2 总RNA提取及第一链合成

大鲵组织样品研磨后用Trizol(Invitrogen)提取总RNA,用分光光度计(Eppendorf Biometer, Germany)检测RNA质量。以此RNA为模板,利用反转录试剂盒RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 (TaKaRa, Japan)合成cDNA第一链(具体操作见说明书),-20℃保存、备用。

1.3 *hsc70*基因中间序列的克隆

对 GenBank 中收录的已知物种 *hsc70* 基因的 cDNA 序列进行同源比对,在相对保守区域设计引物 P1(5'-AATGAATCCCACGAACACTG-3')和 P2(5'-ACACCTGAATCAAGACTCCA-3'),以 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增,25 μL 反应体系,包含 2.5 μL 10×PCR Buffer,2.5 μL MgCl₂ (25 mmol/L),1 μL dNTPs(2.5 mmol/L),10 mmol/L 引物各 0.5 μL,0.3 μL *Taq* 酶(5 U/μL)和 1 μL cDNA 模板,ddH₂O 16.7 μL。扩增条件为 94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,56℃退火 45 s,72℃延伸 1 min,35 个循环,72℃终延伸 10 min。PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳检测,然后用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒(AXYGEN)回收纯化,连接到 pMD-18T 载体(TaKaRa),再转入大肠杆菌 DH5a 感受态细胞,挑选克隆菌送测序。引物合成和测序均在上海生工生物有限公司进行。

1.4 *hsc70*基因cDNA末端的克隆

根据测序后的*hsc70*基因中间保守序列,设计并合成用于进行3'RACE和5'RACE特异性末端扩增的引物 P3R(5'-CTGTTACTTGATGTCACCCC-3')和 P5R(5'-GGTCAGCATTTCAGCTCCTCAAAAC-3')。利用试剂盒SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)和 Advantage 2 PCR Kit(Clontech)扩增得到大鲵*hsc70*基因cDNA末端序列。扩增产物按上述方法回收、纯化、克隆后送上海生工生物有限公司测序。

1.5 序列分析

利用序列拼接软件SeqMan(DNASTAR6.0)将测序后的中间保守序列、3'RACE和5'RACE末端序列进行拼接,获得大鲵*hsc70*基因的cDNA全长序列。序列同源性比对利用NCBI在线工具(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)进行,另外利用在线工具进行开放阅读框(ORF)、相对分子质量、等电点、疏/亲水性分析。蛋白预测分析使用ExPASy在线软件(http://www.expasy.org/tools/)进行;利用Mega 5.0软件将大鲵*hsc70*基因编码的氨基酸(AA)与选择的NCBI中部分已知物种*hsc70*氨基酸序列做Clustal W比对并构建进化树。选择物种包括人(*Homo sapiens*, Hs, NP_006588.1)、褐家鼠(*Rattus norvegicus*, Rn, NP_077327.1)、牛(*Bos taurus*, Bt, NP_776770.2)、中华鳖(*Pelodiscus sinensis*, Ps, NP_001273837.1)、钝口螈(*Ambystoma mexicanum*, Am, AAK31583.1)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*, Xl, NP_001080068.1)、白鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*, Hm, ADH15624.1)、小体鲟(*Acipenser ruthenus*, Ar, AEK81529.1)、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*, Ma, AFW97631.1)和草鱼(*Ctenopharyngodon idella*, Ci, ADX32515.1)。

1.6 *hsc70*的半定量PCR

根据大鲵*hsc70*基因全序列,设计半定量PCR引物 *Hsc70*-F1(5'-ATCTTGGCACCACCTACTCCT-3')和 *Hsc70*-R1(5'-CAAAGACAGTGTTCGTGGGAT-3'),扩增该基因约177 bp的序列片段。以大鲵 β -actin基因(序列号HQ822274)为内参,利用软件Primer 5.0设计半定量PCR引物 β -actin F1(5'-TGA TGGTTGGTATGGGACAGAA-3')和 β -actin R1(5'-CTCTTCTGGGGCAACACGGA-3')。在S1000PCR仪(BIO-RAD)中进行PCR反应,体系为25 μ L,其中包含10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, 1 μ L dNTPs(10 mmol/L)、上下游引物各1 μ L(10 mmol/L), 1 μ L Taq酶(5 U/ μ L)和 1 μ L cDNA模板, ddH₂O 17.5 μ L。其中模板为健康大鲵不同组织的cDNA第一链。反应条件为94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 57 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C终延伸45 s, 30个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10 min。PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 大鲵 *hsc70* 基因序列分析

采用RT-PCR和RACE技术克隆到大鲵*hsc70*基因cDNA序列全长为2 284 bp,其中3'端和5'端非翻译区分别为87 bp(1~87)和253 bp(2 032~2 284),中间序列即编码区长1 944 bp(88~2 031),编码647个氨基酸(AA); G+C含量为46%, A+T含量为54%,在3'端非翻译区的Poly(A)尾巴上游有典型的真核细胞加尾信号(AATAAA)。GenBank登录号为HM998289。预测编码蛋白的相对分子质量约为70 748.8,理论等电点(*P*)为5.27,分子式为C₃₁₀₄H₄₉₈₅N₈₅₅O₉₉₅S₁₇₆。蛋白在水溶液中280 nm处的摩尔消光系数为33 600 mol/(L·cm),不稳定系数为35.4,不稳定系数小于40,说明该基因表达的蛋白属于稳定蛋白,并且亲水/疏水指数分析结果表明为亲水性蛋白。该核苷酸序列与已知两栖类的热休克同源蛋白70的同源性在80%左右,如与钝口螈(*Ambystoma mexicanum*)的同源性为83.5%,与莱桑池蛙(*Rana lessonea*)的同源性为80.8%,与其他物种的同源性则相对较低。将其翻译为氨基酸序列进行比对,结果发现,该基因的AA序列具有热休克蛋白家族序列标签IDLGTTYSCV和IVLVGGSTRIPKIQK区,分别位于AA序列9-18和334-348位的氨基酸残基,并且在其C'端有热休克蛋白GGMP四肽简单重复序列(615-622位),表明所克隆的序列属于热休克蛋白70家族基因。

2.2 氨基酸序列比对及系统进化树构建

将克隆到的*hsc70*基因编码区翻译成AA后在NCBI中进行tblastn序列比对,发现其与钝口螈(*Ambystoma mexicanum*, Am, GI:13242237)的AA序列相似性为94%,与其他已知物种的相似性在90%左右。在NCBI中选择部分已知物种*hsc70*氨基酸序列,与大鲵*hsc70*编码AA比对并构建系统进化树。

从图1中可以看出,该基因的AA序列与分类地位最近的钝口螈差异最小,与其他物种的AA序列存在较大差异,尤其在54、87、146和501氨基酸位点处,大鲵*hsc70*在这4个位点编码的氨基酸分别为P(脯氨酸)、G(甘氨酸)、S(丝氨酸)、S(丝氨酸),而其他物种则为A(丙氨酸)、K(赖氨酸)、T(苏氨酸)和M(甲硫氨酸)。

Ad	MSKGPSV	GID	LGTTYSCV	GV	FQHGKVEI	IA	NDQGNRT	TPS	YVAFDTER	L	IGDPAKN	QVA	MNPTNTV	FDA	KRLIGRR	FED	AVVQSD	M	GHW	PF	94						
Am											A						G		K		94						
Ps		A									A					D					94						
Xl		A									A										94						
Hm		A									A					D	G				94						
Ci		A									A					D	G				94						
Ma		A							S		A					D	G				94						
Bt		A									A					D					94						
Hs		A									A					D					94						
Rn		A									A					D					94						
Ar		TA							S		A										94						
Ad	NVSDGGR	PK	VEVDYK	GETK	SFYPEE	ISSM	VLTKMK	EIAE	AYLGKT	VSNA	VVSVPA	YFND	SQRQAT	KDAG	TIAGLN	VLR	INEPTAA	AAIA	YG		186						
Am		I				V					T						P				186						
Ps	T	N	A		Q	E					T										186						
Xl		S			Q	E	A				T										186						
Hm		IN	NT		Q	E	A	S			IT					S					186						
Ci		IN	NT		Q	E	M				IT					F	S				186						
Ma		IN	NT		Q	E			V		IT					S					186						
Bt	M	N	A		Q	E					T									T	186						
Hs	M	N	A		Q	E					T										186						
Rn	M	N	A		Q	E					T										186						
Ar		TA			L	E			S	T	T										186						
Ad	LDKKVGA	ERN	VLIFFDL	GGGT	FDVSI	LTI	ED	GIFEV	KSTAG	DTHLGG	EDFD	NRMVNH	FVAE	FKRKHK	KDII	DNKRAV	RRLR	TACERA	KRTL	SS	278						
Am																					278						
Ps												I				T	E				278						
Xl																					278						
Hm											IT					S					278						
Ci											IT					S					278						
Ma		S									IT					S					278						
Bt											I					S	S	E			278						
Hs											I					S	S	E			278						
Rn											I					S	S	E			278						
Ar		V									I				Y	S					278						
Ad	STQASIE	IDS	LYEGID	FYTS	ITRAR	FEELN	ADLFR	GTLDP	VEKSLR	DAKL	DKIQIH	DIVL	VGGSTR	IPKI	QKLLQ	DFNG	KELNKS	SINPD	EA		370						
Am											A										370						
Ps									A		S										370						
Xl											S										370						
Hm										M	A						Y				370						
Ci										M	A						Y				370						
Ma										M	A						Y				370						
Bt										A	S										370						
Hs										A	S										370						
Rn										A	S										370						
Ar											M	A									370						
Ad	VAYGAA	VQAA	IISGDK	SENV	QDLLLD	VTP	LSLGI	ETAGG	VMTVL	IKRNT	TIPTQT	QTF	TTYSD	NQPG	LIQVY	EGERA	MTKDN	NLLGK	FE		462						
Am																					462						
Ps																					462						
Xl																					462						
Hm																					462						
Ci																					462						
Ma																					462						
Bt																					462						
Hs																					462						
Rn																					462						
Ar																					462						
Ad	LTGIPPA	PRG	VPQIEV	TEDI	DANGIL	NVSA	VDKST	GKESK	ITITND	KGRL	SKEDI	ERMVQ	EAEKY	KCEDE	KQDKV	S	S	S	S	AT	554						
Am							N							V							554						
Ps							N							A							554						
Xl							N							D	A						554						
Hm						M	N							A	D	V		A	G	S	554						
Ci						M	N							A	D	V		A	G	S	554						
Ma						M	N							A	D	V		A	G	S	554						
Bt							N							A							554						
Hs							N							A							554						
Rn							N							A							554						
Ar							N							S	D	M	E		A	S	554						
Ad	VEDEK	LQ	GKI	SDEDK	T	KILE	KCNEI	I	AWLD	KNQTA	E	KDEF	EHQ	Q	KELE	KV	CNPII	T	KLVQ	GAGGM	PGGFP	GAGAP	TGGSS	GPTIE	EVD	655	
Am				D																						655	
Ps				S	Q	D		N						S			G	S								655	
Xl	K			Q		D		V						S												655	
Hm	K			Q		D		V	S					S												655	
Ci	K			Q		D		V	S					S												655	
Ma	K			Q		D		V	V					S												655	
Bt				N		Q		D		N				S													655
Hs				N		Q		D		N				S													655
Rn				N		Q		D		N				S													655
Ar				N		Q		D		S				S													655
Ar	E			Q				G		E	Y	H															655

图 1 大鲵 *hsc70* 基因 AA 序列与其他物种比对结果

Fig.1 The AA sequence aligning of *hsc70* gene with other species

基于 AA 比对结果，构建不同物种 *hsc70* 基因的 Neighbor-Joining(NJ)和 Minimum-Evolution(ME)系统进化树，得到相似的聚类结果，图 2 为利用 NJ 方法构建的进化树。聚类结果显示，大鲵 *hsc70* 基因先与同属于有尾两栖类的钝口螈聚在一起，然后再与非洲爪蟾聚为一小类，而哺乳类的牛、人和褐家鼠聚在一起，中华鳖处于上述两个进化小单位

的中间类型。鱼类则形成一个大的聚类群。这些进化关系与其分类关系基本一致，说明 *hsc70* 基因在进化上同生物进化是同阶进行的。

将图 2 所列 11 个物种的 *hsc70* 基因 cDNA 和 AA 序列长度与斑马鱼的相比较，结果表明，这 12 个物种 cDNA 序列长度在 2 130 bp(褐家鼠)和 2 770 bp(斑马鱼)之间；但 12 个物种的 *hsc70* 基因 cDNA

的 AA 序列的长度在 646(福家鼠)~658(斑马鱼)之间,说明物种间 *hsc70* 基因的 cDNA 中间部分序列长度相当保守,而 3'端和 5'端非翻译区的序列片段长度差异较大。

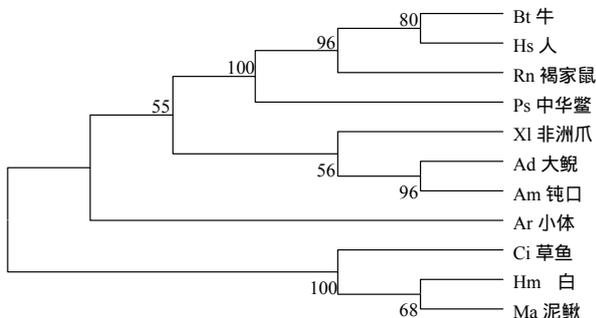
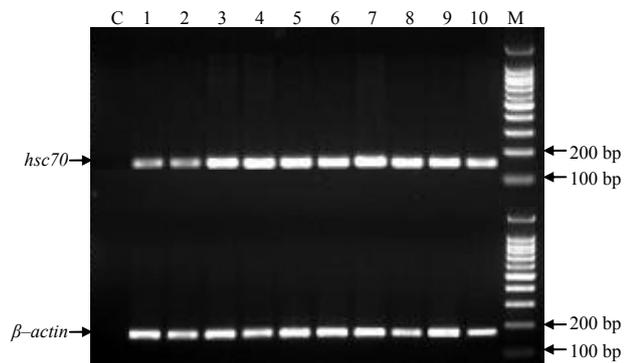


图2 基于NJ法构建的 *hsc70* 基因氨基酸序列的系统进化树

Fig.2 The phylogenetic tree based on amino acid sequences of *hsc70* gene by NJ method

2.3 *hsc70* 基因在组织中的表达

以大鲵 β -actin 基因为内参,利用半定量 PCR 方法检测大鲵 *hsc70* 在正常状态下的组织表达情况。检测结果见图 3。*hsc70* 基因在 10 种组织内都以较高的水平表达,但仍然存在组织差异:在肾脏、脑、肺、皮肤、肝脏、肾脏、脾脏中表达量相对较高,在肌肉和垂体中则较低。这些表达特征与 *hsc70* 基因在草鱼^[8]、凡纳滨对虾^[9]、泥鳅^[10]等物种的表达特征基本类似。但岩原鲤 *hsc70* 基因在肌肉中的表达丰度大^[11],这与草鱼、泥鳅以及大鲵的不同,说明不同物种中 *hsc70* 基因的表达有差异。



C 对照;1 肌肉;2 垂体;3 脑;4 肺;5 皮肤;6 肝脏;7 肾脏;8 脾脏;9 胃;10 心脏;M maker。

图3 大鲵 *hsc70* 半定量 PCR 检测结果

Fig.3 Relative quantification PCR results for *hsc70* in normal tissues of Chinese giant salamander

3 讨论

本研究克隆了大鲵的 *hsc70* 基因 cDNA 的序列全长 2 284 bp,发现其与已知部分物种 *hsc70* 基因 cDNA 核苷酸序列片段差异较大,但编码的 AA 数目在 658~646,说明 *hsc70* 基因 cDNA 序列长度和其编码蛋白的 AA 个数没有明显的相关性,核苷酸长度差异主要在 3'端和 5'端非翻译区。大鲵 *hsc70* 基因编码蛋白的 AA 序列与钝口螈同源性最高(97.1%),与牛、鼠等的同源性也达到 95%左右。这说明 *hsc70* 基因编码的蛋白在物种间比较保守,这与其在整个进化史上是一个古老且保守的结论是一致的^[2]。但是编码氨基酸也存在一定的变异,特别是在 54、87、146 和 501 氨基酸位点上,大鲵与其他物种的氨基酸完全不同,进一步分析表明大鲵在这 4 个位点的突变可能存在物种进化上的正选择作用。正选择是指生物在进化过程中将含有发生了有利突变固定下来的选择作用,是生物对自然界的一种适应性突变,这种突变尤其在抗逆等相关的基因上表现较多^[12]。大鲵作为一种古老的物种,处在水生动物向陆生动物过渡的阶段,*hsc70* 也属于抗逆相关蛋白基因,但该四个位点的突变是否是一种适应性的正选择还有待于进一步研究验证。利用该基因的 AA 序列构建进化树,结果表明,基因的聚类关系与物种的分类地位是相关的,如泥鳅、白鲢、草鱼聚在一类,而两栖类的钝口螈、大鲵、非洲爪蟾聚在一起,哺乳类的牛、人和褐家鼠聚在一起。

对大鲵 *hsc70* 基因在肾脏、脑、肺、皮肤、肝脏、肾脏、脾脏、心脏、肌肉和垂体 10 种组织的表达情况分析结果显示,尽管 *hsc70* 基因在 10 种组织内表达丰度都较高,但仍有组织差异:垂体和肌肉表达量最少,脾脏次之,肾脏、皮肤等组织丰度最高。这些结果与其他鱼类的结果不完全相似。例如 *hsc70* 在草鱼肾脏、鳃的表达量最高,而在肌肉、小肠等表达量低^[8]。在泥鳅的肠、鳃及肝组织内 *hsc70* 基因以较高量表达,而在肌肉、心脏则微量表达^[10]。这些都表明作为一种广泛存在于真核和原核动物中的保守基因,*hsc70* 基因表达有组织普遍性,但同时也有一定的特异性。

尽管热休克蛋白最早是在热或者光毒性压力刺激下产生而命名的^[13],但随着研究的深入,发现其在动物免疫方面也发挥一定的作用。鱼类和甲壳

动物热休克同源蛋白的免疫作用已有报道,该基因对虾感染白斑综合症过程中抵制细胞凋亡所必须的^[14];在草鱼中其可以促进免疫系统行使免疫应答反应^[8],而在近江牡蛎被溶藻弧菌感染后,该基因高度表达,参与了机体抗病原感染的相关过程^[15]。目前大鲵疾病频发^[16-17],成为制约大鲵养殖的主要因素之一。为了对大鲵病害防治提供研究基础,促进大鲵养殖业健康、持续发展,下一步将开展热休克同源蛋白在大鲵疾病和免疫相关方面的研究。

参考文献:

- [1] 单红,周国勤,张其中.南方鲇 HSC70 cDNA 的克隆及序列分析[J].上海水产大学学报,2007,16(4):310-316.
- [2] 林钟婷,朱静,翁银标,等.热休克蛋白 70 的研究进展[J].中国畜牧兽医,2007,34(3):67-69.
- [3] Guerrero C A, Bouyssonade D, Zarate S, et al. Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry[J]. J Virol, 2002, 76: 4096-4102.
- [4] 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]. J Fish Dis, 2010, 33(10): 789-801.
- [5] Zhu R ,Chen Z Y ,Wang J ,et al .Extensive diversification of MHC in Chinese giant salamanders *Andrias davidianus*(Anda-MHC) reveals novel splice variants[J]. Developmental and Comparative Immunology , 2014 , 42(2) : 311-322 .
- [6] Wang L X , Yang H , Li F G , et al . Molecular characterization ,tissue distribution and functional analysis of macrophage migration inhibitory factor protein(MIF) in Chinese giant salamanders *Andrias davidianus*[J]. Developmental and Comparative Immunology , 2013 , 39(3) : 161-168 .
- [7] Yang L P ,Meng Z N ,Liu Y ,et al .Growth hormone and prolactin in *Andrias davidianus* : cDNA cloning , tissue distribution and phylogenetic analysis[J]. General and Comparative Endocrinology , 2010 , 165(2) : 177-180 .
- [8] 周小飞.草鱼热休克蛋白 Hsc70 和 Hsp70 在免疫反应中不同基因表达、蛋白质合成和分泌的特征探讨[D].成都:成都电子科技大学生命科学与技术学院,2011.
- [9] 吴任.凡纳滨对虾一种 HSC70 的 cDNA 克隆、原核表达及其体内表达分析[D].广州:暨南大学生命科学技术学院,2006.
- [10] 陈建华,张俊彬,王怀民,等.泥鳅 HSC70 cDNA 克隆及表达分析[J].水产科学,2013,32(5):273-279.
- [11] 章海滨,张修月,宋昭彬.岩原鲤 HSC70 基因的克隆、序列分析及其组织表达研究[J].四川动物,2013,32(3):325-327.
- [12] 陶敏,樊棠怀,徐立中,等.趋化因子及其受体家族分子适应性进化分析[J].遗传,2007,29(12):1519-1524.
- [13] Kampinga H H, Hageman J, Vos M J, et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins[J]. Cell Stress and Chaperones, 2009, 14: 105-111.
- [14] Yan F ,Xia D ,Hu J ,et al .Heat shock cognate protein 70 gene is required for prevention of apoptosis induced by WSSV infection[J]. Arch Virol ,2010 ,155 :1077-1083 .
- [15] 刘志刚,张其中,张占会,等.近江牡蛎 HSC70 基因对溶藻弧菌感染的反应[J].中国水产科学,2012,19(3):500-508.
- [16] 孟彦,曾令兵,杨焱清,等.大鲵腹水病原菌的分离与鉴定研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2009,3(37):77-81.
- [17] Meng Y , Ma J , Jiang N , et al . Pathological and microbiological findings from mortality of the Chinese giant salamander(*Andrias davidianus*)[J]. Arch Virol , 2014 , 159 : 1403-1412 .

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维