

# 美洲鲈 *hsp70* 的分子特征及其对运输应激的应答

张 勇<sup>①</sup> 徐钢春<sup>①②</sup> 杜富宽<sup>②</sup> 顾若波<sup>①②\*</sup>

① 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081; ② 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,  
农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室 无锡 214081

**摘要:** 运用同源克隆和 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术获取了美洲鲈 (*Alosa sapidissima*) 热应激蛋白 70 (*hsp70*) 的全长 cDNA 序列, 其总长度为 2 545 bp, 开放阅读框 (ORF) 为 1 914 bp, 推测编码 637 个氨基酸, 其氨基酸的二级结构含有 HSP70 家族的 3 个特征序列。氨基酸同源性分析显示, 美洲鲈 *hsp70* 与墨西哥脂鲤 (*Astyanax mexicanus*) 等鱼类的相似性达 84% 以上, 与无脊椎动物果蝇 (*Drosophila auraria*) 及大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的相似性分别为 73% 和 38%。荧光定量 PCR 检测显示, 该基因在美洲鲈鳃、肌肉、头肾中高表达, 在脑和心中相对高表达, 在肝、脾、肠、肾中微量表达。采用荧光定量 PCR 方法研究运输应激对美洲鲈未经繁殖的亲鱼 *hsp70* mRNA 水平的影响, 在运输实验中鳃、肝 *hsp70* mRNA 水平呈先升高后降低的变化趋势, 头肾 *hsp70* mRNA 水平呈现递增趋势。该结果表明克隆到的基因符合诱导型 *hsp70* 的特点, 而且美洲鲈鳃、肝、头肾组织的 *hsp70* mRNA 对运输应激表现出明显的应答作用。

**关键词:** 美洲鲈; 热应激蛋白 70; 基因克隆; 基因表达; 运输应激

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2016) 02-268-13

## Molecular Characterization of *Hsp70* and Its Response to Transport Stress in American Shad (*Alosa sapidissima*)

ZHANG Yong<sup>①</sup> XU Gang-Chun<sup>①②</sup> DU Fu-Kuan<sup>②</sup> GU Ruo-Bo<sup>①②\*</sup>

① *Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081*; ② *Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China*

**Abstract:** American shad (*Alosa sapidissima*) belongs to Clupeomorpha, Clupeiformes, Clupeidae, *Alosa*. As eurythermal, euryhaline anadromous and migratory fish, American shad and Chinese shad are not only very similar in appearance and habits, but also have high nutritional value and economic value. American shad is

**基金项目** 国家科技支撑计划项目 (No. 2012BAD25B07) ;

\* 通讯作者, E-mail: gurb@ffrc.cn;

**第一作者介绍** 张勇, 男, 硕士研究生; 研究方向: 鱼类繁育生理学; E-mail: 846164414@qq.com.

收稿日期: 2015-09-10, 修回日期: 2015-12-28 DOI: 10.13859/j.cjz.201602013

extremely sensitive to changes in the external environment, vulnerable to the impact of environmental factors change (such as sound, light, water physical and chemical factors, etc.) and the influence of manual operation such as fishing, transportation, etc.

Heat stress proteins (HSPs), also known as heat shock proteins, are widely present in different species. It is a family of non-specific cell protective proteins associated with resilience, and similar to a number of house-keeping genes products. The heat stress proteins, especially the heat stress protein 70 (*hsp70*) family, are highly conserved in evolution. It also has a variety of biological functions. As a molecular chaperone, it assists proteins folding, assembly, transportation, and regulation, as well as repair of damaged proteins, and disintegration of denatured proteins under stress. It can also protect mitochondria from cytokines damage, and play an important role in anti-apoptosis, anti-oxidation and immune response. *Hsp70* cDNA was cloned, analyzed, and the expression level of *hsp70* mRNA was detected in a variety of fish species, such as bluntnose black bream (*Megalobrama amblycephala*), grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*), silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), Nile tilapia (*Tilapia nilotica*), roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*), bronze gudgeon (*Coreius guichenoti*), Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*), sword tail (*Xiphophorus hellerii*), bastard halibut (*Paralichthys olivaceus*) etc. Studies show that the expression of *hsp70* gene is regulated at the transcriptional level. This study aimed to investigate the expression of *hsp70* gene in American shad broodstocks tissues and its differential expression before and after the transport stress, in order to provide a theoretical basis for resistance mechanism study of this species.

In this experiment, by means of artificial transportation stress, we took 6 tails as the transport 0 h sampling, then collected 24 tails randomly into 12 bags, each containing 2 tails: 6 bags for 2 h transport stress sampling, while the other 6 bags for 4 h sampling. The results were expressed by Mean  $\pm$  SE, and the differences between groups were analyzed by One-way ANOVA. The full-length cDNA of *hsp70* of American shad was cloned by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) methods. The results revealed that the length of *hsp70* cDNA was 2 545 bp, containing an open reading frame (ORF) of 1 914 bp specified a peptide of 637 amino acids. The secondary structures contained three signature sequences of HSP70 family (Fig. 2). The homology analysis indicated that *hsp70* of American shad shared more than 84% identity with the *hsp70*s of other fishes such as *Astyanax mexicanus*, it also shared as high as 73% and 38% identity with *Drosophila auraria* and *Escherichia coli* (Table 2). The tissue-specific expressions of *hsp70* mRNAs were detected. A high expression was observed in the gill, muscle and head kidney, while relatively high expression was encountered in brain and heart, and a weak expression was found in the liver, spleen, intestine and kidney (Fig. 4). Real-time quantitative PCR showed that *hsp70* mRNA content in gill and liver increased significantly after transport for 2 hours and then dropped after transport for 4 hours (Fig. 5 and Fig. 6), while *hsp70* mRNA showed an increasing trend in head kidney (Fig. 7). These results suggest that our cloned gene is consistent with the characteristics of *hsp70*, and that the *hsp70* mRNA in gill, liver, and head kidney showed obvious response to transport stress.

**Key words:** American shad (*Alosa sapidissima*); Heat stress protein 70 (*hsp70*); Gene cloning; mRNA expression; Transport stress

热应激蛋白又称热休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs), 研究发现它广泛存在于不同

物种 (Iwama et al. 1998), 是生物体内与抗逆相关的一族非特异性的细胞保护蛋白 (Iwama et al. 1999)。与众多的管家基因相似, 热应激蛋白尤其是 HSP70 家族在进化上表现出高度的保守性。比较人类 (*Homo sapiens*) 和果蝇 (*Drosophila auraria*) HSP70 氨基酸序列发现, 人类 HSP70 与果蝇的相似度达 73% (Evgen'ev et al. 2014)。它还具备多种生物学功能, 作为分子伴侣, 在应激状态下帮助蛋白质正确折叠、组装、运输, 同时调节、修复损伤蛋白并降解变性蛋白 (Hightower 1991, Feder et al. 1999); 在细胞保护方面, 保护线粒体免受细胞因子损伤, 在抗细胞凋亡、抗氧化中起重要作用 (Feige et al. 1994, Basu et al. 2002, 祝璟琳等 2007); 还能参与免疫应答中的抗原提呈, 发挥协同免疫作用 (张旭辉 2001)。hsp70 基因主要由 3 种不同的基因所编码, 一种是在所有细胞中均能稳定表达的组成型热休克蛋白 70 (heat shock cognate 70, hsc70), 其在应激原刺激下表达量不变或仅有少量变化; 一种是诱导型 hsp70, 它能在机体受到生理、病理及环境等应激源胁迫下被高度诱导表达 (田照辉等 2013); 另一种为葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78 ku, grp78), 它具有与 HSP 类似的分子伴侣功能, 在蛋白质的折叠、转运过程以及内质网应激反应中发挥主要功能 (Sommer et al. 2002)。近年来一批学者从细胞系水平、多种细胞培养 (Arya et al. 2007)、整个生物体组织层面对鱼类热应激蛋白的结构、性质、功能进行了广泛研究 (Iwama et al. 1998)。团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) (明建华等 2009)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、鲢鱼 (*Hypophthalmichthys molitrix*)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) (何珊等 2009)、淞江鲈 (*Trachidermus fasciatus*) (刘庆全 2013)、圆口铜鱼 (*Coreius guichenoti*) (赵建华 2014)、西伯利亚鲟 (*Acipenser baerii*) (田照辉等 2013)、剑尾鱼 (*Xiphophorus hellerii*) (万文菊等 2007)、牙鲈 (*Paralichthys*

*olivaceus*) (刘旭东 2011) 等多种鱼类的 hsp70 cDNA 已被克隆分析, 部分鱼类 hsp70 mRNA 的组织表达水平检测也已经完成。研究表明, hsp70 基因的表达主要在转录水平进行调控 (Iwama et al. 1998, 任宝波等 2005)。

美洲鲟 (*Alosa sapidissima*) 隶属于鲱形总目 (Clupeomorpha) 鲱形目 (Clupeiformes) 鲱科 (Clupeidae) 西鲱属。它与中国鲟 (*Tenualosareevesii richardson*) 同为广温性、广盐性的溯河产卵洄游性鱼类, 它们不仅在外形和生活习性上很相似, 也都具有极高的营养价值和经济价值 (齐红莉等 2009, 洪孝友 2011)。美洲鲟对外界环境变化异常敏感, 易受多种环境因子及人工操作的影响, 表现为鱼体过度活跃, 四处狂游, 机体功能出现紊乱, 最终常常出现损伤、出血甚至死亡。目前鲟鱼的环境应激相关研究涉及运输、小容器暂养、不同麻醉剂 (杜浩 2005)、盐度 (Chittenden 1973a)、溶氧 (Chittenden 1973b) 等多个方面, 皮质醇、血液生化指标的变化和实验中的鱼死亡率都是常用指标, 而从分子生物学角度研究鲟鱼运输应激中 hsp70 mRNA 的表达变化尚未见报道。本研究通过同源克隆和 cDNA 末端快速克隆 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 技术获得了控制 HSP70 合成的基因全长 cDNA, 对其进行对应氨基酸序列的比对, 构建分子进化树, 并分析该基因在美洲鲟未经繁殖的亲鱼组织器官中的表达分布以及运输应激前后的表达差异。旨在进一步了解美洲鲟体内 HSP70 的合成及表达调控机制, 以期为深入探究美洲鲟的抗逆机理提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验用鱼与养殖管理

实验所用美洲鲟为完全性成熟且未经繁殖的亲鱼, 饲养于淡水渔业研究中心宜兴杞亭基地规格为 700 cm × 435 cm × 120 cm 的室内水泥池。采用自然光照, 养殖用水为曝气的地下水, 全天持续微孔增氧, 每天吸污并换水 10 ~

15 cm 水深, 每日上、下午均投喂 1 次宁波天邦海水鱼膨化饲料。实验期间水温为 ( $21 \pm 0.5$ ) °C, 溶氧大于 8 mg/L, pH 为 7.8, 氨氮 0.001 6 mg/L, 亚硝酸盐 0.037 mg/L。

## 1.2 实验设计

2015 年 5 月 11 日, 拉网选取规格基本一致且健康未经繁殖的美洲鲟亲鱼 30 尾, 平均体重 ( $679.22 \pm 21.08$ ) g, 平均体长 ( $34.97 \pm 0.29$ ) cm。运输实验采用塑料袋封闭式模拟运输的方法, 实验期间运鱼袋不再充氧。打包后的运鱼袋置于泡沫箱中并放在阴凉处平板车上, 每隔 15 min 摇动 15 min。随机选取 6 尾迅速于浓度为 100 mg/L 的丁香油中做快速深度麻醉, 作为运输 0 h 采样。其余 24 尾迅速用双层塑料袋 (长 70 cm、宽 50 cm) 充氧密封后打包, 水和氧气体积比约 1:3。每袋放鱼 2 尾, 共计 12 袋。12 个运鱼袋分为 2 组, 每组 6 个, 两组分别用于运输后 2 h、4 h 取材, 每组的 6 袋为实验重复; 每个时间点从相对应的 6 袋取材组中挑取活鱼用于采样, 累计每个时间点取 6 尾。直至采样结束时水中溶解氧在 4 mg/L 以上。实验期间统计累计死亡率。

## 1.3 样品采集与处理

样品鱼用 100 mg/L 丁香油进行快速深度麻醉后, 分别解剖, 快速取出鳃、脑、肝、脾、肠、心、头肾、肾、肌肉 9 种组织, 编号后立即放于液氮中冻存, 后置于 -70°C 冰箱中保存备用。

## 1.4 实验方法

### 1.4.1 RNA 提取与反转录

取出冻存的脑组织 50 ~ 100 mg, 加入到 1 ml RNAiso Reagent (TaKaRa, 大连), 用电动匀浆器 (IKA T10 basic ULTRA-TURRAX) 充分研磨, 按说明书提取总 RNA。提取的 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶 (1 × TAE 配制) 电泳, Andy Safe™ DNA Gel Stain 染色显示 28S rRNA 和 18S rRNA, 检测 RNA 的完整性。

参照 Prime Script™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, Code No. 6210A) 的使

用说明将获得的总 RNA 样品反转录合成 cDNA。反应体系为: Oligodt Premer (1 mol/L) 1 μl、dNTP (250 mol/L) 1 μl、RNA 模板 5 μl、无菌双蒸水 3 μl。反应条件: 65°C 5 min, 4°C 保持。反应结束后, 配制下一步反应体系: 将上一步体系产物作为模板 10 μl、5 × Preme Script<sup>II</sup> Buffer 4 μl、RNase Inhibitor ( $40 \times 10^6$  U/L) 0.5 μl、Preme Script<sup>II</sup> RTase ( $200 \times 10^6$  U/L) 1 μl、RNase free dH<sub>2</sub>O 4.5 μl。反应条件: 42°C 40 min, 70°C 15 min, 4°C 保持。反转录产物置于 -20°C 冰箱中保存备用。

### 1.4.2 *hsp70* 基因 cDNA 的克隆

在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库中搜索其他鱼类的 *hsp70* 基因, 应用在线 Clustalw (<http://www.genome.jp/tools/clustalw>) 对其进行序列多重比对分析, 找到保守序列并根据此序列应用 Primer Premier 5.0 软件设计核心序列引物。由于 *hsp70* 的 cDNA 序列较长, 为了减少后续 RACE 的难度, 我们设计了两对核心引物 *hsp70*-F1、*hsp70*-R1 和 *hsp70*-F2、*hsp70*-R2 (表 1), 尽量增加获得的核心序列长度。

应用 PCR 扩增 *hsp70* 基因片段。反应体系为 25 μl: cDNA 模板 1 μl, 10 × Buffer 2.5 μl, dNTP (10 μmol/L) 2 μl, 正向、反向引物 (10 μmol/L) 各 1 μl, TaKaRa Ex Taq 酶 ( $5 \times 10^6$  U/L) 0.125 μl, 无菌双蒸水 17.375 μl。PCR 扩增程序: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 65°C 30 s, 72°C 100 s, 10 个循环 (每一循环退火温度降低 1°C); 94°C 30 s, 65°C 30 s, 72°C 100 s, 10 个循环 (每一循环退火温度降低 1°C); 94°C 30 s, 63°C 30 s, 72°C 100 s, 20 个循环; 72°C 延伸 7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶 (1 × TAE 配制) 电泳, Andy Safe™ DNA Gel Stain 染色, 在 Tanon1600 凝胶成像仪上观察并拍照。切胶回收 PCR 产物, 连接 pMD18-T 载体并转化到 DH5 大肠杆菌感受态细胞中。PCR 体系使用通用引物 M13、RVM, 筛选出阳性克隆并于 37°C 220 r/min 培养过夜 (10 ~ 12 h)。将菌液送至上海博尚生物公司测序, 分析结果, 得

到美洲鲌 *hsp70* 基因片段。再根据获得的 *hsp70* 基因的中间片段序列, 设计特异的 5' - RACE 和 3' - RACE 特异引物 (表 1), 用 RACE 方法扩增核心片段的 5' 和 3' 端序列, RACE 实验部分由武汉转导生物公司完成。

**1.4.3 荧光定量 PCR 检测 *hsp70* 基因在美洲鲌未经繁殖的亲鱼组织器官的分布情况** 从 -70℃ 冰箱中取出 6 条美洲鲌亲鱼的 9 种器官组织样品, 将 6 条鱼相同的组织分别取等量混合, 进行总 RNA 提取 (如前所述)。cDNA 获取按 Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, 大连) 试剂盒说明操作。根据美洲鲌 *hsp70* 基因 cDNA 序列设计荧光定量引物 F3 和 R3 (表 1)。内参基因为  $\beta$ -actin, 引物 B1 和 B2 (表 1)。所有引物均由上海生工生物技术有限公司合成。

采用嵌合荧光法进行 Real Time PCR 扩增反应。用 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒说明配置反应体系, 在 ABI 7500 PCR 仪 (Applied Biosystem, 美国) 上进行荧光定量 PCR 反应。PCR 反应条件: 50℃ 2 min, 95℃ 2 min; 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 40 个循环; 溶解的反应条件为: 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 30 s, 60℃

15 s。每个样品重复 3 次。

**1.4.4 运输应激实验中鳃、肝 *hsp70* mRNA 测定** 从 -70℃ 冰箱中取出运输 0 h、2 h、4 h 采样的鳃、肝、头肾组织样品, 具体方法同前所述。

## 1.5 数据处理

实验数据应用 Excel 2010 和 SPSS20 进行统计学计算和分析, 荧光定量结果运用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法计算基因相对表达量, 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和 Duncan 多重比较方法进行显著性检验, 结果以平均值  $\pm$  标准误 (Mean  $\pm$  SE) 表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 美洲鲌 *hsp70* 基因 cDNA 全长序列及分析

以反转录的 cDNA 为模板, PCR 分别获得 630 bp (图 1a) 和 1 000 bp 的片段 (图 1b)。

测序得到该片段的核酸序列, 在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 上进行 blastn, 确定这两个片段均为 *hsp70* 基因编码区的部分序列。拼接得到 1 339 bp 序列, 送公司进行两端 RACE 扩增得到测序结果, 将以上获得的序列进行拼接得到 *hsp70* 基因的全长

表 1 实验用引物序列

Table 1 Sequence of primers used in this experiment

引物 Primer	序列 Sequence (5' - 3')	用途 Usage
<i>hsp70</i> -F1	TGTCGTCACGGTGCCAGCCTACT	扩增 <i>hsp70</i> 核心片段上游引物 Upstream primer for amplifying <i>hsp70</i> core fragment
<i>hsp70</i> -R1	CCACGTGGCGCAGGTGGAAT	扩增 <i>hsp70</i> 核心片段下游引物 Downstream primer for amplifying <i>hsp70</i> core fragment
<i>hsp70</i> -F2	GACCTGGGCACCACCTACTCCTGTGT	扩增 <i>hsp70</i> 核心片段上游引物 Upstream primer for amplifying <i>hsp70</i> core fragment
<i>hsp70</i> -R2	CACCTCAAAGATGCCGTCTTCGAT	扩增 <i>hsp70</i> 核心片段下游引物 Downstream primer for amplifying <i>hsp70</i> core fragment
F3	AGAACAAGAGGGCTGTGAGGAGA	<i>hsp70</i> 定量上游引物 Upstream primer for <i>hsp70</i> quantification
R3	TCAATGCCATCAAAGAGCGAGT	<i>hsp70</i> 定量下游引物 Downstream primer for <i>hsp70</i> quantification
B1	AACGGATCCGGTATGTGCAAAGC	$\beta$ -actin 定量上游引物 Upstream primer for $\beta$ -actin quantification
B2	AACGGATCCGGTATGTGCAAAGC	$\beta$ -actin 定量下游引物 Downstream primer for $\beta$ -actin quantification
5' - RACE	GGGTGTGGTCTGTTTCC	5' RACE 特异性引物 Specific primer for 5' RACE
3' - RACE	CGCAATACCACTATCCCGTCAAACA	3' RACE 特异性引物 Specific primer for 3' RACE

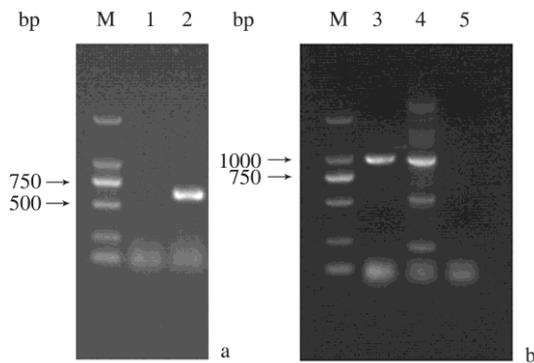


图 1 美洲鲈 *hsp70* 基因同源克隆的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 The amplification results of American shad *hsp70* cDNA by homologous cloning

a. 630 bp PCR 产物电泳检测; b. 1 000 bp PCR 产物电泳检测。

a. Electrophoresis result of PCR products (630 bp); b. Electrophoresis result of PCR products (1 000 bp).

M. DL2000 DNA 分子量标准; 1、5. PCR 阴性对照, 未加模板; 2、3、4. 核心片段。

M. DL2000 DNA marker; 1, 5. Control; 2, 3, 4. Core fragment.

cDNA。 *hsp70* 基因全长 2 545 bp, 5'端非翻译区 (untranslated regions, UTR) 99 bp, 3' - UTR 532 bp, 开放阅读框 1 914 bp, 推测编码 637 个氨基酸, polyA 加尾信号为 AATAA, 且含有 HSP70 家族特征序列 IDLGTTYS (9 ~ 16 aa), IFDLGGGTFDVSIL (197 ~ 210 aa) 和 IVLVGGSTRIPKIQK (334 ~ 348 aa) (图 2)。

## 2.2 氨基酸同源性比较与进化树分析

通过 BLASTp 与多种生物 HSP70 氨基酸序列进行同源性比较 (表 2), 美洲鲈 *hsp70* 基因氨基酸序列除了与大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 仅有 38% 的相似性外, 与表 2 所列的其他物种均有较高的同源性, 为 73% ~ 88%, 进一步证实了 *hsp70* 进化上较高的保守性。

利用 MEGA5.1 软件, 将上述比对结果采用邻接法 (neighbor joining, NJ), 重复 1 000 次, 构建 Bootstrap 验证的系统进化树 (图 3)。美洲鲈 *hsp70* 基因与墨西哥脂鲤 (*Astyanax mexicanus*) 亲缘关系最近, 并与牙鲆、黄鲂

(*Monopterus albus*)、鳊鱼 (*Miichthys miui*)、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 形成鱼类的一个分支; 然后草鱼、鲢鱼、团头鲂、圆口铜鱼、唐鱼 (*Tanichthys albonubes*)、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)、鲫鱼 (*Carassius auratus*)、斑马鱼 (*Danio rerio*) 形成鱼类的一个小分支, 它与尼罗罗非鱼、尖吻鲈 (*Lates calcarifer*)、鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*)、红笛鲷 (*Lutjanus sanguineus*) 分支和大西洋鲑 (*Salmo salar*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 分支共同构成了鱼类的另一个分支; 这两个鱼类的分支构成了脊椎动物的一个分支; 哺乳动物中人 (*Homo sapiens*)、家犬 (*Canis lupus familiaris*)、大鼠 (*Rattus norvegicus*)、小鼠 (*Mus musculus*) 构成了脊椎动物的另一分支, 无脊椎动物的果蝇 (*Drosophila auraria*) 和微生物中的大肠杆菌则分别形成与前两支亲缘关系较远的独立分支。

## 2.3 美洲鲈 *hsp70* 基因在不同组织器官中的表达分布

*hsp70* 基因在鳃、脑、肝、脾、肠、心、头肾、肾、肌肉组织中均有表达。采用实时荧光定量 PCR 分析美洲鲈 *hsp70* 基因在各组织的相对表达情况, 以脾的相对表达量为 1, 美洲鲈 *hsp70* 基因在组织中的表达量由高到低为头肾、肌肉、鳃、脑、心、肝、脾、肾、肠 (图 4)。其中, 头肾中的表达量极显著高于其他组织 ( $P < 0.01$ ), 其次是肌肉和鳃 ( $P < 0.05$ )。

## 2.4 运输胁迫对美洲鲈亲鱼 *hsp70* 基因 mRNA 表达的影响

实验过程对美洲鲈转移至塑料充氧袋后的行为观察发现, 开始时鱼体极度活跃, 不断冲撞, 随着时间持续, 鳃盖开合频率加快, 部分鱼体吻部上缘、眼睛及各鳍基部出现渗血甚至吻部出血等现象。运输实验 2 h 时死亡率为 8.3%, 实验进行 4 h 时死亡率达到 70.8%, 实验 5 h 后死亡率达 100%, 可见美洲鲈亲鱼运输应激反应剧烈, 不耐运输。

在本实验运输操作胁迫持续期间, 美洲鲈

```

1 GGGCCACGCGTTGAGTGGTGGGGGGGGGTAGAGCTGGACGAGAAGCTGCATTACTGAACAGACTTTTCATCTCAGTTTACACTGATAAAGAGGAAATGTCCTCAAGGGACCCAGCAGTT
1 M S K G P A V
121 GGCATTGACCTGGGACCACCTACTCCTGTGTGGGGTCTTCCAGCATGGCAAAGTAGAGATCATGCCAACGACCAGGAAACAGGACCACCCAGCTATGTTGCCTTACAGACTCG
8 G I D L G T T Y S C V G V F Q H G K V E I I A N D Q G N R T T P S Y V A F T D S
241 GAAAGATTGATAGGTGATGCTGCAAAGAATCAAGTGGCAATGAACCAACCAACACAGCTCTTTGACCCAAGAGGCTGATTGGCGGGGTTTCATGACACTGTGGTGCAGTGCACATG
48 E R L I G D A A K N Q V A M N P T N T V F D A K R L I G R R F D D T V V Q S D M
361 AAGCACTGGCCCTTACGGTCATCAATGACTCGACACGGCCCAAGGTGACGGTGCAGTACAAGGGCGAGACCAAGGCCCTTCTACCTGAGGAAATCTCCTCCATGGTGTGGTCAAAATG
88 K H W P F T V I N D S T R P K V Q V E Y K G E T K A F Y P E E I S S M V L V K M
481 AAGGAGATCGCTGAGGCTACCTGGGAAAACCTGTACCAACGCTGTGCTCAGGGTCCAGCCTACTTCAATGACTCCGAGCCAGGCCACTAAAGAGCTGGAACCATCTCGCCCTG
128 K E I A E A Y L G K T V T N A V V T V P A Y F N D S Q R Q A T K D A G T I S G L
601 AACGTGTTGAGAATTATCAACGAGCCACAGCCCGCCCATCGCTACGGCTGGATAAAGGTAAAGGTGCAGAGAGGAACGCTCCTCATCTTTGATCTGGGCGTGGCACTTTTGACGTG
168 N V L R I I N E P T A A A I A Y G L D K G K G A E R N V L I F D L G G G T F D V
721 TCCATCTGCAATAGAAGATGGAATTTTGAAGTAAAGCAACAGCAGGACAGCACGACCTGGTGGGAGGACTTTGACAATCGCATGTCACACTTTGTCGATGAATCAAGAGG
208 S I L T I E D G I F E V K A T A G D T H L G G E D F D N R M V Q H F V D E F K R
841 AAAACAAAAGGACATAAGTCAGAACAAGAGGGCTGTGAGGAGATTGCGTACAGCATGCGAGAGGGCCAAAGAAATCCTGTCGTCAGCACCAGGCAAGCCTCGAGATCGACTCGCTC
248 K N K K D I S Q N K R A V R R L R T A C E R A K R I L S S S T Q A S L E I D S L
961 TTTGATGGCATTGACTTCTACAGTCCATCACCAGGGCAGCTTTGAGGAGTTAAACTCTGAACTTCTCAGGGAAACATTAGAACCAGTTGAAAAGCCCTCAGGGATGCCAAAATGGAC
288 F D G I D F Y T S I T R A R F E E L N S E L F R G T L E P V E K A L R D A K M D
1081 AAGGCCAGTCCATGACATTGTGCTTGTGGTGGCTCGACACGCATCCCTAAAATTCAAAACCTCAGGAGTTTCTTCAACGGTAGAGATTTGAATAGAAGTATAAATCCGGACGAG
328 K S Q V H D I V L V G G S T R I P K I Q K L L Q D F F N G R D L N R S I N P D E
1201 GCAGTGCATACGGAGCAGCTGTTGAGGTCGCCCTCCTCAGGTTGATCTCAGAAAATGTACAGGACTTACTGTGTCGATGTTGCTCCACTTTCTTAGGTATTGAGACTGCTGGA
368 A V A Y G A A V Q A A V L M G D T S E N V Q D L L L L D V A P L S L G I E T A G
1321 GGAGTCATGACACCCCTGATTAACGCAATACCCTATCCCGTCAAAACAGACACAGATATTCTCAACATATTGACACAACCCAGCCGGTGTGCTGATCAAGTGTATGAAGTGAACGA
408 G V M T P L I K R N T T I P S K Q T Q I F S T Y S D N Q P G V L I Q V Y E G E R
1441 GCCATGACCAAGATAATAGCCTTCTGGAAAGTTTGAACCTATTGGTATCCCGCTCGCCCTCCTGAGTCCCTCAGATTGAGGTGACCTTTGACATTGACGCGAATGGCATCCTGAAAT
448 A M T K D N S L L G K F E L I G I P P A P R G V P Q I E V T F D I D A N G I L N
1561 GTTTCAGCAGCTGACAAGCAGCTGCAAGAGACAAGATCACAATCACAATGATAAGGACGGTGTGAGCAAGAGAAATGACAGGATGGTCAAGAAGCCGACAAGTACAGGGCA
488 V S A A D K S T G K E N K I T I T N D K G R L S K E E I D R M V Q E A D K Y R A
1681 GAGGATGAACCTCAGAGAGAGAGGATTGCTGCCAGGAATCTCTGAGTATATGCTTCAATATGAAGAGCAGTGTGGAGGACGAGAAGATGAGGGGGAAAATCAGTGAGGAGGAGAAG
528 E D E L Q R E R I A A R N S L E S Y A F N M K S S V E D E K M R G K I S E E E K
1801 AACAAAGTCATAGAGAAGTGAAGAAGCAATCTCTGGCTTGACAACAACCACTGGCTGAAAAGGAAGATGAGCACCACCTGAAGGAACTTGAGAAAGTGTGCAGTCCAGTCATC
568 N K V I E K C K E A I S W L D N N Q L A E K E E Y E H H L K E L E K V C S P V I
1921 TCCAACTGTACAGGAGGGGTACCACCGGAGGCTGTAGAGCCAGGCTCAAGCTGAAATCTCAAGGTCACCACTTGAAGAACTGGATTAACTGGTGAAGATTATGAGGGCAAGACGT
608 S K L Y Q G G V P P G G C R A Q A Q A E S Q G P T I E E L D *
2041 TGGTGTGAGAGCTGTGACAGAAGAGACTGCTCTTTGTGAAACAGCTTATGACAGTTTGTAGCAAATCTCAGAAGAAGGAAATGTTTATTATCTTAACCCGAAGTCAAACTGGCTAA
2161 AACAGCAGCGTAAATCTTTGGAGGGATTAGTCTGAGCCTTAAGTACTTCCAAAAGGTGTTATGGGAAATTTATTTTCGACTCAACAGGCACTATTTTGTCTCAGACTATTGGTAA
2281 CAAAATAAATAGGGGATGCCATATCCATAACAATGATAAAGCAATTTAAGCTGTACAGATTGAAATGTGTCTTTCCAGAAAGTATTTTTCACCAAGTGTTTTAAATA
2401 GAATTACGTTGTAACATATACTGTAAGTGTGTTGGGACAGACAAATGTCTATGTCAGTATGTTATTTATGATCTTTCTGTAATTGATTAATAAATAAATACTCAAAAAA
2521 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 2 美洲鲈 hsp70 cDNA 全长序列及推测的氨基酸序列

Fig. 2 Full length cDNA nucleotide and deduced amino acid sequences of hsp70 in American shad

方框内分别是起始密码子 (ATG) 和终止密码子 (TAA); 双下划线表示 poly(A) 加尾信号; 实线下划线部分表示 HSP70 家族特征序列 IDLGTYS (9~16 aa), IFDLGGTTFDVSIL (197~210 aa) 和 IVLVGGSTRIPKIQK (334~348 aa)。

The initiation codon (ATG) and termination codon (TAA) are boxed, poly (A) signal sequence (aataa) is double underlined, three characteristic sequences of HSP70 family are in bold and underlined.

亲鱼鳃、肝、头肾组织 hsp70 mRNA 的表达量均呈现波动。在运输应激 2 h 时, 鳃组织 hsp70 mRNA 水平显著升高 (P < 0.05) (图 5), 肝极显著升高 (P < 0.01) (图 6), 4 h 时鳃、肝 hsp70 mRNA 水平均回落至运输 0 h 水平附近。头肾 hsp70 mRNA 水平随运输时间呈上升趋势, 至 4 h 时 hsp70 mRNA 水平升高显著 (P

< 0.05) (图 7)。综上可知, 运输操作应激可以显著提高鳃、肝、头肾热应激蛋白 70 基因的 mRNA 水平。

### 3 讨论

#### 3.1 美洲鲈 hsp70 cDNA 的克隆和序列分析

本实验克隆了美洲鲈 hsp70 cDNA 序列,

表 2 美洲鲟 HSP70 氨基酸序列与其他物种已知的 HSP70 比对

Table 2 The comparison of American shad HSP70 amino acid sequence with other known species

物种 Species	登录号 Accession no.	相似性 Similarity (%)	物种 Species	登录号 Accession no.	相似性 Similarity (%)
墨西哥脂鲤 <i>Astyanax mexicanus</i>	XP_007233036.1	88	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	AAI71454.1	87
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	ADX32514.1	88	鳊鱼 <i>Siniperca chuatsi</i>	AFU54391.1	86
鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>	AEO44578.1	88	红笛鲷 <i>Lutjanus sanguineus</i>	ADO32584.1	86
鲮鱼 <i>Müichthys müiy</i>	CCF23009.1	88	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	ABG56390.1	86
团头鲂 <i>Megalobrama amblycephala</i>	ACG63706.2	88	大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	ACI34374.1	85
圆口铜鱼 <i>Coreius guichenoti</i>	AHA44483.1	88	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	BAD83574.1	84
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	NP_001266600.1	88	大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	AAA17441.1	83
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	KKF29441.1	87	家犬 <i>Canis lupus familiaris</i>	BAB78505.1	83
黄鳝 <i>Monopterus albus</i>	AGO01981.1	87	小鼠 <i>Mus musculus</i>	AAC84169.1	83
鲫鱼 <i>Carassius auratus</i>	BAC67184.2	87	人 <i>Homo sapiens</i>	NP_005518.3	82
尖吻鲈 <i>Lates calcarifer</i>	AEH27544.1	87	果蝇 <i>Drosophila auraria</i>	CAA55168.1	73
鲢鱼 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	AGT99006.1	87	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	AAA18300.1	38
唐鱼 <i>Tanichthys albonubes</i>	ADM15726.1	87			

其符合 *hsp70* 基因家族的特征, 对其进行氨基酸同源性比较的结果与前人研究结果一致 (王文菊等 2007, 何珊等 2009, 明建华等 2009, 刘旭东 2011, 刘庆全 2013, 赵建华 2014), 美洲鲟 HSP70 与其他鱼类、哺乳类的不同物种均具有很高的相似性 (表 2), 一方面说明了本实验结果的可靠性, 另一方面也进一步证实 *hsp70* 家族在进化上的高度保守性, 表明该基因在生物进化中发挥着重要的生理功能, 如细胞保护功能, 维持细胞应激状态下必需功能蛋白稳定性等 (孔垂辉等 2007)。

### 3.2 美洲鲟 *hsp70* 基因在不同组织器官中的表达分布

对美洲鲟 *hsp70* 基因组织表达分布的研究, 表明其在鳃、脑、肝、脾、肠、心、头肾、肾、肌肉 9 个不同组织器官中均可检测到表达, 其中头肾表达量显著高于其他组织, 鳃、肌肉表达高于脑和心, 肝、脾、肾、肠中表达量较低。本实验结果与相关研究报道 (林亚秋 2009, 林亚秋等 2009, 倪蒙等 2012, 刘庆全 2013, 赵建华 2014) 进行比较, 发现 *hsp70* 基因在大多鱼类不同组织中广泛表达, 同时其在不同实验鱼类的不同组织中表达水平确实存在差异。

*hsp70* 在淞江鲈 (刘庆全 2013) 的鳃、肌肉中表达量较高, 而在肠、心中表达较低, 同样的在圆口铜鱼 (赵建华 2014) 肌肉中表达量最高, 这些均与 *hsp70* 在美洲鲟组织中的表达相似。林亚秋等 (2009) 对草鱼 *hsp70* 组织表达研究指出, 鳍中表达最高, 而鲤鱼 (林亚秋 2009) 心表达最高, 两种鱼鳃组织表达均较低。小体鲟 (*Acipenser ruthenus*) (倪蒙等 2012) *hsp70* 基因在肝中表达量最高, 而鳃中未见表达。这些与本研究结论不一致, 主要原因可能是实验鱼种类, 所处的生长时期, 养殖环境因子等多重因素影响, 导致了 *hsp70* 基因在不同组织中的差异表达。

### 3.3 运输应激下美洲鲟未经繁殖的亲鱼 *hsp70* 基因 mRNA 的表达情况

鱼类运输中涉及到捕捞、运输、卸载等人工操作, 运输过程中水体理化因子如温度、pH、氨氮、溶氧等均会发生波动, 在其综合效应下, 机体发生应激胁迫, 使得运输鱼类存活率下降 (许源剑等 2010)。实验初步研究结果显示, 美洲鲟亲鱼对外界环境变化有剧烈的应激反应, 这与大量研究报道相符合。美洲鲟对于外界环境变化的反应迅速, 游动迅猛, 对水体溶

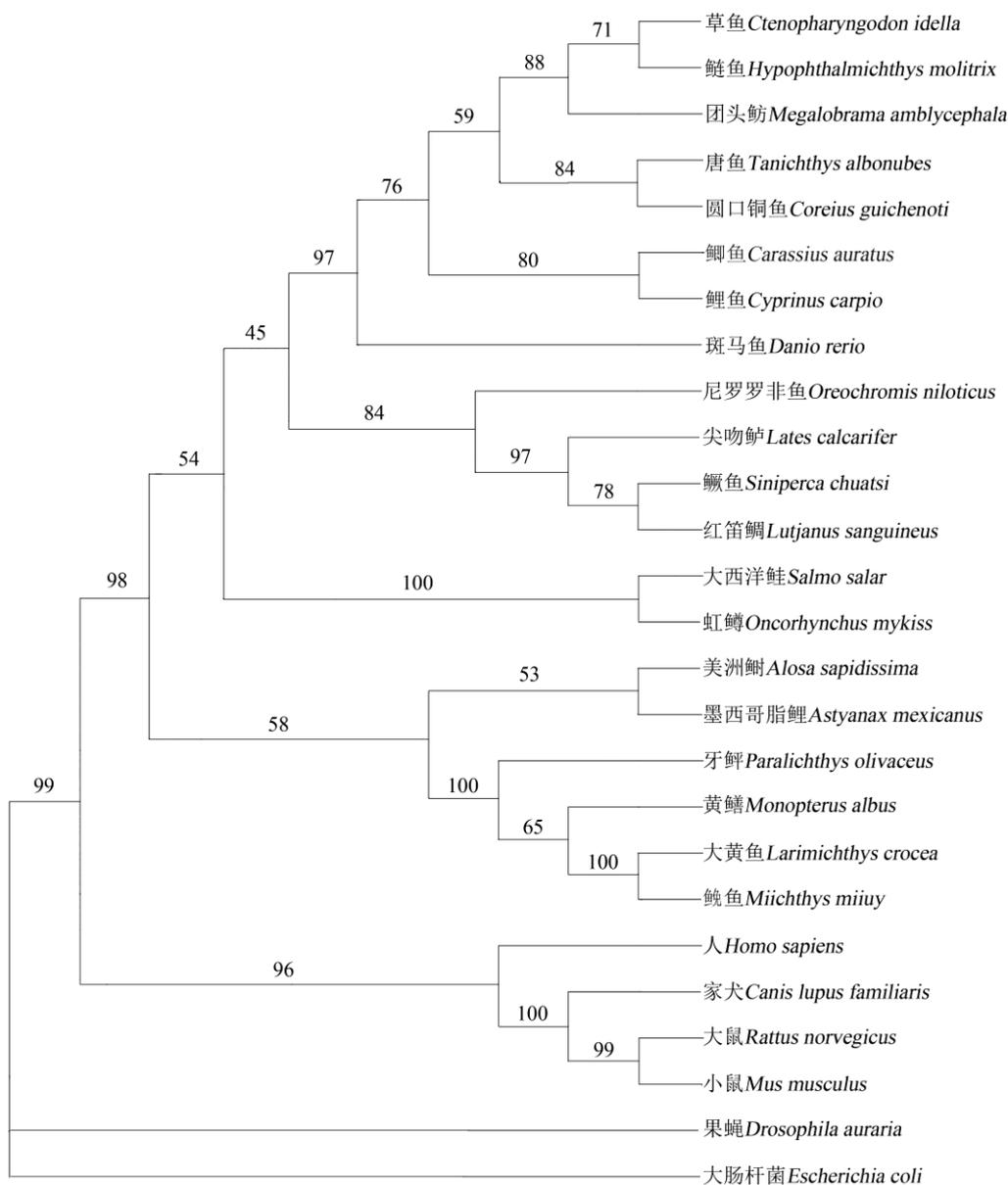


图 3 *hsp70s* 系统进化树

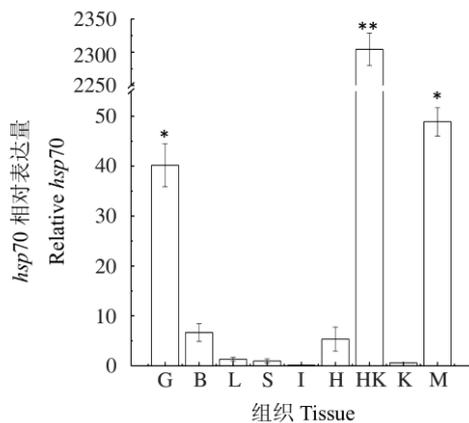
Fig. 3 The phylogenetic tree of HSP70s

采用 NJ Bootstrap 法构建系统进化树，图中各枝上的数据表示 1 000 次 bootstrap 验证中此分支的可信度；图中各个物种的 *hsp70* 基因数据来源于 GenBank，其登录号见表 2，美洲鲟的数据为本研究测定。

The phylogenetic tree was constructed by neighbor joining bootstrap. Data on each branch of this figure showed confidence level of 1 000 times bootstrap confirmation. *Hsp70* gene data of each species in Figure was from GenBank and the accession number was shown in Table 2, data of American shad was measured in this study.

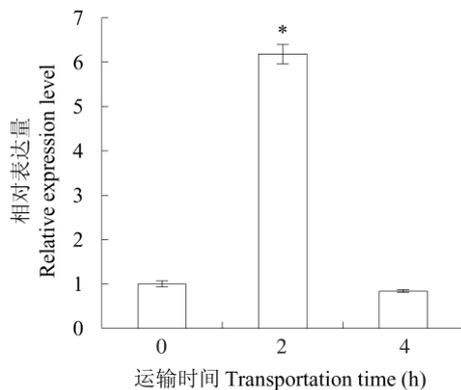
氧需求较高，呼吸频率及游动速度加快，而鳃是主要活跃器官，其较高的表达量推测它可能

是美洲鲟应激状态下主要的效应器官。研究发现圆口铜鱼（赵建华 2014）在急性操作胁迫后

图 4 美洲鲟不同组织中 *hsp70* 基因的表达分布Fig. 4 Expression level of *hsp70* in tissues of American shad

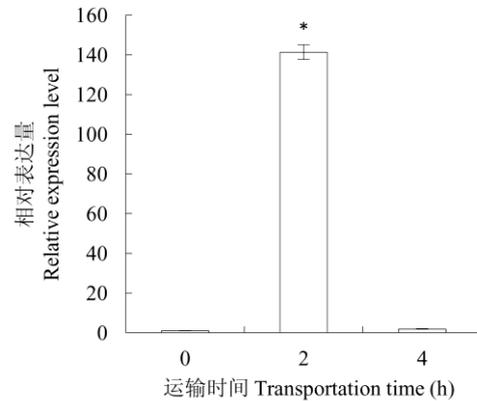
G. 鳃; B. 脑; L. 肝; S. 脾; I. 肠; H. 心; HK. 头肾; K. 肾; M. 肌肉。\* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), \*\* 表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

G. Gill; B. Brain; L. Liver; S. Spleen; I. Intestine; H. Heart; HK. Head kidney; K. Kidney; M. Muscle. \* means significant difference at  $P < 0.05$ , \*\* means significant difference at  $P < 0.01$ .

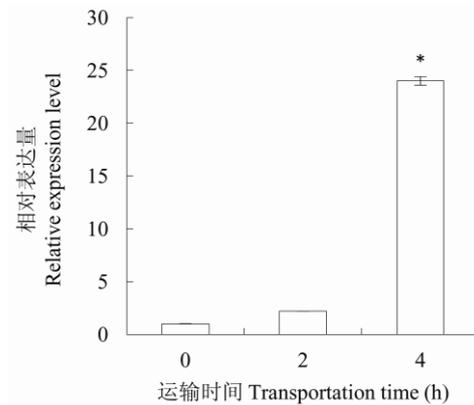
图 5 运输应激对鳃 *hsp70* mRNA 水平的影响Fig. 5 Effects of transportation stress on gill *hsp70* mRNA level

\* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。\* means significant difference at  $P < 0.05$ .

鳃、头肾组织均发生形态学结构改变,表明应激过程对鳃、头肾均造成了一定的损伤,影响了鳃的呼吸功能以及头肾的免疫功能。机体肝

图 6 运输应激对肝 *hsp70* mRNA 水平的影响Fig. 6 Effects of transportation stress on liver *hsp70* mRNA level

\* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。\* means significant difference at  $P < 0.05$ .

图 7 运输应激对头肾 *hsp70* mRNA 水平的影响Fig. 7 Effects of transportation stress on head kidney *hsp70* mRNA level

\* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。\* means significant difference at  $P < 0.05$ .

代谢受应激状态的影响,通过一些抗氧化酶指标来衡量肝的损伤情况比较常见,而通过 *hsp70* mRNA 水平变动来研究肝应激也逐渐成为一种新的思路。鉴于 HSP70 在机体对抗应激中的重要功能,本实验对运输应激下美洲鲟鳃、头肾及肝的 *hsp70* mRNA 水平进行了研究。研究结

果发现,在运输应激中鳃、肝 *hsp70* 表达量均呈现先升高后下降的变化趋势,而肝升高幅度明显高于鳃。头肾表达量呈升高趋势,在 4 h 时急剧上升。可见 *hsp70* 基因的表达有组织特异性,应激条件下 *hsp70* 表达量在不同组织器官中会出现不同程度的升高或降低,这与研究对象的种类、应激源的特征及在不同组织中的表达灵敏性均有关联。*hsp70* 基因主要在转录水平进行调控 (Bonga et al. 1997, 任宝波等 2005), 由热休克转录因子 (heat shock transcription factor, HSF) 和热休克元件 (heat shock element, HSE) 共同参与。应激下迅速激活热休克转录因子 (HSF), 形成三聚体并转入核内结合热休克元件 (HSE), 启动 *hsp70* 基因的转录。*hsp70* 基因不含内含子故而在应激后短时间内便可产生, 导致 *hsp70* mRNA 水平明显升高。而 *hsp70* mRNA 水平升高后又可通过负反馈进行调控, 大量游离的 HSP70 与热休克转录因子 (HSF) 结合, 抑制其活性, 因而阻止了热休克蛋白 (HSP) 的进一步合成, 使 *hsp70* mRNA 含量维持在一定的水平 (Iwama et al. 1998, 任宝波等 2005, 赵建华等 2011, Evgen'ev et al. 2014, 赵建华 2014), 而此过程中热休克转录因子 (HSF) 只是活性的改变而其数量不变 (Rabindran et al. 1997)。

目前有关运输应激过程对鱼类不同组织 *hsp70* 基因表达的影响还鲜有报道。与本研究鳃中表达量变化相似, 赵建华 (2014) 研究发现, 不同运输条件对圆口铜鱼各个组织 *hsp70* mRNA 水平的影响存在差异, 鳃在运输处理后表现出明显的升高, 运输后的恢复期有所下降, 但仍高于运输前水平, 表明这是 *hsp70* 负反馈调控的结果 (明建华等 2009, Evgen'ev et al. 2014)。本实验中肝与鳃的变动趋势相似, 推测运输过程对机体鳃、肝均造成了一定的损伤, 使得 *hsp70* 表达水平升高, 发挥 HSP70 的损伤修复及抗氧化功能, 来增强机体对应激的耐受性。头肾是鱼类重要的免疫器官, 也参与应激

状态下的神经-内分泌-免疫调节过程 (赵建华等 2011)。动物实验显示应激对免疫功能的影响是抑制性的 (谷建勇 2002), 刘小玲 (2006) 研究发现, 运输导致黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 产生应激反应, 造成白细胞吞噬功能的抑制。李茜 (2013) 发现急性操作胁迫会导致圆口铜鱼头肾细胞结构和数量的变化。本实验中头肾 *hsp70* 表达量持续升高, 说明头肾细胞在该应激下调控 *hsp70* 基因大量表达使其在头肾细胞中发挥其细胞保护功能, 进而推测, 随着运输应激持续时间的延长对美洲鲟亲鱼头肾组织细胞可能造成了一定的损伤。

鱼类受到外界不良刺激后产生一系列应激反应, 而应激刺激超过鱼体承受范围还会诱发多种疾病, 甚至死亡 (王国强等 2009, 赵建华等 2011)。大量研究报道显示, 鱼类在应激操作处理后, 机能发生紊乱, 有时还伴随延迟死亡现象 (Chittenden 1973a, b)。Du 等 (2014) 研究了长江刀鲚 (*Coilia nasus*) 装载应激的致死机制, 发现新陈代谢和免疫是两种最常见的应激途径。一方面在新陈代谢途径中发挥关键作用的糖代谢、脂代谢及其相关酶的转录组表达在应激后均呈现上升趋势, 另一方面免疫途径中 TNF- $\alpha$ 、caspase-9、细胞色素 C、caspase-3 等细胞凋亡相关蛋白的转录组表达检测均增高, 最终导致器官损伤以及应激致死。本研究美洲鲟亲鱼在运输应激后出现较高的死亡率, 再次说明其对环境变动的适应能力极其有限, 美洲鲟亲鱼不耐运输。针对美洲鲟亲鱼运输中应激机理的研究及其有效运输方法的探讨仍需进一步的研究加以论证。

## 参 考 文 献

- Arya R, Mallik M, Lakhota S C. 2007. Heat shock genes integrating cell survival and eath. *Journal of Bioscience*, 32(3): 595-610.
- Basu N, Todgham A E, Ackerman P A, et al. 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, 295(2): 173-183.

- Bonga S E W. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77(3): 591–625.
- Chittenden M E. 1973a. Salinity tolerance of young American shad, *Alosa sapidissima*. *Chesapeake Science*, 14(3): 207–210.
- Chittenden M E. 1973b. Effects of handling on oxygen requirements of American shad (*Alosa sapidissima*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 30(1): 105–110.
- Du F K, Xu G C, Nie Z J, et al. 2014. Transcriptome analysis gene expression in the liver of *Coilia nasus* during the stress response. *Bmc Genomics*, 15(1): 1–11.
- Evgen'ev M B, Garbuz D G, Zatsepina O G. 2014. Heat Shock Proteins and Adaptation to Variable and Extreme Environments. Dordrecht: Springer Netherlands, 59–115.
- Feder M E, Hofmann G E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response. *Evolutionary and ecological physiology. Annual Review of Physiology*, 61(1): 243–282.
- Feige U, Polla B S. 1994. Heat shock proteins: the *hsp70* family. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 50(11/12): 979–986.
- Hightower L E. 1991. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell*, 66(2):191–197.
- Iwama G K, Thomas P T, Forsyth R B, et al. 1998. Heat shock protein expression in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 8(1): 35–56.
- Iwama G K, Vijayan M M, Forsyth R B, et al. 1999. Heat shock proteins and physiological stress in fish. *Integrative and Comparative Biology*, 39(6): 901–909.
- Rabindran S K, Giorgi G, Clos J, et al. 1997. Molecular cloning and expression of a human heat shock factor, HSF1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(16), 6906–6910.
- Sommer T, Jarosch E. 2002. BiP binding keeps ATF6 at bay. *Developmental Cell*, 3(1): 1–2.
- 杜浩. 2005. 美洲鲌 (*Alosa sapidissima*) 人工孵化、养殖及转运关键技术的研究. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 23–38.
- 谷建勇. 2002. 应激对机体的影响. *上海畜牧兽医通讯*, (6): 24–25.
- 何珊, 梁旭方, 李观贵, 等. 2009. 鲢鱼、草鱼和尼罗罗非鱼热休克蛋白 70 基因 cDNA 全序列的克隆与分析. *环境科学学报*, 29(11): 2324–2330.
- 洪孝友. 2011. 美洲鲌早期发育的形态学及组织学观察. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 1–10.
- 孔垂辉, 徐玉明. 2007. HSP70 和肝脏抗氧化能力. *北京体育大学学报*, 30(5): 656–658.
- 李茜. 2013. 急性操作胁迫对养殖圆口铜鱼头肾免疫功能的影响. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 14–28.
- 林亚秋. 2009. 鲤鱼 *hsp70* 基因组织表达差异研究. *安徽农业科学*, 37(11): 4915–4916, 5077.
- 林亚秋, 郑玉才, 吉红. 2009. 草鱼 *hsp70* 基因 cDNA 部分序列克隆及其组织表达差异. *淡水渔业*, 39(4): 67–71.
- 刘庆全. 2013. 淞江鲈 (*Trachidermus fasciatus* Heckel) *hsp70* 全序列的克隆及其表达的初步研究. 上海: 复旦大学硕士学位论文, 14–27.
- 刘小玲. 2006. 应激对黄颡鱼非特异性免疫细胞的影响. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 29–34.
- 刘旭东. 2011. 牙鲈 *hsp70* 与 *hsc70* 基因的克隆、表达及其 SNPs 与耐热性状的相关性分析. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 30–39.
- 明建华, 谢骏, 刘波, 等. 2009. 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*, 16(5): 635–648.
- 倪蒙, 温海深, 步艳, 等. 2012. 小体鲟 *hsp70* 基因全长 cDNA 序列的分离及表达分析. *中国海洋大学学报*, 42(12): 21–28.
- 齐红莉, 梁拥军, 杨广, 等. 2009. 美洲鲌应激反应机理的研究. *华北农学*, 24(1): 36–39.
- 任宝波, 王玉艳, 王纯净, 等. 2005. HSP70 家族的分类及基因结构与功能. *动物医学进展*, 26(1): 98–101.
- 田照辉, 徐绍刚, 王巍, 等. 2013. 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*, 37(2): 344–350.
- 许源剑, 孙敏. 2010. 应激胁迫对鱼类运输的影响及其应对措施. *科学养鱼*, (11): 16–17.
- 万文菊, 王纪亭, 石存斌, 等. 2007. 剑尾鱼热应激蛋白 *hsp70* cDNA 片段的克隆与序列分析. *大连水产学院学报*, 22(1): 1–5.
- 王国强, 王雯. 2009. 应激反应对鱼类影响的研究进展. *安徽农业科学*, 37(24): 11579–11580.
- 张旭辉. 2001. 热休克蛋白 70 与热耐受的机制. *解放军预防医学杂志*, 19(1): 73–75.

赵建华. 2014. 圆口铜鱼应激生理机制及缓解策略研究. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 39-82.

生命科学, 23(4): 394-401.

祝璟琳, 王国良. 2007. 鱼类 HSP70 研究进展. 宁波大学学报: 理工版, 20(4): 446-450.

赵建华, 杨德国, 陈建武, 等. 2011. 鱼类应激生物学研究与应用.

工版, 20(4): 446-450.