

DOI: 10.3969/j.issn.2096-8248.2026.01.001

引用格式: 李涛, 梁仁豪, 丁伟, 等. 大眼双锯鱼热休克蛋白 1B 基因克隆及其对运输胁迫的响应 [J]. 江苏海洋大学学报 (自然科学版), 2026, 35 (1): 1-12.

大眼双锯鱼热休克蛋白 1B 基因克隆 及其对运输胁迫的响应

李涛^{1a, b}, 梁仁豪², 丁伟³, 蔡佳⁴, 陈利雄^{1a, b},
黄小林^{1a, b}, 杨育凯^{1a, b}, 黄忠^{1a, b}, 喻大鹏⁴

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所 a. 深圳试验基地, 广东 深圳 518121;

b. 农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室 / 广东省渔业生态环境重点实验室, 广东 广州 510300;

2. 广州大学 生命科学学院, 广东 广州 510006; 3. 深圳市智海海洋生物科技有限公司, 广东 深圳 518116;

4. 广东海洋大学深圳研究院, 广东 深圳 518116)

摘要: 对大眼双锯鱼 (*Amphiprion ephippium*) 热休克蛋白 A 家族 1B (heat shock protein family a member 1B, HSPA1B) 的分子特征及其在运输状态下的表达模式进行了探讨。以大眼双锯鱼为实验材料, 取其肝脏组织样品, 提取 RNA 逆转录后进行 HSPA1B 基因克隆, 然后使用实时荧光定量 PCR 的方法检测 HSPA1B 基因在各个组织中的表达情况。同时构建在运输状态下的应激模型, 通过实时荧光定量 PCR 技术分析不同组织中 HSPA1B 基因在不同运输阶段的表达变化。结果显示, HSPA1B 基因 ORF 全长 1 734 bp, 编码 577 个氨基酸残基, 预测其分子质量大小约为 63.94×10^3 u, 理论等电点 pI 为 5.42。构建系统进化发育树显示, 大眼双锯鱼 HSPA1B 蛋白与眼斑双锯鱼 (*Amphiprion ocellaris*) HSPA1B 聚为一支, 相似度高达 99.13%。HSPA1B 基因广泛分布于大眼双锯鱼 (*A. ephippium*) 各组织中, 相比于肠道组织, 在肌肉中表达量最高, 其次是脑组织和皮肤组织, 其他所测组织中表达量较低。除肝脏外, 大眼双锯鱼 (*A. ephippium*) HSPA1B 基因在运输胁迫前期 (6 h) 即出现显著响应, 表达上调, 在运输中期 (12 h, 24 h) 达到峰值, 运输后期表达量下调, 并维持一定量的高表达。HSPA1B 基因参与大眼双锯鱼免疫组织应激性免疫应答, 由此可将 HSPA1B 基因作为大眼双锯鱼是否处于应激状态的重要指标。

关键词: 大眼双锯鱼; HSPA1B; 序列分析; 运输胁迫; 表达分析

中图分类号: S968.9

文献标志码: A

文章编号: 2096-8248 (2026) 01-0001-12

Characteristics of the HSPA1B gene in *Amphiprion ephippium* and its response to transportation stress

LI Tao^{1a, b}, LIANG Renhao², DING Wei³, CAI Jia⁴, CHEN Lixiong^{1a, b}, HUANG Xiaolin^{1a, b},
YANG Yukai^{1a, b}, HUANG Zhong^{1a, b}, YU Dapeng⁴

(1. a. Shenzhen Base, Shenzhen 518121; b. Key Laboratory for Development and Utilization of South China Sea Fisheries Resources/Key Laboratory for Fisheries Ecological Environment of Guangdong Province,

收稿日期: 2025-09-01; 修订日期: 2025-11-11

基金项目: 海南省科技专项资助项目 (ZDYF2022XDNY349); 深圳市规划与自然资源局农业发展专项资金 (渔业类) 农业高新技术项目 (2023-222)

作者简介: 李涛, 高级工程师, 硕士, 研究方向为水产养殖, (E-mail) lit151415@126.com。

通信作者: 喻大鹏, 工程师, 博士, 研究方向为水产养殖, (E-mail) yudapeng@gdou.edu.cn。

Guangzhou 510300, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, China;

2. School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China;

3. Shenzhen Zhihai Marine Biotechnology Co., Ltd., Shenzhen 518116, China;

4. Shenzhen Institute of Guangdong Ocean University, Shenzhen 518116, China)

Abstract: This study investigates the molecular characteristics of heat shock protein family a member 1B (HSPA1B) in *Amphiprion ephippium* and its expression patterns under transport conditions. Using *A. ephippium* as the test material, liver tissue samples were collected to clone the *HSPA1B* gene following RNA extraction and reverse transcription. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was then employed to detect the expression of the *HSPA1B* gene across various tissues. Simultaneously, a transport stress model was established to monitor expression changes in different tissues at various time points during transportation using RT-qPCR. The results showed that the open reading frame (ORF) of the *HSPA1B* gene is 1 734 bp in length, encoding 577 aa residues. The predicted molecular mass is approximately 63.94×10^3 u, with a theoretical isoelectric point (pI) of 5.42. Phylogenetic analysis revealed that the HSPA1B protein of *A. ephippium* clusters with that of *Amphiprion ocellaris*, sharing a high similarity of 99.13%. The *HSPA1B* gene is widely distributed in various tissues of *A. ephippium* (large-eyed double-sawfish). Compared to intestinal tissues, it exhibits the highest expression level in muscle tissue, followed by brain and skin tissues, with lower expression levels in other tested tissues. Except for the liver, *A. ephippium* *HSPA1B* gene shows significant upregulation during the early stage of transport stress (6 h), reaches peak expression levels during the middle stage of transport (12 h, 24 h), and subsequently downregulates expression levels during the late stage of transport while maintaining a certain level of high expression. The *HSPA1B* gene is involved in the immune histostress response of *A. ephippium*, making it a critical indicator for assessing whether the fish is under stress.

Key words: *Amphiprion ephippium*; *HSPA1B*; sequence analysis; transport stress; expression analysis

早在 20 世纪 60 年代遗传学家 Ritossa 在研究中发现,当巴氏果蝇 (*Drosophila busckii*) 遭受高温胁迫后其染色体会出现异常膨突,后续研究证实是由高温应激而导致的该突变^[1]。随后 Tissières 等学者于 1974 年进一步研究发现,在黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 幼虫经过高温胁迫后,其染色体同样发生突变,且从其组织中分离鉴定出 6 种相关编码基因和蛋白质,并将其命名为“热休克蛋白”^[2]。直至 20 世纪 90 年代,研究人员才将已发现的 HSPs 进行分类,根据其分子量大小及其同源性,将 HSPs 划分为以下 7 类,分别是 HSPH (HSP110), HSPC (HSP90), HSPA (HSP70s), DNAJ (HSP40), HSPB (sHSP), HSPD/E (HSP60/HSP10) 和 CCT (TRiC)^[3]。还有研究人员按照其表达模式进行划分,主要分为以下两类:其中一类为“诱导型 HSPs”,正常情况下并不表达,但受到外界应激刺激后,将会大量表达;另一类称为“组

成性 HSPs”,广泛存在于机体各个组织中,当受到应激刺激后,其表达量可能会上升^[4-5]。HSP70 家族蛋白是热休克蛋白中最著名、功能最保守的核心家族之一,在从细菌到人类的几乎所有生物体中都存在,扮演着“细胞伴侣”的关键角色。其成员分布在细胞的不同部位,执行特定功能,例如: HSPA1B 蛋白位于内质网中,主要负责内质网内蛋白质的折叠、组装,监控内质网应激^[6]; HSPA9 蛋白位于线粒体基质中,其最关键的功能是协助核编码的蛋白质前体转运进入线粒体并进行折叠,对维持线粒体功能至关重要^[7]; HSPA8 蛋白与 HSPA1A/HSPA1B 蛋白均位于细胞质/核质中, HSPA8 蛋白主要协助新生肽链折叠、蛋白质跨膜转运等,而 HSPA1A/HSPA1B 蛋白在热休克或其他应激刺激下表达量急剧上调,是细胞应激防御系统的核心^[8]。随后研究发现, HSPA1B 虽然与 HSPA1A 功能基本相同,但在应激条件下, HSPA1B 表达量更高,是细胞应激反

应中 HSP70 的主要来源^[8-9]。且 HSP70 是生物体在应对各种环境胁迫(如高温、缺氧、污染、病原感染等)时高度保守的一类重要的分子伴侣蛋白。其主要功能是参与新生肽链的折叠、转运,以及防止错误折叠蛋白的聚集,促进变性蛋白的复性或降解,从而维持细胞的蛋白质稳态,提高机体的耐受力与适应性。在水产养殖领域,随着集约化养殖的发展,鱼类不可避免地面临多种应激原,包括高密度运输、温度突变、水质恶化等。这些应激原会破坏鱼体的生理平衡,抑制免疫系统,导致生长迟缓、疾病暴发甚至死亡。因此,探究鱼类在应激条件下的分子应答机制,对于评估其健康状况、制定科学的抗应激策略具有重要意义。

大眼双锯鱼(*Amphiprion ephippium*),隶属于硬骨鱼纲(Osteichthyes)、辐鳍亚纲(Actinopterygii)、鲈形目(Perciformes)、雀鲷科(Pomacentridae)、海葵鱼亚科(Amphiprioninae)、双锯鱼属(*Amphiprion*)。主要栖息于印度洋和太平洋的温暖水域,也包括大堡礁、红海等热带珊瑚礁区域,是一种重要的海水观赏鱼品种,广受人们喜爱,市场需求旺盛,交易频繁^[10]。近年来,由于气候变化造成海水温度升高、酸化加剧,加之工业污染等人因素的影响,珊瑚礁栖息地出现退化甚至消失的现象^[11],使其生存环境急剧减少。目前,中国水产科学研究院南海水产研究所已成功建立了大眼双锯鱼的全人工亲鱼驯化、培育及人工繁殖、育苗和养成技术体系^[12]。但大眼双锯鱼进入市场前,需要进行长途运输到暂养地,然后再集中销售。商家在异地交易过程中发现,大眼双锯鱼常在运输过程中出现大量死亡,损耗严重,推测其可能受到运输胁迫的影响,出现了应激死亡^[13-14]。当前鱼类活体运输胁迫研究主要存在两方面不足:一方面,多数实验集中于低氧、高氨氮、高亚硝态及硝态氮、振动等单一胁迫因素,而实际运输是多种胁迫的复合场景,相关综合性研究较少^[15];另一方面,现有成果多聚焦在能量代谢、氧化与免疫等生理表型层面,对驱动这些变化的细胞内源头性应激机制探索仍显薄弱^[16]。

研究表明热休克蛋白与生物的环境适应能力密切相关,当生物体受到胁迫时,HSPs 会被大量诱导,以减少或避免应激损伤。观赏鱼运输体量较小,且因其特殊的观赏价值,要求更高的保活率,更低的损伤。然而,目前大多数研究聚焦于经济鱼类的保活运输,对海水观赏鱼相关研究较少。基于此,本研究

克隆并鉴定了大眼双锯鱼 *HSPA1B* 基因,并对其进行了生信分析,利用荧光定量检测技术分析其在各组织中的表达差异,以及在运输过程中表达变化,阐明运输应激与大眼双锯鱼 *HSPA1B* 基因之间的联系,为进一步开展水生动物保活运输抗逆机制研究奠定理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼及场地

实验所需大眼双锯鱼(*A. ephippium*)由中国水产科学研究院南海水产研究所提供。暂时饲养于实验室循环海水车间,车间温度(31.0±0.5)℃,海水温度(26.5±0.2)℃,海水 pH 为 8.1~8.3,溶解氧高于 5 mg/L,日常照料由专人管理。

1.2 试剂与耗材

珊瑚专用海水素购自海之绚水族用品科技有限公司。ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(货号:Q711-02)和 RNA isolater Total RNA(货号:R401-01)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。HiScript II Q Select RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)(货号:R223-01)用于 cDNA 合成。北京索莱宝科技有限公司 Buffer EX(货号:B3060)替代氯仿。北京全式金生物技术股份有限公司的 PCR 扩增试剂(货号:AS122-11)与纯化试剂 EasyPure® PCR and Purification Kit(货号:EP101-01)用于 PCR 产物制备。感受态细胞 *E.coli* DH5α Competent Cells(货号:9057)、高保真酶 PrimeSTAR® Max DNA Polymerase(货号:R045A)、Premix Taq™(Ex Taq™ Version 2.0 plus dye)(货号:RR902A)及 TA 克隆载体 pMD™19-T Vector Cloning Kit(货号:6013)等分子克隆试剂购自宝日医生物技术(北京)有限公司。

1.3 模拟运输实验

实验设置 5 组运输时间,分别为 0, 6, 12, 24 和 48 h,同时设置对照组不进行运输操作,每个运输时间组分别打包运输。实验前先将大眼双锯鱼禁食 24 h。模拟运输实验使用聚乙烯袋作为运输容器,每袋注入 4 L 人工海水,每袋放入平均体长为(6.65±0.70)cm 大眼双锯鱼 5 尾,并把袋子内空气排空,充入 4 L 纯氧,每个运输时间设置 3 个重复,起始运输水温为(21.74±0.28)℃。充氧完毕后快速使用橡皮筋封口,置于泡沫箱中,为降低温度泡沫箱内放 4 个冰袋,模拟运输期间禁止打开塑料袋。采用车载的方法,在中国水产科学研究院南海水产研究

所深圳试验基地周边市政公路模拟运输。

1.4 样品采集

为检测大眼双锯鱼 *HSPA1B* 基因表达谱, 随机取 3 尾大眼双锯鱼, 分别取鳃、肝脏和脾脏等 10 个组织, 装入提前标记好的冻存管内, 置于液氮中速冻。然后在运输 0, 6, 12, 24 和 48 h, 这 5 个时间点随机选取 6 尾大眼双锯鱼(分别从运输胁迫组与空白对照组 (*Ae*-CK) 两组, 各取 3 尾鱼), 分离大眼双锯鱼鳃、肝脏和脾脏等 10 个组织, 将其装入预先标记好的冻存管中, 液氮速冻, 实验结束后, 全部转移至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.5 组织总 RNA 的提取和反转录

参考徐泽华等^[17]的文献实验方法, 使用 Trizol 裂解样品提取组织总 RNA。所有样品先经 1.50% 琼脂糖凝胶电泳检测以评估 RNA 完整性; 随后使用超微量分光光度计 (NanoDrop 2000C) 测定

所提 RNA 的质量与浓度。最后, 依据反转录试剂盒 HiScript II Q Select RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 说明书, 将合格 RNA 反转录为 cDNA, 并于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.6 大眼双锯鱼 *HSPA1B* 基因克隆

由于大眼双锯鱼 (*A. ephippium*) 全基因组信息与相关基因序列尚未公布, 本研究选取其同属近缘物种眼斑双锯鱼 (*A. ocellaris*) (同为鲈形目、雀鲷科、双锯鱼属) *HSPA1B* 基因序列 (开放阅读框, ORF) 设计克隆引物 (见表 1)。从大眼双锯鱼 (*A. ephippium*) 肝脏组织提取总 RNA, 反转录为 cDNA, 用作 PCR 模板。使用高保真酶进行 PCR 扩增。将获得的 PCR 产物连接至 pMDTM19-T 载体转化 DH5 α 。将筛选的阳性克隆送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序, 然后使用 NCBI 数据库进行比对鉴定。

表 1 实验所使用引物
Table 1 Primers used in the experiment

基因	引物序列 (5'~3')	产物大小 /bp	温度 / $^{\circ}\text{C}$
<i>Ae</i> - <i>HSPA1B</i>	F: ATGAATCCCACCAACACAAT	1 734	51.4
	R: TCAGTCCACTTCTCGATG		53.8
<i>q</i> - <i>Ae</i> - <i>HSPA1B</i>	F: AGCAGCCATCGCTTATGG	173	58.7
	R: GGTGTGCGAAGTCTCCC		55.8
<i>q</i> - <i>Ae</i> - β - <i>actin</i>	F: CGGTCGGCGTCCAACCTTCTTAG	144	60.9
	R: TCTCGGCGAAGGGTAGACACAC		61.7

1.7 *HSPA1B* 基因生物信息学分析

对获得的大眼双锯鱼 (*A. ephippium*) *HSPA1B* 基因 CDS 区序列的特征进行分析: 首先利用生物信息学软件 DNASTar 7.0 的 MegAlign 模块将大眼双锯鱼 *HSPA1B* 基因与 NCBI 中已公布的其他物种 *HSPA1B* 的 CDS 序列进行比对; 随后将以上 CDS 序列翻译成氨基酸, 采用 MEGA 12 软件, 基于最大似然法 (ML 法) 构建系统发育树。借助 ExPASy 网站的 ProtParam 和 ProtScale 分析大眼双锯鱼 (*A. ephippium*) *HSPA1B* 蛋白的理化性质与疏水性; SignalP 6.0 和 DeepTMHMM 预测信号肽与跨膜结构域^[18]。

1.8 *HSPA1B* 基因在大眼双锯鱼中的表达分析

根据测序所得的 *HSPA1B* 基因序列, 设计 qPCR 特异性引物 *q*-*Ae*-*HSPA1BF*/*q*-*Ae*-*HSPA1BR* (见表 1), 由上海生工生物合成。以大眼双锯鱼不同组织 cDNA 为模板, β -*actin* 为内参基因, 设计引物 *q*-*Ae*- β -*actinF*/*q*-*Ae*- β -*actinR*, 按 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒说明进行实时荧光定量 PCR。反

应体系为 10.0 μL , 包括 5.0 μL SYBR qPCR Enzyme、0.5 μL 上游引物 *q*-*Ae*-*HSPA1BF* 和 0.5 μL 下游引物 *q*-*Ae*-*HSPA1BR*、1.0 μL 稀释 5 倍的 cDNA 模板及 3.0 μL 无酶水。反应程序设置为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 42 个循环; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算 *HSPA1B* 基因相对表达量。

1.9 数据分析

所有实验数据采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。单因素方差分析 (one-way ANOVA) 比较组间差异, 并进行 Duncan 多重比较, 分析组间区别。数据结果表示为: 均值 \pm 标准差 (mean \pm SD), $P < 0.05$ 表示差异显著。利用 GraphPad Prism 9.0 软件绘制柱状图。

2 结果

2.1 大眼双锯鱼 *HSPA1B* 基因克隆及生物信息学分析

大眼双锯鱼 *HSPA1B* 基因开放阅读框长度为

1 734 bp, 编码 577 个氨基酸残基, 该蛋白的分子式 63.94×10^3 u, 理论等电点 pI 为 5.42 (见图 1)。为 $C_{2806}H_{4526}N_{774089}S_{16}$, 预测其分子质量大小约为

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
1	ATGAATCCCACCAACAATCTTTGATGCCAAACGGCTCATCGGAAGAAAGTTAACGCCAGTGGTCCAGTCCGACATGAAGCTCTGG								
1	M N P T N T I F D A K R L I G R K F N D P V V Q S D M K L W								
	100	110	120	130	140	150	160	170	180
91	CCTTCAAGGTGATCAGCGACAATGGAAAGCCAAAGTCCAGGTGGAGTACAAAGGGGAGACCAAGGCGTTCTATCCTGAGGAGATCTCC								
31	P F K V I S D N G K P K V Q V E Y K G E T K A F Y P E E I S								
	190	200	210	220	230	240	250	260	270
181	TCCATGGTCTGGTAAAGATGAAGGATCGCTGAGGCCTACCTGGGACAGAGGGTGTCAATGCAGTCATCAGTGCCTGGTCTTATTC								
61	S M V L V K M K E I A E A Y L G Q R V S N A V I T V P A Y F								
	280	290	300	310	320	330	340	350	360
271	AATGATCCCAAAGCAAGCCACTAAGGATGCGGGTGTGATCTCTGGACTAAATGTTCTGAGGATCATCAATGAGCTACAGCAGCAGCC								
91	N D S Q R Q A T K D A G V I S G L N V L R I I N E P T A A A								
	370	380	390	400	410	420	430	440	450
361	ATCGCTTATGGTCTGGATAAAGGTAAGAGAGAGCGCAACGTGCTCATCTTTGATCTCGGTGGTGGCACATTTGATGTATCCATCCTG								
121	I A Y G L D K G K R G E R N V L I F D L G G G T F D V S I L								
	460	470	480	490	500	510	520	530	540
451	ACTATCGAGGACGGCATCTTTGAGGTGAAAGCCACAGCTGGAGACACACCTTTGGGGGGAGGACTTCGACAACCGAATGGTCAACACC								
151	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 N H								
	550	560	570	580	590	600	610	620	630
541	TTTGTAGAGGAATTAAGAGAAAACACAAGAAGGACATCAGCCAGAATAAGAGAGCAGTGGAGAGATTGCGCACAGCTTGTGAGAGAGCA								
181	F V E E F K R K H K K D I S Q N K R A V R R L R T A C E R A								
	640	650	660	670	680	690	700	710	720
631	AAGAGAACCTTGTCTCCAGCACCCAGGCAAGCATCGAGATTGACTCTCTGTTGAGGGAATTGACTTTTACACCTCCATCACCAGGGCA								
211	K R T L S S S T Q A S I E I D S L F E G I D F Y T S I T R A								
	730	740	750	760	770	780	790	800	810
721	CGATTCGAGGAGCTCAACTCGGAGCTTTCAGGGAACTGAGCCGGTTGAGAAGGCCCTGCAAGACGCCAAGTGGACAAGTCCAAG								
241	R F E E L N S E L F R G T L E P V E K A L Q D A K L D K S K								
	820	830	840	850	860	870	880	890	900
811	ATCCATGAAATCGTCTGGTGGTGGCTCCACAAGAATCCCAAAATCCAGAAGCTCTTACAGGACTTTTAAATGGCAGAGACCTGAAC								
271	I H E 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								
	910	920	930	940	950	960	970	980	990
901	AAGAGCATCAACCCAGATGAAGCCGTGGCTACGGTGCAGCAGTCCAGGCTGCTATCCTCATGGGCGACACTTCAGAGAATGTCCAGGAT								
301	K S I N P D E A V A Y G A A V Q A A I L M G D T S E N V Q D								
	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080
991	CTGCTGTCTGGATGGTGGCTCCACTGTCTCTGGGCATCGAAACTGCGGGTGGAGTTATGACGTCTTTGATCAAGCGAAACCCACAATC								
331	L L L L D V A P L S L G I E T A G G V M T S L I K R N T T I								
	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
1081	CCCACCAAGCAGACCCAGATTTTCTCCACTTACTCAGACAACCAGCCAGGTGTTCTGATCCAGGTGTATGAAGGTGAGAAAGCCATGACC								
361	P T K Q T Q I F S T Y S D N Q P G V L I Q V Y E G E K A M T								
	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260
1171	AAAGACAATAACCTCTGGGAAAGTTGAGCTCACAGGTATCCCTCTGCTCCAGAGGTGTACCGCAAGTGGAGGTAACCTTCGACATC								
391	K D N N L L G K F E L T G I P P A P R G V P Q V E V T F D I								
	1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330	1340	1350
1261	GACGCCAACGGCATCCTAAACGTGTCTGCCGTAGACAAAAGCACCGGCAAGAAAACAAAATCACCATCACCAACGACAAGGGCCGCCTC								
421	D A N G I L N V S A V D K S T G K E N K I T I T N D K G R L								
	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430	1440
1351	AGCAAAGAGGAGATTGAGCGAATGGTGCAGGATGCAGAAAATTACAAAGCTGAGGATGACGTGCAGAGAGAAAGTCCGAGCGAAGAAC								
451	S K E E I E R M V Q D A E N Y K A E D D V Q R E K V A A K N								
	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530
1441	TCGCTGGAGTTCGTACGCCTACCACATGAAGAGCAGCGTTGAGGACGAGAACATGAAGGGAAGATTAGCGAGGCGGATAAAAAGATGGTC								
481	S L E S Y A Y H M K S S V E D E N M K G K I S E A D K K M V								
	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610	1620
1531	ATTGACAAGTGAACACGACAATTTCTGGTGGAGAACAACCAGCTGGCAGAGAAGGACGAGTACGAGCATCAGCAGAAAGGAAATAGAG								
511	I D K C N Q T I S W L E N N Q L A E K D E Y E H Q Q K E I E								
	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690	1700	1710
1621	AAAGTGTGCAAGCAATCGTGACAAAGTTGTACCAGGGAGCAGCACTGTCCAGGAAGCTGTGGCAGCCAGCGGAAGGAGGCTCACAGGGT								
541	K V C K P I V T K L Y Q G A A L S G S C G S Q T E G G S Q G								
	1720	1730							
1711	CCCACATCGAGGAAGTGGACTGA								
571	P T I E E V D *								

注: 下划线表示 ATPase 核苷酸结合结构域; 灰色底色表示 HSP70 蛋白肽结合结构域。

图 1 大眼双锯鱼 *HSPA1B* 基因核苷酸和氨基酸序列
Fig. 1 Nucleotide and amino acid sequence of the *HSPA1B* gene in *A. ehippium*

在构成蛋白质的 20 种常见氨基酸中, 含量最多的是赖氨酸 (Lys), 占比 8.8%; 谷氨酸 (Glu) 次之, 占比 8.5%; 含量最少的氨基酸是色氨酸 (Trp), 仅占 0.3%。该蛋白中不含有稀有氨基酸, 带负电荷的

氨基酸 (Asp+Glu) 数量为 87, 带正电荷的氨基酸 (Arg+Lys) 数量为 76。不稳定性指数为 36.87, 归类为稳定蛋白质。亲 / 疏水性预测结果 (见图 2) 显示, *HSPA1B* 蛋白最大疏水值为 2.211, 位于第 334

位氨基酸处;最小疏水值为-3.311,位于第532位氨基酸处。序列对比结果表明,本研究获得的 *HSPA1B* 基因 ORF 与眼斑双锯鱼相比存在 30 个碱基差异,核苷酸同源性达 98.2%,其编码的蛋白仅在靠近 C 端区域存在 5 个不同的氨基酸位点。

通过生物信息学软件在线分析 *HSPA1B* 基因理化性质、信号肽、亚细胞定位以及二、三级结构预测。结果如图 2 所示, *HSPA1B* 蛋白总平均亲疏水性 (GRAVY) 为 -0.468,该蛋白质为亲水性蛋白质 (见图 2a); *HSPA1B* 为胞内蛋白,无信号肽序列,

无跨膜结构域 (见图 2b 和 c); 主要定位于细胞质和细胞核,并在这两个区域穿梭发挥其分子伴侣功能。 *HSPA1B* 蛋白二级结构 (见图 2d) 主要由 α -螺旋构成,占 46.45%;其次,在二级结构中结构占比较高的是无规则卷曲,占 34.84%; β -折叠占比较少,占有 15.60%。对大眼双锯鱼 *HSPA1B* 蛋白的三级结构进行预测 (见图 2e),发现 *HSPA1B* 蛋白的 GMQE 置信度为 0.89,使用蓝色、绿色和灰白色分别标注出 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角与无规则卷曲 4 种二级结构在三维模型中的位置。

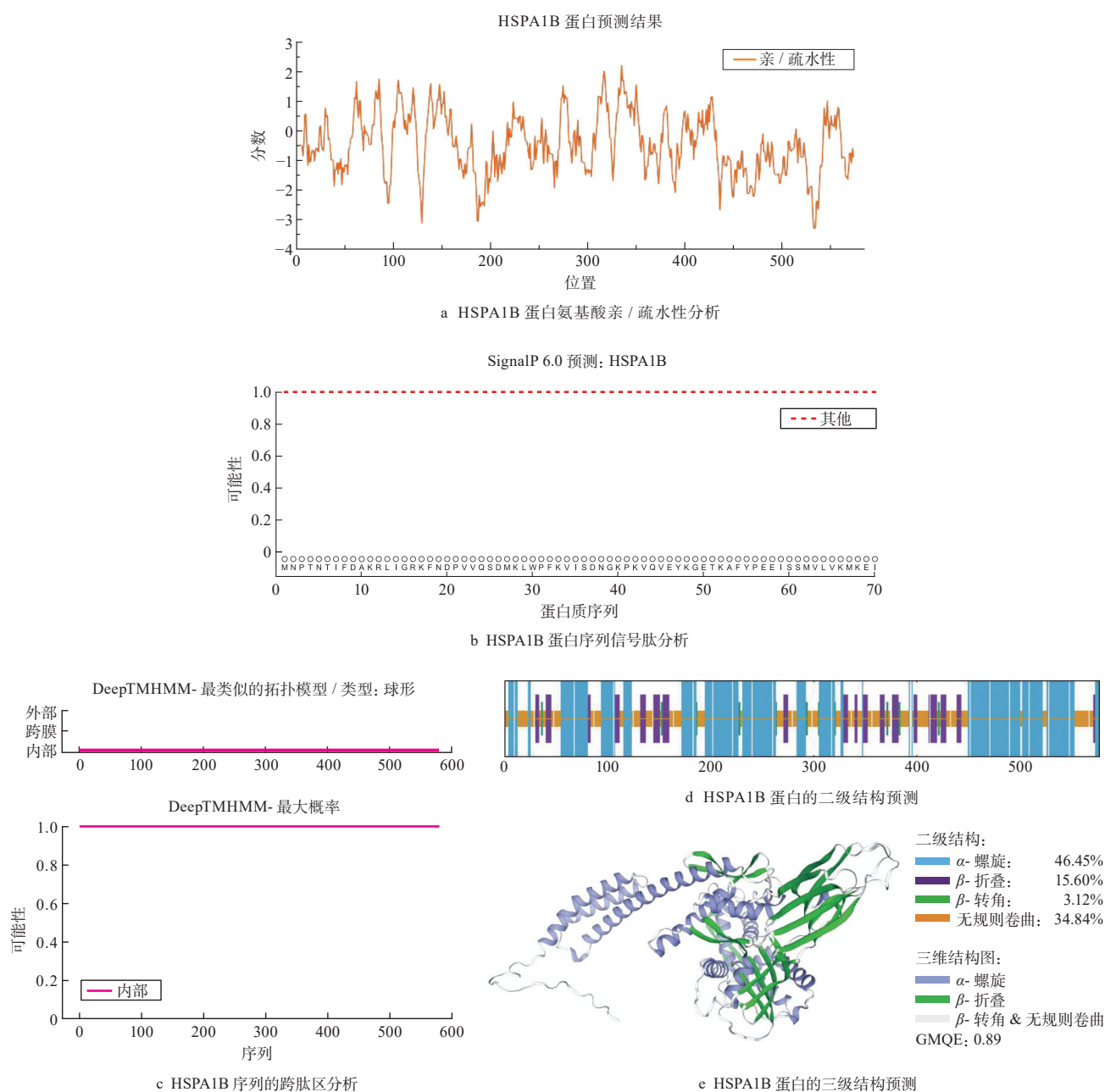


图 2 生物信息学软件在线分析大眼双锯鱼 *HSPA1B* 蛋白

Fig. 2 Bioinformatics software online analysis of the *HSPA1B* protein in *A. ephippium*

通过 SMART 在线预测大眼双锯鱼 HSPA1B 保守结构域, 结果(见图 3a)表明, HSPA1B 蛋白在 1~552 aa 处有一个 HSP70 结构域。利用 EMBL-EBI 数据库的 InterProScan 功能对蛋白质结构域进行进一步预测(见图 3b)。

发现其包含有两个典型的 HSP70 蛋白家族标志性序列, 均位于序列中心部分, 两个保守基序分别为¹³IFDLGGGTFDVSIL⁵⁰和²⁷⁴JVLVGGSTRIPKIQK²⁸⁸, 在 HSPA1B 氨基酸的 2~137 aa 和 150~274 aa 处存在一个不连续的结构域, 具有消耗 ATP 的能力; 在 326~483 aa 和 478~555 aa 处, 分别具有一个多肽结合

结构域和 C-末端结构域, 这 3 个结构域是 HSP70s 家族保守结构域。

从 NCBI 上下载已公布的 HSPA1B 氨基酸序列, 然后使用 MEGA12 软件将大眼双锯鱼 HSPA1B 氨基酸序列与下载的 HSPA1B 氨基酸序列进行多重序列比对, 并采用邻近法(neighbor-joining, N-J)构建系统发育树。从 HSPA1B 蛋白构建的系统发育树(见图 4)可以看出, 辐鳍鱼类聚集成一进化支系, 而哺乳类和两栖类聚集成另一进化支系。多重序列比对结果(见图 5)显示, 大眼双锯鱼 HSPA1B 蛋白与眼斑双锯鱼相似度最高为 99.13%。

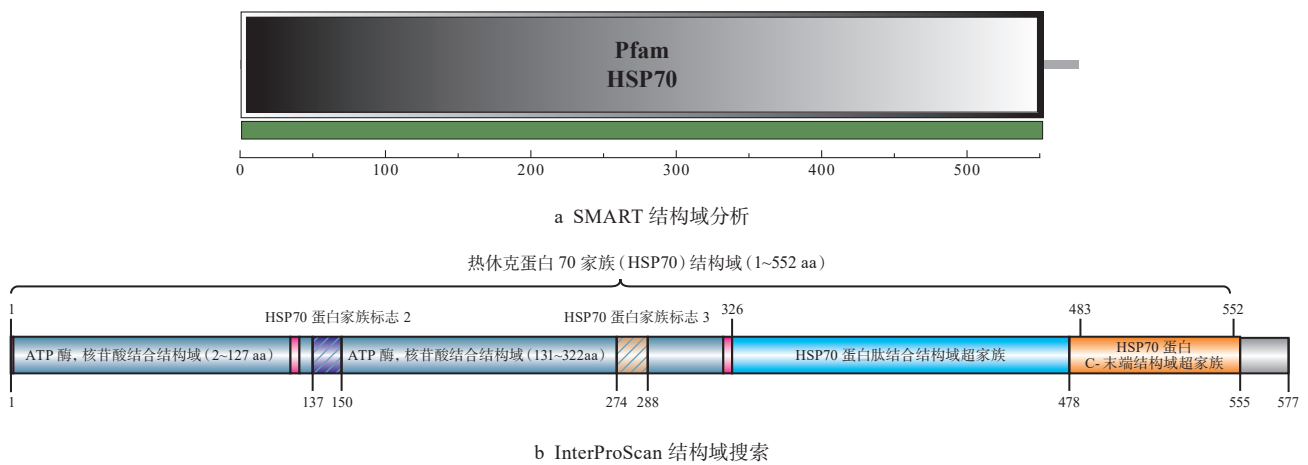


图 3 大眼双锯鱼 HSPA1B 蛋白结构域 SMART 与 InterProScan 预测
Fig. 3 Structure domain SMART of HSPA1B protein in *A. ephippium* and prediction by InterProScan

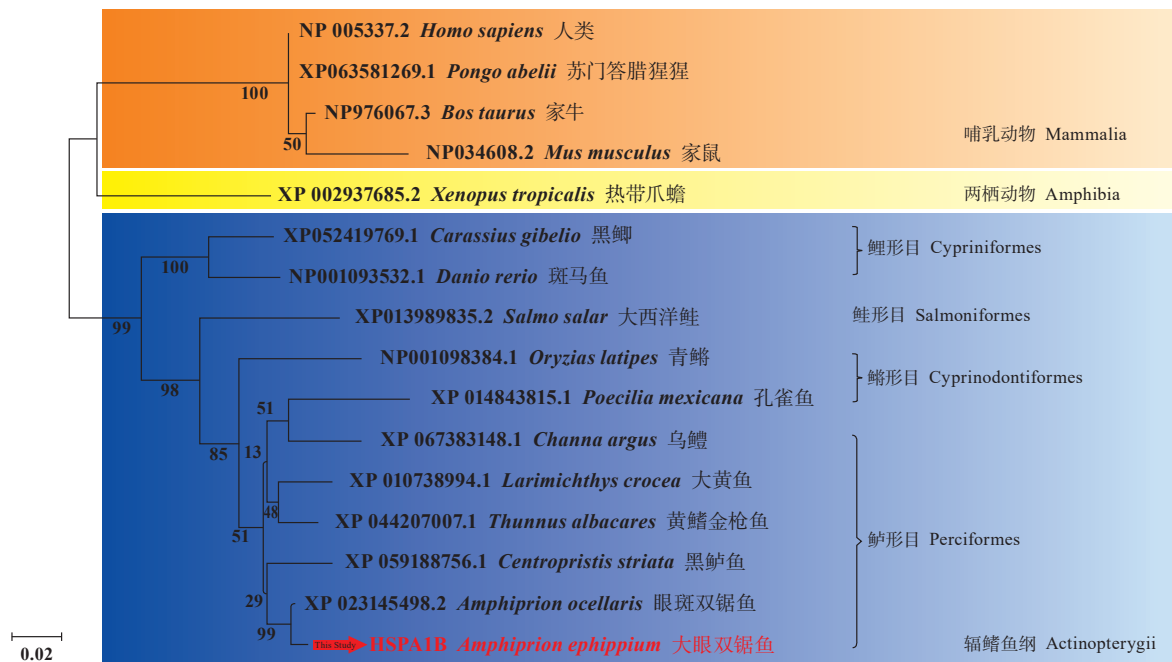


图 4 HSPA1B 蛋白系统发育树
Fig. 4 HSPA1B protein phylogenetic tree

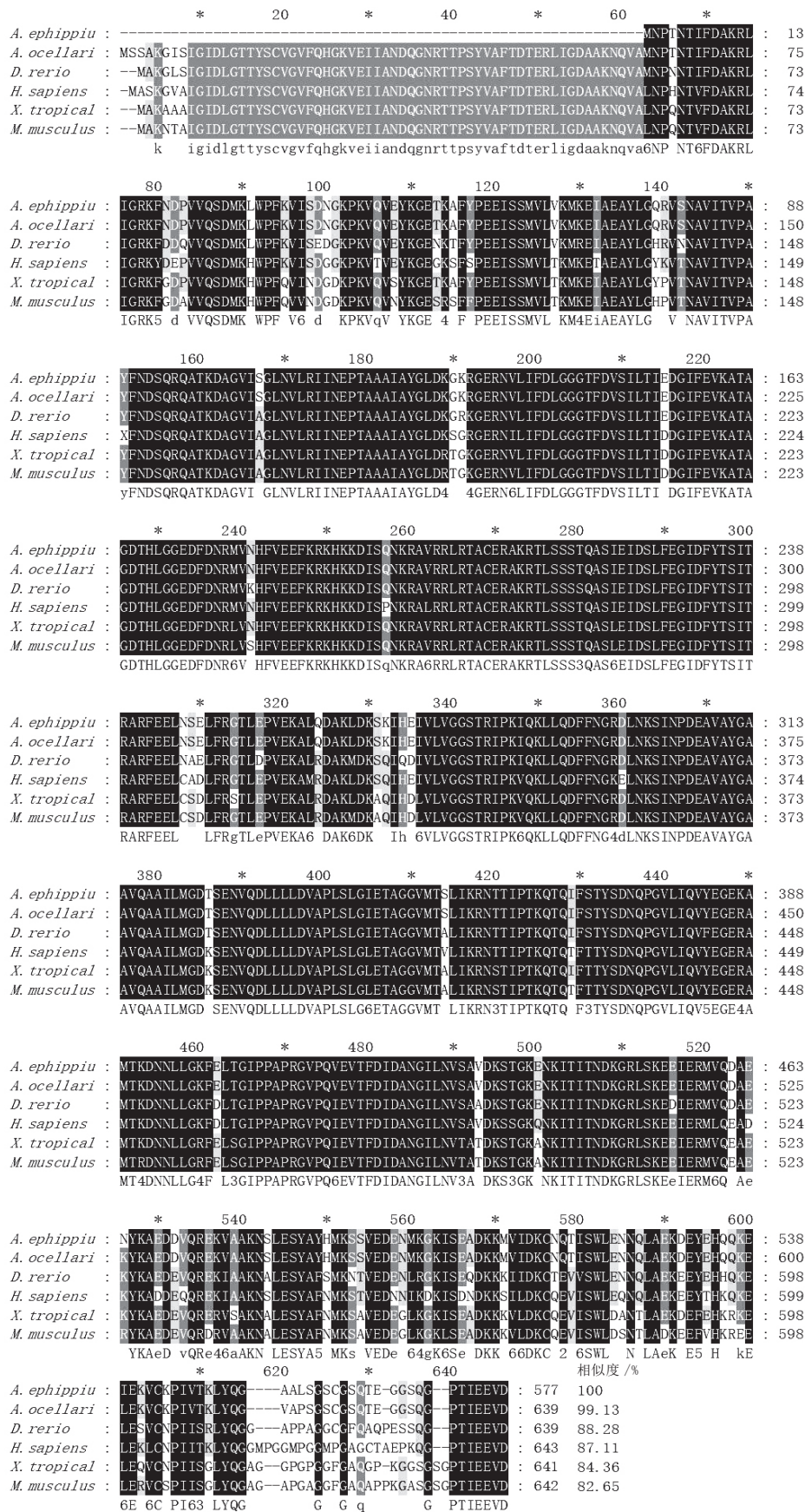


图5 大眼双锯鱼 HSPA1B 与其他物种 HSPA1B 氨基酸序列多重序列比对

Fig. 5 Multiple sequence alignment of *A. ehippium* HSPA1B amino acid sequence with other species HSPA1B amino acid equence

利用在线工具 STRING 预测并构建大眼双锯鱼 HSPA1B 蛋白互作网络, 如图 6 所示。互作蛋白互作相关评分高于 0.8, 置信度高于 0.7。结果显示, HSPA1B 与 DNAJA1, DNAJA2, DNAJA2B,

DNAJA4, DNAJB1A, DNAJB1B, GAK, CLPB 和 STIP1 具有互作关系。推测其可能在蛋白折叠, 内质网降解与应激中扮演重要角色。

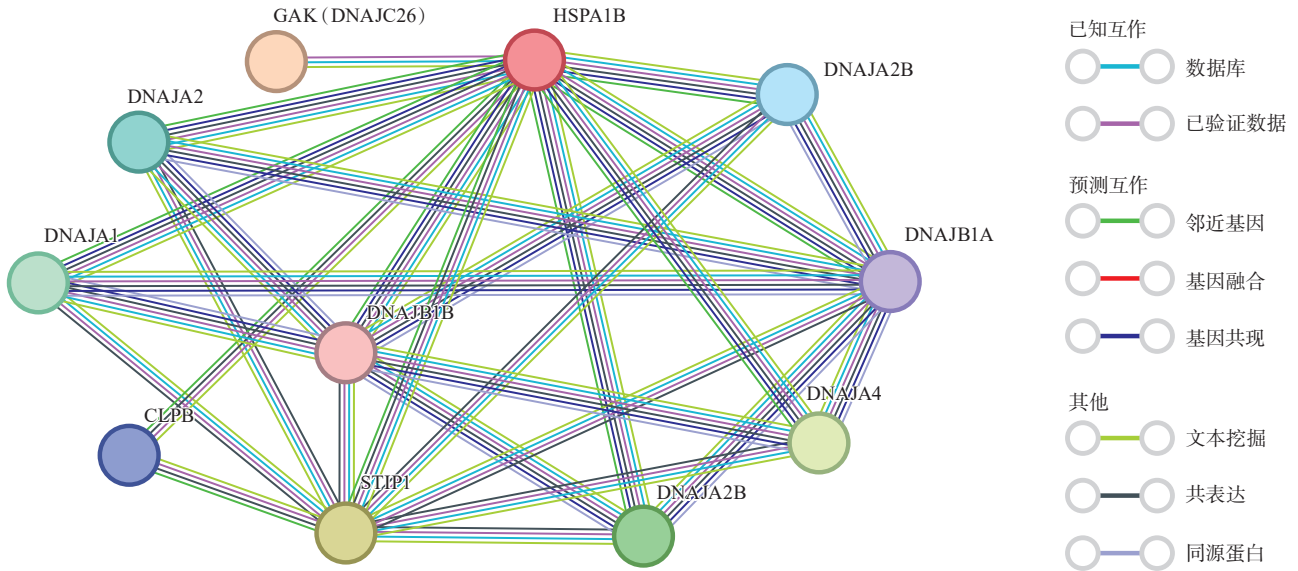
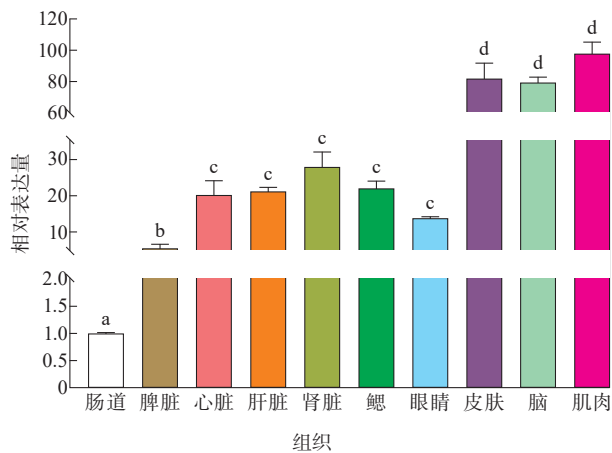


图 6 HSPA1B 蛋白质互作预测
Fig. 6 HSPA1B protein interaction prediction

2.2 HSPA1B 基因在大眼双锯鱼不同组织中的表达分析

利用实时荧光定量 PCR 技术对 HSPA1B 基因进行组织特异性表达分析, 如图 7 所示。结果表明, HSPA1B 基因在检测的 10 个组织中均有表达。其中, HSPA1B 基因在肌肉中的相对表达量最高, 为 98.18, 其次是脑和皮肤, 而在眼睛、鳃、肾脏等组织中相对表达量较低, 在肠道中相对表达量最低。



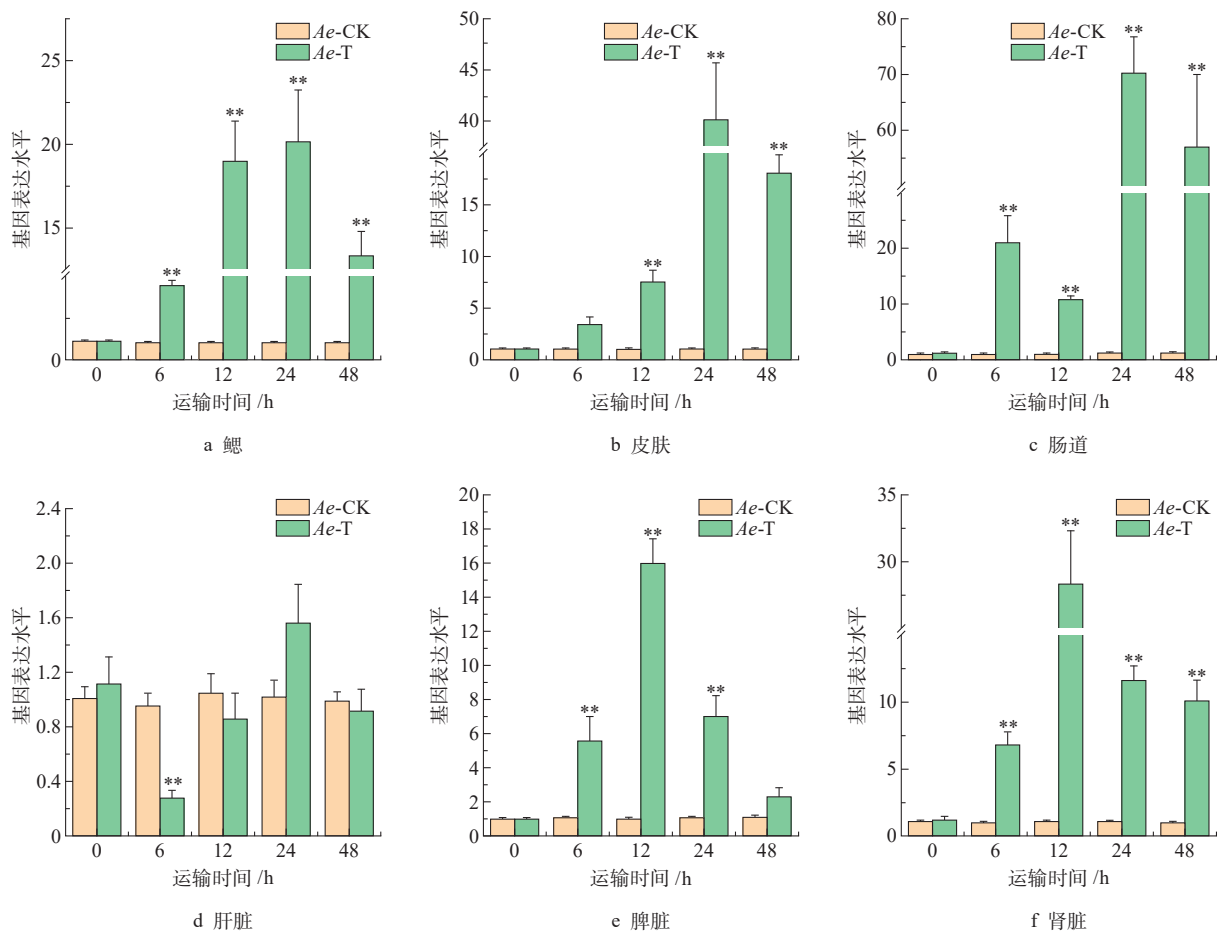
注: 不同小写字母表示组织间差异显著 ($P < 0.05$), 相同小写字母表示组织间差异不显著 ($P > 0.05$)。

图 7 大眼双锯鱼 HSPA1B 基因组织分布结果
Fig. 7 Tissue distribution of HSPA1B gene in *A. ephippium*

2.3 在运输胁迫下大眼双锯鱼 HSPA1B 基因表达差异

如图 8 所示, 大眼双锯鱼 (*A. ephippium*) HSPA1B 基因的相对表达量在运输胁迫期间的趋势为先上调后下调; 在运输 6 h, 相对表达量迅速上调并呈现极显著差异 ($P < 0.01$), 随后继续密闭运输 24 h 时相对表达量达到峰值; 同时大眼双锯鱼皮肤和肠道中 HSPA1B 基因相对表达量的变化较为缓慢。在 24 h 才达到最高峰, 但变化最为显著 ($P < 0.01$), 分别为 *Ae-CK* 的 40 倍和 70 倍, 达峰后相对表达量下降, 仍极显著高于 *Ae-CK* ($P < 0.01$)。

肾脏和脾脏 HSPA1B 基因的相对表达量均在运输 6 h 即表现出极显著上调 ($P < 0.01$), 在 12 h 达到最高峰后下降, 其中肾脏在 24 h 和 48 h 时仍维持稳定显著高表达 ($P < 0.01$); 脾脏在运输 24 h 和 48 h 持续下降, 在 48 h 时下降至接近 *Ae-CK*; 肝脏组织与其他组织表达水平变化相反, 在 6 h 时出现极显著下调 ($P < 0.01$) 后恢复对照组水平。可见, 除肝脏外, 鳃、肾脏、脾脏、皮肤和肠道 HSPA1B 基因的相对表达量均在运输中期 (12 h 或 24 h) 就表现出了极显著上调 ($P < 0.01$), 这种上调在 12 h 或 24 h 达到最高峰。



注: * 表示与 *Ae-CK* 相比差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示与 *Ae-CK* 相比差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 8 大眼双锯鱼不同组织中 *HSPA1B* 基因相对表达水平变化

Fig. 8 Changes in the relative expression levels of *HSPA1B* gene in different tissues of *A. ephippium*

3 讨论

自热休克蛋白从果蝇中发现以来,国内外学者对脊椎动物 *HSP70* 基因结构、蛋白功能、遗传进化以及表达模式开展了深入的研究,而且迄今为止已有多种鱼类的 *HSP70* 基因的表达被广泛研究,但大多集中在可食用鱼类应激研究方向,观赏鱼中的研究相对较少^[18]。*HSP70* 家族作为热休克蛋白中高度保守的分子伴侣蛋白,主要是协助蛋白正确折叠、组装、转运和降解,尤其是在细胞受到外界胁迫(如高温、缺氧、毒素等)时,防止蛋白质错误折叠和聚集,从而维持细胞的蛋白稳定。*HSP70* 家族蛋白具有 3 个高度保守的结构域,分别为 ATP 结合域、肽结合域与 C-末端结构域。本研究所克隆的大眼双锯鱼序列具有以上 3 个保守结构域,推测其属于热休克 70 蛋白(*HSP70*) 家族成员^[19]。通过对眼斑双锯

鱼 *HSPA1B* 核酸和氨基酸序列进行比对分析后,发现其与同属的眼斑双锯鱼的 ORF 相比少了 30 个碱基,但是其相似度高达 98.2%。而在其翻译成蛋白序列后,在其 C 端又有 5 个氨基酸的区别,但其分子质量大小依然为 70×10^3 u,与 *HSP70s* 家族蛋白大小相似,最终确认本研究克隆的基因为 *HSPA1B* 基因。*HSPA1B* 蛋白的系统进化性分析发现,较近亲缘关系的物种聚类在同一分支内部;大眼双锯鱼和眼斑双锯鱼的距离最近,辐鳍鱼类聚集成一进化支系,而哺乳类和两栖类聚集成另一进化支系,表现出了显著的进化差异。序列分析结果表明,眼斑双锯鱼 *HSPA1B* 蛋白具有 *HSP70s* 家族蛋白的典型特征,并且与近缘物种眼斑双锯鱼 (*A. ocellaris*) 的 *HSPA1B* 具有极高的相似性 (99.13%),这从分子水平上佐证了二者密切的亲缘关系,也说明该基因在进化上高度保守,暗示其可能承担着不可或缺的生

理功能。

在观赏鱼售卖过程中, 运输是一个必不可少的环节, 但往往造成鱼类生存环境的急剧变化, 从而诱发强烈的应激反应^[20]。与正常生理状态相比, 应激状态下鱼体内分泌活动与能量代谢等生理生化过程发生显著改变, 严重影响鱼类健康。在面对运输胁迫时, 鱼群会启动一套高度保守的应激响应程序, 其核心通路与应对其他压力时类似。其中热休克蛋白(HSPs)上调, 被认为是最经典的标志性反应。研究发现, 在鱼类受到外界压力胁迫的状态下, HSP70 和 HSP90 等分子伴侣的表达会急剧增加, 以保护细胞内的蛋白质免受变性或错误聚集, 维持细胞功能^[21]。其中 *HSP70* 基因的表达水平常被用作评估运输胁迫严重程度的分子标志物之一^[22]。本研究发现, 大眼双锯鱼在运输胁迫下 *HSPA1B* 基因表现出了独特的表达模式。除肝脏外, 鳃、肾脏、脾脏、皮肤和肠道 *HSPA1B* 基因的相对表达量均在运输中期(12 h, 24 h)就表现出极显著上调, 上调水平最高可达 70 倍。结果表明, 在应激状态下, *HSPA1B* 基因可能通过早期快速响应和中后期稳定高表达, 维持鱼体在持续应激状态下的生理稳态。*HSPA1B* 基因在应激早期具有快速响应的特点^[23]。作为细胞核-胞质型的 HSP70s 蛋白成员, *HSPA1B* 蛋白具有特别的表达和功能模式。在正常情况下, *HSPA1B* 蛋白维持相对较低的表达水平, 少量存在于胞质中, 当细胞受到外界刺激时, *HSPA1B* 蛋白迅速大量表达并转运入细胞核, 具有明显的诱导型 HSP70s 蛋白的特征^[24]。*HSPA1B* 可在核内发挥稳定核糖体及其他核内蛋白的正常组装, 调节转录的功能, 以在应激状态下维持细胞正常的生理功能^[25]。作为鱼类应对外界环境变化的重要器官系统, 鳃组织直接接触水体环境变化; 皮肤作为机体与外界环境的第一道物理屏障, 直接承受各种环境压力, 承担物理屏障与渗透调节双重功能; 肌肉组织作为运动器官, 维持较高基础代谢水平, 需要高水平的 HSP70 来维持蛋白质稳态; 而脑组织作为神经中枢, 对代谢异常和应激刺激具有高度敏感性。*HSPA1B* 基因在鳃、皮肤、肌肉及脑组织中均呈现较高丰度表达的特征, 与其持续应对环境波动(如温度、溶氧、氨氮等)的生理需求密切相关。上述结果表明, *HSPA1B* 基因的高丰度表达可能是通过维持细胞蛋白质稳态, 增强了组织对物理或化学刺激的耐受性。在四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum*)的研究中也同样观

察到了在鳃、肌肉和全脑中高丰度表达, 且在受到运输胁迫后快速表达上调的现象^[26]。

4 结论

本研究成功克隆了大眼双锯鱼(*A. ephippium*) *HSPA1B* 基因, 其编码的蛋白序列具有 3 个 HSP70 蛋白家族的特征序列, 确定为 HSP70s 蛋白成员。*HSPA1B* 的序列特征及其在运输胁迫下的表达分析结果表明, 大眼双锯鱼的 *HSPA1B* 开放阅读框长度 1 734 bp, 编码 577 个氨基酸残基, 分子质量为 63.94×10^3 u, 等电点为 5.42。该蛋白不含信号肽, 为非跨膜蛋白, 并有 3 个 HSP70s 蛋白典型结构域。*HSPA1B* 作为一种诱导型的 HSP70s 蛋白成员, 具有快速响应、瞬时高表达的特点; 尤其在长距离运输胁迫下, *HSPA1B* 参与大眼双锯鱼抑制程序性细胞死亡的相关应答反应, 增加细胞在应激下的存活率, 可作为反映鱼类是否处于应激性损伤状态的检测指标之一。

参考文献:

- [1] HAGYMASI A T, DEMPSEY J P, SRIVASTAVA P K. Heat-shock proteins [J]. Current Protocols, 2022, 2 (11): e592.
- [2] TUTAR L, TUTAR Y. Heat shock proteins: an overview [J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2010, 11 (2): 216-222.
- [3] ZININGA T, RAMATSUI L, SHONHAI A. Heat shock proteins as immunomodulators [J]. Molecules, 2018, 23 (11): 2846.
- [4] 李庆伟, 徐静, 李瑶. 热休克蛋白进化及生物学功能研究进展 [J]. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 2024, 47 (1): 78-85.
- [5] 马鸣遥, 刘玉芬. 热休克蛋白与动物应激性反应的相关性研究进展 [J]. 畜牧兽医科技信息, 2024 (3): 18-20.
- [6] LI Yang, SHAN Chen, YANG Bo, et al. Up-regulation of HSPA1A and HSPA1B in the blood of tophi patients and its clinical significance [J]. Acta Biochimica Polonica, 2022, 69 (4): 781-785.
- [7] SHEN Na, XIA Yuan, SHEN Xuxing, et al. HSPA9 contributes to tumor progression and ferroptosis resistance by enhancing USP14-driven SLC7A11 deubiquitination in multiple myeloma [J]. Cell Reports, 2025, 44 (5): 115720.

- [8] GUAN Yufeng, ZHU Xianjun, LIANG Junjie, et al. Upregulation of HSPA1A/HSPA1B/HSPA7 and downregulation of HSPA9 were related to poor survival in colon cancer [J]. *Frontiers in Oncology*, 2021, 11: 749673.
- [9] ATAROD S, TURNER B, PEARCE K F, et al. Elevated level of HSPA1L mRNA correlates with graft-versus-host disease [J]. *Transplant Immunology*, 2015, 32 (3): 188-194.
- [10] 韩冰冰, 王辉. 海南省小丑鱼的产业发展及前景探析 [J]. *江西水产科技*, 2021 (3): 43-46.
- [11] 吴绵璇, 罗孝文, 张永战. 近 40 年永兴岛造礁石珊瑚动态变化及其控制因素 [J]. *热带海洋学报*, 2025, 44 (6): 51-63.
- [12] 李涛, 黄小林, 杨育凯, 等. 大眼双锯鱼仔、稚、幼鱼的形态发育与生长 [J]. *南方水产科学*, 2023, 19 (1): 165-172.
- [13] 张亮子, 黄泽南, 尤娟, 等. 鱼类运输应激反应及其对存活率影响研究进展 [J]. *广东海洋大学学报*, 2024, 44 (2): 24-31.
- [14] 朱旻琪, 管维良, 茅林春. 鱼类保活运输技术研究进展 [J]. *食品研究与开发*, 2021, 42 (22): 186-191.
- [15] 高金伟, 杜富宽, 顾若波, 等. 运输应激对刀鲚生理生化指标和 HPI 轴基因表达影响及甘草甜素的作用 [J]. *上海海洋大学学报*, 2015, 24 (6): 817-825.
- [16] 张云龙, 贺亚蒙, 袁娟, 等. 运输过程中水质和鱼类生理指标的变化及运输控制策略 [J]. *水生生物学报*, 2018, 42 (2): 439-450.
- [17] 徐泽华, 顾露露, 谷昭天, 等. 团头鲂巨噬细胞集落刺激因子 1 受体 (MCSF1R) 的表达与进化分析 [J]. *江苏海洋大学学报(自然科学版)*, 2025, 34 (2): 8-17.
- [18] ROSENZWEIG R, NILLEGODA N B, MAYER M P, et al. The Hsp70 chaperone network [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2019, 20 (11): 665-680.
- [19] MANUCHA W. HSP70 family in the renal inflammatory response [J]. *Inflammation & Allergy Drug Targets*, 2014, 13 (4): 235-240.
- [20] FAZIO E, FERLAZZO A. Evaluation of stress during transport [J]. *Veterinary Research Communications*, 2003, 27 (S1): 519-524.
- [21] MORÁN L T, MAYER M P, RÜDIGER S G D. The Hsp70—Hsp90 chaperone cascade in protein folding [J]. *Trends in Cell Biology*, 2019, 29 (2): 164-177.
- [22] 郑文亚, 李国生, 刘犇, 等. 运输应激对山羊小肠形态和热休克蛋白表达的影响 [J]. *中国畜牧杂志*, 2021, 57 (12): 207-212.
- [23] PICARD B, GAGAOUA M. Meta-proteomics for the discovery of protein biomarkers of beef tenderness: an overview of integrated studies [J]. *Food Research International*, 2020, 127: 108739.
- [24] YU Anmin, LI Ping, TANG Ting, et al. Roles of Hsp70s in stress responses of microorganisms, plants, and animals [J]. *BioMed Research International*, 2015, 2015: 510319.
- [25] TUKAJ S. Heat shock protein 70 as a double agent acting inside and outside the cell: insights into autoimmunity [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21: 5298.
- [26] 吴子宜, 赖文杰, 邹振江, 等. 四指马鲛热休克蛋白 70 基因 (HSP70) 表达分析 [J]. *海南热带海洋学院学报*, 2024, 31 (2): 1-10.

(责任编辑: 李琴)