

红螯光壳螯虾 *Hsp70* 基因的特征及其在热应激下的表达

姚成杰^{1,2}, 刘佳珺^{1,2}, 林振炯^{1,2}, 王艺磊^{1,2}

(集美大学水产学院, 福建省水产生物育种与健康养殖工程研究中心, 福建 厦门 361021)

[摘要] 从NCBI数据库中获得红螯光壳螯虾 *CqHsp70* 的 cDNA 全长 2231 bp, 可编码 643 个氨基酸, 其中 4—598aa 为 HSP70 结构域。实时定量 PCR 结果表明, *CqHsp70* 基因在红螯光壳螯虾的鳃、肝胰腺、血液中均有表达。在高温(34 ℃)应激过程中, 红螯光壳螯虾 *CqHsp70* 基因在三个组织中的表达量呈先升高后降低的模式, 在 12 h 时表达量最高, 与对照组存在显著性差异。这一结果说明高温应激后的 12 h 是红螯光壳螯虾调控热应激的关键点, 在夏天高温季节的养殖过程中应特别加以注意。

[关键词] 红螯光壳螯虾; *Hsp70*; 热应激; 基因表达

[中图分类号] Q 786

Characterization of *Hsp70* Gene and Its Expression Under Heat Stress in *Cherax quadricarinatus*

YAO Chengjie^{1,2}, LIU Jiajun^{1,2}, LIN Zhentong^{1,2}, WANG Yilei^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Fujian Engineering Research Center of Aquatic Breeding and Healthy Aquaculture, Xiamen 361021, China)

Abstract: In this study, a 2231 bp full-length cDNA of *CqHsp70* was obtained from NCBI. It encodes 643 amino acids containing an HSP70 domain (4-598aa). Quantitative real-time PCR results showed that *CqHsp70* gene was expressed in the gill, hepatopancreas, and haemocytes. In the stage of high-temperature (34 ℃) stress, the expression level of the *CqHsp70* gene in the three tissues all increased first and then returned to normal, with the highest expression at 12 h. The results showed that 12 hours after high-temperature stress was the key point of regulatory response, and special attention should be paid during the process of red claw crayfish culture in the hot summer.

Keywords: *Cherax quadricarinatus*; *CqHsp70*; heat stress; gene expression

0 引言

红螯光壳螯虾 (*Cherax quadricarinatus*), 原产于澳大利亚, 属于甲壳纲 (Crustacea) 十足目 (Decapoda) 拟河虾科 (Parastacidae), 为我国 20 世纪 90 年代引进的淡水虾类。由于食性广、生长快、肉质细嫩、味道鲜美、营养丰富, 深受养殖户和消费者的喜爱^[1]。已有研究表明, 导致养殖生物免疫抗病能力降低的主要原因是环境因子变化^[2]。其中, 水温作为影响虾蟹等甲壳类动物生存最重要的环境因子之一, 不仅直接影响其代谢、生长、蜕壳和存活等^[3-5], 而且还会影响盐度、溶氧量等环境因子。

[收稿日期] 2020-07-20

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (41676161); 国家级创业计划项目 (201810390035S)

[作者简介] 姚成杰 (1995—), 男, 硕士生, 主要从事甲壳动物功能基因研究。通信作者: 王艺磊 (1963—), 女, 教授, 主要从事甲壳动物功能基因研究。E-mail: ylwang@jmu.edu.cn

热休克蛋白（heat shock protein, HSP）是一类高度保守的细胞蛋白家族^[6]。按分子质量大小可分为 HSP110、HSP90、HSP70、HSP60 及小分子 HSP 和泛素等 6 个家族^[7]。其在环境胁迫因子（高温、重金属和微生物感染等）刺激下表达量显著升高^[8-10]。HSP70 是 HSP 家族蛋白中含量最多的热应激蛋白，该蛋白广泛存在于动植物和微生物中，并扮演着“守卫者”的角色，其功能主要是参与和调控蛋白质的折叠修饰^[11]，在应激等不利条件下，提高细胞的抵抗力，起到应激保护作用。研究表明，HSP70 可通过降解异常蛋白促进蛋白的正确重折叠而在应对热胁迫时发挥重要调节作用^[12-13]。

研究热应激本质及 HSPs 的作用机理，对于动物生产和繁殖有着非常深远的现实意义。近年来，水生动物体在热应激过程中 HSPs 的表达变化相继被报道，例如有西伯利亚鲟（*Acipenser baeri*）^[14]、虹鳟（*Oncorhynchus mykiss*）^[15]、银鲫（*Carassius auratus gibelio*）^[16]。相较于克氏原螯虾（*Procambarus clarkia*）^[17]和锯缘青蟹（*Scylla serrata*）^[18]等水生无脊椎动物，红螯光壳螯虾的相关研究较少。

本实验以红螯光壳螯虾为研究对象，在 NCBI 上获取 *Hsp70*（KR058821.1）基因序列的基础上，分析其结构特征，研究其在高温应激下鳃、肝胰腺和血淋巴中的表达变化，以期研究红螯光壳螯虾热应激过程中的生理机制奠定基础，有助于螯虾养殖者理解热应激的生理变化、评估热应激的不利影响并做好热应激预防。

1 材料与方法

1.1 材料

红螯光壳螯虾取自厦门市纪雄水产有限公司，体长（13.03 ± 0.43）cm，体重（80.69 ± 0.56）g，于本实验室 28 ℃ 的淡水养殖缸中暂养 7 d 后用于实验。

1.2 实验方法

1.2.1 高温应激实验

对照组以红螯光壳螯虾生长温度（26 ~ 30 ℃）的中间温度（28 ℃）进行实验，高温组设定为 34 ℃ 和 36 ℃。观察到红螯光壳螯虾的生长状况为：28 ℃ 下 20 尾虾生长均良好，活力较好；34 ℃ 应激下，20 尾虾在初始一段时间反应大，躲避反应较为频繁，24 h 之后活力有所恢复，48 h 有 30% 的虾死亡；36 ℃ 应激下，20 尾虾在 24 h 内全部死亡。根据数据统计及活力观察，最终确定以 34 ℃ 进行高温应激实验。

将 28 ℃ 下暂养的红螯光壳螯虾分为 2 组，分别设为对照组和实验组。对照组水温为 28 ℃，于 0 h 取样。实验组水温为 34 ℃，于 6 h、12 h、48 h 和 72 h 取样。每个时间点各取 6 尾虾，共 24 尾。每尾虾取其血细胞、鳃和肝胰腺，放入 RNA later 溶液后保存于 -80 ℃ 超低温冰箱中，用于 RNA 的提取。

1.2.2 热休克及免疫相关基因定量引物设计

本实验所用的 *Hsp70* 基因和内参基因 β -actin 定量引物通过 Primer 5.0 软件设计，所有引物依托厦门铂瑞生物科技有限公司合成。各引物及其序列如表 1 所示。

表 1 实时定量 PCR 引物序列
Tab. 1 qRT-PCR primer sequence

基因名称 Gene name	正向引物	反向引物
β -actin	CCTCATGCCATCCTTCGTCT	TCATTCTCGAAGTCAAGGGCA
<i>Hsp70</i>	ACTTCGTACTGCCTGTGAGC	CCATTTTAGCATCACGAAGGGC

1.2.3 总 RNA 的提取及 cDNA 模板制备

用 Eastep™ Super 总 RNA 试剂盒提取红螯光壳螯虾鳃、肝胰腺和血淋巴 3 个组织 5 个时相（对照组 0 h；实验组 6，12，48，72 h）的 RNA，利用紫外分光光度计和 1%（质量分数）琼脂糖凝胶电泳来验证 RNA 的质量及完整性。采用 Promega 公司提供的 M-MLV 酶进行逆转录，制备定量用 cDNA 模板。

1.2.4 目的基因的生物信息学分析

用 Compute pI/Mw tool(http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)预测等电点和分子质量; 用 NetPhos 2.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)查找磷酸化位点; 采用 SignalP 5.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)寻找信号肽; 用 BioEdit 软件(<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)进行序列多重比较; 用 MEGA X 软件(<http://www.megasoftware.net/>)中的邻接法构建系统进化树。

1.2.5 实时定量 PCR 体系及条件

以红螯光壳螯虾的 β -actin 作为内参基因, 以逆转录获得的 cDNA 第一条链为模板。反应体系如下: cDNA 模板 4.5 μ L, SYBR Green Real-time PCR Master Mix 5 μ L, 正/反向定量引物各 0.25 μ L。包括对照组在内的 5 个时相, 每个时相做 6 个样品。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 15s, 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 40 个循环。

数据分析: 根据仪器自动给出样品的 RQ 值 (即 $2^{-\Delta\Delta C_t}$, 其中 ΔC_t = “样品目的基因的 C_t 值” 减 “内参基因 β -actin 的 C_t 值”, $\Delta\Delta C_t$ = “每一个样品的 ΔC_t 值” 减 “基准样品的 ΔC_t 值”), 记录下 RQ 值。用 RQ 的平均值 \pm 标准误 (mean \pm standard error, $M \pm SE$) 表示基因表达水平。

使用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行 t -检验和单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为显著水平, $P < 0.01$ 为极显著水平。

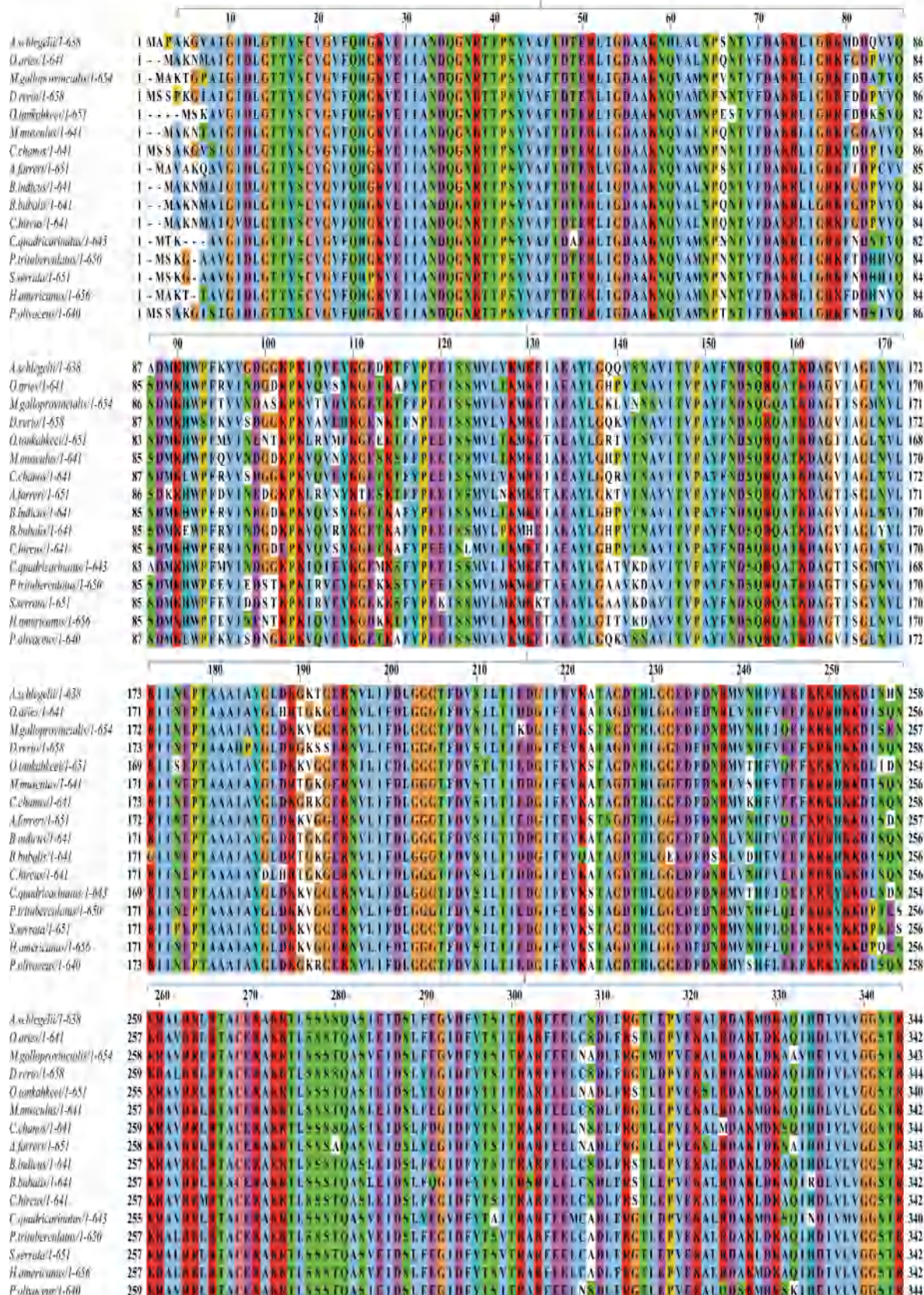
2 结果

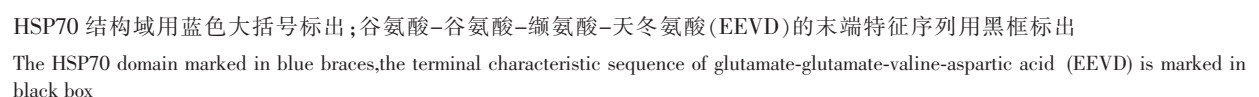
2.1 *CqHsp70* 序列分析

红螯光壳螯虾 *CqHsp70* 基因 Genbank 数据库登录号为 KR058821.1。其核苷酸序列及推导的氨基酸序列见图 1。*CqHsp70* 的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 1932 bp, 编码氨基酸 643 个。使用 Compute pI/Mw tool 预测得到理论等电点为 5.27, 分子质量为 70.3 ku, 5' UTR 37 bp, 3' UTR 549 bp。该序列预测含有 32 个丝氨酸 (Ser) 磷酸化位点, 39 个苏氨酸 (Thr) 磷酸化位点和 12 个酪氨酸 (Tyr) 磷酸化位点。此外, 4—598aa 为 HSP70 结构域, 序列中并没有发现信号肽。

```
1 TGAGAGGGCGAGAAGGCGCCATTCCCGCTCAGTCTTGACACCGACGACGCCAGACTC 60
61 GTCCTCTGCACTTTTAATACCGCTATTACTCTCTAAAACAGTAGTGatgacgaaagca 120
1 M T K A 4
121 gtaggcacgatcttggcaccacettctcatgtgtaggtgttttcagcatgggaaggta 180
5 V G I D L G  $\Delta$  $\Delta$ F  $\Delta$ (S) C V G V F Q H G K V 24
181 gagatcattgcaaatgaccagggtaacagaactacaccatcttatgtagctttcacagat 240
25 E I I A N D Q G N R  $\Delta$  $\Delta$ P (S)(Y) V A F  $\Delta$ D 44
241 gcagagagacttattggtgatgctgcaaaaaccaggtggcaatgaatccaacaataca 300
45 A E R L I G D A A K N Q V A M N P N N  $\Delta$  64
301 gtttttgatgccaaaagggtgataggaagaaaattcaatgattctactgttcaggctgac 360
65 V F D A K R L I G R K F N D (S) $\Delta$  V Q A D 84
361 atgaagcactggcctttcatggttaattaatgatggigggaacccaaaattcagattgaa 420
85 M K H W P F M V I N D G G K P K I Q I E 104
421 tacaaaggagagatgaatccttctatccagaggaaatttcattccattggtttctataaag 480
105 (Y) K G E M K (S) F (Y) P E E I (S)(S) M V L I K 124
481 atgaaagagactgcagaagcttaccttggggccactgtaaaggatgcagttataactgtt 540
125 M K E  $\Delta$ A E A (Y) L G A  $\Delta$ V K D A V I  $\Delta$ V 144
541 cctgcatacttcaacgattcacagcggaagcaaccaagatgccgaaccatctccggt 600
145 P A (Y) F N D (S) Q R Q A  $\Delta$ K D A G  $\Delta$ I (S) G 164
601 atgaatgtgcttcgtattatcaatgagcctaccgctgctgtattgcgtatggtcttgac 660
165 M N V L R I I N E P T A A A I A (Y) G L D 184
661 aaaaaagtggtggagaacgtaagtgttttaattcttgacccttggtggagggtacattgat 720
185 K K V G G E R N V L I F D L G G G  $\Delta$ F D 204
721 gtttcaatcttgacaatagaagatggcatttttgaagtaaaatctactgcaggagatacc 780
205 V (S) I L  $\Delta$ I E D G I F E V K (S) $\Delta$ A G D  $\Delta$  224
781 catcttggaggagaagactttgacaaccgtaigtgttactcatttcattcaagattcaaa 840
```


多重比对发现 HSP70 在不同物种中保守性高（见图 2）。比对中所用的物种和氨基酸序列信息见表 2。





<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

2.3 HSP70 的系统进化树构建

从 NCBI 数据库中获取了 16 个不同物种的 HSP70 氨基酸序列 (见表 2)。使用 MEGA X 软件分析 HSP70 的进化树。根据构建后得到的 HSP70 进化树可见: HSP70 主要分为脊椎动物和无脊椎动物两支, 脊椎动物分支中包含哺乳动物和鱼类, 无脊椎动物分支中包括虾蟹类和贝类等。红螯光壳螯虾 HSP70 与美洲螯龙虾 (*Homarus americanus*)、锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 及三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 等虾蟹类的 HSP70 聚为一支, 其与美洲螯龙虾一致性最高, 达到 99%。

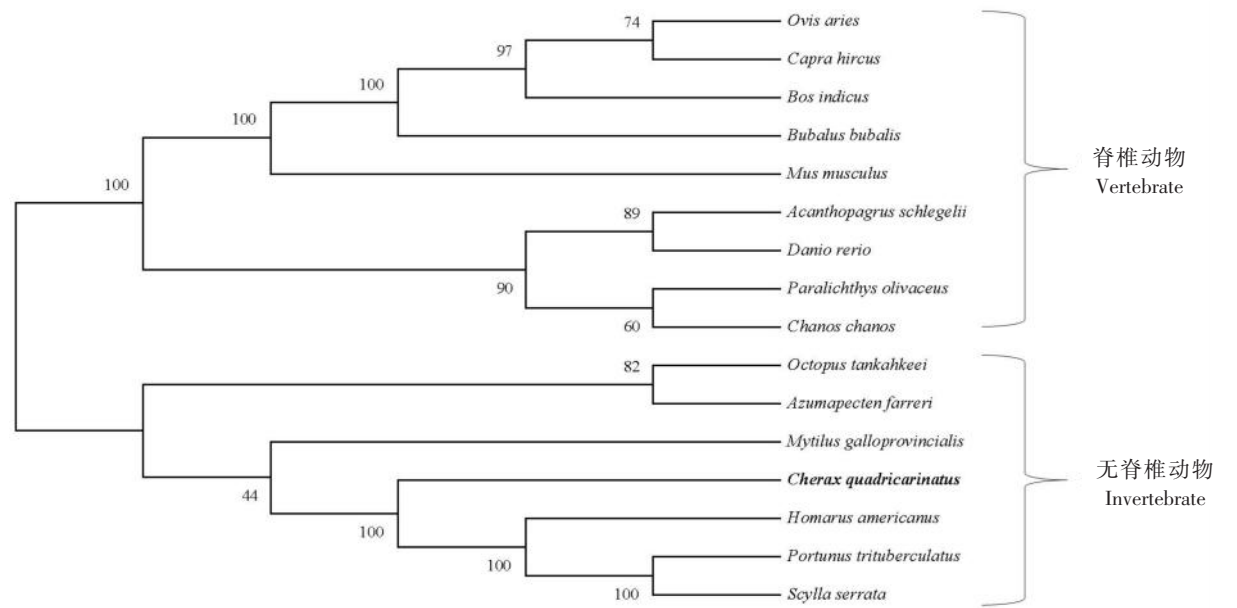


图 3 *CqHSP70* 和其他物种 HSP70 氨基酸序列系统进化树
Fig.3 Phylogenetic tree of the *CqHSP70* compared with HSP70 from other species

表 2 HSP70 的物种名称和 GenBank 登录号
Tab.2 Species and GenBank accession numbers of HSP70

物种名称 Species name	基因登录号 GenBank accession nmuber	物种名称 Species name	基因登录号 GenBank accession nmuber
绵羊 (<i>Ovis aries</i>)	AEX55801.1	褐牙鲆 (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	BAA31697.1
山羊 (<i>Capra hircus</i>)	AEX55800.1	嘉庚鞘 (<i>Octopus tankahkeei</i>)	AJP60218.1
水牛 (<i>Bubalus bubalis</i>)	ABU87908.1	栉孔扇贝 (<i>Azumapecten farreri</i>)	ABE77386.1
瘤牛 (<i>Bos indicus</i>)	QGW08891.1	紫贻贝 (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	AAW52766.1
黑棘鲷 (<i>Acanthopagrus schlegelii</i>)	AAX07834.1	红螯光壳螯虾 (<i>Cherax quadricarinatus</i>)	QIB00649.1
小鼠 (<i>Mus musculus</i>)	AAC84169.1	美洲螯龙虾 (<i>Homarus americanus</i>)	ABA02165.1
斑马鱼 (<i>Danio rerio</i>)	AAF70445.1	锯缘青蟹 (<i>Scylla serrata</i>)	AFI61333.1
遮目鱼 (<i>Chanos chanos</i>)	AQY77553.1	三疣梭子蟹 (<i>Portunus trituberculatus</i>)	ACL37319.1

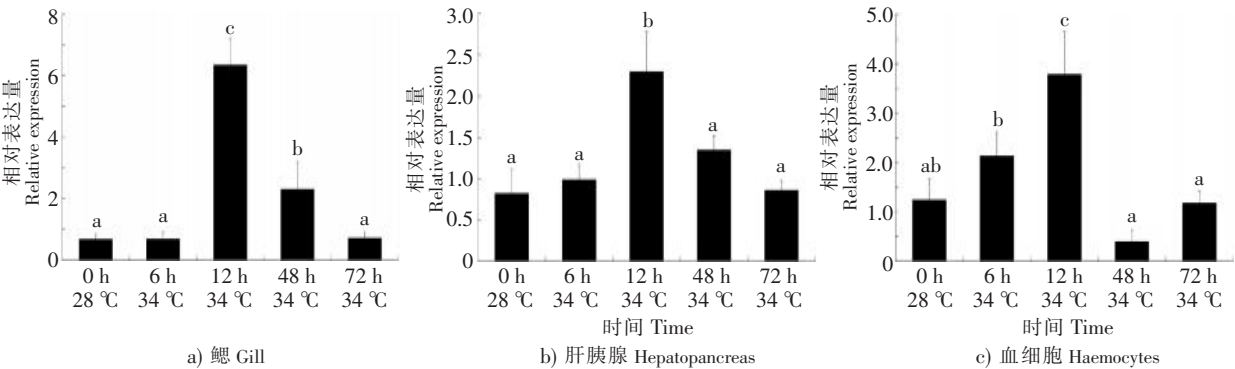
2.4 *CqHsp70* 在热应激下的表达

采用实时荧光定量 PCR 方法, 对红螯光壳螯虾在 34 ℃ 高温应激下的鳃、肝胰腺和血细胞中的 *CqHsp70* 基因表达量进行分析。结果表明: 红螯光壳螯虾鳃中 *CqHsp70* 基因表达量在 6 h 时最低, 与对照组差异不显著; 12 h 时该基因表达量最高, 与对照组形成极显著差异 ($P < 0.01$); 之后回落至正常水平 (见图 4a)。

在 34 ℃ 高温应激下, 红螯光壳螯虾肝胰腺中 *CqHsp70* 基因表达量变化趋势与鳃相同。6 h 时, 该基因的表达量与对照组差异不显著; 12 h 时该基因表达量最高, 与对照组形成显著差异 ($P <$

0.05)；48 h 时已回复正常表达水平（见图 4b）。

在 34 ℃ 高温应激下，红螯光壳螯虾血细胞中 *CqHsp70* 基因表达量在 6 h 时已开始上升，但与对照组没有显著性差异；12 h 时该基因表达量最高，与对照组形成极显著差异；48 h 之后表达量与对照组差异不显著，已恢复至正常水平（见图 4c）。



相同字母表示差异不显著($P>0.05$),相邻字母表示差异显著($P<0.05$),相隔字母表示差异极显著($P<0.01$), $n=6$
The same letter indicates no significant differences ($P>0.05$), adjacent letters indicate significant differences ($P<0.05$), separated letters indicate a significant difference ($P<0.01$), $n=6$

图 4 热应激之后红螯光壳螯虾鳃、肝胰腺、血细胞中 *CqHsp70* 基因的相对表达量
Fig.4 Relative expression level of *CqHsp70* in gill, hepatopancreas, haemocytes after heat stress

3 讨论

3.1 *CqHsp70* 基因的结构特征

HSP70 家族在进化上是高度保守的，是目前研究最深入的 HSP 之一，适量 HSP70 的存在对维持动物正常生长发育是必需的，在提高细胞对应激的耐受性及维护细胞自稳等方面具有重要的生物学作用^[19]。红螯光壳螯虾 *CqHsp70* 的 cDNA 全长 2231 bp，5' UTR 37 bp，3' UTR 549 bp，可编码 643 个氨基酸，4—598aa 为 HSP70 结构域。*CqHsp70* 预测含有 83 个磷酸化位点，序列含有 39 个丝氨酸 (Ser) 磷酸化位点，32 个苏氨酸 (Thr) 磷酸化位点和 12 个酪氨酸 (Tyr) 磷酸化位点。在序列中没有发现信号肽，与拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 的 HSP70 分析结果一致^[20]。HSP70 结构域可再分为三个结构域，N 端两个结构域 (ATP 酶结构域和底物结合结构域) 和 C 端结构域，且具有谷氨酸—谷氨酸—缬氨酸—天冬氨酸 (EEVD) 的末端特征序列^[21]。多重序列比较结果显示，红螯光壳螯虾 HSP70 与其他物种蛋白序列在 N 端 ATP 酶结构域和底物肽结合结构域相似性很高，在 C 端结构域保守性有所降低，这符合 HSP70 的保守性和结构特征^[22]。

HSP70 在动物中广泛存在。进化树分析结果表明，HSP70 分为两大支，一大支由脊椎动物组成，一大支由无脊椎动物组成，与其进化地位较一致。红螯光壳螯虾的 *CqHSP70* 与虾蟹类的 HSP70 聚为一支，且相似度较高，并与美洲螯龙虾的 HSP70 相似性最高，这表明 HSP70 蛋白在甲壳动物中高度保守。

3.2 *CqHsp70* 基因的表达

热应激是指当环境温度超过动物舒适温度 (产热最低点与蒸发散热急剧增加起始点之间的温度) 时，动物体为保护其正常的代谢作用和各种生理机制所必须做出的各种反应的总和^[6]。生物体在正常生理条件下有少量的热休克蛋白存在且表达量低，其表达量在受到热应激后会被强烈诱导^[23]。

作为一种重要的内源性细胞保护因子，HSP70 具有修复应激给机体带来损害的功能^[24]。在大多数的器官中，应激诱导的 HSP70 是热休克蛋白中重要成员之一，当受到热应激诱导之后其表达量会增加^[25]。对大西洋无眼裂缝虾 (*Rimicaris exoculata*) 转录组分析结果表明，两个 *Hsp70* 亚型基因表达量在热应激后分别增加 261 倍和 154 倍^[26]。拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 的 *Hsp70* 基因表达量在

热应激后显著提高^[27]。另外,甲壳类动物在热应激后,*Hsp70* 表达量的升高对保护机体起着重要作用。研究表明,短期高温暂养斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 可增加 *Hsp70* 的表达,减少鳃相关病毒的复制^[28]。非致死热休克诱导凡纳滨对虾 (*Penaeus vannamei*) *Hsp70* 的合成,促进其对热、氨和金属的耐受性^[29]。而采用 RNAi 技术敲除 *Hsp70*,会降低方斑卤虫 (*Artemia franciscana*) 幼体对热和细菌感染的耐受性^[30]。

本实验选择鳃、肝胰腺和血液这三个虾蟹重要免疫器官对 *Hsp70* 基因表达量变化进行分析,实时定量 PCR 结果表明, *CqHsp70* 基因在红螯光壳螯虾的鳃、肝胰腺、血细胞中均有表达。尤其是在血细胞中表达水平最高,其次是在肝胰腺中,而在鳃中表达水平最低。这说明红螯光壳螯虾血细胞是 *CqHsp70* 发挥其抗应激作用的重要部位。

高温应激初始阶段 (6 h 内),红螯光壳螯虾血细胞中 *CqHsp70* 基因表达上调,这可能是由于血细胞中的 *CqHsp70* 基因作为重要细胞保护因子较早发挥作用。随着应激时间的延长,血细胞、肝胰腺和鳃中的 *CqHsp70* 基因的表达在 12 h 达到高峰。说明此时 *CqHsp70* 在应激防御中起着不可替代的重要作用,也说明高温应激后的 12 h 是红螯光壳螯虾调控热应激的关键点,在夏天高温季节的养殖过程中应特别加以注意。

[参 考 文 献]

- [1] 顾志敏,许谷星,黄鲜明,等. 红螯螯虾的室内人工育苗 [J]. 水产学报, 2003, 27(1): 32-37.
- [2] LE MOULLAC G, HAFFNER P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea [J]. Aquaculture, 2000, 191(1/2/3): 121-131.
- [3] CHEN J C, LIN M N, TING Y Y, et al. Survival, haemolymph osmolality and tissue water of *Penaeus chinensis* juveniles acclimated to different salinity and temperature levels [J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part A: Physiology, 1995, 110(3): 253-258.
- [4] HENNIG O, ANDREATTA E. Effect of temperature in an intensive nursery system for *Penaeus paulensis* (Pérez Farfante, 1967) [J]. Aquaculture, 1998, 164(1/4): 167-172.
- [5] SAUCEDO P E, OCAMPO L A, MONTEFORTE M, et al. Effect of temperature on oxygen consumption and ammonia excretion in the Calafia mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856) [J]. Aquaculture, 2004, 229(1/2/3/4): 377-387.
- [6] 尚进才,王亚洲,高岩,等. 热休克蛋白的研究进展 [J]. 医学理论与实践, 2010, 23(5): 527-529.
- [7] FEDER M E, HOFMANN G E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology [J]. Annual Review of Physiology, 1999, 61(1): 243-282.
- [8] WELCH W J. How cells respond to stress [J]. Scientific American, 1993, 268(5): 56-64.
- [9] POCKLEY A G. Heat shock proteins as regulators of the immune response [J]. The Lancet, 2003, 362(9382): 469-476.
- [10] SRIVASTAVA P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity [J]. Nature Reviews Immunology, 2002, 2(3): 185-194.
- [11] HEMMINGSEN S M, WOOLFORD C, VAN DER VIES S M, et al. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly [J]. Nature, 1988, 333(6171): 330-334.
- [12] GOŁA ŚE, MAISURADZE G G, SENET P, et al. Simulation of the opening and closing of *Hsp70* chaperones by coarse-grained molecular dynamics [J]. Journal of Chemical Theory and Computation, 2012, 8(5): 1750-1764.
- [13] MAILHOS C, HOWARD M K, LATCHMAN D S. Heat shock proteins *Hsp90* and *Hsp70* protect neuronal cells from thermal stress but not from programmed cell death [J]. Journal of Neurochemistry, 1994, 63(5): 1787-1795.
- [14] 王晓雯,张蓉,朱建亚,等. 急性热应激对西伯利亚鲟肝功指标及肝脏热休克蛋白表达的影响 [J]. 四川农业大学学报, 2019(1): 19.
- [15] 李珍. 热应激过程中虹鳟热休克蛋白基因 *HSP40* 和 *HSP90β* mRNA 表达变化 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.

- [16] 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 [J]. 渔业科学进展, 2018, 39(6): 65-71.
- [17] 徐进, 魏开金, 徐滨, 等. 克氏原螯虾对高温应激的生理学响应 [J]. 淡水渔业, 2017, 47(6): 9-13.
- [18] 袁嘉恩, 许忠能, 韩博平, 等. 锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) Hsp70 基因 cDNA 的克隆及序列分析 [J]. 生态科学, 2008, 27(1): 24-30.
- [19] 周小红, 徐利楠, 薛友林, 等. Hsp70 核苷酸结合域突变体影响酶活的分子动力学模拟研究 [J]. 生物信息学, 2013, 11(4): 250-254.
- [20] 李文杏, 刘元婧, 叶海辉, 等. 拟穴青蟹 HSP70 基因的克隆与组织表达 [J]. 厦门大学学报 (自然科学版), 2011, 50(4): 759-764.
- [21] DUDLEY P, WOOD C K, PRATT J R, et al. Developmental regulation of the plant mitochondrial matrix located HSP70 chaperone and its role in protein import [J]. FEBS Letters, 1997, 417(3): 321-324.
- [22] KIANGA J G, TSOKOSA G C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology [J]. Pharmacology & Therapeutics, 1998, 80(2): 183-201.
- [23] 赵欢. 刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka) 对温度胁迫响应分子机理的基础研究 [D]. 青岛: 中国科学院研究生院 (海洋研究所), 2011.
- [24] RAVAGNAN L, GURBUXANI S, SUSIN S A, et al. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor [J]. Nature Cell Biology, 2001, 3(9): 839-843.
- [25] NELSON R J, ZIEGELHOFFER T, NICOLET C, et al. The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein synthesis [J]. Cell, 1992, 71(1): 97-105.
- [26] COTTIN D, SHILLITO B, CHERTEMPS T, et al. Identification of differentially expressed genes in the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata* exposed to heat stress [J]. Marine Genomics, 2010, 3(2): 71-78.
- [27] YANG Y N, YE H, HUANG H, et al. Expression of Hsp70 in the mud crab, *Scylla paramamosain* in response to bacterial, osmotic, and thermal stress [J]. Cell Stress and Chaperones, 2013, 18(4): 475-482.
- [28] DE LA VEGA E, HALL M R, DEGNAN B M, et al. Short-term hyperthermic treatment of *Penaeus monodon* increases expression of heat shock protein 70 (HSP70) and reduces replication of gill associated virus (GAV) [J]. Aquaculture, 2006, 253(1/4): 82-90.
- [29] SUNG Y Y, RAHMAN N A, SHAZILI N A M, et al. Non-lethal heat shock induces Hsp70 synthesis and promotes tolerance against heat, ammonia and metals in post-larvae of the white leg shrimp *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) [J]. Aquaculture, 2018, 483: 21-26.
- [30] IRYANI M T M, MACRAE T H, PANCHAKSHARI S, et al. Knockdown of heat shock protein 70 (Hsp70) by RNAi reduces the tolerance of *Artemia franciscana* nauplii to heat and bacterial infection [J]. Journal of Experimental Marine Biology & Ecology, 2017, 487: 106-112.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)