

网络出版时间:2018-07-06 13:25

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2019.01.001

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180706.1323.002.html

花斑裸鲤 *GeHSP70* 基因的克隆及其对 重金属 Cu^{2+} 胁迫的应答

栗瑞红¹, 卫福磊¹, 张霞¹, 王玉晴¹,
朱世海¹, 王国杰², 王振吉², 李长忠¹

(1 青海大学 生态环境工程学院, 青海 西宁 810016; 2 青海省渔业环境监测站, 青海 西宁 810012)

[摘要] 【目的】克隆花斑裸鲤 *GeHSP70* 基因, 并进行生物信息学分析; 研究正常和 Cu^{2+} 胁迫条件下 *GeHSP70* 的表达模式。【方法】采用分子生物学技术克隆花斑裸鲤 *GeHSP70* 基因的全长 cDNA, 分析其生物信息学特征。采用 Real-time PCR 技术分析正常和 0.01 mg/L Cu^{2+} 胁迫(胁迫 0, 12, 24, 48 h)条件下 *GeHSP70* mRNA 在花斑裸鲤肝脏、肾脏、脑和鳃 4 个组织中的表达情况, 并采用 ELISA 试剂盒检测肝脏、鳃组织中 *GeHSP70* 蛋白的表达水平。【结果】花斑裸鲤 *GeHSP70* 序列共 1 387 bp, 由 123 bp 的 5'-UTR、592 bp 的 3'-UTR 和 672 bp 的编码区构成, 编码 223 个氨基酸; *GeHSP70* 蛋白是疏水性蛋白, 分子质量为 11.15 ku, 等电点为 5.01, 包含 2 个 HSP70 家族的特征序列: IDLGTTYS(11—18 位氨基酸)和 IFDLGGGTFDVSIL(199—212 位氨基酸)。 *GeHSP70* 基因核苷酸序列与鲫鱼的同源性最高(93%), 在系统进化树中与同科或属中鱼种聚合成一个分支, 显示出高度保守性。Real-time PCR 结果表明, 正常条件下花斑裸鲤 *GeHSP70* 在鳃组织中的表达量最高, 其次是肝脏, 在脑和鳃组织中表达量较低; 随着 0.01 mg/L Cu^{2+} 胁迫时间的延长, 花斑裸鲤肝脏、肾脏和鳃组织的 *GeHSP70* mRNA 表达量先升后降, 在 24 h 表达量最高, 而脑组织的表达量持续升高; *GeHSP70* 在花斑裸鲤肝脏和鳃组织的蛋白水平表达量总体均表现为先升后降, 表明 Cu^{2+} 能够诱导 *GeHSP70* 的表达。【结论】成功克隆了花斑裸鲤 *GeHSP70* cDNA 全长, 在 0.01 mg/L Cu^{2+} 胁迫下花斑裸鲤 *GeHSP70* 在 mRNA 水平和蛋白水平呈规律性应答, 表明 *GeHSP70* 是潜在的反映水环境质量的生物标志物。

[关键词] 花斑裸鲤; 热应激蛋白 70; Real-time PCR; 重金属胁迫

[中图分类号] Q785

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2019)01-0001-10

Cloning of *GeHSP70* gene of *Gymnocypris eckloni* and its response to Cu^{2+} stress

LI Ruihong¹, WEI Fulei¹, ZHANG Xia¹, WANG Yuqing¹, ZHU Shihai¹,
WANG Guojie², WANG Zhenji², LI Changzhong¹

(1 College of Eco-Environmental Engineering, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016, China;

2 Qinghai Fisheries Environment Monitoring Station, Xining, Qinghai 810012, China)

Abstract: 【Objective】This study cloned *Gymnocypris eckloni* *GeHSP70* gene and analyzed its bioinformatics and expression pattern under normal condition and Cu^{2+} stress. 【Method】The full-length cDNA of *Gymnocypris eckloni* *GeHSP70* gene was cloned by molecular biology technology, and its bioinformatics characteristics were analyzed. The *GeHSP70* mRNA expressions in liver, kidney, brain and gill under normal and 0.01 mg/L Cu^{2+} stress (0, 12, 24 and 48 h) were analyzed by Real-time PCR technology. The

[收稿日期] 2017-10-16

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31460700)

[作者简介] 栗瑞红(1993—), 女, 河南许昌人, 在读硕士, 主要从事高原动物资源保护与利用研究。E-mail: 1016179449@qq.com

[通信作者] 李长忠(1966—), 男, 青海湟中人, 教授, 硕士生导师, 主要从事高原动物资源保护与利用研究。

E-mail: lichangzhong@qhu.edu.cn

ELISA kit was used to determine the protein level of GeHSP70 in liver and gill.【Result】*Gymnocypris eckloni* GeHSP70 sequence is 1 387 bp in length with 123 bp 5'-UTR, 592 bp 3'-UTR and 672 bp encoding region, encoding 223 amino acids. GeHSP70 is a hydrophobic protein with molecular weight of 11.15 ku and an isoelectric point of 5.01. It includes 2 HSP70 family feature sequences of IDLGTTYS (11—18 amino acid) and IFDLGGGTFDVSIL (199—212 amino acid). The nucleotide sequence of GeHSP70 gene has the highest homology with *Carassius auratus* (93%). Real-time PCR showed that the expression of *Gymnocypris eckloni* GeHSP70 gill tissue under normal conditions is the highest, followed by liver, brain and gill tissues. With the extension of 0.01 mg/L Cu^{2+} exposure, GeHSP70 mRNA expressions of *Gymnocypris eckloni* in liver, kidney and gill tissues firstly increased then decreased with the peak at 24 h, while the expression in brain tissue increased all the time. The protein levels in *Gymnocypris eckloni* liver and gill tissues first increased and then decreased, indicating that Cu^{2+} induced the expression of GeHSP70.【Conclusion】 This study successfully cloned the full-length *Gymnocypris eckloni* cDNA of GeHSP70, and GeHSP70 showed regular response at mRNA and protein levels to 0.01 mg/L Cu^{2+} exposure, indicating that GeHSP70 is a potential biomarker to reflect the quality of water environment.

Key words: *Gymnocypris eckloni*; heat shock protein 70; Real-time PCR; heavy metal stress

花斑裸鲤(*Gymnocypris eckloni*)又称大嘴鱼,属鲤科(Cyprinidae)裂腹鱼亚科(Schizothoracinae)裸鲤属(*Gymnocypris*),主要分布于青海省玛多县内黄河段和札陵、鄂陵等淡水湖泊及柴达木盆地的奈齐河水系,是我国黄河上游特有的土著鱼类,也是黄河上游重要经济鱼类。花斑裸鲤在高原淡水生态系统的食物链中具有重要的地位,也是我国重要的水生野生动物种质资源,具有重要的经济开发价值和生态保护价值。目前对于花斑裸鲤的研究主要集中在其系统发育和起源、遗传多样性、人工繁育和驯化养殖、胚胎发育以及生物学特性等方面^[1]。近年来,黄河上游总体水质保持良好,无明显重金属超标现象,总体上不影响花斑裸鲤的生存和繁殖,但是偶尔的个别重金属瞬时超标的潜在风险依旧存在。花斑裸鲤长期生存在无污染的天然水体中,对于重金属胁迫有较高的敏感性。

热休克蛋白(Heat shock proteins, HSPs)又称热应激蛋白,是细胞在热诱导条件下产生的一种蛋白质,在生物进化过程中高度保守,广泛存在于原核生物以及真核生物细胞中^[2-3]。据在不同海洋生物中发现的 HSPs 的氨基酸序列、分子量和功能,可将其分为 HSP110、HSP90、HSP70、HSP60 和小型 HSP 几个主要的家族^[4]。HSPs 不仅可以对温度应激产生应答,对可能造成蛋白损伤的环境因素,例如温度刺激、盐度变化、重金属暴露等均会发生诱导性表达^[5-7]。研究发现,生物体在受到任何一种有害物质胁迫后的第一个反应就是提高 HSPs 的表达水平^[8]。作为生物标志物, HSPs 要比传统的生长、繁

殖等生物学指标更敏感,其主要特点在于可以将所受胁迫的综合效应表现在诱导蛋白的完整性上,这一特性称为“蛋白毒性”(Proteotoxicity)^[9],因此 HSPs 可作为早期的预警标志物应用于生态风险评估领域。HSP70 是 HSPs 家族中最重要且最保守的一类具有分子伴侣作用的蛋白质,其分子伴侣功能主要表现为在机体细胞受到外界刺激时表达增加,加强细胞对外界刺激的耐受性,有效维持细胞结构的稳定,减轻机体的损伤程度并可加快细胞的修复速度,从而对细胞所必需的蛋白质进行保护^[10-11],还可以参与细胞免疫^[12],抑制细胞的凋亡。

Cu 是鱼类所必需的微量元素之一,在鱼体内的多种生理生化过程中可以作为酶(如细胞色素氧化酶、过氧化物歧化酶等)的辅助因子。鱼类主要通过食物来摄取其所需量的 Cu,但当食物中的 Cu 元素不能满足鱼类生长所需时,鱼类可以通过鳃和皮肤从水中吸收,以满足机体的需要。Cu 也是水产养殖中常用除藻药物的活性成分。但作为重金属, Cu 过量时会损伤鱼类的神经生理功能,破坏嗅觉器官的结构以及内分泌功能等^[13]。研究表明,过量 Cu 暴露可以降低鱼类成活率及生长速度,尤其在急性或亚急性的胁迫试验中更为明显;在组织结构学方面, Cu 进入鱼体内后,会在机体的多个组织和器官中富集,从而引起组织结构的病理变化^[14]。为了防止和控制渔业水域水质以及水体生物受到污染,《国家渔业水质标准》(GB 11607—89)中规定水体中的 Cu 质量浓度 ≤ 0.01 mg/L。

筛选出有效的生物标记物,可以提前准确而全

面地对水质变化做出预警,以达到提前预防及保护水体生物的目的。本研究克隆了花斑裸鲤 *HSP70* (*GeHSP70*) 基因,分析了其在肝脏、肾脏、脑和鳃组织中的表达水平,并研究了 0.01 mg/L Cu^{2+} 胁迫下 *GeHSP70* 在花斑裸鲤肝、肾、脑和鳃组织中 mRNA 和蛋白水平的表达情况,旨在为黄河上游水环境污染的早期预警以及花斑裸鲤的保护提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 花斑裸鲤 2015-08-15 从青海省渔业环境监测站隆务河口养殖场(青海,循化)取 3 龄期成体花斑裸鲤 20 尾,平均体长为 $(20.3 \pm 2.5) \text{ cm}$,平均体质量 $(90.1 \pm 10.5) \text{ g}$ 。

1.1.2 试剂及仪器 总 RNA 提取试剂盒(DP419),购自天根生物试剂公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(D1200),购自索莱宝生物试剂公司;Prime Script™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit (6210A)、pMDTM19-T Vector Cloning Kit (6013)、3' Full RACE Core Set with Prime Script™ RTase 试剂盒(6106)、SMARTer® RACE 5'/3' Kit 试剂盒(634859)、Premix ExTaq、Prime Script™ RT reagent Kit(Perfect Real Time)(RR0370A),均购自 TaKaRa 公司;SYBR Green Supermix,购自伯乐生物公司;HSP70 ELISA 试剂盒(H264),购自南京建成生物公司;大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,由上海生工生物有限公司提供,引物合成与序列测定也由该公司完成;Nano Drop 2000 RNA 浓度测定仪,购自美国 Thermo Scientific 公司。

1.2 Cu^{2+} 胁迫

试验在 4 个水族箱($480 \text{ mm} \times 250 \text{ mm} \times 455 \text{ mm}$)内进行。试验开始前,水族箱用 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 高锰酸钾(分析纯)溶液浸泡 30 min,然后用清水反复清洗以确保无高锰酸钾残留。花斑裸鲤运回后,在青海大学生态环境工程学院细胞遗传实验室水族箱内暂养 2 周,每天正常投食以避免饥饿对试验结果的影响。养殖期间用水皆为曝气 2 d 的自来水且每天更换 1/3,试验期间用自动增氧泵增氧保证溶氧量不低于 6 mg/L 。参考《国家渔业水质标准》对渔业水质 Cu^{2+} 质量浓度 $\leq 0.01 \text{ mg/L}$ 的规定,本试验选取 0.01 mg/L 的 Cu^{2+} 对花斑裸鲤进行胁迫。挑取健康无伤病和规格相近的花斑裸鲤个体 20 尾,随机平均分为 1 个空白对照组和 3 个平行试验组,每组 5 尾鱼,空白对照组鱼正常饲养,试验组鱼进行

Cu^{2+} 胁迫。在 Cu^{2+} 胁迫的 0, 12, 24 和 48 h 时从各组随机取样 1 尾,擦去表面水渍后将鱼击昏,冰上迅速剖取肝脏、鳃、肾脏和脑组织,液氮中迅速冷冻后置于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,待用。

1.3 总 RNA 提取与 cDNA 合成

使用总 RNA 提取试剂盒提取花斑裸鲤肝脏、鳃、肾和脑组织的总 RNA,用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 纯度,合格后用 Nano Drop 2000 测定 RNA 浓度。利用 Prime Script™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit 进行反转录,并调整样品总 cDNA 质量浓度为 $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

1.4 花斑裸鲤 *GeHSP70* 全长序列的克隆

1.4.1 引物的设计与合成 根据 GenBank 中虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)、斑马鱼 (*Danio rerio*) 等的 *HSP70* 基因保守序列(GenBank 序列登录号分别为: AB062281.1、HQ259769.1、AF210640.1),利用 Primer Premier 5.0 设计编码区序列克隆所需引物 *GeHSP70*-F1/*GeHSP70*-R1、*GeHSP70*-F2/*GeHSP70*-R2、*GeHSP70*-F3/*GeHSP70*-R3、*GeHSP70*-F4/*GeHSP70*-R4(表 1)。

1.4.2 编码区片段的扩增 以 1.3 节反转录获得的对照组花斑裸鲤鳃组织的 cDNA 为模板,分别将上游引物(*GeHSP70*-F1、*GeHSP70*-F2、*GeHSP70*-F3、*GeHSP70*-F4)和下游引物(*GeHSP70*-R1、*GeHSP70*-R2、*GeHSP70*-R3、*GeHSP70*-R4)两两配对作为引物,PCR 扩增花斑裸鲤 *GeHSP70* 编码区片段。PCR 反应体系为 $25 \mu\text{L}$,其中, Premix ExTaq $12.5 \mu\text{L}$,上下游引物各 $1 \mu\text{L}$,cDNA 模板 $1 \mu\text{L}$,加 ddH $_2\text{O}$ 补足 $25 \mu\text{L}$ 。扩增程序: $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 4 min; $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min。取 $20 \mu\text{L}$ PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,并用 BIO-RAD 凝胶成像系统拍照,筛选出与试验所需目的片段长度最为吻合的扩增产物,切下目的片段,用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行回收纯化,回收 DNA 产物保存于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

利用 pMDTM19-T Vector Cloning Kit 将目的 DNA 片段与载体 pMD19-T 进行连接。将上述连接液转入到 $50 \mu\text{L}$ DH5 α 感受态细胞中,最终将培养液涂布于含氨苄青霉素(AMP)的 LB 固体培养基上,利用蓝白斑试验筛选阳性克隆菌。用枪头挑取阳性白色克隆菌落, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 160 r/min 振荡培养 12 h,进行菌液 PCR 验证后测序,对测序结果进行对比分析。

表 1 本试验所用引物名称及序列
Table 1 Names and sequences of primers used in this study

引物名称 Primer	序列(5'→3') Sequence(5'→3')	退火温度/℃ T _m	用途 Usage
GeHSP70-F1	CCAATGACCAGGGAAAC	56	<i>GeHSP70</i> 基因编码区序列克隆 <i>GeHSP70</i> gene coding sequences cloning
GeHSP70-R1	TGGCAGCAATCTTCTC	56	
GeHSP70-F2	TATTGGGATTGAC	56	
GeHSP70-R2	CTTTGCCTTTGT	56	
GeHSP70-F3	TCAGTGATGGAGGG	55	
GeHSP70-R3	TGCCCTTGTCATTGGT	56	
GeHSP70-F4	CCAGAGGCAAGCGA	57	
GeHSP70-R4	TGGAGCAGGTGGGA	55	
GeHSP70-3'R1	ACGACAGGTTTCCC	58	<i>GeHSP70</i> 基因 3'-UTR 克隆 <i>GeHSP70</i> gene 3'-UTR cloning
GeHSP70-3'R2	TTCGATCTGCGGGACT	59	
GeHSP70-3'R3	ATTGCCTACGGCCT	58	
GeHSP70-5'F1	GGAGAGAGGGCCA	59	<i>GeHSP70</i> 基因 5'-UTR 克隆 <i>GeHSP70</i> gene 5'-UTR cloning
GeHSP70-5'F2	CAGGAGTAGGTGGTG	59	
GeHSP70-5'F3	GGCTGTCAGCTGGC	58	
GeHSP70-CF	AGTAGGTGGCCTCT	59	<i>GeHSP70</i> 基因全长 cDNA 克隆 <i>GeHSP70</i> gene full-length cDNA cloning
GeHSP70-CR	TTGAGCACTCGTTCT		
GeHSP70-RTF	AAGGAAACAGAAC	60	荧光定量 Real-time
GeHSP70-RTR	GCTCGTTGATGATTCTC		
β-actin-RTF	ATGGGAACCGCTGCCTCTT	58	
β-actin-RTR	GGTCAGCAATGCCAGGTA		

1.4.3 3'-UTR 和 5'-UTR 的扩增 利用上述所获得的 *GeHSP70* 部分编码区片段,用 Primer Premier 5.0 设计 5'RACE 引物(GeHSP70-5'F1、GeHSP70-5'F2、GeHSP70-5'F3)和 3'RACE 引物(GeHSP70-3'R1、GeHSP70-3'R2、GeHSP70-3'R3)(表 1)。用 3'Full RACE Core Set with Prime Script™ RTase 试剂盒反转录 1.3 节中花斑裸鲤鳃组织总 RNA,获得 3'-UTR cDNA 模板。用 SMARTer® RACE 5'/3' Kit 试剂盒反转录 1.3 节中花斑裸鲤鳃组织总 RNA 获得 5'-UTR cDNA 模板。

分别以 GeHSP70-3'R1、GeHSP70-3'R2、GeHSP70-3'R3 和 GeHSP70-5'F1、GeHSP70-5'F2、GeHSP70-5'F3 为引物进行 3'-UTR 和 5'-UTR 的扩增。PCR 反应体系为 25 μL,其中,Premix Ex-Taq 12.5 μL,引物 1 μL,cDNA 模板 1 μL,通用引物 UPM 1 μL,加 ddH₂O 补足 25 μL。扩增程序:95 ℃ 4 min;95 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s,35 个循环;72 ℃ 10 min。按照 1.4.2 节所述步骤进行 PCR 产物电泳,回收与试验所需目的片段长度最为吻合的 3'-UTR 和 5'-UTR 基因片段,经转化、菌液 PCR 验证后测序,对测序结果进行对比分析。

1.4.4 *GeHSP70* 全长 cDNA 的获得 将测序获得的编码区片段、3'-UTR 和 5'-UTR 使用 DNA-MAN 软件进行拼接,获得 *GeHSP70* 全长 cDNA。根据 *GeHSP70* 全长 cDNA 序列,分别在 *GeHSP70*

基因的 5'和 3'非编码区设计引物 GeHSP70-CF 和 GeHSP70-CR(表 1),用于 cDNA 全长扩增。PCR 反应体系为 25 μL,其中 Premix ExTaq 12.5 μL,HSP70-CF 和 HSP70-CR 各 1 μL,cDNA 模板 1 μL,加 ddH₂O 补足 25 μL。扩增程序:95 ℃ 4 min;95 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 10 min。按照 1.4.2 节所述步骤进行 PCR 产物电泳,并回收扩增目的基因片段,经转化、菌液 PCR 验证后测序,对测序结果进行对比分析。

1.5 *GeHSP70* 序列分析及系统进化树的构建 用 ExPASy Protparam([Http://web.expasy.org/prot param/](http://web.expasy.org/prot_param/))软件在线分析 *GeHSP70* 的蛋白质性质及结构;运用生物信息学软件 Alignment 进行不同物种 *HSP70* 序列的同源性比对;使用 MEGA5 软件,以邻位相接法(Neighbor Joining,N-J)构建不同物种的 *HSP70* 基因序列系统进化树。

1.6 *GeHSP70* 在花斑裸鲤肝、肾、脑和鳃组织中的表达分布

按照 *GeHSP70* 基因全长 cDNA 序列设计 Real-time PCR 引物 GeHSP70-RTF 和 GeHSP70-RTR(表 1)。以 β-actin 为内参基因,其引物序列见表 1。利用 Prime Script™ RT reagent Kit(Perfect Real Time)反转录 1.3 节提取的空白对照组花斑裸鲤各组织 RNA 作为模板,以 GeHSP70-RTF 和 GeHSP70-RTR 为引物,β-actin-RTF 和 β-actin-RTR

为内参引物,用 Real-time PCR 检测 *GeHSP70* 在花斑裸鲤肝、肾、脑和鳃组织中的表达情况。反应体系为 20 μL ,其中包括 SYBR Green Supermix 10 μL ,上下游引物各 0.5 μL ,模板 cDNA 1 μL ,ddH₂O 8 μL 。扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环。被检测组织的样品分别来自 3 尾鱼,每尾鱼的每种组织样品分别进行检测,每个样品的 *GeHSP70* 基因和 β -actin 分别进行 3 次重复,结果取平均值。

1.7 Cu^{2+} 胁迫下 *GeHSP70* 在花斑裸鲤肝、肾、脑和鳃组织中的表达

1.7.1 mRNA 水平的表达 取 Cu^{2+} 胁迫后各个时间段的花斑裸鲤肝脏、鳃、肾和脑组织的总 RNA,按照 1.6 节的试验步骤,检测 Cu^{2+} 胁迫后不同时间段花斑裸鲤 *GeHSP70* 在肝、肾、脑和鳃组织中的表达情况。被检测组织的样品分别来自 3 尾鱼,每尾鱼的每种组织样品分别进行检测,每个样品的 *GeHSP70* 和 β -actin 分别进行 3 次重复,结果取平均值。

1.7.2 蛋白水平的表达 选取对重金属胁迫较为敏感的肝脏和鳃组织,通过 ELISA 法检测在重金属 Cu^{2+} 胁迫下花斑裸鲤两种组织中 *GeHSP70* 蛋白在不同时间的表达量。运用 HSP70 ELISA 试剂盒,将 HSP70 标准品分别稀释成 0,1.5,3.0,6.0,12.0,24.0 和 48.0 ng/mL 的溶液,备用。取 Cu^{2+} 胁迫后各个时间段的花斑裸鲤肝脏和鳃组织,加入一定量的 PBS(pH 7.4),研磨成匀浆后将标准品稀释液与样品分别加入各反应孔中,然后加入链酶亲和素-HRP 进行反应,多次洗涤后加入显色液和终止剂,并在 450 nm 波长处依序测量各标准品和样品的吸光度 ($D_{450\text{ nm}}$),以标准品 $D_{450\text{ nm}}$ 为横坐标,

HSP70 质量浓度为纵坐标,绘制标准曲线,根据标准曲线计算花斑裸鲤肝脏和鳃组织中 *GeHSP70* 的表达量。所有检测样品均设置 3 个重复,结果取平均值。

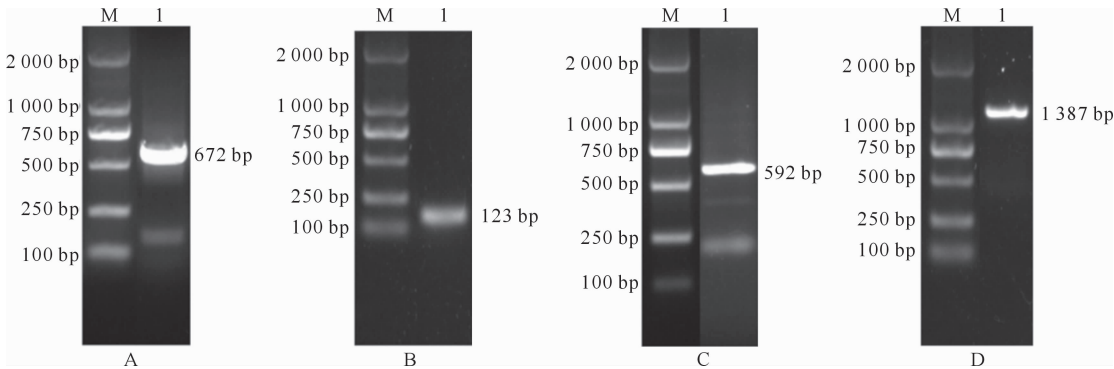
1.8 数据统计分析

Real-time PCR 所得的数据应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行相对定量分析,基因的相对表达水平所得试验数据应用 Excel、SPSS20.0 和 OriginPro 8.0 软件进行统计分析,差异性检验采用单因素方差分析 (Analysis of variance, ANOVA),结果均以 $P < 0.05$ 作为显著性判断的标准。

2 结果与分析

2.1 花斑裸鲤 *GeHSP70* 全长 cDNA 的克隆

将上游引物 *GeHSP70*-F1、*GeHSP70*-F2、*GeHSP70*-F3、*GeHSP70*-F4 和下游引物 *GeHSP70*-R1、*GeHSP70*-R2、*GeHSP70*-R3、*GeHSP70*-R4 两两配对作为引物进行 PCR 扩增,其中引物对 *GeHSP70*-F2 和 *GeHSP70*-R2 获得了花斑裸鲤 672 bp 的 *HSP70* 基因编码区片段(图 1-A),其余引物对均未获得目的片段。用引物 *GeHSP70*-5' F1、*GeHSP70*-5' F2、*GeHSP70*-5' F3 进行 5' RACE,其中 *GeHSP70*-5' F2 扩增到 123 bp 的 *GeHSP70* 5'-UTR 片段(图 1-B);用引物 *GeHSP70*-3' R1、*GeHSP70*-3' R2、*GeHSP70*-3' R3 进行 3' RACE,其中 *GeHSP70*-3' R3 扩增出 592 bp 的 3'-UTR 片段(图 1-C)。用引物对 *GeHSP70*-CF 和 *GeHSP70*-CR 进行 *GeHSP70* 全长 cDNA 扩增,结果获得了 1 387 bp 的 *GeHSP70* 全长 cDNA 序列(图 1-D)。扩增获得的编码区序列、非编码区序列和全长 cDNA 序列经过测序比对,确认为 *GeHSP70* 基因序列。



A. 编码区片段;B. 5'-UTR;C. 3'-UTR;D. 全长 cDNA;M. DNA Marker;1. PCR 产物
A. Coding sequences;B. 5'-UTR;C. 3'-UTR;D. Full-length cDNA;M. DNA Marker;1. PCR product

图 1 花斑裸鲤 *GeHSP70* 基因的克隆结果

Fig. 1 Cloning result of *Gymnocypris eckloni* *GeHSP70* gene

2.2 *GeHSP70* 序列特征分析

花斑裸鲤 *GeHSP70* 编码 223 个氨基酸。用 ExPASy Protparam 软件进行在线分析,结果表明 *GeHSP70* 是疏水性蛋白,分子式为 C₄₀₈₆ H₆₇₈₇ N₁₃₈₇

O₁₆₆₄ S₂₉₇, 分子质量为 11.15 ku, 等电点(Isoelectric point,PI)为 5.01,该蛋白包含 2 个 HSP70 家族的特征序列:IDLGTTYs(11—18 位氨基酸)和 IF-DLGGGTDFVSIL(199—212 位氨基酸)(图 2)。



核苷酸序列的单下划线分别表示起始密码子和终止密码子;氨基酸序列的灰色背景部分为细胞质特异性调控基序, 双下划线部分为四肽序列,方框为 *HSP70* 特征序列

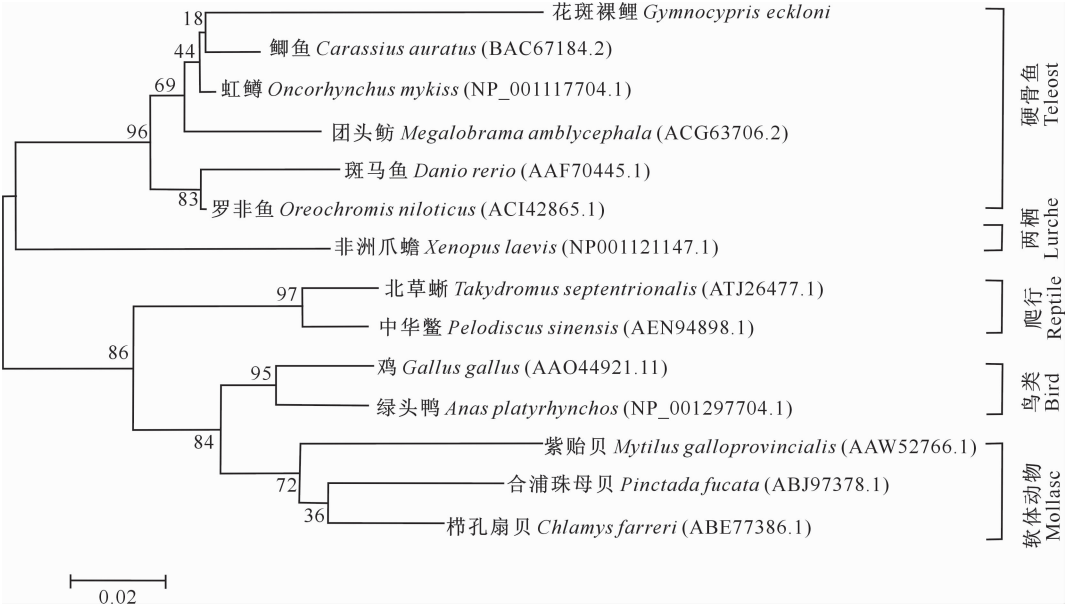
Underlines represent the starting codon and the termination codon, grey background shows cytoplasmic specific regulation base sequence,double underlined part is the tetrapeptide sequence,and box shows the *HSP70* character sequence

图 2 *GeHSP70* cDNA 序列及其编码的氨基酸序列
Fig. 2 Complete cDNA sequence and amino acid sequences of *GeHSP70*

2.3 花斑裸鲤的进化分析

利用 Alignment 软件进行不同物种 *HSP70* 序列的同源性比对,结果表明,花斑裸鲤 *GeHSP70* 基因序列与鲫鱼(AB092839.2)、虹鳟(AB062281.1)、团头鲂(EU884290.2)、斑马鱼(AF210640.1)、罗非鱼(ACI42865.1)、非洲爪蟾(NP001121147.1)、北草蜥(ATJ26477.1)、中华鳖(AEN94898.1)、鸡(AAO44921.11)、绿头鸭(NP_001297704.1)、合浦珠母贝(EF011061.1)、紫贻贝(AY861684.1)、栉孔扇贝(DQ466080.1)的同源性分别为 93%,88%,86%,82%,79%,75%,73%,71%,69%,68%,

68%,66%和 65%。结果表明,本试验克隆的 *GeHSP70* 基因与其他物种的 *HSP70* 基因同源性较高,具有很高的保守性。
使用 MEGA5 软件,以邻位相接法(Neighbor Joining,N-J)构建不同物种的 *HSP70* 基因序列系统进化树,结果如图 3 所示。由图 3 可知,花斑裸鲤与其他同属于硬骨鱼类的鱼聚成一支,其中与鲫鱼的遗传距离最近。进化树的形态结果与传统分类学结果具有较高的一致性,进一步说明了克隆的基因是花斑裸鲤 *GeHSP70* 基因。



节点上数据表示 1 000 次重复的支持率,比例尺表示每千碱基的替换数目

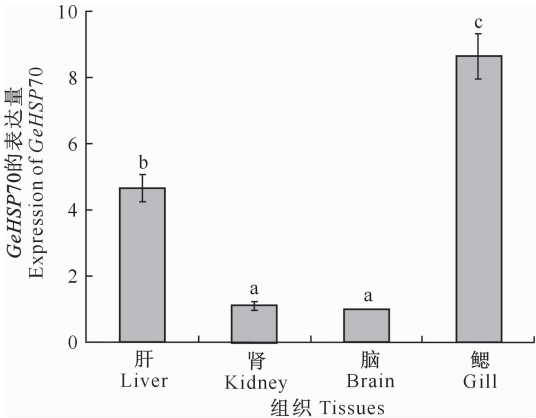
Numbers at the nodes denote the bootstrap values of 1 000 replicates. Scale represents the number of substitutions per 1 000 bases

图 3 基于 *HSP70* 基因的相关物种进化分析

Fig. 3 Evolutionary analysis of related species based on *HSP70*

2.4 正常状态下 *GeHSP70* 在花斑裸鲤各组织的表达

通过 Real-time PCR 检测正常状态下 *GeHSP70* 在花斑裸鲤各个组织的表达量,结果见图 4。



图柱上标注不同小写字母者表示差异显著($P < 0.05$)

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$)

图 4 正常状态下 *GeHSP70* 在花斑裸鲤不同组织的 mRNA 表达

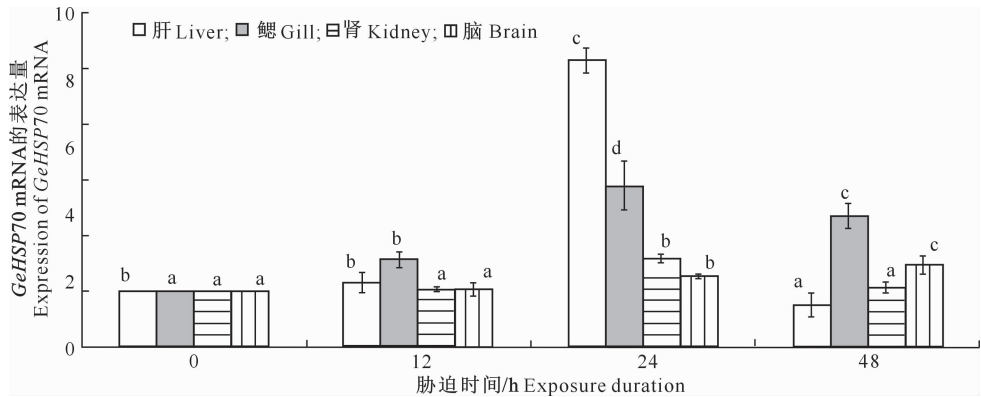
Fig. 4 Analysis of mRNA expression level of *GeHSP70* in different tissues of *Gymnocypris eckloni*

由图 4 可以看出,*GeHSP70* 基因在花斑裸鲤肝

脏、肾脏、脑和鳃组织中均有表达,其中在鳃组织中表达量最高,显著高于其他组织($P < 0.05$),其次是肝脏,显著高于肾脏和脑($P < 0.05$),而在肾脏和脑中表达不显著($P > 0.05$)。

2.5 Cu^{2+} 胁迫下 *GeHSP70* 在花斑裸鲤各组织的表达

2.5.1 mRNA 水平的表达 通过 Real-time PCR 检测 Cu^{2+} 胁迫下 *GeHSP70* mRNA 在花斑裸鲤肝脏、鳃、肾脏和脑组织中的表达,结果见图 5。由图 5 可以看出,在 Cu^{2+} 胁迫 48 h 内花斑裸鲤肝脏和鳃组织中 *GeHSP70* mRNA 的表达水平总体均表现为先升后降的趋势,在 24 h 时表达量最大,显著大于其他时段($P < 0.05$),12 h 和 48 h 时鳃组织的 *GeHSP70* mRNA 表达量明显高于肝脏,24 h 肝脏 *GeHSP70* mRNA 表达量明显高于鳃组织;花斑裸鲤肾脏中 *GeHSP70* mRNA 表达量也呈先上升后下降的趋势,在 0~12 h 内表达较为平稳,在 24 h 时表达量达到最大值后下降;脑组织中 *GeHSP70* mRNA 表达量在 48 h 内表现出持续升高的趋势,24 h 时的表达量显著高于 0 和 12 h,48 h 时的表达量显著高于其他时间。



同一组织不同胁迫时间相比,图柱上标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同

Different lowercase letters indicate significant difference among different stress times in same tissue ($P<0.05$). The same below

图 5 Cu^{2+} 胁迫下 *GeHSP70* 在花斑裸鲤不同组织的 mRNA 水平表达

Fig. 5 Expression of *GeHSP70* mRNA in different tissues of *Gymnocypris eckloni* under Cu^{2+} stress

2.5.2 蛋白水平的表达 由图 6 可以看出,在 0.01 mg/L Cu^{2+} 胁迫 48 h 内,花斑裸鲤肝脏和鳃组织中 *GeHSP70* 蛋白表达水平总体呈先上升后下降的趋势,在 24 h 时表达量最大,显著大于其他时段的表达量($P<0.05$),12 h 时鳃组织的表达量约为肝脏的 1.4 倍,而 24 h 时肝脏的表达量约为鳃组织的 1.2 倍。

动物迅速适应环境的变化,保护机体少受损害,此外 HSP70 还有恢复变性蛋白和清除永久变性蛋白的作用。

本试验克隆得到花斑裸鲤 *GeHSP70* 基因,经过氨基酸序列分析发现, *GeHSP70* 蛋白含有 HSP70 家族的 2 个特征序列: IDLGGTYS(11—18 位氨基酸)和 IFDLGGGTFDVSIL(199—212 位氨基酸)。在鱼类 HSP70 家族中,诱导型 HSP70 中 GGXP 四肽序列在多数情况下只出现一次^[17]。本试验克隆得到的花斑裸鲤 *GeHSP70* 在靠近 C 端只有一个 GGMP 四肽序列,表明花斑裸鲤 *GeHSP70* 可能是诱导型 HSP70 蛋白。与所有真核生物一样, *GeHSP70* 在 C 末端也具有高度保守的细胞质特异性调控基序 EEVD^[18-19]。

同源性分析表明,花斑裸鲤 *GeHSP70* 与其他鱼类的同源性达到 79% 以上,其中与鲫鱼的同源性最高,达到 93%。花斑裸鲤 *GeHSP70* 系统树分析将花斑裸鲤与鲫鱼、虹鳟、团头鲂聚在一个鱼类的分支上,这与牙鲈 *HSP70*^[20]、团头鲂 *HSP70*^[21] 以及鲢鱼、草鱼和尼罗罗非鱼^[22] 的分类结果一致,也与传统分类学分类结果一致。

Real-time PCR 检测发现, *GeHSP70* 基因在肝脏、肾脏、脑和鳃组织中均有表达,尤其在鳃中表达量显著高于其他组织($P<0.05$),其次是肝脏,在脑和肾脏中表达不显著($P>0.05$)。这与淞江鲈^[23]和草鱼^[24] *HSP70* 的表达模式相似。也有研究表明,正常情况下黄颡鱼 *HSP70* 在肝、头、肾、鳃和脑中均有表达,但表达量在鳃中最高^[25]。主要原因可能是,在水生动物中鳃组织是较先也是直接与水环境接触的,因此鳃组织比其他组织对水环境的改变更

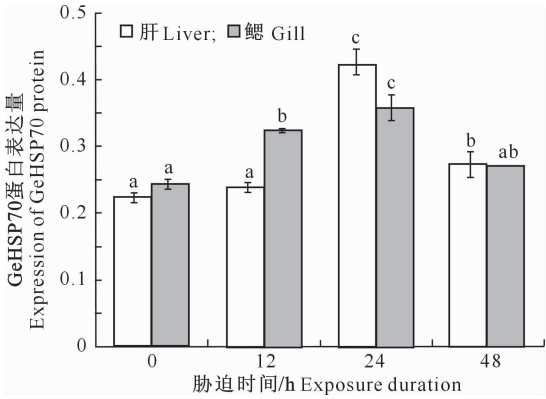


图 6 Cu^{2+} 胁迫下 *GeHSP70* 在花斑裸鲤不同组织的蛋白水平表达

Fig. 6 Expression of *GeHSP70* protein in different tissues of *Gymnocypris eckloni* under Cu^{2+} exposure

3 讨论

HSP70 是一类有机体在受到高温刺激时大量表达的蛋白。研究表明,不仅温度可以诱导热休克蛋白的表达,其他一些应激条件(酸碱环境、缺氧、金属离子和稠环芳烃有机物)也可诱导热休克蛋白合成增加。作为热休克蛋白家族一员, HSP70 可以帮助蛋白质正确折叠、组装、运输,同时还有调节和修复损伤蛋白以及降解变性蛋白的功能^[15-16],可以使

敏感。

通过 Real-time PCR,对 Cu^{2+} 胁迫下不同时间花斑裸鲤 *GeHSP70* 在肝脏、鳃、肾和脑组织中的 mRNA 表达水平的研究结果显示:在 48 h 内,花斑裸鲤肝脏、肾脏和鳃组织中 *GeHSP70* mRNA 表达量均呈现出先升高后下降的趋势,在 24 h 达到最大值;而脑组织在 48 h 内则表现出持续升高的趋势。这与对栉孔扇贝^[26]、白云邓氏鱼^[27]、草鱼^[28] 的研究结果基本一致。

用 ELISA 法测定了 Cu^{2+} 胁迫下 *GeHSP70* 蛋白在花斑裸鲤肝脏和鳃组织中的表达水平,结果发现,重金属 Cu^{2+} 胁迫下花斑裸鲤肝脏和鳃组织中 *GeHSP70* 的表达量均呈先上升后下降的趋势,在 24 h 达到最大值,这与对白云邓氏鱼^[27]、鲤鱼^[29] 的研究结果相似。

本研究结果表明,花斑裸鲤在重金属 Cu^{2+} 胁迫下肝脏和鳃组织中 *GeHSP70* mRNA 水平的表达与蛋白水平的表达趋势基本一致,均为先上升后下降,且在 12 h 时 *GeHSP70* mRNA 水平和 *GeHSP70* 蛋白水平的表达量均为鳃组织高于肝脏,而到 24 h 时则相反。形成该结果的主要原因是,鳃作为鱼类的呼吸器官,也是鱼类摄取生长所需物质的器官之一^[30],对外界应激的应答比较敏感^[31-33],因此在 Cu^{2+} 胁迫前期,花斑裸鲤鳃组织中 *GeHSP70* mRNA 水平和蛋白水平的表达量均高于肝脏;而作为生物体必需元素之一的铜,在达到鱼类生长需要量之前并未显著诱导 HSP70 表达^[34],但当 Cu^{2+} 摄入量远大于吸收量和排出量时, Cu^{2+} 就会在主要的解毒器官肝脏内富集,此时 HSP70 作为分子伴侣,会与热休克因子(HSF)分离后再与变性蛋白结合,HSP70 所释放的 HSF 在蛋白激酶或丝氨酸苏氨酸激酶的作用下磷酸化,形成激活状态的 HSF 三聚体转入核内,与 HSP70 热休克反应元件(HSE)结合实现进一步激酶磷酸化,启动 HSP70 基因的表达,从而诱导肝脏内 *GeHSP70* 的表达水平升高^[35-37]。随着 Cu^{2+} 胁迫时间的延长,当 HSP70 积累到一定程度时又会和 HSE 分离而与 HSF 结合,此时转录停止,从而实现反馈抑制热休克反应^[38],因此在 48 h 时,*GeHSP70* 在花斑裸鲤肝脏和鳃组织中的表达量均有所下降。

综上所述,花斑裸鲤在重金属 Cu^{2+} 胁迫下各个组织中 *GeHSP70* mRNA 水平与蛋白水平的表达表现出一定的规律性和相关性,但其应答模式的调控机理还需进一步研究。本研究克隆了花斑裸鲤

GeHSP70 cDNA 全长序列,明确了其生物信息学特征,以及正常和 Cu^{2+} 胁迫下 *GeHSP70* 在不同组织中的 mRNA 和蛋白水平的表达量,有助于更加深入理解 *GeHSP70* 作为分子伴侣的应激应答模式,为天然水体环境污染的早期预警、生物标记物的筛选、应激应答模式研究以及花斑裸鲤的保护等提供一定的理论依据。

[参考文献]

- [1] 申志兴,王国杰,杨成,等.青海省花斑裸鲤现状及保护对策[J].青海畜牧业,2011(2):17-19.
Shen Z X, Wang G J, Yang C, et al. The status and protection measures of the *Gymnocypris eckloni* in Qinghai province [J]. Qinghai Animal Husbandry, 2011(2):17-19.
- [2] Craig E A. The heat shock response [J]. CRC Crit Rev Biochem, 1985, 18(2):39-80.
- [3] Frydman J. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones [J]. Annu Rev Biochem, 2001, 70:603-649.
- [4] Lindquist S, Craig E A. The heat-shock proteins [J]. Annual Review of Genetics, 2007, 22:631-677.
- [5] Cara J B, Aluru N, Moyano F J, et al. Food deprivation induces HSP70 and HSP90 protein expression in larval gilthead sea bream and rainbow trout [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2005, 142(4):426-431.
- [6] 沈骅,王晓蓉,张景飞.应用应激蛋白 HSP70 作为生物标志物研究锌、铜及其联合毒性对鲫鱼肝脏的影响 [J]. 环境科学学报, 2004, 24(5):895-899.
Shen H, Wang X R, Zhang J F. The effects of the stress protein HSP70 on the liver of *Crucian carp* were studied as biomarkers [J]. Journal of Environmental Science, 2004, 24(5):895-899.
- [7] 沈骅,王晓蓉,张景飞,等.低浓度 Zn 对幼龄鲫鱼肝脏组织应激蛋白 HSP70 诱导的影响 [J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(3):441-443.
Shen H, Wang X R, Zhang J F, et al. The influence of low concentration Zn on HSP70 induced by liver tissue of young *Crucian carp* [J]. Journal of Agricultural Environmental Science, 2004, 23(3):441-443.
- [8] 沈骅,王晓蓉,张景飞,等.低浓度 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 对鲫鱼肝脏组织中 HSP70 诱导的影响 [J]. 环境污染与防治, 2004, 26(4):244-247.
Shen H, Wang X R, Zhang J F, et al. The influence of low concentration Pb^{2+} and Cd^{2+} on HSP70 induced in the liver of *Crucian carp* [J]. Environment Pollution and Control, 2004, 26(4):244-247.
- [9] Sanders B M. Stress-proteins in aquatic organisms: an environmental perspective [J]. Crit Rev Toxicol, 1993, 23:49-75.
- [10] 张勇,徐铜春,杜富宽,等.美洲鲈 hsp70 的分子特征及其对运输应激的应答 [J]. 动物学杂志, 2016, 51(2):268-280.
Zhang Y, Xu G C, Du F K, et al. Molecular characteristics of the *Alosa sapidissima* hsp70 and its response to transport

- stress [J]. Chinese Journal of Zoology, 2016, 51(2): 268-280.
- [11] 祝璟琳, 王国良. 鱼类 HSP70 的研究进展 [J]. 宁波大学学报 (理工版), 2007, 20(4): 446-450.
- Zhu J L, Wang G L. Research progress on fish HSP70 [J]. Journal of Ningbo University (Polytechnic Edition), 2007, 20(4): 446-450.
- [12] Xie Y H. Molecular characterization of the HSP70 and HSP90 genes in Asian clam (*Corbicula fluminea*) and their expression analysis during heavy metal exposure [J]. Gene, 2017, 16(1): 146-150.
- [13] 刘迪秋, 葛 锋, 陈朝银, 等. 重金属铜、镉对鲫肝脏基因表达的影响 [J]. 水产科学, 2010, 17(6): 227-230.
- Liu D Q, Ge F, Chen C Y, et al. Effects of heavy metal copper and cadmium on the gene expression of the *Crucian carp* liver [J]. Fisheries Science, 2010, 17(6): 227-230.
- [14] 刘福军, 张饮江, 王明学. 铜对鱼类慢性毒性研究进展 [J]. 水生生物学报, 2003, 27(3): 302-307.
- Liu F J, Zhang Y J, Wang M X. The progress of copper on chronic toxicity of fish [J]. Journal of Aquatic Biology, 2003, 27(3): 302-307.
- [15] 凌明圣. 分子伴侣 HSP70 研究进展 [J]. 国外医学分子生物学分册, 1997, 15(5): 227-230.
- Ling M S. Molecular partner HSP70 research progress [J]. Foreign Medical Molecular Biology Branch, 1997, 15(5): 227-230.
- [16] Graj E A. Heat shock protein and molecular chaperones, mediators of proteins stress 70 and chaperones 60 in diverse species [J]. Cell, 1994, 34: 253-258.
- [17] Deane E E, Woo N Y S. Cloning and characterization of the hsp70 multigene family from silver sea bream; modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 330: 776-783.
- [18] Demand J, Lfidars J. The carboxy-terminal domain of HSC70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors III [J]. Molecular and Cellular Biology, 1998, 18(4): 2023-2028.
- [19] Vayssier M, Leguerhier F, Fabian J F, et al. Cloning and analysis of a *Trichinella briotovi* gene encoding a cytoplasmic heat shock protein of 72 kD [J]. Parasitology, 1999, 119: 81-93.
- [20] 刘旭东. 牙鲆 *hsp70* 与 *hsc70* 基因的克隆、表达及其 SNPs 与耐热性状的相关性分析 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- Liu X D. The correlation analysis between *Paralichthys olivaceus hsp70* and *hsc70* gene cloning, expression and SNPs and heat resistance traits [D]. Qingdao: China Ocean University, 2011.
- [21] 明建华, 谢 骏, 刘 波, 等. 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 [J]. 中国水产科学, 2009, 16(5): 635-648.
- Ming J H, Xie J, Liu B, et al. The cloning, sequence analysis and thermal stress of the *Megalobrama amblycephala* were affected on the expression of mRNA [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(5): 635-648.
- [22] 何 珊, 梁旭方, 李观贵, 等. 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 [J]. 环境科学学报, 2009, 29(11): 2324-2330.
- He S, Liang X F, Li G G, et al. Cloning and analysis of the gene cDNA sequence in *Hypophthalmichthys molitrix*, *Ctenopharyngodon idella*, and *Oreochromis niloticus* heat shock protein 70 gene [J]. Journal of Environmental Sciences, 2009, 29(11): 2324-2330.
- [23] 刘庆全. 淞江鲈 (*Trachidermus fasciatus* Heckel) hsp70 全序列的克隆及其表达的初步研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2013.
- Liu Q Q. A preliminary study on the *Trachidermus fasciatus* Heckel cloning and expression of hsp70 sequences [D]. Shanghai: Fudan University, 2013.
- [24] Zhang A, Zhou X, Wang X, et al. Characterization of two heat shock proteins (Hsp70/Hsc70) from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): evidence for their differential gene expression, protein synthesis and secretion in LPS challenged peripheral blood lymphocytes [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2011, 159(2): 109-114.
- [25] 张 娟, 张其中, 张占会, 等. 黄颡鱼 HSC70 基因及其组织表达分析 [J]. 水生生物学报, 2009, 33(3): 426-433.
- Zhang J, Zhang Q Z, Zhang Z H, et al. Analysis of *Pseudobagrus fulvidraco* HSC70 gene and its tissue expression [J]. Journal of Aquatic Biology, 2009, 33(3): 426-433.
- [26] Qu L Y, Xiang J H, Sun X Q, et al. Expression analysis of HSP70 in various tissues of *Chlamys farreri* under thermal stress [J]. High Technology Letters, 2005, 15(5): 96-100.
- [27] Jing J, Liu H, Chen H, et al. Acute effect of copper and cadmium exposure on the expression of heat shock protein 70 in the Cyprinidae fish *Tanichthys albonubes* [J]. Chemosphere, 2013, 1(14): 1-10.
- [28] 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 [C]. 成都: 电子科技大学, 2011.
- Zhou X F. The characteristics of different gene expression, protein synthesis and secretion of *Ctenopharyngodon idella* HSC70 and HSP70 in immune response [D]. Chengdu: University of Electronic Science and Technology, 2011.
- [29] 王云彪, 侯晓丽, 徐镜波. 温度与铜联合胁迫下鲤鱼 HSP70 的组织特异性表达 [C]//中国环境科学学会. 中国环境科学学会学术年会论文集. 北京: 中国环境出版社, 2011: 3714-3717.
- Wang Y B, Hou X L, Xu J B. Tissue specific expression of tissue specific table of *Cyprinus carpio* HSP70 under combined temperature and copper stress [C]//China Society of Environmental Sciences. Paper on the academic annual meeting of the China Society of Environmental Science. Beijing: China Environmental Press, 2011: 3714-3717.
- [30] Mohammad M N A, Mona S Z, Elsayed A K, et al. Use of fish as bio-indicator of the effects of heavy metals pollution [J]. Aquac Res Development, 2015, 6(4): 1-13.

[30]

Chen F,Reheman A,Cao J,et al. Effect of melatonin on monochromatic light-induced T-lymphocyte proliferation in the thymus of chickens [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology,2016,161:9-16.

[31]

Li S,Cao J,Wang Z,et al. Melatonin mediates monochromatic light-induced insulin-like growth factor 1 secretion of chick liver;involvement of membrane receptors [J]. Photochemistry and Photobiology,2016,92(4):595-603.

[32]

Bai X,Wang Y,Wang Z,et al. In ovo exposure to monochromatic lights affect posthatch muscle growth and satellite cell proliferation of chicks; role of IGF-1 [J]. Growth Factors, 2016,34(3/4):107-118.

[33]

曹 静,陈耀星,王子旭,等. 单色光对肉鸡生长发育的影响 [J]. 中国农业科学,2007,40(10):2350-2354.
Cao J,Chen Y X,Wang Z X,et al. Effect of monochromatic light on broiler growth [J]. Scientia Agricultura Sinica,2007, 40(10):2350-2354.

[34]

Xie D,Wang Z X,Dong Y L,et al. Effects of monochromatic light on immune response of broilers [J]. Poultry Science, 2008,87(8):1535-1539.

[35]

胡 易,姜 楠,陈耀星,等. 单色光对肉鸡体质量和小肠免疫 应激相关因子 IL-6 与 TNF- α 表达的影响 [J]. 畜牧兽医学 报,2012,43(9):1479-1482.
Hu Y,Jiang N,Chen Y X,et al. Effect of monochromatic light on body weight and expression of IL-6 and TNF- α in small in-

testine of broilers [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2012,43(9):1479-1482.

[36]

Hughes B O,Black A J. The effect of environmental factors on activity, selected behaviour patterns and “fear” of fowls in cages and pens [J]. British Poultry Science,1974,15(4):375- 380.

[37]

王永芬,席 磊,赵亚军,等. 栖架式舍饲散养模式对蛋鸡行为 与鸡舍环境的影响 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学 版),2017,45(1):21-27.
Wang Y F,Xi L,Zhao Y J,et al. Effects of housing range mode with perches on behavior of laying hens and environ- ment of henhouse [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed),2017,45(1):21-27.

[38]

Deep A,Schwean-Lardner K,Crowe T G,et al. Effect of light intensity on broiler behaviour and diurnal rhythms [J]. Ap- plied Animal Behaviour Science,2012,136(1):50-56.

[39]

Sultana S,Hassan M R,Choe H S,et al. The effect of mono- chromatic and mixed LED light colour on the behaviour and fear responses of broiler chicken [J]. Avian Biology Research, 2013,6(3):207-214.

[40]

Olanrewaju H A,Miller W W,Maslin W R,et al. Effects of light sources and intensity on broilers grown to heavy weights;Part 1. Growth performance,carcass characteristics, and welfare indices [J]. Poultry Science, 2016, 95(4): 727- 735.

(上接第 10 页)

[31]

Kim S G,Jee J H,Kang J C. Cadmium accumulation and elimi- nation in tissues of juvenile olive flounder, *Paralichthys oli- vaceus* after sub-chronic cadmium exposure [J]. Environmen- tal Pollution,2004,127:117-123.

[32]

Zhang A Y,Guo Y F,Zhang S N,et al. Cytokine effects and cellular signaling pathways of grass carp HSP70 in head kid- ney leukocytes [J]. Fish & Shellfish Immunology,2015,46: 550-556.

[33]

Xing H,Li S,Wang X,et al. Effects of atrazine and chlorpyri- fos on the mRNA levels of HSP70 and HSC70 in the liver, brain,kidney and gill of common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Chemosphere,2013,90:910-916.

[34]

Idriss A A,Ahmad A K. Heavy metal concentrations in fishes from Juru River,estimation of the health risk [J]. Bull Envi- ron Contam Toxicol,2015,94:204-208.

[35]

Drevnick P E,Sandheinrich M B,Oris J T. Increased ovarian follic- ular apoptosis in fathead minnows (*Pimephales promelas*) ex- posed to dietary methylmercury [J]. Aquat Toxicol,2006,79: 49-54.

[36]

Sfakianakis D G,Renieri E,Kentouri M,et al. Effect of heavy metals on fish larvae deformities;a review [J]. Enviro Res, 2015,137:246-255.

[37]

Adeyemo O K,Adedeji O B,Offor C C. Blood lead level as bio- marker of environmental lead pollution in feral and cultured African catfish(*Clarias gariepinus*) [J]. Nigerian Vet,2010, 31:139-147.

[38]

Price B D,Calderwood S K. Heat-induced transcription from RNA polymerase II and III and HSF binding activity are co- ordinateately regulated by the products of the heat shock genes [J]. Cell Physiol,1992,153:392-401.