

# 瓶囊碘泡虫 *HSP70* 基因的克隆、鉴定及功能预测\*

刘晓聪, 赵元著, 张金叶

(重庆师范大学 生命科学学院 动物生物学重庆市重点实验室, 重庆 401331)

**摘要:** HSP70 (Heat shock proteins 70) 是分子量约为 70 kD 的热休克蛋白, 具有保护细胞和生命体的重要作用。通过分子克隆和染色体步移技术首次获得瓶囊碘泡虫 (*Myxobolus am pullicapsulatus* Zhao *et al.*, 2008) HSP70 家族同源基因的完整序列, 并利用生物信息学方法对该基因进行鉴定, 同时对它编码的蛋白序列进行分析。结果显示: 瓶囊碘泡虫 HSP70 蛋白为 HSPA8 同源物, 命名为 MaHSPA8; MaHSPA8 基因核苷酸序列全长 2 696 bp, 共编码 662 个氨基酸, MaHSPA8 蛋白相对分子量为 72.5 kD, 等电点为 5.37, 无跨膜区和信号肽, 共有 24 个潜在的抗原位点。此发现将为进一步研究 HSP70 基因在瓶囊碘泡虫寄生过程中的作用提供基础资料。

**关键词:** 瓶囊碘泡虫; HSP70 基因; 克隆; 生物信息学分析

**中图分类号:** Q966

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1672-6693(2016)02-0037-06

HSPs (Heat shock proteins) 是一类在原核生物和真核生物体内都普遍存在的分子伴侣, 在机体遇到有害刺激后的应激反应中起着重要的防御作用。依据分子量大小, HSPs 可分为 HSP100、HSP90、HSP70、HSP60、HSP40 和小 HSP 家族。目前, HSP70 是研究最多的一类应激蛋白, 主要包括 4 大类成员: HSP70、HSC70 (Heat shock cognate 70)、GRP78 (Glucose-regulated protein 78, 又称 HSPA5) 和 HSP75 (HSPA9)。其中人类 HSP70 蛋白包括 HSPA1A、HSPA1B 和 HSPA6; HSC70 包括 HSPA1L、HSPA2 和 HSPA8<sup>[1]</sup>。正常生理条件下, HSP70 蛋白表达量极少, 但受到物理、化学、生物等应激原作用后, 表达迅速增加, 故又称为诱导型蛋白<sup>[2]</sup>。然而, HSC70 蛋白在正常细胞质内组成性表达, 应激条件下仅受到轻度诱导<sup>[3-4]</sup>。HSC70 蛋白在结构和功能上同 HSP70 蛋白具有相似性, 同时, HSC70 蛋白在胚胎发育、细胞凋亡、细胞存活、先天免疫反应等细胞事件中也具有自身独特的功能<sup>[5-8]</sup>。更重要的是, 由于 HSC70 蛋白和临床疾病如癌症、心血管疾病、神经疾病、肝脏疾病等存在一定关联, 因而成为了一个潜在的治疗靶点<sup>[9-11]</sup>。目前关于人类及其他脊椎动物、软体动物、甲壳动物、植物、细菌、病毒等物种中 HSC70 基因的研究已较广泛<sup>[12-17]</sup>。此外, 一些病原微生物 HSP70 抗原性的研究已表明: HSP70 可作为疫苗的候选成分<sup>[18-19]</sup>。相比之下, HSP70 在粘孢子虫中的相关研究较少。

瓶囊碘泡虫 (*Myxobolus am pullicapsulatus* Zhao *et al.*, 2008) 是一种主要寄生于鲫鱼 (*Carassius auratus auratus*) 的粘孢子虫, 多在宿主鳃部形成乳白色圆形孢囊, 严重时布满整个鳃部导致寄主鱼因呼吸困难而死亡, 给渔业和水产养殖业带来了严重的经济损失<sup>[20]</sup>。由于粘孢子虫的孢囊具有坚硬的孢子外壳, 药物很难进入, 几乎所有药物对该病均无显著疗效<sup>[21-22]</sup>。同时, 粘孢子虫生活史复杂, 人工培养尚未成功, 也给粘孢子虫病的控制和预防带来了极大困难。此外, 化学药物在水体、鱼体内造成的大量残留, 不但污染环境还会给人类健康带来隐患。比较而言, 生物技术疫苗不存在以上问题, 且具有良好的预防效果, 尤其是基因工程疫苗制备简单, 易大量生产等优点已成为防御寄生虫的首选, 因此, 生物疫苗应是治疗粘孢子虫病较为理想的防治方法<sup>[23]</sup>。为此, 本研究对瓶囊碘泡虫 HSP70 家族基因成员之一进行了克隆、鉴定及功能预测, 旨在为进一步研究该基因的功能提供基础数据, 对粘孢子虫病的防治研究也具有一定科学意义。

\* 收稿日期: 2015-11-05 修回日期: 2016-01-06 网络出版时间: 2016-1-20 21:25

资助项目: 国家自然科学基金 (No. 31471980); 重庆市基础与前沿研究项目 (No. cstc2014jcyjA00006); 重庆市教育委员会科学技术研究项目 (No. KJ1400515); 重庆师范大学校级科研基金项目 (No. 13XLB027; No. 14XYY024)

作者简介: 刘晓聪, 女, 研究方向为粘孢子虫分类及进化, E-mail: Lxcong2015@163.com; 通讯作者: 张金叶, 副教授, E-mail: yjz0916@163.com

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.n.20160120.2125.006.html>

## 1 材料与方法

### 1.1 样本采集与虫种鉴定

研究所用病鲫采自重庆市沙坪坝区陈家桥镇。将病鲫鳃部检获的粘孢子虫孢囊小心剥离至 1.5 mL 的离心管内,超纯水离心去除杂质后,用穿刺针穿破孢囊,取少量孢子涂抹到载玻片上,置于 Leica-DM6000 显微镜下观察、拍照。瓶囊碘泡虫的鉴定参照文献[20]。

### 1.2 主要试剂

DNA 提取试剂盒 DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN),胶回收试剂盒(E. Z. N. A Gel Extraction Kit), pMD 19-T, rTaq 聚合酶, LA Taq 聚合酶, dNTPs, DL5000 Marker (TaKaRa), Genome Walking Kit (TaKaRa), 质粒提取试剂盒(E. Z. N. A Plasmid Mini Kit I)。

### 1.3 瓶囊碘泡虫基因组 DNA 的提取

瓶囊碘泡虫基因组 DNA 的提取严格按照 DNA 提取试剂盒的使用说明操作执行,并进行电泳检测、浓度测定, -20 °C 保存备用。

### 1.4 瓶囊碘泡虫 HSP70 基因的克隆、测序

从 GenBank 下载其他物种 HSP70 蛋白序列及核酸序列,以此利用 Primer 5 设计兼并引物(表 1)。首先,以瓶囊碘泡虫基因组 DNA 为模板进行 HSP70 基因片段的扩增。PCR 反应体系为:2.5  $\mu\text{L}$  10 $\times$  Ex Taq ( $\text{Mg}^{2+}$  Free), 1.5  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (25  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 2.5  $\mu\text{L}$  dNTP (25  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 引物各 0.5  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 1.2 ng 的模板 DNA, 0.2  $\mu\text{L}$  Ex Taq 酶(5U  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), 灭菌双蒸水补足至 25  $\mu\text{L}$ 。反应程序为:94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 45 s, 59.7 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 2 min, 循环 30 次,最后 72 °C 延伸 10 min。纯化后克隆至 pMD19-T 载体,菌液送上海英潍捷基贸易有限公司进行测序。然后,依据已测 HSP70 片段序列,分别于 5' 和 3' 端设计特异引物 HSP70-R1、HSP70-R2、HSP70-R3、HSP70-F1、HSP70-F2 和 HSP70-F3(表 1)。PCR 反应程序及详细操作参照 Genome Walking Kit 使用说明执行,纯化后的片段克隆至 pMD 19-T 载体,菌液送上海英潍捷基贸易有限公司进行测序。

### 1.5 瓶囊碘泡虫 HSP70 基因生物信息学分析

利用 BioEdit 软件将获得的瓶囊碘泡虫 HSP70 基因序列进行拼接、寻找 ORF 并翻译成蛋白序列,结合 Codon W 分析 HSP70 基因的碱基组成及密码子使用频率。利用 ProtParam 软件(<http://www.expasy.org/prot-param>)预测蛋白质的理论分子量、等电点等理化性质;利用软件 ExPASy 的 ProtScale 程序分析蛋白亲/疏水性;利用 TMHMM 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)分析蛋白的跨膜区;利用 SignalP4.0 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测信号肽和剪切位点;使用软件 TargetP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)对蛋白质亚细胞定位;使用在线软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>)分析蛋白潜在抗原表位。

## 2 结果

### 2.1 形态学鉴别性特征

孢囊乳白色,平均直径为 2.1 mm;成熟孢子壳面观呈长梨形,缝面观呈梭形,前端稍尖后端钝圆(封二彩图 1)。孢子长(18.9 $\pm$ 0.7)  $\mu\text{m}$ ,范围为 17~20.0  $\mu\text{m}$ ;宽(9.3 $\pm$ 0.5)  $\mu\text{m}$ ,范围为 8.5~10.7  $\mu\text{m}$ 。两等大长梨形极囊并行排列在孢子前端,约占孢腔 2/3,两极囊前端紧贴,末端分开,两极囊纵轴之间约成 30° 夹角,极囊长(9.3 $\pm$ 0.5)  $\mu\text{m}$ ,范围为 7.8~10.2  $\mu\text{m}$ ;宽(3.45 $\pm$ 0.4)  $\mu\text{m}$ ,范围为 2.8~3.7  $\mu\text{m}$ ;极丝 9~10 圈。

### 2.2 HSP70 基因全序列的特征分析

本研究得到的瓶囊碘泡虫 HSP70 基因序列全长 2 696 bp,含 1 989 bp 开放阅读框(ORF),5' 端非编码区为 623 bp,3' 端非编码区为 84 bp(图 2),共编码 662 个氨基酸。BioEdit 分析表明 AT 含量为 61.91%,GC 含量为 38.09%,AT 和 GC 的偏斜分别为 0.07,0.02,因此,该序列碱基组成更偏向于 A 和 G。全基因序列的相同意义

表 1 本研究所用 PCR 引物序列

Tab.1 Sequence of primers designed in this study

引物名称	引物序列(5'~3')
HSP70-R	GGHWCNCANTWYTTTCGYHT
HSP70-F	NGHNCCRTANGCNACIHC
HSP70-R1	TACCATCACCTGCCTGCTT
HSP70-R2	TTCGGTTTCCGCTGGTCAG
HSP70-R3	ACGCCACATAAGAGGGAGTT
HSP70-F1	GTGCGGAGACTTAGAACAGC
HSP70-F2	TACCATACCCCGTGCTCGTT
HSP70-F3	AAGTTGTCTTTGTTCGGAGGAT

密码子使用率(RSCU)分析表明(表 2),UCU、AGA、CUU 出现的频率较高;UCG、CUA、AUA、UAG 等密码子出现次数相对较少。

瓶囊碘泡虫 HSP70 蛋白的预测分子量约为 72.5 kD,等电点为 5.37;由 20 种氨基酸组成,其中 Gly 最高占 8.8%,Trp 最低占 0.3%(表 3),负电荷残基(Asp+Glu)总个数为 98,正电荷残基(Arg+Lys)总个数为 83;HSP70 蛋白的不稳定指数为 42.05。该氨基酸 ORF 序列的第 6~382 位氨基酸位点发现 HSP70 家族的典型 NBD\_sugar-kinase\_HSP70\_actin superfamily 结构域(图 2),NCBI 比对显示与 *Nilaparvata lugens* (ADE34170.1),*Tachysurus fulvidraco* (ACR15181.1),*Brachionus plicatilis* (BAO23806.1),*Cotesia vestalis* (AGF34718.1),*Cuculus canorus* (KFO73662.1)和 *Anas platyrhynchos* (EOA96319.1)最为相似,相似度分别为 77%,78%,78%,78%,78%和 78%,相似物种的蛋白序列均属 HSPs 家族中的 HSPA8,故暂将瓶囊碘泡虫 HSP70 蛋白命名为 MaHSPA8。

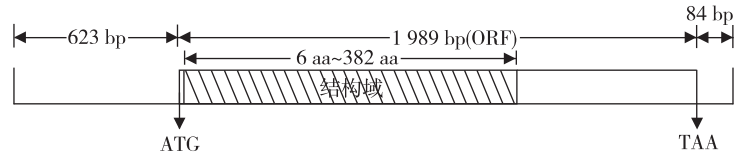


图 2 瓶囊碘泡虫 HSP70 基因结构示意图

Fig. 2 The schematic diagram of *M. ampullicapsulatus* HSP70 gene

表 2 瓶囊碘泡虫 HSP70 基因核酸序列相对同义密码子统计表

Tab. 2 Relative synonymous codon usage (RSCU) of *M. ampullicapsulatus* HSP70 gene

密码子	RSCU 值	密码子	RSCU 值	密码子	RSCU 值	密码子	RSCU 值
UCU	2.67	CAA	1.31	UGU	0.86	CUG	0.53
AGA	2.60	UGG	1.33	GUA	0.82	ACA	0.51
CUU	2.53	UAU	1.29	AAU	0.84	GAC	0.44
ACU	2.47	AAA	1.26	CAC	0.80	GCG	0.41
UAA	2.00	GCC	1.22	ACC	0.77	CGG	0.4
GGA	1.93	UUG	1.20	AAG	0.74	AGG	0.40
GUU	1.82	CAU	1.20	GCA	0.73	GAG	0.37
CCU	1.63	CCA	1.19	UAC	0.71	GGG	0.34
GCU	1.63	AAC	1.16	CAG	0.69	CCG	0.30
GAA	1.63	UGC	1.14	UGA	0.67	GGC	0.28
GAU	1.56	GUC	1.09	AGC	0.67	GUG	0.27
AUU	1.47	UCA	1.07	CGC	0.60	ACG	0.26
AUC	1.47	UUA	1.07	CGA	0.60	UCG	0.13
GGU	1.45	AUG	1.00	UUU	0.59	CUA	0.13
UUC	1.41	AGU	0.93	UCC	0.53	AUA	0.06
CGU	1.40	CCC	0.89	CUC	0.53	UAG	0.00

表 3 瓶囊碘泡虫 HSP70 蛋白的氨基酸组成比例

Tab. 3 Composition of amina acids of *M. ampullicapsulatus* HSP70

氨基酸	个数	比例	氨基酸	个数	比例	氨基酸	个数	比例	氨基酸	个数	比例
Ala	49	7.4%	Gln	26	3.9%	Leu	45	6.8%	Ser	41	6.2%
Arg	29	4.4%	Glu	54	8.2%	Lys	54	8.2%	Thr	44	6.6%
Asn	31	4.7%	Gly	58	8.8%	Met	13	2.0%	Trp	2	0.3%
Asp	44	6.6%	His	9	1.4%	Phe	29	4.4%	Tyr	11	1.7%
Cys	7	1.1%	Ile	46	6.9%	Pro	27	4.1%	Val	43	6.5%

ExPaSy 和 Bioedit 分析显示,瓶囊碘泡虫 HSP70 蛋白具有典型的亲水区,总平均亲水性为-0.435,表明该蛋白为亲水性蛋白(图 3)。TMHMM 软件预测蛋白的跨膜区域显示,瓶囊碘泡虫 HSP70 蛋白全部位于膜外(封二彩图 4),表明该蛋白为非跨膜蛋白。SingalP 分析显示,HSP70 蛋白的 C 值为 0.117,Y 值为 0.144,S 值为 0.253,平均为 0.146,小于 0.5(封二彩图 5);这表明该蛋白不存在信号肽及信号肽剪切位点,不是分泌蛋白。Target P 亚细胞定位预测显示,瓶囊碘泡虫 HSP70 蛋白为胞质蛋白。

### 2.3 HSP70 蛋白序列抗原表位预测

通过在线 B 淋巴细胞抗原表位预测软件,计算出瓶囊碘泡虫 HSP70 序列共有 24 个共同抗原表位(表 4),依据吴玉章等报道的方法<sup>[24]</sup>,确定 NH<sub>2</sub>-QKASQDGSGGMPGGMPGGMPGNFQGQGGFPGAGGQDSHP

GAGPTIEEVD-COOH 为最佳抗原表位。

### 3 讨论

HSP70 蛋白是热休克蛋白家族中最重要且最保守的一类蛋白,参与生物体正常生理和病理条件下不同的生物过程,它的蛋白序列的完整性对研究蛋白质的结构和功能具有重要的作用。本研究得到的瓶囊碘泡虫 HSP70 基因全长 2 696 bp,所编译的蛋白质含起始密码子 ATG(M;甲硫氨酸)和终止密码子 TAA,表明该基因序列的完整性<sup>[25]</sup>。其中,第 6~382 位氨基酸具有 HSP70 家族典型的 NBD\_sugar-kinase\_HSP70\_actin superfamily 结构域,且同其他物种同源物最高一致性达到 78% (原核生物同真核生物相比 HSP70 家族同源物之间氨基酸序列一致性约为 50%<sup>[4]</sup>),从而表明了该蛋白序列具有高度保守性。

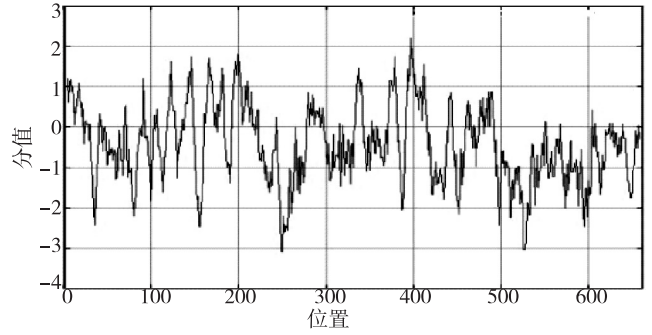


图 3 瓶囊碘泡虫 HSP70 蛋白序列的疏水性分析

Fig. 3 Hydrophobicity profile of *M. ampullicapsulatus* HSP70

表 4 瓶囊碘泡虫 HSP70 蛋白的 B 细胞优势表位确定

Tab. 4 Prevalent epitope of *M. ampullicapsulatus* HSP70

序号	表位起始位点	氨基酸序列	平均抗原指数
1	1~6	MSSAPA	0.66
2	32~44	DQGNRTTPSYVAF	1.04
3	49~68	RLIGDGAKNQVAMNPENTVF	0.7
4	79~84	EDKEVQ	0.66
5	96~101	SDHGKP	0.74
6	112~115	QFFP	0.59
7	130~134	TAEAY	0.38
8	149~162	YFNDSQRQATKDAG	0.93
9	176~180	PTAAA	0.54
10	186~193	DKKSATGS	1.01
11	223~236	ATTGDTHLGGEDFD	0.92
12	248~258	KRKNKKDISQN	0.76
13	343~346	RIPK	0.59
14	365~372	INPDEAVA	0.83
15	385~388	EKHD	0.64
16	406~411	ETAGG	0.36
17	420~439	TTIPTKKTQTFTTYSQNPQ	0.95
18	448~453	ERAMTK	0.75
19	464~475	SGIPPAPRGVPQ	1.29
20	493~514	VDKSSSKSQKITITNDKGRLSK	0.73
21	522~543	ESEKYKEEDEAIRDKVTAKNE	0.85
22	554~575	ALENQQITSKLDAGEVESCKKK	0.52
23	588~599	LASKEEFEAKRK	0.63
24	<b>610~662</b>	<b>QKASQDGS<del>G</del>MPG<del>G</del>MPG<del>G</del>MPG<del>G</del>MPNFGQGGFPAGGQDSHP<del>P</del>SAGPTIEEVD</b>	1.67

注:其中粗体代表优选抗原表位。

HSP70 家族中的 HSPA8 具有必不可少的持家基因功能,有研究报道由于 HSPA8 是细胞存活必须基因,致使 HSPA8 敲除小鼠不能存活<sup>[26]</sup>。HSPA8 蛋白可被携带  $\gamma\delta$  T 细胞受体的 T 细胞所识别,而且  $\gamma\delta$  T 细胞可以识别来自微生物的抗原(如 HSPs)和磷酸化细菌代谢物<sup>[27-28]</sup>。上述研究表明 HSPA8 蛋白可作为抗原参与病原与宿主之间的免疫应答反应。因此,可以推测 MaHSPA8 蛋白在瓶囊碘泡虫的存活、与宿主的相互识别等寄生生活中发挥着重要的生物学意义。

在本研究中,瓶囊碘泡虫的 HSP70 蛋白为胞质蛋白。研究还预测了瓶囊碘泡虫的最佳抗原表位,这为粘孢

子虫 *HSP70* 基因的抗原性研究提供了初步基础数据。在很多原虫病的防御中,*HSP70* 基因具有特有的分子伴侣功能、抗原呈递作用及超强的免疫原性,故而该基因已成为寄生虫疫苗构建及抗原筛选的首选基因<sup>[29]</sup>。医学原虫的研究表明:利氏曼原虫(*Leishmania infantum*)入侵宿主巨噬细胞后,*HSP70* 基因能刺激机体产生活跃的细胞免疫应答<sup>[30]</sup>;利用 *HSP70* 基因构建的弓形虫 DNA 疫苗具有高水平的保护性体液和细胞免疫力<sup>[31]</sup>;在水产养殖病害研究中,将刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)*HSP70* 和 iAg 组合,可诱导宿主体液免疫、细胞免疫以及 T 细胞增值反应从而有效预防刺激隐核虫的感染<sup>[32-33]</sup>。上述研究成果,尤其是刺激隐核虫的研究成果,尽管能为粘孢子虫病的防御研究提供参考,但粘孢子虫的致病机理仍然有待揭示,因此关于 *HSP70* 基因在粘孢子虫适应鱼体寄生生活中的作用还有待于进一步深入研究。

## 参考文献:

- [1] Daugaard M, Rohde M, Jäättelä M. The heat shock protein 70 family: highly homologous proteins with overlapping and distinct functions[J]. FEBS Letters, 2007, 581(19): 3702-3710.
- [2] Sung D Y, Vierling E, Guy C L. Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis Hsp70* gene family[J]. Plant Physiology, 2001, 126(2): 789-800.
- [3] Gebauer M, Zeiner M, Gehring U. Interference between proteins Hsp46 and Hop/p60, which bind to different domains of the molecular chaperone hsp70/hsc70[J]. Molecular and Cellular Biology, 1998, 18(11): 6238-6244.
- [4] Chen H S, Jia J, Su H F, et al. Downregulation of the constitutively expressed Hsc70 in diabetic myocardium is mediated by insulin deficiency[J]. Journal of Endocrinology, 2006, 190(2): 433-440.
- [5] Hartl F. Molecular chaperones in cellular protein folding [J]. Nature, 1996, 381(6583): 571-579.
- [6] Hartl F, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. [J]. Science, 2002, 295(5561): 1852-1858.
- [7] Beere H M. "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis[J]. Journal of Cell Science, 2004, 117(13): 2641-2651.
- [8] Kreiling J A, Creton R, Reinisch C. Early embryonic exposure to polychlorinated biphenyls disrupts heat-shock protein 70 cognate expression in zebrafish[J]. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 2007, 70(12): 1005-1013.
- [9] Bakkenist C J, Koreth J, Williams C S, et al. Heat shock cognate 70 mutations in sporadic breast carcinoma [J]. Cancer Research, 1999, 59(17): 4219-4221.
- [10] Kawada S, Ishii N. Peripheral venous occlusion causing cardiac hypertrophy and changes in biological parameters in rats[J]. European Journal of Applied Physiology, 2009, 105(6): 909-917.
- [11] Zhou Y B, Wang Y F, Zhang Y, et al. *In vitro* activity of cepharanthine hydrochloride against clinical wide-type and lamivudine-resistant hepatitis B virus isolates[J]. European Journal of Pharmacology, 2012, 683(13): 10-15.
- [12] Gromov P S, Celis J E. Identification of two molecular chaperons (HSX70, HSC70) in mature human erythrocytes[J]. Experimental Cell Research, 1991, 195(2): 556-559.
- [13] Boutet I, Tanguy A, Rousseau S, et al. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (hsp70) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Cell Stress and Chaperones, 2003, 8(1): 76-85.
- [14] Lo W Y, Liu K F, Liao I C, et al. Cloning and molecular characterization of heat shock cognate 70 from tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. Cell Stress and Chaperones, 2004, 9(4): 332-343.
- [15] Wu S H, Wang C, Chen J, et al. Isolation of a cDNA encoding a 70 kDa heat-shock cognate protein expressed in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Molecular Biology, 1994, 25(3): 577-583.
- [16] Mehlert A, Young D B. Biochemical and antigenic characterization of the Mycobacterium tuberculosis 71 kD antigen, a member of the 70 kD heat-shock protein family [J]. Molecular Microbiology, 1989, 3(2): 125-130.
- [17] Prange R, Werr M, Löffler-Mary H. Chaperones involved in hepatitis B virus morphogenesis [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1999, 380(3): 305-314.
- [18] Kakeya H, Udono H, Ikuno N, et al. A 77-kilodalton protein of *Cryptococcus neoformans*, a member of the heat shock protein 70 family, is a major antigen detected in the sera of mice with pulmonary cryptococcosis [J]. Infect Immun 1997, 65(5): 1653-1658.
- [19] Brunham R C, Peeling R, Maclean I, et al. Postabortal chlamydia trachomatis salpingitis: correlating risk with antigen-specific serological responses and with neutralization [J]. J Infect Dis, 1987, 155(4): 749-755.
- [20] Zhao Y J, Sun C Y, Michael L, et al. Description of *Myxobolus ampullicapulatus* sp. n. (Myxozoa: Myxobolidae) based on morphological and molecular data [J]. Journal of Parasitology, 2008, 94(3): 737-742.
- [21] Supamattaya K, Fischer-Scherl T H, Hoffmana R W. Renal sphaerosporosis in cultured grouper *Epinephelus malabaricus* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1990, 8(1): 35-38.
- [22] Feist S, Peeler E J, Gardiner R, et al. Proliferative kidney disease and renal myxosporidiosis in juvenile salmonida

- from rivers in England and Wales[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2002, 25(8): 451-458.
- [23] Munoz P, Sitja-Bobadilla A, Alvarez-Pellitero P. Immuno histochemical characterization of a polyclonal antibody against *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxosporea; Bivalvulida), a parasite from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) (Teleostei: Serranidae)[J]. *Parasitology Research*, 1988, 84(9): 733-740.
- [24] Wu Y Z, Zhu X H. A new approach for B-cell epitope prediction in viral proteins [J]. *Chinese Science Bulletin*, 1995, 40(9): 761-763.
- [25] Zhang Y Y, Yuan H R, Lu W Y, et al. A novel Omega-class glutathione S-transferase gene in *Apis cerana cerana*: molecular characterisation of GSTO2 and its protective effects in oxidative stress[J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2013, 18(4): 503-516.
- [26] Florin L, Becker K A, Sapp C, et al. Nuclear translocation of papillomavirus minor capsid protein L2 requires Hsc70 [J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(11): 5546-5553.
- [27] Kishi A, Ichinohe T, Hirai I, et al. The cell surface-expressed HSC70-like molecule preferentially reacts with the rat T-cell receptor V delta 6 family[J]. *Immunogenetics*, 2001, 53(5): 401-409.
- [28] Rajagopalan S, Zordan T, Tsokos G C, et al. Pathogenic anti-DNA autoantibody-inducing T helper cell lines from patients with active lupus nephritis: isolation of CD4<sup>+</sup> 8<sup>-</sup> T helper cell lines that express the gamma delta T-cell antigen receptor[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(18): 7020-7024.
- [29] Srivastava P K, Udono H, Blachere N E, et al. Heat shock proteins transfer peptide s during antigen processing and CTL priming[J]. *Immunogenetics*, 1994, 39(2): 93-98.
- [30] Rico A I, Del R G, Soto M, Soto M, et al. Characterization of the immunostimulatory properties of *Leishmania infantum* Hsp70 by fusion to the *Escherichia coli* maltose-binding protein in normal and nu/nuBAIB/cmice[J]. *Infection and Immunity*, 1998, 66(1): 347-352.
- [31] Fachado A, Rodriguez A, Angel S O, et al. Protective effect of a naked DNA vaccine cocktail against Lethal toxoplasmosis in mice[J]. *Vaccine*, 2003, 21(13/14): 1327-1335.
- [32] Josepriya T A, Chien K H, Lin H Y, et al. Immobilization antigen vaccine adjuvanted by parasitic heat shock protein 70C confers high protection in fish against cryptosporidiosis [J] *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 517-527.
- [33] Asea A, Kraeft S K, Kurt-Jones E A, et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine[J]. *Nat Med*, 2000, 6(4): 435-442.

## Animal Sciences

### Cloning, Identification and Functional Prediction of Heat Shock Protein 70 Gene in *Myxobolus ampullicapiculatus*

LIU Xiaocong, ZHAO Yuanjun, ZHANG Jinye

(Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

**Abstract:** HSP70s is group of heat shock proteins with molecular weight about 70 kD and play an important role during protecting cells or organism from being poisoned. In this study, one HSP70 family member's complete sequence of *Myxobolus ampullicapiculatus* was firstly cloned and analyzed by using bioinformatic approaches and genome walking technique so as to acquire its basic information, and bioinformatic methods were used to identify the gene and analysis its protein sequence. Results show that *M. ampullicapiculatus* HSP70 is the homology of HSPA8, named as MaHSPA8. *MaHSPA8*, the full length of which is 2 696 bp, encodes 662 amino acids with predicted molecular weight 72.5 kD, pI 5.3. Additionally, 24 potential antigenic sites were predicted for this protein, but it has no transmembrane region as well as signal peptide. All of these results would provide the foundational data for in depth research of the HSP70's role during the parasitic process of *M. ampullicapiculatus* in the fishes.

**Key words:** *Myxobolus ampullicapiculatus*; HSP70 gene; cloning; bioinformatics analysis

(责任编辑 方 兴)