

# 高温诱导对中间球海胆 *hsp70* 基因和 *hsp90* 基因的表达研究\*

白雪秋 庞震国 张伟杰 常亚青 高银雪 丁君

(大连海洋大学 农业部北方海水增养殖重点实验室 大连 116023)

**摘要** 以中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)作为实验对象,研究其在高温胁迫条件下热休克蛋白基因中 *hsp70* 基因和 *hsp90* 基因(以下简称 *hsp70* 和 *hsp90*)的响应。采用荧光实时定量 PCR 技术,检测 *hsp70* 和 *hsp90* 在 40 枚中间球海胆的不同组织(管足、体腔细胞、肠、性腺和口器)中的相对表达量,以及在海胆耐热家系和对照家系(共 240 枚)的管足组织中的相对表达量。结果显示:(1)中间球海胆的各组织中均有 *hsp70* 和 *hsp90* 基因的表达,且对温度急剧变化均有应答。高温诱导过程中,海胆管足、体腔细胞和肠组织中 *hsp70* 和 *hsp90* 基因的相对表达量经过 6h(29°C)达到最大值且显著高于其初始值( $P < 0.05$ );性腺中 *hsp70* 和 *hsp90* 基因的相对表达量分别经过 12h(24°C)和 24h(22°C)达到最大值;口器中两个基因的相对表达量都经过 12h 达到最大值。(2)高温诱导过程中,*hsp70* 和 *hsp90* 基因在海胆体腔细胞和管足中的表达趋势相似,且表达量在各时间点的相对差异不显著( $P > 0.05$ )。(3)高温诱导过程中,*hsp70* 基因在海胆耐热家系和对照家系中的表达趋势均为先升高后降低,且耐热家系和对照家系间各时间点的相对表达量没有显著差异( $P > 0.05$ );*hsp90* 基因的表达量随温度的变化呈现先升高后降低的趋势,诱导 12h 时在 2 个耐热家系中的相对表达量显著高于 2 个对照家系( $P < 0.05$ )。结果表明,温度变化会显著影响中间球海胆 *hsp90* 基因的表达,*hsp90* 基因可作为中间球海胆耐热品系选育的候选指示因子。

**关键词** 中间球海胆; *hsp70*; *hsp90*; 温度; 实时荧光定量 PCR

**中图分类号** Q958.8 **doi:** 10.11693/hyhz20141200366

中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)主要分布于日本的北海道和俄罗斯远东地区的海域(常亚青等, 2004),具有生长快和性腺品质好等优点,1989 年由大连海洋大学从日本引入我国,目前已成为我国最具有经济价值的海胆种类之一(Ding *et al.*, 2007)。温度是影响海洋动物生长和生理活动的重要因素(Burge *et al.*, 2014),温度直接影响中间球海胆的生长发育、摄食代谢、繁殖存活、性腺产量和品质等(常亚青等, 1999; 马福恒, 2002)。中间球海胆在原产地的生存水温为-2—25°C,在 15°C 左右摄食最为活跃,超过 23°C 即可导致生长减慢、疾病暴发甚至大

量死亡(常亚青等, 2004)。热休克蛋白(Heat Shock Protein)是一种高度保守的蛋白质,其主要的功能是作为分子伴侣,防止蛋白折叠、重新折叠变性蛋白及将变性蛋白降解等。根据分子量不同,热休克蛋白可分为 HSP90、HSP70、HSP60、HSP40 和小分子量的 HSP 蛋白。HSP70 蛋白和 HSP90 蛋白是热休克蛋白家族中的重要成员,通过在应激反应中快速调节细胞的防御体系使细胞得到修复和保护,对可能造成蛋白质损伤的环境因素产生诱导性表达,可以用来分析生物对环境变化的响应(董云伟等, 2008; 于姗姗等, 2012)。HSPs 蛋白家族成员在凋亡体形成的不同

\*国家高技术研究发展计划(863)重大项目, 2012AA10A412 号; 辽宁省农业攻关及成果产业化项目, 2015203003 号。白雪秋, 硕士研究生, E-mail: baixue135qiu@sina.cn

通讯作者: 丁君, 研究员, 硕士生导师, E-mail: dingjun1119@dlou.edu.cn

收稿日期: 2014-12-31, 收修改稿日期: 2015-05-13

阶段发挥阻断作用, HSP70 蛋白作为分子伴侣可以通过阻断细胞色素 c 的释放、阻断 Apaf-1 寡聚化及阻断 caspase-9 的活化等多种方式阻断凋亡体的形成, 因而认为 *hsp70* 基因(简称 *hsp70*)的表达能保护细胞免受热激引起凋亡(Mosser *et al.*, 2000; Saleh *et al.*, 2000); *hsp90* 基因(简称 *hsp90*)则通过阻断 Apaf-1 寡聚化, 参与阻断凋亡体的形成(Yahara, 1998)。温度变化可诱导海胆(*Paracentrotus lividus*)(Matranga *et al.*, 2000)和海参(*Apostichopus japonicus*)(Dong *et al.*, 2007)*hsps* 的表达。Matranga 等(2002)用 *hsp70* 作为胁迫标记通过海胆体腔细胞来分析海胆对温度胁迫、酸性 pH 和重金属的响应。Dong 等(2007)发现高温胁迫幼参影响 *hsp70* 的表达量。吉成龙等(2011)报道在 28°C 的热激条件下刺参体壁中 *hsp70* 的表达量增加。Zhao 等(2014)通过加入捕食者来研究海胆的遮蔽行为中 *hsp70* 的表达量差异。Osovitz 等(2005)研究了环境温度对紫色球海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)管足组织 *hsp70* 基因表达的影响。本研究对中间球海胆在高温胁迫条件下 *hsp70* 和 *hsp90* 基因的表达差异进行初步研究, 在分子水平上探究海胆的耐热性能, 阐释海胆中热休克蛋白对高温诱导的响应。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

实验所需中间球海胆均取自农业部北方海水增殖重点实验室。

**1.1.1 海胆不同组织样品** 从健康海胆随机选取 40 枚[壳径为(43.09±0.53)mm, 体重为(32.15±0.36)g], 用于海胆的不同组织中 *hsp70*、*hsp90* 基因的表达研究。

**1.1.2 海胆不同家系样品** 从 11 月龄的海胆耐热品系中随机选取 3 个家系(2013Si1-1, 2013Si7-2, 2013Si13-2), 并与 3 个对照家系(2013SiC-3, 2013SiC-5, 2013SiC-6)共同用于研究 *hsp70*、*hsp90* 基因在海胆不同家系中的表达, 每个家系随机选取 40 枚海胆[壳径为(16.32±0.63)mm, 体重为(2.02±0.20)g], 共 240 枚。

### 1.2 温度处理

将实验海胆置于同一个升温水槽内进行升温实验。初始温度为 19°C(0h), 温度以每 0.5h 升高 2°C, 升至 29°C, 然后维持至 6h 后让水温自然回落。分别在实验开始 0h、1.5h、3h、6h、12h、24h、48h 的时间点取样(常亚青等, 1999; 马福恒, 2002)。

### 1.3 样品采集

用于不同组织实验海胆的取样组织部位为海胆

管足、体腔细胞(离心体腔液得到)、口器、性腺和肠, 将样品收集于 1.5mL RNase 离心管中, 经液氮冷冻后, 存于-80°C 冰箱保存。

海胆耐热家系和对照家系的取样部位为海胆管足, 将海胆管足样品存于 1.5mL RNase 离心管后迅速用液氮冷冻, 于-80°C 冰箱保存。

其中每个海胆单独采集样品, 然后将每 5 个生物学重复的样品等量混合后进行 RNA 提取, 用于后续实验。

### 1.4 总 RNA 的提取及 cDNA 的制备

将冻存的组织取出 10—20mg, 提取总 RNA(RNA 提取试剂盒, 天根生化科技有限公司, 北京)。1%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, NV3000 spectrophotometer 检测 RNA 纯度及浓度, 将符合实验要求的 RNA 溶液冻存于-80°C 冰箱中备用。

PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa, 中国大连)试剂盒进行反转录。20μL 反应体系包含 4μL 5× PrimeScript™ buffer, 1μL PrimeScript™ RT enzyme Mix I, 25pmol Oligo dT Primer, 50pmol Random 6 mers, 500ng Total RNA, RNase Free ddH<sub>2</sub>O 补足至 20μL。样品混匀后在 PCR 仪上进行反转录, 条件为 37°C 15min, 85°C 5s。

### 1.5 引物设计筛选及 RT-PCR

采用 primer premier5.0(韩俊英等, 2011)软件对每个基因设计实时荧光定量 PCR 引物, 检测其引物特异性及扩增效率, 经过筛选每个基因各得到一对特异性引物, 引物序列信息见表 1, 引物于上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 RT-PCR 引物序列信息  
Tab.1 RT-PCR primer sequence information

基因	引物序列(5'→3')
<i>hsp70</i> -F	ACACTCATCTCGGAGGAG
<i>hsp70</i> -R	CTTTCTATGCTTTTCGCTTGA
<i>hsp90</i> -F	CCCACCAGACCATTATCA
<i>hsp90</i> -R	TCTCAGCCTTCTCCATTT
18S rRNA-F	GTTCGAAGGCGATCAGATAC
18S rRNA-F	CTGTCAATCCTCACTGTGTC

利用 RT-PCR 研究 *hsp70* 和 *hsp90* 在中间球海胆各组织中的表达量, 使用 SYBR® Premix Ex Taq™ II Kit (*Tli* RNaseH Plus, TaKaRa)试剂盒, 在 Applied Biosystems 7500 real-time PCR system(Life Technologies, USA) 上进行荧光定量 PCR。20μL 反应体系为 10μL 2×SYBR Premix Ex Taq™ II (*Tli*

RNaseH Plus), 0.4μL ROX Reference Dye II, 1μL cDNA 模板, 上下游引物各 0.4μL, ddH<sub>2</sub>O 补足至 20μL。反应程序为 95°C 30s, 40 个循环的 95°C 5s, 60°C 32s;溶解曲线阶段 95°C 30s, 60°C 1min, 95°C 15s。以 18SrRNA 为内参基因, 采用 2<sup>-Ct</sup> 法计算目的基因的相对表达水平。

### 1.6 数据处理

用 SPSS17.0 对实验数据进行统计分析, 通过正态分布和方差同质性检验, 验证各实验数据之间有无明显交互作用后, 单因素方差分析(ANOVA)和 Duncan 多重比较用于比较不同样品的数据差异的显著性,  $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 RNA 提取结果及引物筛选结果

将提取的 RNA 进行 RNA 完整性检测, 经 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测分析, 由图 1 可知, 样品电泳后所得到的条带显示 28S, 18S 条带清晰, 且 28S 条带的亮度明显高于 18S。表明提取的 RNA 完整性良好, 符合后续实验要求。

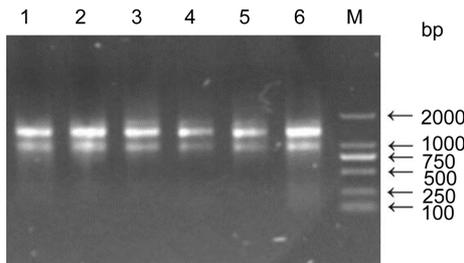


图 1 海胆部分样品 RNA 的琼脂糖电泳图  
Fig.1 Agarose electrophoresis pattern of RNA  
1—6 点样口为海胆样品

### 2.2 高温诱导对海胆不同组织中 *hsps* 表达的影响

在高温诱导过程中, 以 *hsp70* 和 *hsp90* 基因在海胆各组织中 0 时刻的表达量作为初始值。*hsp70* 和 *hsp90* 在海胆的管足、体腔细胞和肠组织中的表达趋势基本相同, 即随着温度其相对表达量迅速升高, 在温度达到设置的最高温度(29°C)时其相对表达量也均达到最大且显著高于其初始值( $P < 0.05$ ), 其中在实验进行至 6h 时, 海胆管足中 *hsp70* 和 *hsp90* 的相对表达量分别高于初始值 236 倍和 109 倍。

性腺中 *hsp70* 的相对表达量经过 12h 达到最大值, 为 106.56; *hsp90* 的相对表达量经过 24h 达到最高, 为 45.33, 且显著高于其初始值( $P < 0.05$ )。口器中 *hsp70* 和 *hsp90* 两基因的相对表达量均经过 12h 达到最大值,

分别为 145.55 和 45.56, 显著高于其初始值( $P < 0.05$ ) (图 2, 图 3)。

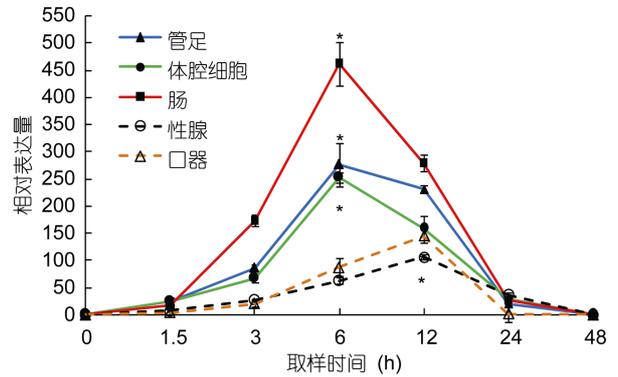


图 2 中间球海胆不同组织中 *hsp70* 的相对表达量  
Fig.2 Relative expression of *hsp70* in different tissues of *S. intermedius*

\*代表同一组织样中此时间点的相对表达量与初始值相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。横坐标为实验开始后取样进行的时间点, 纵坐标为基因的相对表达量。下同

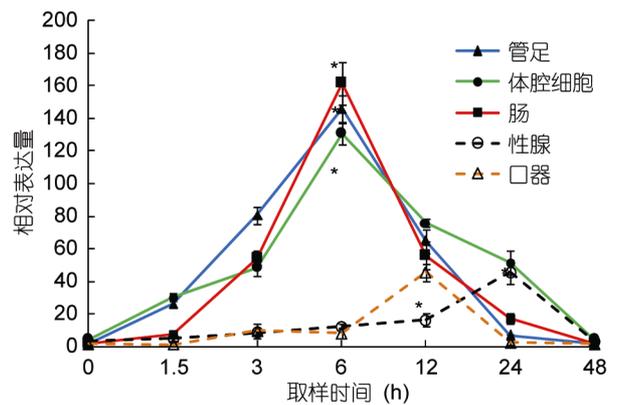


图 3 中间球海胆不同组织中 *hsp90* 的相对表达量  
Fig.3 Relative expression of *hsp90* in different tissues of *S. intermedius*

### 2.3 高温诱导对中间球海胆不同家系中 *hsps* 表达的影响

图 4 为中间球海胆耐热家系和对照家系中 *hsp70* 基因的荧光定量表达结果, 各组以 0h 的 *hsp70* 表达量作为初始值。在实验过程中, 耐热家系(2013Si1-1, 2013Si7-2, 2013Si13-2) 和对照家系(2013SiC-3, 2013SiC-5, 2013SiC-6)中 *hsp70* 的表达趋势基本相同, 从适宜水温 19°C(0h)升至 29°C(3h)的过程中, *hsp70* 的相对表达量均逐渐升高并在 29°C 时出现最大值(分别为 329.75、97.29、239.31、230.02、120.51、194.75), 且显著高于其初始值( $P < 0.05$ )。在 0h、1.5h、6h、24h 和 48h, 6 个家系之间 *hsp70* 基因的相对表达量差异不

显著( $P>0.05$ )。在 3h 耐热家系 2013Si7-2 和对照家系 2013SiC-5, 耐热家系 2013Si13-2 和对照家系 2013SiC-3 之间 *hsp70* 基因的相对表达量显著不显著( $P>0.05$ )。在温度维持在 29°C 的过程中 *hsp70* 的相对表达量逐渐下降, 且在随后的温度逐渐自然回落的过程中, *hsp70* 的相对表达量出现了明显的下降并在实验开始后 48h(19°C)降至接近初始值。

高温诱导对中间球海胆 *hsp90* 基因表达的影响如图 5 所示, 其中各组以 0h 的 *hsp90* 表达量作为初始值。在实验过程中, *hsp90* 的相对表达量均有不同程度的增加, 各组达到最大值的时间点不同, 并且随着温度的变化其表达趋势也不同。 *hsp90* 在这 6 组中均随着温度而升高, 虽然每组 *hsp90* 的相对表达量达到最大值的时间点有差异, 但三个耐热家系和一个对照家系(2013SiC-5)的相对表达量的最大值均显著高于其初始值( $P<0.05$ )。由图 5 可看出, 耐热家系在高温

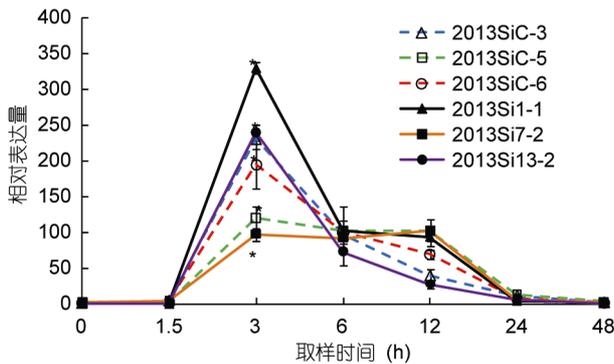


图 4 中间球海胆不同家系中 *hsp70* 基因的相对表达量  
Fig.4 Relative expression of *hsp70* in different chains of *S. intermedius*

耐热家系 2013Si1-1、2013Si7-2、2013Si13-2; 对照家系 2013SiC-3、2013SiC-5、2013SiC-6。下同

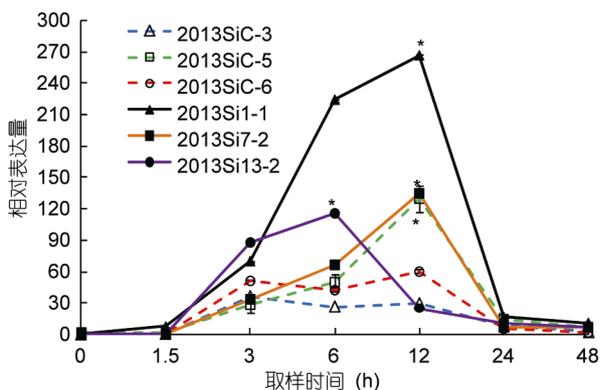


图 5 中间球海胆不同家系中 *hsp90* 基因的相对表达量  
Fig.5 Relative expression of *hsp90* in different chains of *S. intermedius*

诱导过程中, *hsp90* 的相对表达量增加的速率明显快于对照家系, 且耐热家系(2013Si1-1 和 2013Si7-2)在 12h 的相对表达量显著高于对照家系(2013SiC-3 和 2013SiC-6) ( $P<0.05$ )。在实验开始后 48h(19°C), 6 个家系中 *hsp90* 的相对表达量均降至接近初始值。

### 3 讨论

#### 3.1 高温诱导对中间球海胆不同组织中 *hsps* 表达的影响

热休克蛋白作为分子伴侣与胞内多肽形成复合物, 有助于蛋白质折叠、防止蛋白质聚集和胞内蛋白质运输, 满足细胞最基本的生存功能(Pratt *et al.*, 2003)。本研究对中间球海胆 *hsp70* 和 *hsp90* 基因的组织特异性表达进行了分析, 结果表明, 所检测的 5 个不同组织(管足、体腔细胞、肠、性腺和口器)中均有 *hsp70* 和 *hsp90* 的表达。在正常条件下, 海胆能合成 *hsp70* 和 *hsp90*。

以往对 *hsp70* 和 *hsp90* 基因在生物体不同组织中的表达也有研究报道。周鑫等(2013)报道了草鱼热休克蛋白组织特异性表达与不同组织对温度变化的敏感和耐受程度有关; 黄桂菊等(2007)研究高温刺激合浦珠母贝不同组织中热休克蛋白 *hsp70* 的表达量, 结果显示, *hsp70* 的表达量大小依次为鳃、消化腺、外套膜、闭壳肌、性腺; 韩俊英等(2011)通过 RT-PCR 对 *hsp70* 在脊尾白虾的肝胰腺和肌肉中的表达分析发现, 温度引起该基因的高表达, 且在肝胰腺中的高表达时间相对肌肉较早, 肝胰腺胁迫比肌肉较敏感。本研究结果显示, 当温度升高后, 海胆 *hsp70* 基因在各组织中的表达均发生了变化, 由图 2 和图 3 可知, *hsp70* 和 *hsp90* 在口器和性腺中的表达趋势不同于管足、体腔细胞和肠, 且 *hsp70* 和 *hsp90* 的相对表达量也明显低于后三者, 与黄桂菊等(2007)和韩俊英等(2011)的实验结果相似, 推测 *hsp70* 和 *hsp90* 在中间球海胆的管足、体腔细胞和肠三种组织中优先转录和表达, 可见各组织对高温产生应激的次序和程度存在差异。

#### 3.2 高温诱导对中间球海胆不同家系中 *hsps* 表达的影响

体腔细胞多用于研究生物体对环境胁迫的敏感响应(Matranga *et al.*, 2000), 小个体海胆不能提供足量的体腔液, 而海胆的选育工作通常在个体较小的早期进行。管足是棘皮动物水管系统的主要组成部分(常亚青等, 2004), 易于获取, 且可活体取样, 对海胆伤害较小。本实验研究了海胆的管足和体腔细胞中

*hsp70* 和 *hsp90* 基因的相对表达量, 结果显示这两个基因在管足和体腔细胞中的表达趋势相似, 且在各个时间点的相对表达量差异不显著( $P>0.05$ )。Osovitz 等(2005)也曾用管足组织研究了环境温度对紫色球海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*) *hsp70* 表达的影响。因此本研究以管足作为样本进行海胆耐热家系和对照家系 *hsps* 的相关研究。

高温诱导条件下, *hsp70* 和 *hsp90* 作为分子伴侣在阻止细胞凋亡的过程中扮演着不同的角色(Yahara, 1998; Mosser *et al.*, 2000; Saleh *et al.*, 2000), 因此如果用内源 *hsps* 作为环境热应激的指标, 应该将不同类型 *hsps* 分开研究。Wang 等(2014)报道, 急性热应激和渗透压胁迫对刺参 *hsp70*、*hsp90* 和 *sod* 基因表达的影响。董云伟等(2008)发现, 刺参的 *hsp70* 的表达量在温度升高后立即升高; 曲凌云等(2005)报道, 高温刺激栉孔扇贝后, 其血淋巴细胞中 *hsp70* 的表达量逐渐升高。本研究结果显示, 海胆耐热家系和对照家系中 *hsp70* 的表达量在温度升高过程中逐渐增加, 与两位研究者的结论一致, 推测海胆在受到温度升高刺激时, 机体迅速合成 *hsps*, 从而可以增强机体的应激耐受性以保护组织细胞(Matrange *et al.*, 2002)。

Dong 等(2008)指出刺参在 30°C 预处理后, 其耐受性的变化与 *hsps* 的变化模式一致。Dubeau 等(1998)指出鲑鱼(*Salmo salar*)成活率的提高与 *hsps* 水平在热激后显著升高有直接关系。本研究高温诱导过程中, *hsp70* 基因在海胆耐热家系和对照家系中的表达未出现明显差异( $P>0.05$ ); *hsp90* 在耐热家系中的相对表达量增加的速率明显比对照家系的快, 且在 12h(温度升至最高的时间点)耐热家系(2013Si1-1 和 2013Si7-2)的相对表达量显著高于对照家系(2013SiC-3 和 2013SiC-6)( $P<0.05$ ); 而在耐热家系 2013Si13-2 中该基因的相对表达量高于对照家系中 2013SiC-5 的原因可能是由于本研究的中间球海胆耐热家系和对照家系的样本都是从耐热家系总体和未经过筛选的家系总体中随机挑选的, 所以两个总体内部的样本点之间也会存在差异(组内方差), 对照家系也会存在潜在的“耐热家系”。综上所述, *hsp90* 基因可作为中间球海胆耐热品系选育的候选指示因子。在后续的研究中, 还将对在高温诱导条件下 *hsp70*、*hsp90* 基因与海胆活性及死亡率的相关性进行进一步验证, 为中间球海胆耐热品系的快速选育提供参考。

### 3.3 *Hsps* 基因表达的时序性

*hsp70* 和 *hsp90* 这两个基因的表达具有时序性,

在高温环境条件下, 机体合成热休克蛋白作为分子伴侣防止变性蛋白被降解(董云伟等, 2008), 并且 *hsp70* 和 *hsp90* 对凋亡体形成的不同阶段发挥各自的阻断作用(Mosser *et al.*, 2000; Saleh *et al.*, 2000)。仿刺参经热激 72h 后 *hsp70* 表达量降至初始值(Dong *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2011)。Roberts 等(1997)也指出 *hsps* 的表达具有可塑性, 且与环境因子有关。本研究结果也显示, *hsp70* 和 *hsp90* 基因在中间球海胆中均出现时序性表达, 性腺中 *hsp70* 和 *hsp90* 达到最大值的时间点也不相同, *hsp90* 较 *hsp70* 延迟; 在海胆耐热家系和对照家系中, *hsp70* 基因的表达量在升温过程中的 3h 达到最大值, *hsp90* 基因的表达量达到最高值的时间点不同。说明 HSP70 和 HSP90 虽都是热休克蛋白家族的成员, 但在海胆耐热诱导过程中响应不同。

### 参 考 文 献

- 于姗姗, 王青林, 孟宪亮等, 2012. 盐度骤变对仿刺参 *hsp70* 及 *hsp90* 基因表达的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 42(9): 22—27
- 马福恒, 2002. 盐度和温度对中间球海胆摄食与存活的影响. 水产科学, 21(6): 1—3
- 吉成龙, 孙国华, 杨建敏等, 2011. 刺参 (*Apostichopus japonicus*) 高温胁迫消减 cDNA 文库的构建与分析. 海洋与湖沼, 42(1): 60—66
- 曲凌云, 相建海, 孙修勤等, 2005. 温度刺激下栉孔扇贝不同组织热休克蛋白 HSP70 的表达研究. 高技术通讯, 15(5): 96—100
- 周 鑫, 董云伟, 王 芳等, 2013. 草鱼 *hsp70* 和 *hsp90* 对温度急性变化的响应. 水产学报, 37(2): 216—221
- 常亚青, 丁 君, 宋 坚等, 2004. 海参、海胆的生物学研究与养殖. 北京: 海洋出版社, 217—218
- 常亚青, 王子臣, 王国江, 1999. 温度和藻类饵料对虾夷马粪海胆摄食及生长的影响. 水产学报, 23(1): 69—76
- 黄桂菊, 曲妮妮, 喻达辉等, 2007. 合浦珠母贝热休克蛋白 *hsp70* 基因的克隆与表达分析. 中国水产科学, 14(5): 726—732
- 董云伟, 董双林, 纪婷婷, 2008. 水生动物热休克蛋白研究进展. 中国海洋大学学报(自然科学版), 38(1): 39—44
- 韩俊英, 李 健, 李吉涛等, 2011. 脊尾白虾热休克蛋白 HSP70 基因的克隆及其表达分析. 水产学报, 35(8): 1130—1138
- Burge C A, Eakin C M, Friedman C S *et al.*, 2014. Climate change influences on marine infectious diseases: implication for management and society. *Annu Rev Mar Sci*, 6: 249—277
- Ding J, Chang Y Q, Wang C H *et al.*, 2007. Evaluation of the growth and heterosis of hybrids among three commercially important sea urchins in China: *Strongylocentrotus nudus*, *S. intermedius* and *Anthocidaris crassispina*. *Aquaculture*, 272(1—4): 273—280
- Dong Y W, Ji T T, Dong S L, 2007. Stress responses to rapid temperature changes of the juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka). *Journal of Ocean*

- University of China, 6(3): 275—280
- Dong Y W, Dong S L, 2008. Induced thermotolerance and expression of heat shock protein 70 in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fisheries Science*, 74(3): 573—578
- DuBeau S F, Pan F, Tremblay G C *et al*, 1998. Thermal shock of salmon in vivo induces the heat shock protein hsp 70 and confers protection against osmotic shock. *Aquaculture*, 168(1—4): 311—323
- Matranga V, Bonaventura R, Di B G, 2002. *Hsp70* as a stress marker of sea urchin coelomocytes in short term cultures. *Cell Molecular Biology (Noisy-le-grand)*, 48(4): 345—349
- Matranga V, Toia G, Bonaventura R *et al*, 2000. Cellular and biochemical responses to environmental and experimentally induced stress in sea urchin coelomocytes. *Cell Stress and Chaperones*, 5(2): 113—120
- Meng X L, Dong Y W, Dong S L *et al*, 2011. Mortality of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka, exposed to acute salinity decrease and related physiological responses: Osmoregulation and heat shock protein expression. *Aquaculture*, 316(1—4): 88—92
- Mosser D D, Caron A W, Bourget L *et al*, 2000. The chaperone function of *hsp70* is required for protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 20(19): 7146—7159
- Osovitz C J, Hofmann G E, 2005. Thermal history-dependent expression of the *hsp70* gene in purple sea urchins: Biogeographic patterns and the effect of temperature acclimation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 327(2): 134—143
- Pratt W B, Toft D O, 2003. Regulation of signaling protein function and trafficking by the *hsp90/hsp70*-based chaperone machinery. *Experimental Biology and Medicine*, 228(2): 111—133
- Roberts D A, Hofmann G E, Somero G N, 1997. Heat-shock protein expression in *Mytilus californianus*: acclimatization (seasonal and tidal-height comparisons) and acclimation effects. *Biological Bulletin*, 192(2): 309—320
- Saleh A, Srinivasula S M, Balkir L *et al*, 2000. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by *Hsp70*. *Nature Cell Biology*, 2(8): 476—483
- Wang Q L, Yu S S, Qin C X *et al*, 2014. Combined effects of acute thermal and hypo-osmotic stresses on osmolality and *hsp70*, *hsp90* and *sod* expression in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka. *Aquaculture international*, 22(3): 1149—1161
- Yahara I, 1998. Structure and function of molecular chaperones: Functions of HSP90, a major stress protein. *Neuroscience Research*, 31(1): S15
- Zhang W J, Zhao C, Liu P J *et al*, 2010. First report on tube feet differential pigmentation in the cultivated sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* (Agassiz, 1863) and its relationship with growth performance. *Aquaculture Research*, 41(10): e706—e708
- Zhao C, Ji N J, Zhang B L *et al*, 2014. Effects of covering behavior and exposure to a predatory crab *Charybdis japonica* on survival and HSP70 expression of juvenile sea urchins *Strongylocentrotus intermedius*. *PLoS One*, 9(5): e97840

## RELATIVE EXPRESSION OF GENES *HSP70* AND *HSP90* IN SEA URCHIN *STRONGYLOCENTROTUS INTERMEDIUS* IN THERMAL STRESS

BAI Xue-Qiu, PANG Zhen-Guo, ZHANG Wei-Jie, CHANG Ya-Qing, GAO Yin-Xue, DING Jun  
(Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture,  
Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

**Abstract** To understand the response behavior of heat shock proteins (*hsp70* and *hsp90*) under thermal stress in sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*, we determined the relative expression quantity of *hsp70* and *hsp90* in adult urchin tissues (including tube-feet, coelomocytes, intestine, gonad and lantern using the RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction). Different expressions of the two genes between thermal-tolerant chains and control ones were compared especially in tube feet. The results show that the two genes are expressed ubiquitously in various adult tissues and responded quickly to the thermal stress. Relative expressions of the genes in tube feet, coelomocytes, and intestine of sea urchins reached their highest levels in 6h (29°C), which is significantly higher than the control points ( $P < 0.05$ ). The relative expression of *hsp70* and *hsp90* reached the maximum in 12h (24°C) and 24h (22°C) respectively in gonads. Relative expression of the two genes reached maximum at 12h in lantern. In tube feet and coelomocytes, the expression trends of *hsp70* and *hsp90* were quite similar and no significant difference was found in different time ( $P > 0.05$ ). The expression of *hsp70* increased gradually from the beginning of experiment, then decreased despite of temperature variation, and no significant difference between heat-resistant and control sea urchin chains at all the time points ( $P > 0.05$ ). In heat-resistant chains, the expression of *hsp90* increased at first, and then decreased gradually at 12h, but the expression of *hsp90* in the two heat-resistant chains were higher than the two control ones ( $P < 0.05$ ). The result indicates that thermal stress can significantly affect the expression of *hsp90*; and therefore, *hsp90* can be used as an internal thermal-tolerant indicator in heat-resistant selection breeding of *S. intermedius*.

**Key words** *Strongylocentrotus intermedius*; *hsp70*; *hsp90*; temperature; RT-PCR