

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2012.00634

尼罗罗非鱼 *TCP-1-beta* 和 *TCP-1-eta* 的分子特征 及其低温诱导表达

谢建丽^{1,2} 林勇³ 曾兰³ 王忠卫¹ 桂建芳¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3. 广西壮族自治区水产研究所, 南宁 530021)

摘要: 为了研究尼罗罗非鱼耐寒性状的分子基础并为耐寒品种选育提供参考, 研究从尼罗罗非鱼中克隆了 HSP60 家族 *TCP-1-beta* 和 *TCP-1-eta* 基因并对其在低温诱导下的表达特征进行了分析。尼罗罗非鱼 *TCP-1-beta* cDNA 长度为 1755 bp, 包括 1605 bp 的完整开放阅读框, 编码 534 个氨基酸; 尼罗罗非鱼 *TCP-1-eta* cDNA 长度 1651 bp, 包括 1638 bp 的完整开放阅读框, 编码 545 个氨基酸。与其他物种同源基因的蛋白序列比对结果显示, *TCP-1-beta* 和 *TCP-1-eta* 蛋白在物种间同源性很高, 且都具有保守的 ATP 结合结构域等, 预示其在物种间功能的保守性。实时荧光定量 PCR 结果表明: *TCP-1-beta* 和 *TCP-1-eta* 在各组织中呈遍在表达, 但在肌肉中表达量最高; 诱导温度从 22°C 降至 12°C, 不同低温诱导 48h 后 *TCP-1-beta* 和 *TCP-1-eta* 均呈上调表达, 在 18°C 时表达开始上调, 随着低温胁迫程度加强, 表达上调幅度增大, 至 12°C 时表达量达到最高, *TCP-1-beta* 和 *TCP-1-eta* 上调幅度分别达到常温的 12.2 倍和 10.7 倍。这些结果预示在尼罗罗非鱼中, *TCP-1-beta* 和 *TCP-1-eta* 是潜在的耐寒相关基因。

关键词: 尼罗罗非鱼; *TCP-1-beta*; *TCP-1-eta*; 实时荧光定量 PCR; 低温; 诱导表达

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2012)04-0634-06

罗非鱼(*Oreochromis, tilapia*)原产于非洲, 是热带、亚热带暖水性鱼类, 是当前淡水养殖业的重要养殖品种之一, 但我国亚热带地区罗非鱼养殖缺乏耐寒品种, 在寒灾和早春期间罗非鱼因低温出现大量死亡, 造成巨大的经济损失^[1]。目前, 对于罗非鱼耐寒的研究主要集中在通过种间杂交改善罗非鱼的抗低温能力^[2-4], 例如尼罗罗非鱼和奥里亚罗非鱼的杂交后代奥尼罗非鱼的耐寒能力比尼罗罗非鱼强并且具有很好的耐盐性^[5]。但是, 对于鱼类耐寒的分子机制知之甚少。

CCT 蛋白(Chaperonins containing TCP-1(t-complex polypeptide 1))属于 Hsp60 家族 II 类亚族, 存在于古细菌(Thermosome)^[6]和真核细胞质(TriC, the TCP-1 ring complex)^[7-9]。真核细胞质中 TriC 是双层环构

成的柱状复合物, 每个环由 8 个序列相关、分子量为 60 kD 的亚基构成(TCP-1-alpha 到 TCP-1-theta), 以 ATP 依赖的方式辅助其他蛋白的正确折叠^[10]。大量研究表明, *TCP-1* 与生物体的耐寒力相关, 如酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)*TCP-1-alpha* 和 *TCP-1-beta* 的低温诱导表达模式显示 *TCP-1* 是一种冷激表达蛋白^[11]; 在葱蝇(*Delia antiqua*)幼虫中 *TCP-1* 的上调表达与其耐寒能力增强相关^[12]; 肉蝇(*Sarcophaga crassipalpis*)滞育期的热休克蛋白如 *TCP-1*、*Hsp70* 家族等的上调表达与其低温存活能力密切相关^[13]。

本研究克隆了尼罗罗非鱼的 *TCP-1-beta* 和 *TCP-1-eta* 的完整编码序列, 并对其不同组织和不同低温诱导下的表达图式进行了分析, 为进一步研究鱼类 *TCP-1-beta* 和 *TCP-1-eta* 在低温条件下的作用机制

收稿日期: 2011-05-03; 修订日期: 2012-03-15

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(200903046-03); 国家科技支撑计划(2008BADB9B02)资助

作者简介: 谢建丽(1985—), 女, 河南南阳人; 遗传学硕士; 主要从事鱼类遗传学研究。E-mail: ruilix1108@gmail.com

通讯作者: 桂建芳, 研究方向为鱼类发育遗传学与细胞工程学。E-mail: jfgui@ihb.ac.cn

奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验尼罗罗非鱼来自广西南宁国家级罗非鱼良种场, 养殖时间 2 个月, 规格 35—45 g。实验前于实验室常温暂养 7d。采集常温下尼罗罗非鱼的脾脏、肠、肾脏、心脏、脑、肌肉和肝胰腺置于液氮中冻存。暂养结束时, 挑选健康个体分 4 组进行低温诱导实验^[14], 四个实验组目的温度分别为 18℃、16℃、14℃和 12℃, 从 22℃开始控制降温, 每 6h 降低 1℃, 降至目的温度并保持 48h, 然后快速剪下肝胰腺组织置于液氮中冻存。

1.2 实验方法

RNA 提取与 cDNA 合成 将液氮冻存的组织样品放入研钵里充分研磨, 等液氮挥发之后立即把样品转进装有 175 μL RNA Lysis Buffer 的离心管中, 颠倒混匀, 按照 promega 产品说明进行总 RNA 抽提。抽提出的 RNA 通过 1%的琼脂糖电泳分析 RNA 的完整性, 通过紫外分光光度计测定 RNA 的 A_{260}/A_{280} 用于判断 RNA 的纯度并计算浓度。提取的 RNA 的 A_{260}/A_{280} 的值均在 1.8—2.0 之间。每个样品取相同质量的 RNA 样品, 按照 fermentas 逆转录试剂盒的操作说明进行逆转录获得 cDNA, 作为 PCR 扩增的模板。

cDNA 克隆和序列分析 通过 EST 拼接获得尼罗罗非鱼 *TCP-1-beta* 和 *TCP-1-eta* cDNA 序列, 根据序列设计引物对尼罗罗非鱼 *TCP-1-beta*(上游引物 5'TTCATCATGGCGTCCCTATC3'和下游引物 5' GGAAGCTGTGTCTGGTGGTT3')和 *TCP-1-eta*(上游引物 5'TGCAAAGATGATGCCACAC 3'和下游引物 5'TCGTTAGTGAGCATGGGGTTC3')进行扩增。以常温尼罗罗非鱼肌肉 cDNA 为模板, 20 μL PCR 反应体系中加入 1 μL 的 cDNA, 上下游引物(10 μmol/L, 上海生工)各 0.4 μL, dNTPs (2.5 mmol/L, takara) 0.4 μL, *Taq* 酶(1 U/μL, fermentas 公司) 0.4 μL, 无菌双蒸水补至 20 μL。按以下程序进行 PCR 扩增, 95℃预变性 5min, 94℃ 40s, 55℃ 30s, 72℃ 2min, 32 个循环, 72℃延伸 5min, 最后进入 4℃状态。1%琼脂糖凝胶电泳并切割目的条带, 用 Axygen 胶回收试剂盒进行回收纯化。参照 pMD18-T 克隆试剂盒说明(takara

公司)克隆目的片段, 并筛选阳性克隆送往上海生工生物技术公司测序。应用 DNASTar 分析软件对所得序列进行分析, 翻译成蛋白序列, 并用 BLAST 搜索引擎查找 GenBank/EMBL 数据库, 获得同源的蛋白序列, 并采用 Clustal W 软件进行多序列比对, 使用 MEGA5 软件以邻接法(NJ)构建进化树^[15, 16]。

表达图式研究 抽提尼罗罗非鱼常温和不同低温处理的肝胰腺组织总 RNA, 以随机引物逆转录获得总 cDNA。内参引物根据罗非鱼 *beta-actin* 序列设计, 上游引物为 5'-CACACAGTGCCCATCTACGAG-3', 下游引物为 5'-ACGATTTCCCTCTCGGCTG-3', 预期扩增产物长度为 146 bp。根据测序获得的序列设计特异引物, *TCP-1-beta* 上游引物序列为 5'-GATGGCACGGTGGGAAACA-3', 下游引物序列为 5'-GGGTGATGGTCCGGAACTCG-3', 预期扩增产物长度为 158 bp。*TCP-1-eta* 上游引物序列为 5'-CAAACGCTACGAAAATCCAAAG-3', 下游引物序列为 5'-CCAGCTTGTCGTATAAGATGTTCC-3', 预期扩增产物长度为 149 bp。实时荧光定量 PCR 按照以前的报道^[17, 18]进行操作, 同时设置无模板阴性对照, 95℃预变性 10s, 95℃变性 10s, 60℃退火 1min, 40 个循环反应。实时荧光定量 PCR 反应在 ABI 公司 7500 fast 定量 PCR 仪上进行。

2 结果

2.1 *TCP-1-beta* 和 *TCP-1-eta* 的序列分析

扩增获得 *TCP-1-beta* 长度 1755 bp, 包含 1605 bp 完整开放阅读框, 编码 535 个氨基酸, 总相对分子量为 57.628 kD, 理论等电点为 6.25, 开放阅读框中碱基含量为 A=25.4%, T=19.3%, G=27.9%, C=27.4%, Genbank 登录号 JQ797420。扩增获得 *TCP-1-eta* 长度 1651 bp, 包含 1638 bp 完整开放阅读框, 编码 545 个氨基酸, 总相对分子量为 59.390 kD, 理论等电点为 5.64, 开放阅读框中碱基含量为 A= 24.8%, T= 18.4%, G=30.6%, C=26.2%, Genbank 登录号 JQ797421。

2.2 尼罗罗非鱼 *TCP-1-beta* 和 *TCP-1-eta* 的系统关系 经 BLASTP 发现, 尼罗罗非鱼 *TCP-1-beta* 与鲑鱼(*Salmo salar*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、爪蟾(*Xenopus laevis*)、小鼠(*Mus musculus*)、人类(*Homo sapiens*)和果蝇(*Drosophila melanogaster*)的同源性分别是 92%、92%、89%、88%、87%和 73%。*TCP-1-eta* 与斑马鱼、爪蟾、小鼠、人类和果蝇的同源性分别是

92%、89%、88%、89%和76%。多序列比对结果表明, TCP-1-beta 和 TCP-1-eta 蛋白在物种间相似性很高, 且都具有保守的 ATP 结合结构域^[19]等, 预示其在物种间功能的保守性。

利用 MEGA5.03 软件, 根据真核生物 TCP-1-beta 和 TCP-1-eta 蛋白序列分别构建系统进化树。尼罗罗非鱼 TCP-1-beta 与鲈形目的南极岩斑鱼 (*Notothenia coriiceps*) 聚在一起, 依次与鲑鱼、斑马鱼等硬骨鱼类聚在一起, 然后与爪蟾、鸡、鼠、人等脊椎动物聚为一类, 而果蝇与曼氏血吸虫、家蚕则更为接近(图 1)。尼罗罗非鱼的 TCP-1-beta 与斑马鱼最为接近, 然后与爪蟾、鸡、鼠、人等脊椎动物聚为一类(图 2)。

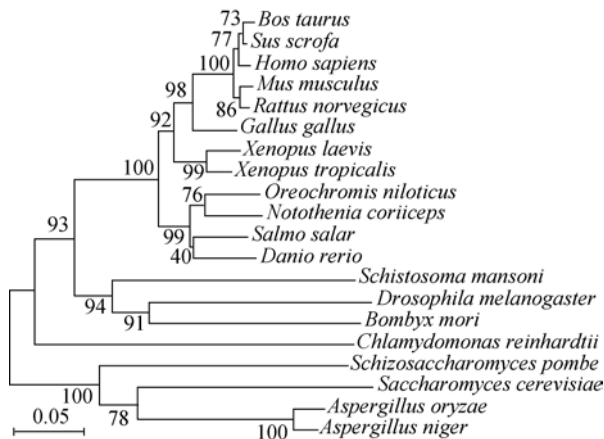


图 1 真核生物 TCP-1-beta 氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树
Fig. 1 Neighbour-joining tree of TCP-1-beta amino acid sequences among eukaryotes

系统树结点的数值代表 1000 次评估的自举检验置信度

Numbers at branch nodes represent the confidence level of 1000 bootstrap replications

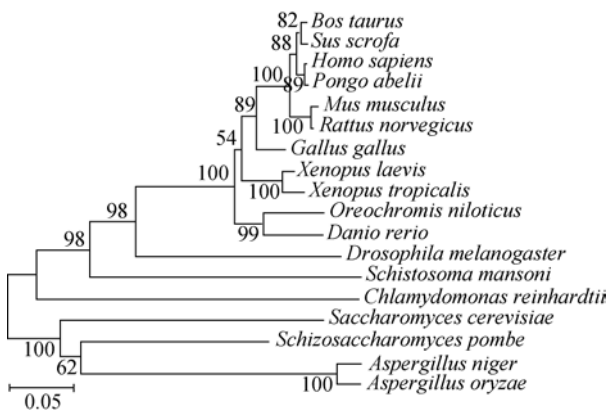


图 2 真核生物 TCP-1-eta 氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树
Fig. 2 Neighbour-joining tree of TCP-1-eta amino acid sequences among eukaryotes

系统树结点的数值代表 1000 次评估的自举检验置信度

Numbers at branch nodes represent the confidence level of 1000 bootstrap replications

2.3 TCP-1-beta 和 TCP-1-eta 在肌肉组织中优势表达

以常温养殖罗非鱼脾脏中的表达量为对照, 分析 TCP-1-beta 和 TCP-1-eta 在不同组织中的相对表达量。结果显示, TCP-1-beta 和 TCP-1-eta 在组织中呈遍在表达, 但在各组织中表达丰度差异显著, 两者均在肌肉中表达量最高, 肝胰腺次之, 在脾脏中表达最低, 表明 TCP-1-beta 和 TCP-1-eta 在肌肉中优势表达(图 3)。

2.4 TCP-1-beta 和 TCP-1-eta 在低温诱导下上调表达

以罗非鱼常温条件下肝胰腺的表达量为对照, 分析了 TCP-1-beta 和 TCP-1-eta 在不同低温胁迫 48h 的相对表达量。结果显示, 从 22°C 至 12°C 的范围内, 随着处理温度降低, TCP-1-beta 在 18°C 时表达开始上调, 但幅度较小, 为常温 22°C 的 2.8 倍, 之后相对表达量变化不大, 但当处理温度降到 12°C 时, 表达上调幅度达到常温的 12.2 倍。TCP-1-eta 在 18°C 时表达开始上调, 但幅度较小, 为常温 22°C 的 2 倍, 之后表达量处于持续上调状态, 当处理温度降到 12°C 时, 表达上调幅度达到常温的 10.7 倍(图 4)。

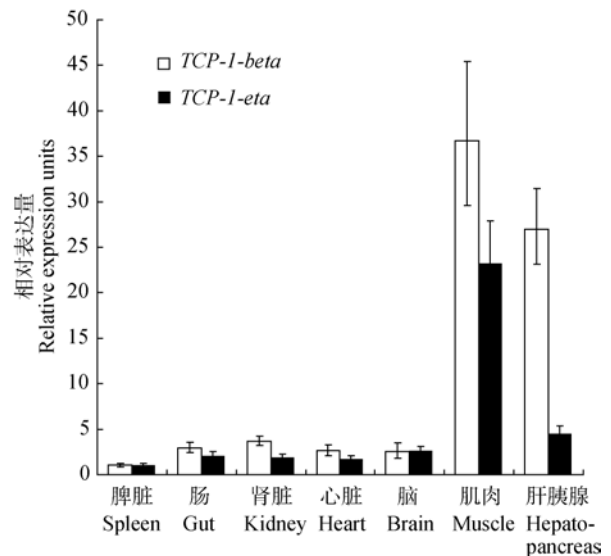


图 3 尼罗罗非鱼 TCP-1-beta 和 TCP-1-eta 在不同组织中的相对表达

Fig. 3 Relative expression levels of TCP-1-beta and TCP-1-eta in tilapia tissues

3 讨论

目前, 关于 TCP-1 与鱼类耐寒能力关系的研究已经开展。在不同温度处理下鲤鱼的微阵列分析显示, TCP-1-epsilon 和 TCP-1-eta 均在低温诱导下上调表达^[20]; 南极美露鳕 (*Dissostichus mawsoni*) 和 5 种

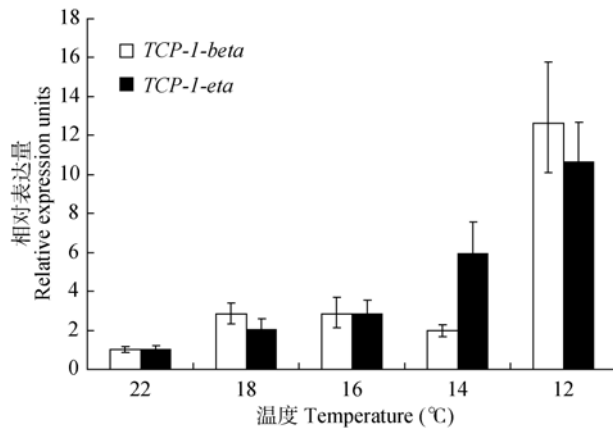


图4 尼罗罗非鱼 *TCP-1-beta* 和 *TCP-1-eta* 在不同温度下的相对表达

Fig. 4 Relative expression levels of *TCP-1-beta* and *TCP-1-eta* under different temperatures

热带/温带鱼的微阵列分析显示, 南极美露鳕中的 *TCP-1* 表达量显著高于热带/温带鱼类, 推测 *TCP-1* 在美露鳕对南极低温的适应中发挥作用^[21]; 南极岩斑鳕(*Notothenia coriiceps*)中 *TCP-1-beta* 和 *TCP-1-theta* 的蛋白结构域中存在氨基酸替换, 推测与低温条件下实现催化活性所需的结构灵活性有关^[22]。

本研究克隆了尼罗罗非鱼 *TCP-1-beta* 和 *TCP-1-eta* 的完整编码序列并对它们在不同组织和低温诱导条件下的表达情况进行研究。通过 BLASTP 分析发现, *TCP-1-beta* 和 *TCP-1-eta* 与其他物种的蛋白具有很高的同源性, 同源性分别为 92%—73% 和 92%—76%, 暗示其在物种间功能的保守性。在常温条件下, 不同组织的相对表达量结果显示, *TCP-1-beta* 和 *TCP-1-eta* 在组织中呈遍在表达。不同低温诱导 48h 的相对表达量显示, 从 22—12°C 的范围内, *TCP-1-beta* 和 *TCP-1-eta* 在低温诱导下均呈上调表达, 在 18°C 时表达开始上调, 至 12°C 时表达量达到最高, *TCP-1-beta* 和 *TCP-1-eta* 上调幅度分别达到达到常温的 12.2 倍和 10.7 倍, 说明 *TCP-1-beta* 和 *TCP-1-eta* 是低温诱导下上调表达的基因, 是潜在的尼罗罗非鱼耐寒相关基因。

在酵母中, 通过等效突变研究 *TCP-1* 不同亚基的作用, 结果显示不同亚基的等效突变产生不同的表型, 推测 8 个 *TCP-1* 亚基可作为独立个体参与细胞内信号通路^[23], 但 *TCP-1* 不同亚基的具体作用方式和参与的信号通路尚无定论。尼罗罗非鱼的 *TCP-1-beta* 和 *TCP-1-eta* 都是低温诱导下上调表达的基因, 但两者的表达模式存在差异, *TCP-1-beta* 在 18—

14°C 诱导下表达量无明显变化, 12°C 诱导时表达量上调至 22°C 的 12.2 倍, *TCP-1-eta* 在 22—12°C 诱导下表达量呈持续上调状态, 推测 *TCP-1-beta* 和 *TCP-1-eta* 可能在应对低温时的作用不同, 因此对于 *TCP-1* 的作用有待进一步探讨。本研究分析了尼罗罗非鱼 *TCP-1-beta* 和 *TCP-1-eta* 的分子特征和低温诱导表达图式, 有利于进一步探讨罗非鱼的耐寒分子机制和 *TCP-1* 不同亚基的作用。

参考文献:

- [1] Zhao Y F, Lin L S. Effect of cold current on tilapia culture and countermeasures [J]. *Scientific Fish Farming*, 2008, (4): 5—6 [赵永锋, 林连升. 寒流对南方罗非鱼养殖的影响及应对措施. 科学养鱼, 2008, (4): 5—6]
- [2] Lin Y, Tang Z Y, Tang Z S, et al. Study on TAD of five tilapia strains [J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2010, 37(5): 222—225 [林勇, 唐瞻杨, 唐章生, 等. 罗非鱼 5 个不同品系低温致死的研究. 水产科技情报, 2010, 37(5): 222—225]
- [3] Li C H, Li S F. Study on low lethal temperature of different strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 1996, 23(5): 195—198 [李晨虹, 李思发. 不同品系尼罗罗非鱼致死低温的研究. 水产科技情报, 1996, 23(5): 195—198]
- [4] Yang S, Du C, Lu M X, et al. Study on lethal temperature of five tilapia hybrids F1 [J]. *Journal of Aquaculture*, 2006, 27(2): 11—14 [杨淞, 杜诚, 卢迈新, 等. 5 种杂交 F1 代罗非鱼致死低温的初步研究. 水产养殖, 2006, 27(2): 11—14]
- [5] Yang H, Wu T T, Xia D Q. Study on culture of three tilapia hybrids [J]. *Scientific Fish Farming*, 2005, (3): 18 [杨弘, 吴婷婷, 夏德全. 三种奥尼杂交罗非鱼养殖效果比较. 科学养鱼, 2005, (3): 18]
- [6] Chen H Y, Zhang C X, Ma X K, et al. Heat shock proteins of the hyperthermophilic archaea [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 24(12): 2011—2021 [陈华友, 张春霞, 马晓珂, 等. 极端嗜热古菌的热休克蛋白. 生物工程学报, 2008, 24(12): 2011—2021]
- [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: 243—282
- [8] Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, et al. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response [J]. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(5): 244—252
- [9] Hartl F U. Molecular chaperones in cellular protein folding [J]. *Nature*, 1996, 381(13): 571—579
- [10] Spiess C, Meyer A S, Reissmann S, et al. Mechanism of the eukaryotic chaperonin: protein folding in the chamber of se-

- crets [J]. *Trends in Cell Biology*, 2004, **14**(11): 598—604
- [11] Somer L, Shmulman O, Dror T, *et al.* The eukaryote chaperonin CCT is a cold shock protein in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2002, **7**(1): 47—54
- [12] Kayukawa T, Chen B, Miyazaki S, *et al.* Expression of mRNA for the t-complex polypeptide-1, a subunit of chaperonin CCT, is upregulated in association with increased cold hardiness in *Delia antiqua* [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2005, **10**(3): 204—210
- [13] Rinehart J P, Li A, Yocum G D, *et al.* Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, **104**(27): 11130—11137
- [14] Ma D M, Cheng G P, Yu H Y, *et al.* Effect of different cooling rates on *O. niloticus*, juveniles [J]. *Guangxi Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2010, **26**(4): 200—203 [马旦梅, 程光平, 喻海燕, 等. 吉富罗非鱼对不同降温速率胁迫的死亡反应研究. 广西畜牧兽医, 2010, **26**(4): 200—203]
- [15] Wang R, Xiao Q, Gui J F. Molecular cloning and expression analysis of fructose-1, 6-bisphosphatase in gibel carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(6): 1130—1135 [王锐, 肖青, 桂建芳. 银鲫果糖-1,6-二磷酸酶的分子克隆与表达分析. 水生生物学报, 2010, **34**(6): 1130—1135]
- [16] Gan L, Zhang Y B, Sun F, *et al.* Molecular cloning and characterization of *nub1* gene from crucian carp *Carassius auratus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(4): 702—708 [甘力, 张义兵, 孙帆, 等. 鲫 *Nub1* 基因的克隆及特征分析. 水生生物学报, 2010, **34**(4): 702—708]
- [17] Zhu R, Zhang Y B, Zhang Q Y, *et al.* Functional domains and the antiviral effect of the dsRNA-dependent protein kinase PKR from *Paralichthys olivaceus* [J]. *Journal of Virology*, 2008, **82**(14): 6889—6901
- [18] Liu S, Gui J F. Molecular characterization and functional analysis of gibel carp DMRT2b [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, **35**(3): 379—383 [刘沙, 桂建芳. 银鲫 *dmrt2b* 基因的分子特征及功能分析. 水生生物学报, 2011, **35**(3): 379—383]
- [19] Xu Z, Horwich A L, Sigler P B. The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP) 7 chaperonin complex [J]. *Nature*, 1997, **388**(6644): 741—750
- [20] Gracey A Y, Fraser E J, Li W, *et al.* Coping with cold: An integrative, multitissue analysis of the transcriptome of a poikilothermic vertebrate [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, **101**(48): 16970—16975
- [21] Chen Z, Cheng C H, Zhang J, *et al.* Transcriptomic and genomic evolution under constant cold in Antarctic notothenioid fish [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, **105**(35): 12944—12949
- [22] Pucciarelli S, Parker S K, Detrich H W, *et al.* Characterization of the cytoplasmic chaperonin containing TCP-1 from the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* [J]. *Extremophiles*, 2006, **10**(6): 537—549
- [23] Amit M, Weisberg S J, Nadler-Holly M, *et al.* Equivalent mutations in the eight subunits of the Chaperonin CCT produce dramatically different cellular and gene expression phenotypes [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2010, **401**(3): 532—543

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND INDUCTION EXPRESSION OF *TCP-1-BETA* AND *TCP-1-ETA* UNDER LOW TEMPERATURES IN TILAPIA *OREOCHROMIS NILOTICUS*

XIE Jian-Li^{1,2}, LIN Yong³, ZENG Lan³, WANG Zhong-Wei¹ and GUI Jian-Fang¹

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Guangxi Fishery Institute, Nanning 530021, China)

Abstract: Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is one of the commercially important fish species in the southern China, but the lack of cold-resistant strains in tilapia results in a large number of deaths in winter and early spring. Some heat-shock proteins (Hsps) have been revealed to facilitate correct folding of other proteins under diverse forms of physiological stresses, such as extreme temperatures, chemical toxicity and oxidative stress. To understand the molecular mechanism of cold tolerance in fish, we cloned the full-length cDNAs of *TCP-1-beta* and *TCP-1-eta* of the Hsp60 family in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), and studied their expression patterns under normal and low temperature treatments. The *TCP-1-beta* cDNA consisted of 1755 bp and encoded a peptide of 534 amino acids. The *TCP-1-eta* cDNA consisted of 1651 bp and encoded a peptide of 545 amino acids. Multiple alignment and homological analysis revealed their evolutionary conservation and functional significance of *TCP-1-beta* and *TCP-1-eta* among eukaryotes. Significantly, the deduced amino acid sequences of *TCP-1-beta* and *TCP-1-eta* contained highly conserved amino-acid motifs and three ATP-binding sites. The tilapia *TCP-1-beta* was highly homologous with *TCP-1-beta* in other species, sharing 92% identities with *Salmo salar* and *Danio rerio*, 89% with *Xenopus laevis*, 88% with *Mus musculus*, 87% with *Homo sapiens*, and 73% with *Drosophila melanogaster*. Tilapia *TCP-1-eta* shared 92% identities with that of *Danio rerio*, 89% with *Xenopus laevis*, 88% with *Mus musculus*, 89% with *Homo sapiens*, and 76% with *Drosophila melanogaster*. Phylogenetic trees were also constructed among amino acid sequences of *TCP-1-beta* and *TCP-1-eta* in eukaryotes. The tilapia *TCP-1-beta* was clustered with *Notothenia coriiceps* *TCP-1-beta*, and tilapia *TCP-1-eta* was clustered with *Danio rerio* *TCP-1-eta*. Total RNAs were extracted from seven tissues including spleen, gut, kidney, heart, brain, muscle and hepatopancreas. Using *beta-actin* as internal control, their expression patterns were analyzed by real-time PCR, in which *TCP-1-beta* and *TCP-1-eta* mRNA existed in all seven tissues, and expressed mainly in muscle. To study the response of *TCP-1* to low temperatures, the mRNA levels of *TCP-1-beta* and *TCP-1-eta* were analyzed in response to cold induction treatments. The experimental fishes were divided into five groups and kept at different temperatures (22°C, 18°C, 16°C, 14°C and 12°C) for 48 hours. Total RNAs were extracted from hepatopancreas tissue at different temperature treatments (22°C, 18°C, 16°C, 14°C and 12°C). Real-time PCR analysis revealed that *TCP-1-beta* and *TCP-1-eta* mRNA increased at 18°C and peaked at 12°C. *TCP-1-beta* mRNA was 2.8 fold up-regulated at 18°C compared to normal temperature at 22°C, and then held stable until the induction temperature changed to 12°C which induced 12.2 fold increase in mRNA levels of *TCP-1-beta*. The expression level of *TCP-1-eta* was 2 fold upregulated at 18°C compared to normal temperature at 22°C, and then a gradual increase in the level of *TCP-1-eta* was observed, reaching a peak of 10.7 fold increase at 12°C. The cold-induced expression of *TCP-1-beta* and *TCP-1-eta* suggested that they might be cold tolerance-related genes in Nile tilapia. Therefore, this study established a basis for studying the molecular mechanism of cold tolerance in Nile tilapia.

Key words: *Oreochromis niloticus*; *TCP-1-BETA*; *TCP-1-ETA* Real-time PCR; Low temperature; Induction expression