

doi: 10.7541/2016.148

泥蚶谷胱甘肽过氧化物酶基因的全长克隆与表达分析

程雪艳^{1, 2, 3} 蒋国萍^{1, 3, 4} 柴雪良^{1, 2, 3, 4} 滕爽爽^{1, 3}

(1. 浙江省海洋水产养殖研究所, 温州 325005; 2. 温州医科大学检验医学院, 生命科学学院, 温州 325035; 3. 浙江省近岸水域生物资源开发和保护重点实验室, 温州 325005; 4. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为了探讨谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPx)基因在泥蚶应激反应中的作用, 研究采用RACE技术克隆了泥蚶*TgGPx*基因(*TgGPx*)cDNA全长, 其cDNA全长1195 bp, 包含45 bp 5'-UTR, 639 bp开放阅读框(ORF)和511 bp 3'-UTR。ORF编码212个氨基酸残基, 预测蛋白分子量为24.3 kD, 理论等电点为8.33, 其中, 第53个氨基酸U是由密码子²⁰²UGA²⁰⁴编码的硒代半胱氨酸(Se-Cys)。在3'-UTR上存在一段序列, 形成一种独特的茎环结构, 即SECIS元件。SECIS元件在密码子UGA翻译为Se-Cys的过程中起决定性作用。通过序列比对与系统进化分析, 发现软体动物中也存在不同种类的*GPx*基因, *TgGPx*与*GPx1*和*GPx2*的亲缘关系较近。利用qRT-PCR技术对*TgGPx*在泥蚶的不同组织以及重金属刺激后的表达量进行分析, 结果表明, *TgGPx*在泥蚶的5个组织中都有表达, 但存在组织特异性, 在外套膜中的表达量最高, 在血细胞中的表达量最低。用重金属铅、铜、镉刺激后, *TgGPx*在肝胰脏中的表达量显著升高, 表明*TgGPx*在维护机体正常功能方面及泥蚶抵御外界刺激的应激反应中发挥作用。

关键词: 泥蚶; 谷胱甘肽过氧化物酶; 全长克隆; 基因表达

中图分类号: Q781

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2016)06-1144-08

活性氧(ROS)又称氧自由基, 在大多数情况下是由细胞正常代谢和呼吸作用产生的, 在机体中有广泛的生物学作用。在贝类细胞免疫过程中, 机可以通过产生大量的活性氧(ROS)来消灭病原体, 除此之外, ROS作为生长因子和第二信使等在机体的生长调控中也发挥重要作用。但当ROS过量时, 机体内发生氧化应激反应, 导致脂质的过氧化、蛋白质的变性、DNA的损伤, 改变并抑制了酶的活性。对细胞造成各种损伤, 造成细胞内的不平衡从而导致细胞凋亡^[1, 2]。为避免ROS的过量产生, 贝类在进化过程中形成了一个有效的抗氧化体系, 以减小自由基对机体的损害及修复已存在的损伤。抗氧化体系包括抗氧化分子和抗氧化酶系等^[3, 4]。抗氧化分子主要包括维生素A、C和E、抗坏血酸、谷胱甘肽和尿酸等, 抗氧化酶系包括超氧化物歧化

酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPx)等。SOD通过催化O²⁻的歧化反应, 生成H₂O₂和O₂, H₂O₂则经CAT作用, 还原为H₂O和O₂。GPx的主要作用是还原脂类氢过氧化物, 但在CAT含量很少或H₂O₂产量很低的部位可以代替CAT发挥作用^[5]。几种抗氧化酶共同发挥作用, 以此来清除多余的氧自由基及防止其连锁反应^[6]。

GPx于1957年由Mills首次发现, 能够通过催化还原性GSH还原一系列的氢过氧化物, 在机体抗氧化过程中发挥重要的作用。GPx有两种类型, 一种是硒依赖性的谷胱甘肽过氧化物酶(Se-GPx), 一种是不含硒的谷胱甘肽过氧化物酶, 又称为谷胱甘肽转硫酶(GST)。Se-GPx可以还原脂类氢过氧化物和H₂O₂, GST可以还原过氧化物和具有解毒的功能,

收稿日期: 2015-12-23; 修订日期: 2016-05-29

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2012AA10A410-1); 浙江省重大科技专项(2012C12907-4); 温州市种子种苗科技创新专项(N20120017)
资助 [Supported by National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2012AA10A410-1); Major Science and Technology Projects of Zhejiang Province (2012C12907-4); Seed Science and Technology Innovation Project of Wenzhou City (N20120017)]

作者简介: 程雪艳(1992—), 女, 河南省邓州人; 硕士研究生; 主要从事滩涂贝类分子遗传学研究。E-mail: 15658693728@163.com

通信作者: 滕爽爽, 助理研究员; E-mail: 188175998@qq.com

但不能还原H₂O₂^[5]。目前Se-GPx家族中研究较为深入的同工酶有四种, 分别为胞内GPx(GPx1)、胃肠道GPx(GPx2)、血浆GPx(GPx3)、磷脂氢GPx(GPx4), 4种同工酶的分布、亚基结构、酶学特点有显著不同。此外, 有学者发现了附睾分泌蛋白GPx(GPx5)、嗅上皮及胚胎组织GPx(GPx6)以及其他一些GPx^[2]。目前, 在软体动物中, 有关GPx基因和酶活的研究已有较多报道, 如四角蛤蜊(*Macraea veneriformis*)^[7]、褶纹冠蚌(*Cristaria plicata*)^[8]、皱纹盘鲍(*Halibut discus hanhai*)^[9]、合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)^[10]、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)^[11]、文蛤(*Meretrix meretrix*)^[12]等。

泥蚶(*Tegillarca granosa*)属软体动物门(Mollusca)、双壳纲(Bivalvia)、蚶目(Arcoida)、蚶科(Arcidae), 在我国主要分布于山东以南沿海^[13], 是我国主要的经济养殖贝类之一, 具有很高的经济价值。但近年来, 由于工业废水的大量排放, 泥蚶经常处于水体重金属及微生物等物质严重超标的状态, 对机体造成严重的损伤, 影响了泥蚶养殖产业的发展。因此, 开展泥蚶在应激状态下的表达调控规律的研究对利用泥蚶基因资源和发展健康养殖具有重要的意义。本研究对泥蚶含硒谷胱甘肽过氧化物酶TgGPx基因的结构特征和在重金属胁迫的表达进行分析, 为深入了解TgGPx在泥蚶中的作用机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料和重金属处理

实验用泥蚶[壳长:(30±1) mm]取自浙江省海洋水产养殖研究所清江基地, 实验前在实验室里暂养1周, 温度控制在(23±1)℃, 盐度为30左右。暂养期间连续充气, 每天换水1次, 换水后投喂3×10⁶ cell/L亚心型扁藻(*Platymonas subcordiformis*)。实验前1天停止投饵, 随机选择反应灵敏的个体分组实验。取泥蚶鳃、外套膜、闭壳肌、血细胞、肝胰脏5个组织, 每个组织各取3个重复, 液氮速冻后, 置-80℃超低温冰箱保存备用, 用于检测TgGPx在不同组织中的表达量。根据刘琴^[14]、王召根等^[15]结论中泥蚶重金属离子Pb²⁺[Pb(NO₃)₂]、Cd²⁺[CdCl₂]、Cu²⁺[CuSO₄]半致死浓度以及安全浓度设置合适的浓度分别对泥蚶进行处理, 其中Pb²⁺浓度为0.89 mg/L、Cd²⁺浓度为0.25 mg/L、Cu²⁺浓度为0.029 mg/L, 同时以砂滤海水养殖的泥蚶作为空白组。浸泡后分别于0、6h、12h、24h和48h取肝胰脏组织, 液氮速冻后, 置-80℃超低温冰箱保存备用, 实验组和空白

组的每个时间点取3个重复。

1.2 TgGPx cDNA全长的扩增

RNA提取和cDNA第一链的合成 用艾德莱公司的EASYspin Plus组织/细胞RNA快速提取试剂盒提取泥蚶肝胰脏的总RNA, 检测其完整性和纯度。按照PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa)操作说明合成cDNA第一链。

TgGPx基因核心序列同源克隆 根据Se-GPx基因序列高度保守区域, 利用primer premier5.0设计引物, 上游引物为TgGPx-F1, 下游引物为TgGPx-R1(表1)。以肝胰脏cDNA为模板, 在Eppendorf扩增仪进行PCR反应, 扩增TgGPx基因的核心片段。PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳检测后, 由上海生工生物工程公司测序。测序所得序列进行比对分析, 根据测序结果设计引物TgGPx-F2和TgGPx-R2进行验证。

TgGPx基因cDNA序列3'末端和5'末端扩增 根据获得的TgGPx基因片段, 设计3'外侧引物TgGPx-3Race-F1和3'内侧引物TgGPx-3Race-F2, 5'外侧引物TgGPx-5Race-F1和5'内侧引物TgGPx-5Race-F2。按照3'-Full RACE Core Set with PrimeScriptTM RTase(TaKaRa)和5'-Full RACE Kit with TAP(TaKaRa)操作说明进行巢式PCR反应合成TgGPx基因的3'末端和5'末端。PCR结束后于2%琼脂糖凝胶电泳检测后, 对目的片段进行回收, 按照pMD19-T vector(TaKaRa)说明书的要求进行克隆测序, 由杭州擎科生物科技有限公司测序。

1.3 TgGPx基因序列分析和系统发育分析

测序得到的序列用NCBI Blast程序分析, 并在seqman软件中与原有序列进行拼接。以NCBI ORF finder程序进行开放阅读框(ORF)查找, 用ProtParam

表1 试验中所用引物序列

Tab. 1 Primers used in the study

引物Primers	引物序列Primers sequence (5'-3')
TgGPx-F1	TGCAACCAGTCGGTCATCAGGAGAA
TgGPx-R1	AGGAACCTCTCAAAGTTCCAGG
TgGPx-F2	ATTAAAGCATGTTCGACC
TgGPx-R2	AGAAATACAAAAGTGGG
TgGPx-3Race-F1	TTCTACGAGAACGACTGCCGACACCT
TgGPx-3Race-F2	CGACTGCCGACACCTAGTGATGATGC
TgGPx-5Race-F1	CACTAGGTGTCGGCAGTCGTTCTCGTA
TgGPx-5Race-F2	AATCCATTCTGGTCGAACATGCTTTA
TgGPx-Real-F	CTTGTGGTTCTGGGGTTCC
TgGPx-Real-R	GTCGGCAGTCGTTCTCGTA
Tg-18S rRNA-F	CTTTCAAATGTCTGCCCTATCAACT
Tg-18S rRNA-R	TCCCGTATTGTTATTTTCGTCACT

程序分析蛋白质基本理化性质(<http://web.expasy.org/protparam/>)，Smart在线软件预测蛋白的功能域(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)，SignalP4.1程序分析TgGPx基因是否存在信号肽(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)，用NetNGlyc1.0程序预测可能存在的糖基结合位点(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)，用SECISearch 2.19程序搜索TgGPx基因中的硒代半胱氨酸插入序列(<http://genome.unl.edu/SECISearch.html>) (Selenocysteine insertion sequence, SECIS)。用DANMAN软件将TgGPx氨基酸序列与其他物种的GPx氨基酸序列进行同源性比对；用MEGA6.0软件构建TgGPx氨基酸NJ (Neighbor-Joining, 邻接法)系统进化树，并用Bootstrap重复1000次计算各分支的置信度。

1.4 TgGPx基因的组织表达

采用Real-time PCR的方法检测TgGPx基因在泥蚶不同组织中的表达，以18S rRNA基因作为内参基因。TgGPx基因特异性引物为TgGPx-Real-F和TgGPx-Real-R，18S rRNA基因特异性引物为Tg-18S rRNA -F和Tg-18S rRNA -R。按照SYBR[®] Premix Ex TaqTM II(Tli RNaseH Plus)试剂盒(TaKaRa)操作说明进行Real-time PCR反应。每个组织的样品设3次重复，结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析^[16]，实验数据采用SPSS 19.0软件统计分析($P<0.05$ 为显著差异, $P<0.01$ 为极显著差异)。

1.5 TgGPx基因在经重金属胁迫后的表达变化

通过检测肝胰脏中TgGPx基因在不同取样时间的表达变化分析TgGPx基因在重金属胁迫中的作用。Real-time PCR的引物和程序同1.4。

2 结果

2.1 TgGPx基因的克隆与序列分析

对TgGPx基因的序列进行分析，发现TgGPx cDNA序列全长1195 bp (GenBank登录号: KT452785)，包含45 bp 5'-UTR, 639 bp开放阅读框(ORF)和511 bp 3'-UTR。ORF编码212个氨基酸残基，预测蛋白分子量为24.3 kD, 理论等电点为8.33。氨基酸序列中第53个氨基酸(U⁵³)是由密码子(²⁰²UGA²⁰⁴)编码的硒代半胱氨酸(Se-Cys)，第87、165个氨基酸Q⁸⁷, W¹⁶⁵与结合硒有关，第103、181个氨基酸R¹⁰³, R¹⁸¹与结合谷胱甘肽有关。TgGPx基因氨基酸序列中存在GPx家族签名序列⁷⁷LGFPCNQF⁸⁴和活性位点序列¹⁶⁵WNFEKF¹⁷⁰。

在TgGPx基因3'-UTR上有一段98 bp的序列形成一个独特的茎环结构，该结构称为Se-Cys插入元

件(Selenocysteine insertion sequence, SECIS)，在UGA码解译成Se-Cys中发挥作用。TgGPx基因的茎环结构有一个开放区域、一个核心区域，还有一个茎一个环。在顶环下面5'端的突起上有保守碱基AA，在茎的5'端有保守碱基AGUA和在茎的3'端有保守碱基GA、AGUA和GA处于SECIS元件的核心区域，在核心区域的碱基不符合配对原则，形成非Watson-Crick双链。

2.2 TgGPx基因与其他物种Se-GPx基因的同源性分析和系统进化分析

对泥蚶TgGPx基因的氨基酸序列与其他12种物种Se-GPx氨基酸序列进行多重序列比对，发现泥蚶TgGPx基因与紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)和三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)的相似度最高，都达到61.79%；与虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)的相似度达到59.91%；与斑马鱼(*Danio rerio*)GPx1基因的相似度达到54.93%；与人(*Homo sapiens*)GPx1基因的相似度达到52.11%。

TgGPx基因与其他物种不同类型的Se-GPx构建Neighbor-joining系统进化树(图1)。脊椎动物Se-GPx基因的四种同工酶，GPx1和GPx2的同源性最近，聚为一支；然后再与GPx3聚集在一起，GPx4与其他3个同工酶的亲缘关系最远。软体动物主要分为两支，一支与GPx1和GPx2的亲缘关系最近，另外一支与GPx3的亲缘关系最近。其中泥蚶TgGPx基因处于与GPx1和GPx2的亲缘关系较近的软体动物分支中。

2.3 TgGPx基因在泥蚶不同组织的表达分析

TgGPx基因在所有被检测的组织(鳃、外套膜、闭壳肌、血细胞、肝胰脏)中均有所表达，在外套膜中的表达量最高，在血细胞中的表达量最低(图2)。以肝胰脏组织作为参比，在外套膜中的表达量是在肝胰脏中表达量的9.59倍($P<0.01$)，闭壳肌中的表达量是肝胰脏中表达量的3.83倍($P<0.01$)；在血细胞中的表达量是在肝胰脏中表达量的0.04倍($P<0.05$)；在鳃中的表达量是在肝胰脏中表达量的1.35倍。

2.4 TgGPx基因在泥蚶重金属胁迫后的时序表达分析

利用实时荧光定量PCR分析了泥蚶TgGPx基因在经过Pb²⁺、Cu²⁺、Cd²⁺三种重金属离子处理后，在不同时间段肝胰脏中表达量的变化，以空白组0作为对照(图3)。

在Pb²⁺处理组，TgGPx基因在处理后表达量逐渐升高，在12h的表达量最高，为0时表达量的5.31倍($P<0.01$)，在12h后表达量开始逐渐减小，在24h的表

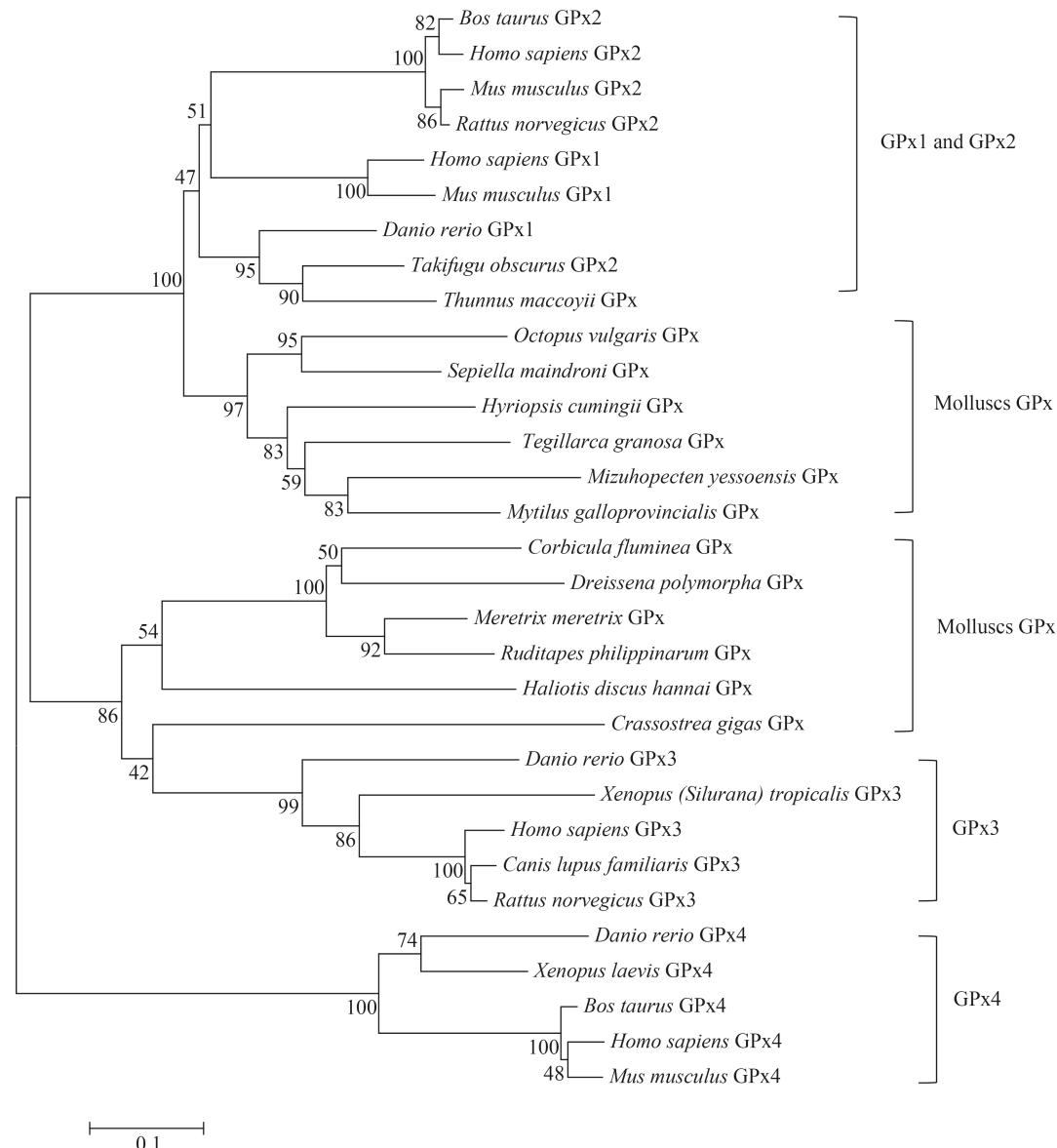


图1 基于不同物种Se-GPx基因氨基酸序列构建的NJ系统进化树

Fig. 1 Neighbor-joining phylogenetic tree of Se-GPx amino acid sequences from different species

智人GPX1 (*H. sapiens* GPX1: NP_000572.2); 智人GPX2 (*H. sapiens* GPX2: NP_002074.2); 智人GPX3 (*H. sapiens* GPX3: AAP50261.1); 智人GPX4 (*H. sapiens* GPX4: NP_001034937.1); 小家鼠GPX1 (*M. musculus* GPX1: AAH86649.1); 小家鼠GPX2 (*M. musculus* GPX2: NP_109602.2); 小家鼠GPX4 (*M. musculus* GPX4: NP_001032830.2); 褐家鼠GPX2 (*R. norvegicus* GPX2: NP_899653.2); 褐家鼠GPX3 (*R. norvegicus* GPX3: NP_071970.2); 家牛GPX2 (*B. taurus* GPX2: NP_001156611); 家牛GPX4 (*B. taurus* GPX4: NP_777195); 斑马鱼GPX1 (*D. rerio* GPX1: NP_001007282.2); 斑马鱼GPX3 (*D. rerio* GPX3: NP_001131027.1); 斑马鱼GPX4 (*D. rerio* GPX4: NP_001007283.2); 三角帆蚌 (*H. cumingii* GPX: ACY72387.1); 南方黑鮨 (*T. maccoyii* GPX: ABO38817.1); 暗纹东方鲀GPX2 (*T. obscurus* GPX2: ACR20472.1); 曼氏无针乌贼 (*S. maindroni* GPX: AEK48346.1); 虾夷扇贝 (*M. galloprovincialis* GPX: ADQ92353.1); 真蛸 (*O. vulgaris* GPX: AGZ63440.1); 紫贻贝 (*D. polymorpha* GPX: ADY38576.1); 家犬GPX3 (*C. lupus familiaris* GPX3: NP_001157926.1); 河蚬 (*C. fluminea* GPX: ABQ24217.1); 长牡蛎 (*C. gigas* GPX: ABS19600.1); 斑马贻贝 (*D. discus hannai* GPX: ADD71075.1); 非洲爪蟾GPX4 (*X. laevis* GPX4: NP_001165213.1); 热带爪蟾GPX3 (*X. (Silurana) tropicalis* GPX3: NP_988961.2); 菲律宾蛤仔 (*R. philippinarum* GPX: ACU83220.1); 文蛤 (*M. meretrix* GPX: ADR51677.1)

达量为0表达量的5.03倍($P<0.01$), 在48h的表达量为0时表达量的2.16倍。

在 Cu^{2+} 处理组, *TgGPx*基因在处理后表达量先升高, 在6h的表达量为0时表达量的3.55倍($P<0.01$)。在12h时表达量下降, 然后继续升高, 在24h表达量

达到最大值(5.62倍, $P<0.05$), 在48h的表达量为0时表达量的2.71倍($P<0.05$)。

在 Cd^{2+} 处理组, *TgGPx*基因表达量的变化趋势与 Cu^{2+} 处理组相似。表达量在24h达到最大值(10.52倍, $P<0.01$)。

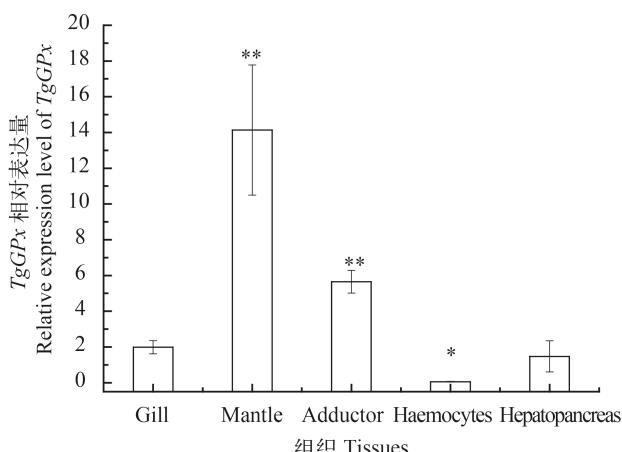
图2 *TgGPx*在成体泥蚶不同组织的表达

Fig. 2 The expression level of *TgGPx* in tissues of adult *T. granosa*

与肝胰脏组织相比, *代表 $P<0.05$; **代表 $P<0.01$; 下同
Significant differences across hepatopancreas are indicated with * at $P<0.05$ and ** at $P<0.01$; the same applies below

3 讨论

3.1 泥蚶*TgGPx*基因的生物信息学分析

我们首次克隆出泥蚶Se-*GPx*基因, 该基因全长1195 bp, 编码区长度为639 bp, 编码212个氨基酸。在202—204位置的碱基为UGA, UGA具有两种意义, 在不含硒的蛋白中, 通常被识别做终止密码子, 在含硒的蛋白中, 可以识别并翻译成Se-Cys, 作为硒蛋白的重要部分发挥作用。通过与其他物种Se-*GPx*氨基酸序列进行多序列比对, 发现*TgGPx*基因

中存在GPx家族签名单元LGFPCNQF和活性位点单元WNFEKF, 这两个重要的功能域与GPx的催化活性有关^[9, 17], 第87、165个氨基酸Q, W与*TgGPx*的催化作用密切相关, 对硒的固定有重要作用^[18]。第103、181个氨基酸R, R与结合谷胱甘肽有关^[19]。这些保守氨基酸关系对*TgGPx*基因的抗氧化功能有重要作用。

在硒蛋白中, 硒是以Se-Cys的形式存在, 作为酶的催化基团发挥作用^[20]。UGA码被解译成Se-Cys需要SECIS元件发挥作用, 真核生物的SECIS元件处于3'-UTR, 目前有两种结构类型, *TgGPx*基因的结构符合II型SECIS结构, 含有保守碱基AUGA、AA和GA。AUGA和GA形成非Watson-Crick双链, 构成SECIS元件的核心区域。保守碱基AA位于顶环下方5臂的突环上而不是处于顶环, 决定了*TgGPx*基因的结构符合II型结构^[21]。AUGA与(A) AA一般相距的碱基在11—13个, 在这段序列中AUGAC和AA之间相距的碱基数是13个, AA突环与顶环之间通常由4对碱基相连。SECIS元件对UGA密码子翻译成Se-Cys发挥重要的作用, 保守碱基发生突变或者缺失会影响UGA密码子的通读, 导致Se-*GPx*基因不能编码蛋白质^[22]。

3.2 *GPx*基因的同源性分析与系统进化分析

在Se-*GPx*基因的4种同工酶中, *GPx1*和*GPx2*的同源性最接近^[23], *GPx4*和其他3个同工酶的亲缘关系最远。由Se-*GPx*基因的系统进化树可以看出软件动物分为两支, 一支与*GPx1*和*GPx2*的亲缘关系

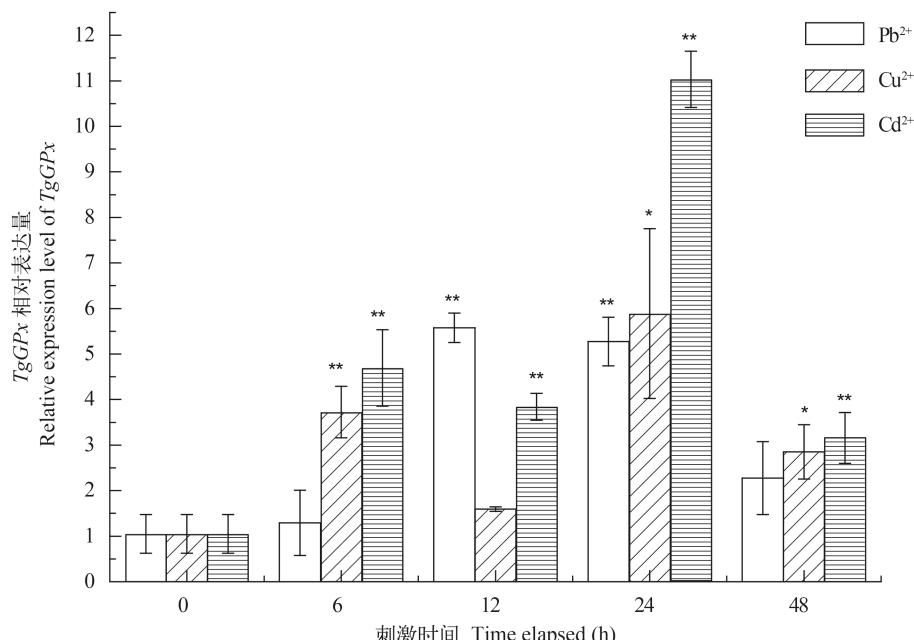
图3 *TgGPx*基因重金属胁迫后肝胰脏组织的表达情况

Fig. 3 The expression level of *TgGPx* in hepatopancreas after three heavy metal exposures

最近, 另外一支与 $GPx3$ 的亲缘关系最近, 这一特征已在很多文献中得到证实^[9, 11, 12], 由此可以看出软体动物内应存在不同类型的Se- GPx 基因。在Se- GPx 基因的4种同工酶中 $GPx3$ 是血浆 GPx , 是一种分泌性蛋白, 一般来说分泌性蛋白的分泌有赖于蛋白质N端的信号肽的存在。通过对不同类型的 GPx 氨基酸序列进行分析, 发现 $GPx3$ 以及与 $GPx3$ 亲缘关系较近的软体动物分支中的氨基酸序列N端一般均有信号肽, 而 $GPx1$ 和 $GPx2$ 以及与之亲缘关系较近的软体动物分支中的氨基酸序列N端大多没有信号肽, 可以看出信号肽序列与Se- GPx 基因同工酶的分类可能存在一定的关系, 软体动物的Se- GPx 基因可能通过信号肽片段的有无对同工酶种类、表达部位以及作用底物等进行初步判定。在本文中, 泥蚶 $TgGPx$ 基因与 $GPx1$ 和 $GPx2$ 的亲缘关系较近, 在进化树中聚为一支。由于 $GPx1$ 和 $GPx2$ 的同源性很高, 二者是保守的细胞质硒代半胱氨酸, 因此无法具体分辨 $TgGPx$ 基因到底属于 $GPx1$ 还是 $GPx2$ 。

3.3 泥蚶 $TgGPx$ 基因的组织表达分析

利用实时荧光定量PCR对 $TgGPx$ 基因在泥蚶5个组织中的表达量进行分析, 发现不同组织的表达量差异较为显著, 表明 $TgGPx$ 基因的表达可能具有组织特异性。其中 $TgGPx$ 基因在外套膜中的表达量最高, 血细胞中的表达量最低。Wang等^[12]对Se- GPx 基因在文蛤中的表达量进行分析, 发现 $Mme GPx$ 基因在肝胰脏中的表达显著高于其他组织; Wu等^[9]对Se- GPx 基因在皱纹盘鲍中的表达量进行分析, 发现表达量最高的组织为肝胰脏; Shan等^[11]对Se- GPx 基因在虾夷扇贝中的表达量进行分析, 结果表明表达量最高为外套膜; 姜晶晶等^[10]对Se- GPx 基因在合浦珠母贝中的表达量进行分析, 发现在外套膜中的表达量最高。脊椎动物的Se- GPx 基因具有不同种类的同工酶, 表达部位和底物特性各不相同。根据上文对Se- GPx 基因的系统进化分析, 可以看出软体动物中也存在不同种类的Se- GPx 基因, 文蛤、皱纹盘鲍等物种的Se- GPx 基因与 $GPx3$ 的亲缘关系较近, 泥蚶、虾夷扇贝、合浦珠母贝等物种的Se- GPx 基因与 $GPx1$ 、 $GPx2$ 的亲缘关系较近。因此, Se- GPx 基因在不同的双壳贝类中主要表达的部位不尽一致。

此外, Badariotti等^[24]对长牡蛎的(Cg)-Clp1和(Cg)-Clp2的基因进行分析, 发现外套膜通过壳有机基质的分泌和细胞增殖来支配壳的形成和机体的增长。Shan等^[11]对 GPx 基因在虾夷扇贝成体不同组织与胚胎发育过程中的表达量进行分析, 发现 GPx 基因在成体组织中, 外套膜的表达量最高, 在

发育时期中, 担轮幼体表达量最高, 说明 GPx 基因可能在虾夷扇贝成长发育过程中发挥作用。因此, 我们推测 $TgGPx$ 基因在泥蚶的生长发育过程中可能也有一定的作用。

3.4 泥蚶 $TgGPx$ 基因在重金属胁迫后的表达分析

同时, 分析了泥蚶 $TgGPx$ 基因在经过 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 三种重金属离子处理后, 在不同时间段 GPx 基因表达量的变化。肝胰腺作为贝类的主要解毒器官, 贝类体内富集的重金属都将通过肝胰腺解毒; 鳃直接与重金属接触, 但是由于鳃主要是作为呼吸和滤食器官, 解毒能力较弱, 所以在重金属的刺激下, 肝胰腺中的 GPx 基因的活性变化较大。顾海龙^[25]对Cd、Pb、Hg胁迫对泥蚶抗氧化酶的影响进行研究, 充分证明了这一点。利用qPCR分析泥蚶在经过三种重金属处理后, GPx 基因在肝胰腺组织中表达量的变化, 在 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 处理组, $TgGPx$ 基因表达量的变化趋势为上升-下降-上升-下降, 分析原因可能是重金属进入泥蚶肝胰腺器官内以后, 产生了对 GPx 基因的诱导作用, 使机体产生大量的 GPx 基因清除体内多余的氧自由基。随着 GPx 基因的逐渐消耗, GPx 基因的表达量达到了较低的水平, 重金属会诱导机体产生更多的 GPx 基因来满足机体的需要; 在 Pb^{2+} 处理组 $TgGPx$ 基因表达量逐渐上升, 在12h也达到显著提高, 然后开始下降。 GPx 基因的表达量在经历最高值之后, 开始逐渐下降, 分析原因可能是因为体内氧自由基已经达到合适的水平, 对机体没有损害, 或者是长时间的重金属胁迫, 使生物体内活性氧不断累积, 对机体产生氧化损伤, 进而导致蛋白的合成能力下降, 抗氧化酶的催化作用被减弱, 超出了机体的适应能力^[26]。泥蚶经过 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 处理后, $TgGPx$ 基因表达量的变化趋势不同, 这与泥蚶对不同重金属的敏感度, 以及不同重金属的毒性有关。在外界刺激过程中, 机体可以区分不同的风险影响, 采取不同的应对措施, 通过对抗氧化酶的调节使氧自由基处于一个合适的水平^[27]。总体而言, $TgGPx$ 基因在经过外界刺激后表达量发生显著变化, 可以推断 $TgGPx$ 基因在泥蚶海洋重金属污染反应中作为一种急性反应蛋白发挥作用。

参 考 文 献:

- [1] Yang X L. Molecular cloning, prokaryotic expression and enzymatic activity analysis of CAT from *Cristaria plicata* [D]. Thesis for Master of Science. Nanchang University, Nanchang. 2011 [杨细兰. 褶纹冠蚌过氧化氢酶基因克隆、原核表达及酶活性分析. 硕士学位论文, 南昌大学, 2011].

- 南昌. 2011]
- [2] Ni D J. Molecular cloning and expression of antioxidant enzyme genes from Zhikong Scallop *Chlamys farreri* [D]. Thesis for PhD of Science. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao. 2007 [倪多娇. 柱孔扇贝抗氧化酶基因的克隆与表达分析. 博士学位论文, 中国科学院海洋研究所, 青岛. 2007]
- [3] Yu B P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species [J]. *Physiological Reviews*, 1994, **74**(1): 139—162
- [4] Roch P. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates [J]. *Aquaculture*, 1999, **172**(1): 125—145
- [5] Ma S. Progress on GSH-Px and GST [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2008, **29**(10): 53—56 [马森. 谷胱甘肽过氧化物酶和谷胱甘肽转硫酶研究进展. 动物医学进展, 2008, **29**(10): 53—56]
- [6] Wan M, Mai K S, Ma H M, et al. Effects of dietary selenium and vitamin E on antioxidant enzyme activities in abalone, *Haliotis discus hannai* Ino [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(5): 496—503 [万敏, 麦康森, 马洪明, 等. 硒和维生素E对皱纹盘鲍血清抗氧化酶活力的影响. 水生生物学报, 2004, **28**(5): 496—503]
- [7] Chang Y. Molecular cloning of catalase and glutathione peroxidase antioxidant enzyme genes in *Mactra veneriformis* [D]. Thesis for Master of Science. Inner Mongolia Agricultural University, Huhehot. 2013 [常悦. 四角蛤蜊CAT、GPX 抗氧化酶基因的克隆. 硕士学位论文, 内蒙古农业大学, 呼和浩特. 2013]
- [8] Deng L R. Molecular cloning, identification and function characterization of glutathione S-transferase and Glutathione Peroxidase in the freshwater mussel *Cristaria plicata* [D]. Thesis for Master of Science. Nanchang University, Nanchang. 2011 [邓利荣. 褶纹冠蚌谷胱甘肽硫转移酶和谷胱甘肽过氧化物酶基因的分子克隆、表达及功能鉴定. 硕士学位论文, 南昌大学, 南昌. 2011]
- [9] Wu C L, Mai K S, Zhang W B, et al. Molecular cloning, characterization and mRNA expression of selenium-dependent glutathione peroxidase from abalone *Haliotis discus hannai* Ino in response to dietary selenium, zinc and iron [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 2010, **152**(2): 121—132
- [10] Jiang J J, Zhang D C, Ma J J, et al. Molecular characterization and expression analysis of selenium dependent glutathione peroxidase on pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University* (Natural Science Edition), 2010, **39**(6): 614—621 [姜晶晶, 张殿昌, 麻建军, 等. 合浦珠母贝含硒谷胱甘肽过氧化物酶基因特征与表达分析. 福建农林大学学报(自然科学版), 2010, **39**(6): 614—621]
- [11] Shan Z G, Li H J, Bao X B, et al. A selenium-dependent glutathione peroxidase in the Japanese scallop, *Mizuhpecten yessoensis*: cDNA cloning, promoter sequence analysis and mRNA expression [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2011, **159**(1): 1—9
- [12] Wang C, Huan P, Yue X, et al. Molecular characterization of a glutathione peroxidase gene and its expression in the selected Vibrio-resistant population of the clam *Meretrix meretrix* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, **30**: 1294—1302
- [13] Zhang Y P, Lin Z H, Ying X P, et al. Morphological variations and discriminant analysis of different geographical populations of *Tegillarca granosa* [J]. *Journal of fisheries of China*, 2004, **28**(3): 339—342 [张永普, 林志华, 应雪萍, 等. 不同地理种群泥蚶的形态差异与判别分析. 水产学报, 2004, **28**(3): 339—342]
- [14] Liu Q. Behavior of Pb, Cd and Cr in *Tegillarca granosa* Innaeus [D]. Thesis for Master of Science. Ocean University of China, Qingdao. 2008 [刘琴. 重金属 Pb、Cd 和 Cr 在泥蚶中的行为研究. 硕士学位论文, 中国海洋大学, 青岛. 2008]
- [15] Wang Z G, Wu H X, Wang Y H, et al. Acute toxic and joint toxic experiments of Cd²⁺ and Cu²⁺ on *Tegillarca granosa* [J]. *Marine Sciences*, 2014, **38**(8): 16—20 [王召根, 吴洪喜, 王瑶华, 等. Cd²⁺和Cu²⁺对泥蚶的急性毒性和联合毒性试验. 海洋科学, 2014, **38**(8): 16—20]
- [16] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method [J]. *Methods*, 2001, **25**: 402—408
- [17] Doyen P, Vasseur P, Rodius F. Identification, sequencing and expression of selenium-dependent glutathione peroxidase transcript in the freshwater bivalve *Unio tumidus* exposed to Aroclor 1254 [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 2006, **144**(2): 122—129
- [18] Wang X C, Wang W F, Liu F, et al. Full-length cDNA cloning and expression analysis of selenium dependent glutathione peroxidase from *Macrobrachium nipponense* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(6): 1113—1118 [王雪参, 王文锋, 刘方, 等. 日本沼虾含硒谷胱甘肽过氧化物酶全长克隆及表达分析. 水生生物学报, 2012, **36**(6): 1113—1118]
- [19] Ren B, Huang W H, Akesson B, et al. The crystal structure of seleno-glutathione peroxidase from human plasma at 2.9 Å resolution [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1997, **268**(5): 869—885
- [20] Low S C, Berry M J. Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1996, **21**(6): 203—208
- [21] Xu H B, Huang K X, Qu X H, et al. SECIS structure of selenoproteins gene was identified by RNA draw program in eukaryotes [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2001, **46**(7): 556—558 [徐辉碧, 黄开勋, 瞿祥虎, 等. 采用RNA Draw程序识别真核生物硒蛋白基因的SECIS结构. 科学通报, 2001, **46**(7): 556—558]
- [22] Qu Y H, Huang K X, Gao Z H, et al. Selenocysteine insertion sequence elements in glutathione peroxidase cDNA

- NAs from seven species [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, **15**(2): 274—278 [瞿祥虎, 黄开勋, 高中洪, 等. 谷胱甘肽过氧化物酶的硒代半胱氨酸插入元件. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, **15**(2): 274—278]
- [23] Han X. Study on eukaryotic expression and characterization of seleno proteins with antioxidant activity [D]. Thesis for PhD of Science. Jilin University, Jilin. 2014 [韩笑. 具有抗氧化活性的硒蛋白的真核表达与活性研究. 博士学位论文, 吉林大学, 吉林. 2014]
- [24] Badariotti F, Lelong C, Dubos M P, et al. Characterization of chitinase-like proteins (Cg-Clp1 and Cg-Clp2) involved in immune defence of the mollusk *Crassostrea gigas* [J]. *FEBS Journal*, 2007, **274**(14): 3646—3654
- [25] Gu H L. Molecular ecotoxicological studies of blood clam, *Tegillarca granosa* exposed to Cd, Pb, Hg [D]. Thesis for Master of Science, Shanghai Ocean University, Shanghai. 2013 [顾海龙. Cd、Pb、Hg暴毒下泥蚶的分子生态毒理学研究. 硕士学位论文, 上海海洋大学, 上海. 2013]
- [26] Chen X X. Effects of heavy metal Cd and Cu on toxicity of *Tegillarca granosa* [D]. Thesis for Master of Science, East China University of Science and Technology, Shanghai. 2013 [陈肖肖. 重金属Cd和Cu对泥蚶(*Tegillarca granosa*)的毒理学效应. 硕士学位论文, 华东理工大学, 上海. 2013]
- [27] Li C H, He J J, Su X R, et al. A manganese superoxide dismutase in blood clam *Tegillarca granosa*: Molecular cloning, tissue distribution and expression analysis [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2011, **159**(1): 64—70

FULL-LENGTH cDNA CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF GLUTATHIONE PEROXIDASE FROM BLOOD CLAM *TEGILLARCA GRANOSA*

CHENG Xue-Yan^{1,2,3}, JIANG Guo-Ping^{1,3,4}, CHAI Xue-Liang^{1,2,3,4} and TENG Shuang-Shuang^{1,3}

(1. Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325005, China; 2. Laboratory Medicine and Life Science College of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; 3. Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Preservation of Coastal Bio-resource, Wenzhou 325005, China; 4. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Glutathione peroxidase (GPx) is an important member of cellular enzymatic antioxidant system regulating stress response of host as an acute protein. In this study, a selenium-dependent glutathione peroxidase (*TgGPx*) gene from blood clam *Tegillarca granosa* was cloned and analyzed by rapid amplification of cDNA ends (RACE). The nucleotide sequence of *TgGPx* was consisted of 1195 bp with a 45 bp 5'UTR a of 511 bp 3'UTR and 639 bp open reading frame (ORF) encoding a peptide of 212 amino acids with an estimated molecular mass of 24.3 kD and a theoretical isoelectric point of 8.33. *TgGPx* had a characteristic codon at ²⁰²UGA²⁰⁴ that corresponded to Selenocysteine as U⁵³. A selenocysteine insertion sequence (SECIS) element was identified in the 3'-UTR of *TgGPx* cDNA, which forms a stem-loop secondary structure. SECIS element plays a decisive role in the translation of the stop codon UGA into a selenocysteine. Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis revealed that there were different types of GPx genes in mollusks. *TgGPx* has a closer phylogenetic relationship with GPx1 and GPx2. *TgGPx* expressed in all five tissues with the highest mRNA level in mantle and the lowest in haemocytes. The expression pattern of *TgGPx* in adult may support its role in adult tissue growth and larval development. *TgGPx* was significantly up-regulated in hepatopancreas by heavy metals (Zn²⁺, Cu²⁺ and Cd²⁺) exposure, suggesting *TgGPx* may play a role in stress response and maintaining the body's normal function in *T. granosa*.

Key words: *Tegillarca granosa*; Glutathione peroxidase; Full length clone; mRNA expression