

斑节对虾 GPx3a 基因的分子克隆及表达分析

刘伟^{1,2}, 赵超¹, 范嗣刚¹, 王鹏飞¹, 闫路路¹, 邱丽华¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPx)是生物体内重要的抗氧化酶, 能防止过氧化氢对生物体的氧化应激。该研究利用 RACE 技术获得了斑节对虾(*Penaeus monodon*)GPx3a(*PmGPx3a*)的全长 cDNA 序列, 进行了相关生物信息学分析。作者利用荧光定量 PCR 方法研究了 *PmGPx3a* 在斑节对虾不同组织的表达情况。探究了 *PmGPx3a* 在不同胁迫条件下(盐度、重金属和细菌)的表达情况。结果表明 *PmGPx3a* cDNA 全长 1135 bp, 其中开放阅读框(ORF)长 651 bp, 预测编码 216 个氨基酸。*PmGPx3a* 推导的氨基酸序列与其他动物的 GPx3a 氨基酸序列具有高度一致性。实时定量 PCR 结果显示, 在高低盐胁迫下, *PmGPx3a* 在肝胰腺中相对表达量都为上升的($p < 0.05$)。在铜、锌、铬胁迫中, 鳃中的 *PmGPx3a* 的相对表达量总体呈现下降趋势, 在肝胰腺中呈现上升趋势。在哈维弧菌(*Vibrio harveyi*)刺激下, *PmGPx3a* 在血淋巴中的相对表达量总体呈现上升趋势, 24 h 后表达量最大, 显著高于对照组 2.2 倍($P < 0.05$)。以上研究结果表明, *PmGPx3a* 基因参与了斑节对虾对环境胁迫和氧化应激的适应性反应。

关键词: 斑节对虾(*Penaeus monodon*); 谷胱甘肽过氧化物酶; 盐度胁迫; 重金属胁迫; 细菌刺激

中图分类号: S917.4 文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2018)02-0141-09

DOI: 10.11759/hyxx20170817002

活性氧分子(Reactive oxygen species, ROS)是一类在需氧细胞信号转导通路中行使重要生理学功能的生物分子, 但高浓度的 ROS 可通过细胞氧化应激反应诱导细胞凋亡^[1]。炎症、压力及呼吸作用均能引起机体的氧化应激, 导致主要细胞成分(脂类、蛋白或 DNA)受到损害^[2]。为清除过量的 ROS 过氧化物, 生物体会产生一些非酶类抗氧化剂(如 α -生育酚、 β -胡萝卜素、抗坏血酸和谷胱甘肽等)和一些抗氧化酶(如谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)等)^[3]。

GPx 不仅可以通过催化过氧化氢转化为水来调节细胞内信号的转导, 也可保护机体内细胞生物膜及其他重要成分^[4]。目前, GPx 在哺乳类、鱼类、昆虫类等多个物种中被克隆出来。GPx 可分为两种类型: (1)含硒谷胱甘肽过氧化物酶(Se-GPx), 可作用于无机过氧化物和有机过氧化物, 有由 TGA 编码的硒代半胱氨酸(Sec); (2)不含硒的谷胱甘肽过氧化物酶, 其只作用于有机过氧化物^[5]。生物体通过这两种类型的 GPx, 以谷胱甘肽作为酶作用底物, 经氧化还原反应, 清除机体内过剩的 ROS。在哺乳类中, Se-GPx 有 4 种类型: 细胞内型 GPx(GPx1), 胃肠道型 GPx(GPx2),

血浆型 GPx(GPx3)和磷脂氢型 GPx(GPx4)。GPx5 和 GPx6 也被陆续从哺乳类中发现, 分析认为其为同源物。另外, 从哺乳类发现的 GPx7, 其为不含硒代半胱氨酸的谷胱甘肽过氧化物酶^[6-8]。

在甲壳动物中, 刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)^[9]、拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)^[10]、脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)^[11]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[12]、克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*)^[13]等物种中的 GPx 被克隆出来并分析。研究表明, 当生物体遭遇病原体, 如哈维弧菌(*Vibrio harveyi*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、对虾白斑综合症病毒 WSSV 等入侵时, GPx 表达量或活性大部分是上调的^[3, 10, 14-15]。当生物体遭遇急性应激时, 其 GPx 的

收稿日期: 2017-08-17; 修回日期: 2017-10-24

基金项目: 广东省科技厅项目(2015A020209037); 广东省海洋渔业科技与产业发展专项(A201601A08); 海南省科技厅项目(20163147)

[Foundation: The Guangdong Province Science and Technology Program, No.2015A020209037; The Guangdong Province Marine Fishery Science and Technology and Industrial Development of Special Scientific and Technological Research and Development Projects, No.A201601A08; The Natural Science Foundation Program of Hainan Province, No.20163147]

作者简介: 刘伟(1993-), 女, 山东青岛人, 硕士研究生, 从事海洋生物功能基因研究, 电话: 15602335674, E-mail: 15602335674@163.com; 邱丽华, 通信作者, 研究员, E-mail: qiugroup_bio@outlook.com

表达大多也是上调的^[10, 12]。上调的 GPx 可以帮助机体清除多余的 ROS^[10]。

斑节对虾(*Penaeus monodon*)味道鲜美、营养丰富,为东南亚海域及中国南海海域重要养殖经济水产种类^[16-17]。近年来海洋环境污染日趋严重,水体重金属及微生物等经常严重超标,致使养殖对虾处于应激状态,从而病害频发,斑节对虾的养殖产业发展因此也受到严重影响^[18-19]。因此,本研究获得了斑节对虾 *PmGPx3a* 基因 cDNA 序列,并对其在应激状态下的表达情况进行研究,为深入了解斑节对虾的 GPx 家族基因整体特征及对其抗氧化作用奠定基础,并为斑节对虾养殖的健康发展提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

实验用斑节对虾均来自于中国水产科学研究院南海水产研究所深圳实验基地,体质量为(15±1)g,水体温度控制在(25±1)°C。实验前在海水盐度为 33 水泥池中暂养 3 d,每天更换 1/3 海水,投喂斑节对虾商业饲料(斑节对虾配合饲料,广东双湖饲料有限公司)。实验前 24 h 停止喂食。取 3 尾斑节对虾解剖取肝胰腺、眼柄、胸神经、脑、血淋巴、鳃、胃、肠、心和肌肉等组织用于基因克隆和组织表达分析,其余斑节对虾用于应激实验。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 的合成

用 Trizol(Invitrogen, USA)方法提取上述所取的斑节对虾组织样品的总 RNA,溶于 DEPC 处理水中。用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,使用 NanoDrop 2000/2000c 分光光度计测定浓度及纯度。根据 SMARTTM RACE cDNA 合成试剂盒(Clontech, USA)说明书操作,以总 1 μg RNA 为模板,逆转录合成 cDNA 和 3'RACE cDNA,用于基因全长的扩增及基因片段的验证。取 1 μg 总 RNA,用 PrimeScript^{RT} Regent kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)合成 cDNA,仅用于相对表达量检测。

1.2.2 *PmGPx3a* 全长的扩增

PmGPx3a 相应的 EST 序列由作者实验室斑节对虾转录组测序结果(数据未发表)筛选取得,采用降落 PCR(touchdown PCR)技术,以斑节对虾 3'RACE cDNA 为模板,设计特异性引物(GPx3a-rF1: TCGCC GACTACAAGGGGAAGGT 和 GPx3a-rF2: AACCA

GTTCGGGAAGCAAGAGCC),扩增目的基因的 3' 末端,并用 headtoe PCR (PmGPx3a-head: ATGTGGC GACCTACTGAG 和 PmGPx3a-toe: AAATTCCTGGC TCAGGAGGA)验证 *PmGPx3a* 开放阅读框 ORF 的正确性。

1.2.3 序列及系统发生分析

利用 NCBI 数据库 Blast 在线软件(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)分析序列,用 SMART 软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行蛋白结构域和功能域的预测和分析,利用 ExPASY 软件(http://web.expasy.org/compute_pi/)预测氨基酸序列的理论等电点及分子量,利用 MEGA 6.0 Neighbour-Joining 方法构建系统进化树,用 texshade 软件对不同物种同源序列进行多重序列比对。

1.2.4 *PmGPx3a* 组织表达分析

以得到的 *PmGPx3a* cDNA 全长和内参基因 EF-1α,设计实时定量 PCR 引物(GPx3a-qF: AACCA GTTCGGGAAGCAAGAGCC 和 GPx3a-qR: CGTTC GCTGCTGGCTCTTGCTT, EF-1α-qF: TTCCGACTC CAAGAACGACC 和 EF-1α-qR: GAGCAGTGTGGC AATCAAGC),对斑节对虾的不同组织(肝胰腺、胸神经、肌肉、眼柄、脑、鳃、心、胃、肠)中的表达量进行检测。反应总体积为 12.5 μL,6.25 μL 的 SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa),1 μL cDNA 模板、0.5 μL 的上游引物 qF 和 0.5 μL 的下游引物 qR,双蒸水补足至 12.5 μL。反应条件为 94°C 预变性 30 s;94°C 变性 15 s,60°C 退火延伸 30 s,40 个循环;溶解温度从 55°C 升至 97°C;40°C 冷却 5 min,使用 Roche Light-Cycler 480 实时定量 PCR 仪进行 PCR。每个样品进行 3 个重复,基因相对表达量用 2^{-ΔΔCt} 法计算,用“平均值±标准差”(X±SD)表示基因相对表达水平,通过统计分析软件 SPSS 21.0 对实验结果进行单因素方差(One-Way ANOVA)分析,差异显著性结果表示为 P<0.05。

1.2.5 斑节对虾盐度应激方法

实验设置 23 和 43(正常海水为 33)2 个盐度梯度,使用淡水和海盐调整盐度,并且每天用盐度计测定养殖水盐度并较准。实验组于 4、8、16 和 32 h 取 3 尾斑节对虾的肝胰腺和鳃,于盐度 33 取 3 尾斑节对虾的肝胰腺和鳃作为 0 h 对照组,并立即存于液氮中,然后置于-80°C 待用。

1.2.6 斑节对虾重金属胁迫方法

重金属胁迫实验使用锌(Zn)、铜(Cu)、镉(Cd)3

种重金属,工作浓度据前人的研究^[20-23]分别设为0.51、0.18和7.73 mg/L。用去离子水溶解3种重金属CuSO₄·5H₂O、ZnSO₄·7H₂O和CdCl₂·2.5H₂O并配置成100倍的工作液。实验一共设为4组,分别为对照组、Cu处理组、Cd处理组和Zn处理组,实验组分别于处理的第6、12、24、48和96小时取3尾斑节对虾的鳃和肝胰腺,对照组中加入等量的去离子水,并取3尾斑节对虾的鳃和肝胰腺作为0 h对照。样品立即存于液氮中,然后置于-80℃待用。

1.2.7 斑节对虾细菌刺激实验

细菌刺激采用哈维弧菌和无乳链球菌,因两者为革兰氏阴性菌和阳性菌,互为对照,可观测基因在这两种菌刺激下的表达变化情况。细菌刺激分为两个实验组和1个对照组,实验组分别用哈维弧菌(*V. harveyi*),和无乳链球菌(*S. agalactiae*)菌悬液注射刺激,对照组注射PBS。哈维弧菌组每尾斑节对虾注射200 μL哈维氏弧菌悬液(1×10⁷菌落形成单位/mL),无乳链球菌组每尾虾注射200 μL无乳链球菌悬液(1×10⁷菌落形成单位/mL),对照组每尾虾注射200 μL PBS。并于注射后的0、6、24、48、72和96 h各取3尾斑节对虾的血淋巴,离心后去上清留沉淀存于液氮中保存。

按照前述方法提取盐度应激、重金属胁迫及细菌注射刺激实验的组织总RNA,按照上述方法逆转录合成cDNA,取稀释后的cDNA为模板,EF-1为内参进行定量表达分析,反应体系、反应程序、数据处理方法同1.2.4。

2 结果

2.1 *PmGPx3a* 的 cDNA 序列特征

通过克隆得到的*PmGPx3a* cDNA全长1135 bp,经进化树分析,命名为*PmGPx3a*(GenBank: KY204031)。开放阅读框(ORF)为651 bp,5'非编码区(UTR)为100 bp,3'UTR 384bp(图1)。预测*PmGPx3a*基因编码216个氨基酸,理论分子量约24.7 kDa,理论等电点是6.33。SMART分析表明,*PmGPx3a*氨基酸序列含有一个谷胱甘肽过氧化物酶活性位点序列(59~74aa)和一个典型的谷胱甘肽过氧化物酶结构域(93~100),第71位氨基酸U为硒代半胱氨酸。

用textshade软件对不同物种的GPx进行多重序列比对(图2),斑节对虾GPx氨基酸序列与其他物种中的GPx氨基酸序列高度保守。其中,*PmGPx3a*与刀额新对虾相似度最高(57%),与斑节对虾GPx3同

一亚型的GPx同源性的44%。与其他动物的同源性为:疣荔枝螺(*Reishia clavigera*)47%,栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)43%,菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)44%,中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)45%,黄鳝(*Monopterus albus*)47%,青鳉(*Oryzias latipes*)45%,普式野马(*Equus caballus*)47%。

```

1 GTTTAAAGTCCGGAGCCGGGACAACAGACAGACAACTGAGAGCGCCAGTCACCCGCCAGC 60
61 CACTCGACGGGAAGGCGAGCGGTCTCTCTCTCGCAGCAGTGTGGGGGGGGTTCGT 120
1 M L W A G F V 7
121 TTCCTCGCGCCCTGAGCGTGGGCGAGGGGCGCGTGGGTCGGGTCGGGCGGCAAGGGC 180
8 S L A A L S V G A G A A S D R V A A R A 27
181 GTGCTTCCACCACCCGAACAATGGCGGGACCATCTATGACTTCAACGAGCTGGACCTCTT 240
28 C F H H P N N G T I Y D F N E L D L F 47
241 CGAGACGAGGAACGTTTCCCTCGCCGACTACAAGGGGAAGGTAGTGTGATCGTCAATGT 300
48 E T R N V S L A D Y K G K V V L I V N V 67
301 GCGACCTACTGAGGGTACACTGCTCAGTACCTTGACATGAATGTGCTACAAAGCTCTA 360
68 A T Y U G Y T A Q Y L D M N V L Q S S Y 87
361 CAACAACCTTCGAGGTCTGGCCTTCCCTTGAACCAAGTTCGGGAAGCAAGGCCAGCAGC 420
88 N N F E V L A F P C N Q F G K Q E P A A 107
421 GAACCGCACGGAGCTCTATAACGGCATCAAGTACGTCCTGCGGCAACATGTTGAGGCC 480
108 N A T E L Y N G I K Y V R P G N M F E P 127
481 CAACTTCAACATGTTCAAGAAGATCGAGGTGAACGGCGGAGAACGAGCACCTCTGTACAC 540
128 N F T M F K K I E V N G E N E H P L Y T 147
541 TTAACCTCAAGGAGTACTGCCCGACCACAAGGGAGTCTTTTCGGACAAGAAAAGCTGTA 600
148 Y L K E Y C P T T R E S F S D K K K L Y 167
601 CTACGAGCCCATCCCGGTGAGCGTCTGCGCTGGAACTGGGAGAAGTCTCTCATCACCAA 660
168 Y E P I R V S V R V W N W E K F L I T K 187
661 GAGCGGCAAGCCCTTCATGCGGTACGACCTGCGCAAGCCGGAAGAAATCAAGAACGA 720
188 S G K P F M R Y D P G T K P E E I K N D 207
721 CGTGGCATCTCTGAGCCAGGAATTTTAAAGTGTGTTTTTTTCCCTTAAAGGCTCATATTT 780
208 V A F L L S Q E F * 216
781 TATTGTTTATTTAATAGAAGTGTATGAACCTTAAATACCTTACAGTCAITTTGAATCTG 840
841 CTTCGTCATGTGTCTTGTTCCTCTCTGTGACTACTGGGAGTCTGCGCCCGCCCAT 900
901 GCATGTTGCCATGAAGGTGCCCGCAGAAACCCCGGGTGGCGCGCTGGAAGCGGGG 960
961 CGATCTCGGGTCCGGTCTTATAGCACATTCATCTCGACCTTGTGACTCTGCGCTGCCAT 1020
1021 GATGGGGGCAAGGAGCTTTTTTGGGGTGGGGGGGAAGGATAAGAAAGGACGCAGAA 1080
1081 ATAAACAACATTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1135
    
```

图1 *PmGPx3a* 的核酸和氨基酸序列

Fig. 1 The nucleotide and deduced amino acid sequences of *PmGPx3a*

两边每行标注的序号指核苷酸和氨基酸的位置:起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)用方框标出;poly(A)尾巴用斜体字标出;单下划线标注为谷胱甘肽过氧化物酶活性位点序列;双下划线标注为谷胱甘肽过氧化物酶结构域2序列;波浪线标注为硒代半胱氨酸位点。The initiation code (ATG) and the termination code (TAA) are boxed. The glutathione peroxidase signature 2 is double underlined, and the glutathione peroxidase active site is underlined. The wavy line indicates selenocysteine

系统进化树分析显示(图3),*PmGPx3a*与刀额新对虾GPx聚为一支,再与斑节对虾GPx3a同一亚型的GPx3聚为一支。

2.2 *PmGPx3a* 的组织表达分析

利用实时定量PCR技术对*PmGPx3a*在斑节对虾9种组织中的转录表达水平进行检测,结果表明*PmGPx3a*在各个组织中均有表达,在斑节对虾眼柄组织中表达量最高,其次是胃、鳃,在肝胰腺组织的表达量最低(图4)。

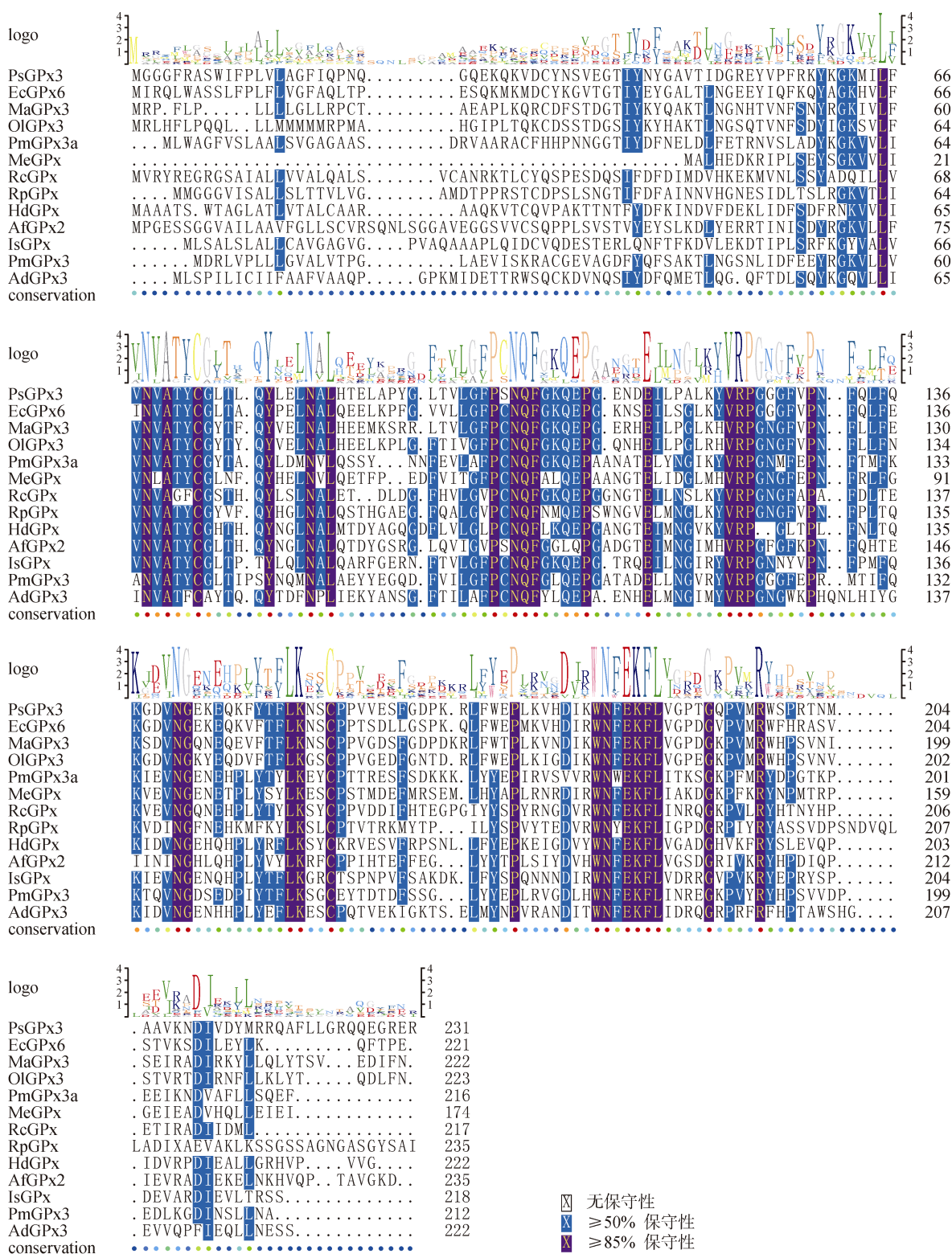


图2 *PmGPx3a* 的氨基酸序列与其他物种 GPx 的氨基酸多重序列对比

Fig. 2 Multiple alignments of the deduced amino acid sequences of GPx3a from *Penaeus monodon* and other species

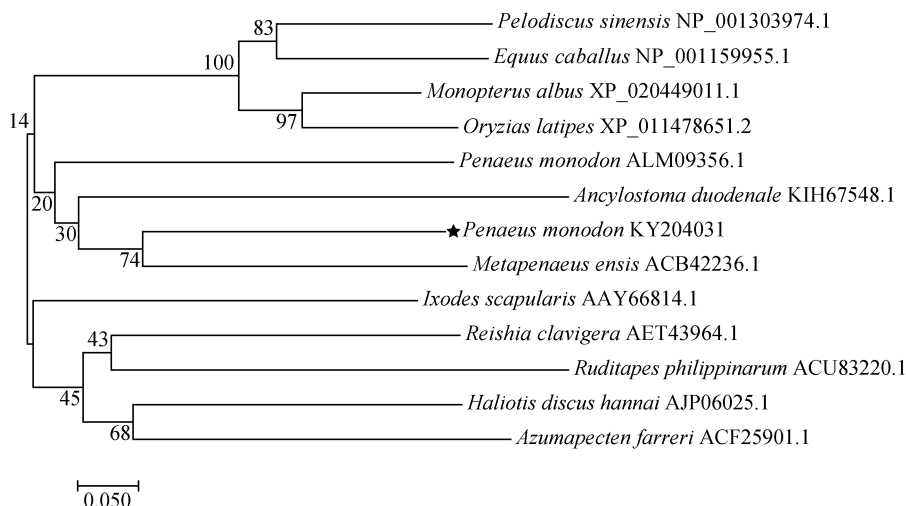


图 3 基于 PmGPx3a 氨基酸序列的 NJ 系统进化树

Fig. 3 NJ phylogenetic tree based on PmGPx3a amino acid sequences

编码 GPx 基因的 GenBank 号分别为: 斑节对虾 (*P. monodon*, KY204031); 刀额新对虾 (*M. ensis*, ACB42236.1); 疣荔枝螺(*Reishia clavigera*, AET43964.1); 中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*, NP_001303974.1); 皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*, ADD71075.1); 黄鳝(*Monopterus albus*, XP_020449011.1); 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*, ACF25901.1); 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*, ACU83220.1); 青鳉(*Oryzias latipes*, XP_011478651.2); 普式野马(*Equus caballus*, NP_001159955.1); 斑节对虾 GPx3(ALM09356.1)

GenBank accession numbers encoded GPx1 are listed as follows: *P.monodon* (KY204031); *M.ensis*(ACB42236.1); *Reishia clavigera* (AET43964.1); *Pelodiscus sinensis* (NP_001303974.1); *Haliotis discus hannai* (ADD71075.1); *Monopterus albus* (XP_020449011.1); *Chlamys farreri* (ACF25901.1); *Ruditapes philippinarum* (ACU83220.1); *Oryzias latipes* (XP_011478651.2); *Equus caballus* (NP_001159955.1); *P. monodon* GPx3 (ALM09356.1)

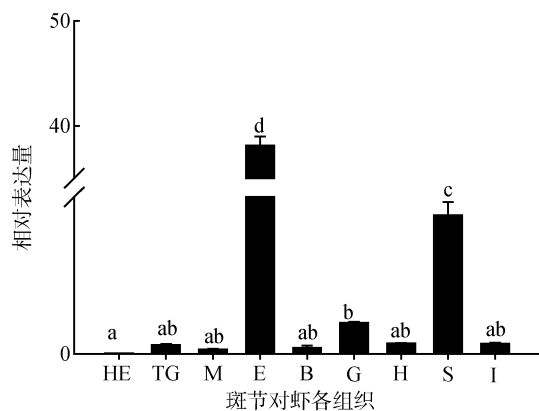


图 4 PmGPx3a 在各组织表达情况

Fig. 4 Expression of PmGPx3a in different tissues

HE. 肝胰腺; TG. 胸神经; M. 肌肉; E. 眼柄; B. 脑; G. 鳃; H. 心脏; S. 胃; I. 肠; 图中数值为“平均值±标准差”(X±SD), 小写字母不同表示差异显著性($P<0.05$), 图 5~图 7 同

HE. hepatopancreas; TG. thoracic ganglia; M. muscle; E. eye; B. brain; G. gill; H. heart; S. stomach; I. intestines; Each bar represents the mean ± SD ($n=3$). Different letters indicate statistically significant differences ($P<0.05$), the same as Fig. 5~Fig. 7

2.3 PmGPx3a 在盐度应激下表达分析

通过荧光定量 PCR 检测, 在高盐度 43 和低盐度 23 胁迫过程中, PmGPx3a 在肝胰腺的表达水平变化如图 5。结果显示, 在高盐度胁迫下, PmGPx3a 相对

表达量在第 8 小时上升到最大值, 是对照组的 4.5 倍, 显著高于对照组($P<0.05$)。在低盐度胁迫过程中, PmGPx3a 相对表达量在 32 h 达到最高值, 是对照组的 3 倍, 显著高于对照组($P<0.05$)。

在高盐度 43 和低盐度 23 胁迫过程中, PmGPx3a 在鳃的表达水平变化如图 5, 结果显示, 在高盐度胁迫下, PmGPx3a 的相对表达量总体呈现下降趋势, 在 16 h 下降至最低, 显著低于对照组($P<0.05$)。

在低盐度胁迫过程中, PmGPx3a 相对表达量总体呈先下降后上升的趋势, 在第 8 小时达到最低的相对表达量, 显著低于对照组($P<0.05$), 在 32 h 上升到最大值, 约为对照组的 1.2 倍, 显著高于对照组($P<0.05$)。

2.4 PmGPx3a 在重金属胁迫下表达分析

在铜、锌、铬胁迫过程中, PmGPx3a 在鳃的表达水平变化如图 6a, 结果显示, 在铜胁迫下, PmGPx3a 的相对表达量总体呈下降的趋势, 并在 12 h 达到最低值, 显著低于对照组($P<0.05$)。在铬胁迫下, PmGPx3a 的相对表达量总体趋势为先上升后下降, 最高表达量在第 24 小时, 为对照组的 1.4 倍, 显著高于对照组($P<0.05$), 在第 48 小时达到最低相对表达量, 显著低于对照组($P<0.05$)。在锌胁迫下, PmGPx3a 的相对表

达量总体呈下降趋势, 在第 24 小时达到最低相对表

达量, 显著低于对照组($P < 0.05$)。

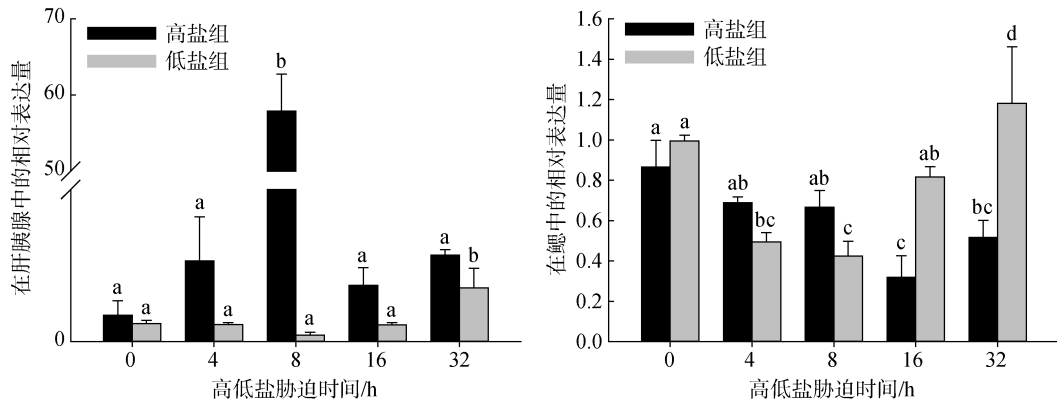


图 5 斑节对虾肝胰腺和鳃中 *PmGPx3a* 在高低盐胁迫过程中表达变化情况

Fig. 5 Relative expression levels of *PmGPx3a* in the gills and hepatopancreas of shrimps under osmotic stress

在铜、锌、铬胁迫过程中, *PmGPx3a* 在肝胰腺的表达水平变化如图 6b, 结果显示, 在铜胁迫下, *PmGPx3a* 的相对表达量总体趋势为先上升后下降, 在第 6 小时达到最高水平, 约为对照组的 7.8 倍, 显著高于对照组($P < 0.05$)。在铬胁迫下, *PmGPx3a* 的相

对表达量总体趋势为先上升后下降, 在第 48 小时达到最大值, 显著高于对照组 4.8 倍($P < 0.05$)。在锌胁迫下, *PmGPx3a* 的相对表达量总体呈现上升趋势, 在第 24 小时达到最大值, 显著高于对照组 3.3 倍 ($P < 0.05$)。

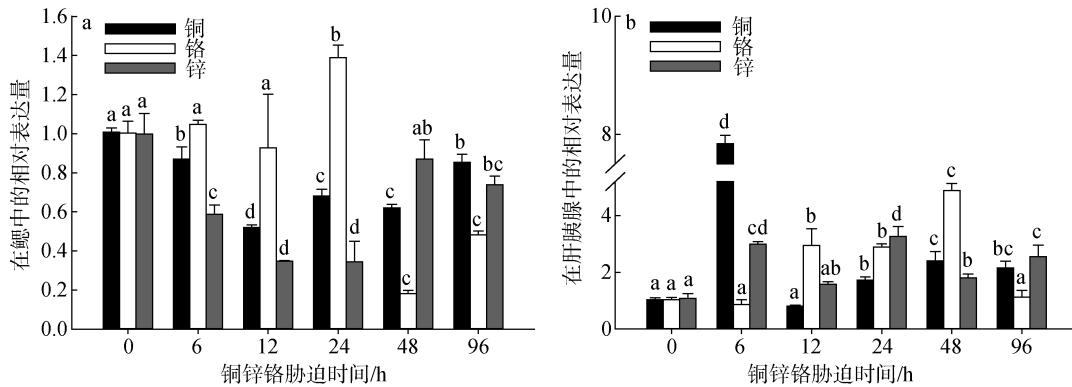


图 6 斑节对虾鳃(a)和肝胰腺(b)中 *PmGPx3a* 在重金属胁迫过程中表达变化情况

Fig. 6 Relative expression levels of *PmGPx3a* in the gills and hepatopancreas of shrimps under heavy metal exposure

2.5 *PmGPx3a* 在细菌刺激下的表达分析

在哈维弧菌和无乳链球菌刺激过程中, *PmGPx3a* 在血淋巴的表达水平变化如图 7, 结果显示, 在哈维弧菌刺激下, *PmGPx3a* 的相对表达量总体呈现上升趋势, 在 24 h 达到最大表达量, 显著高于对照组 2.2 倍($P < 0.05$)。在无乳链球菌刺激下, *PmGPx3a* 的相对表达量在第 6 小时达到最低相对表达量, 显著低于对照组($P < 0.05$)。

3 讨论

在甲壳动物中, GPx 可以通过催化过氧化氢转

化为水来行使重要细胞内信号的转导作用^[10, 24]。本研究成功克隆了 *PmGPx3a*。通过 BLAST 对比, 证实 GPx3a 属于 GPx 家族, 具有硒代半胱氨酸位点, 含有一个典型的谷胱甘肽过氧化物酶活性位点序列(59~74aa), 含有一个典型的谷胱甘肽过氧化物酶结构域 2(93~100), 可通过催化作用, 促进体内 ROS 转化成水而保护机体不被过度氧化。多重序列比对与系统进化树结果显示, *PmGPx3a* 比较保守, 与刀额新对虾的一致性有 57%。不同物种的 GPx 序列在进化上高度保守, 说明其在生物体中具有重要作用。

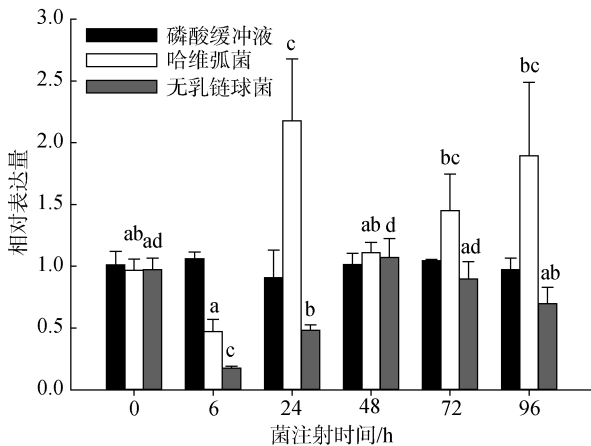


图 7 斑节对虾血淋巴中 *PmGPx3a* 在哈维弧菌和无乳链球菌刺激过程中表达变化情况

Fig. 7 Expression profiles of *PmGPx3a* mRNA in the blood of shrimps after *V. harveyi* and *S. agalactiae* infection

实时定量 PCR 结果表明, *PmGPx3a* 在斑节对虾各个组织中均有表达。在眼柄中表达量最高, 其次是胃、鳃, 且表达水平有显著差异 ($P < 0.05$), 在肝胰腺组织的表达量最低。不同的组织表达量代表 *PmGPx3a* 存在组织表达差异。

盐度胁迫是最常见的水生生物环境胁迫因子^[25]。本研究通过改变斑节对虾所处的海水盐度, 检测 *PmGPx3a* 在不同盐度下的表达水平。实验结果显示, *PmGPx3a* 在鳃中的相对表达量在两种盐度胁迫下基本为下降的, 而在肝胰腺中的相对表达量都为上升的, 推测原因是: 斑节对虾经高低盐胁迫, 生物体产生一系列 ROS, 而后生物体一些抗氧化酶活性升高, 以消除过量的 ROS, 但由于鳃直接暴露于胁迫环境中, 首先直接受到高低盐环境的损害, 其血细胞颗粒细胞和小颗粒细胞产生一定的损伤, 故鳃中的 *PmGPx3a* 表达量为下调的。

一定浓度的重金属能影响斑节对虾蜕皮频率和生长率^[26], 以往的研究也表明, 斑节对虾暴露于过量的重金属环境下, ROS 活性显著增加, 造成机体生成过量的自由基, 从而对机体造成损伤^[26-27]。GPx 等抗氧化酶能通过氧化还原反应, 清除过量的自由基, 从而保护机体免受 ROS 的损伤。在本次重金属胁迫实验中, *PmGPx3a* 在鳃中的相对表达量总体呈现下降的趋势, 在肝胰腺中的相对表达量总体呈现上升的趋势。在铜胁迫下, *PmGPx3a* 在 6 h 达到最大值, 约为对照组的 7.8 倍, 显著高于对照组 ($P < 0.05$); 在铬胁迫下, *PmGPx3a* 的相对表达量总体趋势为先上升后下降, 在第 48 小时达到最大值, 显著高于对

照组 4.8 倍 ($P < 0.05$); 在锌胁迫下, *PmGPx3a* 的相对表达量总体呈现上升趋势, 在第 24 小时达到最大值, 显著高于对照组 3.3 倍 ($P < 0.05$)。这表明 *PmGPx3a* 在重金属胁迫的表达模式与高低盐应激的情况相同。斑节对虾暴露于过量的重金属环境, 一定程度上破坏了鳃细胞, 致使鳃中 *PmGPx3a* 表达量下降, 而肝胰腺因为重金属胁迫, 呼吸暴发活性显著增加, 造成过量自由基, *PmGPx3a* 的相对表达量升高表明, *PmGPx3a* 能够快速参与清除体内自由基的过程中, 保护机体免受重金属的损伤。

在甲壳动物免疫中, 吞噬作用可以产生多种活性氧, 在此过程中, 细胞膜结合复合物 NADPH 与外来颗粒结合, 并将氧分子还原成超氧化物离子, 随后导致生成过氧化氢、羟基自由基及许多其他反应性化合物^[28-29]。研究表明, 海水养殖对虾中, 对虾细菌性疾病致病菌大多数为弧菌和气单胞菌, 即为革兰氏阴性菌^[30], 但为研究 *PmGPx3a* 在细菌注射条件下的表达模式, 作者注射了两种菌: 一种为革兰氏阴性菌, 即哈维弧菌, 一种为革兰氏阳性菌, 即无乳链球菌, 取血淋巴进行定量分析。结果表明: 在哈维弧菌刺激下, *PmGPx3a* 的相对表达量总体呈现上升趋势, 在 24 h 达到最大表达量, 显著高于对照组 2.2 倍 ($P < 0.05$)。在无乳链球菌刺激下, *PmGPx3a* 的相对表达量在 6、24 h 是下调的, 推测可能是生物体的 GPx 家族在受到不同的菌刺激时, 不同亚型的 GPx 面对不同的菌刺激, 产生的应答不同。生物体可能通过降低 GPx3a 的表达来应援 GPx 基因家族其他成员的高表达, 所以作者猜测, 机体应对无乳链球菌刺激时, 产生主要作用的 GPx 可能是 GPx 家族的其他成员。此现象表明, *PmGPx3a* 在细菌刺激下, 对哈维弧菌的刺激更敏感。

综上所述, 本研究克隆获得了 *PmGPx3a* cDNA 全长, 分析了其氨基酸序列特征, 构建了不同物种 Gpx 的 NJ 系统进化树, 探讨了 *PmGPx3a* 在不同环境理化因子刺激下的表达变化, 结果表明了 *PmGPx3a* 参与斑节对虾应对环境胁迫的应激反应, 为深入探讨甲壳动物抗氧化基因家族的结构及功能提供了基础材料。

参考文献:

- [1] Cesaratto L, Vascotto C, Calligaris S, et al. The importance of redox state in liver damage[J]. Annals of Hepatology, 2004, 3(3): 86-92.
- [2] Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer

- cells and therapeutic implications[J]. Drug Resistance Updates Reviews & Commentaries in Antimicrobial & Anticancer Chemotherapy, 2004, 7(2): 97-110.
- [3] Liu C H, Tseng M C, Cheng W. Identification and cloning of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its expression following *Vibrio alginolyticus* infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(1): 34-45.
- [4] Wu C L, Zhang W B, Mai K S, 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 & Physiology Part C Toxicology & Pharmacology, 2010, 152(2): 121-132.
- [5] 姜晶晶, 张殿昌. 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[J]. 福建农林大学学报(自然版), 2010, 39(6): 614-621.
Jiang Jingjing, Zhang Dianchang. Molecular characterization and expression analysis of a 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.
- [6] Margis R, Dunand C, Teixeira F K, et al. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview[J]. Febs Journal, 2010, 275(15): 3959-3970.
- [7] Kryukov G V, Castellano S, Novoselov S V, et al. Characterization of mammalian selenoproteomes[J]. Science, 2003, 300(5624): 1439-1443.
- [8] Chu F F, Doroshov J H, Esworthy R S. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI[J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(4): 2571-2576.
- [9] Wu L T, Chu K H. Characterization of an ovary-specific glutathione peroxidase from the shrimp *Metapenaeus ensis* and its role in crustacean reproduction[J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology, 2010, 155(1): 26-33.
- [10] Zeng Y Y, Jiang Y X, Ai C X. Effects of ammonia-N stress on the activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in different tissues and organs of *Scylla paramamosain*[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2011, 30, 210-215.
- [11] Duan Y, Liu P, Li J, et al. Expression profiles of selenium dependent glutathione peroxidase and glutathione S-transferase from *Exopalaemon carinicauda* in response to *Vibrio anguillarum* and WSSV challenge[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(3): 661-670.
- [12] Parrilla-Taylor D P, Zenteno-Savín T. Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation[J]. Aquaculture, 2011, 318(3): 379-383.
- [13] Xia X F, Zheng J J, Shao G M, et al. Cloning and functional analysis of glutathione peroxidase gene in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(6): 1587-1595.
- [14] Liu K F, Mawsheng Y, Kou G H, et al. Identification and cloning of a selenium-dependent glutathione peroxidase from tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and its transcription following pathogen infection and related to the molt stages[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2010, 34(9): 935-944.
- [15] Ren H, Li J, Li J T, et al. Cloning of catalase and expression patterns of catalase and selenium-dependent glutathione peroxidase from *Exopalaemon carinicauda* in response to low salinity stress[J]. Journal of Ocean, 2015, 34(8): 52-61.
- [16] 孙苗苗, 杨其彬, 陈百尧, 等. 斑节对虾 4 个地理群体遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 海洋科学, 2017, 41(3): 41-47.
Sun Miaomiao, Yang Qibin, Chen Baiyao, et al. Genetic diversity in four populations of *Penaeus monodon* assessed by AFLP makers[J]. Marine Sciences, 2017, 41(3): 41-47.
- [17] 陈劲松, 江世贵, 黄建华, 等. 斑节对虾天门冬氨酸转氨酶基因的克隆及氨氮胁迫条件下的表达分析[J]. 南方水产科学, 2017, 3: 73-82.
Chen Jinsong, Jiang Shigui, Huang Jianhua, et al. Molecular cloning and expression analysis of aspartate aminotransferase (AST) in *Penaeus monodon* under ambient ammonia stress[J]. South China Fisheries Science 2017, 3: 73-82.
- [18] Ahsanullah M, Negilski D S, Mobley M C. Toxicity of zinc, cadmium and copper to the shrimp *Callinassa australiensis*. III. Accumulation of metals[J]. Marine Biology, 1981, 64(3): 311-316.
- [19] 段亚飞, 张家松, 董宏标, 等. 副溶血弧菌对斑节对虾非特异性免疫酶活性的影响[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1557-1564.
Duan Yafei, Zhang Jiasong, Dong Hongbiao, et al. The non-specific immune response of *Penaeus monodon* to *Vibrio parahaemolyticus* challenge[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(9): 1557-1564.
- [20] Li R, Qian J, Zhang W, et al. Human heat shock protein specific cytotoxic T lymphocytes display potent antitumour immunity in multiple myeloma[J]. British Journal of Haematology, 2014, 166(5): 690-701.
- [21] Grundtman C, Kreutmayer S B, Almanzar G, et al. Heat shock protein 60 and immune inflammatory responses in atherosclerosis[J]. Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology, 2011, 31(5): 960-968.
- [22] Märker T, Sell H, Zillessen P, et al. Heat shock protein 60 as a mediator of adipose tissue inflammation and insulin resistance[J]. Diabetes, 2012, 61(3): 615-625.
- [23] 史进选, 傅明骏, 赵超, 等. 斑节对虾 GRP94 基因的克隆及其在不同应激条件下的表达与分析[J]. 南方水产科学, 2016, 12(5): 61-70.

- Shi Jinxuan, Fu Mingjun, Zhao Chao, et al. Characterization and expression analysis of GPP94 in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under different acute stresses[J]. South China Fisheries Science, 2016, 12(5): 61-70.
- [24] Arun S, Krishnamoorthy P, Subramanian P. Properties of glutathione peroxidase from the hepatopancreas of freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii*[J]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1999, 31(6): 725-732.
- [25] 胡志国, 刘建勇, 袁瑞鹏, 等. 3个凡纳滨对虾引进群体对温度和盐度耐受力的配合力分析[J]. 海洋科学, 2016, 40(1): 25-31.
Hu Zhiguo, Liu Jianyong, Yuan Ruipeng, et al. Analysis of combining ability of survival of imported *Litopenaeus vannamei* populations under temperature and salinity stress [J]. Marine Sciences, 2016, 40(1): 25-31.
- [26] Chen J C, Lin C H. Toxicity of copper sulfate for survival, growth, molting and feeding of juveniles of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*[J]. Aquaculture, 2001, 192(1): 55-65.
- [27] Mokhtar M B, Aris A Z, Munusamy V, et al. Assessment level of heavy metals in *Penaeus monodon* and *Oreochromis* spp. in selected aquaculture ponds of high densities development area[J]. European Journal of Scientific Research, 2009, 30: 1450-216.
- [28] Muñoz M, Cedeño R, Rodríguez J, et al. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*[J]. Aquaculture, 2000, 191(1): 89-107.
- [29] 段亚飞, 董宏标, 王芸, 等. 鳃弧菌感染对斑节对虾免疫相关指标的影响[J]. 海洋科学, 2015, 39(9): 44-50.
Duan Yafei, Dong Hongbiao, Wang Yun, et al. The non-specific immune related indexes response of *Penaeus monodon* to *Vibrio anguillarum* challenge[J]. Marine Sciences, 2015, 39(9): 44-50.
- [30] 张朝霞. 养殖斑节对虾(*Penaeus monodon*)细菌性疾病的研究[D]. 厦门: 厦门大学, 1999.
Zhang Zhaoxia. Studies on bacterial disease of *Penaeus monodon*[D]. Xiamen: Xiamen University, 1999.

Molecular cloning and expression analysis of glutathione peroxidase 3a gene from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

LIU Wei^{1,2}, ZHAO Chao¹, FAN Si-gang¹, WANG Peng-fei¹, YAN Lu-lu¹, QIU Li-hua¹

(1. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Received: Aug. 17, 2017

Key words: *Penaeus monodon*; glutathione peroxidase; osmotic stress; heavy metal exposure; bacterial infection

Abstract: Glutathione peroxidase (GPx) is an antioxidant enzyme that plays an important role in protection against oxidative stress by scavenging hydrogen peroxide (H₂O₂). The full-length cDNA sequence of *PmGPx3a* from *Penaeus monodon* was obtained by high-throughput transcriptome sequencing and rapid amplification of cDNA ends. On this basis, the expression levels of *PmGPx3a* in different tissues under osmotic stress, heavy metal exposure, and bacterial infection were detected by fluorescence-quantitative real-time PCR. The cDNA of *PmGPx3a* was 1135 bp in length, including an open reading frame (ORF) of 651 bp encoding 216 amino acids. The blast analysis demonstrated that *PmGPx3a* shared high identity with glutathione peroxidase of *Metapenaeus ensis*. In the salinity stress experiment, the relative expression of *PmGPx3a* was found to be upregulated in the hepatopancreas under high salinity and low salinity ($P < 0.05$). Under heavy metal exposure, the expression level of *PmGPx3a* was downregulated in the gill, whereas in the hepatopancreas, the transcript level of *PmGPx3a* was upregulated ($P < 0.05$). After the injection of *Vibrio harveyi*, the expression level of *PmGPx3a* was increased up to 2.2-fold compared to that in the PBS group. These results reveal that *PmGPx3a* plays a significant role in the adaptive response to conditions of oxidative stress and environmental toxicity.

(本文编辑: 谭雪静)