

斑鳢(*Channa maculata*)微囊藻毒素去毒相关 基因 sGST 的克隆与序列分析*

肖圣杰 梁旭方 廖婉琴 雷腊梅 韩博平

(暨南大学生命科学技术学院 广州 510632)

提要 采用 RT-PCR 技术和 RACE 技术成功克隆淡水鱼类斑鳢 sGST 基因 cDNA 全序列, 推测得到氨基酸序列, 初步分析其结构功能域及系统进化关系。结果表明, 斑鳢 sGST 基因 cDNA 序列全长为 898bp, 编码 225 个氨基酸。斑鳢 sGST 与真鲷、金头鲷、鲮、黑头鲮、川鲮、大口黑鲈等最新定名为 ρ 型的 sGST 氨基酸同源性较高, ρ 型 sGST 为水生生物所特有并共同占据进化树上独立的分枝; 与大鼠、小鼠、人等哺乳动物 sGST 现有所有类型同源性均很低, 并且在进化树上距离也较远, 表明本研究成功克隆的 sGST 基因应属于 ρ 型, 可能在鱼类等水生生物对水栖环境的适应上有重要作用。

关键词 斑鳢, sGST, 克隆, 序列分析, 微囊藻毒素, 去毒
中图分类号 Q953

斑鳢(*Channa maculata*)主要分布于广东、广西、台湾及东南亚地区, 是位于淡水生态系统食物链上游的次级消费者, 通过食物链摄取大量以微囊藻为食的浮游动物、贝类、虾、小型鱼类等初级消费者体内积累的微囊藻毒素。斑鳢抗逆性强, 在微囊藻毒素和其他毒素污染严重的水域都能正常生存并繁殖, 因而其体内相关去毒酶可能具有重要作用。可溶性谷胱甘肽 S-转移酶(soluble glutathione S-transferase, sGST)是水生动物体内重要的抗氧化酶, 并被证实在水生生物微囊藻毒素去毒过程中发挥关键作用(Pflugmacher *et al.*, 1998)。本研究通过 RT-PCR 技术和 RACE 技术成功克隆淡水鱼类斑鳢微囊藻毒素去毒相关基因 sGST 的 cDNA 全序列, 并初步分析其结构功能域及系统进化关系, 为深入研究鱼类微囊藻毒素去毒分子机理奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验鱼

斑鳢(*Channa maculata*)于广州市石牌市场购得。

1.2 斑鳢总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成

从斑鳢分离肝脏组织, 总 RNA 的提取与纯化按 Promega 公司的 SV Total RNA Isolation System 试剂盒推荐方法进行。cDNA 第一链的合成使用 TaKaRa RNA LA PCRTM Kit (AMV) Ver. 1.1 试剂盒, 以斑鳢肝脏总 RNA 为模板, oligo(dT)₁₈ 为反转录引物, 操作按试剂盒推荐方法进行。

1.3 斑鳢 sGST 基因 cDNA 核心片段的克隆

根据已知脊椎动物 sGST 氨基酸序列的保守区域设计一对引物: GST01F(5'-TCTTTTGAGAA-AATGGAGCACAA-3')和 GST02R(5'-CCCTCGA ACATGCGCTGGTACAT-3'), 用于克隆斑鳢 sGST 基因 cDNA 核心片段的 PCR 扩增条件均为: 94 预变性 3min, 94 1min, 40 1min, 72 1min, 共 30 个循环, 最后 72 延伸 5min。扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 RACE 扩增斑鳢 sGST 全长 cDNA

1.4.1 sGST 3 末端 cDNA 扩增 根据克隆得到的斑鳢 sGST 基因 cDNA 核心片段设计 PCR 引

* 国家自然科学基金资助项目, 03673067 号; 广东省科技计划项目, 2005B20301005 号; 广东省水文局蓝藻重点项目, 2003—2006; 教育部留学回国人员科研启动基金项目, 2005—2006; 广东省自然科学基金项目, 031886 号; 肖圣杰, 硕士, E-mail: sainty172@sina.com

通讯作者: 梁旭方, 教授, E-mail: tliangxf@jnu.edu.cn

收稿日期: 2006-09-12, 收修改稿日期: 2006-12-19

物 S1(5'-GTGAATGAGTCCTACGGT-3')和 S2(5'-TTCCAGTCCCAGGGAAAC-3')。3 RACE 的操作参照 TaKaRa 3'-Full RACE Core Set 试剂盒推荐方法进行。扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4.2 sGST 5'末端 cDNA 扩增 根据克隆得到的斑鳢 sGST 基因 cDNA 核心片段设计 5' RACE 反转录引物 RT primer (5'-(P)CCTCAGT-GATACA CT-3')和嵌套 PCR 引物, 第一次 PCR 引物对为 A1 (5'-ATTTTGAAGGCAGGAAGC-3')和 3'RACE 引物 S1, 二次 PCR 引物对为 A2 (5'-CTTGCTTTGACTTGTGCT-3')和 3 RACE 引物 S2。5 RACE 的操作参照 TaKaRa 5'-Full RACE Core Set 试剂盒推荐方法进行。扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 PCR 产物的克隆及测序

PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳纯化, H. Q. & Q. Gel Extraction Kit II (U-gene)回收后, 克隆至 pMD 18-T 载体(TaKaRa), 转化感受态 *E. coli* JM109, 并利用 M13 正反向引物, 通过 PCR 反应检测得到阳性克隆, 阳性克隆由博亚公司进行测序。

1.6 序列分析与系统树构建

对测序结果进行分析整理得到斑鳢 sGST 基因 cDNA 全长序列, 推测得到其氨基酸序列, 并分别与 NCBI 网站 GenBank 上发表的各种生物 sGST 氨基酸序列一起, 用 BLAST 和 DNA 分析软件 Vector NTI suite 6.0 进行序列分析。采用 CLUSTAL 1.81 软件进行序列比对排列后, 用 Mega 3 软件采用邻接法构建系统树, 500 次重复计算靴带(bootstrap)值。

2 结果与分析

2.1 斑鳢 sGST 基因的 cDNA 序列

通过对 sGST 核心片段、3 RACE 片段、5 RACE 片段测序结果进行序列拼接, 确定克隆得到的斑鳢 sGST 基因 cDNA 序列, 全长为 898bp, 其中 5'非翻译区(5'-UTR)为 44bp, 3'非翻译区(3'-UTR)为 176bp, 开放阅读框(ORF)为 678bp, 编码 225 个氨基酸(图 1)。斑鳢 sGST 基因的起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TGA, polyA 加尾信号是 AATAAA(图 1)。

2.2 斑鳢 sGST 与其他生物 sGST 同源性比较及系统进化分析

将斑鳢 sGST 和其他生物 sGST 氨基酸序列

通过 BLAST 进行同源性比较, 结果发现: 斑鳢 sGST 与真鲷(*Pagrus major*)、金头鲷(*Sparus aurata*)、鲈(*Pleuronectes platessa*)、黑青斑河鲀(*Tetraodon nigroviridis*)、川鲈(*Platichthys flesus*)等海水鱼或海水起源鲈形目鱼类——大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)sGST 的氨基酸同源性较高, 分别为: 74%、73%、72%、69%、67%、74%; 而与鲤科鱼类黑头鲷(*Pimephales promelas*)、斑马鱼 sGST 同源性较低, 分别为 58%、51%; 值得指出的是它甚至与文昌鱼(*Branchiostoma belcheri tsingtaunese*)和一种海生绿藻(*Coccomyxa* sp.) sGST 的同源性也达到 45%和 41%; 与哺乳动物大鼠、小鼠、人等的同源性很低, 仅为 10%左右。

GST 是广泛存在于各种生物体内的由多个基因编码具有多种功能的一组同工酶, 有膜结合和胞液两种形式, 以胞液 GST(sGST)为主。根据基因结构、氨基酸序列、底物特异性、化学亲和力及动力学行为等不同标准, 哺乳动物 sGST 可分为 8 种类型: α (Alpha)、 μ (Mu)、 π (Pi)、 σ (Sigma)、 θ (Theta)、 ω (Omega)、 κ (Kappa)和 ζ (Zeta)。近年来在其他生物中又相继发现了其他许多类型: 例如细菌中的 β (Beta), 昆虫中的 δ (Delta)、U、 ϵ (Epsilon), 植物中的 τ (Tau)、 λ (Lambda)和 ϕ (Phi)等(Hayes *et al*, 2004)。目前还没有基于序列相似性对 sGST 分型的明确标准, 通常公认氨基酸序列同源性大于 60%为同型, 低于 30%则为不同型(Sheehan *et al*, 2001)。

Konishi 等(2005)克隆了一个新的真鲷 sGST 基因(GenBank 序号: AB158412), 开放阅读框为 675bp, 编码一个约为 28-kDa 的蛋白亚基, 与他们之前克隆的编码两个大小均为 25-kDa 左右蛋白亚基、归类为 α 型 sGST 的基因(GST Alpha-1 和 GST Alpha-2)在结构和性质上有很大的不同。基因组序列分析表明, 此新真鲷 sGST 基因与大口黑鲈、鲈 sGST (早期命名为 GST Alpha, 后归为 Theta-related GST)基因序列和结构相类似, 均由 6 个外显子和 5 个内含子构成, 而哺乳动物的 Theta 型只含有 5 个外显子。对真鲷 sGST 结合底物进行研究发现, 真鲷 sGST 与 CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene)的反应活性很强, 但不能与 CHP (cumene hydroperoxide)、DCNB (1,2-dichloro-4-nitrobenzene)、EA (ethacrynic acid)、4-hydroxy-nonenal 及 p-nitrobenzyl chloride 等哺乳类 sGST

```

TTTTCTGTTTCTCAGCTAGTATTGTCGCAGCTCCCTCTGAAACCATGGCCAACAATATAA 60
                                     M A N N I 5
CCGTGTTGTGGGGCTCCGGTTCCTCCCTCCCTGCTGGAGGGTGTGATCGCCTTGGAGGAAA 120
T V L W G S G S P P C W R V L I A L E E 25
AGAACGTGCGGGACTACAACAGCGTGCAGCTCTCCTTTGAGAAAATGGAGCACAAGTCAA 180
K N V R D Y N S V Q L S F E K M E H K S 45
AGCAAAGTCTGGATATAAAATCCAGGGGTGAGCTTCTGCCTTCAAATTTGGGGACCTTG 240
K Q V L D I N P R G Q L P A F K I G D L 65
TCGTGAATGAGTCTACGGTGCCTGCATGTTCTAGAGAAAAATCCAGTCCCAGGGAA 300
V V N E S Y G A C M F L E K K F Q S Q G 85
ACCGGCTGACACCAGAGTGTATCACTGAGGAGGGTCATATGTACCAGCGCATGTTGAAG 360
N R L T P E C I T E E G H M Y Q R M F E 105
GTCAAACCTGAGCCAGAAAATGGCTGATGTTATTACTACAACCTGGAAGGTGCCAGAGG 420
G Q T L S Q K M A D V I Y Y N W K V P E 125
GGGAGCGCATGACTCTGCTGTGAAGAGGAACAGAGAAGCTCTGATTTCTGAACTCAAGC 480
G E R H D S A V K R N R E A L I S E L K 145
TGTGGGAGGGATACCTGCAGAAGGGACCAGGCCCTTCTGGCAGAAAGAACTTTTCAC 540
L W E G Y L Q K G P G P F L A G K N F S 165
TGCTGATGTTGTTGTTTATCCAGCGATTGCATATCTCTCCGTTTTGGGTTATGTGAAG 600
L A D V V V Y P A I A Y L F R F G L C E 185
AGCGTTACCCTAAATTGGCAGCGTACTATAATTCTTTGAAGAGCAGACCAGCATCAAAA 660
E R Y P K L A A Y Y N S L K S R P S I K 205
CCACTTGGCCTCCTACCTGGTGGAAACCCACAGGGCTCAGACTTGTGAAAGACCTCT 720
T T W P P T W L E T P Q G S D L L K D L 225
GAGAGTCAAACACAGCTAACTGTCTTATGTAACCACTCCTTGCATCACATTACTTTAGT 780
TGACTGCGGTTTTGAATAAATGCTGTTCTCTGCTTGTAGTTTCTTTACATCCTTTGTT 840
TTGTGACTTGAAGTGAATAAAGGCTTGTGTTGTGTACCAAAACCAAAAAAAAAAAAAA 898

```

图 1 斑鳢 sGST 基因 cDNA 全序列及推测的氨基酸序列

Fig. 1 The nucleotide sequence of sGST cDNA and predicted amino acid sequence in *C. maculata*
注: 起始密码子 ATG 和终止密码子 TGA 用黑体表示, polyA 加尾信号(AATAAA)用下划线标示

经典底物结合。另外, 真鲷 sGST 与现有哺乳动物各型 sGST 的同源性均很低。因此, 真鲷、大口黑鲈、鳢 sGST 均不应归为 α 型或 θ 型, Konishi 等(2005)认为, 他们所克隆的真鲷 sGST 应属于一新类型, 并将该类型定名为“Rho”(ρ)型。作者所克隆的斑鳢 sGST, 与此真鲷 ρ 型 sGST 和大口黑鲈 sGST 氨基酸序列同源性最高(均为 74%), 据此作者认为斑鳢 sGST 基因也属于 ρ 型 sGST。

以本试验中成功克隆的斑鳢 sGST 氨基酸序列和各种生物 sGST 各类型的已知氨基酸序列(来自 GenBank)一起用邻接法构建系统树(图 2)。图 2 与斑鳢 sGST 氨基酸序列通过 BLAST 进行同源性比较得出的结果一致: 斑鳢 sGST 与黑青斑河鲈一未命名的蛋白(GenBank 序号: CAF99459)处于同一进化树分枝, 与真鲷(ρ 型 sGST)、金头鲷(*Sparus aurata*)、鳢(Theta-related GST)等海水鱼 sGST 处于邻近的进化树分枝, 且与黑头鲈、文昌鱼甚至一种海藻的 sGST 共同聚为一类占据进化

上独立的分枝, 推测这些都应归为 ρ 型 sGST; 据此系统树分析结果, 黑青斑河鲈此未命名蛋白应命名为 ρ 型 sGST; 真鲷 GST Alpha-1 和 GST Alpha-2、斑马鱼 Alpha like GST、条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)sGST, 与黑青斑河鲈另一个未命名的蛋白(GenBank 序号: CAG 09409)处于同一个或邻近的进化树分枝, 并与哺乳动物 α 型聚在一起, 推测这些都应归为 α 型 sGST; 同鱼类与哺乳类 α 型 sGST 系统树分析结果相类似, 底鳉(*Fundulus heteroclitus*)GST Theta 与哺乳动物 θ 型 sGST 处于同一个或邻近的进化树分枝, 欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*) GST Pi、鲑鱼(*Oncorhynchus nerka*) GST Pi 与哺乳动物大鼠 GST Pi-2 也聚为一类。以上结果表明, 不同种生物 sGST 各个类型基本上分别占据进化上独立的分枝, 且本研究中成功克隆的斑鳢 sGST 基因应属于水生生物所特有的 ρ 型 sGST。

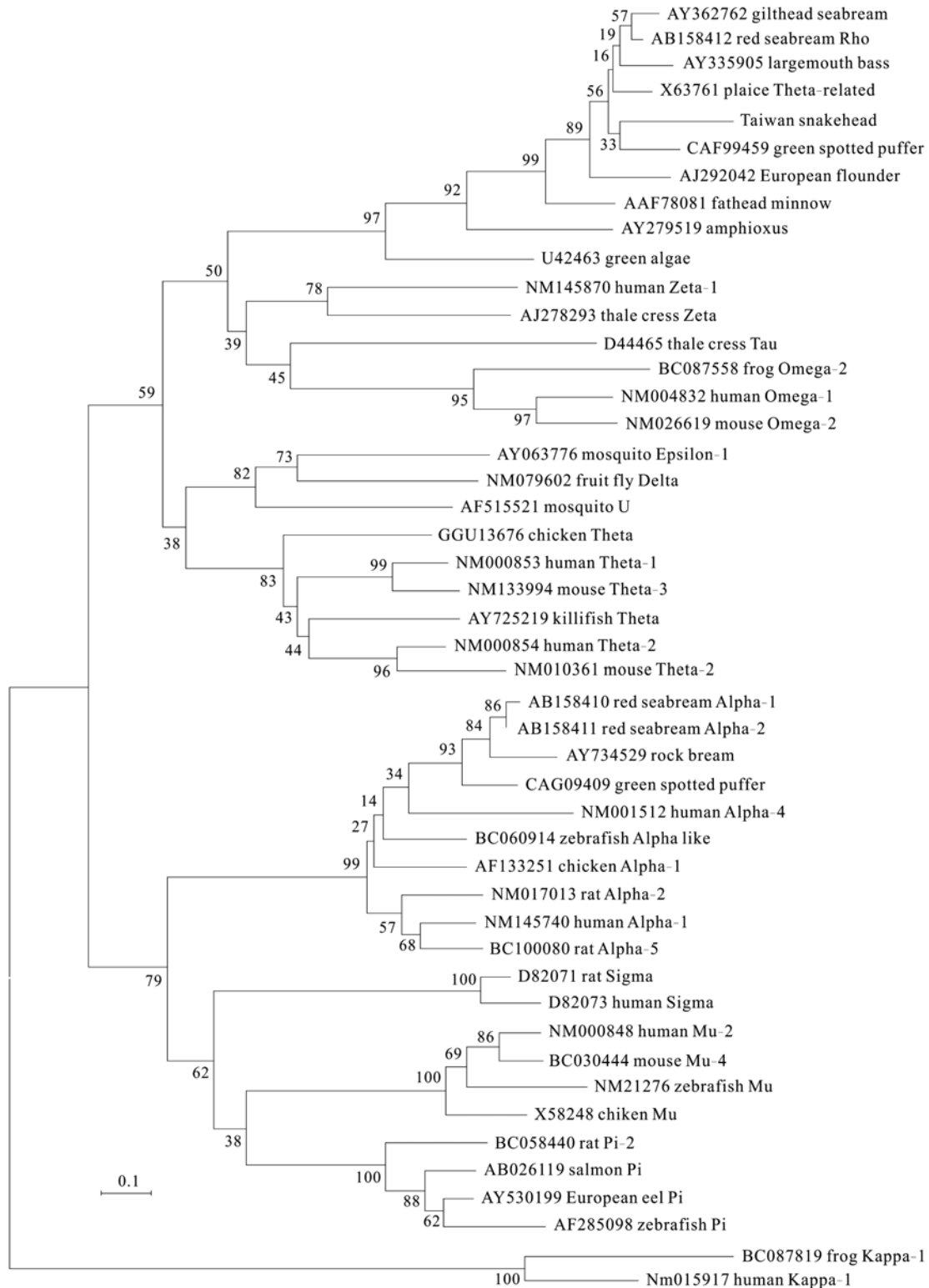


图 2 用邻接法构建的斑鳢和其他生物各类型 sGST 基因系统树

Fig. 2 A neighbor-joining phylogenetic tree of sGST in *C. maculata* with various classes of sGST of other species

注: 采用 CLUSTAL 1.81 软件和 Mega 3 软件构建系统树, 500 次重复计算靴带值

3 讨论

淡水鱼类尤其是居于富营养化水体食物链顶端的斑鳢, 非常容易在体内聚集较高浓度的微囊藻毒素, 长期的自然选择可能会使它们对微囊藻

毒素的耐受性增强, 因此斑鳢可作为研究与微囊藻毒素去毒相关基因的一个十分理想的实验材料。

本研究中克隆得到的斑鳢 sGST 基因 cDNA

序列全长为 898bp, 编码 225 个氨基酸。斑鳢 sGST 与真鲷、金头鲷、鲈、黑头鲷、斑马鱼等同源性较高(50%—74%), 与哺乳动物大鼠、小鼠、人等的同源性很低(10%以下)。对斑鳢 sGST 和其他物种各类型的 sGST 氨基酸序列进行同源性分析并用邻接法构建系统树, 表明本研究成功克隆的 sGST 基因应属于水生生物所特有的 ρ 型 sGST, 这很可能与鱼类等水生生物 sGST 基因承担诸如藻毒素等水环境毒物去毒代谢的特殊功能有关。

GST 广泛存在于动植物体内, 可催化 GSH 与有毒化学物质结合, 使之成为水溶性加合物而排出体外, 起到十分重要的解毒作用。sGST 控制所有毒物在前期(第 1 时相)之氧化、水解去毒过程(第 2 时相)所共有的加合排毒过程, 也因此被称为第 2 时相去毒酶。微囊藻毒素能刺激生物体内活性氧的生成, 诱导机体内去毒相关基因(如 sGST、GPx、谷胱甘肽合成酶等)转录表达加强, 这些基因的表达产物一方面缓解氧化压力、抑制活性氧对机体的损伤, 另一方面催化毒素形成亲水化合物经排泄系统排出体外(Gehring *et al*, 2004)。由于在鱼类微囊藻毒素去毒代谢过程中, 第 2 时相的加合排毒过程具有独一无二的键作用, 因而鱼类等淡水生物 sGST 基因也被称为微囊藻毒素去毒酶基因(Pflugmacher *et al*, 1998)。

目前, 关于微囊藻毒素在水生动植物体内去毒代谢的详细研究, 还只停留在去毒十分关键的

第一步, 即 sGST 的催化下微囊藻毒素与 GSH 发生加合反应。作者在本研究中通过 RT-PCR 技术和 RACE 技术成功克隆淡水鱼类斑鳢 sGST 基因 cDNA 全序列, 推测得到氨基酸序列, 并分析其结构功能域及系统进化关系, 这为进一步获得此基因的侧翼调控序列, 深入研究鱼类微囊藻毒素去毒基因的表达调控机制, 阐述生态系统中微囊藻毒素去毒代谢分子机理, 以及进一步研发鱼类微囊藻毒素生物去毒器奠定了基础。

参 考 文 献

- Gehring M M, Shephard E G, Downing T G *et al*, 2004. An investigation into the detoxification of microcystin-LR by the glutathione pathway in Balb/c mice. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(5): 931—941
- Hayes J D, Flanagan J U, Jowsey I R, 2004. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45: 51—88
- Konishi T, Kato K, Araki T *et al*, 2005. A new class of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the red sea bream *Pagrus major*. *Biochem J*, 388(Pt1): 299—307
- Pflugmacher S, Wiegand C, Oberemm A *et al*, 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/General Subjects*, 1425: 527—533
- Sheehan D, Meade G, Foley V M *et al*, 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J*, 360(Pt1): 1—161

MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF MICROSYSTIN DETOXIFICATION-RELATED sGST IN SNAKEHEAD FISH *CHANNA MACULATA*

XIAO Sheng-Jie, LIANG Xu-Fang, LIAO Wan-Qin, LEI La-Mei, HAN Bo-Ping
(College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou, 510632)

Abstract Microcystins are being increasingly recognized as a potential hazard to aquatic ecosystems and human health, as it can sustain in freshwater aquaculture products. Microcystin detoxification-related genes such as soluble glutathione S-transferase (sGST) play an important role in microcystin detoxification in various fishes. The *Channa maculata*, or commonly called Taiwan snakehead is an upstream animal member of freshwater food chain, and it can survive and reproduce in highly polluted waters and show a very strong resistance to microcystins and many other toxins. Therefore, they were chosen for study on the mechanism of endurance in the fish, and further on human protection against the toxin.

The fish samples were collected in a local street market. After deprivation of the life and separation of liver, the sGST was analyzed. A 210bp cDNA fragment of sGST was successfully amplified by RT-PCR from the liver. The full sGST cDNA sequence of the fish was further obtained by 3'- and 5'-rapid amplification of cDNA ends (RACE). Nucleotide sequence analysis revealed that the cloned sGST cDNA was 898bp in length, having 225 amino acid residues encoded.

A search in the BLAST protein database revealed that, the deduced amino acid sequence of the sGST is very similar to the sGST of other fishes, such as largemouth bass (*Micropterus salmoides*) (74% identity) and red sea bream (*Pagrus major*) (74% identity), which were recently classified as the Rho-class sGST, a new class of sGST, now found only in fish and other aquatic organisms. Results of the BLAST search and phylogenetic tree building revealed a big difference in sGST between aquatic organisms and land mammals, implying that the new class sGST in fish and other aquatic organisms may have special function for the detoxification of aquatic toxins.

Key words Taiwan snakehead *Channa maculata*, sGST, Molecular cloning, Sequence characterization, Microcystin, Detoxification