

重金属胁迫下厚壳贻贝谷胱甘肽 S-转移酶基因表达分析*

刘慧慧¹ 何建瑜¹ 赵荣涛¹ 薛超波^{2①}

(1. 浙江海洋学院 国家海洋设施养殖工程技术研究中心 舟山 316004; 2. 舟山市质量技术监督检测研究院 舟山 316021)

提要 谷胱甘肽 S 转移酶(Glutathione S-transferase, GST)因对环境污染反应灵敏, 且具有降解毒物、抗氧化等作用常被作为水体污染的指示分子; 厚壳贻贝对环境污染物具有很强的耐受性, 是重要的海洋环境污染监测生物, 因此研究厚壳贻贝 GST 分子及其表达特征, 对正确使用其进行海洋环境污染预警具有重要价值。本文通过同源克隆法获得厚壳贻贝 GST 部分序列(Gene Bank 序列号为 KC176684), 经序列比对和系统进化分析初步推断所得到的 GST 基因为 pi 型。鉴于铜和镉是目前海水中主要的重金属污染源, 进一步利用实时荧光定量 PCR 技术检测铜和镉胁迫后 GST 在厚壳贻贝血液中的表达水平, 结果显示铜(Cu^{2+} 浓度为 $20\mu\text{g/L}$)和镉(Cd^{2+} 浓度为 $200\mu\text{g/L}$)胁迫均造成 GST 高水平表达, 但最高表达量出现的时间略有差别, Cu^{2+} 出现在刺激后第 10 d, 表达量为对照组的 6.95 倍, Cd^{2+} 则出现在第 15 d, 约为对照组的 6.11 倍, 说明 GST 参与了厚壳贻贝重金属的解毒过程, 且对于不同重金属胁迫的解毒能力稍有不同。鉴于厚壳贻贝 GST 对重金属刺激的敏感作用, 可将其作为海水养殖环境污染监测的生物指示基因。

关键词 厚壳贻贝; 谷胱甘肽 S-转移酶(GST); 重金属胁迫; 表达分析

中图分类号 Q789 doi: 10.11693/hyhz20121204002

厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)是一种栖息于海水中的常见双壳经济贝类, 北至辽宁大连, 南至福建东山均有分布, 以浙江沿海资源量最大, 其软体部蛋白质含量较高, 鲜味氨基酸和必需氨基酸组成丰富, 微量元素构成合理, 属营养价值和经济价值都较高的海产贝类(何建瑜等, 2012), 已发展为浙江沿海重要的经济养殖品种。但随着近年来沿海城市工业化进程的加速, 厚壳贻贝繁殖的周边海域水质、环境因子持续恶化, 生境污染不断加剧, 作为一种典型的滤食性潮间带生物, 厚壳贻贝因具有个体较大, 生活史较长, 活动性差, 容易采集, 对环境污染物(如重金属、病原微生物等)具有很强的耐受性等特征, 常被作为环境指示生物来监测海区环境的变化。

谷胱甘肽 S-转移酶(Glutathione S-transferase,

GST)是多功能解毒酶超家族中的一员(雷安平等, 2009; 张妍, 2012), 主要在抗毒机制第 II 阶段起作用, 因此也称为 II 相解毒酶, 在生物体内起到抵抗外源物质入侵和细胞毒性防御的作用(Saranya Revathy *et al*, 2012; Umasuthan *et al*, 2012), 涉及细胞的去毒及毒素的解毒过程(Masella *et al*, 2005; Ohnuma *et al*, 2011)。其作用机理是促进还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH)的活性基团—巯基与毒素结合形成亲电子试剂(程炜轩等, 2009), 使亲电的疏水化合物变成亲水物质, 易于从胆汁或尿液中排泄(Liao *et al*, 2006)。此外, GST 通过催化过氧化氢的氧化还原反应, 清除体内由代谢反应产生的氧自由基和过氧化物, 参与体内免疫反应(罗凯娅等, 2012), 保护细胞免受外界胁迫造成的损伤(Blanchette *et al*, 2002;

* 国家科技支撑计划, 2011BAD13B08 号; 国家星火计划项目, 2012GA700111 号; 浙江省海洋与渔业项目, 浙海渔计(2012)83 号。
刘慧慧, 硕士, 讲师, E-mail: liuhuihui_77@163.com

通讯作者: 薛超波, E-mail: xuechaobo2001@163.com

收稿日期: 2012-12-04, 收修改稿日期: 2013-05-20

张永国等, 2006)。另有研究证实, GST 中 pi 型能参与细胞的增殖调控, 并通过各种基因控制的酶在抗氧化反应中协同作用发挥功能(Salinas *et al*, 1999, Fu *et al*, 2012), 可以作为生物受环境污染的指示标记物, 其表达水平在一定程度上可以有效地反应生物体受环境毒物的损害程度(Saranya Revathy *et al*, 2012), 该特征在硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)(Blanchette *et al*, 2002)及太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)(Boutet *et al*, 2004)中均有报道。

GST 在生命活动过程中有解毒、抗氧化等保护细胞的作用, 而且对污染物有敏感反应, 常作为生物标志物。厚壳贻贝因对环境污染具有耐受性, 而常被用作污染指示生物来监测海区环境的变化。因此, 为研究厚壳贻贝 GST 基因在代谢活动中的作用, 以及分析该基因在海洋环境污染监测中的指示作用, 本文克隆了厚壳贻贝 GST 基因, 并采用实时荧光定量 PCR 技术, 以其血液中 GST 为分子标记, 监测镉、铜等重金属胁迫下 GST 基因的相对表达情况, 以期为厚壳贻贝的大规模安全养殖及正确运用其 GST 分子作为环境污染预警提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料

本次实验成体厚壳贻贝于2012年6月购自舟山水产品市场, 平均壳长9.3cm, 平均壳高4.6cm, 于25°C 洁净海水中暂养1周, 每天换新鲜海水, 定期投喂微绿球藻(*Prochlorococcus*)和小球藻(*Chlorella*)。随后将厚壳贻贝随机分为2组, 每组30只, 并立即抽取各组的3只厚壳贻贝血液, 提取总 RNA 作为对照组, 标记为 0d。实验采用 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{CdCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 两种重金属进行胁迫处理, 将两组贻贝分别置于含铜(Cu^{2+} 浓度为20 $\mu\text{g/L}$)和镉(Cd^{2+} 浓度为200 $\mu\text{g/L}$)的10L 海水中, 每天换一半含有相应浓度重金属的海水, 定期投喂微绿球藻和小球藻, 分别取处理后第5d、10d、15d、20d、30d 的厚壳贻贝(每个时间点随机取3只)血液提取总 RNA。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

用一次性针筒(5mL)快速从厚壳贻贝闭壳肌抽取血液, 立即置于 4°C 800r/min 离心 10min, 沉淀用于总 RNA 提取, 方法按 TaKaRa 公司的 Trizol Total RNA 提取试剂盒推荐方法进行, 获得的总 RNA 以 1.5%非变性琼脂糖电泳检测, 并置于紫外分光光度计(Bio-Rad, USA)下检测其 A260/A280 值。以 TaKaRa

M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 试剂盒(TaKaRa)对所提取的 RNA 进行反转录, 获得相应 cDNA。

1.3 厚壳贻贝 GST 基因克隆

根据已知海水双壳贝类紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*, AF527010)、地中海贻贝(*Mytilus edulis*, AY557404)、硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*, EU 024655)、河蚬(*Corbicula fluminea*, AY885667)、美洲帘蛤(*Mercenaria mercenaria*, EU024655)的 GST 基因通过 Primer 5.0 软件在保守区设计兼并引物 GST-F 和 GST-R(表 1)。以厚壳贻贝血液 cDNA 为模板, 克隆 GST 基因。20 μL 扩增反应体系: 10 \times PCR Buffer 2 μL , Mg^{2+} (25mmol/L)2 μL , dNTPs(2.5mmol/L)0.4 μL , GST-F (10 $\mu\text{mol/L}$)、GST-R(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.8 μL , ddH₂O 13 μL , Taq 酶(5U/ μL , TaKaRa)0.4 μL , 模板 cDNA 0.6 μL 。PCR 扩增条件: 95°C 预变性 4min, 94°C 变性 1min, 53°C 退火 30s, 72°C 延伸 45s, 循环 35 次; 最后 72°C 延伸 10min。以 DL 2000 Marker 为标记, 1.5%琼脂糖电泳检测 PCR 产物, 选取与预期大小一致的约 500bp 的条带用琼脂糖胶纯化试剂盒(TIANGEN)纯化后, 送上海英潍捷基生物公司测序。

表 1 厚壳贻贝 GST 基因克隆及荧光定量所用的引物序列
Tab.1 Primer sequences for GST cloning and real-time quantitative PCR in *Mytilus coruscus*

引物(primer)	引物序列(sequences)
GST-F	5'-GGTTTYSARMTKGYRCAGTC-3'
GST-R	5'-CCRTTKACRGGCATMTTCTT-3'
qGST-F	5'-GCAGGCAGCAACATTAGAC-3'
qGST-R	5'-GCCAACATACGCTCATAGA-3'
β -actin-F	5'-ATGAAACCACCTACAACAGT-3'
β -actin-R	5'-TAGACCCACCAATCCAGACG-3'

1.4 厚壳贻贝 GST 基因克隆序列分析

将双向测序获得的 cDNA 序列利用 DNASTar7.0 软件进行拼接, 以 Clustal X1.8 和 BLASTn(<http://www.Ncbi.Nlm.Nih.gov/BLAST/>)进行序列同源性比对, 在 MEGA4.1 软件中采取 Neighbor-Joining 算法构建系统发育树, 1000 次重复计算 Bootstrap 值(Kumar *et al*, 2004), 进行系统发育分析。

1.5 厚壳贻贝 GST 基因表达实时荧光定量 PCR 检测

根据 GST 基因测序结果设计荧光定量 PCR 引物 qGST-F 和 qGST-R, 采用 RT-PCR 法, 以 β -actin 为内参, 分析 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 胁迫下厚壳贻贝血液中 GST 的表达情况(引物 qGST-F、qGST-R、 β -actin-F、 β -actin-R 见表1)。20 μL PCR 反应体系: qGST-F(10 $\mu\text{mol/L}$)与

qGST-R(10 μ mol/L) 各 0.8 μ L, 2 \times SYBR[®] Premix Ex TaqTM (TaKaRa)10 μ L, cDNA 0.8 μ L, ddH₂O 7.6 μ L, 反应在 ABI-7500型 PCR 仪上进行, 采用两步法进行扩增, 即95 $^{\circ}$ C 预变性1min, 95 $^{\circ}$ C 变性10s, 59.6 $^{\circ}$ C 延伸 45s, 共40个循环, 结束后, 从55 $^{\circ}$ C 缓慢升温到95 $^{\circ}$ C, 制备熔解曲线。每次反应都设置阴性对照和无模板对照, 每个反应3个重复孔。

1.6 数据处理

GST 的相对表达量按用最小二乘法 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算(Pfaffl, 2001), 并利用 SPSS 13.0 进行单因子显著性差异分析(ANOVA)和 t 检验, 分别标记为显著差异 ($P<0.05$)和极显著性差异($P<0.01$)。

2 结果

2.1 基因扩增及进化发育分析

以反转录得到的血液 cDNA 为模板(总 RNA 浓度, A260/A280=1.91), 用兼并性引物扩增得到一条约 500bp 的特异性条带, 与预期扩增产物片段大小接近(图 1)。经 3 次测序确认后的序列提交 NCBI 数据库获得 GenBank 序列号为 KC176684, 通过 BLAST 比对发现, 该序列与紫贻贝(AF527010)和地中海贻贝(AY557404)的 pi 型 GST 基因均有较高的相似性(93%—94%), 初步判断所获得的 GST 分子为 pi 型。选取人、猴、鼠、巨蜥及部分双壳贝类各种 GST 亚型利用 MEGA4.1 构建厚壳贻贝 GST 的系统发育树见图 2, 结果发现, Alpha、Zeta、Kappa、Pi、Omega、Mu 和 Sigma 等 7 种亚型的 GST 基因之间相互成簇, 各聚成一支; 且每一种亚型中脊椎动物和无脊椎动物的 GST 基因也相互分开, 各聚成不同的亚支, 说明各亚型差别明显, 具有相对独立的保守结构域。厚壳贻贝 GST 与 pi 型 GST 双壳贝类位于同一进化支, 进一步说明本次实验获得的 GST 基因归属于 pi 型, 这

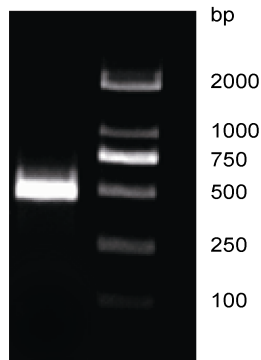


图 1 GST 扩增产物电泳图谱

Fig.1 The gel electrophoresis pattern of GST PCR product

与 BLAST 的比对结果相似, 同时也说明厚壳贻贝 GST 与人、猴、鼠等在进化上具有较大的差别。

2.2 Cu²⁺及 Cd²⁺胁迫下厚壳贻贝 GST 基因表达

GST 和内参 β -actin 的扩增曲线均呈“S”形, 复孔间扩增曲线重叠, 指数区明显、基线平整, 阴性对照和无模板对照无扩增, 熔解曲线均为单一峰, 扩增效率达 100% \pm 5%, 说明定量 PCR 反应体系良好, 无非特异性扩增, 确保相对定量结果的准确性(周向红等, 2011)。检测发现, 厚壳贻贝 GST 受铜胁迫前几天一直处于低水平表达, 至第 10 d 表达迅速达到最高, 为对照组的 6.95 倍, 接下来的 10 d 内一直保持相对较高的表达水平, 约为对照组的 2.5—3.5 倍, 之后开始下降, 30d 后 GST 表达量基本下降至对照组水平。Cd²⁺胁迫处理后, GST 的表达值一直处于逐步上升状态, 15d 时达到最高, 约为对照组的 6.11 倍, 之后表达逐渐降低, 至 30 d 时仍略高于(1.49 倍)对照组。上述结果说明, GST 基因参与了重金属的解毒过程, 但是对于不同的重金属解毒作用稍有不同。

3 讨论

3.1 厚壳贻贝 GST 基因的序列分析

目前已发现的谷胱甘肽 S 转移酶亚型至少有 14 种(Wan *et al.*, 2008; Umasuthan *et al.*, 2012), 分别为 alpha(α), beta(β), delta(δ), epsilon(ϵ), zeta(ζ), theta(θ), kappa(κ), lambda(λ), mu(μ), pi(π), sigma(σ), tau(τ), phi(ϕ)和 omega(Ω)。这些亚型的分类基于对谷胱甘肽 S-转移酶基因 N 端结构域的氨基酸、结构、抗体反应以及对抑制剂的敏感性(Kim *et al.*, 2009)。本次实验扩增得到厚壳贻贝 GST 序列经测序和 Blastn 比对初步判定为 pi 型, 在系统进化树中与双壳贝类 pi 型 GST 位于同一进化支, 与人、猴、鼠等进化上差别较大。此外, 上述各种 GST 亚型之间相互成簇, 各聚成一支, 该结果与周向红等(2011)对条斑紫菜 GST 基因的分析类似。有学者(林群等, 2009)提出, 各种 GST 基因最终汇聚成同一树根, 可能是由于它们在起源上具有相同的祖先, 由同一的 GST 基因发展变化而来。

pi 型是众多 GST 亚型的典型代表, 广泛参与免疫细胞中毒素的代谢和亲脂性化合物及其衍生物的产生过程(Kim *et al.*, 2009), 因其具有抗氧化活性, 并参与机体免疫防御, 常被用作环境污染的指示标记物, 其表达水平在一定程度上可以有效地反应生物体受环境毒物的损害程度, 该特征在海洋双壳贝类中表现明显, 已获得的海洋贝类中的 GST 基本属于

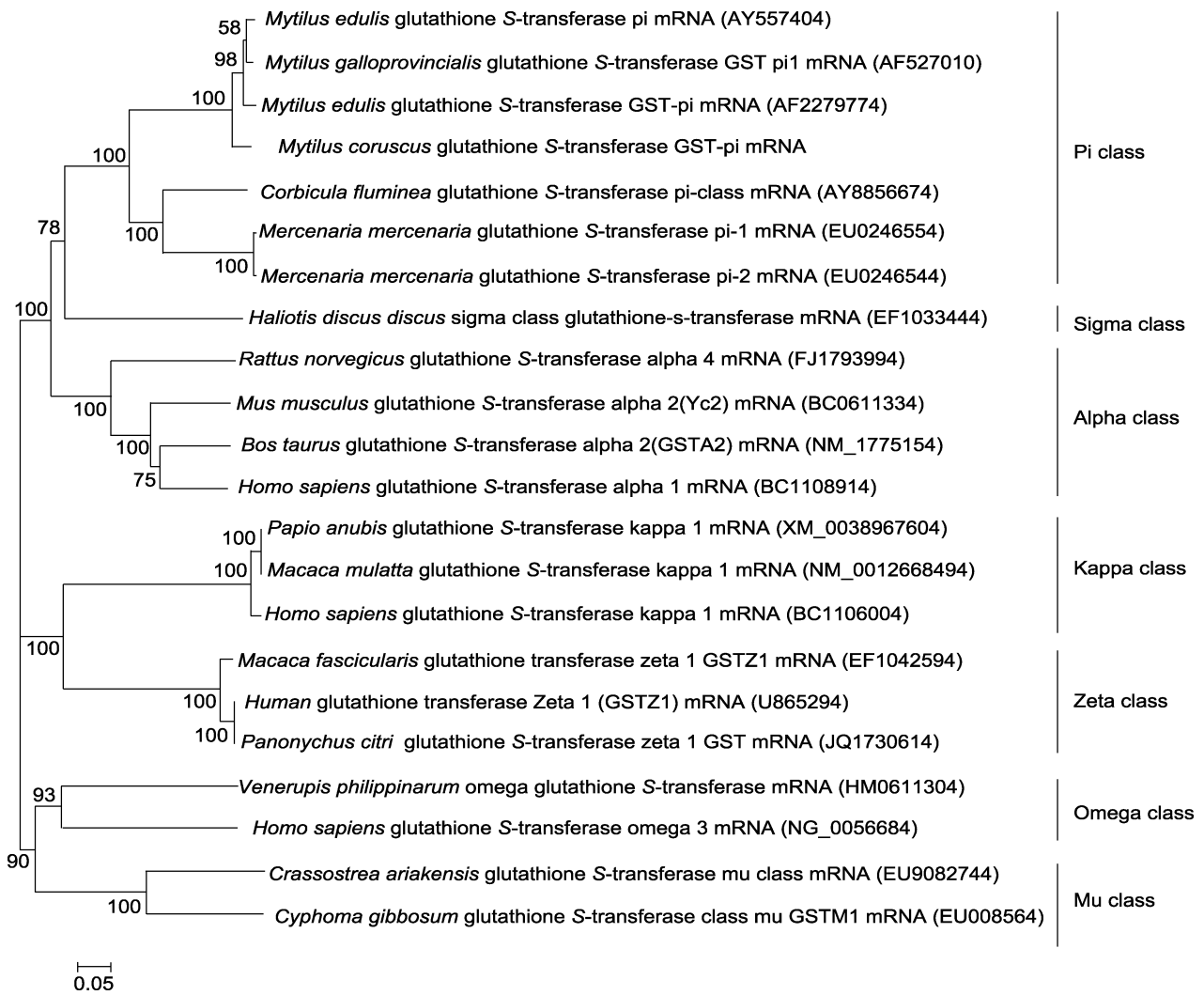


图 2 厚壳贻贝 GST 基因与其他 GST 亚型之间的进化分析
Fig.2 The relationship of *M. coruscus* GST-pi and other GST in phylogenetic tree

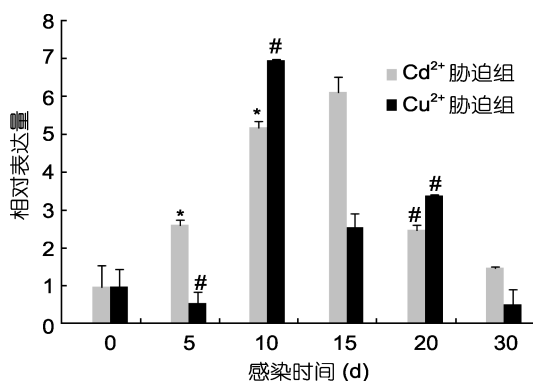


图 3 重金属胁迫下厚壳贻贝 pi 型 GST 基因的表达分析
Fig.3 Expression analysis of GST-pi from *M. coruscus* under stress of heavy metals

“*”表示差异显著($P<0.05$); “#”表示差异极显著($P<0.01$)

pi 型(Yang *et al*, 2004; Rhee *et al*, 2007)。本研究已从厚壳贻贝中克隆出的该条基因核心序列, 还有待

于通过扩增基因全长确定其结构特征, 并找到调控位点, 为进一步利用该基因评估厚壳贻贝等海洋经济贝类的养殖水体污染状况奠定基础。

3.2 重金属胁迫下厚壳贻贝 GST 基因的表达分析

通过相对定量表达分析发现, 铜和镉胁迫均能促使厚壳贻贝 GST 基因表达升高, 且表现为时间依赖型, 该结果说明厚壳贻贝对重金属刺激较为敏感, 可以通过自身的代谢调控作用排出毒素, GST 基因在该免疫过程中发挥了重要作用, 参与重金属的解毒过程, 周向红等(2011)用不同浓度重金属(铅)刺激条斑紫菜, 其 GST 表达出现类似的结果。有研究证实, GST 参与重金属解毒的过程主要通过两种方式: 一是 GST 基因能够催化还原型谷胱甘肽直接与重金属离子共价结合, 从而降低重金属离子毒性并促进重金属向液泡或质外体转运(Adamis *et al*, 2009); 二是

GST 的过氧化物酶活性能利用还原型谷胱甘肽向氢过氧化物发动亲核攻击,使其还原为低毒的一元醇(monohydroxy alcohol),从而缓解重金属胁迫产生的氧化胁迫(Edwards *et al*, 2000)。

此外,铜和镉胁迫后 GST 基因的表达特征略有不同,其中 Cu²⁺刺激 10d 时表达量达到最高,为对照组 6.95 倍, Cd²⁺刺激 15d 时表达量最高(6.11 倍),随后都开始下降,但 Cd²⁺刺激后的表达量下降较为缓慢,至 30d 时仍有较高的表达(约为对照组的 1.49 倍)。上述表达特征可能是由于 GST 对不同重金属的解毒能力有所不同。另外,海洋贝类中的 GST 虽然主要为 pi 型,但仍有其他类型 GST 的存在,生物表现出的解毒作用亦是不同类型 GST 综合作用的结果, Boutet 等(2004)研究太平洋牡蛎受到碳氢化合物和农药的污染后 GST 的表达水平,发现体内各种亚型的 GST 表达量都有明显的变化,且与毒素类型以及浓度有关,与环境因子和个性特征无关。本研究还有待于进一步检测不同浓度重金属刺激作用下 GST 的表达量,以确定生物的耐受程度,从而利用基因的表达情况指示水环境中重金属的污染状况。

3.3 厚壳贻贝 GST 分子对环境污染的指示功能

环境污染物是引发经济贝类发生死亡的重要原因,至今已报道的环境污染物有重金属、杀虫剂、有机污染物、工业废水和环境内分泌干扰物等,上述毒物进入细胞后,大量的 O₂⁻ 和 H₂O₂ 等活性氧分子立即在细胞中产生,这些活性氧分子不但直接对细胞造成损伤,还将大量脂质分子氧化成为过氧化脂质,细胞膜的结构与功能会受到过氧化脂质的影响,机体正常的生命活动受到危害(梁旭方, 2006)。GST 分子具有细胞解毒和抗氧化双重功效,当环境污染物对贝类产生刺激时,其机体内的 GST 活性显著升高(Blanchette *et al*, 2002),并通过催化过氧化氢的氧化还原反应,清除体内由代谢反应产生的氧自由基和过氧化物,保护细胞免受外界胁迫环境损伤(张永国等, 2006),基于此敏感反应, GST 可作为环境污染指示分子(Lenartova *et al*, 2000),并有研究证实 GST 活性与污染物水平显著相关,可直观反映环境的污染状况(Martinez-Lara *et al*, 1996)。在环境污染的评估和监测方面,贝类的 pi 型 GST 的作用尤为突出(Rhee *et al*, 2007), Blanchette 等(2003)对北方圆蛤 pi 型 GST 的研究是最早报道的海洋双壳贝类 pi 型 GST, 结果指出 pi 型 GST 具有很强的解毒作用,从而使北方圆蛤能生活在污染严重的水体中,菲律宾蛤仔(*Ruditapes*

philippinarum)的 pi 型 GST 亦是镉等污染物的良好指示分子(Wang *et al*, 2011); Feng 等(2009)对硬壳蛤 pi 型 GST 研究发现,该基因没有内含子,且这种无内含子的 GST 要比有内含子的 GST 解毒效果更明显,而高速游动的乌贼、斑马鱼等水生生物 GST 均有内含子,说明活动性差的贝类 GST 解毒效果更强,可成为很好的环境污染指示物。

厚壳贻贝作为典型的营附着生活的双壳贝类,对环境污染具有很强的耐受性,是最常见的指示水体持久性污染的生物指示剂(Hoarau *et al*, 2004)。本研究中,在铜和镉持续胁迫下,厚壳贻贝 GST 基因的表达呈明显上升状态,说明 GST 参与该生物的解毒过程,可以指示水环境中重金属的污染状况。Boutet (2004)曾指出 pi 型 GST 是农药污染监测的有效标记物,而重金属是农药中的组成成分,本项研究结果可为重金属污染的防治和检测提供有效手段。因此,通过对厚壳贻贝等贝类体内 GST 表达水平进行实时监测,可加强对养殖水体中重金属污染程度的检测,保证水产养殖业的持续健康发展。

参 考 文 献

- 何建瑜, 赵荣涛, 刘慧慧, 2012. 舟山海域厚壳贻贝软体部分营养成分分析与评价. 南方水产科学, 8(4): 37—42
- 张永国, 亢晋勇, 2006. 谷胱甘肽硫转移酶的生理功能述评. 忻州师范学院学报, 22(3): 125—128
- 张 妍, 2012. 近江牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)谷胱甘肽 S 转移酶和金属硫蛋白基因 cDNA 克隆及原核表达研究. 广东: 暨南大学硕士论文, 1—6
- 林 群, 梁旭方, 胡永乐等, 2009. 近江牡蛎 4 种类型 GST 基因 cDNA 全序列的克隆与分析. 生态毒理学报, 4(2): 237—243
- 罗凯娅, 刘欣欣, 葛端阳等, 2012. 鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)侵染对青蛤(*Cyclina sinensis*)谷胱甘肽硫转移酶及其基因表达的影响. 海洋与湖沼, 43(4): 735—740
- 周向红, 易乐飞, 李信书等, 2011. 条斑紫菜谷胱甘肽 S-转移酶基因的克隆与表达分析. 水产学报, 35(6): 1354—1361
- 梁旭方, 2006. 鱼虾贝肝脏 sGST 去毒酶基因的研究. 水利渔业, 26(5): 4—5
- 程炜轩, 梁旭方, 李观贵等, 2009. 鳊鱼两种谷胱甘肽 S-转移酶基因 cDNA 的克隆与分析. 生态毒理学报, 4(4): 537—543
- 雷安平, 陈 欢, 黎双飞等, 2009. 谷胱甘肽 S 转移酶的功能、应用及克隆表达. 环境科学与技术, 32(12): 85—91
- Adamis P D B, Mannarino S C, Eleutherio E C A, 2009. Glutathione and gamma-glutamyl transferases are involved in the formation of cadmium-glutathione complex. FEBS Letters, 583(9): 1489—1492

- Blanchette B N, Singh B R, 2002. Induction of glutathione S-transferase in the Northern Quahog *Mercenaria mercenaria* after exposure to the polychlorinated biphenyl (PCB) mixture aroclor1248. *Journal of Protein Chemistry*, 21(8): 489—494
- Blanchette B, Singh B R, 2003. An enzyme based dechlorination of a polychlorinated biphenyl (PCB) mixture, Aroclor 1248, using glutathione S-transferases from the northern quahog *Mercenaria mercenaria*. *Journal of Protein Chemistry*, 22(4): 377—386
- Boutet I, Tanguy A, Moraga D, 2004. Characterisation and expression of four mRNA sequences encoding glutathione S-transferases pi, mu, omega and sigma classes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to hydrocarbons and pesticides. *Marine Biology*, 146(1): 53—64
- Edwards R, Dixon D P, Walbot V, 2000. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science*, 5(5): 193—198
- Feng X, Singh B R, 2009. Molecular identification of glutathione S-transferase gene and cDNAs of two isotypes from northern quahog (*Mercenaria mercenaria*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 154(1): 25—36
- Fu J, Xu W, Mai K *et al*, 2012. Effects of dietary menadione on the activity of antioxidant enzymes in abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 30(1): 118—123
- Hoarau P, Garello G, Gnassia-Barelli M *et al*, 2004. Effect of three xenobiotic compounds on Glutathione S-transferase in the clam *Ruditapes decussatus*. *Aquatic Toxicology*, 68(1): 87—94
- Kim M, Ahn IY, Cheon J *et al*, 2009. Molecular cloning and thermal stress-induced expression of a pi-class glutathione S-transferase (GST) in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 152(2): 207—213
- Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5(2): 150—163
- Lenartova V, Holovska K, Javorsky P, 2000. The influence of environmental pollution on the SOD and GST-isoenzyme patterns. *Water Science And Technology*, 42(1—2): 209—214
- Liao W Q, Liang X F, Wang L *et al*, 2006. Molecular cloning and characterization of alpha-class glutathione S-transferase gene from the liver of silver carp, bighead carp and other major Chinese freshwater fishes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 20(3): 114—126
- Martinez-Lara E, Toribio F, Lopez J *et al*, 1996. Glutathione S-transferase isoenzyme patterns in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) exposed to environmental contaminants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 113(2): 215—220
- Masella R, Benedetto R D, Vari R *et al*, 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(10): 577—586
- Ohnuma T, Anan E, Hoashi R *et al*, 2011. Dietary diacetylene faltarindiol induces phase 2 drug metabolizing enzymes and blocks carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice through suppression of lipid peroxidation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 34(3): 371—378
- Pfaffl M W, 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9): 2002—2007
- Rhee J S, Lee Y M, Hwang D S *et al*, 2007. Molecular cloning, expression, biochemical characteristics, and biomarker potential of the theta class glutathione S-transferase (GST-T) from the polychaete *Neanthes succinea*. *Aquatic Toxicology*, 83(2): 104—115
- Salinas A E, Wong M G, 1999. Glutathione S-transferases-a review. *Current Medicinal Chemistry*, 6(4): 279—310
- Saranya Revathy K, Umasuthan N, Lee Y *et al*, 2012. First molluscan theta-class Glutathione S-transferase: Identification, cloning, characterization and transcriptional analysis post immune challenges. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 162(1): 10—23
- Umasuthan N, Saranya Revathy K, Lee Y *et al*, 2012. A novel molluscan sigma-like glutathione S-transferase from Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: Cloning, characterization and transcriptional profiling. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 1: 539—550
- Wan Q, Whang I, Lee J, 2008. Molecular characterization of mu class glutathione-S-transferase from disk abalone (*Haliotis discus discus*), a potential biomarker of endocrine-disrupting chemicals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 150(2): 187—199
- Wang L, Pan L, Liu N *et al*, 2011. Biomarkers and bioaccumulation of clam *Ruditapes philippinarum* in response to combined cadmium and benzo[a]pyrene exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 3407—3417
- Yang H L, Zeng Q Y, Li E Q *et al*, 2004. Molecular cloning, expression and characterization of glutathione S-transferase from *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 139(2): 175—182

MOLECULAR EXPRESSION PATTERN OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE GENE IN *MYTILUS CORUSCUS* EXPOSED TO HEAVY METALS

LIU Hui-Hui¹, HE Jian-Yu¹, ZHAO Rong-Tao¹, XUE Chao-Bo²

(1. Zhejiang Ocean University, National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Zhoushan 316004, China;
2. Zhoushan Institute of Calibration and Testing for Qualitative and Technical Supervision, Zhoushan 316021, China)

Abstract Glutathione S-transferases (GSTs) are important members in the superfamily of phase II detoxification enzymes for playing crucial roles in immune and metabolic processes of vertebrates and invertebrates. They are often used as water pollution indicators for their sensitive reactions to environmental pollutants. *Mytilus coruscus*, an important aquatic shellfish of high economic value, is widely cultured in the East China Sea, especially in Zhoushan Islands. Meanwhile, they are frequently used as a biomonitoring species in quick response to pollution. Therefore, the expression of GST from *M. Coruscus* has been regarded as a crucial biomarker to environmental pollution. Partial cDNA sequence of GST was cloned from *M. Coruscus* (GenBank accession no: KC176684). Based on multiple sequence alignment and phylogenetic analysis, the sequence belonged to pi-class GSTs. Copper and cadmium are currently common pollutants in the ocean. The GST mRNA expression of hemocyte in *M. Coruscus* were tested by SYBR Green quantitative RT-PCR after being stressed by Cu²⁺(20 μg/L) and Cd²⁺(200 μg/L). The mRNA expression was found time-dependent and up-regulated, and the maximum expression of copper treat group was 6.95-fold than that of control at 10 d; but the cadmium treat group appeared at 15d with 6.11-fold than the control. The results show that GST of *Mytilus coruscus* took a part in heavy metal detoxification with different ability against disparate heavy metal stresses. The expression of GST in *M. Coruscus* could be a potential biomarker to monitor environmental contaminants.

Key words *Mytilus coruscus*; Glutathione S-transferase (GST); heavy metals stress; expression analysis