

菲律宾蛤仔(*Venerupis philippinarum*) Rho 型 GST 和微粒体型 GST 的序列分析及表达特征研究*

章盈盈^{1,3} 袁泽轶² 王清¹ 李巧梅^{1,3} 吴惠丰¹ 赵建民^{1①}

(1. 中国科学院烟台海岸带研究所 中国科学院海岸带环境过程与生态修复重点实验室 烟台 264003;

2. 国家海洋信息中心 天津 300171; 3. 中国科学院大学 北京 100049)

提要 谷胱甘肽硫转移酶是一类在细胞解毒和抗氧化过程中发挥重要作用的超家族酶系。采用 cDNA 末端快速扩增技术, 从菲律宾蛤仔中克隆获得 Rho 型 GST 和微粒体型 GST 基因的全长序列(分别命名为 VpGSTR 和 VpGSTMi)。序列分析显示, VpGSTR 和 VpGSTMi 的 cDNA 全长分别为 942bp 和 661bp, 编码 234 和 149 个氨基酸。系统分析结果表明, 菲律宾蛤仔 GST 与 GSTMi 在进化树上的位置与其分类所处的位置一致。荧光定量 PCR 结果发现, VpGSTR 和 VpGSTMi 广泛分布于所检测组织中, 且在肝胰腺组织中表达量最高。在鳃弧菌侵染后, VpGSTR 和 VpGSTMi 基因表达量在 24h 内均表现出明显的上升趋势。上述结果表明, VpGSTR 和 VpGSTMi 可能在菲律宾蛤仔抵御细菌侵染导致的氧化应激中发挥重要功能。

关键词 谷胱甘肽硫转移酶; 菲律宾蛤仔; 基因克隆; 基因表达

中图分类号 S917.4 doi: 10.11693/hyhz20130700102

谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)是一类广泛分布的多功能超家族酶系, 主要催化还原型谷胱甘肽(GSH)的巯基与疏水性化合物的亲电子基团结合, 将其转化为水溶性代谢产物并排出体外, 从而达到解毒目的(Eaton *et al.*, 1999)。此外, GST 具有过氧化物酶和异构酶活性, 可参与氧化应激信号通路的调节, 避免 H₂O₂ 等引起的细胞死亡(Adler *et al.*, 1999; Hayes *et al.*, 2005); 同时, GST 能够以非催化的形式结合多种内源或外源配体, 参与氧化损伤生物大分子的修复及被氧化含巯基蛋白的再生(Sheehan *et al.*, 2001; Laborde, 2010)。GST 已被发现广泛分布于动物、植物和微生物在内的所有生物中(Pearson, 2005)。根据细胞内定位, GST 可分为胞质型(Cytosolic GST)、线粒体型(Mitochondria GST, 也称为 Kappa GST)和微粒体型(Microsomal GST)GST 三大类。其中, 胞质型 GST 分布最广, 根据 N-端氨基酸序列、底物特异性等特征, 可分成 Alpha、Beta、

Rho、Omega 等 13 类; 微粒体型 GST 是一类膜结合蛋白, 活化后能够防止脂质的过氧化作用(Mosialou *et al.*, 1993), 且多具有过氧化物酶活性(Prabhu *et al.*, 2001), 现已被归入参与花生四烯酸与谷胱甘肽代谢(MAPEG)的膜结合蛋白家族(Jakobsson *et al.*, 1999; Hayes *et al.*, 2005)。

菲律宾蛤仔(*Venerupis philippinarum*)是我国沿海各地广泛养殖的经济贝类, 其病害问题是制约蛤仔养殖业健康发展的重要瓶颈之一。鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)作为海洋环境中的常见致病菌之一, 已被证明是导致多种双壳贝类发病及死亡的重要原因。通过探讨菲律宾蛤仔抗病功能基因在病原菌感染下的表达规律, 有助于深入了解机体的固有免疫防御系统。本研究采用 cDNA 末端快速扩增(Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE)技术, 从菲律宾蛤仔中克隆获得 Rho 型 GST(VpGSTR)和微粒体型 GST(VpGSTMi)的 cDNA 全长序列, 并运用实时荧光

*国家自然科学基金资助项目, 41206105 号。章盈盈, 硕士研究生, E-mail: yzhang@yic.ac.cn

通讯作者: 赵建民, 研究员, E-mail: jmzhao@yic.ac.cn

收稿日期: 2013-07-23, 收修改稿日期: 2013-09-09

定量 PCR 方法研究了 VpGSTR 和 VpGSTMi 的组织分布及其在鳃弧菌刺激下的时序表达特征, 可为进一步探讨 GST 在菲律宾蛤仔抵御病原侵染中的免疫功能提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验用动物及试剂

实验用菲律宾蛤仔(壳长 3—4cm)购于烟台当地水产市场, 在过滤海水中暂养 10d 后开始鳃弧菌侵染实验; 暂养期间, 持续曝气, 每天定时投喂扁藻并进行完全换水。

Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司, M-MLV 反转录酶购于美国 Promega 公司, Taq DNA Polymerase 购于美国 Fermentas 公司, pMD18-T 载体、DNA Marker、SYBR Premix Ex Taq™ 均为大连宝生物工程有限公司产品, 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自天根生化科技有限公司, 其余试剂均购自国药集团。

1.2 组织取样及鳃弧菌刺激

实验用的鳃弧菌购于中国海洋微生物保藏中心, 株型为 1A07299。将鳃弧菌接种于 2216E 液体培养基, 培养至对数生长期后离心收集菌体; 采用灭菌过滤海水重悬菌体, 以 10^7 CFU/mL 的浓度浸泡刺激菲律宾蛤仔; 分别在处理后 6、12、24、48、96h 采集血淋巴样品, 低速离心(2000r/min, 4°C)收集血淋巴细胞用于总 RNA 提取, 每个时间点采集 6 个平行样本。实验过程中, 设置未经任何处理的对照组。

分别采集对照组的肝胰腺、血淋巴细胞、鳃、性腺和肌肉组织, 用以测定目的基因的组织表达, 每个组织设置 6 个平行。

1.3 总 RNA 提取及 cDNA 合成

总 RNA 提取使用 Trizol 试剂, 具体操作参照说明书。cDNA 合成按照美国 Promega 公司的 M-MLV 反转录酶操作说明书进行; 以总 RNA 为模板, Oligo dT 为逆转录引物, 反应条件如下: 70°C 5min, 冰上放置 1—2min, 42°C 50min, 65°C 15min 终止反应, 并于 4°C 结束程序。

1.4 目的基因全长 cDNA 的扩增

根据实验室已有的 EST 序列, 分别设计基因特异性引物: VpGSTR(F1: 5'-TTACCGCTGGATGAA CAAGG-3', F2: 5'-AAGAACGCCAACACTGGATA-3'), VpGSTMi(F3: 5'-CGTATTGCCCTTCGTTCTGA-3', F4: 5'-ACATGCCAGCCCTAATCACA-3')。采用巢氏 PCR 扩增后, 将纯化的目的片段连接到 pMD-18T

载体, 转化至 *Escherichia coli* Top10F'感受态细胞; 经蓝白斑筛选和菌落 PCR 鉴定, 分别挑取 5 个阳性克隆送至北京诺赛基因公司进行序列测定。

1.5 生物信息学分析

将获得的 VpGSTR 和 VpGSTMi 序列提交 Genbank 数据库注册, 并采用 BLAST 在线程序进行比对分析。经 CLUSTAL X 进行多序列比对排列后, 用 MEGA4.0 构建系统进化树, 计算方法为邻位相连法(Neighbor-Joining)和自展内部分枝法(Bootstrapping)评定进化树的可靠性, 重复次数为 1000。

1.6 VpGSTR 和 VpGSTMi 基因的时空表达

采用 ABI7500 荧光定量 PCR 系统, 测定目的基因的组织分布及其在鳃弧菌刺激后的时序表达情况。实验过程中, 以菲律宾蛤仔 β -actin 为内参基因(Actin-RT-F: 5'-CTCCCTTGAGA AGAGCTACGA-3', Actin-RT-R: 5'-GATACCAGCAGATTCATACCC-3'); VpGSTR 和 VpGSTMi 的基因特异性引物分别为: VpGSTR-F: 5'-AAGACGGGGATCTTGTGTG-3', VpGSTR-R: 5'-TCTCTGTCACGTTTCGTTTGC-3'; VpGSTMi-F: 5'-ACGTATTGCCCTTCG TTCTG-3', VpGSTMi-R: 5'-AACATGCCAGCCCTAATCAC-3'。荧光定量 PCR 参照本实验室已经优化的扩增体系及反应条件进行(Zhang *et al*, 2012), 数据处理采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法(Livak *et al*, 2001), 使用 SPSS 软件进行单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 认定为差异显著。

2 结果

2.1 序列分析

通过序列拼接, 分别获得 VpGSTR 与 VpGSTMi 的全长 cDNA 序列, GenBank 注册号依次为 GQ384394 与 GQ384399。其中, VpGSTR 的开放阅读框(ORF)包括 705bp(图 1), 编码 234 个氨基酸, 预测分子量为 27.43kDa, 理论等电点为 9.64。经 BLAST 比对分析可知, VpGSTR 基因编码的蛋白序列与南极帽贝(*Laternula elliptica*)GSTR 的相似性为 64%, 而与其它物种的序列相似性较低。SMART 软件分析显示, VpGSTR 为分泌型蛋白, 具有典型的谷胱甘肽 S-转移酶 N-末端结构域(G 位点, M¹—E⁷⁶)和 C-末端结构域(H 位点, T¹⁰⁸—R¹⁹⁸)。多重比对结果表明, 参与谷胱甘肽结合的 N-末端区域较为保守, 而与特异性疏水底物结合的 C-末端保守性较低(图 2)。

VpGSTMi 的 ORF 包括 450bp(图 3), 编码 149 个氨基酸, 预测分子量为 16.74kDa, 理论等电点为 9.84。BLAST 分析发现, VpGSTMi 编码的蛋白序列与

```

1                               M H L W W G
1 GCACCGCTGCAGAACCATACACACGAAAATGTGCAATAACAATGCACTTGTGGTGGGGC
7 S G S A P C W K P M L V L A E K G L W E
61 TCTGGTTCAGCACCATGTTGGAAACCTATGCTTGTGTTAGCGGAGAAGGGGCTCTGGGAG
27 G L P N T K I E F S K K E H K Q G D V L
121 GGATTACCAAATACAAAGATAGAGTTCTCGAAGAAGGAGCATAAACAGGGGGACGTTTTG
47 K Y N P R G Q V P T F K D G D L V V N E
181 AAGTATAATCCACGAGGCCAGGTGCCAACATTTAAAGACGGGGATCTTGTGTGAACGAA
67 S G A I C M Y L E E K Y S K D S N K L L
241 TCTGGTCCGATATGCATGTACCTGGAGGAAAAATACAGCAAGGACTCAAACAACTATTA
87 P A D V N K R A E V Y Q R M F E S P N L
301 CCAGCGGATGTCAATAAGCGAGCTGAAGTGTACCAGAGGATGTTGAGTCCCCGAATCTG
107 Q T N V T E K L V Y Y R W M N K E E D W
361 CAAACGAACGTGACAGAGAAGCTTGTCTATTACCGTGGATGAACAAGGAAGAGGATTGG
127 D K K Y L E E H T E K A K E E L S R W N
421 GATAAGAAATACCTGGAAGAGCACACCGAAAAGGCGAAGGAAGAAATTAAGCCGATGGAAC
147 T I L G D N D Y L C G K E F T M A D V F
481 ACAATTTTAGGTGATAATGATTACTTGTGTGGCAAGGAATTTACGATGGCGGACGTTTTT
167 V Y P V L A F L I R S G A K L P N Q P A
541 GTCTATCCAGTGTGGCGTCTTAATTAGATCCGGTGCCAAAGCTGCCCAATCAACCAGCT
187 L M Q Y Y K R G Y T R P F V Q P R G H P
601 CTAATGCAGTACTACAAAAGGGGTTACACACGACCATTTGTCCAGCCACGTGCCACCCA
207 L E R R G G S L S L A I Y K L L K R R K
661 CTGGAAGAAGAGGGGGAAGCCTATCCTTAGCGATTATAAACTTTTAAAAAGGAGAAAA
227 F Y G N K L Q I *
721 TTTTACGGAATAAATTACAAATTTGAATAAATGGGGCAGGTTAGAAAAGAGAAAAAC
781 TTTGATGTTATTTTCTTACTTTTGTGGTTTTTGTGATGATTATCTTTATGATATCTTTATTT
841 AAACCGTTAACATTTTCCCTACTAAAAGCAGGTTCTTTTTTGGTGTAACCTTTTTTTTCAA
901 AAATAAATTGATAATAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 VpGSTR 全长 cDNA 序列及推测的氨基酸序列

Fig. 1 The full-length cDNA of VpGSTR and deduced amino acid sequence

方框为起始密码子, 终止密码子用星号表示, 下划线部分为信号肽, 阴影部分分别为 GST-N 结构域和 GST-C 结构域。

太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)及皱纹盘鲍(*Haliotis discus discus*)的相似性分别是和 61%和 62%。Pfam 在线软件分析显示, VpGSTMi 具有典型的 MAPEG (Membrane Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism)膜蛋白结构域(F¹⁶—R¹⁴⁵)。此外, 微粒体型 GST 的酶活性位点精氨酸残基(R¹¹⁴)和酪氨酸残基(Y¹²¹)也高度保守(图 4)。

2.2 系统进化分析

系统进化分析结果显示, 胞质型 GST 和微粒体型 GST 分别聚类(图 5)。本研究获得的 VpGSTR 和 VpGSTMi 分别归于 Rho 型簇和微粒体型簇。VpGSTR 首先与菲律宾蛤仔的 Rho 亚型、南极帽贝(*L. elliptica*)聚成一簇, 这三个物种的 GSTR 再与斑马鱼(*Danio rerio*)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)等鱼类的 GSTR 聚成 Rho

型 GST 分支; 而 VpGSTMi 归属于 MAPEG 家族中的 GSTMi1, 并与 GSTMi3、GSTMi2 形成微粒体型 GST 分支。VpGSTMi 与长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、皱纹盘鲍(*H. discus discus*)、栉孔扇贝(*Azumapecten farreri*)聚成一个分支, 表明 VpGSTMi 与无脊椎动物的 GSTMi 亲缘关系较近, 而与哺乳动物的亲缘关系较远。由上可见, 菲律宾蛤仔 Rho 型和微粒体型 GST 在进化分类中的地位与传统分类学中的位置相符合。

2.3 VpGSTR 和 VpGSTMi 基因的组织分布

利用实时荧光定量 PCR 技术, 检测了 VpGSTR 和 VpGSTMi 基因在菲律宾蛤仔的组织分布特征。结果发现, 在肝胰腺、鳃、血淋巴细胞、外套膜和肌肉中均可检测到 VpGSTR 和 VpGSTMi 基因的表达, 且均以肝胰腺组织中的表达水平最高。其中, VpGSTR

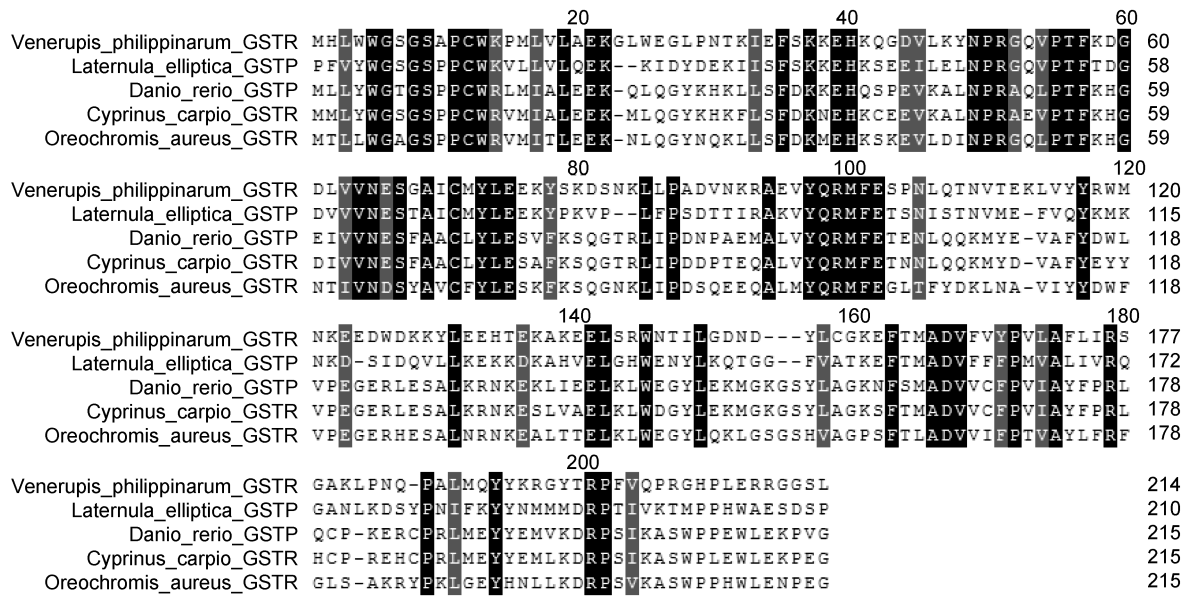


图 2 VpGSTR 与其它物种 GSTR 的多重比对结果

Fig.2 Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of VpGSTR with GSTR from *Laternula elliptica* (ACM44933), *Danio rerio* (NP001038525), *Cyprinus carpio* (ABD67511), *Oreochromis aureus* (ACT22667) 所用序列来自 GenBank, 信息如下: 南极帽贝(ACM44933)、斑马鱼(NP001038525)、鲤鱼(ABD67511)、罗非鱼(ACT22667)。黑色阴影为氨基酸序列完全保守, 灰色阴影为氨基酸序列部分保守。

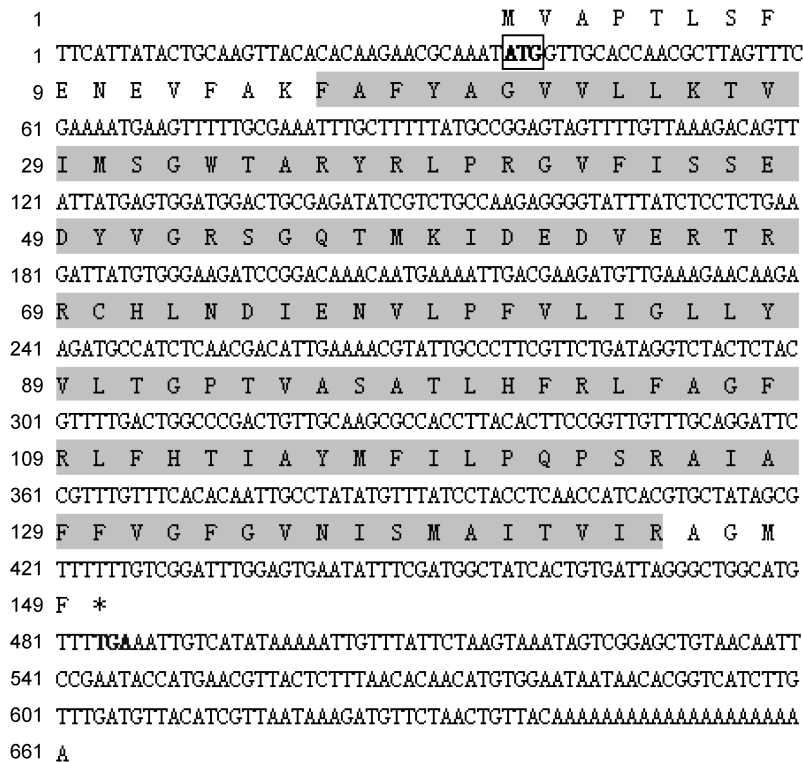


图 3 VpGSTMi 全长 cDNA 序列及推测的氨基酸序列

Fig.3 The full-length cDNA of VpGSTMi and deduced amino acid sequence 方框为起始密码子, 终止密码子用星号表示, 阴影部分为预测的 MAPEG 结构域。

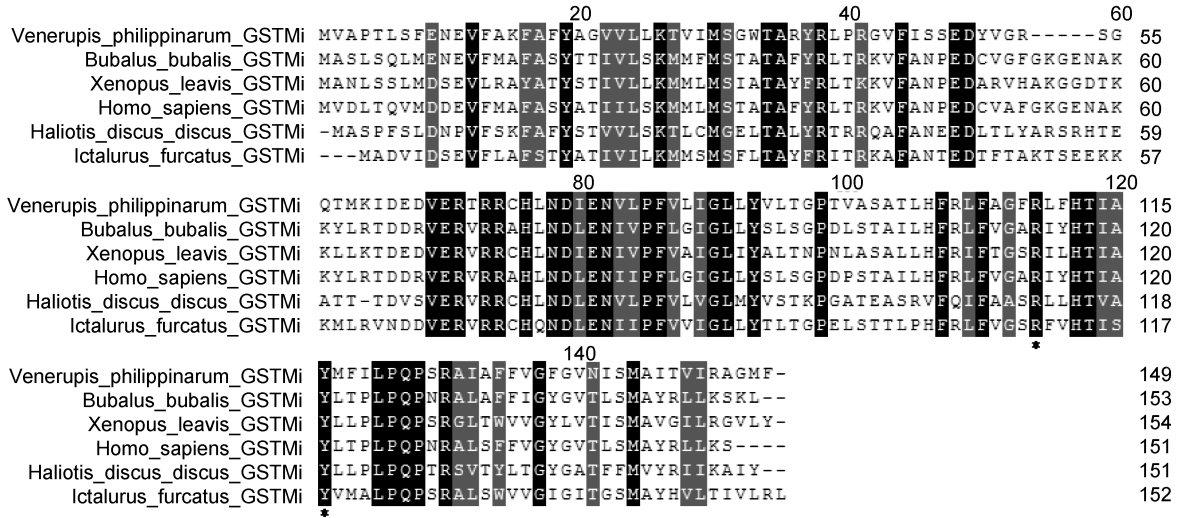


图 4 VpGSTMi 与其它物种 GSTMi 的多重比对结果

Fig.4 Multiple alignment of deduced amino acid sequence of VpGSTMi with GSTMi from *Bubalus bubalis* (AEB71425), *Xenopus laevis* (NP001084720), *Homo sapiens* (AAP36387), *Haliotis discus discus* (ABO26660), and *Ictalurus furcatus* (ADO28130) 所用序列来自 GenBank, 信息如下: 水牛(AEB71425)、非洲爪蟾(NP001084720)、人(AAP36387)、皱纹盘鲍(ABO26660)、长鳍真鲷(ADO28130)。黑色阴影为氨基酸序列完全保守, 灰色阴影为氨基酸序列部分保守; *为保守的精氨酸和酪氨酸残基。

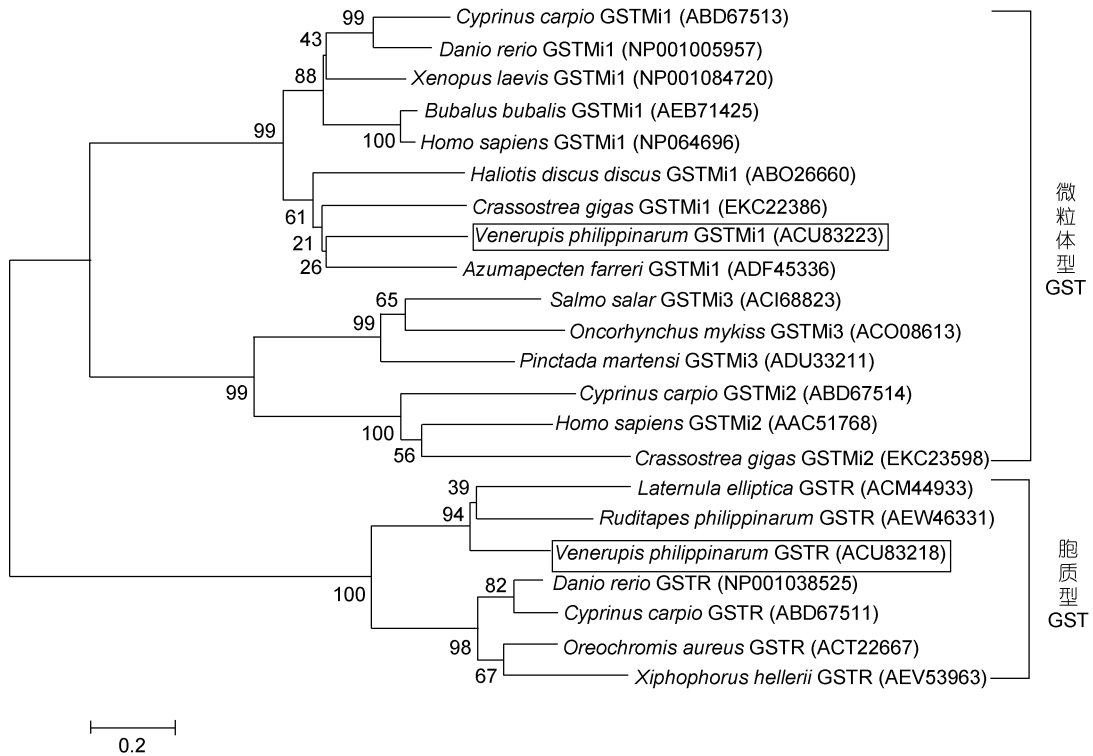


图 5 Rho 型 GST 和微粒体型 GST 的系统进化分析

Fig.5 Phylogenetic tree of Rho and microsomal class GST proteins constructed by neighbor-joining method based on the sequences from different animals

的表达从高到低依次为肝胰腺>鳃>血淋巴细胞>外套膜>肌肉(图 6a), 而 VpGSTMi 的表达水平则为肝胰腺>血淋巴细胞>鳃>外套膜>肌肉(图 6b)。

2.4 VpGSTR 和 VpGSTMi 在鳃弧菌刺激后的时序表达

采用实时荧光定量 PCR, 分析了鳃弧菌刺激后

菲律宾蛤仔血淋巴细胞中 VpGSTR 和 VpGSTMi 基因的时序表达(图 7)。结果发现, 鳗弧菌刺激 6h 后, VpGSTR 基因表达量较对照组水平无显著变化; 在菌刺激 12h 和 24h 后, VpGSTR 基因的相对表达量显著升高($P<0.05$), 分别达到对照组的 2.5 倍和 3.5 倍;

随着菌刺激时间的延长, VpGSTR 基因的表达量逐步回落, 在 96h 降低到对照组水平。与 VpGSTR 类似, VpGSTMi 基因的表达量也呈现逐步上升而后又降至对照水平的趋势; 其中, 暴露 24h 后 VpGSTMi 基因的表达量较对照组水平显著升高(2.7 倍, $P<0.05$)。

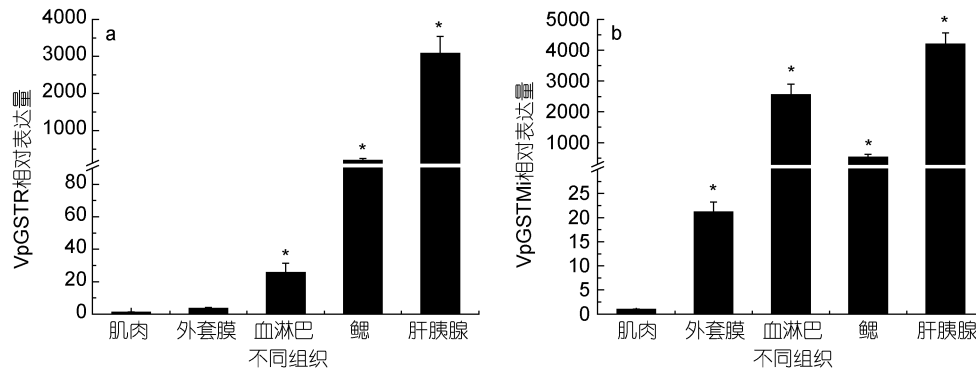


图 6 VpGSTR(a)和 VpGSTMi(b)在菲律宾蛤仔中的组织分布特征

Fig.6 Tissue distribution of VpGSTR (a) and VpGSTMi (b) determined by qRT-PCR

*: 表示不同组织中 GST 基因的表达水平显著高于肌肉组织($P<0.05$)。

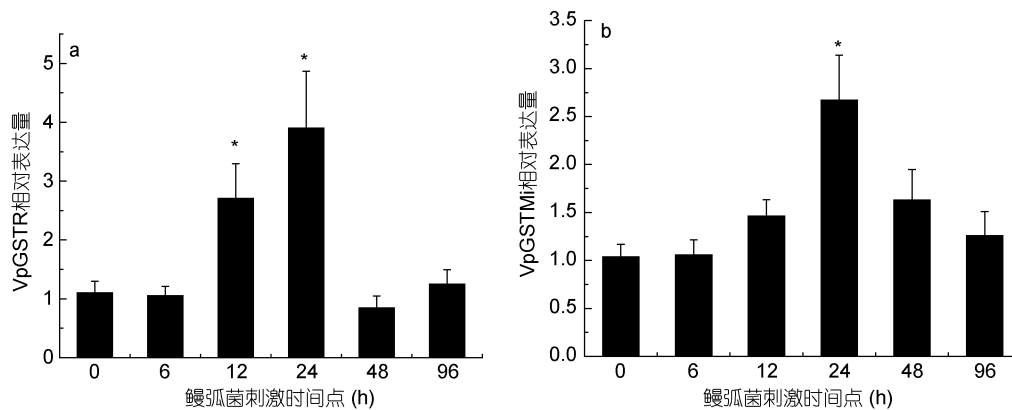


图 7 菲律宾蛤仔经鳗弧菌刺激后 VpGSTR(a)和 VpGSTMi(b)基因的时序表达

Fig.7 The temporal expression of VpGSTR (a) and VpGSTMi (b) mRNA in the clams post *Vibrio anguillarum* challenge

*: 表示侵染后实验组的基因表达水平显著高于初始水平($P<0.05$)。

3 讨论

谷胱甘肽硫转移酶普遍存在于生物体内, 在机体有毒化合物代谢转化和抗氧化反应等过程中起着重要作用。目前, 已在多种海洋动物中先后发现了多种类型的 GST 的存在(Wan *et al*, 2008; Xu *et al*, 2010; Li *et al*, 2012; Saranya *et al*, 2012; Umasuthan *et al*, 2012; Zhang *et al*, 2012; Espinoza *et al*, 2013)。本研究克隆获得了菲律宾蛤仔两种 GST 的 cDNA 序列, 分别属于 Rho 型和微粒体型家族。序列分析表明, VpGSTR 具有典型的谷胱甘肽 S-转移酶 N-末端结构域(G 位点)和 C-末端结构域(H 位点)。其中, N-末端主

要为谷胱甘肽提供结合位点, 具有高度保守的色氨酸、丝氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、结氨酸和谷氨酰胺残基(Park *et al*, 2009); 而 C-末端为特异性的疏水底物提供结合位点, 其氨基酸变异程度较高, 利于不同底物的结合(Mannervik *et al*, 1988; Blanchette *et al*, 2007)。VpGSTMi 氨基酸序列存在保守的精氨酸残基(R¹¹⁴)和酪氨酸残基(Y¹²¹); 其中, 精氨酸残基(R¹¹⁴)被认为是 MAPEG 家族催化功能的作用位点, 而酪氨酸残基(Y¹²¹)可能与酶的活性相关。同时, 两个氨基酸残基位置上的相近, 有利于催化形成二级结构(Jakobsson *et al*, 1999; Chen *et al*, 2011)。

由于 GST 功能的多样性, 其在不同物种中的组

织分布存在较大差异;且多种内源或者外源因素都被证明可介导 GST 在组织中表达量的变化。本研究发现, VpGSTR 和 VpGSTMi 广泛存在于所检测组织中,并以肝胰腺组织中的表达水平最高。这与已有的研究结果相一致,即 GST 呈多组织分布,且多数 GST 在海洋动物的肝胰腺或肝脏组织中呈高表达水平(Kim *et al*, 2009; Park *et al*, 2009; 邹青青等, 2010; Chen *et al*, 2011)。肝胰腺被认为是外源毒物和细菌积聚的主要位点, GST 作为重要的解毒酶和抗氧化酶,可能参与了病原菌侵染过程中产生的过量活性氧的清除(Pushpamali *et al*, 2008)。此外, VpGSTMi 在血淋巴细胞中也有较高水平的表达,推测其在血细胞介导的免疫防御中发挥了重要作用。类似的现象在中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)中也有发现, Delta 型 GST 被认为与血淋巴细胞介导的免疫反应密切相关(Zhao *et al*, 2010)。

本研究中,通过测定鳗弧菌侵染后血淋巴细胞 GST 基因表达量的变化,探讨了 VpGSTR 和 VpGSTMi 在菲律宾蛤仔免疫防御反应中的作用。结果显示,鳗弧菌刺激可诱导 VpGSTR 和 VpGSTMi 基因的表达,并在刺激后 24h 达到基因表达的最高峰,随后逐渐恢复至初始水平。目前,有关海洋动物受弧菌侵染后 GST 基因表达量变化的结果已有报道。例如,马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)血细胞微粒体型 GST 和长牡蛎(*C. gigas*)Sigma 型 GST 在弧菌刺激 6h 后的表达水平显著提高(Labreuche *et al*, 2006; Chen *et al*, 2011)。海洋双壳贝类由于其滤食习性,会从周围水环境中积累大量的细菌。在应对弧菌等细菌的侵染时,贝类通过改变活性氧(ROS)产生、血细胞吞噬、水解酶活性等来达到免疫目的(Canesi *et al*, 2002)。ROS 的增加有利于杀灭入侵细菌,但过量的活性氧对贝类自身也具有毒害作用,因此必须予以清除。抗氧化酶系统对于调节机体内 ROS 的水平、维持细胞内稳态、保护机体免受过氧化损伤具有重要作用。研究表明,细菌侵染时伴随吞噬引起的呼吸暴发产生的 ROS、有毒的脂质过氧化代谢产物、有机过氧化物和细菌内毒素等均能使得 GST 表达量发生变化(Dubovskiy *et al*, 2008)。因此,在细菌刺激过程中, GST 可能协同过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽还原酶(GR)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、硫氧还蛋白(TRx)等多种酶类参与了活性氧的清除。

参 考 文 献

邹青青,王军花,郭红军等,2010. 池蝶蚌和三角帆蚌谷胱甘

- 肽转移酶基因表达特征. 动物学杂志, 45(4): 96—101
- Adler V, Yin Z, Fuchs S Y *et al*, 1999. Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J*, 18(5): 1321—1334
- Blanchette B, Feng X, Singh B R, 2007. Marine glutathione S-transferases. *Mar Biotechnol* (NY), 9(5): 513—542
- Canesi L, Gallo G, Gavioli M *et al*, 2002. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc Res Tech*, 57(6): 469—476
- Chen J, Xiao S, Deng Y, 2011. Cloning of a novel glutathione S-transferase 3 (GST3) gene and expression analysis in pearl oyster, *Pinctada martensii*. *Fish & Shellfish Immunol*, 31(6): 823—830
- Dubovskiy I M, Martemyanov V V, Vorontsova Y L *et al*, 2008. Effect of bacterial infection on antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of *Galleria mellonella* L. larvae (Lepidoptera, Pyralidae). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 148(1): 1—5
- Eaton D L, Bammler T K, 1999. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci*, 49(2): 156—164
- Espinoza H M, Shireman L M, McClain V *et al*, 2013. Cloning, expression and analysis of the olfactory glutathione S-transferases in coho salmon. *Biochem Pharmacol*, 85(6): 839—848
- Hayes J D, Flanagan J U, Jowsey I R, 2005. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45: 51—88
- Jakobsson P J, Morgenstern R, Mancini J *et al*, 1999. Common structural features of MAPEG—a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci*, 8(3): 689—692
- Kim J H, Raisuddin S, Rhee J S *et al*, 2009. Molecular cloning, phylogenetic analysis and expression of a MAPEG superfamily gene from the pufferfish *Takifugu obscurus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 149(3): 358—362
- Laborde E, 2010. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death Differ*, 17(9): 1373—1380
- Labreuche Y, Lambert C, Soudant P *et al*, 2006. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes Infect*, 8(12): 2715—2724
- Li C, Su X, Li Y *et al*, 2012. Two classes of glutathione S-transferase genes with different response profiles to bacterial challenge in *Venerupis philippinarum*. *Fish & Shellfish Immunol*, 32(1): 219—222
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402—408
- Mannervik B, Danielson U H, 1988. Glutathione transferases structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem*, 23(3): 283—337
- Mosialou E, Ekström G, Adang A E *et al*, 1993. Evidence that rat liver microsomal glutathione transferase is responsible for glutathione-dependent protection against lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol*, 45(8): 1645—1651
- Park H, Ahn I Y, Kim H *et al*, 2009. Glutathione S-transferase as a biomarker in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* after exposure to the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 150(4): 528—536

- Pearson W R, 2005. Phylogenies of glutathione transferase families. *Methods Enzymol*, 401: 186—204
- Prabhu K S, Reddy P V, Gumprecht E *et al*, 2001. Microsomal glutathione S-transferase A1-1 with glutathione peroxidase activity from sheep liver: molecular cloning, expression and characterization. *Biochem J*, 360(Pt 2): 345—354
- Pushpamali W A, De Zoysa M, Kang H S *et al*, 2008. Comparative study of two thioredoxin peroxidases from disk abalone (*Haliotis discus discus*): Cloning, recombinant protein purification, characterization of antioxidant activities and expression analysis. *Fish & Shellfish Immunol*, 24(3): 294—307
- 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. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 162(1): 10—23
- 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. *Biochemical Journal*, 360(Pt 1): 1—16
- Umasuthan N, Revathy K S, Lee Y *et al*, 2012. A novel molluscan sigma-like glutathione S-transferase from Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: cloning, characterization and transcriptional profiling. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 155(4): 539—550
- Wan Q, Whang I, Lee J, 2008. Molecular cloning and characterization of three sigma glutathione S-transferases from disk abalone (*Haliotis discus discus*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 151(3): 257—267
- Xu C, Pan L, Liu N *et al*, 2010. Cloning, characterization and tissue distribution of a pi-class glutathione S-transferase from clam (*Venerupis philippinarum*): Response to benzo[a]pyrene exposure. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 152(2): 160—166
- Zhang L, Qiu L, Wu H *et al*, 2012. Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes from *Venerupis philippinarum* exposed to heavy metals and benzo[a]pyrene. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 155(3): 517—527
- Zhao D, Chen L, Qin C *et al*, 2010. A delta-class glutathione transferase from the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: cDNA cloning, characterization and mRNA expression. *Fish & Shellfish Immunol*, 29(4): 698—703

SEQUENCE AND TRANSCRIPTIONAL PROFILES OF RHO AND MICROSOMAL CLASS GST GENES IN MANILA CLAM *VENERUPIS PHILIPPINARUM*

ZHANG Ying-Ying^{1,3}, YUAN Ze-Yi², WANG Qing¹, LI Qiao-Mei^{1,3}, WU Hui-Feng¹, ZHAO Jian-Min¹
(1. *Yantai Institute of Coastal Zone Research, Key Laboratory of Coastal Zone Environmental Processes and Ecological Remediation, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China*; 2. *National Marine Data and Information Service, Tianjin 300171, China*;
3. *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

Abstract Glutathione S-transferase (GST) is a family of versatile enzymes playing significant roles in cellular defense against oxidative stress. In this study, the full-length cDNAs of two glutathione S-transferases (GSTs) (named VpGSTR and VpGSTMi) were cloned from *Venerupis philippinarum* using RACE technique. Sequence analysis showed that VpGSTR comprised an open reading frame (ORF) of 705bp, encoding a polypeptide of 234 amino acids, and VpGSTMi possessed an ORF of 450bp, encoding a polypeptide of 149 amino acids. Phylogenetic analysis showed that VpGSTR and VpGSTMi were linked in evolution with other Rho and microsomal homologues. The VpGSTR and VpGSTMi transcript were detected in all tissues but in the highest level in hepatopancreas. After challenged with *Vibrio anguillarum*, the expression of both VpGSTR and VpGSTMi transcripts was up-regulated in 24h. These findings suggest that VpGSTR and VpGSTMi may play an important role in cellular defense against oxidative stress caused by bacterial challenge.

Key words glutathione S-transferases; *Venerupis philippinarum*; gene cloning; expression analysis