

三疣梭子蟹含硒谷胱甘肽过氧化物酶 基因克隆及其表达分析*

李蒙^{1, 2, 3} 王金凤^{1, 2, 3, 4} 黄骞^{1, 2, 3, 4} 李才文^{1, 2, 3, 4}

(1. 中国科学院海洋研究所 海洋生态与环境科学重点实验室 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋生态与环境科学功能实验室 青岛 266237; 3. 中国科学院海洋大科学研究中心 青岛 266071; 4. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要 为探究三疣梭子蟹的免疫机制以及谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)在甲壳动物响应寄生虫感染免疫过程中的作用, 本研究采用 RACE 方法从三疣梭子蟹中克隆获得硒半胱氨酸-谷胱甘肽过氧化物酶基因的全长 cDNA 序列, 其 cDNA 序列全长为 696bp, 5'-UTR 长度为 102bp, 3'-UTR 长度为 87bp, 开放阅读框长度为 507bp, 编码 168 个氨基酸, 其中含有一个典型的由蛋白石终止密码子(²²⁰TGA²²²)编码的硒半胱氨酸(⁴⁰U)。预测了该基因编码的氨基酸序列及其中的保守结构域, 包括 GPx 家族签名序列(⁶⁴LAFPCNQF⁷¹)、活性位点序列(¹⁵²WNFEKF¹⁵⁷)以及与酶催化活性相关的氨基酸位点包括谷氨酰胺(⁷⁴Q)、精氨酸(⁹⁰R 和 ¹⁶⁸R)和色氨酸(¹⁴²W)。相似性比对和系统发育分析结果表明, 三疣梭子蟹硒半胱氨酸-谷胱甘肽过氧化物酶(SeGPx)与甲壳动物中的 SeGPxs 相似性较高, 其中与拟穴青蟹 SeGPx 相似性最高, 并与其在系统发育树中聚为一支。经血卵涡鞭虫侵染后(0—192h), SeGPx 基因在三疣梭子蟹的血细胞、胰腺和鳃组织中的转录水平均发生显著性升高。该结果表明, SeGPx 在三疣梭子蟹应对血卵涡鞭虫的免疫反应中发挥重要作用, 可通过调控甲壳宿主体内被病原扰乱的氧化还原状态进而起到宿主组织保护作用。

关键词 甲壳动物; 固有免疫; 寄生虫; 谷胱甘肽过氧化物酶基因; 分子克隆; 基因表达
中图分类号 S917 **doi:** 10.11693/hyhz20180500128

谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPx)是一类广泛存在于需氧生物体内的重要抗氧化酶。GPxs 家族成员一般可分为两大类型, 分别为不含硒谷胱甘肽过氧化物酶(non-selenium-dependent GPx, non-SeGPx)和含硒谷胱甘肽过氧化物酶(selenium-dependent GPx, SeGPx) (Arthur, 2001; Brigelius-Flohé *et al*, 2013)。而且, 在哺乳动物中, GPxs 家族成员可进一步分为 8 种不同亚型(Herbette *et al*, 2007; Margis *et al*, 2008; Toppo *et al*, 2008)。作为重要抗氧化酶, 谷胱甘肽过氧化物酶可将活性氧种类(Reactive oxygen species, ROS), 如无机过氧化物(H₂O₂)或者有机过氧化物催化产生水或者酒精, 进而参与生物体内氧化还

原稳态的调控过程(Ursini *et al*, 1995)。而最新研究表明, GPxs 除了具有对 ROS 的催化功能外, 还可在生物机体中发挥某些新型生理功能, 例如 GPx1 对胰岛素信号通路的调控作用、GPx2 的致癌过程、GPx3 参与机体炎症反应、GPx4 参与细胞凋亡过程、GPx5 参与精子发生过程以及 GPx7 和 GPx8 参与潜在的蛋白折叠过程(Brigelius-Flohé *et al*, 2013)。

相较于脊椎动物而言, GPxs 在甲壳动物中的功能研究仍相对较少。目前, GPx 基因仅在少数虾、蟹甲壳类动物中, 如凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)、中国明对虾

*国家自然科学基金面上项目, 41676102 号; 支持“率先行动”中国博士后科学基金会与中国科学院联合资助优秀博士后项目, 2016LH0034 号; 中国博士后科学基金第 60 批面上资助项目, 2016M600561 号。李蒙, 博士后, E-mail: limeng@qdio.ac.cn

通信作者: 李才文, 博士生导师, 研究员, E-mail: cwli@qdio.ac.cn

收稿日期: 2018-05-24, 收修改稿日期: 2018-08-29

(*Fenneropenaeus chinensis*)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)，以及拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)中克隆获得(Liu *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2009; Yeh *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2012; Duan *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2013)。而且，近年来的研究结果表明，*GPx* 基因可参与甲壳动物对细菌、病毒等病原感染的免疫响应过程，在甲壳动物的固有免疫中发挥重要作用(Liu *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2009; Yeh *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2012; Duan *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2013)。

三疣梭子蟹是广泛分布于东亚沿海地区的重要海产经济蟹类之一。在我国，三疣梭子蟹养殖在海产蟹类养殖业中具有重要地位，近年来其年产量均超过 10 万吨，其中 2016 年养殖产量为 125000 吨，产值逾 100 余亿元(农业部渔业渔政管理局, 2017)。然而，自 2004 年以来，血卵涡鞭虫逐渐成为引发三疣梭子蟹流行病害“牛奶病”的重要寄生性病原，给我国三疣梭子蟹养殖业造成巨大的经济损失，严重妨碍我国海产蟹类养殖业的可持续、健康发展(许文军等, 2007; 李才文等, 2014a, b; 王金凤等, 2015; Li *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017)。而探究三疣梭子蟹对血卵涡鞭虫的免疫机制可为该寄生虫流行性疾病的防控提供重要理论依据。因此，在本研究中，我们克隆分析了三疣梭子蟹 *GPx* 基因的全长 cDNA 序列，并进一步检测了经血卵涡鞭虫感染后该基因在三疣梭子蟹多个重要组织中的转录表达变化，初步探究了 *GPx* 基因在甲壳动物固有免疫中的重要作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物和病原准备

从山东青岛市胶南当地养殖场采购三疣梭子蟹[体重(140±10)g]，采用血涂片镜检法和特异性 PCR 扩增法对用于本实验的三疣梭子蟹进行血卵涡鞭虫感染检测分析(Stentiford *et al.*, 2005; Small *et al.*, 2007a)，确认无该寄生虫感染。将三疣梭子蟹置于室内水循环系统中[盐度=30，温度=(23±0.5)°C，氨=0—0.3mg/L，亚硝酸盐=0—0.6mg/L，pH=7.4—8.2]驯养 1 周后开展后续相关实验。

采集血卵涡鞭虫重度感染蟹作为免疫刺激实验中的病原供体，病原分离准备工作可参见 Small 等(2007b)。简言之，将约 0.5mL 感染血卵涡鞭虫的蟹血淋巴液加入含有 10mL MAM 缓冲液(Small *et al.*, 2007b)的无菌 25cm² 细胞培养瓶中，室温放置 30min。

然后，将培养瓶中的虫体细胞悬浮液转入新的无菌 25cm² 细胞培养瓶中，室温放置 30min。收集虫体细胞悬浮液并在转速为 400g 和 7°C 条件下离心 10min，弃上清后保留虫体细胞沉淀。采用 MAM 缓冲液洗涤血卵涡鞭虫两次后，对悬浮液中血卵涡鞭虫的数量进行计数，将虫体细胞浓度稀释至 1.0×10⁶cells/mL，用于后续 2.5 部分的实验中。

1.2 总 RNA 提取和反转录 PCR

采用 Trizol 试剂(TaKaRa, Japan)提取组织总 RNA，采用无 RNA 酶的 DNAase I (TaKaRa, 日本)去除基因组 DNA 污染。RNA 样品质量及浓度采用 NanoDrop 2000 紫外分光光度计(A260nm/A280nm)进行测定分析，并通过 1%的琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 样品中 28S rRNA 和 18S rRNA 条带的完整性检测 RNA 样品完整性。使用 PrimeScriptTM 反转录试剂盒(TaKaRa 公司, 日本)，根据说明书操作反转录合成 cDNA 第一链，保存于-80°C 超低温冰箱中用于后续基因转录表达分析。

1.3 三疣梭子蟹 *GPx* 基因的全长 cDNA 序列克隆

根据已克隆获得三疣梭子蟹 *GPx* 基因的 cDNA 序列中间片段(GenBank 序列号: KU529652)，使用 Primer Premier 5.0 软件设计基因特异性引物序列(表 1)，采用 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech, USA)分别克隆获得 *GPx* 基因的 5'和 3'末端 cDNA 序列。首先按照 RACE 试剂盒的操作说明，将三疣梭子蟹肝胰腺组织总 RNA 样品反转录合生用于后续 5'和 3' RACE PCR 扩增的 cDNA 第一链模板。RACE 扩增的外层 5'和 3'末端 PCR 反应分别采用基因特异性引物 5gsp1 和 3gsp1 与 UPM 引物配对，PCR 反应程序设置为：94°C 预变性 5min；94°C 变性 30s，68°C 退火 30s (每个循环降 1°C)，72°C 延伸 1min(15 个循环)；94°C 变性 30s，58°C 退火 30s，72°C 延伸 1min(28 个循环)，最后 72°C 延伸 10min。RACE 扩增的内层 5'和 3'末端 PCR 反应分别采用基因特异性引物 5gsp2 和 3gsp2 与 NUP 引物配对，PCR 程序同上。采用 TA 克隆试剂盒(TaKaRa 公司, 日本)将 5'和 3' RACE-PCR 内层扩增产物插入 pMD19-T 载体中，挑选含有重组质粒的 10 个阳性单克隆菌落送至 Invitrogen 公司测序。最后，通过 Lasergene 软件(DNASTar 公司, 美国)对 *GPx* 基因的中间 cDNA 序列、5'和 3'末端 cDNA 序列进行拼接，从而获得三疣梭子蟹 *GPx* 基因的全长 cDNA 序列。

表 1 本研究中 5'和 3' RACE 扩增和实时荧光定量 PCR 引物
Tab.1 The primers used for the 5'- and 3'-RACE and qRT-PCR

引物名称	引物序列 (5'—3')	引物用途
<i>PtSeGPx</i> -5gsp1	TCCACCTTGCCAAACATCTCCAT	5'RACE
<i>PtSeGPx</i> -5gsp2	CTCCTCGTGAGTGGTGTTCCTG	
<i>PtSeGPx</i> -3gsp1	GCTDATCCAGAACACGCGG	3'RACE
<i>PtSeGPx</i> -3gsp2	GTCCTGGTAACAACCTTTGAGCC	
<i>PtSeGPx</i> -QRT-F	GTCCTGGTAACAACCTTTGAGCC	qRT-PCR
<i>PtSeGPx</i> -QRT-R	ATGATACACTTGGGGTCTGCC	
β -actin-qF	TCACACACTGTCCCCATCTACG	qRT-PCR
β -actin-qR	ACCACGCTCGGTCAGGATTTTC	
UPM	Long-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAG-TGGTATCAACGCAGAGT Short-CTAATACGACTCACTATAGGGC	5'和 3'RACE
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	5'和 3'RACE

1.4 序列和系统发育分析

采用 MUSCLE 在线软件对 *PtSeGPx* 氨基酸序列与其他物种 *GPxs* 氨基酸序列进行比对分析(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>), 通过 Lasergene 软件中的 MegAlign 程序分析 *PtSeGPx* 氨基酸序列与已报道 *GPxs* 氨基酸序列的相似性。采用 MEGA 5.0 软件(<http://www.megasoftware.net/>)基于邻接法构建系统发育树对 *PtSeGPx* 进行系统发育分析。上述序列分析中所使用的其他物种 *GPxs* 序列可参见表 2。此外, 通过在线分析工具 InterPro(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)MotifScan(http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)对 *PtSeGPx* 蛋白序列中的保守结构域进行预测分析。N-连接糖基化位点通过 NetNGlyc 1.0 Server 进行预测分析 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)。 *PtSeGPx* 蛋白的三维结构通过在线分析软件 Swiss-model(<http://swissmodel.expasy.org/>)进行分析, 其分子量和等电点则通过 LasergeneR 软件 (DNASTAR Inc., USA)中的 EditSeq 程序分析获得。

1.5 *PtSeGPx* 基因经血卵涡鞭虫侵染后的转录表达分析

为了获得 *PtSeGPx* 基因经血卵涡鞭虫免疫刺激后的转录表达变化, 本文经由 70%酒精擦拭后的第五步足关节膜对实验组中的三疣梭子蟹($n=40$)注射 100 μ L 含有血卵涡鞭虫滋养体细胞的 Nephrops 缓冲液(Shields *et al*, 2000), 注射剂量为 10^5 虫体细胞/个体; 对照组中的三疣梭子蟹($n=40$)则注射等体积 Nephrops 缓冲液。本实验已有研究表明, 上述血卵涡鞭虫注射剂量可有效引发三疣梭子蟹的免疫响应(Li *et al*, 2015a, b)。实验期间, 实验组和对照组分别放置

于相同环境条件下的独立循环水系统中进行喂养。在实验起始后 6、12、24、48、96 和 192h 时进行样品采集, 于实验组和对照组中在每个时间点随机选取 5 只梭子蟹进行解剖取样, 采集鳃、肝胰腺和血细胞样品, 采集方法可参见 Li 等(2015a, b)。此外, 本文在免疫刺激实验起始前采集 5 只未处理的三疣梭子蟹个体相应的组织样品作为后续数据分析的空白对照。

经血卵涡鞭虫侵染后, 采用实时荧光定量 PCR 检测分析 *PtSeGPx* 基因在三疣梭子蟹中三个重要组织中(鳃、肝胰腺和血细胞)的转录表达水平, 实时荧光定量 PCR 的引物参见表 1, 引物序列的特异性通过溶解曲线和 1%琼脂糖凝胶电泳分析进行确认。实时荧光定量 PCR 仪器采用 Rotor-Gene Q 2plex HRM 热循环仪(QIAGEN, 德国), 采用 25 μ L PCR 反应体系, 包括 12.5 μ L SYBR *Premix Ex Taq II* (2 \times) (TaKaRa, Japan)、10 μ mol/L 上、下游引物各 0.5、1 μ L cDNA 模板和 10.5 μ L 无菌水, 每个反应设置 3 个重复。PCR 程序设定为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30s, 然后 95 $^{\circ}$ C 变性 5s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30s (40 个循环)。PCR 反应完成后添加溶解曲线评估 PCR 扩增反应的特异性, 并依据公式 $E=10^{(-1/\text{slope})}$ 测定实时荧光定量 PCR 的扩增效率 (Rasmussen, 2001)。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法(Livak *et al*, 2001), 以 β -actin 作为内参基因计算目的基因的相对 mRNA 表达量(Liu *et al*, 2013; Li *et al*, 2015a, b)。

1.6 数据分析

实验数据以平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)的形式呈现, 采用统计分析软件 SPSS 20.0 对数据进行单因素方差分析(ANOVA)和 Duncan 多重比较显著性分析。 $P<0.05$ 表示数据具有显著性差异。

表 2 本研究中用于序列分析的 GPx 基因家族序列
Tab.2 The members of GPx family used for sequence analysis

序列名称	GenBank 序列号	来源物种
三疣梭子蟹 GPx	KY216076	<i>Portunus trituberculatus</i>
拟穴青蟹 GPx	AEN69448	<i>Scylla paramamosain</i>
日本沼虾 GPx	ADV17661	<i>Macrobrachium nipponense</i>
罗氏沼虾 GPx	ACM68948	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>
脊尾白虾 GPx	AGJ03551	<i>Exopalaemon carinicauda</i>
栉孔扇贝 GPx	ACF25900	<i>Chlamys farreri</i>
文蛤 GPx	ADR51677	<i>Meretrix meretrix</i>
紫贻贝 GPx	ADY38576	<i>Mytilus galloprovincialis</i>
背角无齿蚌 GPx	ANG56607	<i>Sinanodonta woodiana</i>
菲律宾蛤仔 GPx	ACU83220	<i>Ruditapes philippinarum</i>
九孔鲍 GPx	ADF80272	<i>Haliotis diversicolor supertexta</i>
非洲爪蟾 GPx1	NP_001088896	<i>Xenopus laevis</i>
非洲爪蟾 GPx3a	NP_001085319	<i>X. laevis</i>
非洲爪蟾 GPx4a	NP_001165215	<i>X. laevis</i>
非洲爪蟾 GPx7	NP_001088904	<i>X. laevis</i>
斑马鱼 GPx1	NP_001007282	<i>Danio rerio</i>
斑马鱼 GPx2	NP_001316688	<i>D. rerio</i>
斑马鱼 GPx3	NP_001131027	<i>D. rerio</i>
斑马鱼 GPx4a	NP_001333466	<i>D. rerio</i>
斑马鱼 GPx4b	NP_001025241	<i>D. rerio</i>
斑马鱼 GPx7	NP_001018337	<i>D. rerio</i>
小鼠 GPx1	NP_032186	<i>Mus musculus</i>
小鼠 GPx2	NP_109602	<i>M. musculus</i>
小鼠 GPx3	NP_032187	<i>M. musculus</i>
小鼠 GPx4	AAI06148	<i>M. musculus</i>
小鼠 GPx5	NP_034473	<i>M. musculus</i>
小鼠 GPx6	NP_663426	<i>M. musculus</i>
小鼠 GPx7	NP_077160	<i>M. musculus</i>
小鼠 GPx8	NP_081403	<i>M. musculus</i>
人 GPx1	AAH07865	<i>Homo sapiens</i>
人 GPx2	AAH22820	<i>H. sapiens</i>
人 GPx3	NP_002075	<i>H. sapiens</i>
人 GPx4	AAH39849	<i>H. sapiens</i>
人 GPx5	NP_001500	<i>H. sapiens</i>
人 GPx6	NP_874360	<i>H. sapiens</i>
人 GPx7	NP_056511	<i>H. sapiens</i>
人 GPx8	NP_001008398	<i>H. sapiens</i>

2 结果与讨论

2.1 *PtSeGPx* 基因全长 cDNA 序列的克隆分析

我们采用 RACE 技术首次从三疣梭子蟹中成功克隆获得 *SeGPx* 基因的全长 cDNA 序列, 并已提交至

GenBank 数据库 (GenBank 序列号: KY216076)。
PtSeGPx 基因的 cDNA 序列全长为 696bp, 开放阅读框长度为 507bp, 编码 168 个氨基酸, 5'UTR 长度为 102bp, 3'UTR 长度为 87bp(图 1)。此外, cDNA 序列中的起始密码子 ATG、终止密码子 TAG 以及 poly (A)

2.2 序列比对和系统发育分析

多重序列比对结果显示, PtSeGPx 蛋白序列与已报道甲壳动物中的 SeGPxs 蛋白序列相似性(>70%)要高于与其他物种 GPxs 的相似性(30%—60%), 其中与拟穴青蟹 SeGPx 蛋白序列相似性最高为

91.0%(图 3)。并且, PtSeGPx 中的保守结构域 GPx 家族签名序列(⁶⁴LAFPCNQF⁷¹)、活性位点序列(¹⁵²WNFEKF¹⁵⁷)以及硒半胱氨酸残基(⁴⁰U)在无脊椎动物和脊椎动物的 GPxs 蛋白中具有很高的保守性(图 3)。

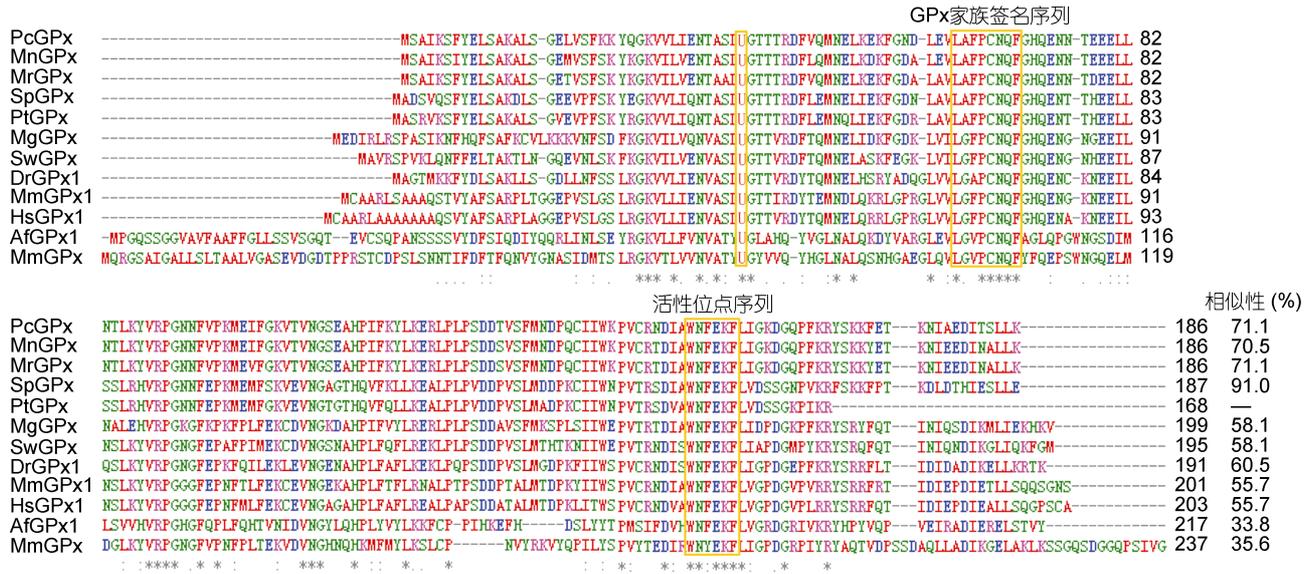


图 3 PtSeGPx 蛋白序列与其他物种 GPxs 序列的相似性比对

Fig.3 Comparison and percent identity (%) of PtSeGPx protein sequence with the counterparts of other species
注: 保守结构域, 包括 GPx 家族签名序列(⁶⁴LAFPCNQF⁷¹)、活性位点序列(¹⁵²WNFEKF¹⁵⁷)与硒半胱氨酸残基(U)均以黄色方框标注; 氨基酸位点的保守性程度由高到低依次分别以不同符号(*), (:), 和 (·)进行标注

基于邻接法对 PtSeGPx 氨基酸序列与其他物种 GPxs 序列进行系统发育分析, 结果显示 PtSeGPx 与甲壳动物 SeGPx 序列同源性较高, 并与其聚为一支(图 4)。目前, 依据蛋白石密码子编码的硒半胱氨酸的存在与否(Herbette et al, 2007), 谷胱甘肽过氧化物酶通常被分为含硒谷胱甘肽过氧化物酶(SeGPx)和不含硒谷胱甘肽过氧化物酶(non-SeGPx)两个亚家族(Arthur, 2001; Brigelius-Flohé et al, 2013)。因此, 由以上分析结果可以发现, 本研究克隆获得的三疣梭子蟹 GPx 基因是甲壳动物中一个新发现的含硒谷胱甘肽过氧化物酶基因。

2.3 PtSeGPx 基因经血卵涡鞭虫侵染后的转录表达变化

经血卵涡鞭虫侵染后, PtSeGPx 基因在三疣梭子蟹血细胞、肝胰腺和鳃组织中的转录水平均发生显著性变化。PtSeGPx 基因在三个被检测组织中的转录表达均可受到血卵涡鞭虫的诱导并发生显著性表达上调(图 5)。本研究中, PtSeGPx 基因在三疣梭子蟹血细胞和肝胰腺中的转录表达显著上调结果与之前的研

究结果是一致的(Li et al, 2016)。经血卵涡鞭虫侵染后, PtSeGPx 基因在三疣梭子蟹血细胞(图 5a)和肝胰腺组织(图 5b)中的转录水平变化呈现类似的表达变化模式, 均可在 6—192h 侵染期间发生显著性表达上调(P<0.05)。在三疣梭子蟹鳃组织中, PtSeGPx 基因的转录表达在经血卵涡鞭虫侵染 12、48 和 192h 时发生显著性上调(P<0.05), 而在侵染 24h 时发生显著性下调(P<0.05)(图 5c)。以上结果表明, PtSeGPx 基因在三疣梭子蟹鳃中的表达变化与其在血细胞和肝胰腺中的表达变化具有差异性, 一方面这可能与本研究中对三疣梭子蟹的侵染方式相关; 另一方面可能是由组织器官的免疫功能差异性所导致的不同组织器官在应对血卵涡鞭虫侵染过程中的免疫应答差异性, 进而导致 PtSeGPx 基因在三个不同组织器官中出现差异性表达。

血细胞和肝胰腺是甲壳动物中的重要免疫组织, 对细菌和病毒等病原发挥重要的免疫防御功能。已有研究发现, 在脊尾白虾和克氏原螯虾中受到细菌或病毒侵染后, GPx 基因在其血细胞和肝胰腺组织中的转录水平发生显著性表达上调, 表明 GPx 基因在甲

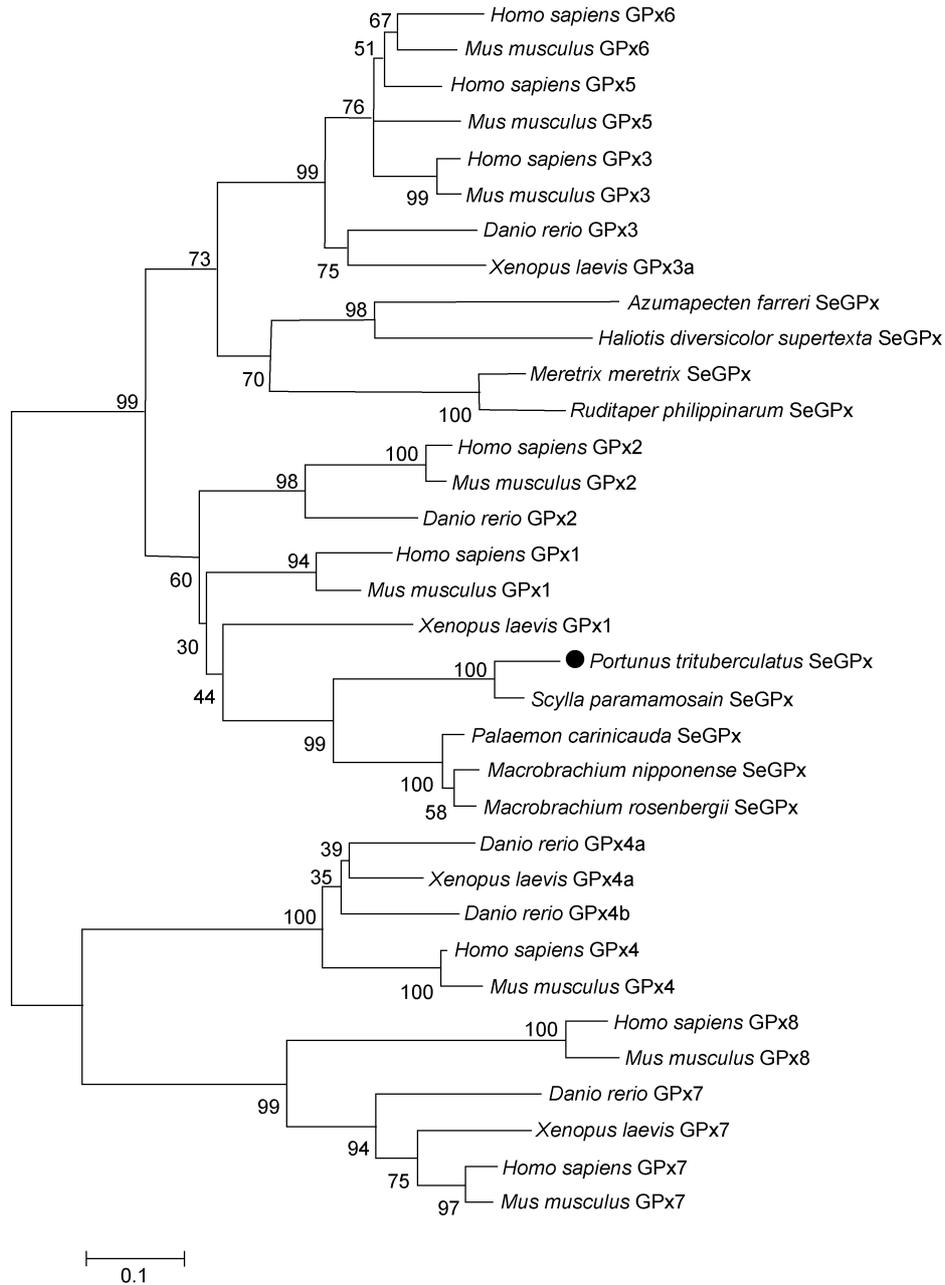


图 4 PtSeGPx 的系统发育分析

Fig.4 Phylogenetic analysis of PtSeGPx

注: 用于构建系统发育树的以上相关物种及其 GPx 序列信息可参见表 2

壳动物免疫系统中具有重要作用(Duan *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2013)。同时, 研究表明, 作为一种重要抗氧化酶, GPx 基因在甲壳动物应对入侵病原的免疫反应中的转录表达上调可促进清除机体产生的过量 ROS, 使甲壳宿主减轻或避免发生氧化损伤, 在甲壳宿主自我防护过程中发挥重要作用(Liu *et al.*, 2007; Yeh *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010)。Duan 等(2015)研究发现, 副溶血弧菌可通过紊乱斑节对虾体内的抗氧化酶(如

GPx、CAT 和 SOD 等)影响甲壳宿主的抗氧化状态, 进而引起斑节对虾中鳃组织和肝胰腺组织中的氧化应激反应, 甚至导致其肝胰腺组织损伤。因此, 本研究中 PtSeGPx 基因的显著性表达上调结果表明, PtSeGPx 在三疣梭子蟹对血卵涡鞭虫的免疫响应过程发挥重要作用, 参与调控平衡甲壳宿主在免疫反应中的氧化还原状态, 使其重要组织避免遭受氧化损伤从而对宿主起到重要防护作用。

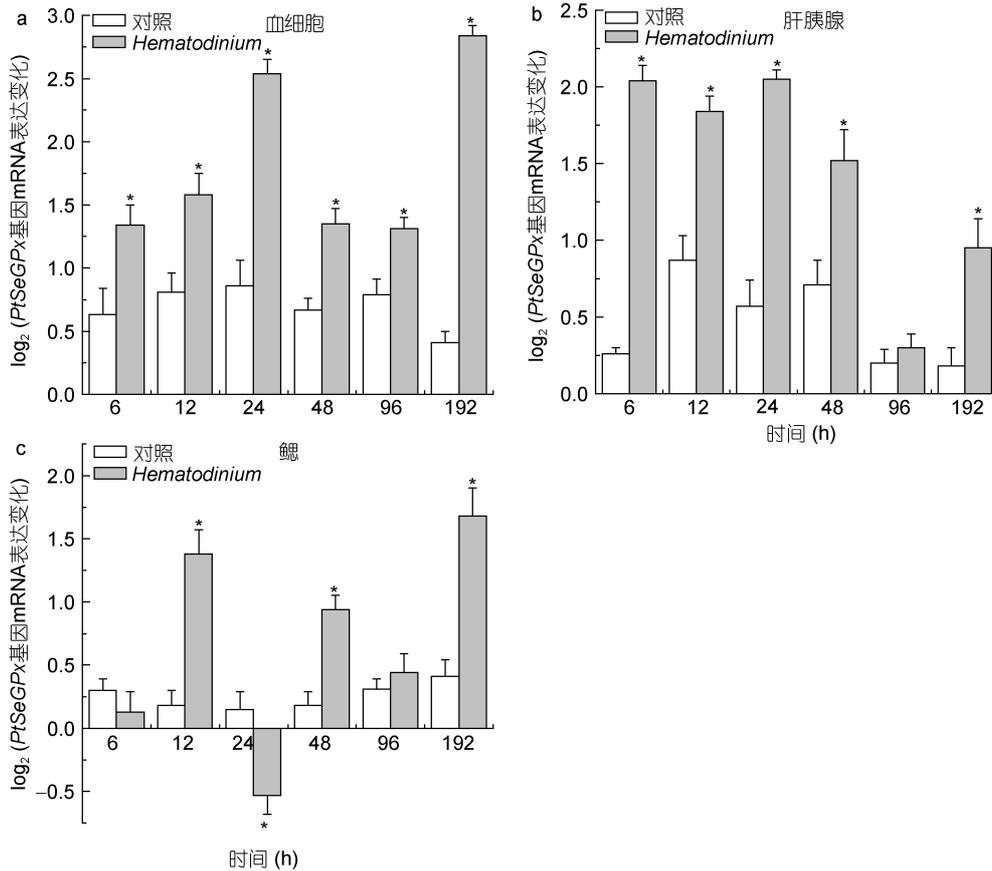


图5 *PtSeGPx* 基因的转录表达分析

Fig.5 Relative mRNA expression profiles of *PtSeGPx* transcripts

注: 数据显著性差异以*表示($P < 0.05$, $n=5$)

3 结论

本研究首次于三疣梭子蟹中克隆获得含硒谷胱甘肽过氧化物酶基因 *PtSeGPx* 的全长 cDNA 序列并对其进行了序列分析, 进一步采用 qRT-PCR 方法探究了血卵涡鞭虫侵染条件下 *PtSeGPx* 基因在三疣梭子蟹中 3 个重要组织中的转录表达变化。研究表明, *PtSeGPx* 基因在三疣梭子蟹对血卵涡鞭虫的免疫响应过程中发挥重要作用, 这将有助于我们进一步了解甲壳动物响应寄生虫感染的分子免疫机制。

参 考 文 献

- 许文军, 施 慧, 徐汉祥等, 2007. 养殖梭子蟹血卵涡鞭虫感染的初步研究. 水生生物学报, 31(5): 637—642
- 李才文, 许文军, 2014a. 海水甲壳类寄生性病原血卵涡鞭虫 (*Hematodinium* spp.) 研究进展. 海洋与湖沼, (1): 1—10
- 李才文, 宋书群, 刘 云等, 2014b. 寄生性病原血卵涡鞭虫 (*Hematodinium* sp.) 感染山东半岛养殖梭子蟹的初步研究. 海洋与湖沼, (4): 776—782
- 王金凤, 李才文, 李 蒙等, 2015. 血卵涡鞭虫感染三疣梭子

- 蟹的病原形态学及组织病理学变化. 海洋与湖沼, 46(4): 748—757
- 农业部渔业渔政管理局, 2017. 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 1—157
- Allmann C, Krol A, 2006. Selenoprotein synthesis: UGA does not end the story. Biochimie, 88(11): 1561—1571
- Arthur J R, 2001. The glutathione peroxidases. Cell Mol Life Sci, 57(13—14): 1825—1835
- Aumann K D, Bedorf N, Brigelius-Flohé R *et al*, 1997. Glutathione peroxidase revisited — simulation of the catalytic cycle by computer-assisted molecular modelling. Biomed Environ Sci, 10(2—3): 136—155
- Brigelius-Flohé R, Maiorino M, 2013. Glutathione peroxidases. Biochim Biophys Acta, 1830(5): 3289—3303
- Duan Y F, Liu P, Li J T *et al*, 2013. Expression profiles of selenium dependent glutathione peroxidase and glutathione S-transferase from *Exopalaemon carinicauda* in response to *Vibrio anguillarum* and WSSV challenge. Fish Shellfish Immunol, 35(3): 661—670
- Duan Y F, Zhang J S, Dong H B *et al*, 2015. Oxidative stress response of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* to *Vibrio parahaemolyticus* challenge. Fish Shellfish Immunol, 46(2): 354—365

- Fu M J, Zou Z H, Liu S F *et al*, 2012. Selenium-dependent glutathione peroxidase gene expression during gonad development and its response to LPS and H₂O₂ challenge in *Scylla paramamosain*. *Fish Shellfish Immunol*, 33(3): 532—542
- Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet J R, 2007. Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *FEBS J*, 274(9): 2163—2180
- Li C W, Song S Q, Liu Y *et al*, 2013. *Hematodinium* infections in cultured Chinese swimming crab, *Portunus trituberculatus*, in northern China. *Aquaculture*, 396—399: 59—65
- Li M, Li C W, Wang J F *et al*, 2015a. Immune response and gene expression in hemocytes of *Portunus trituberculatus* inoculated with the parasitic dinoflagellate *Hematodinium*. *Mol Immunol*, 65(1): 113—122
- Li M, Wang J F, Song S Q *et al*, 2015b. Early transcriptional response to the parasitic dinoflagellate *Hematodinium* in hepatopancreas of *Portunus trituberculatus*. *J Invertebr Pathol*, 130: 28—36
- Li M, Wang J F, Song S Q *et al*, 2016. Molecular characterization of a novel nitric oxide synthase gene from *Portunus trituberculatus* and the roles of NO/O₂⁻-generating and antioxidant systems in host immune responses to *Hematodinium*. *Fish Shellfish Immunol*, 52: 263—277
- Liu C H, Tseng M C, Cheng W, 2007. Identification and cloning of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its expression following *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish Shellfish Immunol*, 23(1): 34—45
- Liu K F, Yeh M S, Kou G H *et al*, 2010. 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. *Dev Comp Immunol*, 34(9): 935—944
- Liu Y, Cui Z X, Li X H *et al*, 2013. A newly identified anti-lipopolysaccharide factor from the swimming crab *Portunus trituberculatus* with broad spectrum antimicrobial activity. *Fish Shellfish Immunol*, 34(2): 463—470
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_t} method. *Methods*, 25(4): 402—408
- Margis R, Dunand C, Teixeira F K *et al*, 2008. Glutathione peroxidase family—an evolutionary overview. *FEBS J*, 275(15): 3959—3970
- Rasmussen R, 2001. Quantification on the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K I eds. *Rapid Cycle Real-time PCR*. Berlin, Heidelberg: Springer Press, 21—34
- Ren Q, Sun R R, Zhao X F *et al*, 2009. A selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) and two glutathione S-transferases (GSTs) from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol*, 149(4): 613—623
- Shields J D, Squyars C M, 2000. Mortality and hematology of blue crabs, *Callinectes sapidus*, experimentally infected with the parasitic dinoflagellate *Hematodinium perezii*. *Fish Bull*, 98: 139—152
- Small H J, Shields J D, Hudson K L *et al*, 2007a. Molecular detection of *Hematodinium* sp. infecting the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J Shellfish Res*, 26(1): 131—139
- Small H J, Shields J D, Neil D M *et al*, 2007b. Differences in enzyme activities between two species of *Hematodinium*, parasitic dinoflagellates of crustaceans. *J Invertebr Pathol*, 94(3): 175—183
- Stentiford G D, Shields J D, 2005. A review of the parasitic dinoflagellates *Hematodinium* species and *Hematodinium*-like infections in marine crustaceans. *Dis Aquat Organ*, 66(1): 47—70
- Toppo S, Vanin S, Bosello V *et al*, 2008. Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily. *Antioxid Redox Signal*, 10(9): 1501—1514
- Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohé R *et al*, 1995. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol*, 252: 38—53
- Wang J F, Li M, Xiao J *et al*, 2017. *Hematodinium* spp. infections in wild and cultured populations of marine crustaceans along the coast of China. *Dis Aquat Organ*, 124(3): 181—191
- Xia X F, Zheng J J, Shao G M *et al*, 2013. Cloning and functional analysis of glutathione peroxidase gene in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish Shellfish Immunol*, 34(6): 1587—1595
- Yeh S P, Liu K F, Chiu S T *et al*, 2009. Identification and cloning of a selenium dependent glutathione peroxidase from giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol*, 27(2): 181—191

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF A SELENIUM-DEPENDENT GLUTATHIONE PEROXIDASE GENE FROM *PORTUNUS TRITUBERCULATUS*

LI Meng^{1,2,3}, WANG Jin-Feng^{1,2,3,4}, HUANG Qian^{1,2,3,4}, LI Cai-Wen^{1,2,3,4}

(1. CAS Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Marine Ecology and Environmental Science Laboratory, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China; 3. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Glutathione peroxidase (GPx) is an essential antioxidant enzyme that associated with the immune defense of aerobic living organisms against invading pathogens. To investigate the potential role of GPx genes in crustacean immune response against parasitic infection, we isolated and characterized a novel selenium-dependent glutathione peroxidase gene (*PtSeGPx*) in *Portunus trituberculatus*. The open reading frame (ORF) encoded 168 amino acids, with a characteristic selenocysteine residue (⁴⁰U) encoded by an opal codon (²²⁰TGA²²²). The conserved domains including the GPx signature motif 2 (⁶⁴LAFPCNQF⁷¹) and the active site motif (¹⁵²WNFEKF¹⁵⁷), as well as the catalytically related amino acid residues consisting of Gln (⁷⁴Q), Arg (⁹⁰R), Trp (¹⁴²W), and Arg (¹⁶⁸R), were identified in the deduced PtSeGPx protein sequence. Amino acid comparison and phylogenetic analyses indicated that the PtSeGPx was closely related to and clustered with the crustacean SeGPxs. The PtSeGPx transcripts were extensively and induced significantly in multiple major tissues (e.g. hemocytes, hepatopancreas, and gills) of *P. trituberculatus* during its host immune response against the invasion of the parasitic dinoflagellate *Hematodinium*, implying its involvement in the crustacean innate immunity against parasitic infection.

Key words crustacean; innate immunity; parasite; glutathione peroxidase gene; molecular cloning; gene expression