

海洋球石藻(*Emiliana huxleyi*)病毒硫氧还蛋白 (TRX)基因的克隆及生物信息学分析*

张彦锋¹ 刘静雯¹ 张稚兰¹ 董双林²

(1. 集美大学生物工程学院 厦门 361021; 2. 中国海洋大学 教育部水产养殖重点实验室 青岛 266003)

提要 首次从海洋球石藻病毒(*Emiliana huxleyi* virus-EhV 99B1)中克隆了硫氧还蛋白(Trx)基因(该序列已提交 GenBank, 登录号: GU109280)。系统进化关系分析表明: EhV99B1-Trx 与 GenBank 中已报道的 EhV86-Trx (NC_007346)有很高的同源性, 核酸及其推导的氨基酸序列的同源性分别为 98%和 100%, 而与其它物种的 Trx 序列同源性仅为 9.8%—18.8%。采用生物信息学方法和工具分析了 EhV99B1-Trx 的生化参数, 预测了该蛋白的高级结构。结果表明: (1) EhV99B1-Trx 基因的开放阅读框全长 591bp, 编码 196 个氨基酸, 蛋白的相对分子量为 22.1kDa, 理论等电点为 5.27; (2) EhV-99B1-Trx N 端蛋白结构域具有保守的 Cys-Gly-Pro-Cys (CGPC)硫氧还蛋白氧化还原活性位点氨基酸基序; (3) 对该蛋白二、三级结构分析预测结果进一步证实 EhV99B1-Trx 基因编码的为一种新型的硫氧还蛋白家族成员。

关键词 海洋球石藻病毒(EhV), 硫氧还蛋白(Trx), 基因克隆及生物信息学分析

中图分类号 Q943

硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)是一类广泛存在于生物体内的多功能小分子酸性蛋白, 参与细胞的一系列生化反应, 包括酶活性的调节(Laurent *et al.*, 1964; Arnér *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2001)、转录因子的调控(Schenk *et al.*, 1994)、硫酸盐的同化还原反应(Tsang *et al.*, 1978)、T1 噬菌体的特殊 DNA 复制(Pigiet *et al.*, 1986)以及在氧化逆境中发挥作用(Álamo *et al.*, 2000; Jee *et al.*, 2005)等。其功能绝大多数是依赖于硫氧还蛋白还原靶蛋白中的二硫键。二硫化物对蛋白质的结构和生物学活性是至关重要的。二硫键的形成和重排是蛋白质氧化折叠过程中的限速步骤之一, 通过对包涵体形式和人工合成肽进行体外折叠可以获得具有天然活性的蛋白(Rudolph *et al.*, 1996; Bernardez, 1998)。

Trx 广泛存在于细菌、酵母、动物及植物细胞中。其中, 植物中 Trx 的种类位居所有生物之首且具有丰

富的多样性(Gelhaye *et al.*, 2005)。植物 Trx 在碳代谢以及一些生化过程的酶活性的调控中起关键作用, 并可能参与植物生长的全过程(Gelhaye *et al.*, 2005)。与植物相比, 动物细胞中的 Trx 种类很少, 但它们的功能对细胞来说却是至关重要的, 如: 缓解胞内氧化胁迫、控制生长和细胞程序性死亡、调节细胞因子和趋化因子的活力(Álamo *et al.*, 2000; Jee *et al.*, 2005; Mitchell *et al.*, 2005)。迄今, 已在动植物、细菌及酵母等不同生物中鉴定了 200 多种 Trx 蛋白, 测序结果表明, 原核生物中的 Trx 有 50%的同源性, 而哺乳动物细胞中的 Trx 的同源性高达 90%。所有 Trx 中都含有一个外露且高度保守的、含两个半胱氨酸残基的活性中心(Cys2-Gly-2Pro-2Cys)。目前国内外有关 Trx 的研究报道较多集中于 Trx 参与细胞衰老和凋亡过程及其机制研究(Zhou *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2006; Masutani *et al.*, 2005)。另外, Trx 单独作为蛋白质二硫键氧化还

* “十一五”国家科技支撑计划重大项目子课题, 2006BAD09A06 号; 集美大学中青年创新团队专项基金资助, 2008A002 号。
张彦锋, 硕士研究生, E-mail: cheungyf@163.com

通讯作者: 刘静雯, 教授, E-mail: ljwsbch@163.com

收稿日期: 2009-11-25, 收修改稿日期: 2009-12-23

原酶促进蛋白质的折叠,用大肠杆菌 Trx 基因构建可溶性融合表达系统已被广泛应用(Edward *et al*, 1993; Kurokawa *et al*, 2000; 安乃莉等, 1999)。

海洋病毒是导致海洋宿主生物死亡率的主要原因、是全球生物地化循环的驱动者和地球上最大的生物多样性库(Fuhrman, 1999; Suttle, 2005)。最新的研究结果证实,在环境胁迫条件下浮游植物即可以被病毒感染也可能诱导宿主程序性细胞死亡过程(PCD)(Franklini *et al*, 2006; Bidle *et al*, 2007)。病毒作为一种导致微藻自然死亡率介质的潜在意义受到极大关注,但对病毒与藻宿主细胞之间相互作用关系和机制的了解却甚少。目前已从球石藻 *Coccolithophorid* 的不同株系中分离出十多株双链 DNA 病毒,由于其与其它的藻类双链 DNA 病毒相差很大,已被划分为藻类双链 DNA 病毒科中的一个新的属(*Coccolithovirus*)。Wilson 等(2005)对海洋球石藻 *Emiliania huxleyi* 病毒 EhV86 株系进行了全基因组测序并首次在该病毒基因组中发现了 Trx 基因的存在(No.NC_007346)。由此推测 Trx 可能在球石藻对环境胁迫响应过程中以及球石藻病毒与宿主细胞之间相互作用关系中起着重要的调节作用。

本研究利用分子克隆技术首次从海洋球石藻病毒 EhV-99B1 中获得 Trx 基因完整的 ORF 并对其进行生物学信息分析。为进一步探讨 Trx 在球石藻病毒与宿主相互作用过程中的调节作用以及该病毒 Trx 的功能与应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验用海洋微藻和病毒 球石藻 *Emiliania huxleyi* 病毒 EhV-99B1 株分离于挪威 Raunefjord 海域。该病毒滤液及其特异性宿主海洋球石藻 *E. huxleyi* (Eh-BOF92)均由挪威卑尔根大学生物系 Gunnar Bratbak 教授赠送。

1.1.2 菌种和试剂 pBS-T 载体、Taq DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶、核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 均为 TaKaRa 公司产品,大肠杆菌菌株 DH5 α 为本实验室保存,琼脂糖为西班牙进口分装,DNA 凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒为碧云天产品,测序由广州英俊公司完成,其余试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.1.3 引物设计 根据 Genbank 中已报道的 EhV86 基因组全序列,寻找 TRX 完整的开放阅读框,

根据该序列采用 GeneDoc 软件和 Primer Premier 5.0 软件设计引物。本实验中采用的引物为:TRX-F: 5'-CCCGAATTCATCTTTATAATCGCACC-3' (划线部分为 *EcoR* I 酶切位点),TRX-R: 5'-CCAAGCTTAAT TGACTCATCGACGAATTGTA-3' (划线部分为 *Hind* III 酶切位点)。

1.2 实验方法

根据张稚兰等(2009)的方法,在实验室纯培养条件下建立球石藻(Eh)与其特异性病毒(EhV)稳定的感染体系,经卷式切向流超滤浓缩和 CsCl 密度梯度离心得到高纯度的 EhV 病毒颗粒。

1.2.1 EhV-99B1 病毒基因组提取及硫氧还蛋白基因片段的扩增 采用 CTAB 法提取病毒基因组 DNA (Sambrook *et al*, 2001)。以病毒的 DNA 为模板,在 25 μ l 反应体系中(无菌 ddH₂O 5.5 μ l, rTaq 预混液 12.5 μ l, DNA 模板 5 μ l, 引物 F 和 R 各 1 μ l)进行 PCR,反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3min: 95 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 60s, 72 $^{\circ}$ C 90s, 扩增 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。PCR 产物经 1.2%琼脂糖凝胶检测、回收。

1.2.2 DNA 连接与转化

DNA 连接反应: PCR 产物经纯化后与 pBS-T 载体连接。连接反应为 10 μ l 体系: 回收 PCR 3 μ l, 10 \times DNA 连接缓冲液 1 μ l, T₄ DNA 连接酶 1 μ l, 载体 1 μ l, 无菌 ddH₂O 4 μ l, 于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。

大肠杆菌的转化: 被转化的感受态细胞为 *E. coli* DH5 α , 感受态细胞的制备方法参照《分子克隆实验指南(第 3 版)》进行(Sambrook *et al*, 2001)。将 10 μ l T 克隆连接产物加入到 200 μ l 的感受态细胞中,置冰浴 30min, 42 $^{\circ}$ C 热激 90s, 冰浴 2min。加入到含有 800 μ l LB 培养基(1%蛋白胨, 0.5%酵母提取物, 1% NaCl, pH 7.0)的试管中混匀, 37 $^{\circ}$ C 培养 1h。取未离心菌液 200 μ l 涂布含氨苄青霉素(终浓度为 0.1mg/ml)的 LB 固体平板(1%蛋白胨, 0.5%酵母提取物, 1% NaCl, pH 7.0, 预先涂有 40 μ l 20mg/ml 的 X-gal 与 4 μ l 200mg/ml 的 IPTG), 同时将剩余菌液于 8000r/min 离心 1min, 分别取上清、沉淀各 200 μ l 涂布平板(同上), 于 37 $^{\circ}$ C 倒置培养约 12h。

1.2.3 重组质粒的筛选与鉴定 用灭菌的牙签挑取白斑, 接种于含氨苄青霉素(终浓度 0.1mg/ml)的 LB 液体培养基中(组分包括 1%蛋白胨、0.5%酵母提取物、1% NaCl, pH 7.0), 37 $^{\circ}$ C 摇床上震荡培养 12h。

采用碧云天质粒小量抽提试剂盒提取质粒, 经 1%琼脂糖凝胶电泳检测确定重组质粒。重组质粒经

PCR 和双酶切验证目标片段, 双酶切采用 20 μ l 体系: 10 \times 缓冲液 2 μ l, 15U/L *Eco*R I 1.5 μ l, 10U/L *Hind* III 1.5 μ l, 重组质粒 237.99ng/L 10 μ l, 无菌 ddH₂O 5 μ l, 37 $^{\circ}$ C 反应 20h, 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 阳性克隆的 DNA 序列分析 将酶切鉴定后的阳性克隆送广州英俊生物技术有限公司测序, 测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 搜索, 应用 Primer-Premier5.0、DNA Star、seqtool、Clustal X、MEGA 4.1 软件进行序列分析。采用在线生物信息学软件对该蛋白质的二、三级结构进行预测。

2 结果与分析

2.1 病毒的增殖、病毒颗粒的浓缩与纯化

在本实验建立的病毒与宿主感染体系中, 病毒感染宿主藻后 60h 左右可以观察到明显的宿主细胞裂解现象, 并释放出大量病毒粒子。当宿主细胞 90% 以上被病毒裂解(即培养液几乎澄清)后, 经超滤、浓缩和 CsCl 密度梯度离心后出现界限明显、清晰的病毒区带, 获得了高纯度病毒颗粒, 为制备病毒基因组提供充足的病毒材料。

2.2 病毒基因组 DNA 的提取与 PCR 扩增

采用 CTAB 法可以有效提取海洋球石藻病毒的基因组 DNA。为了便于随后重组载体的构建, 在引物设计时引入 2 个酶切位点。以病毒基因组 DNA 为模板, 用 EhV 的 Trx 特异引物进行 PCR 扩增。扩增产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测到大小约为 600bp 的特异性片段(图 1, lane1-3)。

2.3 pBS-Trx 重组子的筛选及鉴定

将 PCR 产物与 pBS-T 载体连接, 转化 *E. coli* DH5⁻, 通过蓝白斑筛选, 获得了有插入外源 DNA 的阳性克隆(图 2a), pBS-Trx 重组质粒经 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切及 PCR 鉴定, 大小与其 PCR 产物基本相同(图 1, 图 2b, c)。

2.4 克隆片段的序列分析

2.4.1 EhV99B1-Trx 的系统进化关系分析和同源性比对 以 EhV-99B1 基因组为模板, 根据已报道的海洋球石藻病毒 EhV86-Trx 基因序列设计一对特异

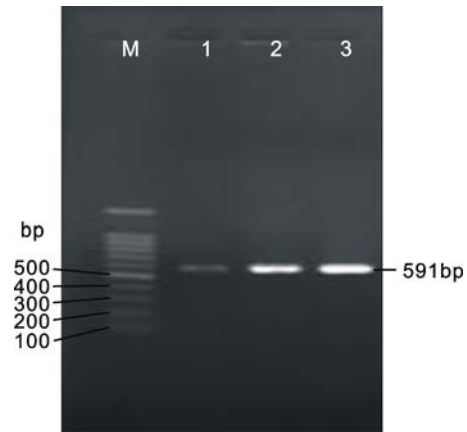


图 1 EhV-99B1 Trx 基因片段 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR product of Trx in EhV-99B1
M. 100bp 的 DNA 分子量标记; 1—3 为 EhV-99B1 的 Trx 基因片段 PCR 产物

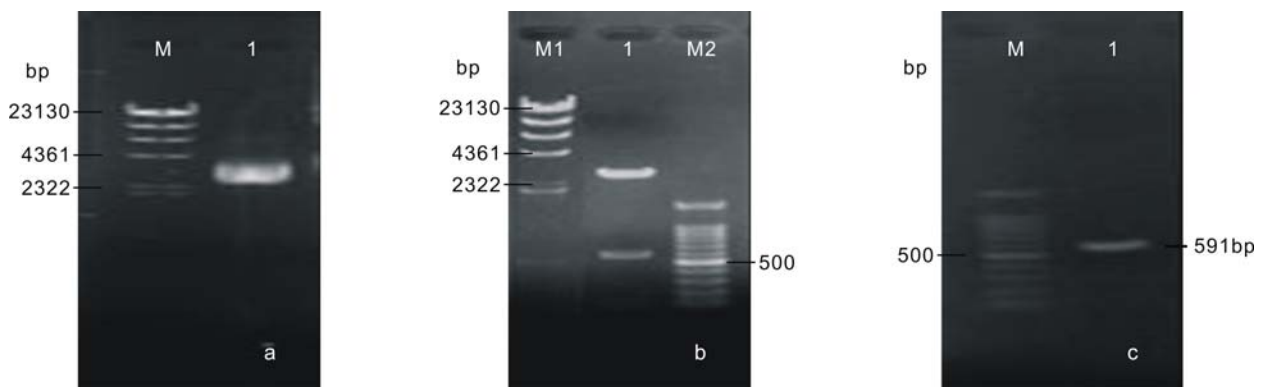


图 2 pBS-Trx 重组质粒双酶切琼脂糖凝胶电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of the digest product of the pBS-Trx recombinant plasmid
a. pBS-Trx 重组质粒; b. 重组质粒的双酶切电泳; c. 重组质粒的 PCR 检测

a: M 为 *Hind* III DNA 标记, 1 为 pBS-Trx 重组质粒; b: M1 为 *Hind* III DNA 标记, M2 为 100bp DNA Marker, 1 为 pBS-Trx/*Eco*R I+*Hind* III; c: M 为 100bpDNA Marker, 1 为 PCR 产物

引物进行 PCR, 扩增获得 EhV-99B1 Trx 基因全长序列, 产物经测序大小为 591bp(该序列已提交 GenBank, 登陆号: GU109280)。采用 GeneDoc、DNASar、ClustalX 等方法, 对来自不同物种的 Trx 序列差异性进行了分析。多重同源性比对发现: 该克隆片段与 GenBank 中 EhV86 分离株(登陆号:NC_007346)的同

源性极高, 核酸和对应推导的氨基酸序列同源性分别达 98%和 100%; 而 EhV99B1-Trx 基因与其它 11 种物种的同源性仅在 9.8%(水稻 *Oryza sativa*)—18.8%(气味杆菌 *Flavobacteria bacterium*)之间。根据 GenBank 中各物种的 Trx 氨基酸序列建立了系统进化树(分析软件: MEGA 4.1)(表 1, 图 3)。

表 1 EhV99B1-Trx 与 GenBank 中其它物种 Trx 氨基酸序列的同源性比对
Tab.1 The amino acid sequence identities between EhV99B1 and other organisms in GenBank

物种	GenBank 登录号	相似度
<i>Emiliana huxleyi</i> Virus 86	CAI65892	100.0%
<i>Flavobacteria bacterium</i> BBFL7	ZP_01201944	18.8%
<i>Nicotiana tabacum</i>	CAA41415	17.3%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2I9H_A	16.3%
<i>Trypanosoma cruzi</i>	AAT79533	15.5%
<i>Escherichia coli</i>	AAA24696	14.1%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAA84613	13.5%
<i>Plasmodium vivax</i> SaI-1	XP_001615815	12.4%
<i>Homo sapiens</i>	AAA74596	11.9%
<i>Mus musculus</i>	BAA04881	11.1%
<i>Cyanidium caldarium</i>	CAA79820	10.7%
<i>Oryza sativa</i> Japonica Group	CAJ01694	9.8%

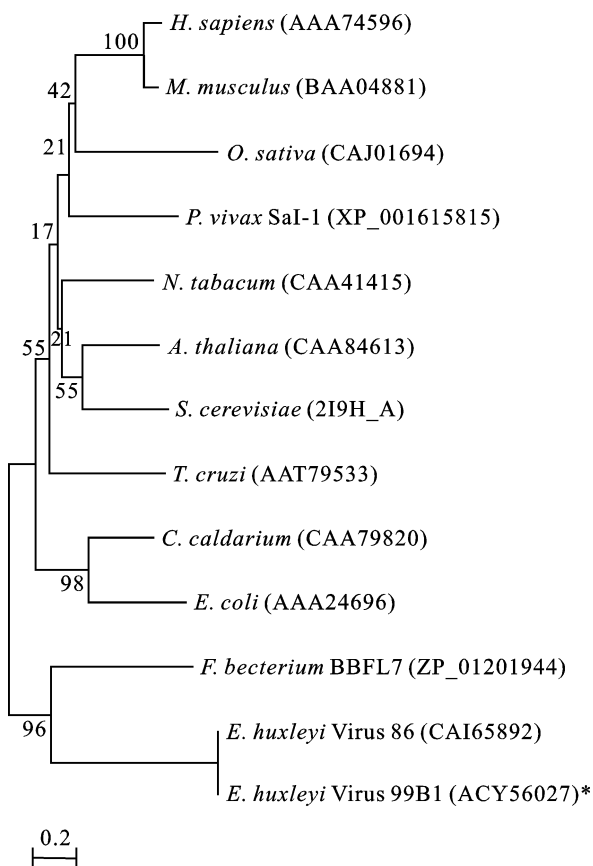


图 3 根据 Trx 氨基酸序列绘制的系统树

Fig.3 The distance tree based on the amino acid sequences of the Trx from different organisms
注: 由 MEGA 4.1 软件绘制邻接树

2.4.2 EhV99B1-Trx 生化特性和结构分析 在线软件[ProtParam: <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>, ESPript: <http://esprict.ibcp.fr/ESPrict/ESPrict/index.php>, SWISS-MODEL: <http://swissmodel.expasy.org/>]分析表明, 该基因编码的蛋白质有 196 个氨基酸残基, 分子量为 22.1kDa, 等电点(pI)为 5.27, 为酸性氨基酸, 其中缬氨酸最多, 有 21 个, 占氨基酸总数的 10.7%。带负电荷的氨基酸(天门冬氨酸+谷氨酸)有 23 个, 带正电荷的氨基酸(精氨酸+赖氨酸)19 个, EhV99B1-Trx N 末端具有高度保守的活性位点基序 CGPC, 而其 C 末端氨基酸序列结构上差异较大, EhV99B1-Trx 的高级构象有 2 个螺旋, 4 个折叠, 二级结构的折叠顺序为 1、1、2、2、3、4 (图 4, 5a), 说明 Trx 基因在不同物种中的保守性。图 5b 为与 EhV99B1-Trx 同源性相对较高的人类(*Homo sapiens*)的 Trx 三级结构模型图, 以该物种 Trx 结构为模板预测出 EhV99B1-Trx 的三级结构, 它们之间的相似性为 24.76%。

3 讨论

本研究首次从海洋球石藻病毒 EhV99B1 基因组中克隆到 Trx 基因完整的 ORF, 用 BLAST 序列分析软件进行序列比对, 与 GenBank 中已报道的 EhV86 类 Trx 基因序列和推导的氨基酸序列的同源性很高, 分别为 98%和 100%, 表明克隆成功。

9.8%—18.8%，其中与原核生物的同源性相对较高些。其 C 端氨基酸序列保守性比较差，但 N 端氨基酸序列高度保守，说明 N 端对维持 Trx 的结构与功能起关键作用。由此可见，球石藻病毒的 Trx 类蛋白在结构和功能上与其它物种之间存在较大差异，可能是 Trx 家族中的一个新成员。Trx 的多重性可以说明其是一个多基因家族。到目前为止，有关 Trx 的种类、数量及表达的研究不断增加，但还没有定论。随着基因组测序和 EST 序列数据库的日益完善，将可能发现更多新的 Trx 成员，同时，鉴定 Trx 的种类、数量也将会成为现实。通过进一步对它的种类、特点、功能等方面的认识，为更好地利用 Trx 奠定基础。

硫氧还蛋白系统通过调节细胞氧化还原反应、核酸代谢、转录因子活性等途径影响细胞的生长、增殖、功能和对环境胁迫的反映(Pigiet *et al*, 1986; Schenk *et al*, 1994; Álamo *et al*, 2000; Jee *et al*, 2005)。在 Trx 系统介导的众多生物学功能中，Trx 与细胞凋亡(程序性细胞死亡 PCD)的关系及其机制受到了越来越多的关注。在哺乳动物中，大量研究表明，Trx 通过各种复杂的信号通路与各种蛋白激酶相互作用调节细胞的凋亡过程。PCD 是一个精确的、内在的细胞内主动死亡过程，是在基因活动指导下进行的生理性步骤，涉及特殊的半胱氨酸蛋白酶(caspase)调节作用。caspase 家族在凋亡通路中发挥着至关重要的作用。每个 caspase 的活性位点都有一个半胱氨酸残基，caspase 的氧化还原状态(主要是依靠 Trx 系统)可以调节其活性。Saitoh 等(1998)发现 Trx 可抑制 caspase 样蛋白酶的活性而抑制细胞凋亡。另有研究显示有活性的 Trx 能激活 caspase8 而促进细胞死亡，并提出了细胞死亡的 Trx 依赖机制(Mitchell *et al*, 2005)。caspase 富含其催化活性所需要的 Cys 模序，氧化能抑制 caspase 的活性，而 Trx 系统能恢复其活性。可见 Trx 对细胞凋亡具有双向调节作用。

近年来，有关 Trx 系统在动植物生长、代谢中调节作用的研究已经取得了很大进展，但 Trx 基因在病毒基因组中的存在却极为罕见，目前尚未在高等动物、植物病毒及噬菌体中发现该基因。Wilson 等(2005)首次在海洋球石藻病毒 EhV86 基因组中发现 Trx 基因的存在，在病毒感染后 33h 采用核酸微阵列检测方法没有检测到该基因的表达。病毒感染、杀死和裂解浮游植物是海洋生态系统中的普遍现象。海洋病毒被确认是导致浮游植物自然死亡率的主要介质，由病毒介导的宿主死亡可能不仅会影响藻类物种的种间演

图 5 EhV99B1-Trx 的三级折叠结构预测图(a)与 NCBI 中模板物种 *H. sapiens* Trx 三级结构图(b)

Fig.5 The 3-dimensional structures of EhV99B1-Trx (a) and the model organism *H. sapiens* Trx (b) domain predicted by the SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>)

注: 三级结构分析, Cys87—Cys90 和 Cys35—Cys38 分别表示 EhV99B1-Trx (ACY56027)和 *H. sapien* Trx (2DIZ_A)N 端高度保守的活性位点基序(CGPC); 该两个物种 Trx 功能域氨基酸序列的相似性为 24.762%; e 值为 $4.90e^{-11}$; 图中蓝色部分代表 α -螺旋; 红色部分代表 β -折叠

利用生物信息学方法对 EhV99B1-Trx 基因进化树、蛋白的理化性质及其二、三级结构等进行了分析预测。虽然 EhV99B1-Trx 与基因库中已报道的 EhV86 分离株的 Trx 基因具有高度的同源性，但与其它原核和真核物种的 Trx 类蛋白的同源性却很低，只有

替, 也可能影响种内演替, 因而在自然海洋环境中, 病毒控制着浮游植物群落的多样性和丰度, 同时病毒与宿主之间的相互作用在赤潮动力学及感染传播中也起着关键作用。因此, 近年来病毒感染诱导的浮游植物主动死亡现象引起了人们极大的兴趣。Lawrence 等(2001)已在病毒感染的赤潮异弯藻中检测到了细胞凋亡的特征, 单链 RNA 病毒感染的赤潮异弯藻细胞中发现在核区外围的异染色质化。最近, Bidle 等(2007)在病毒感染的球石藻 *E. huxleyi* 细胞中检测到凋亡关键蛋白酶 metacaspase 的高表达, 同时伴随着光合作用效率(F_v/F_m)显著降低。对于单细胞的浮游植物种群而言, 在遭到病毒感染时诱导 PCD 过程: 在病毒一方: 可能活化宿主细胞死亡基因; 在细胞一方, 也可能激活本身的自杀机制, 以消除病毒继续繁殖的基础保护整个种群的存活。海洋病毒裂解宿主细胞的机制尚不清楚。藻病毒基因组中 Trx 基因的发现, 提出了一些列新颖而有趣的问题: 病毒的 Trx 与宿主该系统之间有何功能关联? 病毒 Trx 基因的表达在病毒感染、裂解、诱导调节宿主细胞主动死亡等过程中的调控机制如何? EhV-Trx 基因结构和特性的获得有助于对海洋球石藻病毒 Trx 基因的理解, 为今后深入研究微藻类病毒与宿主之间相互作用关系机制及该基因的生物功能奠定了理论基础。

参 考 文 献

- 安乃莉, 张智清, 王 嵩等, 1999. 应用硫氧还蛋白促进外源蛋白在大肠杆菌的可溶性表达. 病毒学报, 15(2): 130—135
- 张稚兰, 刘静雯, 董双林等, 2009. 海洋球石藻 *Emiliania huxleyi* 病毒主要外壳蛋白基因的克隆与序列分析. 海洋与湖沼, 40(2): 152—157
- Sambrook J, Russell D W 著, 2001. 黄培堂译, 2002. 分子克隆实验指南(第三版)(上、下册). 北京: 科学出版社, 1—96
- Álamo M J P, Jurado J, Madueno R G *et al*, 2000. Transcriptional regulation of glutaredoxin and thioredoxin pathways and related enzymes in response to oxidative stress. *J Biol Chem*, 275: 13398—13405
- Arner E S J, Holmgren A, 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem*, 267: 61022—61091
- Bernardez D C E, 1998. Refolding of recombinant proteins. *Curr Opin Biotechnol*, 9(2): 157—163
- Bidle K D, Haramaty L, Ramos J B *et al*, 2007. Viral activation and recruitment of metacaspases in the unicellular coccolithophore, *Emiliania huxleyi*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(14): 6049—6054
- Chen Y, Cai J, Jones D P, 2006. Mitochondrial thioredoxin in regulation of oxidant induced cell death. *FEBS Lett*, 580(28): 6596—6602
- Davis J W, Ronai Z, Tew K D, 2001. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *J Pharm and Exp Ther*, 296: 1—6
- Edward R, La Vallie, Elizabeth A *et al*, 1993. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Nature Biotech*, 11: 187—193
- Franklin D J, Brussaard C P D, Berges J A, 2006. What is the role and nature of programmed cell death in phytoplankton ecology? *Eur J Phycol*, 41: 1—14
- Fuhrman J A, 1999. Marine virus and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, 399: 451—458
- Gelhaye E, Rouhier N, Navrot N *et al*, 2005. The plant thioredoxin system. *Cell Mol Life Sci*, 62: 24—35
- Jee C, Vanoaica L, Lee J *et al*, 2005. Thioredoxin is related to life span regulation and oxidative stress response in *Caenorhabditis elegans*. *Genes to Cells*, 10: 1203—1210
- Kurokawa Y, Yanagi H, Yura T, 2000. Overexpression of protein disulfide isomerase DsbC stabilizes multiple-disulfide-bonded recombinant protein produced and transported to the periplasm in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 66: 3960—3965
- Laurent T C, Moore E C, Reichard P, 1964. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. Isolation and characterization of thioredoxin the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. *J Biol Chem*, 239: 3436—3444
- Lawrence J E, Chan A M, Suttle C A, 2001. A novel virus (HaNIV) causes lysis of the toxic bloom-forming alga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *J Phycol*, 37: 216—222
- Masutani H, Ueda S, Yodoi J, 2005. The thioredoxin system in retroviral infection and apoptosis. *Cell Death Differ*, 12: 991—998
- Mitchell D A, Marletta M A, 2005. Thioredoxin catalyzes the S-nitrosation of the caspase-3 active site cysteine. *Nature Chem Biol*, 1: 54—158
- Pigiet V P, Schuster B J, 1986. Thioredoxin-catalyzed refolding of disulfide-containing proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 7643—7647
- Rudolph R, Lilie H, 1996. *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FASEB J*, 10: 49—56
- Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M *et al*, 1998. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J*, 17(9): 2596—2606
- Schenk H, Klein M, Erdbruggert W *et al*, 1994. Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF- κ B and AP-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 672—676
- Suttle C A, 2005. Viruses in the sea. *Nature*, 437: 356—361
- Tsang M L, Schiff J A, 1978. Assimilatory sulfate reduction in an

Escherichia coli mutant lacking thioredoxin activity. J Bacteriol, 134: 131—138

Wilson W H, Schroeder D C, Allen M J *et al*, 2005. Complete genome sequence and lytic phase transcription profile of a

Coccolithovirus. Science, 309: 1090—1092

Zhou J, Damdimopoulos A E, Spyrou G *et al*, 2007. Thioredoxin1 and thioredoxin 2 have opposed regulatory functions on hypoxia inducible factor 1 alpha. Biol Chem, 282(10): 7482—7490

CLONING AND BIOINFORMATIC ANALYSIS OF THIOREDOXIN-LIKE PROTEIN GENE (Trx) IN MARINE COCCOLITHOPHORID *EMILIANA HUXLEYI* VIRUS

ZHANG Yan-Feng¹, LIU Jing-Wen¹, ZHANG Zhi-Lan¹, DONG Shuang-Lin²

(1. College of Bio-Engineering, Jimei University, Xiamen, 361021; 2. Key Laboratory of Mariculture Research, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

Abstract Thioredoxin (Trx) is a small ubiquitous protein that displays different functions mainly via redox-mediated processes. We here report the cloning and characters of a gene (EhV-Trx) coding for a novel thioredoxin-like protein in marine unicellular *Emiliana huxleyi* virus (EhV-99B1) (GenBank accession No.GU109280). EhV is the first virus-containing Trx gene reported. We also evaluated the phylogenetic relationships between EhV99B1-Trx and homologues from other organisms, showing a high identification with known Coccolithovirus EhV86-Trx gene (NC_007346) in 98% and 100% of nucleotide and deduced amino acid sequences, respectively. However, the EhV99B1-Trx had 9.8%—18.8% identity in amino acid sequence with other organisms. The secondary and the 3D structures of EhV99B1-Trx were predicted in bioinformatics. The results show that: (1) The thioredoxin gene had an open reading frame of 591bp, which contained a deduced amino acid sequence with 196 residues, 22.1kDa in molecular mass and theoretical pI 5.27; (2) A conserved thioredoxin-like domain was detected in the N-terminal region of EhV-99B1 Trx, with a typical conserved Cys-Gly-Pro-Cys (CGPC) residue motif active site; (3) The predicted secondary and 3D structural modeling and folding patterns suggested that EhV99B1-Trx-like is identifiable as a new member of thioredoxin family. Therefore, this study provides novel insights into the relationship between Trx families and environment stress, as well as the interaction between EhVs infection and their hosts.

Key words *Emiliana huxleyi* virus (EhV), Thioredoxin (Trx), Gene clone and bioinformatics