

青蛤(*Cyclina sinensis*)金属硫蛋白及硫氧还蛋白 基因的克隆与表达分析*

吕 达 罗凯娅 潘宝平 高 虹

(天津师范大学生命科学学院 细胞遗传与分子调控天津市重点实验室 天津 300387)

提要 利用构建的 cDNA 文库及高通量测序方法, 获得金属硫蛋白及硫氧还蛋白基因全长。结果表明, 青蛤金属硫蛋白和硫氧还蛋白的 cDNA 全长分别为 776bp 和 804bp, 金属硫蛋白基因编码 74 个氨基酸, 包含 7 个 CXC 特征结构; 硫氧还蛋白基因编码 165 氨基酸, 包含 5 个氨基酸构成的活性中心。采用实时定量 PCR 方法分析了两种基因在 Cd^{2+} 胁迫下的表达变化, 结果显示, 金属硫蛋白基因在 Cd^{2+} 胁迫下 6—12h mRNA 表达量急剧上升, 与对照组有显著性差异($P < 0.01$)。硫氧还蛋白基因在 Cd^{2+} 胁迫下 mRNA 在 6h 明显升高, 在 6—24h 与对照组出现显著性差异($P < 0.05$)。说明 Cd^{2+} 能够诱导青蛤金属硫蛋白和硫氧还蛋白基因表达的时序性升高, 二者的转录过程反映了贝类抵御重金属胁迫的分子调控过程。

关键词 青蛤, 金属硫蛋白(MTs), 硫氧还蛋白(Trx), 基因表达

中图分类号 Q789

青蛤(*Cyclina sinensis*)是我国重要的海产经济贝类, 鉴于其生活在海河口区域并靠滤水进行呼吸及取食(王兴强等, 2006; 潘宝平等, 2010), 极易受到环境重金属的污染。金属硫蛋白(Metallothioneins, MTs)是一类广泛存在于生物体内, 能够被金属离子及氧化损伤等因素诱导而产生的金属结合蛋白, 参与生物体的重金属解毒和自由基清除等修复作用(刘维青等, 2006)。MTs 的表达水平反映了生物体对环境的应激反应情况及对重金属的解毒能力, 通常用于评价重金属的污染状况和生物体的适应能力(张桂春, 2005)。近年来, 国内外有关 MTs 在无脊椎动物中已有许多研究报道(Lemoine *et al*, 2003; Rebelo *et al*, 2003)。硫氧还蛋白(Thioredoxin, Trx)亦存在于众多原核及真核生物中, 是参与细胞内多种代谢过程的一类蛋白质(董文甫等, 2006), 它具有抗氧化和抑制调节作用(Spector *et al*, 1988)。一般认为, 在重金属胁迫条件下, Trx 通过与细胞信号调节激酶的作用, 来抵

抗重金属对细胞的损伤并延缓细胞的凋亡。目前, 国内外有关硫氧还蛋白的研究报道主要集中在植物及人类肿瘤研究方面, 有关贝类硫氧还蛋白研究文献相对较少(Wang *et al*, 2011), 青蛤的 Trx 与 MTs 基因及表达未见正式报道。

1 材料与方法

1.1 实验材料

青蛤样品采自天津大港海滨滩涂, 选择贝壳指标没有显著差异的成体, 在人工海水中暂养 7d, 持续曝气, 每天投喂 5‰的小球藻(*Chlorella sp.*), 选择闭壳反应灵敏个体进行实验。

1.2 实验方法

1.2.1 青蛤 cDNA 文库的构建 解剖青蛤取不同组织置于 1ml TRIZOL 中提取组织总 RNA, 采用 QIAGEN 公司的 Oligotex mRNA Kits 方法进行分离纯化。cDNA 文库的构建根据 Clontech 公司的 SMART

* 天津市科委应用基础与前沿技术重点项目资助, 09JCZDJC19300 号; 天津市科委应用基础研究面上项目资助, 10JCYBJC09100 号。吕 达, E-mail: zeustorm@163.com

通讯作者: 潘宝平, 博士, 教授, E-mail: panbaoping@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-05-23, 收修改稿日期: 2011-10-10

cDNA Library Construction Kit 试剂盒说明书, 连接载体采用 pBluescript II SK* 改造体, 感受态细胞为 *E. coli* (DH5a)。文库随机测序引物 T7-F: 5'TAATACGACTCACTATAGG3', T3-R: 5'AATTAACCCTCACTAAAGG3', 将所得序列去除载体序列后拼接得到 contig 及无法与其它序列拼接的 singlest 数据。

1.2.2 生物信息学分析 将获得的青蛤 MTs 基因及 Trx 基因类似序列在线进行 BLASTX 分析, 使用 ORF Finder 查找开放阅读框, SignalP 3.0 查找信号肽, 利用 ProtParam 预测序列的分子式及结构域, Swiss-model 分析蛋白质空间结构行进预测。

1.2.3 重金属镉胁迫实验 试验组动物暂养于 Cd²⁺ 胁迫的海水中, 胁迫条件为前期急性毒性试验中不致死的 Cd²⁺ 浓度 0.201mg/L(张丽岩等, 2010), 对照组置于不含镉离子的海水中。两组样品分别置于不同养殖箱, 24h 换水一次, 换水率 50%, 其间不进行投喂。

1.2.4 基因表达的荧光定量分析 使用 Trizol 按时间顺序 0h、6h、12h、24h、48h 和 96h 分别提取的青蛤肝脏总 RNA, 两组样品每个时间段分别取 8 个个体; 使用 MMLV 反转录酶将其反转录为 cDNA, 以青蛤 β-actin 基因为内参, 该基因 RT-PCR 引物: actin-F: 5'CACCACAAGTCCGAGAG3', actin-R: 5'CCGATAGTGATGACCTGACC3', 扩增片段长度 153b; 金属硫蛋白基因 RT-PCR 引物: CS-MT-F: 5'AGAGGTG-AAGCCAGACGC3', CS-MT-R: 5'CTCGAAGGTCCAGGTGT3', 扩增片段长度 149bp; 硫氧还蛋白基因 RT-PCR 引物: CS-TRX-F: 5'CACACAGCAAGGAGA-AAGAATG3', CS-TRX-R: 5'TAGGTCCCAACAGTCT-ACAAGGT3', 扩增片段长度 130bp。反应在 Rotor-Gene 6000 实时定量 PCR 仪上进行, 反应程序为: 95℃ 预变性 2min, 94℃ 变性 15s, 58℃ 退火 15s, 72℃ 延伸 20s, 40 个循环。数据分析采用 2^{-ΔΔCT} 法(Livak *et al.*, 2001)。使用 SPSS 12.0 软件对同一时间点两个浓度组的表达水平进行单因素方差分析, 确定青蛤肝脏细胞 MTs 基因及 Trx 基因在不同时间段的转录水平。

2 结果与分析

2.1 青蛤金属硫蛋白及硫氧还蛋白基因序列及编码分析

构建的 SMART-cDNA 文库容量为 1.12 × 10⁶ cfu/ml, 重组率约为 96.4%。经随机挑取克隆大规模测序后, 经 BLASTX 比对分析发现金属硫蛋白及硫氧还蛋白类似序列, 分别与其它物种的金属硫蛋白

及硫氧还蛋白有很高的相似性。金属硫蛋白类似序列与三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)相似性最高(相似性为 44%, E 值为 2E-13), 硫氧还蛋白类似序列与胸斑草雀(*Taeniopygia guttata*)相似性最高(相似性为 52%, E 值为 1e-41)。青蛤金属硫蛋白基因及硫氧还蛋白基因在 GenBank 的注册号分别为 HM246244 和 JN969050。

青蛤金属硫蛋白基因的 cDNA 序列全长 776bp, 5'UTR 为 113bp, 3'UTR 为 438bp。开放阅读框长度为 225bp, 可以编码 74 个氨基酸。在推导的氨基酸序列中共有 16 个 Cys 残基, 它们与邻近的氨基酸组成了 7 个金属硫蛋白的保守性结构 CXC。见图 1。

```

114 atgagtgaacttgcggtgtacaacagaggtgaagccagacgcc
    M S E T C G C T T E V K P D A
159 gaagctaagaatgttcgctgcacaatcaaaaggttcgtgcaaa
    E A K K C S A A Q S K G S C K
204 tgcggaccagactgtaagtgcggggacgcttgtaaagtgtccgga
    C G P D C K C G D A C K C S G
249 tgtgccactgcatgtagctgtacacctggaccttgcgagtggtca
    C A T A C S C T P G P C E C A
294 aaagcggcaaggattgtggttcagcggaaagccatctgcatag
    K G G K D C G C S G K P S A *
  
```

图 1 青蛤金属硫蛋白全长 cDNA 序列的开放阅读框及结构域分析

Fig.1 The open reading frame of the full length cDNA of *C. sinensis* MTs and analysis on the structural domain
注: 加框部分代表起始密码子, *代表终止密码子, CXC 模式用下划线表示

青蛤硫氧还蛋白基因的 cDNA 序列全长 804bp (图 2), 5'UTR 为 52bp, 3'UTR 为 202bp。开放阅读框长度为 498bp, 可以编码 165 个氨基酸。本基因含有典型的硫氧还蛋白结构域, 具有由 5 个氨基酸残基 (-Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-) 构成的活性部位。

2.2 青蛤金属硫蛋白基因在镉离子胁迫下不同时间段的表达分析

试验组在镉离子胁迫下, 青蛤肝脏 MTs 基因的表达量在 6h 急剧上升, 12h 表达量最高, 与对照组出现差异极显著 ($P < 0.01$), 随后到 24h 下降趋势明显, 但仍显著高于对照组及胁迫前水平 ($P < 0.05$)。48h 后相对表达基本恢复到正常水平(图 3A)。以上研究结果表明, Cd²⁺ 胁迫可导致细胞内 MTs 基因表达量出现明显上调趋势, 但持续时间相对较短。

52 atggccttctagaacattgctgcgagattttgcaaatgaatagg
 M A S R T L L R R I L Q M N R
 97 cgatgcagctacagagaactgtcatccaagatctgtagtgcca
 R C Q L Q R T V I P R S V V P
 142 gtaactcagatattacagcagaatccataccatgccagcatcac
 V T Q I L Q Q K S I P C Q H H
 187 agtcagtccagagagctttgcacacagcaaggagaaagaatggtt
 S Q S R E L C T Q Q G E R M V
 232 ataaatatacaggatgtaaggacttcgaggaaagtgtcctaata
 I N I Q D V K D F E E S V L N
 277 aatcctttacctgtgtgtggatctcatgcaacatggtgtgga
 N P L P V V V D F H A T W C G
 322 ccttgtagactgttgggacctagattggaatctctagtgtggcagt
P C R L L G P R L E S L V G S
 367 aaaagtggtaaagtgttttggccaagcttgatgtgatgaagtt
 K S G K V V L A K L D V D E V
 412 gaggaattgcaatgaaatacaggataagctctgtaccaactgtg
 E E I A M K Y R I S S V P T V
 457 atagggttcaaaaataaagaagcaagacaagtttattggactt
 I G F K N K E A K D K F I G L
 502 caagatgacgataataattgaaacttttctagatagattgatagga
 Q D D D I I E T F L D R L I G
 547 taa
 *

图 2 青蛤硫氧还蛋白全长 cDNA 序列的开放阅读框及结构域分析

Fig.2 The open reading frame of the full length cDNA of *C. sinensis* Trx and analysis on the structural domain
注: 加框部分代表起始密码子, *代表终止密码子, WCGPC 活性部位用下划线表示

2.3 青蛤硫氧还蛋白基因在镉离子胁迫下不同时间段的表达分析

试验组在镉离子胁迫下, 青蛤肝脏 Trx 基因的表达量在 6h 呈明显上升趋势, 并且表达量最高, 随后呈现下降趋势。在 6h、12h、24h 表达量均与同时间点对照组及胁迫前水平有显著性差异($P<0.05$), 随后的 48h、96h 表达量基本趋于正常(图 3B)。由以上实验结果分析可知, Cd^{2+} 胁迫可导致细胞内 Trx 基因表达量在一定时期出现明显上调趋势, 并且有一定的持续时间。

3 讨论

金属硫蛋白 MTs 是一类广泛存在于生物中的低分子量、富含半胱氨酸、并能被诸如重金属离子、甾

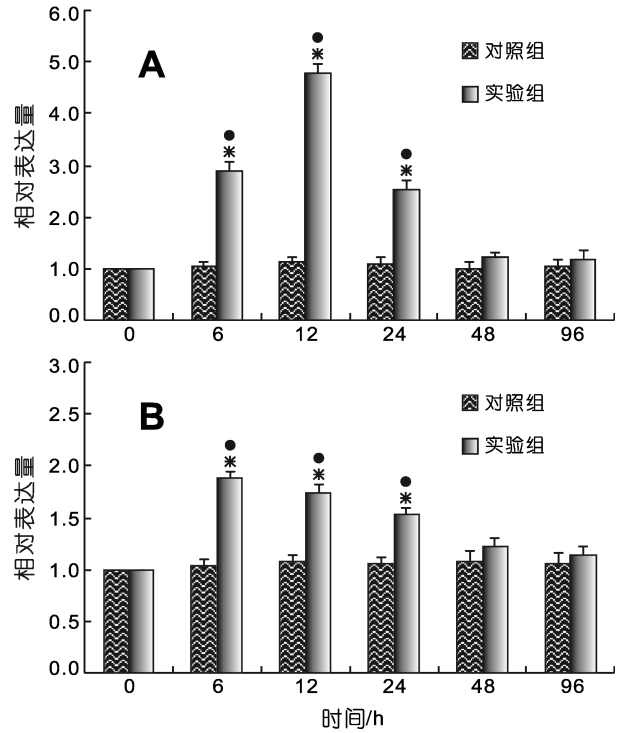


图 3 青蛤肝脏细胞 MTs 基因和 Trx 基因在重金属镉胁迫下不同时间相对表达量的变化

Fig.3 The relative expression of MTs and Trx gene in liver of *C. sinensis* under Cd^{2+} stress at different time

注: A. MTs 基因, B. Trx 基因。*表示相同时间点胁迫浓度下基因表达水平与对照组差异显著($P<0.05$), ·表示该时间点基因的转录表达水平与同组胁迫前(0h)相比差异显著($P<0.05$)

体激素、细胞因子、氧化应激等条件诱导的金属结合蛋白。Coyle 等(2002)认为, 金属硫蛋白主要功能是稳态调节细胞内金属水平, 参与生物体内必需金属元素的调节和非必需金属元素的解毒过程。本研究中得到青蛤金属硫蛋白基因表达的氨基酸序列中富含半胱氨酸(Cys)达 21.62%, Cys 是金属结合位点, 其巯基能共价结合金属离子, Cys 富集也是软体动物 MTs 的重要特征之一(Engelken *et al*, 1999)。另外, 在青蛤 MTs 中有 7 个 CXC 的结构, 属于无脊椎动物金属硫蛋白共有的一段保守性序列标签(Imagawa *et al*, 1990)。Binz 等(1999)认为, 在软体动物金属硫蛋白的 C-末端还会有一个保守的特征序列 CxCx(3)CTGx(3)CxCx(3)CxCxCK, 但在本研究中的金属硫蛋白氨基酸序列中未发现完全符合此特征的序列。另外, 在美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)的 CvMT D (AAQ2391211) 以及长牡蛎(*Crassostrea gigas*)的 CgMT(CAB8558811) 等 C-末端序列都与这一特征不相符。由此可见, 软体动物的金属硫蛋白多样化程度较高。

一些学者认为,在生物体内的重金属水平与金属硫蛋白基因表达水平之间存在典型的倒“U”型关系(Hermesz *et al*, 2001; Chan *et al*, 2004; Wu *et al*, 2006),即当重金属达到某一浓度阈值时,金属硫蛋白会随重金属剂量增加而上升,一旦超出该浓度阈值,重金属就会对生物体产生不可逆的毒性,金属硫蛋白水平就会随重金属水平增加而降低。鉴于前期试验结果,本研究中试验组的镉离子胁迫浓度采用了不产生致死的 Cd^{2+} 安全浓度(0.201mg/L)水平,基本维持在青蛤能够承受 Cd^{2+} 胁迫浓度的阈值范围之内。其 mRNA 表达量在 6—12h 时明显上调,与对照组出现显著性差异($P<0.01$),24h 后开始下降,48h 趋于正常水平。说明青蛤 MTs 基因直接参与了抗重金属应激反应,同时说明了 MTs 在青蛤重金属危害防御系统中的作用。

硫氧还蛋白 Trx 在生物体内具有抗氧化保护和氧化还原酶的作用,其活性位点-Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-能够完成二巯基/二硫键转化反应,对生物体内的多种蛋白质进行氧化还原调节(段莹亮,2009)。Wang 等(2011)的研究发现,菲律宾蛤仔肝脏中 Trxs 家族中的 VpTrx1 和 VpTrp14 基因,在 Cu^{2+} 及 Cd^{2+} 离子胁迫下其 mRNA 有明显表达,认为这两种基因的表达产物可能是菲律宾蛤仔抵抗重金属胁迫过程中的重要抗氧化作用物质。本试验结果显示,青蛤硫氧还蛋白 Trx 相关基因在 Cd^{2+} 胁迫下在 6h、12h、24h 表达量均与同时间点对照组及胁迫前水平有显著性差异($P<0.05$)。研究者初步认为,在青蛤抵抗重金属污染中金属硫蛋白和硫氧还蛋白均起着相当重要的作用,它们不但可以承担调节细胞内金属水平和抗氧化保护作用,并且能够相对延长贝类对重金属胁迫的耐受性。本研究中采取的重金属胁迫下相关抗逆性基因表达时序的同步解析,有利于揭示贝类体内必需金属元素和非必需金属元素的调节机制,并且能够为建立抗重金属污染贝类品系提供有价值的实验数据。

参 考 文 献

- 王兴强,曹梅,阎斌伦等,2006.青蛤的生物学及其繁殖.水产科学,25(6):312—316
- 刘维青,倪多娇,宋林生等,2006.海湾扇贝(*Argopecten irradians*)金属硫蛋白基因的克隆与分析.海洋与湖沼,37(5):444—449
- 张丽岩,宋欣,高玮玮等,2010. Cd^{2+} 对青蛤(*Cyclina sinensis*)的毒性及蓄积过程研究.海洋与湖沼,41(3):418—421
- 张桂春,2005.金属硫蛋白的功能及应用前景.烟台师范学院学报:自然科学版,21(1):142—145
- 段莹亮,2009.硫氧还蛋白(Trx)及 Trx80 在免疫系统中的作用.气候与环境研究,25(4):483—486
- 董文甫,李艳红,岳文斌,2006.硫氧还蛋白研究进展.草食家畜,4:4—6
- 潘宝平,宋欣,罗凯娅等,2010.青蛤(*Cyclina sinensis*)溶菌酶基因在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)刺激下的表达.海洋与湖沼,41(6):901—906
- Binz P A, Kägi J H R, 1999. Metallothionein: Molecular Evolution and Classification. In: Klaassen C ed. Metallothionein Vol. , Birkhäuser Verlag Basel, 7—13
- Chan P, Shiu C, Wong F *et al*, 2004. Common carp metallothionein gene: cDNA cloning, gene structure and expression studies. Biochim Biophys Acta, 1676: 162—171
- Coyle P, Philcox J C, 2002. Metallothionein: The multipurpose protein. Cellular and Molecular Life Sciences, 59: 627—647
- Engelken J, Hildebrandt A, 1999. cDNA cloning and cadmium-induced expression of metallothionein mRNA in the zebra mussel *Dreissena polymorphan*. Biochemistry and Cell Biology, 77: 237—241
- Hermesz E, Ábrahám M, Nemcsók J, 2001. Tissue-specific expression of two metallothionein genes in common carp during cadmium exposure and temperature shock. Biochem Physiol Part C, 128: 457—465
- Imagawa M, Onozawa T, Okumura K *et al*, 1990. Characterization of metallothionein cDNAs induced by cadmium in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Biochemical Journal, 268: 237—240
- Lemoine S, Laulier M, 2003. Potential use of the levels of the mRNA of a specific metallothionein isoform (MT220) in mussel (*Mytilus edulis*) as a biomarker of cadmium contamination. Marine Pollution Bulletin, 46(11): 1450—1455
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the 2^{-CT} methods. Methods, 25: 402—408
- Rebelo M, Pfeiffe W, Silva H *et al*, 2003. Cloning and detection of metallothionein mRNA by RT-PCR in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*). Aquatic Toxicology, 64(3): 359—362
- Spector A, Yan G Z, Huang R R *et al*, 1988. The effect of H2O2 upon thioredoxin-enriched lens epithelial cells. Journal of Biological Chemistry, 263(10): 4984—4990
- Wang Q, Ning X, Chen L *et al*, 2011. Responses of thioredoxin1 and thioredoxin-related protein 14 mRNAs to cadmium and copper stresses in *Venerupis philippinarum*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 154(3): 154—160
- Wu S M, Jong K J, Lee Y J, 2006. Relationships among metallothionein, cadmium accumulation, and cadmium tolerance in three species of fish. Bull Environ Contam Toxicol, 76: 595—600

EXPRESSION OF METALLOTHIONEIN AND THIOREDOXIN GENE IN *CYCLINA SINENSIS* EXPOSED TO CADMIUM

LÜ Da, LUO Kai-Ya, PAN Bao-Ping, GAO Hong

(College of Life Sciences, Tianjin Key Laboratory of Cyto-Genetical and Molecular Regulation,
Tianjin Normal University, Tianjin, 300387)

Abstract The sequences of metallothionein and thioredoxin of *Cyclina sinensis* were cloned with the large scale EST sequencing method to built the clams *C. sinensis* SMART-cDNA library. Real-Time PCR (RT-PCR) technique was used to detect the expression of metallothionein and thioredoxin gene under Cadmium (Cd). The results showed that the full length cDNA of metallothionein and thioredoxin was 776bp and 804bp respectively. The open reading frame (ORF) of metallothionein encoded 74 amino acids (aa) with 7 typical sequence: CXC. The ORF of thioredoxin encoded 165 amino acids with a typical active position (Trp-Cys-Gly-Pro-Cys.) Real-Time PCR showed that the expression of metallothionein gene significant increased under Cd²⁺ stress from 6h to 12h, which was significant different from the control group ($P<0.01$), then it tend to normal level after 24h. The expression level of thioredoxin gene increased under Cd²⁺ intimidated at 6h. And the expression of 12h, 24h was significant different from the control group ($P<0.05$). Our investigation showed that Cd²⁺ could induce the expression of metallothionein and thioredoxin gene, and the transcription reveals the molecular regulation mechanism in the immune defense of Cd²⁺ stress in clam of *Cyclina sinensis*.

Key words *Cyclina sinensis*, Metallothionein (MTs), Thioredoxin (Trx), Gene expression

2011 年度《海洋与湖沼》动态

(1) 《海洋与湖沼》2011 年最新公布的总被引频次在海洋科学期刊中名列第一位; 影响因子为 1.404, 学科影响指标和综合评价总分均列海洋科学期刊首位; 综合评价总分在全国科技期刊中排第 18 位。

(2) 荣获 2011 年度百种中国杰出学术期刊奖。

(3) 荣获 2011 年度中国精品科技期刊奖。