

鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染对青蛤(*Cyclina sinensis*)谷胱甘肽硫转移酶及其基因表达的影响*

罗凯娅 刘欣欣 葛端阳 潘宝平

(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)

摘要 在鳃弧菌胁迫下测定了青蛤血清及肝脏谷胱甘肽硫转移酶(GSTs)活力,利用 SMART cDNA 文库和高通量测序方法,筛选到青蛤 σ 型谷胱甘肽硫转移酶基因(CsGSTS)的全长。采用荧光定量 PCR 法分析 CsGSTS 基因的表达过程。结果表明,青蛤的 CsGSTS 基因 cDNA 全长 793bp,编码 206 个氨基酸,具典型的 GST-N 和 GST-C 结构域。血清中的 GSTs 活力在感染后 6—24h 显著升高($P<0.01$),肝脏 GSTs 活力在 6—12h 显著下降($P<0.05$),48—96h 又明显上调($P<0.01$);肝脏 CsGSTS 基因表达水平在胁迫后 3—6h 降低,24h 显著升高,48h 达到最大值,约为对照组的 3 倍。说明谷胱甘肽硫转移酶及其基因表达参与了青蛤的免疫应答反应。该研究为探索贝类的抗病害免疫机制提供了重要的实验数据。

关键词 青蛤,谷胱甘肽硫转移酶(GSTs),酶活力,CsGSTS 基因,基因表达

中图分类号 Q789

青蛤(*Cyclina sinensis*)是我国沿海重要的经济软体动物,其具有生长快、肉质鲜美和适应性广等诸多优点,目前已成为重要的海水养殖对象之一(宋欣等,2010)。鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)是引起水产养殖动物病害的重要病原微生物,常给水产养殖造成巨大的损失,目前在江苏等省区已经引起青蛤的大面积病害和死亡现象(王兰萍等,2007)。鳃弧菌的致病性与许多毒力因子有关,如脂多糖的类脂 A 可引起宿主产生内毒素反应,胞外蛋白酶能造成感染部位的组织损伤等(陈吉祥等,2003)。

谷胱甘肽硫转移酶(Glutathione S-transferases, GSTs)是由多基因编码的一组同工酶(雷安平,2009),主要存在于细胞液中。GSTs 对异源物质的生物转化和解毒具有重要作用(伍忠奎等,2004; Masella *et al*, 2005),可催化谷胱甘肽(GSH)与有毒物质的亲电基团结合,使之转化成亲水物质并排出体外, GSTs 还具有抗氧化酶和异构酶活性(Armstrong, 1997; Ivarsson *et al*, 2003; Shimada, 2006),其酶活力的大小对生物机体肝脏的早期损伤诊断具有一定的价值(瞿

建宏等,2006)。根据氨基酸/核苷酸序列、免疫、动力学等不同标准,目前已发现的 GSTs 超过 10 种类型,如 α 、 μ 、 π 、 σ 、 θ 、 ω 、 β 、 κ 、 ζ 等型(Sheehan *et al*, 2001; Allocati *et al*, 2009; Wan *et al*, 2009)。

本研究采用鳃弧菌感染方法,分析了青蛤不同组织 GSTs 的活性变化。同时利用构建的青蛤 cDNA 文库筛选出青蛤的 CsGSTS 基因,并分析其在病原体感染下组织器官的表达趋势,为探索青蛤抗病害机理和免疫反应机制提供重要的实验数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

活体青蛤(*Cyclina sinensis*)采自天津大港滩涂,将其暂养于人工海水中,持续曝气,每天投喂 5‰的小球藻(*Chlorella sp.*),两天换水一次,一周后进行感染实验。

1.2 实验方法

1.2.1 感染实验 将鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)于 2216E 培养基上 37℃培养 24h 后,用无菌生理盐水重

* 天津市科委应用基础与前沿技术重点项目资助,12JCZDJC22800 号。罗凯娅, E-mail: kaiyaluo@126.com

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

收稿日期: 2012-04-20, 收修改稿日期: 2012-06-10

悬菌液, 将其浓度调至 1×10^8 cell/ml。随即选取 78 只青蛤, 向其中 36 只青蛤于闭壳肌处注射 $50 \mu\text{l}$ /只的鳃弧菌菌液, 另 36 只注射等量灭菌生理盐水作对照, 剩余 6 只青蛤不作处理(0h)。分别按 0h 和注射后 3h、6h、12h、24h、48h、96h 时随即选取 6 只青蛤, 提取血淋巴并称取肝脏、鳃、闭壳肌、腹足、外套膜和生殖腺各 50mg, 迅速放入液氮冷冻, 分别用于谷胱甘肽硫转移酶活力测定及总 RNA 提取。

1.2.2 酶液制备及活性测定 抽提青蛤血淋巴细胞并于 4°C 、3000r/min 离心 10min, 取上清用于血清 GSTs 活性的测定。取出冷冻肝脏在预冷匀浆器中按质量体积比 1 : 9 加入预冷生理盐水进行匀浆, 4°C 、4500 r/min 离心 15min, 取上清液即为粗酶提取液, 将该组织匀浆液稀释为 1% 和 5% 浓度, 分别用于蛋白浓度和酶活性的测定。实验所用谷胱甘肽硫转移酶测定试剂盒以及可溶性蛋白(考马斯亮蓝法)试剂盒均购自南京建成生物研究所。酶活力单位定义: 每毫升血清或每毫克组织蛋白, 在 37°C 反应 1min 扣除非酶促反应, 使反应体系中 GSH 浓度降低 $1 \mu\text{mol/L}$ 为一个酶活力单位。

1.2.3 cDNA 文库的构建与测序 将青蛤各组织放于液氮中研磨后, 置于 1ml TRIZOL (Catalog number: 15596-0260) 中提取组织总 RNA, mRNA 的分离按 QIAGEN 公司的 Oligotex mRNA Kits 试剂盒操作手册进行, cDNA 文库的构建采用 Clontech 公司的 SMART cDNA Library Construction Kit 试剂盒说明书进行, 连接载体使用 pBluescript II SK+改造体, 转化菌株为 *E. coli* (DH5 α)。文库随机测序引物 T7-F: 5'-TAATACGACTCACTATAGG-3', T3-R: 5'-AATTAA CCCTCACTAAAGG-3'。将所得序列去除载体序列后进行拼接得到 contig 和无法与其它序列拼接的 singlest 数据, 对测得的 ESTs 序列用 BLAST 程序进行同源性分析。

1.2.4 CsGSTS 基因序列分析 将获得的青蛤 sigma 型谷胱甘肽硫转移酶基因类似序列的全长 cDNA 序列与 GenBank 中的核酸数据库作 BLASTX 分析, 使用开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)在线分析, SMART 查找信号肽及结构域, Clustal W 对氨基酸序列进行多重比对和同源性分析, 利用 MEGA4.1 以邻接法(NJ)构建分子系统树。

1.2.5 CsGSTS 基因表达分析 取各时间点肝脏样品, 参照 1.2.3 方法提取总 RNA 并反转成 cDNA。以青蛤肝脏 cDNA 为模板, β -actin 基因为内参基因, RT-PCT 引物为: actin-F: 5'-CACCACAACCTGCCGAGAG-3',

actin-R: 5'-CCGATAGTGATGACCTGACC-3'; CsGSTS-F: 5'-TATCGGACCAAAGATGACGC-3'; CsGSTS-R: 5'-AGTTCTGGGTAGGAGG AGAGTAG-3'。反应程序为: 95°C 预变性 30s, 95°C 变性 5s, 58°C 退火 30s, 72°C 延伸 30s, 40 个循环。数据处理采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法(Livak *et al.*, 2001), 使用 SPSS 软件对同一时间点实验与对照组的表达水平进行单因素方差分析, 确定青蛤肝脏 CsGSTS 基因在不同时间段的转录水平。

2 结果

2.1 鳃弧菌侵染对青蛤 GSTs 活力的影响

鳃弧菌侵染后, 青蛤血清 GSTs 活力表现出先升高后下降的趋势(图 1A)。侵染前(0h)青蛤血清 GSTs 活力约为 18.3U/ml , 侵染后 6h 血清 GST 活力显著升高($P < 0.01$), 12h 达到最大值 68.5U/ml , 约为对照组的 3.4 倍, 24h 开始下降, 但仍显著高于对照组($P < 0.01$), 48—96h 趋于正常水平。

鳃弧菌侵染 96h 内, 肝脏中 GSTs 活力则表现为先降低后升高的趋势(图 1B)。侵染前青蛤肝脏 GSTs

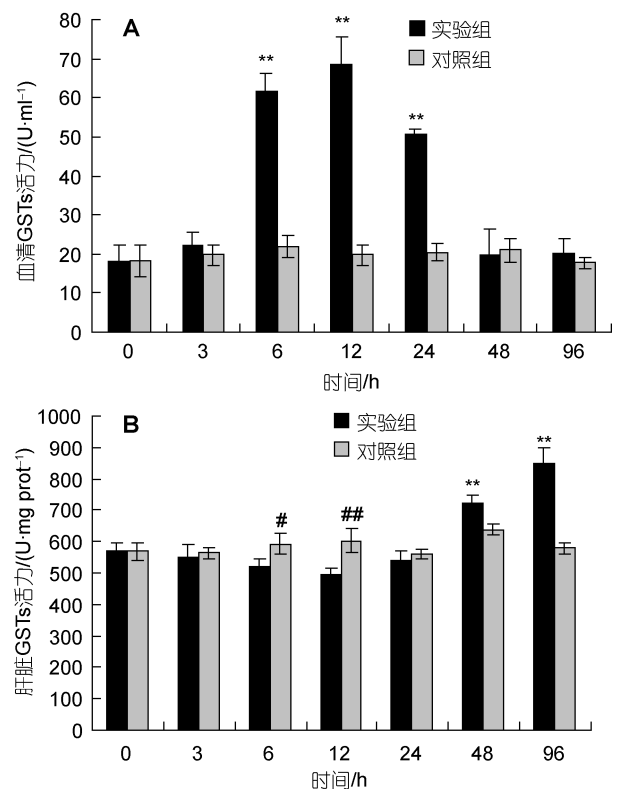


图 1 鳃弧菌注射后血清和肝脏 GSTs 活力变化

Fig.1 Changes in GSTs activity in serum and liver after injection of *V. anguillarum*

注: #表示对照组酶活力大于实验组, 具有显著性差异($P < 0.05$), ##表示差异极显著($P < 0.01$); **表示实验组酶活力大于对照组, 差异极显著($P < 0.01$)

活力 569.8U/mg prot, 弧菌侵染 6h 后酶活力下降为 521.8U/mg prot, 与对照组具有显著性差异($P<0.05$), 12h 酶活力降低到最小值 495.7U/mg prot。24h 后开始逐渐升高, 48h 显著高于对照组($P<0.01$), 并在 96h 达到最大值 850.1U/mg prot, 约为对照组的 1.5 倍。

2.2 青蛤 CsGSTS 基因的结构分析

构建的 SMART-cDNA 文库容量为 1.12×10^6 cfu/ml, 重组率约为 96.4%。随机挑取克隆大规模测序后, 经 BLASTX 比对和 ORF 在线分析发现青蛤 σ 型谷胱甘肽转移酶基因全长序列。青蛤 CsGSTS 基因 cDNA 全长 739bp, ORF 为 621bp, 编码 206 个氨基酸 (图 2), 分子量为 23.47kDa, 理论等电点 $pI=7.66$, 具有完整的 GST-N 和 GST-C 结构域, N 端结构为 β - α - β - α - β - α , C 端为 5 个 α 螺旋。青蛤 CsGSTS 基因在 GenBank 中的注册号为 JN806099。

2.3 CsGSTS 基因同源性分析及分子系统树构建

同源性分析表明, 青蛤 CsGSTS 基因与菲律宾蛤仔 *Ruditapes philippinarum* σ 型谷胱甘肽转移酶基因 (GenBank 登录号: ADI44317.1) 同源性最高, 一致性达到 58%。青蛤等 5 个物种的 σ 型 GST 氨基酸序列进行多重比对分析 (图 3), 结果显示 σ 型 GST 都具有 N 端谷胱甘肽结合位点 (G 位点) 和 C 端特异性底物结合位点 (H 位点), 其中 G 位点具有高度保守的酪氨酸 (Y) 和丝氨酸 (S), 是与谷胱甘肽结合并催化反应的重要氨基酸。而 H 位点氨基酸可变性较大, 决定了 σ 型 GST 底物的特异性。

利用青蛤与其它 15 个物种的 σ 型 GST 氨基酸序列以邻接法构建了分子系统树 (图 4), 采用 bootstrap 1000 个循环检验拓扑结构的置信度。结果表明, 青蛤 σ 型 GST 与菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*)、大竹蛏 (*Solen grandis*) 的进化距离最近, 而后与太平洋巨型章鱼 (*Enteroctopus dofleini*)、新西兰鱿鱼 (*Nototodarussloanii*) 聚成一支, 与昆虫、脊椎动物等进化距离较远。

2.4 CsGSTS 基因表达分析

鳗弧菌侵染 96h 内, 青蛤肝脏中 CsGSTS 基因相对表达量表现为先降低后升高的趋势 (图 5)。鳗弧菌侵染 3h 后, 实验组 CsGSTS 基因表达量开始下降, 与对照组差异显著 ($P<0.05$); 6h 后降低至最小值, 与对照组差异极显著 ($P<0.01$), 随后 CsGSTS 基因表达量开始回升, 24h 与对照组具有显著性差异 ($P<0.05$), 48h 表达量达到最大值, 约为对照组的 3 倍, 96h 开始下降, 但仍高于对照组 ($P<0.05$)。对照组 CsGSTS 相

对表达量各时间点与 0h 相比差异不显著 ($P>0.05$)。

3 讨论

谷胱甘肽硫转移酶是许多生物体内重要的解毒酶和抗氧化酶, 许多实验研究表明双壳类 GSTs 可以作为环境污染的生物标志物 (Brian *et al*, 2002; Cheung *et al*, 2002)。鳗弧菌的胞外产物如胞外蛋白、溶血素、细菌外毒素和细胞毒素等能对宿主细胞产生毒害作用, 并引起坏死性组织损伤 (吴后波等, 2003)。由于

```

35 ATGGCTACGTACAAGGTTTCATACTTCCTTGGACGGGTAATGGA
   O M A T Y K V S Y F P W T G N G
80 GAGATAATAAGACTTGGCCCTAGTGGCTGCTGGAAAGCAGTTCGAA
  16 E I I R L A L V A A G K Q F E
125 GACGAAAGGTTAAGCTGGGATGAGTGGGTGAAAATAAAACAAAA
  31 D E R L S W D E W V K I K Q K
170 ACACCAGCAAAGCAAATGCCTATTCTAACAGTAACAGAGAATGCC
  46 T P A K Q M P I L T V T E N A
215 AAATCCACGATGTATGGTCAGTCAGCAGCTTGTGCAAAGTACATC
  61 K S T M Y G Q S A A C A K Y I
260 GCCAAAAAGTACGGTCTGTGTTGGAAGGACGCCGGAAGAGGAATTG
  76 A K K Y G L F G R T P E E E L
305 TTAATCGACGAGGTGTCGAATGCGTCGCTGATTACAACGAGAA
  91 L I D E V F E C V A D L Q R E
350 ATCGCCAAATTTTCTTATGAGGAGGATGAACTAAGAAGGCAGAA
 106 I A K F S Y E E D E T K K A E
395 CTGAGGCAGAAAGTCATGGAAGAAGCCCTCCGAGATTTAACGCA
 121 L R Q K V M E E A L P R F N D
440 TACTTCAAACACGCTCGTCAACGTACGGCAAAAACGGATACATT
 136 Y F K L R S S T Y G K N G Y I
485 ATCGGACCAAAGATGACGCTCGCCGATCTTCATACCTATAACCTC
 151 I G P K M T L A D L H T Y N L
530 CTGGACCAGACGTCGGGTGCAATAGAGGGTCTACTCTCTCTCTAC
 166 L D Q T S G A I E G L L S S Y
575 CCAGAAGTACGAAACACACAGGAATTATGAAGTCAGACCCCTAAA
 181 P E L T K H T G I M K S D P K
620 ATTGCAACGTGGATAAAAAAAGCCCTGCGCCTTAG 655
196 I A T W I K T R P A P *

```

图 2 CsGSTS 基因全长 cDNA 序列的开放阅读框及结构域分析

Fig.2 The open reading frame of full length cDNA of CsGSTS gene and analysis on the structural domain

注: 方框为起始密码子, *表示终止密码子, 下划线表示 GST-N 结构域, 波浪线表示 GST-C 结构域

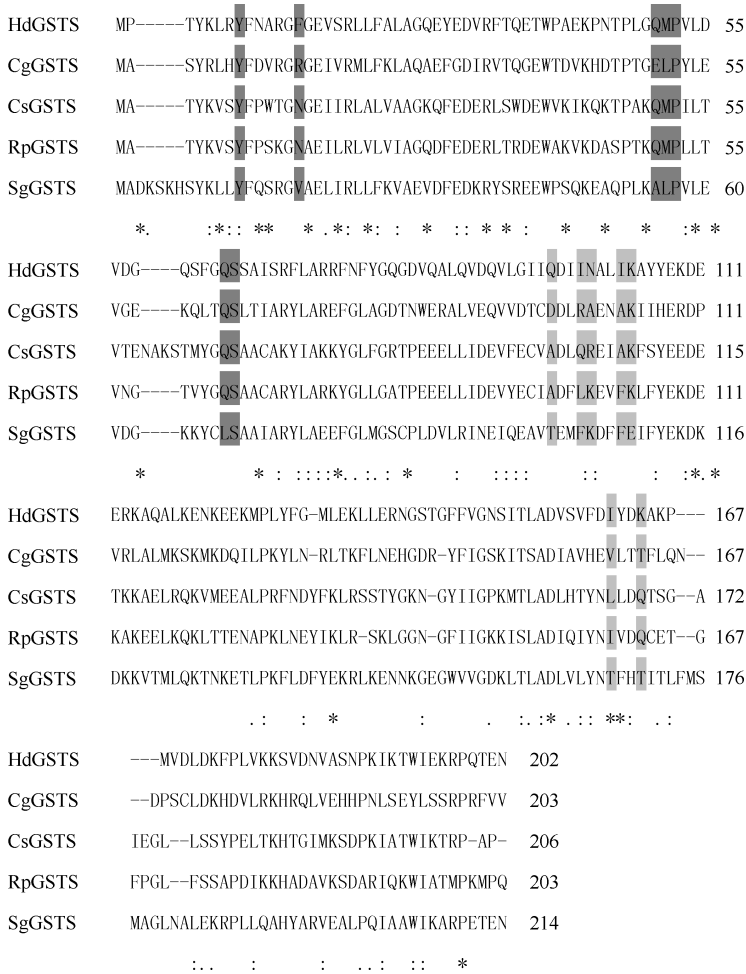


图3 青蛤与其它物种σ型 GST 的多序列比对

Fig.3 Multiple alignments of sigma like GST between *C. sinensis* and other species

注: *表示保守部分, : 表示次保守, 黑色阴影表示 G 位点, 灰色阴影表示 H 位点。HdGSTs: *Haliotis discus discus* 盘鲍(ABO26603); CgGSTs: *Crassostrea gigas* 太平洋牡蛎(CAE11863); RpGSTs: *Ruditapes philippinarum* 菲律宾蛤仔(ADI44317.1); SgGSTs: *Solen grandis* 大竹蛭(AEW43451.1)

GSTs 为胞内蛋白, 鳃弧菌感染前青蛤血清中 GSTs 活力很低。感染后 6—24h 内血清中 GSTs 活力显著升高, 可能与鳃弧菌溶血素对血细胞的溶血作用有关, 或者弧菌产生的细胞毒素等造成感染部位组织损伤, 导致细胞内容物释放至血清中, 从而使血清中 GSTs 活力显著升高。而肝脏中 GSTs 活力在弧菌感染 6—12h 下降, 可能肝细胞的功能已受到毒物破坏, 酶合成受阻, 导致酶活力下降。同时机体通过自身免疫途径修复损伤, 并合成大量免疫相关因子, 肝脏中 GSTs 活力逐渐回升, 从而抵御病原微生物的进一步侵害。因肝脏本身是机体解毒和毒物代谢的主要器官, 其 GSTs 受毒物的影响较大(瞿建宏等, 2006)。

Aliya 等(2003)认为, GSTs 类型丰富, 其 N 端结构

域较为稳定, 通常具有保守的酪氨酸/丝氨酸。酪氨酸和丝氨酸残基是结合谷胱甘肽并与其巯基相互作用的氨基酸, 该结构中的丝氨酸残基可与 GSH 的巯基基团结合, 酪氨酸残基是形成有催化能力酶结构以及 GSH 巯基作用的重要氨基酸残基。本实验中青蛤的σ型 GST 氨基酸序列 G 位点中包含酪氨酸位点和丝氨酸位点, 这些保守的氨基酸结构可能是 GST 发挥功能的核心区域。而 H 位点作为特异性底物结合位点, 其结构可变性较大, 氨基酸不具有保守性。本研究经分子系统学分析表明, 青蛤σ型 GST 与菲律宾蛤仔、大竹蛭等双壳类软体动物σ型 GST 汇成一支, 与昆虫、哺乳动物等的遗传距离相对较远, 说明青蛤σ型 GST 在动物类群间的进化过程与其生物分类学进化地位基本一致。

鳃弧菌感染后的青蛤肝脏中σ型 GST 基因相对表达量表现为先下降后升高的趋势。这与邹青青等(2010)的研究结果相似, 该实验在利用嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)对三角帆蚌的免疫刺激时发现, 感染后 3—12h 内三角帆蚌血细胞 GST 表达量呈明显下降; 本研究中的青蛤在弧菌感染 3—6h 后, 肝脏 CsGSTs 基因表达量亦出现下降趋势。吴后波等(2003)认为, 病原菌可由感染部位随血流扩散至肝、肾等组织器官进行繁殖, 其细菌外毒素等可直接破坏、降解宿主组织为自身提供氨基酸等营养。与 GSTs 活力变化类似, 肝脏 CsGSTs 基因表达量的降低可能与感染前期肝脏细胞损伤有关。

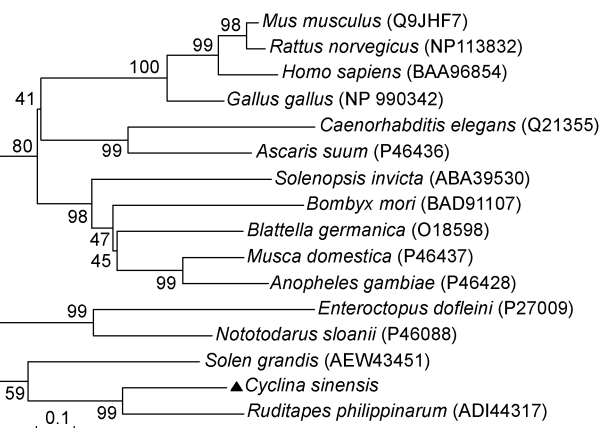


图4 使用邻接法(NJ)构建的 16 个物种σ型 GST 氨基酸序列系统树

Fig.4 The phylogenetic tree constructed by the amino acid sequences of sigma like GST of 16 species using NJ (Neighbor Joining) method

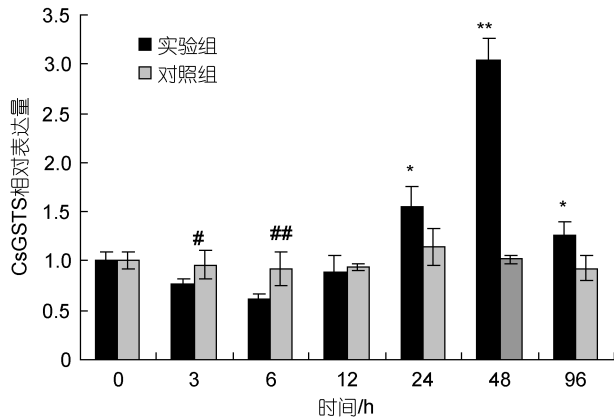


图5 鳃弧菌感染不同时间青蛤肝脏 CsGSTS 基因的表达
Fig.5 The expression of CsGSTS gene at different times in liver of *C. sinensis* infected by *V. anguillarum*

注: #表示相同时间点对照组表达量高于实验组并具有显著性差异($P < 0.05$), ##表示差异极显著($P < 0.01$); *表示实验组表达量高于对照组并具有显著性差异($P < 0.05$), **表示差异极显著($P < 0.01$)

但随着青蛤免疫系统相关因子的基因(包括 CsGSTS 基因)在病原物强烈诱导下随之启动, 导致 mRNA 表达量不断回升。CsGSTS 基因转录水平在感染后 24h 显著升高, 并在 48h 达到表达高峰, 该结果与青蛤其它免疫相关因子如溶菌酶(潘宝平等, 2010)、磷酸酶(宋欣等, 2010)的研究结果基本一致。鉴于肝脏是贝类的代谢和解毒中心, 其合成的谷胱甘肽转移酶参与清除有毒的内源或外源化合物, 保护机体免受进一步毒害, 最终完成免疫过程。本研究结果说明鳃弧菌感染前期可能会对青蛤组织造成一定损伤, 但青蛤肝脏 GSTs 活力及 CsGSTS 基因转录水平都会随之升高, 参与了青蛤的免疫应答反应, 并且在青蛤抵御病原微生物侵害中起着重要作用。

参 考 文 献

- 王兰萍, 耿荣庆, 刘 意等, 2007. 我国青蛤种质资源研究与利用现状. 江苏农业科学, 4: 254—255
- 伍忠奎, 余新炳, 吴忠道, 2004. 胞液谷胱甘肽 S-转移酶的研究进展. 中国热带医学, 4(2): 285—286
- 吴后波, 潘金培, 2003. 病原弧菌的致病机理. 水生生物学报, 27(4): 422—426
- 邹青青, 王军花, 郭红军等, 2010. 池螺蚌和三角帆蚌谷胱甘肽 S 转移酶基因表达特征. 动物学杂志, 45(4): 96—101
- 宋 欣, 张丽岩, 高玮玮等, 2010. 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*) 感染对青蛤(*Cyclina sinensis*)磷酸酶活性的影响. 海洋与湖沼, 41(2): 254—258
- 陈吉祥, 于德华, 李 筠, 2003. 鱼类病原鳃弧菌致病相关因子及分子生物学. 海洋科学, 27(8): 11—15

- 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
- 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
- 瞿建宏, 陈家长, 胡庚东等, 2006. 苯酚胁迫下罗非鱼组织中过氧化氢酶与谷胱甘肽-S-转移酶的动态变化. 生态环境, 15(4): 687—692
- Aliya S, Reddanna P, Thyagaraju K, 2003. Does glutathione S-transferase Pi (GST-Pi) a marker protein for cancer. Molecular and Cellular Biochemistry, 253: 319—327
- Allocati N, Federici L, Masulli M *et al*, 2009. Glutathione S-transferases in bacteria. FEBS Letters, 276: 58—75
- Armstrong R N, 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. Chemical Research in Toxicology, 10: 2—18
- Brian N B, Singh B R, 2002. Induction of glutathione S-transferase in the Northern Quahog *Mercenaria mercenaria* after exposure to the polychlorinated biphenyl (PCB) mixture aroclor 1248. Journal of Protein Chemistry, 21(8): 489—494
- Cheung C C C, Zheng G J, Lam P K S *et al*, 2002. Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels *Perna viridis*. Marine Pollution Bulletin, 45: 181—191
- Ivarsson Y, Mackey A J, Edalat M *et al*, 2003. Identification of residues in glutathione transferase capable of driving functional diversification in evolution. A novel approach to protein redesign. Journal of Biological Chemistry, 278: 8733—8738
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ methods. Methods, 25: 402—408
- Masella R, Benedetto R D, Vari R *et al*, 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathionerelated enzymes. Journal of Nutritional Biochemistry, 16: 577—586
- Sheehan D, Meade G, Foley V M *et al*, 2001. Structure, function and evolution of glutathione S-transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. Biochemical Journal, 360(Pt1): 1—16
- Shimada T, 2006. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 21: 257—276
- Wan Q, Whang I, Lee J S *et al*, 2009. Novel omega glutathione S-transferases in disk abalone: Characterization and protective roles against environmental stress. Comparative Biochemistry and Physiology, 150: 558—568

EFFECT OF *VIBRIO ANGUILLARUM* ON ACTIVITY AND GENE EXPRESSION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASES IN *CYCLINA SINENSIS*

LUO Kai-Ya, LIU Xin-Xin, GE Duan-Yang, PAN Bao-Ping

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

Abstract The activities of glutathione S-transferases (GSTs) in serum and liver were tested under *Vibrio anguillarum* stress. The sigma-like glutathione S-transferases of *Cyclina sinensis* (CsGSTS) were cloned with SMART-cDNA library and large scale EST sequencing method, then the expression of CsGSTS in liver were detected by the real-time quantitative PCR. Results showed the GSTs activities in serum were up-regulated at 6—24h ($P<0.01$) after infection, while in liver the activities declined at 6—12h and increased significantly at 48—96h. The full length cDNA of CsGSTS consisted of 793bp, encoding 206 amino acids with the typical GST-N and GST-C domain. The CsGSTS expression declined at 3—6h ($P<0.05$), and increased significantly at 24h, then reached its highest level at 48h, which was about three times higher than control group. Results showed that *Vibrio* may cause tissue injury at the first stage of infection, then plenty of GSTs were produced and CsGSTS expressed intensively, both participating in the immune response of the clam. This investigation provided important experimental data for the study on immunologic mechanism in *C. sinensis*.

Key words *Cyclina sinensis*, Glutathione S-transferases (GSTs), Enzyme activity, CsGSTS gene, Gene expression