

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00360

三角帆蚌GPX基因cDNA全序列的克隆及其编码蛋白的结构分析

李西雷¹, 汪桂玲¹, 李家乐^{1,2}, 袁一鸣¹

1. 上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;
2. 上海市高校水产养殖学 E 研究院, 上海 201306

摘要: 根据本实验室构建的三角帆蚌 cDNA 文库中已标注的 EST 序列, 利用 cDNA 末端快速扩增法(RACE)克隆了三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPX)基因 cDNA 全序列。序列分析表明, 该基因 cDNA 序列全长 1286 bp, 包括 5'端非翻译区(Untranslated Region) 39 bp、3'端非翻译区 659 bp 和开放阅读框(Open reading frame, ORF)588bp, 共编码 195 个氨基酸, 分子量约为 22.2 kDa, 理论等电点为 8.44, 属于含硒类 GPX。该氨基酸序列具有 GPX 所有亚型中均高度保守的 3 个环状结构, 对酶的三级结构起稳定作用。在线分析结果表明: GPX 的氨基酸序列不存在明显的疏水区, 也不存在信号肽序列。氨基酸相似性对比结果显示, 三角帆蚌 GPX 氨基酸序列与脊椎动物 GPX-2 及 GPX-1 的序列相似度较高, 为 73.1%-80.8%, 与其他型 GPX 相似度较小, 相似度低于 60%。构建的系统进化树显示三角帆蚌 GPX 与其他几种鱼类 GPX 聚为一类, 与其他已发表的几种软体动物 GPX 相距较远, 推测本实验克隆的三角帆蚌 GPX 基因和已发表的软体动物不属于同一种 GPX 类型。

关键词: 三角帆蚌; GPX 基因; RACE; 编码蛋白

Full-length cDNA cloning and encoding protein structure analysis of GPX in *Hyriopsis cumingii*

LI Xi-Lei¹, WANG Gui-Ling¹, LI Jia-Le^{1,2}, YUAN Yi-Ming¹

1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China;
2. Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Universities, Shanghai 201306, China

Abstract: Based on the EST sequence of mantle cDNA library of *Hyriopsis cumingii*, the complete cDNA of *Hyriopsis cumingii* GPX gene was cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE) in this paper. The GPX full-length cDNA sequence was 1286 bp including a 39 bp 5'-untranslated region, a 659 bp 3'-untranslated region and an open reading frame (ORF) 588 bp in length, which encodes for 195 amino acids with the predicted molecular weight of 22.2 kDa and the isoelectric point of 8.44. Molecular structure analysis revealed that GPX was Se-GPX. The amino acid sequences have three highly conserved loop structures that have a stabilizing effect on the tertiary structure of the enzyme. The amino acid se-

收稿日期: 2009-08-24; 修回日期: 2009-12-31

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973 计划)前期研究专项(编号: 2009CB126000), 国家自然科学基金项目(编号: 30871923), 上海市科委
地方院校能力建设项目(编号: 08390510100)和上海市水产养殖重点学科建设项目 (编号: Y1101)资助

作者简介: 李西雷(1987-), 男, 硕士研究生, 专业方向: 水产动物种质资源与种苗工程。E-mail: lixilei1314@163.com

通讯作者: 汪桂玲(1974-), 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 水产动物遗传育种。E-mail: glwang@shou.edu.cn

李家乐(1963-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 水产动物种质资源与种苗工程。E-mail: jlli@shou.edu.cn

quence did not contain obvious hydrophobic domain and signal peptide. Homologous analysis of amino acid sequences indicated that the GPX of *H. cumingii* shared a high similarity with GPX-2 and GPX-1 of vertebrates (73.1%-80.8%), and low similarity with other types (< 60%). Phylogenetic trees showed that GPX of *Hyriopsis cumingii* was clustered together with GPX of some fishes and far away from GPX of several other published Molluscas. These results indicated GPX gene of *H. cumingii* cloned in this study was different from the GPX genes from other Molluscas.

Keywords: *Hyriopsis cumingii*; glutathione peroxidase; RACE; encoding protein

谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPX)是生物体内抗氧化防御系统的重要组成部分,是生物体内重要的活性氧自由基清除剂^[1,2]。研究表明GPX是一个含有多种同工酶的超家族酶类,根据其亚细胞定位、氨基酸序列不同以及结合底物的特异性,可分为几种不同的同工酶^[3,4],而根据GPX包含的硒半胱氨酸(Selenocysteine, Sec)不同,又可简单分为含硒和不含硒两大类。

由于GPX具有消除体内活性氧自由基的能力,被认为在解除重金属离子毒害、增强机体对外界胁迫的适应性等方面起重要作用。目前对GPX的研究主要集中在GPX基因的克隆和环境胁迫或病理条件下GPX基因的表达等方面。Jo等^[5]克隆了太平洋牡蛎的GPX基因,该基因全长1310 bp,编码244个氨基酸,第80位氨基酸为硒半胱氨酸,属于含硒类。王琳等^[6]研究了微囊藻毒素和脂多糖对鲢鱼和草鱼肝脏GPX基因活体诱导表达的影响。白桂芹等^[7]证明肝炎病毒蛋白可通过影响GPX基因及其表达的异常调节引起肝细胞的病理损害,导致肝硬化和肝细胞癌的发生。此外,王凡等^[8]研究铜污染对栉孔扇贝内脏团抗氧化酶活性的影响,表明GPX对铜的早期污染具有指示作用。

三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)属瓣鳃纲(Lamellibranchia)蚌目(Unionoida)蚌科(Unionidae)帆蚌属,是中国特有的优良淡水育珠蚌。随着淡水珍珠蚌养殖生产的高密度、集约化发展以及各种因素导致的水体污染,使三角帆蚌的养殖也频繁发生各种病害。对其免疫系统及相关免疫因子,尤其是体内参与免疫反应的抗氧化酶的研究就显得尤为重要。相对脊椎动物的研究而言,贝类尤其是淡水贝类的免疫因子及其相关基因的研究还相当薄弱,迄今为止,有关淡水贝类的谷胱甘肽过氧化物酶基因的研究仅见斑马纹贻贝(*Dreissena polymorpha*)^[9]和

一种珠蚌*Unio tumidus*^[10]等少数物种。本研究根据本实验室构建的三角帆蚌cDNA文库中已标注的EST序列^[11],通过RACE技术克隆了三角帆蚌谷胱甘肽过氧化物酶基因的cDNA全序列,并对其基因结构特征以及相应的蛋白质序列进行了初步分析,为进一步研究三角帆蚌GPX基因在环境胁迫或病理条件下的时空表达及其功能与抗病的关系等研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用的三角帆蚌为3龄蚌,采自浙江省金华市威望养殖新技术有限公司生产基地,根据实验需要放5只于玻璃缸(50 cm×30 cm×35 cm)中暂养,以小球藻投喂一周。

1.2 方法

1.2.1 三角帆蚌外套膜总RNA提取

活体解剖,取三角帆蚌外套膜组织100 mg左右置于1.5 mL离心管中,加入1 mL RNAiso Plus试剂,经匀浆、氯仿抽提、异丙醇沉淀、75%酒精清洗,用适量0.01% DEPC处理过的水溶解总RNA^[12]。总RNA的完整性利用1.5%的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,用紫外分光光度计进行纯度分析。

1.2.2 全长cDNA的扩增、克隆和序列测定

根据本实验室构建的三角帆蚌外套膜cDNA文库中已标注的EST序列,用Primer Premier 5.0软件并结合BLAST程序设计特异性引物,所用引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。

3'末端扩增使用TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver.3.0[宝生物工程(大连)有限公司]试剂盒,设计的上游特异性引物GPXf: 5'-ATTCGGACGAGGGAA

ATAGC-3'。5'末端扩增使用 BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 与 Advantage® 2PCR Enzyme System 试剂盒(BD Biosciences Clontech 公司), 设计的下游特异性引物 GPXr: 5'-CTCCTGACGGCAAGCCATAC-3'。

RACE 扩增产物经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳分离检测, 用 TIANGel Midi Purification Kit(天根生化科技(北京)有限公司)回收目的片段 PCR 产物, 纯化后的 RACE 产物与 pMD19-T[宝生物工程(大连)有限公司]载体连接构建重组质粒, 转化到感受态细胞 *E.coli* DH5 α , 经 LB 平板(含 Amp⁺、IPTG 和 X-gal)培养后, 筛选重组子进行插入片段检测, 所获得的阳性克隆由上海英骏生物技术有限公司进行序列测定。

1.2.3 序列分析

通过 BLAST 数据库搜索 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), 分析核苷酸序列、氨基酸序列的相似性。应用 ORF Finder 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 确定正确的开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF)。用 ProtParam 程序、Signal P 3.0 server、TMPred server 及 ProtScale 等软件分别预测氨基酸序列的物理参数及信号肽, 分析氨基酸跨膜结构及氨基酸序列的疏水区。用 MEGA 4.1 软件, 构建三角帆蚌 GPX 氨基酸序列与其他谷胱甘肽过氧化物

酶家族氨基酸序列的 NJ 系统进化树, 并用重复 1 000 次的自展 (Bootstrap) 检验计算各分支的置信值。蛋白质的二级结构用 Jpred3 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/index.html>) 进行预测^[13], 三级结构通过 ESyPred3D^[14] (<http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>) 提交进行分析。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增与克隆测序

提取三角帆蚌外套膜总 RNA, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在紫外灯下观察, 可见 3 条清晰的条带 (图 1 A)。用分光光度计测 OD 值, OD_{260}/OD_{280} 为 1.85, 结果表明提取的总 RNA 纯度较高, 符合 RT-PCR 及 RACE 扩增的要求。以特异性引物 GPXf 和通用引物 M13 Primer M4 进行 3' RACE 扩增, 在 1 300 bp 左右获得 1 条明显的与预期大小相符的目的带 (图 1 B); 同样以特异性引物 GPXr 和通用引物 UPM 进行 5' RACE 扩增, 获得 1 条约 600 bp 的特异带 (图 1 C)。

2.2 三角帆蚌 GPX 基因 cDNA 序列的特征分析

3' RACE 和 5' RACE 扩增产物分别经克隆、测序后拼接, 获得了三角帆蚌 GPX 基因的全长 cDNA

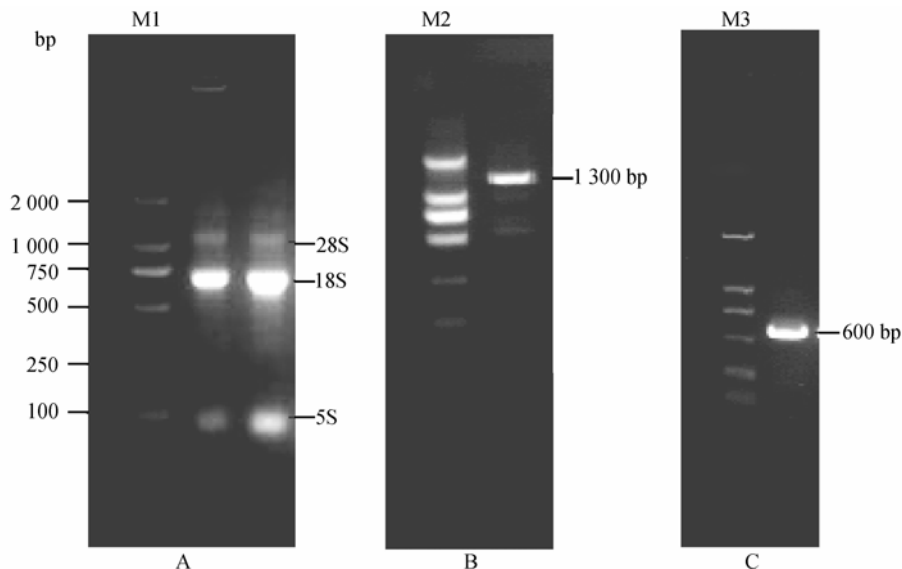


图 1 三角帆蚌总 RNA 完整性检测以及 3'、5'RACE 扩增产物电泳图

A: RNA 完整性检测; B: 3'RACE 扩增产物; C: 5'RACE 扩增产物。M1、M2、M3: DL2000 DNA 分子质量标准。

序列, GenBank 登录号为 GU126426。该基因 cDNA 全长 1 286 bp, 包括 39 bp 的 5'端非翻译区(UTR), 659 bp 的 3'端非翻译区(UTR)。开放阅读框长度为 588 bp, 可编码 195 个氨基酸残基。169~171 bp 处 3 个碱基 TGA 不是终止密码子, 而是编码硒半胱氨酸(Sec)的密码子, 密码子为 UGA, 3'UTR 区含有典型的多聚腺苷酸加尾信号序列 AATAAA 和 PolyA 尾。

2.3 三角帆蚌GPX氨基酸序列分析

根据三角帆蚌 GPX 基因的 cDNA 全序列推导, 共得到 195 个氨基酸, 原子总量 3143, 分子式为: $C_{1009}H_{1569}N_{267}O_{291}S_6Se_1$, 预测的氨基酸分子量约为 22.2 kDa, 理论等电点为 8.44。不稳定指数为 24.46, 显示此蛋白质性质稳定。赖氨酸(Lys)、亮氨酸(Leu)、天冬酰胺(Asn)和苯丙氨酸(Phe)含量比较高, 分别占总氨基酸的 9.23%、8.72%、7.69%和 7.18%; 组氨酸(His)、半胱氨酸(Cys)和色氨酸(Trp)含量较少, 分别为 1.54%、1.03%和 1.03%; 仅含有一个硒半胱氨酸(Sec), 为酶的活性中心位点。

三角帆蚌 GPX 氨基酸与人(hoGPX)、小鼠(mGPX)、热带爪蟾(xGPX)、斑马鱼(dGPX)、鲫鱼(cGPX)、条石鲷(oGPX)、牙鲆(pGPX)、南美白对虾(lGPX)和一种珠蚌 *Unio tumidus*(uGPX)的 GPX 氨基酸进行序列对比。结果显示, 与哺乳动物、热带爪蟾、斑马鱼及肿胀珠蚌 GPX 类似, 三角帆蚌 GPX 也含有位于 N 端由 TGA 编码的 Sec 位点。GPX 序列中的 Gln78 和 Trp156 为相应的硒结合位点, 由此可推断三角帆蚌 GPX 属于含硒类 GPX。哺乳动物中 Arg52、Arg98、Arg179 等残基在传递底物至催化中心过程中起重要作用^[15], 而这些位点在三角帆蚌中大多也保守, 分别为 Arg49、Arg94 以及 Arg172。三角帆蚌 GPX 包含有 3 个环状结构, 对酶的三级结构起稳定作用, 其氨基酸序列在所有物种中均高度保守。第一个环结构是 Asn39-Tyr52(NVASLUGTTVRDFT), 第二个环结构是 Leu68-Gln78(LGFPCNQFGHQ), 第三个环结构是 Trp156-Phe158(WNF)(图 2)。

2.4 GPX蛋白的结构预测分析

ProtScale 在线分析结果表明三角帆蚌 GPX 蛋白质不存在明显的疏水区。TMpred 在线分析表明, GPX 不存在跨膜区。SigalP 程序中 NN 和 HMM 模型对

信号肽的分析结果显示, 三角帆蚌 GPX 也不存在信号肽序列, 和罗氏沼虾的预测结果一致^[16], 推测此类 GPX 属非分泌性蛋白。

Jpred3 软件对三角帆蚌 GPX 蛋白二级结构预测结果表明, 该蛋白质二级结构以不规则卷曲为主, 另外在第 51~61、83~92、118~126 以及第 179~193 氨基酸残基处存在 α 螺旋, 在第 14~17、34~39、65~71、158~163 以及第 168~173 氨基酸残基处存在 β 折叠。

根据 Kavanagh 等(<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>)报道的人 GPX-1 A 链三级结构(PDB id: 2f8a)为模板, 通过 ESyPred3D 预测获得了三角帆蚌 GPX 的三级结构。三角帆蚌的 GPX 蛋白质三级结构预测结果包含第 10~191 氨基酸残基, 三角帆蚌 GPX 三级结构与人的 GPX1 三级结构相似, 其模式见图 3。由预测结果分析二级结构也显示三角帆蚌 GPX 以无规卷曲为主, 同时也含有螺旋和折叠。由图 3 可知, GPX 基本上呈球形, 疏水基多聚在分子内部, 而亲水基多分布在分子表面, 说明该蛋白是亲水性的, 与上述预测结果相一致。

2.5 三角帆蚌GPX氨基酸序列同源性及分子进化分析

迄今为止, 在所有物种中根据氨基酸序列不同、结合底物的特异性以及亚细胞定位, 共发现了 8 种谷胱甘肽过氧化物酶家族的同工酶^[17], 分别命名为 GPX-1、GPX-2、GPX-3、GPX-4、GPX-5、GPX-6、GPX-7 和 GPX-8。三角帆蚌 GPX 蛋白氨基酸序列经 Blast 比对发现, 与脊椎动物 GPX-2 及 GPX-1 的序列相似度较高, 为 73.1%~80.8%, 与其他型 GPX 相似度较小, 相似度低于 60%(表 1)。推测同型 GPX 在物种进化过程中相当保守, 而不同类的 GPX 氨基酸序列则差异相对较大。

用 ClustalW 软件将三角帆蚌 GPX 氨基酸序列与其他物种的 8 种亚型 GPX 全部氨基酸序列一起进行多重序列比对, 再用 MEGA4.1 软件以邻接法(NJ 法)构建系统树(图 4)。结果显示, 不同亚型 GPX 基本上独立占据了进化树上的不同分支, 较为特殊的是 GPX-4、GPX-7 和 GPX-8, 这 3 种亚型的 GPX 分别处于同一分支上的不同小分支, 说明这 3 个亚型的 GPX 可能来源于一个共同祖先。三角帆蚌 GPX 首先与其他几种鱼类 GPX 聚为一类, 然后与哺乳动

hGPX	---MAVRIP LKPQNFFDVTAKTLKGQEVKLSKYKGKVILVENVASLUGTT	47
dGPX	-----MAGTMKKFYDLSAKLLSGDLLNFSSLKGKVLIENVASLUGTT	43
hoGPX	-----MAFIAKSFYDLSAISLDGEKVDNFTRGRAVLIENVASLUGTT	43
xGPX	---MRLAMVSR-TVYEF SARLLSAGENTALSQYKGRVLLIENVASLUGTT	46
mGPX	MCAARLSAAAQSTVYAF SARPLTGGEPSVLSGLRGKVLLIENVASLUGTT	50
uGPX	EGRTKCTNTKNHTVHDFSFLNVYGNETIDLRYYRGEVLLVNVVATYUGLT	50
cGPX	-----	
oGPX	-----	
pGPX	-----	
IGPX	-----	
	* * *****	
	Loop	
hGPX	VRDFTQMNELASKFEKG-LVILGFPCNQFGHQENGNNDEILNSLKYVRPG	96
dGPX	VRDFTQMNELHSRYADQGLVVLGAPCNQFGHQENCKNEEILQSLKYVRPG	93
hoGPX	TRDFTQLNELQCRFP RR-LVVLGFPCNQFGHQENCNEEILNSLKYVRPG	92
xGPX	IRDYQTMSRLQSMYGPRLQVLAFCNQFGHQENSGNQEILNLKHVRPG	96
mGPX	IRDYTEMNDLQKRLGPRGLVVLGFPCNQFGHQENGKNEEILNSLKYVRPG	100
uGPX	VQ-YHGSNALQGYRND SFRVLGVPCSQFHFQEP AFTSEELMNLKYARPG	99
cGPX	-----MNELHSRYADQGLVVLGAPCNQFGHQENTKNDEILSLKYVRPG	44
oGPX	-----MNELHNRYSAKGLVILGVPCNQFGHQENCKNEEILKALKYVRPG	44
pGPX	-----MNELHSRYSSKGLVILGVPCNQFGHQENCKNEEILRCLKYVRPG	44
IGPX	-----MNQLKEEFGDK-LEVLAFPCNQFGHQENTTEGELLSSLRHVRPG	43
	** * * ***** ** * * * *	
	Loop	
hGPX	NGFEPAFPI MEKCDVNGSNSHPLFQFLREKLQ QPSDDPVSLMTHANNIIW	146
dGPX	NGFEPKFQILEKLEVNGENAHPLFAFLKEKLPQPSDDPVSLMGDPKFIIW	143
hoGPX	GGYQPTFTLVQKCEVNGQNEHPVFAYLKD KLPYPYDDPFSLMTDPKLIW	142
xGPX	GGFEPNFPLFEKVDVNGEKEHPLFTFLKGQLPYP SDDSI SLMQDPKSIW	146
mGPX	GGFEPNFPLFEKCEVNGEKAHPLFTFLRNALPT SDDPTALMTDPKYIIW	150
uGPX	HGFVPNFNLTKTEVNGHKEHPLFTYIKSELPPARDR----VQP--ILY	142
cGPX	NGFEPNFQ LLEKLEVNGVNAHPLFVFLKEKLPQPSDDSVSLMGDPKFIIW	94
oGPX	NGFEPKFQ LLEKVDVNGQDAHPLFVFLKEKLPFP CDDAMALMTDPKFIIW	94
pGPX	NGFEPKFQ LLEKVDVNGKDAHPLFVYLKNSLPFP SDDTMALMSDPKFITW	94
IGPX	NNFEPKMVMFGKVDVNGSTADPVFKYLKERLPLPADDSVSFMSDPKCIW	93
	* * * * * * * * * * * * * * *	
hGPX	EPVTRTDISWNFEKFLIAPDGPKPKRYSRKFETKDIYNDIKDLIQQFGL-	195
dGPX	SPVCRNDISWNFEKFLIGPDGEPFKRYSRRFLTIDIDADIKELLKRTK--	191
hoGPX	SPVRRSDVAWNFEKFLIGPEGEPPRRYSRTFTPTINIEPDIKRLKVAI--	190
xGPX	SPVRRNDIAWNFEKFLIARNGVVPYKRYGRRFETFNIIQQDIEKLLDETCE-	195
mGPX	SPVCRNDIAWNFEKFLVGPDGVPVRYSRRFRITIDIEPDIETLLSQSGNS	201
uGPX	EPIYTS DVRWNFEKFLIGRDGHPVYRYSRMLDTADIAVEIKLLHGHGKD	193
cGPX	SPVNRNDISWNFEKFLIGPDGEPFKRYSRRFLTIDIEADIKELLKRAK--	142
oGPX	SPVSRNDVSWNFEKFLVSPDGEPYKRYSRNFLT TTDIEADIKELLKRVK--	142
pGPX	SPVSRNDVSWNFEKFLIGPDGEPYKRYSRNFLT TTDIEADIKDLLQKVK--	142
IGPX	TPVCRSDIAWNFEKFLIGKDGPFKRFSKKYETILLKDEIANLLKA----	139
	* * * * * * * * * * * * * * *	
	Loop	

图 2 三角帆蚌与其他物种 GPX 的氨基酸序列比较及结构分析

“-”表示比较时必要的氨基酸缺口, “*”表示保守的氨基酸残基, 阴影部分的“U”代表 UGA 编码的硒代半胱氨酸位点, 黑体代表硒的结合位点, 方框代表传递底物至催化中心中起重要作用的氨基酸, 有助于稳定酶立体结构的 3 个环结构用粗下划线表示。各序列名称对应的物种及 GenBank 登录号为: hGPX(*H. cumingii*), dGPX (*Danio rerio*, NP_001007282.2), hoGPX (*Homo sapiens*, NP_002074.2), xGPX (*Xenopus tropicalis*, NP_001015740.2), mGPX (*Mus musculus*, NP_032186.2), cGPX (*Carassius auratus*, ABJ09418.1), oGPX (*Oplegnathus fasciatus*, AAU44619.1), pGPX (*Paralichthys olivaceus*, ABU49600.1), lGPX (*Litopenaeus vannamei*, AAY41441.1), uGPX (*Unio tumidus*, ABH10623.1)。

物 GPX-1 型聚在一起, 再与 GPX-2 型聚在一起。而斑马纹贻贝 (*Dreissena polymorpha*)、河蚬 (*Corbicula fluminea*)、牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 以及珠蚌 *Unio tumidus* 等几种软体动物则与 GPX-6、GPX-5 和 GPX-3 簇群相距较近。三角帆蚌与其他已发表的几种软体动物 GPX 相距较远, 推测本实验克隆的三角帆蚌 GPX

基因和已发表的软体动物不属于同一种 GPX 类型。

3 讨论

谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX) 是一个多酶家族, 一部分酶有依赖硒的谷胱甘肽过氧化物酶活性, 并含有独特的 UGA 编码的硒半胱氨酸 (Sec), 而另外

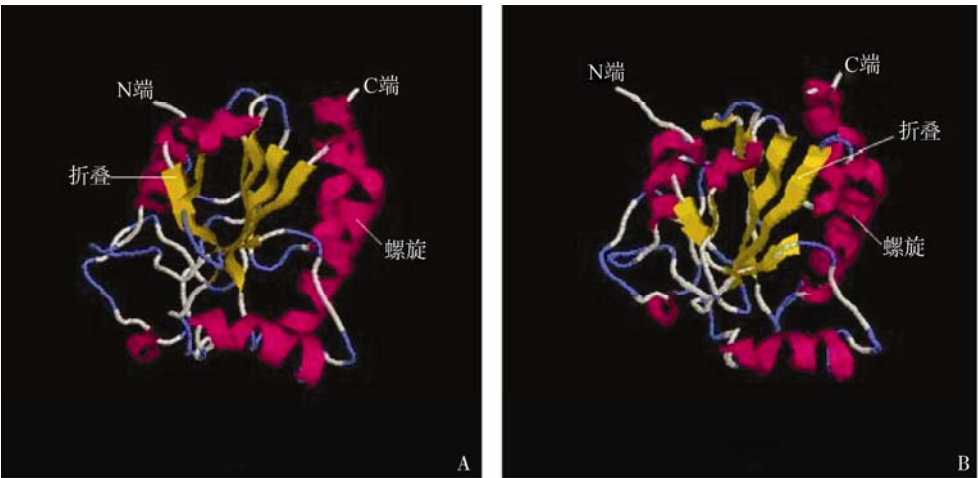


图 3 ESyPred3D 预测的三角帆蚌(A)GPX 三级结构预测结果及模板(B)

表 1 三角帆蚌与其他物种 GPX 序列相似性比较

物种及类型	GenBank 登录号	相似度(%)
牛(<i>Bos taurus</i>)GPX-2	NP_001156611.1	80.80
野猪(<i>Sus scrofa</i>)GPX-2	NP_001108608.1	80.20
人(<i>Homo sapiens</i>)GPX-2	NP_002074.2	80.20
大鼠(<i>Rattus norvegicus</i>)GPX-2	NP_899653.2	79.70
小鼠(<i>Mus musculus</i>)GPX-2	NP_109602.2	79.10
斑马鱼(<i>Danio rerio</i>)GPX-1	NP_001007282.2	80.40
人(<i>Homo sapiens</i>)GPX-1	AAP80181.1	75.10
大鼠(<i>Rattus norvegicus</i>)GPX-1	NP_110453.3	74.70
野猪(<i>Sus scrofa</i>)GPX-1	NP_999366.1	74.20
日本鳗鲡(<i>Anguilla japonica</i>)GPX-1	ACN78878.1	73.90
热带爪蟾(<i>Xenopus tropicalis</i>) GPX-1	NP_001015740.2	73.40
小鼠(<i>Mus musculus</i>)GPX-1	NP_032186.2	73.20
牛(<i>Bos taurus</i>)GPX-1	NP_776501.1	73.10
斑马鱼(<i>Danio rerio</i>)GPX-3	NP_001131027.1	57.80
牛(<i>Bos taurus</i>)GPX-5	NP_001020506.2	59.00
野猪(<i>Sus scrofa</i>)GPX-5	NP_999051.1	57.90
人(<i>Homo sapiens</i>)GPX-5	CAA06463.1	57.80
野猪(<i>Sus scrofa</i>)GPX-6	NP_001131079.1	59.00

一部分酶则不含Sec, 不含硒的谷胱甘肽过氧化物酶不能分解过氧化氢, 在体内具有清除过氧化物及解毒的双重功能。目前发现GPX至少有 8 种同工 酶 [17], 其在机体中的分布、亚基结构、一级序列和酶学特点上有显著不同。含硒的GPX主要包括GPX-1、GPX-2、GPX-3 和GPX-4。GPX-1 主要分布在组织的胞浆和红细胞, 它以硒半胱氨酸为活性中心位点, 以谷胱甘肽为催化底物, 催化还原H₂O₂ 和有机过氧化物, 该酶最初被命名为谷胱甘肽过氧化物酶 [18], 现在通称为GPX-1。GPX-2 高表达于胃肠道粘膜上皮细胞 [19], 也称胃肠型GPX(gGPX)。其氨基酸序列

与GPX-1 的相似性约为 65%, 并且具有相似的底物。血浆谷胱甘肽过氧化物酶(GPX-3 或pGPX)是一种细胞外糖蛋白, 是目前已知的GPX家族 8 个成员中唯一的细胞外亚型。GPX-4 又称磷脂氢谷胱甘肽过氧化物酶(PHGPX), 是一个单体酶, 能特异地催化磷脂氢过氧化物的还原。不含硒的GPX主要包括GPX-5、GPX-7 和GPX-8。GPX-5 是GPX家族中第一个被发现不含硒的酶, 它作为一种分泌蛋白表达于附睾中 [20]。GPX-7 是一种新的磷脂氢谷胱甘肽过氧化物酶, 其活性位点是半胱氨酸, 在多种组织中均有表达 [21]。最近发现, GPX家族中存在着一种新

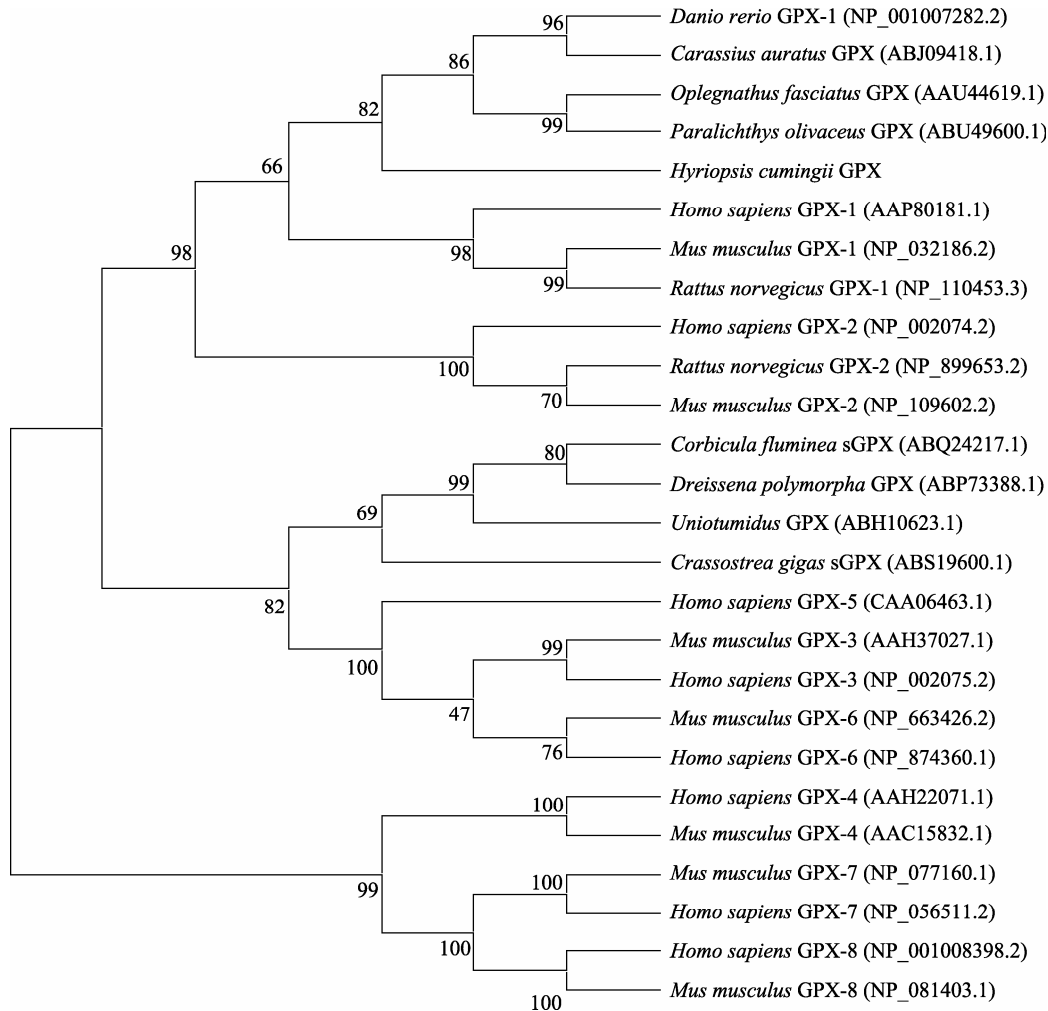


图 4 不同类型 GPX 氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树

括号内的编号代表 GenBank 序列号; 节点上的数字为重复 1 000 次的自展(Bootstrap)检验置信值。

的不含硒的酶, 称为 GPX-8, 其功能尚还需进一步研究^[21]。此外, 比较特殊的是 GPX-6, 它特异性表达于嗅觉上皮细胞中^[22], 过去称为嗅蛋白(OMP), 其特殊性在于人体中的活性位点是硒半胱氨酸, 而在大鼠和小鼠中的活性位点则是半胱氨酸^[23]。

本实验采用 RACE 快速扩增法, 获得了三角帆蚌 GPX 的全长 cDNA 序列 1 286 bp, 共编码 195 个氨基酸。¹⁶⁹TGA¹⁷¹ 不是终止密码子, 而是编码硒半胱氨酸(Sec)的密码子, 故本研究得到的三角帆蚌 GPX 属于含硒类 GPX。硒依赖型 GPX 的催化基团是 Sec, 它由终止密码子 UGA 编码, 对它的研究拓展了人们对遗传密码的认识, Sec 也因此被人们称作第 21 种氨基酸^[24], Sec 在原核和真核生物中的表达略有不同, 但是它们的表达都依赖于 mRNA 中特殊的二级结构。

在真核生物中, UGA 解读为 Sec 取决于硒蛋白 mRNA 的 3' 非翻译区(UTR)内的一种特殊的二级结构茎环——“ 硒半胱氨酸插入序列(SECIS) ”^[25], 只有当 mRNA 中存在这种 SECIS 时, UGA 才能被作为硒半胱氨酸的密码子而被翻译。因此, 我们推测三角帆蚌 GPX 的 mRNA 中也存在着相同的茎环结构来识别 Sec 的密码子。

哺乳动物中, Sec 与硒结合位点 Gln82 和 Trp160 通过氢键结合^[26], 在鱼类和虾类以及其它淡水贝类 GPX 中也存在相应的硒结合位点 Gln 和 Trp, 而在三角帆蚌 GPX 序列中同样存在着相应的硒结合位点 Gln78 和 Trp156, 这样在三级结构中能够形成固定的氢键。哺乳动物中 Arg52、Arg98、Arg179 等残基在传递底物至催化中心过程中起重要作用^[15], 而这

些位点在三角帆蚌中大多也保守。哺乳动物GPX蛋白均包含有3个环状结构,其氨基酸序列在所有物种中均高度保守,这3个环结构起到稳定酶的三级结构的作用^[27]。三角帆蚌GPX中也具有这保守的3个环:第一个环结构是Asn39-Tyr52 (NVLSTGTTVRDFT),第二个环结构是Leu68-Gln78(LGFPCNQFGHQ),第三个环结构是Trp156-Phe158(WNF)。而鲫鱼、条石鲷、牙鲆等鱼类以及罗氏沼虾^[16]、南美白对虾^[28]由于GPX氨基酸序列较短,仅含有后两个环状结构。到目前为止,对无脊椎动物GPX的高级结构了解还很少,本实验利用软件对三角帆蚌GPX蛋白的二级结构进行了预测,发现三角帆蚌GPX二级结构中以无规卷曲为主,另有4处螺旋以及5处折叠。没有明显的疏水区和跨膜区,也不存在信号肽,推测此类GPX属细胞内的非分泌性蛋白。以人的GPX-1三级结构为模板,通过ESyPred3D网络服务器对三角帆蚌GPX进行三级结构预测,并将其和人GPX-1的结构进行比对,发现三角帆蚌和人GPX-1蛋白具有高度相似性(54.5%),三级结构也非常相似。

BLAST结果表明,本研究得到的三角帆蚌GPX氨基酸序列与斑马鱼、大鼠、小鼠、牛、人等脊椎动物的GPX-2及GPX-1的序列相似度均较高,为73.1%~80.8%,与其他GPX亚型相似度较小。由于GPX-2的氨基酸序列与GPX-1的相似度较高,此外,无脊椎动物中GPX的研究还很少,迄今尚未在任何一种无脊椎动物体内发现上述所有的GPX亚型。本实验也是首次对三角帆蚌GPX基因进行研究,所获得的数据有限,尚不能对所克隆的三角帆蚌GPX基因进行更为详细的分类。从构建的GPX氨基酸系统进化树来看,不同亚型的GPX基本上独立占据了进化树上的不同分支。同一亚型中高等哺乳动物的GPX单独聚在一起,其分子进化关系和物种进化关系基本吻合;鱼类、贝类等低等动物和高等动物间聚类分析的自展置信值均比较低,说明低等动物体内GPX分化还比较原始。进化树中较为特殊的是GPX-4、GPX-7和GPX-8,这3种亚型的GPX分别处于同一分支上的不同小分支,说明这三个亚型的GPX可能来源于一个共同祖先。三角帆蚌单独与相对低等的鱼类聚在一起,形成一个独立的分化群,推测三角帆蚌GPX和这几种鱼类的GPX为同一种亚型,然后与哺乳动物GPX-1型聚在一起,再与

GPX-2型聚在一起。而斑马纹贻贝(*Dreissena polymorpha*)、河蚬(*Corbicula fluminea*)、牡蛎(*Crassostrea gigas*)以及珠蚌(*Unio tumidu*)几种软体动物则与GPX-6、GPX-5和GPX-3簇群相距较近,本实验得到的三角帆蚌GPX氨基酸与其他几种软体动物GPX相距较远,推测该GPX和已发表的几种软体动物不属于同一种GPX类型。目前软体动物GPX的相关研究很少,还未涉及蛋白质高级结构及功能的研究,至于三角帆蚌存在哪几类亚型的GPX尚需进一步研究。

由于三角帆蚌生长环境的特殊性以及贝类的富集作用,使得三角帆蚌更容易受到外界环境污染的影响,体内更容易富集有毒有害物质。镉可以诱导GPX基因的表达量发生显著性变化,表明GPX与胁迫环境下的生理代谢变化有重要关系^[5]。此外,刘萃红^[29]通过观察不同浓度的CdCl₂对人的淋巴细胞GPX活性的影响发现:淋巴细胞GPX活性随CdCl₂浓度升高而下降,说明Cd明显抑制了淋巴细胞GPX活性,且这种抑制呈剂量依赖性。这提示了Cd可能通过抑制GPX活性,使细胞内自由基累积,过量的自由基造成基因的损伤,进一步导致了细胞的凋亡和功能的丧失。相对于高等动物的GPX研究,低等软体动物的GPX研究较少。本研究克隆得到三角帆蚌GPX基因的cDNA全序列,在此基础上,用生物信息学方法对其蛋白序列进行了分析和预测,这些结果将为分子水平上进一步研究三角帆蚌GPX,包括GPX在病理条件下的时空表达及其功能与抗病的关系等研究奠定基础,为将来三角帆蚌病害防治提供新的思路和途径。

参考文献(References):

- [1] 王咏梅. 自由基与谷胱甘肽过氧化物酶. 解放军药学报, 2005, 21(5): 369-371.
- [2] 任洪林, 柳增善, 王克坚. 鲍免疫相关基因和蛋白的研究进展. 遗传, 2009, 31(4): 348-358.
- [3] Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohé L, Baumann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohé L. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol*, 1995, 252: 38-53. [\[DOI\]](#)
- [4] Arthur J R. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57(13-14): 1825-1835. [\[DOI\]](#)
- [5] Jo PG, Choi YK, Choi CY. Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea*

- gigas* in response to cadmium exposure. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2008, 147(4): 460–469. [\[DOI\]](#)
- [6] 王琳, 梁旭方, 刘秀霞, 程炜轩, 郁颖. 微囊藻毒素和脂多糖对鲢鱼和草鱼肝脏去毒相关基因活体诱导表达的影响. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2009, 30(1): 111–116.
- [7] 白桂芹, 成军, 张树林. 谷胱甘肽过氧化物酶与肝炎病毒蛋白关系的研究进展. 胃肠病学和肝病杂志, 2004, 13(1): 82–84.
- [8] 王凡, 赵元凤, 吕景才, 刘长发. 铜污染对扇贝内脏团抗氧化酶活性的影响. 水产科学, 2008, 27(12): 622–624.
- [9] Doyen P, Bigot A, Vasseur P, Rodius F. Molecular cloning and expression study of pi-class glutathione S-transferase (pi-GST) and selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) transcripts in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2008, 147(1): 69–77.
- [10] Doyen P, Vasseur P, Rodius F. Identification, sequencing and expression of the selenium-dependent glutathione peroxidase transcript in the freshwater bivalve *Unio tumidus* exposed to Aroclor 1254. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2006, 144(2): 122–129.
- [11] Bai Z, Yin Y, Hu S, Wang G, Zhang X, Li J. Identification of genes involved in immune response, microsatellite and SNP markers from expressed sequence tags generated from hemocytes of freshwater pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*). *Marin Biotechnol*, 2009, 11(4): 520–530. [\[DOI\]](#)
- [12] 汪桂玲, 李家乐. 淡水育珠蚌外套膜提取总 RNA 的改良方法. 生物技术通报, 2008, (z1): 356–357.
- [13] 王佳, 张利平, 杨联, 费春红, 王磊, 谢超, 吴建平. 山羊、绵羊 MT-IV 分子特性研究. 遗传, 2008, 30(12): 1591–1596.
- [14] Lambert C, Leonard N, de Bolle X, Depiereux E. ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures. *Bioinformatics*, 2002, 18(9): 1250–1256. [\[DOI\]](#)
- [15] Aumann KD, Bedorf N, Brigelius-Flohé R, Schomburg D, Flohé L. Glutathione peroxidases revisited-simulation of the catalytic cycle by computer-assisted molecular modeling. *Biomed Environ Sci*, 1997, 10(2–3): 136–155.
- [16] Yeh SP, Liu KF, Chiu ST, Jian SJ, Cheng W, Liu CH. Identification and cloning of a selenium dependent glutathione peroxidase from giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, DOI:10.1016/j.fsi.
- [17] Bae YA, Cai GB, Kim SH, Zo YG, Kong Y. Modular evolution of glutathione peroxidase genes in association with different biochemical properties of their encoded proteins in invertebrate animals. *BMC Evol Biol*, 2009, DOI: 10.1186/1471-2148-9-72. [\[DOI\]](#)
- [18] 马森. 谷胱甘肽过氧化物酶和谷胱甘肽转硫酶研究进展. 动物医学进展, 2008, 29(10): 53–56.
- [19] Chu FF, Doroshow JH, Esworthy RS. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidases, GSHPx-GI. *J Biol Chem*, 1993, 268(4): 2571–2576.
- [20] Vernet P, Rock E, Mazur A, Rayssiguier Y, Dufaure JP, Drevet JR. Selenium-independent epididymis-restricted glutathione peroxidase 5 protein(GPX5) can back up failing Se-dependent GPxs in mice subjected to selenium deficiency. *Mol Reprod Dev*, 1999, 54(4): 362–370.
- [21] Toppo S, Vanin S, Bosello V, Tosatto SCE. Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase(Gpx) superfamily. *Antioxidants Redox Signal*, 2008, 10(9): 1501–1513. [\[DOI\]](#)
- [22] Dear TN, Campbell K, Rabbitts TH. Molecular cloning of putative odorant-binding and odorant-metabolizing proteins. *Biochemistry*, 1991, 30(43): 10376–10382. [\[DOI\]](#)
- [23] Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehab O, Guigó R, Gladyshev VN. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, 2003, 300(5624): 1439–1443.
- [24] Kvalica J. Selenium and the organism. *Cas Lek Cesk*, 1999, 138(4): 99–106.
- [25] Sayed AA, Cook SK, Williams DL. Redox balance mechanisms in *Schistosoma mansoni* rely on peroxiredoxins and albumin and implicate peroxiredoxins as novel drug targets. *J Biol Chem*, 2006, 281(25): 17001–17010. [\[DOI\]](#)
- [26] Epp O, Ladenstein R, Wendel A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. *Eur J Biochem*, 1983, 133(1): 51–69. [\[DOI\]](#)
- [27] Fukuhara R, Kageyama T. Structure, gene expression, and evolution of primate glutathione peroxidases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2005, 141(4): 428–436. [\[DOI\]](#)
- [28] Liu CH, Tseng MC, Cheng W. Identification and cloning of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidases, of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its expression following *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 23(1): 34–45. [\[DOI\]](#)
- [29] 刘萃红. 镉对淋巴细胞谷胱甘肽过氧化物酶的影响. 中国误诊学杂志, 2002, 2(5): 662–663.