

文章编号: 1000-0615(2016)11-1664-10

DOI: 10.11964/jfc.20150810046

斑节对虾含硒谷胱甘肽过氧化物酶基因全长克隆及表达分析

唐 蕾^{1,2}, 傅明骏^{1,3}, 赵 超^{1,3}, 邱丽华¹, 刘文生², 江世贵^{1*}

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300;

2. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642;

3. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 热带水产研究开发中心, 海南 三亚 572018)

摘要: 为了研究含硒谷胱甘肽过氧化物酶(selenium-dependent glutathione peroxidase, Se-GPx)在斑节对虾应激反应和卵巢发育中的作用, 实验以斑节对虾肝胰腺转录组数据中筛选获得的*Se-GPx*基因(*Pm Se-GPx*)片段为基础, 利用RACE技术获得*Pm Se-GPx*基因的cDNA全长, 并对其进行了生物信息学分析; 利用荧光定量PCR技术研究了*Pm Se-GPx*在斑节对虾不同组织、卵巢发育各期、肝胰腺组织在pH9、硫酸铜(Cu²⁺)应激下的相对表达量和变化趋势。结果显示, *Pm Se-GPx*基因cDNA全长为959 bp, 5'非编码区(UTR)长10 bp, 开放阅读框(ORF)长639 bp, 编码212个氨基酸, 310 bp的3'UTR包含一个硒代半胱氨酸插入序列(SECIS), ORF中的密码子²⁰⁹TGA²¹¹编码硒代半胱氨酸(selenocysteine, U⁶⁷)。实时定量PCR实验结果表明, *Pm Se-GPx*在斑节对虾的肝胰腺、卵巢、精巢、心脏等组织中均有表达, 其中肝胰腺中表达量显著高于其他组织, 卵巢次之; 卵巢发育阶段表达结果则显示*Pm Se-GPx*在卵巢发育各期均有表达, 在卵巢Ⅲ期表达量最高, 其次是V期; 在Cu²⁺胁迫下, 其表达量总体呈现先下降后上升然后又下降的趋势; 在环境pH为9胁迫下, 表达趋势呈现先下降, 后回升, 然后又下降, 再大幅上升的趋势。研究表明, Se-GPx在斑节对虾卵巢发育过程中具有重要作用, 且Se-GPx参与斑节对虾对环境理化因子应激的免疫调控。

关键词: 斑节对虾; 含硒谷胱甘肽过氧化物酶; 卵巢发育; Cu²⁺胁迫

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)是在抗氧化防御系统中起到重要作用的一类功能蛋白质, 它能够以谷胱甘肽(glutathione, GSH)或硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)为电子供体清除体内多余的过氧化氢和磷脂过氧化物, 从而保护机体免受氧化损伤。目前在动物体内发现了8种GPx, 分别为GPx1~8, 并根据GPxs催化活性中心氨基酸序列是否携带有一个特殊的硒代半胱氨酸(selenocysteine, SeCys), 其有助于提高其催化活性, 将GPx区分为含硒GPx和不含GPx^[1]。以SeCys作为氧化反应活性中心的GPxs多

以谷胱甘肽(GSH)为底物, 其反应中心通常由催化四联体(硒代半胱氨酸、色氨酸、天冬酰胺和谷氨酸)组成^[2]。除了具有共同的抗氧化功能外, 不同GPxs亚型还具有各自独特的生物学功能。目前GPxs的研究主要集中在人类医学上, 在甲壳动物中的研究较少。在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)、刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)和拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)等甲壳动物中对含硒谷胱甘肽过氧化物酶基因进行了克隆和表达分析, 但并未有明显的亚型区分^[2-6]。

收稿日期: 2015-08-24 修回日期: 2016-07-05

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-47); 广东省科技计划项目(2014B020202003); 海南省应用技术研发与示范推广专项(ZDXM2015056); 深圳市生物产业发展专项资金现代农业生物产业推广扶持计划(NYSW20140331010053)

通信作者: 江世贵, E-mail: jiangsg@scsfri.ac.cn

由于近年来水产养殖水体经常出现绿藻爆发等现象, 容易引起水体pH变化, 而CuSO₄作为杀藻剂在水产养殖中应用广泛, 这些环境因素的变化会对水产动物产生一定的影响。GPxs可作为环境胁迫条件下水生生物体内抗氧化性的检测指标。低盐度胁迫能促进黄姑鱼(*Nibea albiflora*)抗氧化系统的增强, GSH-Px在一定盐度范围内呈先上升后下降的趋势^[7]。氨氮胁迫下凡纳滨对虾的GPx活性显著上升, 投喂抗坏血酸丰富的卤虫可增加凡纳滨对虾的抗氧化能力^[8]。氨氮胁迫过程中脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)的血淋巴GPx活力和GPx基因表达显著高于对照组, 而肝胰腺中GPx基因表达在48~72 h有所下降, 结果可推测肝胰腺可能是脊尾白虾主要的氨氮代谢中心^[9]。本实验克隆了斑节对虾*Pm Se-GPx*基因cDNA全长, 研究了该基因的组织差异性表达、卵巢发育周期中表达水平变化、在CuSO₄胁迫和pH 9胁迫下的斑节对虾*Se-GPx*基因的表达变化趋势, 研究结果将有助于阐明*Se-GPx*在斑节对虾卵巢发育中的调控机制及机体对环境理化因子应激机制。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验所用斑节对虾组织样及卵巢发育各期样本采于海南三亚(120~200 g), 取脑、心脏、肌肉、胸神经、肝胰腺、鳃、淋巴器官、精巢、卵巢等组织, 所需的斑节对虾不同卵巢发育阶段判断可依据黄建华等^[10]的研究, 每组取3个平行, 加入RNAlater溶液(Life Technologies, USA) 4 °C保存过夜, 然后转移到-80 °C保存。

1.2 实验方法

环境理化因子胁迫 环境理化因子胁迫实验在深圳试验基地开展, 实验所用斑节对虾体重为15~20 g, 实验分别使用硫酸铜浓度为7.73 mg/L^[11]和pH 9的海水, 每天换水两次, 分别在0、6、12、24、48、96 h时取肝胰腺组织, 每组取3个平行, 加入RNAlater溶液(Life Technologies, USA) 4 °C保存过夜, 然后转移到-80 °C保存。

RNA提取和逆转录 根据TRIzol(Life Technologies, USA)说明书提取斑节对虾各组织、卵巢发育各期、应激不同时间段的肝胰腺组

织。各取2 μL RNA用1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性, 取2 μL RNA用核酸蛋白分析仪Nanodrop2000进行浓度检测。

各取3 μg肝胰腺总RNA用SMART™RACE kit (Clontech, USA)进行逆转录合成cDNA和3' RACE cDNA, 用于基因片段的验证及基因全长的扩增。取1 μg各样本RNA, 用Prime Script™Real-time PCR Kit (TaKaRa, Japan)进行逆转录合成cDNA, 用于基因表达情况的检测。

RACE扩增*Pm Se-GPx*基因全长 以斑节对虾肝胰腺转录组数据中筛选获得*Pm Se-GPx*的部分序列为基础, 设计*Pm Se-GPx*的3'RACE引物*Se-GPx-rF1*和*Se-GPx-rF2*(表1)。以斑节对虾3'cDNA为模板, 加入*Se-GPx-rF1*和UPM引物进行第一次特异性扩增, PCR体系总体积为25 μL, 分别为16.2 μL RNase Free ddH₂O, 2.5 μL 10×Ex Taq Buffer, 2 μL dNTP Mix (10 μmol/L), 1 μL 3'cDNA, 0.5 μL *Se-GPx-rF1* (10 μmol/L), 2.5 μL UPM, 0.3 μL Ex Taq。扩增程序为94 °C预变性3 min; 94 °C变性30 s, 72 °C退火30 s, 72 °C延伸3 min, 5个循环; 94 °C变性30 s, 63 °C退火30 s, 70 °C延伸3 min, 5个循环; 94 °C变性30 s, 68 °C退火30 s, 72 °C延伸3 min, 25个循环; 72 °C延伸10 min, 4 °C保存10 min。然后以PCR产物为模板进行第二次特异性扩增, PCR体系总体积为25 μL, 分别为18.2 μL RNase Free ddH₂O, 2.5 μL 10×Ex Taq Buffer, 2 μL dNTP Mix (10 μmol/L), 1 μL 3'cDNA, 0.5 μL *Se-GPx-rF2* (10 μmol/L), 0.5 μL NUP, 0.3 μL Ex Taq。设置一个空白对照, 用同体积ddH₂O代替*Se-GPx-rF2*,

表 1 引物序列

Tab. 1 Nucleotide sequences of primers

引物名称 primers	引物序列 sequences of primers
Se-GPx-F	GTGGAAAGCTGGATGA
Se-GPx-R	ACTACGACAAAGAGTGGACC
Se-GPx-rF1	ACAGCGAGGACCCAATCTACACG
Se-GPx-rF2	GGAGGACCTGAAGGGGGACATCA
Se-GPx-qF	GAGGAATACCGAGGGAAAG
Se-GPx-qR	AAGGGAAGCCAAGAATGA
18S-qF	GAGACGGCTACCACATCTAAG
18S-qR	ATACGCTAGTGGAGCTGGA

同一条件扩增。扩增程序为94 °C预变性3 min; 94 °C变性30 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸3 min, 35个循环; 72 °C延伸10 min, 4 °C保存10 min。用浓度为1.2%的琼脂糖凝胶检测产物, 然后用2%的琼脂糖凝胶电泳, 对目的条带进行割胶回收。PCR产物按与pMD18-T载体16 °C连接过夜, 转化涂板, 挑取单克隆摇菌, 菌液PCR检测目的条带正确导入后送公司测序^[12]。

Pm Se-GPx基因验证 根据斑节对虾肝胰腺腺转录组中的*Pm Se-GPx*的部分序列及3'RACE结果, 设计*Pm Se-GPx*的上下游验证引物Se-GPx-F和Se-GPx-R(表1)。以斑节对虾肝胰腺cDNA为模板, Se-GPx-F和Se-GPx-R为引物进行扩增, PCR体系总体积为25 μL, 分别为18.2 μL RNase Free ddH₂O, 2.5 μL 10×Ex Taq Buffer, 2 μL dNTP Mix (10 μmol/L), 1 μL 3'cDNA, 0.5 μL Se-GPx-F (10 μmol/L), 0.5 μL Se-GPx-R (10 μmol/L), 0.3 μL Ex Taq。扩增程序为94 °C预变性3 min; 94 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸3 min, 35个循环; 72 °C延伸10 min, 4 °C保存10 min。琼脂糖凝胶检测PCR产物, 按上述方法进行克隆、测序验证。

序列及系统发生分析 利用NCBI数据库中VecScreen、Blast、ORF Finder等软件分析测序结果。使用DNAMAN软件对已验证序列进行片段的拼接。使用ExPASy软件(http://web.expasy.org/compute_pi/)进行等电点及分子量的预测、功能位点的查找。使用NetPhos 2.0 server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)查找磷酸化位点; 用SMART软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行蛋白结构域和功能域的预测和分析。用在线软件SECISearch (<http://genome.unl.edu/SECISearch.html>)查找序列硒插入片段。采用SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>)在线软件进行蛋白质三级结构的预测。用Clustal-X软件对不同物种同源序列进行多重序列比对, 用MEGA 5.0进行聚类分析, 并采用Neighbour-joining方法构建系统进化树。

Pm Se-GPx基因的表达情况 以扩增得到的*Pm Se-GPx*基因和内参基因18S序列, 设计定量引物Se-GPx-qF和Se-GPx-qR、18S-qF和18S-qR(表1), 对斑节对虾各组织、卵巢发育各期、CuSO₄胁迫和pH9胁迫下的*Pm Se-GPx*基因的表达量进行检测。反应总体积为10 μL, 5 μL SYBR、1.5 μL

模板、0.3 μL的上游引物和0.3 μL的下游引物, 双蒸水补足10 μL。使用Lightcycler 480II定量PCR仪, 反应条件为95 °C预变性30 s; 95 °C变性20 s, 60 °C退火60 s, 45个循环; 65 °C延伸15 s; 溶解温度从55 °C升至97 °C; 37 °C冷却5 min。每个样品进行3个重复操作, 基因表达量用2^{-ΔΔCt}法计算, 实验数据用SPSS软件进行统计分析。

2 结果

2.1 *Pm Se-GPx*基因的克隆与序列分析

*Pm Se-GPx*基因(GenBank登录号: KR908787)全长为959 bp, 开放阅读框长639 bp, 编码212个氨基酸, 5'非编码区10bp, 3'非编码区310 bp。在28 bp的polyA尾前14 bp处有个加尾信号。预测等电点为4.61, 分子量为23.65 ku(图1)。序列含有10个磷酸化位点(Ser¹⁵⁰、Ser¹⁹⁵、Thr¹⁰⁷、Thr¹²⁹、Tyr³⁵、Tyr¹¹⁷、Tyr¹⁴⁵、Tyr¹⁵⁶、Tyr¹⁶⁴、Tyr¹⁹⁰), 1个糖基化位点(⁴³NGS⁴⁵)。氨基酸序列第67位氨基酸为特殊的硒代半胱氨酸(U⁶⁷)。

2.2 *Pm Se-GPx*硒插入片段(SECIS)预测

用SECISearch 2.19软件预测斑节对虾*Se-GPx*基因的3'-UTR有92bp的硒代半胱氨酸插入片段(SECIS), 形成一个茎环状二级结构(图2)。与人类GPx3的硒插入片段相比较可以看出相似度很高, 都属于二型硒插入片段^[12], 斑节对虾*Se-GPx*硒插入片段含有一个顶环, 4个内环, 3个折叠, 保守的腺嘌呤(AA)在内环上。

2.3 *Pm Se-GPx*蛋白三级结构预测

利用SWISS-MODEL网站进行*Pm Se-GPx*蛋白质三级结构的预测, 以人类GPx3的三维结构(图3-a)作为模板[PDB code: 2r37.1.A], 用三级结构查看软件PyMOL对*Pm Se-GPx*的蛋白序列进行空间三维结构的模拟(图3-b)。结果可知, 其蛋白结构由6个β-片层、6个α-螺旋及连接的无规则卷曲构成, 与人类的GPx3蛋白三级结构相似性为49.11%, 整体蛋白构像均呈袋状。

2.4 进化树构建

用MEGA5.0软件构建斑节对虾与其他物种GPxs系统发育树, 不同物种的GPx1、GPx2、GPx3和GPx4明显地分别聚为一支, 甲壳动物的GPx(拟穴青蟹、凡纳滨对虾、斑节对虾、罗氏

```

1 GAGGGACATCATGgaccgctggtgctctgctgctcggggctgactcgtgacccccgctgcccagggtcatctcgaaacgcgctgtggagaagtt 100
1      M D R L V P L L L G V A L V T P G L A E V I S K R A C G E V      30
101 gcggtgacttctaccagttctccccaagacccttaacggttcgaacctcatcacttcgaggaataccgaggaaggtgtgtgctggtgccaactgg 200
31 A G D F Y Q F S A K T L N G S N L I D F E E Y R G K V L L V A N V A 64
201 cgacctactgagggtccacctcccctctgacaacaaatgaatgcacttgcgaatactacgagggccaagatttcgtcattcttggcttcccttggca 300
65 T Y U G L T I P S Y N Q M N A L A E Y Y E G Q D F V I L G F P C N 97
301 ccagttcggtctgcaagagccccggagccacggccgatgagctcctaaacggctccgttacgctcgggtggcggttcgagccccgatgaccatc 400
98 Q F G L Q E P G A T A D E L L N G V R Y V R P G G G F E P R M T I 130
401 ttccagaagacgcaggtcaacggggacagcagggaccaccaatctacagttcttgaagagcggctgtgaatacacagacacggacttttcttgggtctgt 500
131 F Q K T Q V N G D S E D P I Y T F L K S G C E Y T D T D F S S G L Y 164
501 actacgagcctcttgggtcggggatctccattggaacttcgaaaaattcctcattaacaggggaagaaaaccgctctacaggtaccaccgctcctgct 600
165 Y E P L R V G D L H W N F E K F L I N R E G K P V Y R Y H P S V V 197
601 cgaccggagacctgaagggggacatcaactccctccttaatgctTAAAAAGGACCCGTAACCTGGCCTATAAGGAAAGCCCTGTCTCTGATCCA 700
198 D P E D L K G D I N S L L N A * 212
701 GAAGCCACGCCTACGAGTGCCCTTACGTATGACCCATCGCCGTAACCTTCGGGAGGCGGTGTGTGAGGGGGCGAGGGCGGGCGCTCTTGTGCAT 800
801 TCTGCTCGCCGCTCTCTGTCCCTGGGCACTGTGGCGTGGCTATGGCGTGGAGCGTGGCTGAACATCTACCTCCGTGCCGATCAACGAACTCAA 900
901 ACTGATTTTGTAAATAATTGTTGTTACACGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 959
    
```

图 1 *Pm Se-GPx*基因的cDNA全长序列及编码的氨基酸序列

双下划线为信号肽(M¹-A¹⁹), 方框为谷氨酰胺还原酶活性位点(G⁵⁵-T⁷⁰), 加粗字体为起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA), 圆圈标注为硒代半胱氨酸(U⁶⁷), 波浪线为加尾信号(TAATAA), 斜体为磷酸化位点(S¹⁵⁰、S¹⁹⁵、T¹⁰⁷、T¹²⁹、Y³⁵、Y¹¹⁷、Y¹⁴⁵、Y¹⁵⁶、Y¹⁶⁴、Y¹⁹⁰), 灰色阴影为糖基化位点(⁴³NGS⁴⁵)。

Fig. 1 The cDNA and amino acid sequences of gene encoding GPx3 from *P. monodon*

Double underline indicates the signal peptide (M¹-A¹⁹). Glutamine reductase activity sites (G⁵⁵-T⁷⁰) are labeled in box. The translation initiation codon (ATG) and termination codon (TAA) are indicated in bold. Selenium cysteine (U⁶⁷) is shown by circle. wavy line indicates the polyadenylation signals (TAATAA) in the UTR. The phosphorylation sites (S¹⁵⁰、S¹⁹⁵、T¹⁰⁷、T¹²⁹、Y³⁵、Y¹¹⁷、Y¹⁴⁵、Y¹⁵⁶、Y¹⁶⁴、Y¹⁹⁰) are shown by italics, the glycosylation site (⁴³NGS⁴⁵) is marked by grey shade

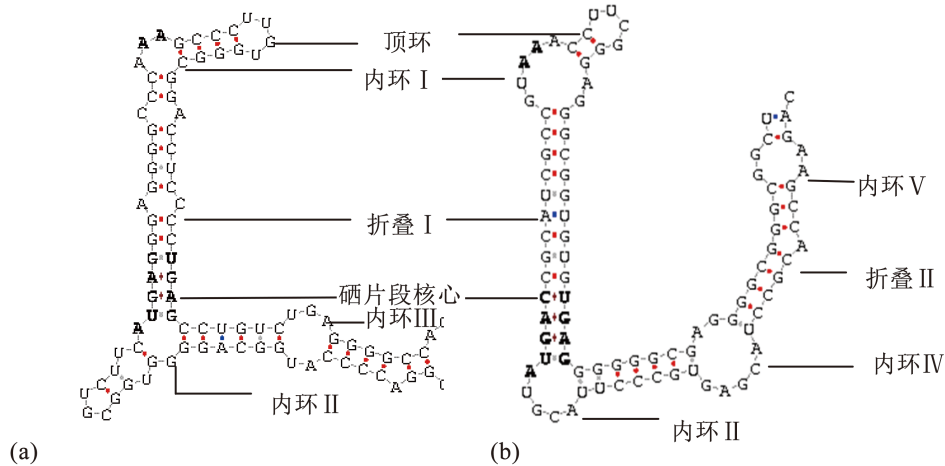


图 2 斑节对虾(a)与人类(b)硒插入片段比较

Fig. 2 Comparison of selenocysteine insertion sequence (SECIS) elements of *H. sapiens* GPx3 (a) with *P. monodon* GPx (b)

沼虾)单独聚为一支, 并与GPx1和GPx2聚为一个
 大支, 斑节对虾Se-GPx与褶纹冠蚌的GPx聚为一
 小支, 然后与其他物种GPx3、刀额新对虾卵巢
 特异表达GPx聚为一支(图4)。

2.5 多重序列比对

用Bioedit进行多重序列比对, 斑节对虾Se-
 GPx与其他物种的GPx3一致性较低, 但其催化四
 联体(Se⁶⁷、Gln¹⁰²、Trp¹⁷⁵和Asn¹⁷⁶)保守性很高。

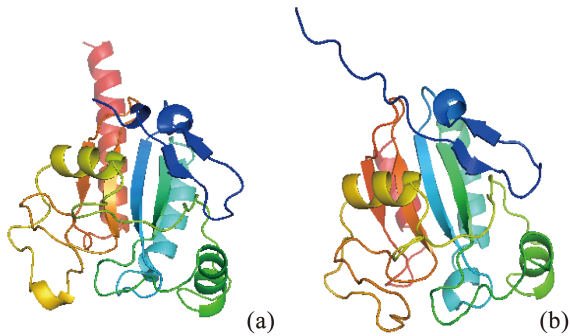


图3 Pm Se-GPx蛋白三级结构预测

(a)人类GPx3的三维结构, (b)斑节对虾Se-GPx的三维结构

Fig. 3 Prediction of the tertiary structure of Pm Se-GPx protein

(a) indicates the three-dimensional space structure of human,

(b) indicates the three-dimensional space structure of *P. monodon*

一致性最高的矛尾鱼(*Latimeria chalumnae*)为45.28%,与金领娇鹁(*Manacus vitellinus*)、青鳉(*Oryzias latipes*)和正毛丝鼠(*Chinchilla lanigera*)一致性为41.98%,与红鳍东方鲀(*Chinchilla lanigera*)和金仓鼠(*Mesocricetus auratus*)一致性为41.51%,白斑狗鱼(*Esox lucius*)、布氏鼠耳蝠(*Myotis brandtii*)和短尾负鼠(*Monodelphis domestica*)的一致性分别为41.04%、40.09%和39.62%(图5)。

2.6 Pm Se-GPx基因表达情况

Pm Se-GPx基因在各组织的表达 用实时荧光定量的手段检测Pm Se-GPx基因在不同组织中表达水平的变化,以18S为内参基因(图6)。由图可知,Pm Se-GPx基因在斑节对虾所检测的9种组织(脑、胸神经、心脏、肝胰腺、肌肉、淋巴器官、鳃、精巢和卵巢等)中均有表达,其中肝胰腺表达量最高,为鳃的81倍,卵巢次之,与其他组织的表达水平都有显著性的差异($P<0.05$)。

Pm Se-GPx基因在卵巢各期的表达 用实时荧光定量方法检测Pm Se-GPx基因在斑节对虾卵巢不同的发育时期的表达水平的变化(图7),斑节对虾卵巢的不同发育时期呈上升趋势。Pm Se-GPx在I期时表达量较低,在卵巢发育前期II期中表达骤然升高($P<0.05$),为I期的2.2倍;随后在III期继续升高,达到峰值,为I期的2.8倍;IV期略有下降,但与其他时期无显著差异($P>0.05$);在成熟期V期时有升高趋势,为I期的2.7倍。

CuSO₄胁迫Pm Se-GPx基因的表达 斑节对虾经浓度为7.73 mg/L的CuSO₄胁迫后不同时间段取样,用实时荧光定量方法检测Pm Se-GPx基因水平的变化(图8),表达结果总体趋势为先下调后上调后又下调,暴露48 h后Pm Se-GPx的表达量有一个显著上调的过程,到96 h又明显抑制($P<0.05$)。

pH9胁迫Pm Se-GPx基因的表达 斑节对虾经pH 9胁迫后不同时间段取样,用实时荧光定量方法检测Pm Se-GPx基因在肝胰腺中的表达水平的变化,结果如图9所示,pH 9的胁迫条件下Pm Se-GPx基因表达水平总体也是明显的下调趋势,在24 h左右有小幅回升,但在96 h左右又大幅度回升。

3 讨论

GPxs目前在人类中发现8种,且每种亚型具不同的生物学功能^[13]。本实验从斑节对虾肝胰腺转录组中筛选获得了斑节对虾Se-GPx基因的一段序列,克隆获得其全长,并命名为Pm Se-GPx(GenBank登录号:ALM09356.1)。信号肽预测结果显示Pm Se-GPx有19个氨基酸的信号肽,表明该蛋白是分泌性蛋白。通过Blast比对和进化树分析发现斑节对虾Se-GPx其他物种的GPxs同属于GPxs家族,而且与GPx3亚型聚为一支,可推测其为GPx3亚型。Pm Se-GPx氨基酸序列与其他物种的GPx3氨基酸序列进行多重序列比对发现Pm Se-GPx与其他物种的GPx3一致性较差,最高只有45.28%。结果预示着甲壳动物的GPxs家族可能与哺乳动物GPxs家族的进化过程有一定差异,其原因有待进一步深入研究。

台湾学者从斑节对虾血细胞中克隆表达出一个含硒GPx基因(GenBank登录号:GQ996722),其cDNA全长为1321 bp,开放阅读框为564 bp的,编码187个氨基酸^[4]。该GPx与本研究的Pm Se-GPx两者均为含硒GPx,3'非编码区含有一个硒插入片段,与Pm Se-GPx氨基酸序列比对一致性仅为38.5%。进化树分析结果显示,PmGPx与脊椎动物GPxs家族中的GPx1和GPx2亚型聚为一支,而Pm Se-GPx与脊椎动物GPxs家族中的GPx3亚型聚为一支,因此可推测,它们为斑节对虾GPxs家族不同的GPx亚型。PmGPx经半定量检测结果显示其在各组织均有表达,Pm Se-GPx荧光定量

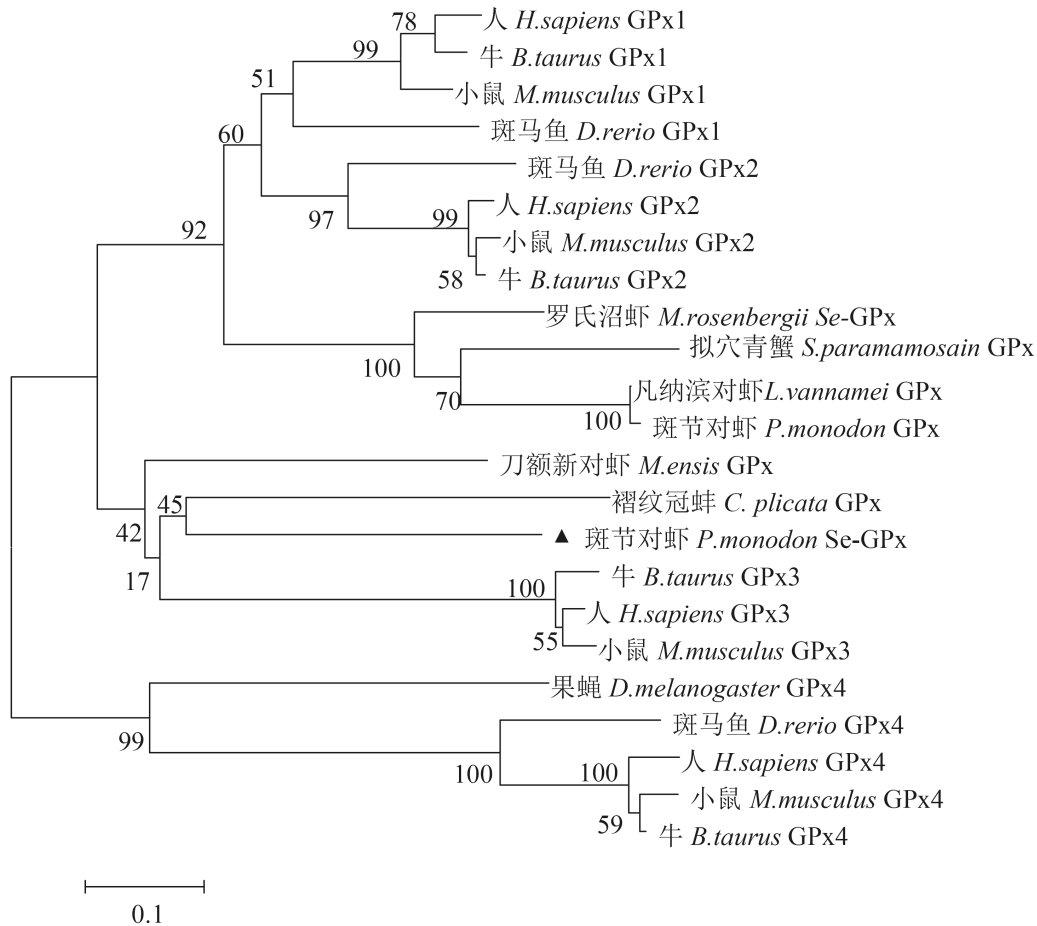


图 4 邻位法构建的GPxs系统发育树

Fig. 4 NJ phylogenetic tree based on GPxs

Litopenaeus vannamei(凡纳滨对虾GPx: AAY41441.1), *Macrobrachium rosenbergii*(罗氏沼虾Se-GPx: ACM68948.1), *Metapenaeus ensis*(刀额新对虾GPx: ACB42236.1), *Scylla paramamosain*(拟穴青蟹Se-GPx: AEN69448.1), *Penaeus monodon*(斑节对虾GPx: predicted amino acid sequence from GQ996722.1, Se-GPx: ALM09356.1), *Homo sapiens*(人GPx1: NP_000572.2, GPx2: NP_002074.2, GPx3: NP_002075.2, GPx4: NP_001034937.1), *Mus musculus*(小鼠GPx1: NP_032186.2, GPx2: AAD41533.1, GPx3: NP_032187.2, GPx4: NP_001032830.2), *Bos taurus*(牛GPx1: NP_776501.1, GPx2: NP_001156611.1, GPx3: AAA16579.2, GPx4: NP_777195.1), *Drosophila melanogaster*(果蝇GPx4: AAF47761.1), *Cristaria plicata*(褶皱纹冠蚌GPx: ADL62715.1), *Danio rerio*(斑马鱼GPx1: NP_001007282.2, GPx2: XP_009291566.1, GPx4: NP_001025241.2), 本研究斑节对虾Se-GPx用黑色三角形标明

结果显示其在各组织中均有表达, 在肝胰腺中表达量最高, 结果推测斑节对虾不同亚型的GPxs具有组织特异性表达。

目前对于GPxs的研究在人类、哺乳动物及植物中较为深入, 解析了其在机体内的功能结构与作用机制, 脊椎动物中GPxs家族不同亚型具有组织特异性表达。有研究表明GPx3主要在山羊的肾脏中表达, 其次是心脏、肝胰腺和睾丸^[14], 而斑节对虾Se-GPx的组织表达结果显示, 其在各组织均有表达, 但在斑节对虾肝胰腺中表达量最高, 其次为卵巢, 与上述研究结果相似, 该基因除了抗氧化能力外还可能参与斑节

对虾卵巢组织的发育。而其在卵巢发育各期表达结果显示, 随着卵巢成熟, *Pm Se-GPx*表达量呈上升趋势。刀额新对虾GPx在卵巢发育过程中的表达量也是随着卵巢的成熟先上升后下降^[15], 与本实验结果相符。结果推测可能是因为在卵巢的快速发育时期会产生大量的代谢产物需要进行清理, 因此Se-GPx表达量上升, 以保护卵巢免受氧化伤害。

Cu²⁺胁迫后*Pm Se-GPx*的表达量明显被抑制, 在48 h左右的明显上调可能是因为机体在48 h左右对外界毒性产生的适应性表现, 因此出现回升, 但由于毒性较强, 细胞结构受到破坏, 所

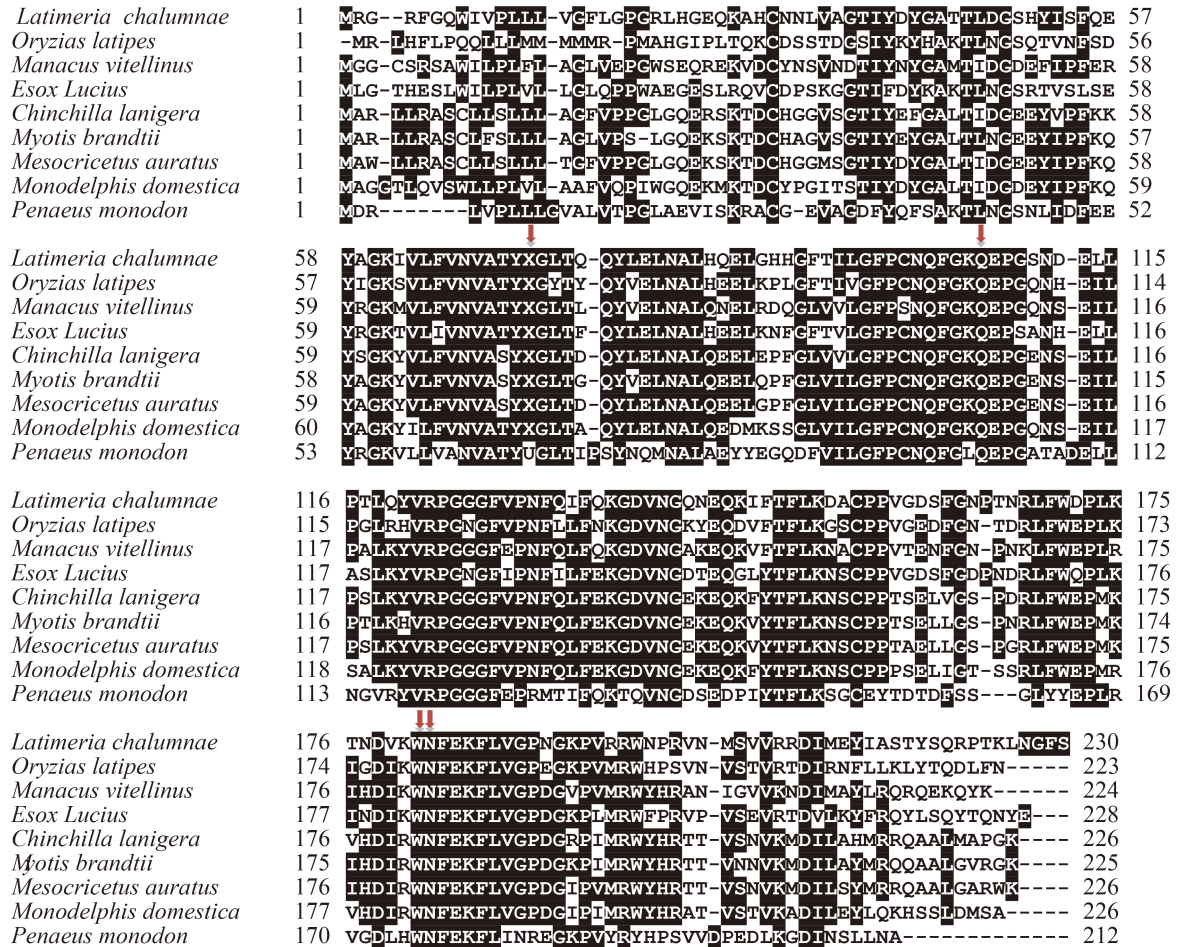


图5 Se-GPx多重序列比对

黑色阴影为相同序列；箭头所指位置表示催化四联体(硒代半胱氨酸U/X、谷氨酰胺Q、色氨酸W和天冬酰胺N)

Fig. 5 Multiple alignment of the Se-GPx

Black shadows indicate the same sequences; the arrows indicate the sites of catalysis of couplet of four(selenocysteine U/X, glutamine Q, tryptophan W and asparagine N)

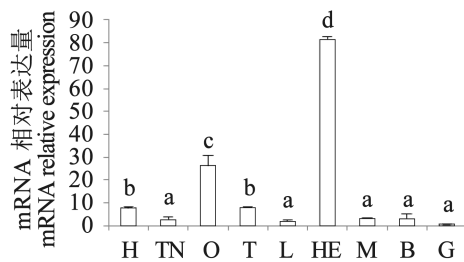


图6 斑节对虾Se-GPx基因在各组织中的表达量

H: 心脏; TN: 胸神经; O: 卵巢; T: 精巢; L: 淋巴器官; HE: 肝胰腺; M: 肌肉; B: 脑; G: 鳃。相同字母表示差异性不显著($P>0.05$), 不同字母表示差异性显著($P<0.05$)

Fig. 6 Distribution of Se-GPx gene expression in different tissues of *P. monodon*

H: heart, TN: thoracic nerve, O: ovary, T: testis, L: lymphoid organs, HE: hepatopancreas, M: muscle, B: brain, G: gill. The same letter indicates no significant difference ($P>0.05$), different letters mean significant difference ($P<0.05$)

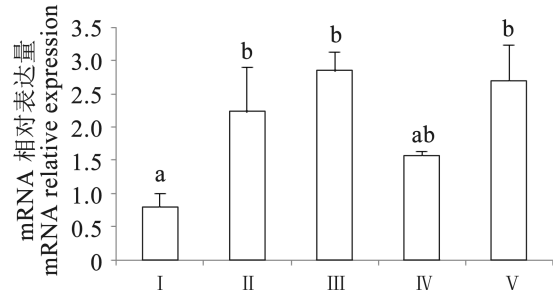


图7 斑节对虾Se-GPx基因在卵巢发育各期的表达量

相同字母表示差异性不显著($P>0.05$), 不同字母表示差异性显著($P<0.05$)

Fig. 7 Distribution of *Pm* Se-GPx gene expression in ovary developmental stages of *P. monodon*

The same letter indicates no significant difference ($P>0.05$), different letters mean significant difference ($P<0.05$)

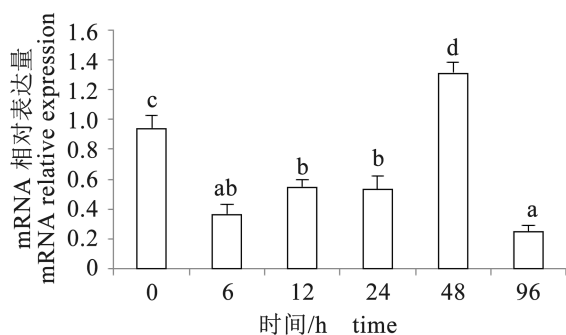


图 8 斑节对虾 *Se-GPx* 基因在 CuSO_4 胁迫后各时间的表达量

相同字母表示差异性不显著 ($P>0.05$), 不同字母表示差异性显著 ($P<0.05$)

Fig. 8 Distribution of *Se-GPx* gene expression in stress of CuSO_4 in *P. monodon*

The same letter indicates no significant difference ($P>0.05$), different letters mean significant difference ($P<0.05$)

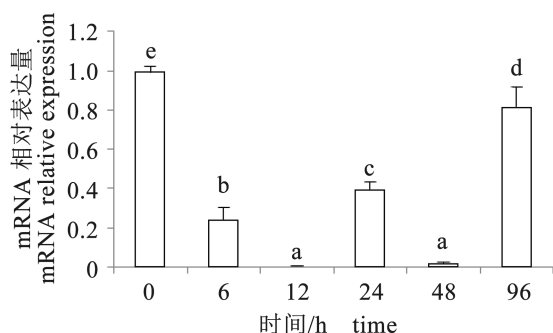


图 9 斑节对虾 *Se-GPx* 基因在 pH9 胁迫的表达量

相同字母表示差异性不显著 ($P>0.05$), 不同字母表示差异性显著 ($P>0.05$)

Fig. 9 Distribution of *Se-GPx* gene expression in stress in pH 9 in *P. monodon*

The same letter indicates no significant difference ($P>0.05$), different letters mean significant difference ($P>0.05$)

以 *Pm Se-GPx* 的表达量随着时间延长又呈现被抑制的趋势。pH9 胁迫条件下斑节对虾 *Se-GPx* 表达量的结果显示, 表达量总趋势呈现明显的抑制, 在 24 h 左右小幅度回升, 然后继续受到抑制, 但是在 96 h 时有明显上调, 结果可推测, 碱性胁迫可能诱导 *Se-GPx* 的表达, 结果与 Wang 等^[16] 研究得到酸碱性均可诱导凡纳滨对虾 *GPx3* 基因表达上升的结果一致。由以上结果我们可以推测斑节对虾的 *Se-GPx* 基因可能参与机体的胁迫应激反应。

GPxs 家族成员在哺乳动物中的研究已相当透彻, 但在水产动物中研究还较为简单, 与哺乳

动物的 GPxs 家族差异较大, 因此还需要进一步的研究工作以验证其功能。

参考文献:

- [1] Epp O, Ladenstein R, Wendel A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1983, 133(1): 51-69.
- [2] Liu C H, Tseng M C, Cheng W. Identification and cloning of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its expression following *Vibrio alginolyticus* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(1): 34-45.
- [3] Yeh S P, Liu K F, Chiu S T, et al. Identification and cloning of a selenium dependent glutathione peroxidase from giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27(2): 181-191.
- [4] Liu K F, Yeh M S, Kou G H, et al. 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[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2010, 34(9): 935-944.
- [5] 王雪参, 王文锋, 刘方, 等. 日本沼虾含硒谷胱甘肽过氧化物酶全长克隆及表达分析[J]. *水生生物学报*, 2012, 36(6): 1113-1118.
Wang X S, Wang W F, Liu F, et al. Full-length cDNA cloning and expression analysis of selenium dependent glutathione peroxidase from *Macrobrachium nipponense*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36(6): 1113-1118 (in Chinese).
- [6] 刘春云, 傅明骏, 张子平, 等. 拟穴青蟹 *PHGPx* 基因的克隆及其表达分析[J]. *水产学报*, 2015, 39(2): 161-173.
Liu C Y, Fu M J, Zhang Z P, et al. Molecular cloning and expression analysis of *Sp-PHGPx* in *Scylla paramamosain*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(2): 161-173 (in Chinese).
- [7] 张晨捷, 张艳亮, 高权新, 等. 低盐胁迫对黄姑鱼幼鱼肝脏抗氧化功能的影响[J]. *南方水产科学*, 2015, 11(4): 59-64.
Zhang C J, Zhang Y L, Gao Q X, et al. Effect of low salinity stress on antioxidant function in liver of juvenile *Nibea albiflora*[J]. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(4): 59-64 (in Chinese).
- [8] Wang W N, Wang Y, Wang A L. Effect of supplemental L-ascorbyl-2-polyphosphate (APP) in enriched live food on the immune response of *Penaeus vannamei* exposed

- to ammonia-N[J]. *Aquaculture*, 2006, 256(1-4): 552-557.
- [9] 任海, 李健, 李吉涛, 等. 急性氨氮胁迫对脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) 抗氧化系统酶活力及 GPx 基因表达的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2014, 33(4): 647-655.
- Ren H, Li J, Li J T, *et al.* Effects of acute ammonia stresses on antioxidant enzyme activities and GPx gene expression in *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2014, 33(4): 647-655 (in Chinese).
- [10] 黄建华, 马之明, 周发林, 等. 南海北部野生斑节对虾卵巢解剖结构及组织学的研究[J]. *南方水产*, 2005, 1(3): 49-53.
- Huang J H, Ma Z M, Zhou F L, *et al.* Study on anatomy structure and histology of the ovary of wild *Penaeus monodon* (Fabricius) from the north of South China Sea[J]. *South China Fisheries Science*, 2005, 1(3): 49-53 (in Chinese).
- [11] Chen J C, Lin C H. Toxicity of copper sulfate for survival, growth, molting and feeding of juveniles of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*[J]. *Aquaculture*, 2001, 192(1): 55-65.
- [12] Fu M J, Zou Z H, Liu S F, *et al.* Selenium-dependent glutathione peroxidase gene expression during gonad development and its response to LPS and H₂O₂ challenge in *Scylla paramamosain*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(3): 532-542.
- [13] 于扬, 魏景艳. 谷胱甘肽过氧化物酶及其合成机制[J]. *生物物理学报*, 2013, 29(10): 724-737.
- Yu Y, Wei J Y. Glutathione peroxidase and its synthesis mechanism[J]. *Acta Biophysica Sinica*, 2013, 29(10): 724-737 (in Chinese).
- [14] 张建新, 王茜, 荀文娟, 等. GPxs 家族基因在山羊不同组织和睾丸不同发育时期的表达特性研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2011, 42(5): 650-657.
- Zhang J X, Wang Q, Xun W J, *et al.* The expression of glutathione peroxidases family genes in different tissues and testes at different stages of male goats[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2011, 42(5): 650-657 (in Chinese).
- [15] Wu L T, Chu K H. Characterization of an ovary-specific glutathione peroxidase from the shrimp *Metapenaeus ensis* and its role in crustacean reproduction[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 155(1): 26-33.
- [16] Wang W N, Zhou J, Wang P, *et al.* Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute PH stress[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2009, 150(4): 428-435.

Full-length cDNA cloning and expression analysis of selenium-dependent glutathione peroxidase from *Penaeus monodon*

TANG Lei^{1,2}, FU Mingjun^{1,3}, ZHAO Chao^{1,3}, QIU Lihua¹, LIU Wensheng², JIANG Shigui^{1*}

(1. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

3. Tropical Aquaculture Research and Development Center of South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Sanya 572018, China)

Abstract: Selenium-dependent glutathione peroxidase (denoted as Se-GPx) plays an important role in the enzymatic antioxidant defense system. It clears the reactive oxygen species (ROS) to avoid the cellular damage. In order to study the function of Se-GPx in immune system and the ovarian development of *Penaeus monodon*, the full-length cDNA sequence of Se-GPx from black tiger shrimps (denoted as *Pm Se-GPx*) was obtained by high-throughput transcriptome sequencing and RACE. The full-length cDNA of *Pm Se-GPx* is 959 bp, including an open reading frame (ORF) of 639 bp encoding a polypeptide of 212 amino acids, a 5'UTR of 10 bp and a 3'UTR of 310 bp containing a conserved selenocysteine insertion sequence (SECIS) element. The molecular mass of the deduced amino acid (aa) sequence was 23.65 kDa with an estimated *pI* of 4.61. Blast and phylogenetic analyses suggest that *Pm Se-GPx* is a new member of the shrimp GPxs family. The tertiary structure of *Pm Se-GPx* protein presents like a bag and there is a catalysis site, which contains couplet of four conservative residues (cysteine C/selenocysteine U, glutamine Q, tryptophan W and asparagine N). *Pm Se-GPx* mRNA expression was detected in nine tissues by real-time PCR. *Pm Se-GPx* mRNA expressed was the highest in the hepatopancreas and moderate in the ovary. The result showed that *Pm Se-GPx* was expression mainly in hepatopancreas which plays an important role in detoxification. At different stages of ovary development, *Pm Se-GPx* was expressed highly at Stage III and Stage V, which indicated a large number of ROS may be produced during these development stages. *Pm Se-GPx* may protect the ovary from the oxidization damage. Under the stress of Cu²⁺, the expression of *Pm Se-GPx* showed a trend of decline, but recovered at 48 h, and then decreased. The result showed that the stress of Cu²⁺ may inhibit the expression of *Pm Se-GPx*. Under the stress of pH 9, expression trend of *Pm Se-GPx* first declined, but recovered at 24 h, then rose significantly at the 96 h. The result showed that neutral environment may inhibit the expression of *Pm Se-GPx* but aqueous alkaline medium may promote it. Presumably, Se-GPx plays an important role during the ovarian development and immune regulation of *P. monodon*. Our study provides a basis for further research in reproduction and immunology of *P. monodon*.

Key words: *Penaeus monodon*; Se-GPx; ovarian development; stress of Cu²⁺

Corresponding author: JIANG Shigui. E-mail: jiangsg@scsfri.ac.cn

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-47); Guangdong Province Project of China (2014B020202003); Hainan Applied Technology Research and Development and Demonstration Projects (ZDXM2015056); Development of Biology Industry in Shenzhen (NYSW20140331010053)