

奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼 几种谷胱甘肽 S-转移酶基因克隆与分析

瞿春梅 梁旭方 沈丹 何珊 白小丽

华中农业大学水产学院, 武汉 430070

摘要 通过 RT-PCR 法和 RACE 法, 分别从奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aureus*) 肝脏获得 alpha、rho1、rho2 型 GST (GSTA、GSTR1、GSTR2) 基因 cDNA 全序列, 从尼罗罗非鱼 (*Oreochromis nilotica*) 肝脏获得 GSTR1、GSTR2 基因 cDNA 全序列。结果表明: 奥利亚罗非鱼 GSTA 基因 cDNA 全序列为 933 bp, 5' 非翻译区 (5'-UTR) 为 98 bp, 3' 非翻译区 (3'-UTR) 为 166 bp, 开放阅读框 (ORF) 为 669 bp, 编码 222 个氨基酸。奥利亚、尼罗罗非鱼 GSTR1 基因 ORF 均为 681 bp, 均编码 226 个氨基酸; 奥利亚、尼罗罗非鱼 GSTR2 基因 ORF 均为 693 bp, 均编码 230 个氨基酸。氨基酸序列同源性比较和系统进化分析均表明, 罗非鱼 GST 基因与鱼类 GST 同源性较高, 与哺乳类、鸟类、两栖类 GST 同源性较低。

关键词 谷胱甘肽 S-转移酶; 基因克隆; 序列分析; 奥利亚罗非鱼; 尼罗罗非鱼

中图分类号 Q 959.483 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)01-0082-06

微囊藻毒素 (microcystins, MCs) 是蓝藻的一些属产生的单环七肽, 在发生水华的水体中普遍存在^[1]。该毒素已经确定了多种异构体, 最常见的为 MC-LR、MC-RR、MC-YR 三种^[2], 其中 MC-LR 因其高急性毒性, 强促癌活性而受到广泛的关注。水体中含一定浓度的 MCs 可导致鱼卵变形、鱼类行为和生长异常及死亡^[3-4], 对人类健康也构成严重威胁^[5-6]。肝脏是微囊藻毒素去毒与致毒的靶器官^[7]。有研究表明, 谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 能催化微囊藻毒素等毒性物质与还原型谷胱甘肽 (GSH) 的巯基结合, 使亲电的疏水化合物变成亲水物质, 易于经排泄系统排出体外, 减少其毒性, 在微囊藻毒素去毒过程中发挥重要作用^[8]。而在大口黑鲈^[9]、草鱼^[10] 等淡水鱼类中, alpha 型 GST (GSTA) 和 rho 型 GST (GSTR) 蛋白是鱼类肝脏 GST 蛋白的主要类型。因此, 笔者对奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aureus*)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis nilotica*) 不同型 GSTA、GSTR 基因 cDNA 全序列进行克隆, 旨在为进一步比较研究不同品种罗非鱼微囊藻毒素去毒能力的关系及从分子

水平揭示不同品种罗非鱼肝脏不同型 GST 基因的表达水平与表达调控机制提供基础资料。

1 材料与方法

试验用奥利亚罗非鱼、尼罗罗非鱼均由广东罗非鱼良种场提供。

1.1 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成

分别从奥利亚罗非鱼、尼罗罗非鱼分离肝脏组织, 总 RNA 的提取与纯化按 Promega 公司的 SV Total RNA Isolation System 试剂盒推荐方法进行。cDNA 第一链的合成使用 ToYoBo ReverTra Ace- α -TM 试剂盒, 分别以奥利亚罗非鱼、尼罗罗非鱼总 RNA 为模板, oligo (dT)₂₀ 为反转录引物, 操作按试剂盒推荐方法进行。-80 °C 保存备用。

1.2 cDNA 核心序列的克隆

根据已发表的脊椎动物 alpha 型、rho 型 GST 氨基酸序列的保守区域设计 2 对简并引物。以上述 cDNA 为模板, 用 GSTA01F 与 GSTA02R 和 GSTR01F 与 GSTR02R 引物扩增奥利亚罗非鱼 GSTA 和 GSTR 基因 cDNA 核心片段; 用

收稿日期: 2010-12-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30670367)、广东省科技计划项目 (2007B020701002)

瞿春梅, 硕士研究生。研究方向: 鱼类功能基因。E-mail: 626062609@qq.com

通讯作者: 梁旭方, 博士, 教授。研究方向: 鱼类摄食与代谢机制及应用技术。E-mail: xufang_liang@yahoo.com

GSTR01F 与 GSTR02R 引物扩增尼罗罗非鱼 GSTR (表 1)。PCR 扩增条件均为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 1 min, 40 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min。

表 1 奥利亚罗非鱼、尼罗罗非鱼 GST 基因 PCR 引物

Table 1 PCR primer sequences for cloning of blue tilapia and Nile tilapia GSTs gene

引物 Primer	引物序列 (5' → 3') Primer sequence
核心序列 cDNA	
GSTA01F	5'-ATCCTGAACTACATCGCAGG(A/G)AA (G/A)TA(T/C)-3'
GSTA02R	5'-TGGAGGTTTCTAGCGCTGCC (A/T/ C)GG(T/C)TG-3'
GSTR01F	5'-TGGAGGGTGTATGATCGCGCTGGA (A/ G)GA(A/G)AA(A/G)-3'
GSTR02R	5'-CGTGTCTGGACCTCAGG(T/G)TT(T/ C)TCCA(A/G)CCA-3'
5'RACE	
AOGSTA5'01R	5'-CCACCAAAGGGACCTGTTG-3'
AOGSTA5'02R	5'-CCGAGTTGTCAGAAGCAC-3'
GSTR15'01R	5'-TGAATGTTGGAAGCTGTC-3'
GSTR15'02R	5'-CTTCTTTGGACTTGTGCTC-3'
GSTR25'01 R	5'-TGATGACATTGTCTCCATG-3'
GSTR25'02 R	5'-CTTGTGGGACTTGTGTT-3'
3'RACE	
AOGSTA3'01F	5'-CTTGCTGATGTGCTGCTTG-3'
AOGSTA3'02F	5'-CAGGGCAGGATGACACAA-3'
GSTR13'01F	5'-TCAGGCTCTCATGTGGCAG-3'
GSTR13'02F	5'-GGAGAGTATCACAATCTGC-3'
GSTR23'01F	5'-CCAACAGTTGGCACTCTCTT-3'
GSTR23'02F	5'-GGAGAGTATCACAATCTGC-3'

1.3 5' 末端 cDNA 扩增

根据获得的奥利亚罗非鱼肝脏 GSTA 基因 cDNA 核心序列和 2 种罗非鱼 GSTR 基因 cDNA 核心序列, 设计 6 条特异引物 (AOGSTA5'01R 和 AOGSTA5'02R、GSTR15'01R 和 GSTR15'02R、GSTR25'01R 和 GSTR25'02R) 用于 5' RACE (表 1)。5' RACE 的操作按 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒 (Clontech, USA) 推荐方法进行, 取 1 μL 总 RNA (约 1 μg), 以试剂盒提供的 5'-RACE CDS Primer A, SMART II™ A Oligonucleotide 为引物, 合成 cDNA 第一链后, 用 TE Buffer 稀释 10 倍备用。首次 PCR 反应体系为: 10 倍稀释产物 2.5 μL、10 × PCR buffer 5 μL、dNTP (各 10 mmol/L) 1 μL、PowerScript Reverse Transcriptase 1 μL、AOGSTA5'01R、GSTR15'01R、GSTR25'01R 引物分别为 1 μL、试剂盒提供的 10 × Universal Primer A Mix (UPM) 引物 5 μL, 最后加双蒸水至 50 μL。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 1 min,

62 °C 1 min, 72 °C 1 min, 25 个循环; 72 °C 延伸 5 min。取首次扩增产物 1 μL, 用试剂盒提供的 Nested Universal Primer (NUP) 引物、以 AOGSTA5'02R、GSTR15'02R、GSTR25'02R 引物进行 2 次 PCR 扩增, 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 1 min, 57 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min。获得奥利亚罗非鱼肝脏 GSTA 基因和 2 种罗非鱼 GSTR1、GSTR2 cDNA 序列的 5' 末端。

1.4 3' 末端 cDNA 扩增

根据获得的奥利亚罗非鱼肝脏 GSTA 基因 cDNA 核心序列和 2 种罗非鱼 GSTR 基因 cDNA 核心序列, 设计 6 条特异引物 (AOGSTA3'01F 和 AOGSTA3'02F、GSTR13'01F 和 GSTR15'02F、GSTR23'01F 和 GSTR23'02F) 用于 3' RACE (表 1)。参考 3'-Full RACE Core Set 试剂盒 (TaKaRa) 所提供方法, 以 oligo dT-3 sites Adaptor primer 为引物进行反转录反应。然后以试剂盒提供的引物 3 sites Adaptor primer 分别与引物 AOGSTA3'01F、GSTR13'01F、GSTR23'01F 进行首次 PCR 反应, 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min; 巢式 PCR 所用引物为 3 sites Adaptor primer 与 AOGSTA3'02F、GSTR13'02F、GSTR23'02F, 进行 2 次 PCR 反应, 与 5' RACE 二次 PCR 扩增条件相同, 获得奥利亚罗非鱼肝脏 GSTA 基因和 2 种罗非鱼 GSTR1、GSTR2 cDNA 序列 3' 末端片段。

1.5 PCR 产物的克隆、分析及系统树构建

PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳纯化, H. Q. & Q. Gel Extraction Kit II (U-gene) 回收后克隆至 pMD 19-T 载体 (TaKaRa), 转化感受态 *E. coli* DH5α, 利用 M13 正反向引物, 通过 PCR 筛选阳性克隆, 阳性克隆菌液由上海英骏生物技术公司 ABI 3730 测序仪进行测序。将所获得的 5'、3' 末端片段与核心片段进行序列拼接, 得到罗非鱼 GSTs 基因 cDNA 全序列。

根据测序结果整理得到奥利亚罗非鱼肝脏 GSTA、GSTR1、GSTR2 基因 cDNA 全序列和尼罗罗非鱼 GSTR1、GSTR2 cDNA 全序列, 推测其氨基酸序列, 应用 BLAST (<http://www.Ncbi.Nlm.Nih.gov/BLAST/>) 和 Vector NTI suite 8.0 软件与 GenBank 上发表的多种脊椎动物 GSTs 氨基酸序

列进行序列同源性分析。用 Mega 4.0 软件采用邻接法构建系统树,1 000 次重复计算靴带 (bootstrap) 值。

2 结果与分析

2.1 奥利亚罗非鱼 *GSTA*、*GSTR1*、*GSTR2* 基因 cDNA 全序列的克隆与分析

利用 RT-PCR 和 RACE 技术,我们从奥利亚罗非鱼肝脏克隆得到 *GSTA*、*GSTR1*、*GSTR2* 基因

cDNA 全序列。对其分析发现,奥利亚罗非鱼 *GSTA*、*GSTR1*、*GSTR2* 基因 cDNA 全序列分别为 933、915、1 063 bp,其中 5'非翻译区(5'-UTR)分别为 98、61、61 bp,3'非翻译区(3'-UTR)分别为 166、173、309 bp,开放阅读框(ORF)为 669、681、693 bp,分别编码 222、226、230 个氨基酸,终止密码子为 TAA、TGA、TGA, polyA 加尾信号为 AATAAA、TATTAA、AATTAA (GenBank no. FJ436095、FJ436093、FJ436094)。

```

AoGSTA (1)  MSEKPVLYFNGRGMESIRWLLTVAEVEFDEVLTTREQYEKLLNDGALMFQQVPLVEMDGMKLIQTKAILNYIAEKYNLHAKDPKERY
OnGSTA (1)  MSEKPVLYFNGRGMESIRWLLTVAEVEFDEVLTTREQYEKLLNDGALMFQQVPLVEMDGMKLIQTKAILNYIAEKYNLHAKDPKERY
PmGSTA (1)  MAGKVVLYHFNGRGMESIRWLLTVAEVEFDEVLHTRDQLKQLSDGDLMFQQVPMVEIDGMKLIQTKAILNYIAEKYNLHGKDLKDRV
DrGSTA (1)  MSGKVVLYHFNGRGMESIRWLLAVAGVQFEVFLETEKEQFDKLLSDGALTFQQVPLVEIDGMKLVQSKAILNYIAGKYNLYGKDLKERA
CgGSTA (1)  MAAKPVLYFNGRGMESIRWLLAAAGVEFEEVFLETRQEYKLLQSGILMFQQVPMVEIDGMKLVQTRAILNYIAGKYNLYGKDLKERA
XIGSTA (1)  MAEKPVLYHFNGRGMESIRWLLAAAGVEFDEQYIETREQYEKLLKDGSLMFEQVPLVQMDGMNLIQTKAILSYIAGKYNMYGKDLKERL
HsGSTA (1)  MAGKPKLHYFNGRGMERIPRWLLAAAGVEFEEKFIGSAEDLGLKLRNDGSLMFFQQVPMVEIDGMKLVQTRAILNYIASKYNLYGKDIKERA
* * * * *
AoGSTA (91) MINMYSEGLTDLMEMIMLPTFPDPKPK--LDNIQSKAKERYLPVYEKALTG--PVYLVGGKLSLADVLLVECTLMLEEKFPDILKDFPN
OnGSTA (91) MINMYSEGLTDLMEMIMLPTFPDPKPK--LDNIQSKAKERYLPVYEKALTG--PVYLVGGKLSLADVLLVECTLMLEEKFPDILKDFPN
PmGSTA (91) MINMYSEGVDLMEIMMPLFPDPKPK--LANIEAKATERYLPVFEKVLG--QIYLVGGKISVADVLLFECTLMLEEFAGILGDFRN
DrGSTA (91) MIDIYSEGLIDLMEMIMVSPFPTAENKEKVFNSIEEAKAVRFLPVFEKALAN--SSFLVGGKLSRADVHLLLEATLMLQELFPSILATFPK
CgGSTA (91) LIDMYVGGTDDLMGFLSFPFLSAEDKVKQCAFVVEKATSRYPAYEKVLDHGDQDFLVGNRLSWADIHLLLEAILMVEEKKSDALSGFPL
XIGSTA (91) FIDMYVDGTDDLGLTGVVYVLDLAGKEKQKANIKEKATKRYFPIYEKVLKD--QHLYVGNKFSWADVLMLEALMTEEFHSDILSCFPN
HsGSTA (91) LIDMYTEGMADLNEMILLPLCPAEEKAKIALIKEIKISRYFPAFEKVLQSHGQDYLVGNKLSRADISLVELLYVEELDSSLISNFPPL
* * * * *
AoGSTA (177) IKSFGQGRMTQIPASIRFLQPGSKRKPAPDEKYLKNNVEVLNLKLLPL---
OnGSTA (177) IKSFGQGRMTQIPASIRFLQPGSKRKPAPDEKYLKNNVEVLNLKLLPL---
PmGSTA (177) VKAFQGRMTRIPAIDEFLKPGSKRKPQDDQYVKTIMEVLDIKSLP---
DrGSTA (179) IQAFQEQMKALPAISKFLQPGSARKPPDEEYVRTVKAVLSHLFK---
CgGSTA (181) LQAFKKRISSTPIIKKFLAPGSKRKPISDDKYVETVRRVLRMYDYVKPH
XIGSTA (179) LKDFKERIKQIPTIAKFLQPGSPKPPPDWKYVTVTKTVLNM-----
HsGSTA (181) LKALKTRISNLPVTKKFLQPGSPRKPADAKALEEARKIFRF-----
* * * * *

```

氨基酸序列中的“-”表示比较时必要的氨基酸缺口,“*”表示保守的氨基酸残基。下图同。The amino acid sequence of dashes indicate the amino acid gaps that are necessary to align these sequences, the conserved residues in all sequences are indicated by asterisk. The same as below.

图 1 奥利亚罗非鱼推测氨基酸序列及与其他鱼类、哺乳类 *GSTA* 氨基酸序列同源性的比较

Fig. 1 Comparison of the deduced amino acid sequences of *GSTA* from blue tilapia with other fishes and mammals

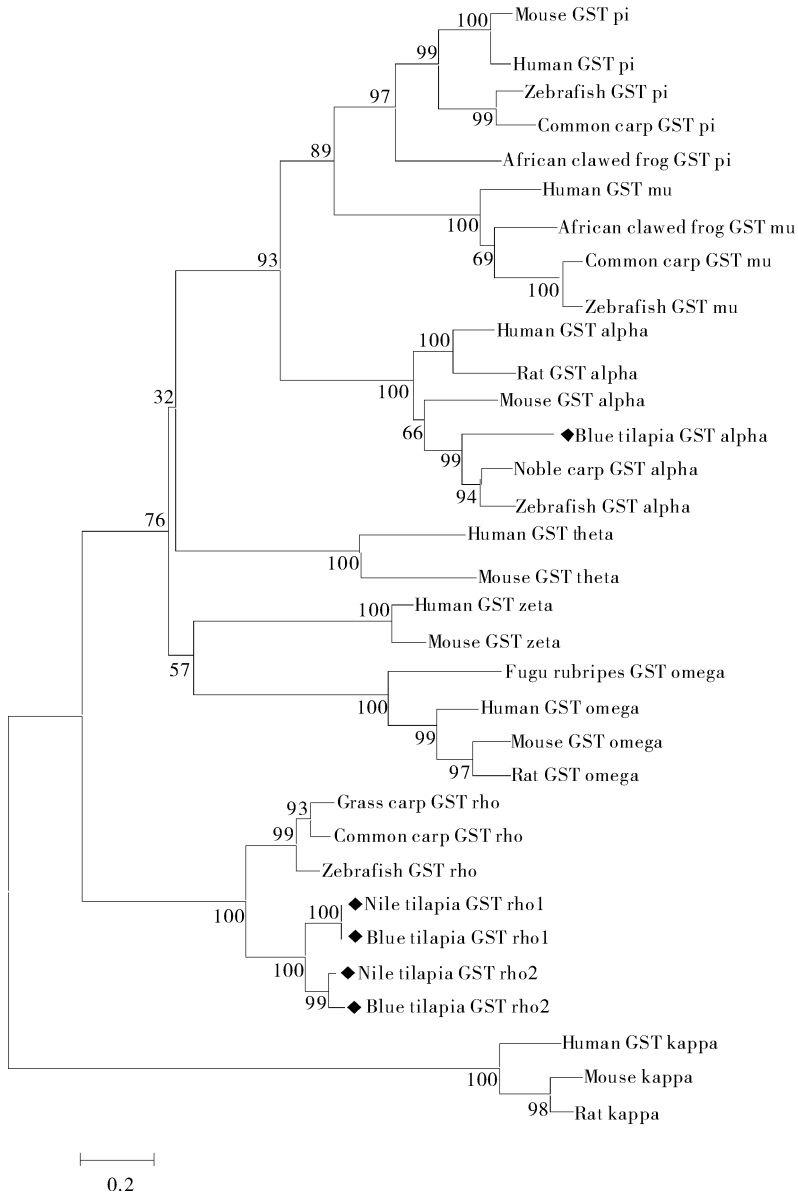
```

AoGSTR1 (1)  MAKAMTLLWAGSPPCWRVMITLLEKNLQGYNQKLLSFDKMEHKSKEVLDINPRGQLPTFKHGNTIVNDSYAVCFYLESKFKSQGNKLIP
OnGSTR1 (1)  MAKAMTLLWAGSPPCWRVMITLLEKNLQGYNQKLLSFDKMEHKSKEVLDINPRGQLPTFKHGNTIVNDSYAVCFYLESKFKSQGNKLIP
AoGSTR2 (1)  MAKDMTLLWYTGSPPCWRVMIALEENLQGYNQKLLSFDKMEHKSQVLDINPRGQLPTFKHGNDVINESYAVCFYLESQFKSQGKTLIP
OnGSTR2 (1)  MAKDMTLLWYTGSPPCWRVMIALEENLQGYNQKLLSFEKMEHKSQVLDINPRGQLPTFKHGNDVINESYAAFCYLESQFKSQGKTLIP
* * * * *
AoGSTR1 (91) DSQEEQALMYQRMFEGLTFYDKLNAVITYDFWVPEGERHESALNRNKEALTTELKLEWEGYLKQLGSGSHVAGPSFTLADVIVFPTVAYL
OnGSTR1 (91) DSQEEQALMYQRMFEGLTFYDKLNAVITYDFWVPEGERHESALNRNKEALTTELKLEWEGYLKQLGSGSHVAGPSFTLADVIVFPTVAYL
AoGSTR2 (91) DGPAEQALMYQRMFEGLTFYDKLNAVITYDFWVPEGERHESALNRNKEALTTELKLEWEGYLKQLGSGSYLAGPSFTLADVIVFPTVGT
OnGSTR2 (91) DGPAEQALMYQRMFEGLTFYDKLNAVITYDFWVPEGERHESALNRNKEALTTELKLEWEGYLKQLGSGSYLAGPSFTLADVIVFPTVGT
* * * * *
AoGSTR1 (181) RFLGSLAKRYPKLGEYHNLLKDRPSVKASWPPHWLENPEGQDTLKDI---
OnGSTR1 (181) RFLGSLAKRYPKLGEYHNLLKDRPSVKASWPPHWLENPEGQDTLKDI---
AoGSTR2 (181) GFGLSPERYPKLGEYHNLLKERPSVKASWPPHWLENPKDQDRLKDALKDI
OnGSTR2 (181) RFLGSPERYPKLGEYHNLLKERPSVKASWPPHWLENPKDQDRLKDALKDI
* * * * *

```

图 2 奥利亚、尼罗罗非鱼 *GSTR1*、*GSTR2* 推测氨基酸序列同源性的比较

Fig. 2 Comparison of the deduced amino acid sequences of *GSTR1* and *GSTR2* from blue tilapia and Nile tilapia



The sequences of glutathione S-transferase respectively were GST pi; Human *Homo sapiens* BC010915, mouse *Mus musculus* NM_013541, zebrafish *Danio rerio* NM_131734, common carp *Cyprinus carpio* DQ497597, and African clawed frog *Xenopus laevis* NM_001088783; GST mu; Human NM_000849, African clawed frog AJ416998, common carp DQ411312, and zebrafish NM_212676; GST alpha; Human NM_145740, rat *Rattus norvegicus* NM_017013, mouse BC012639, noble carp *Hypophthalmichthys nobilis* EF100902 and zebrafish BC060914; GST theta; Human NM_000853 and mouse MMU48419; GST zeta; Human NM_145870, mouse NM_010363; GST omega; Mouse NM_214050, rat NM_010362, pufferfish *Takifugu rubripes* NM_001007602; GST rho; Grass carp *Ctenopharyngodon idella* EU107283, common carp DQ411314, zebrafish NM_001045060; GST kappa; Mouse NM_029555, rat NM_181371 and human NM_015917; and blue tilapia GST alpha, rho1, rho2 and Nile tilapia GST rho1, rho2 are highlighted by black diamond.

图 3 罗非鱼 *GSTA*、*GSTR1*、*GSTR2* 和其他生物的 *GSTs* 基因核苷酸系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of glutathione S-transferase based on nucleotide sequences of blue tilapia *Oreochromis aureus*, Nile tilapia *Oreochromis nilotica* and other species

2.2 尼罗罗非鱼 *GSTR1*、*GSTR2* cDNA 全序列的克隆与分析

利用 RT-PCR 和 RACE 技术,从尼罗罗非鱼肝

脏克隆得到 *GSTR1*、*GSTR2* 基因 cDNA 全序列。分析发现,尼罗罗非鱼 *GSTR1*、*GSTR2* 基因 cDNA 全序列分别为 902、1 093 bp,其中 5'非翻译区分别

为 60、67 bp, 3'非翻译区分别为 161、333 bp, 开放阅读框为 681、693 bp, 编码 226、230 个氨基酸, 终止密码子均为 TGA, polyA 加尾信号为 TATTAA、AATAAT (GenBank no. EU107284, FJ436092)。

2.3 氨基酸同源性比较与系统树分析

使用 Vector NTI suite 8.0 软件进行氨基酸序列比较发现, 奥利亚罗非鱼 GSTA 与尼罗罗非鱼、真鲷 (*Pagrus major*)、斑马鱼 (*Danio rerio*) GSTA 同源性较高, 分别为 99.5%、75.2%、64.3%, 与鸡 (*Gallus gallus*)、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)、人 (*Homo sapiens*) GSTA 同源性较低, 分别为 55.9%、58.5%、50.9% (图 1)。

用 Vector NTI suite 8.0 软件进行氨基酸序列比较发现, 奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼 GSTR 基因氨基酸序列高度保守。其中, 奥利亚与尼罗罗非鱼 GSTR1、GSTR2 氨基酸序列同源性, 分别高达 99.6%、94.8%。而奥利亚罗非鱼 GSTR1 与 GSTR2 氨基酸序列同源性仅为 81.3%, 尼罗罗非鱼 GSTR1 与 GSTR2 氨基酸序列同源性仅为 82.2% (图 2)。

根据基因结构、氨基酸序列、底物特异性、化学亲和力及动力学行为等不同标准, 哺乳动物的 GST 可分为: alpha、mu、pi、sigma、theta、omega、kappa 和 zeta 型。近年来在其他生物中又相继发现了许多类型: 如鱼类中的 rho 型, 细菌中的 beta 型, 昆虫中的 delta、U、epsilon 型, 植物中的 tau、lambda 和 phi 型等^[11-12]。将所获得的罗非鱼 GSTs cDNA 全序列采用 Mega 4.0 软件, 以邻接法 (NJ method) 构建系统进化树 (图 3)。系统进化树结果表明, 各型 GST 分别聚为一支, 其中克隆所得到的奥利亚罗非鱼 GSTA 与其他鱼类、哺乳类 GSTA 聚为一支, 且从进化水平上与鱼类更近、与哺乳类较远, 与其在进化中的地位相一致。奥利亚、尼罗罗非鱼 GSTR1、GSTR2, 均与其他鱼类 GSTR 聚为一支, 证实所得 GST 基因均属于 rho 型, 而对 2 种 rho 型 GST 基因功能的确定仍有待进一步研究。

3 讨 论

淡水水体富营养化导致有害蓝藻水华频频发生, 并可能产生具有严重危害的微囊藻毒素。罗非鱼具有食性杂、抗逆性强等优点, 可吞食、消化有毒微囊藻。关于罗非鱼微囊藻毒素去毒作用分子机制的研究表明, GST 在微囊藻毒素去毒代谢过程中扮

演了重要角色^[13-14]。GST 是鱼类重要的第二时相去毒酶基因, 其表达产物一方面缓解氧化压力、抑制活性氧对机体的损伤, 另一方面催化毒素形成亲水化合物经排泄系统排出体外^[15]。

本研究从奥利亚罗非鱼获得 933 bp 的 GSTA 基因 cDNA 全序列, 其中 5'-UTR 为 98 bp, 3'-UTR 为 166 bp, ORF 为 669 bp, 编码 222 个氨基酸。与我们先前获得的尼罗罗非鱼 GSTA 基因高达 99.5% 的同源性, 与真鲷、斑马鱼 GSTA 同源性适中, 分别为 75.2%、64.3%, 与鸡 (鸟类)、非洲爪蟾 (两栖类)、人 (哺乳类) GSTA 同源性较低, 分别为 55.9%、58.5%、50.9%。奥利亚、尼罗罗非鱼 GSTR1 基因 5'-UTR 分别为 61、60 bp, 3'-UTR 分别为 173、161 bp, ORF 均为 681 bp, 均编码 226 个氨基酸; 奥利亚、尼罗罗非鱼 GSTR2 基因 5'-UTR 分别为 61、67 bp, 3'-UTR 分别为 309、333 bp, ORF 均为 693 bp, 均编码 230 个氨基酸。其中, 奥利亚与尼罗罗非鱼 GSTR1、GSTR2 氨基酸序列同源性, 分别高达 99.6%、94.8%。而奥利亚罗非鱼 GSTR1 与 GSTR2 氨基酸序列同源性仅为 81.3%, 尼罗罗非鱼 GSTR1 与 GSTR2 氨基酸序列同源性仅为 82.2%。系统进化分析也进一步表明, 罗非鱼 GST 基因与鱼类 GST 同源性较高, 与哺乳类、鸟类、两栖类 GSTs 同源性较低, 且各型 GST 分支清晰明确, 分别聚为一支。

对于比较研究, 同一型 GST 基因在不同品种罗非鱼肝脏微囊藻毒素代谢过程中所起作用的大小, 以及同种罗非鱼不同型 GST 在其微囊藻毒素代谢过程中所起作用的大小次序是否与这些鱼类对微囊藻毒素耐受能力的高低次序呈一定的相关性, 还需进一步确定。本研究成功克隆的奥利亚罗非鱼的 GSTA、GSTR1、GSTR2 以及尼罗罗非鱼的 GSTR1、GSTR2 基因 cDNA 全序列, 为从分子水平研究淡水鱼类肝脏微囊藻毒素的代谢去毒分子机制及调控机制奠定了基础, 对罗非鱼的选育和安全养殖也有一定的指导意义。

参 考 文 献

- [1] CARMICHAEL W W. The toxins of cyanobacteria [J]. *Sci Am*, 1994, 270: 64-72.
- [2] FASTNER J, CODD G A, METCALF J S, et al. An international intercomparison exercise for the determination of purified microcystin-LR and microcystins in cyanobacterial field

- material [J]. *Anal Biochem Chem*, 2002, 374: 437-444.
- [3] LINDHOLM T, OHMAN P, KURKI-HELASMO K, et al. Toxic algae and fish mortality in a brackish-water lake in Aland, SW Finland [J]. *Hydrobiologia*, 1999, 397: 109-120.
- [4] NISHIWALI-MATSUSHEMA R, OHTA T, NISHIWAKI S, et al. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR [J]. *Cancer Res Clinoncol*, 1992, 118: 420-424.
- [5] HALLEGREFF G M. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase [J]. *Phycologia*, 1993, 32: 79-99.
- [6] POURIA S, ANDRADE A, BARBOSA J, et al. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil [J]. *Lancet*, 1998, 352: 21-26.
- [7] ERIKSSON J E, MERILUOTO J A O, KUJARI H P, et al. Preliminary characterization of a toxin isolated from the cyanobacterium *Nodularia spumigena* [J]. *Toxicon*, 1988, 26: 161-166.
- [8] PFLUGMACHER S, WIEGAND C, OBEREMM A, et al. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1425: 527-533.
- [9] DOI A M, PHAM R T, HUGHES E M, et al. Molecular cloning and characterization of a glutathione S-transferase from largemouth bass (*Micropterus salmoides*) liver that is involved in the detoxification of 4-hydroxynonenal [J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 67: 2129-2139.
- [10] FU J, XIE P. The acute effects of microcystin LR on the transcription of nine glutathione S-transferase genes in common carp *Cyprinus carpio* L. [J]. *Aquatic Toxicol*, 2006, 80: 261-266.
- [11] HAVES J D, FLANAGAN J U, JOWSEY I R. Glutathione transferases [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2004, 45: 51-88.
- [12] KONISHI T, KATO K, ARAKI T, et al. A new class of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the red sea bream *Pagrus major* [J]. *Biochem J*, 2005, 388(1): 299-307.
- [13] BEATTIE K A, RESSLER J, WIEGAND C, et al. Comparative effects and metabolism of two microcystins and nodularin in the brine shrimp *Artemia salina* [J]. *Aquat Toxicol*, 2003, 62: 219-226.
- [14] MONOD G, BOUDRY M A, GILLET C. Biotransformation enzymes and their induction by B-naphtoflavone during embryo larval development in salmonid species [J]. *Comp Biochem Physiol C*, 1996, 114: 45-50.
- [15] GEHRINGER M M, SHEPHARD E G, DOWNING T G, et al. An investigation into the detoxification of microcystin-LR by the glutathione pathway in Balb/c mice [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(5): 931-941.

Molecular cloning and sequence analysis of alpha- and rho- classes of glutathione S-transferases in two tilapias, *Oreochromis aureus* and *Oreochromis nilotica*

QU Chun-mei LIANG Xu-fang SHEN Dan HE Shan BAI Xiao-li

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The full-length cDNAs encoding alpha-class, rho1-class, rho2-class *GST* (*GSTA*, *GSTR1*, and *GSTR2*) were cloned and sequenced from the blue tilapia (*Oreochromis aureus*), and the *GSTR1*, *GSTR2* were cloned and sequenced from the Nile tilapia (*Oreochromis nilotica*) by RT-PCR and RACE method. The full-length blue tilapia *GSTA* cDNA was 933 bp in length, containing an open reading frame of 669 bp (encoding 222 amino acids), flanked by 98 bp 5'UTR and 166 bp 3'UTR. Both the blue tilapia and Nile tilapia *GSTR1* cDNA ORF were 681 bp (encoding 226 amino acids), and both the blue tilapia and Nile tilapia *GSTR2* cDNA ORF were 693 bp (encoding 230 amino acids), respectively. Homology and the phylogenetic tree constructed based on *GST* sequences showed that the tilapia *GSTs* amino acid sequence were highly conserved with fish, and had low homologous relationship with amphibian, bird and mammal *GSTs*.

Key words glutathione S-transferase; molecular cloning; sequence analysis; *Oreochromis aureus*; *Oreochromis nilotica*

(责任编辑: 边书京)