

日本沼虾 mu 型可溶性谷胱甘肽 S-转移酶的克隆与表达

瞿春梅 梁旭方 张进 何珊 沈丹

华中农业大学水产学院, 武汉 430070

摘要 利用简并引物从日本沼虾肝脏克隆 mu 型 sGST 基因 cDNA 核心片段获得其 sGST 氨基酸序列。序列分析表明日本沼虾肝脏 mu 型 sGST 基因 cDNA 核心序列长 299 bp, 编码 99 个氨基酸。日本沼虾 sGST 与南美白对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、小鼠 (*Mus musculus*)、大鼠 (*Rattus norvegicus*)、肩突硬蜱 (*Ixodes scapularis*)、扇头蜱 (*Rhipicephalus appendiculatus*)、热带爪蟾 (*Xenopus tropicalis*)、微小牛蜱 (*Rhipicephalus microplus*) 和太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 的 mu 型 sGST 基因核苷酸同源性为 60% 左右, 表明所克隆的日本沼虾 sGST 亦属于 mu 型 sGST。通过对日本沼虾活体浸泡 MC-LR, 发现微囊藻毒素对日本沼虾肝脏 mu 型 sGST 基因表达没有显著的诱导作用。

关键词 日本沼虾; 谷胱甘肽 S-转移酶基因; 克隆; 微囊藻毒素; 活体诱导表达

中图分类号 Q 959.223⁺.63 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)02-0103-06

谷胱甘肽 S-转移酶 (soluble glutathione S-transferase, sGST), 也称微囊藻毒素去毒酶, 是代谢多种内源或外源毒性物质之解毒酶系统的重要组成部分, 在微囊藻毒素去毒过程中起着关键作用, 该酶有胞液和膜结合两种形式, 以胞液 GST (sGST) 为主。sGST 基因控制所有毒物在第 1 时相之氧化、水解去毒过程后第 2 时相所共有的加合去毒过程, 因此也被称为第 2 时相去毒酶。它能催化微囊藻毒素与还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 发生加合反应, 降低微囊藻毒素毒性并将其直接经排泄系统排出体外^[1]。微囊藻毒素是由铜绿微囊藻、水华鱼腥藻等产生的单环七肽肝毒素, 可造成野生动物、家畜、家禽等中毒死亡^[2-4], 并引发人类肝损伤和肝癌高发等危害^[5-6], 微囊藻毒素对人类健康所造成的威胁已引起世界各国公共卫生系统的广泛关注^[7-8], 淡水藻类污染已成为一个全球性的环境卫生问题^[9]。哺乳类 sGST 基因已有大量研究。近年来, 对海水鱼类 (肉食性鱼类) sGST 基因也有一些报道^[10-12], 而目前有关淡水鱼类 sGST 基因研究日益成为该领域的研究焦点^[13]。蚌、贝类以及螯虾等有壳类无脊椎动物生活在富含毒素的水体中, 毒素

在其体内富集和存留, 通过生态系统食物链对人类造成的潜在威胁不可忽视。但关于淡水螺、虾对微囊藻毒素去毒作用机制的报道却很少。本研究通过 RT-PCR 技术从虾肝脏成功克隆 mu 型 sGST 基因 cDNA 核心片段, 并推测得到氨基酸序列, 旨在为进一步获得这些基因的侧翼调控序列, 深入研究淡水螺、虾对微囊藻毒素去毒基因的表达调控机制, 阐述生态系统中微囊藻毒素去毒代谢分子机制奠定基础, 并对从基因水平上定向筛选微囊藻毒素高效去毒鱼虾品系, 以及进一步研发转基因淡水鱼虾微囊藻毒素生物去毒器提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 供试虾及试剂

1) 供试虾。试验虾于广东省湛江水库捕得, 选活泼、健康、肢体完整、体长 4~5 cm 的个体用于试验。试验前在实验室 10 L 水族箱中暂养。温度为 (25±3) °C, 养殖用水为曝气除氯的自来水, 饲养期间连续充氧。

2) 试剂。总 RNA 提取试剂盒 SV Total RNA Isolation System 为 Promega 公司产品, RNA 反转

收稿日期: 2012-05-16

基金项目: 国家科技部“863”项目 (2007AA09Z437) 和国家自然科学基金项目 (30670367)

瞿春梅, 硕士研究生, 研究方向: 动物遗传工程. E-mail: 626062609@qq.com

通讯作者: 梁旭方, 博士, 教授, 研究方向: 鱼类生理生态学. E-mail: xfliang@mail.hzau.edu.cn

录试剂盒 TaKaRa RNA LA PCR™ Kit (AMV) Ver. 1.1、载体 pMD 19-T Vector、Taq DNA 聚合酶为大连宝生物工程有限公司产品,其他试剂均为进口分装或者国产分析纯试剂,大肠杆菌 DH5 α 由笔者所在实验室保存,MC-LR 购自 Sigma 公司。

1.2 日本沼虾总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成

从虾分离肝脏组织,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 TaKaRa RNA LA PCR™ Kit (AMV) Ver. 1.1 试剂盒,以虾肝脏总 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。-20 °C 保存备用。

1.3 日本沼虾 mu 型 sGST 基因 cDNA 核心序列的克隆和测序

根据已发表的脊椎动物、软体动物及节肢动物 mu 型 sGST 氨基酸序列的保守区域设计 1 对简并引物:GST01F/GST02R(表 1),并以上述 cDNA 为模板,用该引物扩增虾 mu 型 sGST 基因 cDNA 核心片段。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,最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳纯化,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* DH5 α ,利用 M13 正反向引物,通过 PCR 反应检测得到阳性克隆,阳性克隆由博亚公司采用 ABI Prism™ 377 (Perkin Elmer, USA) 进行测序。用 DNA 分析软件 vector NTI suite 8.0 进行序列分析。

表 1 日本沼虾 sGST、 β -ACT 基因 PCR 引物

Table 1 PCR primer sequences for cloning of shrimp sGST, β -ACT gene

引物名称 Name of primer	引物序列 Sequence of primers
GST01F	5'-GCCTTCCCAATCTTCCCTA (C/T) TACAT (T/C/A)GA-3'
GST02R	5'-ACAATAGGTGATCTTGTCTCC (A/G/T/C)GC(G/A)AACCA-3'
FQGST01F	5'-AGTCGACATGCTGATGGACC-3'
FQGST02R	5'-CACGTTACCTGCTAATCCTC-3'
FQACT01F	5'-TACACCTTCACCAACTGC-3'
FQACT02R	5'-ATCTGCTGGAAGTGGAGAG-3'

1.4 序列分析与系统树构建

对测序结果进行分析整理得到虾 mu 型 sGST 基因 cDNA 核心序列,推测得到其氨基酸序列,与 NCBI 网站 GenBank 上发表的各种生物 sGST 核苷

酸序列一起,用 Blat 和 DNA 分析软件 Vector NTI suite 8.0 进行序列分析。采用 CLUSTAL X 1.81 软件进行序列比对排序后,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。

1.5 肝脏 mu 型 sGST 基因 mRNA 表达水平的测定

虾捕捞后转到实验室暂养,在 10 L 水族箱中暂养 1 周后将试验虾随机分成 2 组,每组 5 尾,一组加入 PBS 作为对照,一组加入 MC-LR 用于染毒试验,浸泡质量浓度为 50 μ g/L。以 β -肌动蛋白为外参照,应用 RT-PCR 技术检测 MC-LR 浸泡日本沼虾 24 h 后肝脏 mu 型 sGST 基因 mRNA 的表达水平。总 RNA 提取和 cDNA 合成同前所述。

根据克隆得到的日本沼虾肝组织 mu 型 sGST 基因 cDNA 核心片段设计特异引物,以 FQGST01F 和 FQGST02R 引物扩增日本沼虾 mu 型 sGST 基因 cDNA 片段,以 FQACT01F 和 FQACT02R(表 1)扩增日本沼虾 β -肌动蛋白 cDNA 片段。PCR 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,指数增长期内终止反应。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色后用凝胶成像系统及相关软件进行分析 (Alphalmager™, Alpha innotech, USA),结果以 mu 型 sGST 与 β -肌动蛋白 mRNA 的 RT-PCR 产物条带亮度之比 (%) 表示。

1.6 数据处理

采用统计分析软件 SPSS 10.0 对日本沼虾肝脏 mu 型 sGST 基因 MC-LR 诱导前后 mRNA 相对表达水平平均值差异进行统计分析。若 $P < 0.05$,平均值的差异即认为是显著的。

2 结果与分析

2.1 日本沼虾 mu 型 sGST 基因 cDNA 序列的克隆与系统进化分析

利用 RT-PCR 技术,从日本沼虾肝脏克隆得到日本沼虾 sGST 基因 cDNA 核心序列。对其分析发现,日本沼虾 sGST 基因 cDNA 核心序列为 299 bp,编码 99 个氨基酸(图 1)。再对日本沼虾 sGST 基因 cDNA 进行 Blast 分析,结果表明:日本沼虾 sGST 与南美白对虾、大鼠、小鼠等 mu 型 sGST 的核苷酸同源性较高,分别为 61.1%、61.4%、61.9%;而与肩突

```

1 GCCTTCCCAATCTTCCCTATTACATTGATGGTGTGATGTGAAGCTGACGCAGAGTTACGCC 60
1 A F P N L P Y Y I D G D V K L T Q S Y A 20
61 ATCATGGGCATCTGGGAAGAAAGTAAGACCTCTGTGAAAAACAGAGAAGGAGAGGATG 120
21 I M R H L G R K Y D L C G K T E K E R M 40
121 ACAGTGACATGCTGTGACACAGGGGAGACATGCGTTTCGGGTTCTACACAGCCTCT 180
41 T V D M L M D Q G R D M R F G F Y T A S 60
181 CTCGAATTACACAGAAGAAGGACAAAGAAATACATAGGTAGTCTGAAGAGACCTTGAAA 240
61 L N Y T E E G A K K Y I G S L K E T L K 80
241 TTACTCTGGAACATCTTGGTAAATCAGACCTGGTTTTCGGGACAGAAGATCACCTATTGT 299
81 L L S N I L G N Q T W F A E T R S P I 99

```

图1 日本沼虾 mu 型 sGST 基因 cDNA 核心序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of shrimp mu class sGST cDNA

硬蜱、扇头蜱、热带爪蟾、微小牛蜱和太平洋牡蛎等的同源性较低,分别为 57.5%、57.5%、58.0%、57.5%、57.0%(图 2)。另外,日本沼虾 sGST 与脊椎动物的 mu-型 sGST 同源性较高,与其他亚型同源性较低,因此,我们认为克隆的日本沼虾 sGST 亦属于 mu-型 sGST。以本试验中成功克隆的日本沼虾 mu 型 sGST 核苷酸序列和其他生物 sGST 已知核苷酸序列(来自 GenBank)一起用邻接法构建系统树(图 3),结果显示日本沼虾与亲缘关系最近的南美白对虾处于同一分支,而与亲缘关系较近的贝类和蜱类位于相邻分支,与大鼠、小鼠等哺乳动物以及热带爪蟾等两栖动物处于进化树上的不同分支,这说明淡水鱼虾微囊藻毒素去毒酶基因与脊椎动物谷胱甘肽 S-转移酶基因存在较大差异,这与 GST 基因承担微囊藻毒素去毒代谢特殊功能相一致。

2.2 微囊藻毒素对日本沼虾 mu 型 sGST 基因 mRNA 表达的影响

以 β -肌动蛋白为对照,测定微囊藻毒素对日本沼虾肝脏 mu 型 sGST 基因 mRNA 表达的影响。结果表明,日本沼虾在 MC-LR (50 $\mu\text{g/L}$) 浸泡 24 h 后,其肝脏 mu 型 sGST 基因 mRNA 表达水平与 PBS 对照组相近。采用统计分析软件 SPSS 10.0 对结果进行统计分析后发现在 MC-LR 诱导前后日本沼虾肝脏 mu 型 sGST 基因 mRNA 表达水平没有显著变化 ($P > 0.05$)。

3 讨论

本研究中,微囊藻毒素对日本沼虾肝脏 mu 型 sGST 基因 mRNA 表达没有显著影响,这与许多的试验结果是不同的。Beattie 等^[14]将 3 个发育阶段的虫蚤暴露在含有微囊藻毒素的水体环境中一段时间,发现其酶提取液中 sGST 的活性显著升高;王琳

等^[15]对罗非鱼腹腔注射 MC-LR (50 $\mu\text{g/kg}$) 24 h 后,其肝脏 sGST 基因表达水平明显上调;Gehring-er 等^[16]给予小鼠一定剂量的微囊藻毒素处理后,测得 sGST 表达也增强。本研究之所以出现这样的结果,可能有以下几方面的原因:1)MC-LR 的相对分子质量较大,MC-LR 通过被动扩散直接进入生物体内的量可能十分有限,而应该主要是随摄取的食物通过消化道进入动物体内^[17]。本试验采用浸泡法,一方面,MC-LR 通过扩散进入到虾体内的速度很小;另一方面,日本沼虾的外壳能阻止微囊藻毒素进入体内或减缓其进入体内的速度,因此在试验时间内进入到虾体内的微囊藻毒素的量很少,不足以引起 mu 型 sGST 基因表达的变化。Rafael 等^[18]对大型蚤进行微囊藻毒素浸泡,同样也发现 sGST 无明显变化;2)日本沼虾暴露于 MC-LR 下,MC-LR 使虾本身出现某种抵御机制,一定程度上减少了摄食和滤水这两条暴露途径的毒素积累。张双玲等^[19]把铜锈环梭螺置于不同浓度毒藻液中,同样也发现,高浓度的 MC 暴露并没有导致螺肝组织中高浓度的 MC 积累;3)从进化的角度讲,鱼类对 MC 的脆弱性可能受到其生活习性及其摄食模式的影响^[20]。日本沼虾生活在富营养化水体中,它们接触到微囊藻毒素的几率、浓度均较大,长期的自然选择必然会使它们对微囊藻毒素的耐受性大大提高,因此对微囊藻毒素的耐受能力也会相应增强。而本试验的浸泡质量浓度为 50 $\mu\text{g/L}$,可能因为浸泡浓度太低而日本沼虾对微囊藻毒素的耐受能力太强,所以经微囊藻毒素浸泡后不能诱导其表达的显著增强。

鱼虾贝肝脏 sGST 去毒酶基因在天然状态下主要用于藻毒素等天然毒物的去毒,而在养殖污染状态下,则主要用于农药等人造毒物的去毒^[21]。由于在淡水鱼类微囊藻毒素去毒代谢过程中,第 2 时相的加合排毒过程具有独一无二的键作用,因此淡水鱼类肝脏 sGST 去毒酶又被称为微囊藻毒素去毒酶。目前,在脊椎动物中已发现了 8 类 sGST,包括 alpha、mu、pi、theta、sigma、zeta、kappa、omega 等。

贝类及螯虾等有壳类无脊椎动物对毒物的清除较鱼类等脊椎动物缓慢,有富集毒素的作用。把微囊藻作为斑马贻贝的单一食料时,1 周后观察到藻毒素在贻贝中达到最大含量,并在接下来的 1 周内仍保持很高含量,在第 3 周时含量开始降低,但在其体内长时间高浓度存在的藻毒素并未引起贻贝可见

```

mn (1) GCCTTCCCAATCTCCCTATTACATTGATGGTGTGTAAGCTGACGCAGAGTTACGCCATCATGCGCCATCTGGGAAGAAAGTACGAC
lv (1) GCCTTCCCAACCTTCCCTACTACATCGACGGAGACGTGAAGATAACGCAGAGCAAAGCCATCATGCGCTACCTGGCACGGAAGCACGGC
cg (1) GCCTTCCCAATATTCCTTACTTACATTGATGATGATATAAAAAA TACACAAAAGTAACTCCATATTGAGGTATATTGGAGATAAACATGGC
xt (1) GACTTCCCAATTTACCATACCTCTTGGATGGTGTGTAAGCTTTCACAAAAGTAATGCAATCCTTCGCTATATTGCACGCAAGCACGGGA
is (1) AAGTTCCCGAATCTGCCCTACTACATCGATGGGACGCTCAAGCTCACACAGAGTGTGGCCATCTTGCCTTATCTCGCAAGAAAGTACGAC
rm (1) GAGTTCCCAATCTGCCTTACTACATTGATGGCGATGTCAAGCTGACCCAGAGTATGGCTATCTCGCGTTACCTGCCAGGAAGCATGGT
ra (1) GATTTCCCAATCTGCCTTACTACATTGACGGCGACGTCAAGCTCACCCAAAGCATGGCCATCTTGCCTTACCTGCCAGGAAGTATGAT
mm (1) GACTTCCCAATCTGCCCTACTTAATTGATGGGTCACACAAGATCACCCAG AGCAATGCCATCCTGCGGTATCTTGGCCGCAAGCACAAAC
rn (1) GACTTCCCAATCTGCCCTACTTAATTGATGGATCGCGCAAGATTACCCAGGCAATGCCATAATGCGCTACCTTGGCCGCAAGCACCAAC
      *****
mn (91) CTCTGTGGAAGAAACAGAGAAG GAGAGGATGACAGTGCAGATGCTGATGGACCAGGGGAGAGACATGCGTTCCGGTTCTAC---ACAGCC
lv (91) CTCTGTGGCAGCAGCGCCGGAGGAACCTCGTCAGGACAGACATGATAGAGTGTCAACTGACAGACATGCACGAAGCTTTCTTT---ACCGTC
cg (91) CTGTTAGGAAAAACTCCCCGAGACAAAAGTGGACTGTGATATGATGGTGGAGAACGCCATGGATTTAGAAAATGGG GTCATTGCGTTGTGC
xt (91) CTTTGTGGAGAGTCAGAAAAAGAAAAGATGTATGTTGATTAATAGAAAATCAAACCATGGATTTCCGGATGGGTCTTGTGTAATTGCT
is (91) CTGGGTCTAGGAATGAGGAGGAAACAGAGAGTGGACGCTCTCGAGCAACAGGCTCGGGACCTCGCCACCAACCTGATC---CGCAGT
rm (91) TTGGAGGGCAAGACTGAAGCCGAGAAGC AGCGAGTGGATGTCTCTGAGCAGCAGTTCGCTGACTTCGCTATGAATGGGTTGCTGTGTC
ra (91) TTGATGGGCAAGACTGAAGCTGAGAAGCAGCGAGTCGATGTCGTCGAACAGCAGCTGGCGGACTTCCGTGCAACTGGGGTCTGCTCTGC
mm (91) CTGTGTGGGAGACAGAAAGAGGAGGATTCTGTGGACATTTGGAGAATCAGCTCATGGACAACCCGATGGTGTGCGCA GACTTTGC
rn (91) CTGTGTGGAGACAGAGGAGGAGCGGATTCTGTCCGACATTTGGGAGAACCAGGTCATGGACAACCCGATGCAGCTCATCATGCTTTGT
      *          **          ** *          *          **
mn (178) TCTCTCAATTACACAGAAGAA ---GGAGCAAAGA---AATACATAGGTAGTCTGAAAGAGACCTTGAANA---TACTCTCGAACATCTTG
lv (178) ACCTACGAACACTACGAACA --- GAAGGATGC----CTACACGGCTCCCTCCCCGCAAGCTGAGGC---AGTACTCGGACTTCCTC
cg (181) TACGACAACGACTACGAAAAGAT-CAAGGACG- ----ACTACTTTGCCAA--TGCAAGGACAAAATAAGACAGTTGACACG-TTCCTT
xt (181) TACAATCCTCAATTTGAAACT- GAAGGGG- ----CATATTTAGAAAAGCTGCCTATTGCTTTGAAA---AGATTCTCTGCTTTCTA
is (178) TTTCTCCCTGGTGTCAACTTGAAGAAGCCCGTAAGAAGTACGAGGAGAACATGGGGAACGTACTCAAAC ---CCTGGCGGACCACCTG
rm (181) TACAACCCTGATTTGAAAAGCT- GAAGGGTG- ----ACTACCTCAAGAACCTGCCGGCTTCTCTCAAG- ---CTTTCTCGACTATTG
ra (181) TACAGCCTGACTTTGAAAAGCT- GAAGGGCG- ----ACTACCTCAAGGATCTGCCGGCTCCCTCAAAG- ---CTTTCTGACTATTG
mm (181) TATAACCCTGACTTTGAGAAGCT- GAAGCCAG- ----GGTACCTGGAGCAACTGCCTGGAATGATGCGGC---TTTACTCCGAGTTCCTG
rn (181) TACAACCCGACTTTGAGAAGCA- GAAGCCAG- ----AGTTCTTGAAGACCATCCCTGAGAAGATGAAGC---TCTACTCTGAGTTCCTG
      *          **          *          *          *          *
mn (259) GGTAATCAGACC-TGGTTTGCCG- AGACAAGATCACC-TATTGT
lv (256) GGCAG-CAGACCTGGTTCGCCGGAGACAAGCTAAC-TACATC
cg (262) GGAGA-CAAACCTTGGTTCGCTGGAGATGGTATCACCATCTGT-
xt (262) GGAGA-CAGATCCTGGTTTGCAGGCGATAAGATCACT-TTTGTC
is (265) GCCAA-TCGAAAAGTGGCCGTGGGTGACAGGTCACG-TACGTC
rm (262) GGAAC-CCACAAGTTCTTTGCTGGGACAATCTCACC-TATGTT
ra (262) GGAAA-CCGCAAGTTTTTTGCTGGTGATAATCTCACT-TATGTC
mm (262) GGCAA-GCGCCATGGTTTGCAGGGGACAAGATCACC-TTTGTG
rn (262) GGCAA-GCGACCATGGTTTGCAGGGGACAAGGTCACC-TATGTC
      *          *          *          *          *

```

mn: 日本沼虾 *Macrobrachium nipponensis*; lv: 南美白对虾 *Litopenaeus vannamei*, GenBank: AY573381; cg: 太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas*, GenBank: AJ558252; xt: 热带爪蟾 *Xenopus tropicalis*, GenBank: NM_001004964; is: 肩突硬蜱 *Ixodes scapularis*, GenBank: XM_002400689; rm: 微小牛虻 *Rhipicephalus microplus*; GenBank: AF077609; ra: 扇头蜱 *Rhipicephalus appendiculatus*, GenBank: AY298732; mm: 小鼠 *Mus musculus*, GenBank: BC019413; rn: 大鼠 *Rattus norvegicus*, GenBank: M11719. “-”表示比较时必要的氨基酸缺口, “*”表示保守的氨基酸残基 The amino acid sequence of dashes indicates the amino acid gaps that are necessary to align these sequences. The conserved residues in all sequences are indicated by asterisk (*).

图 2 日本沼虾 mu 型 sGST 核苷酸序列及与其他生物 sGST 核苷酸序列同源性的比较

Fig. 2 Nucleotide sequence of shrimp mu class sGST was aligned against other animal sGSTs sequences

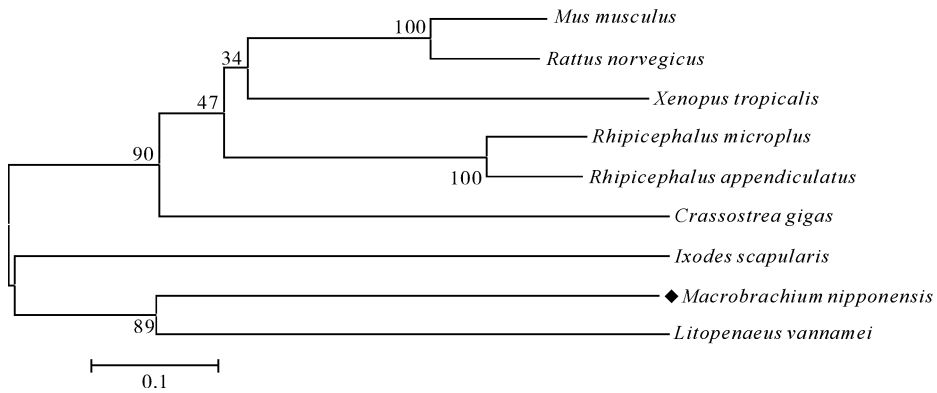


图 3 用邻接法构建的日本沼虾和其他生物 sGST 系统树

Fig. 3 A neighbor-joining phylogenetic tree of sGST in shrimp with sGST of other species

性的损伤^[22]。与贝类等有壳类无脊椎动物相比,鱼类对藻毒素的积聚量较低且清除速度较快。试验条件下用微囊藻填喂虹鳟,1 h 后毒素在其肝脏内迅速聚集,并且在随后的 24 h 内大部分被排出体外。鱼类具备快速吸收并清除藻毒素的能力,说明其体内存在发达的藻毒素去毒系统。另外,最新研究成果显示,某些调制因子(modulating factors),特别是那些由蓝藻水华产生的物质,对微囊藻毒素去毒酶活性有显著作用。例如,微囊藻毒素对微囊藻毒素去毒酶活性有明显促进作用;另一方面,来源于包括蓝藻(蓝细菌)在内的 Gram 氏阴性菌的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)等物质却可有效抑制虹鳟、斑马鱼微囊藻毒素去毒酶活性^[23-24],这也可能与它们对微囊藻毒素毒性的高敏感度有关。

关于微囊藻毒素在淡水鱼虾体内去毒代谢的详细研究,还只停留在去毒十分关键的第一步,即在 sGST 的催化下微囊藻毒素与 GSH 发生加合反应,至于淡水鱼虾微囊藻毒素去毒代谢其他相关基因的精确结构,以及这些基因的顺式元件与反式因子作用机制尚不清楚^[25]。此外,是否可以在食物中添加特定的物质(例如生物硒等),增强淡水鱼虾等水生动物微囊藻毒素去毒酶基因的表达以减轻急性或长期接触导致的慢性致毒作用;是否可以从基因水平上定向筛选高效去毒的淡水鱼虾品系,通过非经典生物操纵更为有效地直接消除微囊藻毒素,这些都有待于进一步研究。本研究中通过 RT-PCR 技术成功克隆日本沼虾 sGST 基因 cDNA 核心序列,这对深入探讨日本沼虾等淡水螺虾微囊藻毒素去毒酶基因的调控机制,阐述生态系统中微囊藻毒素去毒代谢分子机制,以及对于从基因水平上定向筛选微

囊藻毒素高效去毒鱼虾品系,研制可有效提高微囊藻毒素解毒基因表达水平的去毒饲料添加剂,从而提高淡水养殖鱼虾之食用安全保障均具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 瞿春梅,梁旭方,沈丹,等. 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[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(1): 82-87.
- [2] CODD G A. Cynobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance [J]. Water Sci Technol, 1995, 32: 149-156.
- [3] DAWSON R M. The toxicology of microcystins [J]. Toxicon, 1998, 36: 953-962.
- [4] CARMICHAEL W W. Health effects of toxin-producing cyanobacteria: "the CyanoHABs" [J]. Hum Ecol Risk Assess, 2001, 7: 1393-1407.
- [5] YU S J. Primary prevention of hepatocellular carcinoma [J]. J Gastroenterol Hepatol, 1995, 10: 674-682.
- [6] POURIA S, ANDRADE A D, BARBOSA J, et al. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru [J]. Brazil Lancet, 1998, 352: 21-26.
- [7] CHORUS I, FALCONER I R, SALAS H J, et al. Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters [J]. J Toxicol Environ Health, 2000(3): 323-347.
- [8] HITZFELD B C, HOGER S J, DIETRICH R. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment [J]. Environ Health Perspect, 2000, 10: 113-122.
- [9] KRIENITZ L, BALLOT A, KOTUT K, et al. Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of lesser flamingos at Lake Bogoria, Kenya [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2003, 43: 141-148.
- [10] LEAVER M J, GEORGE S G. Structure of the plaice glutathione S2 transferase A gene [J]. Mar Environ Res, 1995, 39: 33-37.

- [11] LEAVER M J, GEORGE S G. Three repeated glutathione S2 transferase genes from a marine fish, the plaice (*Pleuronectes platessa*) [J]. Mar Environ Res, 1996, 42(14): 19-23.
- [12] LEAVER M J, WRIGHT J, GEORGE S G. Structure and expression of a cluster of glutathione S2 transferase genes from a marine fish, the plaice (*Pleuronectes platessa*) [J]. Biochem J, 1997, 321: 405-412.
- [13] LIAO W Q, LIANG X F, WANG L, et al. Cloning of the microcystin-detoxifying enzyme gene in the main Chinese freshwater fishes [J]. Ecol Sci, 2005, 24(1): 6-8.
- [14] 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]. Aquatic Toxicology, 2003, 62: 219-226.
- [15] 王琳, 梁旭方, 廖婉琴, 等. 罗非鱼微囊藻毒素去毒相关基因克隆与活体表达研究[J]. 水生生物学报, 2007, 31(6): 788-797.
- [16] GEHRINGER M M, SHEPHARD E G, DOWNING T G, et al. An investigation into the detoxification of microcystin-LR by the glutathione pathway in Bal b/c mice [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(5): 931-941.
- [17] 吴幸强, 龚艳, 王智, 等. 微囊藻毒素在滇池鱼体内的积累水平及分布特征[J]. 水生生物学报, 2010, 34(2): 388-392.
- [18] RAFAEL O R, CLAUDIA W. Age related acute effects of microcystin-LR on *Daphnia magna* biotransformation and oxidative stress [J]. Toxicon, 2010, 56: 1342-1349.
- [19] 张双玲, 陆开宏, 郑忠明, 等. 微囊藻毒素在铜锈环棱螺肝组织中的累积降解及对 3 种酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(1): 54-59.
- [20] 程炜轩, 梁旭方, 王琳, 等. 斑马鱼和鲢对微囊藻毒素与孔雀石绿的行为反应[J]. 水生态学杂志, 2009, 2(5): 36-40.
- [21] 梁旭方. 鱼虾贝肝脏 sGST 去毒酶基因的研究[J]. 水利渔业, 2006, 26(5): 4-5.
- [22] PIRES L M, KARLSSON K M, MERILUOTO J A, et al. Assimilation and depuration of microcystin-LR by the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* [J]. Aquatic Toxicology, 2004, 69: 385-396.
- [23] WIEGAND C, PFUGMACHER S, GIESE M H, et al. Uptake, toxicity, and effects on detoxication enzymes of atrazine and trifluoroacetate in embryos of zebrafish [J]. Ecotoxicol and Environm [J]. Safety, 2000, 45: 122-131.
- [24] BEST J H, EDDY F B, CODD G A. Effects of microcystin cells, cell extracts and lipopolysaccharide on drinking and liver function in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum [J]. Aquat Toxicol, 2003, 64: 419-426.
- [25] 于燕, 梁旭方, 廖婉琴, 等. 水生生物对微囊藻毒素去毒分子机理及调控因子研究[J]. 水生生物学报, 2007, 31(5): 738-743.

Molecular cloning and *in vivo* expression analysis of mu-class soluble glutathione S-transferase in shrimp

QU Chun-mei LIANG Xu-fang ZHANG Jin HE Shan SHEN Dan

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

Abstract Soluble glutathione S-transferase (sGST) is extremely important for metabolic detoxication by catalyzing the conjugation of GSH (glutathione) with microcystins. In this study, the amino acid sequence of a mu-class sGST cDNA fragment from the liver of *Macrobrachium nipponensis* were firstly obtained by RT-PCR using degenerated primers. Sequence analysis revealed that the cloned mu-class sGST cDNA fragment was 299 bp in length, encoding 99 amino acids. Homologous analysis showed that the nucleotide sequence of the glutathione S-transferase gene in *M. nipponensis* was 60% homologous to the glutathione S-transferase gene of *Litopenaeus vannamei*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Ixodes scapularis*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Xenopus tropicalis*, *Rhipicephalus microplus* and *Crassostrea gigas*. This suggested that the sGST cloned in this study belonged to mu-class GST. The result of further experiment showed that mu-class sGST level did not change significantly in *M. nipponensis* exposed in MC-LR.

Key words shrimp (*Macrobrachium nipponensis*); sGST; clone; microcystins; *in vivo* induced expression