

刘光辉,余岸良,何杨,等. 黄颡鱼硒蛋白基因的克隆与分析[J]. 华中农业大学学报, 2024, 43(1): 185-193.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.01.021

黄颡鱼硒蛋白基因的克隆与分析

刘光辉¹, 余岸良¹, 何杨¹, 郭雨诗¹, 柯江¹, 罗智^{1,2,3}

1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 华中农业大学深圳营养与健康研究院, 武汉 430070;
3. 中国农业科学院深圳农业基因组研究所/岭南现代农业科学与技术广东省实验室深圳分中心, 深圳 518000

摘要 为探讨黄颡鱼硒蛋白 *selenow2a*、*selenop2* 和 *selenot2* 基因之间的关系, 采用 3'/5' RACE PCR 克隆得到 3 个基因的 cDNA 全长, 分别为 891、1 998 和 1 432 bp, 其中 ORF 长度分别为 288、828 和 600 bp, 编码 95、275 和 219 个氨基酸。在线工具 SECISerach3 对 3 个基因的 cDNA 序列分析结果显示, 它们都含有可以编码硒代半胱氨酸的终止密码子, 以及在 3' 非编码区存在 SECIS 元件。通过氨基酸序列比对和系统发育树分析, 发现 *selenow2a*、*selenop2* 和 *selenot2* 基因预测得到的氨基酸序列与斑马鱼 (*Danio rerio*) 氨基酸相似性分别为 82.24%、66.19% 和 79.45%, 而与斑点叉尾鲴 (*Ictalurus punctatus*) 的氨基酸相似性分别为 94.74%、68.50% 和 90.95%, 在发育树上则显示为树杈相接近。采用实时荧光定量 PCR 检测 3 个硒蛋白基因的 mRNA 在黄颡鱼心脏、肝脏、肌肉、脑、肠、脾脏、精巢和卵巢组织中的表达, 结果显示其 mRNA 表达水平呈现组织特异性。表明 3 个基因拥有硒蛋白家族的特征, 但在组织表达上具有特异性。

关键词 硒蛋白; 基因克隆; 分子特征; 黄颡鱼; 组织表达

中图分类号 Q959.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)01-0185-09

硒(selenium)是脊椎动物维持细胞功能的正常行使并参与多种代谢活动必需的微量元素之一^[1-2]。体内过高或过低的硒水平会引起水产动物机体免疫力^[3]、生长性能^[4]的降低以及硒毒性^[5]等负面影响。因此,在水产饲料中添加适量的硒用于保持鱼体健康成长是必需的^[6]。

硒代半胱氨酸(selenocysteine, Sec)是细胞中硒的主要形式,于 20 世纪 70 年末被发现且被归于第 21 种氨基酸,由终止密码子 UGA 编码,并通过特殊的共翻译机制嵌入到多肽链中。硒蛋白是含有 Sec 的蛋白,也是硒参与体内生理调控的关键生物分子,其特征是至少含有 1 个 Sec, Sec 的存在使得硒蛋白能够参与氧化还原反应。至今,在小鼠和人类中分别发现了 24 种和 25 种硒蛋白^[7]。通常情况下,UGA 密码子在翻译中执行终止信号。然而,当硒半胱氨酸插入序列(selenocysteine insertion sequence, SECIS)出现在 3' 非翻译区(3' untranslated region, 3' UTR)时,UGA 会被翻译成 Sec^[8]。

在斑马鱼中已经鉴定 18 个含 Sec 的硒蛋白基因^[9],此外,部分硒蛋白基因也在其他鱼类中被发现。例如,在蓝鳍金枪鱼(*Thunnus maccoyii*)和光唇鱼(*Acrossocheilus fasciatus*)发现硒蛋白 *gpx1* 基因^[10-11];在鲤(*Cyprinus carpio*)和蓝鳍金枪鱼得到了 *gpx4* 基因的信息^[10,12]。硒蛋白基因 *selenou*、*selenow* 和 *selenop* 的信息也分别在河豚(*Tetraodontidae*)、鲫(*Carassius auratus*)和罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)中获得^[13-15]。最近,笔者所在实验室已经在黄颡鱼中克隆获得了 7 种硒蛋白(*gpx1*、*gpx3*、*gpx4*、*selenow*、*selenop*、*txnr2* 和 *txnr3*)基因的信息,并描述了这些硒蛋白基因的分子特征^[16]。在此基础上,本研究克隆获得黄颡鱼 3 个硒蛋白基因(*selenow2a*、*selenop2* 和 *selenot2*)的全长 cDNA 序列,使用生物信息学等方法分析其氨基酸序列同源性、结构域和进化关系,并探讨了它们的组织表达分布,以期深入了解硒蛋白基因之间的结构和功能的异同及它们在生物进化上的联系提供基础资料。

收稿日期:2022-11-02

基金项目:华中农业大学深圳营养与健康研究院项目(SZYJY2023016);国家重点研发计划“蓝色粮仓”科技创新专项(2018YFD0900400)

刘光辉, E-mail: ghliu@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 罗智, E-mail: luozhi99@mail.hzau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 试验鱼及试剂

试验用鱼购自武汉市当地农贸市场。在不投喂处理24 h后,选取健康、体形一致的体质量为(24.2±2.4) g的黄颡鱼分2组进行采样分析:第1组黄颡鱼取肝脏和卵巢组织用于基因cDNA克隆。第2组黄颡鱼样品用于测试心脏、肝脏、脑、脾脏、肌肉、精巢、卵巢和肠组织中黄颡鱼基因的表达水平。取样方法参照Zhao等^[17]方法,所有样品的获取均在冰上进行,样品总RNA的分离和提取在取样后迅速进行,于-80℃保存样品和RNA提取物。

凝胶回收试剂盒(Omega)、TRIzol试剂、逆转录试剂盒、3'/5'RACE PCR试剂盒、RT-PCR试剂盒,均购自TaKaRa公司;RNA提取实验中用到的异丙醇、乙醇等化学试剂均为分析纯(上海国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 硒蛋白基因cDNA序列的克隆

序列克隆参照文献^[17]的研究方案进行。总RNA的提取按照TRIzol说明书进行。使用琼脂糖凝胶电泳和Nanodrop ND 2000分光光度计(Thermo Fisher Scientific, USA)检测总RNA的质量和浓度,以提取的总RNA为模板,按照逆转录试剂盒(Prime-Script™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit)说明书进行,合成第一链cDNA。

根据GenBank数据库及转录组测序数据,设计扩增黄颡鱼硒蛋白基因序列的引物(表1)。包括目的cDNA核心片段及3'和5'末端,采用巢式PCR反应扩增目的片段,其中Outer-PCR反应参数为:95℃预变性5 min;然后95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,共25个循环;最后72℃延伸5 min。Inner-PCR反应参数为:95℃预变性5 min;然后95℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 1 min,共30个循环;最后72℃延伸5 min^[18]。扩增所得目的片段,采用Omega公司胶回收试剂盒进行回收提纯,然后将目的片段克隆到pMD™19-T (TaKaRa)载体,转化到DH5α感受态细胞中,后续将转化的菌液均匀涂在含氨苄的LB平板上,随机挑选菌落进行PCR检测,将带有目的条带的菌液送至武汉擎科生物有限公司测序。

1.3 序列分析

使用DNASar软件拼接序列片段,获得cDNA全长。拼接好的cDNA序列通过NCBI进行Blast分析,以确定该序列命名是否正确。使用DNASar软

表1 黄颡鱼硒蛋白基因cDNA克隆引物序列

Table 1 Nucleotide sequences of the primers used for the cDNA cloning

引物 Primers	序列 Sequences (5'-3')
3'-RACE PCR	
3' <i>selenow2a</i> -outer	GAGGTATCTGGCTTCGTTGG
3' <i>selenow2a</i> -inner	GCCACCTTGCCTCATACTCT
3' <i>selenop2</i> -outer	AGGACCAAGAACACTACCATT
3' <i>selenop2</i> -inner	ACATGCTTCAGTTATCGCTCT
3' <i>selenot2</i> -outer	GAATACTCCAGGTCTATCAGCC
3' <i>selenot2</i> -inner	CTGCTTGCCATTGCTCTGA
3' RACE outer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT
3' RACE inner	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTAC-TATAGG
5'-RACE PCR	
5' <i>selenow2a</i> -outer	TGCCAACGAAGCCAGATAC
5' <i>selenow2a</i> -inner	TAGCCTCATCCGCCACAAT
5' <i>selenop2</i> -outer	GATTCCCTCTGCTGTTCGTT
5' <i>selenop2</i> -inner	CCACGAATAGCGTTGAAGC
5' <i>selenot2</i> -outer	GATTCATCTTGAGGTGGTTGTC
5' <i>selenot2</i> -inner	TCAGAGCAATGGCAAGCAG
5' RACE outer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA
5' RACE inner	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGAT-CAGTCGATG

件,找出目的基因的开放阅读框(open reading frame, ORF),将其翻译成氨基酸序列,并使用Clustal-W软件进行氨基酸多序列比对和氨基酸相似性分析。在GUIDANCE网站(<http://guidance.tau.ac.il/>)上对氨基酸多序列进行比对、剪切操作^[19],并采用MEGA 6.0软件的邻接法(NJ)构建构建进化树,每个节点的可信值设置为1 000次重复计算。使用SE-CISearch3 (<http://gladyshelab.org/selenoprotein-predictionserver>)预测得到硒蛋白的SECIS元件,使用SECISln (<http://genome.crg.es/software/SECISaln/>)获得SECIS元件的标准模型^[18]。

1.4 硒蛋白基因的组织表达分析

采用实时荧光定量PCR(qPCR)检测黄颡鱼硒蛋白基因的组织表达情况^[18]。各组织样品的总RNA提取方法同本文“1.2”,按照逆转录试剂盒(TaKaRa)说明书进行操作。荧光定量PCR引物如表2所示。本试验用GeNorm进行标准化选出在黄颡鱼不同组织中稳定表达的*hprt*和*b2m*作为内参基因,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算硒蛋白基因的组织表达水平。

1.5 数据处理

试验数据用SPSS 26.0软件(SPSS, Michigan Avenue, Chicago, IL, USA)进行处理,结果以“平均

值±标准误”(mean±SEM, n=3)表示,使用单因素方差分析(one-way ANOVA)和Duncan’s多重比较检验进行不同组间指标差异性的统计检验。统计分

析之前用Kolmogorov-Smirnov检验所有数据的正态分布性,以Levene检验分析方差齐性,显著性水平为 $\alpha=0.05$ ^[17-18]。

表 2 硒蛋白基因荧光定量PCR引物

Table 2 Primers for quantitative PCR of selenoprotein genes

基因 Genes	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')	登录号 Accession No.
<i>selenow2a</i>	TACGAACCCCGCTATCAGGA	ATCGTGGGCTTTCTGGATGG	ON109398
<i>selenop2</i>	CAGGACGCTTTTTCAAGGGC	GGCAGCACAATGTGAAACGT	ON313812
<i>selenot2</i>	CACACACAGGCAGAACAAGC	AGCTGGCTGATAGACCTGGA	ON109397
18S rRNA	AGCTCGTAGTTGGATCTCGG	CGGGTATTTCAGGCGAGTTTG	KP938527
β -actin	GGACTCTGGTGATGGTGTGA	CTGTAGCCTCTCTCGGTCAG	EU161066
<i>gapdh</i>	GCCTCCTGCACCACAAACT	GCCTTGTTGAGCTTGACGAA	KP938522
<i>tuba</i>	TCAAAGCTGGAGTTCTCGGT	AATGGCCTCGTTATCCACCA	KP938526
<i>b2m</i>	GCTGATCTGCCATGTGAGTG	TGTCTGACACTGCAGCTGTA	KP938520
<i>elfa</i>	GTCTGGAGATGCTGCCATTG	AGCCTTCTTCTCAACGCTCT	KU886307
<i>ubce</i>	TCAAGAAGAGCCAGTGGAGG	TAGGGGTAGTCGATGGGGAA	KP938524
<i>hpri</i>	ATGCTTCTGACCTGGAACGT	TTGCGGTTTCAGTGCTTTGAT	KP938523

2 结果与分析

2.1 *selenow2a*、*selenop2* 和 *selenot2* 基因的分子特征和进化关系

本研究使用RT-PCR和RACE的方法获得了*selenow2a*、*selenop2*和*selenot2*的cDNA全长序列,长度分别为891、1 998和1 432 bp,其中ORF长度分别

是288、828和600 bp,能够编码的氨基酸个数分别为95、275和219个(表3)。将黄颡鱼*selenow2a*、*selenop2*和*selenot2*基因预测得到的氨基酸序列与斑马鱼(*Danio rerio*)进行比较,发现氨基酸相似性分别为82.24%、66.19%和79.45%,而与斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)的氨基酸相似性分别为94.74%、68.50%和90.95%。

表 3 硒蛋白基因cDNA序列信息

Table 3 cDNA sequence information of the selenoprotein genes

基因 Genes	登录号 Accession No.	5' UTR/bp	ORF/bp	3' UTR /bp	全长/bp Full length	蛋白/aa Protein
<i>selenow2a</i>	ON109398	128	288	475	891	95
<i>selenop2</i>	ON313812	80	828	1090	1998	275
<i>selenot2</i>	ON109397	108	660	664	1432	219

cDNA序列中存在编码Sec的终止密码子,在3'非编码区有SECIS元件序列(图1)。黄颡鱼*selenow2a*、*selenop2*和*selenot2*基因预测的氨基酸结构域中存在保守的氧化还原序列CXXU(U为Sec,X为任意氨基酸)。其中*Selenow2a*结构域中还包括有硒蛋白Rdx结构域和硫氧还蛋白样超家族,*Selenop2*结构域包括信号肽区域和富组氨酸区域,*Selenot2*结构域包括硒蛋白Rdx结构域(图2)。AAUGA保守序列存在于黄颡鱼*Selenow2a*、*Selenop2*和*Selenot2*的SECIS元件上(图3)。

在进化关系上,黄颡鱼*Selenow2a*与斑点叉尾鲷的*Selenow2a*进化关系更加密切,而与斑马鱼*Selenow2a*、黄颡鱼同源蛋白*Selenow*、人类*Selenow*和大鼠*Selenow*关系较远(图4A)。*Selenop2*则与斑马鱼*Selenop*的同源蛋白*Selenopb*(*Selenop2*)在进化上更

为亲近,而与其他物种关系较为疏远(图4B),黄颡鱼*Selenot2*的进化关系与*Selenop2*较为类似(图4C)。

2.2 *selenow2a*、*selenop2* 和 *selenot2* 基因的组织表达分析

通过实时荧光定量PCR检测克隆的黄颡鱼*selenow2a*、*selenop2*和*selenot2*基因在8种组织中的mRNA表达水平,结果如图5所示。黄颡鱼*selenow2a* mRNA在各个组织中广泛表达,表达水平最高的是卵巢,而心脏中mRNA表达相对较低(图5A)。*selenop2*在各个组织中广泛分布,其mRNA表达最高和最低分别是卵巢和脾脏(图5B)。*selenot2*的心脏、肠、肝脏中mRNA表达水平较高,最高的是肠,而脑、精巢、卵巢、脾脏中很低(图5C)。总的来说,表达水平具有组织特异性。

A

1 CTAATGATCGTTGACCTCCGCGGATTATCAAATAGGCCACGCCTTCCCGATGACGCAATA
61 TCTGTTACGCTGTTCTGGAAATCCCTAGAAAATAAGTGCATCCCAGTCTGAGATCAGTCCG
121 GTTTGGTATGGGTGTA AAAATCAATGTGGAATATTGTGGCGGATGAGGCTACGAACCCC
1 M G V K I N V E Y C G G U G Y E P
181 GCTATCAGGAGCTCAAGCGAGTCGTCATCGGCGAGTTTCTGAGGCGGAGGTATCTGGCT
18 R Y Q E L K R V V I G E F P E A E V S G
241 TCGTTGGCAGACAAGGGAGTTTTGAGATCGAGATCAATGGACAGCTAGTTTTCTCAAAGC
38 F V G R Q G S F E I E I N G Q L V F S K
301 TAGAAACCAGCGGTTTTCCCTACGAAGATGATGTCATGGAGGCCATCCAGAAAGCCACG
58 L E T S G F P Y E D D V M E A I Q K A H
361 ATGGCAAACCAGTGGAGAAAATCACCAAGAGCCGCCACCTTGCATCATACTCTAACTAC
78 D G K P V E K I T K S R P P C V I L *
421 CTCCGAAAACAAGGCTATGAGTGA AAAC TTTGTAATCATGTAACAGCTCCTCAGATGT
481 CTCTTTTGCCTCTGCTTCTAATGGGGTGT TTTTGGACTTAAATGATTGGTGTAGCTAAA
541 AACATAAGGTTACACTATGAAGCTCTCAGTCCAATCACTTTCAGATAGTAGCAGAAATGA
601 AAGGGAGATGTTGAAGTGTGCATTA AAAAAGGTTCAGATGTGTTTTACGGTTTTACTGTA
661 CTAATTGCTGCCTTGATTAAGATATTTAATTATAGATGATAATATAAAATATTAACATTA
721 AAAAAATGCTTATAAGATTTAGAAAATAAAGGTAACATGTAGA ACTTTCAGTTATCAAAA
781 TCACACAGTAATAAAATCCATTATCCAGGAACTGGTTAAGATGTTGAAATGGCTTTTTCA
841 GTTTTCCTAATTGTTTTGTAAGACTATTTCCAATCTAAGAAAAAAAAA

B

1 TCAAGTATCTGTTTTGTAGGGAAGAAGTCAAGGGATTTAAGCTCACATCCTTCCATAAGG
61 AAGGGACAGAGACGTGAGCCATGCAAGCGGTGTTGGCTCTGTGCTTGGCCTCACTCCAG
1 M Q A V L A L C L A S L P G
121 GCCTGCTCTGGGCTTCAACGCTATTCGTGGAGAGAGACAGCAGCAAGTCGACCATCTGTA
15 L L W A S T L F V E R D S S K S T I C K
181 AACTCGCACCGCACTGGGAGATCGATGGCCGCTCTCCCATGAGTGAGCTGTTGGGAAACG
35 L A P H W E I D G R S P M S E L L G N V
241 TGGTGGTGGTAGCACTGTTGAAAGCCACTGACATTTCTGCCTCACGCGGCTGTAAAG
55 V V V A L L K A T U H F C L T Q A A K M
301 TGGGAGACCTGCGTGATAAGCTGGTACGGGGAAACCTGACCAGCGTTGCATTTCTGATCG
75 G D L R D K L V R G N L T S V A F L I V
361 TGAATGAACAGGACGCTTTTCAAGGGCCATGTATTGGGAGCTGAAGAAACGAACAGCAG
95 N E Q D A F S R A M Y W E L K K R T A E
421 AGGGAATCCCTGTGTACCAACAGGGCCACTGCAGGACGACGCTGGGACACGCTACAGG
115 G I P V Y Q Q G P L Q D D V W D T L Q G
481 GAGATAAAGACGACTTCTTAGTTTACGATCGATGCGGCCGCTGACGTTTCACTTGTGC
135 D K D D F L V Y D R C G R L T F H I V L
541 TGCCGTACAGCTTCTGCACTATCCGTACGTGGAGGCGGCCATCAGAGCCACGTA CTTC
155 P Y S F L H Y P Y V E A A I R A T Y L Q
601 AAAACATCTGTA ACTGCACGCAATTCAACTTACTCAAATAACTAGCAACAACGTGACCA
175 N I C N C T Q F N S T Q I T S N N V T T
661 CAACAAGGAGTACGGAGCAGAACACAAATGCAACAGAATCATCCNNGAACAGAATCACC
195 T R S T E Q N T N A T E S S X N K N H H
721 ACCACCACATCACCACCACCATCACCACCACCACATCACCACCACATCACCATCACC
215 H
781 ATCACCATCGAGATGACCACAGCCAGGATAGCTCCTCCCTAAATCCTGTCATCACC AAGA
235 H H R D D H S Q D S S S L N P V I T K T
841 CCAATAGCACCAGAACAGTGCAGAAACACACTACGAGGACCAAGAACACTACCATTCTG
255 N S T R T V Q K H T H E D Q E H Y H S V
901 TAAAATAGAAGCCTGACTCCTTTAGAGA ACTATGGCTTTAAAGATATCATA CAGCACCAT
275 K *
961 TAAACAGCTAATCCGGTTTCTTTACTATTCTACTAGAGCTACGATGCTAAAACATATAGC
1021 CACCAGCATCATA CACATTCGTAGCCAAATCTTCTTGAAGCCAGATTTTTTAAATACGAC
1081 GTCACTGTGATATGAACAAATAGTGC GAAATAACATGCTTCAGTTATCGCTCTGTATACG
1141 AACCGATTTATTTTCGTA AAAATAATCTGTAGGATTTTACTGCTTCTAATCAACGAGTCAA
1201 TTCTAATAACGGCGTTTATACGTCATATTTAAATCAGTTAATTATTTCAATTTGACACT
1261 CATTCTGACCAAAATATCCTCAACATTTTATTTAGAACAAAAGTAATGGCACCCCTATAC
1321 AAGACAGAAGGCTTAGTGTGTGGGTCTGTGGGAGCCGACAGCTGCGATGGCTGAGCTGCA
1381 TTACTACATTA CTGCATTA CTCACTCTGCACCCTTTCAACAATTAAGTCAGTATTTGTCT
1441 TGGAGTTGTGTGGGTGTGGCTAAATGTCTAAACGATTGATAAATGTGTCATATGGTTAA
1501 ACCTGCCATTTATA CAATGAATTGGCAGATAAGTTTTCTTTCCCTAGCAGCTTGCAATAT
1561 AAATGAAAACACATAAAATTTCTCAGCTGATTA ACTACATGTGCGTAAGTGATATCGGG
1621 CTGTTATTGTAATTTATTTGATTTTAGAAAAGGTTTGGTCCAGTACAGTTTACAGGAA
1681 GTCATAACTAGCTTTCAGGTGTAGAAACATCTCCGATGGATCGTTGTGAAAGCTCGCTC
1741 CTCTTGGGCTCCTCGTCA TATGCTCTTAATGAAGTCTGCACATCAAACCCACACCGGGGGC
1801 GTGCACGCTGATGCTGAGCTGAGTAGGAATCAGGTGGAGCACCAACACAAGTTCTGTCCA
1861 GATGGCTGCCTCTCAA ACTGAGGTATCTGAAATCCGGTATCTGAACTTGGGTCAGCTGAA
1921 CAAAAGCTGAAGGGACCTTATTTTTGTACTATTATAACCCCTTTTATAATATATTATATT
1981 TAAATATAAAAAATTATA

C

```

1 ATCTGGCAACCCTGTGAGAGTCTGCACAGTGTGTAGTGAACCTGTCACCTCTGTAGTGA
61 CCGGGGCGTTGCAGTTCATGCAGGTCCCCTCGCTTCTTATAGAAATGGCCGAATAT
1 M A E Y
121 AGCCACACGGGTATATTAACGGCTTTGTTGTTTACGGCCGTGACGGTGAGAGATATT
5 S H T G I L T A L L L F T A V T V R D I
181 TACCTGGGCCGCACTGCACAGAGCAGCAGGACGCGCAGAGCAGCGTGGCCCTCCGGCGGC
25 Y L G R T A T E Q Q D A Q S S V A S G G
241 TTCCCGGAGGCGGAGAGCAGCACACACAGGCAGAACAAGCCGAAATTCTACACAGGACCG
45 F P E A E S S T H R Q N K P K F Y T G P
301 GTGCTGAAGTTTCAGTACTGTATTTCTGAGGGTACAGTAAGGTGTTCCAGGAATACTCC
65 V L K F Q Y C I S U G Y S K V F Q E Y S
361 AGGTCTATCAGCCAGCTGTATCCTGACATCAAAAATCGAGGGAGATAATTATCCTCCAAA
85 R S I S Q L Y P D I K I E G D N Y P P K
421 CTCATCAACAAATACCTTGCAAATTTTCATCTCTACTTTAAACTGCTTGCCATTGCTCTG
105 L I N K Y L A N F I S Y F K L L A I L
481 ATTGTCACTGGACAAAACCTTTCCAAATGCTTGAACAAACACACCAAGAGTTTGGTCT
125 I V T G Q N P F Q M L G T N T P R V W S
541 TGGGGACAAGAAAATAAGATATTTCTCATGTCTCATGATGTTCTTTCTCAGTAACATGCTG
145 W G Q E N K I F S C L M M F F L S N A L
601 GAGACACAGTTCCTGTCTACTGGAGCATTGAGATAACATTAATGATGTTCCCATTTGG
165 E T Q F L S T G A F E I T L N D V P I W
661 TCGAAGCTACAGTCAGGGTATGTACCGAACATTCAGGAGCTCTTTCACATTCTGGACAAC
185 S K L Q S G Y V P N I Q E L F H I L D N
721 CACCTCAAGATGAATCAGGCAACAACCTCAAATCCCCTCGCCGTAGCACTGCTGTTTG
205 H L K M N Q A N N L K F P S P *
781 AGCTGAGAGAGAGAGGTTTCTGGAGTTGTTTCTCTGGACAGTGAGACCGTGGACTGTGGC
841 TTAATGAAGGCCTGCACTGCAAACAGCTTGCTGTGGGTGTAGACTGGATGTTCTCTGTCAC
901 CACACACGCTTCTCTGACCAGCGACACACTCCTCCAGACTGACTCAATCTTGACCGGGC
961 AGCGTGCTATACGCATCCATTGTGTA AAAAGTCATTCATAAGCCGGACACTCTAAACTTTA
1 021 TTTTTCGAATGCTGAAAATAGAGATACATGAGCATGTGAGACCAATAATCTTAATAAGG
1 081 AAAAGTGCATAAAAATGTCTCACATTTGTCTGCAAACGATTGATCAAGGGTATGTTTTTTT
1 141 GTGTGTGTGGGGCGCTGCTGTA AAAACTGTAATTATGTATACAGGATCTTTCCCATATATA
1 201 CATTCACTTGCACCTGAACAGTTGTTTTTTTTTCGGGGATAAGGAAAATATTACTGGTA
1 261 ATGTGCAATTAATTTTTCCCCACTTTGGTTAACGTGTAATTCATGTACTCTAGCTG
1 321 AGAGTTGAGATGGGAAGATATGTTGTTAGATGGGAAAACATGGTATCTATTGGGGTCTGCA
1 381 GATTTATCCTTCTCTTATTTCTTCAGGCTTTTTTAGCAAATGTATAAAAA
    
```

编码硒代半胱氨酸的终止密码子以粗体显示,并将U用方框标记,在3'非编码区中预测的硒代半胱氨酸插入序列(SECIS)用下划线显示。The termination codon translated into selenocysteine is shown in bold and the U is marked with a box. The predicted selenocysteine insertion sequence (SECIS) in the 3' untranslated region is shown as a underline.

图1 黄颡鱼 *selenow2a* 基因(A)、*selenop2* 基因(B)和 *selenot2* 基因(C)的核苷酸序列及其氨基酸序列和功能域

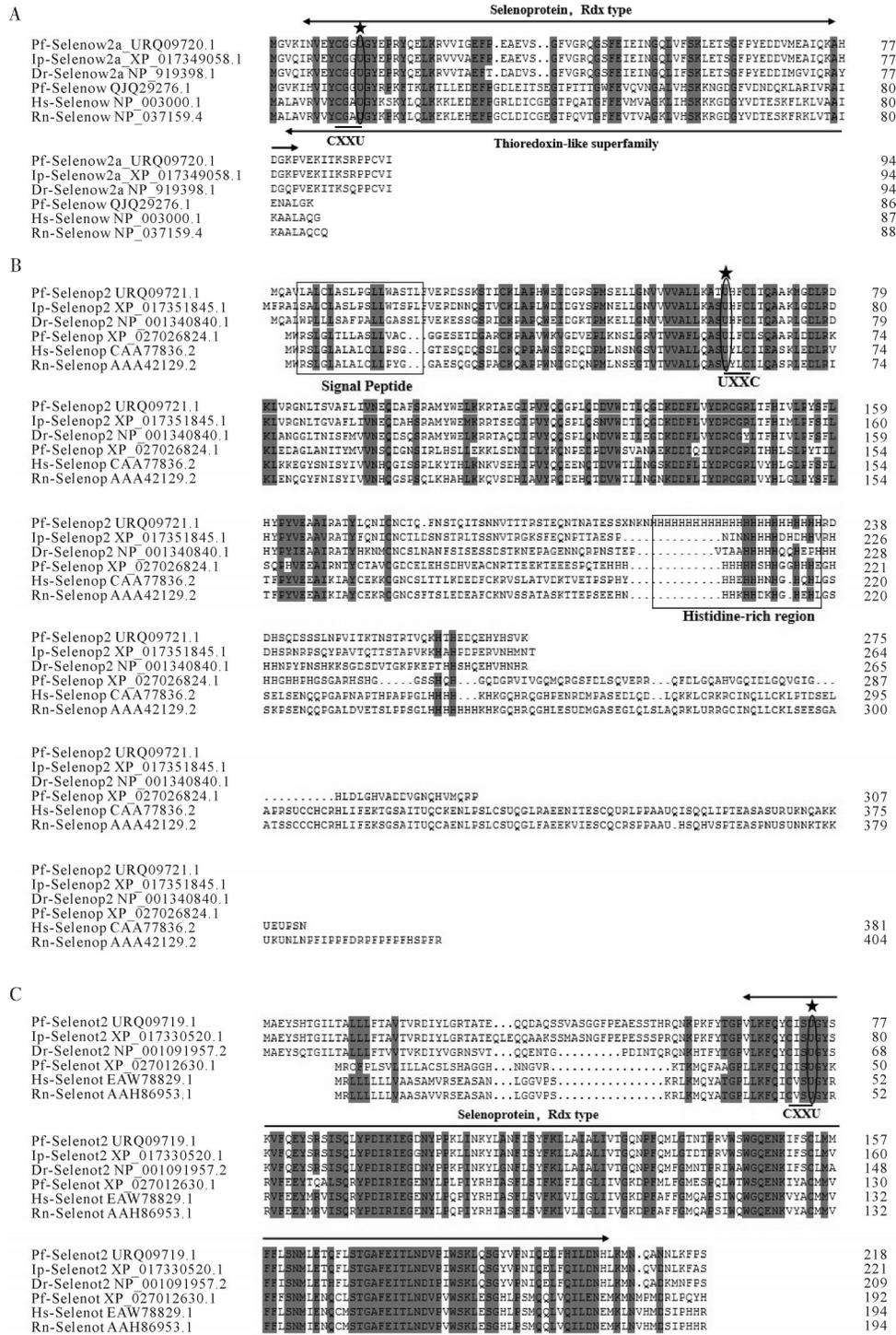
Fig.1 Nucleotide sequence of the *selenow2a*(A), *selenop2*(B) and *selenot2*(C) gene of yellow catfish and its deduced amino acid sequence and predicted functional domain

3 讨论

本研究克隆并获得3个黄颡鱼硒蛋白基因 *selenow2a*、*selenop2* 和 *selenot2*,并在克隆得到的3个硒蛋白基因的cDNA序列中发现编码Sec的终止密码子和在3'非编码区发现SECIS元件,确定了克隆得到的基因属于硒蛋白家族^[8]。比较和分析预测得到的氨基酸序列和结构域,发现3个克隆的基因与斑马鱼、斑点叉尾鲴都有比较高的氨基酸相似性和相似结构域,暗示它们在进化过程中是保守的^[9-10,20-21]。通过比对不同物种之间硒蛋白基因以及亚型基因之间的进化关系,进一步说明了这种保守的现象。最后,检测了3个硒蛋白基因在黄颡鱼8种测试组织中的表达分布,结果表明3个硒蛋白基因具有组织特异性。

克隆得到的 *selenow2a* 是黄颡鱼 *selenow* 的亚型

基因。已有的研究报道了 *selenow* 在黄颡鱼多个组织中表达分布,并且发现在黄颡鱼的鳃中表达量最高^[16]。但是本研究结果显示 *selenow2a* 在卵巢中表达水平最高。有研究人员发现雌性塞内加尔鲷 (*Solea senegalensis*) 的卵母细胞生长中会增加 *selenow2a* 的表达,这是一种抗氧化保护措施^[22],因此,我们推测 *selenow2a* 基因在黄颡鱼卵巢中的高mRNA表达可能和雌性黄颡鱼后续的卵巢发育有关。本研究在预测的结构域中发现了与氧化还原调节相关的CXXU序列和硫氧还蛋白样折叠结构,暗示 *Selenow2a* 能够参与机体的抗氧化反应^[9],这与之前报道的 *Selenow* 类似^[16],这可能与2个基因具有相近的ORF长度和氨基酸数目有关。氨基酸同源性和系统发育树分析的结果表明黄颡鱼 *Selenow2a* 和斑点叉尾鲴 *Selenow2a* 在进化关系中最接近。



Pf: 黄颡鱼 *Pelteobagrus fulvidraco*; Ip: 斑点叉尾鲷 *Ictalurus punctatus*; Dr: 斑马鱼 *Danio rerio*; Hs: 智人 *Homo sapiens*; Rn: 褐家鼠 *Rattus norvegicus*.

使用序列上方的横线标记Rdx结构域和硫氧还蛋白超家族;横线代表氧化还原序列CXXU(U为Sec,X为任意氨基酸);Sec(U)使用(★)代表;保守的U位置用椭圆标记。方框代表信号肽区域和富组氨酸区域。Horizontal line above the sequences denotes the Rdx structural domain and thioredoxin-like superfamily. The horizontal line below the sequence shows the redox sequence CXXU (U is Sec, X is any amino acid). Sec(U) is represented using (★). The conservative U position is marked with an ellipse. The boxes indicate signal peptide regions and histidine-rich regions.

图2 Selenow2a(A)、Selenop2(B)和Selenot2(C)氨基酸序列多重比对

Fig.2 Multiple amino acid sequence alignment of Selenow2a(A), Selenop2(B) and Selenot2(C)

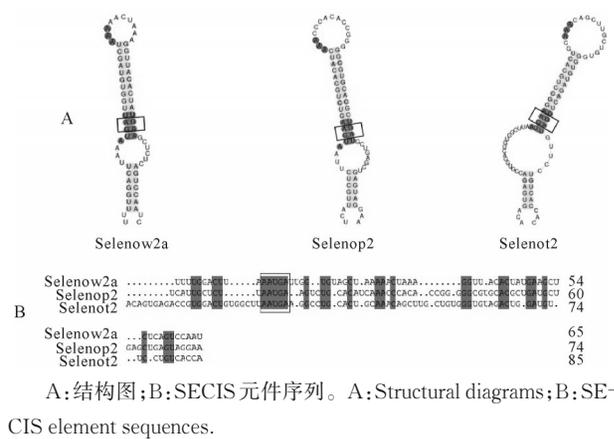


图 3 黄颡鱼硒蛋白 SECIS 元件分析与比较

Fig.3 Analysis and comparison of selenoprotein selenocysteine insertion sequence (SECIS) elements of selenoprotein genes from yellow catfish

Selenop 是唯一已知的含有多个 Sec 的硒蛋白，

主要将硒从肝脏传递到其他器官^[23]，在人类中有 10 个，而在斑马鱼中发现了 17 个^[9]，之前的研究报道了在黄颡鱼的 *selenop* 基因上发现了 13 个 Sec^[16]。然而，在本研究中克隆得到 *selenop2* 的 cDNA 序列中仅发现了 1 个 Sec，以及 3'非编码区也仅含有 1 个 SE-CIS 元件，这和斑马鱼中的基因 *selenop2* 是类似的结果^[9]，这可能表明 Selenop2 不参与机体中硒的传递。本研究克隆的 *selenop2* 的 cDNA 序列相较于数据库中 *selenop2* 基因多出了 SECIS 元件，证明了克隆得到的 *selenop2* 属于硒蛋白家族。结构域分析发现了保守区域 UXXC 氧化还原序列，这种保守序列暗示 Selenop2 能够参与黄颡鱼的氧化还原稳态调节。此外，氨基酸同源性和系统发育树的分析结果显示黄颡鱼 Selenop2 和斑马鱼 Selenopb (Selenop2) 在进化上最近。有趣的是，黄颡鱼的 *selenop* 基因和 *selenop2*

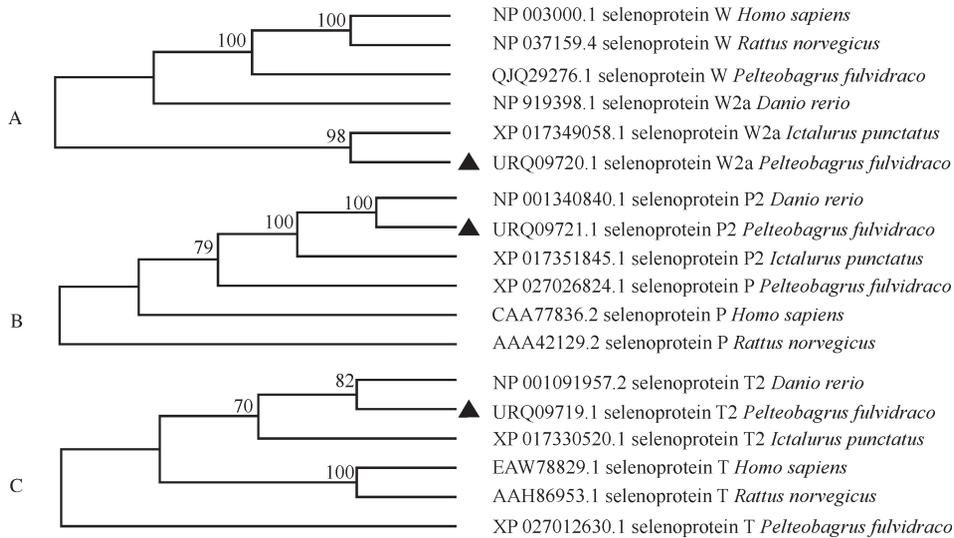


图 4 Selenow2a(A)、Selenop2(B)和 Selenot2(C)氨基酸序列系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree based on Selenow2a (A), Selenop2 (B) and Selenot2 (C) sequences

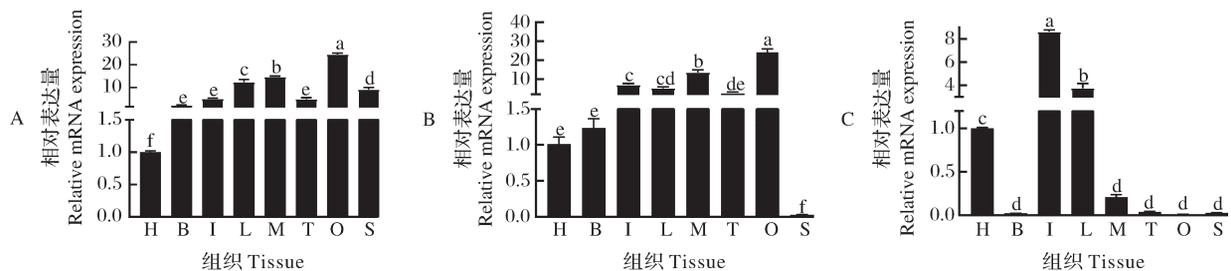


图 5 硒蛋白基因 *selenow2a* (A), *selenop2* (B) 和 *selenot2* (C) 在黄颡鱼不同组织中的分布和表达

Fig.5 The distribution and expression of selenoprotein genes *selenow2a* (A), *selenop2* (B) and *selenot2* (C) in different tissues in yellow catfish

H:心脏 Heart; B:脑 Brain; I:肠 Intestine; L:肝 Liver; M:肌肉 Muscle; T:精巢 Testis; O:卵巢 Ovaries; S:脾脏 Spleen. 柱上不同字母表示基因表达具有显著差异($P < 0.05$, 单因素方差分析)。Various letters indicate different genes expressions($P < 0.05$, one-way ANOVA).

基因在不同的组织表达水平是不同的^[16],表现出基因表达的特异性。Selenop2和Selenop生物组织定位、生化特异性和进化关系之间的差异可能有助于理解硒蛋白P的独特。

Selenot2和黄颡鱼Selenot具有同源关系,与Selenot具有类似的硒蛋白Rdx结构域和保守的CXXU氧化还原序列,暗示其具有氧化还原功能。氨基酸同源性和系统发育树的分析结果表明黄颡鱼Selenot2和斑马鱼Selenot2在进化中关系最近。黄颡鱼*selenot2*基因主要在黄颡鱼的心脏、肠、肝脏和肌肉中表达。相关研究表明,Selenot在保护金鱼(*Carassius auratus*)的心脏免受缺血再灌注(Ischemia-Reperfusion, IR)损伤时发挥了重要作用^[24],因此,我们猜测*selenot2*基因在黄颡鱼心脏中的高mRNA水平可能也有这种作用。

本研究通过RACE克隆获得3个黄颡鱼硒蛋白基因(*selenow2a*、*selenot2*和*selenop2*)并使用生物信息技术推测出它们的氨基酸序列。通过与斑马鱼、斑点叉尾鲷对比分析,发现3个硒蛋白基因的核苷酸序列和氨基酸序列在鱼类中存在保守的序列,并且可以在人类和大鼠中找到,表明这些保守序列可能在不同物种的硒蛋白功能的稳定发挥中扮演重要角色。实时荧光定量PCR结果显示,3个硒蛋白基因在黄颡鱼体内均有表达,但不同的组织中表达水平差异显著,这可能与硒蛋白功能有关,还需要进一步深入的研究。

参考文献References

- [1] LU J, HOLMGREN A. Selenoproteins[J]. Journal of biological chemistry, 2009, 284(2): 723-727.
- [2] LABUNSKYY V M, HATFIELD D L, GLADYSHEV V N. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles[J]. Physiological reviews, 2014, 94(3): 739-777.
- [3] GAO X J, TANG B, LIANG H H, et al. Selenium deficiency induced an inflammatory response by the HSP60 - TLR2-MAPKs signalling pathway in the liver of carp[J]. Fish & shellfish immunology, 2019, 87: 688-694.
- [4] LIN Y H, SHIAU S Y. Dietary selenium requirements of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*[J]. Aquaculture, 2005, 250(1/2): 356-363.
- [5] ZHANG B L, DUAN G Q, FANG Y Y, et al. Selenium(IV) alleviates chromium(VI)-induced toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J/OL]. Environmental pollution, 2021, 272: 116407 [2022-11-02]. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116407>.
- [6] 郭正富, 李军, 杨小琴. 不同硒水平对鲈鱼生长性能及抗氧化能力的影响[J]. 中国饲料, 2018(6): 88-92. GUO Z F, LI J, YANG X Q. Effects of dietary selenium content on growth performance and antioxidant capacity of juvenile Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*) [J]. China feed, 2018(6): 88-92 (in Chinese with English abstract).
- [7] KRYUKOV G V, CASTELLANO S, NOVOSELOV S V, et al. Characterization of mammalian selenoproteomes[J]. Science, 2003, 300(5624): 1439-1443.
- [8] SQUIRES J E, BERRY M J. Eukaryotic selenoprotein synthesis: mechanistic insight incorporating new factors and new functions for old factors[J]. IUBMB life, 2008, 60(4): 232-235.
- [9] KRYUKOV G V, GLADYSHEV V N. Selenium metabolism in zebrafish: multiplicity of selenoprotein genes and expression of a protein containing 17 selenocysteine residues[J]. Genes to cells, 2000, 5(12): 1049-1060.
- [10] THOMPSON J L, SEE V H L, THOMAS P M, et al. Cloning and characterization of two glutathione peroxidase cDNAs from southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) [J]. Comparative biochemistry and physiology part B: biochemistry and molecular biology, 2010, 156(4): 287-297.
- [11] LIU G D, SHENG Z, WANG Y F, et al. Glutathione peroxidase 1 expression, malondialdehyde levels and histological alterations in the liver of *Acrossocheilus fasciatus* exposed to cadmium chloride[J]. Gene, 2016, 578(2): 210-218.
- [12] HERMESZ E, FERENCZ Á. Identification of two phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (*gpx4*) genes in common carp [J]. Comparative biochemistry and physiology part C: toxicology & pharmacology, 2009, 150(1): 101-106.
- [13] CASTELLANO S, NOVOSELOV S V, KRYUKOV G V, et al. Reconsidering the evolution of eukaryotic selenoproteins: a novel nonmammalian family with scattered phylogenetic distribution[J]. EMBO reports, 2004, 5(1): 71-77.
- [14] CHEN W B, ZHANG Z, DONG H Y, et al. Molecular cloning and sequence analysis of selenoprotein W gene and its mRNA expression patterns in response to metabolic status and cadmium exposure in goldfish, *Carassius auratus* [J]. Comparative biochemistry and physiology part B: biochemistry and molecular biology, 2015, 184: 1-9.
- [15] THUMMABANCHA K, ONPARN N, SRISAPOOME P. Molecular characterization and expression analyses of cDNAs encoding the thioredoxin-interacting protein and selenoprotein P genes and histological changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to silver nanoparticle exposure[J]. Gene, 2016, 577(2): 161-173.
- [16] XU X J, ZHANG D G, ZHAO T, et al. Characterization and expression analysis of seven selenoprotein genes in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* to dietary selenium levels[J/OL]. Journal of trace elements in medicine and biology, 2020, 62: 126600 [2022-11-02]. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126600>.
- [17] ZHAO T, WU K, HOGSTRAND C, et al. Lipophagy mediated carbohydrate-induced changes of lipid metabolism via oxidative stress, endoplasmic reticulum (ER) stress and ChREBP/

- PPAR γ pathways [J]. Cellular and molecular life sciences, 2020, 77(10): 1987-2003.
- [18] 杨水波. 糖诱导 SUMO 化修饰对黄颡鱼脂质代谢调控机理的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2021. YANG S B. Sumoylation and its regulatory mechanism in carbohydrate influencing lipid metabolism of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021 (in Chinese with English abstract).
- [19] PENN O, PRIVMAN E, LANDAN G, et al. An alignment confidence score capturing robustness to guide tree uncertainty [J]. Molecular biology and evolution, 2010, 27(8): 1759-1767.
- [20] SCHWEIZER U, STEEGBORN C. New insights into the structure and mechanism of iodothyronine deiodinases [J]. Journal of molecular endocrinology, 2015, 55(3): R37-R52.
- [21] XIE X Z, CHEN M N, ZHU A Y. Identification and characterization of two selenium-dependent glutathione peroxidase 1 isoforms from *Larimichthys crocea* [J]. Fish & shellfish immunology, 2017, 71: 411-422.
- [22] TINGAUD-SEQUEIRA A, CHAUVIGNÉ F, LOZANO J, et al. New insights into molecular pathways associated with flatfish ovarian development and atresia revealed by transcriptional analysis [J/OL]. BMC genomics, 2009, 10: 434 [2022-11-02]. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-434>.
- [23] SCHOMBURG L, SCHWEIZER U, HOLTSMANN B, et al. Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues [J]. The biochemical journal, 2003, 370(2): 397-402.
- [24] MAZZA R, GATTUSO A, IMBROGNO S, et al. Selenoprotein T as a new positive inotrope in the goldfish, *Carassius auratus* [J/OL]. The journal of experimental biology, 2019, 222(11): jeb201202 [2022-11-02]. <https://doi.org/10.1242/jeb.201202>.

Cloning and analysis of selenoprotein genes in yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*

LIU Guanghui¹, YU Angen¹, HE Yang¹, GUO Yushi¹, KE Jiang¹, LUO Zhi^{1,2,3}

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
 2. Shenzhen Institute of Nutrition and Health, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
 3. Shenzhen Branch, Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Genome Analysis Laboratory of the Ministry of Agriculture/Agricultural Genomics Institute at Shenzhen, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shenzhen 518000, China

Abstract In this study, to investigate the relationship among the three selenoprotein genes *selenow2a*, *selenop2* and *selenot2* in yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*, 3'/5' RACE PCR was used to clone the full length cDNAs of three genes, which were 891, 1 998 and 1 432 bp with the ORFs of 288, 828 and 600 bp, encoding 95, 275 and 219 amino acids, respectively. The cDNA sequence analysis of the three genes by online tool SECISerach3 showed that they all contained the stop codons encoding selenocysteine and the selenocysteine insertion sequence (SECIS) element in the 3' untranslated region (3' UTR). Through amino acid sequence comparison and phylogenetic tree analysis, it was found that the predicted amino acid sequences of *selenow2a*, *selenop2* and *selenot2* genes shared 82.24%, 66.19%, and 79.45% similarity with those of zebrafish (*Danio rerio*), respectively, and shared 94.74%, 68.50% and 90.95% similarity with those of channel catfish (*Ictalurus punctatus*), respectively, which was shown to be close to the fork of the tree. Quantitative real-time PCR was used to examine the mRNA expression of three selenoprotein genes in the heart, liver, muscle, brain, intestine, spleen, testis and ovaries of yellow catfish, and the results suggested that the mRNA expression levels were tissue-specific. These results suggested that these three genes share the characteristics of selenoprotein family, but are tissue-specific in expression.

Keywords selenoprotein; gene cloning; molecular characterization; yellow catfish; tissue expression

(责任编辑: 边书京)