

罗非鱼微囊藻毒素去毒相关基因克隆与活体表达研究

王琳 梁旭方 廖婉琴 雷腊梅 韩博平

(暨南大学生命科学技术学院, 广州 510632)

摘要:可溶性谷胱甘肽 S-转移酶(Soluble glutathione S-transferase, sGST)催化微囊藻毒素(Microcystins, MCs)与还原型谷胱甘肽(GSH)的加合去毒代谢过程,谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPX)为 sGST 的去毒反应提供 GSH,解偶联蛋白 2(Uncoupling protein 2, UCP2)则可抑制微囊藻毒素诱发活性氧导致的肝细胞凋亡。本研究从罗非鱼肝脏通过简并引物克隆 sGST、GPX 与 UCP2 基因 cDNA 核心序列,并应用 5' RACE 和 3' RACE 技术分别扩增罗非鱼肝脏 sGST 基因 cDNA 序列 5' 末端和 3' 末端序列而获得其 cDNA 全序列。罗非鱼肝脏 sGST 基因 cDNA 全序列长 861 bp, 其中 5' 非翻译区(5'-UTR)为 25 bp, 3' 非翻译区(3'-UTR)为 167 bp, 开放阅读框(ORF)为 669 bp, 编码 222 个氨基酸, 包含脊椎动物完整 sGST 的 2 个功能域: N-末端功能域(GSH 结合位点)和 C-末端功能域(底物结合位点)。罗非鱼 sGST 与真鲷、条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)、斑马鱼同源性较高, 达到 64.3%—78.5%, 而与人、大鼠、小鼠、牛、猪、鸡差异较大, 氨基酸同源性为 48.2%—55.9%。罗非鱼肝脏 GPX、UCP2 基因 cDNA 核心序列长 280 bp、776 bp, 分别编码 92、258 个氨基酸。罗非鱼 GPX 与条石鲷、虹鳟、斑马鱼、人、大鼠、小鼠、牛、猪 GPX 同源性均较高, 达到 69.6%—85.9%。罗非鱼 UCP2 与真鲷、斑马鱼、鲤鱼、欧洲白鲑(*Leuciscus cephalus*)、草鱼、人、大鼠、小鼠 UCP2 同源性更高, 达到 71.8%—93.8%。通过对罗非鱼(5—8 g)活体腹腔注射亚致死量 MC-LR(50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bwt), 发现微囊藻毒素对罗非鱼肝脏 sGST 基因表达有显著的诱导作用($p < 0.05$), 注射微囊藻毒素 24h 后 sGST 基因 mRNA 表达水平上调 80%。注射微囊藻毒素 24h 后, 虽然罗非鱼肝脏 GPX 与 UCP2 基因 mRNA 表达水平亦出现明显的升高趋势, 但两者均未出现显著性的变化($p > 0.05$)。本研究从基因表达调控的角度证实, 罗非鱼肝脏 sGST 在微囊藻毒素去毒过程中可能发挥关键作用, 同时也说明罗非鱼肝脏 GPX、UCP2 基因可能在微囊藻去毒过程中发挥协同作用。

关键词:罗非鱼;可溶性谷胱甘肽 S-转移酶;谷胱甘肽过氧化物酶;解偶联蛋白 2;分子克隆;活体诱导表达;微囊藻毒素

中图分类号: Q344+.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2007)06-0788-11

微囊藻水华富营养化在湖泊、池塘中最常见的一种蓝藻水华, 所产生的微囊藻毒素(Microcystins, MCs)对淡水水体的污染已成为一种全球性的环境卫生问题。该毒素已经确定了 60 多种异构体, 最常见的为 MC-LR、MC-RR、MC-YR 三种^[1]。微囊藻毒素通过胆汁酸转运系统转运至肝实质细胞^[2], 肝脏是微囊藻毒素去毒与致毒的靶器官^[3]。藻毒素进入肝细胞后, 可引起细胞中产生大量的活性氧分子(Reactive oxygen species, ROS), 并造成生物体肝组织损伤。有研究表明, 在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^[4,5], 但

罗非鱼可吞食、消化有毒水华藻类, 其微囊藻毒素去毒分子机理已成为目前的研究热点^[6]。

可溶性谷胱甘肽 S-转移酶(Soluble glutathione S-transferase, sGST)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, 在微囊藻毒素去毒过程中发挥关键作用^[7]。谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidases, GPX), 是细胞内清除 ROS 的主要抗氧化酶。在通常情况下 ROS 可将脂质分子氧化为过氧化脂质分子, 而过氧化脂质分子在 GPX 的作用下被还原, 否则肝细胞脂质过氧化的

收稿日期: 2006-01-09; 修订日期: 2007-10-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(30670367); 广东省水文局蓝藻重点项目; 广东省科技计划项目(2005B20301005); 广东省自然科学基金项目(031886); 教育部留学回国人员科研启动基金项目资助

作者简介: 王琳(1980—), 女, 汉族, 山西人; 硕士研究生; 主要从事分子遗传方面的研究

通讯作者: 梁旭方, Tel: 020-85221497, E-mail: tliangxf@jnu.edu.cn

加剧最终将导致肝细胞凋亡。解偶联蛋白 2(Uncoupling protein 2, UCP2)是解偶联蛋白家族的新成员,是一种线粒体内膜蛋白,在抑制细胞线粒体 ROS 的过量生成与防止细胞凋亡方面起着重要作用^[8-10]。本项研究首次从罗非鱼肝脏克隆 sGST 基因 cDNA 全序列以及 GPX 与 UCP2 基因 cDNA 核心序列,并以 β -肌动蛋白(β -ACT)为外参照,比较活体腹腔注射亚致死量 MC-LR (50 μ g/kg body weight, bwt)对罗非鱼肝脏 sGST、GPX 与 UCP2 基因表达水平的影响,这对深入研究罗非鱼微囊藻毒素去毒分子机理,从基因水平上定向筛选微囊藻毒素高效去毒鱼类品系,以及进一步研发转基因淡水鱼类微囊藻毒素生物去毒器均具有重要意义。

1 材料与方 法

实验罗非鱼(5—8 g)由广东罗非鱼良种厂提供。罗非鱼捕捞后转到实验室暂养。不同性别的罗非鱼,在 96 L 水族箱中驯养 3 周以上,喂食购买的经济鱼食。驯养期自然死亡率低于 10%。鱼类养殖用水为曝气除氯的自来水,水温为(24 \pm 2) $^{\circ}$ C,饲养期间连续充氧。随后实验鱼 10 尾随机分成 2 组,每组 5 尾在自然光照周期下饲养于室内,用于染毒试验。MC-LR 为 Sigma 公司产品。

1.1 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成 从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 TaKaRa RNA LA PCRTM Kit (AMV) Ver.1.1 试剂盒,以罗非鱼总 RNA 为模板,oligo(dT)₁₈ 为反转录引物,操作按试剂盒推荐方法进行。-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2 罗非鱼 sGST、GPX 与 UCP2 基因 cDNA 核心序列的克隆 根据已发表的脊椎动物 sGST、GPX、UCP2 氨基酸序列的保守区域设计 3 对简并引物(表 1)。以上述 cDNA 为模板,分别用 sGST01F 与 sGST02R、GPX01F 与 GPX02R、UCP201F 与 UCP202R 引物扩增罗非鱼 sGST、GPX 与 UCP2 基因 cDNA 核心片段。PCR 扩增条件均为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3min,94 $^{\circ}$ C 60s,40 $^{\circ}$ C 60s,72 $^{\circ}$ C 60s,共 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。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 18-T 载体(TaKaRa),转化感受态 *E. coli* JM109,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 PrismTM 377 (Perkin Elmer, USA)进行测序。用 DNA 分析软件

vector NTI suite 6.0 进行序列分析。

表 1 罗非鱼 sGST、GPX、UCP2、 β -ACT 基因 PCR 引物

Tab. 1 PCR primer sequences for cloning of tilapia sGST, GPX, UCP2, β -ACT gene

Name of primer	Sequence of primers
sGST01F	5'-ATCCTGAACTACATCGCAGGGAAGTAT-3'
sGST02R	5'-TGGAGGTTTCTAGCGTGCCTGGTTG-3'
sGST03F	5'-AGGATCCCAAAGAACGAG-3'
sGST04R	5'-CAGAAACCTGCTGATGGC-3'
sGST3'S	5'-AGGGCAGGATGACACAA-3'
sGST5' RT	5'-(P)CACAGGAAGGTAGCG-3'
sGST5'S1	5'-CATGATACTCCCTTCACC-3'
sGST5'A1	5'-TTCCATGAGGTCTGTCAA-3'
sGST5'S2	5'-GGACAACATTCAGAGCAA-3'
sGST5'A2	5'-CCTCAGAGTACATGTTGA-3'
GPX01F	5'-GTGCCCTGCAACCAGTTTGGACACCAAGA-3'
GPX02R	5'-ACCAGGAACTTTTCGAAATTCCA-3'
GPX03F	5'-CACCAAGAGAACTGCAAG-3'
GPX04R	5'-CACGTCACTTCTACACAC-3'
UCP201F	5'-TCACCTTTCCACTGGACACCCGAAAGGT-3'
UCP202R	5'-ATAGGTGACAAACATCACTACATTCCA-3'
UCP203F	5'-CATCCGATACAGAGGG-3'
UCP204R	5'-CACGGCAGATTGCTGACAA-3'
ACT01F	5'-CGTGACATCAAAGAGAAGC-3'
ACT02R	5'-TCTGCTGGAAGGTGGACAG-3'

1.3 3' 和 5' RACE 克隆罗非鱼 sGST 基因 cDNA 全序列 根据获得的罗非鱼肝脏 sGST 基因 cDNA 核心片段序列,设计 1 条特异引物 sGST3'S (表 1) 用于 3' RACE。根据获得的罗非鱼肝脏 sGST 基因 cDNA 核心片段序列,设计 5 条特异引物 sGSTRT、sGSTS1、sGSTS2、sGSTA1、sGSTA2 (表 1) 用于 5' RACE。参考 3'-Full RACE Core Set 试剂盒(TaKaRa)提供方法,以 Oligo dT-3site Adaptor Primer 作为反转录引物用于 cDNA 合成,RT-PCR 扩增条件为:30 $^{\circ}$ C 1min, 50 $^{\circ}$ C 30min, 95 $^{\circ}$ C 5min, 5 $^{\circ}$ C 5min。利用所设计的特异引物 sGST3'S 和试剂盒提供 3site Adaptor Primer 进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件均为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 94 $^{\circ}$ C 60s, 50 $^{\circ}$ C 60s, 72 $^{\circ}$ C 2min, 共 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。获得 cDNA 3' 末端片段。按照 5'-Full RACE Core Set 试剂盒(TaKaRa)提供方法进行 5' 末端扩增。取 5 μ L 总 RNA (约 5 μ g),以 sGST5' RT 为引物合成 cDNA 第一链后,加入 RNase H,分解 mRNA,接着用 T4 连接酶对单链 cDNA 进行环化。cDNA 环化产物用 TE Buffer 稀释 10 倍备用。首次 PCR 反应体系为 10 倍稀释产物 4 μ L、10 \times PCR buffer 5 μ L、dNTP (2.5mmol/L each) 4 μ L、rTaq 酶 0.25 μ L,以及 sGST5'S1、sGST5'A1 引物各 1 μ L,加

ddH₂O 至 50 μL。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 3min,随之 94℃ 1min,55℃ 1min,72℃ 1min,25 个循环,最后 72℃ 延伸 5min。取首次扩增产物 1 μL,用 sGST5'S2、sGST5'A2 引物进行二次 PCR 扩增,扩增条件为:94℃ 预变性 3min,94℃ 1min,60℃ 1min,72℃ 1min,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 5min。获得罗非鱼 sGST 基因 cDNA 5' 末端片段。经测序后,将所获得的 3'、5' 末端片段与核心片段进行序列拼接,得到罗非鱼 sGST 基因 cDNA 全序列。

1.4 肝脏 sGST、GPX 与 UCP2 基因 mRNA 水平的测定 实验室中驯养 3 周以上的罗非鱼,10 尾随机分成 2 组,每组 5 尾,用于染毒试验。经人工饲养排毒后的罗非鱼染毒方式采用腹腔注射,以磷酸缓冲液(PBS)为溶剂,MC-LR 的注射量为 50 μg/kg bwt,对照组直接注射 PBS。24h 后冰冻麻醉,分离肝脏组织。总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成同 1.3。

以 β-肌动蛋白为外参照,采用 RT-PCR 方法比较罗非鱼肝脏的 sGST、GPX 与 UCP2 基因 mRNA 相对水平,根据罗非鱼 sGST、GPX、UCP2 基因核心序列设计特异引物 sGST03F 和 sGST04R、GPX03F 和 GPX04R、UCP203F 和 UCP204R(表 1)分别扩增 1 条 332 bp 的 sGST 基因 cDNA 片段,1 条 234 bp 的 GPX 基因 cDNA 片段,1 条 485 bp 的 UCP2 基因 cDNA 片段。根据已发表的罗非鱼 β-肌动蛋白(GenBank: AB037865)设计 2 条特异引物 ACT01F 和 ACT02R,扩增罗非鱼 β-肌动蛋白 cDNA 片段(436 bp)(表 1)。

PCR 反应条件为 94℃ 预变性 3min,94℃ 60s,55℃ 60s,72℃ 60s,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 5min。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(AlphaImaget, Alpha Inotech, USA)进行分析,结果以 sGST、GPX、UCP2 与 β-肌动蛋白 mRNA 的 RT-PCR 产物亮度之比(%)表示。

1.5 统计分析 采用统计分析软件 SPSS 10.0 对罗非鱼肝脏 sGST、GPX 与 UCP2 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

2.1 罗非鱼 sGST 基因 cDNA 全序列的克隆与分析

利用 RT-PCR 和 RACE 技术,我们从罗非鱼肝脏克隆得到罗非鱼 sGST 基因 cDNA 全序列。对罗非鱼 sGST 分析发现,罗非鱼 sGST 基因 cDNA 全序列为 861 bp,其中 5' 非翻译区(5'-UTR)为 25 bp,3' 非

翻译区(3'-UTR)为 167 bp,开放阅读框(ORF)为 669 bp,编码 222 个氨基酸。罗非鱼 sGST 终止密码子为 TAA。sGST 基因 cDNA 的 polyA 加尾信号为 AATAAA(图 1)。目前,在哺乳动物中已发现了 8 种类型 sGST,包括 α(alpha)、μ(mu)、π(pi)、σ(sigma)、θ(theta)、ω(omega)、κ(kappa)和 ζ(zeta)等^[11]。对罗非鱼 sGST 基因 cDNA 进行 BLAST 分析表明,罗非鱼 sGST 与脊椎动物的 α 型 sGST 同源性最高,因此认为我们克隆的罗非鱼 sGST 亦属于 α 型 sGST。

依据人 α 型 sGST 的二级结构^[12,13],推导出的罗非鱼 sGST 的二级结构(图 1),它们均由 2 个保守区域构成:N-末端功能域和 C-末端功能域。前者位于第一位到第八十位氨基酸,包含 3 个 α 螺旋和 4 个 β 折叠。

```

1          CAAAAAGAAAACAGCAACAAAAGCC 25
26 ATGCTGAAAAACCTGTGCTACTATTTAAATGGGAGAGGGAAGATGGAGTCAATCCGCG 85
1  M S E K P V L Y Y F N G R G K M E S I R 20
           β1
86 TGGCTTTTAAGTGTGCTGAAGTCGAGTTTGATGAAGTCTCTGACAACCTGGGAGCAG 145
21 W L L L T V A E V E F D E V L L L T T R E Q 40
           α1           β2
146 TATGAAAACTCCTGAATGATGGGGCGCTCATGTTTCAACAGGTCCTTTGGTGGAAATG 205
41 Y E K L L L N D G A L M F Q P L V E M 60
           α2           β3
206 GATGGCATGAAGCTCATTCAGACAAAAGCAATCCTGAATACATCGCAGAGAAATACAAT 265
61 D G M K L I K A I L N Y I A E K Y N 80
           β4           α3
266 CTGCATGCAAGGATCCCAAGAACGAGTAATGATCAACATGTACTCTGAGGGATTGACA 325
81 L H A K D P K E R V M I N M Y S E G L T 100
           α4
326 GACCTCATGAAAATGATCATGATACTTCCTTCACCCCAAGATCCCAACCCAAACTGGAC 385
101 L M E M I M I L P F T P D P K P K L D 120
386 AACATTGAGAGCAAGCAAGGAGCGCTACCTTCCTGTGTATGAAAAGGCTCTGACTGGA 445
121 N I Q S K A K E R Y L P V Y E K A L T G 140
           α5
446 CCGGTGTACCTGGTGGAGGTAACACTAAGCCTTCTGCTGATGTGCTGCTTGTGAATGCACC 505
141 P V Y L V G G K L S L A D V L L V E C T 160
           α6
506 CTGATGCTGGAGGAGAAATTTCCAGACATCTGAAAAGACTTCCCAATATCAAGTCCCTT 565
161 L M L E E K F P D I L K D F P N I K S F 180
           α7
566 CAGGGCAGGATGACACAAATCCCGCATCAGCAGGTTCTGACGCGGGCAGCAAGAGG 625
181 Q G R M T Q I P A I S R F L Q P G S K R 200
           α8
626 AAGCCAGCGCCAGATGAAAAACTTGAATAATGTTGTGGAAGTCTTAACCTCAAGTTG 685
201 K P A P D E K Y L K N V V E V L N L K L 220
           β5           α9
686 CCACITTAAGAAAACACTACAAAAGATCTGTTTACATTCTCATTAGGCAACGTGATTATGA 745
221 P L *** 222
746 TCAGTTACATCTGGAGGCATACGTGAAGATAAACCGTGCACCTAACACAACATGGAAA 805
806 GAACCTCTGTAATCTGCTTACCATAAACACATTTGACACAAAAAATAAAAAAAAAA 861

```

图 1 罗非鱼 sGST 基因 cDNA 全序列及推测氨基酸序列

Fig. 1 The full-length nucleotides sequence and deduced amino acid sequence of tilapia sGST gene

起始密码子(ATG)黑体表示,终止密码子(TAA)星号表示,以及多聚腺苷酸信号序列(AATAAA)以下划线表示。二级结构的结构域中氨基酸残基用下划线表示:α表示α螺旋,β表示β折叠。

GSH-连接位点的氨基酸残基阴影表示

The ATG start codon is boldfaced and the TGA translation stop codon is marked by an asterisk. The underlined (AATAAA) is polyadenylation signal. Residues in secondary structure domain are underlined: α refers to a α-helix, and β to a β-strand. Glutathione-binding residues (i.e. the G-site ligands) are shaded. The sense strand is displayed from the 5' to 3' direction

N-末端功能域的主要功能是与谷胱甘肽相结合,第九位的酪氨酸残基和第六十七位的谷氨酰胺残基,被认为是GSH与N-末端功能域相互作用所必需的,它们在不同物种的 α 型sGST中都是保守的。C-末端功能域位于第八十七位到二百二十二位氨基酸,包含1个 β 折叠和6个 α 螺旋,其中 α 螺旋9是 α 型sGST区别于其他类型sGST的重要结构,该螺旋被认为对二聚体结合后的稳定性及非底物配体与 α 型sGST的结合有重要作用。C-末端功能域除了与第二个疏水性底物相互作用外,由于它在第四个 α 螺旋含有一个保守的天冬氨酸残基,因此它对GSH也有作用。

将得到的sGST序列进行BLAST分析表明所克隆基因属新基因。使用vector NTI suite 6.0软件进行氨基酸序列比较发现,罗非鱼sGST与真鲷、条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)、斑马鱼sGST同源性较高,分别为75.2%、78.5%、64.3%,与人、大鼠、小鼠、猪(哺乳类)、鸡(鸟类)sGST同源性较低,分别为52.2%、52.7%、48.2%、51.8%、55.9%(图2)。

2.2 罗非鱼GPX基因cDNA核心序列的克隆与分析

利用简并引物GPX01F和GPX02R通过RT-PCR,从罗非鱼肝脏中克隆得到与预期280 bp相符的GPX基因cDNA部分序列,将这一片段克隆后测序并推测其氨基酸序列为92个氨基酸(图3)。GPX是一个多酶家族,共有5个成员:胞质内GPX(Classic or cytosolic GPX, GPX1)、胃肠道特异性GPX(Gastrointestinal-specific GPX, GPX2)、血浆GPX(Plasma GPX, GPX3)、磷脂过氧化氢GPX(Phospholipid hydroperoxide GPX, GPX4)以及附睾特异性GPX(Epididymis-specific GPX, GPX5)^[13],其中前4种酶都有依赖硒的谷胱甘肽过氧化物酶活性并含有独特的UGA编码的硒代半胱氨酸(Selenocysteine, SeC),简称Se-GPX,而GPX5则不含SeC。将罗非鱼GPX氨基酸序列进行BLAST分析同时也证实我们所克隆的GPX属于GPX家族中的GPX1亚型。经结构功能分析,发现罗非鱼GPX1的硒结合位点、酶催化活性中心、活性必需的氨基酸等重要位点在脊椎动物中均保守(图4)。哺乳动物中SeC与硒结合位点Gln82和Trp160通过氢键结合^[14],而鱼类中存在相应的硒结合位点Gln75和Trp153,推测也能通过氢键与SeC结合。人GPX氨基酸序列中Arg52、Lys86、Arg98、Arg179和Arg180构成催

化活性中心是GSH的结合位点,罗非鱼等鱼类中同样很保守。此外,GPX酶蛋白均包含有3个环状结构,其氨基酸序列在所有物种的所有亚型中均高度保守,起到稳定酶三级结构的作用^[15],罗非鱼的GPX环结构序列也十分保守(图4)。使用vector NTI suite 6.0软件进行氨基酸同源性序列对比分析,发现罗非鱼GPX与条石鲷、斑马鱼、虹鳟GPX氨基酸同源性分别为85.9%、78.3%、83.7%,而与人、大鼠、小鼠、猪GPX氨基酸同源性分别为71.7%、70.7%、70.7%、69.6%(图4),这与脊椎动物GPX承担清除过氧化脂质分子的共同作用相一致。

2.3 罗非鱼UCP2基因cDNA核心序列的克隆与分析

利用简并引物UCP201F和UCP202R通过RT-PCR,从罗非鱼肝脏中克隆得到与预期大小相符776 bp UCP2基因cDNA部分序列,将这一片段克隆后测序并推测其氨基酸序列为258个氨基酸(图5)。经结构功能分析发现,罗非鱼UCP2此段氨基酸序列包含线粒体内膜载体蛋白3个特征结构:特征结构PLDTAKVRL位于罗非鱼UCP2第3位到第11位氨基酸;特征结构PTDVVKVRF位于罗非鱼UCP2第102到110位氨基酸;特征结构PVDVVKTRY位于罗非鱼UCP2第201位到209位氨基酸^[16,17](图5)。使用vector NTI suite 6.0软件进行氨基酸同源性序列比较分析表明,罗非鱼UCP2与真鲷、斑马鱼、鲤鱼、欧洲白鲑(*Leuciscus cephalus*)、草鱼UCP2同源性更高分别为93.8%、74.1%、74.5%、73.8%、74.1%,与人、大鼠、小鼠UCP2氨基酸同源性较高分别为72.9%、71.8%、71.8%(图6)。UCP2编码区在鱼类、哺乳类中均具有较高保守性,提示着脊椎动物UCP2可能在线粒体有氧呼吸代谢过程中承担某种最基本的生命功能。

2.4 微囊藻毒素对罗非鱼肝脏sGST、GPX、UCP2基因mRNA表达的影响

以 β -肌动蛋白为对照,测定微囊藻毒素对罗非鱼肝脏sGST、GPX、UCP2基因mRNA表达的影响(图7,图8)。结果表明,罗非鱼在MC-LR(50 μ g/kg bwt)腹腔注射24h后,其肝脏sGST、GPX、UCP2基因mRNA表达水平均有不同程度的明显上调,其中sGST基因mRNA表达量在毒素诱导前后出现显著性变化($p < 0.05$)。

tGST	1	MSEKPVLYYFNDRGKMESIRWLLTVAEVEFDEVLLTTRQYKELLNDGALMFQQVPLVEM
rsbGST	1	MAGKVVLYYFNDRGKMESIRWLLTVAEVEFDEVLLTTRDQLKQLSDGDLMFQQVPMVEI
rbGST	1	MAGRVLHYFNDRGKMESIRWLLTVAGVEFDEMVLTRDQYKELLSDGALMFQQVPMVEI
zGST	1	MSGKVVLYYFNDRGKMESIRWLLAVAGVQFEVFLTEKEQFDKLLSDGALTFQQVPLVEI
hGST	1	MAEKPKLHYSNTRGRMESIRWLLAAAGVEFEKFIKSAEDLDKLRNDGYLMFQQVPMVEI
rGST	1	MPGKPVLYYFDGRGRMEPIRWLLAAAGVEFEQFLKTRDDLARLRNDGSLMFQQVPMVEI
mGST	1	MAGKPVLLHFNARGRMECIRWLLAAAGVEFEKFIQSPEDLEKLRNDGSLMFQQVPMVEI
pGST	1	MAGKPVLLHYFNDRGKMESIRWLLAAAGVEFEKFIKTPEDLDKLRNDGSLMFQQVPMVEI
cGST	1	MAAKPVLYYFNDRGKMESIRWLLAAAGVEFEVFLTTRQYKELLQSGILMFQQVPMVEI
		* * ** ** * * * * * * * * * * * * * * * *
tGST	61	DGMKLIQTKAILNYIAEKYNLHAKDPKERVMINMYSEGLDLMEMIMLPFTDPKPK--
rsbGST	61	DGMKLIQTKAILNYIAEKYNLHGKDLKDRVMINMYSEGVDLMEMIMLPFTDPKPK--
rbGST	61	DGMKLVQTKAILNYIAEKYNLHGTNPKDRVTINMYCEGVDLMEMIMLPFTDPKPK--
zGST	61	DGMKLVQSKAILNYIAGKYNLYGKDLKERAMIDIYSEGLDLMEMIMVSPFTPAENKEKV
hGST	61	DGMKLVQTRAILNYIASKYNLYGKDIKEKALIDMYIEGIADLGEMILLPFTPQEEQDAK
rGST	61	DGMKLVQTRAILNYIATKYNLYGKDKERALIDMYAEGVADLDEIVLHYPYIPGKEKAS
mGST	61	DGMKLAQTRAILNYIATKYDLYGKDKERALIDMYSEGILDLTEMIGQLVLCPPDQREAK
pGST	61	DGMKLVQTRAILNYIATKYNLYGKDAKERALIDMYTEGVADLGEMILLPLCPPNEKDAK
cGST	61	DGMKLVQTRAILNYIAGKYNLYGKDLKERALIDMYVGGTDDLGMGFLSFPFLSAEDKVKQ
		***** * ***** ** * * * * * * * * * *
tGST	119	LDNIQSKAKERYLPVYEKALT--GPVYLVGGKLSLADVLLVECTLMLEEKFPDILKDFPN
rsbGST	119	LANI EAKATERYLPVFEKVL S--GQIYLVGGKISVADVLLFECTLMLEEKFPAGILGDFRN
rbGST	119	LDTIQTKAKERYLPVFEKALT--GPYLVGGKLSCADVQLVECTLMLEEKFPDILADFPN
zGST	121	FSNIEEKAKVRFPLPVFEKALA--NSSFLVGGKLSRADVHLLLEATLMLQELPFSILATFPK
hGST	121	LALIQEKTKNRYFPAFEKVLKSHGQDYLGNKLSRADIHLVELLYVEELDSSLISSFPFL
rGST	121	LAKIKDKARNRYFPAFEKVLKSHGQDYLGNRLSRADVYLQVLYHVEELDPSALANFPL
mGST	121	TALAKDRTKNRYLPAFEKVLKSHGQDYLGNRLTRVDIHLLEVLVVEEFDASLLTPFPFL
pGST	121	VASIKEKSTNRYLPAFEKVLKSHGQDYLGNKLSRADIQLVELLYVEELDPSLLANFPL
cGST	121	CAFVVEKATSRYPAYEKVLKDHGQDFLVGNRLSWADIHLLEAILMVEEKSDALSGFPFL
		* * ** * * * * * * * * * * * * * * *
tGST	177	IKSFQGRMTQIPAIRFLQPGSKRKPAPDEKYLKNVVEVLNKLPL---- 222
rsbGST	177	VKAFQGRMTRIPAIIDFLKPGSKRKPQDDQYVKTIMEVLDIKSLP--- 222
rbGST	177	LKSFQGRMTLLPAISRFLQPGSKRKPQPDETYVKTIMEVFKIQFPLK-- 223
zGST	177	IQAFQEQMKALPAISKFLQPGSARKPPDDEEYVRTKAVLSHLFK---- 223
hGST	181	LKALKTRVSNLPTVKKFLQPGSPRKPMPDEKSLEE---SRKIFRF---- 222
rGST	181	LKALRTRVSNLPTVKKFLQPGSQRKPLEDEKCVGNPQLSLQLFRHL--- 226
mGST	181	LKAFKSRISSLPNVKKFLQPGSQRKPPMDAKQIQEARKAFKIQ----- 223
pGST	181	LKALKTRVSNLPTVKKFLQPGSQRKPPMDAKKIRR---SQEYFPD---- 222
cGST	181	LQAFKKRISSIPTIKKFLAPGSKRKPISDDKYVETVRRVLRMYDVKPH 229
		* ** ** * * * * *

图2 罗非鱼 sGST 推测氨基酸序列及与其他鱼类、哺乳类、鸟类 sGSTs 氨基酸序列同源性的比较

Fig. 2 Deduced amino acid sequences of tilapia sGST were aligned against published fish, mammalian and bird sGSTs sequences 序列如下:罗非鱼 (tGST),真鲷 (rsbGST, GenBank: BAE06152),条石鲷 (rbGST, GenBank: AAU44618),斑马鱼 (zGST, GenBank: NP-998559),人 (hGST, GenBank: CAA46642),大鼠 (rGST, GenBank: AAF37739),小鼠 (mGST, GenBank: NM-008181),猪 (pGST, GenBank: CAA93433),鸡 (cGST, GenBank: NP-990743)。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

The sequences of GSTs respectively were tilapia (tGST), Red sea bream (rsbGST, GenBank: BAE06152), Rock bream (rbGST, GenBank: AAU44618), Zebrafish (zGST, GenBank: NP-998559), Human (hGST, GenBank: CAA46642), Rat (rGST, GenBank: AAF37739), Mouse (mGST, GenBank: NM-008181), Pig (pGST, GenBank: CAA93433), Chicken (cGST, GenBank: NP-990743). 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 (*)

```

1   GTGCCCTGCACCAGTTTGGACACCAAGAGAACTGCAAGAACGATGAAATCCTAAGATCT   59
1   A L H Q F G H Q E N C K N D E I L R S   19
60  CTGAAGTATGTCCTCCAGGAATGGCTTTGAACCAAAGTCCAGCTCCTCGAGAAGGTG   119
20  L K Y V R P G N G F E P K F Q L L E K V   39
120 GATGTGAATGGAAGGATGCCACCCCTTGTGTCTATCTGAAGAAAACTCCATTC   179
40  D V N G K D A H P L F V Y L K E K L P F   59
180 CCCTGCGATGATGCCCTGGGTCTCATGAATGATCCAAAGTACATCATTGGAGTCCAGTG   239
60  P C D D A L G L M N D P K Y I I W S P V   79
240 TGTAGGAATGACGTGTCTGGAATTCGAAAAGTTCCTGGT   280
80  C R N D V S W N F E K F L   92

```

图 3 罗非鱼 GPX 基因 cDNA 部分序列及推导的氨基酸序列

Fig. 3 The nucleotides sequence and deduced amino acid sequence of tilapia GPX gene. The sense strand is displayed from the 5' to 3' direction

3 讨 论

罗非鱼可吞食、消化有毒微囊藻,但关于罗非鱼对微囊藻毒素去毒作用分子机理至今未见研究报告。大量研究表明,sGST在微囊藻毒素去毒代谢过程中扮演了重要角色^[18,19]。Gehringer等^[20]研究证实小鼠在MC-LR诱导下,其GST、GPX活性增加同时也伴随着相应基因转录表达的增强。Best等^[21]研究发现,影响sGST活性的负调控因子,其作用只有在活体处理时才存在,因而推断调控因子的作用可能涉及sGST的合成过程,即与sGST基因转录调控有关。

采用腹腔注射之活体染毒方式,本研究发发现微囊藻毒素对罗非鱼肝脏sGST基因表达有显著的诱导作用,对罗非鱼肝脏GPX、UCP2基因表达也有明显的诱导趋势,这些解毒相关基因的诱导表达可能与罗非鱼对微囊藻毒素具有很强的耐受能力有关。罗非鱼处于微囊藻毒素胁迫的环境中,不但参与微囊藻毒素去毒加合反应的基因(sGST)表达增强,而且为了适应微囊藻毒素胁迫环境下的生存,罗非鱼体内一些对ROS敏感的抗氧化相关基因(GPX、UCP2)的转录表达也有增强的趋势,这与Gehringer等^[20]有关微囊藻毒素去毒分子机理的假说十分吻合。

微囊藻毒素进入罗非鱼肝细胞后,使细胞中产生大量活性氧分子,这些活性氧分子将脂质分子氧化为过氧化脂质分子,以自由基链式反应的方式对肝脏造成严重损伤。过氧化脂质分子在谷胱甘肽过氧化物酶GPX的作用下,被GSH还原生成GSSG和还原型脂质分子,而sGST则催化GSH与微囊藻毒素结合,成为水溶性化合物排出体外,起到解毒作

用。与此同时,罗非鱼肝脏通过诱导UCP2基因表达来抑制肝细胞内ROS的过量生成与肝细胞凋亡的发生^[8-10],进而保护肝脏免受ROS导致的损伤。因此我们认为,罗非鱼对微囊藻毒素的强耐受能力,很可能与微囊藻毒素对罗非鱼肝脏去毒相关基因,特别是sGST基因表达的显著诱导作用有关。微囊藻毒素对罗非鱼肝脏去毒相关基因表达的这种诱导作用,与对微囊藻毒素更为敏感的斑马鱼这些去毒相关基因,对微囊藻毒素同样处理基本上没有变化形成鲜明对照(未发表结果)。本研究从基因表达调控的角度证实,罗非鱼肝脏sGST在微囊藻毒素去毒过程中有可能发挥关键作用,同时也说明罗非鱼肝脏GPX、UCP2基因有可能在微囊藻去毒过程中发挥协同作用。

目前,有关鱼类肝脏对微囊藻毒素解毒作用与解毒机理的研究相对较少,一般用解毒酶活性为指标间接测定微囊藻毒素对鱼类等水生动物肝脏解毒酶的诱导作用,不同研究者的结果往往不一致。sGST酶活性的测定是采用标准底物1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)与谷胱甘肽进行加合反应,通过在340nm测定CDNB加合产物的数量来计算酶活性。由于微囊藻毒素也可与谷胱甘肽进行加合反应,但其加合产物在340nm不能进行有效检测,故当有微囊藻毒素存在时会干扰sGST酶活性的测定,使所测得的sGST酶活性比实际的sGST酶活性值降低。采用解毒酶基因mRNA水平为指标直接测定微囊藻毒素对鱼类肝脏解毒酶基因表达的诱导作用,避免了一般采用鱼类等水生动物解毒酶活性为指标的间接测定方法,由于微囊藻毒素对其解毒酶活性测定的干扰而使诱导作用测定结果不可靠的问题。

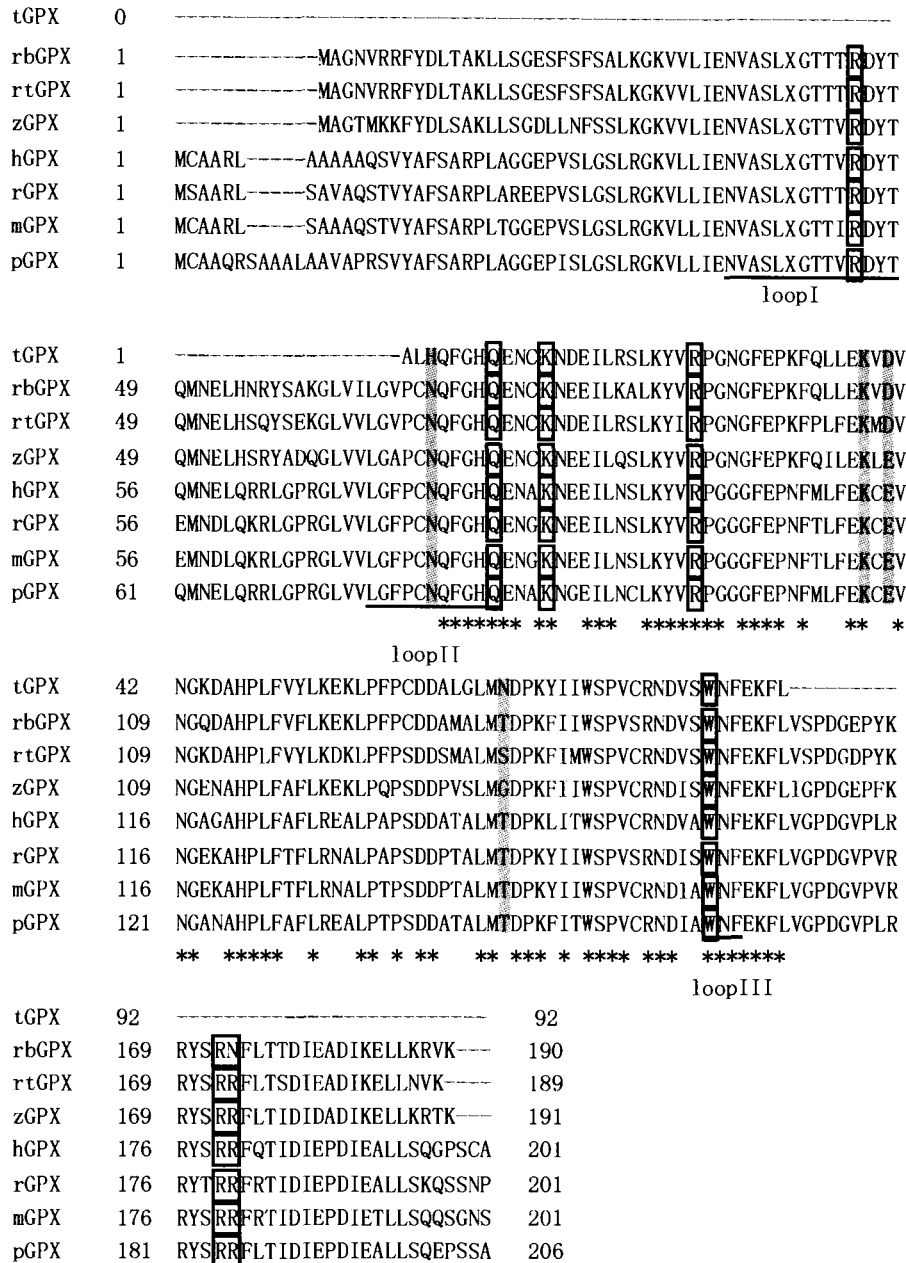


图4 罗非鱼 GPX 推测氨基酸序列及与其他鱼类、哺乳类 GPXs 氨基酸序列同源性的比较

Fig. 4 Deduced amino acid sequences of tilapia GPX were aligned against published fish and mammalian GPXs sequences

序列如下:罗非鱼 (tGPX), 条石鲷 (rbGPX, GenBank: AY734530), 虹鳟 (rtGPX, GenBank: AF281338), 斑马鱼 (zGPX, GenBank: NM-001007281), 人 (hGPX, GenBank: HUMGLP), 大鼠 (rGPX, GenBank: NM-030826), 小鼠 (mGPX, GenBank: NM-008160), 猪 (pGPX, GenBank: AF532927)。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,“黑体”代表 UGA 编码的硒代半胱氨酸位点,“阴影方框”代表硒的结合位点,“方框”代表催化活性中心位点,“阴影”代表活性必需的氨基酸。有助于稳定酶立体结构的三个环结构用粗下划线标示

The sequences of GPX respectively were tilapia (tGPX), Rock bream (rbGPX, GenBank: AY734530), Rainbow trout (rtGPX, GenBank: AF281338), Zebrafish (zGPX, GenBank: NM-001007281). Human (hGPX, GenBank: HUMGLP), Rat (rGPX, GenBank: NM-030826), Mouse (mGPX, GenBank: NM-008160), Pig (pGPX, GenBank: AF532927), 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 (*). Selenocysteine residues are indicated by black bold, the active-site residues located within hydrogen-bonding distance to the selenium atom are indicated by shade boxes, catalytic active sites are indicated by boxes, residues which are important for the activity of GPX1 are indicated by shade. Three loop structures that stabilize the structure of the enzyme are underlined

```

1 TCACCTTCCACTGGACACCGCAAAGGTCAAGCTACAGATTCAAGGAGAGAAGAAGGCA 59
1 T F P L D T A K V R L Q I Q G E K K A 19
60 GTGGGGGGCATCCGATACAGAGGGGTGTTGGGACCATCAGACCATGATCCGAACAGAA 119
20 V G G I R Y R G V F G T I S T M I R T E 39
120 GGGCCAAAGTCTCTGTACAATGGTCTGGTGGCTGGGCTGCAGAGACAGCTGTGCTTTGCC 179
40 G P K S L Y N G L V A G L Q R Q L C F A 59
180 TCCGTGAGAATCGGCTCTATGACAACGTTAAAAATTTCTACACTGGTGGCAAAGACAAC 239
60 S V R I G L Y D N V K N F Y T G G K D N 79
240 CCTAGTGTACTGGTACGTATCCTGGCTGGCTGCACCACAGGTGCCATGGCGGTGTCCTTT 299
80 P S V L V R I L A G C T T G A M A V S F 99
300 GCGCAGCCACCGACGTGGTCAAGGTTGATTCCAAGCCAGATGAATCTGGACGGAGTG 359
100 A Q P T D V V K V R F Q A Q M N L D G V 119
360 GCCCGCCGCTACAGCAGCACCATGCAGGCTTACAGACACATCTCCAACACGAGGGCATG 419
120 A R R Y S S T M Q A Y R H I F Q H E G M 139
420 CGTGGGCTCTGGAAGGAACATTACCAACATCACAAGAAACGCCCTGGTAAACTGCACA 479
140 R G L W K G T L P N I T R N A L V N C T 159
480 GAGCTGGTTACATACGACCTGATAAAGGAGGCCATCCTTAGACACAAGCTGTTGTACAGAC 539
160 E L V T Y D L I K E A I L R H K L L S D 179
540 AATCTGCCGTGCCACTTTGTCTCTGCGTTTGGCGCGGCTTCGTTACCACAGTGATTGCC 599
180 N L P C H F V S A F G A G F V T T V I A 199
600 TCCCCGTAGACGTGGTAAAGACCAGATACATGAACTACCCGCCGGCCAGTATAAGAGC 659
200 S P V D V V K T R Y M N S P P G Q Y K S 219
660 GCCATTAAGTGTGCCTGGACCATGTTAACTAAAGAGGGGCCAACAGCATTCTACAAAGGA 719
220 A I N C A W T M L T K E G P T A F Y K G 239
720 TTCGTGCCCTCGTTCCTGAGGTTGGGATCGTGAATGTAGTGATGTTTGTACCTAT 776
240 F V P S F L R L G S W N V V M F V T Y 258
    
```

图 5 罗非鱼 UCP2 基因 cDNA 部分序列及氨基酸序列

Fig. 5 The nucleotides sequence and deduced amino acid sequence of tilapia UCP2 gene
 线粒体内膜载体蛋白 3 个特征结构用方框表示

The three mitochondrial carrier protein signature motifs are boxed. The sense strand is displayed from the 5' to 3' direction

```

tUCP2 1 -----TFPLDTAKVRLQIQGEK-----AVGGIRY
rsbUCP2 1 -----Y
zUCP2 1 MVGFRAGDVPPATVKF IGAGTAACIADLFTFPLDTAKVRLQIQGENKASTNMGRGPVKY
ccUCP2 1 MVGFRAGDVPPATVKF IGAGTAACIADLFTFPLDTAKVRLQIQGESKIPVNTGHGPVKY
ecUCP2 1 MVGFRAGDVPPATVKF IGAGTAACIADLFTFPLDTAKVRLQIQGETKGPANTGHGPVQY
gcUCP2 1 MVGFRAGDVPPATVKF IGAGTAACIADPFTFPLDTAKVRLQIQGETKGPANTGHGPVKY
hUCP2 1 MVGFKATDVPPATVKFLGAGTAACIADLITFPLDTAKVRLQIQGESQGPVRATAS-AQY
rUCP2 1 MVGFKATDVPPATVKFLGAGTAACIADLITFPLDTAKVRLQIQGESQGLARTAAS-AQY
mUCP2 1 MVGFKATDVPPATVKFLGAGTAACIADLITFPLDTAKVRLQIQGESQGLVRTAAS-AQY

tUCP2 26 RGVFGTISTMIRTEGPKSLYNGLVAGLQRQLCFASVIRIGLYDNVKNFYTGKDNPSVLR
rsbUCP2 2 RGVFGTISTMIKTEGPRSLYNGLVAGLQRQMCFASIRIGLYDNVKNFYTGKDNPNVLR
zUCP2 61 RGVFGTISTMVRVEGPRSLYSGLVAGLQRQMSFASVIRIGLYDSVKQFYTKGSDHAGIGSR
ccUCP2 61 RGVFGTISTMVRVEGPRSLYSGLVAGLQRQMSFASVIRIGLYDSVKQFYTKGSEHVIGSR
ecUCP2 61 RGVFGTISTMVRVEGPRSLYNGLVAGLQRQMSFASVIRIGLYDSVKQFYTKGSDHVGIGSR
gcUCP2 61 RGVFGTISTMVRVEGPRSLYSGLVAGLQRQMSFASVIRIGLYDSVKQFYTKGSDHVGIGSR
hUCP2 60 RGVMTILTMRTEGPRSLYNGLVAGLQRQMSFASVIRIGLYDSVKQFYTKGSEHASIGSR
rUCP2 60 RVLGTILTMRTEGPRSLYNGLVAGLQRQMSFASVIRIGLYDSVKQFYTKGSEHAGIGSR
mUCP2 60 RVLGTILTMRTEGPRSLYNGLVAGLQRQMSFASVIRIGLYDSVKQFYTKGSEHAGIGSR
*** ** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

tUCP2 86 ILAGCTTGAMAVSFAQPTDVVKVRFQAQMNLDGVARRYSTMQAYRHFQHEGMRGLWKG
rsbUCP2 62 ILAGCTTGAMAVSFAQPTDVVKVRFQAQSNLDGVARRYTGTMQAYKHIFQNEGMRGLWKG
zUCP2 121 LMAGCTTGAMAVAVAQPTDVVKVRFQAQVSAG-SSKRYHSTMDAYRTIAKEEGFRGLWKG
ccUCP2 121 LMAGCTTGAMAVALAQPTDVVKVRFQAQNSAG-ANKRYHSTMDAYRTIAKEEGFRGLWKG
ecUCP2 121 LMAGCTTGAMAVALAQPTDVVKVRFQAQISAG-ANKRYQSTMDAYRTIAKEEGFRGLWKG
gcUCP2 121 LMAGCTTGAMAVAVAQPTDVVKVRFQAQIGAG-ANKRYNGTMAAYRTIAKEEGFRGLWKG
hUCP2 120 LLAGSTTGALAVAVAQPTDVVKVRFQAQARAG-GGRRYQSTVNAYKTIAKEEGFRGLWKG
rUCP2 120 LLAGSTTGALAVAVAQPTDVVKVRFQAQARAG-GGRRYQSTVEAYKTIAKEEGIRGLWKG
mUCP2 120 LLAGSTTGALAVAVAQPTDVVKVRFQAQARAG-GGRRYQSTVEAYKTIAKEEGIRGLWKG
** **** ** ***** ** * ** * ** *****
    
```


tUCP2	146	TLPNITRNALVNCTELVYDLIKEAILRHKLLSDNLPCHFVSFAFGAGFVTTVIASPVDVV
rsbUCP2	102	TLPNITRNALVNCTELVYDLIKEAILKHNLLSDNLPCHFVSFAFGAGFVTTVIASPVDVV
zUCP2	180	TGPNITRNAIVNCTELVYDLIKDALLKSSLMTDDLPCFHVSFAFGAGFCTTVIASPVDVV
ccUCP2	180	TGPNITRNAIVNCTELVYDLIKDALLKSSLMTDDLPCFHVSFAFGAGFCTTVIASPVDVV
ecUCP2	180	TGPNITRNAIVNCTELVYDLIKDALLKSSLMTDDLPCFHVSFAFGAGFCTTVIASPVDVV
gcUCP2	180	TGPNITRNAIVNCTELVYDLIKDALLKSSLMTDDLPCFHVSFAFGAGFCTTVIASPVDVV
hUCP2	179	TSPNVARNAIVNCAELVYDLIKDALLKANLMTDDLPCFHVSFAFGAGFCTTVIASPVDVV
rUCP2	179	TSPNVARNAIVNCTELVYDLIKDTLLKANLMTDDLPCFHVSFAFGAGFCTTVIASPVDVV
mUCP2	179	TSPNVARNAIVNCAELVYDLIKDTLLKANLMTDDLPCFHVSFAFGAGFCTTVIASPVDVV
		* ** *** ** * ***** * * * **** * ***** *****
tUCP2	206	KTRYMNSPPGGYKSAINCAWTMLTKEGPTAFYKGFVPSFLRLGSWNVVMFVTY-----
rsbUCP2	162	KTRYMNSPPGGYKSAINCAWTMMTKEGPTAFYKGFVPSFLRLG-----
zUCP2	240	KTRYMNSAQQYSSALNCAVAMLTKEGPKAFYKGFMPFSLRLGSWNVVMFVTYEQLKRAM
ccUCP2	240	KTRYMNSAQQYSSALNCAVAMLTKEGPKAFYKGFMPFSLRLGSWNVVMFVTYEQLKRAM
ecUCP2	240	KTRYMNSAQQYSSALNCAVAMFKAKEGPKAFYKGFMPFSLRLGSWNVVMFVTYEQLKRAL
gcUCP2	240	KTRYMNSAQQYSSALNCAVAMLTKEGPKAFYKGFMPFSLRLGSWNVVMFVTYEQLKRAM
hUCP2	239	KTRYMNSALGGYSSAGHCALTMKKEGPRAFYPKGFMPFSLRLGSWNVVMFVTYEQLKRAL
rUCP2	239	KTRYMNSALGGYHSAGHCALTMLRKEGPRTFYKGFMPFSLRLGSWNVVMFVTYEQLKRAL
mUCP2	239	KTRYMNSALGGYHSAGHCALTMLRKEGPRAFYKGFMPFSLRLGSWNVVMFVTYEQLKRAL
		***** ** * * ** * **** * *****
lUCP2	258	----- 258
rsbUCP2	162	----- 204
zUCP2	300	MAARQNWHITPL 310
ccUCP2	300	MAARHNWATPL 310
ecUCP2	300	MAARHNWATPL 310
gcUCP2	300	MAARHNWVITPL 310
hUCP2	299	MAACTSREAPF 309
rUCP2	299	MAAYESREAPF 309
mUCP2	299	MAAYQSREAPF 309

图6 罗非鱼 UCP2 推测氨基酸序列及与其他鱼类、哺乳类 UCP2 氨基酸序列同源性的比较

Fig. 6 Deduced amino acid sequences of tilapia UCP2 were aligned against published fish and mammalian UCP2 sequences 序列如下: 罗非鱼 (tUCP2), 真鲷 (rsbUCP2, GenBank: AF487341), 斑马鱼 (zUCP2, GenBank: NM-131176), 鲤鱼 (ccUCP2, GenBank: CCA243486), 欧洲白鲑 (ecUCP2, GenBank: AY368268), 草鱼 (gcUCP2, GenBank: AY948546), 人 (hUCP2, GenBank: BC011737), 大鼠 (rUCP2, GenBank: AB010743), 小鼠 (mUCP2, GenBank: U69135)。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 The sequences of UCP2 respectively were tilapia (tUCP2), Red sea bream (rsbUCP2, GenBank: AF487341), Zebrafish (zUCP2, GenBank: NM-131176), Common carp (ccUCP2, GenBank: CCA243486), European chub UCP2 (ecUCP2, GenBank: AY368268), Grass carp (gcUCP2, GenBank: AY948546), Human (hUCP2, GenBank: BC011737), Rat (rUCP2, GenBank: AB010743), Mouse (mUCP2, GenBank: U69135). 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 (*)

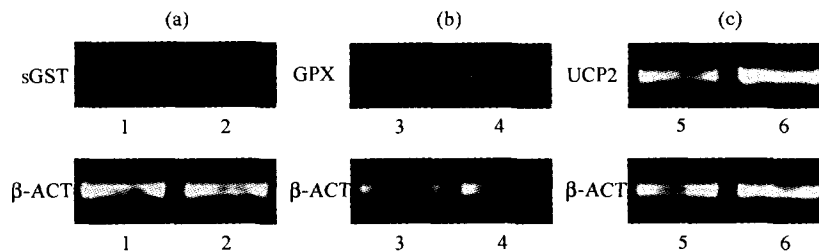


图7 腹腔注射 PBS(1. 3. 5)、MC-LR(2. 4. 6) 24 h 后罗非鱼肝脏 sGST/β-肌动蛋白(a)、GPX/β-肌动蛋白(b)、UCP2/β-肌动蛋白(c)对比电泳图
Fig. 7 Analysis of sGST/β-ACT(a), GPX/β-ACT(b) and UCP2/β-ACT(c) mRNA expression in the liver of tilapia after i.p. PBS (1. 3. 5) and MC-LR (2. 4. 6) for 24 h by RT-PCR

关于微囊藻毒素在淡水鱼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 sGST 的催化下微囊藻毒素与 GSH 发生加合反应, 至于淡水鱼类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理尚不清楚。对于微囊藻毒素在淡水生态系统其他类群体内的去

毒机理、降解途径及其相互关系, 特别是种群数量巨大并具有重要生态作用的淡水浮游动物微囊藻毒素去毒酶基因亟待进一步研究。此外, 是否可以在食物中添加特定的物质(例如生物硒等), 增强淡水鱼类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

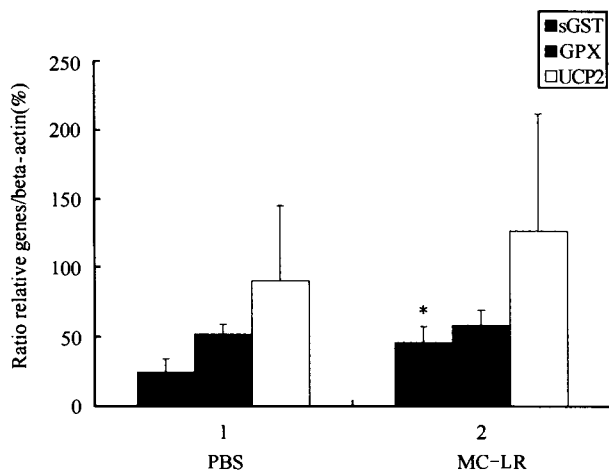


图8 罗非鱼 sGST、GPX 和 UCP2 mRNA 表达的 RT-PCR 分析柱形图
Fig. 8 Tilapia sGST, GPX and UCP2 mRNA abundant after exposure
罗非鱼分别腹腔注射 1. PBS, 2. MC-LR (50 μ g/kg bwt) 24h 后肝脏组织特异性表达 sGST 与 β -ACT 表达量百分比 (黑色), GPX 与 β -ACT 表达量百分比 (灰色) 表示, UCP2 与 β -ACT 表达量百分比 (白色) 表示。显著性差异“*”表示

1. PBS, 2. MC-LR (50 μ g/kg bwt) for 24h to following i.p. treatments. sGST/ β -ACT % (black), GPX/ β -ACT % (gray), UCP2/ β -ACT % (white). The statistically significant changes are indicated by asterisk (*)

平上定向筛选高效去毒的淡水鱼类品系(例如鲢鱼、罗非鱼等),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。

参考文献:

- [1] 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
- [2] Runnegar M, Seward D J, Ballatori N, et al. Hepatic Toxicity and Persistence of ser/thr Protein Phosphatase Inhibition by Microcystin in the Little Skate *Raja erinacea* [J]. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1999, **161**: 40—49
- [3] 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
- [4] Lindholm T, Öhman P, Kurki-Helasma K, et al. Toxic algae and fish mortality in a brackish-water Lake in Åland, SW Finland [J]. *Hydrobiologia*, 1999, **397**: 109—120
- [5] Nishiwaki-Matsushima 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
- [6] He J Y, He Z R, Guo Q L. The toxicity of microcystin aeruginosa to fishes and daphnia [J]. *Journal of Lake Science*, 1997, **9**(1): 49—56 [何家苑,何振荣,郭琼琳.有毒铜绿微囊藻对鱼和溞的毒性.湖泊科学, 1997, **9**(1): 49—56]
- [7] 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
- [8] Negre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, et al. A role for uncoupling protein 2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation [J]. *FASEB J.*, 1997, **11**(10): 809—815
- [9] Fleury C, Neverova M, Collins S, et al. Uncoupling protein 2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia [J]. *Nat. Genet.*, 1997, **15**(3): 269—272
- [10] Liang X F, Ogata H Y, Oku H, et al. Abundant and constant expression of uncoupling protein 2 in the liver of red sea bream *Pagrus major* [J]. *Comp. Biochem. Physiol. A.*, 2003, **136**(3): 655—661
- [11] Rushmore T H, Morton M R, Pickett C B. The antioxidant responsive element [J]. *Biol. Chem.*, 1991, **266**(18): 1632—1639
- [12] Dirr H, Reinemer P, Huber R. X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases—Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function [J]. *Eur. J. Biochem.*, 1994, **220**: 645—661
- [13] Li J, Xia Z X, Ding J P. Thioredoxin-like domain of human k class glutathione transferase reveals sequence homology and structure similarity to the y class enzyme [J]. *Protein Sci.*, 2005, **14**: 2361—2369
- [14] Epp O, Ladenstein R, Wendel A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution [J]. *Eur. J. Biochem.*, 1983, **133**: 51—69
- [15] Ryoji Fukuhara, Takashi Kageyama. Structure, gene expression, and evolution of primate glutathione peroxidases [J]. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 2005, **141**: 428—436
- [16] Bouillaud F, Arechaga I, Petit P, et al. A sequence related to a DNA recognition element is essential for the mitochondrial uncoupling protein [J]. *EMBO J.*, 1994, **13**(8): 1990—1997
- [17] Palmieri D, Bouillaud F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP [J]. *Biochem. J.*, 2000, **345** Pt 2: 161—179
- [18] 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
- [19] 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
- [20] Gehringer M M, Shephard E G, Downing T G, et al. An investigation into the effect of selenium supplementation on microcystin hepatotoxicity [J]. *Toxicon*, 2003, **41**: 451—458
- [21] Best J H, Eddy F B, Codd G A. Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides and of microcystin-LR, on glutathione S-transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*) [J]. *Aquat. Toxicol.*, 2002, **60**: 223—231

MOLECULAR CLONING AND *IN VIVO* EXPRESSION ANALYSIS OF MICROCYSTIN DETOXIFICATION-RELATED GENES IN NILE TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

WANG Lin, LIANG Xu-Fang, LIAO Wan-Qin, LEI La-Mei and HAN Bo-Ping

(College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632)

Abstract: Soluble glutathione S-transferase (sGST) of freshwater fish is extremely important to microcystins (MCs) purification from fish body, by catalyzing the conjugation of GSH (Glutathione) with microcystins. Glutathione peroxidase (GPX) is essential to the detoxification of cyanotoxins by providing GSH for sGST. Because oxidation and reactive oxygen species (ROS) generation is necessarily involved in both the toxication and detoxification process of cyanotoxins in hepatocytes, uncoupling protein 2 (UCP2) also has an important role in inhibiting the excessive production of ROS to restrain hepatocytes apoptosis. In this study, RT-PCR using degenerated primers, yielded a sGST cDNA fragment of 399 bp, a GPX cDNA fragment of 280 bp and a UCP2 cDNA fragment of 776 bp from the liver of a phytoplanktivorous freshwater fish, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), which consumed substantial amounts of toxic blue-green algae in the food. The sGST cDNA fragment was further completed by 5' and 3' RACE (Rapid amplification of cDNA ends). The full-length tilapia sGST cDNA was 861 bp in length, containing an ORF (Open reading frame) of 669 bp (encoding 222 amino acids), flanked by 25 bp 5' UTR (Untranslated region) and 167 bp 3' UTR. The deduced amino acid sequence from this sGST cDNA fragment contains two conserved domains, N-terminal domain (glutathione-binding site) and C-terminal domain (substrate-binding site). Homology of the sGST amino acid sequence is high (64.3%—78.5%) with red sea bream (*Pagrus major*), rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) and zebrafish sGST, and is low (51.8%—55.9%) with human, rat, cow, pig and chicken sGST. However, both the GPX and UCP2 amino acid sequences show a high conservation with GPX and UCP2 of both fish and mammals (69.6%—85.9% for the GPX with rainbow trout, rock bream, zebrafish, human, rat, mouse, cow and pig GPX, and 71.8%—93.8% for the UCP2 with red sea bream, zebrafish, common carp, European chub *Leuciscus cephalus*, grass carp, human, rat and mouse UCP2). Tilapia juveniles (5—8 g) were exposed to a sub-lethal dose (50 µg/kg bwt) of MC-LR by intraperitoneal injection. Using β-actin as external control, a significant increase (about 80%) in the liver sGST mRNA expression was found in response to the MC-LR exposure after 24h ($p < 0.05$), indicating the importance of GST in microcystin detoxification. Although no significant changes were seen in the liver GPX and UCP2 mRNA expression, the expression level of both genes tended to increase after exposed to MC-LR. We suggested that sGST might be responsible for the strong tolerance of the phytoplanktivorous fish to microcystins, and hepatocyte proteins coping with oxidative stress (GPX and UCP2), might also have some auxiliary effect.

Key words: Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*); Soluble Glutathione S-transferase (sGST); Glutathione peroxidase (GPX); Uncoupling protein 2 (UCP2); Molecular cloning; *In vivo* induced expression; Microcystins (MCs)