

日本鳗鲡谷胱甘肽过氧化物酶1和4的克隆、分析和组织表达分布

刘振兴¹, 柯浩¹, 曹艳林^{1,2}, 张健骝¹, 林敏¹, 孟轩¹

(1. 广东省农业科学院 兽医研究所 广东省兽医公共卫生公共实验室, 广东 广州 510640; 2. 华南农业大学 生命科学学院 广东 广州 510642)

摘要: 采用RACE技术, 克隆了日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)谷胱甘肽过氧化物酶1和4(*GPx1*、*GPx4*)基因的完整编码序列(Complete coding sequence, CDS)。*GPx1*基因全长993 bp, 5'非编码区(UTR)29 bp, CDS 573 bp, 3' UTR 372 bp, PolyA 19 bp; 第803–898位碱基(位于3' UTR)形成1个硒半胱氨酸插入序列(Selenocysteine insertion sequence, SECIS), 协助144–146位密码子TGA编码Sec。*GPx4*基因全长1 048 bp, 5' UTR 115 bp, CDS 561 bp, 3' UTR 346 bp, polyA 26 bp, 第766–863位碱基(位于3' UTR)形成1个SECIS, 协助299–301位密码子TGA编码Sec。*GPx1*包含190个氨基酸, 分子量21.4 kD, 等电点8.04, 第21位氨基酸具有1个潜在的N-糖基化位点。*GPx4*包含186个氨基酸, 分子量21.4 kD, 等电点8.85, 第68位和153位氨基酸具有2个潜在的N-糖基化位点。*GPx1*、*GPx4*均具有Sec、Trp、Gln和Asn构成的催化四联体。日本鳗鲡与其他脊椎动物相比, *GPx1*的核苷酸序列一致性为42.7%~60.2%, 氨基酸序列一致性为56.4%~80.4%; *GPx4*的核苷酸序列一致性为46.5%~60.2%, 氨基酸序列一致性为59.9%~81.2%。进化分析显示, 脊椎动物的*GPx1*、*GPx4*分别占据进化树的不同分支。利用Swiss-Model预测了日本鳗鲡*GPx1*、*GPx4*单体的3D模型, 序列分析显示, *GPx1*可以形成1个同源四聚体。本研究在克隆日本鳗鲡 β -actin基因部分CDS序列的基础上, 采用Real-time RT-PCR方法, 检测了日本鳗鲡*GPx1*、*GPx4*基因表达, 比较了*GPx1*、*GPx4*在鳃、皮肤、肌肉、肝、脾、肾、肠组织中的表达变化, 发现在鳗鲡的肠、肌肉、肝脏等组织中*GPx1*、*GPx4*明显表达, 并且*GPx1*的表达量高于*GPx4*。[中国水产科学, 2010, 17(3): 439–447]

关键词: 日本鳗鲡; 谷胱甘肽过氧化物酶; Real-time RT-PCR; 3D模型

中图分类号: S91

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)03-0439-09

线粒体电子传递以及“呼吸爆发”等生理过程会产生大量活性氧(Reactive oxygen species, ROS), ROS浓度过高会造成氧化应激, 损伤机体组织细胞^[1]。谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPx)是机体抗氧化酶系统的重要成员, 与超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)等主要抗氧化酶协同作用清除ROS, 维持组织正常的氧化还原水平^[2-3]。

哺乳动物GPx的研究, 在催化机理^[4-5], 组织分布, 亚细胞定位、结构、功能和进化^[6-11]等方面已有广

泛报道。鱼类作为低等脊椎动物, 其GPx在基因克隆、鱼类生长状况评价以及环境标志物(Biomarker)应用等方面的研究也正逐步开展。目前已经克隆到斑马鱼(*Danio rerio*)GPx1、GPx4, 金枪鱼(*Thunnus maccoyii*)GPx1、GPx4, 条石鲷(*Oplegnathus fasiatus*)GPx1, 草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)GPx1, 罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)GPx1, 鲤(*Cyprinus carpio*)GPx4, 大西洋鲑(*Salmo salar*)GPx4的完整编码序列(Complete coding sequence, complete CDS)。GPx的酶活能够反映鱼体氧化还原水平, 是评价鱼类生长状况的一个常用生

收稿日期: 2009-12-22; 修订日期: 2010-01-26.

基金项目: 广东省教育部产学研项目(2006D90204008)与东莞市科技发展专项基金项目(2006D055)联合资助.

作者简介: 刘振兴(1981-), 男, 助理研究员, 主要从事鱼类病害与免疫学研究. E-mail: liuzhenxing81@yho.com.cn

通讯作者: 柯浩, 副研究员. E-mail: keha@tom.com

化指标^[12-13]。水体重金属、农药等污染会诱导鱼类GPx表达量的显著增加,因此GPx也被用作监测水体环境污染的生物标志物^[14-15]。

日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)是中国重要的出口养殖鱼类,对其GPx基因克隆的研究尚未见报道,本研究在克隆日本鳗鲡GPx1、GPx4和 β -actin基因的基础上,采用Real-time RT-PCR方法检测了日本鳗鲡GPx1、GPx4基因的表达,并进一步分析了GPx1、GPx4在鳃、皮肤、肌肉、肝、脾、肾、肠等不同组织的表达变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 日本鳗鲡,体质量250~300 g,每80尾养殖于4 m³水体中。

1.1.2 菌株、试剂 Trizol购自Invitrogen公司,cDNA第一链合成试剂盒、Taq酶、TdT酶、pMD18-T载体、SYBR green premix购自TaKaRa公司,凝胶回收试剂盒、PCR纯化试剂盒购自Axygen公司, TOP10工程菌为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 cDNA第一链的合成 用0.02%的H₂O₂浸泡日本鳗鲡,诱导GPx表达。4 h后取日本鳗鲡肝脏组织,参照Trizol说明书提取RNA,参照PrimeScript cDNA第一链合成试剂盒说明书,反转录cDNA第一链。

1.2.2 GPx1、GPx4基因中间片段的克隆 根据已知的脊椎动物GPx1、GPx4基因,使用Oligo 6.0软件设计兼并引物GPX1F/GPX1R以及GPX4F/GPX4R(表1),以cDNA第一链为模板,合成鳗鲡GPx1、GPx4的中间片段,PCR反应程序为:94℃ 2 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,35个循环;72℃ 5 min。PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,割胶回收目的片段,与pMD18-T载体连接,转化到Top10菌株中,送上海生工公司测序。

1.2.3 GPx1、GPx4基因的3' RACE 根据克隆到的中间片段设计正向引物GPX1F1、GPX1F2, GPX4F1、GPX4F2,与反向引物RAP、AP(表1)。以cDNA第一链为模板,先分别用GPX1F1/RAP和GPX4F1/RAP进行第

1次扩增,反应程序:94℃ 2 min;94℃ 30 s,54℃ 30 s,72℃ 1 min,35个循环;72℃ 5 min。将扩增产物作为模板,分别加入GPX4F1/AP、GPX4F2/AP,进行第2次扩增,反应程序:94℃ 2 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,35个循环;72℃ 5 min。参照1.2.2的方法,回收目的片段,转化、测序。

表1 本研究所用引物

Tab. 1 Primers used in cloning and real-time PCR

引物名称 Primer	序列(5'-3') Sequence
GPX1F	CYGGTAAAYCAGTTYGGAWCATC
GPX1R	AGRAACTTTCRAARTTCCA
GPX4F	CRTCYAAAYCAGTTTGCGCGCAG
GPX4R	CTTSGTGAARTTCCACACYTGAT
GPX1F1	GCACGTTCCGTCCAGGCAAG
GPX1F2	AGCCCAGTCTGCAGGAAT
GPX4F1	TTGCCAGTCCCTACAATG
GPX4F2	TGCGGAGTTCGACCTATTCA
GPX1R1	CAGACTGGGCTCCAGATGA
GPX1R2	ATCGCTAGGGAACGGAAGT
GPX4R1	CCCGTTTACATCAATCTTACTG
GPX4R2	GGTCGAACTCCGCATTGTA
FAP	GGCCACGCGTCCGACTAGTACT17
RAP	GGCCACGCGTCCGACTAGTACT17
AP	GGCCACGCGTCCGACTAGTACT
BAF	RCCATGGATGAYGAYATYGC
BAR	AGYCAGTGTACAKGYWGGCC
qGPX1F	AAGCGGTACAGCAGGAGATTC
qGPX1R	TATTTCGAGCCATTACAAAGC
qGPX4F	GGGGAGTCTGGGAACTACAT
qGPX4R	TCCACTTCACTTGGGTCTCTG
qBAF	CACCGCAAATGCTTCTAAAGAG
qBAR	GCCATGCCAATGTTGTCTGTT

注: Y: C/T, R: A/G, S: G/C, W: A/T, K: G/T.

1.2.4 GPx1、GPx4基因的5' RACE 根据克隆到的中间片段以及3'末端序列设计反向引物GPX1R1、GPX1R2, GPX4R1、GPX4R2, 正向引物FAP(表1)。将cDNA第一链纯化后,用TdT酶加同聚化polyG尾,将加尾产物作为模板,先分别用反向引物GPX1R1/FAP、GPX4R1/FAP进行第1次扩增,反应程序:94℃ 2 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,35个循环;72℃ 5 min。将扩增产物作为模板,分别加入GPX4R1/

AP、GPX4R2/AP, 进行第2次扩增, 反应程序: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35个循环; 72 °C 5 min。参照1.2.2的方法, 回收目的片段, 转化、测序。

1.2.5 β -actin 基因的克隆 根据已知的脊椎动物 β -actin 基因序列, 使用Oligo 6.0软件设计兼并引物BAF、BAR(表1), 以cDNA第一链为模板合成 β -actin序列。反应程序: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 3 min, 35个循环; 72 °C 10 min。参照1.2.2的方法, 回收目的片段, 转化、测序。

1.2.6 GPx1、GPx4 基因的生物信息学分析 使用SECISearch、DNA Star、ClustalX、MEGA4.0、SignalP3.0、ProtScale、NetNGlyc、Swiss-Model等生物学软件对克隆的GPx1、GPx4基因cDNA序列以及推测的蛋白质结构进行生物信息学分析。

1.2.7 GPx1、GPx4 mRNA 转录水平的 Real-time RT-PCR 检测方法 使用Oligo 6.0软件分别设计GPx1、GPx4、 β -actin的Real-time RT-PCR引物: qGPX1F/qGPX1R, qGPX4F/qGPX4R, qBAF/qBAR(表1)。反应体系参照SYBR Premix Ex Taq使用说明书, GPx1反应程序为: 95 °C 1 min; 95 °C 10 s, 56 °C 10 s, 72 °C

15 s, 50个循环; GPx4反应程序为: 95 °C 10 s, 56.5 °C 10 s, 72 °C 10 s, 50个循环; β -actin: 95 °C 1 min; 95 °C 10 s, 56.5 °C 10 s, 72 °C 15 s, 50个循环。参照博日Line-Gene K荧光定量PCR仪使用说明书, 制作标准曲线, 计算扩增效率。以 β -actin为内参基因, 分析GPx1、GPx4的相对表达量。

1.2.8 GPx1、GPx4 基因表达的组织分布 分别取3尾日本鳗鲡的鳃、皮肤、肌肉、肝、脾、肾、肠组织按照1.2.1的方法合成cDNA第一链, 按照1.2.7的方法, 确定GPx1、GPx4在上述组织中的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 GPx1、GPx4 及 β -actin 基因的克隆

将拼接以后的GPx、 β -actin核苷酸序列登录GenBank, 其中2条GPx为完整的编码序列, 登录号为GPx1: FJ769219; GPx4: FJ769220; β -actin为部分编码序列(1 527 bp), 登录号为GU001950。

2.2 GPx1、GPx4 基因的生物信息学分析结果

2.2.1 GPx1、GPx4 基因 cDNA 序列和推测蛋白质序列 日本鳗鲡GPx1、GPx4的核苷酸序列以及推测蛋白质序列的一级结构信息如表2所示。

表2 日本鳗鲡GPx1、GPx4的基本特点
Tab. 2 Basic features of *Anguilla japonica* GPx1 and GPx4

项目 Item	GPx1	GPx4
全长/bp Full length	993	1048
5' UTR/bp	29	115
完整编码序列/bp CDS	573	561
3' UTR/bp	372	346
Sec位点/nt Sec site	144-146	299-301
硒半胱氨酸插入序列/nt SECIS	803-898	766-863
肽链氨基酸数目/个 Amino acid	190	186
分子量/kD Molecular weight	21.4	21.4
等电点 Ip	8.04	8.85
N-糖基化位点 N-glycosylation site	21位氨基酸	68、153位氨基酸

与其他脊椎动物GPx1、GPx4蛋白质序列的多重比对结果显示, 日本鳗鲡GPx1、GPx4具有构成催化四联体的Sec、Trp、Gln和Asn 4个保守氨基酸。从比对结果可以看出, GPx4缺少GPx1中的寡聚化环(Oligomerization loop)片段和“PGGG”结构域

(“PGGG” motif)(图1)。日本鳗鲡GPx1、GPx4的3D模型显示, GPx4的“PGGG”结构域和寡聚化环的缺失对蛋白质三级结构产生了明显影响(图2), 并将进一步影响二聚体、四聚体的形成(详见3讨论)。

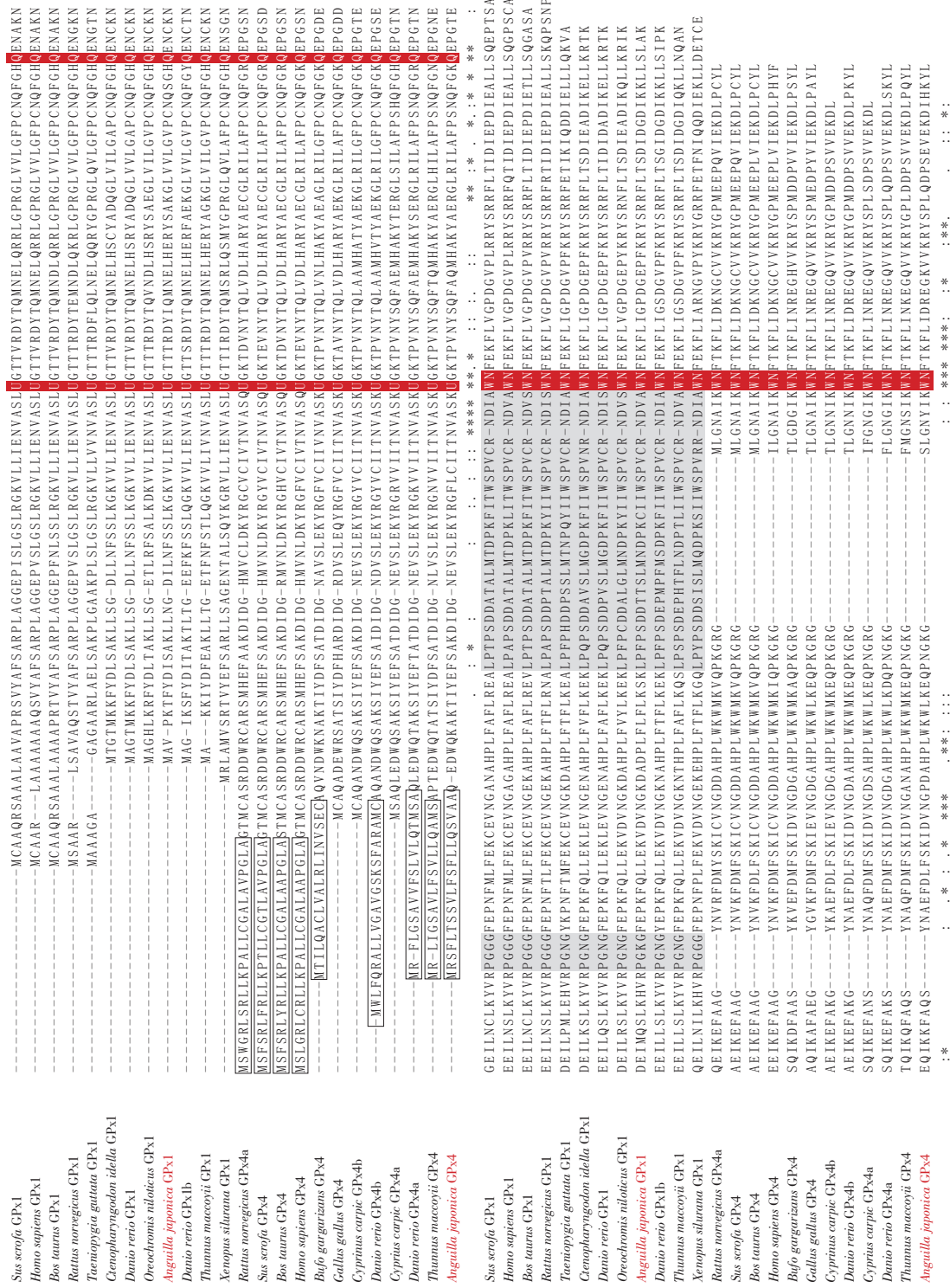


图1 日本鳗鲡与其他脊椎动物GPx1、GPx4氨基酸序列多重比对结果 (CLUSTAL W)

* 表示相同氨基酸; ; 或. 表示相似氨基酸, 催化四肽用红色方框标出, PGGG结构和寡聚化环用灰色方框标出, 部分GPx4具有的信号肽用方框标出。
 Fig. 1 Multiple alignment of the *Anguilla japonica* s GPx1 and GPx4 amino acid sequences with other vertebrate animals. GPx4 sequences are boxed. Identical (*) and similar residues (; or .) identified by CLUSTAL W program are indicated. Catalytic tetrad is boxed in red. PGGG motif and oligomerization loop are boxed in grey. N terminal signal peptides in partial GPx4 sequences are boxed.

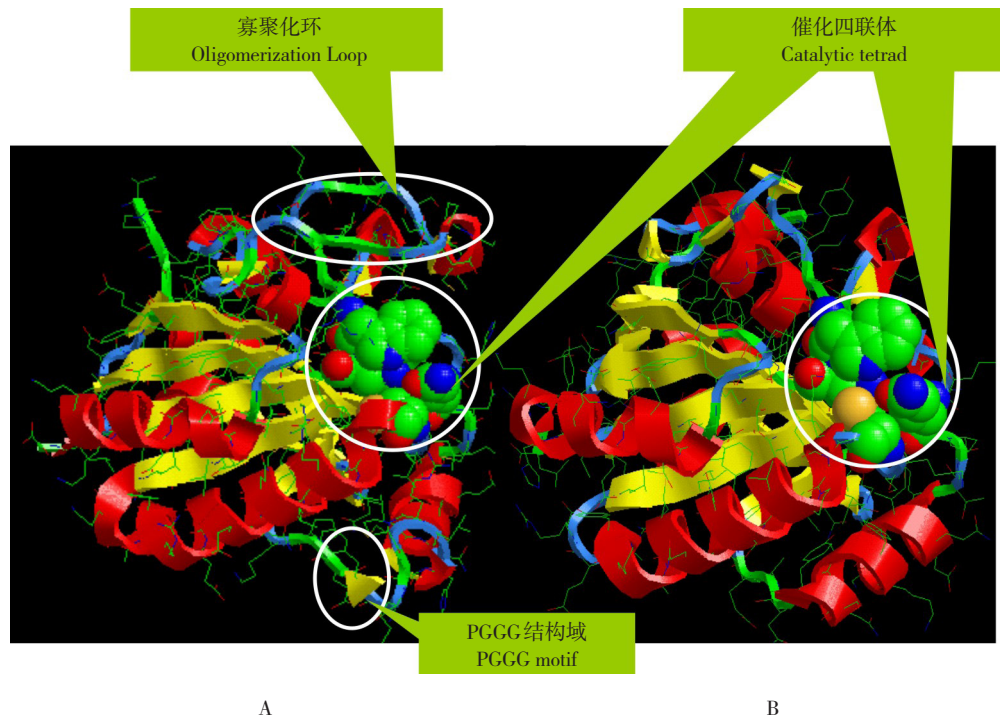


图2 预测的日本鳗鲡GPx1 (A)、GPx4 (B) 3D模型
 Fig. 2 Predicted 3D model of *Anguilla japonica*'s GPx1 (A) and GPx4 (B)

2.2.2 GPx1、GPx4基因的同源性及进化分析 与其他脊椎动物相比较,日本鳗鲡GPx1的核苷酸序列一致性为42.7%~60.2%,氨基酸序列一致性为56.4%~80.4%;GPx4的核苷酸序列一致性为

46.5%~60.2%,氨基酸序列一致性为59.9%~81.2% (表3)。根据脊椎动物的GPx1、GPx4核苷酸序列构建的进化树显示:GPx1、GPx4基因分别占据了2个不同的分支(图3)。

表3 日本鳗鲡与其他脊椎动物GPx1、GPx4核苷酸、氨基酸序列一致性比较
 Tab. 3 Comparison of amino acid and nucleotide identity of *Anguilla japonica*'s GPx1 and GPx4 with other vertebrate animals' GPx %

物种 Species	核苷酸一致性 Nucleotide identity		氨基酸一致性 Amino acid identity	
	GPx1	GPx4	GPx1	GPx4
金枪鱼 <i>Thunnus maccoyii</i>	60.2	57.8	77.8	78.0
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	57.3	—	79.4	—
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	52.5	60.2	80.4	81.2
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	51.0	—	79.4	—
蟾 <i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	45.3	—	63.0	—
中华大蟾蜍 <i>Bufo gargarizans</i>	—	50.6	—	60.9
鹌鹑 <i>Coturnix japonica</i>	42.7	—	56.4	—
红原鸡 <i>Gallus gallus</i>	—	52.4	—	70.6
人 <i>Homo sapiens</i>	43.6	47.2	65.1	62.6
鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	43.2	46.5	64.0	59.9

注：“—”表示未引用相关序列
 Note: “—” donate the absence of suitable sequences.

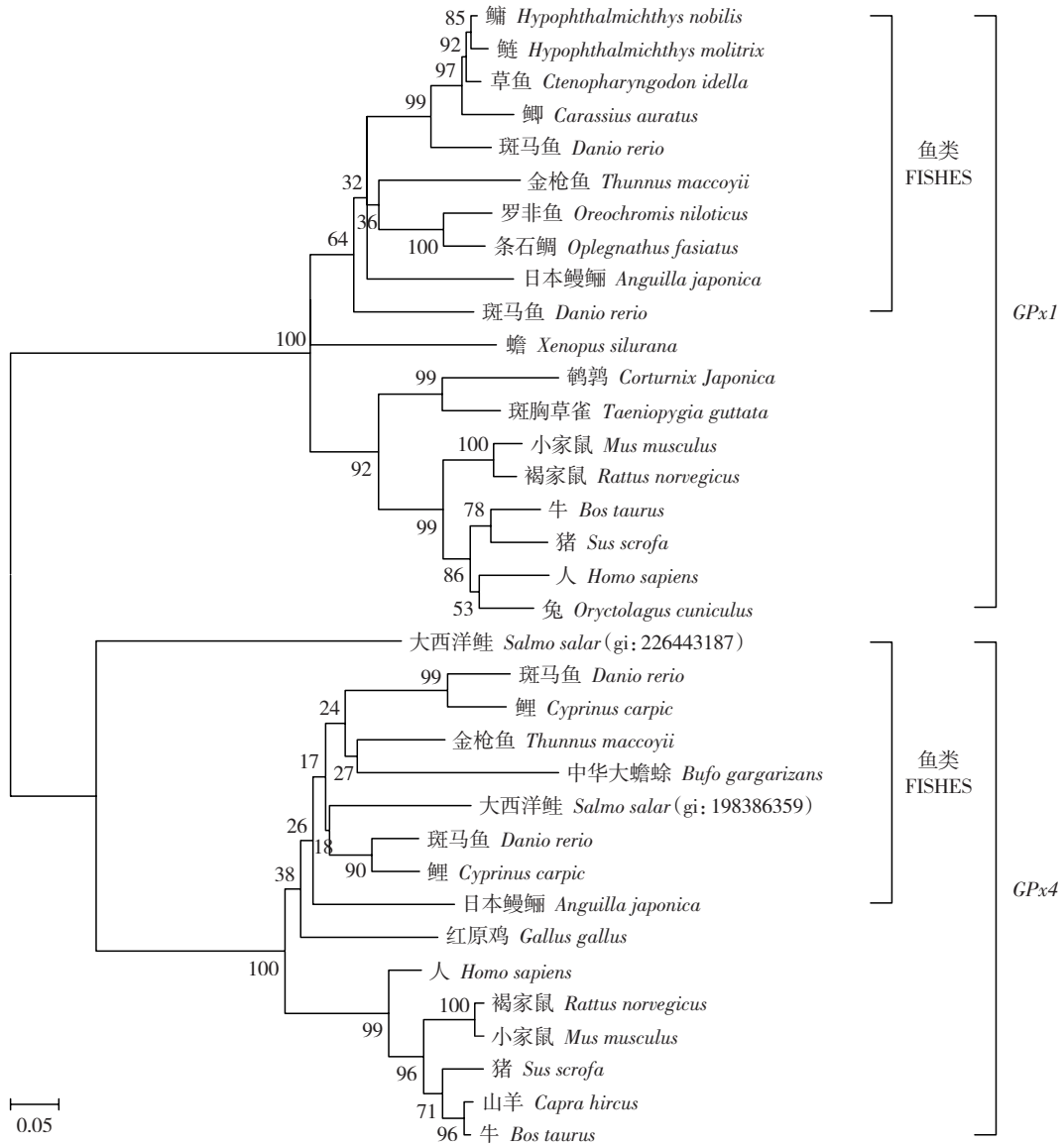


图3 日本鳗鲡 GPx1、GPx4 与其他脊椎动物 GPx 核苷酸序列的 NJ 进化树分析
节点数字表示置信度。

Fig. 3 NJ phylogenetic tree showing the relationship of *Anguilla japonica*'s GPx1 and GPx4 nucleotide sequences with other vertebrate animals' GPx generated by MEGA4.0 program
Numbers on node indicate bootstrap confidence values.

2.3 GPx1、GPx4 mRNA 转录水平的 Real-time RT-PCR 检测

经过优化反应体系和反应程序后可以使 GPx1、GPx4 及 β-actin 基因的扩增效率分别达到 99.2%、100.5%、99.5%，标准曲线的 R²>0.98，可以采用 ΔCt 法计算 GPx1、GPx4 的相对表达量。

2.4 GPx1、GPx4 基因表达的组织分布

GPx1、GPx4 在鳗鲡的肠、肌肉、肝脏组织中可见

明显表达(图4),并且在上述同种组织中, GPx1 的表达量要高于 GPx4。

3 讨论

3.1 日本鳗鲡 GPx1、GPx4 的结构

在脊椎动物中,小部分 GPx 的活性中心为 Cys,大部分 GPx 的催化中心包含 1 个读码框架内的终止密码子 UGA 编码的 Sec,这种编码机制依赖于特

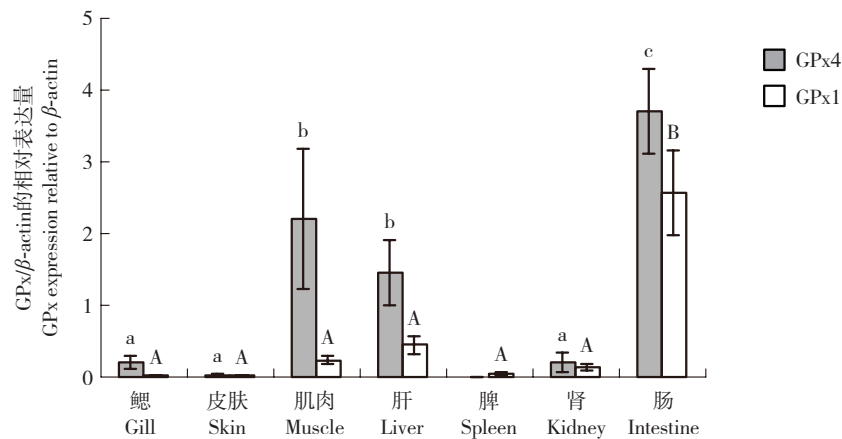


图4 GPx1、GPx4在日本鳗鲡供检组织中的表达

大写字母表示GPx4的组织表达差异;小写字母表示GPx1的组织表达差异.不同字母的组之间具有显著性差异($P < 0.05$),相同字母的组之间不具有显著性差异($P > 0.05$).

Fig. 4 Tissue distribution of *Anguilla japonica* GPx1 and GPx4

Capital letters and small letters donate significant differences in GPx4 and GPx1, respectively. Different letters mean significant differences ($P < 0.05$), while the same ones mean no significant differences ($P > 0.05$).

殊的Sec t-RNA以及位于mRNA 3' UTR中的硒半胱氨酸插入序列(Selenocysteine insertion sequence, SECIS),后者形成的茎环结构,协助tRNA识别UGA^[16]。日本鳗鲡GPx1、GPx4的3' UTR中包含SECIS(图5),协助1个读码框架内的UGA编码1个Sec,然后与Trp、Gln和Asn形成脊椎动物GPx家族具有的典型催化四联体。日本鳗鲡GPx与其他脊椎动物相比较,表现出较高的氨基酸序列一致性,尤其是催化四联体所在的氨基酸片段,在脊椎动物GPx家族中表现了较高的保守性。

GPx家族的很多成员可以通过疏水作用和氢键形成同源二聚体、四聚体^[17-18]。寡聚化环片段和“PGGG”结构域在寡聚体形成中起了重要作用。日本鳗鲡GPx1存在这2个结构,推测可以形成同源四聚体。日本鳗鲡GPx4由于“PGGG”结构域的缺失,改变了邻近 α 螺旋的空间位置,破坏了GPx4的二聚体作用界面,而寡聚化环的缺失又使日本鳗鲡GPx4失去了四聚体作用界面,因此日本鳗鲡GPx4可能是以单体形式存在。GPx4的结构特点使它可以催化磷脂氢过氧化物等复杂底物,在防止生物膜的氧化损伤中发挥了重要作用;最近报道1种推测的哺乳动物GPx,可能也具有类似活性^[19]。这种催化复杂底物的

特点也使GPx4在神经系统发育、细胞增殖、凋亡以及多种信号转导通路中发挥了重要作用^[20-21]。

人类体内存在位于细胞核、胞质、线粒体的3种GPx4,其中线粒体GPx4比胞质GPx4在N端多27个氨基酸,“翻译机制”假说认为,这是由同一条mRNA在2个不同起始密码子(ATG)进行转录而产生的长、短2个产物^[20]。进一步分析发现,人的线粒体GPx4 N端存在1个疏水性的、分泌型蛋白“信号肽”(图1),这段序列的长度(25个氨基酸)与线粒体GPx4多出的片段长度(27个氨基酸)极其接近。日本鳗鲡和中华大蟾蜍(*Bufo gargarizans*)的GPx4虽然没有临近N端的第2个起始密码子,但是却具有类似“信号肽”的N端疏水结构,它们是否也分布于线粒体中,有待进一步的研究。

3.2 日本鳗鲡GPx的组织表达分布

本研究选择基因表达相对定量常用的 β -actin作为内参基因^[22],分析GPx1、GPx4组织表达分布。结果显示,GPx1、GPx4在日本鳗鲡肠道中有很高的表达量,作者认为这可能与日本鳗鲡的肉食性和腐食性造成的氧化压力有关,还需要进一步探讨。脾脏中2种GPx的表达水平较低,酶活检测初步显示,脾脏中可能存在着其他形式的GPx。本研究针对日本

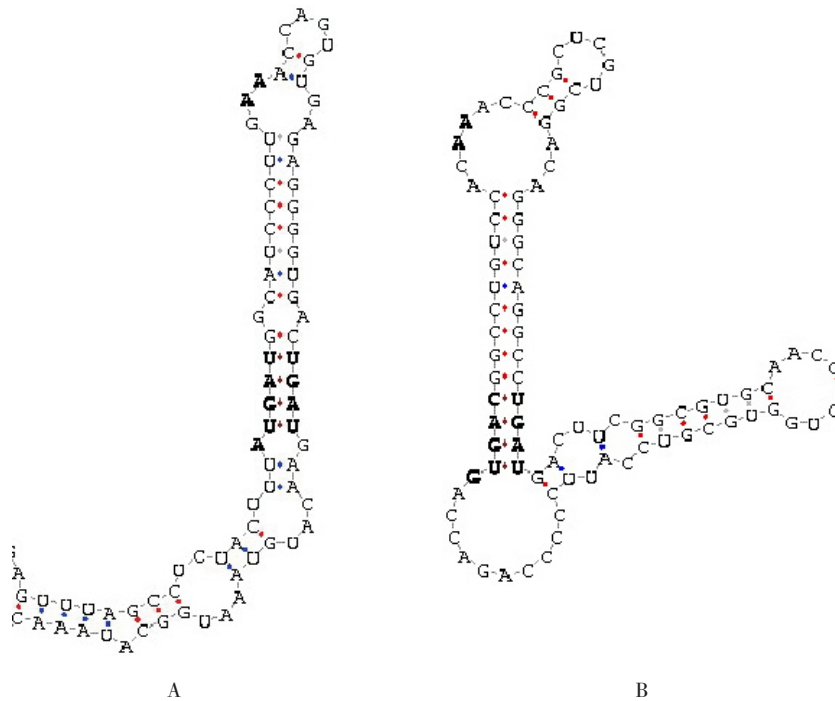


图5 日本鳗鲡GPx1 (A) 和GPx4 (B) 的硒半胱氨酸插入序列形成的茎环结构
Fig. 5 SECIS stem-loop structures of *Anguilla japonica* GPx1 (A) and GPx4 (B)

鳗鲡进行的Real-time RT-PCR的检测,为养殖环境和鳗鲡健康水平判断提供了一个较为准确、灵敏的方法,为进一步开展相关研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 陈瑗,周玫. 自由基-炎症与衰老性疾病[M]. 北京: 科学出版社,2007: 47.
- [2] Fan J L, Cai H B, Yang S, et al. Comparison between the effects of normoxia and hypoxia on antioxidant enzymes and glutathione redox state in ex vivo culture of CD 34⁺ cells [J]. 2008, 151 (2) B: 153-158.
- [3] Yu H J, Ge Y, Wang Y, et al. A fused selenium-containing protein with both GPx and SOD activities [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 358 (3): 873-878.
- [4] Tosatto S C, Bosello V, Fogolari F, et al. The catalytic site of glutathione peroxidases [J]. Antioxid Redox Signall, 2008, 10 (9): 1515-1525.
- [5] Toppo S, Flohé L, Ursini F, et al. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: Variations of a basic scheme [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2009, 1790 (11): 1486-1500.
- [6] Margis R, Dunand C, Teixeira F K, et al. Glutathione peroxidase family-an evolutionary overview [J]. FEBS J, 2008, 275 (15): 3959-3970.
- [7] Bae Y A, Cai G B, Kim S H, et al. Modular evolution of glutathione peroxidase genes in association with different biochemical properties of their encoded proteins in invertebrate animals [J]. BMC Evol Biol, 2009, 9: 72.
- [8] Toppo S, Vanin S, Bosello V, et al. Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily [J]. Antioxid Redox Signal, 2008, 10 (9): 1501-1513.
- [9] Ghyselinck N B, Jimenez C, Lefrançois A M, et al. Molecular cloning of a cDNA for androgen-regulated proteins secreted by the mouse epididymis [J]. J Mol Endocrinol, 1990, 4: 5-12.
- [10] Thisse C, Degraeve A, Kryukov G V, et al. Spatial and temporal expression patterns of selenoprotein genes during embryogenesis in zebrafish [J]. Gene Expr Patterns, 2003, 3 (4): 525-532.
- [11] Kryukov G V, Castellano S, Novoselov S V, et al. Characterization of mammalian selenoproteomes [J]. Science, 2003, 300 (5624): 1439-1443.
- [12] Sitjà-Bobadilla A, Calduch-Giner J, Saera-Vila A, et al. Chronic exposure to the parasite *Enteromyxum leei* (*Myxozoa Myxosporaea*) modulates the immune response and the expression of growth, redox and immune relevant genes in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. [J]. Fish Shellfish Immunol, 2008, 24 (5): 610-619.
- [13] 徐奇友,李婵,许红,等. 茶多酚对虹鳟生长性能、生化指标和非特异性免疫指标的影响[J]. 动物营养学报, 2008, 20 (5): 547-553.
- [14] Choi C Y, An K W, Nelson E R, et al. Cadmium affects the

- expression of metallothionein (MT) and glutathione peroxidase (GPX) mRNA in goldfish, *Carassius auratus* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2007, 145 (4) C: 595–600.
- [15] 刘海芳, 王凡. 水环境污染程度的分子生物标志物的研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2007, 35 (18): 5502–5503.
- [16] Walezak R, Westhof E, Carbon P, et al. A novel RNA structural motif in the selenocysteine insertion element of eukaryotic selenoprotein mRNAs [J]. *RNA*, 1996, 2: 367–379.
- [17] 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 (1): 51–69.
- [18] Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Floh é R, et al. Diversity of glutathione peroxidases [J]. *Methods Enzymol*, 1995, 252: 38–53.
- [19] Utomo A, Jiang X, Furuta S, et al. Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (42): 43522–43529.
- [20] Savaskan N E, Ufer C, Kühn H, et al. Molecular biology of glutathione peroxidase 4: from genomic structure to developmental expression and neural function [J]. *Biol Chem*, 2007, 388: 1007–1017.
- [21] Conrad M, Schneider M, Seiler A, et al. Physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammals [J]. *Biol Chem*, 2007, 388 (10): 1019–1025.
- [22] 朱芷葳, 董常生. 持家基因作为相对定量内标物的稳定性比较 [J]. *生物技术通讯*, 2006, 17 (5): 807–809.

Molecular cloning, characterization and tissue distribution of glutathione peroxidase 1 and 4 from Japanese eel, *Anguilla japonica*

LIU Zhenxing¹, KE hao¹, CAO Yanlin^{1,2}, ZHANG Jianfei¹, LIN Min¹, MENG Xuan¹

(1. Institute of Veterinary Medicine, Guangdong Academy of Agricultural Sciences Guangdong Common Lab of Veterinary Public Health, Guangzhou 510640, China; 2. College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Full length cDNAs encoding glutathione peroxidase 1 (*GPx1*) and glutathione peroxidase 4 (*GPx4*) of Japanese eel, *Anguilla japonica* were obtained from liver by a reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA (RACE). The *GPx1* is 993 bp, including a coding sequence (CDS) of 573 bp, a 5' untranslated region of 29 bp, a 3' untranslated region of 372 bp, and a 19 bp poly A tail. The *GPx4* is 1 048 bp, including a coding sequence (CDS) of 561 bp, a 5' untranslated region of 115 bp, a 3' untranslated region of 346 bp, and a 26 bp poly A tail. *GPx1* and *GPx4* both contain a putative selenocysteine residue which is encoded by the unusual stop codon of TGA, with the selenocysteine insertion sequence (SECIS) locating in 3' untranslated region. The GPx1 and GPx4 are predicted to separately encode proteins of 190 amino acids and 186 amino acids. The molecular weights of GPx1 and GPx4 are both nearly 21.4 kD. Estimated pI of GPx1 is 8.04 and GPx4's is 8.85. One N-glycosylation site is found in GPx1 and two in GPx4. GPx1 and GPx4 both possess a classic catalytic tetrad composed of selenocysteine, tryptophan, asparagine and glutamine. The nucleotide identity of GPx1 between Japanese eel and other vertebrate animals is 42.7%–60.2%, and amino acid identity is 56.4%–80.4%. The nucleotide identity of GPx4 between Japanese eel and other vertebrate animals is 46.5%–60.2%, and amino acid identity is 59.9%–81.2%. Phylogenetic analysis result shows that GPX1 and GPX4 split into two clusters. The 3D structures are predicted with Swiss-Model software. Sequence analysis result suggests that GPx1 is homotetrameric. This research established the methods for determination of the Japanese eel's GPx1 and GPx4 relative expression level by using Real-time RT-PCR based on the cloning of partial CDS of β -actin gene. The expression analysis of *GPx1* and *GPx4* was carried out in different tissues including gill, skin, muscle, liver, spleen, kidney and intestine, and the results indicate GPx1 and GPx4 both show a high expression level in intestine, liver and muscle. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (3): 439–447]

Key words: *Anguilla japonica*; glutathione peroxidase; Real-time RT-PCR; 3D model

Corresponding author: KE Hao. E-mail: keha@tom.com