

泥蚶乙二醛酶 I 基因的克隆及时空表达特征分析

姚韩韩, 董迎辉, 姚彬彬, 包永波, 林志华*

(浙江万里学院浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室, 浙江 宁波 315100)

摘要: 为探索贝类乙二醛酶 I 基因的结构及功能特征, 实验利用 RACE 技术首次克隆获得泥蚶乙二醛酶 I 基因(Tg-GLOI)的 cDNA 全长序列, 并对其氨基酸序列特征及时空表达特征进行了研究。结果发现, Tg-GLOI 基因的 cDNA 全长序列为 1 807 bp, 开放阅读框为 540 bp, 编码 180 个氨基酸, 在 27~169 aa 处具有典型的乙二醛酶系保守序列; 成熟的乙二醛酶 I 由 2 个相同的亚基组成, 每个亚基由乙二醛酶 I 基因编码, 其二级结构由 18 个 α -螺旋、20 个 β -折叠片和 36 个转角组成, 每个亚基各含 1 个 Zn^{2+} ; 氨基酸序列比对发现, Tg-GLOI 氨基酸序列与太平洋牡蛎的同源性达到 86.1%, 与其他脊椎动物的同源性也都在 70% 以上, 表现出高度保守性。qRT-PCR 结果显示, Tg-GLOI 基因在泥蚶成贝 8 个组织中均有表达, 在内脏团中的表达量最高, 极显著地高于其他组织($P < 0.01$); 在各发育时期中, Tg-GLOI 表达量随发育进程呈逐渐升高的趋势, 在眼点幼虫期达到最高, 极显著高于其他时期($P < 0.01$), 而在幼虫变态至稚贝时, 表达量又极显著地下降($P < 0.01$)。研究表明, Tg-GLOI 具有类似于高等动物的分子结构, 并在泥蚶不同组织、不同发育时期表达差异显著, 这为进一步研究该酶在贝类中的功能和作用机制奠定了重要基础。

关键词: 泥蚶; 乙二醛酶 I 基因; 基因克隆; 时空表达; 荧光定量 PCR

中图分类号: Q 785; S 968.3

文献标志码: A

α -酮基醛类物质, 如乙二醛、甲基乙二醛(MG)等是体内糖酵解、脂质过氧化等多个代谢途径的产物, 是一类对细胞具有高度毒性的物质, 可引起体内细胞和组织损伤。而乙二醛酶 I (glyoxalase I, GLOI) 的天然活性底物为 α -酮基醛类物质, 能够将其转化为对细胞无害的 α -羟基酸等物质, 在细胞中发挥着重要的解毒功能^[1-2]。另外, 乙二醛酶 I 通过催化 α -酮基醛类物质反应, 还对细胞周期^[3]、细胞生长具有重要的调节功能^[4]。有关乙二醛酶 I 的基因结构、酶活性及作用机理研究已在高等动物中广泛展开, 其与炎症反应、血管病变等多种疾病的相关性分析也有一些报道^[5-7]。然而, 在海洋贝类中, 仅见 Zhang 等^[8]在太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)全基因组中筛查到乙二醛酶 I 基因的 cDNA 全长, 而有关其基因结构、表达特征及具体功能的研究尚未见报道。

泥蚶(*Tegillarca granosa*)是我国四大海水养殖贝类之一, 具有较高的经济价值和产业发展前景, 开展其代谢、生长调控机制等分子生物学研究对开发利用泥蚶基因资源和发展健康养殖具有重要意义。本研究首次克隆得到泥蚶乙二醛酶 I (Tg-GLOI) 基因的 cDNA 全长序列, 并对其序列特征、组织表达及发育时期表达特征进行了分析, 为探索乙二醛酶 I 在贝类中的生物功能及作用机理研究奠定重要基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用泥蚶材料均于 2013 年 6 月取自浙江省象山县的宁波甬盛水产种业有限公司。挑选个体大、性腺发育成熟的泥蚶成贝, 活体解剖后迅速取血液、斧足、闭壳肌、内脏团、外套膜、鳃、精巢和

收稿日期: 2014-04-16 修回日期: 2014-06-23

资助项目: 国家现代贝类产业技术体系项目(CARS-48); 浙江省自然科学基金重点建设专项(LZ12C19001); 宁波市科技创新团队项目(2011B82017); 浙江省重中之重学科开放基金项目(ZS2012015)

通信作者: 林志华, E-mail: zhishua9988@126.com

卵巢 8 个组织,用液氮速冻后分别放入冻存管中,置于 -80 ℃ 冰箱中备用。

泥蚶不同发育时期的样品,须经亲贝催产、人工授精和早期培育来获得。取性腺饱满的泥蚶亲贝,通过阴干、流水刺激等方法催产。挑选待产的雌、雄个体,淡水冲洗后单个放入盛有过滤海水的烧杯中排精、产卵,然后挑选镜检质量好、无污染的卵子,通过筛绢网过滤和低速离心获得成熟卵子样品。选择质量好的精、卵进行人工授精,培养于 600 L 的塑料大桶中,发育温度保持在 27 ~ 30 ℃,利用显微镜跟踪观察受精、发育进程,用过滤、离心方法获得卵裂期、囊胚期、原肠胚期、担轮幼虫期、D 形幼虫期、壳顶幼虫期、眼点幼虫期及稚贝期样品。所有样品用液氮速冻, -80 ℃ 保存。

RNA 提取试剂 Trizol 由 Invitrogen 公司生产, SMARTTM RACE cDNA Amplification kit 和 Advantage 2 Polymerase kit 购自美国 Clontech 公司, PMD18-T 载体、大肠杆菌 DH5 α 、rTaq 聚合酶购自 TaKaRa 公司,胶回收试剂盒购自天根生物

技术有限公司,反转录试剂盒购自美国 Promega 公司, SYBR Green Real-time Master Mix 购自美国 Bio-rad 生物技术有限公司。PCR 所用引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 Tg-GLOI 基因 cDNA 全长的克隆

RNA 提取 采用 Trizol 法提取泥蚶各组织及发育时期样品的总 RNA,用 1.0% 琼脂糖电泳检测其完整性, NanoVue 微量紫外分光光度计检测浓度和纯度。

Tg-GLOI 基因的 cDNA 全长克隆 从泥蚶 454 转录组文库的注释信息中,检索到 Tg-GLOI 的 EST 片段,分别设计 3'-RACE 和 5'-RACE 特异性引物 GSP1 和 GSP2 (表 1),利用 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒和 Advantage 2 Polymerase 试剂盒扩增该基因的 cDNA 全长,具体操作按试剂盒说明书要求。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,胶回收试剂盒割胶纯化。纯化后的 PCR 产物与 PMD-18T 载体连接,转化到大肠杆菌 DH5 α 中进行克隆,将阳性克隆送往 Invitrogen 公司测序。

表 1 实验所用的引物及序列
Tab.1 Primers and their sequences used in this experiment

引物名称 primer name	引物序列(5'→3') sequence	引物信息 information of primers
GSP1	CTGCCTGCGACAGATTTGAAAACTTGG	3'-RACE 扩增
GSP2	TTCAAATCTGTCGCAGGCAGCATC	5'-RACE 扩增
Real-GLOI-F	AACCACTTTCGGATGAAGATGT	荧光定量引物
Real-GLOI-R	CTTTAGCAACCTCATTCCCATT	
18s-F	CTTTCAAATGTCTGCCCTATCAACT	
18s-R	TCCCGTATTGTTATTTTCGTCAC	内参基因荧光定量引物

1.3 生物信息学分析

利用 DNAMAN 6.0 软件对序列进行拼接,获得 Tg-GLOI 基因的 cDNA 全长序列,并用该软件进行开放阅读框(ORF)预测和蛋白质理化性质分析;用 NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)进行同源序列搜索和结构域查找。用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)预测信号肽, ProtScale 在线软件 (<http://web.expasy.org/protscale/>)分析蛋白质疏水性, TMHMM 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)预测蛋白质跨膜区, Sanger 软件 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>)预测蛋白质结构域, PHD 软件 (<http://www.predictprotein.org/>)预测蛋白质结构及特殊结合位点, Swiss Model 软件 (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>)对蛋白质高级结构进行预测。

根据推导出的 Tg-GLOI 基因编码的氨基酸序列,利用 NCBI Blastx 下载获得太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*, EKC29441)、小鼠 (*Mus musculus*, AAH24663)、野猪 (*Sus scrofa*, XP_001927992)、牛 (*Bos taurus*, NP_001076965)、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*, NP_001086524)、人 (*Homo sapiens*, NP_006699)、大西洋鲑 (*Salmo salar*, ACH70673)、斑马鱼 (*Danio rerio*, NP_998316)、鸡 (*Gallus gallus*, XP_419481)、中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*, XP_006126600) 及褐家鼠 (*Rattus norvegicus*, NP_997477) 的乙二醛酶 I 氨基酸序列,用 ClustalW 软件对其进行氨基酸序列比对, MEGA 4.0 软件 NJ 法构建系统进化树。

1.4 Tg-GLOI 基因不同组织和发育时期时空表达特征分析

提取泥蚶 8 个组织(血液、斧足、闭壳肌、内脏

团、外套膜、鳃、精巢和卵巢, $n=3$) 和 9 个发育阶段样品(成熟卵子、卵裂期、囊胚期、原肠胚期、担轮幼虫期、D 形幼虫期、壳顶幼虫期、眼点幼虫期及稚贝期, $n>500$) 的总 RNA, 按照 Promega 反转录试剂盒说明进行反转录获得 cDNA 第一链。根据已获得的 Tg-GLOI 基因的 cDNA 全长序列, 设计荧光定量引物 Real-GLOI-F 和 Real-GLOI-R(表 1), 以 18S rRNA(表 1) 为内参基因进行相对定量。PCR 反应体系为 20 μ L, 包含: SYBR Green Mix 10 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 上下游特异性引物(10 mmol/L) 各 1 μ L。使用 ABI 7500 fast 荧光定量 PCR 仪进行扩增, 具体反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 20 s, 然后进行 40 个循环: 95 $^{\circ}$ C 变性 3 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸

10 s。每个组织、发育时期样品设 3 个平行, 基因的相对 mRNA 水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算, 结果用平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示, 采用 SPSS 16.0 进行 ANOVA 单因素方差分析, $P<0.05$ 为显著差异, $P<0.01$ 极显著差异。

2 实验结果

2.1 Tg-GLOI 基因的 cDNA 全长序列分析

克隆得到 Tg-GLOI 基因的 cDNA 全长序列共 1 807 bp, 其中 5'-非编码区(5'-UTR) 10 bp, ORF 为 540 bp, 编码 180 个氨基酸, 3'-非编码区(3'-UTR) 1 257 bp, 包括终止密码子 TAA、加尾信号 AATAAA 及多聚 PolyA 尾巴(图 1)。

```

1      ATAGAAAAACATGAGCCTAAACCACTTTTCGGATGAAGATGTCAAAAAGGCTTGTGTGA
1      M E P K P L S D E D V K K A C C E
61     GCCAGAAGATGCAACTCAAGATTTTCTTCCAACAACAATGTTACGCATTAAAGATCC
18     P E D A T Q D F F F Q Q T M L R I K D P
121    CAAAAGATCTCTTGAATTTTATACAAAAGTAATGGGAATGAGGTTGCTAAAGAAATTGA
38     K R S L E F Y T K V M G M R L L K K F D
181    TTTTCCATCAATGAAGTTTTCCTTGTATTTATGGGATATGAGAAATCTGAAGATATTCC
58     F P S M K F S L Y F M G Y E K S E D I P
241    TCAGGATGAACTGAAAAGACAATATTTTGTTCAAAACAAGGCAACATTGGAATTAAC
78     Q D E T E K T I F C F K T K A T L E L T
301    ACACAACTGGGGAACTGAAAATGATGAAAATCAGAGTTATCATAATGGAATAGTGATCC
98     H N W G T E N D E N Q S Y H N G N S D P
361    AAGGGGATTTGGTCATATTGGAATAGTAGTTCCAAATGTTGATGCTGCCTGCGACAGATT
118    R G F G H I G I V V P N V D A A C D R F
421    TGAAAACTTGGAGTAGAATTTGTTAAGAAGCCTAATGATGGCAAGATGAAAGGATTAGC
138    E K L G V E F V K K P N D G K M K G L A
481    ATTCATCAAGATCCGGATGGCTACTGGATTGAAATATTAAATCCAAATAATATGACAAG
158    F I K D P D G Y W I E I L N P N N M T S
541    TATCAAAAGCTAAATACAATTACAGAATGAAAAGATAATTAAAGAAACTCGGTAGATTTT
178    I K S *
601    GATTATTAAAGGACCTTAATTTTGAACACAGGTGTAAATTCAAATTCAAATTAATAAAAA
661    AACTAGTGCTATAGAAATGTCTAGAACATCAAATAGATTAATAGTAAATTTTGCAAAATT
721    AAATAGACCAAGAGTAAATTTGCATACGGGGCTTAAAGAATATACAGGTGTATAAAACA
781    TCCGATTTCATCAGGGAATCATTATAAATTCCTTTAAAAAGAAACGCCATAATAATGA
841    AACACCACACCACTGTGTATTGATGGGTAATCCCTGTAAGCTGTCAAGCTTTTGACCTGTT
901    GATGGGTCTTCGTGAGGATGGTGATAAATATTTTACAGACCTGTCTATTCTTATTATCA
1561   GAGTCTTCAAAGAATGAAATACCTGGTGTAACTGCATGTAAATATATTTCTGTATGCT
1621   ATGTATTTATCATGATTATGGCTAATAATTTTGGCATCATTATGTGTGTGCCATTTGCTT
1681   TTTAAATATATGTTATATGGTAAGTGCTTTTGCTGATGATTTTAAAGGTATGTTAATGA
1741   TTGACAAATCAAGCAAAAATAAAGCTATTAAATTAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
1801   AAAAAAA
  
```

图 1 Tg-GLOI 基因 cDNA 全长序列及推导的氨基酸序列

加框的密码子代表 Tg-GLOI 基因的起始密码子、终止密码子、加尾信号, * 代表蛋白翻译结束;阴影部分为 Tg-GLOI 的特征性序列,下划线加粗部分为 2 个糖基结合位点,斜体加粗的为 3 个蛋白酶 C 磷酸化位点,双下划线加粗的是 2 个酪氨酸蛋白酶 II 磷酸化位点

Fig. 1 The nucleotide and deduced amino acid sequences of of Tg-GLOI gene in *T. granosa*

The letters boxes are the start codon, the stop codon and the polyadenylation signal sequence. The * represents the end of the protein translation. The conserved domain of Tg-GLOI is shaded. The bold underlined parts were two N-glycosylation binding sites, the bold italics parts were three protease C phosphorylation sites, and the double underlined bold parts were two protease II tyrosine phosphorylation sites

2.2 Tg-GLOI 蛋白的功能域、结构域与高级结构预测

Tg-GLOI 基因共编码 180 个氨基酸,推导出分子量为 20.8 kDa,理论等电点 $pI = 5.13$ 。预测结果表明无信号肽,TMHMM 软件预测显示无跨膜区域,蛋白质亚细胞定位为细胞质。

PHD 软件预测结果表明,Tg-GLOI 的氨基酸序列在 107 位(NQSY)和 174 位(NMTS)处各有 1 个 N-糖基化位点,在 60 位(SMK)、81 位(TEK)和 177 位(SIK)处各有 1 个蛋白酶 C 磷酸

化位点,在 7 位(SDED)和 102 位(TEND)各有 1 个酪氨酸蛋白酶 II 磷酸化位点,并在 29 ~ 50 aa 处具有乙二醛酶 I 酶系特征性序列(glyoxalase I signature 1)QTMLRIKDPKRSLEFYTKVMGM,这与 NCBI BLAST、Expasy Prosite 等软件预测结果一致。NCBI BLAST 和 Sanger 软件预测显示,在 27 ~ 169 aa 处具有乙二醛酶家族保守序列(glyoxalase/bleomycin resistance protein like superfamily)(图 2)。

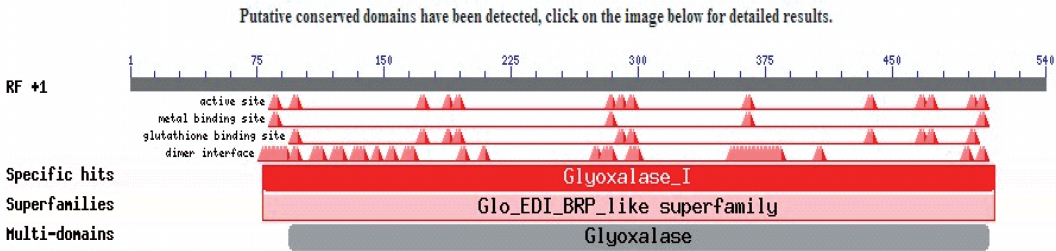


图 2 NCBI BLAST 软件预测的 Tg-GLOI 蛋白功能域

Fig.2 The prediction of protein functional domains of Tg-GLOI protein using the NCBI BLAST software

成熟的 Tg-GLOI 蛋白由 2 个相同的亚基组成,每个亚基由 *Tg-GLOI* 基因编码,其二级结构由 18 个 α -螺旋、20 个 β -折叠片和 36 个转角组成,每个亚基都包含 1 个 Zn^{2+} ,且 Zn^{2+} 结合部位都位于亚基之间的缝隙内(图 3)。

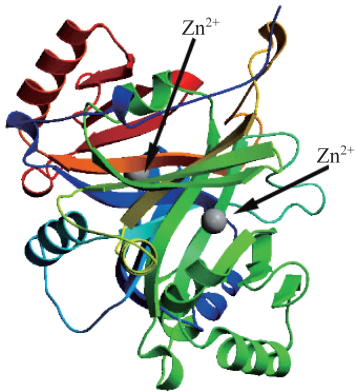


图 3 Tg-GLOI 蛋白的二级结构预测图

Fig.3 The prediction of Tg-GLOI protein secondary structure of *T. granosa*

2.3 Tg-GLOI 氨基酸序列同源性及系统进化树分析

氨基酸序列比对结果显示,Tg-GLOI 与同为双壳贝类的太平洋牡蛎的同源性达到 86.1%,与其他脊椎动物的同源性都在 70% 以上,表现出高度保守性(图 4)。从构建的系统进化树结果来看,哺乳动物首先聚为一支,然后再与爬行纲的中华鳖、鸟纲的鸡、两栖纲的非洲爪蟾、鱼纲的斑马鱼和大西洋鲑聚为一大支,代表了脊椎动物门这一大门类,而泥蚶首先与太平洋牡蛎聚为一支,然后再与脊椎动物这一大支聚在一起(图 5)。

2.4 Tg-GLOI 基因的时空表达特征分析

利用 qRT-PCR 技术,检测了 *Tg-GLOI* 基因在不同组织和不同发育时期的时空表达特征。结果发现,*Tg-GLOI* 基因在成贝 8 个组织中均有表达,表达量由高到低依次为,内脏团 > 斧足 > 外套膜 > 闭壳肌 > 血液 > 精巢 > 鳃 > 卵巢。其中,在内脏团中的表达量最高,极显著地高于其他组织 ($P < 0.01$),斧足、外套膜及闭壳肌组织之间表达量无显著性差异 ($P > 0.05$),但极显著高于血液、鳃、精巢和卵巢等组织 ($P < 0.01$)(图 6)。

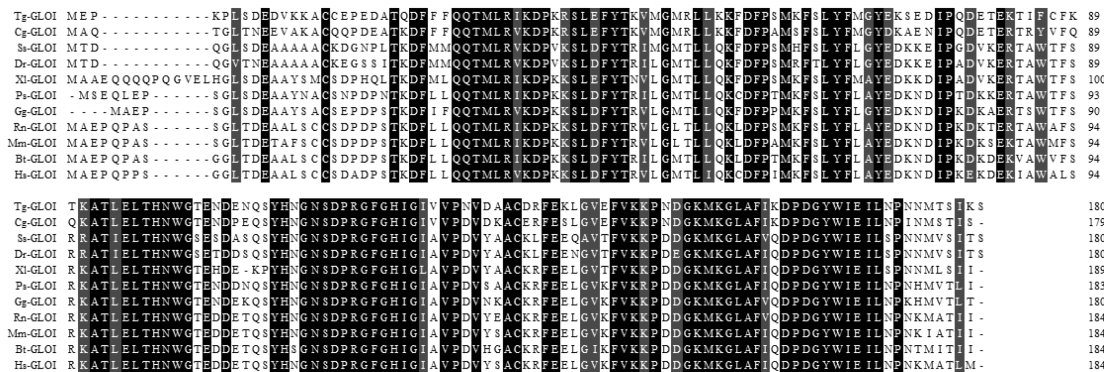


图 4 泥蚶与其他物种 GLOI 氨基酸序列比对

Tg 代表泥蚶,Cg 代表太平洋牡蛎,Ss 代表野猪,Dr 代表斑马鱼,Xl 代表非洲爪蟾,Ps 代表中华鳖,Gg 代表鸡,Rn 代表褐家鼠,Mm 代表小鼠,Bt 代表牛,Hs 代表人

Fig. 4 Amino acid sequence alignment of GLOI between *T. granosa* and other species

Tg represents *Tegillarca granosa*, Cg represents *Crassostrea gigas*, Ss represents *Sus scrofa*, Dr represents *Danio rerio*, Xl represents *Xenopus laevis*, Ps represents *Pelodiscus sinensis*, Gg represents *Gallus gallus*, Rn represents *Rattus norvegicus*, Mm represents *Mus musculus*, Bt represents *Bos Taurus*, and Hs represents *Homo sapiens*

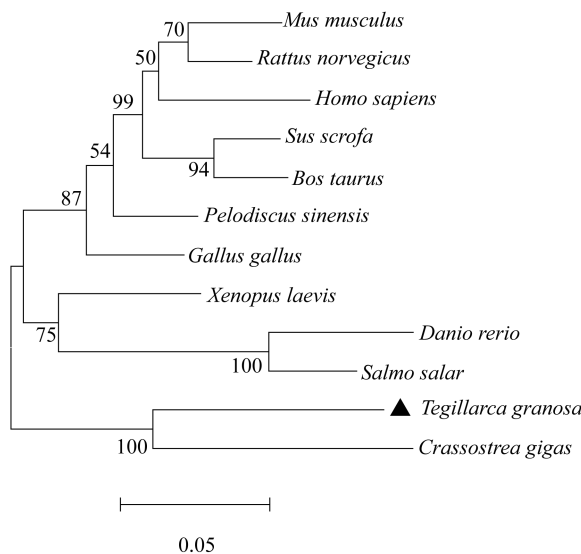


图 5 利用 MEGA4.0 软件 NJ 法构建的 GLOI 系统进化树

Fig. 5 Neighbor-Joining phylogenetic tree of GLOI amino acid sequences by MEGA4.0 software

Tg-GLOI 基因在 9 个发育时期都有表达,表达量随着泥蚶发育进程呈逐步升高的趋势,而在眼点幼虫期表达量达到最高,极显著地高于其他发育阶段($P < 0.01$),但在幼虫变态至稚贝时,表达量又极显著下降($P < 0.01$) (图 7)。

3 讨论

在高等动物中,对乙二醛酶 I 的基因结构、酶活性、功能及作用机理等研究已较透彻^[5-7,9],这

为该基因在低等无脊椎动物中的结构和功能研究提供了重要参考。在乙二醛酶 I 基因编码氨基酸数目方面,各种动物间差异不大,如在斑马鱼^[10]和大西洋鲑^[11]中编码 180 个氨基酸,在非洲爪蟾中编码 189 个氨基酸^[12],在低等软体动物的太平洋牡蛎中编码 179 个氨基酸^[8],而本研究克隆得到的泥蚶 *Tg-GLOI* 基因的 ORF 长度为 540 bp,编码 180 个氨基酸。在氨基酸序列同源性方面,泥蚶 *Tg-GLOI* 与同为双壳贝类的太平洋牡蛎的

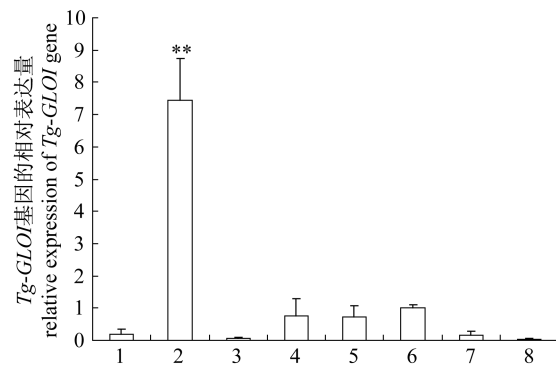


图 6 *Tg-GLOI* 基因在 8 个组织中的表达特征分析 ($n = 3$)

1. 血液; 2. 内脏团; 3. 鳃; 4. 外套膜; 5. 闭壳肌; 6. 斧足; 7. 精巢; 8. 卵巢; ** 代表极显著差异, $P < 0.01$, 下同

Fig. 6 Analysis of expression of *Tg-GLOI* gene in eight tissues of *T. granosa* ($n = 3$)

1. blood; 2. digestive gland; 3. gill; 4. mantle; 5. adductor muscle; 6. foot; 7. testis; 8. ovary; ** represents very significant differences, $P < 0.01$, the same as below

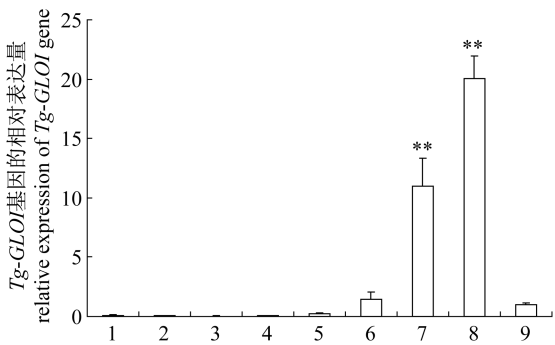


图 7 *Tg-GLOI* 基因在不同发育时期的表达特征分析 ($n > 500$)

1. 卵子; 2. 卵裂期; 3. 囊胚期; 4. 原肠胚期; 5. 担轮幼虫期; 6. D 形幼虫期; 7. 壳顶幼虫期; 8. 眼点幼虫期; 9. 稚贝期

Fig. 7 Analysis of expression of *Tg-GLOI* gene in different developmental stages

1. mature eggs; 2. 2 - 4 cells; 3. blastula; 4. gastrulae; 5. trochophore; 6. D-shaped larvae; 7. umbo larvae; 8. eyebot larvae; 9. juvenile clams

同源性最高(86.1%),与鱼纲中大西洋鲑的同源性达到 73.9%,而与其他脊椎动物的同源性也都在 70% 以上,这表明乙二醛酶 I 基因结构具有高度的保守性。在乙二醛酶 I 的分子结构研究方面,已有学者采用亲和层析^[13]、多重晶体置换(multiple isomorphous replacement, MIR)^[14]等方法证明人的乙二醛酶 I 是一种含 Zn^{2+} 的同源二聚体金属蛋白酶,每个亚基各含有 1 个 Zn^{2+} ,且 Zn^{2+} 为该酶的活性区域,位于 2 个亚基的交接处,与来自 2 个亚基的 4 个氨基酸残基 Gin-33、Glu-99、His-126、Glu-172 相互作用;本研究用 Swiss model 软件对泥蚶 *Tg-GLOI* 的高级结构进行了预测,发现其每个亚基各含有 1 个 Zn^{2+} ,且 Zn^{2+} 结合部位位于亚基之间的缝隙内,这与高等动物的分子结构基本相同,因为结构上的高度保守性,推测 *Tg-GLOI* 在泥蚶中可能发挥着类似于高等动物中的生物功能。

作为调节细胞糖代谢的关键酶之一,乙二醛酶 I 存在于机体所有组织细胞中,为机体提供了一个有效的酶保护机制^[15]。本研究利用 qRT-PCR 技术检测了 *Tg-GLOI* 基因在泥蚶不同组织和不同发育时期的时空表达特征,结果发现该基因在 8 个组织、9 个发育时期均有表达,这表明 *GLOI* 基因在泥蚶多个生命活动中发挥着重要功能。在组织表达差异性分析中,*Tg-GLOI* 基因在泥蚶内脏团中的表达量极显著地高于其他 7 个组

织($P < 0.01$)。在双壳贝类中,内脏团集高等动物肝脏、胰脏功能为一体,是机体发生糖代谢、脂代谢及氨基酸代谢最活跃的器官,也是机体主要的解毒及排泄器官^[16],因此,*GLOI* 基因在泥蚶内脏团中有较高表达量就不难理解了。

除了细胞解毒功能外,乙二醛酶 I 还可通过转变 α -酮基醛类化合物对蛋白质合成和细胞分裂的抑制,来参与细胞周期的调节^[3],实现调控细胞生长^[4]、细胞增殖等功能^[17]。Kurz 等^[4]发现通过抑制乙二醛酶 I 的活性,可抑制肿瘤细胞生长;隋龙等^[18]研究结果表明乙二醛酶 I 基因的过量表达可明显促进子宫内膜癌细胞系 Ishikawa 细胞增殖,并抑制其细胞凋亡,证明乙二醛酶 I 对调节细胞生长具有重要作用;郑秀琴等^[19]研究发现乙二醛酶 I 对神经元细胞的发育具有重要作用。本实验中,*Tg-GLOI* 基因在泥蚶整个早期发育变态进程中均有表达,表明其在维持胚胎正常生长、发育及稳定成熟的过程中发挥着十分重要的作用。在泥蚶发育变态进程中,*Tg-GLOI* 基因的表达量也呈上升趋势,在眼点幼虫期达到最高,在由幼虫期变态至稚贝时,表达量又显著下降并趋于稳定。泥蚶担轮幼虫前的胚胎发育主要依靠卵子自身营养来维持生长、代谢,不需要 *Tg-GLOI* 基因表达量太高;从 D 形幼虫开始内脏团(或肝胰脏)逐渐形成并进行摄食,糖代谢和生长比较旺盛,*Tg-GLOI* 基因表达量快速升高;壳顶幼虫至眼点幼虫期,内脏团、鳃、斧足、外套膜等组织器官迅速发育完善^[20],此期也是泥蚶神经元细胞发育的关键时期,因此推测 *Tg-GLOI* 基因的高表达量可能与内脏团等器官的发育和神经元细胞的形成密切相关;当泥蚶成功变态至稚贝期,器官、组织已基本形成,则 *Tg-GLOI* 基因的表达量就相对降低并趋于稳定。

参考文献:

[1] Thornalley P J. Glyoxalase I-structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation [J]. Biochemical Society Transactions, 2003, 31(6): 1343 - 1348.

[2] Richard J P. Kinetic parameters for the elimination reaction catalyzed by triosephosphate isomerase and an estimation of the reaction's physiological significance [J]. Biochemistry, 1991, 30(18): 4581 - 4585.

- [3] Szent-Györgyi A. Cell division and cancer [J]. Science, 1965, 149: 34 – 37.
- [4] Kurz A, Rabbani N, Walter M, *et al.* Alpha-synuclein deficiency leads to increased glyoxalase I expression and glycation stress [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010, 68(4): 721 – 733.
- [5] Thornalley P J. The glyoxalase system in health and disease [J]. Molecular Aspects of Medicine, 1993, 14(4): 287 – 371.
- [6] Kalousova M, Zima T, Tesar V, *et al.* Advanced glycoxidation end products in chronic diseases clinical chemistry and genetic background [J]. Mutation Research, 2005, 579(1–2): 37 – 46.
- [7] Fujimoto M, Uchida S, Watanuki T, *et al.* Reduced expression of glyoxalase-I mRNA in mood disorder patients [J]. Neuroscience Letters, 2008, 438(2): 196 – 199.
- [8] Zhang G, Fang X, Guo X, *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation [J]. Nature, 2012, 490(7418): 49 – 54.
- [9] Kim N S, Umezawa Y, Ohmura S, *et al.* Human glyoxalase I; cDNA cloning, expression and sequence similarity to glyoxalase I from *Pseudomonas putida* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(15): 11217 – 11221.
- [10] Hedge A, Qiu N C, Qiu X, *et al.* Genomewide expression analysis in zebrafish mind bomb alleles with pancreas defects of different severity identifies putative Notch responsive genes [J]. PLoS One, 2008, 3(1): e1479.
- [11] Andreassen R, Lunner S, Hoyheim B. Characterization of full-length sequenced cDNA inserts (FLICs) from Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. BMC Genomics, 2009, 10: 502.
- [12] Klein S L, Strausberg R L, Wagner L, *et al.* Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NIH *Xenopus* initiative [J]. Developmental Dynamics, 2002, 225(4): 384 – 391.
- [13] Aronsson A C, Marmstål E, Mannervik B. Glyoxalase I, a zinc metalloenzyme of mammals and yeast [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1978, 81(4): 1235 – 1240.
- [14] Cameron A D, Olin B, Ridderström M, *et al.* Crystal structure of human glyoxalase I-evidence for gene duplication and 3D domain swapping [J]. Embo Journal, 1997, 16(12): 3386 – 3395.
- [15] Zhu C Y, Li Z H, Wang F T. An update on progress in glyoxalase I inhibitor as an emerging class of anticancer agents [J]. Pharmaceutical and Clinical Research, 2011, 19(4): 337 – 342. [朱昶宇, 李宗河, 王昉彤. 乙二醛酶 I 抑制剂抗肿瘤研究进展. 药学与临床研究, 2011, 19(4): 337 – 342.]
- [16] Chen C F, Shen W L, Huo L H, *et al.* Effects of cadmium on the microstructure and ultrastructure of gill and hepatopancreas in *Tegillarca granosa* [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(4): 522 – 528. [陈彩芳, 沈伟良, 霍礼辉, 等. 重金属离子 Cd^{2+} 对泥蚶鳃及肝脏细胞显微和超微结构的影响. 水产学报, 2012, 36(4): 522 – 528.]
- [17] Gillespie E. Effects of S-lactoylg glutathione and inhibitors of glyoxalase I on histamine release from human leukocytes [J]. Nature, 1979, 277(5692): 135 – 137.
- [18] Sui L, Guo Q S, Zhang Z B, *et al.* Expression of glyoxalase I and its effect on cell proliferation and apoptosis in endometrial carcinoma [J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2010, 45(6): 429 – 433. [隋龙, 郭奇桑, 张箴波, 等. 乙二醛酶 I 在子宫内膜癌组织和细胞中的表达及其对细胞增殖和凋亡的影响. 中华妇产科杂志, 2010, 45(6): 429 – 433.]
- [19] Zheng X Q, Zhou H, Xie C M, *et al.* Methylglyoxal induces oxidative stress-dependent cell injury in cultured hippocampal neuronal cells [J]. Journal of Southeast University: Medical Sciences, 2008, 27(3): 212 – 216. [郑秀琴, 周红, 谢春明, 等. 甲基乙二醛诱导大鼠海马神经元氧化应激损伤的实验研究. 东南大学学报: 医学版, 2008, 27(3): 212 – 216.]
- [20] Wang R C, Wang Z P. Science of marine shellfish culture [M]. Qingdao: China Ocean University Press, 2008. [王如才, 王昭萍. 海水贝类养殖学. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2008.]

Cloning and spatiotemporal expression analysis of glyoxalase I gene in the mud clam (*Tegillarca granosa*)

YAO Hanhan, DONG Yinghui, YAO Binbin, BAO Yongbo, LIN Zhihua*

(Zhejiang Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resources, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China)

Abstract: Glyoxalase I (GLOI), an enzyme of the glyoxalase system, is involved in the cellular detoxication, and also plays an important role in the cell cycle and cellular growth. In order to explore the molecular structure and biological function of GLOI in molluscs, GLOI gene of *Tegillarca granosa* (Tg-GLOI) was cloned by SMART RACE techniques, and characteristics of its amino acid sequence and expression in different tissues and developmental stages were analyzed. The full length cDNA of Tg-GLOI was 1 807 bp, and its complete ORF (Open Reading Frame) was 540 bp encoding 180 amino acids. There was a conserved domain of glyoxalase family at the 27 – 169 aa in amino sequence of Tg-GLOI. Mature glyoxalase I of *T. granosa* contains two identical subunits, and each subunit was encoded by GLOI gene. The second structure of Tg-GLOI contains eighteen α -helices, twenty parallel β -sheets and thirty-six corners, each of the subunits comprising a Zn^{2+} , and the Zn^{2+} binding sites are located within the gap between subunits. Homologous analysis showed that the amino acid sequence of Tg-GLOI shared 86.1% similarity with *Crassostrea gigas*, and shared more than 70% similarity with those of vertebrates. The results of tissue-specific expression by real time PCR showed that Tg-GLOI gene was expressed in all tissues, and the expression of digestive gland was significantly higher than other tissues ($P < 0.01$). The results of relative expression in different development stages revealed that the expression of Tg-GLOI gene was gradually increased with the process of development, and showed the highest expression in the eyebot larvae stage, which was significantly higher than other stages ($P < 0.01$). And the expression decreased significantly from eyebot larvae stage to juvenile clams ($P < 0.01$) and then stabilized. The results showed that Tg-GLOI had the similar molecular structure as the higher species, and the relative expression revealed significant differences in different tissues and development stages, which laid the theoretical foundation for further study on function and mechanisms of GLOI in molluscs.

Key words: *Tegillarca granosa*; glyoxalase I; gene cloning; spatiotemporal expression; real time PCR

Corresponding author: LIN Zhihua. E-mail: zhihua9988@126.com