

刺参呼吸树抗氧化防御酶类基因在夏眠期的表达特征

王天明^{1,2}, 杨红生^{1*}, 苏琳^{1,2}

(1. 中国科学院海洋研究所, 海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 以夏眠刺参呼吸树为研究材料, 研究了刺参抗氧化防御酶类的基因表达特征, 共获得夏眠刺参的5个基因片段序列: 铜锌超氧化物歧化酶(Cu/Zn-SOD)、过氧化氢酶(CAT)、磷脂酰谷胱甘肽过氧化物酶(PHGPx)、过氧化物还原酶-5(PRDX5)及过氧化物还原酶-6(PRDX6), 完成基因序列初步分析; 利用荧光定量PCR技术, 以NDUFA13(NADH dehydrogenase [ubiquinone]1 alpha subcomplex subunit 13)和ACTB(beta actin)基因为多内参, 定量分析实验各阶段刺参抗氧化防御酶类基因表达量。结果表明, 刺参抗氧化酶类基因与近、远源物种同源性均较高; 现场调查实验结果显示, 相对5月非夏眠刺参样品, 8月夏眠刺参呼吸树组织Cu/Zn-SOD及PRDX5基因表达上调, CAT及PHGPx基因表达量均出现显著下降。温度诱导夏眠实验证实Cu/Zn-SOD基因在实验第0天表达量显著上升至2.01倍, 并一直保持较高水平; CAT基因表达在实验第0天下调, 第5天时出现上调, 而在第10天和40天表达量均出现显著下降; PHGPx基因表达实验期间均出现显著下调, 在第40天时降到最低, 为0.34倍; PRDX5基因表达在实验第0天出现显著上调至1.55倍, 第5天回落后呈现上升, 于第40天达到高值1.91倍; PRDX6基因表达在实验第10、20天出现显著下调。

关键词: 刺参; 夏眠; 抗氧化防御; 荧光定量PCR

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

夏眠是动物应对高温、干旱、食物匮乏等极端环境的一种生存策略, 广泛存在于脊椎动物及无脊椎动物中, 期间, 动物机体发生一系列调整以应对不利环境的影响^[1]。夏眠过程中, 动物保持一定的能量消耗, 其有氧代谢活动将产生氧自由基等对机体造成损伤的代谢产物, 同时, 夏眠动物机体遭受着外界环境因子的胁迫; 因此, 防御系统调整是夏眠动物成功应对夏眠期间各种胁迫的重要过程。抗氧化系统是防御系统的重要组成部分, 酶类抗氧化剂主要有超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD), 过氧化氢酶(catalase, CAT)及谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)等^[2]。

关于夏眠动物防御系统调整的研究已有报道, 其调控比较复杂。如在夏眠锄足蟾(*Scaphiopus couchii*)和蜗牛(*Otala lactea*)抗氧化防御研究中

发现, 夏眠肝脏组织中, 谷胱甘肽-S-转移酶(GST)和CAT等活性显著低于活动状态时的活性, 而SOD活性却显著高于活动状态时的活性, 而且肝脏组织的抗氧化酶类活性调整与其他各组织(心脏、肾、肌肉、肺和肠)的调整并不相同^[3]; 夏眠的胰腺和肌肉组织中, CAT、SOD、GPX和GST活性均比正常状态要高^[4]。

夏眠刺参(*Apostichopus japonicus*)抗氧化防御调控相关研究发现, 刺参夏眠期间抗氧化酶活性发生显著调整^[5]。本研究以前期454测序构建的刺参转录表达谱数据为基础, 筛选刺参抗氧化防御相关酶类基因, 分析基因序列特征, 采用荧光定量PCR方法检测夏眠刺参抗氧化防御酶类基因表达变化, 从转录水平研究刺参夏眠期间抗氧化防御酶类调控过程, 旨在为刺参夏眠调控的分子机理研究提供支持。

收稿日期: 2011-04-13 修回日期: 2011-06-08

资助项目: 国家“十一五”科技支撑计划(2006BAD09A02); 国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA10A411); 山东省良种工程项目

通讯作者: 杨红生, E-mail: hshyang@126.com

1 材料与amp;方法

1.1 实验动物及样品

现场调查样品采集 现场调查实验刺参取自山东日照前三岛,对照样品(正常生长刺参)于2009年5月采集,海水温度为15.23℃,夏眠样品于2009年8月采集,海水温度为25.42℃;每组各取5只刺参,体质量70~80g,根据消化道内容物及退化程度判定刺参状态(8月采集的刺参处于夏眠期)。采捕获得刺参进行现场解剖,分别取呼吸树组织存于冻存管,液氮保存,带回实验室研磨成粉末状,存入冻存管,-80℃保存备用。

诱导实验设计及样品采集 温度诱导夏眠实验用刺参为2龄刺参,体质量75~85g,总计80只,于2010年4月取自青岛胶南刺参养殖池(水温12.23℃),该池刺参养殖期间不投饵,摄食天然饵料。刺参从池中取出后放入塑料袋,低温储运至实验室,暂养驯化一周(15±0.5)℃。驯化后刺参随机分为对照组及实验组,对照组保持(15±0.5)℃,实验组温度从15℃水温以1.5℃/d升温速度经过一周后达到预定温度,之后保持(25±0.5)℃范围。实验期间,连续充气,每天换水1/2,用电加热棒控制水温,实验期间水温的日变化不超过0.5℃,盐度为32.53~34.61,pH值变动范围为7.76~7.89,每天按时定量投喂人工配合饲料(由马尾藻粉、鼠尾藻粉、海泥、细沙和海参配合饵料按等比例配合而成),定时换水和清理粪便及残饵,定期检查水温和刺参的情况。

自实验组水温升至预设温度时开始计时,分别于0,5,10,20,40d等5个时间点取样,每组随机取5只刺参,记录湿重,分别解剖取呼吸树组织置入液氮中,用陶瓷研钵磨成粉末,存入冻存管,-80℃保存备用。

1.2 RNA提取及cDNA模板合成

总RNA提取 刺参呼吸树样品采用TRIZOL法提取总RNA,操作如下:

取30mg已研磨样品粉末加入1.5mL离心管,加1mL TRIZOL试剂,震荡混匀组织样品,裂解组织。加入0.2mL氯仿,用力震荡15s,室温放置5min。12 000×g,4℃,离心15min。(离心后,混合物从上到下依次为无色的水相、中间相和淡红色的酚仿相, RNA存在于水相中)小心吸取300μL水相移至Eppendorf离心管中,加入等

体积异丙醇,混匀后-20℃放置15min。12 000×g,4℃,离心15min,沉淀RNA。去上清,加1mL 75%的乙醇洗涤RNA沉淀,12 000×g,4℃,离心10min,弃上清,重复洗涤一次。

将带有RNA沉淀的离心管置于干净处,干燥5~10min,加入30μL RNase-free水,4℃,放置30min,充分溶解RNA,获得总RNA样品。

用琼脂糖电泳检查RNA样品的完整性,以28S组分与18S组分的比率为参考,判断RNA样品降解程度;取少量RNA样品,稀释100倍使用Thermo Scientific NanoDrop 1000分光光度计检测计算总RNA样品浓度。

cDNA模板合成 使用Oligo dT及M-MLV反转录酶反转合成cDNA,具体操作如下: RNA 1~5μL(总量1 000ng),RQ1RNase-Free DNase 1μL,RNase-Free RNase inhibitor 0.5μL,5×M-MLV Buffer 2μL,RNase-Free water调整总体积至11.5μL,37℃温浴20min,之后在上述体系中加入Stop solution 1.0μL,65℃10min灭活DNase I;在以上体系中加入Oligo dT 2.0μL,70℃热变性5min,迅速冰浴2min;在已完成变性反应的以上体系中加入:5×M-MLV反应缓冲液3.0μL,无RNase dNTP(10mmol/L)1.25μL,M-MLV反转录酶(200U)1.0μL,RNase E抑制剂0.5μL,RNase-Free water调整总体积至25μL,轻微震荡混匀后低速离心。置入PCR仪42℃反转录1h,95℃、10min灭活反转录酶,取2μL溶液电泳检测其质量,将获得的优质cDNA溶液-20℃保存备用。

1.3 抗氧化防御相关基因筛选、功能分析及引物设计

根据刺参转录表达谱数据注释信息,筛选抗氧化防御相关酶类基因;采用NCBI网站中的Blast软件搜索序列相似性、比对同源性(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>);利用ExPASy Proteomics tools网站中的Translate软件翻译获得目标基因氨基酸序列,简单分析序列属性及正确性;应用ClustalW2程序(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)对多个物种抗氧化酶氨基酸序列进行多序列比对和同源性分析;完成所选基因生物信息学分析,确定序列信息可靠、功能信息明确的基因序列;利用在线引物设计软件Primer 3.0进行引物设计,设计退火温度(T_M)为

<http://www.scxuebao.cn>

60 °C,采用普通 PCR 产物分析、测序等方法确定产物单一性,梯度及阴性对照实时定量 PCR 法检测引物效率及二聚体生成情况。

1.4 Real-time PCR 基因表达定量及分析

SYBR Green RT PCR 实验 利用 Eppendorf 实时定量 PCR 仪和 SYBR green 试剂,对刺参样品进行抗氧化防御相关酶类基因表达量测定,使用筛选确定的 NDUFA13 (NADH dehydrogenase [ubiquinone]1 α subcomplex subunit 13) 和 ACTB (β -actin) 作为多内参进行标准化处理和分析(内参基因信息见表 1)。

SYBR Green RT PCR 反应体系:cDNA1.0

μ L,SYBR Green Master Mix 12.5 μ L Forward primer 0.8 μ L Reverse primer 0.8 μ L DEPC water 9.9 μ L。

反应条件:总体积 25.0 μ L,预变性 95 °C 5 s,40 个循环扩增 95 °C 10 s,60 °C 20 s,72 °C 30 s。结束反应后,溶解曲线分析产物单一性。

数据分析 采用 Eppendorf 荧光定量 PCR 仪自带软件(realplex software version 2.2)分析和收集数据,获取各基因扩增曲线的 C_t 值,采用几何平均数法处理多内参数据,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法处理^[6-7],实验组与对照组差异采用统计软件(PASW Statistics 18.00)进行单因素方差分析,显著性差异为 $P < 0.05$ 。

表 1 内参基因信息及引物

Tab. 1 The accession numbers and corresponding oligonucleotide primers of internal control genes

基因名称 gene name	注册号 GenBank accession no.	引物名称 primer name	引物序列 primer sequence	产物长度/bp primer length
NDUFA13	HQ292611	Fc1	GACATTCTGAAGCAACTGCAAC	170
		Rc1	AACATTGCCTCATCTGTTCCT	
ACTB	AB510191	Fc2	AAGGTTATGCTCTTCCTCACGCT	137
		Rc2	GATGTCACGGACGATTTACG	

2 结果

2.1 抗氧化防御酶基因及多序列同源性分析

抗氧化防御酶类基因信息及引物 刺参呼

吸树组织抗氧化防御酶类基因表达检测共筛选 5 个目的基因进行实时定量 PCR 检测;基因的 GenBank 注册号、用于荧光定量 PCR 的引物及其产物长度见表 2。

表 2 刺参抗氧化防御酶类基因及引物

Tab. 2 The accession numbers and corresponding oligonucleotide primers of antioxidant enzymes genes

基因名称 gene name	注册号 GenBank accession no.	引物名称 primer name	引物序列 primer sequence	产物长度/bp primer length
Cu/Zn-SOD	JF769856	F1	TACAAGAGGACTACACGGCTTTC	150
		R1	TCCACATTGCCTAGATCACCTAC	
CAT	JF769855	F2	TAACTACCAGAGAGACGGACCTG	135
		R2	ACATCACCGGAGTAGTGAATCTG	
PHGPx	JF769857	F3	GGATGTGTGTGTCTAGTGGTGAA	161
		R3	GAATTACTCCCAGGTTCTGACT	
PRDX5	JF769853	F4	TATTCACCTCTGGCTGCTCTAAG	191
		R4	TGTGAAGTCACAGCAGGTATCAG	
PRDX6	JF769854	F5	TCGAGTCTGGATTCTCTACAGC	154
		R5	TGGTACCTCCTAATGGTCACAC	

2.2 多序列同源性分析

刺参 Cu/Zn-SOD 氨基酸序列及同源性比对 筛选获得的刺参 Cu/Zn-SOD cDNA 片段长为 447 bp,位于开放阅读框区域(ORF),推导的氨基酸序列长为 149aa,与多个物种的 Cu/Zn-SOD 氨基酸序列比对结果显示,刺参 Cu/Zn-SOD 氨基酸序列与粉虱(*Bemisia tabaci*)的 ADO20320.1 相似性最高,为 71%;而与家鼠的 NP_058746.1 及柃孔扇贝(*Chlamys farreri*)的 ABD58974.1 相似性最低,

均为 66%(图 1)。

刺参 CAT 基因序列及同源性比对 筛选获得的刺参 CAT cDNA 片段长为 402 bp,位于开放阅读框区域,推导的氨基酸序列长为 134aa,与多个物种的 CAT 氨基酸序列比对结果显示,刺参 CAT 氨基酸序列与囊舌虫(*Saccoglossus kowalevskii*)的 XP_002738841.1 相似度最高,为 60%;与家鼠(*R. norvegicus*)的 NP_036652.1 相似度最低,为 46%(图 2)。

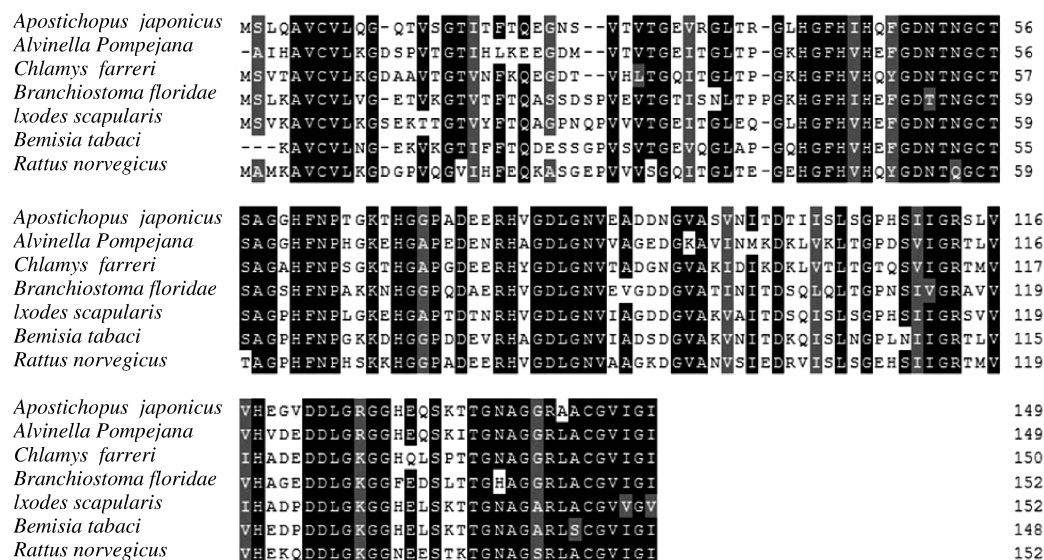


图1 刺参与其他多个物种的 Cu/Zn-SOD 氨基酸序列的多序列比对

相似性高于 80% 的氨基酸用深色背景白色字体标出,一致性的氨基酸用黑色背景和白色字体标出,近似氨基酸用灰色背景和白色字体标出。用来进行比对的序列包括:庞贝蠕虫 (*Alvinella pompejana*) 的 ABY50192.1,栉孔扇贝的 ABD58974.1,家鼠的 NP_058746.1,文昌鱼 (*Branchiostoma floridae*) 的 XP_002590336.1,肩突硬蜱 (*Ixodes scapularis*) 的 XP_002405905.1,粉虱的 ADO20320.1。

Fig.1 Multiple sequence alignment analysis of Cu/Zn-SOD partial sequences from *A. japonicus* and other species

Amino acid residues that are conserved in at least 80% sequences are shaded and similar amino acids are shaded in dark.

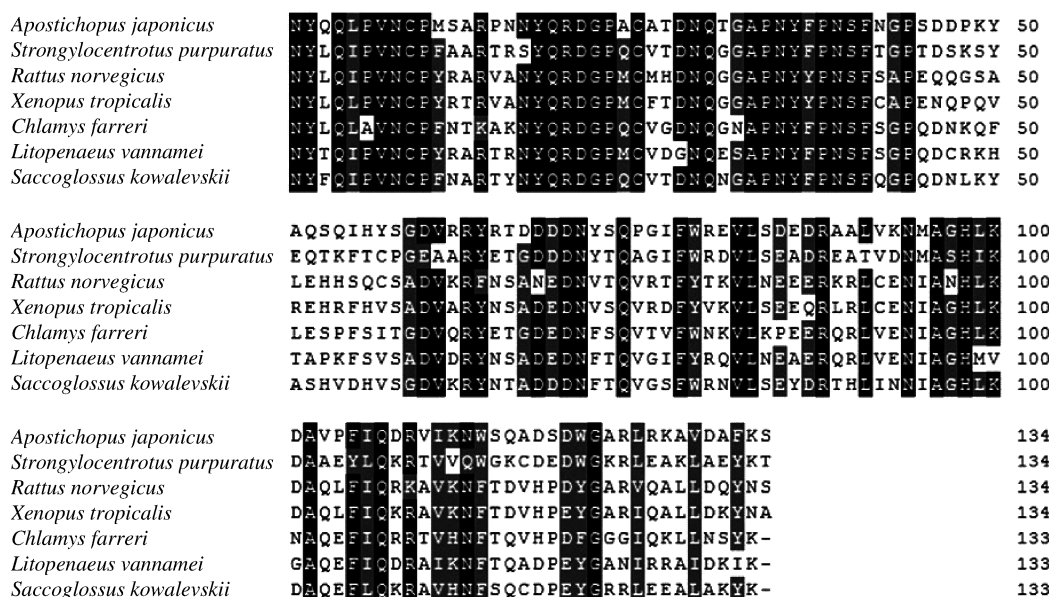


图2 刺参与其他多个物种的 CAT 氨基酸序列的多序列比对

相似性高于 80% 的氨基酸用深色背景白色字体标出,一致性的氨基酸用黑色背景和白色字体标出,近似氨基酸用灰色背景和白色字体标出。用来进行比对的序列包括:紫海胆 (*Strongylocentrotus purpuratus*) 的 XP_786217.2,栉孔扇贝的 ABI64115.1,家鼠的 NP_036652.1,凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的 AAR99908.1,非洲负子蟾 (*Xenopus tropicalis*) 的 NP_001072167.1,囊舌虫的 XP_002738841.1。

Fig.2 Multiple sequence alignment analysis of CAT partial sequences from *A. japonicus* and other species

Amino acid residues that are conserved in at least 80% sequences are shaded and similar amino acids are shaded in dark.

刺参 PHGPx 基因序列及同源性比对 筛选获得的刺参 PHGPx cDNA 片段长为 507 bp,位于开放阅读框区域,推导的氨基酸序列长为

169aa,与多个物种的 PHGPx 氨基酸序列比对结果显示,刺参 PHGPx 氨基酸序列与蜱虫 (*Rhipicephalus microplus*) 的 ABA62395.1 相似度

最高,为62%;与斑马鱼(*Danio rerio*)的ACF72883.1相似性最低,为56%(图3)。

刺参PRDX5基因序列及同源性比对筛选获得的刺参PRDX5 cDNA片段长为402 bp,位于开放阅读框区域,推导的氨基酸序列长为

134aa,与多个物种的PRDX5氨基酸序列比对结果显示,刺参PRDX5氨基酸序列与文昌鱼的XP_002613574.1相似性最高,为70%;与丝盘虫(*Trichoplax adhaerens*)的XP_002108078.1相似性最低,为57%(图4)。

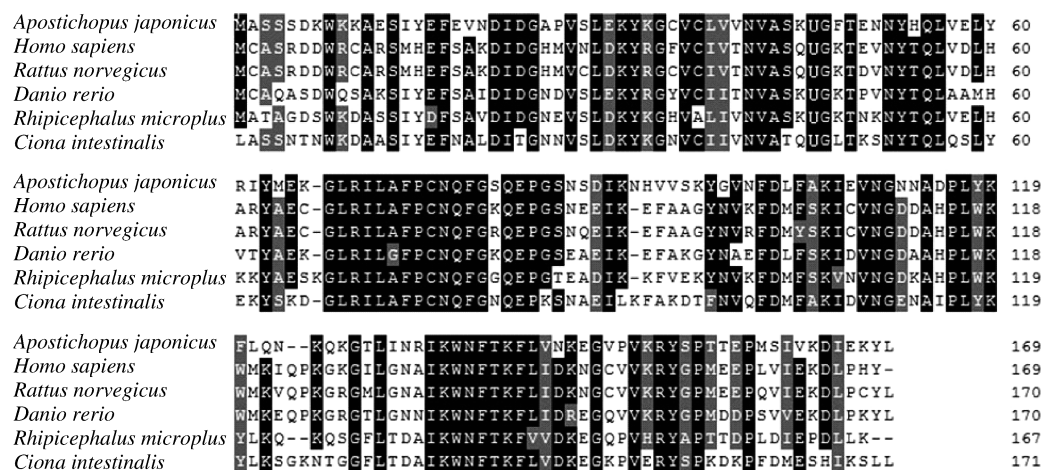


图3 刺参与其他多个物种的PHGPx氨基酸序列的多序列比对

相似性高于80%的氨基酸用深色背景白色字体标出,一致性的氨基酸用黑色背景和白色字体标出,近似氨基酸用灰色背景和白色字体标出。用来进行比对的序列包括:蜚虫的ABA62395.1,玻璃海鞘(*Ciona intestinalis*)的NP_001177287.1,斑马鱼的ACF72883.1,人(*Homo sapiens*)的NP_002076.2,家鼠AAC52503.2。

Fig. 3 Multiple sequence alignment analysis of PHGPx partial sequences from *A. japonicus* and other species

Amino acid residues that are conserved in at least 80% sequences are shaded and similar amino acids are shaded in dark.

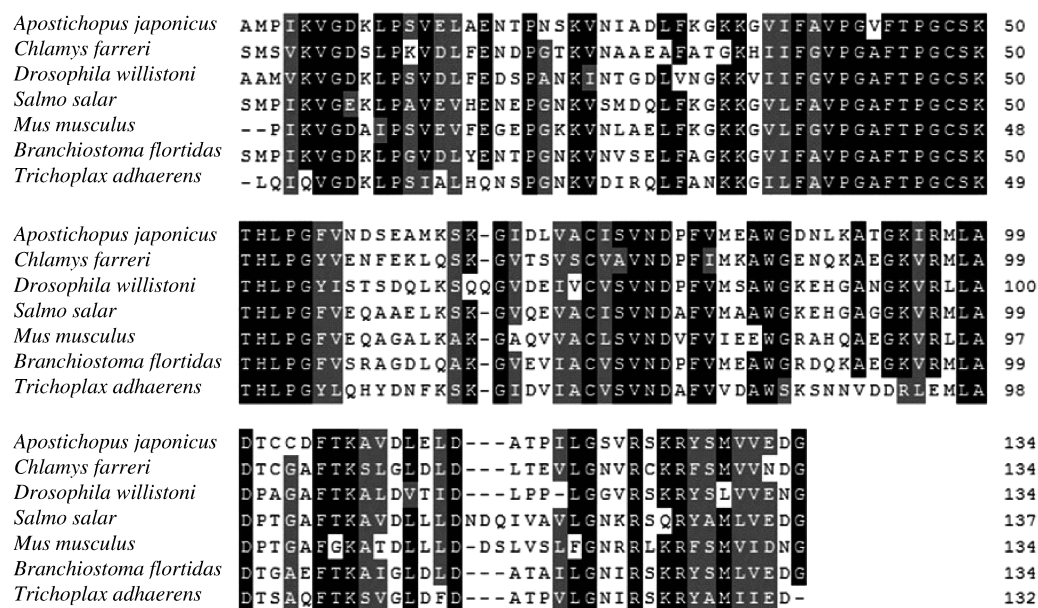


图4 刺参与其他多个物种的PRDX5氨基酸序列的多序列比对

相似性高于80%的氨基酸用深色背景白色字体标出,一致性的氨基酸用黑色背景和白色字体标出,近似氨基酸用灰色背景和白色字体标出。用来进行比对的序列包括:文昌鱼的XP_002613574.1,栉孔扇贝的ABR27748.1,大西洋鲑(*Salmo salar*)的ACI66176.1,丝盘虫的XP_002108078.1,果蝇(*Drosophila willistoni*)的XP_002070031.1,小鼠(*Mus musculus*)的AAF27532.1。

Fig. 4 Multiple sequence alignment analysis of PRDX5 partial sequences from *A. japonicus* and other species

Amino acid residues that are conserved in at least 80% sequences are shaded and similar amino acids are shaded in dark.

刺参 PRDX6 基因序列及同源性比对 筛选获得的刺参 PRDX6 cDNA 片段长为 477 bp,位于开放阅读框区域,推导的氨基酸序列长为 159aa,与多个物种的 PRDX6 氨基酸序列比对结果显示:刺参 PRDX6 氨基酸序列与囊舌虫的 XP_

002733706.1 相似度最高,为 76%;与人 (*H. sapiens*) 的 NP_004896.1,家鼠的 NP_036652.1 及非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 的 NP_001084316.1 相似度最低,均为 66% (图 5)。

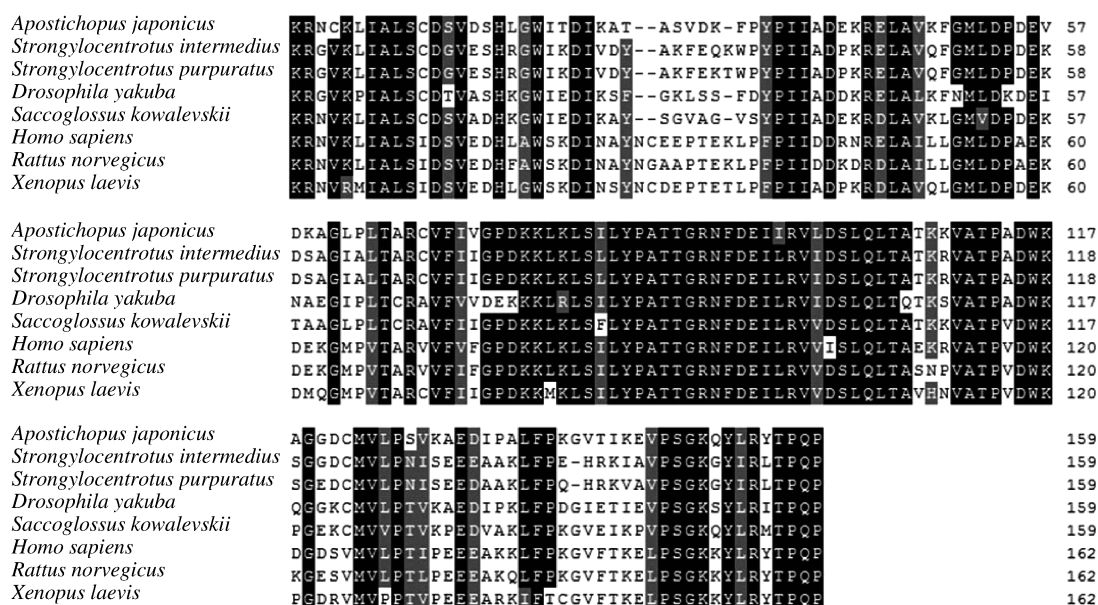


图 5 刺参与其他多个物种的 PRDX6 氨基酸序列的多序列比对

相似性高于 80% 的氨基酸用深色背景白色字体标出,一致性的氨基酸用黑色背景和白色字体标出,近似氨基酸用灰色背景和白色字体标出。用来进行比对的序列包括:囊舌虫的 XP_002733706.1, 虾夷马粪海胆 (*Strongylocentrotus intermedius*) 的 ADK11694.1, 果蝇的 XP_002087749.1, 紫海胆的 XP_784500.2, 人的 NP_004896.1, 非洲爪蟾的 NP_001084316.1, 家鼠的 NP_036652.1。

Fig. 5 Multiple sequence alignment analysis of PRDX6 partial sequences from *A. japonicus* and other species

Amino acid residues that are conserved in at least 80% sequences are shaded and similar amino acids are shaded in dark.

2.3 现场调查刺参夏眠期间呼吸树组织抗氧化防御酶基因表达

定量分析现场采捕的正常生长刺参及夏眠刺参呼吸树组织抗氧化防御酶基因表达结果显示,与正常生长刺参样品相比,夏眠刺参呼吸树组织中 Cu/Zn-SOD 及 PRDX5 基因表达上调, CAT 及 PHGPx 基因表达量均出现显著下降, PRDX6 基因表达量基本没有变化 (图 6)。

2.4 温度诱导夏眠期间刺参湿重变化及呼吸树组织抗氧化防御酶类基因表达

25 °C 诱导刺参夏眠实验期间, 0、5、10、20 及 40 d 取样统计分析结果表明, 实验组刺参湿重在第 10 天显著低于对照组, 20 d 之后与对照组差异极显著 (图 7)。

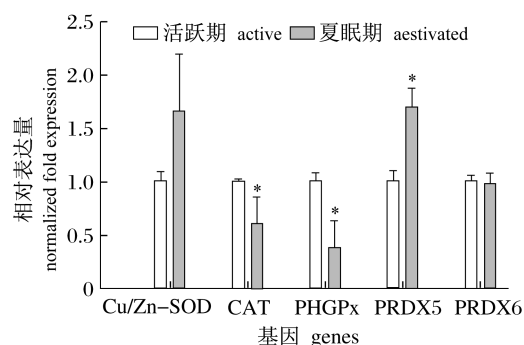


图 6 现场取样刺参夏眠期间呼吸树组织抗氧化防御酶类基因表达变化

Fig. 6 Expression of Cu/Zn-SOD, CAT, PHGPx, PRDX5 and PRDX6 genes in two phases of *A. japonicus*: active in ordinary (control) and inactive in aestivation (aestivated) “*” indicates significant differences ($P < 0.05$) among mRNA levels within genes. Values indicate the mean \pm SD ($n = 5$).

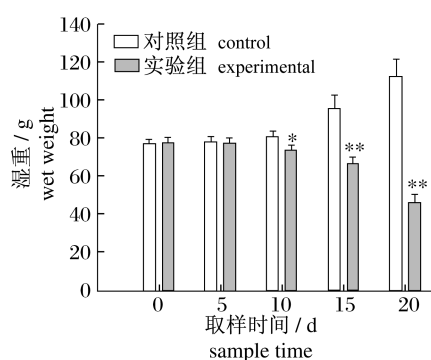


图7 温度诱导夏眠实验期间刺参湿重变化
Fig.7 Variation of the sea cucumbers' body weights during experiment

* indicates significant differences ($P < 0.05$) and ** indicates extremely significant differences ($P < 0.001$) between control and experimental groups. Values indicate the mean \pm SD ($n=5$).

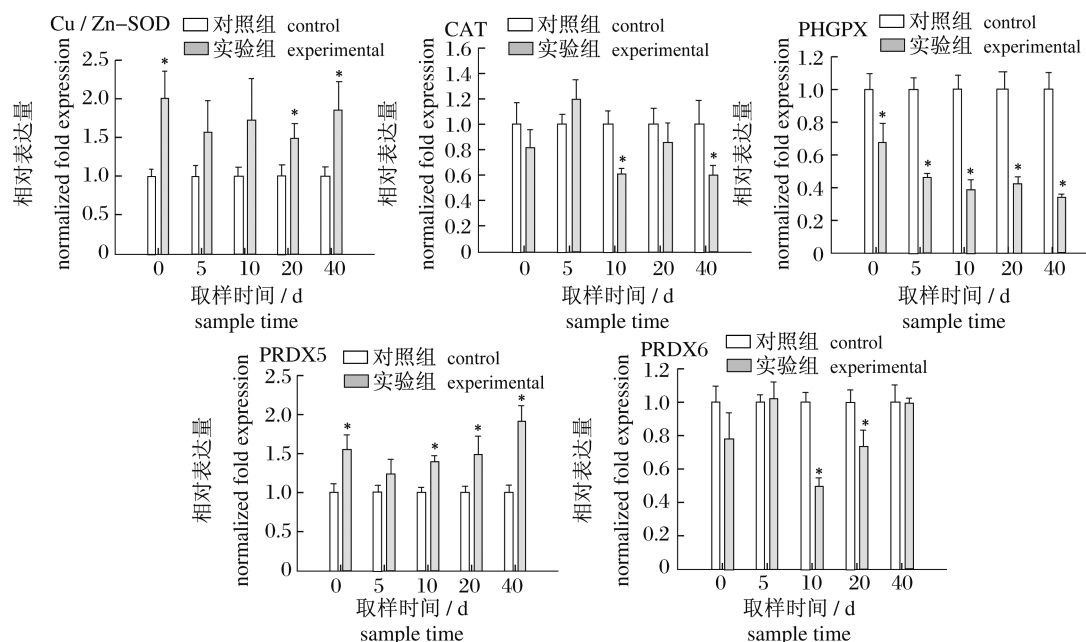


图8 温度诱导刺参夏眠期间呼吸树组织抗氧化防御酶类基因表达变化

Fig.8 Expression of Cu/Zn-SOD, CAT, PHGPx, PRDX5 and PRDX6 genes in thermal induced aestivation of *A. japonicus*; 15 °C cultured (control) and 25 °C thermal stressed (experimental)

* indicates significant differences ($P < 0.05$) among mRNA levels within genes. Values indicate the mean \pm SD ($n=5$).

3 讨论

需氧生物在氧化还原循环及各种酶促反应、电子传递等过程中产生大量的超氧阴离子自由基 (O_2^-)、羟自由基 ($\cdot OH$)、过氧化氢 (H_2O_2) 等活性氧,形成自由基,进而损伤各类生物大分子,引起生物体各种生理病变;同时,机体通过抗氧化防御系统及时去除机体自由基,以维持生物正常生命活动^[8]。

温度诱导夏眠实验期间,刺参呼吸树组织抗氧化防御酶基因 Cu/Zn-SOD, CAT, PHGPx, PRDX5 和 PRDX6 表达量检测结果显示, Cu/Zn-SOD 基因在诱导夏眠实验第 0 天表达量显著上升至 2.01 倍,并在实验过程中一直保持较高水平;CAT 基因表达在诱导夏眠实验期间,第 0 天下调,第 5 天时出现上调,而在第 10 天和 40 天表达量均出现显著下降;PHGPx 基因表达在整个诱导实验期间均出现显著下调,在 40 天时降到最低,为 0.34 倍;PRDX5 基因表达在诱导实验第 0 天出现显著上调至 1.55 倍,第 5 天回落后呈现上升,于第 40 天达到高值 1.91 倍;PRDX6 基因表达在诱导实验第 10、20 天出现显著下调(图 8)。

动物夏眠期间受环境因子胁迫及自身代谢调整等影响,抗氧化防御系统相应发生调整,目前主要通过抗氧化防御酶类(SOD、CAT 和 GPX 等)活性检测对其调控进行分析,研究认为,不同抗氧化酶调控不一致,同种抗氧化酶在不同动物机体中调控并不相同,并且具有组织差异。如锄足蟾夏眠期间肝脏 GST 和 CAT 等活性显著低于活动状态,而 SOD 活性呈现相反调整^[3];与之不同,夏眠蜗牛的肝胰腺和肌肉组织中,GST 和 CAT 活性

均比正常状态要高^[4],夏眠 *Helix pomatia* 肝胰腺组织中,GST 活性出现上调^[9]。

目前关于刺参夏眠期间抗氧化防御调控机理的研究主要采用室内温度胁迫及现场调查等实验手段,通过抗氧化防御酶活性检测等方式进行。WANG 等^[5,10]采用急性温度刺激及现场调查实验对刺参抗氧化防御调控机理进行了较为系统的研究。急性温度刺激对刺参抗氧化防御酶类活性影响研究中发现,24 ℃ 温度条件下,刺参体腔液中 SOD 和 CAT 活性均在短时间内(0.5 h)出现显著下降,之后快速恢复至正常水平;32 ℃ 温度条件下,刺参体腔液中 SOD 和 CAT 活性均在短时间(0.5 h)出现显著下降,而较长时间时(3 ~ 12 h)出现显著上升(12 h 后刺参出现大量死亡)^[10]。在夏眠刺参体腔液细胞抗氧化防御酶活性调查发现,SOD 和 CAT 活性在夏眠期间出现上升,在夏眠恢复期间出现下降后回升;而谷胱甘肽还原酶(GR)活性及谷胱甘肽(GSH)在进入夏眠期间出现下降,在夏眠恢复期间回升至较高水平;硒-谷胱甘肽过氧化物酶(Se-GPx)活性除了在七月下旬检测到一峰值,整个夏季温度较高时期均保持较低水平,而总谷胱甘肽过氧化物酶无显著变化;WANG 等^[5]认为刺参抗氧化防御在夏眠期间发生调整,是刺参对夏季高温环境胁迫的自适应调控机制。JI 等^[11]通过恒定高温(26 ℃)及缓慢升温方式(16 ℃ 升至 26 ℃)对刺参高温环境下及夏眠期呼吸树、消化道等组织 CAT 和 SOD 活性进行了分析检测,认为刺参在进入夏眠过程中 CAT、SOD 活性均出现上升,但之后回落至较低水平。

本研究从转录水平对刺参夏眠期间呼吸树抗氧化防御酶类进行了基因表达分析。筛选获得刺参抗氧化酶类基因片段 5 个,分别与多个近、远源物种相应序列比对,结果显示同源性均较高,可初步确定所筛选的基因功能。Cu/Zn-SOD 是一类广泛存在于真核细胞胞质中的 SOD,它将超氧阴离子自由基快速歧化为过氧化氢和分子氧^[12];PHGPx 是一种 GPx,PRDX5 和 PRDX6 同属 Prx,GPx、Prx 及 CAT 的主要功能是催化过氧化氢形成水和分子氧^[13-14]。因此,研究所选基因片段属于刺参催化自由基转化为水和分子氧的关键酶类基因,其定量研究可反应相应酶基因表达情况。研究结果表明,夏眠刺参呼吸树组织中 Cu/Zn-

SOD 及 PRDX5 基因表达加强,而 CAT 及 PHGPx 基因表达受到抑制。该结果与夏眠动物各酶活调控情况存在异同:Cu/Zn-SOD 基因表达出现上升,与夏眠锄足蟾肝脏组织及夏眠刺参体腔液、呼吸树和消化道组织中酶活变化趋势一致^[3,5];CAT 基因表达下降,与夏眠锄足蟾肝脏组织中酶活变化趋势一致,而与夏眠蜗牛的肝胰腺和肌肉组织及夏眠刺参体腔液、呼吸树、消化道等组织中酶活变化趋势不同^[3-5];PHGPx 基因表达下降,与夏眠刺参体腔液 Se-GPx 酶活变化基本趋势一致^[5]。

综上所述,刺参夏眠期间抗氧化防御酶类基因表达调控明显,各基因表达调控差异较大,且与夏眠动物抗氧化酶类活性调控研究结果存在异同,其调控机理及与酶活变化之间的联系有待进一步研究和分析。今后工作可从分子水平深入开展夏眠刺参抗氧化防御酶类调控研究,结合生理生化水平的研究,将更加全面地阐明夏眠刺参抗氧化防御调控机理。

参考文献:

- [1] STOREY K B. Life in the slow lane: molecular mechanisms of estivation [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, 2002, 133(3): 733-754.
- [2] 张克烽,张子平,陈芸,等. 动物抗氧化系统中主要抗氧化酶基因的研究进展[J]. *动物学杂志*, 2007, 42(2): 153-160.
- [3] GRUNDY J E, STOREY K B. Antioxidant defenses and lipid peroxidation damage in estivating toads, *Scaphiopus couchii* [J]. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, 1998, 168(2): 132-142.
- [4] HERMES-LIMA M, STOREY K B. Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail [J]. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 1995, 37(6): R1386-R1393.
- [5] WANG F Y, YANG H S, WANG X Y, et al. Antioxidant enzymes in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) during aestivation [J]. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2011, 91(1): 209-214.
- [6] VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of

- multiple internal control genes[J]. *Genome Biology*, 2002,3(7):34.
- [7] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. *Methods*, 2001,25(4):402-408.
- [8] SIES H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants [J]. *Experimental Physiology*, 1997, 82 (2): 291-295.
- [9] NOWAKOWSKA A, CAPUTA M, ROGALSKA J. Natural aestivation and antioxidant defence in *Helix pomatia*: effect of acclimation to various external conditions[J]. *Journal of Molluscan Studies*, 2010, 76(4):354-359.
- [10] WANG F Y, YANG H S, GAO F, *et al.* Effects of acute temperature or salinity stress on the immune response in sea cucumber, *Apostichopus japonicus* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, 2008, 151(4): 491-498.
- [11] JI T T, DONG Y W, DONG S L. Growth and physiological responses in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka: Aestivation and temperature[J]. *Aquaculture*, 2008, 283(1-4): 180-187.
- [12] TAINER J A, GETZOFF E D, RICHARDSON J S, *et al.* Structure and mechanism of copper, zinc superoxide-dismutase[J]. *Nature*, 1983, 306(5940): 284-287.
- [13] LIM Y S, CHA M K, UHM T B, *et al.* Removals of hydrogen-peroxide and hydroxyl radical by thiol-specific antioxidant protein as a possible role *In vivo* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1993, 192(1):273-280.
- [14] MICHIELS C, RAES M, TOUSSAINT O, *et al.* Importance of Se-Glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell-survival against oxidative stress[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1994, 17(3):235-248.

欢迎订阅 2012 年《水产学报》

《水产学报》是由中国科协主管、中国水产学会主办、上海海洋大学承办、科学出版社出版的以反映我国水产科学技术成果为主的学术类核心期刊(中国科学引文数据库 CSD 核心库和中信所核心库),1964 年创刊,是中国水产科学研究领域历史最为悠久的刊物之一。2002-2009 年连续荣获“百种中国杰出科技期刊”称号,2009-2011 年获得中国科协“精品科技期刊示范项目(B 类)”资助。

本刊主要刊载水产基础研究、水产养殖和增殖、水产品病害防治、渔业水域环境保护、渔业资源与管理、水产品保鲜加工与综合利用等方面的研究论文、研究简报和综述。

本刊为月刊,大 16 开,每期 160 页,每期订价 49.00 元,全年订价 588.00 元。国内统一刊号:CN 31-1283/S,国际标准刊号:ISSN 1000-0615,国内邮发代号:4-297,国外发行代号:M-387。读者可在当地邮局办理订阅,破季、漏订或补订可直接与杂志社联系。个人订户可享受 6 折优惠。

杂志社地址:上海市临港新城沪城环路 999 号 201 信箱(邮编:201306)

联系人:张美琼

联系电话与传真:021-61900227

E-mail: mqzhang@shou.edu.cn; jfc@shou.edu.cn

Website: www.scxuebao.cn; www.scxuebao.com

Transcriptional regulation of antioxidant enzymes in respiratory tree of sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) during aestivation

WANG Tian-ming^{1,2}, YANG Hong-sheng^{1*}, SU Lin^{1,2}

(1. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Graduate University, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Aestivation is a kind of dormancy that is probably defined as a survival strategy for dealing with arid conditions, food shortage and high environmental temperature. As an adaptation for life in stressful environments, multiple adjustments occurred in aestivated organism including the regulation of defense system. Antioxidant enzymes are regulated in aestivating animals usually. To evaluate the transcriptional regulations associated with antioxidant defense in sea cucumber during aestivation, gene expression of antioxidant enzymes in respiratory tree was analyzed in this study. Five partial sequences of antioxidant enzyme genes were obtained from *Apostichopus japonicus* transcriptome database: Cu/Zn-SOD (copper-zinc superoxide dismutase), CAT (catalase), PHGPx (Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase), PRDX5 (Peroxiredoxin-5) and PRDX6 (Peroxiredoxin-6). The multiple sequence alignment (MSA) was conducted and special primers were designed for Real-time PCR assay. These genes expressions were normalized by multiple internal control genes of NDUFA13 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13) and ACTB (beta actin), and their variations during aestivation of *A. japonicus* were analyzed. Compared with the active sea cucumbers (sampled in May), the antioxidant enzymes got transcriptional change in respiratory tree of aestivated sea cucumbers (sampled in Aug); the expression of Cu/Zn-SOD genes got increase to 1.66 fold ($P > 0.05$); the expression of PRDX5 genes got significant increase to 1.69 fold ($P < 0.05$); the expression of CAT and PHGPx got significant decrease to 0.60 and 0.38 fold respectively ($P < 0.05$); no notable expression variation of PRDX6 was found. It was mainly consistent with the variation of these genes expressions in later phase of thermal induced aestivation of *A. japonicus* (aestivated sea cucumbers sampled on 40 d); the expressions of Cu/Zn-SOD and PRDX5 genes got significant increase to 1.85 and 1.91 fold respectively ($P < 0.05$); the expressions of CAT and PHGPx genes got significant decrease to 0.60 and 0.34 fold respectively ($P < 0.05$); no notable expression variation of PRDX6 was found. The result indicated that the gene expressions of different antioxidant enzymes were regulated differently during aestivation of sea cucumber.

Key words: *Apostichopus japonicus* (Selenka); aestivation; antioxidant defense; real-time PCR

Corresponding author: YANG Hong-sheng. E-mail: hshyang@126.com