第 39 卷第 2 期
2015 年 2 月

水 产 学 报
JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA

Vol. 39, No. 2
Feb., 2015

文章编号:1000 - 0615(2015)02 - 0161 - 13　　DOI:10.3724/SP.J.1231.2015.59459

拟穴青蟹 *PHGPx* 基因的克隆及其表达分析

刘春云[1], 傅明骏[2], 张子平[1], 邹志华[1], 贾锡伟[1], 王艺磊[1*]

(1. 集美大学水产学院,农业部东海海水健康养殖重点实验室,福建 厦门 361021;
2. 中国水产科学研究院南海水产研究所,广东 广州 510300)

摘要: 为了探讨磷脂氢谷胱甘肽过氧化物酶(phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, PHGPx)在拟穴青蟹免疫防御反应和精巢发育中的作用,实验从拟穴青蟹转录组数据库中筛选出 *PHGPx* 基因的 EST 序列,利用 SMART-RACE 技术克隆得到该基因的全长 cDNA,命名为 *Sp-PHGPx*。通过相关生物信息学软件对该序列进行分析,运用实时荧光定量技术对 *Sp-PHGPx* mRNA 在成熟雌雄拟穴青蟹各组织、性腺不同发育时期以及 H_2O_2 和脂多糖(LPS)应激下鳃和肝胰腺组织中的表达情况进行分析。结果发现,*Sp-PHGPx* 基因的 cDNA 全长为 1 024 bp,编码 180 个氨基酸。同源性分析和系统进化树分析表明,Sp-PHGPx 与其他物种的 PHGPx(GPx4)亲缘关系较近。实时定量 PCR 结果显示,*Sp-PHGPx* 在成熟拟穴青蟹雌雄各组织中均有不同程度的表达,其中精巢的表达量最高。在性腺不同发育阶段,*Sp-PHGPx* 在卵巢发育过程中的表达量差异不显著;而在精巢发育过程中,其表达量在精子细胞期(T2 期)显著高于精母细胞期(T1 期)和成熟精子期(T3 期),同时也显著高于卵巢发育各时期的表达量。在 LPS 应激下,鳃和肝胰腺中 *Sp-PHGPx* 的表达量分别在 6 和 12 h 显著上调;H_2O_2 应激下,鳃中的表达量在 3 h 显著升高,肝胰腺中的表达量在被检测的各时相中无显著差异。研究表明,Sp-PHGPx 可能在免疫防御反应以及精巢的发育和成熟等过程中发挥着重要作用。

关键词: 拟穴青蟹; 磷脂氢谷胱甘肽过氧化物酶(PHGPx); 基因克隆; 表达; 性腺发育

中图分类号: Q 785; S 968.2　　**文献标志码**:A

谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)是一种重要的体内过氧化物分解酶,能以谷胱甘肽(GSH)或硫氧还蛋白(Trx)为电子供体,催化还原过氧化氢(H_2O_2)和有机氢过氧化物等活性分子为水和相应的醇类[1-3]。在哺乳动物中,目前已发现 8 种 GPx,根据其催化位点是硒代半胱氨酸(Sec)还是半胱氨酸(Cys),可分为硒依赖性 GPx(GPx1-4 和人类的 GPx6)和硒非依赖性 GPx(GPx5-8,人类 GPx6 除外)。同时根据其一级结构,组织分布和结合底物的特异性等又可分为典型的 GPx(GPx1)、肠胃型 GPx(GPx2)、血浆型 GPx(GPx3)、磷脂型 GPx(PHGPx/GPx4)、附睾型 GPx(GPx5)和嗅觉型 GPx(GPx6);而 GPx7 和 GPx8 由于是新近发现的,其功能和分布尚不明确[4-6]。

磷脂氢谷胱甘肽过氧化物酶(PHGPx/GPx4)是 GPx 家族中独特且重要的成员之一。1982 年 Ursini 等[7]首次从猪的肝脏中发现该酶,与其他 GPx 家族成员相比,PHGPx 并不是通常的四聚体结构,而是单体结构。它能特异地还原磷脂氢过氧化物,从而保护卵磷脂脂质体和生物膜免受氧化损伤。随后该酶在猪的心脏和脑,老鼠的精巢和肝脏以及人的胎盘等组织中也被成功分离纯化[8]。PHGPx 被认为是一种硒酶,含有硒代半胱氨酸,位于活性位点。通过对小鼠 *PHGPx* 基因 cDNA 的克隆[8],在该序列中发现由终止密码子"TGA"编码的硒代半胱氨酸,且位于活性位点,随后该基因相继在山羊(*Capra hircus*)[9]、鲤

收稿日期:2014-09-04　　**修回日期**:2014-10-17

资助项目:国家自然科学基金(31072200,31472266);集美大学创新团队基金(2010A001)

通信作者:王艺磊,E-mail:ylwang@jmu.edu.cn

(*Cyprinus carpio*)[10]、果蝇(*Drosophila melanogaster*)[11]、微小牛蜱(*Boophilus microplus*)[12]和盐芥(*Thellungiella halophile*)[13]等中被成功克隆和分析。

研究表明,PHGPx 广泛分布于生物体的各组织中,且在不同组织中的表达情况差异较大,可能与其发挥的不同功能相关。Lei 等[14]的研究发现,在大鼠的睾丸内,PHGPx 的活性最高,显著高于肝脏和心脏等组织。Shi 等[15]发现,山羊 PHGPx 在精巢中表达量最高,其次是心脏和脑。Garolla 等[16]发现男性不育与精子中 PHGPx 的表达水平有关。Schweizer 等[17]研究发现,PHGPx 特异地表达于脑中的神经细胞。Huang 等[18]在硒化钠培养的兔大动脉平滑肌细胞中发现,大量表达的 PHGPx 可抑制由亚油酸过氧化导致的细胞凋亡。以上研究结果显示,PHGPx 可能在精巢的发育、神经系统的发育和细胞凋亡等过程中发挥一定的作用。

目前关于 PHGPx 的研究主要集中在脊椎动物(如哺乳动物)中,而在无脊椎动物,尤其是甲壳动物中的研究相对较少。甲壳动物中现已被报道的 SeGPxs 有:凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)[19]、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)[20]、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)[21]、斑节对虾(*Penaeus monodon*)[22]、刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)[23]和拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)[24]等,而关于 PHGPx 的研究仅发现在丰年虫(*Artemia franciscana*)和海水鱼虱(*Lepeophtheirus salmonis*)中。同时,关于甲壳动物中 GPx 家族的分类和系统分析仍不完善。拟穴青蟹隶属于节肢动物门(Arthropoda)甲壳纲(Crustacea),是我国东南沿海重要的经济养殖蟹类[25-26]。有关拟穴青蟹 PHGPx 在免疫防御反应和性腺发育中的研究尚未有报道。

本实验根据已有的拟穴青蟹转录组数据库,筛选出 *PHGPx* 基因的 EST 序列,通过 SMART-RACE 等分子生物学方法首次克隆获得该基因的 cDNA 全长,并利用生物信息学的方法对其结构和功能进行预测分析,命名为 *Sp-PHGPx*。同时,对其在拟穴青蟹雌雄各组织、性腺不同发育时期的表达情况以及脂多糖(LPS)和 H_2O_2 应激下鳃和肝胰腺组织中的表达变化进行分析,旨在为研究 PHGPx 在拟穴青蟹的免疫防御机制和性腺发生过程中的作用等提供理论依据,也为研究甲壳动物 GPx 家族的进化过程和分类积累重要资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验动物 拟穴青蟹购自漳浦某青蟹养殖场,解剖前对其体长、体宽、体质量和性腺重进行测量,其中雌蟹体质量为 110 ~ 460 g 不等,雄蟹体质量为 60 ~ 350 g 不等。性腺不同发育阶段的分期参照本实验室常规方法进行[27-28],即根据性腺的外部形态、颜色、性腺指数(gonado-somatic index,GSI)以及组织切片等进行分期。卵巢分为 5 个时期:增殖期(O1 期),卵黄生成前期(O2 期),卵黄生成早期(O3 期),卵黄生成中期(O4 期)和卵黄生成晚期(O5 期)。精巢分为 3 个时期:精母细胞期(T1 期),精子细胞期(T2 期)和成熟精子期(T3 期)。不同发育阶段的雌雄青蟹各取 5 只,对于成熟个体除分别取卵巢和精巢外,另外取肝胰腺、鳃、肌肉、眼柄、胸神经节、脑、胃及肠等组织,立即放入液氮中速冻后置 -80 ℃保存备用。血淋巴先置于含抗凝剂的离心管中,离心后去上清保留血细胞,-80 ℃保存备用。

LPS 和 H_2O_2 应激实验参照本实验室 Fu 等[24]的方法进行,实验蟹体质量为(200 ± 50) g。实验组为用改良的蟹生理盐水(MCSS)稀释的 LPS(0.5 mg/kg)和 0.03% H_2O_2(100 μL/kg)分别注射于青蟹第五步足基部;对照组为注射等量 MCSS 的青蟹,空白对照组为未注射的健康青蟹,注射后分别于 3,6,12 和 24 h(仅 LPS 实验组)取鳃和肝胰腺组织($n = 4$)。保存于 RNAlater 中,用于 RNA 的提取。

主要试剂 总 RNA 提取试剂 Trizol 购自美国 Invitrogen 公司,逆转录 PCR 试剂盒购自 Thermo 公司,琼脂糖凝胶回收试剂盒购自上海捷瑞生物公司,pMD19-T 载体连接试剂盒购自 TaKaRa 公司,感受态 DH5α 菌株为实验室保种,SYBR Green Realtime PCRMaster Mix 购自 Promega 公司。

引物 根据本课题组青蟹转录组测序 EST 数据库,筛选获得 *Sp-PHGPx* 基因的部分 cDNA 序列。使用 Primer 5.0 软件分别设计 RACE 特异性引物和定量引物。本实验所用引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成(表 1)。

1.2 实验方法

总 RNA 的提取和第一条 cDNA 链的合成

用 Trizol 试剂提取拟穴青蟹成熟各组织以及不同发育时期的精巢和卵巢的总 RNA[27]。用分光光度计测定总 RNA 浓度和 OD_{260}/OD_{280} 值,同时用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。经检测合格后,可用于接下来模板链的合成。5′ & 3′-RACE 模板和定量模板的合成按照逆转录试剂盒的具体操作说明进行。模板合成后,用内参引物 18S rRNA-F/R 检测其制备效果。

表 1　本实验所用的主要引物及其序列

Tab. 1　The main primers used in this study

引物名称 primer name	引物序列(5′-3′) primer sequence
SMART II™ A Oligo	AGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG
3′-CDS *	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC$(T)_{30}$VN
5′-CDS *	$(T)_{25}$VN
NUP	CTAATACGACTCACTATAGGGC
UPM-long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
UPM-short	CTAATACGACTCACTATAGGGC
M13-F	GTAAAACGACGGCCAG
M13-R	CAGGAAACAGCTATGACC
PHGPx-3′outer	AAGACCAAACAGGGTGGGATGCT
PHGPx-3′inner	CCGCAGTGGTAATCCCGTGTCC
PHGPx-5′outer	GAAGTTGCCGAGCATCCCACC
PHGPx-5′inner	GCATCCCACCCTGTTTGGTCTTC
PHGPx-F	GGGCTTTGGTGTGGTATGGT
PHGPx-R	CAGGAAACAGCTATGACC
18S rRNA-F	ATGATAGGGATTGGGGTTTGC
18S rRNA-R	AGTAGCGACGGGCGGTGT

Notes: * N = A, C, G or T; V = A, G or C

3′-RACE 和 5′-RACE　根据 3′-和 5′-RACE cDNA 第一条链为模板,利用 RACE 特异引物(GSP1 和 GSP2)和通用引物(UPM 和 NUP)进行两轮 PCR,退火温度根据 RACE 引物而定(注:本实验中 3′-和 5′-RACE 的退火温度一样,反应条件也一样)。第一轮 PCR 扩增反应条件:95 ℃ 3 min;95 ℃ 30 s,68 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s,10 个循环,touchdown 1 ℃;95 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s,25 个循环;72 ℃ 10 min;16 ℃ 5 min。第二轮巢式 PCR 以第一轮产物稀释 50 倍为模板,扩增反应条件:95 ℃ 3 min;95 ℃ 30 s,65 ℃ 30 s,2 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 10 min;16 ℃ 5 min。

Sp-PHGPx 基因 cDNA 全长的获得　将 3′-和 5′-RACE 扩增的目的产物经电泳检测,割胶回收后,连接入 pMD19-T 载体中,送往上海生工生物工程公司测序,分别对 3 个不同个体进行测序,最终确定该片段。将已知的 EST 序列和测序正确的 5′-和 3′-RACE 获得的片段进行拼接后,进而获得该基因的全长 cDNA 序列。同时设计 head to toe 引物,验证其开放阅读框(open reading frame, ORF)的正确性。

实时荧光定量 PCR　使用的定量模板是用随机引物逆转录合成的,同时以 18S rRNA 作为内参基因[24](内参引物序列见表 1),每个样品做 5 个个体重复。20 μL 的反应体系:10 μL SYBR Green Realtime PCR Master Mix,10 μmol/L 的 PHGPx-F 和 PHGPx-R(表 1)各 0.5 μL,cDNA 模板 9 μL。反应条件为 95 ℃ 1 min,45 个循环(95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min)。先检测该基因的扩增曲线和熔解曲线,并对定量产物进行割胶测序,以验证其是否为基因特异产物,然后再进行定量实验。

根据罗氏 LC480 仪器分析得到的 C_t 值计算各个样品的 RQ 值,即为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$,其中 ΔC_t = 目的基因的 C_t 值 − 对应的内参基因的 C_t 值,$\Delta\Delta C_t$ = 每个样品的 ΔC_t 值 − 基准样品的 ΔC_t 值。基因的表达水平由 RQ 平均值 ± 标准误的平均值(mean ± SE)来表示,利用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)或 *t*-检验(*t*-test)分析,同时用 Microsoft Office 2010 对统计结果进行作图分析,显著性差异表示为 $P < 0.05$。

生物信息学分析　序列的拼接采用 CAP3(http://doua.prabi.fr/software/cap3)进行;开放阅读框的确定采用 ORF Finder(http://www.

ncbi. nlm. nih. gov/gorf/gorf. html)进行。之后采用以下不同的在线分析软件对 *Sp-PHGPx* 及其推导的氨基酸序列进行一系列的生物信息学分析。蛋白等电点和分子量的预测:Compute PI/Mw tool(http://web. expasy. org/compute_pi/);糖基化位点和磷酸化位点的预测:NetNGlyc 1. 0 Server (http://www. cbs. dtu. dk/services/NetNGlyc/)和 NetPhos 2. 0(http://www. e. dtu. dk/services/NetPhos/);信号肽预测:SingalP 4. 1 Server (http://www. cbs. dtu. dk/services/SignalP/);蛋白功能结构域的预测:InterProScan software(http://www. ebi. ac. uk/InterProScan/);三维结构的构建和分析:SWISS-MODEL(http://swissmodel. expasy. org/)和 Pymol viewer 软件;序列的同源性比对:使用 BioEdit 软件进行比对分析;系统进化树的构建:使用 MEGA 5. 03 软件中的邻接法(Neighbor-Joining,NJ)。

2 结果与分析

2.1 *Sp-PHGPx* 基因的全长克隆和序列分析

通过 RACE 技术克隆获得 *Sp-PHGPx* 的全长 cDNA 序列(GenBank登录号:KM275218)(图1),

```
1    ACATTGACCACAGACTGAGGGCTTTGGTGTGGTATGGTGTGGTGCTTTCGATACCCTCCA 60
61   TAACTCTCTCCTGTAGTTCCCAGAGTTTGTTGGCATTGGGTGGAGGAGCAGGTCTAATAT 120
121  CCTACACAAGACCCTTAGTCatggctgctggtccttccttctatgagttcagtgctgtgg 180
1                        M  A  A  G  P  S  F  Y  E  F  S  A  V  D 14
181  acatagatggcaatgaggtgtccatggaaaaatataaggatcgggtgtgtattgtagtca 240
15    I  D  G  N  E  V  S  M  E  K  Y  K  D  R  V  C  I  V  V  N 34
241  atgttgcaagcaaatgaggcaagactgatgtgaactacaccgaactggtgcagcttcaca 300
35    V  A  S  K  U  G  K  T  D  V  N  Y  T  E  L  V  Q  L  H  K 54
301  agaagtatgagcctcagggcctcagcatcctggccttcccctgcaatcagtttggaggcc 360
55    K  Y  E  P  Q  G  L  S  I  L  A  F  P  C  N  Q  F  G  G  Q 74
361  aggaacctggcacagaggcggagataaagaagtttgctgagggctatggggtgaagtttg 420
75    E  P  G  T  E  A  E  I  K  K  F  A  E  G  Y  G  V  K  F  D 94
421  acatgttttccaaagtaaaggtgaacggtagcgatactcatcctctttgggacttcttga 480
95    M  F  S  K  V  K  V  N  G  S  D  T  H  P  L  W  D  F  L  K 114
481  agaccaaacagggtgggatgctcggcaacttcatcaagtggaattttactaaattcttgg 540
115   T  K  Q  G  G  M  L  G  N  F  I  K  W  N  F  T  K  F  L  V 134
541  tggaccgcagtggtaatcccgtgtcccgctactctccacagaccaatcccaaggtgtgtg 600
135   D  R  S  G  N  P  V  S  R  Y  S  P  Q  T  N  P  K  V  C  V 154
601  tgtgtgatagggataatacacacacacacacatacacacacgcatatgtatatacgtatg 660
155   C  D  R  D  N  T  H  T  H  T  Y  T  H  A  Y  V  Y  T  Y  V 174
661  tacatacatttatacatacataaACACGCAGTAAAAGTGTTGTCTTGTCATTTGCAGGGC 720
175   H  T  F  I  H  T  *                                        180
721  TGAACAGGTACTGAAACATTGAATATCCCTAAGATAAGATGTGAATTTCATCAGCTATAT 780
781  TAGCAATGAGTAAATGAGAACATAGGCTACTGTTTATTACTTATTTACAGAAAACACATC 840
841  TAATGTCTCCAAGGCATATTTATATAGAAATCACAAACATTTCAAGGCATATTTTTAGCA 900
901  AACAAATAATAAAAGTTTACTGTAAGGATGAACTAAATCCAGACTGTATGCAGTCCAGTT 960
961  TGCATTCCAATAAACAAGATTCTTTCTAGTGTACTCCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1020
1021 AAAA 1024
```

图 1 *Sp-PHGPx* 基因的 cDNA 全长及其推导的氨基酸序列

起始密码子(atg)和终止密码子(taa)用加粗标出;加尾信号(AATAAA)用双波浪线标出;3 个糖基化位点(^{45}NYTE^{48})、(^{102}NGSD^{105})和(^{128}NFTK^{131})用灰色阴影标出;4 个丝氨酸磷酸化位点(S^{6},S^{11},S^{21},S^{145}),1 个苏氨酸磷酸化位点(T^{160}),2 个酪氨酸磷酸化位点(Y^{25},Y^{169})均用圆圈标出;保守的催化四联体(^{39}U,^{74}Q,^{127}W,^{128}N)用方框标出;基序(^{27}DRVCIVVNVASKUGKT^{42})、(^{64}LAFPCNQF^{71})和(^{127}WNFTKFL^{133})分别用双下划线、单下划线和单波浪线标出

Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequence of *Sp-PHGPx* from *S. paramamosain*

The initiation codon(atg) and the stop codon(taa) are all characterized in bold. The polyadenylation signal sequence(AATAAA) is in bold and double wave line. The three glycosylation sites are in gray. Four serine phosphorylation site, one phosphorylation site of threonine and two tyrosine phosphorylation site are all marked by circle. The amino acid residuals(^{39}U,^{74}Q,^{127}W,^{128}N) involved in the fixation of selenium are marked by box. The motif of(^{27}DRVCIVVNVASKUGKT^{42}), (^{64}LAFPCNQF^{71}) and (^{127}WNFTKFL^{133}) are indicated in double underlined, single underlined and wave line

该序列包括 140 bp 的 5′非编码区(untranslated region,UTR),543 bp 的开放阅读框和 341 bp 的 3′UTR(包含 PloyA 尾)。3′-UTR 含有典型的加尾信号 AATAAA。该 cDNA 序列可编码 180 个氨基酸,预测的蛋白分子质量约为 20.43 ku,等电点约为 7.69。该蛋白的第 39 个氨基酸为硒代半胱氨酸(Sec),由终止密码子(TGA)编码,其与氨基酸残基(^{74}Q、^{127}W、^{128}N)构成催化四联体,参与硒的固定。

SignalP 分析未发现有信号肽;TMHMM 分析发现其无跨膜区。NetPhos 2.0 Server 预测显示,其含有 4 个丝氨酸磷酸化位点(S^{6},S^{11},S^{21},S^{145}),1 个苏氨酸磷酸化位点(T^{160})和 2 个酪氨酸磷酸化位点(Y^{25},Y^{169});NetNGlyc 1.0 Server 推测其含有 3 个糖基化位点,分别为(^{45}NYTE^{48})、(^{102}NGSD^{105})和(^{128}NFTK^{131});ScanProsite 分析显示,PHGPx 蛋白的第 1 ~ 150 位氨基酸为磷脂氢谷胱甘肽过氧化物酶的功能域,其基序(^{27}DRVCIVVNVASKUGKT^{42})为 PHGPx 活性位点基序,(^{64}LAFPCNQF^{71})为标签序列,其中硒代半胱氨酸(U^{39})在中心活性位点上(图 1)。

2.2　Sp-PHGPx 的空间结构模拟

采用 SWISS-MODEL 在线同源建模软件,将 Sp-PHGPx 的氨基酸序列提交至服务器,系统会自动将 Sec(U)识别为 Cys(C)(注:以下 PHGPx 三维结构的第 39 位氨基酸是 Cys),经同源分析发现其蛋白结构与人类的 GPx4 相似度最高,达到 64.63%。以人类 GPx4 的三维结构作为模板[PDB code:2obi.1.A(1.55 Å)],用三维结构查看软件 PyMOL,对 Sp-PHGPx 的蛋白序列进行空间三维结构的模拟(图 2)。结果显示,该蛋白由 5 个 α 螺旋和 7 个 β 折叠片组成。其中 Sec(U)位于 β3 和 α3 之间的蛋白表面,Gln(Q)位于 β4 和 α4 之间的蛋白表面,Trp(W)和 Asn(N)位于 α5 和 β6 之间的蛋白表面,4 个氨基酸残基通过氢键相连,参与硒的固定。

2.3　Sp-PHGPx 氨基酸序列的同源性分析

将拟穴青蟹的 PHGPx 与其他物种的 PHGPx(GPx4)进行多重比对后发现,Sp-PHGPx 具有构成催化四联体的 4 个保守氨基酸(Sec/Cys、Trp、Gln 和 Asn),且在 GPx 的催化活性区(NVASKCGLT),标志性基序(LAFPCNQF)以及 PHGPx 特有的序列[KWNF(T/X)KFL]区域保守性也很高(图 3)。

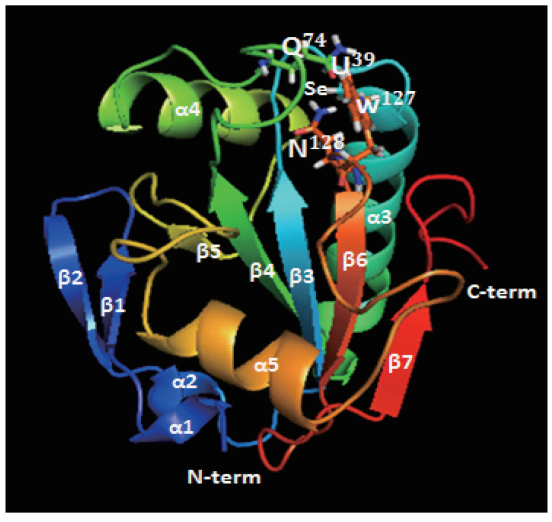

图 2　拟穴青蟹 PHGPx 的空间结构模拟

αi 和 βi 分别代表 α-螺旋和 β-折叠;活性位点 Sec(^{39}U)和 Gln(^{74}Q),Trp(^{127}W),Asn(^{128}N)位于袋状蛋白的表面,通过氢键相连,参与硒(Se)的固定

Fig. 2　The predicted three-dimensional space structure of Sp-PHGPx

αi and βi indicate a-helices and b-sheets, respectively. The active site selenocysteine(^{39}U) residue, together with glutamine(^{74}Q), tryptophan(^{127}W) and Asparagine(^{128}N), is located in a pocket on the protein surface, and bonded with hydrogen, which is involved in the fixation of selenium

2.4　Sp-PHGPx 系统进化树的分析

根据 NCBI 上已注册的部分物种不同亚型的 GPxs(主要为 GPx1-GPx4 和甲壳动物中已报道的 GPx)的氨基酸序列,采用 MEGA 5.0 软件,以邻接法构建系统发育树,Bootstrap 值为 1 000。

结果显示,不同物种的 GPx1-GPx4 明显地各自聚为一支;Sp-PHGPx 与其他物种的 PHGPx(GPx4)聚为一大支,在 PHGPx 这一大支中,拟穴青蟹和丰年虫单独聚为一小支,果蝇、斑马鱼以及其他哺乳动物分别聚为一小支;除了丰年虫,虾蟹中已报道的 GPx 与 PHGPx(GPx4)的亲缘关系均较远(图 4)。凡纳滨对虾、拟穴青蟹、罗氏沼虾和日本沼虾的 GPx 聚为一小支,与哺乳动物中 GPx1 和 GPx2 亲缘关系相对较近。刀额新对虾和中华绒螯蟹分别聚为一小支,且与其他物种相距较远。

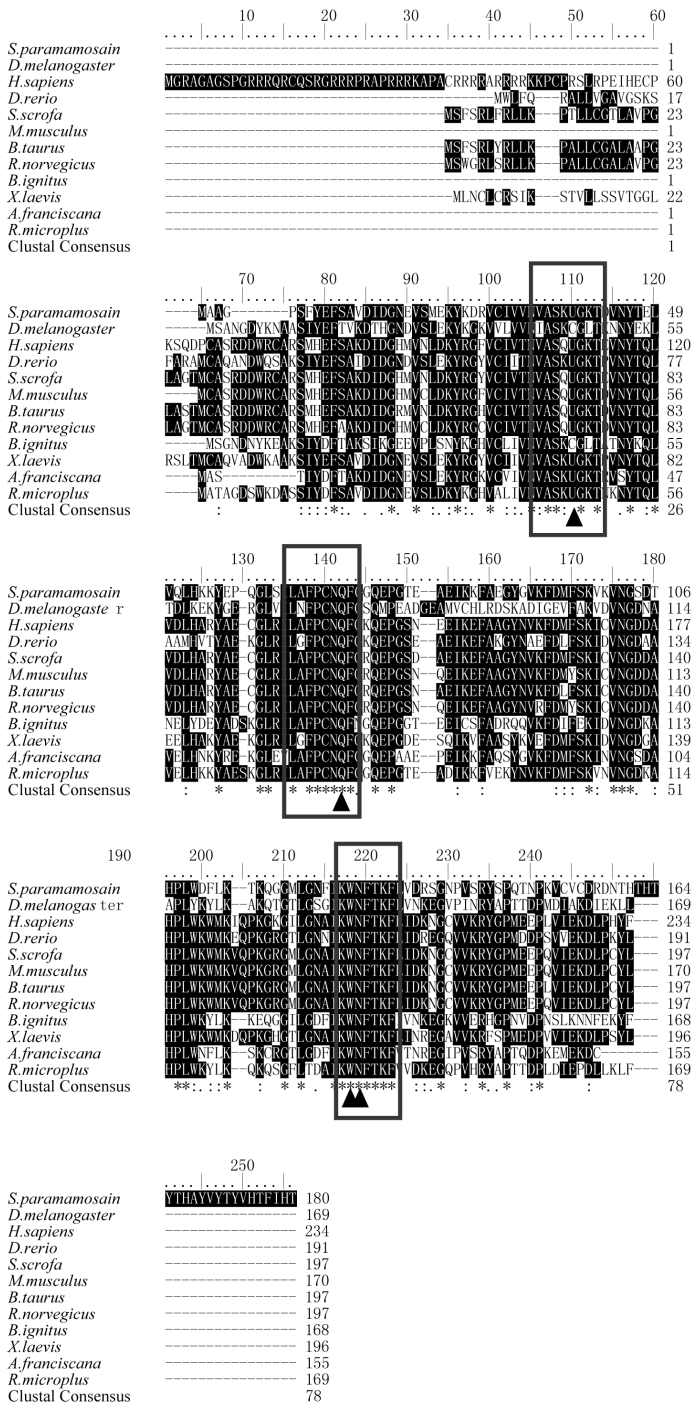

图 3 拟穴青蟹和其他物种 PHGPx 氨基酸序列的多重比对

所用的氨基酸序列的物种名和相应的登录号分别为:拟穴青蟹,KM275218;果蝇,NP_728870.1;人类,NP_001034937.1;斑马鱼,NP_001025241.2;野猪,NP_999572.1;小家鼠,BAC06511.1;黄牛,NP_777195.1;褐家鼠,NP_058861.3;红光熊峰,ACP44071.1;非洲爪蟾,NP_001165215.1;丰年虫,ABY62740.1;微小扇头蜱,ABA62395.1

4 个保守氨基酸(Sec/Cys、Trp、Gln 和 Asn)用黑色三角形标出;GPx 的催化活性区(NVASKCGLT),标志性基序(LAFPCNQF)以及 PHGPx 特有的序列[KWNF(T/X)KFL]区域用灰色方框标出

Fig. 3 Multiple alignment of the PHGPx amino acid sequence between *S. paramamosain* and other species

The Species and GenBank Accession numbers of amino acid sequences are listed as follows: *Scylla paramamosain*, KM275218; *Drosophila melanogaster*, NP_728870.1; *Homo sapiens*, NP_001034937.1; *Danio rerio*, NP_001025241.2; *Sus scrofa*, NP_999572.1; *Mus musculus*, BAC06511.1; *Bos taurus*, NP_777195.1; *Rattus norvegicus*, NP_058861.3; *Bombus ignitus*, ACP44071.1; *Xenopus laevis*, NP_001165215.1; *Artemia franciscana*, ABY62740.1; *Rhipicephalus microplus*, ABA62395.1

The four conserved amino acid residues (Sec/Cys, Trp, Gln and Asn) are marked by black triangles. The active-site motif (NVASKCGLT), the signature motif (LAFPCNQF) and the special sequence [KWNF(T/X)KFL] of PHGPx are indicated by gray rectangles

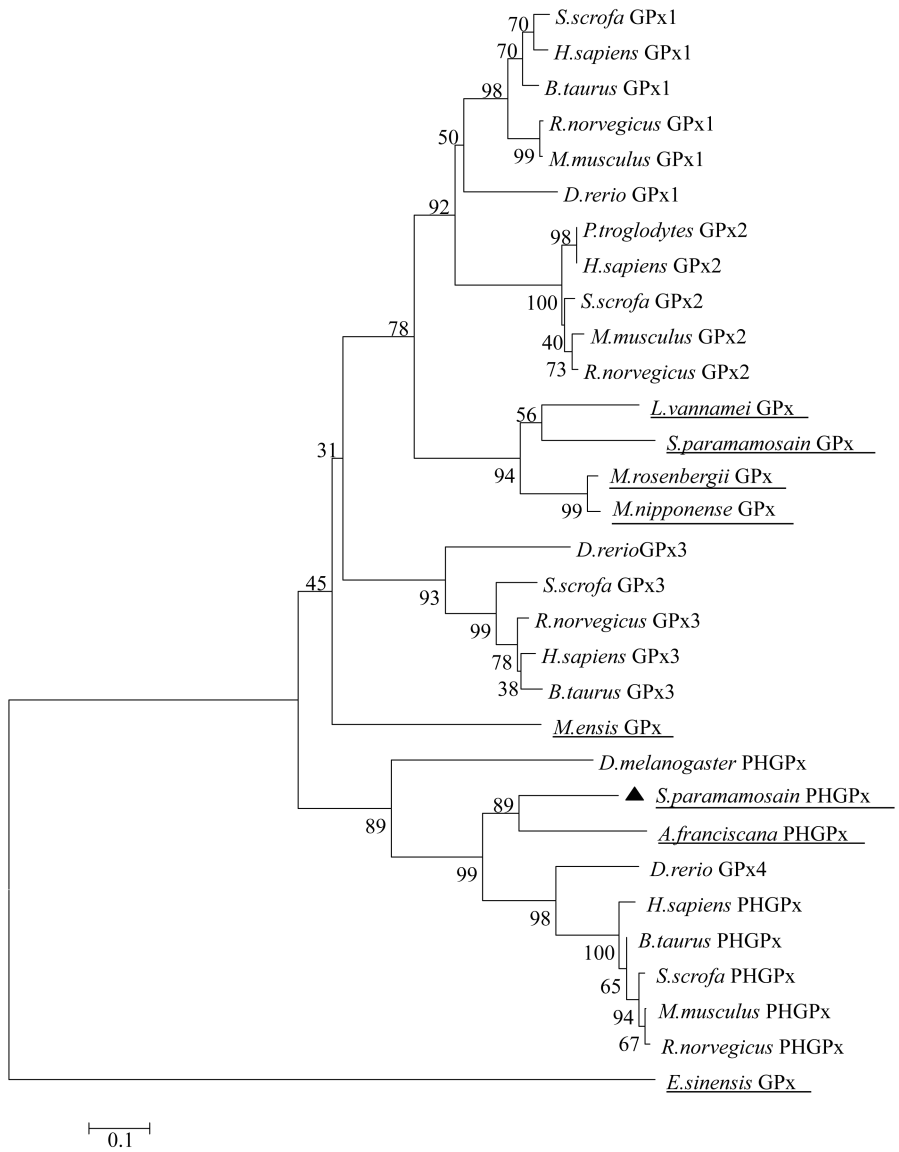

图 4　不同物种 GPx 氨基酸序列的系统进化树

甲壳动物 GPxs 用下划线表示,拟穴青蟹 PHGPx 用三角形标出。

所用的氨基酸序列的物种名和相应的登录号分别为凡纳滨对虾 GPx,AAY41441.1;中华绒螯蟹 GPx,ACV41935.1;拟穴青蟹 GPx,AEN69448.1;罗氏沼虾 GPx,ACM68948.1;日本沼虾 GPx,ADV17661.1;刀额新对虾 GPx,ACB42236.1;人类 GPx1,AAH07865.2;褐家鼠 GPx1,NP_110453.3;小家鼠 GPx1,NP_032186.2;野猪 GPx1,NP_999366.1;黄牛 GPx1,NP_776501.1;斑马鱼 GPx1,NP_001007282.2;人类 GPx2,AAH22820.2;褐家鼠 GPx2,NP_899653.2;小家鼠 GPx2,NP_109602.2;野猪 GPx2,ABI63991.2;黑猩猩 GPx2,NP_001108606.1;人类 GPx3,NP_002075.2;褐家鼠 GPx3,NP_071970.2;野猪 GPx3,NP_001108627.1;黄牛 GPx3,NP_776502.1;斑马鱼 GPx3,NP_001131027.1;其余物种名和登录号见图 4

Fig. 4　The phylogenetic tree of GPx amino acid sequences from different species

GPxs of crustaceans are marked with underline. *S. paramamosain* marked by triangle.

The Species and GenBank Accession numbers of amino acid sequences are listed as follows: *Litopenaeus vannamei* GPx, AAY41441.1; *Eriocheir sinensis* GPx, ACV41935.1; *Scylla paramamosain* GPx, AEN69448.1; *Macrobrachium rosenbergii* GPx, ACM68948.1; *Macrobrachium nipponense* GPx, ADV17661.1; *Metapenaeus ensis* GPx, ACB42236.1; *Homo sapiens* GPx1, AAH07865.2; *Rattus norvegicus* GPx1, NP_110453.3; *Mus musculus* GPx1, NP_032186.2; *Sus scrofa* GPx1, NP_999366.1; *Bos taurus* GPx1, NP_776501.1; *Danio rerio* GPx1, NP_001007282.2; *Homo sapiens* GPx2, AAH22820.2; *Rattus norvegicus* GPx2, NP_899653.2; *Mus musculus* GPx2, NP_109602.2; *Sus scrofa* GPx2, ABI63991.2; *Pan troglodytes* GPx2, NP_001108606.1; *Homo sapiens* GPx3, NP_002075.2; *Rattus norvegicus* GPx3, NP_071970.2; *Sus scrofa* GPx3, NP_001108627.1; *Bos taurus* GPx3, NP_776502.1; *Danio rerio* GPx3, NP_001131027.1; For the Species and GenBank Accession numbers of others consult Fig. 4

2.5　*Sp-PHGPx* 基因在雌雄各组织中的表达情况

以 18S rRNA 为内参基因,实时定量 PCR 结果显示,*Sp-PHGPx* 基因在所检测的雌雄拟穴青蟹各组织中均有不同程度的表达(图 5),其中精

巢的表达量最高,且显著高于其他各组织($P<0.05$);雌性的鳃、脑和心脏以及雄性的脑中均有较高水平的表达;在雌蟹中,鳃和心脏的表达量显著高于雄蟹($P<0.05$);而在雄蟹中,精巢的表达量显著高于雌蟹的卵巢($P<0.05$)(图 5)。

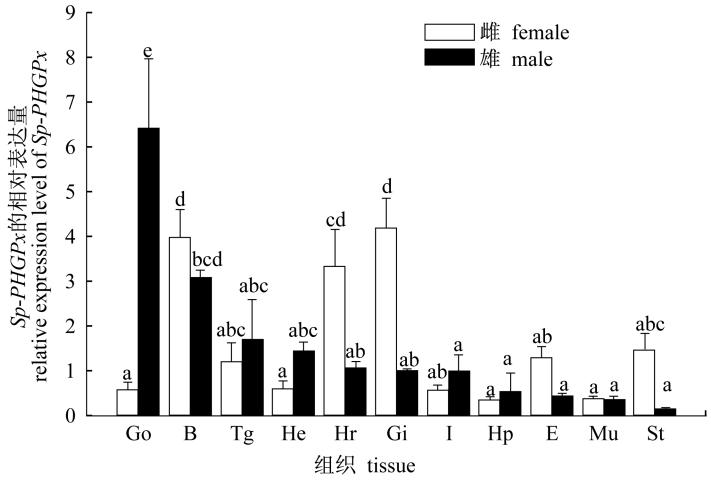

图 5 *Sp-PHGPx* 基因在雌雄各组织中的表达情况

Go. 性腺(卵巢和精巢); B. 脑; Tg. 胸神经节; He. 血细胞; Hr. 心脏; Gi. 鳃; I. 肠; Hp. 肝胰腺; E. 眼柄; Mu. 肌肉; St. 胃。柱上不同字母代表具有显著性差异($P<0.05$)

Fig. 5 The expression pattern of *Sp-PHGPx* gene in different tissues of female and male *S. paramamosain*

Gonad. (ovary and testis); B. brain; Tg. thoracic ganglia; He. haemocytes; Gi. gill; I. intestines; Hp. hepatopancreas; E. eyestalk; Mu. muscle; St. stomach. Bar with different letters indicates significant differences($P<0.05$)

2.6 *Sp-PHGPx* 基因在性腺不同发育时期的表达情况

在卵巢不同发育阶段,*Sp-PHGPx* 的表达量相对较恒定且各时期之间无显著性差异;而在精巢不同发育阶段,*Sp-PHGPx* 的表达量呈先上升后下降的趋势,在 T2 期(精子细胞期)的表达量最高,显著高于 T1 期(精母细胞期)和 T3 期(成熟精子期)($P<0.05$)。同时发现,在精巢发育的 T2 期(精子细胞期),*Sp-PHGPx* 的表达量显著高于卵巢发育各时期的表达量($P<0.05$)(图 6)。

2.7 LPS 和 H_2O_2 应激下 *Sp-PHGPx* 基因在鳃和肝胰腺组织中的表达变化

在 LPS 诱导应激下,鳃中 *Sp-PHGPx* 基因在 6 h 表达量显著升高,与对照组有显著性差异($P<0.05$),之后表达量逐渐下调,接近正常水平(图 7-a);肝胰腺中该基因在 12 h 表达量显著升高且达到峰值,与对照组之间差异显著($P<0.05$),之后开始下降,在 24 h 时基本恢复到正常水平(图 7-b)。在 H_2O_2 诱导应激下,鳃中 *Sp-PHGPx* 基因在 3 h 表达量明显上调,显著高于对照组,随后开始下调并趋于正常水平(图 7-c)。而肝胰腺中该基因在被检测的各时相中,表达量均没有显著差异(图 7-d)。

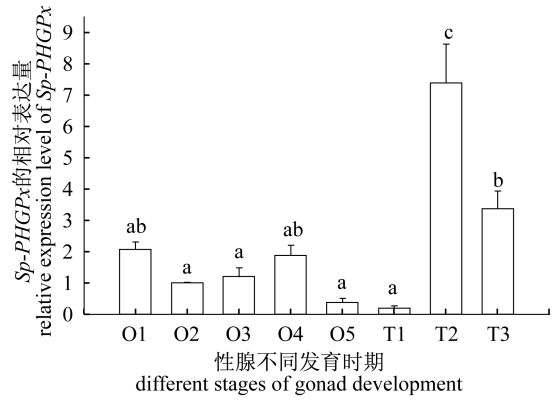

图 6 *PHGPx* 基因在拟穴青蟹性腺发育各时期的表达情况

O1 ~ O5 表示卵巢发育各时期:O1. 增殖期; O2. 卵黄发生前期; O3. 卵黄发生早期; O4. 卵黄发生中期; O5. 卵黄发生晚期。T1 ~ T3 表示精巢发育各时期:T1. 精母细胞期; T2. 精子细胞期; T3. 成熟精子期

柱上不同字母代表具有显著性差异($P<0.05$)

Fig. 6 Relative expression levels of *PHGPx* during different stages of gonadal development from *S. paramamosain*

O1 – O5 represents different stages of ovary development: O1. Proliferation; O2. Previtellogenesis; O3. Primary vitellogenesis; O4. Secondary vitellogenesis; O5. Tertiary vitellogenesis. T1-T3 represents different stages of testis development: T1. The spermatocyte stage; T2. The spermatid stage; T3. the mature sperm stage

Bar with different letters indicates significant differences ($P<0.05$)

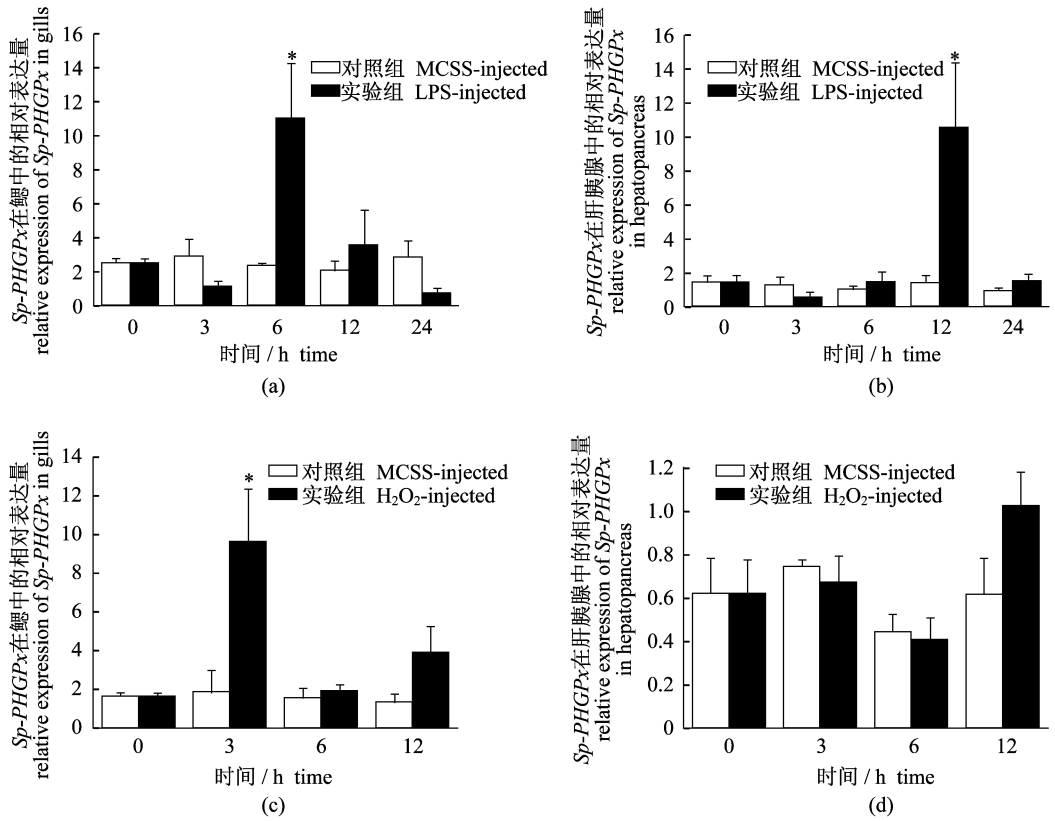

图 7　*Sp-PHGPx* 基因在 LPS 和 H_2O_2 应激下鳃和肝胰腺组织中的表达情况

* 表示与对照组有显著性差异($P<0.05$)

Fig. 7　Relative expression levels of *Sp-PHGPx* under the challenge of LPS and H_2O_2 in gills and hepatopancreas from *S. paramamosain*

* indicates significant difference compared with control($P<0.05$)

3　讨论

PHGPx 是目前发现的唯一能将细胞膜上的有机氢过氧化物还原成相应的醇类,从而保护生物膜免受氧化损伤的酶[29-30]。根据转录位点的不同,PHGPx 有 3 种不同类型,分别为细胞质型(cGPx4)、线粒体型(mGPx4)和精核型(snGPx4)[4]。由于 PHGPx 催化底物的复杂性,使其在抗氧化、细胞凋亡和精子发生等过程中发挥着重要作用[31]。本实验从拟穴青蟹中成功克隆获得 *Sp-PHGPx* 的 cDNA 全长,可编码 180 个氨基酸,分子量约为 20.43 ku;在该基因的第 255~257 位含有通常编码终止密码子的"TGA"编码硒代半胱氨酸(Sec)。对其 3′-UTR 预测显示,其不含硒插入性片段(SECIS),这与哺乳动物中 GPx4 家族成员有所差异。在已研究过的大多数节肢动物和植物中,PHGPx 的活性位点为 Cys,为硒非依赖的 GPx[3,32]。但也有例外,如微小牛蜱含有 Sec 和 SECIS 结构[12];丰年虫(ABY62740.1)只含有 Sec,但不含 SECIS 结构。本研究结果与丰年虫 PHGPx 的结果相似,表明不同物种间 PHGPx 的组织分布、催化机理和功能等均有所差别[31]。生物信息学分析显示,该序列不含信号肽和跨膜结构,表明该蛋白不是分泌蛋白,可能分布在细胞质中,与某些大分子物质结合,发挥着一定的生物学作用,这与植物盐芥的结果相似[13],预示 *Sp-PHGPx* 可能为细胞质型 GPx4(cGPx4)。

多重比对结果显示,Sp-PHGP*x* 具有 GPx 家族典型的结构,如活性位点基序[N(V/I)ASX(U/C)GXT],标签序列[L(A/X)FPCNQF]和 PHGPx 特有的序列(KWNF(T/X)KFL),其中硒代半胱氨酸(^{39}U)位于中心活性位点上,与保守的氨基酸残基(^{74}Q、^{127}W、^{128}N)构成催化四联体,对硒的固定起着重要的作用[33]。系统进化树分析表明,Sp-PHGP*x* 与 GPx4(PHGPx)聚为一支,

且与丰年虫的亲缘关系最近;而与甲壳动物中其他已报道的 Se-GPx 亲缘关系相对较远。这一结果预示,甲壳动物的 GPx 家族可能具有不同于哺乳动物 GPx 家族的进化过程,分类也有所不同,有待进一步深入研究。

实时定量 PCR 结果显示,*Sp-PHGPx* 基因在成熟拟穴青蟹雌雄各组织中均有不同程度的表达,其中精巢的表达量最高,显著高于其他各组织($P<0.05$),表明 *Sp-PHGPx* 基因的表达具有一定的组织特异性。该基因在精巢中的高表达与脊椎动物中已报道的人[34]、山羊[35]以及小鼠[36]的结果相一致,说明 Sp-PHGPx 在精巢中不仅具有抗氧化功能,而且对雄性生殖系统可能也发挥着重要作用。在精巢不同发育阶段,*Sp-PHGPx* 基因的表达量在精母细胞期(T1 期)表达量最低,之后表达量显著升高并在精子细胞期(T2 期)达到峰值,在成熟精子期(T3 期)开始降低,T2 期显著高于其他各时期($P<0.05$)。这一结果与拟穴青蟹 *Se-GPx* 基因在精巢发育过程中的表达情况相一致[24],原因可能是由于在精子发生过程中尤其是精子细胞期(T2 期)细胞代谢旺盛,大量的代谢产物需要被清除[37],此时大量的 *PHGPx* 基因开始表达,以保证精子的正常发育和成熟。同时发现,*Sp-PHGPx* 在精巢发生中后期(T2 期和 T3 期),其表达量显著高于卵巢发育各阶段的表达量,这一现象也进一步说明,PHGPx 对精子的发生起着更为重要的作用。

鳃组织是拟穴青蟹的氧交换中心,直接与外界环境接触;肝胰腺为拟穴青蟹重要的代谢和免疫器官,二者均被认为参与虾蟹类的免疫防御反应。在 LPS 应激下,鳃组织中 *Sp-PHGPx* 基因的表达量在 6 h 显著上调并达到最高,与对照组有显著性差异;在肝胰腺组织中其表达量在 12 h 达到峰值,且与对照组差异显著。这可能是由于机体受到病原体应激后,激活第一道免疫防线,导致呼吸爆发,产生过量的活性氧簇(reactive oxygen species,ROS),此时 *Sp-PHGPx* 基因的上调表达对清除体内过剩的 ROS 可能具有一定的作用。在 H_2O_2 应激下,鳃组织在 3 h 出现显著上调,肝胰腺组织的表达量在检测的时相内没有显著变化。Fu 等[24]在研究拟穴青蟹 *Se-GPx* 基因在 H_2O_2 应激下的表达情况时发现,鳃组织在被检测的时相内,表达量没有显著性差异,肝胰腺组织的表达量却在 3 和 6 h 分别出现显著和极显著的上调。这一结果可能是因为在甲壳动物中,当机体受到外界应激后,不同亚型的 GPx 在不同组织中发挥的效应可能有所不同。

本实验首次从拟穴青蟹中克隆获得 *PHGPx* 基因的 cDNA 全长,通过生物信息学的分析,并结合其在成熟拟穴青蟹雌雄各组织、性腺不同发育时期的表达情况以及 LPS 和 H_2O_2 应激下的表达变化,初步显示其在拟穴青蟹的免疫防御反应和精巢发育等过程中发挥着重要的作用,同时也为不同物种间 GPx 家族的进化研究和分类积累了一些重要资料。

参考文献:

[1] Arthur J R. The glutathione peroxidases[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2000, 57(13 - 14): 1825 - 1835.

[2] Zhang Y, Cai G B, He L, *et al*. Bioinformatics analysis of glutathione peroxidase in parasitic trematodes[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2010, 26(4): 293 - 298. [章莹,蔡国斌,何立,等. 寄生性吸虫谷胱甘肽过氧化物酶生物信息学分析. 中国人兽共患病学报,2010,26(4):293 - 298.]

[3] 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 Evolutionary Biology, 2009(9): 72.

[4] Brigelius-Flohe R, Maiorino M. Glutathione peroxidases[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2013, 1830(5): 3289 - 3303.

[5] Toppo S, Vanin S, Bosello V, *et al*. Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2008, 10(9): 1501 - 1514.

[6] Xia X F, Zheng J J, Shao G M, *et al*. Cloning and functional analysis of glutathione peroxidase gene in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(6): 1587 - 1595.

[7] Ursini F, Maiorino M, Valente M, *et al*. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism, 1982, 710(2): 197 - 211.

[8] Roveri A, Maiorino M, Ursini F. Enzymatic and immunological measurements of soluble and membrane-bound phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase[J]. Methods in Enzymology, 1994, 233: 202 – 212.

[9] Shi L G, Xun W J, Zhou H L, *et al*. Bioinformatis analysis of PHGPx gene in goat(*Capra hircus*)[J]. Biotechnology Bulletin, 2012(12): 106 – 113. [施力光,荀文娟,周汉林,等. 山羊磷脂氢谷胱甘肽过氧化物酶生物信息学分析. 生物技术通报, 2012(12): 106 – 113.]

[10] Hermesz E, Ferencz á. Identification of two phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (gpx4) genes in common carp[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology, 2009, 150(1): 101 – 106.

[11] Li D, Blasevich F, Theopold U, *et al*. Possible function of two insect phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidases[J]. Journal of Insect Physiology, 2003, 49(1): 1 – 9.

[12] Cossio-Bayugar R, Miranda E, Holman P J. Molecular cloning of a phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase gene from the tick, *Boophilus microplus*(Acari: Ixodidae)[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 35(12): 1378 – 1387.

[13] Ma T T, Zhou Y J, Gao F, *et al*. Cloning and expression analysis of glutathione peroxidase 6 (ThGPX6) in *Thellungiella halophile*[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2012, 13(2): 252 – 258. [马亭亭,周宜君,高飞,等. 盐芥谷胱甘肽过氧化物酶基因(ThGPX6)的克隆及表达分析. 植物遗传资源学报, 2012, 13(2): 252 – 258.]

[14] Lei X G, Evenson J K, Thompson K M, *et al*. Glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase are differentially regulated in rats by dietary selenium[J]. Journal of Nutrition, 1995, 125(6): 1438 – 1446.

[15] Shi L G, Xun W J, Yue W B, *et al*. Cloning, characterization, and expression analysis of goat (*Capra hircus*) phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx)[J]. International Journal of Biological Sciences, 2010, 6(4): 316.

[16] Garolla A, Maiorino M, Roverato A, *et al*. Oral carnitine supplementation increases sperm motility in asthenozoospermic men with normal sperm phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase levels[J]. Fertility & Sterility, 2005, 83(2): 355 – 361.

[17] Schweizer U, Bräuer A U, Köhrle J, *et al*. Selenium and brain function: A poorly recognized liaison[J]. Brain Research Reviews, 2004, 45(3): 164 – 178.

[18] Huang H S, Chang W C, Chen C J. Involvement of reactive oxygen species in arsenite-induced downregulation of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in human epidermoid carcinoma A431 cells[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2002, 33(6): 864 – 873.

[19] Liu C H, Tseng M C, Cheng W. Identification and cloning of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its expression following *Vibrio alginolyticus* infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(1): 34 – 45.

[20] Ren Q, Sun R R, Zhao X F, *et al*. A selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) and two glutathione S-transferases (GSTs) from Chinese shrimp(*Fenneropenaeus chinensis*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology, 2009, 149(4): 613 – 623.

[21] Yeh S P, Liu K F, Chiu S T, *et al*. Identification and cloning of a selenium dependent glutathione peroxidase from giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(2): 181 – 191.

[22] Liu K F, Yeh M S, Kou G H, *et al*. Identification and cloning of a selenium-dependent glutathione peroxidase from tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and its transcription following pathogen infection and related to the molt stages[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2010, 34(9): 935 – 944.

[23] Wu L T, Chu K H. Characterization of an ovary-specific glutathione peroxidase from the shrimp *Metapenaeus ensis* and its role in crustacean reproduction[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 155(1): 26 – 33.

[24] Fu M, Zou Z, Liu S, *et al*. Selenium-dependent glutathione peroxidase gene expression during gonad development and its response to LPS and H_2O_2 challenge in *Scylla paramamosain*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(3): 532 – 542.

[25] Lin Q, Li S J, Li Z B, *et al*. Species composition in genus *Scylla* from the coast of southeast China[J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 38(2): 211 – 219. [林琪,李少菁,黎中宝,等. 中国东南沿海青蟹属(*Scylla*)的种类组成. 水产学报, 2007, 38(2):

211 – 219.]

[26] Huang J R, Huang H Y, Ye H H, *et al*. Cloning and analysis of β-actin gene from *Scylla paramamosain* [J]. Journal of Xiamen University: Natural Science, 2012, 51(2): 274 – 279. [黄静茹, 黄辉洋, 叶海辉, 等. 拟穴青蟹 β-肌动蛋白基因的克隆与分析. 厦门大学学报: 自然科学版, 2012, 51(2): 274 – 279.]

[27] Dai Y, Han K, Zou Z, *et al*. SUMO-1 of mud crab (*Scylla paramamosain*) in gametogenesis [J]. Gene, 2012, 503(2): 260 – 268.

[28] Gao J, Zou Z H, Jia X W, *et al*. Molecular cloning and expression analysis of OTUB during gonadal development in *Scylla paramamosain* [J]. Chinese Journal of Zoology, 2013, 48(3): 407 – 416. [高洁, 邹志华, 贾锡伟, 等. 拟穴青蟹 OTUB 的分子克隆及其在性腺发育过程中的表达. 动物学杂志, 2013, 48(3): 407 – 416.]

[29] Li W J, Gu S, Jin L, *et al*. Screening of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase genes in plants [J]. Journal of Tsinghua University: Science and Technology, 2000, 40(11): 12 – 14. [李文君, 谷硕, 金岚, 等. 植物谷胱甘肽磷脂氢过氧化物酶基因的筛查. 清华大学学报: 自然科学版, 2000, 40(11): 12 – 14.]

[30] Ursini F, Heim S, Kiess M, *et al*. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation [J]. Science, 1999, 285(5432): 1393 – 1396.

[31] 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]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(42): 43522 – 43529.

[32] Hu Z, Lee K S, Choo Y M, *et al*. Molecular characterization of a phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase from the bumblebee *Bombus ignitus* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 155(1): 54 – 61.

[33] Liu Z X, Ke H, Cao Y L, *et al*. Molecular cloning, characterization and tissue distribution of glutathione peroxidase 1 and 4 from Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(3): 439 – 447. [刘振兴, 柯浩, 曹艳林, 等. 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. 中国水产科学, 2010, 17(3): 439 – 447.]

[34] Diaconu M, Tangat Y, Bohm D, *et al*. Failure of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expression in oligoasthenozoospermia and mutations in the PHGPx gene [J]. Andrologia, 2006, 38(4): 152 – 157.

[35] Baek I J, Seo D S, Yon J M, *et al*. Tissue expression and cellular localization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) mRNA in male mice [J]. Journal of Molecular Histology, 2007, 38(3): 237 – 244.

[36] Imai H, Sumi D, Hanamoto A, *et al*. Molecular cloning and functional expression of a cDNA for rat phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: 3′-untranslated region of the gene is necessary for functional expression [J]. Journal of Biological Chemistry, 1995, 118(5): 1061 – 1067.

[37] Shi L G, Xun W J, Que W B, *et al*. Tissue expression profile and cellular localization of PHGPx in gonad of goat [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(17): 3653 – 3659. [施力光, 荀文娟, 岳文斌, 等. 山羊 PHGPx 基因在不同组织中的表达特点及性腺中的定位. 中国农业科学, 2010, 43(17): 3653 – 3659.]

Molecular cloning and expression analysis of *Sp-PHGPx* in *Scylla paramamosain*

LIU Chunyun[1], FU Mingjun[2], ZHANG Ziping[1], ZOU Zhihua[1], JIA Xiwei[1], WANG Yilei[1*]

(1. *Key Laboratory of Healthy Mariculture for East China Sea*, *Ministry of Agriculture*, *Fisheries College*, *Jimei University*, *Xiamen* 361021, *China*;
2. *South China Sea Fisheries Research Institute*, *Chinese Academy of Fishery Sciences*, *Guangzhou* 510300, *China*)

Abstract: Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) is one of the members of GPx family, which has its unique ability to reduce hydroperoxides in complex lipids such as phospholipid, cholesterol and so on. PHGPx is a key enzyme in the antioxidant defense systems of living organisms, including crustaceans, which plays important roles in the effect of antioxidant and sexual maturity of male. In this study, expressed sequence tag (EST) of *Scylla paramamosain* PHGPx gene was identified from transcriptome sequencing library and the full length cDNA was cloned by SMART-RACE method, which was named *Sp-PHGPx*. The full-length cDNA of *Sp-PHGPx* is 1 024 bp, including a 5′UTR of 140 bp, a 3′UTR of 341 bp and an open reading frame of 543 bp, encoded a duduced protein of 180 amino acids. Sequence comparison and phylogenetic analysis showed that Sp-PHGPx was clustered with PHGPx (GPx4) of other species, far from GPx1 and GPx2. Quantitative real time PCR revealed that *Sp-PHGPx* was expressed in various tissues of the mature female and male crabs with the highest expression level in testis. During the different stages of gonadal development, there was no significant difference in the development of ovary; while *Sp-PHGPx* was expressed at the highest level in spermatid stage (T2) and was significantly higher than spermatocyte stage (T1) and mature sperm (T3) during the development of testis. Moreover, the expression levels of T2 are higher than these of other stages of ovary development. When under the challenge of LPS, the expression level of *Sp-PHGPx* was up-regulated significantly at 6 h in gill and at 12 h in hepatopancrea compared with control. The expression of *Sp-PHGPx* in gill was induced significantly at 3 h, while there was no significant difference in hepatopancrea when exposed to H_2O_2. Above results suggest that Sp-PHGPx may be involved in immune defense and the male reproduction in *S. paramamosain*.

Key words: *Scylla paramamosain*; PHGPx; gene cloning; expression; gonadal development

Corresponding author: WANG Yilei. E-mail: ylwang@jmu.edu.cn