

鳙鱼微囊藻毒素去毒酶基因 cDNA 全序列的克隆与序列分析*

丁雪芬, 梁旭方**, 汪祖昊, 雷腊梅, 韩博平

(暨南大学生命科学技术学院, 广州 510632)

摘要:淡水鱼类可溶性谷胱甘肽 S-转移酶(soluble glutathione S-transferase, sGST)在微囊藻毒素去毒代谢过程中起着关键作用, 又被称为微囊藻毒素去毒酶. 通过简并引物克隆鳙鱼肝脏 sGST 基因 cDNA 核心序列, 应用 5'-RACE 和 3'-RACE 技术分别扩增该序列的 5' 末端和 3' 末端序列, 最后通过序列拼接获得鳙鱼肝脏 sGST 基因 cDNA 全序列. 序列分析结果表明, 鳙鱼肝脏 sGST 基因 cDNA 全长 934 bp, 其中 5'-UTR 长 104 bp, 3'-UTR 长 158 bp, 编码区 672 bp, 编码 223 个氨基酸. 鳙鱼与海水鱼类、鸟类、哺乳类等不同类群 sGST 的 N-末端功能域氨基酸同源性较高, 达 75% 左右, 而 C-末端功能域氨基酸同源性较低, 仅为 43.6% - 55.9%, 这与脊椎动物 sGST 的 N-末端功能域均存在相同的 GSH 结合位点, 而 C-末端功能域存在不同的底物结合位点相一致. 鳙鱼 sGST 的 C-末端功能域的低同源性可能与其承担微囊藻毒素去毒代谢之特殊功能有关.

关键词:微囊藻毒素去毒酶基因; cDNA 序列; 分子克隆; 鳙鱼

Cloning and analysis of the full-length cDNA sequence of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) microcystin-detoxifzyme gene

DING Xuefen, LIANG Xufang**, WANG Zuhao, LEI Lamei & HAN Boping

(College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, P. R. China)

Abstract: Soluble Glutathione S-transferase (sGST) of freshwater fish is extremely important to microcystin purification from fish body, and therefore is also named microcystin-detoxifzyme. PCR using two degenerated primers, yielded a cDNA fragment of 405 bp from the liver of bighead carp (*Aristichthys nobilis*). This cDNA fragment was completed by 5'- and 3'-RACE. The complete sGST cDNA sequence of bighead carp was 934 bp in length, containing an open reading frame of 672 bp (encoding 223 amino acids), flanked by 104 bp 5'-UTR and 158 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). Comparison of the N-terminal domain and C-terminal domain of bighead carp sGST with rock bream (*Oplegnathus fasciatus*), red sea bream (*Pagrus major*), chicken, mouse, rat and human sGST showed that, the N-terminal domain is highly conserved (75%) in the sGST of fishes, Aves and mammals, while the C-terminal domain has less similarity (43.6% - 55.9%) among different sGST, which is consistent with the different function of the two domains. From the homologous analysis result, we might conclude that, there is a big difference in the C-terminal substrate-binding site between the microcystin-detoxifzyme gene of freshwater fish and the glutathione S-transferase gene of mammals, which seems to be consistent to the special function of this gene in freshwater fish for microcystin detoxification.

Keywords: Microcystin-detoxifzyme gene; cDNA sequence; molecular cloning; bighead carp

湖泊富营养化进程的加速, 导致藻类过量繁殖而形成水华, 同时还产生了大量的藻毒素. 藻毒素中危害

* 国家自然科学基金(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(031886)、广州市科技计划项目(06A1207088)、教育部留学回国人员科研启动资金联合资助. 2006-01-11 收稿; 2007-01-09 收修改稿. 丁雪芬, 女, 1981 年生, 硕士研究生; E-mail: kinki635@sohu.com.

** 通讯作者; E-mail: tliangxf@jnu.edu.cn.

最大的一种是微囊藻毒素(microcystin, MC),可造成野生动物、家畜、家禽等中毒死亡^[1-3],并引发人类肝损伤和肝癌高发等危害^[4,5].微囊藻毒素对人类健康所造成的威胁已引起世界各国公共卫生系统的广泛关注^[6-8].目前,自来水厂主要采用物理、化学方法,通过专门装置去除微囊藻毒素,但随着水体富营养化进程加剧,自来水厂处理成本迅速攀升而不堪重负.因此,利用各种生物去毒酶并通过生态学方法去除微囊藻毒素已开始成为该领域研究热点.淡水鱼类可溶性谷胱甘肽 S-转移酶(soluble glutathione S-transferase, sGST)在天然状态下主要用于微囊藻毒素等天然毒物的去毒,因而淡水鱼类 sGST 基因又被称为微囊藻毒素去毒酶基因.本研究根据已知脊椎动物 sGST 氨基酸保守序列设计 1 对简并引物,利用 RT-PCR 技术扩增鳙鱼肝脏微囊藻毒素去毒酶 cDNA 核心片段,再应用 5'-RACE 和 3'-RACE 技术首次获得鳙鱼肝脏微囊藻毒素去毒酶基因 cDNA 全序列,以期阐明鳙鱼微囊藻毒素去毒分子机理提供新信息.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼 鳙鱼由广州石牌东市场购得.

1.1.2 试剂 SV Total RNA Isolation System 为 Promega 公司产品, TaKaRa RNA LA PCRTM Kit(AMV) Ver.

1.1.1, pMD 18-T Vector、Taq DNA 聚合酶为宝生物工程(大连)有限公司产品,其它试剂均为进口分装或者国产分析纯试剂.

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成 从鳙鱼快速分离肝脏组织,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,以鳙鱼总 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.

1.2.2 鳙鱼微囊藻毒素去毒酶基因 cDNA 克隆 根据已知脊椎动物 sGST 氨基酸序列的保守区域设计合成正、反向简并引物 sGST01F 和 sGST02R(表 1),扩增鳙鱼 sGST 基因 cDNA 核心片段. PCR 扩增条件为: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 1 min, 40℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min.

表 1 鳙鱼 sGST 基因 PCR 引物

Tab. 1 PCR primer sequences for cloning of bighead carp sGST gene

Name of primer	Sequence of primer
sGST01F	5'- ATCCTGAAC TACATCGCAGG(A/G)AA(G/A)TA(T/C) -3'
sGST02R	5'- TGGAGGTTTCCTAGCGCTGCC(A/T/C)GG(T/C)TG -3'
sGST5 RT	5'- (P) AACACAGGCAGGAAG -3'
sGST5 S1	5'- GGATCTCATCATAATGTCTG -3'
sGST5 A1	5'- CTCTGCATACATGTCAATC -3'
sGST5 S2(sGST3 S1)	5'- GCAGAAACAGCTCGGTAA -3'
sGST5 A2	5'- AGCCCCTTCTTTAAGGTC -3'
sGST3 S2	5'- GCCTTACCAAGAATCAGCA -3'

1.2.3 鳙鱼微囊藻毒素去毒酶基因 5' 端 cDNA 扩增(5'-RACE)和 3' 端 cDNA 扩增(3'-RACE)

1.2.3.1 5'-RACE 根据克隆得到的鳙鱼 sGST 基因 cDNA 核心片段设计 5'-RACE 反转录引物 sGST5' RT 和 2 对 PCR 引物 sGST5' S1、sGST5' A1, sGST5' S2、sGST5' A2(表 1). 5'-RACE 的操作按试剂盒推荐方法进行. 取 5 μl 总 RNA(约 5 μg),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 μl、10 × PCR buffer 5 μl、dNTP(2.5 mM each) 4 μl、rTaq 酶 0.25 μl,以及 sGST5' S1、sGST5' A1

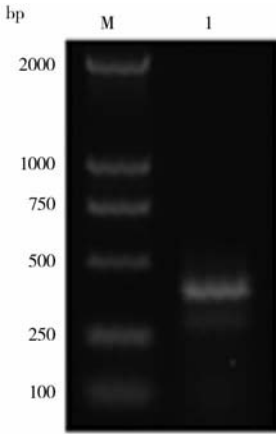


图1 RT-PCR 获得鳊鱼肝脏 sGST 基因 cDNA 片段 1% 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 sGST cDNA fragment generated by RT-PCR from the liver of bighead carp. M: marker

引物各 1 μ l, 加 ddH₂O 至 50 μ l. PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 25 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min. 取首次扩增产物 1 μ l, 用 sGST5' S2、sGST5' A2 引物进行二次 PCR 扩增. 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min.

1.2.3.2 3'-RACE 3'-RACE 的操作参照试剂盒推荐方法进行. 首先以试剂盒提供的 oligo dT-3sites Adaptor primer 为引物进行反转录反应. 然后以 3sites Adaptor primer (试剂盒提供) 和 sGST3' S1 (与 sGST5' S2 序列相同) (表 1) 为引物进行首次 PCR 反应, PCR 反应条件与 5'-RACE 第一次 PCR 相同, 但循环次数为 30 次; 巢式 PCR 所用引物为 3sites Adaptor primer 和 sGST3' S2 (表 1), PCR 反应条件与 5'-RACE 二次 PCR 相同.

1.2.4 PCR 产物测序及序列分析 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 pMD18-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进行测序. 序列同源性分析使用 vector NTI suite 6.0 软件.

2 结果

2.1 鳊鱼肝脏 sGST cDNA 全序列的克隆与分析

以鳊鱼肝脏 cDNA 为模板, 用 sGST01F、sGST02R 简并引物进行 PCR 扩增, 得到 1 个预期片段大小的 PCR 产物 (图 1). 经电泳纯化回收后, 克隆至 pMD18-T 载体. 用 M13 正向引物进行单向测序, 得到一个 405 bp 的 cDNA 片段.

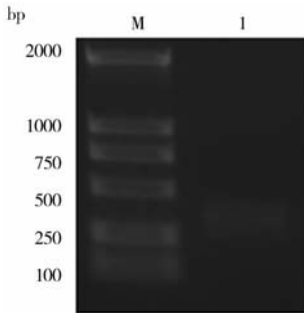


图2 5'-RACE PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 5'-RACE PCR product. M: marker

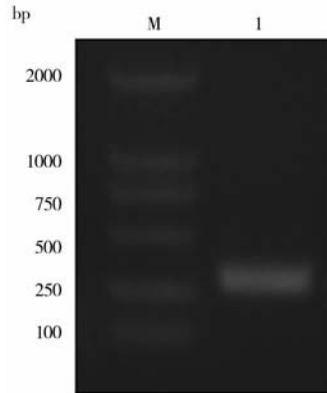


图3 3'-RACE PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 3 3'-RACE PCR product. M: marker

利用 5'-RACE 和 3'-RACE 技术分别从鳊鱼肝脏获得 2 个预期片段大小的 PCR 产物 (图 2, 图 3). 对这 2 个片段进行克隆、测序, 得到分别为 418 bp、269 bp 的 cDNA 片段. 通过序列拼接, 确定鳊鱼 sGST 基因 cDNA 全长为 934 bp, 其中 5' 非翻译区 (5'-UTR) 为 104 bp, 3' 非翻译区 (3'-UTR) 为 158 bp, 开放阅读框 (ORF) 为 672 bp, 编码 223 个氨基酸. polyA 加尾信号为 ATAAA (图 4).

2.2 鳊鱼微囊藻毒素去毒酶序列与结构分析

鳊鱼与条石鲷、真鲷、鸡、大鼠、小鼠、牛、羊、人的 sGST 氨基酸同源性为 55.7% - 66.2% (图 5). 进一步分别比较鳊鱼与条石鲷、真鲷、鸡、大鼠、小鼠、人 sGST 的 N-末端与 C-末端功能域发现, 鱼类、鸟类、哺乳

```

1   GGTACCCTCTGCACACACACACACACTGCTGCACAGCAAAGAGTTCGCTTCATTTT   59
60  GAGAACATTTATTTTATTTTAAAGTGTGCGCTTATTTTGTGAAAATGCTCTGGAAAAGTT 120
1   1                               M S G K V   5
121 GTGTTGCATTACTTCAATGGAAGAGGGAAAAATGGAGTCGGTCCGATGGCTTTTGGCCGCA 180
6   V L H Y F N G R G K M E S V R W L L A A   25
181 GCTGGAGTCGAGTTTGAGGAGGTGTTTCTGACCAAAAAGGAGCATTTTGATAAACTGCTG 240
26  A G V E F E E V F L T K R E H F D K L L   45
241 AATGATGGAGCCCTGATGTTTTCAGCAGGTGCCTTTGGTTGAAATAGATGGGATGCAGCTT 300
46  N D G A L M F Q Q V P L V E I D G M Q L   65
301 GTGCAGTCAAGGCTACTTGAATTACATCGCTGGAAAATACAATCTCTATGGAAAAGAC 360
66  V Q S R A I L N Y I A G K Y N L Y G K D   85
361 CTAAAGAACGGGCTTTGATTGACATGTATGCAGAGGGTACCAGCGATCTAATGGATCTC 420
86  L K E R A L I D M Y A E G T S D L M D L   105
421 ATCATAATGTCTGTTTTCGCTCCACCCGAAAACAAGCAGAAACAGCTCGGTAATATTGAG 480
106 I I M S V F A P P E N K Q K Q L G N I E   125
481 CAAAAGGCAAAGAGCGCTTCTCGCTGTGTTTGAAGGGTCTTGCAAACCTCTCAATTC 540
126 Q K A K E R F L P V F E K G L A N S Q F   145
541 CTGGTGGAAACCAAGTTGAGCCGCGCTGATGTTACCTTCTGGAGGTCACCTCTGATGCTG 600
146 L V G N Q L S R A D V H L L E V T L M L   165
601 CAGGAGTTATCCCTACAATACTGTCAACCTTTCCAAAATCCAGGCGTTCAGGAAAAGA 660
166 Q E L F P T I L S T F P K I Q A F Q E R   185
661 ATGAAGGCCTTACCAAGAATCAGCAAGTCTCAGCCCGCAGTGAAGAAAACCTCTCT 720
186 M K A L P R I S K F L Q P G S A R K P P   205
721 CCTGATGAGGTGTACGTGAAAACGTGAAGGAGGTGTTGAGCCACCTCTTAAGTAGAAG 780
206 P D E V Y V K T V K E V L S H L F K *   223
781 GACCACTTAAAAACATTTAGATGATGTTAATCACTAATTAATTTACAAGCTTCTTATTA 840
841 AACTGAGGCACTAAAATGGACAGATTTATTTGGAATGTACAAGATACTGTCTGGATAAA 900
901 GTAATAATATTGTGATATGCAAAAAAAAAAAAAAAAA 934
    
```

图 4 鳙鱼肝脏 sGST 基因 cDNA 全序列和推测的氨基酸序列. 起始密码子(ATG)用黑体表示, 终止密码子(TAG)用*标出,多聚腺苷酸信号序列(ATAAA)以下划线表示

Fig. 4 The nucleotide sequence of bighead carp sGST cDNA and predicted amino acid sequence.

The ATG start codon is boldfaced and the TAG translation stop codon is marked by “*”.

The underlined (ATAAA) is polyadenylation signal

类等不同类群 sGST 的 N-末端功能域氨基酸同源性较高, 达到 75% 左右, 而这些不同类群 sGST 的 C-末端功能域氨基酸同源性较低, 仅为 43.6% - 55.9% (表 2).

表 2 鳙鱼与其他脊椎动物 sGST 氨基酸序列 N 末端与 C 末端同源性比较(%)

Tab. 2 Amino acid sequences identity of the N-terminal domain and the C-terminal domain of sGST from bighead carp and other vertebrates(%)

种类	bcGST		rbGST		rsbGST		cGST		rGST		mGST	
	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C	N	C
rbGST	76.3	55.9										
rsbGST	71.3	55.0	86.3	73.1								
cGST	77.2	50.4	68.8	44.9	68.8	42.9						
rGST	72.5	49.6	68.8	42.8	65.0	42.1	70.0	54.9				
mGST	68.8	53.0	67.5	47.8	63.8	46.3	68.8	53.7	72.5	58.2		
hGSTA1	73.8	43.6	68.8	43.5	67.5	41.2	78.8	53.7	70.0	49.3	70.0	54.4

bcGST	1	MSGVVVLFHFNGRGKMSVSRWLLAAAGVFEFEEVFLTKREHFDKLLNDGALMFQQVPLVEI	60
rbGST	1	MAGRVVVLFHFNGRGKMSIRWLLTVAGVEFDEMYLTTTRDQYKLLSDGALMFQQVPMVEI	60
rsbGST	1	MAGKVVVLFHFNGRGKMSIRWLLTVAEVEFDEVHLTTRDQLKQLSDGDLMFQQVPMVEI	60
cGST	1	MSGKPVVLFHANTRGRMSVSRWLLAAAGVFEFEKFLKEDLKQLKSDGSLFLFQQVPMVEI	60
rGST	1	MAGKPVVLFHFNGRGKMSVSRWLLAAAGVFEFEEELFETREEFEKLLQQGTLMYEQVPMVEI	60
mGST	1	MAAKPKLYYFNGRGKMSIRWLLAAAGVFEFEEFLETREYQEKMKQDGHLLFGQVPLVEI	60
caGST	1	MAGKPTLHFNGRGRMECIRWLLAAAGVFEFEKFIEKPEDLDKLKNDSLMFQQVPMVEI	60
shGST	1	MAAKPKLYYFNGRGKMSIRWLLAAAGVFEFEEFLETREYQEKMKQDGHLLFGQVPLVEI	60
hGSTA1	1	MAEKPKLHYFNARGRMESTRWLLAAAGVFEFEKFIKSAEDLDKLRNDGYLMFQQVPMVEI	60
		* * * * * * * * * * * * * * * * * *	
bcGST	61	DGMQLVQSRAILNYIAGKYNLYGKDKLERALIDMYAEGTSDMLDIIMSVFAPPENKQKQ	120
rbGST	61	DGMKLVQTKAILNYIAEKYNLHGTPNKDRVTINMYCEGVMDLMMEMIMLPFSTDP-KEK-	120
rsbGST	61	DGMKLIQTKAILNYIAEKYNLHGKDLKDRVMINMYSEGVMIDLMMEMIMLPFKDP-KPK-	120
cGST	61	DGMKMVQTRAILNYIAGKYNLYGKDKLERALIDMYVEGLADLYELIMMNVPQADKKEEH	120
rGST	61	DGMNLVQTRAILRYVAAKYDLYGRNQEQAWIDMYVEGLRDLSDMIMYFPLSLPEEKEMN	120
mGST	61	DGMMLTQTRAILSYLAAKYNLYGKDKLKERVRIDMYADGTQDLMMMIIVAPFKTPKEEES	120
caGST	61	DGMKLVQTRAILNYIATKYNLYGKDKMERALIDMYSEGVDLGMEMHFPPLCPPAEKDAK	120
shGST	61	DGMMLTQTRAILSYLAAKYNLYGKDKLKERVRIDMYADGTQDLMMMIIVAPFKTPKEEES	120
hGSTA1	61	DGMKLVQTRAILNYIASKYNLYGKDIKERALIDMYIEGLADLGMILLPLVPCPPPEEKDAK	120
		*** * * * * * * * * * * * * * * *	
bcGST	121	LGNIEQKAKERFLPVFEKGLA--NSQFLVGNQLSRADVHLLEVTMLQELFPTILSTFPK	178
rbGST	121	LDTIQTKAKERYLPVFEKALT--GPIYLVGGKLSADVQLVECTLMLEEFKPGILADFPN	176
rsbGST	121	LANIEAKATERYLPVFEKVLG--GQIYLVGGKVSADVLLLECTLMLEEFKAGILGDFRN	176
cGST	121	LANALDKAANRYFPVFEKVLKDHGHDFLVGNKLSRADVHLETLILAVEESKPDALAKFPL	180
rGST	121	LEYILQRATTRFFPVYEKALRDHGQDFLVGNRSLWADVQLLEVLMAEECHASVLSGFPL	180
mGST	121	YDLILSRAKTRYFPVFEKILKDHGEAFLVGNQLSWADIQLLEALIMVEELSDAPVLSDFPL	180
caGST	121	LTLIREKTTNRYLPAFENVLKSHGQDYLVGNKLSRADIHLVELLYVVEELDPSLLANFPL	180
shGST	121	YDLILSRAKTRYFPVFEKILKDHGEAFLVGNQLSWADIQLLEALIMVEELSDAPVLSDFPL	180
hGSTA1	121	LALIKEIKNRYFPAFEKVLKSHGQDYLVGNKLSRADIHLVELLYVVEELDSSLISSFPL	180
		* * * * * * * * * * * * * * *	
bcGST	179	IQAFQERMKALPRISKFLPGSARKPPDPVEVYVKTVKEVLSHLFK	223
rbGST	177	LKSFQGRMTLLPAISRFLQPGSKRKPQPDETYVKTIMEVFKIQF-	220
rsbGST	177	VKAFQGRMTRIPAIDFLKPGSKRKPQPDQYVKTVMVEV-----	215
cGST	181	LQSFKARTSNIPNIKKFLQPGSQRKP----RLEE-----	210
rGST	181	LQDFKVRTSQIPTINRFLQPGSQRKPPLDEQSIGTAKDI-----	219
mGST	181	LQAFKTRISNIPTIKKFLQPGSQRKPDPDPYVEVVRTVL-----	220
caGST	181	LKALKARVSSLPVKKFLQPGSQRKPPTDEKKIEEARKV-----	219
shGST	181	LQAFKTRISNIPTIKKFLQPGSQRKPDPDPYVEVVRTVL-----	220
hGSTA1	181	LKALKTRISNLPVKKFLQPGSPRKPMPMEKSLSEARKIFRF---	222
		* * * * * * * * * * * * * * *	

图 5 鳊鱼与其他脊椎动物 sGST 氨基酸序列同源性比较, 相同的氨基酸残基用 * 标出. 鳊鱼 (bcGST, AAI 02541), 条石鲷 (rbGST, AAU 44618), 真鲷 (rsbGST, BAE 06150), 鸡 (cGST, NP_001001777), 大鼠 (rGST, XP_343546), 小鼠 (mGST, BAB 31640), 牛 (caGST, AAB 72239), 羊 (shGST, AAD 42800), 人 (hGSTA1, NP_665683)

Fig. 5 Alignment of the deduced amino acid sequences of sGST from bighead carp and other vertebrates.

The identical residues are indicated by “*”. Bighead carp (bcGST, AAI 02541), rock bream (rbGST, AAU 44618), red sea bream (rsbGST, BAE 06150), chicken (cGST, NP_001001777), mouse (mGST, XP_343546), rat (rGST, BAB 31640), cattle (caGST, AAB 72239), sheep (shGST, AAD 42800), human (hGSTA1, NP_665683)

结合位点^[15-17]. 不同种类 sGST 的 N-末端氨基酸结构域功能基本相同, 而不同种类 sGST 的 C-末端氨基酸结构域决定 sGST 不同的底物结合特性. 由于 C-末端氨基酸结构域的这种特殊性, 使 sGST 超家族的不同成员具有催化许多不同结构化合物反应的能力^[18]. sGST 在体内主要催化 GSH 的巯基 (-SH) 攻击亲电物质的亲电中心, 产生硫醚连接的谷胱甘肽结合物. 因此, 只要化合物有一亲电中心, 无论是原形还是代谢物, 均可与 GSH 结合^[19].

我们克隆得到的鳙鱼 sGST 基因 cDNA 全序列为 934 bp, 编码 223 个氨基酸. 序列分析表明, 该氨基酸序列与人 alpha 型 sGST (GSTA1) 氨基酸序列具有相似的二级结构, 均由 N-末端功能域和 C-末端功能域构成. 鳙鱼 sGST 与海水肉食性鱼类、鸟类、哺乳类 sGST 的 N-末端功能域均高度保守, 这与 sGST 的 N-末端功能域均存在相同的 GSH 结合位点相一致. 鳙鱼 sGST 与海水肉食性鱼类、鸟类、哺乳类 sGST 的 C-末端功能域进行比较发现, 不同类群 sGST 的 C-末端功能域氨基酸同源性低, 这与 sGST 的 C-末端功能域存在不同的底物结合位点相一致. 鳙鱼 sGST 的 C-末端功能域的低同源性与其承担微囊藻毒素去毒代谢之特殊功能相适应.

4 参考文献

- [1] Codd G A. Cynobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. *Water Sci Technol*, 1995, **32**: 149 - 156.
- [2] Dawson R M. The toxicology of microcystins. *Toxicol*, 1998, **36**: 953 - 962.
- [3] Carmichael W W. Health effects of toxin-producing cyanobacteria: "the CyanoHABs". *Hum Ecol Risk Assess*, 2001, **7**: 1393 - 1407.
- [4] Yu S J. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 1995, **10**: 674 - 682.
- [5] Pouria S, Andrade A D, Barbosa J *et al.* Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet*, 1998, **352**: 21 - 26.
- [6] Chorus I, Falconer I R, Salas H J *et al.* Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational water. *J Toxicol Environ Health*, 2000, **3**: 323 - 347.
- [7] Hitzfeld B C, Hoger S J, Dietrich R. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environ Health Perspect*, 2000, **10**: 113 - 122.
- [8] 谢 平. 水生动物体内的微囊藻毒素及其对人类健康的潜在威胁. 北京: 科学出版社, 2006.
- [9] Hayes J D, Flanagan J U, Jowsey I R. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2004, **45**: 51 - 88.
- [10] Dirr H, Reinemer P, Huber R. X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. *Eur J Biochem*, 1994, **220**: 645 - 661.
- [11] 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. *Protein Sci*, 2005, **14**: 2361 - 2366.
- [12] Sheehan D, Casey J P. Microbial glutathione S-transferases. *Com Biochem Physiol*, 1993, **104**: 1 - 6.
- [13] Whalen R, Boyer T. Human glutathione S-transferase. *Semin Liver Dis*, 1998, **18**(4): 345 - 358.
- [14] 谢 平. 鲢、鳙与藻类水华控制. 北京: 科学出版社, 2003.
- [15] Best J H, Eddy F B, Codd G A. Effects of Microcystis cells, cell extracts and lipopolysaccharide on drinking and liver function in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *Aquat Toxicol*, 2003, **64**: 419 - 426.
- [16] 聂立红, 王声勇, 胡毅玲. 谷胱甘肽硫-转移酶研究进展. 中国病理生理杂志, 2000, **16**(11): 1240 - 1243.
- [17] Wiegand C, Pflugmacher S, Giese M *et al.* Uptake, toxicity, and effects on detoxication enzymes of atrazine and trifluoroacetate in embryos of zebrafish. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2000, **45**: 122 - 131.
- [18] Oakley A J, Lo Bello M, Nuccetelli M *et al.* The ligandin (non-substrate) binding site of human Pi class glutathione transferase is located in the electrophile bindingsite (H site). *J Mol Biol*, 1999, **291**(4): 913 - 926.
- [19] Adriana M Doi1, Robert T Pham, Erin M Hughes, David S Barber, Evan P. Gallagher Molecular cloning and characterization of a glutathione S-transferase from largemouth bass (*Micropterus salmoides*) liver that is involved in the detoxification of 4-hydroxynonenal. *Biochemical Pharmacology*, 2004, **67**: 2129 - 2139.