

带格式的：编号方式：连续

学校编码：10384  
学号：22620061152362

分类号\_密级\_  
UDC\_

厦门大学

硕士学位论文

# 杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)异物代谢酶对 苯并[a]芘暴露和细菌感染的应答特性研究

## Response characteristic of *CYP7A1* and *abGST*sigma of Variously Colored Abalone(*Haliotis diversicolor* Reeve,1846) with bacterial challenge and BaP exposure

徐丹丹

指导教师姓名：王克坚 教授

专业名称：环境科学

论文提交日期：2009年5月

论文答辩时间：2009年6月

学位授予日期：2009年7月

答辩委员会主席：\_\_\_\_\_

评阅人：\_\_\_\_\_

2009年5月

带格式的：字体：非倾斜

删除的内容: **challenged**

带格式的：字体颜色：黑色

带格式的：字体：三号，字体颜色：黑色

删除的内容:

带格式的：字体颜色：黑色

带格式的：字体颜色：黑色

带格式的：字体颜色：黑色

带格式的：字体颜色：黑色

带格式的：字体颜色：黑色

带格式的：字体颜色：黑色

带格式的：字体：Times New Roman，字体颜色：黑色

带格式的：字体：Times New Roman，字体颜色：黑色

带格式的：居中，缩进：左 1.28 字符，首行缩进：0.13 字符，行距：固定值 29 磅，对齐网格

带格式的：正文，居中，缩进：左 1.28 字符，首行缩进：0.13 字符，行距：固定值 29 磅，对齐网格

带格式的：字体颜色：黑色

删除的内容:

带格式的：字体：Times New Roman，字体颜色：黑色

带格式的：字体：(默认) Times New Roman，(中文) 楷体\_GB2312，字体颜色：黑色

带格式的：居中

## 厦门大学学位论文原创性声明

删除的内容:

带格式的: 字体颜色: 黑色

带格式的: 字体: Times New Roman, 字体颜色: 黑色

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下, 独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果, 均在文中以适当方式明确标明, 并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外, 该学位论文为( )课题(组)的研究成果, 获得( )课题(组)经费或实验室的资助, 在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称, 未有此项声明内容的, 可以不作特别说明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

( ) 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

( ) 2. 不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人（签名）：

年 月 日

带格式的：字体：Times New Roman，三号，字体颜色：黑色，不检查拼写或语法

带格式的：定义网格后不调整右缩进，段落间距段前：24 磅，段后：24 磅，行距：1.5 倍行距，不调整西文与中文之间的空格，不调整中文和数字之间的空格

删除的内容：

带格式的：字体：Times New Roman，字体颜色：黑色

带格式的：字体：Times New Roman，字体颜色：黑色

带格式的：字体：Times New Roman，字体颜色：黑色

带格式的 ... [1]

带格式的 ... [2]

带格式的 ... [3]

带格式的 ... [4]

带格式的 ... [5]

带格式的 ... [6]

带格式的 ... [7]

带格式的 ... [8]

带格式的 ... [9]

带格式的 ... [10]

带格式的 ... [11]

带格式的 ... [12]

带格式的 ... [13]

带格式的 ... [14]

带格式的 ... [15]

带格式的 ... [16]

带格式的 ... [17]

带格式的 ... [18]

带格式的 ... [19]

带格式的 ... [20]

带格式的 ... [21]

带格式的 ... [22]

带格式的 ... [23]

带格式的 ... [24]

带格式的 ... [25]

带格式的 ... [26]

带格式的 ... [27]

带格式的 ... [28]

带格式的 ... [29]

带格式的 ... [30]

带格式的 ... [31]

带格式的 ... [32]

带格式的：字体颜色：黑色

带格式的 ... [33]

带格式的：居中

厦门大学博硕士学位论文摘要库

# 目录

缩略语中英文对照表..... i

中文摘要..... iii

英文摘要..... v

第一章 绪论..... 1

    第一节 谷胱甘肽硫转移酶研究进展..... 1

    第二节 细胞色素 P450 的研究进展..... 6

    第三节 本研究的主要内容和技術路线..... 11

第二章 杂色鲍细胞色素 P450 (*CYP7A1*) 基因、谷胱甘肽硫转移酶  
    GST 基因全长 cDNA 序列的克隆与分析..... 13

    第一节 材料与方 法..... 13

        1 材料..... 13

        2 方法..... 15

    第二节 结果..... 20

        1 总 RNA 的提取..... 20

        2 3'RACE 扩增..... 21

        3 5'RACE 扩增..... 22

        4 全长 cDNA 序列的扩增..... 22

        5 杂色鲍 *CYP7A1* 序列分析..... 25

        6 杂色鲍 abGSTsigma 序列分析..... 28

    第三节 讨论..... 28

第三章 BAP 暴露对杂色鲍 ABGSTSIGMA, *CYP7A1* 基因表达及  
    GST 酶活性的诱导研究..... 30

带格式的

带格式的 ... [34]

带格式的 ... [35]

带格式的: 字体颜色: 黑色

带格式的 ... [36]

删除的内容: 12

删除的内容: 1

删除的内容: 12

删除的内容: 1

删除的内容: 17

删除的内容: 6

删除的内容: 22

删除的内容: 11

删除的内容: (...)

带格式的 ... [37]

带格式的 ... [38]

删除的内容: (ABGSTSIGMA)

删除的内容: 24

删除的内容: 13

删除的内容: 24

删除的内容: 13

删除的内容: 24

删除的内容: 13

删除的内容: 24

删除的内容: 13

删除的内容: 26

删除的内容: 15

删除的内容: 31

删除的内容: 20

删除的内容: 2 ...

删除的内容: 32

删除的内容: 21

删除的内容: '

删除的内容: 33

删除的内容: 22

删除的内容: 33

删除的内容: 22

删除的内容: 36

删除的内容: 24

删除的内容: 39

删除的内容: 28

删除的内容: 39

删除的内容: 28

带格式的 ... [41]

删除的内容: 41

带格式的: 居中

第一节 材料与方法	30	删除的内容: 41
1 材料	30	删除的内容: 30
2 方法	31	删除的内容: 41
第二节 结果	35	删除的内容: 30
1 总 RNA 的提取	35	删除的内容: 42
2 扩增效率分析	36	删除的内容: 31
3 杂色鲍 <i>CYP7A1</i> , GST 基因组织表达差异分析	36	删除的内容: 46
4 <i>CYP7A1</i> , GST 基因 BaP 诱导时间效应关系	36	删除的内容: 35
5 GST 酶活测定结果	42	删除的内容: 46
第三节 讨论	43	删除的内容: 35
第四章 <b>细菌感染对杂色鲍 <i>ABGSTSIGMA</i>, <i>CYP7A1</i> 基因表达及 GST 酶活性的诱导研究</b>	48	删除的内容: 47
第一节 材料与方法	48	删除的内容: 36
1 材料	48	删除的内容: 47
2 方法	49	删除的内容: 36
第二节 结果	51	删除的内容: 47
1 总 RNA 的提取	51	删除的内容: 36
2 <i>CYP7A1</i> , GST 基因细菌诱导时间效应关系	51	删除的内容: 47
3. 细菌攻毒对 GST 酶活的影响	55	删除的内容: 36
第三节 讨论	57	删除的内容: 36
结 语	60	删除的内容: 36
参考文献	63	删除的内容: 36
在学期间参加的科研项目及成果	69	删除的内容: 36
致 谢	70	删除的内容: 36

删除的内容: 41

删除的内容: 30

删除的内容: 41

删除的内容: 30

删除的内容: 42

删除的内容: 31

删除的内容: 46

删除的内容: 35

删除的内容: 46

删除的内容: 35

删除的内容: 47

删除的内容: 36

删除的内容: 47

删除的内容: 36

删除的内容: 36

删除的内容: 36

删除的内容: 错误! 未定义书签 ... 42

删除的内容: 53

删除的内容: 42

删除的内容: 54

删除的内容: 43

带格式的 ... 43

删除的内容: **ABGSTSIGMA**

删除的内容: **杂色鲍** ... 44

删除的内容: 59

删除的内容: 485947

删除的内容: 59

删除的内容: 485947

删除的内容: 59

删除的内容: 496048

删除的内容: 60

删除的内容: 516250

删除的内容: 62

删除的内容: 516250

删除的内容: 62

删除的内容: 62

删除的内容: 516250

删除的内容: 62

删除的内容: 556654

删除的内容: 66

删除的内容: 576856

带格式的 ... 45

带格式的 ... 46

带格式的 ... 47

## CONTENTS

<b>Lists of abbreviation</b> .....	i
<b>Abstract in Chinese</b> .....	iii
<b>Abstract in English</b> .....	v
<b>Chapter 1: Introduction</b> .....	1
Section 1: <b>Research progress of glutathione S - transferases (GSTs)</b> .....	1
Section 2: <b>Research progress of cytochrome P450</b> .....	6
Section 3: <b>Technical protocol, purpose and significance of studies</b> .....	11
<b>Chapter 2: Cloning and sequence analysis of P450(CYP7A1) and abGSTsigma of abalone</b> .....	13
Section 1: <b>Materials and methods</b> .....	13
1 Materials.....	13
2 Methods.....	15
Section 2: <b>Results</b> .....	20
1 Isolation of total RNA.....	20
2 3' Rapid Amplification of cDNA End.....	21
3 5' Rapid Amplification of cDNA End.....	21
4 Full-length cDNA sequence.....	22
5 Sequence analyse of <i>CYP7A1</i> .....	24
6 Sequence analyse of abGSTsigma.....	28
Section 3: <b>Discussion</b> .....	28
<b>Chapter 3: Study of the abGSTsigma, <i>CYP7A1</i> gene expression and the activity of GSTs in abalone exposed to BaP</b> .....	30
Section 1: <b>Materials and methods</b> .....	30

带格式的	
删除的内容:	
删除的内容:	
删除的内容: 分页符	
带格式的: 字体颜色: 黑色	
删除的内容: ... [51]	
带格式的: ... [52]	
带格式的: 字体颜色: 黑色	
带格式的: ... [53]	
带格式的: 字体颜色: 黑色	
带格式的: ... [54]	
带格式的: ... [55]	
带格式的: ... [56]	
带格式的: ... [57]	
带格式的: ... [58]	
带格式的: ... [59]	
删除的内容:	
带格式的: ... [60]	
删除的内容:	
带格式的: ... [61]	
删除的内容:	
带格式的: ... [62]	
带格式的: ... [63]	
带格式的: ... [64]	
带格式的: 字体颜色: 黑色	
带格式的: ... [65]	
带格式的: ... [66]	
带格式的: ... [67]	
带格式的: ... [68]	
带格式的: ... [69]	
带格式的: ... [70]	
带格式的: ... [71]	
带格式的: ... [72]	
删除的内容: s	
带格式的: ... [73]	
带格式的: 字体颜色: 黑色	
带格式的: ... [74]	
带格式的: 字体颜色: 黑色	
删除的内容: full	
带格式的: ... [75]	
带格式的: 字体颜色: 黑色	
带格式的: ... [76]	
带格式的: 字体颜色: 黑色	
删除的内容: sequence	
带格式的: ... [77]	
带格式的: ... [78]	
删除的内容: sequence	
带格式的: ... [79]	
带格式的: ... [80]	
带格式的: 字体颜色: 黑色	
带格式的: ... [81]	
带格式的: ... [82]	
带格式的: ... [83]	
带格式的: 居中	

CONTENTS

1.1 Materials..... 30

1.2 Methods..... 31

**Section 2: Results..... 35**

1 Isolation of total RNA..... 35

2 Analysis of amplify efficiency ..... 36

3 Analysis of differential expression of *CYP7A1* and abGSTsigma ..... 36

4 Expression of *CYP7A1* and abGSTsigma in abalone exposed to BaP ..... 36

5 GST activity ..... 36

**Section 3: Discussion ..... 43**

**Chapter 4: Study of the abGSTsigma, *CYP7A1* gene expression and the activity of GSTs in abalone challenged with bacteria..... 48**

**Section 1: Materials and methods..... 48**

1 Materials ..... 48

1 Methods..... 49

**Section 2: Results..... 51**

1 Isolation of total RNA..... 51

2 Expression of *CYP7A1* and abGSTsigma in abalone challenged with bacteria 51

3 GST activity..... 55

**Section 3: Discussion ..... 57**

**Summary..... 60**

**References..... 63**

**Research projects involved and papers published ..... 69**

**Acknowledgements..... 70**

- 带格式的 ... [84]
- 带格式的 ... [85]
- 带格式的 ... [86]
- 带格式的 ... [87]
- 带格式的 ... [88]
- 带格式的 ... [89]
- 带格式的 ... [90]
- 删除的内容:
- 带格式的 ... [91]
- 带格式的 ... [92]
- 带格式的 ... [93]
- 带格式的 ... [94]
- 带格式的: 字体颜色: 黑色
- 带格式的 ... [95]
- 带格式的 ... [96]
- 删除的内容: 47
- 带格式的 ... [97]
- 带格式的 ... [98]
- 带格式的: 字体颜色: 黑色
- 删除的内容: 47
- 带格式的 ... [99]
- 带格式的: 字体颜色: 黑色
- 删除的内容: 1
- 带格式的 ... [100]
- 删除的内容: 47
- 带格式的 ... [101]
- 删除的内容: 2
- 带格式的: 字体颜色: 黑色
- 删除的内容: 48
- 带格式的 ... [102]
- 带格式的: 字体颜色: 黑色
- 删除的内容: 50
- 带格式的 ... [103]
- 带格式的 ... [104]
- 删除的内容: 50
- 带格式的 ... [105]
- 带格式的: 字体颜色: 黑色
- 删除的内容: 50
- 带格式的 ... [106]
- 带格式的 ... [107]
- 删除的内容: 54
- 带格式的 ... [108]
- 带格式的 ... [109]
- 删除的内容: 56
- 带格式的 ... [110]
- 带格式的 ... [111]
- 带格式的: 字体颜色: 黑色
- 删除的内容: 59
- 带格式的 ... [112]
- 带格式的: 字体颜色: 黑色
- 删除的内容: 62
- 带格式的 ... [113]
- 带格式的 ... [114]
- 带格式的 ... [115]
- 带格式的: 居中

缩略语中英文对照表

缩写	英文	中文
<b>Amp</b>	Ampicillin	氨苄青霉素
AMV-RT	Avian myeloblastosis virus reverse transcriptase	禽类成髓细胞 瘤病毒反转录酶
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
BLAST	Basic local alignment search tool	基本局域联想搜寻工具
bp	Base pair	碱基对
<b>cDNA</b>	Complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
cfu	Clonal formation unit	单克隆菌落形成单位
d	Day	天
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
dNTPs	Deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
<b>DTT</b>	Dithiothreitol	二硫苏糖醇
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid	已二胺四乙酸
g	Gram	克
GST/GSTrs	Glutathione s-transferase	谷胱甘肽硫转移酶
h	Hour	小时
kDa	Kilodalton	千道尔顿
L	Litre	升
LB	Luria-Bertani medium	LB 培养基
min	Minute	分钟
mL	Millilitre	毫升
mRNA	Messenger ribonucleic acid	信使RNA
NCBI	National center for biotechnology information	美国国家生物信息中心
ng	Nanogram	纳克
ORF	Open reading frame	开放阅读框
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液

- 带格式的
- 删除的内容: ——分页符——
- 带格式的: 字体颜色: 黑色
- 带格式的 (... [116])
- 删除的内容: (... [117])
- 带格式的 (... [118])
- 带格式的 (... [119])
- 删除的内容: <sp>Amp
- 带格式的 (... [120])
- 删除的内容: (... [121])
- 删除的内容: (... [122])
- 带格式的 (... [122])
- 带格式的 (... [123])
- 带格式的 (... [124])
- 删除的内容: (... [125])
- 带格式的 (... [126])
- 带格式的 (... [127])
- 删除的内容: (... [128])
- 带格式的: 字体颜色: 黑色 (... [128])
- 删除的内容: (... [129])
- 删除的内容: (... [130])
- 带格式的: 字体颜色: 黑色 (... [130])
- 删除的内容: cDNA (... [131])
- 删除的内容: ... (... [131])
- 带格式的 (... [132])
- 带格式的 (... [133])
- 删除的内容: (... [134])
- 带格式的 (... [135])
- 带格式的 (... [136])
- 删除的内容: (... [137])
- 带格式的 (... [137])
- 删除的内容: (... [138])
- 删除的内容: DTT (... [138])
- 带格式的 (... [139])
- 带格式的 (... [140])
- 带格式的: 字体颜色: 黑色 (... [140])
- 删除的内容: (... [141])
- 带格式的 (... [141])
- 删除的内容: 毫 (... [142])
- 带格式的: 字体颜色: 黑色 (... [142])
- 删除的内容: (... [142])
- 带格式的 (... [142])
- 带格式的 (... [143])
- 带格式的 (... [144])
- 带格式的 (... [145])
- 带格式的 (... [146])

PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链反应	带格式的 ... [152]
RACE	Rapid amplification of cDNA ends	快速扩增cDNA末端	删除的内容:
RT-PCR	Reverse-transcriptase	反转录-聚合酶链反应	带格式的 ... [153]
	polymerase chain reaction		带格式的 ... [154]
rpm	revolutions per minute	转数 / 分	带格式的 ... [155]
RQ	Relative quantification	相对定量值	带格式的: 缩进: 首行缩进: 8 字符
SMART	Switching mechanism at	转录本5'末端转换机制	带格式的 ... [157]
	5' end of RNA transcript		带格式的: 字体颜色: 黑色
TEMED	Tetramethylethylenediamine	四甲基二乙胺	删除的内容:
Tris	Tris(Hydroxymethyl)aminomethane	三羟甲基氨基甲烷	带格式的: 字体: (默认) Times New Roman, 字体颜色: 黑色
UTR	Untranslated region	非转录区域	带格式的 ... [158]
			带格式的: 字体: (默认) Times New Roman, 字体颜色: 黑色
			带格式的 ... [159]
			带格式的: 缩进: 首行缩进: 8 字符
			带格式的 ... [160]
			带格式的 ... [161]
			带格式的 ... [162]
			带格式的: 字体颜色: 黑色

带格式的: 居中

## 中文摘要

杂色鲍 (*Haliotis diversicolor*) 属软体动物门, 腹足纲, 前鳃亚纲, 原始腹足目, 鲍科, 是我国南方鲍种, 因其生长迅速, 经济价值高, 在南海海域得到广泛养殖。但长期以来遭受疾病困扰, 致使鲍鱼养殖业经常遭受重大损失, 而迄今尚无有效的免疫防治措施。为探索鲍的免疫相关机制, 本实验室前期利用 SSH 技术, 构建了细菌攻毒杂色鲍血淋巴细胞 SSH cDNA 文库, 发现细菌感染下杂色鲍血淋巴细胞中细胞色素 P450 (*CYP7A1*) 与谷胱甘肽硫转移酶 (*abGSTsigma*) 基因上调表达, 推测在鲍体内 *CYP7A1* 与 *abGSTsigma* 不仅参与异源物质的代谢过程, 也可能参与机体的免疫应答过程。本研究拟在此基础上, 对杂色鲍分别进行 BaP 暴露与细菌攻毒, 观察在两个不同刺激过程中 *CYP7A1* 与 *abGSTsigma* 基因分别在杂色鲍体内的诱导表达情况, 从而对 *CYP7A1* 与 *abGSTsigma* 是否参与异源物质的代谢以及可能的免疫应答过程做出分析。取得的主要研究成果如下。

**1. 利用 RACE 技术克隆了杂色鲍 *CYP7A1* 与 *abGSTsigma* cDNA 全长序列:** *CYP7A1* cDNA 序列 (GeneBank 登录号为 EF587282) 全长 2185bp, 包含一个 1494bp 的开放阅读框, 编码 498 个氨基酸, 其理论分子量为 57557.0Da, 等电点为 6.56。 *abGSTsigma* cDNA 序列全长 1328bp (GeneBank 登录号为 EF546619)。包含有一个 624bp ORF, 编码 208 个氨基酸, 其理论分子量为 23.67KDa, 等电点为 5.67。

**2. *CYP7A1* 与 *abGSTsigma* mRNA 在健康杂色鲍的存在情况:** 利用 Real-time PCR 技术检测了 *CYP7A1* 与 *abGSTsigma* 在健康杂色鲍体内的不同组织器官 (鳃、血淋巴细胞、消化腺、外套膜、腹足、上足、性腺、肾、粘液腺) 中的转录表达情况, 结果表明 *abGSTsigma*、*CYP7A1* 基因均广泛的在各种组织中表达。其中外套膜, 鳃等表达量较高, 腹足, 消化腺和次之, 血淋巴细胞表达量最低。

**3. 在 BaP 暴露条件下 *CYP7A1* 与 *abGSTsigma* 两种基因在杂色鲍不同组织中的表达变化:** 在 BaP 诱导下 *abGSTsigma* 在消化腺、鳃、外套膜、血淋巴细胞 4 个组织中均上调表达, 酶活性也有提高。而 *CYP7A1* 则仅在血淋巴细胞中有上调表达, 在外套膜、消化腺、鳃中无上调表达。

带格式的

删除的内容: 分页符

删除的内容: &lt;sp&gt;

... [163]

带格式的: 字体颜色: 黑色

带格式的 ... [164]

带格式的 ... [165]

带格式的 ... [166]

删除的内容: ,

带格式的 ... [167]

带格式的 ... [168]

带格式的 ... [169]

带格式的 ... [170]

带格式的 ... [171]

带格式的 ... [172]

带格式的 ... [173]

带格式的 ... [174]

带格式的 ... [175]

带格式的 ... [176]

带格式的 ... [177]

带格式的 ... [178]

带格式的 ... [179]

带格式的 ... [180]

带格式的 ... [181]

带格式的 ... [182]

带格式的 ... [183]

带格式的 ... [184]

带格式的 ... [185]

带格式的 ... [186]

删除的内容: ,

带格式的 ... [187]

带格式的 ... [188]

带格式的 ... [189]

带格式的 ... [190]

带格式的 ... [191]

带格式的 ... [192]

带格式的 ... [193]

带格式的 ... [194]

删除的内容: ,

带格式的 ... [195]

带格式的 ... [196]

带格式的: 字体颜色: 黑色

带格式的 ... [197]

带格式的: 居中

4. 在细菌攻毒条件下 *CYP7A1* 与 *abGSTsigma* 两种基因在杂色鲍不同组织中的表达变化: *abGSTsigma* 在被检测的 4 个组织中均显著上调表达, 酶活性也有提高。而 *CYP7A1* 则仅在血淋巴细胞中有上调表达, 在消化腺、鳃中无上调表达。

5. 研究结果表明 *abGSTsigma* 可能参与了免疫应答过程: *abGSTsigma* 基因在细菌感染和 BaP 暴露下都在不同组织中显著表达, 表明杂色鲍 *abGSTsigma* 基因可能参与鲍体内异源物质代谢与免疫应答两个过程。而 *CYP7A1* 基因仅在血淋巴细胞中表达, 推测在杂色鲍体内, *CYP7A1* 可能与免疫应答过程相关, 而与异源物质代谢相关性较小。

关键词: 杂色鲍; *CYP7A1*; GST; BaP; 细菌感染; 免疫调节

- 删除的内容: ,
- 带格式的: 字体: Times New Roman, 加粗, 字体颜色: 黑色
- 带格式的: 字体: Times New Roman, 字体颜色: 黑色
- 带格式的: 缩进: 首行缩进: 2 字符
- 删除的内容: ,
- 带格式的: 字体: 小四, 字体颜色: 黑色
- 带格式的: 字体: 小四, 字体颜色: 黑色
- 带格式的: 字体: 小四, 加粗, 字体颜色: 黑色
- 删除的内容: ,
- 带格式的: 字体: 小四, 字体颜色: 黑色
- 带格式的: 首行缩进: 0 字符
- 带格式的: 字体颜色: 黑色
- 删除的内容: 是否参与
- 带格式的: 字体颜色: 黑色
- 带格式的: 字体: 小四, 字体颜色: 黑色
- 带格式的 (... [198])
- 带格式的 (... [199])
- 带格式的: 字体颜色: 黑色
- 删除的内容: 了
- 带格式的 (... [200])
- 带格式的: 字体颜色: 黑色
- 删除的内容: 和免疫应答等西
- 带格式的 (... [201])
- 带格式的 (... [202])
- 带格式的: 字体颜色: 黑色
- 删除的内容: ,
- 带格式的: 字体颜色: 黑色
- 带格式的 (... [203])
- 带格式的: 字体颜色: 黑色
- 删除的内容: ab
- 带格式的 (... [204])
- 删除的内容: sigma
- 带格式的: 字体颜色: 黑色
- 带格式的: 两端对齐
- 带格式的: 居中

**ABSTRACT**

Abalones, belonging to one of the largest marine gastropod mollusks, are economically important seafood in aquaculture worldwide. In order to study the immunological mechanisms of the abalone, a forward subtractive suppression hybridization (SSH) library from haemocytes of *H. diversicolor* challenged with bacteria was constructed. P450 (*CYP7A1*) and GST(abGSTsigma) were selected.

Cytochrome P450 and glutathione s-transferase (GST) are both very important enzymes which have been found in all living organisms systems examined. These two enzymatic systems are able to metabolize a phenomenal number of endogenous and exogenous compounds and have been regarded as key objects in the biology field because of their diversity in structures and functions. The research of these two enzymatic systems mostly focus on the detoxification of xenobiotics. In order to study the relationship between the abGSTsigm, *CYP7A1* and the immunological system, the abalones were exposed to BaP and bacteria indepently. Real-time PCR was used to monitor the express pattern during the exposure.

The following results were obtained:

1. Full-length of *CYP7A1* and abGSTsigma cDNA were cloned. A full-length cDNA of *CYP7A1* (GenBank accession number EF587282) was 2185 bp containing an open reading frame of 1494 bp, encoding 498 amino acid residues with a predicted protein molecular weight of 57557.0Da and an estimated pI of 5.56. A full-length cDNA of a sigma class GST (abGSTsigma) (GenBank accession number EF546619) was 1328 bp containing an open reading frame of 624 bp, encoding 208 amino acid residues with a predicted protein molecular weight of 23.67 kDa and an estimated pI of 5.67.
2. The abGSTsigma mRNA and *CYP7A1* mRNA were distributed in multiple tissues tested and was highly demonstrated in the gill, mantle and kidney of normal abalones.
3. In BaP exposed abalone, the abGSTsigma gene was signigicantly expressed in the hemocytes, gill, mantle and digestive gland and the total GSTs enzyme was

带格式的: 字体颜色: 黑色

带格式的 ... [205]

带格式的: 字体: Times New Roman, 字体颜色: 黑色

带格式的: 两端对齐

带格式的 ... [206]

删除的内容: 、

带格式的 ... [207]

带格式的: 项目符号和编号

带格式的 ... [208]

带格式的 ... [209]

带格式的 ... [210]

带格式的: 居中

also induced in the four tissues.

4. In bacteria-challenged abalone, the abGSTsigma gene and total GSTs enzyme were also significantly expressed in the four tissues.

5. The CYP7A1 gene was only induced in hemocytes in both bacteria-challenged and BaP exposed.

The preliminary work revealed that the sigma class glutathione S-transferase gene abGSTsigma, a phase II detoxification enzyme, had a positive response to bacterial challenge, and that will lead to an insightful study on elucidating the interactions between immune responses and biotransformation exerted by abGSTsigma.

**Key words:** Variously Colored Abalone; CYP7A1; GST; BaP; Bacterial challenge

带格式的: 字体: Times New Roman, 字体颜色: 黑色

带格式的 (... [211])

带格式的 (... [212])

带格式的 (... [213])

带格式的 (... [214])

删除的内容: ...: (... [215])

带格式的: 字体: (默认) Times New Roman, 字体颜色: 黑色

删除的内容: ;

带格式的: 字体: (默认) Times New Roman, 字体颜色: 黑色

删除的内容: ;

带格式的: 字体: (默认) Times New Roman, 字体颜色: 黑色

删除的内容: ab

带格式的 (... [216])

删除的内容: sigma;

带格式的 (... [217])

删除的内容: ;

带格式的 (... [218])

带格式的: 缩进: 左侧: 0.63 厘米, 段落间距段前: 24 磅, 段后: 24 磅

带格式的: 正文, 左

带格式的: 字体颜色: 自动设置

带格式的: 居中

# 第一章 绪论

## 第一节 谷胱甘肽硫转移酶研究进展

谷胱甘肽硫转移酶 (glutathione S - transferases, GSTs) 是一组具有多种生理功能的蛋白质, 主要存在细胞液中, 是污染物在体内生物转化相 II 反应过程中的重要酶。40 多年前在玉米中首次发现了 GST, 接下来又在其他植物和高等动物(含陆生和水生)中相继发现<sup>[1]</sup>, 现已发现它们广泛存在于包括植物、动物和细菌在内的各种生物体内, 它们约占真核或原核细胞总蛋白的 1%<sup>[2]</sup>。

GSTs 能催化还原型的谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 的巯基 (-SH) 结合到疏水的化合物上, 使亲电子的化合物变成亲水的物质, 易于从胆汁或尿液中排泄<sup>[3]</sup>。通过这种方式将体内各种有潜在毒性的物质及亲脂性化合物降解排出。

GSTs 的活性可以被诱导, 通常被其参与代谢的亲电子化合物所诱导。GSTs 在机体有毒化合物的代谢、保护细胞免受急性毒性化学物质攻击中起到重要作用。此外, 亲电子致癌物可被 GSTs 解毒, 致突变剂与 DNA 大分子共价结合能激发某些肿瘤的形成, 所以 GSTs 有抑制细胞癌变的功能。

### 1.1 GSTs 分类

GSTs 是由 23-29KDa 的不同亚基构成的二聚体, 每一类 GST 同工酶中组成的亚基种类有多种, 因此编码 GSTs 同工酶的基因是一个巨大的超基因家族。GSTs 超家族包括胞质 GSTs 和线粒体 GSTs 两大类。基于氨基酸序列的相似性, 脊椎动物中可溶性 GSTs 根据基因结构不同可分 7 类:  $\alpha\mu\pi\theta\kappa\sigma\zeta$ <sup>[3-10]</sup>。其他类的胞质 GSTs 也相继在非哺乳动物中被发现, 它们包括植物、昆虫、细菌、真菌、寄生虫和鱼类等<sup>[9,11-14]</sup>。在同一类中, 不同 GSTs 同工酶氨基酸的同源性至少为 40%; 而不同的 GSTs 中, 氨基酸同源性不到 30%。

### 1.2 GSTs 的基本结构

GST 是一个超基因家族。在 N 端存在较高的保守区域。研究不同类型的 GST 的结构表明, 尽管不同类型的 GST 序列差异很大, 但 GST 的二级结构和高级结构具有相似性<sup>[10]</sup>。至今报道的所有可溶性 GSTs 都有相似的三级结构。

GSTs 是由 23-29kDa 的不同亚基构成的球状二聚体蛋白, 由 200 至 240 个氨基酸组成。尽管不同类 GSTs 间序列同源性不高, 但它们都遵循一个规范的折叠

带格式的 ... [219]

删除的内容: -----分页符-----

删除的内容:

带格式的 ... [220]

带格式的 ... [221]

删除的内容: ... [222]

删除的内容: ... [223]

带格式的 ... [224]

带格式的 ... [225]

带格式的 ... [226]

删除的内容: (

带格式的 ... [227]

删除的内容: )

带格式的 ... [228]

删除的内容: (

带格式的 ... [229]

删除的内容: )

带格式的 ... [230]

删除的内容: (-SH)

带格式的 ... [231]

删除的内容: ... [232]

删除的内容: <sup>4</sup>

带格式的 ... [233]

删除的内容: <sup>1</sup>

带格式的 ... [234]

带格式的: 上标

删除的内容: <sup>1</sup>

带格式的 ... [235]

删除的内容: <sup>10</sup>

删除的内容: <sup>9H</sup>

带格式的: 字体颜色: 黑色

带格式的 ... [236]

删除的内容: <sup>12</sup>

带格式的 ... [237]

删除的内容: <sup>11-</sup>

带格式的 ... [238]

删除的内容: <sup>15</sup>

删除的内容: <sup>14]</sup>

带格式的 ... [239]

删除的内容:

删除的内容: <sup>11</sup>

带格式的 ... [240]

删除的内容:

带格式的: 居中

方式, 每个亚基的多肽链形成两个结构域。亲水的 G 功能区: N-末端氨基酸结构域 80 个氨基酸采用类似于硫氧还蛋白拓扑结构的折叠方式来折叠, 排列形成 4 股  $\beta$  折叠和三股  $\alpha$  螺旋(图 1-1)。在 GSTs 中, 结构域 GST\_N 是高度保守的, 提供了绝大多数 GSH 的结合位点。它通过一段短的连接序列与结构域 GST\_C 相连。

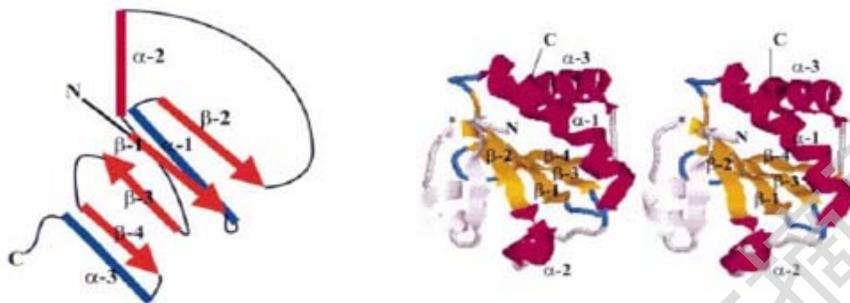


图 1-1 硫氧还蛋白的折叠<sup>[9]</sup>

H 功能区: 其余氨基酸以 5 到 6 股  $\alpha$  螺旋构成 C-末端氨基酸结构域, 为各种结构的亲电底物的结合提供一个疏水的环境。结构域 GST\_C 远没有结构域 GST\_N(约第 87-第 210 个氨基酸残基)保守, 不同类的胞质 GSTs 在结构域 GST\_C 中的螺旋数变化很大: Pi 类和 Mu 类有 5 个  $\alpha$  螺旋<sup>[15,16]</sup>, 而 alpha 类 6 个  $\alpha$  螺旋<sup>[17]</sup>。结构域 GST\_C 提供绝大多数疏水底物结合的残基, 也提供用于结合 GSH 高度保守的天冬氨酸残基(在  $\alpha$ -4 中)。结构域 GST\_C 的不同可能就造就了这 3 种酶底物特异性的不同<sup>[18]</sup>。

在各类 GSTs 中, G 位点高度保守, 而 H 位点在不同的 GSTs 中变化较大, 这为 GSTs 结合多种底物提供了条件<sup>[16-18]</sup>, 使 GST 超家族具有催化许多不同结构化合物反应的能力。

### 1.3 GST 的功能

GSTs 的主要作用是保护细胞免受化学诱导产生的毒素的攻击。GSTs 的防御机制是使外源疏水复合物失活, 避免这些外源复合物产生细胞毒性和遗传毒性物质。上述的这种失活作用是通过谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 上的巯基对亲电底物的亲核攻击而发生亲电取代反应或者依赖亲水底物的加成反应来实现的<sup>[19]</sup>。最终的谷胱甘肽-疏水复合物经由 ATP 依赖性离子通道运出动物细胞, 而后代谢成

带格式的: 字体: 倾斜

删除的内容: (

带格式的 (... [241]

删除的内容: )

带格式的 (... [242]

带格式的 (... [243]

删除的内容: <sup>10</sup>

删除的内容: (

带格式的 (... [244]

删除的内容: )

带格式的 (... [245]

带格式的: 上标

删除的内容: <sup>1</sup>

删除的内容: <sup>16</sup>

删除的内容: <sup>15</sup>II

带格式的 (... [246]

删除的内容: <sup>17</sup>

删除的内容: <sup>16</sup>

带格式的 (... [247]

删除的内容: ... (... [248]

带格式的 (... [249]

带格式的 (... [250]

删除的内容: ... (... [251]

带格式的 (... [252]

删除的内容: ... (... [253]

带格式的 (... [254]

删除的内容: ... (... <sup>19</sup> [255]

带格式的 (... [256]

带格式的: 上标

删除的内容: <sup>1</sup>

带格式的 (... [257]

删除的内容: <sup>17</sup>

删除的内容: <sup>16</sup>II

带格式的 (... [258]

删除的内容: <sup>18</sup>

删除的内容: <sup>17</sup>II

带格式的 (... [259]

删除的内容: <sup>19</sup>

删除的内容: <sup>18</sup>,

带格式的 (... [260]

带格式的 (... [261]

带格式的 (... [262]

带格式的 (... [263]

删除的内容: (

带格式的 (... [264]

删除的内容: )

带格式的 (... [265]

删除的内容: <sup>20</sup>

带格式的 (... [266]

带格式的 (... [267]

带格式的: 居中

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库