

DOI: 10.1360/yc-007-0349

## 鱼类谷胱甘肽转移酶基因 cDNA 克隆及其序列分析

孙玉华<sup>1</sup>, 谢平<sup>2</sup>, 郭海涛<sup>1</sup>, 夏文伟<sup>1</sup>

1. 华中农业大学水产学院, 农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 武汉, 430070
2. 中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉, 430072

**摘要:** 采用 RT-PCR 方法, 从鲢、鲤、鲫 3 种鱼类肝脏总 RNA 中克隆出了谷胱甘肽转移酶 Pi 型(GST Pi)cDNA 序列, 推导了其编码的氨基酸序列。3 种鱼类 GST Pi 的 ORF 全长 627 bp, 编码 208 个氨基酸。翻译起始密码均为 ATG, 终止密码子均为 TGA。鱼类与哺乳动物、两栖类爪蟾以及节肢动物丝虫之间 GST Pi 氨基酸序列相似度平均值分别为 50%、33%、15%左右。5 种鱼类之间的氨基酸序列相似度较大, 其中鲤科鱼类之间平均为 85%左右。我们以 GST Pi 为分子标记, 用最大简约数法(MP)构建了 13 个物种的系统进化树, 识别出两个大的单系类群: 哺乳类组成类群一(bootstrap 100); 鱼类组成类群二(bootstrap 93)。通过比较鱼类与哺乳类 GST Pi N 末端和 C 末端功能域的氨基酸组成差异, 探讨了淡水鱼类 GSTs 承担较强的微囊藻毒素去毒能力的可能分子机制。

**关键词:** 谷胱甘肽转移酶 Pi 型; 鲢; 鲤; 鲫

## Cloning and the sequence analysis of the fish glutathione transferase Pi gene

SUN Yu-Hua<sup>1</sup>, XIE Ping<sup>2</sup>, GUO Hai-Tao<sup>1</sup>, XIA Wen-Wei<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Education Ministry, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China
2. Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China

**Abstracts:** Using RT-PCR method, the glutathione transferase Pi cDNAs were cloned from *Cyprinus carpio*, *Hypophthalmichthys molitrix*, and *Carassius auratus*. The open reading frames (ORFs) from the 3 fishes were 627 bp long (encoding for 208 amino acids) with the initial code ATG and the terminal code TGA. The sequence similarity was 50% between fish and mammals, 33% between fish and amphibian, and 15% between fish and arthropoda, respectively. The sequence similarity was big among fishes, and the average value of the 4 cyprinids was about 85%. Phylogenetic tree was constructed for 13 species based on GST Pi amino acid sequences using MP (Maximum Parsimony) method. Two major clusters were recognized: cluster one consisted of Mammals (bootstrap 100) and cluster two consisted of fishes (bootstrap 93). Based on the sequences analyses of N/C domain of GST Pi, we proposed the detoxification mechanism of freshwater fishes that were thought to have stronger tolerance to microcystins.

**Keywords:** glutathione transferase Pi; *Cyprinus carpio*; *Hypophthalmichthys molitrix*; *Carassius auratus*

收稿日期: 2006-06-26; 修回日期: 2006-08-30

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30530170), 华中农业大学科研启动基金(编号: 52204 - 04031)以及华中农业大学大学生科技创新基金资助  
[Supported by Chinese National Natural Science Foundation(No.30530170), and the Scientific Research Startup Fund of HAZU(No.52204 - 04031)]

作者简介: 孙玉华(1973—), 男, 湖北人; 博士; 研究方向: 鱼类遗传学研究。E-mail: yhsun67@sina.com

通讯作者: 谢平, 男, 博士, 研究员。研究方向: 淡水生态学。E-mail: xieping@ihb.ac.cn

可溶性谷胱甘肽转移酶(glutathione transferases, GSTs) 普遍存在于各种生物体内, 是一组由多个基因编码的、代谢多种内源或外源毒性物质酶的 II 相解毒酶系。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重要作用。GSTs 主要催化多种化学物质包括药物、化疗剂、致癌物以及氧化应激产生的各种毒性代谢物等, 与还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH) 的巯基(-SH) 结合, 使这些亲电性的疏水化合物变成亲水性的物质, 减少其毒性, 并易于从胆汁或尿液中排泄<sup>[1]</sup>。根据 GSTs 基因结构、氨基酸序列、底物特异性、免疫学及动力学行为等不同标准, 脊椎动物 GSTs 可分为 9 类:  $\alpha$ (alpha)、 $\mu$ (mu)、 $\pi$ (pi)、 $\sigma$ (sigma)、 $\theta$ (theta)、 $\omega$ (omega)、 $\kappa$ (kappa) 和  $\zeta$ (zeta) 以及微粒体 GSTs (mGSTs) 等<sup>[2,3]</sup>。近些年来, 随着人们对动植物体内去毒代谢的研究深入, 陆续有一些 GSTs 基因被克隆<sup>[4-7]</sup>。一些 GSTs 基因已被用于监控环境水域污染的生物标记以及转基因功能研究<sup>[8,9]</sup>。

已有研究表明, 不同的动物类群可能具有不同的微囊藻毒素解毒能力。与人类、小鼠等脊椎动物相比, 鱼类对微囊藻毒素的积聚量较低且清除速度较快, 具有较高的耐受性<sup>[10]</sup>。淡水鱼类 GSTs 基因在天然状态下主要用于微囊藻毒素等天然毒物的去毒, 因此又被称为微囊藻毒素去毒酶基因。不同的鱼类对藻毒素的解毒能力也不同<sup>[11]</sup>。谢平等<sup>[12]</sup>通过东湖围隔实验, 发现鲢、鳙等鱼类可控制蓝藻水华, 提出了非经典的控藻理论。我们对鲢、鳙、鲫等进行 50  $\mu$ g/kg 藻毒素初提物灌喂实验, 证实鲢、鳙比鲤、鲫等对藻毒素具有较高的耐受性。

为了更好的理解不同分类阶元动物以及不同鱼类解毒能力差异的机制, 有必要在分子水平上对其解毒酶基因进行比较分析。本研究, 我们选择 GSTs 家族中 GST Pi 型, 以鲤、鲫、鲢鱼类为研究材料, 采用 RT-PCR 方法, 从这 3 种鱼类肝脏总 RNA 中克隆出谷胱甘肽转移酶 Pi (GST Pi) cDNA 序列, 推导了其编码的氨基酸序列。通过查阅 GenBank 中已登录的其它动物的 GST Pi 氨基酸序列, 比较分析不同物种的 GSTs 氨基酸序列特征。同时, 通过比较鱼类与哺乳类 GST Pi N 末端和 C 末端功能域的氨基酸组成差异, 探讨了淡水鱼类 GSTs 承担较强的微囊藻毒素去毒能力的可能分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

鲤、鲫、鲢购自华农集贸市场, 运回后立即进行肝脏总 RNA 抽提。

### 1.2 总 RNA 的提取

实验用的玻璃器皿经 0.1% 的 DEPC 水处理, 150  $^{\circ}$ C 烘烤 4 h。塑料器皿经 0.1% DEPC 水浸泡过夜, 双蒸水冲洗, 37  $^{\circ}$ C 烘干。金属用具经 1 mol/L 的 NaOH 浸泡 2 h, 经 0.01% 的 DEPC 水彻底冲洗后, 37  $^{\circ}$ C 烘干。各试剂用无 RNase 的 0.01% DEPC 水配置。总 RNA 抽提试剂盒 TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司。从活体中取出肝脏组织, 迅速置于 1 mL TRIzol 试剂的匀浆器中, 冰上研磨, 具体抽提步骤按 TRIzol Reagent 说明书进行。

### 1.3 引物设计

通过搜索 GenBank 已登录的鱼类谷胱甘肽转移酶序列信息, 用 CLUSTAL 软件<sup>[13]</sup>将同源序列对齐, 根据序列的保守性, 用 Primer primer 5.0 软件在 cDNA 序列 ORF 的上下游区域, 设计一对特异引物: GF 5'-CCATGGCTCCCTACACTCTCACATACTT-3'; GR 5'-TCACTGTTTGCCGTTGCCGTTGATGGG-3', 引物由上海基康生物公司合成。预计 PCR 将扩增一段约 600 bp 含有完整开放读码框 cDNA 片段。

### 1.4 cDNA 第一条链的合成及 PCR 扩增

取 1.0  $\mu$ L 的总 RNA 作为模板, 采用 TaKaRa 公司 RNA PCR Kit (AMV) Ver3.0 试剂盒中提供的 Oligo(dT)-Adaptor 和 AMV 逆转录酶在 10  $\mu$ L 体系中合成第一条 cDNA 链。以 0.5  $\mu$ L cDNA 为模板, 采用引物 GF 和 GR 进行 PCR 扩增。扩增体系按照 RNA PCR Kit (AMV) Ver3.0 试剂盒中说明书进行。PCR 产物在 5 v/cm 的条件下经 1% 琼脂糖凝胶电泳 30 min, 切胶后, 按 TaKaRa 公司 Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit 试剂盒说明书回收和纯化 PCR 产物。

### 1.5 PCR 产物克隆及测序

按照说明书操作步骤, 将 PCR 产物的连接到 TaKaRa(大连)公司的 pMD18-T 载体上, 然后转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 在含有 Amp/IPTG/X-Gal 的平板上进行蓝白斑筛选。挑取白斑, 扩大培养后将菌液送往上海基康公司进行测序。

## 1.6 序列分析及系统进化树构建

在GenBank中查询所有已登录物种的GST Pi序列,用CLUSTAL软件将所有同源序列对齐,分析其碱基组成特点,推导ORF区所编码的氨基酸序列,并进行氨基酸序列分析。用MEGA软件<sup>[44]</sup>计算序列之间的成对遗传距离D,序列相似度 $S=1-D$ 。同时,以氨基酸序列为分子标记,用MEGA软件中最大简约法(MP)构建系统发育树,用自展法(Bootstrap)进行1,000次重复,获得一致系统树,并用一致性指数(consistency index, CI)来衡量分析结果的可靠性。

## 2 结果

### 2.1 GST Pi 基因核酸及其编码氨基酸序列比较分析

通过DNA marker估计,PCR扩增的产物约为600 bp左右。产物测序后,通过NCBI中BLAST命令,查找GenBank中已登录的同源序列。结果显示我们获得的序列与GST Pi型cDNA序列之间具有很高的同源性,其中与斑马鱼(GenBank No. NM\_001020513)同源性最高,达90%以上。分析表明,序列包含了谷胱甘肽转移酶Pi cDNA的完整开放阅读框ORF(open reading frame)。3种鱼类GST Pi的ORF全长627 bp(GenBank no. DQ501283, DQ497597-DQ497598),编码208个氨基酸。翻译起始密码均为ATG,终止密码子均为TGA。

我们从GenBank查找已登录的其它物种GST Pi序列,获得了哺乳类的人、牛、猪、鼠,鱼类的斑马

鱼、鳗鲡,两栖类的爪蟾,以及节肢动物盘尾丝虫的cDNA及氨基酸序列信息(GenBank登录号见图1)。用CLUSTAL软件将已知的GST Pi氨基酸序列对齐(图1)。哺乳类ORF区均是633 bp,编码210个氨基酸。爪蟾的ORF区是639 bp,编码212个氨基酸。盘尾丝虫ORF区是627 bp,编码208个氨基酸。哺乳类在第140~141位比鱼类多了两个氨基酸残基KA(赖氨酸和丙氨酸)或KT(赖氨酸和苏氨酸)或QA(谷氨酰胺和丙氨酸)。爪蟾比鱼类多了4个氨基酸残基,分别是43~44位的KD(赖氨酸和天冬氨酸)以及140~141位的SK(赖氨酸和丝氨酸)。

用MEGA软件比较了不同物种之间氨基酸序列相似度(表1)。可以看出,鱼类与哺乳动物、两栖类爪蟾以及丝虫之间GST Pi氨基酸序列相似度平均值分别为50%、33%、15%左右。4种鲤科鱼类之间的氨基酸序列相似度较大,平均为85%左右;鲤科鱼类与鳗鲡的序列相似度平均为65%。

### 2.2 以GST Pi氨基酸序列构建系统发育树

13个物种谷胱甘肽转移酶Pi氨基酸序列对齐后,共有158个氨基酸变异位点,其中系统发育信息位点105个。以氨基酸序列为分子标记,用MEGA软件包中的最大简约法(MP)构建了13个物种的系统进化树图2。我们可以识别出两个大的单系类群:哺乳类组成了类群一(bootstrap 100);鱼类组成了类群二(bootstrap 93)。盘尾丝虫处于拓扑结构的最底部,其次是两栖类爪蟾。

表1 13物种谷胱甘肽转移酶Pi氨基酸序列相似度

Table 1 The similarity of GST Pi amino acid sequences from 13 species

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Bos													
Hom	0.864												
Cri	0.842	0.853											
Mes	0.847	0.842	0.955										
Rat	0.853	0.847	0.919	0.929									
Mus	0.836	0.83	0.897	0.892	0.913								
Dan	0.481	0.497	0.513	0.497	0.481	0.481							
Hyp	0.481	0.521	0.497	0.497	0.481	0.481	0.897						
Cyp	0.505	0.513	0.513	0.505	0.505	0.513	0.836	0.847					
Car	0.513	0.521	0.513	0.505	0.497	0.505	0.824	0.836	0.95				
Ang	0.456	0.456	0.473	0.489	0.473	0.473	0.667	0.654	0.64	0.654			
Xen	0.395	0.422	0.422	0.422	0.439	0.413	0.282	0.321	0.368	0.359	0.368		
Onc	0.166	0.154	0.21	0.22	0.21	0.188	0.154	0.12	0.143	0.108	0.241	0.199	

注:表中物种缩写同上。

Note: The same abbreviations of species in Fig.1 are followed.

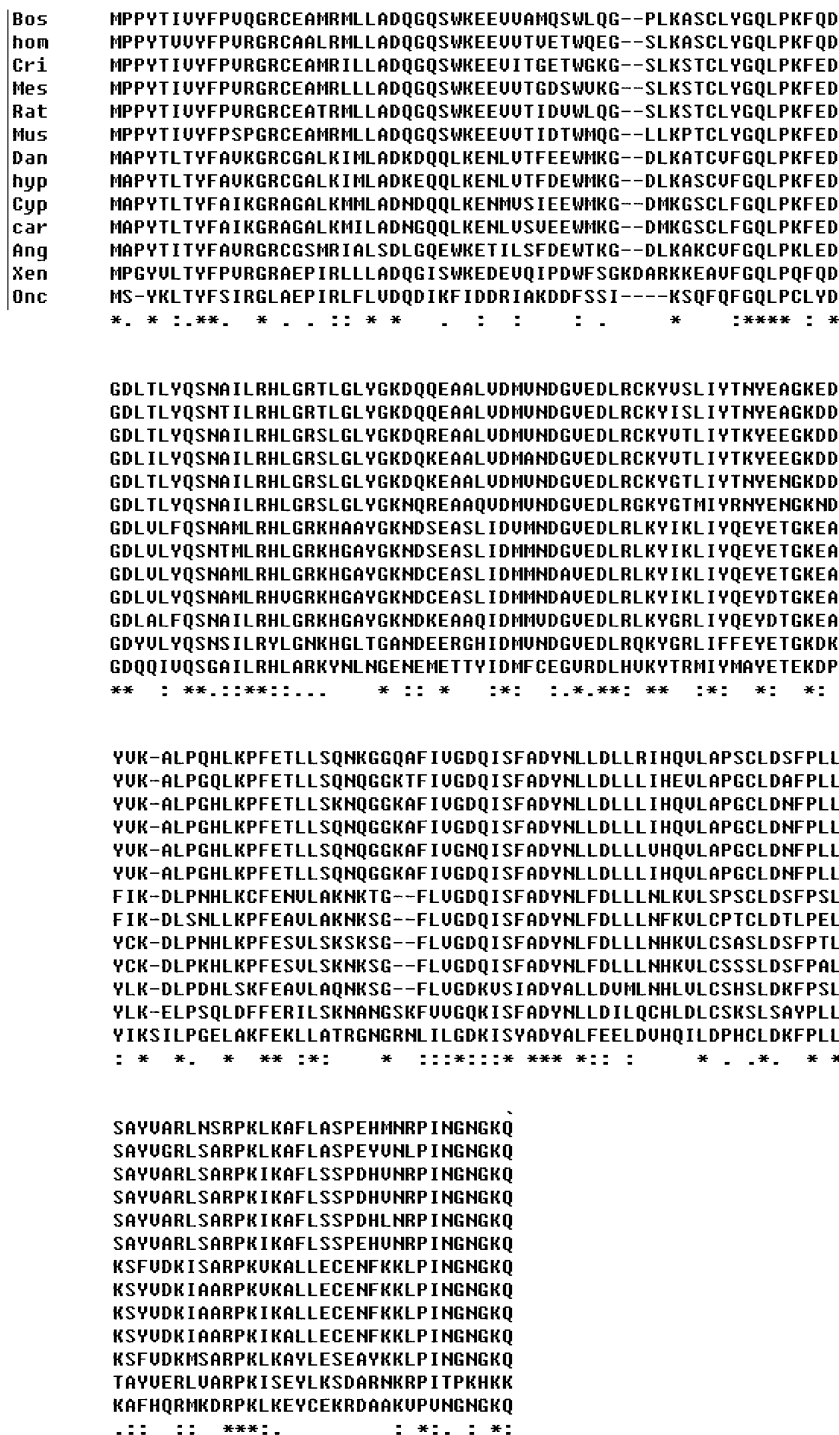


图 1 13 个物种 GST Pi 氨基酸序列比较

Bos: (NM\_177516)黄牛; Hom: (NM\_000852)人类; Cri: (L46796)仓鼠; Mes: (L40382)黄金鼠; Rat: (NM\_012577)褐家鼠; Mus: (NM\_181796)小家鼠; Dan: (NM\_131734)斑马鱼; Hyp: 鲢鱼; Cyp: 鲤鱼; Car: 鲫鱼; Ang: (AY530199)鳗鲡; Xen: (XLA489617)爪蟾; Onc: (L28771)盘尾丝虫。

Fig. 1 The alignment of GST Pi for 13 species  
Bos: *Bos taurus*; Hom: *Homo sapiens*; Cri: *Cricetulus migratorius*; Mes: *Mesocricetus auratus*; Rat: *Rattus norvegicus*; Mus: *Mus musculus*; Dan: *Danio rerio*; Hyp: *Hypophthalmichthys molitrix*; Cyp: *Cyprinus carpio*; Car: *Carassius auratus*; Ang: *Anguilla anguilla*; Xen: *Xenopus laevis*; Onc: *Onchocerca volvulus*.



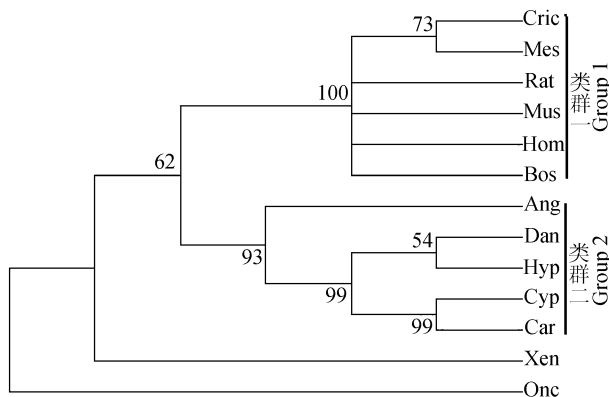


图2 用最大简约数法(MP)构建的13个物种的GSTs氨基酸序列系统进化树

注: 图中物种缩写同上。

Fig. 2 Phylogenetic tree based on GST Pi amino acid sequences using MP method

The same abbreviations of species in Fig.1 are followed.

### 3 讨论

谷胱甘肽转移酶(GSTs)是一种典型的球状同源二聚体蛋白。每个亚单位都有一个活性中心,由200至240个氨基酸组成,分子量介于23~29 kDa。GSTs亚单位多肽链通常存在两个功能域: N-末端功能域和C-末端功能域。N-末端功能域高度保守,通常包含第1~80个氨基酸残基,由3个 $\alpha$ 螺旋和4个 $\beta$ 片层组成一个类似于硫氧还蛋白的空间折叠结构,形成一个GSH结合位点。C-末端功能域由第81~210个氨基酸残基组成,由5个 $\alpha$ 螺旋结构组成,形成一个底物结合位点<sup>[11]</sup>。不同GSTs的底物特异性是由C-末端功能域中的一些氨基酸残基决定的<sup>[12]</sup>。

在已知9种GSTs类型中,GST Pi是机体表达最为广泛的一类。脊椎动物GST Pi基因全长约为3 kb,由6个内含子和7个外显子组成。编码一个24 kDa、等电点约为7.0的蛋白质<sup>[14]</sup>。与其他8种类型GSTs酶相比较,GST Pi相当的保守。其N-末端功能域的酪氨酸、丝氨酸或半胱氨酸残基被认为是结合GSH并与其巯基相互作用的必需氨基酸,如47位的半胱氨酸残基易与GSH的巯基基团结合;49位的酪氨酸残基是形成有催化能力酶结构以及与GSH巯基作用的重要氨基酸残基<sup>[15]</sup>。我们比较了鱼类与哺乳类GST Pi N-末端功能域的主要氨基酸差异。从图1看,哺乳动物37位是不带电荷的氨基酸残基,而鱼类都是带负电的酸性谷氨酸;哺乳动物49位都是酪氨酸残基,而鱼类都是苯丙氨酸残基;哺乳动物76位全

是不带电荷的亮氨酸,而鱼类都是带正电的组氨酸。我们推测,这些氨基酸残基的变化,特别是鱼类中76位的既可以作为亲电基团又可以作为亲核基团的组氨酸残基的作用,可能会增加鱼类GST酶与GSH的结合能力。由于GST Pi在解毒过程中,N-末端功能域与GSH的结合对于解毒过程十分重要,这些改变可能与淡水鱼类GSTs较强的微囊藻毒素去毒代谢能力有关。

鱼类和哺乳类C-末端功能域氨基酸序列最显著的差异是哺乳类在第140~141位比鱼类多了两个氨基酸残基KA(赖氨酸和丙氨酸)或KT(赖氨酸和苏氨酸)或QA(谷氨酰胺和丙氨酸)。哺乳动物177位都是不带电的丝氨酸残基,而鱼类是带正电的赖氨酸残基;哺乳动物196位都是非极性脯氨酸残基,而鱼类是带负电的天冬氨酸残基。这些氨基酸残基的改变,特别是鱼类196位的天冬氨酸残基代替哺乳动物的脯氨酸残基可能具有重要意义(哺乳类脯氨酸会阻碍C-末端功能域的 $\alpha$ 螺旋的形成,影响C-末端功能域与底物结合以及酶的催化能力)。

我们比较了不同鱼类之间,特别是解毒能力较强的鲢与其它4种鱼类GST Pi型酶氨基酸序列变异。总体来看,N-末端功能域较为保守,在C-末端功能域变化较大。鲢134位是丝氨酸残基,而其它鱼类是脯氨酸残基;鲢136位是非极性亮氨酸残基,而其它都是极性组氨酸残基;鲢185位是带负电的谷氨酸残基,其它鱼类是不带电荷氨基酸残基。值得关注的是134位的变异。鲢134位是丝氨酸残基,有利于形成 $\alpha$ 螺旋结构,而其它鱼类都是脯氨酸残基,会破坏影响 $\alpha$ 螺旋的形成。鲢相对于其它4种鱼类较强的微囊藻毒素耐受能力,可能与其C-末端功能域的氨基酸特异性有关。

从表1看,不同分类阶元动物之间的GST Pi氨基酸序列相似度总体较低。比如,鱼类与哺乳动物、两栖类爪蟾以及丝虫之间GST Pi氨基酸序列平均相似度分别为50%、33%、15%左右。鱼类与哺乳类GST Pi氨基酸序列同源性较大,这一结果与图2氨基酸序列进化树是一致的。同一分类阶元内物种间的GST Pi氨基酸序列相似度较高。哺乳动物之间的平均相似度达到85%;鱼类之间的氨基酸序列相似度总体较高,其中四种鲤科鱼类之间的氨基酸序列相似度平均为85%;鲤科鱼类与鳊序列相似度平均为65%。

目前,关于微囊藻毒素在水生动植物体内去毒

代谢的研究还不够深入, 还只停留在 GSTs 的催化下微囊藻毒素与 GSH 发生加合反应。本研究成功扩增鲢、鲫、鲤等鱼类 GST Pi cDNA 全长 ORF, 比较了不同物种 GST Pi cDNA 序列及其编码氨基酸序列的差异。这对下一步进行鲢、鲫、鲤等鱼类的全长 cDNA 克隆, 进一步研究淡水鱼类肝脏微囊藻毒素去毒酶基因的表达调控机理, 阐述微囊藻毒素去毒代谢分子机制具有重要参考价值。

### 参考文献(References):

- [1] Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J*, 2001, 360: 1–16. [\[DOI\]](#)
- [2] Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005, 45: 51–88. [\[DOI\]](#)
- [3] Konishi T, Kato K, Araki T, Shiraki K, Takagi M, Tamaru Y. A new class of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the red sea bream *Pagrus major*. *Biochem J*, 2005, 388: 299–307.
- [4] Cowell IG, Dixon KH, Pemble SE, Ketterer BK, Taylor JB. The structure of the human glutathione S-transferase 7r gene. *Biochem J*, 1988, 255: 79–83.
- [5] George SG. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: Malins, DC, Ostrander GK eds, *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, CRC Press, 1994, 37–85.
- [6] Riol M, Valinas N, Fernandez G, Lopez P. Glutathione S-transferases from rainbow trout liver and freshly isolated hepatocytes: purification and characterization. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2001, 128: 227–235. [\[DOI\]](#)
- [7] LIAO Wan-Qing, LIANG Xu-Fang, WANG Lin, FANG Ling, LEI La-Mei, HAN Bo-Ping. Cloning of the microcystin-detoxifzyme gene in the main Chinese freshwater fishes. *Ecologic Science*, 2005, 24(1): 6–8.
- 廖婉琴, 梁旭方, 王琳, 方玲, 雷腊梅, 韩博平. 淡水鱼类微囊藻毒素去毒酶基因的克隆. *生态科学*, 2005, 24(1): 6–8.
- [8] López P, Valiñas N, Riol M. Glutathione S-transferase cytosolic isoforms as biomarkers of polychlorinated biphenyl (Arochlor-1254) experimental contamination in rainbow trout. *Toxicol Lett*, 2002, 136: 97–106. [\[DOI\]](#)
- [9] LIU Xin-Fang, LI Jia-Yang. Characterization of an Ultra-Violet inducible gene that encodes Glutathione S-transferase in *Arabidopsis thaliana*. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 29(5): 458–460.  
刘新仿, 李家洋. 紫外线强烈诱导的谷胱甘肽转移酶基因的功能鉴定. *遗传学报*, 2002, 29(5): 458–460
- [10] Chen J, Xie P. Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* and *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. *Toxicol*, 2005, 45: 615–625. [\[DOI\]](#)
- [11] Li L, Xie P, Chen J. *In vivo* studies on toxin accumulation in liver and ultrastructural changes of hepatocytes of the phytoplanktivorous bighead carp i.p.-injected with extracted microcystins. *Toxicol*, 2005, 46: 533–545. [\[DOI\]](#)
- [12] XIE Ping. Silver Carp and Bighead, and Their Use in the Control of Algal Blooms. Beijing: Science Press, 2003.  
谢平. 鲢鳙与藻类水华控制. 北京: 科学出版社, 2003.
- [13] Higgins DG, Sharp PM. CLUSTAL: A package for performing multiple sequence alignments on a microcomputer. *Gene*, 1988, 73: 237–244. [\[DOI\]](#)
- [14] Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe Arizona USA, 2001.
- [15] Aliya S, Reddanna P, Thyagaraju K. Does glutathione S-transferase Pi (GST-Pi) amarker protein for cancer? *Mol Cell Biochem*, 2003, 253: 319–327. [\[DOI\]](#)