

魁蚶过氧化氢酶基因克隆及表达分析

黄永欢^{1, 2}, 刘志鸿^{1*}, 吴彪¹, 周丽青¹,
孙秀俊¹, 杨爱国¹, 李东明^{1, 2}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东青岛 266071;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 采用RT-PCR和cDNA末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE)克隆出魁蚶过氧化氢酶(SbCAT)基因cDNA全长序列, 该基因全长为2181 bp, 包括1431 bp的开放阅读框(open reading frame, ORF), 96 bp的5'端非翻译区(UTR)和654 bp的3'-UTR。其中ORF编码477个氨基酸, 预测分子量为54 ku, 理论等电点为8.03。SbCAT氨基酸序列与其他所选动物的氨基酸序列具有较高的相似性, 其相似度为68%~96%, SbCAT氨基酸具有CAT基因家族的特征性序列, 包括CAT活性位点, 1个亚铁血红素结合位点及3个催化位点残基。此外, SbCAT还具有保守的亚铁血红素结合口袋与还原型辅酶Ⅱ(NADPH)结合位点。采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测了SbCAT的组织表达特征。结果显示, SbCAT mRNA在所检测的6种组织中均有表达, 在外套膜中表达量较高, 在肝胰腺和红细胞中表达量较低。经鳃弧菌和金黄色葡萄球菌刺激后, 鳃弧菌刺激组的外套膜表达量一直较低, 其他组织均表现出先上升再下降的趋势。研究表明, SbCAT可能在魁蚶免疫防御中发挥重要作用。

关键词: 魁蚶; 过氧化氢酶; RACE; qRT-PCR

中图分类号: Q 758; S 917.4

文献标志码: A

魁蚶(*Scapharca broughtonii*)属软体动物门(Mollusca), 瓣鳃纲(Lamellibranchia), 蚶目(Arcoida), 蚶科(Arcidae), 毛蚶属(*Scapharca*), 俗称赤贝、大毛蛤, 是一种高蛋白、低脂肪食品, 具有较好的市场前景和开发利用价值^[1]。与其他无脊椎动物一样, 魁蚶也主要依靠非特异性免疫因子进行免疫防御活动, 但又具有其特殊性, 即魁蚶血淋巴中含有红细胞, 而且红细胞已被证明不仅具有运输氧气的功能, 还能够发挥免疫作用^[2-3]。目前, 有关魁蚶免疫相关基因的研究报道不多, 仅有锰超氧化物歧化酶(SbMnSOD)^[4]、铁蛋白(SbFer)^[5]、半乳糖凝集素(SbGal)^[6]及大防御素(SbBDef1)^[7]等少数几个。因此深入开展魁蚶免疫因子的相关研究, 对于

丰富魁蚶免疫学资料具有重要意义。

过氧化氢酶(Catalase, CAT)是以过氧化氢为底物, 通过催化一对电子的转移而最终将其分解为水和氧气的一类末端氧化酶^[8]。CAT可通过与SOD协同作用清除细胞体内过多的活性氧(ROS), 避免氧化损伤^[9-10]。ROS是微生物的潜在杀灭剂, 能独立或与溶酶体一起杀灭入侵微生物, 同时也可作为细胞内第二信使在转录水平上进行调控^[11-12], 但是活性氧自由基过多会对机体产生不可逆的氧化损伤。CAT能通过维持机体ROS的平衡, 在机体免疫中发挥重要的作用。

CAT由单个基因编码, 在物种间高度保守^[13-15]。CAT的研究主要集中在植物方面, 海洋动物中也有不少报道。目前, 已从近江牡蛎(*Crassostrea*

收稿日期: 2015-10-12 修回日期: 2016-03-09

资助项目: 科技基础条件平台项目(2060503-D1); 科技基础性工作专项(2013FY110700); 山东省自然科学基金(ZR2013CQ047); 黄海水所基本科研业务费项目(2060302201516054)

通信作者: 刘志鸿, Email: liuzh@ysfri.ac.cn

hongkongensis)^[16]、合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)^[17]、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[18]、皱纹盘鲍(*Haliotis discus discus*)^[19]等多种海洋动物中克隆出CAT的全长cDNA序列, 并开展了一定的免疫学基础研究。不过, 目前尚无魁蚶CAT的相关研究报道。

本实验拟克隆魁蚶CAT基因cDNA全长, 分析其氨基酸序列特征, 并开展CAT基因的不同组织分布及对鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)刺激的免疫应答反应研究, 以期进一步丰富贝类CAT免疫研究, 为魁蚶免疫因子资源的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用魁蚶采自青岛市胶南海区, 壳长约为4 cm。魁蚶运回实验室后充气暂养, 每日换水2次, 期间投喂单细胞藻类, 7 d后进行细菌刺激实验。刺激实验前2 d停止投喂。

1.2 方法

细菌刺激 实验魁蚶分为鳗弧菌刺激组、金黄色葡萄球菌刺激组及对照组, 每组选用40粒健康魁蚶。实验鳗弧菌和金黄色葡萄球菌分别经2216E培养基、LB培养基扩大培养后离心, 沉淀用PBS稀释至OD₆₀₀=0.4(1 OD=5×10⁸ mL), 得到菌悬液。用微量注射器分别在各组魁蚶前闭壳肌处注射50 μL菌悬液或PBS, 注射后放回原养殖槽内暂养, 分别在注射后0、4、8、16、24、32和64 h时随机取3个个体, 并抽取血淋巴液, 离心(4 °C, 800 min, 15 min)收集血细胞, 解剖取外套膜、鳃、闭壳肌、肝胰腺、斧足等组织, 所取样品立即放入液氮中, 速冻后放于-80 °C冰箱中保存备用, 用于总RNA的提取。

RNA的提取及cDNA的合成 RNA提取采用异硫氰酸胍法^[20]进行, 用Solution D与β巯基乙醇裂解组织, 氯仿/异戊醇(24:1)和水饱和酚去除蛋白质, 异丙醇与醋酸钠沉淀核酸, 75%乙醇洗涤核酸并干燥, DNase去除基因组DNA, 然后再去除DNase, 经沉淀、洗涤、干燥得到总RNA。通过电泳检测RNA完整性, Eppendorf核酸分析仪检测其纯度。按照PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)说明书合成cDNA, 置于-20 °C备用。

SbCAT基因的克隆 根据本实验已建转录

组文库中筛选到的EST序列, 利用Primer primer 5.0及Oligo 6.0软件设计上下游引物CAT-F和CAT-R, 以反转录的第一条链cDNA为模板扩增获得该序列。运用SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit User Manual (Clontech)试剂盒进行3'-RACE和5'-RACE扩增获得cDNA全长。

3'-RACE和5'-RACE均采用巢式PCR扩增, 根据获得的序列, 设计3'-RACE的两条上游引物(RCAT-F1、RCAT-F2)和5'-RACE两条下游引物(RCAT-R1、RCAT-R2)(引物见表1)。分别以反转录后的3'-cDNA和5'-cDNA为模板, 以试剂盒中提供的UPM与RCAT-F1和UPM与RCAT-R1为引物, 进行第一轮PCR扩增, 再分别以第一轮PCR产物为模板, 以试剂盒中提供的NUP与RCAT-F2和NUP与RCAT-R2为引物进行二次PCR。PCR反应条件均为94 °C 30 s, 72 °C 3 min, 5个循环; 94 °C 30 s, 70 °C 30 s, 72 °C 3 min, 5个循环; 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 3 min, 20个循环; 4 °C 保温。

表1 基因克隆和荧光定量所用到的引物

Tab. 1 Primers for gene clone and qRT-PCR experiments

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequences
CAT-F	TGATTCAGGATTTTCGTT
CAT-R	TGATAAGTTTGCCACA
RCAT-F1	TATAATTCTAAAGCCAAGAATTACCA
RCAT-F2	CCTGGAGTGTGGCAAACCTATCAAAC
RCAT-R1	CGGTGTAAAACCTTGACAGCAAACCCTCT
RCAT-R2	TTTCTTGCTACTTTAGCGAATGGTGC
QCAT-F	GGCAAGATGGTCTGGATAG
QCAT-R	TGTGTGTGTCTGGGTAGGAG
β-actin-F	GAGACCTTCAACACCCCGC
β-actin-R	TAGGTGGTCTCGTGGATGCC

PCR产物经1%的琼脂糖凝胶电泳检测后, 用MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit (TaKaRa)回收, 利用pEASY-T1(全式金)进行克隆, 利用DH5α感受态细胞进行转化, 培养得到的阳性克隆由生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测序。

SbCAT基因序列特征分析 测序获得的所有正确序列通过seqMan进行拼接获得完整的cDNA

序列,通过Blast(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)查找同源序列,利用ClustalX和Dnaman软件进行多序列同源比对;通过EditSeq软件翻译序列的ORF;在线ExPASy(<http://web.expasy.org/protscale/>)预测蛋白分子量大小及等电点;利用Interproscan和Smart在线软件(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>, <http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测编码蛋白的功能域;利用TMHMM、SignalP 3.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>、<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>)等在线软件分析蛋白的跨膜结构和预测信号肽;利用NetNGlyc 1.0 Serve(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)在线软件分析氨基酸的糖基化位点。

SbCAT基因表达的定量分析 根据SbCAT基因序列设计荧光定量的引物QCAT-F和QCAT-R,选取 β -actin作为内参基因^[7],运用SYBR[®] Premix EX Taq[™] II (Tli RnaseH Plus)试剂盒(TaKaRa)进行实时荧光定量分析,反应体系为SYBR[®] Premix EX Taq[™] II 10 μ L, PCR正反引物各0.8 μ L, ROX Reference Dye II (50 \times)0.4 μ L, cDNA 2 μ L, 加DEPC水至20 μ L,反应条件为95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 40个循环。每个样品重复3次,得到的数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行分析,获得基因的相对表达量。采用SPSS 17.0软件进行单因素方差分析,当 $P < 0.05$ 为存在显著性差异, $P < 0.01$ 为存在极显著性差异。

2 结果

2.1 SbCAT基因序列分析

将扩增得到的序列进行拼接,获得SbCAT基因cDNA全长序列(GenBank登录号为ALZ42087.1)(图1)。该基因全长为2181 bp,包括1431 bp的开放阅读框,5'UTR为96 bp,3'UTR为654 bp,3'端含有多聚腺苷酸加尾信号AATAAA和poly(A)尾。共编码477个氨基酸,预测分子量为54 ku,理论等电点为8.03。该序列无信号肽和跨膜结构,含有一个CAT核心结构域,1个酶免疫响应区(428-470),1个CAT活性位点(₆₁FNRERIPERVV HAKGAG₇₇),1个亚铁血红素结合位点(₃₅₁RLFSY PDTH₃₅₉),并发现了3个参与过氧化氢酶催化位点(His-72, Asn-145和Tyr-355)和一个糖基化位点NFSQ。

2.2 SbCAT氨基酸序列同源性和进化树分析

Blastp结果显示,SbCAT与泥蚶(*Tegillarca granosa*)CAT的序列相似性高达96%,与其他软体动物合浦珠母贝、近江牡蛎、褶纹冠蚌(*Cristaria plicata*)等的相似性也高达84%,与日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的相似性达72%,与草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)、原鸡(*Gallus gallus*)、小家鼠(*Mus musculus*)等脊椎动物的相似性也达到了68%~71%。用Clustalx对SbCAT氨基酸序列与其他14种动物的氨基酸序列进行多序列比对。结果发现,15个NADPH结合位点(P-148、H-191、F-195、S-198、R-200、N-210、H-232、K-234、I-299、W-300、P-301、H-302、Q-439、T-442、F-443)以及7个亚铁血红素结合口袋(H-72、S-111、N-145、F-150、F-158、R-351、Y-355)(图2)。用Mega 5.0软件以邻位相接法(NJ法)构建的CAT基因系统进化树,在该系统进化树中,魁蚶先与软体动物聚在一起,再与虾蟹类聚在一起,最后和脊椎动物聚在一起(图3)。

2.3 SbCAT基因组织表达分析

qRT-PCR检测结果表明,SbCAT基因在魁蚶血细胞、斧足、鳃、外套膜、闭壳肌和肝胰腺中均有表达,但表达量存在差异,在肝胰腺中表达最低,外套膜中表达最高,是肝胰腺的351倍($P < 0.01$)(图4)。

2.4 SbCAT基因对鳃弧菌和金黄色葡萄球菌刺激的反应

鳃弧菌刺激后,SbCAT在外套膜的表达量持续较低,而在其他5个组织的表达量均有明显变化,表现为先上调后下降的趋势。鳃弧菌刺激后4和8 h,各个组织中SbCAT表达量均低于对照组,至16 h,鳃和肝胰腺中的表达量开始上升,且在鳃中的表达量达到最大值,为对照组的3.2倍($P < 0.01$),随后表达量下降到对照组水平。24 h,斧足和肝胰腺内SbCAT的表达达到最高值,为对照组的4.8倍及5.0倍($P < 0.01$),随后下降;而在闭壳肌与血淋巴内的反应最相似,均在32 h时出现最高值,分别为对照组的16.7倍($P < 0.01$)及14.4倍($P < 0.01$),随后开始回落(图5)。

金黄色葡萄球菌刺激后,6个组织均表现为

```

1  TGTTACAGC GACTTTTCAC TGCGCATTAA TATCTCATAT TACAGTCTGC GCTACATCTT TTTGACGTTT ACATTGGAGT CATTAGAACT
91  GTAATC ATG GCA ACC AGA GAC AAG GCC TCC AAT CAG CTC TTA GAT TTC AAG AAT ACG CAA AAG GCA GAG GAT GTG
    M A T R D K A S N Q L L D F K N T Q K A E D V
166  CTC ACA ACA GGA ACA GGT GCC CCT GTG GGT ACA AAA ACG GCC ACC ATG ACC GTA GGA CCC CGT GGA CCT GTT TTG
    L T T G T G A P V G T K T A T M T V G P R G P V L
241  AIT CAG GAT TTC GTT TTT ACT GAT GAA ATG GCT CAC TTC AAC AGA GAA AGA ATT CCT GAA AGA GTC GTG CAC GCC
    I Q D F V F T D E M A H F N R E R I P E R V V H A
316  AAA GGC GCA GGT GCG TTT GGA TAT TTT GAA TGC ACA AAT GAC ATC ACA AAG TAC TGT AAA GCA GCA CCA TTC GCT
    K G A G A F G Y F E C T N D I T K Y C K A A P F A
391  AAA GTA GGC AAG AAA ACT CCA GTT GCT ATT AGA TTT TCT ACA GTC GGT GGA GAG AGC GGA TCT GCT GAT ACA GCC
    K V G K K T P V A I R F S T V G G E S G S A D T A
466  AGA GAT CCC AGA GGG TTT GCT GTC AAG TTT TAC ACC GAA GAC GGA AAC TGG GAT CTT GTA GGA AAT AAC ACA CCC
    R D P R G F A V K F Y T E D G N W D L V G N N T P
541  ATC TTC TTC ATC AGA GAC CCA ATG CTG TTT CCA AGC TTT ATC CAC ACG CAG AAG AGA AAT CCC CGA ACA CAC CTG
    I F F I R D P M L F P S F I H T Q K R N P R T H L
616  AAG GAT CCT GAT ATG TTT TGG GAT TTT ATT ACC TTA AGA CCA GAG ACT ACT CAC CAG GTG TCG TTC TTG TTC TCT
    K D P D M F W D F I T L R P E T T H Q V S F L F S
691  GAC CGA GGT ACT CCG GAT GGA TAT CGT CAT ATG AAC GGA TAC GGA AGT CAT ACA TTC AAA ATG GTG AAC AAA GCC
    D R G T P D G Y R H M N G Y G S H T F K M V N K A
766  GGA AAA TCT TAT TAC TGT AAA TTC CAC TTT AAG ACG GAT CAA GGA ATT AAA AAT CTG ATG GCA GAT AAA GCT CGC
    G K S Y Y C K F H F K T D Q G I K N L M A D K A A
841  GAA TTG TCT AAA GAT GAT CCA GAT TAC GCC ATC CGG GAT CTT TAT AAT TCC ATT GAA TCA GGA AAA TTC CCT TCA
    E L S K D D P D Y A I R D L Y N S I E S G K F P S
916  TGG ACT GTG AAA GTA CAG GTC ATG ACT TTT GAA GAA GCT GAA AAG TTC AGA TAC AAT CCA TTT GAT TTG ACA AAG
    W T V K V Q V M T F E E A E K F R Y N P F D L T K
991  ATA TGG CCA CAG AAG GAG TTC CCA TTG ATA ACT GTT GGC AAG ATG GTT CTG GAT AGG AAC CCA AAG AAC TAC TTT
    I W P Q K E F P L I T V G K M V L D R N P K N Y F
1 066  GCT GAA GTG GAA CAA ATT GCT TTT GCA CCG GCC CAT ATG ATT CCT GGT ATT GAA GCC AGT CCA GAT AAA ATG TTA
    A E V E Q I A F A P A H M I P G I E A S P D K M L
1 141  CAG GGG AGA TTA TTC TCC TAC CCA GAC ACA CAC AGA CAT CGC CTC GGC AGT AAC TAT CTA CAG ATT CCA GTC AAC
    Q G R L F S Y P D T H R H R L G S N Y L Q I P V N
1 216  TGT CCG TAT AAT TCT AAA GCC AAG AAT TAC CAG AGA GAC GGG CCA CAG TGT GTG GAC GAT AAT CAA GGC GGC GCT
    C P Y N S K A K N Y Q R D G P Q C V D D N G G A
1 291  CCA AAC TAT TAT CCA AAC AGT TTT ATG GGA CCA CGT GAC AAG GTT GAC AGC ATG GAG TCT GAG TTT ACT ATC ACT
    P N Y Y P N S F M G P R D K V D S M E S E F T I T
1 366  GGA GAT GTT AAA CGT TAC AAT ACA GCA GAT GAA GAT AAC TTC TCA CAA GTC ACA ACT TTC TGG AAT AAG GTG TTA
    G D V K R Y N T A D E D N F S Q V T T F W N K V L
1 441  AAA CCG GAA GAA AAG AAA CGT ATG TGT GAG TAT ATT GGC GGT CAT GCT GCT GCT GCG TCT GAA TTC TTA CAG AAA
    K P E E K K R M C E Y I G G H A A A A S E F L Q K
1 516  GAG AGT GAA TAG AGAACTGGGA GTAAAAATGG CCCTTCTGG AGTGTGGGCA AACTTATCAA ACAGGAAATA GAGAAGGCCA
    E S E *
1598  AGGCAAAAAT AGCTCAGCAA GCAGCATAAA CAAGATTGGA CTACACAAAT CTAGATTGA CTATATCTGT ACAAGGAGTG AATAATAACG
1688  TGTATAACTA CATGTACTTT TAAACATGT TAAAGACAAG TACATTTGCA TGATGCAGCA ATTGAGCAAT CCGGATGTAT TATTATCCAC
1778  GATGATACTA TAAATGTTTG AGTACACGTT ACTTAAAGAC TATCTTAGTT AAATTGATTG TCATCTGTAT TAAAGTTACC ACATTTACTT
1868  TTATTTAATG TGGTGGACCT TACGAAATGG ATATATTTAT ATCAATAATC AGCATTTAAA TGATTTAATG TTTAGTTTTG TATCAGTGCT
1958  GTCATGTGCT ACTTTTGAAT TATATTATT CATAAAAAT CAAAAGTAAC ACATGACAGT GCAAATGTAT TCATTATAAC GATTATGTCT
2048  GTGTAACAC ATGTAGAAG CACAAATGCA TGGTCATATA GACATTTACA GCTCACAAAG GTAATGTGT AAATTCAAAT TAATAAAATG
2138  TAATAAAAT AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA

```

图1 *SbCAT*基因cDNA全长及推导的氨基酸序列

小写字母代表3'及5'非编码区; 大写字母部分为编码区, 方框内的分别为起始密码子ATG和终止密码子TAG; 加尾信号ATTTAA和poly(A)用波浪线表示; CAT活性位点用单下划线表示; 血红素结合位点用虚线表示; 糖基化位点用双下划线表示; 3个过氧化氢酶催化位点(His-72, Asn-145和Tyr-355)用加粗字体表示, NADPH结合位点用阴影表示

Fig. 1 The full-length of cDNA and deduced amino acid sequence of CAT from *S.broughtonii*

3', 5' untranslated regions are shown with lowercases; Coding region is shown with uppercases. Start codon ATG and stop codon TAG are boxed; Putative polyadenylation signal (AATAAA) and poly (A) tail are marked by the wavy lines; Catalase active site motif is underlined; Heme-ligand signature motif is underlined by dotted line; Putative N-glycosylation site is double underlined; Three conserved catalytic amino acids (His-72, Asn-145 and Tyr-355) are bold; NADPH binding residues are shadowed.

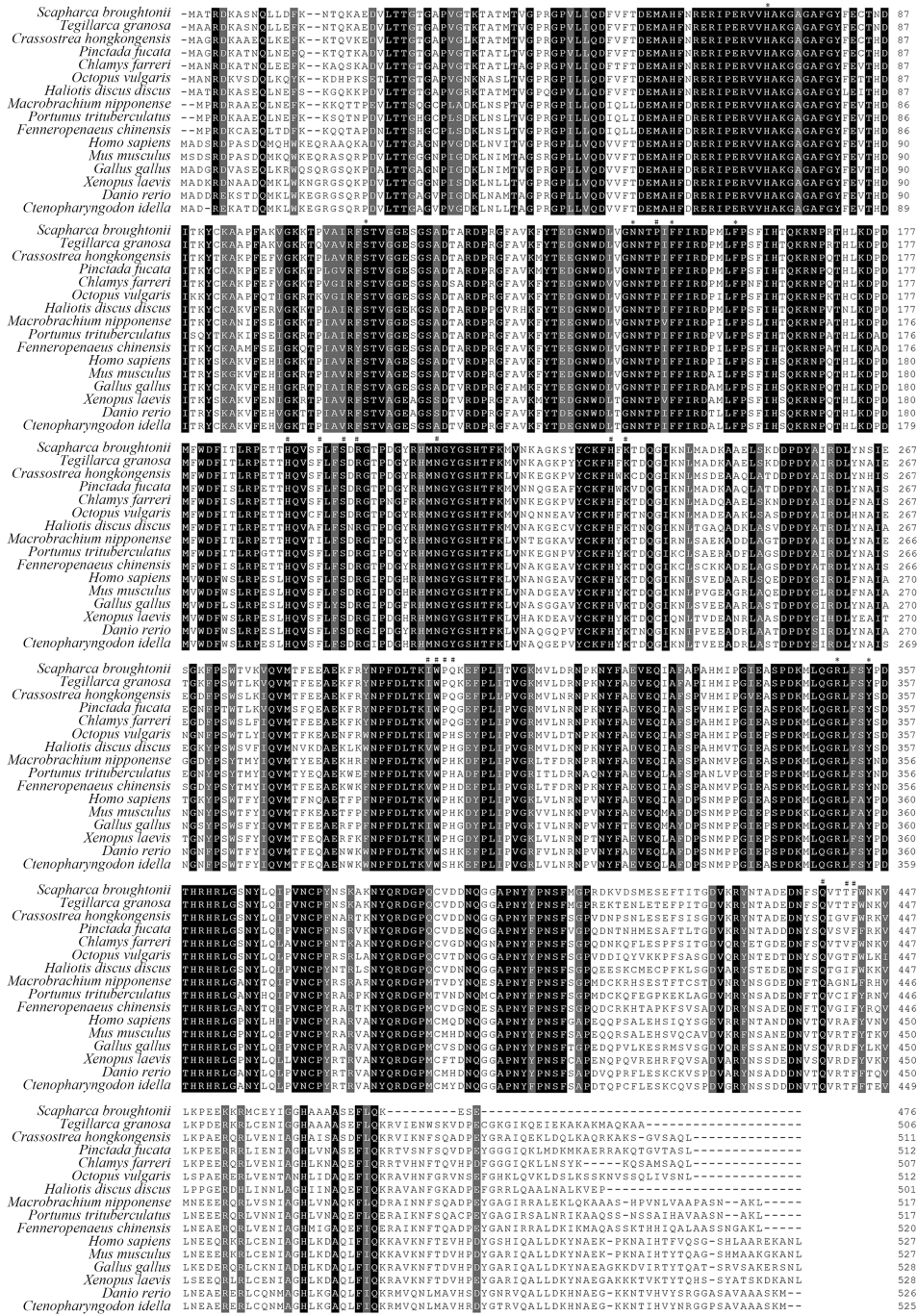


图2 魁蚶CAT氨基酸序列与其他动物序列比对结果

黑色覆盖表示保守的氨基酸残基，灰色覆盖表示相似的氨基酸残基；“*”表示亚铁血红素结合口袋；“#”表示NADPH结合位点。GenBank登录号：近江牡蛎(ADZ76134.1)；合浦珠母贝(ADW08700.1)；魁蚶(ALZ42087.1)；泥蚶(AKZ20727.1)；栉孔扇贝(ABI64115.1)；章鱼(AGZ63441.1)；皱纹盘鲍(ABQ60044.1)；日本沼虾(AGJ70294.1)；三疣梭子蟹(ACI13850.2)；中国对虾(ABW82155.1)；人(NP_001743.1)；小家鼠(AAA66054.1)；原鸡(NP_001026386.2)；非洲爪蟾(ABK62836.1)；斑马鱼(NP_570987.1)；草鱼(ACL99859.2)

Fig. 2 Multiple alignment of the amino acid sequence of SbCAT with other animals

The black shadowing shows identical amino acids and the gray shadowing indicates similar amino acids. The “*” indicates the heme binding pocket; the “#” indicates the NADPH binding site. GenBank: *Crassostrea hongkongensis* (ADZ76134.1); *Pinctada fucata* (ADW08700.1); *Scapharca broughtonii* (ALZ42087.1); *Tegillarca granosa* (AKZ20727.1); *Chlamys farreri* (ABI64115.1); *Octopus vulgaris* (AGZ63441.1); *Haliotis discus discus* (ABQ60044.1); *Macrobrachium nipponense* (AGJ70294.1); *Portunus trituberculatus* (ACI13850.2); *Fenneropenaeus chinensis* (ABW82155.1); *Homo sapiens* (NP_001743.1); *Mus musculus* (AAA66054.1); *Gallus gallus* (NP_001026386.2); *Xenopus laevis* (ABK62836.1); *Danio rerio* (NP_570987.1); *Ctenopharyngodon idella* (ACL99859.2).

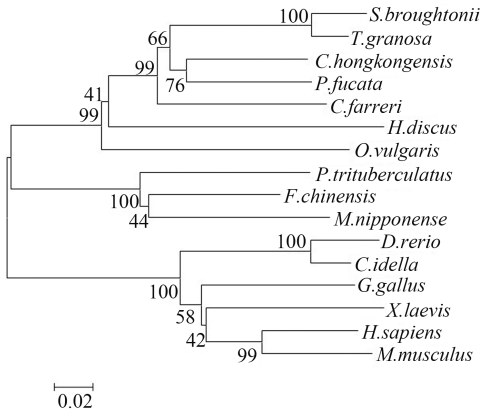


图3 NJ法构建的SbCAT系统进化树

Fig. 3 The phylogenetic tree of SbCAT constructed by Neighbor-Joining method

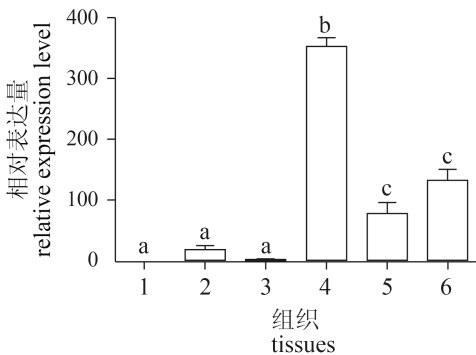


图4 SbCAT在魁蚶不同组织中的表达水平

1. 肝胰腺; 2. 闭壳肌; 3. 血细胞; 4. 外套膜; 5. 斧足; 6. 鳃。不同字母表示两组组织之间 SbCAT基因表达量差异极显著(P<0.01)

Fig. 4 The expression level of SbCAT in different tissues of S.broughtonii

1. hepatopancreas; 2. adductor muscle; 3. haemolymph; 4. mantle; 5. foot; 6. gill. Different superscript letters indicates difference levels are statistically extremely distinguishable (P<0.01)

先上调后下降的趋势。斧足、鳃和肝胰腺的表达趋势较为相似, 均在8 h时出现最大值, 分别为对照组的9.1倍(P<0.01)、3.9倍(P<0.01)和2.1倍(P<0.05); 而外套膜和血淋巴在16 h时出现表达高峰, 分别为对照组的1.8倍(P<0.01)和26.7倍(P<0.01), 随后表达量下降到低于对照组的水平; 闭壳肌的表达有所迟缓, 到32 h时才到达最高峰, 为对照组的12.3倍(P<0.01)。

3 讨论

CAT是一类广泛存在于真核和原核生物中的末端氧化酶, 可分为3类: 单功能CAT(mono-

functional catalase), 双功能CAT(catalase-peroxidase)和锰CAT(Mn-Catalase)。其中单功能CAT是由4个具有相同多肽链的亚基组成, 亚基的大小为460~590个氨基酸, 相对分子量为50~60 ku^[21], 且含有铁血黄素辅基。本研究获得的SbCAT编码420个氨基酸, 预测蛋白分子量为54 ku, SbCAT还具有保守的亚铁血黄素结合口袋和NADPH结合位点。NADPH可以通过结合位点的氨基酸残基结合在每个单体的表面从而保护CAT, 避免CAT被催化底物H₂O₂所氧化^[22], 这是单功能CAT的特征之一。由此推测SbCAT属于CAT家族中单功能CAT亚群, 并具有其他动物单功能CAT相同的催化机理。通过对得到的魁蚶CAT活性位点₆₁FNRERIPERVVHAKGAG₇₇进行多序列比对, 发现其中魁蚶第62位与近江牡蛎、合浦珠母贝、泥蚶、栉孔扇贝、章鱼、皱纹盘鲍相同, 为天冬酰胺(Asn), 而其他的9种则为天冬氨酸(Asp), 在该活性位点76位上栉孔扇贝为甘氨酸(Gly), 其他均为丙氨酸(Ala), 其他位置并无差异, 这说明CAT活性位点在进化中高度保守。在SbCAT序列中发现了和其他动物CAT不同的特征, 如SbCAT仅存在一个糖基化位点, 而栉孔扇贝CAT中存在2个糖基化位点^[18], 仿刺参CAT存在4个糖基化位点^[23]。糖基化可以影响蛋白的结构, 如蛋白折叠和构象稳定等^[24], 因此推断SbCAT的蛋白三级结构较栉孔扇贝、仿刺参等可能存在差异。

CAT一般有3种定位信号: PTS1、PTS2 和 PEX19BS, 其中 PEX19BS 是膜蛋白通过过氧化物酶体的定位信号, PTS1通常是由氨基酸序列C末端3个氨基酸所组成, 存在于大多数生物体内, 其序列为S/A/C/K/-K/R/H/Q/N/-L/F/I/Y/M^[25], PTS2一般定位于N末端附近, 只存在于少数蛋白中, 其序列为R/K-L/V/I-x(5)-H/Q-L/A^[26]。不同物种的定位信号并不同, 如人和小鼠的PTS为ANL, 栉孔扇贝的为SKT^[18], 褶皱冠蚌的为KSL^[27], 都属于PTS1, 而SbCAT与合浦珠母贝^[17]相似, 在N端附近发现PTS2, 并未发现PTS1。

SbCAT氨基酸序列经过Blastp检索后, 预测为CAT3, 与泥蚶的一致性高达96%, 与合浦珠母贝、近江牡蛎、褶皱冠蚌、栉孔扇贝、三角帆蚌等软体动物的一致性达到了82%~84%, 与

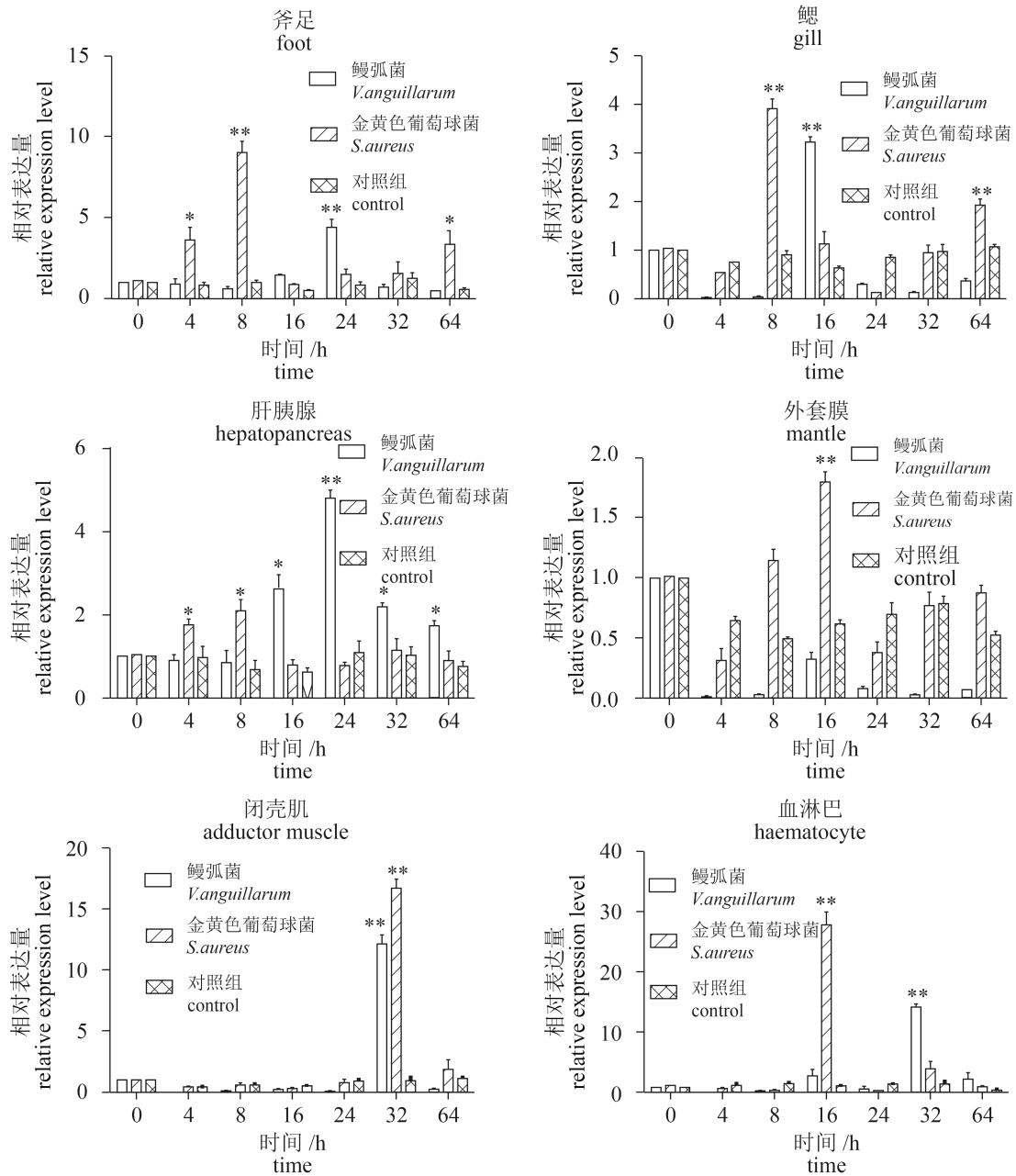


图5 鳃弧菌和金黄色葡萄球菌刺激后SbCAT在魁蚶6个组织中的表达变化

“*”表示组间差异显著($P < 0.05$), “**”表示组间差异极显著($P < 0.01$)

Fig. 5 SbCAT mRNA expression level after *V. anguillarum* and *S. aureus* challenge in six tissues

Statistically distinguishable across control was indicated with an asterisk at $P < 0.05$, two asterisks at $P < 0.01$

虾蟹类、两栖类、哺乳类等一致性也达到了68%~80%,说明CAT在进化中比较保守。进化树分析中表明,SbCAT先和泥蚶聚在一起,然后和其他软体动物聚在一起,再和其他动物聚在一起,说明SbCAT的分子进化地位与魁蚶生物学分类地位基本一致。

CAT被认为是软体动物在不同环境条件下潜在的生物检测指标。Khessiba等^[28]将贻贝暴露于

林丹中,发现CAT活性在不同温度、盐度和光照下均出现明显变化。在不同浓度的重金属的刺激下,文蛤肝脏中CAT活性亦随着重金属种类、浓度的不同发生明显变化^[29]。在本研究中,通过qRT-PCR检测发现,SbCAT与其他双壳贝类过氧化氢酶一样在健康个体的不同组织都有表达^[16-17,27],但表达量差异明显,这可能是由于各个组织的代谢水平、过氧化氢以及其他ROS含量不同造成

的。经鳗弧菌和金黄色葡萄球菌刺激后, SbCAT在鳗弧菌刺激组的外套膜中表达量较低, 其他组织表现出不统一的先上升再下降的趋势。鳗弧菌刺激组的表达高峰主要集中在16~32 h, 而金黄色葡萄球菌刺激组的出现较早, 多集中在8~16 h。研究表明, 微生物刺激可以引起呼吸爆发, 从而导致活性氧的快速产生以抵御微生物的入侵或者通过一定的信号通路诱导细胞保护和防御^[30-32]。因此过氧化氢酶的含量要保持一个较低水平, 从而保证ROS不被分解^[33], 这可能是在细菌刺激早期, SbCAT的表达量无显著升高, 甚至还会低于对照组的原因所在, 这种现象亦出现在栉孔扇贝和近江牡蛎中^[16, 19]。但是, ROS含量过高会破坏氧化防御系统, 因此, 大多组织内的CAT在细菌刺激后的表达量均有所上调, 推测主要是为了清除体内多余的ROS, 避免机体损伤。栉孔扇贝血细胞中CfCAT的表达量在受到鳗弧菌刺激后的12 h出现了表达高峰^[18], 拟穴青蟹血细胞和肝胰腺中CAT在受到LPS刺激后的3~6 h分别出现表达高峰^[34], 而中国明对虾血细胞和肝胰腺中的CAT则是在受到WSSV刺激后的14~37 h出现表达高峰^[35], 与本实验的结果相似。

此外, 研究还表明对照组的斧足、鳃和外套膜内的CAT表达量相对较高, 而这3种组织在受到细菌刺激后, 尤其在外套膜中, 鳗弧菌刺激后, SbCAT表达量持续较低, 没有显著变化, 而在金黄色葡萄球菌刺激后, 其最大值也仅为对照组的1.8倍($P < 0.01$)。推测这3个组织中产生的ROS较少, 免疫反应强度较小。SbCAT对金黄色葡萄球菌刺激的响应时间较鳗弧菌刺激短, 且鳗弧菌刺激后早期, 各个组织内CAT的表达量均出现下降, 这可能是由于鳗弧菌是魁蚶的致病菌^[36], 对魁蚶具有很大的杀伤力, 需要更多的活性氧来清除而致。在实验组中, 血淋巴中SbCAT的表达量均出现下降—升高—下降的趋势, 且升高的幅度较其他组织大。这说明血淋巴是魁蚶重要的免疫组织, 能够对外源细菌刺激做出免疫应答反应^[3]。

参考文献:

- [1] 王颖, 吴志宏, 李红艳, 等. 青岛魁蚶软体部营养成分分析及评价[J]. 渔业科学进展, 2013, 34(1):133-139.
Wang Y, Wu Z H, Li H Y, et al. Analysis and evaluation of nutrition composition in soft tissue of *Anadara uropygimelana*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(1): 133-139(in Chinese).
- [2] 陈竞春, 石安静. 贝类免疫生物学研究概况[J]. 水生生物学报, 1996, 20(1): 74-78.
Chen J C, Shi A J. Malacozoan immunobiology research:a review[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1996, 20(1): 74-78(in Chinese).
- [3] 周丽青, 杨爱国, 王清印, 等. 魁蚶血细胞分类及其免疫功能的初步分析[J]. 水产学报, 2013, 37(4): 599-606.
Zhou L Q, Yang A G, Wang Q Y, et al. Studies on the hemocytes types and their immunological functions in bloody clam (*Scapharca broughtonii*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(4): 599-606(in Chinese).
- [4] Zheng L B, Wu B, Liu Z H, et al. A manganese superoxide dismutase (MnSOD) from ark shell, *Scapharca broughtonii*: Molecular characterization, expression and immune activity analysis[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 45(2): 656-665. DOI:10.1016/j.fsi.2015.05.003.
- [5] Zheng L B, Liu Z H, Wu B, et al. Ferritin has an important immune function in the ark shell *Scapharca broughtonii*[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2016, 59:15-24. DOI:10.1016/j.dci.2015.12.010.
- [6] 郑利兵, 吴彪, 刘志鸿, 等. 魁蚶(*Scapharca broughtonii*)半乳糖凝集素(*SbGal*)基因cDNA的克隆及表达分析[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(5): 1061-1070.
Zheng L B, Wu B, Liu Z H, et al. Cloning and expression analysis of galectin from *Scapharca broughtonii* (*SbGal*)[J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2015, 46(5): 1061-1070(in Chinese).
- [7] Li M, Zhu L, Zhou C Y, et al. Molecular characterization and expression of a novel big defensin (*Sb-BDef1*) from ark shell, *Scapharca broughtonii*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(5): 1167-1173. DOI:10.1016/j.fsi.2012.09.008.
- [8] Kashiwagi A, Kashiwagi K, Takase M, et al. Comparison of catalase in diploid and haploid *Rana rugosa* using heat and chemical inactivation techniques.[J]. Comparative Biochemistry & Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1997, 118(3): 499-503. DOI:10.1016/S0305-0491(97)00216-2.
- [9] Nishikawa M, Hashida M, Takakura Y. Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and

- tumor metastasis[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, 61(4): 319-326. DOI:10.1016/j.addr.2009.01.001.
- [10] 李建喜, 杨志强, 王学智. 活性氧自由基在动物机体内的生物学作用[J]. *动物医学进展*, 2006, 27(10): 33-36.
- Li J X, Yang Z Q, Wang X Z. Biological Function of Reactive Oxygen Free Radicals in Animals[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2006, 27(10): 33-36(in Chinese).
- [11] Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function[J]. *Physiological Reviews*, 2002, 82(1): 47-95. DOI:10.1152/physrev.00018.2001.
- [12] Suzuki Y J, Forman H J, Sevanian A. Oxidants as Stimulators of Signal Transduction[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1997, 22(1-2): 269-285. DOI:10.1016/S0891-5849(96)00275-4.
- [13] Quan F, Korneluk R G, Tropak M B, *et al.* Isolation and characterization of the human catalase gene[J]. *Nucleic Acids Research*, 1986, 14(13): 5321-5335. DOI:10.1093/nar/14.13. 5321.
- [14] Reimer D L, Bailey J, Singh S M. Complete cDNA and 5' genomic sequences and multilevel regulation of the mouse catalase gene.[J]. *Genomics*, 1994, 21(2): 325-336. DOI:10.1006/geno.1994.1273.
- [15] Hideaki N, Mikio Y, Kiminobu G, *et al.* Isolation and characterization of the rat catalase-encoding gene[J]. *Gene*, 1989, 79(2): 279-288. DOI:10.1016/0378-1119(89)90210-2.
- [16] Zhang Y, Fu D K, Yu F, *et al.* Two catalase homologs are involved in host protection against bacterial infection and oxidative stress in *Crassostrea hongkongensis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(6): 894-903. DOI:10.1016/j.fsi.2011.08.005.
- [17] Guo H Y, Zhang D C, Cui S, *et al.* Molecular characterization and mRNA expression of catalase from pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. *Marine Genomics*, 2011, 4(4): 245-251. DOI:10.1016/j.margen. 2011.05.003.
- [18] Li C H, Ni D J, Song L S, *et al.* Molecular cloning and characterization of a catalase gene from Zhikong scallop *Chlamys farreri*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(1): 26-34. DOI:10.1016/j.fsi.2007.06.010
- [19] Ekanayake P M, Zoysa M D, Kang H S, *et al.* Cloning, characterization and tissue expression of disk abalone (*Haliotis discus discus*) catalase[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(3): 267-278. DOI:10.1016/j.fsi.2007.11.007.
- [20] 董迎辉. 泥蚶高通量转录组分析及生长相关基因的克隆与表达研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- Dong Y H. Transcriptome analysis using 454 pyrosequencing and cloning and expression of growth-related genes for the blood clam *Tegillarca granosa*(Linnaeus, 1758)[D]. QingDao: Ocean University of China, 2012(in Chinese).
- [21] Klotz M G, Klassen G R, Loewen P C. Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases.[J]. *Molecular Biology & Evolution*, 1997, 14(9): 951-958. DOI:10.1093/oxfordjournals.molbev.a025838.
- [22] Putnam C D, Arvai A S, Bourne Y, *et al.* Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 296(1): 295-309. DOI: 10.1006/jmbi.1999.3458.
- [23] 高杉, 周遵春, 董颖, 等. 仿刺参过氧化氢酶基因全长cDNA的克隆及表达分析[J]. *中国农业科技导报*, 2014, 16(2): 127-134.
- Gao S, Zhou Z C, Dong Y, *et al.* Full-length cDNA cloning and expression analysis of catalase gene from sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)[J]. *Review of China Agricultural Science and Technology*, 2014, 16(2): 127-134(in Chinese).
- [24] 王家红, 童玥, 朱玥, 等. 蛋白质糖基化的研究进展[J]. *药物生物技术*, 2011, 18(1): 77-80.
- Wang J H, Tong Y, Zhu Y, *et al.* The research progress in protein glycosylation[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2011, 18(1): 77-80(in Chinese).
- [25] Amery L, Brees C, Baes M, *et al.* C-terminal tripeptide Ser-Asn-Leu (SNL) of human D-aspartate oxidase is a functional peroxisome-targeting signal.[J]. *Biochemical Journal*, 1998, 336(2): 367-371. DOI: 10.1042/bj 3360367.
- [26] Rachubinski R A, Subramani S. How proteins penetrate peroxisomes[J]. *Cell*, 1995, 83(83):525-528. DOI:10. 1016/0092-8674(95)90091-8.
- [27] Yang X L, Li G, Wen C G, *et al.* A catalase from the freshwater mussel *Cristaria plicata* with cloning, identification and protein characterization[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(3): 389-399. DOI:10.1016/j.fsi.2011.06.003.

- [28] Khessiba A, Roméo M, Aïssa P. Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane[J]. *Environmental Pollution*, 2005, 133(2): 275-281. DOI:10.1016/j.envpol.2004.05.035
- [29] 任虹, 李强, 李婷. 重金属污染物对文蛤金属酶类的影响[J]. *中国渔业质量与标准*, 2014, 4(4): 7-12.
Ren H, Li Q, Li T. Effects of heavy metals on metalloenzymes from *Meretrix meretrix*[J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2014, 4(4): 7-12(in Chinese).
- [30] Levine A, Tenhaken R, Dixon R, *et al.* H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response[J]. *Cell*, 1994, 79(4): 583-593. DOI:10.1016/0092-8674(94)90544-4.
- [31] Lambert C, Soudant P, Choquet G, *et al.* Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2003, 15(3): 225-240. DOI:10.1016/S1050-4648(02)00160-2.
- [32] 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. DOI:10.1016/j.fsi.2006.09.002.
- [33] Abele-Oeschger D, Sartoris F J, Pörtner H O. Hydrogen peroxide causes a decrease in aerobic metabolic rate and in intracellular pH in the shrimp *Crangon crangon*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 1997, 117(2): 123-129. DOI:10.1016/S0742-8413(97)00059-5.
- [34] Liu H P, Chen F Y, Gopalakrishnan S, *et al.* Antioxidant enzymes from the crab *Scylla paramamosain*: Gene cloning and gene/protein expression profiles against LPS challenge[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28(5-6): 862-871. DOI:10.1016/j.fsi.2010.02.008.
- [35] Zhang Q L, Li F H, Zhang X J, *et al.* cDNA cloning, characterization and expression analysis of the antioxidant enzyme gene, catalase, of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(5): 584-591. DOI:10.1016/j.fsi.2008.01.008.
- [36] 周丽青, 杨爱国, 王清印, 等. 鳃弧菌对魁蚶血细胞形态及免疫功能的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2014, 45(3): 536-541.
Zhou L Q, Yang A G, Wang Q Y, *et al.* Effect of *Vibrio anguillarum* on morphology and immunological function of blood cells in *Scapharca broughtonii*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(3): 536-541(in Chinese).

Gene cloning and expression analysis of catalase in *Scapharca broughtonii*

HUANG Yonghuan^{1,2}, LIU Zhihong^{1*}, WU Biao¹, ZHOU Liqing¹,
SUN Xiujun¹, YANG Aiguo¹, LI Dongming^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Catalase (EC 1.11.1.6) is an important antioxidant enzyme that protects aerobic organisms against oxidative damage by degrading hydrogen peroxide to water and oxygen. In the present study, the complete cDNA of Catalase in ark shell *Scapharca broughtonii* (named *SbCAT*) was cloned by RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends technique, which contained 2181 bp. The cDNA consists of a 5' untranslated region (UTR) of 96 nucleotides, the 3' UTR of 654 bp, and an open reading frame (ORF) of 1431 bp, encoding 477 amino acid residues with 54 ku predicted molecular weight and the theoretical isoelectric point of 8.03. *SbCAT* amino acid sequence compared with the other animals compared 68%–96%. The deduced amino acid sequence of *SbCAT* has characteristic features of catalase family such as the catalase active site (₆₁FNRERIPERVV-HAKGAG₇₇), the catalase heme-ligand signature motif (₃₅₁RLFSYPDTH₃₅₉) and the three catalytic amino acid residues of His-72, Asn-145 and Tyr-355. In addition, *SbCAT* also has the conservative heme-binding pocket and NADPH binding sites. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) method was used to analyze the *SbCAT* mRNA expression characterization in tissues of normal ark shells. The results showed that *SbCAT* mRNA detected was expressed in six had a high similarity of and it was higher in the mantle and lower in the tissues of hepatopancreas and haemocyte. After *Vibrio anguillarum* and *Staphylococcus aureus* challenge, *SbCAT* expression was rather low in mantle with *V. anguillarum* challenged, and significantly up-regulated in other tissues. This results suggests that *SbCAT* may play an important role in the immune defense of *S. broughtonii*.

Key words: *Scapharca broughtonii*; catalase; RACE; qRT-PCR

Corresponding author: LIU Zhihong. E-mail: liuzh@ysfri.ac.cn

Funding projects: National Infrastructure of Fishery Germplasm Resources Programme(2060503-01); National Basic Research Special Foundation of China(2013FY110700); Natural Science Foundation of Shandong Province(ZR2013CQ047); The Basic Scientific Research Fund of YSFRI (2060302201516054)