

三角帆蚌 *CAT* 基因 cDNA 全长克隆及表达分析

袁一鸣¹, 李西雷¹, 白志毅¹, 汪桂玲¹, 李家乐^{1,2*}

(1. 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海市高校水产养殖学 E-研究院, 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) 首次克隆了三角帆蚌过氧化氢酶 (*CAT*) 基因的 cDNA 全长序列, 为 2 804 bp, 包含 112 bp 的 5' 非翻译区 (untranslated region, UTR), 1 303 bp 的 3'UTR 和 1 388 bp 的开放阅读框 (open reading frame, ORF)。ORF 区共编码 462 个氨基酸, 推算的分子量约为 52.7 ku, 理论等电点为 6.35。多序列比对结果显示, 有一段 *CAT* 氨基酸高度保守的催化位点序列 FDRERIPERVVHAKGAG。三角帆蚌 *CAT* 基因有 12 个与还原型辅酶 II (NADPH) 结合的氨基酸残基, 分别是 Asp107、His153、Phe157、Ser160、Arg162、Asn172、Try174、Lys196、Val261、Trp262、His264 和 Try317, 其中第 261 位和第 264 位的氨基酸在不同物种间有所区别。比对结果得到的三角帆蚌 *CAT* 基因的氨基酸序列, 与软体动物的 *CAT* 基因相似性高达 99%, 与虾类、鱼类、两栖类、哺乳类的 *CAT* 基因相似性也达到 98%~99%, 可推断属于 *CAT3*。利用 *CAT* 基因推断得到的氨基酸序列构建 NJ 系统树, 分析显示三角帆蚌首先与软体动物聚在一起, 再与虾类聚在一起, 然后依次与鱼类、两栖类和哺乳类聚在一起。荧光定量结果显示, *CAT* 基因在三角帆蚌的 7 个组织均有表达, 其中在肾中的表达量极低, 在血液中表达呈上调趋势且明显区别于其他组织, 在另外 5 个组织中总体上呈现不统一的先上调后下调的趋势。

关键词: 三角帆蚌; 过氧化氢酶 (*CAT*); 基因表达; RACE-PCR

中图分类号: Q 785; S 917

文献标识码: A

生物体在长期的进化过程中, 形成了一套抗氧化系统来清除体内多余的活性氧, 包括非酶类抗氧化剂和酶类抗氧化剂, 前者如维生素 E、谷胱甘肽、 β -胡萝卜素等; 后者主要有 3 种: 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, *CAT*) 及谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPX)。过氧化氢酶普遍存在于原核生物和真核生物中^[1-2], 能有效地防止 H_2O_2 与细胞有氧代谢中产生的超氧阴离子自由基 $O_2^{\cdot-}$ 进一步生成自由基 $\cdot OH$, 从而防止自由基对细胞的损伤^[3]。对 *CAT* 的研究始于 19 世纪初^[4], 目前已在拟南芥中发现 *CAT* 基因是个小家族, 包括 *CAT1*、*CAT2*、*CAT3* 等成员^[5]。在动物

细胞中, *CAT* 仅由一个基因编码^[6], 无脊椎动物在细胞吞噬过程中通过呼吸爆发抵御感染, 为了防止其间产生过量的氧化压力, *CAT* 就充当了为需氧细胞调节过量活性氧的重要角色^[7], 因此对于 *CAT* 分子水平的研究有益于深入探讨贝类的免疫功能。

三角帆蚌 (*Hypriopsis cumingii*) 是我国特有种, 为优良的淡水育珠母蚌, 三角帆蚌所产的珍珠质量佳, 珠质细腻、光滑、色泽鲜艳、形状较圆^[8]。近年来养殖贝类病害日渐严重, 大规模死亡现象时有发生, 不仅造成了巨大的经济损失, 而且直接威胁到现有养殖产业的生存和发展, 已经成为一个瓶颈问题。迄今为止, 有关无脊椎动物 *CAT* 基因的研究还很有限, 对三角帆蚌 *CAT* 基因的研究

收稿日期: 2010-10-08 修回日期: 2011-01-11

资助项目: 国家“九七三”计划前期研究专项项目 (2009CB126001); 国家自然科学基金项目 (30871923); 国家科技支撑计划项目 (2006BAD01A13); 上海市科委地方院校能力建设项目 (08390510100)

通讯作者: 李家乐, E-mail: jlli@shou.edu.cn

尚未见报道。RACE (rapid amplification of cDNA ends) 技术即 cDNA 末端快速扩增法是一种从低丰度转录本中快速扩增 cDNA 5' 和 3' 末端简单而有效的方法。荧光定量 PCR (real time quantitative PCR) 是近几年从传统 PCR 技术发展起来的新技术, 既保持了传统 PCR 技术灵敏、快速的特点, 又克服了以往 PCR 技术中存在的假阳性污染和不能进行准确定量的缺点。

本研究通过 RACE 技术成功克隆了三角帆蚌 *CAT* 基因全长 cDNA 序列, 且对 cDNA 序列和推导得到的氨基酸序列进行了分析, 并用实时荧光定量 PCR 检测了其在外套膜、血液、肝、肾、胃、肠、斧足等 7 个组织中的表达情况, 为进一步研究三角帆蚌 *CAT* 基因的结构和功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

三角帆蚌于 2009 年 7 月采自浙江省金华市威望养殖新技术有限公司生产基地, 均为二龄健康三角帆蚌, 共 100 只。嗜水气单胞菌取自上海海洋大学病原库。

RNAiso Plus、TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0、TaKaRa pMD19-T Vector、PrimeScript™ RT reagent Kit、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time)、Easy Dilution (for Real Time PCR) 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; *E. coli* DH5α、TIANGel Midi Purification Kit 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; SMART™ RACE cDNA Amplification Kit、Advantage® 2 PCR Enzyme System 购自 BD Biosciences Clontech 公司。

1.2 方法

嗜水气单胞菌的诱导 选取大小相近的二龄健康三角帆蚌在室温中暂养一周, 用气泵提供充足氧气, 适时换水, 每天投喂适量小球藻。激活嗜水气单胞菌并计算菌液浓度, 以 1 mL 的浓度约为 4×10^8 CFU/mL 的嗜水气单胞菌注射到三角帆蚌闭壳肌中, 对照个体注射 1 mL 的磷酸缓冲液。分别在感染后 2、4、8、16、24、48、72 h 的时间点解剖实验蚌 (每次 3 只) 和对照蚌 (3 只), 取外套膜、血液、肝、肾、胃、肠、斧足 7 种组织并保存于 -70 °C。

三角帆蚌各组织的总 RNA 提取 按 RNAiso Plus 说明书提取三角帆蚌外套膜、血液、

肝、肾、胃、肠、斧足的总 RNA。

三角帆蚌 *CAT* 基因克隆和序列测定 三角帆蚌血液 EST 序列 (FK028064) 源自本实验室的 cDNA 文库^[9]。

3' 末端扩增 使用 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 试剂盒, 根据获得的 EST 序列, 利用 Primer primer 5.0 设计上游特异性引物 Cf: 5'-AGGGCGTATGATTGAGTT-3', 下游引物为试剂盒中的 M13 Primer M4: 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'。以反转录后的第一链 Ready cDNA 为模板, 扩增 3' 端的 PCR 反应参数为 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存。

5' 末端扩增 使用 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 与 Advantage® 2 PCR Enzyme System 试剂盒, 采用巢式 PCR, 先用 Primer primer 5.0 设计下游特异性引物 Cr1: 5'-CCTTCTTATTCTCTGACCGTGGCAC-3', 上游引物为试剂盒中的 UPM: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' (Long); 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (Short)。第二次 PCR 以第一次 PCR 产物为模板, 用下游引物 Cr2: 5'-GCAGGACTTCGTCCTCACGGATGAG-3', 上游引物 UPM 进行第二次 PCR。扩增 5' 端的 PCR 反应参数: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 3 min, 25 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存。

扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离检测, 用 TIANGel Midi Purification Kit 回收目的片段 PCR 产物, 连入 pMD19-T 载体, 转化到 *E. coli* DH5α 感受态细胞, 所获得的阳性克隆由上海英骏生物技术有限公司进行序列测定。

三角帆蚌 *CAT* 基因同源性分析及分子进化分析 将获得的三角帆蚌 *CAT* 基因的全长 cDNA 序列与 GenBank 核酸数据库及蛋白数据库作 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 分析。应用 ORF Finder 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 确定正确的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 翻译成氨基酸序列。用 ProtParam 程序 (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 预测氨基酸序列的物理参数, Scratch 程序 (<http://www.ics.uci.edu/~baldig/scratch/index.html>) 预测二硫

键, TMHMM server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析跨膜结构, Signal P 3.0 server 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽, PSORT II Prediction 程序 (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>) 基于其氨基酸序列预测蛋白质亚细胞定位点。利用 ClustalX 软件^[10] 对相应的氨基酸序列进行多序列比对。利用 MEGA 4.0 软件^[11], 采用邻位相接法 (NJ 法) 构建三角帆蚌过氧化氢酶基因氨基酸序列与其他 13 种物种的过氧化氢酶基因氨基酸序列的系统树, 并用 Bootstrap 重复 1 000 次计算各分支的置信度。三级结构通过 ESyPred3D^[12] (<http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>) 提交进行分析。

三角帆蚌 *CAT* 基因表达分析 根据已获得的三角帆蚌内参基因 β -actin^[13], 以及 *CAT* 基因全长 cDNA 序列, 分别设计一对正反引物 (β -actin-F 和 β -actin-R, *CAT*-F 和 *CAT*-R, 表 1), 根据 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Perfect Real Time) 试剂盒进行荧光定量 RT-PCR, PCR 反应参数为 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 45 个循环。反应结束后电脑自动绘制标准曲线, 计算出待测样品中目的基因和内参基因的准确含量。7 种组织分别以该组织的空白对照设为指标参数 1, 得到 7 个时间点实验组的相对表达量。

表 1 β -actin 基因和 *CAT* 基因荧光定量所用到的引物序列
Tab. 1 Primer sequences of real time quantitative RT-PCR for β -actin and *CAT*

| 引物 primers | 序列(5'-3') sequence | 片段 segment |
|---|--------------------------------|---------------|
| <i>β-actin</i> 基因 | | |
| <i>β-actin</i> -F | 5'-ACGGATAACACAAGGAAAGGAAAC-3' | 145 |
| <i>β-actin</i> -R | 5'-ATGGATGGAACACGGCTCT-3' | |
| <i>CAT</i> 基因 | | |
| <i>CAT</i> -F | 5'-CCTGTGGGAAAGATGGTGCT-3' | 84 |
| <i>CAT</i> -R | 5'-CATGTGAGCTGGCGAGAATG-3' | |

2 结果

2.1 血液总 RNA 及 RACE 产物的鉴定

提取的血液总 RNA 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳 (图 1-a)。用分光光度计测 OD 值, 计算 R 值 (OD_{260}/OD_{280}) 为 1.98, 结果表明提取的总 RNA 纯度高, 符合 RACE 扩增要求。3'RACE 及

5'RACE 的产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳 (图 1, Maker 均为 D2000 DNA 分子量标准), 所得产物分别约为 2 700 bp (图 1-b) 和 200 bp (图 1-c)。

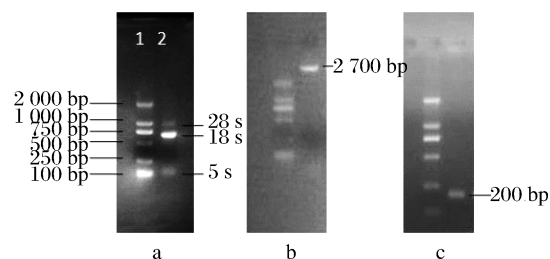


图 1 三角帆蚌总 RNA 完整性的检测以及 3',5' RACE 扩增产物电泳图

a: RNA 完整性检测; b: 3'RACE 产物; c: 5'RACE 产物。

1: D2000 DNA 分子量标准; 2: 三角帆蚌总 RNA 提取产物。

Fig. 1 The gel electrophoresis pattern of total RNA and 3',5' RACE product from *H. cumingii*

A: The gel electrophoresis pattern of total RNA; B: 3'RACE product; C: 5'RACE product.

1: D2000 DNA Maker; 2: Total RNA product of *H. cumingii*.

2.2 *CAT* 基因 cDNA 全长序列的特征

扩增测序得到三角帆蚌 *CAT* 基因的全长 cDNA 序列, 推导获得其氨基酸序列。获得的 cDNA 序列全长 2 804 bp, 5'UTR 为 112 bp, 3'UTR 为 1 303 bp。开放阅读框长度为 1 388 bp, 可编码 462 个氨基酸。图 2 中 AATAAA 为推测的多聚腺苷酸加尾信号位点 (polyadenylation signal site)。

2.3 *CAT* 氨基酸的序列特征

推导得到的氨基酸共有 462 个, 分子量大约为 52.7 ku, 理论等电点为 6.35。GC 含量为 47.73%, 其中脯氨酸 (Pro) 含量最高为 7.4%, 半胱氨酸 (Cys) 和色氨酸 (Trp) 含量最少为 1.5%。带负电荷氨基酸残基 (Asp + Glu) 55 个, 带正电荷氨基酸残基 (Arg + Lys, His) 50 个。脂肪族氨基酸指数为 59.96, 原子总量 7 265, 分子式为 $C_{2359}H_{3547}N_{647}O_{693}S_{19}$ 。三角帆蚌 *CAT* 基因氨基酸含有 5 个半胱氨酸 (Cys), 形成 2 个二硫键, 分别连接第 178 位和第 194 位, 第 261 位和第 290 位的半胱氨酸 (Cys)。预测结果无跨膜结构和信号肽, 蛋白质亚细胞定位为细胞质。

三角帆蚌 *CAT* 基因氨基酸序列经 BlastP 检索, 预测为 *CAT3*, 与栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*)、皱纹盘鲍 (*Haliotis discus discus*)、太平洋牡蛎

(*Crassostrea gigas*) 等软体动物的相似性高达 99%, 与虾类、鱼类、两栖类和哺乳类的相似性也达到 98% ~ 99%。用 Bioedit 软件^[14] 将三角帆蚌 *CAT* 基因氨基酸序列与其他 13 个物种的 *CAT* 基因氨基酸序列进行多序列比对, 用 ClustalX 进行分析(图 3), 用 MEGA 4.1 软件以邻位相接法

(NJ 法) 构建了 *CAT* 基因氨基酸的系统树(图 4), 进化树采用 Bootstrap 重复 1 000 次检验。在该系统进化树中, 三角帆蚌先与软体动物聚在一起, 再与虾类聚在一起, 然后依次与鱼类、两栖类和哺乳类聚在一起。三角帆蚌 *CAT* 基因的分子进化地位与三角帆蚌生物学分类地位一致。

```

1  acgcgaggagagacaaggcagcctaatacagcctaaacgacttcaagga  tgctcaaacaaagcctgatgtgctgactacaggtactggggcccc
91  agtggggaccaagcggccacg
113 ATGACCGTTGGACCCAGGGTCCAGTCTTGATGCAGGACTTCGTCTTACGGATGAGATGGCTCATTTTAACAGAGAAAAGGATCCCTGAG
    M T V G P R G P V L M Q D F V F T D E M A H F N R E R I P E
203 AGAGTCGTCCACGCGAAGGGAGCTGGTGCCTTTGGTTACTTTGAGTGCACACATGACATAACCGCTACTGCAAAGCCAAGCCCTTTGAA
    R V V H A K G A G A F G Y F E C T H D I T A Y C K A K P F E
293 AGTGTGGGAAGAAGACACCTTTGGCTGTGCGTTTTCAACTGTGGGTGGTGGAGTGGCTCAGCTGACACGGCTAGAGATCCTAGAGGA
    S V G K K T P L A V R F S T V G G E S G S A D T A R D P R G
383 TTTGCTGTCAAATTTTACTCTGAGGATGGAACTGGGATTTGGTTGGGAACAACACTCCCATCTTCTTCATCGAGACCCAATGTTGTC
    F A V K F Y S E D G N W D L V G N N T P I F F I R D P M L F
473 CCAAGTTTCATCCATACCCAAAAGAGGAATCCTCAGACTCATTAAAGGACCTGACATGTTCTGGGACTTCATCACCTTCGTCCAGAG
    P S F I H T Q K R N P Q T H L K D P D M F W D F I T L R P E
563 ACCACCCACCAAGTGCCTTCTTATCTCTGACCGTGGCACCCAGATGGTTTTCGTCACATGAATGGCTATGGCAGTACACATTCAA
    T T H Q V S F L F S D R G T P D G F R H M N G Y G S H T F K
653 ATGGTGAACAAGGATGGCAAGCCAATCTACTGCAAGTCCACTGGAAGACTGACCAAGGTATCAAAAACCTGCCAGCAGCAAAGCAGCT
    M V N K D G K P I Y C K F H W K T D Q G I K N L P A D K A A
743 GAACTGGCCAGCAGTGACCCAGATTATCCATAAGAGACCTATACAATGCCATTGCTGAGGGCAACTTCCCATCATGGTCACTGCACATC
    E L A S S D P D Y S I R D L Y N A I A E G N F P S W S L H I
833 CAGTTCATGACCTTTGAGCAGGCTGAAACCTTCAGATTAAATCCATTTGACCTTACCAAGATTTGGCCACAAGGGGAGTATCCACTGATA
    Q V M T F E Q A E T F R F N P F D L T K I W P Q G E Y P L I
923 CCTGTGGGAAAGATGGTGTCAACAGAAAATCCTAAGAATTACTTTGCTGAAAGTGAACAGATTCATTCTCGCCAGCTCACATGATTCCT
    P V G K M V L N R N P K N Y F A E V E Q I A F S P A H M I P
1013 GGCATAGAGCCAAGTCCAGATAAATGCTGCAGGGACGCTGTTCTTACTCGGACCCCATCGTCATCGACTGGGAAGTAACTACCTT
    G I E P S P D K M L Q G R L F S Y S D T H R H R L G S N Y L
1103 CAGATTCCTGTCAACTGCCATACAATGCCAATGTCAAGAATTACCAGAGGGATGGCCACAATGTGTTAATGATAACCAAGCTGGAGCA
    Q I P V N C P Y N A N V K N Y Q R D G P Q C V N D N Q A G A
1193 CCGAACTACTTCCCAACAGTTTCAGTGGCCCTCAAGATGATGCCAAACACATGGAGCACCACTACAGTGAGTGGAGATGTGGCTCGC
    P N Y F P N S F S G P Q D D A K H M E H T T T V S G D V A R
1283 TACAATACTGCTGATGAGGACAACTTTTCCAAGTCAACACTACTGGGAAAAGTTTTGAACCCTGAAGCAAGACAAAGACTGTGTGAG
    Y N T A D E D N F S Q V T T Y W E K V L N P E A R Q R L C E
1373 AACATTGCCAGTCATGCAAAGGATGCCAGGAGTTCATCCAGGAGAGAGTCGTCATCAGTGGAGCAAGGTTGATCCAGAATGTGGACAG
    N I A S H A K D A Q E F I Q E R V V N Q W S K V D P E C G Q
1463 ACAATCCAAAACCTCTGCTTAAATACAAGTCTTTGTAA 1501
    T I Q K L L L K Y K S L *

```

1502 ggaggcaaacagtcagagttactgccagcctgtagacagctcacttgggattcctggaaagctttgttacgaaaatggacttaatgt
 1592 ttatactgtaacattccatagaacaattgaacagatcgagaccatgttgcacgtatgtagaagacacaatgatc taatat
 1682 aaccagtgattcccttatgaaagtgetagatgggataatccttttatctatttgcctgtacagtgattcttaaatctagagaaccat
 1772 ttatacaattttaatttagataaagaaaagataacagttgtagcaataattgtataagatagataacagtatagcaatgcttgatagc
 1862 tagataaaaagttagtaattgataaggtagataacagttctagcaatgattgtataatgtagataaacagttctagctatgattgta
 1952 taatgtagataaacagttctagctatgattgtataatgtagataaacagttctagcaatgattgcataaggtagataaacagttctagttatg
 2042 attgtatagtgtagataaacagttctagcaatgattgcataaggtagataaacagttctagctatgattgtataatgtagataaacagttct
 2132 gctatgattgtataatgtagataaacagttctagcaatgattgcataaggtagataaacagttctagcaataacgtttatgataggttga
 2222 tacataaacactcaatgcaaaaattgaatgaattgttttttcaaaattgtataaaaattgttctatttcaaatgtataggggttagc
 2312 aacattaagtcctcatgagatgtactttcacaataatatttateccatcaaatattatttaaaatataaaaggaagattgtcactat
 2402 gcatttttttaagaactatataatatttttgcctttactttcatcttcattgatttgatattgattgttaattcagttattacctgca
 2492 tacatattttgcatcaagggtattttatagtaattcttttcccttgagataaacacaaatgctttaatgaagtaattttaactttattga
 2582 aagcagcagggtttccaatgtacataattatattacatataatagtaaatgtctgtacattaggaacatcagattaacatgctctcagat
 2672 aaggtgtttgtgttgaaaatggctctggaaaattaatatttcatgatagatgaaatagaaactaactgagcacttcaattgtaataa
 2762 ttaacaaaacaataaagaattaatagcgaaaaaaaaaaaaaa

图 2 *CAT* 编码基因 cDNA 全长及推导的氨基酸序列

小写字母代表 3',5'端非翻译区;大写字母部分为编码区,且上面为核苷酸序列,下面为氨基酸序列;方框标出的是多聚腺苷酸加尾信号位点 AATAAA;保守序列用下划线标出;*表示终止密码子。

Fig. 2 The full-length of cDNA and deduced amino acid sequence of *CAT* from *H. cumingii*

3',5'untranslated regions are shown as lowercases; Coding region is shown as uppercases, where the upper sequence indicates the nucleotides and the lower shows the amino acids; Putative polyadenylation signals (AATAAA) are boxed; Residues underlined are completely conserved across all species aligned sequences; Stop codon is marked with asterisk (*).

Fenneropenaeus chinensis --MPDKCAEQLTDFK--KQQTAPDNLTTSHGCPLSDKLNLSLVGPRGPILLQDIQLLDE 56
Litopenaeus vannamei --MPDKCAEQLNDFK--KQQTAPDNLTTSHGCPLADKLNLSLVGPRGPILLQDIQLLDE 56
Haliotis discus discus --MATRDKASEQLNEFS--KGQKPDVLTGTGAPVGRKTATMTVGPQGPVLLQDFVFTDE 57
Crassostrea gigas --MSTRDKATEQLNEFK--LSHATPEQCTTGTGAPIGLKTATMTAGPLGPVLLQDFVFNDE 57
Chlamys farreri --MANRDKATNQLLEEFK--KAQSKADVLTGTGAPVGTKTATLTAGPRGPVLIQDFIFTDE 57
Hyriopsis cumingii -----MTVGPGRGPVLLQDFVFTDE 19
Oplegnathus fasciatus MADNRGKATDQMKTWKENRSSQRPDLTTGAGHPVGDKNLQTAGPRGPLLQDVVFTDE 60
Rachycentron canadum MADNRDKTTDQMKLWKEGRSQRPDVLTGAGHPVGDKNLQTAGPRGPLLQDVVFTDE 60
Takifugu obscurus MADKRDKATDQMKLWKEGRGYQ--PDILTTGGGHPVGDKNLQTAGPKGPLLQDVVFTDE 59
Ctenopharyngodon idella MAD-REKATDQMKLWKEGRSQRPDVLTGAGVPVGDKNLLTAGPRGPLLQDVVFTDE 59
Mus musculus MSDSRDPASDQMKQWKEQRASQRPDLTTGGGNPVGDKLNIMTAGSRGPLLQDVVFTDE 60
Canis lupus familiaris MADSRDPASDQMKLWKEQRAAQKPDVLTGAGNPVGDKNLNVITVGPGRPLLQDVVFTDE 60
Homo sapiens MADSRDPASDQMKLWKEQRAAQKADVLTGAGNPVGDKNLNVITVGPGRPLLQDVVFTDE 60
Xenopus laevis MADKRDNAADQMKLWKNRGSQKPDVLTGAGNPVGDKNLNVITVGPGRPLLQDVVFTDE 60

,, **:*:*. : **

Fenneropenaeus chinensis MAHFDREIRPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITKYCKAAMFSEIGKQTPIAVRYSTVGGES 116
Litopenaeus vannamei MAHFDREIRPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDISKYCKAALFSEIGKRTPIAVRYSTVGGES 116
Haliotis discus discus MAHFNREIRPERVVHAKGAGAFGYLEITHDITKYCKAKVFERVGKKTPLAIRFSTVGGEK 117
Crassostrea gigas MAHFDREIRPERVVHAKGAGAFGYFECTHDISKYTKAKPFESVGKKTTPVGVRFSTVGGES 117
Chlamys farreri MAHFNREIRPERVVHAKGGGAFGYFEVTHDITKYCKAKPFEFVGKKTTPVGIREFSTVGGES 117
Hypriopsis cumingii MAHFNREIRPERVVHAKGAGAFGYFECTHDIAYCKAKPFESVGKKTPLAVRFSTVGGES 79
Oplegnathus fasciatus MAHFDREIRPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITRYCKAKVFEHVGTTPIAVRFSTVAGES 120
Rachycentron canadum MAHFDREIRPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDISRYCKAKVFEHVGTTPIAVRFSTVAGES 120
Takifugu obscurus MAHFDREIRPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITRYCKAKLFEHVGTTPIAVRFSTVGGES 119
Ctenopharyngodon idella MAHFDREIRPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITRYCKAKVFEHVGTTPIAVRFSTVAGES 119
Mus musculus MAHFDREIRPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITRYSKGVFEHIGKRTPIAVRFSTVAGES 120
Canis lupus familiaris MAHFDREIRPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITKYSKAKVFEHIGKRTPIAVRFSTVAGES 120
Homo sapiens MAHFDREIRPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITKYSKAKVFEHIGKRTPIAVRFSTVAGES 120
Xenopus laevis MAHFDREIRPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITKYSKAKVFENIGKRTPIAVRFSTVAGEA 120

****:*****:****:* ****: * *. *. :** **:. :*:***.**

Fenneropenaeus chinensis GSADTARDPRGFAVKFYTEEGNWLVGNNTPIFFIRDPILFPPSIHTQKRNPATHLKDDAD 176
Litopenaeus vannamei GSTDTARDPRGFAVKFYTEEGNWLVGNNTPIFFIRDPILFPPSIHTQKRNPATHLKDCD 176
Haliotis discus discus GSADTARDPPGVRHKFYTEDGNWLVGNNTPIFFIRDPMLFPPSIHTQKRNPVTLKDDPD 177
Crassostrea gigas GSADTARDPRGFAVKMYTEDGNWDLVGNNTPIFFIRDPILFPPSIHTQKRNPRTLKDDPD 177
Chlamys farreri GSADSARDPRGFAVKFYTEDGNWVVGNNTPIFFIRDPMLFPNF IHTQKRNPQTHLKDDPD 177
Hypriopsis cumingii GSADTARDPRGFAVKFYSEDGNWDLVGNNTPIFFIRDPMLFPPSIHTQKRNPQTHLKDDPD 139
Oplegnathus fasciatus GSADTVRDPGRFAVKFYSEEGNWLTVGNNTPIFFIRDALLFPPSIHQSQRNPQTHMKDDPD 180
Rachycentron canadum GSADTVRDPGRFAVKFYTEQGNWDLTVGNNTPIFFIRDALLFPPSIHQSQRNPQTHMKDDPD 180
Takifugu obscurus GSADTVRDPGRFAVKFYTEEGNWLTVGNNTPIFFIRDALLFPPSIHTQKRNPQTHMKDDPD 179
Ctenopharyngodon idella GSADTVRDPGRFAVKFYTEDGNWDLTVGNNTPIFFIRDALLFPPSIHQSQRNPQTHLKDDPD 179
Mus musculus GSADTVRDPGRFAVKFYTEDGNWDLVGNNTPIFFIRDAILFPPSIHQSQRNPQTHLKDDPD 180
Canis lupus familiaris GSADTVRDPGRFAVKFYTEDGNWDLVGNNTPIFFIRDAILFPPSIHQSQRNPQTHLKDDPD 180
Homo sapiens GSADTVRDPGRFAVKFYTEDGNWDLVGNNTPIFFIRDPILFPPSIHQSQRNPQTHLKDDPD 180
Xenopus laevis GSSDTVRDPGRFAVKMYTEDGNWDLTVGNNTPVFFIRDAMLFPPSIHQSQRNPQTHLKDDPD 180

:. ** * . **::**:. *****:****. :***. ***:***** *:*** *

Fenneropenaeus chinensis MFWDFISLRPETTHQVSELPFSDRGTPDGYRHMNGYGSHTFKLVNAKGEAVYCKFHYKTDQ 236
Litopenaeus vannamei MFWDFISLRPETTHQVSELPFSDRGTPDGYRHMNGYGSRTSKLVNEKGEAVYCKFHYKTDQ 236
Haliotis discus discus MFWDFITLRPETTHQVAFPLFSNRGTPDGYRHMNGYGSHTFKMVNAKGEVYCKFHFKTQ 237
Crassostrea gigas MFWDFISLRPETTHQVSELPFSDRGTPDGYRHMNGYGSHTFKLVNKDDKPVFCKFHFKTQ 237
Chlamys farreri MFWDFISLRPETTHQVSELPFSDRGTPNGFRKMNGYGSHTFKMVNKEGKPVYCKFHFKTQ 237
Hypriopsis cumingii MFWDFITLRPETTHQVSELPFSDRGTPDGFHRHMNGYGSHTFKMVNKDGKPIYCKFHWKTDQ 199
Oplegnathus fasciatus MVWDFWSLRPESLHQVSELPFSDRGIPDGYRHMNGYGSHTFKLVNAAGERFYCKFHFKTQ 240
Rachycentron canadum MVWDFWSLRPESLHQVSELPFSDRGIPDGYRHMNGYGSHTFKLVNADGERVYCKFHYKTDQ 240
Takifugu obscurus MMWDFWSLRPESLHQVSELPFSDRGIPDGYRHMNGYGSHTFKLVNAKGEVYCKFHFKTQ 239
Ctenopharyngodon idella MVWDFWSLRPESLHQVSELPFSDRGIPDGHHRHMNGYGSHTFKLVNAQGEVYCKFHYKTDQ 239
Mus musculus MVWDFWSLRPESLHQVSELPFSDRGIPDGHHRHMNGYGSHTFKLVNADGEAVYCKFHYKTDQ 240
Canis lupus familiaris MVWDFWSLRPESLHQVSELPFSDRGIPDGHHRHMNGYGSHTFKLVNAAGEAVYCKFHYKTDQ 240
Homo sapiens MVWDFWSLRPESLHQVSELPFSDRGIPDGHHRHMNGYGSHTFKLVNANGEAVYCKFHYKTGQ 240
Xenopus laevis MVWDFWSLRPESLHQVSELPFSDRGIPDGHHRHMNGYGSHTFKLVHAKDEAVYCKFHYKTDQ 240

*. *** :****: ***:***:*** *:*.*:*****:* **:. . :****:***.*

Fenneropenaeus chinensis GIKCLSCKKADELASDPDYATRDLYNAISSGDYPSYTYMIQVMTFEEAEKWKFNPFDLT 296
Litopenaeus vannamei GIKCLSSKKADELASDPDYATRDLYNAISSGDYPSYTCIQVMTFEEAEKWKFNPFDLT 296
Haliotis discus discus GIKNLTGAQADKLASVDPDYATRDLYNAIAEGKYPSSWSVFIQVMNVKDAEKLKWNPFDLT 297
Crassostrea gigas GIQNLAAEANRLSAEDPDYAIRDLNINIEDGKYPSSWTLKIQTMTPEQAEKYKWNPFDTV 297
Chlamys farreri GIKNLMADQAAELSKNDPDYAIRDLFNAISEGDFFPSWSLFIQVMTFEEAEKFKYNPFDLT 297
Hyriopsis cumingii GIKNLPADKAAELASSDPDYAIRDLNNAIAEGNFPSSWSLHIQVMTFEQAEFRFNPFDLT 259
Oplegnathus fasciatus GIKNLPVEEADRLASTNPDYAIRDLFNAIANGNCPSSWTFYIQTMTPEQAEKFRFNPFDLT 300
Rachycentron canadum GIKNLLVEEADRLASSNPDYAIRDLFNAIANGNPSWTFYIQTMTPEQAEKFRFNPFDLT 300
Takifugu obscurus GIKNLSVEEAGRASANPDYAIRDLFNAIANGNPSWTFYIQTMTPEQAEKFRFNPFDLT 299
Ctenopharyngodon idella GIKNLTVEEADRLASTNPDYAIRDLNNAISNGNFPSSWTFYIQTMTFEQAENKWNPFDLT 299
Mus musculus GIKNLPVGEAGRLAQEDPDYGLRDLFNAIANGNPSWTFYIQTMTFKEAETFPFNPFDLT 300
Canis lupus familiaris GIKNLSVEDAARLSHEDPDYGLRDLFNAIATGNPSWTFYIQTMTFSAETFPFNPFDLT 300
Homo sapiens GIKNLSVEDAARLSQEDPDYGLRDLFNAIATGKDPSSWTFYIQTMTFNAETFPFNPFDLT 300
Xenopus laevis CIQNLTVEANRLAASDPDYGIHDLYEAITTGNPSWSFYIQTMTFEQAERFKFNPFDLT 300

*: * . * . *: :***. **: : * *. **: . *. **: . . :** :****:*

Fenneropenaeus chinensis KVWPHIDEFPLIPVGRITFDNRPNKNYFAEVEQIAFSPANMVPGEASPDKMLQGRLFSYND 356
Litopenaeus vannamei KVWPHGEFPLIPVGRITFDNRPNKNYFAEVEQIAFSSANMVPGEASPDKMLQGRLFSYND 356
Haliotis discus discus KVWPHGEYPLIPVGRMVLNKNYFAEVEQIAFSPAHMVTGIEASPDKMLQGRLYSYSD 357
Crassostrea gigas KVWSQKDYPLIEVGKMLNRNPNYFAEVEQIAFSPAHFIPGVEASPDKMLQGRLYSYSD 357
Chlamys farreri KVWPHGEYPLIPVGRMVLNRNPNKNYFAEVEQIAFSPAHMIPGIEASPDKMLQGRLYSYSD 357
Hyriopsis cumingii KIWPQGEYPLIPVGKMLNRNPNKNYFAEVEQIAFSPAHMIPGIEPSDKMLQGRLYSYSD 319
Oplegnathus fasciatus KIWSHKEYPLIPVGKMLNRNPNVNYFAEVEQLAFDPSNMPPGIEPSDKMLQGRLYSYSD 360
Rachycentron canadum KVWSHKEYPLIPVGRMVLNRNPNVNYFAEVEQLAFDPSNMPPGIEPSDKMLQGRLYSYSD 360
Takifugu obscurus KVWSHKEYPLIPVGKMLNRNPNVNYFAEVEQMAHDSNMPPGIEPSDKMLQGRLYSYSD 359
Ctenopharyngodon idella KVWSHKEFPLIPVGRITVLRNPNVNYFAEVEQLAFDPSNMPPGIEASPDKMLQGRLYSYSD 359
Mus musculus KVWPHKDYPLIPVGKVLNKNPNVNYFAEVEQMAFDPSNMPPGIEPSDKMLQGRLYSYSD 360
Canis lupus familiaris KIWPHQDYPLIPVGKMLNRNPNVNYFTEVEQMAFDPSNMPPGIEPSDKMLQGRLYSYSD 360
Homo sapiens RVWPHKDYPLIPVGKMLNRNPNVNYFAEVEQIAFDPSNMPPGIEASPDKMLQGRLYSYSD 360
Xenopus laevis KIWPHGDYPLIPVGKMLNRNPNVNYFAEVEQLAFDPSNMPPGIEPSDKMLQGRLYSYSD 360

::* . : :*** **:: . :** *****:***. . . : . * : . **** *****: * *

Fenneropenaeus chinensis THRHLGANYTQIPVNCYRARTKKNYQRDGPVMDGNQESAPNYFPNSFSGPQDCRK-HT 415
Litopenaeus vannamei THRHLGANYTQIPVNCYRARTRNYQRDGPVMDGNQESAPNYFPNSFSGPQDCRK-HT 415
Haliotis discus discus THRHLGSNYLQIPVNCYRARTLSNYQRDGPVMDGNQESAPNYFPNSFSGPQDCRK-HT 416
Crassostrea gigas THRHLGANYLQIPVNCYRARTKKNYQRDGPVMDGNQESAPNYFPNSFSGPMDNPVGC 417
Chlamys farreri THRHLGSNYLQIPVNCYRARTKKNYQRDGPVMDGNQESAPNYFPNSFSGPQDCRK-HT 416
Hyriopsis cumingii THRHLGSNYLQIPVNCYRARTKKNYQRDGPVMDGNQESAPNYFPNSFSGPQDCRK-HT 378
Oplegnathus fasciatus THRHLGANYLQIPVNCYRARTKKNYQRDGPVMDGNQESAPNYFPNSFSGPQDCRK-HT 419
Rachycentron canadum THRHLGANYLQIPVNCYRARTKKNYQRDGPVMDGNQESAPNYFPNSFSGPQDCRK-HT 419
Takifugu obscurus THRHLGANYLQIPVNCYRARTKKNYQRDGPVMDGNQESAPNYFPNSFSGPQDCRK-HT 418
Ctenopharyngodon idella THRHLGANYLQIPVNCYRARTKKNYQRDGPVMDGNQESAPNYFPNSFSGPQDCRK-HT 418
Mus musculus THRHLGANYLQIPVNCYRARTKKNYQRDGPVMDGNQESAPNYFPNSFSGPQDCRK-HT 419
Canis lupus familiaris THRHLGANYLQIPVNCYRARTKKNYQRDGPVMDGNQESAPNYFPNSFSGPQDCRK-HT 419
Homo sapiens THRHLGANYLQIPVNCYRARTKKNYQRDGPVMDGNQESAPNYFPNSFSGPQDCRK-HT 419
Xenopus laevis THRHLGANYLQIPVNCYRARTKKNYQRDGPVMDGNQESAPNYFPNSFSGPQDCRK-HT 419

*****. ** : : ***** . : . ***** * . ** . *****:***** . *

| | | |
|---------------------------------|--|-----|
| <i>Fenneropenaeus chinensis</i> | APKFSVSADVDYNSADEDNFTQVGI FYRQVLNEAERQRLVENIAGHMIGAQEF IQERAI | 475 |
| <i>Litopenaeus vannamei</i> | APKFSVSADVDYNSADEDNFTQVGI FYRQVLNEAERQRLVENIAGHMVGAQEF IQDRAI | 475 |
| <i>Haliotis discus discus</i> | ECPFKLSGDVARYSTEDDNFSQVTGI FWKKVLPGERDHLINNLAGHIINAQEF IQKRAV | 476 |
| <i>Crassostrea gigas</i> | SCPFTTTGECRRYNSVDEDNFSQVGI FWNQVLKPEERDRLVENIGNHLINTQKL IRDRAV | 477 |
| <i>Chlamys farreri</i> | ESPFSITGDVQRYETGDEDNFSQVTVFWNKVLPKPEERQRLVENIAGHLKNAQEF IQRRTV | 476 |
| <i>Hypriopsis cumingii</i> | EHTTTVSGDVARYNTADEDNFSQVTTYWEKVLNPEARQRLCENIASHAKDAQEF IQERVV | 438 |
| <i>Oplegnathus fasciatus</i> | ESKFKVSPDVARYNSADEDNVTQVRTFYTKVLENEERQRLCQNMAGALKGAQLFIQKRMV | 479 |
| <i>Rachycentron canadum</i> | ESKFSVSPDVGRYNSADEDNVTQVRIFYTKVLENEERQRLCQNLGALKGAQLFIQKRMV | 479 |
| <i>Takifugu obscurus</i> | ESKFKVYSPDVARYNSDEDNVTQVRTFYAEVLNDEERQRLCENFAGSLKGAQLFIQKRMV | 478 |
| <i>Ctenopharyngodon idella</i> | ESKCVSPDVGRYNSDDDNVTQVRTFFTEVLNEAERERLQNMAGHLKGAQLFIQKRMV | 478 |
| <i>Mus musculus</i> | EHSVQCAVDVKRFNSANEDNVTQVRTFYTKVLENEERKRLCENIAGHLKDAQLF IQKKAV | 479 |
| <i>Canis lupus familiaris</i> | EHSQCSPDVQRFNSANEDNVTQVRTFYTKVLENEERKRLCENIAGHLKDAQLF IQKKAV | 479 |
| <i>Homo sapiens</i> | EHSIQSGEVRRFNTANDDNVTQVRIFYVNLNEEQKRLCENIAGHLKDAQIF IQKKAV | 479 |
| <i>Xenopus laevis</i> | EHRFQVSADVARYNSDEDNVSQVRDFYVVKVLEEQRLRLCENIAGHLKDAQLF IQKRAV | 479 |
| | : *.: : : ** :*, :: : ** * : * : * : . . : * : * : : : | |
| <i>Fenneropenaeus chinensis</i> | KNFTQADPEYGANIRRALDKIKMAQASSKTHHIQALAASSNGAKL---- | 520 |
| <i>Litopenaeus vannamei</i> | KNFTQADPEYGANIRRAIDKIKMSQASSKT----- | 505 |
| <i>Haliotis discus discus</i> | ANFGKADPEFGRRLQAALNALKVEP----- | 501 |
| <i>Crassostrea gigas</i> | KNFGRADPEFGRKLQAHLDSVSNYSKINVVLNGVKMSDK----- | 516 |
| <i>Chlamys farreri</i> | HNFTQVHPDFGGGIQKLLNSYKQKQMSAQL----- | 507 |
| <i>Hypriopsis cumingii</i> | NQWSKVDPECGQTIQKLLKLYKSL----- | 462 |
| <i>Oplegnathus fasciatus</i> | ENLKAVHPDYGNRVQTLNKNYNAEAQKNTTVHVYSRPGASAI AASSKM- | 527 |
| <i>Rachycentron canadum</i> | ENLKAIHPDYGNRVQTLNKNYNAEAHKSSTVRVYSRPGASAI AASSKM- | 527 |
| <i>Takifugu obscurus</i> | ENLKAIHPDYASRVQKFLDKYNEEAENAHVRVYTRPGASAVA AASSKM- | 526 |
| <i>Ctenopharyngodon idella</i> | QNLMAVHRDYGTRVQALLDKHNAEGKKN-TIHVYNRGGPSAVAAASKM- | 525 |
| <i>Mus musculus</i> | KNFTDVHPDYGARIQALLDKYNAE-KPKNAIHTYQAGSHMAAKGKANL | 527 |
| <i>Canis lupus familiaris</i> | KNFSDVHPDYGARIQALLDKYNAE-KPKNAIHTFMQHGSHLAAREKANL | 527 |
| <i>Homo sapiens</i> | KNFTEVHPDYGSHIQALLDKYNAE-KPKNAIHTFVRSGLVAREKANL | 527 |
| <i>Xenopus laevis</i> | KNFTDVHPEYGARIQALLDKYNAEAKKKTVKTYTQHSSYATSKDKANL | 528 |
| | : . . . : : . | |

图3 三角帆蚌与其他物种的CAT氨基酸的多序列比对结果

阴影部分表示12个与还原型辅酶II(NADPH)结合的氨基酸残基,保守序列用下划线表示。

Fig. 3 Alignment of CAT amino acid sequences from *H. cumingii* and other species

The putative NADPH binding residues are shaded; the sites of conservative sequences are underlined.

Fenneropenaeus chinensis: 中国对虾(ABW82155.1); *Litopenaeus vannamei*: 凡纳滨对虾(AAR99908.1); *Haliotis discus discus*: 皱纹盘鲍(ABQ60044.1); *Crassostrea gigas*: 太平洋牡蛎(ABS18267.1); *Chlamys farreri*: 栉孔扇贝(ABI64115.1); *Hypriopsis cumingii*: 三角帆蚌; *Oplegnathus fasciatus*: 条石鲷(AAU44617.1); *Rachycentron canadum*: 军曹鱼(ACO07305.1); *Takifugu obscurus*: 暗纹东方鲀(ABV24056.1); *Ctenopharyngodon idella*: 草鱼(ACL99859.2); *Mus musculus*: 小家鼠(AAA66054.1); *Canis lupus familiaris*: 家犬亚种(BAB20764.1); *Homo sapiens*: 人(AAK29181.1); *Xenopus laevis*: 非洲爪蟾(ABK62836.1)。

2.4 CAT 基因在各组织中的表达

荧光定量PCR的检测结果发现,标准曲线的线性关系良好(内参基因 β -actin: $R^2 = 1.000$,目的基因CAT: $R^2 = 0.998$, $R^2 > 0.98$),可以在宽广的范围内进行准确定量;扩增效率较好(内参基因 β -actin: $E = 96.5\%$,目的基因CAT: $E =$

100.4%, $0.8 < E < 1.2$);融解曲线峰形单一,说明反应特异信号。将CAT基因在三角帆蚌7个组织中的相对表达量进行统计(图5),CAT基因在三角帆蚌的7个组织均有表达,其中在肾中的表达量极低,在血液中表达呈上调趋势且明显区别于其他组织,另外5个组织总体上呈现不统一

的先上调后下调趋势。胃和肝的表达趋势最为接近,在 8 和 24 h 这两个时间点表达量较高;外套膜和斧足的表达趋势也较为相像,在 4 h 时表达有所上调,然后下调,至 24 h 时达到最低。

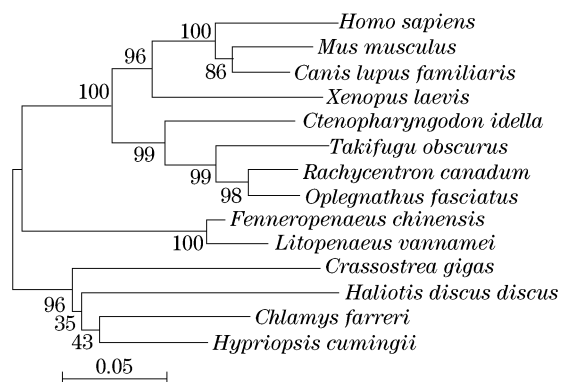


图 4 根据 CAT 氨基酸序列使用 NJ 构建的系统进化树

Fig. 4 The NJ phylogenetic tree of CAT amino acid sequences of species

Homo sapiens: 人 (AAK29181.1); *Mus musculus*: 小家鼠 (AAA66054.1); *Canis lupus familiaris*: 家犬亚种 (BAB20764.1); *Xenopus laevis*: 非洲爪蟾 (ABK62836.1); *Ctenopharyngodon idella*: 草鱼 (ACL99859.2); *Takifugu obscurus*: 暗纹东方鲀 (ABV24056.1); *Rachycentron canadum*: 军曹鱼 (ACO07305.1); *Oplegnathus fasciatus*: 条石鲷 (AAU44617.1); *Fenneropenaeus chinensis*: 中国对虾 (ABW82155.1); *Litopenaeus vannamei*: 凡纳滨对虾 (AAR99908.1); *Crassostrea gigas*: 太平洋牡蛎 (ABS18267.1); *Haliotis discus discus*: 皱纹盘鲍 (ABQ60044.1); *Chlamys farreri*: 栉孔扇贝 (ABI64115.1); *Hypriopsis cumingii*: 三角帆蚌。

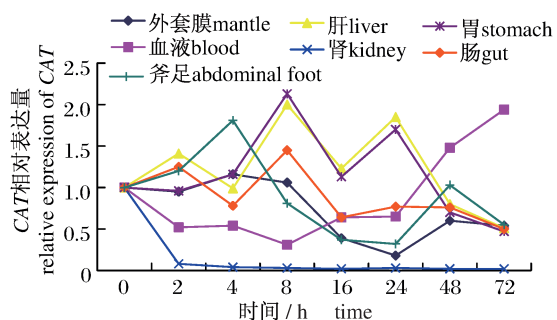


图 5 CAT 基因在三角帆蚌 7 个组织中的表达

Fig. 5 Quantitative expression analysis of CAT in seven organs from *H. cumingii*

3 讨论

3.1 三角帆蚌 CAT 氨基酸序列分析

目前对软体动物 CAT 基因的研究还很少,

FRANCO 等^[15]对贻贝 (*Perna perna*) 暴露在高浓度氧化锌的条件下探讨了 CAT 的抗氧化反应; KHESSIBA 等^[16]将贻贝暴露于林丹中,并对其在不同的温度、盐度、光照和食物量下进行 CAT 的生物监测; DAMIENS 等^[17]在对太平洋牡蛎幼虫的研究中发现, CAT 在 25 °C 的活性高于 20 °C,并在马拉硫磷的诱导下活性增强。本次推导得到的三角帆蚌 CAT 氨基酸经 BlastP 检索,预测为 CAT3,与栉孔扇贝、皱纹盘鲍、太平洋牡蛎等软体动物的相似性高达 99%,与虾类、鱼类、两栖类和哺乳类的相似性也达到 98% ~ 99%。以三角帆蚌 CAT 氨基酸序列为参照,进行多序列比对,结果得到一段 CAT 氨基酸高度保守的催化位点序列: 23FDRERIPERVVHAKGAG39,其中软体动物除太平洋牡蛎的第 24 位与其他物种同为天冬氨酸 (Asp),另外 3 种软体动物 (皱纹盘鲍、栉孔扇贝、三角帆蚌) 均为天冬酰胺 (Asn); 太平洋牡蛎的第 38 位为甘氨酸 (Gly) 其他物种均为丙氨酸 (Ala)。有 12 个与还原型辅酶 II (NADPH) 结合的氨基酸残基,分别是: 第 107 位天冬酰胺 (Asp)、第 153 位组氨酸 (His)、第 157 位苯丙氨酸 (Phe)、第 160 位丝氨酸 (Ser)、第 162 位精氨酸 (Arg)、第 172 位天冬酰胺 (Asn)、第 174 位酪氨酸 (Try)、第 196 位赖氨酸 (Lys)、第 261 位缬氨酸 (Val)、第 262 位色氨酸 (Trp)、第 264 位组氨酸 (His) 和第 317 位酪氨酸 (Try),其中第 261 位,三角帆蚌、条石鲷、家犬、非洲爪蟾为异亮氨酸 (Ile),其他物种为缬氨酸 (Val); 第 264 位,太平洋牡蛎、栉孔扇贝、三角帆蚌为谷氨酰胺 (Gln),其他物种均为组氨酸 (His)。系统进化树中,三角帆蚌先与软体动物聚在一起,再与虾类聚在一起,然后依次与鱼类、两栖类和哺乳类聚在一起。三角帆蚌过氧化氢酶基因的分子进化地位与三角帆蚌生物学分类地位一致。

3.2 三角帆蚌 CAT 氨基酸结构分析

在近半个多世纪以来,自由基引起的衰老理论得到人们的广泛关注,很多研究结果显示 CAT、SOD、GPX 等抗氧化酶的活性降低导致自由基代谢产物的增高。CAT 是一类在进化过程中比较保守的酶类,近年来对 CAT 调控机制的研究显示其与维持膜结构的完整性和调节细胞凋亡有关^[18]。ZAMOCKY 等^[19]按照不同理化特性,将 CAT 划分为典型性 (typical)、非典型性

(atypical) 和 CAT - 过氧化物酶 (catalase- peroxidases, CAT-POD), 通常认为这也是种符合进化关系的划分。按催化中心结构差异可分为两类, 一是含铁卟啉结构 CAT, 又称铁卟啉酶, 典型性 CAT 和 CAT-POD 属于此类; 二是含锰离子代替铁的铁卟啉结构, 又称为锰过氧化物酶 (MnCat), 非典型性 CAT 属于此类^[20]。本研究推导得到的三角帆蚌 CAT 氨基酸属于典型 CAT, 典型的 CAT 氨基酸跨越 4 个结构域, 有 70 ~ 460 个氨基酸残基, 大部分典型 CAT 在结构上具有高度的相似性^[21]。本研究克隆得到三角帆蚌 CAT 基因 cDNA 全序列, 为今后对该基因及三角帆蚌免疫相关功能的深入研究奠定了基础。

3.3 三角帆蚌 CAT 基因的表达分析

过氧化物酶的活性和表达作为一个生物检测方案的指标广泛用于软体动物在不同环境条件下的研究^[22]。EKANAYAKE 等^[23]在皱纹盘鲍中注射过氧化氢以研究 CAT 基因的转录水平, 结果表明, 3 h 后在鳃和消化道表达上调并在 6 h 后进一步上调, 且消化道的转录水平高于鳃的转录水平。另外, 也有研究表明, 在较高的温度、盐度和光照下, CAT 在贻贝中的活性显著增强^[16]。在本次研究中, 三角帆蚌 CAT 基因在不同组织的表达存在较大的差异性, 在肾中的表达量极低, 在血液中表达呈上调趋势且明显区别于其他组织, 另外 5 个组织总体上呈现不统一的先上调后下调趋势, 这主要是由于这些组织的代谢活动水平不同。此外, 胃和肝的表达趋势最为接近, 在 8 h 和 24 h 这 2 个时间点表达量较高; 外套膜和斧足的表达趋势也较为相像, 在 4 h 时表达有所上调, 然后下调, 至 24 h 时达到最低。目前, 已知很多贝类的血细胞都有典型的呼吸爆发现象, 同时伴有活性氧自由基的产生, 这一现象在美洲牡蛎、长牡蛎、食用牡蛎、紫贻贝、海湾扇贝以及 *Pecten maximus* 等中都得到了证实^[24]。呼吸爆发的第一个反应是氧还原一个电子形成超氧阴离子, 是由吞噬细胞膜上的 NADPH 氧化酶催化的。超氧阴离子被胞质酶超氧化物歧化酶 (SOD) 催化转换成过氧化氢。超氧阴离子还可产生羟自由基和单线态氧等活性氧自由基。超氧阴离子、过氧化氢、羟自由基和单线态氧都能够直接参与细胞介导的杀灭细菌、真菌和原生动物。同时与过氧化物酶产生的次卤化物 (hypohalides) 或与溶菌体酶协同作用来

杀伤病原体。三角帆蚌在攻毒后发生呼吸爆发现象, 产生的过氧化氢参与机体杀菌反应, 残余的过氧化氢则被 CAT 降解, 避免对机体造成损伤。

参考文献:

- [1] KASHIWAGI A, KASHIWAGI K, TAKASE M, et al. Comparison of catalase in diploid and haploid *Rana rugosa* using heat and chemical inactivation techniques: Postembryonic reprogramming of gene expression in amphibian and insect cells [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1997, 118 (B): 499 - 503.
- [2] KLOTA M G, KLASSEN G R, LOWEN P C. Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1997, 14: 951 - 958.
- [3] 彭志英, 蒋黎. 紫外速率直接法测定过氧化氢酶活性 [J]. *华西医学*, 1995, 10(1): 4 - 8.
- [4] 刘冰, 梁婵娟. 生物过氧化氢酶研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2005, 21(5): 223 - 232.
- [5] FRUGOLI J A, ZHONG H H, NUCCIO M L, et al. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh [J]. *Plant Physiology*, 1996, 112(1): 327 - 336.
- [6] DU Y Y, WANG P C, CHEN J, et al. Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2008, 50 (10): 1318 - 1326.
- [7] EKANAYAKE P M, ZOYSA M De, 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.
- [8] LI J L, LI Y S. Aquaculture in China-Freshwater pearl culture [J]. *World Aquaculture*, 2009, 40 (1): 60 - 62.
- [9] BAI Z Y, YIN Y X, HU S N, et al. Identification of genes involved in immune response, microsatellite and SNP markers by expressed sequence tags generated from hemocytes of freshwater pearl mussel [J]. *Mar Biotechnol*, 2009, 11: 520 - 530.
- [10] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAK F, et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 4876 - 4882.

- [11] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, *et al.* MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596–1599.
- [12] LAMBERT C, LEONARD N, de BOLLE X, *et al.* ESYPred3D: Prediction of proteins 3D structures [J]. *Bioinformatics*, 2002, 18(9): 1250–1256.
- [13] 袁一鸣, 李家乐, 汪桂玲, 等. 三角帆蚌 β -肌动蛋白基因的 cDNA 全长克隆及表达分析 [J]. *水产学报*, 2010, 34(6): 871–880.
- [14] HALL T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucl Acids Symp Ser*, 1999, 41: 95–98.
- [15] FRANCO J L, TRIVELLA D B B, TREVISAN R, *et al.* Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2006, 160(3): 232–240.
- [16] KHESSIBA A, ROMEO M, AISSA 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.
- [17] DAMIENS G, HIS E, GNASSIA-BARELLI M, *et al.* Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2004, 138C: 121–128.
- [18] 陈金峰, 程素满. 过氧化氢酶在衰老和疾病调控中的作用机制 [J]. *医学分子生物学杂志*, 2007, 4(3): 276–278.
- [19] ZAMOCKY M, KOLLER F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and *in vitro* mutagenesis [J]. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1999, 72(1): 19–65.
- [20] GOLDBERG I, HOCHMAN A. Three different types of catalases in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1989, 268(1): 124–128.
- [21] MARCEL Z, FRANZ K. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and *in vitro* mutagenesis [J]. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1999, 72: 19–66.
- [22] PELLERIN-MASSICOTTE J. Influence of elevated temperature and air exposure on MDA levels and catalase activities in digestive glands of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) [J]. *J Rech Océanogr*, 1997, 22: 91–98.
- [23] 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.
- [24] NAKAMURA N. *In vitro* production of hydrogen peroxide by the amoebocytes of the scallop, *Patinopecten yessoensis* (jay) [J]. *Dev Comp Immunol*, 1985, 9: 407–417.

Cloning and expression analysis of *CAT* gene from *Hyriopsis cumingii*

YUAN Yi-ming¹, LI Xi-lei¹, BAI Zhi-yi¹, WANG Gui-ling¹, LI Jia-le^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China;

2. Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Universities, College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: A 2 804 bp full-length cDNA sequence of catalase (*CAT*) gene from *Hyriopsis cumingii* was obtained by rapid amplification of cDNA ends. It consists of a 112 bp 5' UTR (untranslated region), a 1 388 bp ORF (open reading frame) and a 1 303 bp 3' UTR, and the deduced protein is composed of 462 amino acids, with calculated molecular weight of 52.7 ku, and its isoelectric point was 6.35. Motif analysis showed that *CAT* deduced amino acid sequence contained a highly conserved catalytic site motif "23FDRERIPERVVHAKGAG39". Twelve amino acids (Asp107, His153, Phe157, Ser160, Arg162, Asn172, Try174, Lys196, Val261, Trp262, His264 and Try317) of *CAT* gene of *H. cumingii* were identified as putative residues involved in NADPH binding, and they were different in different species. The *CAT* amino acid residues of *H. cumingii* shared a high similarity with other molluscs (99%), and shrimp, fish, amphibians, mammals (98%–99%). The obtained *CAT* of *H. cumingii* was predicted as *CAT3*. NJ tree suggested that *H. cumingii* clustered with mollusca firstly, and then clustered with shrimp, fish, amphibians and mammals. Real-time quantitative RT-PCR results displayed that *CAT* gene was expressed in a wide range of seven organs, with the lowest level of transcripts found in kidney. Its expression was up-regulated in blood, which was significantly different from other organs. The expressions of other five organs were generally up-regulated first and then down-regulated.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; catalase (*CAT*); gene expression; RACE-PCR

Corresponding author: LI Jia-le. E-mail: jlli@shou.edu.cn