

文章编号: 1000-0615(2017)05-0641-08

DOI: 10.11964/jfc.20160110231

## 大黄鱼过氧化氢酶基因的克隆及其 对鳗弧菌感染的响应

严林飞, 安昕, 包苗苗, 何建瑜, 吴常文, 刘慧慧\*

(浙江海洋大学国家海洋设施养殖工程技术研究中心, 浙江 舟山 316022)

**摘要:** 为探究过氧化氢酶(catalase, CAT)对大黄鱼机体的保护作用, 实验基于大黄鱼基因组序列数据库克隆获得CAT基因1584 bp的完整开放阅读框(GenBank登陆号: KKF-14425.1), 该序列编码527个氨基酸残基, 包含与其他动物高度保守的酶活性中心序列FDRERIPERVVHAKGA、亚铁血红素结合信号序列RLFSYPDTH、3个催化位点残基His75、Asn148和Tyr358, 以及12个NADPH结合位点等, 理论分子量为59.98 ku, 等电点为8.37。多序列比对显示, 大黄鱼CAT氨基酸序列与其他鱼类具有较高的一致性, 与同属于石首鱼科的军曹鱼和条石鲷同源性高达94%, 在进化树中也聚类于同一进化分支, 说明该序列为CAT家族成员。实时荧光定量PCR检测显示, 大黄鱼CAT基因在所检测的7种组织(肝脏、脾脏、脑、肾、肌肉、鳃、肠)中均有表达, 但在肝脏中表达水平最高(为肌肉中的6.68倍)。鳗弧菌感染后, 大黄鱼肝组织中CAT基因的表达随着时间的推移而变化明显, 感染后12 h, 达到最高(7.48倍), 随后逐渐下降, 到72 h已基本恢复到原始水平, 注射PBS的对照组, CAT基因表达只略有上调, 说明病原菌侵染可能引起鱼体产生大量活性氧自由基及H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CAT基因则可以清除体内过量的活性氧, 进而防止它们对细胞造成损伤。

**关键词:** 大黄鱼; 鳗弧菌; 过氧化氢酶(CAT); 基因克隆

**中图分类号:** Q 785; S 965.3

**文献标志码:** A

过氧化氢酶(catalase, CAT, EC 1.11.1.6)是生物进化过程中形成的生物防御系统的关键酶之一, 广泛存在于原核和真核生物体中, 其作用机理是通过催化一对电子转移将过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)分解为水和氧气, 是机体抗氧化系统关键酶<sup>[1]</sup>。环境中很多致病菌和污染物会刺激机体产生大量的活性氧自由基等有害物质, 机体内的多酶促反应和非酶促反应则产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>是有毒害作用的活性氧前体, 当内源性抗氧化系统不足以清除体内过量的自由基及H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>时, 就会导致机体内DNA断裂、脂质过氧化、酶失活等氧化应激, 进而对机体造成氧化损伤, CAT等抗氧

化酶通过催化H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的氧化还原反应, 参与机体免疫防御, 清除代谢过程中产生的氧自由基和过氧化物, 保护细胞免受外界胁迫造成的损伤, 其酶活力或基因表达的变化与机体的抗氧化或健康状态密切联系<sup>[2]</sup>。

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)亦称黄花鱼、黄鱼, 隶属于脊索动物门(Chordata)、硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲈形目(Perciformes)、石首鱼科(Sciaenidae), 是福建、浙江一带重要的经济鱼类, 也是我国重要的海水养殖品种, 被农业部确定为6种最具优势的出口水产品之一<sup>[3]</sup>。但随着大黄鱼养殖业的日益兴起和迅猛发展, 大

收稿日期: 2016-01-13 修回日期: 2016-10-11

资助项目: 国家自然科学基金(41606148); 浙江省自然科学基金(LY14C190004); 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划(2015R411005); 舟山市科技局项目(2015C41014)

通信作者: 刘慧慧, E-mail: liuhuihui\_77@163.com

规模和高密度的人工养殖以及近年来沿海水域污染的加剧,导致大黄鱼自身免疫力下降、疾病频发,以鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)为代表的弧菌病是其中主要病原之一,其广泛存在于海洋动物体内及沿岸海水沉积物中,是海水鱼、虾、贝类常见的细菌性病原之一<sup>[4]</sup>。鱼类是较低等的脊椎动物,其特异性免疫机制还不完善,如大黄鱼因缺乏某些获得性免疫相关因子(CD4和CD8),使其天然免疫在机体中发挥更为重要的作用<sup>[3]</sup>,因此,包括大黄鱼在内的大多数鱼类主要依赖非特异性免疫来抵御病害生物的入侵和修复感染后损伤的机体,其中抗氧化系统是鱼类非特异性免疫的主要依赖对象,因病原菌入侵而导致的氧化损伤主要依赖如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等抗氧化酶系,在短时间内发挥有效清除和降解等作用<sup>[5]</sup>。

对于硬骨鱼类的抗氧化酶系已有报道,但作为我国主要养殖品种的大黄鱼该方面的报道仅限于超氧化物歧化酶<sup>[6]</sup>,为研究大黄鱼*CAT*基因在抵御病原菌感染中的作用,本实验克隆获得大黄鱼*CAT*基因完整开放阅读框,在检测其组织特异性的基础上,采用RT-PCR技术以肝脏中*CAT*为分子标记,监测鳃弧菌感染条件下*CAT*基因的相对表达情况,以期为大黄鱼的大规模健康养殖及正确运用鱼类*CAT*分子作为养殖水体环境污染预警标记提供指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验大黄鱼(1龄,体长20~30 cm,体质量350~400 g)取自浙江舟山东极养殖场,于25 °C沙滤海水中暂养1周,每天全部换新鲜海水。随后将大黄鱼随机分为2组,每组30条,其中实验组腹腔注射100 μL PBS重悬的鳃弧菌菌液(pH 7.4,  $1 \times 10^8$  CFU/mL),对照组注射100 μL PBS(pH 7.4)。收集注射后0、2、6、12、24、48、72 h的肝脏组织提取总RNA。

### 1.2 方法

**总RNA的提取及cDNA的合成** 采集3尾健康大黄鱼肝脏、脾脏、脑、肾、肌肉、鳃、肠等组织,按照Trizol Total RNA试剂盒(TaKaRa, China)推荐方法提取总RNA,1.5%非变性琼脂糖

电泳检测总RNA完整性,紫外分光光度计(Bio-Rad, USA)测定RNA浓度。总RNA经DNAase处理后按照M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit试剂盒(TaKaRa, China)推荐方法对RNA进行反转录,获得相应cDNA。

**大黄鱼*CAT*基因的克隆** 根据大黄鱼基因组数据库,通过Primer 5.0软件设计扩增完整开放阅读框(ORF)的引物,以大黄鱼肝脏cDNA为模板,克隆*CAT*基因。20 μL反应体系:10×PCR Buffer 2 μL, dNTPs 0.4 μL,正向引物CAT-F (5'-ATGGCTGACAACAGAGATAAAAC-3')0.8 μL,反向引物CAT-R (5'-TCACATCTTTGAGGACGC-3')0.8 μL,模板cDNA 0.6 μL, *Taq* DNA聚合酶(TaKaRa)0.4 μL。PCR反应条件:94 °C预变性4 min,94 °C变性1 min,59.4 °C退火30 S,72 °C延伸1 min,循环30次;72 °C延伸10 min。1.5%琼脂糖电泳检测PCR产物,以DL 2000 Marker为标记,选取预期大小条带,以琼脂糖胶纯化试剂盒(TIANGEN, China)纯化后送上海英潍捷基生物公司测序。

**序列分析** 将测序获得的ORF序列以BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>)进行序列同源性比对,Expasy-ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)推测蛋白的理论分子量和等电点,在MEGA 5.2软件中采用Neighbor-Joining算法构建系统发育树,蛋白质结构域以SMART在线工具(<http://smart.emblheidelberg.de/>)预测。

### 大黄鱼*CAT*基因表达实时荧光定量PCR检测

根据基因的测序结果,设计特异性荧光定量PCR引物,采用荧光定量PCR法,以β-actin (β-actin-F: 5'-TCGTCGGTTCGTCCCAGGCATCAG-3', β-actin-R: 5'-ATGGCGTGGGGCAGAGCGTAA CC-3')为内参,分析*CAT*基因在各组织(肝脏、脾脏、脑、肾、肌肉、鳃、肠)中的差异表达以及鳃弧菌感染后的基因表达情况,二者反应体系和反应程序一致。20 μL PCR扩增反应体系: primer-F (5'-GAGCACATCGGCAAGACTACGC-3')0.8 μL, primer-R (5' TTGAGGATTACGCTTCTGGGAG-3')0.8 μL, 2×SYBR® Premix Ex *Taq*™ II (TaKaRa)10 μL, cDNA sample (100 ng/μL)0.8 μL, ROX II 0.4 μL, ddH<sub>2</sub>O 7.2 μL。反应采用两步法进行(ABI-7500型荧光定量PCR仪),即95 °C预变性1 min,95 °C变性10 s,65 °C

延伸45 s, 共40个循环, 反应结束后, 温度从55 °C缓慢升到95 °C, 制备熔解曲线。实验设置无模板对照和阴性对照, 每个反应3个重复。以SPSS 13.0进行单因子显著性差异分析(One-Way ANOVA)和*t*检验, 分别标记显著差异( $P < 0.05$ )和极显著性差异( $P < 0.01$ )

## 2 结果

### 2.1 大黄鱼 CAT 基因序列及分析

以大黄鱼肝脏cDNA为模板(总RNA浓度,  $A_{260}/A_{280}=1.85$ ), 扩增得到CAT开放阅读框1584 bp的序列(GenBank登陆号KKF14425.1), 编码527个氨基酸, 在线预测其分子量为59.98 ku, 等电点为8.37。

SignalP 3.0软件分析发现, 大黄鱼CAT分子不含信号肽, 功能域预测显示, 该分子具有与其他多种动物高度保守的典型酶活性中心序列FDR-ERIPERVVHAKGA(氨基酸残基第64~81位)、亚铁血红素结合信号序列RLFSYPDTH(氨基酸残基第354~362位)、3个用于催化反应的氨基酸残基His<sup>75</sup>、Asn<sup>148</sup>和Tyr<sup>358</sup>以及12个NADPH结合位点, 进一步通过BLASTp比对发现, 目标分子与其他鱼类CAT基因相似度达90%, 与鲈形目的军曹鱼(*Rachycentron canadum*)、条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)相似度最高, 为94%。

基于大黄鱼基因组序列并利用GeneMapper对其CAT分子DNA进行分析(图2), 序列全长6380 bp, 明显短于人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、

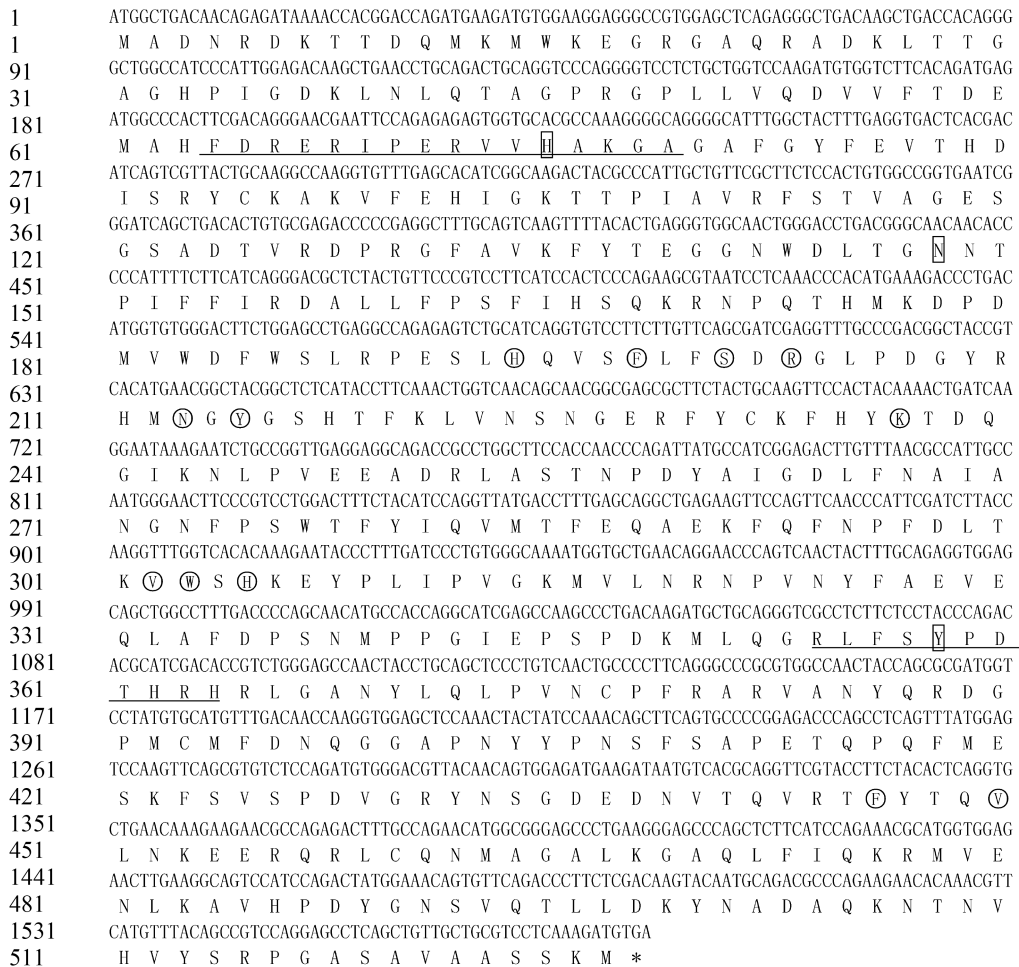


图1 大黄鱼CAT核苷酸序列及其推测氨基酸序列

酶活性中心序列“FDRERIPERVVHAKGA”及亚铁血红素结合信号序列“RLFSYPDTH”用下划线标出; 3个催化位点残基“H”, “N”和“Y”用方框标出, NADPH结合位点用圆圈标出

Fig. 1 Nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of CAT in *L. crocea*

Enzyme active site sequences FDRERIPERVVHAKGA and heme-ligand binding signal sequences RLFSYPDTH are underlined. The three conserved catalytic amino acids H, N and Y are marked in box and NADPH binding sites are marked in circle

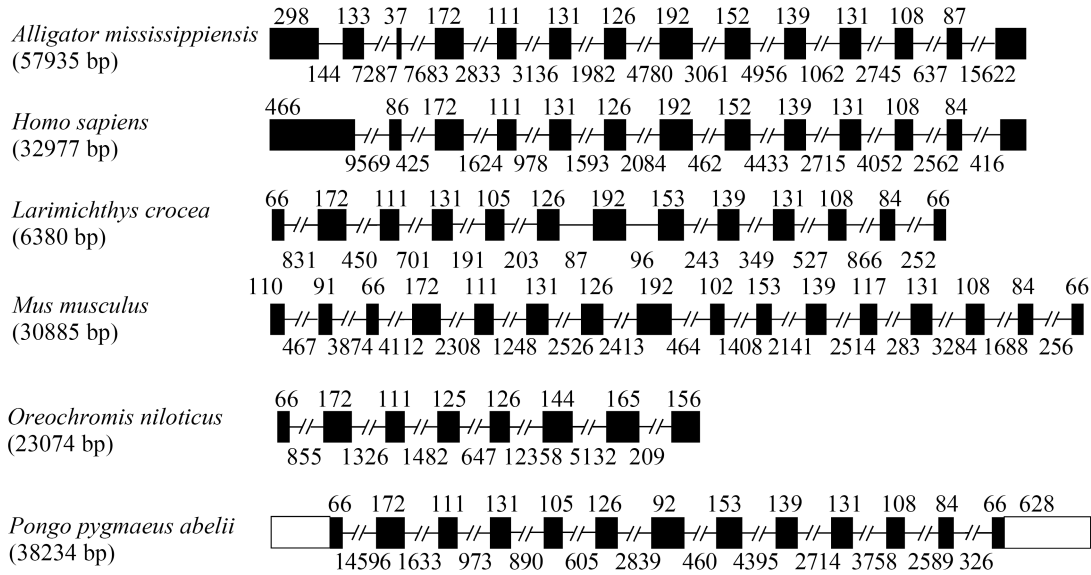


图2 大黄鱼CAT基因内含子与外显子分布图

Fig. 2 The numbers and lengths of introns and exons from CAT genes from various species

美国短吻鳄(*Alligator mississippiensis*)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)等, 含有13个外显子及12个内含子, 与人和猩猩(*Pongo pygmaeus abelii*)相似, 但每个外显子和内含子的长度又与其他物种有所差别。

## 2.2 大黄鱼CAT系统进化分析

选取不同物种的CAT氨基酸序列利用MEGA 5.2构建进化树(图3), 不同纲类的物种分别成簇, 说明在生物进化过程中, CAT分子的基因变异较为明显。在鱼类进化分支中, 大黄鱼与石首鱼科的军曹鱼首先聚在一起, 再与其他鱼类聚类。哺乳动物、鸟类、鱼类等脊椎动物聚为一支, 节肢动物与贝类则位于另一进化分支, 上述进化树所表现的进化关系与传统分类方法一致, 亦说明本次实验获得序列为CAT分子, 与序列分析结果相似。

## 2.3 CAT mRNAs在大黄鱼不同组织内的表达

大黄鱼内参基因 $\beta$ -actin和CAT分子呈“S”形扩增曲线, 复孔间曲线重叠, 扩增峰明显、基线平整, 无模板对照和阴性对照均无扩增, 熔解曲线为单一峰, 扩增效率达100%±5%, 说明RT-PCR反应体系良好, 没有非特异性扩增, 相对定量结果准确。CAT mRNAs在所检测的组织中均可表达, 肝脏中的表达量(比肌肉高6.68倍)明显高于其他组织( $P < 0.01$ ), 其他组织间表达差

异不显著( $P > 0.05$ ), 肠、脾脏、肾中CAT的表达量相对较高, 肌肉中最低(图4)。

## 2.4 鳃弧菌感染条件下大黄鱼CAT基因的表达分析

组织特异性表达结果显示, 大黄鱼肝脏中CAT基因的表达量最高, 因此以肝脏组织为候选实验对象, 鳃弧菌感染后, 肝脏中CAT基因的表达随时间的推移变化明显, 先逐渐升高, 到12 h时达到最高, 为对照组的7.48倍, 随后缓慢下降, 到72 h已基本恢复到原始水平, 注射PBS组CAT基因表达略有上升, 但不明显(图5)。

## 3 讨论

### 3.1 大黄鱼CAT基因序列分析

作为一种含Fe的血蛋白酶类, CAT广泛存在于从单细胞生物的细菌到高等生物的人类中, 能将 $H_2O_2$ 分解为氧和水, 有效清除体内的超氧阴离子自由基( $O_2^-$ )、游离氧(O)、羟自由基(-OH)等活性氧物质, 从而防止它们对细胞造成损伤<sup>[7]</sup>。本实验克隆获得大黄鱼CAT分子, 分子量为59.98 ku, 与其他鱼类相近。CAT氨基酸序列与多种鱼类同源性均较高(90%以上), 具有与其他物种高度保守的亚铁血红素结合信号序列、酶活性中心序列、3个参与催化的氨基酸残基His<sup>75</sup>、Asn<sup>148</sup>和Tyr<sup>358</sup>及12个NADPH结合位点<sup>[8]</sup>,

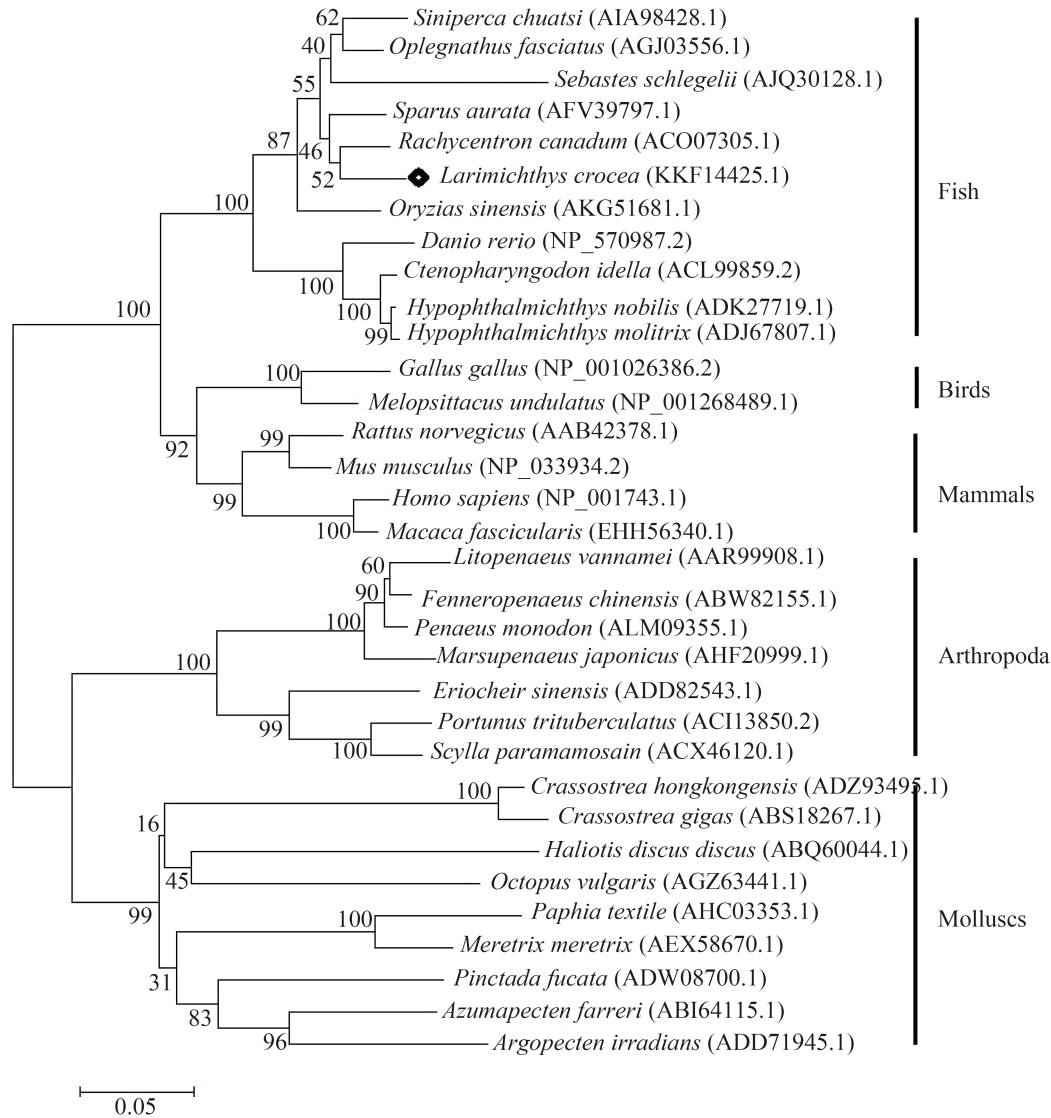


图 3 大黄鱼 CAT 基因与其他物种之间的进化分析

Fig. 3 Phylogenetic tree depicting the relationship of *L. crocea* CAT with other species

因此认为所得到的序列为大黄鱼CAT分子, 在系统进化树中, 大黄鱼与石首鱼科的军曹鱼首先聚在一起, 进一步与其他鱼类聚类, 其所在的鱼类进化支与其他动物分支明显, 该进化关系与传统的分类方法一致。环境胁迫可诱导机体内氧自由基含量显著增加, 而鱼体的CAT分子可以清除体内多余的氧自由基和过氧化氢, 且其基因表达变化或酶活力与机体的抗氧化及健康状况密切相关, 因此该分子常被用作环境污染的指示标记物, 其表达水平在一定程度上可有效地反应机体受环境毒物的损害程度, 该特征在很多鱼类中有报道<sup>[2]</sup>, 本研究已从大黄鱼中克隆出CAT基因的完整开放阅读框序列, 还有待于获得基因全长及上游调控序列, 确定调控位点,

为进一步使用该基因作为评估养殖水体污染状况的分子标记奠定基础。

### 3.2 CAT mRNAs在大黄鱼不同组织内的表达

CAT基因组织特异性表达的相关研究在多种生物中展开, 在哺乳动物中, 肝、肾和血液是其表达的主要场所, 脑中呈低表达<sup>[9]</sup>。在无脊椎动物中, CAT基因的表达亦具有明显的组织差异, 凡纳滨对虾CAT基因在肝胰腺中表达最高, 鳃次之, 肌肉最低<sup>[10]</sup>; 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)CAT基因在所有被检测的组织中均表达, 血细胞、肝胰腺和肠的表达量较高, 其次为卵巢、鳃、淋巴样器官, 肌肉最低<sup>[11]</sup>, 分析认为肝胰腺是无脊椎动物机体中代谢活性较高的

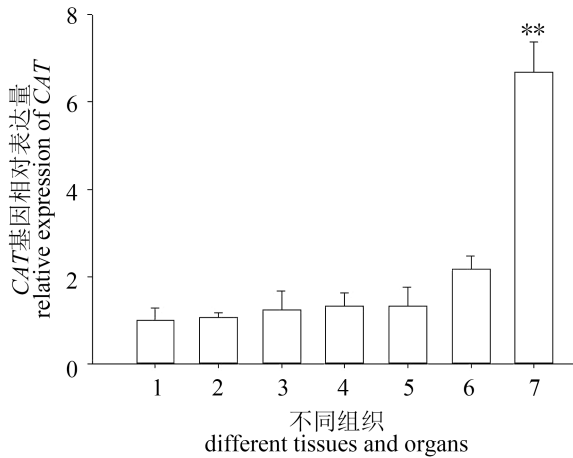


图4 不同组织中大黄鱼CAT基因的表达分析

“\*”表示显著( $P<0.05$ ), “\*\*”表示极显著( $P<0.01$ ), 下同  
1. 肌肉, 2. 脑, 3. 肠, 4. 鳃, 5. 肾, 6. 脾, 7. 肝脏

Fig. 4 Analysis of CAT expression in different tissues of *L. crocea*

The asterisks above the bars represent statistically significant differences from the control samples, “\*” at  $P<0.05$ , “\*\*” at  $P<0.01$ . The same below

1. muscle, 2. brain, 3. intestine, 4. gill, 5. kidney, 6. spleen, 7. liver

组织, 能产生大量的活性氧及其活性前体 $H_2O_2$ , 而CAT在肝胰腺中较高的表达可能与其能降解 $H_2O_2$ , 担任解毒功能密切相关。本次实验结果显示, 大黄鱼CAT基因在所有检测的组织中均有表达, 但肝脏中的表达量明显高于其他组织, 该结果与草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)<sup>[12]</sup>、条石鲷<sup>[13]</sup>类似, 鱼类肝脏与无脊椎动物的肝胰腺类似, 是参与新陈代谢的重要器官, 并能促使一些有毒物质改进, 再排泄出体外, 从而起到解毒作用, 因此在机体中需不断的承受着氧化胁迫进而调控肝脏功能, 氧自由基的产生与其关系密切, 并因此诱导CAT基因的大量转录<sup>[14-15]</sup>, 该特征与本研所得到的大黄鱼肝脏组织中CAT表达高于其他组织的结果一致。

### 3.3 鳃弧菌感染后大黄鱼CAT基因的表达分析

鱼类是水生生态系统中营养级较高的生物, 对水质变化敏感, 而目前水体污染具有复杂性和严重性的特点, 常规的水生态毒理学方法无法满足对水体综合评估的需求, 因此利用生物体内抗氧化防御系统作为检测标记已广泛被应用, 该方法可以灵敏地反应鱼体生理生化状态, 用于评价水体养殖环境对鱼类的影响程度。CAT是机体抗氧化防御系统的重要组成部分, 超

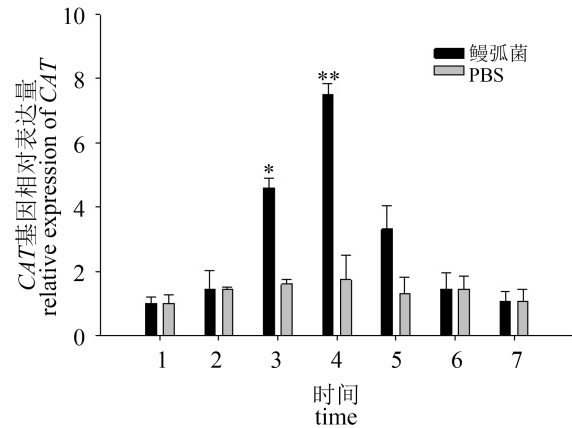


图5 鳃弧菌感染后大黄鱼肝脏组织内CAT基因的表达分析

Fig. 5 Analysis of CAT expression in liver of *L. crocea* after *V. anguillarum* infection

1.0 h, 2.2 h, 3.6 h, 4.12 h, 5.24 h, 6.48 h, 7.72 h

氧化物歧化酶(SOD)将氧自由基转化成 $H_2O_2$ 后, CAT进一步将其还原成水和氧分子, 使细胞免受过氧化氢毒害, 保护机体细胞内环境的稳定, 因此, CAT基因表达及活性变化能反映机体内自由基的代谢情况, 是判断生物体健康状况及抗氧化防御能力的重要指标<sup>[16]</sup>。大黄鱼被鳃弧菌感染后, 其肝脏组织中CAT基因的表达量明显上升, 到12 h表达量达到最高, 为对照组7.48倍, 该结果表明病原菌感染会引发机体的吞噬作用以消耗体内过多的活性氧来维持细胞内环境稳定, 进而引起呼吸爆发, 此时氧首先还原一个电子形成超氧阴离子, 再经吞噬细胞膜上的NADPH氧化酶催化, 超氧阴离子被SOD转换成 $H_2O_2$ <sup>[17]</sup>, 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, 上述基团能直接参与细胞介导的杀灭细菌、真菌和原生动物的等, 同时与CAT产生的次卤化物或与溶菌体酶协同作用来杀伤病原体。此外, 病原菌侵染同样会引起大黄鱼SOD活性增强<sup>[6]</sup>, CAT作为内源活性氧清除剂与SOD协同作用, 在一定程度上清除体内过量的活性氧, 维持其平衡状态, 相似的结果在马氏珠母贝(*Pinctada fucata*)<sup>[18]</sup>、中国明对虾<sup>[10]</sup>中均有报道。在感染后期, 体内ROS积累增多, 机体细胞内正常信号转导、新陈代谢等过程受到影响, 进而导致CAT基因表达水平下降, 该特征符合毒理学规律<sup>[19]</sup>, 结果很好地反应了病原菌对鱼体健康状况的影响, 亦说明CAT分子参与了大黄鱼的天然免疫过程。

## 参考文献:

- [1] 郭勤单, 王有基, 吕为群. 温度和盐度对褐牙鲈幼鱼渗透生理及抗氧化水平的影响[J]. 水生生物学报, 2014, 38(1): 58-67.
- Guo Q D, Wang Y J, Lü W Q. Combined effects of temperature and salinity on the Physiological osmotic induction and antioxidant responses in the juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(1): 58-67(in Chinese).
- [2] Kim J H, Rhee J S, Lee J S, *et al.* Effect of cadmium exposure on expression of antioxidant gene transcripts in the river pufferfish, *Takifugu obscurus* (Tetraodontiformes)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology, 2010, 152(4): 473-479.
- [3] Wu C W, Zhang D, Kan M Y, *et al.* The draft genome of the large yellow croaker reveals well-developed innate immunity[J]. Nature Communications, 2014, 5: 5227.
- [4] 李清禄, 陈强. 海水网箱养殖大黄鱼细菌性病原鉴定与感染治疗研究[J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7(5): 489-493.
- Li Q L, Chen Q. Identification of bacterial pathogen and treatment after infection of *Pseudosciaena crocea* in marine cage culture[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2001, 7(5): 489-493(in Chinese).
- [5] Løvoll M, Kilvik T, Boshra H, *et al.* Maternal transfer of complement components C3-1, C3-3, C3-4, C4, C5, C7, Bf, and Df to offspring in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Immunogenetics, 2006, 58(2-3): 168-179.
- [6] Liu H H, He J Y, Chi C F, *et al.* Identification and analysis of icCu/Zn-SOD, Mn-SOD and ecCu/Zn-SOD in superoxide dismutase multigene family of *Pseudosciaena crocea*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 43(2): 491-501.
- [7] Klotz M G, Klassen G R, Loewen P C. Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases[J]. Molecular Biology and Evolution, 1997, 14(9): 951-958.
- [8] 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.
- [9] Chen X L, Liang H Y, Van Remmen H, *et al.* Catalase transgenic mice: Characterization and sensitivity to oxidative stress[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2004, 422(2): 197-210.
- [10] Tavares-Sánchez O L, Gómez-Anduro G A, Felipe-Ortega X, *et al.* Catalase from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: Molecular cloning and protein detection[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2004, 138(4): 331-337.
- [11] 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.
- [12] 郑清梅, 韩春艳, 温茹淑, 等. 草鱼过氧化氢酶全长 cDNA 的克隆、序列同源分析与组织表达[J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(5): 529-538.
- Zheng Q M, Han C Y, Wen R S, *et al.* Full-length cDNA cloning, sequence homology analysis and tissue expression of a catalase gene from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Genomics and Applied Biology, 2011, 30(5): 529-538(in Chinese).
- [13] Elvitigala D A S, Premachandra H K A, Whang I, *et al.* Marine teleost ortholog of catalase from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*): Molecular perspectives from genomic organization to enzymatic behavior with respect to its potent antioxidant properties[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(4): 1086-1096.
- [14] Kamata H, Honda S I, Maeda S, *et al.* Reactive oxygen species promote TNF $\alpha$ -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases[J]. Cell, 2005, 120(5): 649-661.
- [15] 袁一鸣, 李西雷, 白志毅, 等. 三角帆蚌 *CAT* 基因 cDNA 全长克隆及表达分析[J]. 水产学报, 2011, 35(4): 481-492.
- Yuan Y M, Li X L, Bai Z Y, *et al.* Cloning and expression analysis of *CAT* gene from *Hyriopsis cumingii*[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(4): 481-492(in Chinese).
- [16] Martínez-Álvarez R M, Morales A E, Sanz A. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors[J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 2005, 15(1-2): 75-88.
- [17] Leto T L, Morand S, Hurt D, *et al.* Targeting and

- regulation of reactive oxygen species generation by Nox family NADPH oxidases[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2009, 11(10): 2607-2619.
- [18] Guo H Y, Zhang D C, Cui S G, *et al.* Molecular characterization and mRNA expression of catalase from pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. *Marine Genomics*, 2011, 4(4): 245-251.
- [19] Yin F, Gong H, Ke Q Z, *et al.* Stress, antioxidant defence and mucosal immune responses of the large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* challenged with *Cryptocaryon irritans*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 47(1): 344-351.

## Expression of catalase in *Larimichthys crocea* after infection of *Vibrio anguillarum*

YAN Linfei, AN Xin, BAO Miaomiao, HE Jianyu, WU Changwen, LIU Huihui\*

(National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

**Abstract:** As a key enzyme in the antioxidant systems of living organisms, catalase plays an important role in eliminating hydrogen peroxide against oxidative stress. The open reading frame (ORF) of catalase (GenBank Accession No. KKF14425.1) was cloned from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*), which comprised 1584 bp, encoding a peptide of 527 amino acids (aa) in length, with a predicted molecular mass of 59.98 kDa and a theoretical isoelectric point of 8.37. Several highly conserved motifs, including the proximal active site signature “FDRERIPERVVHAKGA”, the proximal heme-ligand signature sequence “RLFSYPDTH”, the three catalytic amino acid residues of His<sup>75</sup>, Asn<sup>148</sup> and Tyr<sup>358</sup> and NADPH binding site were identified in the deduced amino acid sequence of *CAT* from large yellow croaker. Sequence comparison strongly suggested that this sequence was a member of *CAT* family and highly homologous with other known *CAT* of fish, especially with *Rachycentron canadum* and *Oplegnathus fasciatus* (94%) of Sciaenidae, and they also gathered into the same branch in the phylogenetic tree. Constitutive *CAT* mRNA expression was detected in seven tissues of large yellow croaker with different magnitudes, which was high in liver and low in muscle, suggesting its diverse role in physiology with respect to the tissue type. The mRNA of HSP70 in liver after infection by *Vibrio anguillarum* was detected based on RT-PCR analysis. The transcriptions of *CAT* were upregulated, the maximum level appeared at 12 h post-injection with 7.48-fold and dropped back to the original level at 72 h post-injection, which showed a slight rise in the group of PBS injection. The results indicated that *CAT* in *L. crocea* can function as a potent antioxidant enzyme in large yellow croaker and may play a role in postimmune responses with respect to its peroxidase activity.

**Key words:** *Larimichthys crocea*; *Vibrio anguillarum*; catalase (CAT); gene clone

**Corresponding author:** LIU Huihui. E-mail: liuhuihui\_77@163.com

**Funding projects:** National Natural Science Fund (41606418); Natural Science Foundation of Zhejiang Province, China (LY14C190004); Students' Science and Technology Innovation Projects of Zhejiang Province (2015R411005); Zhoushan Science and Technology Project (2015C41014)