



## 缢蛏过氧化氢酶基因的克隆及其功能

乔晓静<sup>1</sup>, 张卫卫<sup>1,2</sup>, 邵钰娜<sup>1,2\*</sup>, 赵雪琳<sup>1,2</sup>, 李成华<sup>1,2\*</sup>

(1. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211;

2. 宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

**摘要:** 过氧化氢酶 (catalase, CAT) 是抗氧化酶体系的主要成员, 在维持机体氧化还原平衡、抵御病原感染过程中具有重要作用。为研究 *CAT* 基因在软体动物应答病原胁迫过程中的作用, 实验采用 RACE 技术通过克隆和序列拼接获得了缢蛏 *CAT* 基因的全长 cDNA 序列, 并命名为 *ScCAT*。*ScCAT* 基因全长为 2840 bp, 编码 508 个氨基酸。序列分析显示, *ScCAT* 蛋白含有 1 个 CAT 核心结构域 (25~410), 1 个保守的酶活性位点 (<sub>61</sub>FNRERIPER-VVHAKGAGA<sub>78</sub>) 和 1 个亚铁血红素结合位点 (<sub>351</sub>RLFSYPDTH<sub>359</sub>)。多序列比对和系统进化树分析结果显示, *ScCAT* 属于 CAT 基因家族, 且与无脊椎动物文蛤的亲缘关系最近。组织分布显示, *ScCAT* 在所有检测的组织中均能表达, 其中在肝胰腺中表达量最高, 鳃中次之, 血细胞中的表达量最低, 分别为闭壳肌的 85.67 倍、50.09 倍和 0.76 倍。在副溶血弧菌胁迫下, *ScCAT* 在缢蛏肝胰腺中的表达明显上升, 且在 12 h 达到最高值, 为对照组的 3.56 倍; 酶活性测定结果显示, 副溶血弧菌胁迫显著诱导缢蛏肝胰腺和鳃组织中的 CAT 活性。为进一步探讨 *ScCAT* 的蛋白功能, 实验构建 *ScCAT* 原核表达质粒, 通过诱导、纯化后发现 *ScCAT* 重组蛋白具有显著的 CAT 酶活性。研究表明, *ScCAT* 作为一类重要的抗氧化酶参与了缢蛏体内的免疫应答。

**关键词:** 缢蛏; 过氧化氢酶; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

缢蛏 (*Sinonovacula constricta*) 是软体动物门 (Mollusca) 蛏类中的一种重要经济物种, 广泛分布于西太平洋沿岸的潮间带和河口水域<sup>[1]</sup>, 是我国四大传统养殖贝类之一, 也是当今鱼、虾、贝、藻综合生态系养殖中的重要成员。然而, 随着养殖产业的不断扩大, 高密度、集约化养殖模式的建立和推广使得缢蛏病害问题也随之逐年加重, 由弧菌属 (*Vibrio*), 特别是副溶血弧菌 (*Vibrio*

*parahemolyticus*) 所造成的疾病大规模暴发已经严重影响了缢蛏的生存和生长, 使得缢蛏自然资源量急剧下降<sup>[2]</sup>。

研究发现, 机体在抵御病原感染过程中会产生大量的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 物质, 包括过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、羟自由基 (·OH)、超氧阴离子自由基 (O<sup>2-</sup>·) 等<sup>[3]</sup>。尽管产生的 ROS 可清除入侵的病原菌, 但这些 ROS 物质如不能被及时

收稿日期: 2021-01-25 修回日期: 2021-04-05

资助项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项 (2018YFD0901405); 浙江省农业新品种选育重大科技专项 (2021C02069-7); 宁波市“科技创新 2025”重大专项 (2019B10005); 宁波市科技计划项目 (202002N3046)

第一作者: 乔晓静 (照片), 从事水产动物免疫学研究; E-mail: 2596343361@qq.com

通信作者: 邵钰娜, 从事水产动物免疫学研究; E-mail: shaoyina@nbu.edu.cn;

李成华, 从事水产动物免疫学研究; E-mail: lichenghua@nbu.edu.cn



清除, 将破坏细胞膜完整性、损害细胞核内遗传物质等<sup>[4-5]</sup>。生物为了避免过量产生的自由基对机体造成损害, 在其生长与自然进化过程中, 产生了一系列能够清除体内活性氧的酶类, 形成了一套抗氧化系统, 主要包括过氧化氢酶 (catalase, CAT)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、硫氧还蛋白 (thioredoxin, TRx) 以及硫氧还蛋白过氧化氢酶 (thioredoxin peroxidase, TPx) 等, 且各个抗氧化酶之间形成了网络化作用模式, 共同维持机体内部结构的稳定性<sup>[6-9]</sup>。

CAT 作为抗氧化酶系统中的主要成员, 能够迅速有效地清除  $H_2O_2$ , 将其催化分解为  $O_2$  和  $H_2O$ , 同时能够有效防止  $H_2O_2$  与  $O^{2-}$  进一步生成羟自由基  $\cdot OH$ , 以保护细胞免受氧化损伤<sup>[10]</sup>。已有研究表明, CAT 在高等动物抵御逆境胁迫、延缓衰老以及调控细胞氧化还原平衡等各方面均发挥着重要作用。例如, Hasegawa 等<sup>[11]</sup> 研究发现, 小家鼠 (*Mus musculus*) CAT 基因的表达上调可显著降低凋亡基因的表达, 从而延长小家鼠的寿命。另外, 当肠黏膜屏障受损时会伴随 ROS 的增加, 而 CAT 作为 ROS 的清除剂, 可显著抑制肠上皮细胞转录因子的活性, 从而保护肠上皮细胞, 预防肠道疾病<sup>[12]</sup>。此外, CAT 也广泛存在于鱼体中, 已成为评价污染物对水生生物毒性影响的良好分子生物标志物<sup>[13-14]</sup>。

无脊椎动物缺乏特异性免疫系统, 主要通过细胞吞噬过程中的呼吸爆发现象产生 ROS 来抵御外界感染, 而其中的 CAT 在调节细胞内活性氧中起着重要作用<sup>[15]</sup>。例如, 高杉等<sup>[16]</sup> 研究发现, 仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 在细菌脂多糖 LPS 刺激下, 其体腔细胞中的 catalase 表达量显著升高, 表明仿刺参的 catalase 参与了机体应对病原胁迫的免疫应答; Yang 等<sup>[17]</sup> 将嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 注射到褶纹冠蚌 (*Cristaria plicata*) 体内, 发现褶纹冠蚌体内的 CAT 在受到病原侵染时发挥了防御作用。基于缢蛏在水产经济中的重要地位及预防病害的紧迫性, 实验拟通过 RACE 技术扩增缢蛏过氧化氢酶基因 (命名为 *ScCAT*) 全长; 并通过实时荧光定量 (Real-time) PCR 法研究该基因在副溶血弧菌胁迫下的表达特征以及 CAT 酶活性特征, 以期为缢蛏细菌性疾病的免疫防治提供理论基础, 促进我国缢蛏养殖业健康、可持续发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

健康缢蛏 [(10 ± 1.4) g] 采自宁波市海洋渔业科技创新基地, 实验开始前 7 天暂养于天然海水 (盐度 20~22, 温度 19~21 °C) 中; 副溶血弧菌为本实验室保存菌种。

### 1.2 方法

**副溶血弧菌的培养及胁迫缢蛏** 将保存在 -80 °C 的副溶血弧菌接种于 2216E 液体培养基 (5 g/L 胰蛋白胨, 1 g/L 酵母提取物, pH7.6) 中, 在 28 °C、150 r/min 摇床中过夜培养, 5 000×g 离心 10 min 后收集菌体并重新悬浮于无菌海水中。采用浸浴感染方式, 将健康缢蛏随机分为 2 组, 即实验组和对照组, 在实验组中加入终浓度为  $10^7$  CFU/mL 的副溶血弧菌, 并于 6、12、24 和 48 h 解剖缢蛏收集肝胰腺和鳃; 对照组缢蛏在 0 h 取样, 同时, 提取对照组缢蛏的肝胰腺、鳃、闭壳肌、性腺、血细胞、外套膜和斧足进行组织表达分析。血细胞通过 1 mL 无菌注射器收集, 并于 4 °C、800×g 离心 5 min 收集细胞, 其他组织进行液氮研磨。所有实验样品随后置于 -80 °C 冰箱备用。

**缢蛏各组织总 RNA 的提取** 按 RNAiso Plus (TaKaRa, 大连) 说明书对上述缢蛏各组织中的总 RNA 进行提取。

**缢蛏各组织 cDNA 的合成** 根据 cDNA 逆转录试剂盒 (TaKaRa, 大连) 的使用说明, 将缢蛏各组织总 RNA 进行反转录, 用于随后的 *ScCAT* 基因的组织表达分析和诱导表达分析。

**cDNA 末端快速扩增 (rapid amplification of cDNA ends, RACE)** 从本实验室获得的缢蛏转录组数据库 (GenBank 登录号: SRP080845) 中筛选出一条注释为 catalase 的基因片段 (UN008218)。将该序列作为缢蛏 *CAT* 基因克隆的核心序列进行 RACE 扩增, 扩增引物见表 1。参照 3', 5'-RACE kit (TaKaRa, 大连) 的操作流程, 分别进行缢蛏 *CAT* 基因的 3' 和 5' RACE 扩增。将扩增得到的产物连接至 pMD19-T vector (TaKaRa, 大连) 上, 连接产物通过转化筛选出阳性克隆并进行测序 (生工, 上海)。

**缢蛏 *CAT* 基因的生物信息学分析** 利用 BLAST 软件工具拼接 5' 和 3'-RACE 片段序列, 获

表 1 实验所用引物及其序列

Tab. 1 Primers and sequences

引物 primers	序列(5'-3') sequence(5'-3')	用途 usage
ScCAT 3-1	AGTGGGGCGGATGGTGCTAAACA	全长 扩增
ScCAT 3-2	GCCTTGCTCGGTTGGCCAT	
ScCAT 5-1	CGGTCCGAGAAAAGGAACGAAAC	
ScCAT 5-2	CAGGTCTCTCTCCCAACAGTG	
ScCAT F	ATGGCCAACCGAGACAAGGCTAC	原核 表达
ScCAT R	TTATAGGTTGGCGGAGGCTTAC	
ScCAT BamH I F	GGATCCATGGCCAACCGAGACA AGGCTAC	
ScCAT Xho I R	CTCGAGTTGAGTTTGTCGGCA AGAAGAC	定量
ScCAT qF	TTTGTAGTTGTCGGCAAGAAGAC	
ScCAT qR	CCTGATGAAGAAGATGGGTGTGT	
Sc $\beta$ -actin qF	AAGAGCCGTGTTCCATCC	
Sc $\beta$ -actin qR	AGCCTCATCTCCACATAGC	测序
M13 F	GAGCGATAACAATTCACACAGG	
M13 R	CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC	

得 *ScCAT* 基因的 cDNA 全长; 利用 ORF Finder 在线工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 预测 cDNA 全长序列中的开放阅读框 (open reading frame, ORF); 利用在线网址 <http://www.expasy.org/> 将 *ScCAT* cDNA 序列推导成氨基酸序列; 利用 NCBI 网站的 BLAST 序列分析工具 <http://www.premierbiosoft.com> 对 *ScCAT* 碱基及氨基酸序列与数据库进行同源性比对分析; 利用在线网址 <http://smart.embl-heidelberg.de/> 和 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/> 预测 *ScCAT* 蛋白是否有信号肽和跨膜区; 利用在线 ClustalW2 软件 <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> 和在线多序列比对工具 <http://www.bio-soft.net/sms/index.html> 进行多序列比对分析; 利用 MEGA 7.0 软件对 *ScCAT* 进行进化树分析, Bootstrap 设置 1 000 次, 其他参数均使用默认值。

*ScCAT* 基因在缙蛭不同组织及副溶血弧菌感染下的表达分析 对获得的 *ScCAT* 基因的 cDNA 序列设计荧光定量 PCR 引物, 内参基因引物参考相关文献<sup>[18]</sup>(表 1)。利用 SYBR Green 荧光染料 (TaKaRa, 大连) 进行荧光 Real-time PCR 分析, 检测 *ScCAT* 基因在缙蛭肝胰腺、鳃、闭壳肌、性腺、血细胞、外套膜和斧足中的表达情况; 同时检测 *ScCAT* 基因在副溶血弧菌处理前 (对照组 0 h) 和处理后 6、12、24 和 48 h 在缙蛭肝胰腺中的表达变化情况。使用 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪实施, 反应参数为 95 °C 30 s; 95 °C 30 s,

60 °C 20 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环。根据  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算目的基因的相对表达量<sup>[19]</sup>, 以平均值 $\pm$ 标准差 (mean  $\pm$  SD) 表示。使用 SPSS19.0 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。实验柱状图均用 Graphpad Prism 绘制。

*ScCAT* 基因全长克隆及原核表达载体的构建 根据上述已获得的缙蛭 *CAT* 基因全长序列, 设计含 *Bam*H I 和 *Xho* I 限制性内切酶位点的引物 (表 1), 用上述获得的 cDNA 为模板扩增缙蛭 *CAT* 基因 ORF 序列。扩增反应后, 用胶回收试剂盒 (百泰克, 北京) 回收 PCR 产物并与载体 pMD19-T vector 连接, 转化至大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (TaKaRa, 大连)。连接产物通过转化筛选出阳性克隆并进行测序, 将测序正确的克隆质粒用 *Bam*H I 和 *Xho* I 限制性内切酶双酶切, 与经同样酶切的 pET28(a) 原核表达载体酶切产物连接, 转化 *E. coli* 感受态, PCR 筛选阳性克隆, 经测序鉴定获得编码框正确的表达载体 pET28(a)-*CAT* 重组质粒。

*ScCAT* 重组蛋白的诱导表达 利用质粒提取试剂盒 (Omega, 美国) 纯化阳性菌株重组质粒 pET28(a)-*CAT*, 转化至大肠杆菌 *E. coli* 表达感受态 BL21(DE3)(Novagen, 德国), 获得的阳性菌株即为 *ScCAT* 表达菌株。将该表达菌株再接种到卡那霉素质量浓度为 50  $\mu$ g/mL 的 LB 培养液中, 37 °C 摇床振荡培养至菌液 OD<sub>600</sub> 值为 0.4~0.6 时, 加入异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 使其终浓度为 1 mmol/L, 37 °C 诱导表达 3~6 h, 收集菌液, 经离心收集菌体, 获得重组 *ScCAT* 蛋白。

*ScCAT* 重组蛋白的纯化 采用 Ni-NTA Sefinose<sup>TM</sup> Resin 介质 (生工, 上海) 纯化目的蛋白, 方法参照说明书进行。首先, 通过超声破碎仪破碎细菌, 分别收集上清与沉淀, 加入蛋白上样缓冲液, 煮沸 10 min, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析, 证明 *ScCAT* 重组蛋白为可溶性蛋白。其次, 将收集的上清液与 1 mL Ni-NTA Sefinose<sup>TM</sup> Resin 混合, 4 °C 混匀 2 h, 收集流出液; 用 wash buffer (50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mmol/L NaCl, 40 mmol/L 咪唑, pH = 8.0) 洗脱 4 次, 每次 10 mL, 分别收集流出液; 加入 elution buffer (50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, pH 8.0), 每次 1 mL, 洗脱 5 次, 分别收集流出液, 取每次收集的 elution buffer 洗脱的流出液进行 SDS-PAGE 电泳分析。

*ScCAT* 重组蛋白酶活性检测 *ScCAT* 重组蛋白酶活性严格参照过氧化氢酶试剂盒说明书

进行操作(南京建成),按每毫升溶液每秒分解 1 μmol 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的量为一个活力单位,使用 BCA 试剂盒(康为世纪,江苏)对蛋白浓度进行测定。其中,缢蛭 C1Q (Complement 1q) 蛋白和 BSA (Bull Serum Albumin, 牛血清蛋白) 作为对照。

**副溶血弧菌胁迫下缢蛭肝胰腺和鳃组织中 ScCAT 酶活性测定** 取 0.1 g 副溶血弧菌胁迫下的缢蛭肝胰腺和鳃组织,按照重量(g): 体积(mL)=1: 9 的比例加入 9 倍体积的 0.85% 生理盐水(NaCl),制成 10% 匀浆液。利用 BCA 试剂盒对匀浆液进行蛋白浓度测定, ScCAT 酶活性参照过氧化氢酶试剂盒说明书进行操作(南京建成,江苏)。按每毫克组织蛋白每秒分解 1 μmol 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的量为一个活力单位。使用 Excel 2010 对酶活数据进行统计计算,使用 SPSS19.0 软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), P<0.05 表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 ScCAT 基因的全长克隆及序列分析

首先通过 RACE 方法,扩增得到了缢蛭 *catalase* (*CAT*) 基因的全长 cDNA 序列,并命名为 *ScCAT*, *ScCAT* 基因 cDNA 全长为 2840 bp,包含 5'非编码区为 98 bp, 3'非编码区为 1215 bp, 开放阅读框为 1527 bp, 编码 508 个氨基酸, 3'端含有 1 个多聚腺苷酸加尾信号 AATAAA 和 6 个 RNA 不稳定序列 ATTTA (图 1)。*ScCAT* 蛋白分子量为 57.43 ku, 理论等电点为 8.26。其氨基酸序列无信号肽和跨膜结构域, 包含一个 CAT 核心结构域(25~410), 1 个 CAT 活性位点(<sub>61</sub>FNRERIPERVVHAKGAGA<sub>78</sub>) 和 1 个亚铁血红素结合位点(<sub>351</sub>RLFSYS DTH<sub>359</sub>)。

### 2.2 ScCAT 氨基酸序列同源性和进化树分析

多序列比对分析显示, ScCAT 与已报导的其他物种包括脊椎动物和无脊椎动物的过氧化氢酶均具有高度的保守性(图 2), 包括 1 个 CAT 活性位点和 1 个亚铁血红素结合位点, 以及 3 个参与过氧化氢酶催化的位点(His, Asn 和 Tyr)。两两比对结果显示, ScCAT 与文蛤(*Meretrix meretrix*) (AEX58670.1) 的相似性高达 91.8%, 与长牡蛎(*Crassostrea gigas*) (XP\_034331093.1)、厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*) (AQY56552.1)、泥蚶(*Tegillarca granosa*) (AKZ20727.1) 和紫海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*) (XP\_030843604.1) 等的相似性也高

```

1 GACAGAGTTCACCTCCGTGGTGGACTGTTAACTGCTTTCGCTGATTATTTTGTGTTTC
1 M A N R D K A T
61 GTCTTAACAGGGAAGGTGTCAACCGCTAAAGTTGATCGTCCACCCGAGACAGGCTA
9 N Q M D E F R K A Q G S P D L T T G T
121 CAAATCAGATGGATGAGTTCAGAAAAGCTCAGGGGAGCCCTGACCCAGCTGACCACTGGTA
29 G A P A G N K N A S L T V G E R G P V L
181 CAGGAGCCACGACGAAATAAGAAATGCCAGTCTCAGTGTGGGAGAGAGGACCTGTC
49 L Q D F V F T D E M A H F N R R I P E
241 TGCTGCAGGACTTGTCTTACTGATGAGATGGACACTCAACAGGGAGAGGATTCCTG
69 R V Y V H A R G A G A F G Y F E C T H D Y
301 AAGCGGTGTCATGCTAAGGAGCAGGCTTTTGGATATTTGAATGTACACATGATG
89 T Q Y T K L K P F E F V G K K T P L A V
361 TGACACAGTAGCAAAAGCTGAAGCCATTTGAGTTTGTGGCAAGAGACACCCCTGCTG
109 R F S T V G G E S G S A D T A R D P R G
421 TGAGATTCTCTACTGTGGTGGAGACTGGGTGAGCTGACGTGACACAGCCGGGATCCCGAG
129 F A V K M Y T E E G N W D L V G N N T P
481 GCTTTGCTGTAGATGTACACTGAAGAGTAACTGAGTTCATFCAGACCCAGAGAGGA
149 I F F I R D P P L F P S F I H T Q K R N
541 CCATCTTTCATCAGGACCACTGCTGTTCTGAGTTTCATFCAGACCCAGAGAGGA
169 P Q T H L K D P D M F T G T T S L R P P E
601 ACCCCAAACCCTGAGAGCCCGCATGTTCCGGATTTTCACAGCTGGGACTG
189 T T H Q V S F I E S D R G T P C G Y R F
661 AGACCACACACAGGTTTCGTTCTTCTCGGACCGTGTACGCCGTGTGTTATCGCT
209 M N G Y G S H T F K L V N R D C K A V Y
721 TTATGAACGGCTATGGTAGTCAATCCCTCAAGCTGTGGAACAAGGATTTGAAGGACGCT
229 C K F H W K C D Q G I K N L S A D E A G
781 ACTGCAAGTTCACAGTGTGACAGGGCTCAAGAGCTCTCTGCTGATGAGGAG
249 K L G G T D P D Y A M R D L Y N A I A E
841 GCAAGCTGGAGGACAGACCCAGACTGCTATGGGGACTGTACAATGCCATTCGAG
269 N N F P S W S L K I Q V M T Y G E A E Q
901 AGACAACTTCCCTCTGTCCTCAAGTACAGGTCATGACATGACAGGAGCCGAGC
289 E S W N P E D I T R I W P G E F P L I
961 AGTTTCTTGGAACCCATTCGATCTCACAAGATTCGGCCAGGGAGATTCGCCCTTA
309 P V G R M V L N R N P K N Y F A G V E Q
1021 TCCCAGTGGGGCGATGGTGTCAACAGGAATCCCAAGAACTACTTTCGGGGGGTGGAGC
329 I A F S P A H W I P G V E A S P D K M L
1081 AAATTGCCCTTCCCTGCTCAGATGCTCCGAGTGGAGGACCTCCCGACAAGATG
349 Q G R L F S Y S D T H R H R L G S N Y L
1141 TGCAGGGTCCGTTGTTCTGACTGTACACACACCGCTATCGCCTGGGCGACACTACC
369 Q I P V N C P Y N A R L R N Y Q R D G P
1201 TGCAGATTCTGTCAATTGTCCATACATGCCGATTTGGCCAACTACCAAGGGATGGAC
389 Q C V T D N Q A G A P N Y F P N S F G G
1261 CCCAGTGTACTGATAATCAAGCGGGTCCCAATTAITTCUCAAATAGCTTGGTG
409 P K D D V R F C E H M D R V S G Q I G R
1321 GTCCUAGGATGATGGAAGTCTGTGACACACATGGCAAGTGAAGTGGACAGATGGTG
429 Y N T H D D D N F T Q V G T F F N K V L
1381 GCTACAACACCATGATGATGACAACTCACACAAGTGGGACATCTTCCAGAGGAT
449 T A Q G R E N L T S N I A G H L K D A Q
1441 TGACTGCCAGGGCCGAGAGACCTGACATCCAGATCGGACCCACTTGAAGGATGCTC
469 E F I Q K R A V A N F A K A D P V Y G R
1501 AGGATTCATCCAGAGAGAGCTGTGCAACTTCGGCCAGCTGATCCAGTATGGGC
489 M I Q E K L D R F K A E R S E S A N L
1561 GCATGATACAGGAAACTAGACCGCTCAAGGCTGAGGCGAGTGAAGCTCCGCCAAC
509 *
1621 TATAAGATATAGAGTATTGATCAATGAAGAAGTGAAGTATTTATCATAGCAATTT
1681 CTGGAGGATTTTAGTAAATCTACATCAGTATACCATCAGAAAGATTCATATTTGTGC
1741 FATGCAGAAGTATCAAGTGAACCTACTACTTCTACTAGAACTATGAGATCTAGG
1801 ATGGTTACAAGTTCAGATGAAATATGACAAATACAAAATACAACACAGGCGTTTCA
1861 ACTGTTGCTGCTAAGCAATATGGCATGACAAATAGTGTAGATCCAGGCGAGATCC
1921 CACTTGGAGCTGGCTGACTAGGGCATACACTGTGGCCAGAAAGCTCTGTACTGTGTC
1981 TGTGAAGTTGTAGCTGATAAAGCTGTAAGTAAATACATATGGAGATGCTAATGGT
2041 T A T A T T A A G G A C A A A A A A G C C T G T A T T A A A G G T T G C A G A A T T C T G C T T
2101 ATGAGGAAAAATCAGGAATTTAAAGAAAAATCTTATCATTATTTCAATCTGTCAIT
2161 ATTTTGTATATTTTGTGCAAAATATACCATGTCATATGGCTGTGTATGATGCTT
2221 TTATGCTCAAGCTGTACATCTATCAGTATGTTTCTTTTAACTATTTAAAGAG
2281 TTTGATGATATTTAAGAGTTTGTGTAATTAAGAGGTTTGGTAAATGATATTTG
2341 CAAAAGTAAATCCAAATTTATGAGTATTTCAATTAAGTGTATATCAATATTTGCT
2401 TGCCAGTGTGATTAACCAATTTTAGGGCACTAGCTTCTGTGGTAACATTTAATAAT
2461 GTTTGGTTAATGATTTATTTGATATAACTAATGATGAGGTTAGGATTTCAAGCAAC
2521 AGATCAGTGGTTCATAAAAGACCATTTATCTGCTGAGTAAAGTACAAATGTTATATTTA
2581 TAGCCAGAATATAGATAGGACCTTCACTATATGAGTATTAATTTTTCAGATACCA
2641 TCAATGATTCGCGATTTGTTGATTTTACAGGGACACATATAGGAAATGCTTATGCA
2701 TTGCATGTTTGTGATATTTTAAACTTTGGATGATGGTAGTGTAACTTTATTC
2761 GATTAATCATCAATTAAGATTTTGTGTGTTTATGATGATTTATAAATTAATTTA
2821 ATTTGAAATATAAAAAA

```

图 1 ScCAT 基因 cDNA 全长及推导的氨基酸序列

黑色加粗字体分别为起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA, 多聚腺苷酸加尾信号 AATAAA 和 RNA 不稳定序列 ATTTA 用斜体表示。CAT 结构域用下划线表示, 血红素结合位点用灰色阴影表示; 糖基化位点用粗下划线表示, \*表示终止密码子

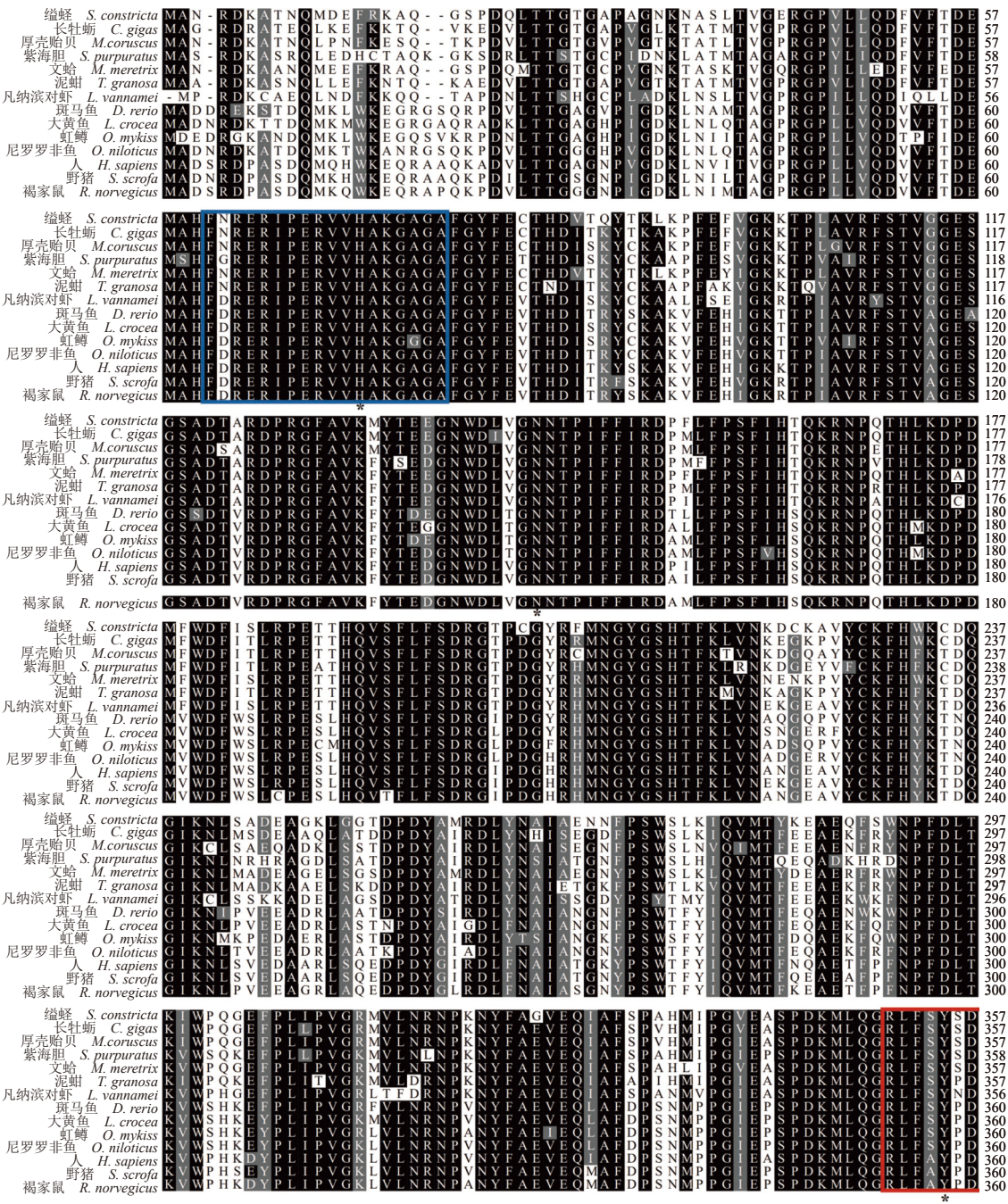
Fig. 1 Full-length of cDNA and deduced amino acid sequence of CAT from *S. constricta*

The start codon and stop codon were blacked. The polyadenylation signal (AATAAA) and RNA instability sequence (ATTTA) were indicated by bold italics. The CAT domain was underlined. Heme-ligand signature motif were shown in gray shadow; putative N-glycosylation sites were underlined in bold; the asterisk indicated the start codon

达 81%~87%, 与凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) (XP\_027238889.1) 的相似性达 79%, 与人 (*Homo sapiens*) (NP\_001743.1)、野猪 (*Sus scrofa*) (NP\_999466.2) 和褐家鼠 (*Rattus norvegicus*) (NP\_036652.1) 等的相似性达 77.6%, 而与斑马鱼 (*Danio rerio*) (NP\_570987.2)、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) (XP\_010733480.3)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) (XP\_021413025.1) 和尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) (XP\_003447569.1) 的相似性次于哺乳动物, 达

74%~76%。

此外, 用 Mega 7.0 软件以邻位相接法 (Neighbor-joining, NJ) 构建了 CAT 基因氨基酸的系统进化树, 采用 Bootstrap 重复 1 000 次检验。结果表明, 缙蛭 CAT 首先与文蛤聚成一小分支, 表明缙蛭 CAT 分子进化地位与文蛤的生物学分类地位基本一致; 随后, 与其他无脊椎动物 CAT 聚合形成一分支, 最后和脊椎动物聚在一起 (图 3)。



(图 2 Fig. 2)

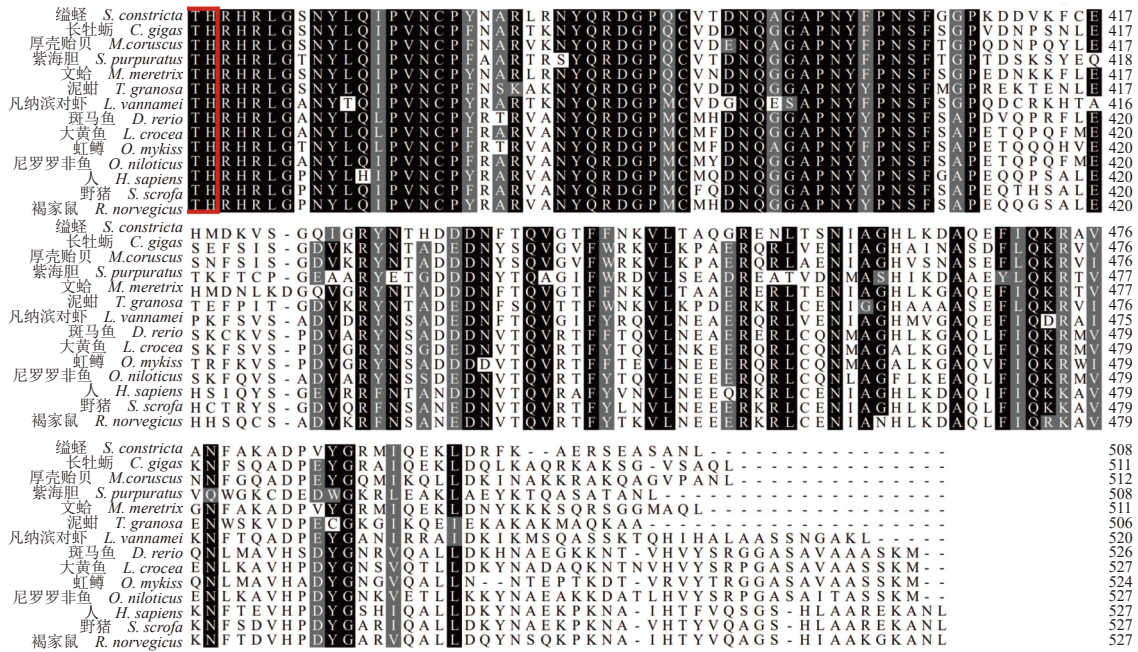


图2 ScCAT氨基酸序列与其他动物序列比对结果

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；蓝色方框表示CAT活性位点，红色方框表示亚铁血红素结合位点，星号表示3个保守的过氧化氢酶催化位点(His, Asn 和 Tyr)

Fig. 2 Alignment of CAT amino acid sequence from *S. constricta* and other species

Alignment of the predicted amino acid sequence of ScCAT with other species. Identical residues were indicated in black, and similar residues were presented in light gray. The catalase proximal active site signature and proximal heme-ligand signature sequence were framed with blue and red boxes, respectively. The three conserved catalytic amino acids (His, Asn and Tyr) were indicated with asterisks

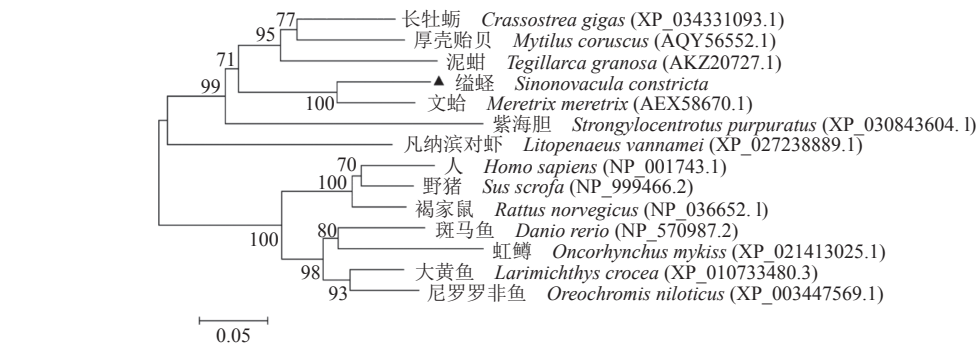


图3 NJ法构建的ScCAT系统进化树

Fig. 3 A phylogenetic tree based on the amino acid sequences of the known CAT proteins from various organisms

2.3 ScCAT基因组织表达分析

为研究 ScCAT 基因的组织分布，利用 qRT-PCR 技术检测了 ScCAT mRNA 在缢蛭血细胞、肝胰腺、鳃、闭壳肌、性腺、外套膜和斧足中的表达。结果表明，ScCAT 基因在所有检测的组织中均能表达，其中，在肝胰腺中的表达量最高，为闭壳肌的 85.67 倍 (P<0.01)，其次是鳃和性腺，分别为闭壳肌的 50.09 倍 (P<0.01) 和 4.29 倍 (P<0.05)。ScCAT 在血细胞中的表达量最低，为闭壳肌的 0.76 倍 (图 4)。

2.4 ScCAT 基因对副溶血弧菌刺激的反应

副溶血弧菌胁迫后，肝胰腺中 ScCAT mRNA 表达水平在 12 h 达到最高值，为对照组 (0 h) 的 3.56 倍 (P<0.05)。随后，胁迫到 24 h 时仍为对照组的 2.93 倍 (P<0.05)，胁迫 48 h 后，仍比对照组显著上调 2.41 倍 (图 5)。

2.5 副溶血弧菌胁迫下缢蛭肝胰腺和鳃组织中的 CAT 活性测定

使用 CAT 测定试剂盒检测副溶血弧菌胁迫

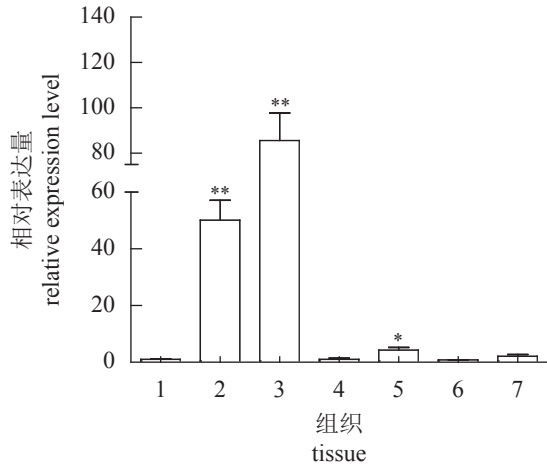


图4 ScCAT在缢蛏不同组织中的表达水平

1. 闭壳肌; 2. 鳃; 3. 肝胰腺; 4. 外套膜; 5. 性腺; 6. 血细胞; 7. 斧足。“\*”表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), “\*\*”表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )

Fig. 4 mRNA expression level of ScCAT in different tissues of *S. constricta*

1. adductor muscle; 2. gill; 3. hepatopancreas; 4. mantle; 5. gonads; 6. hemocytes; 7. foot. Asterisks indicate significant differences: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

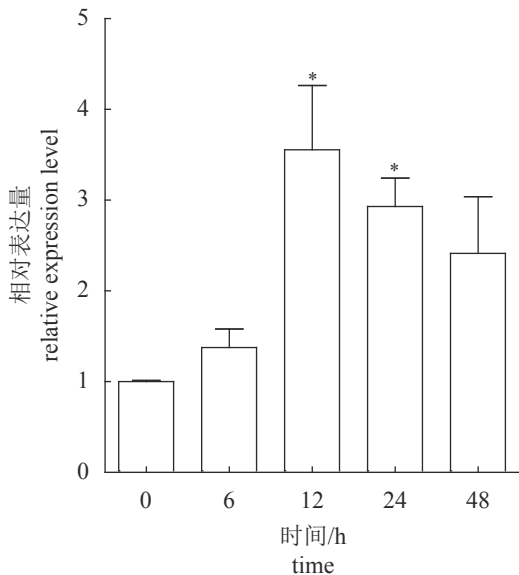


图5 副溶血弧菌胁迫后 ScCAT在缢蛏肝胰腺组织中的表达水平

0 h 作为对照组, “\*”表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

Fig. 5 mRNA expression level of ScCAT after *S. constricta* infection

0 h served as control, asterisks indicate significant differences, \* $P < 0.05$

缢蛏不同时间点后, 缢蛏肝胰腺和鳃组织中的CAT酶活变化(图6)。研究表明, 副溶血弧菌感染缢蛏12h后, 缢蛏肝胰腺CAT酶活达到最高, 为对照组(0h)的1.99倍; 感染24h后, 缢

蛏肝胰腺中的CAT酶活性有所下降, 但相对于对照组仍维持在较高的水平。副溶血弧菌感染缢蛏6h后, 缢蛏鳃组织CAT酶活性缓慢上升, 感染48h后鳃组织中的CAT酶活性达到最高, 为对照组的1.66倍。

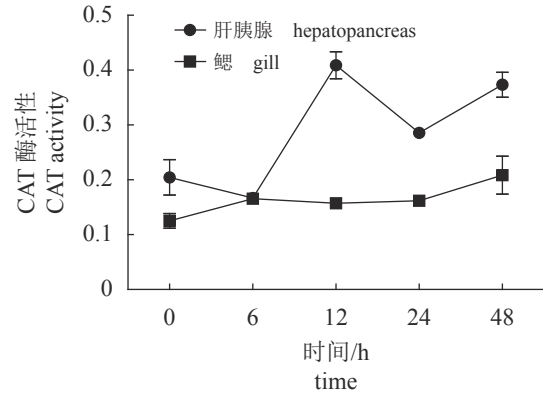


图6 副溶血弧菌胁迫下缢蛏肝胰腺和鳃组织中的CAT酶活性测定

Fig. 6 Enzyme activity of ScCAT in *V. parahaemolyticus*-challenged *S. constricta*

### 2.6 ScCAT酶活水平的测定

ScCAT重组蛋白的表达 将重组质粒pET28(a)-CAT转化至BL21(DE3)感受态中, 并进行诱导纯化, 获得重组的ScCAT蛋白(图7)。阳性菌株在诱导后有1条约58ku的目的蛋白条带

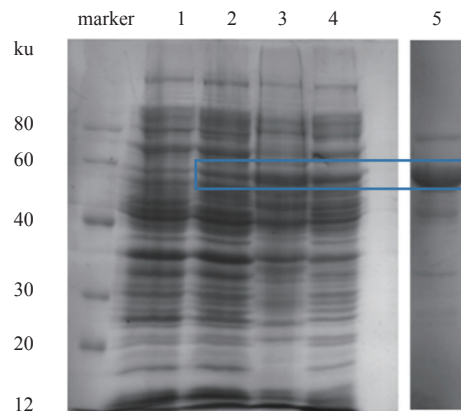


图7 重组 ScCAT 蛋白的表达和纯化结果

Marker. 蛋白标准分子量; 1. IPTG 诱导前细菌蛋白产物; 2. IPTG 诱导后细菌蛋白产物; 3. IPTG 诱导后的可溶性蛋白; 4. IPTG 诱导后的包涵体蛋白; 5. 纯化后的 ScCAT 蛋白

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of ScCAT recombinant protein

M. protein marker; 1. before IPTG induction; 2. after IPTG induction; 3. after IPTG induction with soluble proteins; 4. after IPTG induction with inclusion body proteins; 5. refolded recombinant ScCAT

明显变粗(图7,泳道2~4),且该蛋白主要以可溶性蛋白的形式存在。随后,通过可溶性蛋白纯化方式<sup>[2]</sup>,获得了单一的条带(图7,泳道5),且该蛋白分子量大小与网站预测大小相符,表明纯化后的蛋白即是目的蛋白。

**ScCAT重组蛋白的酶活性测定** 为进一步明确 ScCAT 蛋白是否具有 CAT 酶活性,使用 CAT 测定试剂盒检测重组 ScCAT 蛋白的酶活性,以 BSA 蛋白和缢蛏 CIQ 蛋白为对照<sup>[2]</sup>。与对照 BSA 和 ScCIQ 相比, ScCAT 蛋白具有明显的过氧化氢酶活性,表明纯化得到的目的蛋白即为 CAT 蛋白;且 CAT 酶活性随蛋白质质量浓度的增加而增加,当 ScCAT 重组蛋白质量浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$  时,重组 ScCAT 蛋白酶活性达到最大(图8)。

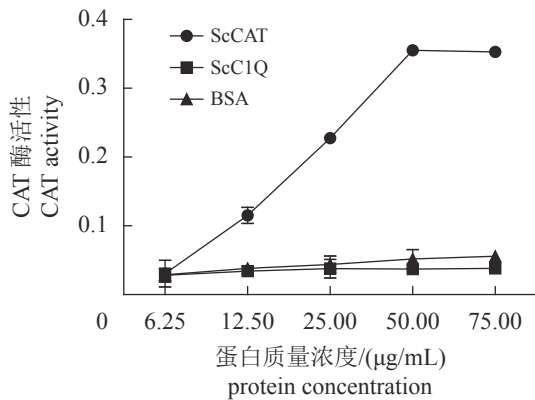


图8 重组 ScCAT 蛋白的酶活性测定

Fig. 8 Activity assay of recombinant ScCAT

### 3 讨论

过氧化氢酶作为生物体中广泛存在的一类末端氧化酶,在生物抗氧化防御系统中具有重要作用,可有效清除氧化应激中产生的  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,以保护细胞免受活性氧损害<sup>[20]</sup>。例如,患有牙周炎的大鼠,其牙龈组织中的 CAT 含量明显低于正常大鼠,且 CAT 含量随着牙周炎的发生而明显降低,表明牙龈组织中的 CAT 含量与牙周炎的发生发展密切相关<sup>[21]</sup>。在结肠癌、肝癌、鳞状上皮细胞癌等癌组织中发现, CAT 等抗氧化酶水平明显下降,表明癌细胞中的氧化还原系统受到了损伤<sup>[22-23]</sup>。综合国内外研究发现,哺乳动物 CAT 在动物抗氧化胁迫、生长发育以及抵御疾病等方面均发挥重要功能。目前,对无脊椎动物 CAT 基因的研究主要集中于软体动物和节肢动物,例如虾夷扇贝<sup>[24]</sup>,脊尾白虾<sup>[25]</sup>,三疣梭子蟹等<sup>[26]</sup>,而目前对缢蛏 CAT 基因功能的研究还未见报道。因此,本实验

以软体动物缢蛏作为研究对象,鉴定并分析了缢蛏 CAT 基因在先天免疫防御中的功能。

首先,通过 RACE 技术扩增缢蛏过氧化氢酶基因(命名为 ScCAT)全长,并利用生物信息学对缢蛏 ScCAT 基因和其推导的蛋白进行结构分析和功能预测,结果显示其 cDNA 全长为 2840 bp,编码 508 个氨基酸残基。BLAST 分析表明 ScCAT 与已报道的其他物种包括脊椎动物和无脊椎动物的过氧化氢酶均具有高度的保守性,其中与文蛤的相似性最高,说明缢蛏与文蛤的亲缘关系最近。多序列比对结果表明 ScCAT 含有一个 CAT 酶活性位点序列( $_{61}\text{FNRERIPERVVHAKGAGA}_{78}$ )和一个亚铁血红素结合位点( $_{351}\text{RLFSYSDDTH}_{359}$ ),这些活性位点在形成和稳定成熟酶的催化活性中心和三维结构以及 CAT 发挥催化功能过程中具有极为重要的作用<sup>[27-28]</sup>。此外,系统进化树分析表明, ScCAT 首先与无脊椎动物 ScCAT 聚成一支,表明与无脊椎动物具有更近的进化关系。

组织分布结果显示, ScCAT 在所有检测的组织中均能表达,其中,在肝胰腺中的表达量最高,鳃次之,其次为性腺和血细胞,在闭壳肌中表达量最低,表达量差异明显。贝类的肝胰脏主要具有造血及排毒功能,是贝类发挥防御功能的主要器官之一。研究发现,肝胰脏中的过氧化氢酶能够增强贝类吞噬细胞的防御能力和机体的免疫功能进而保护机体免受过氧化氢的损伤<sup>[29-30]</sup>,缢蛏肝胰腺中的 CAT 高表达表明其在免疫反应过程中具有重要的作用。缢蛏的鳃通常是单层并且其表面覆盖有保护性黏液,能与含有病原菌的水体直接接触<sup>[31]</sup>, ScCAT 在鳃中的高表达也侧面证明了缢蛏鳃组织是对抗病原菌入侵的早期保护关键部位。

为进一步研究 ScCAT 能否响应病原感染,通过副溶血弧菌胁迫,检测了肝胰腺中 ScCAT 的表达变化。先前的转录组数据结果表明,健康缢蛏的鳃和肝胰腺组织在 0、12、48 h 的基因表达水平未发生明显变化<sup>[32]</sup>,因此,对照组仅在 0 h 取样。研究发现副溶血弧菌胁迫后, ScCAT 在肝胰腺中的表达量显著上调,12 h 达到最高峰,且在胁迫的 24~48 h 内, ScCAT 仍保持较高的水平。 ScCAT 表达变化与其他物种在病原胁迫下的表达变化相一致,例如,鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 刺激栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 后,其血细胞中的 CAT 表达量在 12 h 达到高峰<sup>[33]</sup>;拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 受到 LPS 刺激后,其血细胞



和胰腺中的 *CAT* 在 3~6 h 出现表达高峰<sup>[34]</sup>; 在中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 中, 血细胞和胰腺中的 *CAT* 在受到 WSSV 刺激后的 14~37 h 出现表达高峰<sup>[35]</sup>。实验利用过氧化氢酶测定试剂盒检测副溶血弧菌感染不同时间点后, 缢蛏胰腺和鳃组织中的 *CAT* 酶活性变化, 发现副溶血弧菌感染缢蛏 12 h 后, 缢蛏胰腺中的 *CAT* 酶活性达到最高水平; 24 h 后虽然活性有所下降, 但相对于未感染的缢蛏体内 *CAT* 活性明显上升, 副溶血弧菌感染缢蛏后胰腺中 *CAT* 酶活变化趋势与副溶血弧菌刺激后胰腺中 *CAT* mRNA 变化趋势基本一致。在缢蛏鳃组织中, 副溶血弧菌感染缢蛏 6 h 后, 其酶活性缓慢上升, 感染 48 h 后, *CAT* 酶活性达到最高, 以上表明 *ScCAT* 在病原胁迫下表现出快速的应激反应, 在防御病原菌感染的过程中发挥重要作用。

此外, 实验成功构建了重组表达载体 pET28(a)-*CAT*, 并通过诱导、纯化后得到具有活性的 *ScCAT* 重组蛋白。为研究纯化出的 *ScCAT* 生物学功能, 将其与 BSA 和重组的缢蛏 C1Q 蛋白进行活性对比实验, 结果表明 *ScCAT* 蛋白具有明显的 *CAT* 酶活性, 而 BSA 和 *ScC1Q* 蛋白均无明显的过氧化氢酶活性。本实验成功分离纯化了具有抗氧化能力的重组 *CAT* 蛋白, 对缢蛏的病害研究与防治工作具有重要意义。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

## 参考文献 (References):

- [1] Zhao X L, Duan X M, Wang Z H, *et al.* Comparative transcriptome analysis of *Sinonovacula constricta* in gills and hepatopancreas in response to *Vibrio parahaemolyticus* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 67: 523-535.
- [2] Cui Y, Wei Z X, Shen Y Y, *et al.* A novel C1q-domain-containing protein from razor clam *Sinonovacula constricta* mediates G-bacterial agglutination as a pattern recognition receptor[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 79: 166-174.
- [3] Jacob R A. The integrated antioxidant system[J]. *Nutrition Research*, 1995, 15(5): 755-766.
- [4] 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.
- [5] 方春华, 乔琨, 刘智禹, 等. 海洋生物中抗氧化酶的研究进展[J]. *渔业研究*, 2016, 38(4): 331-342.
- Fang C H, Qiao K, Liu Z Y, *et al.* The research progress of antioxidant enzymes in marine organisms[J]. *Journal of Fisheries Research*, 2016, 38(4): 331-342 (in Chinese).
- [6] Loew O. A new enzyme of general occurrence in organisms[J]. *Science*, 1900, 11(279): 701-702.
- [7] 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).
- [8] Zhang J M, Duan D Z, Song Z L, *et al.* Small molecules regulating reactive oxygen species homeostasis for cancer therapy[J]. *Medicinal Research Reviews*, 2021, 41(1): 342-394.
- [9] Nordberg J, Arnér E S J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001, 31(11): 1287-1312.
- [10] Trasviña-Arenas C H, Garcia-Triana A, Peregrino-Urriarte A B, *et al.* White shrimp *Litopenaeus vannamei* catalase: Gene structure, expression and activity under hypoxia and reoxygenation[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 164(1): 44-52.
- [11] Hasegawa K, Wakino S, Yoshioka K, *et al.* Sirt1 protects against oxidative stress-induced renal tubular cell apoptosis by the bidirectional regulation of catalase expression[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 372(1): 51-56.
- [12] 王群英, 张亚历, 王继德. 过氧化氢酶对肠上皮细胞的保护机制的研究 [M]. 广州: 第一军医大学, 2005.
- Wang Q Y, Zhang Y L, Wang J D. Investigation on the protective mechanism of catalase on intestinal epithelial cells[M]. Guangzhou: First Military Medical University, 2005 (in Chinese).
- [13] Vinagre C, Madeira D, Narciso L, *et al.* Effect of temperature on oxidative stress in fish: lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*[J]. *Ecological Indicators*, 2012, 23: 274-279.

- [14] Vasyukiv O Y, Kubrak O I, Storey K B, *et al.* Catalase activity as a potential vital biomarker of fish intoxication by the herbicide aminotriazole[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2011, 101(1): 1-5.
- [15] Bhagat J, Ingole B S, Singh N. Glutathione S-transferase, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and lipid peroxidation as biomarkers of oxidative stress in snails: a review[J]. *ISJ-Invertebrate Survival Journal*, 2016, 13(1): 336-349.
- [16] 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]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2014, 16(2): 127-134 (in Chinese).
- [17] 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.
- [18] Zhao X L, Fu J P, Jiang L T, *et al.* Transcriptome-based identification of the optimal reference genes as internal controls for quantitative RT-PCR in razor clam (*Sinonovacula constricta*)[J]. *Genes & Genomics*, 2018, 40(6): 603-613.
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [20] Ali D, Ahmed M, Alarifi S, *et al.* Ecotoxicity of single-wall carbon nanotubes to freshwater snail *Lymnaea luteola* L.: impacts on oxidative stress and genotoxicity[J]. *Environmental Toxicology*, 2015, 30(6): 674-682.
- [21] 杨佳栋, 魏凤菊, 潘新新, 等. 动物过氧化氢酶(CAT)的研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2016(7): 59-62.
- Yang J D, Wei F J, Pan X X, *et al.* Research process of animal catalase (CAT)[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2016(7): 59-62 (in Chinese).
- [22] Syed D N, Mukhtar H. Gender bias in skin cancer: role of catalase revealed[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2012, 132(3): 512-514.
- [23] Wu S H, Lee K W, Chen C H, *et al.* Epistasis of oxidative stress-related enzyme genes on modulating the risks in oral cavity cancer[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2010, 411(21-22): 1705-1710.
- [24] Gao J L, Ishizaki S, Nagashima Y. Molecular cloning, characterization, and expression of a catalase gene in the Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis* induced in the presence of Cadmium[J]. *Ocean Science Journal*, 2016, 51(2): 223-233.
- [25] Ren H, Li J, Li J T, *et al.* Cloning of catalase and expression patterns of catalase and selenium-dependent glutathione peroxidase from *Exopalaemon carinicauda* in response to low salinity stress[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2015, 34(8): 52-61.
- [26] Chen P, Li J T, Liu P, *et al.* cDNA cloning, characterization and expression analysis of catalase in swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(12): 9979-9987.
- [27] Muradian K K, Utiko N A, Fraifeld V, *et al.* Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the liver of young and old mice: Linear regression and correlation[J]. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 2002, 35(3): 205-214.
- [28] 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.
- [29] Chen J H, Mai K S, Ma H M, *et al.* Effects of dissolved oxygen on survival and immune responses of scallop (*Chlamys farreri* Jones et Preston)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(3): 272-281.
- [30] 吕昊泽, 刘健, 陈锦辉, 等. 盐度对缢蛏超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性的影响[J]. *海洋渔业*, 2013, 35(4): 474-478.
- Lv H Z, Liu J, Chen J H, *et al.* Effects of salinity on activities of SOD and CAT in hepatopancreas of *Sinonovacula constricta*[J]. *Marine Fisheries*, 2013, 35(4): 474-478 (in Chinese).
- [31] Zhao J M, Qiu L H, Ning X X, *et al.* Cloning and characterization of an invertebrate type lysozyme from *Venerupis philippinarum*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 156(1): 56-60.
- [32] Wang Z H, Shao Y N, Li C H, *et al.* RNA-seq analysis revealed ROS-mediated related genes involved in cadmium detoxification in the razor clam *Sinonovacula con-*

- stricta*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 57: 350-361.
- [33] Li C, Ni D, Song L, *et al.* Molecular cloning and characterization of a catalase gene from Zhikong scallop *Chlamys farreri*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 24(1): 26-34.
- [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.
- [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.

## Characterization of a *catalase* gene from razor clam (*Sinonovacula constricta*)

QIAO Xiaojing<sup>1</sup>, ZHANG Weiwei<sup>1,2</sup>, SHAO Yina<sup>1,2\*</sup>, ZHAO Xuelin<sup>1,2</sup>, LI Chenghua<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** Catalase (CAT) is the main member of antioxidant enzyme system, which plays an important role in maintaining redox homeostasis and resisting pathogen infection. In order to study the function of *CAT* gene in mollusc under pathogen infection, the full-length cDNA sequence of *CAT* in *Sinonovacula constricta* was cloned by RACE approaches, and designated as *ScCAT*. The full-length cDNA of *ScCAT* was 2840 bp and encoded a polypeptide of 508 amino acid residues. Sequence analysis showed that *ScCAT* protein contains a CAT core domain (25-410), a catalase proximal active site signature (<sub>61</sub>FNRRERIPERVVHAKGAGA<sub>78</sub>) and a proximal heme-ligand signature sequence (<sub>351</sub>RLFSYPDTH<sub>359</sub>). Multiple sequence alignment and phylogenetic tree analysis confirm that *ScCAT* belongs to the CAT family, and is closer to invertebrate *Meretrix meretrix*. Tissue distribution analysis revealed that *ScCAT* was constitutively expressed in all examined tissues, and the highest expression was found in the hepatopancreas (85.67-fold,  $P < 0.01$ ), followed by gill (50.09-fold,  $P < 0.01$ ), and the lowest level was detected in hemocytes (0.76-fold) compared to that of adductor muscle. After the razor clams were challenged by *Vibrio parahaemolyticus*, the mRNA level of *ScCAT* was significantly increased in the hepatopancreas, and reached the highest level at 12 h compared with control (3.56-fold,  $P < 0.01$ ). Moreover, the *ScCAT* protein activity in hepatopancreas and gills were significantly increased after *V. parahaemolyticus* challenge, with the higher magnitude in hepatopancreas. In addition, the recombinant protein was expressed in *Escherichia coli*, and the purified *ScCAT* showed highly catalase activity. All these results show that *ScCAT* is an important antioxidant enzyme, which participates in the immune response of *S. constricta*.

**Key words:** *Sinonovacula constricta*; catalase; gene cloning; expression analysis

**Corresponding authors:** LI Chenghua. E-mail: lichenghua@nbu.edu.cn;

SHAO Yina. E-mail: lichenghua@nbu.edu.cn

**Funding projects:** National Key R&D Program of China (2018YFD0901405); Zhejiang Major Program of Science and Technology (2021C02069-7); Ningbo Major Project of Science and Technology (2019B10005); Ningbo Science and Technology Plan Project (202002N3046)