

• 药材与资源 •

吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因全长 cDNA 克隆及序列分析

吴 波¹, 罗光明¹, 潘超美², 张寿文^{1*}

1. 江西中医学院 江西省中药种质资源工程技术研究中心, 江西 南昌 330004

2. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 克隆吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因的全长 cDNA 序列。方法 根据已获得的吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因核心片段序列设计 4 条特异性引物, 采用 RACE 和巢式 PCR 方法克隆获得吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因全长 cDNA。结果 吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因全长 cDNA 序列共 1 048 bp, 包含一个 687 bp 的开放阅读框 (open reading frame, ORF), 共编码 228 个氨基酸。结论 首次从吴茱萸中克隆得到了 Mn/Fe-SOD 基因的全长 cDNA 序列, 为研究该基因在吴茱萸体内超量表达以提高植物抗逆性研究奠定基础。

关键词: 吴茱萸; Mn/Fe-SOD 基因克隆; RACE; 开放阅读框; 序列分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)09-1814-04

Full-length cDNA cloning and sequence analysis of Mn/Fe superoxide dismutase gene in *Evodia rutaecarpa*

WU Bo¹, LUO Guang-ming¹, PAN Chao-mei², ZHANG Shou-wen¹

1. Chinese Medicine Germplasm Resource Engineering Technology, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: **Objective** To clone the full-length cDNA sequence of Mn/Fe superoxide dismutase (Mn/Fe-SOD) gene of *Evodia rutaecarpa*. **Methods** Four gene specific primers were designed according to the previously obtained core sequence of Mn/Fe-SOD gene fragment in *E. rutaecarpa*. RACE and nested PCR technologies were used to clone the full-length cDNA of Mn/Fe-SOD gene in *E. rutaecarpa*. **Results** The full-length cDNA sequence of Mn/Fe-SOD gene composed of 1 048 bp was obtained including an open reading frame (ORF) with 687 bp corresponding to 228 amino acids. **Conclusion** The full-length cDNA sequence of Mn/Fe-SOD gene in *E. rutaecarpa* is cloned and reported for the first time, which lays a foundation for researching the gene excess expression in order to increase stress resistance of *E. rutaecarpa*.

Key words: *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.; Mn/Fe-SOD gene cloning; RACE; open reading frame (ORF); sequence analysis

超氧化物歧化酶 (SOD) 是一种广泛存在于生物体中的金属酶。SOD 根据结合的金属离子不同, 分为 Cu/Zn-SOD、Mn/Fe-SOD, 高等植物细胞质和叶绿体中主要以 Cu/Zn-SOD 为主^[1], 而 Mn/Fe-SOD 主要存在于线粒体中^[2]。Cu/Zn-SOD 基因与 Mn/Fe-SOD 基因起源不同, 区别较大, 并无同源性, 而 Mn-SOD 基因和 Fe-SOD 基因起源于共同的祖先基因^[3]。SOD 是清除生物体内超氧阴离子等自由基

的一种重要抗氧化酶, 与植物抗逆性密切相关^[4]。已有多种植物的 Cu/Zn-SOD 基因被克隆, 并研究了其在植物体内的表达与逆境胁迫的关系, 与之相比, 植物 Mn/Fe-SOD 基因研究较少, 主要集中在菌类微生物和水生动物上^[5-6]。目前在 GenBank 数据库中仅搜索到番茄、辣椒、银杏、莲、山茶、棉花等数条 Mn/Fe-SOD 基因 cDNA 全长序列。近年来对植物 SOD 理化性质研究表明, Mn/Fe-SOD 具有比 Cu/Zn-SOD

收稿日期: 2012-03-06

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目“龙脑樟等 6 种大宗药材规范化种植基地及其 SOP 优化升级研究”(2011BAI04B04)

作者简介: 吴 波 (1980—), 男, 在读博士, 讲师, 从事药用植物生物技术研究。E-mail: wubojxtcmi@sina.com

*通讯作者 张寿文 E-mail: hero220@126.com

网络出版时间: 2012-06-25 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120625.1530.006.html>

更加稳定,且不容易受到毒害作用的优点。

本实验以吴茱萸为研究对象,采用 RACE 技术克隆得到了吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因,对克隆所得序列进行了同源性分析,并采用生物信息学分析方法对编码的氨基酸序列从氨基酸组成、理化性质、二级结构和功能、亲/疏水性等进行了预测和分析,为深入研究该基因功能以及吴茱萸抗逆育种研究奠定基础。

1 材料

样品于2011年4月从江西省樟树市吴城镇吴茱萸 GAP 基地采摘,经江西中医学院张寿文教授鉴定为吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 的健康幼嫩叶片作为供试材料,于-80℃超低温冰箱中保存,备用。引物由 Invitrogen 公司提供,RACE 试剂盒购自 Clontech 公司,Taq DNA 聚合酶、pMD18-T 载体购自 Takara 公司,DNA marker 购自北京全式金生物有限公司,大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存,其余试剂均为进口或国产分析纯。

2 方法

2.1 总 RNA 提取

采用改良异硫氰酸胍法提取吴茱萸幼嫩叶片总 RNA^[7]。

2.2 特异性引物设计

根据吴波等^[8]已克隆的吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因核心片段序列设计克隆吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因 5'和 3'的特异性引物用于巢式 PCR 扩增。引物序列详见表 1。

表 1 特异性引物序列

Table 1 Specific primers sequences

引物名	RACE 引物序列
3'GSP1	TGGATGGGTGTGGCTTGGTTTAGAT
3'GSP2	AGATGTTTGGGAGCACGCCTATTAC
5'GSP1	GACCTCCGCCGTTGAACTTGATAGC
5'GSP2	TCTGGTGGTGTCTTCTGACTCTGCGT

2.3 吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因 3'RACE 和 5'RACE PCR 扩增

2.3.1 3'RACE 的扩增 采用 BD smart 3'RACE cDNA 扩增原理扩增吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因 3'端。3'RACE 第 1 链 cDNA 合成:取 3 μ L 模板总 RNA,加 1 μ L Oligo(dT)₁₈ 引物,加 DEPC 处理过的水 8.5 μ L,70℃变性 5 min,迅速放在冰上 5 min;然后依次加入 5 $\times$ Reaction 缓冲液 4 μ L、10 mmol/L

dNTPs 2 μ L、M-MLV 反转录酶 1 μ L、RNase-Inhibitor (10 U/ μ L) 0.5 μ L,离心,42℃,1 h;95℃,5 min。以合成的 3'RACE 第 1 链 cDNA 为模板,以 3'GSP1 和 UPM 为引物进行第 1 轮 PCR;以第 1 轮 PCR 产物稀释 100 倍为模板,以 3'GSP2 和 NUP 为引物进行第 2 轮巢式 PCR 扩增。第 1 轮扩增采用降落 PCR,具体程序:94℃、5 min;94℃、30 s,72℃、2 min (5 个循环);94℃、30 s;70℃、30 s,72℃、90 s (5 个循环);94℃、30 s;68℃、30 s,72℃、90 s (25 个循环);72℃、10 min。第 1 轮扩增 PCR 反应体系为 50 μ L,具体反应组分:dd H₂O 32.75 μ L,10 $\times$ ex Taq 缓冲液 5 μ L,dNTP (2.5 mmol/L) 4 μ L,第 1 链 cDNA 2 μ L,UPM (10 μ mol/L) 5 μ L,3'GSP1 (10 μ mol/L) 1 μ L,ex Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.25 μ L。第 2 轮扩增程序为:94℃、5 min;94℃、30 s,65℃、30 s,72℃、90 s (35 个循环);72℃、10 min。第 2 轮扩增 PCR 反应体系为 50 μ L,具体反应组分:dd H₂O 33.75 μ L,10 $\times$ ex Taq 缓冲液 5 μ L,dNTP (2.5 mmol/L) 4 μ L,第 1 轮 PCR 产物稀释 100 倍液 5 μ L 巢式引物 NUP (10 μ mol/L) 1 μ L,3'GSP2 (10 μ mol/L) 1 μ L,ex Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.25 μ L。

2.3.2 5'RACE 的扩增 采用 BD smart 5'RACE cDNA 扩增原理扩增,采用巢式 PCR 扩增吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因 5'端。5'RACE 第 1 链 cDNA 合成:取 3 μ L 模板总 RNA,依次加入 5'-CDS 引物 1 μ L,寡聚核苷酸引物 I (Oligo-I) 1 μ L,混匀简单离心,70℃温育 2 min,迅速放在冰上冷却 2 min,简单离心;然后依次加入 5 $\times$ first-strand 缓冲液 2 μ L、20 mmol/L DTT 1 μ L、10 mmol/L dNTPs 1 μ L、M-MLV 反转录酶 1 μ L,离心,42℃温育 1.5 h;72℃,7 min。第 1 轮降落 PCR 扩增合成的 5'RACE 第 1 链 cDNA 为模板,以 5GSP1 和 UPM 为引物。具体程序:94℃、5 min;94℃、30 s,72℃、90 s (5 个循环);94℃、30 s;70℃、30 s,72℃、90 s (5 个循环);94℃、30 s;68℃、30 s,72℃、90 s (27 个循环);72℃、10 min。第 1 轮 PCR 反应体系为 50 μ L,具体反应组分:dd H₂O 34.5 μ L,10 $\times$ Ex Taq 缓冲液 5 μ L,dNTP (2.5 mmol/L) 4 μ L,第 1 链 cDNA 2.5 μ L,UPM (10 μ mol/L) 1.5 μ L,5'GSP1 (10 μ mol/L) 1 μ L,ex Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 1 μ L。第 2 轮扩增程序:94℃、5 min;94℃、30 s,67℃、30 s,72℃、90 s (35 个循环);72℃ 7 min。第 2 轮扩增 PCR

反应体系为 50 μL , 具体反应组分: dd H_2O 33.75 μL , $10\times$ ex *Taq* 缓冲液 5 μL , dNTP (2.5 mmol/L) 4 μL , 第 1 轮 PCR 产物稀释 100 倍液 5 μL , NUP (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 5'GSP2 (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , ex *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μL) 0.25 μL 。

2.4 PCR 产物克隆与重组质粒鉴定

使用琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化 PCR 产物, 与 pMD18-T 载体连接。将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 在 X-gal/IPTG/Amp 琼脂平板进行蓝白斑筛选, 挑取白色菌落培养。用 SDS 碱裂解小量法提取质粒 DNA, 用 *EcoRI* 和 *Hind III* 双酶切鉴定所筛选的阳性克隆。

2.5 序列分析

Invitrogen 公司对选取的阳性克隆进行测序。采用 Blast 程序进行同源性搜索, 用 DNASTar 5.0 软件进行 DNA 序列拼接。使用蛋白质分析软件对所编码的氨基酸性质进行分析。

3 结果与分析

3.1 吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因全长 cDNA 克隆

利用 3'RACE 和 5'RACE 方法分别获得一条 422 bp (图 1) 和 352 bp (图 2) 的特异性条带, 并经过双酶切鉴定。把测序结果进行序列拼接后获得完整的吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因全长 cDNA 序列, 共 1 048 bp, 包含一个 687 bp 的开放阅读框, 该序列已提交 GenBank 基因数据库, 登录号为 JQ285852。

3.2 吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因序列同源性分析

采用 Blast 程序对克隆所得序列进行同源性比

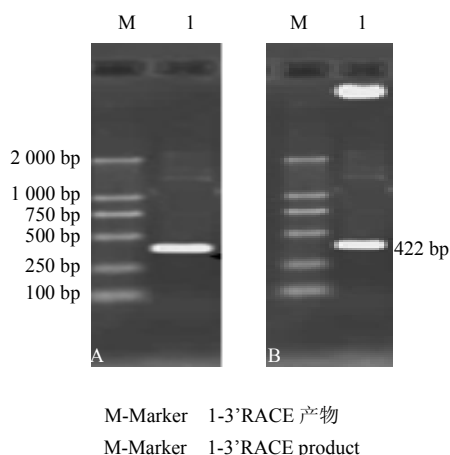


图 1 吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因 3'RACE PCR 产物 (A) 和重组质粒酶切 (B) 电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis of PCR product (A) and recombinant plasmid digestion (B) of Mn/Fe-SOD gene 3'RACE in *E. rutaecarpa*

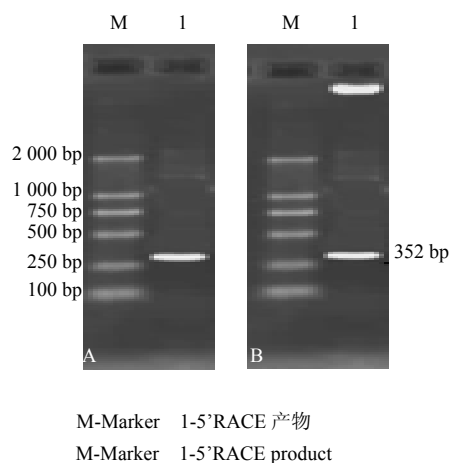


图 2 吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因 5'RACE PCR 产物 (A) 和重组质粒酶切 (B) 电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis of PCR product (A) and recombinant plasmid digestion (B) of Mn/Fe-SOD gene 5'RACE in *E. rutaecarpa*

较。吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因核苷酸序列与芸香科金橘属植物金橘的同源性最高, 达 90%, 与盐芥、葡萄、向日葵、木榄木、海榄雌和巴尔干苣苔不同科属植物的同源性分别为 83%、82%、81%、80%、79%和 76%; 该基因氨基酸序列与金橘的同源性为 94%, 与盐芥、葡萄、向日葵、木榄木、海榄雌和松等植物的同源性分别为 81%、82%、78%、80%、83%和 75%。

3.3 吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因编码氨基酸的理化性质分析

使用 ProtParam 分析软件, 对本实验克隆所得基因的氨基酸序列的氨基酸相对分子质量、理论等电点、蛋白质不稳定指数等理化性质进行了分析, 结果显示, 吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因氨基酸相对分子质量为 $2.543\ 41\times 10^7$; 理论等电点 pI 为 7.16, 属于碱性蛋白; 量最丰富的氨基酸为亮氨酸, 占总氨基酸量的 11.8%; 蛋白质不稳定指数为 36.52, 属于稳定类蛋白。

3.4 二级结构预测与分析

使用 SOPMA 软件预测了吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因氨基酸序列的二级结构, 结构显示, 吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因氨基酸由 50.88%的 α -螺旋、4.82%的 β -折叠、13.16%的延伸链和 31.14%的无规则卷曲组成。

3.5 亲/疏水性预测

使用 ProtScale 软件预测吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因氨基酸序列的亲/疏水性, 从整体上看, 亲水性氨

基酸多于疏水性氨基酸,整个多肽链表现为亲水性。

3.6 信号肽预测

使用 SignalP Server 软件预测吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因氨基酸序列的信号肽,结果表明,吴茱萸 Mn/Fe-SOD 为非分泌蛋白;信号肽可能性为 0.135,因此,吴茱萸 Mn/Fe-SOD 不具有信号肽;酶切位点分析其最可能的酶切位点在 31 号到 32 号氨基酸之间。

4 讨论

本实验采用 RACE 技术克隆了吴茱萸 Mn/Fe-SOD 基因,获得了 cDNA 全长序列,长 1 048 bp,包含一个完整的开放阅读框共 687 bp,编码 228 个氨基酸。通过序列同源性分析,发现与 Cu/Zn-SOD 基因相比,Mn/Fe-SOD 基因在不同科植物中变异程度较大,同源性较低。由此可以推断,植物 Mn/Fe-SOD 基因进化速率较 Cu/Zn-SOD 快。该推断与本课题组在研究柑橘类植物 SOD 基因分子进化时得到的研究结果相符^[9]。

SOD 基因是植物抗逆抗氧化的重要功能基因之一,与植物 Cu/Zn-SOD 基因研究相比,Mn/Fe-SOD 基因研究基础薄弱,其原因之一可能在于 Mn/Fe-SOD 在植物内的分布不广泛,仅存在于叶绿体或线粒体中。但是,近年来的研究发现,在烟草、百合、仙客来等植物中导入外源 Mn/Fe-SOD 基因可以明显增强其抗性^[10-11]。除此之外,在植物中,Mn/Fe-SOD 较 Cu/Zn-SOD 活性稳定,在其溶液中 H₂O₂、DTT 和 NaN₃ 等化学物质对其活性影响很小,无中毒现象^[12]。本实验为今后在此研究基础上,科学合理地评价 Cu/Zn-SOD 基因和 Mn/Fe-SOD 基因对吴茱萸抗逆性的影响及以后的吴茱萸抗性品种选育奠定前期基础。

参考文献

[1] Ogawa K, Kanematsu S, Adada K. Intra and extra-cellular

localization of cytosolic CuZn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyls [J]. *Plant Cell Physiol*, 1996, 37(6): 790-799.

- [2] 马旭俊, 朱大海. 植物超氧化物歧化酶 (SOD) 的研究进展 [J]. *遗传*, 2003, 25(2): 225-231.
- [3] 陈惠芳, 王琦, 付学池, 等. 超氧化物歧化酶 (SOD) 的分子生物学 [J]. *生命的化学*, 2003, 23(4): 291-293.
- [4] 郭丽红, 吴晓岚, 龚明. 谷胱甘肽还原酶和超氧化物歧化酶在玉米幼苗热激诱导的交叉适应中的作用 [J]. *植物生理学通讯*, 2005, 41(4): 429-432.
- [5] Paula A B, Doron G, Bella K, et al. Manganese-containing superoxide dismutase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: its function, expression and gene structure [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2002, 31: 754-764.
- [6] Winton C, Ying H T, Chun H L, et al. Molecular cloning and characterization of cytosolic manganese superoxide dismutase (cytMn-SOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, 20: 438-449.
- [7] 吴波, 高丹, 潘超美, 等. 不同方法提取吴茱萸叶片基因组 DNA 和 RNA 的比较 [J]. *安徽农业大学学报*, 2012, 39(1): 111-115.
- [8] 吴波, 高丹, 潘超美, 等. 吴茱萸 SOD 基因片段克隆和 SNP 分析 [J]. *江西农业大学学报*, 2011, 33(6): 1206-1211.
- [9] 吴波, 刘勇. 柑橘类植物和其他植物的 GPAT 和 SOD 基因分子进化分析 [J]. *江西农业大学学报*, 2011, 33(1): 162-167.
- [10] 高健, 许晓风, 陈学平. 特异种质烟草 HZNH 的 Fe-SOD 基因的克隆与表达 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2005, 21(6): 840-845.
- [11] 陈莉. 麝香百合和仙客来转 Mn-SOD 基因植株的获得及其耐热性鉴定 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
- [12] 张彩莹. 不同来源的超氧化物歧化酶部分理化性质比较研究 [J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(15): 4426-4429.