

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00095

## 东方山羊豆 *Cu/ZnSOD* 基因的克隆及表达分析

李玉坤, 王学敏, 高洪文, 仁爱琴, 王赞, 孙桂枝

中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193

**摘要:** 超氧化物歧化酶是一种广泛存在于真核生物中的金属酶类, 在植物的抗逆性中起到重要的作用。文章采用 RACE 方法, 从东方山羊豆中克隆了 *Cu/ZnSOD* 基因, 并对其进行了初步分析。该基因 cDNA 序列全长 935 bp, 开放阅读框 600 bp, 编码 199 个氨基酸, 蛋白质分子量为 20.35 kDa。通过实时荧光定量 PCR 结果分析, 该基因在东方山羊豆叶中表达量最多, 茎中次之, 根中最少。在 NaCl 和 PEG 诱导下, *Cu/ZnSOD* 基因表达量先上调后下降。NaCl 诱导 24 h 后, 该基因的表达量显著低于对照。ABA 胁迫抑制了该基因的表达。亚细胞定位结果表明, *Cu/ZnSOD* 蛋白定位于叶绿体中。实验结果证明, *Cu/ZnSOD* 基因主要在东方山羊豆的绿色组织中表达, 在抵抗渗透性胁迫方面起到一定作用。

**关键词:** 东方山羊豆; *Cu/ZnSOD* 基因; 基因克隆; 实时荧光定量 PCR; 亚细胞定位

## Cloning and expression analysis of *Cu/ZnSOD* gene from *Galega orientalis* L.

LI Yu-Kun, WANG Xue-Min, GAO Hong-Wen, REN Ai-Qin, WANG Zan, SUN Gui-Zhi

Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

**Abstract:** SOD is an important enzyme which exists in eukaryote extensively and plays an essential role in stress-tolerance of higher plants. A cDNA of *Cu/ZnSOD* gene was cloned from *Galega orientalis* L. using rapid amplification of cDNA ends (RACE) method. The full-length of cDNA sequence is 935 bp, included a 600 bp open reading frame which encoded a 199-amino-acid polypeptide. The molecular weight of this protein was 20.35 kDa. The results of Real-Time PCR indicated that the expression level of *Cu/ZnSOD* gene was the highest in leaves, moderate in stems, and the least in roots. The expression of *Cu/ZnSOD* gene under stress of NaCl and PEG was up-regulated firstly and then declined. The expression level was significantly lower than the control after 24 h treated with NaCl. Abscisic acid downregulated the expression of *Cu/ZnSOD* gene. The result of subcellular localization indicated that *Cu/ZnSOD* was located in chloroplast. Gene *Cu/ZnSOD* mainly expressed in the green organs of *G. orientalis* and played a certain role in resisting osmotic stress.

**Keywords:** *Galega orientalis* L.; *Cu/ZnSOD* gene; cloning; real-time PCR; subcellular localization

收稿日期: 2011-03-29; 修回日期: 2011-10-15

基金项目: 十二五科技支撑项目(编号: 2011BAD17B01)和国际科技合作与交流专项(编号: 2010DFR30620-2)资助

作者简介: 李玉坤, 硕士, 研究方向: 牧草种质资源。Tel: 18911030551; E-mail: liyukun1986@163.com

通讯作者: 王学敏, 博士, 助理研究员, 研究方向: 牧草资源及牧草抗逆分子生理。E-mail: wangxm@iascaas.net.cn

网络出版时间: 2011-11-30 10:35:40

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20111130.1035.007.html>

在正常的生长环境下,植物能够产生少量活性氧(Reactive oxygen species, ROS),包括超氧化物阴离子自由基( $O_2^-$ )、过氧化氢( $H_2O_2$ )、羟自由基(OH)、单线态氧( $^1O_2$ )、过氧基(ROO)等,活性氧的产生和清除存在着动态平衡。一旦植物处于逆境中,这个动态平衡就会被破坏,产生大量的活性氧,此时,一些抗氧化酶(如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、多酚氧化酶(PPO)、丙二醛(MDA)等)被诱导,能够修复被损坏的DNA,防止蛋白氧化,脂质过氧化反应,从而维持植物的正常生长<sup>[1]</sup>。其中,SOD是抵抗氧化损伤,降低活性氧浓度的关键酶<sup>[2,3]</sup>。

超氧化物歧化酶(SOD; EC 1.15.1.1)是一种广泛存在于需氧原核生物和真核生物中的金属酶类。根据螯合的金属离子的不同,SOD可以分为MnSOD、FeSOD和Cu/ZnSOD 3种类型,MnSOD主要位于线粒体,FeSOD一般位于植物的叶绿体中,Cu/ZnSOD则主要位于细胞质和叶绿体中<sup>[4]</sup>。Cu/ZnSOD广泛存在于细胞内,并且占总SOD的90%<sup>[5]</sup>,与植物的抗逆性有密切关系<sup>[6-8]</sup>。

首个从植物中克隆的SOD基因来自玉米(*Zea mays* L.)<sup>[9]</sup>。目前,已经从水稻(*Oryza sativa* L.)、玉米、烟草(*Nicotiana tabacum* L.)、番茄(*Solanum lycopersicum* L.)等多种植物中克隆了SOD基因<sup>[10-14]</sup>。烟草3种SOD基因在不同的环境胁迫下表达量不一样,FeSOD和MnSOD基因的转录水平受PEG和NaCl诱导不明显,ABA诱导后MnSOD基因转录水平增强2倍,而FeSOD基因转录水平没有明显变化。Cu/ZnSOD基因的转录产物在受到PEG和ABA诱导后稍微减少,NaCl诱导使其转录产物积累<sup>[15]</sup>。鹰嘴豆(*Cicer arietinum* L.)冷处理(4℃)24 h后,上胚轴Cu/ZnSOD基因的表达量是对照(25℃)的两倍,且酶活性也有所提高<sup>[16]</sup>。SOD基因能够明显提高转基因烟草和紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)抗寒和抗氧化能力<sup>[17-19]</sup>。

东方山羊豆(*Galega orientalis* L.)为多年生豆科牧草,全世界山羊豆属(*Galega*)共有8个种<sup>[20-22]</sup>,其中东方山羊豆饲用价值最高,而且其抗逆性强、产草量高、饲用品质不亚于紫花苜蓿<sup>[23]</sup>。但与其它牧草资源相比,东方山羊豆目前的相关研究较少<sup>[22]</sup>。

本研究从东方山羊豆中首次克隆了Cu/ZnSOD

基因,并分析了Cu/ZnSOD基因的核苷酸序列和编码的蛋白序列,不同逆境下的表达模式,以及Cu/ZnSOD蛋白的亚细胞定位情况。初步探讨了Cu/ZnSOD基因在牧草抗逆性方面的作用,有助于开展对该基因抗逆机理的深入研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料

东方山羊豆和野生型烟草为中国农业科学院北京畜牧兽医研究所牧草资源研究室提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 材料的处理与总RNA的提取

将东方山羊豆种子用氯气消毒24 h后,播种于铺有滤纸的培养皿中,在光照培养箱(温度为24℃,14 h光照/10 h黑暗)中培养至种子发芽。将发芽后的种子移至蛭石与珍珠岩比例为3:1的花盆中继续培养30 d。幼苗分3部分处理:一部分幼苗用0.25 mol/L NaCl溶液分别处理2、6、10 h,提取叶片总RNA后,用于克隆Cu/ZnSOD基因;一部分幼苗用0.25 mol/L NaCl溶液、20%PEG溶液和 $0.1 \times 10^{-3}$  mol/L ABA溶液分别处理2、4、8、12和24 h,提取叶片总RNA,用于Real-time PCR分析;一部分不做任何胁迫,分别剪取根、茎、叶,提取RNA后,用于组织表达特异性分析。

#### 1.2.2 Cu/ZnSOD基因3'末端、5'末端和全长序列的克隆

用Trizol(Invitrogen, USA)法分别提取0.25 mol/L NaCl溶液处理2、6、10 h后的东方山羊豆幼叶总RNA后,按照质量比为1:1:1混合,用混合RNA为模板,按照SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit(Clontech, Japan)说明书反转录成3'-RACE-Ready-cDNA和5'-RACE-Ready-cDNA。

根据本实验室构建的SSH cDNA文库得到的东方山羊豆Cu/ZnSOD基因的EST序列,用Primer Premier 5.0引物设计软件分别设计3' RACE和5' RACE特异性引物3'GSP和5' GSP,文中所有引物序列见表1。

用3'-RACE-Ready-cDNA和5'-RACE-Ready-cDNA为模板,PCR扩增出3'末端和5'末端序列,测

表 1 引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')
3'GSP	GGGTGACCTGGGAAACATAGTTGCTGA
5'GSP	GGCATCAGCAACTATGTTTCCCAGGTC
<i>Cu/ZnSOD</i> -ORF-F	CAAACACATCAATCTCCATCTCAC
<i>Cu/ZnSOD</i> -ORF-R	AATAACACAGCTGGTACAAAAGCAT
<i>Cu/ZnSOD</i> -RT-F	CCACAAATGGGTGTATCTCA
<i>Cu/ZnSOD</i> -RT-R	AACCACTAAGGCTCTCCCAA
<i>Actin</i> -RT-F	GGACAAGTTATCACCATCGG
<i>Actin</i> -RT-R	TCAGGAATACCTGGAAACATAG
<i>Cu/ZnSOD</i> -F	GGACTAGTATGGAAGTAGCAATGGCTTCTTCAC
<i>Cu/ZnSOD</i> -R	GGACTAGTACTGGAGTCAAGCCAACCAC

序后, 结合 EST 序列用 DNAMAN 5.0 软件拼接出全长 cDNA 序列, 找到开放阅读框 ORF(Open reading frame, ORF), 在 ORF 两端分别设计全长引物 *Cu/ZnSOD*-ORF-F 和 *Cu/ZnSOD*-ORF-R(表 1), 经 PCR 扩增、测序后得到 *Cu/ZnSOD* 基因 cDNA 全长序列。

核酸及氨基酸序列分析、开放阅读框 ORF 的查找用 DNASTar 6.13 软件进行分析, 氨基酸序列的翻译和 *Cu/ZnSOD* 蛋白的同源性分析用 DNAMAN 5.0 软件进行分析, 利用 protein blast 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 和 ScanProsite 服务器 (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>) 对东方山羊豆 *Cu/ZnSOD* 蛋白进行功能预测。利用在线蛋白分析软件 ChloroP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) 进行信号肽预测。从 GenBank 上下载其他植物中的 15 种 *Cu/ZnSOD* 蛋白, 利用 MEGA 4 软件 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。

### 1.2.3 Real-time PCR 检测东方山羊豆 *Cu/ZnSOD* 基因的组织表达特异性

分别提取东方山羊豆的根、茎、叶总 RNA, 按 cDNA Synthesis Kit(Promega, USA) 使用说明书反转录为 cDNA。根据东方山羊豆 *Cu/ZnSOD* 基因全长 cDNA 序列设计特异性引物 *Cu/ZnSOD*-RT-F 和 *Cu/ZnSOD*-RT-R (表 1, 预期扩增片段大小为 199 bp)。以东方山羊豆 *Actin* 基因做内参, 设计特异性引物 *Actin*-RT-F 和 *Actin*-RT-R (表 1, 预期扩增片段大小为 200 bp)。利用 ABI PRISM 7500 Real-time PCR System (ABI, USA), 参考 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (TaKaRa, Japan) 试剂盒说明书, 采用两步法进行 Real-time PCR 扩增: 第一步: 95°C 预变性 30 s; 第二步: 95°C 5 s, 60°C 34 s, 40 个循环。每个 cDNA 样

品做 3 次重复。

根据得到的 Ct 值, 利用 Kenneth 和 Thomas 报道的  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法<sup>[24]</sup>, 分别计算东方山羊豆 *Cu/ZnSOD* 基因在根、茎、叶中的表达量。把根中表达量设为对照, 茎、叶分别设为两个不同处理, 利用公式  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{Target} - Ct_{Actin})_{处理} - (Ct_{Target} - Ct_{Actin})_{对照}$ , 分别计算出根、茎、叶的  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值和标准误 S.E., 绘出柱形图。以上数据均采用 ABI prism 7500 SDS 1.1 软件分析。采用 SAS 8.0 软件进行表达量的方差分析。

### 1.2.4 Real-time PCR 检测东方山羊豆 *Cu/ZnSOD* 基因在不同逆境胁迫下的表达量

按照 1.2.1 中所述处理方法处理东方山羊豆幼苗, 分别提取叶片总 RNA, 反转录为 cDNA。同 1.2.3 的方法, 计算出不同逆境胁迫下的表达量, 把 0 h 设为对照, 2 h、4 h、8 h、12 h 和 24 h 分别设为五个不同处理, 分别计算出  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值和标准误 S.E., 绘出柱形图, 并进行表达量的方差分析。

### 1.2.5 构建植物超表达载体

设计带有 *Spe* 单酶切位点的引物 *Cu/ZnSOD*-F 和 *Cu/ZnSOD*-R (表 1), 以东方山羊豆 cDNA 为模板, 扩增出带有 *Spe* 酶切位点的 ORF 全长。用 *Spe* (TaKaRa, Japan) 酶切扩增产物和 pCAMBIA1302 植物表达载体, 对酶切后的 p1302 载体进行去磷酸化后, 用 T4 DNA 连接酶 (TaKaRa, Japan) 4°C 连接过夜, 转化大肠杆菌, 涂布含有卡那霉素 (50 mg/mL) 的 LB 平板, 经抗生素筛选后挑菌, 摇菌, 抽提质粒后, 经 PCR 检测为阳性克隆的送北京三博远志公司测序。

### 1.2.6 东方山羊豆 *Cu/ZnSOD* 蛋白的亚细胞定位

用冻融法<sup>[25]</sup>分别将空载体 pCAMBIA1302 和重

组质粒 pCAMBIA1302-Cu/ZnSOD 转化农杆菌 LBA4404 感受态细胞, 根据 Voinnet 等<sup>[26]</sup>的方法, 接种过夜培养的农杆菌, 测过夜培养菌液的  $OD_{600}$  达到 0.5。根据公式  $construct = n \times final \times 0.5 / OD_{600}$  (其中,  $n$  为要注射的叶片数, 每片叶子的终体积  $final$  为 3 mL), 计算所需农杆菌菌液的体积  $construct$ 。离心后用与  $final$  等体积的活化缓冲液重悬菌体, 室温下放置至少 2 h 后, 用 1 mL 注射器(去掉针头)在远轴处注射 5~6 周龄的烟草叶片, 培养 3~6 d 后在激光共聚焦显微镜下观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 东方山羊豆 Cu/ZnSOD 基因全长 cDNA 的克隆及氨基酸序列分析

东方山羊豆 Cu/ZnSOD 基因全长 cDNA 序列为 935 bp, ORF 序列为 600 bp。GenBank 登录号为 HM777020。

利用 DNAMAN 5.0 软件对东方山羊豆 Cu/ZnSOD 氨基酸序列分析显示, 开放阅读框编码 199 个氨基酸, 所编码的蛋白质分子量为 20.35 kDa。

利用 Protein blast 程序分析东方山羊豆 Cu/ZnSOD 氨基酸序列, 在 Cu/ZnSOD 氨基酸序列中, Cu 离子结合位点是组氨酸 91、93、108 和 165, Zn 离子结合位点是组氨酸 108、116、125 和天冬氨酸 128。利用 ScanProsite 服务器对东方山羊豆 Cu/ZnSOD 蛋白进行功能位点预测, 结果表明, GNAGGRIACG VV(183~194 bp)中的 C(半胱氨酸)可以形成二硫键, 二硫键对维持 Cu/ZnSOD 结构的稳定性起着重要作用。

用 MEGA 4.0 软件构建 Cu/ZnSOD 的系统进化树(图 1), 分析结果显示, 东方山羊豆 Cu/ZnSOD 蛋白与在叶绿体表达的 Cu/ZnSOD 蛋白(A 组)的亲缘关系近, 与在细胞质中表达的(B 组)亲缘关系远。与紫花苜蓿 SODCP 蛋白亲缘关系最近, 其次是豌豆 (*Pisum sativum* L.), 与玉米 SOD1A、水稻 SODCP、拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)SODCP 等亲缘关系较远。

用在线 ChloroP 1.1 Server 软件分析结果显示, 东方山羊豆 Cu/ZnSOD 蛋白的 1~44 位氨基酸为叶绿体转运肽。VA 间为预测的裂解位点。表明东方山羊豆 Cu/ZnSOD 蛋白可能是一个叶绿体蛋白。

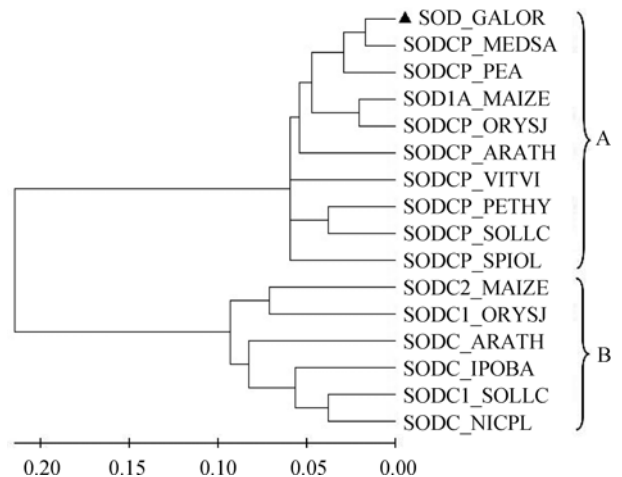


图 1 东方山羊豆 Cu/ZnSOD 蛋白与其他 15 种 Cu/ZnSOD 蛋白的系统进化树

A: 叶绿体 Cu/ZnSOD 蛋白; B: 细胞质 Cu/ZnSOD 蛋白。

SOD\_GALOR(*Galega orientalis* L.), SODCP\_MEDSA(*Medicago sativa* L.; O65198.1), SODCP\_PEA (*Pisum sativum* L.; P11964.1), SOD1A\_MAIZE(*Zea mays* L.; BA150562.1), SODCP\_ORYSJ(*Oryza sativa* L.; P93407), SODCP\_ARATH(*Arabidopsis thaliana* L.; O78310), SODCP\_VITVI(*Vitis vinifera* L.; O65199.1), SODCP\_PETHY(*Petunia xhybrida* L.; P10792.1), SODCP\_SOLLC (*Solanum lycopersicum* L.; P14831), SODCP\_SPIOL(*Spinacia oleracea* L.; P07505.2), SODC2\_MAIZE(*Zea mays* L.; P11428), SODC1\_ORYSJ(*Oryza sativa* L.; Q0DRV6), SODC\_ARATH (*Arabidopsis thaliana* L.; P24704), SODC\_IPOBA(*Ipomoea batatas* L.; Q07796), SODC1\_SOLLC(*Solanum lycopersicum* L.; P14830), SODC\_NICPL(*Nicotiana plumbaginifolia* L.; P27082)。

### 2.2 东方山羊豆 Cu/ZnSOD 基因的组织特异性表达分析

组织特异性表达分析结果表明, 东方山羊豆 Cu/ZnSOD 基因在根中表达量最少, 茎中表达量居中, 叶中最多。以根中表达量为对照, 茎中表达量为根中的 1.2 倍, 叶中表达量为根中 1.8 倍(图 2)。叶片中 Cu/ZnSOD 基因的表达量显著高于根和茎。

### 2.3 东方山羊豆 Cu/ZnSOD 基因在不同逆境胁迫下的表达分析

利用 Real-time PCR 检测了东方山羊豆 Cu/ZnSOD 基因在多种胁迫下的表达情况(图 3)。结果显示, ABA 轻微抑制 Cu/ZnSOD 基因的表达(图 3A)。NaCl 诱导(图 3B)4 h 后, 表达量显著高于对照(0 h), 为对照的 1.8 倍, 达到一个高峰, 随后逐渐降低, 诱导 24 h 后表达量显著低于对照(0 h)。PEG 诱导(图 3C)8 h 后, 表达量显著高于对照(0 h), 为对照的 1.7 倍, 达到一个高峰, 随着诱导时间的延长, Cu/ZnSOD 基因的表达量逐步降低。

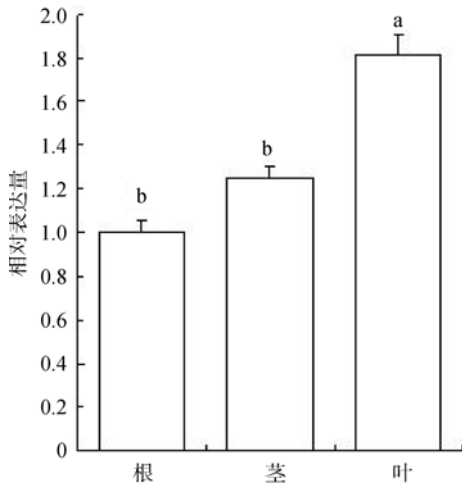


图 2 *Cu/ZnSOD* 基因在东方山羊豆不同器官中的相对表达量

图中不同小写字母表示  $P < 0.05$  水平, 差异显著。

#### 2.4 东方山羊豆 *Cu/ZnSOD* 蛋白的亚细胞定位

经 *Spe* 单酶切, 将东方山羊豆 *Cu/ZnSOD* cDNA 全长序列正向插入 pCAMBIA1302 载体 GFP 蛋白序列前, 使得 *Cu/ZnSOD* 蛋白与 GFP 蛋白融合。经 PCR 检测, 扩增片段大小为 819 bp, 与预期片段大小相符(载体片段 219 bp + ORF 600 bp)。经测序证明序列吻合, 没有发生移码和错配, 表明植物表达载体 pCAMBIA1302-*Cu/ZnSOD* 构建成功。

按照 1.2.6 方法进行 *Cu/ZnSOD* 亚细胞定位分析, 结果显示, 在未融合 *Cu/ZnSOD* 的对照材料中(图 4B), GFP 荧光遍布整个烟草表皮细胞, 而融合了 *Cu/ZnSOD* 蛋白的材料中(图 4A), GFP 荧光主要在叶绿体中激发。结果表明, 东方山羊豆 *Cu/ZnSOD* 定

位于叶绿体, 这与我们预测的结果吻合。

### 3 讨论

东方山羊豆 *Cu/ZnSOD* 基因编码的 *Cu/ZnSOD* 氨基酸序列中的活性位点, 与所有报道的 *Cu/ZnSOD* 基因的研究结果一致<sup>[27]</sup>, 其中 Cu 离子结合位点是组氨酸 91、93、108 和 165, Zn 离子结合位点是组氨酸 108、116、125 和天冬氨酸 128, 通过东方山羊豆 *Cu/ZnSOD* 与其他 15 种 *Cu/ZnSOD* 的同源性分析结果可知, *Cu/ZnSOD* 蛋白中的金属离子结合位点(组氨酸和天冬氨酸)有高度的保守性, N 端序列保守性较低, 没有明显的同源区域, 而 C 端序列保守性较高。有研究者曾经推断, *Cu/ZnSOD* 蛋白抵抗外界氧化胁迫的功能区域或结构区域主要存在于 C 端<sup>[28,29]</sup>。我们的分析结果再一次验证了这一推断。

在光下, 植物中的绿色组织能够产生更多的超氧自由基, 从而诱导 *Cu/ZnSOD* 基因的表达。在陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.) 中, *Cu/ZnSOD* 基因在茎和叶中有表达, 在根中没有表达, 而且叶中表达量高于茎中<sup>[30]</sup>。东方山羊豆 *Cu/ZnSOD* 基因的组织表达特异性结果显示, 其在叶中最多, 茎中表达量居中, 根中表达量最少。由此推测, *Cu/ZnSOD* 基因主要在植物的绿色组织中表达。

前人的研究发现, *Cu/ZnSOD* 主要位于植物体的两个部位: 细胞质和叶绿体。在我们的研究中, 根据叶绿体转运肽预测结果和系统进化树分析(图 1), 预测东方山羊豆 *Cu/ZnSOD* 是一个叶绿体 SOD 蛋白。亚细胞定位结果进一步证实了 *Cu/ZnSOD* 定位

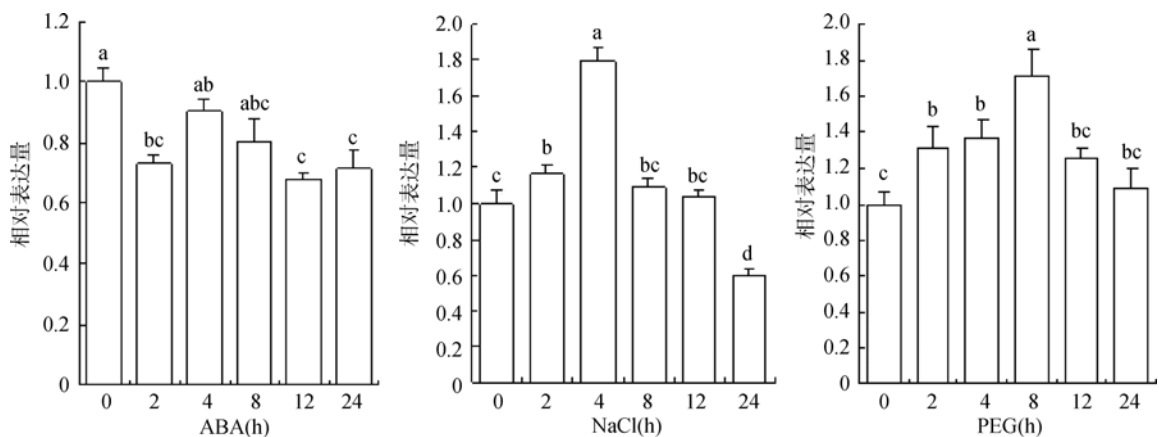


图 3 东方山羊豆 *Cu/ZnSOD* 基因在受到 ABA、NaCl 和 PEG 诱导后的相对表达量

图中不同小写字母表示  $P < 0.05$  水平, 差异显著。

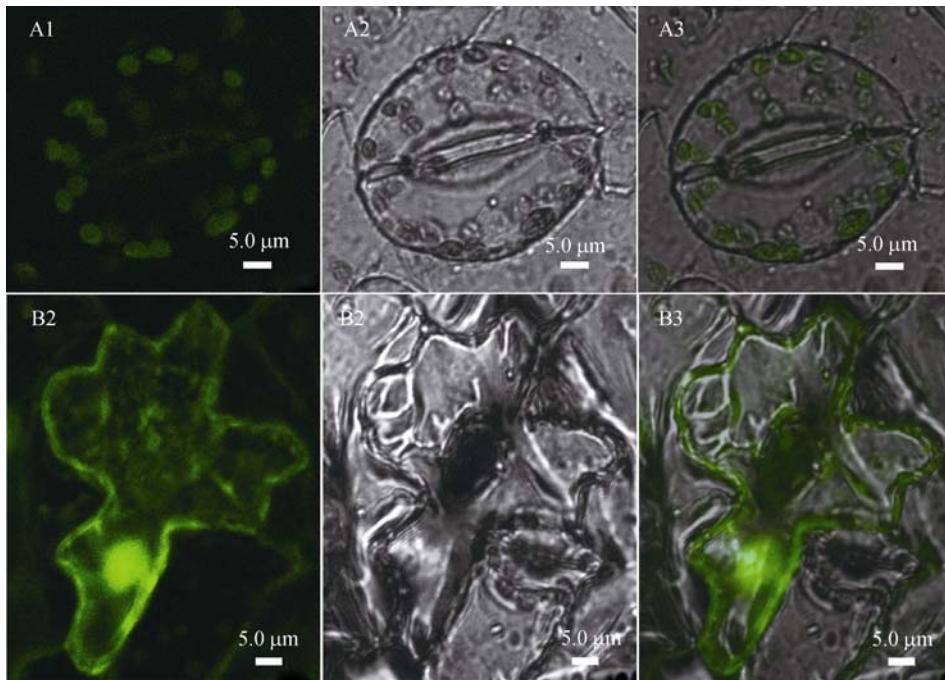


图 4 东方山羊豆 Cu/ZnSOD 蛋白的亚细胞定位

A: 重组质粒 pCAMBIA1302-Cu/ZnSOD; B: 载体 pCAMBIA1302。1: 激发光; 2: 可见光; 3: 激发光叠加可见光。

于叶绿体(图 4), 结合组织表达特异性结果可以认为, 东方山羊豆 Cu/ZnSOD 基因主要在绿色组织中表达。

本研究分析了东方山羊豆 Cu/ZnSOD 基因在不同外界环境胁迫下的表达量, 由图 3A 可以看出, 外源 ABA 抑制了 Cu/ZnSOD 基因的表达, 且表达表现为双峰模式, 这可能是由于 ABA 对该基因的调控还有其它因素的参与。NaCl 和 PEG 可以在短时间内增强 Cu/ZnSOD 基因的表达, 随着胁迫时间的延长, Cu/ZnSOD 基因的表达量逐步降低。许多学者也研究了其它植物 Cu/ZnSOD 基因在不同逆境下的表达分析, Shin 等 [27] 对木薯 (*Manihot esculenta* Crantz.) Cu/ZnSOD 基因 *mSOD2* 在不同胁迫下表达量的研究发现, 所有的化学物质 ( $H_2O_2$ 、ABA、乙烯和 NaCl) 均抑制 *mSOD2* 的表达; 与之相反的, 在木薯 Cu/ZnSOD 基因 *mSOD1* 的表达量研究中, 所有化学物质 (NaCl、ABA、乙烯和蔗糖) 均增强 *mSOD1* 的表达 [31]。干旱胁迫下草地早熟禾 (*Poa pratensis* L.) 叶片中的胞质 Cu/ZnSOD 和叶绿体 Cu/ZnSOD 基因表达量下调, 但是复水后其表达量能恢复到对照水平 [32], 而百脉根 (*Lotus japonicus* L.) 叶片中的胞质 Cu/ZnSOD 和叶绿体 Cu/ZnSOD 基因的转录水平在 NaCl 诱导下均上调 [33]。烟草 Cu/ZnSOD 基因 *SODCc* 和 *SODCp*

在 NaCl 的诱导下表达均上调 [34]。由此推测, Cu/ZnSOD 基因的转录水平受到渗透胁迫的调节, 该类基因可能普遍参与了植物抗逆性的调控, 但是调控的方式和程度在不同物种中表现不同。

本研究对东方山羊豆 Cu/ZnSOD 基因的表达特性, Cu/ZnSOD 的氨基酸序列、蛋白结构, 以及亚细胞定位做了初步分析, 为下一步研究该基因的抗逆机理起到铺垫作用, 也为研究其他的抗逆基因提供一定的方法。

#### 参考文献 (References):

- [1] Alscher RG, Erturk N, Heath LS. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot*, 2002, 53(372): 1331–1341. DOI
- [2] Sen Raychaudhuri S, Deng XW. The role of superoxide dismutase in combating oxidative stress in higher plants. *Bot Rev*, 2000, 66(1): 89–98. DOI
- [3] Slooten L, van Montagu M, Inzé D. Manipulation of oxidative stress tolerance in transgenic plants. In: Lindsey K, ed. *Transgenic Plant Research*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1998: 241–262.
- [4] Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *Cri Rev Biochem Mol Biol*, 1987, 22(2): 111–180. DOI
- [5] 杜金芳, 曾勇庆, 陈伟, 崔景香, 陈其美, 杨伦, 胡艳霞. 猪 Cu/ZnSOD 基因的克隆、表达及功能分析. *遗传*, 2010,

- 32(10): 1037–1042. [DOI](#)
- [6] Song FN, Yang CP, Liu XM, Li GB. Effect of salt stress on activity of superoxide dismutase (SOD) in *Ulmus pumila* L. *J Forestry Res*, 2006, 17(1): 13–16. [DOI](#)
- [7] 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诱导的交叉适应中的作用. *植物生理学通讯*, 2005, 41(4): 429–432. [DOI](#)
- [8] 冯昌军, 罗新义, 沙伟, 王凤国. 低温胁迫对苜蓿品种幼苗SOD、POD活性和脯氨酸含量的影响. *草业科学*, 2005, 22(6): 29–32. [DOI](#)
- [9] Ronald E, Joseph A, John G. Cloning of cDNA for maize superoxide dismutase2 (SOD2). *Proc Nat Acad Sci USA*, 1987, 84(1): 179–183. [DOI](#)
- [10] Bowler C, Alliotte T, De Loose M, van Montagu M, Inzé D. The induction of manganese superoxide dismutase in response to stress in *Nicotiana plumbaginifolia*. *EMBO J*, 1989, 8(1): 31–38. [DOI](#)
- [11] Cannon RE, Scandalios JG. Two cDNAs encode two nearly identical Cu/Zn superoxide dismutase proteins in maize. *Mol Gen Genet*, 1989, 219(1): 1–8. [DOI](#)
- [12] Kaminaka H, Morita S, Yokoi H, Masumura T, Tanaka K. Molecular cloning and characterization of a cDNA for plastidic copper/zinc-superoxide dismutase in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol*, 1997, 38(1): 65–69. [DOI](#)
- [13] Perl-Treves R, Nacmias B, Aviv D, Zeelon EP, Galun E. Isolation of two cDNA clones from tomato containing two different superoxide dismutase sequences. *Plant Mol Biol*, 1988, 11(5): 609–623. [DOI](#)
- [14] Sakamoto A, Ohsuga H, Tanaka K. Nucleotide sequences of two cDNA clones encoding different Cu/Zn-superoxide dismutases expressed in developing rice seed (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol*, 1992, 19(2): 323–327. [DOI](#)
- [15] Bueno P, Piqueras A, Kurepa J, Saviouré A, Verbruggen N, van Montagu M, Inzé D. Expression of antioxidant enzymes in response to abscisic acid and high osmoticum in tobacco BY-2 cell cultures. *Plant Sci*, 1998, 138(1): 27–34. [DOI](#)
- [16] Hernández-Nistal J, Dopico B, Labrador E. Cold and salt stress regulates the expression and activity of a chickpea cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase. *Plant Sci*, 2002, 163(3): 507–514. [DOI](#)
- [17] McKersie BD, Chen Y, De Beus M, Bowley SR, Bowler C, Inze D, D'Halluin K, Botterman J. Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol*, 1993, 103(4): 1155–1163. [DOI](#)
- [18] McKersie BD, Murnaghan J, Jones KS, Bowley SR. Iron-superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance. *Plant Physiol*, 2000, 122(4): 1427–1438. [DOI](#)
- [19] van Camp W, Capiou K, van Montagu M, Inze D, Slooten L. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiol*, 1996, 112(4): 1703–1714. [DOI](#)
- [20] Dorofejuk MT, Dorofejuk VF, Addrusewitsch VT. Cultivation of eastern goat's rue (*Galega orientalis* Lam) as a perennial fodder plant on turf-podzol soils in the Republic of Belarus. *M Archives of Agron Soil Sci*, 1999, 44(2): 131–148. [DOI](#)
- [21] 刘法涛, 杨志忠. 优良豆科牧草——东方山羊豆. *草业家畜*, 2000, (2): 42. [DOI](#)
- [22] 张自和, 于应文. 东方山羊豆在俄罗斯的研究和应用. *草业科学*, 2006, 23(1): 26–33. [DOI](#)
- [23] 沈禹颖, 张自和, 谢田玲. 优良豆科牧草——东方山羊豆的研究与利用. *草业学报*, 2003, 12(6): 105–109. [DOI](#)
- [24] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408. [DOI](#)
- [25] 崔武, 刘炜, 吴光耀. 高效、快速地将外源DNA导入根瘤土壤杆菌. *生物工程学报*, 1995, 11(4): 350–355. [DOI](#)
- [26] Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J*, 2003, 33(5): 949–956. [DOI](#)
- [27] Shin SY, Lee HS, Kwon SY, Kwon ST, Kwak SS. Molecular characterization of a cDNA encoding copper/zinc superoxide dismutase from cultured cells of *Manihot esculenta*. *Plant Physiol Biochem*, 2005, 43(1): 55–60. [DOI](#)
- [28] Kitagawa Y, Tsunasawa S, Tanaka N, Katsube Y, Sakiyama F, Adada K. Amino acid sequence of copper, zinc-superoxide dismutase from spinach leaves. *J Biochem*, 1986, 99(5): 1289–1298. [DOI](#)
- [29] Lee YM, Friedman DJ, Ayala FJ. Superoxide dismutase: an evolutionary puzzle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(3): 824–828. [DOI](#)
- [30] Hu GH, Yu SX, Fan SL, Song MZ. Cloning and expression of the chloroplast copper/zinc-superoxide dismutase gene in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *J Plant Physiol Mol Biol*, 2007, 33(3): 197–204. [DOI](#)
- [31] Lee HS, Kim KY, You SY, Kwon S, Kwak SS. Molecular characterization and expression of a cDNA encoding copper/zinc superoxide dismutase from cultured cells of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Mol Gen Genet*, 1999, 262(4–5): 807–814. [DOI](#)
- [32] Bian SM, Jiang YW. Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. *Sci Hortic*, 2009, 120(2): 264–270. [DOI](#)
- [33] Rubio MC, Bustos-Sanmamed P, Clemente MR, Becana M. Effects of salt stress on the expression of antioxidant genes and proteins in the model legume *Lotus japonicus*. *New Phytol*, 2009, 181(4): 851–859. [DOI](#)
- [34] Bueno P, Piqueras A, Kurepa J, Saviouré A, Verbruggen N,

van Montagu M, Inzé D. Expression of antioxidant enzymes in response to abscisic acid and high osmoticum in tobacco BY-2 cell cultures. *Plant Sci*, 1998, 138(1): 27-34.

[DOI](#)