

研究报告 Original Papers

西伯利亚蓼中 *PsMnSOD* 基因的克隆及其抗逆性检测付畅¹, 刘关君^{2,3}, 张恒¹, 杨传平^{2,3,*}¹哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 哈尔滨 150025; ²东北林业大学林学院²林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, ³林木遗传育种黑龙江省重点实验室, 哈尔滨 150040

提要: 采用 RACE 技术从西伯利亚蓼中克隆了锰超氧化物歧化酶基因 *PsMnSOD* 的 cDNA (GenBank 登录号 FJ848572)。长为 792 bp 的 *PsMnSOD* cDNA 序列含有编码 234 个氨基酸的 705 bp 的开放读码框、57 bp 的 5' 非翻译区和 30 bp 的 3' 非翻译区。构建了 *PsMnSOD* 基因的酵母表达载体 pYES2-*PsMnSOD* 并将其转化到野生型酵母菌株中。分析 *PsMnSOD* 基因在酵母中的表达对酵母 SOD 酶活性的影响及其对盐胁迫、PEG 胁迫、高温和低温胁迫下抗逆性影响的结果表明, *PsMnSOD* 基因在酵母中表达后酵母 SOD 酶活性提高, 酵母对盐渍、PEG、高温和低温等非生物胁迫的抗逆性也增强。

关键词: 西伯利亚蓼; 锰超氧化物歧化酶; 抗逆性

Cloning and Identification of Stress Resistance of Superoxide Dismutase Gene *PsMnSOD* from *Polygonum sibiricum* Laxm

FU Chang¹, LIU Guan-Jun^{2,3}, ZHANG Heng¹, YANG Chuan-Ping^{2,3,*}¹College of Life Sciences and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025, China; ²Key Laboratory of Ministry of Education for Forestry Tree Genetic Improvement and Biotechnology; ³Key Laboratory of Heilongjiang Province for Forestry Tree Genetic Improvement, School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: In this research, *PsMnSOD* cDNA (GenBank No. FJ848572) was isolated from *Polygonum sibiricum* by RACE technology. The nucleotide sequence of *PsMnSOD* cDNA is 792 bp containing an open reading frame of 705 bp encoding 234 amino acids, with a 5' untranslated region of 57 bp and a 3' untranslated region of 30 bp. The *PsMnSOD* gene yeast expression vector pYES2-*PsMnSOD* was constructed and transformed into wild yeast strain. The effects of *PsMnSOD* gene expression on superoxide dismutase activity and resistance to abiotic stress including salt, PEG, high temperature and low temperature of yeast were determined. The results indicated that expression of *PsMnSOD* gene in yeast improved superoxide dismutase activity and resistance ability to abiotic stress including salt, PEG, high temperature and low temperature.

Key words: *Polygonum sibiricum*; manganese superoxide dismutase; stress resistance

一般来说,植物抵御逆境胁迫的抗性与抗氧化酶的活性密切相关(Jithesh 等 2006)。在活性氧胁迫下,植物感受 ROS 信号后能够激活转录因子并使其结合到抗氧化酶基因启动子的抗氧化元件(antioxidant responsive element, ARE)上,介导抗氧化酶基因表达,于是清除活性氧的能力加强(Scandalios 2005)。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是抗氧化酶之一,能将 O_2^- 转化为 H_2O_2 ,再由过氧化物酶将 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 。超氧化物歧化酶可以分为 Cu/Zn SOD (以 Cu 和 Zn 为辅助因子,在植物中定位于细胞质和叶绿体中)、Mn SOD (以 Mn 为辅助因子,在植物中定位于线粒体和过氧化物酶体中)和 Fe SOD (以 Fe 为辅助因子,在植物中定

位于叶绿体中) 3 种类型(Jithesh 等 2006)。Mn SOD 在维持活性氧的平衡中起作用(Kim 等 2008)。迄今已从大豆、棉花、藏边大黄、荷花、葡萄、小麦、烟草、马蹄莲、拟南芥、小盐芥和白花柽柳等多种植物中分离到 *MnSOD* 基因的编码序列。植物转 *MnSOD* 基因后 Mn SOD 活性增强,抗

收稿 2009-12-13 修定 2010-05-05

资助 东北林业大学林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室开放课题、东北林业大学林木遗传育种黑龙江省重点实验室开放课题和黑龙江省青年科学技术专项资金项目(QC06C044)。

致谢 Stefan Hohmann 教授(Göteborg University, Sweden)馈赠酵母菌株 W303-1A。

* 通讯作者(E-mail: yangcp@nefu.edu.cn; Tel: 0451-82190006)。

盐渍、干旱、寒冷和氧化胁迫的能力提高(Bowler等1991; McKersie等1993; Van Camp等1994; Tanaka等1999; Kornyejev等2001; Wang等2004; 覃鹏等2004; 陈莉等2008)。此外, 作为盐生植物的西伯利亚蓼耐盐碱性很强, 可在盐碱地的碱斑中心生长, 是分离抗逆基因和研究植物抗逆机制的良好植物材料。本文从西伯利亚蓼中分离得到锰超氧化物歧化酶基因*PsMnSOD*, 将其转入酵母中表达后对其抗逆性进行了鉴定。

材料与方 法

以从黑龙江省肇东市以南2 km处的盐碱地碱斑处采取的西伯利亚蓼(*Polygonum sibiricum* Laxm)的地下茎为试材, 在温室中以草炭土为培养基质, 将地下茎切段后扦插, 以淡水栽培, 进行扩繁培养。当幼苗长至4~5片真叶时进行盐胁迫处理, 以3% NaHCO₃ 分别胁迫处理幼苗2 h、6 h、12 h、1 d、2 d和3 d后, 取质量相同的幼苗叶片并将其混合。后用液氮速冻并贮于-80℃下保存, 用于RACE扩增。

*PsMnSOD*基因编码区克隆时, 从经3% NaHCO₃ 处理的西伯利亚蓼叶片cDNA文库中筛选*MnSOD*基因的EST片段。根据此EST序列设计5' RACE引物MnSOD及巢式引物MnSOD N(表1)。以3% NaHCO₃ 处理过的西伯利亚蓼幼苗叶片为材料, 用

SDS法提取RNA并用DNA酶I去除基因组DNA。按照SmartTM RACE cDNA Amplification Kit说明书操作, 将RNA反转录成5' RACE cDNA。PCR反应条件为: 94℃预变性1 min; 94℃30 s, 58℃30 s, 72℃1 min, 36个循环; 72℃延伸5 min。用胶回收试剂盒(Promega产品)回收PCR产物后将其与pGEM-T载体(Promega)连接后再将连接产物转化TOP10感受态细胞, 经Amp抗性、蓝白斑反应和菌落PCR筛选到阳性克隆。送上海生物工程技术服务有限公司测序, 重组质粒命名为p*PsMnSOD*。

分析*PsMnSOD*的氨基酸序列, 采用ClustalX1.8软件进行序列比对, 用Mega4软件生成进化树。

构建*PsMnSOD*基因表达载体和转化酵母时, 根据*PsMnSOD*基因cDNA编码区的序列设计并合成一对引物SOD-F和SOD-R(表1), 以p*PsMnSOD* DNA作为模板, 扩增*PsMnSOD*基因编码区并将其亚克隆到pMD19-T Simple载体上, 阳性重组质粒命名为pT-*PsMnSOD*。用限制性内切酶*Bam*HI和*Eco*RI从pT-*PsMnSOD*质粒上切下*PsMnSOD*基因的编码区DNA片段, 将其插入到pYES2载体的*Bam*HI/*Eco*RI位点, 得到*PsMnSOD*基因的酵母表达载体pYES2-*PsMnSOD*(图1)。将pYES2-*PsMnSOD*和pYES2分别转化野生型酵母菌株W303-1A, 以SOD-F和SOD-R为引物经菌落PCR鉴定酵母阳性转化子W303-1A (YES2-*PsMnSOD*),

表1 基因克隆与表达载体构建所用引物序列

Table 1 The sequences of primers used in gene cloning and yeast expression vector constructing

名称	引物序列(5' → 3')	限制性内切酶切位点
MnSOD	AACCCATATTCGAGACTTTATTACC	
MnSOD N	TTGTAAATACGAGGGCGATGC	
GAL1-F	ATTTTCGGTTTGTATTACTTC	
GAL1-R	GTTCTTAATACTAACATAACT	
SOD-F	CGCGGATCCCGTTCCTCCACAAAAGGCTA	<i>Bam</i> HI
SOD-R	CCGGAATTCATTTGTAAATACGAGGGCG	<i>Eco</i> RI

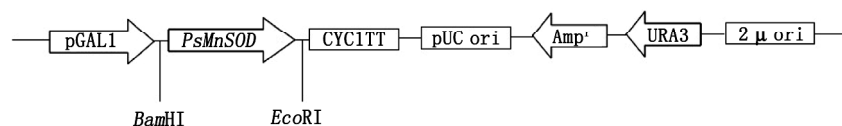


图1 *PsMnSOD*基因酵母表达载体pYES2-*PsMnSOD*的图谱

Fig.1 Map of *PsMnSOD* gene yeast expression vector of pYES2-*PsMnSOD*

以 pYES2 载体的引物 GAL1-F 和 GAL1-R 鉴定 W303-1A (pYES2)。

酵母菌预培养时, 将酵母菌株 W303-1A、W303-1A (pYES2) 和 W303-1A (pYES2-*PsMnSOD*) 分别涂平板活化。挑取单菌落接种至 5 mL SG-*ura* 液体培养基中, 30 °C 下以转速为 200 r·min⁻¹ 的摇床振荡培养 24 h, OD₆₀₀ 值达到 0.2~1.0。取含有 3×10⁵ 个细胞的培养液转接至 YPG 液体培养基中, 至总体积为 5 mL。30 °C 下振荡培养 12 h 得到预培养物, OD₆₀₀ 值介于 0.2~1.0。

按李合生(2000)书中方法检测胁迫下酵母菌 SOD 活性时, 取含有 1.2×10⁶ 个细胞的预培养物转入 20 mL YPG 培养基中。于 30 °C 下以 200 r·min⁻¹ 的转速用摇床培养 36 h。取 10 mL 菌液于离心管中, 以 13 400×g 离心 5 min 后收集菌体沉淀并用液氮研磨。按每克湿菌体 10 mL 的比例加入提取缓冲液(50 mmol·L⁻¹ 磷酸缓冲液, pH 7.8, 1% 聚乙烯吡咯烷酮), 在冰浴中研磨后于 4 °C 下以 10 000×g 离心 20 min, 取上清液即 SOD 粗酶液。以能抑制反应 50% 的酶量为 1 个 SOD 酶活单位, 用 U 表示。SOD 活性=(A₀-A_s)/(0.5A₀·V₁·酶蛋白含量), 式中 SOD 活性为 1 个酶活单位·毫克⁻¹ (U·mg⁻¹), A₀ 为对照管的光吸收值, A_s 为样品管的光吸收值, V₁ 为测定的粗酶液用量(mL), 酶蛋白含量单位为 mg·mL⁻¹。

分析转化 *PsMnSOD* 基因的酵母菌的抗逆性时, 取含有 1.2×10⁶ 个细胞的预培养物转接至 YPG 液体培养基中, 至总体积为 20 mL。按以下条件处理: (1) NaCl 胁迫: YPG 液体培养液中的 NaCl 浓度分别为 0.4 和 0.6 mol·L⁻¹, 于 30 °C 下振荡培养。(2) PEG 胁迫: YPG 液体培养液中的 PEG6000 的浓度分别为 0.2 和 0.3 g·mL⁻¹, 于 30 °C 下振荡培养。(3) 高温胁迫: 将 YPG 液体培养液分别置于 30 °C (对照)、40 °C 和 50 °C 下振荡培养。按上述条件培养 24 h 后, 测定 OD₆₀₀ 值, 比较酵母菌株的生长量。(4) 低温胁迫: 取含有 1.2×10⁶ 个细胞的预培养物转接至 YPG 液体培养基中, 至总体积为 5 mL, 于 30 °C 下培养 12 h 后获得预培养物(OD₆₀₀ 值介于 0.2~1.0), 将其稀释至 OD₆₀₀=0.5 后取 10 μL 稀释的预培养物, 向其中加入 0.1 mL 无菌水, 在 4 °C 条件下培养酵母菌 24 h, 在 YPG 固体平板上划线培养, 将平板置于 30 °C 下培养 48 h 后记录并比较试验结果。

结果与讨论

1 *PsMnSOD* 基因 cDNA 及编码区的克隆

根据西伯利亚藜文库中获得的 *PsMnSOD* 基因的 EST 序列, 采用 5' RACE 引物 MnSOD 及 MnSOD N 扩增得到 800 bp 左右的 *PsMnSOD* 基因的 5' 端序列 cDNA 片段。测序后得到 792 bp 的 cDNA 序列 (GenBank 登录号 FJ848572)。采用 NCBI 的 ORF Finder 软件从获得的序列中查找 ORF, *PsMnSOD* 基因的开放读码框为 705 bp, 编码 234 个氨基酸, 5' 非翻译区为 57 bp, 3' 非翻译区为 30 bp。以西伯利亚藜 *PsMnSOD* cDNA 为模板, 利用引入 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切位点的 *PsMnSOD* 基因特异性引物 (SOD-F 和 SOD-R) 对 *PsMnSOD* 的开放读码框进行 PCR 扩增, 克隆后经测序分析证实该扩增片段与预期的 *PsMnSOD* 基因开放读码框一致。

2 *PsMnSOD* 基因的生物信息学分析

BlastX 分析表明, *PsMnSOD* 基因编码的氨基酸序列与 Mn 超氧化物歧化酶匹配最佳。经过 ProtParam 计算蛋白质的分子量为 26.1 kDa、理论等电点值为 7.13。采用 NCBI 的 BlastP 在蛋白质保守区数据库 (conserved domain database, CDD) 分析表明, *PsMnSOD* 与 Sod_Fe_C、Sod_Fe_N 以及 SodA 匹配。从第 30 个氨基酸至第 227 个氨基酸共 198 个氨基酸与 SodA 匹配最佳, 该区域与超氧自由基转变为过氧化氢及分子氧、无机离子的运输及代谢相关。在 Genbank 蛋白质数据库中选取大豆 (*Glycine max*, ABQ52658)、棉花 (*Gossypium hirsutum*, ABA00455)、藏边大黄 (*Rheum australe*, ABI35908)、荷花 (*Nelumbo nucifera*, ABA10483)、葡萄 (*Vitis vinifera*, ABX79342)、小麦 (*Triticum aestivum*, AAX68501)、烟草 (*Nicotiana glauca*, P11796)、马蹄莲 (*Zantedeschia aethiopica*, AAC63379)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, AAC24832)、小盐芥 (*Thellungiella halophila*, ABL75952) 和白花柽柳 (*Tamarix androssowii*, AAS77885) 等植物的 MnSOD 氨基酸序列与西伯利亚藜 *PsMnSOD* 进行序列比对 (图 2)。*PsMnSOD* 与藏边大黄锰超氧化物歧化酶匹配最佳, 一致性为 88%。*PsMnSOD* 与大豆、棉花、荷花、葡萄、小麦、烟草、马蹄莲、拟南芥、小盐芥和白花柽柳等植物 MnSOD 的一致性分别为 72%、75%、

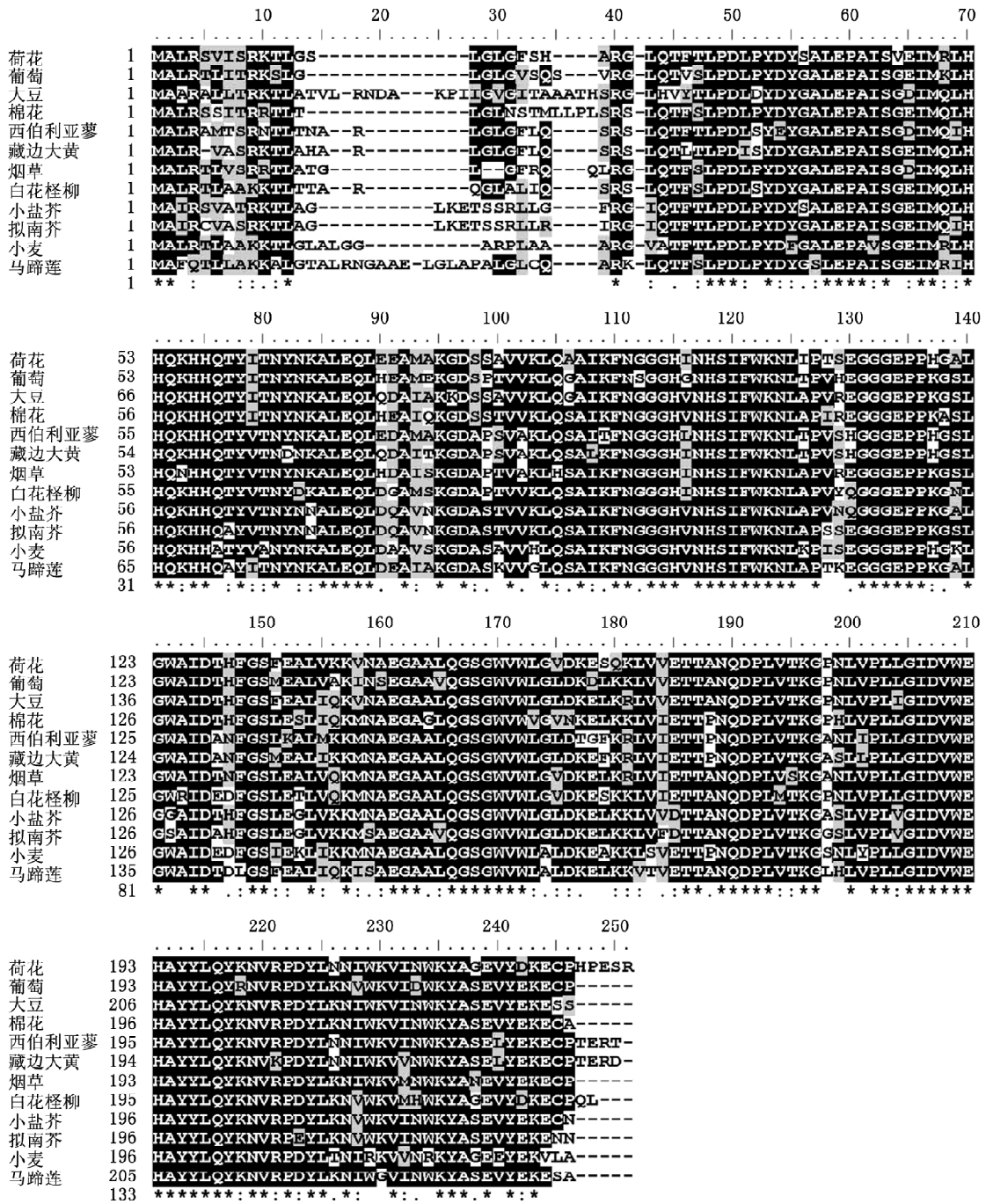


图2 西伯利亚蓼和其它11种植物MnSOD的氨基酸序列比对

Fig.2 Alignments of MnSOD amino acid sequences between *P. sibiricum* and other 11 plants

* 代表保守的氨基酸。

77%、75%、72%、80%、69%、74%、75%和77%。不同植物来源的MnSOD的多序列比对结果表明, MnSOD C端的保守性很高, 但N端的保守性很低。N端13~39氨基酸位置上的序列差

异最大, 可能与信号肽的剪切位点有关。在相似性比较结果的基础上构建MnSOD基因的系统发育树(图3), 在比较的物种中, PsMnSOD与藏边大黄MnSOD的亲缘关系最近。

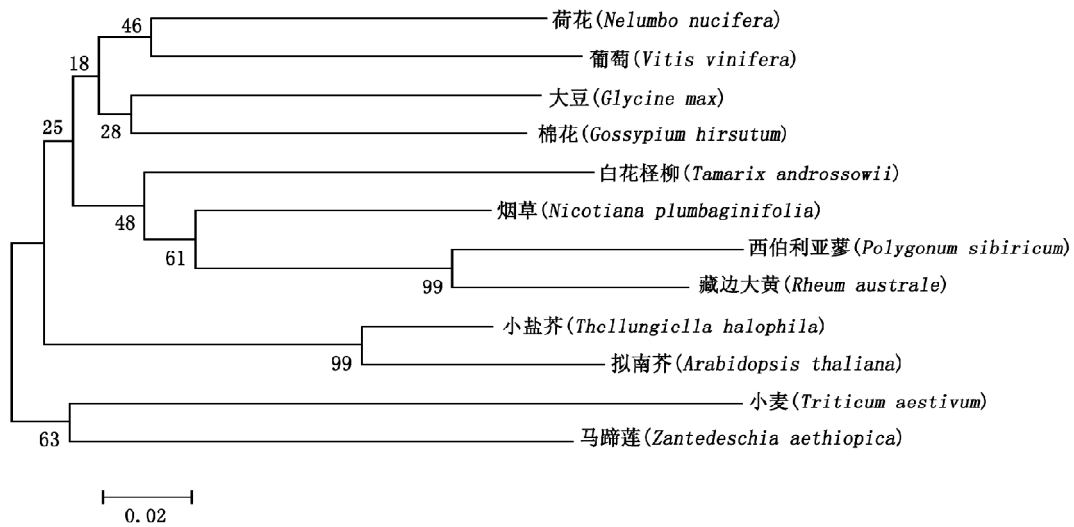
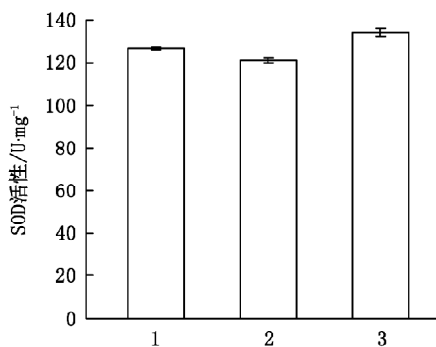


图3 植物 MnSOD 氨基酸序列的分子进化树

Fig.3 Molecular phylogenetic tree of the amino acid sequences of plant MnSOD

3 *PsMnSOD* 基因在酵母中的表达对酵母 SOD 活性的影响

以转化 pYES2 空载体的酵母菌株 W303-1A (pYES2) 和野生型酵母菌株 W303-1A 为对照测定 YPG 诱导培养的酵母菌株 W303-1A (pYES2-*PsMnSOD*) 的 SOD 活性的结果显示, 在非胁迫条件下, *PsMnSOD* 基因转化菌株的 SOD 活性高于转化空载体的酵母菌株和野生型酵母菌株(图 4)。

图4 *PsMnSOD* 基因在酵母菌中的表达对酵母菌 SOD 活性的影响Fig.4 Effect of expression of *PsMnSOD* gene on SOD activity in yeast strains

1: 野生型酵母菌株; 2: 转空载体菌株; 3: *PsMnSOD* 转化菌株。

4 转入 *PsMnSOD* 基因后的酵母菌的抗逆性分析

对 *PsMnSOD* 转化菌株进行抗逆性分析的结果

表明, (1)在非胁迫条件下于 30 °C 生长时, 野生型酵母菌株和转空载体菌株的生长量极为接近, 而 *PsMnSOD* 转化菌株的生长量比野生型菌株(或转空载体菌株)高 6% (图 5-C)。(2)在 NaCl 胁迫条件下, 野生型酵母菌株、转空载体菌株和 *PsMnSOD* 转化菌株的生长均受到抑制, 野生型菌株和转空载体菌株的生长量极为接近, 而 *PsMnSOD* 转化菌株在 0.4 和 0.6 mol·L⁻¹ NaCl 胁迫下的生长量比对照分别高 11% 和 17% (图 5-A)。表明 *PsMnSOD* 转化菌株抗 NaCl 胁迫的能力高于野生型菌株和转空载体菌株。(3)在 PEG 胁迫条件下野生型酵母菌株和转空载体菌株的生长量极为接近, 两者均受强烈地抑制, 而 *PsMnSOD* 转化菌株在 0.2 和 0.3 g·mL⁻¹ PEG 胁迫下的生长量比对照分别高 26% 和 12% (图 5-B)。表明 *PsMnSOD* 基因在酵母中表达后酵母菌对 PEG 的抗性提高。(4)在高温胁迫条件下, 野生型酵母菌株、转空载体菌株和 *PsMnSOD* 转化菌株的生长均受到抑制。在 40 °C 和 50 °C 胁迫下, 野生型菌株和转空载体菌株的生长量极为接近, 而 *PsMnSOD* 转化菌株的生长量比对照分别高 26% 和 19% (图 5-C), 表明 *PsMnSOD* 转化菌株抗高温胁迫的能力高于野生型酵母菌株和转空载体菌株。(5)在 4 °C 低温胁迫条件下, 野生型酵母菌株和转空载体菌株的生长明显受抑制, 而 *PsMnSOD* 转化菌株仍可长出较多菌落(图 5-D), 显示 *PsMnSOD* 基因在酵母中表达后酵母菌株的抗寒性明显提高。

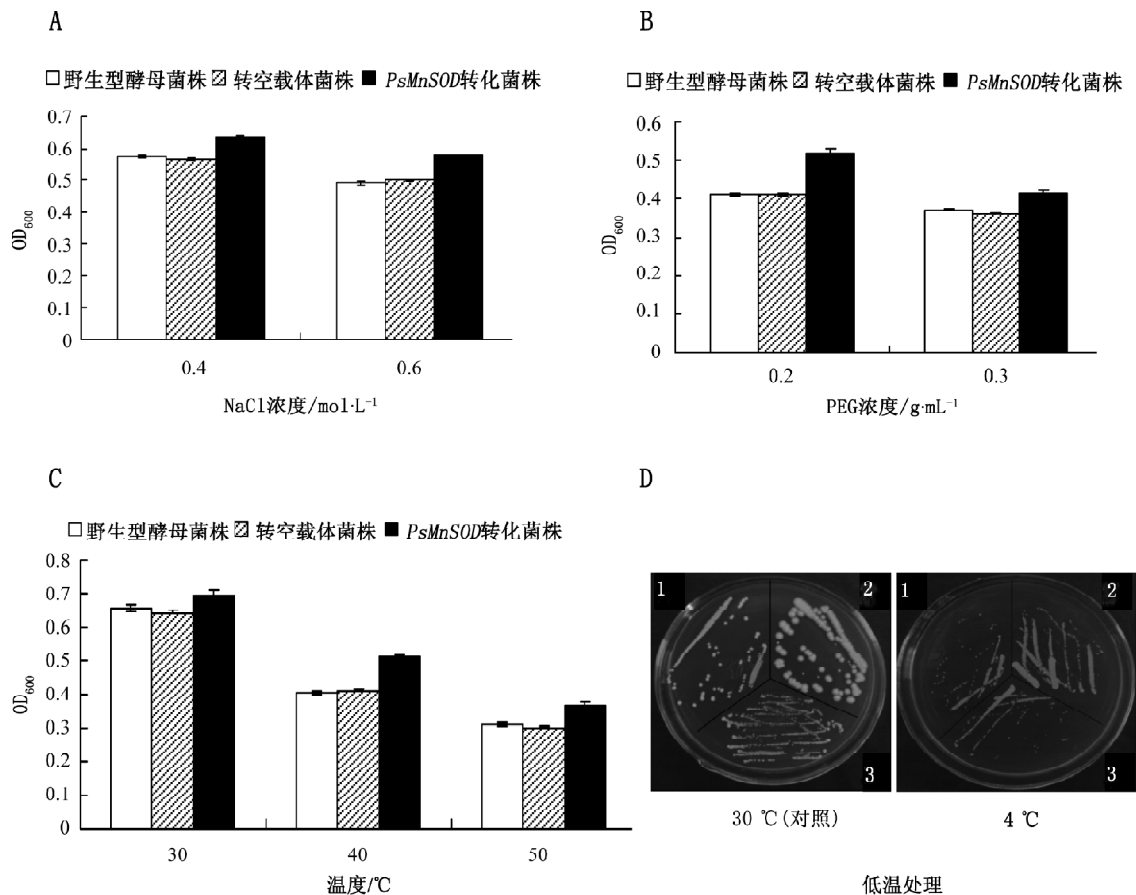


图5 不同胁迫条件下野生型酵母菌株、*PsMnSOD* 转化菌株和转空载体菌株的生长

Fig.5 Growth of W303-1A, W303-1A (pYES2-*PsMnSOD*) and W303-1A (pYES2) under various stressed conditions

A: NaCl胁迫; B: PEG胁迫; C: 高温胁迫; D: 低温胁迫; 1: 野生型酵母菌株; 2: *PsMnSOD* 转化菌株; 3: 转空载体菌株。OD₆₀₀ 值用平均数 ± s (n=3)表示。

参考文献

- 陈莉, 周连霞, 马锋旺, 梁东, 华智锐(2008). 转 *MnSOD* 基因仙客来植株的获得及其对高温胁迫的抗性. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 36 (3): 155~160
- 李合生(2000). 植物生理生化实验原理和技术(第1版). 北京: 高等教育出版社, 167~169
- 覃鹏, 孔治有, 刘叶菊, 刘飞虎(2004). 水分胁迫对烟草转 *SOD* 基因品系光合特性的影响. 江苏农业学报, 20 (2): 91~94
- Bowler C, Slooten L, Vandenbranden S, De Rycke R, Botterman J, Sybesma C, Van Montagu M, Inzé D (1991). Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J*, 10 (7): 1723~1732
- Jithesh MN, Prashanth SR, Sivaprakash KR, Parida AK (2006). Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress defence. *J Genet*, 85 (3): 237~254
- Kim SG, Kim ST, Kang SY, Wang YM, Kim W, Kang KY (2008). Proteomic analysis of reactive oxygen species (ROS)-related proteins in rice roots. *Plant Cell Rep*, 27 (2): 363~375
- Kornyejev D, Logan BA, Payton P, Allen RD, Holaday AS (2001). Enhanced photochemical light utilization and decreased chill-

- ing-induced photoinhibition of photosystem II in cotton overexpressing genes encoding chloroplast-targeted antioxidant enzymes. *Physiol Plant*, 113 (3): 323~331
- McKersie BD, Chen Y, de Beus M, Bowley SR, Bowler C, Inzé D, D'Halluin K, Botterman J (1993). Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol*, 103 (4): 1155~1163
- Scandalios JG (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*, 38 (7): 995~1014
- Tanaka Y, Hibino T, Hayashi Y, Tanaka A, Kishitani S, Takabe T, Yokota S, Takabe T (1999). Salt tolerance of transgenic rice overexpressing yeast mitochondrial Mn-SOD in chloroplasts. *Plant Sci*, 148 (2): 131~138
- Van Camp W, Willekens H, Bowler C, Van Montagu M, Inzé D, Reupold-Popp P, Sandermann H Jr, Langebartels C (1994). Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage. *Nat Biotechnol*, 12: 165~168
- Wang YH, Ying Y, Chen J, Wang XC (2004). Transgenic *Arabidopsis* overexpressing Mn-SOD enhanced salt-tolerance. *Plant Sci*, 167 (4): 671~677