

芥菜锰超氧化物歧化酶基因*BjMnSOD1*的克隆和分析

朱磊¹, 韩苹¹, 张鹤², 孙守如¹, 李严曼^{1,*}

¹河南农业大学园艺学院, 郑州450002; ²郑州市蔬菜研究所十字花科研究课题组, 郑州450002

摘要: 本文通过RACE的方法克隆获得了芥菜超氧化物歧化酶基因序列, 命名为*BjMnSOD1*。该基因全长1 003 bp, 包括696 bp的开放阅读框, 编码231个氨基酸。预测蛋白分子量25.4 kDa, 等电点为8.38。氨基酸序列比对分析表明, *BjMnSOD1*同甘蓝、油菜和白菜的同源性分别为96%、97%和97%。同时具有典型的锰超氧化物歧化酶结构特征。系统进化分析表明*BjMnSOD1*和十字花科植物在进化上亲缘关系较近。半定量和荧光定量PCR结果表明, *BjMnSOD1*可以响应各种胁迫和激素处理。其中盐处理后的动态分析发现, *BjMnSOD1*转录水平的变化和总SOD酶活性变化趋势基本一致。这些结果表明, *BjMnSOD1*属于超氧化物歧化酶基因家族成员中的MnSOD, 并可能在芥菜响应逆境胁迫的过程中起了重要作用。

关键词: *BjMnSOD1*; 芥菜; 基因克隆; 基因表达; 酶活性; 胁迫

活性氧(reactive oxygen species, ROS)包括 O_2^- 、 H_2O_2 、 1O_2 和 $\cdot OH$ 等, 作为植物细胞代谢的副产物, 其合成和清除在正常生长条件下趋于动态平衡(Alscher等2002)。植物一旦遭受胁迫, 这种平衡会被打破, ROS过度积累会造成膜的损伤、蛋白质氧化和DNA断裂等(Apel和Hirt 2004; An和Choi 2010)。为了应对ROS的破坏作用, 植物自身也形成了一套复杂的抗氧化体系, 其中包括抗坏血酸和谷胱甘肽等非酶类代谢物以及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, ASA-POD)和过氧化物酶(peroxidase, POD)等抗氧化酶(Du等2013; 马婷等2016)。超氧化物歧化酶是植物体内活性氧清除系统中第1个发挥作用的抗氧化酶, 它可以将细胞内生成的 O_2^- 转化为 H_2O_2 和 O_2 , H_2O_2 再被其他过氧化物酶转化为 H_2O (McCord和Fridovich 1969)。因此SOD是抵御植物细胞伤害最有效的抗氧化酶, 被认为是植物控制氧化胁迫伤害最必不可少的酶(Alscher等2002; 汪本勤等2007)。

植物超氧化物歧化酶基因以家族形式存在。根据酶活性中心的辅基部位结合金属离子的不同可以分为Fe-SOD (位于叶绿体), Mn-SOD (位于线粒体和过氧化物酶体), Cu/Zn-SOD (位于叶绿体, 细胞质和细胞外间隙)等三种同工酶(Bannister等1987; Pilon等2011)。至今很多物种的锰超氧化物歧化酶基因已经被报道并认为它与植物的抗逆性关系密切(Huseynova等2014; Feng等2015; 徐龙等2016)。大叶藻中的锰超氧化物歧化酶ZmMn-SOD可以减轻高温对大叶藻造成的氧化胁迫伤害, 进而影响

其对全球温室效应的适应能力(Liu等2016); 小盐芥中的*ThMSD*在拟南芥中过量表达可以提高转基因拟南芥的耐盐性(Xu等2014)。

芥菜属于十字花科植物, 是一个非常重要的经济作物, 芥菜的生产过程中常会受到各种各样环境因子的影响。虽然编码锰超氧化物歧化酶的*MnSOD*基因已经从许多物种陆续克隆出来, 但是关于芥菜*MnSOD*基因尚未有全面的报道。本文我们对编码芥菜锰超氧化物歧化酶的*BjMnSOD1*基因进行了全长的克隆和生物信息学分析, 并对该基因在各种胁迫和激素处理后的表达特征进行了分析, 旨在为研究其抗性机理和今后的转基因工作打下基础。

材料与方法

1 实验材料与处理

以芥菜(*Brassica juncea* var. *foliosa* Bailey) 9号种质为试材, 选取饱满一致的种子播于装有育苗基质的营养钵内。于河南农业大学园艺学院三区试验基地育苗。在幼苗长到三叶一心时期, 选取大小一致、健壮的植株, 移至光照培养箱内分别进行不同处理。信号分子诱导采用幼苗全株喷洒处理, 具体浓度如下: $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA、 $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 和 $0.1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BR溶液, 其中低温胁迫采用 10°C 处理24 h, 以清水常温处理为

收稿 2016-12-12 修定 2017-02-27

资助 国家自然科学基金(31301768)和河南省高等学校重点科研项目(16A210031)。

* 通讯作者(E-mail: liyanman2004@163.com)。

对照。盐胁迫下SOD的动态变化采用水培处理,选择长势良好的幼苗移至40 cm×30 cm×12 cm的盒子中进行水培,以Hoagland's (霍格兰氏)营养液培养的幼苗为对照,以含有150 mmol·L⁻¹ NaCl浓度的营养液处理幼苗,并在0、6、12、24、30、36、42和48 h分别取样用于定量和酶活性分析。所有处理取样均采取第2片叶子,放置于-80°C的液氮保存,用于RNA的提取。每个处理均重复3次。

2 RNA提取和cDNA合成

芥菜总RNA的提取采用RNAiso Plus Total RNA提取试剂(TaKaRa, 中国大连), 荧光定量PCR所用cDNA的反转录采用PrimeScriptTM RT reagent

Kit with gDNA Eraser试剂盒(TaKaRa, 中国大连)。用于基因克隆和半定量PCR的cDNA采用2 μg RNA, 以M-MLV反转录酶(Promega, 美国)和Oligo(dT)₁₈引物按照操作说明进行合成。

3 BjMnSOD1基因的克隆与序列分析

依据NCBI已经发布的相近物种的Mn-SOD基因序列, 设计简并引物SOD-F和SOD-R (表1)进行保守片段的扩增。得到的PCR产物回收纯化处理后, 连接到pMD18-T载体(TaKaRa, 中国大连)上, 转化到大肠杆菌感受态细胞DH5α中(TaKaRa, 中国大连), 在涂有IPTG/X-gal的含Amp的LB平板上筛选后, 随机挑取白色阳性克隆送华大公司测序。

表1 用于基因克隆和定量PCR的引物序列

Table 1 Primers used in gene clone and quantitative RT-PCR

引物名称	引物序列(5'→3')	引物名称	引物序列(5'→3')
SOD-F	CTGGAGCCGGCGAT(CT)AGCGG	SOD-R	TCACTTGCATT(CA)(TC)TCT
3'F1	AGGATGGGTGTGGCTCGGTTTAGA	3'F2	ATTGATGTTGGGAGCAGCAGCTAC
B25	GACTCTAGACGACATCGA	B26	GACTCTAGACGACATCGA(T)17
5'R1	TCCACCACCTTCCTTGACAG	5'R2	CTTCTTCACCAAACTTCAA
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	AAPG	GGCCACGCGTCGACTAGTAC(G)16
BjMnSOD1-F	ATCATCTATTCAACAATGG	BjMnSOD1-R	CTCTTGTAAGATGAGTCAAT
BjMnSOD1-F1	GGTCTCCGATCAATCCAG	BjMnSOD1-R1	AGAGCAGCACCTTCAGCA
Action-F	TGCTATCCAGGCTGTTCT	Action-R	TCTTTGCTCATACGGTCA
BjMnSOD1-F2	CGAGGCTTCTTGGTCTCCGA	BjMnSOD1-R2	ACGTACGCCTGGTGATGCTT
25S-F	CGGTTCTCTCGTACTAGGTTGA	25S-R	CCGTCGTGAGACAGGTTAGTTTT

根据中间片段测序结果, 设计3' RACE引物3'F1和3'F2 (表1), 以芥菜cDNA为模板, 然后同通用引物B26和B25 (表1)进行巢式PCR反应, 扩增直接获得基因的3'端。根据中间片段测序结果, 设计5'端特异引物5'R1和5'R2 (表1)。5' RACE所用cDNA需要用TdT试剂盒进行5'端加尾反应, 在cDNA的5'端加polyC。然后以加尾后的cDNA为模板, 以5'端特异引物分别同AAPG、AUAP通用引物(表1)进行两轮巢式PCR反应, 获得基因的5'端。利用DNAMAN6.0将上述所获得的片段进行拼接, 获得该基因的全长, 并根据全长序列设计特异引物BjMnSOD1-F和BjMnSOD1-R (表1)进行全序列的扩增验证。

序列同源性比对由NCBI的BLAST程序进行(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>); 蛋白质一级结

构(等电点、分子量)的预测由ExPASy完成(http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html); 氨基酸序列的多重比对和进化树分析采用Clustalx2.0和MEGA6.0软件; 开放阅读框架预测由NCBI的ORFfinder程序进行(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)。

4 BjMnSOD1表达模式分析

根据已经获得的芥菜BjMnSOD1的cDNA序列设计特异引物BjMnSOD1-F1和BjMnSOD1-R1 (表1), 以Action基因为内参(Genbank登录号: AF-111812)设计引物Action-F和Action-R (表1)。采用半定量RT-PCR对BjMnSOD1基因在不同处理下的表达情况进行研究, RT-PCR反应程序如下: 94°C, 3 min; 94°C, 30 s, 55°C, 30 s, 72°C, 20 s, 28个循环; 72°C, 5 min。PCR重复3次。

根据已经获得的芥菜BjMnSOD1的cDNA序列

设计特异引物*BjMnSOD1*-F2和*BjMnSOD1*-R2 (表1), 以芥菜25S核糖体RNA基因为内参(Genbank登录号: AF128094)设计引物25S-F和25S-R (表1)。采用Applied Biosystems StepOne and StepOnePlus Real-Time PCR Systems (ABI, 美国)进行荧光定量PCR (qRT-PCR)反应, 并使用SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 荧光染料试剂盒(TaKaRa, 中国大连), 在20 μL反应体系中包含SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 10 μL, 正反引物各0.5 μL, ddH₂O 8 μL, cDNA模板(大约为5~15 ng) 1 μL。PCR反应条件: 95°C变性10 s; 95°C变性10 s, 60°C退火45 s, 40个循环。处理设3次生物学重复和3次机械重复, 数据分析得到各个样品的C_T值, 实验结果采用2^{-ΔΔC_T}的方法进行计算(Livak和Schmittgen 2000)。

5 SOD酶活性测定

SOD活性的测定参考Madamanchi等(1994)的方法。称取芥菜叶片0.5 g于预冷的研钵中, 加入5 mL 0.05 mol·L⁻¹预冷的磷酸缓冲溶液(pH 7.8), 在冰浴下研磨成浆, 以10 000×g离心10 min, 取上清液, 加入氮蓝四唑(NBT)反应介质, 在560 nm波长下测定消光值。以抑制NBT光还原50%为1个酶活单位, 以U·g⁻¹ (FW)表示。SOD的总活性=2×(Ack-AE)×VT/(Ack×W×Vs)。其中Ack为照光对照管的吸光度, AE为样品管的吸光度, VT为样品液总体积(mL), Vs为测定时样品液用量(mL), W为样品鲜重(g)。

实验结果

1 芥菜*BjMnSOD1*基因的克隆

以芥菜9号材料叶片的cDNA为模版, 根据NCBI上已知的其他物种的锰超氧化物歧化酶基因序列设计引物, 进行RT-PCR扩增, 得到570 bp的中间片段。根据获得的中间片段分别设计3'和5' RACE引物, 分别扩增获得基因的3'和5'端基因片段。对获得的3个基因片段进行拼接, 最终获得1 003 bp的基因序列(图1)。根据得到的cDNA序列, 设计两端引物, 扩增基因的开放阅读框, 验证获得的开放阅读框序列长度为696 bp, 编码231个氨基酸。其编码蛋白预测分子量为25.4 kDa, 等电点为8.38。

将该cDNA序列在NCBI网站中进行同源性BLAST比对, 发现其编码蛋白与其他物种锰超氧化物歧化酶MnSOD1氨基酸序列具有较高的同源性, 同甘蓝、油菜和白菜的同源性分别为96%、97%、97%, 因此我们将其命名为*BjMnSOD1*, 其全长开放阅读框序列已登录到NCBI, 登录号为HQ-404362。

2 芥菜*BjMnSOD1*基因的生物信息学分析

将不同植物MnSOD氨基酸序列进行比对分析(图2), 发现不同物种的MnSOD氨基酸序列相对比较保守, 尤其是在C末端区域, 不同植物MnSOD氨基酸N端起始的27~30个氨基酸序列保守性比较

```
CTCTCGCAGTAGATCTATCATCTATTCAACAATGGCGATTCTGTTGTAGCCAGCAGAAGAACCCTAACCGGCCT
AAAGGAGACATCTTCGAGGCTTCTTGGTCTCCGATCAATCCAGACCTTCACGCTTCTCTGATCTCCCCTATGACTAC
AGCGCGCTGGAGCCGGCGATCAGCGCGGAGATCATGCAGATCCATCACCAGAAGCATCACCAGGCGTACGTCAC
TAATTACAACAATGCCCTCGAGCAGCTCGATCAGGCCGTCACAAGGGAGACGCTCCGCCGTCGTTAAGTTGCA
GAGCGCCATCAAGTTCAACGGCGGAGGTCATGTGAACCACTCTATTTCTGGAAGAACCTTGCTCCTGTCAAGGA
AGGTGGTGGAGAGCCACCAAGGGAGCCCTTGGTGGAGCTATTGATACTCACTTTGGCTCCCTTGAAGGTTTGGT
GAAGAAGACGAGTGCTGAAGGTGCTGCTGCAAGGTTTCAGGATGGGTGGCTCGGTTTAGACAAAAGACTTA
AGAAGCTTGTGGTTGACACAACAGCCAATCAGGATCCACTTGTGACGAAAGGAGGAAGCTTGGTTCTCTGGTG
GGTATTGATGTTTGGGAGCAGCCTACTACTTGCAGTACAAGAATGTGAGGCCGATTATCTGAAGAACGTGTGG
AAAGTTATCAACTGGAAATACGCTAGCGAAGTTTATGAGAGTGAATGCAAGTGAAGTTTCGTTACAGGATAACAAC
ATAAAGGGGGGACACAGTTCGCGCTCGGCTTTGTTTTATAAGGTTGTCTGAAACAACTTTACGATGTATCTC
TTTTGTCTTGGAGTTGGCTCAATGACTATGTTGCAACAATACACGTTGTTTTCCAAAATGGAGTTTGTCAAGTGA
AGTTTGATACTTGAATTGACTCATCTTACAAGAGTTTATTTCTCTACAAAAAAGAAAAAATTCGAT
GTCGTCTAGAGTCAAAAAAAGAAAAA
```

图1 芥菜*BjMnSOD1*基因的cDNA序列

Fig.1 The nucleotide sequence of *BjMnSOD1* cDNA

粗体阴影表示起始密码子ATG和终止密码子TGA。



图2 芥菜和其他植物MnSOD的氨基酸序列比对

Fig. 2 Alignment of the deduced MnSOD amino acid sequences from mustard and other plants

各物种同源蛋白如下: 芜菁BrMnSOD1 (*Brassica rapa*, XP_009122529); 芥菜BjMnSOD1 (*Brassica juncea*, HQ404362); 芥蓝CsMnSOD1 (*Camelina sativa*, XP_010464784); 拟南芥AtMnSOD (*Arabidopsis thaliana*, NP_187703); 马铃薯StMnSOD (*Solanum tuberosum*, XP_006358755); 番茄SiMnSOD (*Solanum lycopersicum*, XP_004240868); 葡萄VvMnSOD1 (*Vitis vinifera*, XP_010658132)。相同的氨基酸残基用黑色阴影显示, 保守位点用灰色阴影显示。典型的Mn-SOD特征序列用实线方框表示。锰离子结合残基用“■”标注。方框内起始的27~30个氨基酸残基代表预测的线粒体信号肽序列。SOD_Fe_N结构域(Thr³⁰~Ala¹¹¹)和SOD_Fe_C结构域(Pro¹²¹~Val²²⁵)分别用实线和虚线下划线表示。

差, 序列分析发现, 这可能是一段线粒体信号肽序列。不同植物的锰超氧化物歧化酶氨基酸序列中存在几个保守的结构域, 包括典型的Mn-SOD特征序列(DVWEHAYY)和4个保守Mn离子结合位点(His55、His100、Asp192和His196), 1个保守的SOD_Fe_N结构域(Thr³⁰~Ala¹¹¹)和1个保守SOD_Fe_C结构域(Pro¹²¹~Val²²⁵)。

用MEGA6.0软件将芥菜*BjMnSOD1*基因推导的氨基酸序列与其他物种16个具有完整编码区的锰超氧化物歧化酶氨基酸序列进行比对分析, 绘制出进化树(图3)。进化树分析显示, 这些氨基酸序列聚为两大类, 芥菜BjMnSOD1蛋白与同为十字花科的芜菁BrMnSOD1、油菜BnMnSOD1、甘蓝BoMnSOD1、萝卜RsMnSOD1、拟南芥At-MnSOD1、芥蓝CsMnSOD1的氨基酸序列聚为一类。而在这一大类中, 芸薹属的芥菜、芜菁、油菜、甘蓝以及萝卜属的萝卜构成一个亚族, 而拟南芥属的拟南芥和亚麻芥属的芥蓝构成另一亚族。可见锰超氧化物歧化酶在进化关系上具有一定的种属特性。

3 芥菜*BjMnSOD1*基因的表达分析

通过RT-PCR检测*BjMnSOD1*基因的表达发现, 低温和盐胁迫均可以不同程度的诱导*BjMnSOD1*基因的上调表达, 同时, 其还可以响应SA、BR和H₂O₂等信号分子(图4)。这些结果表明: *BjMnSOD1*基因可能参与了多种信号分子的调控途径, 同时作为逆境响应基因参与调控植物的抗逆性。

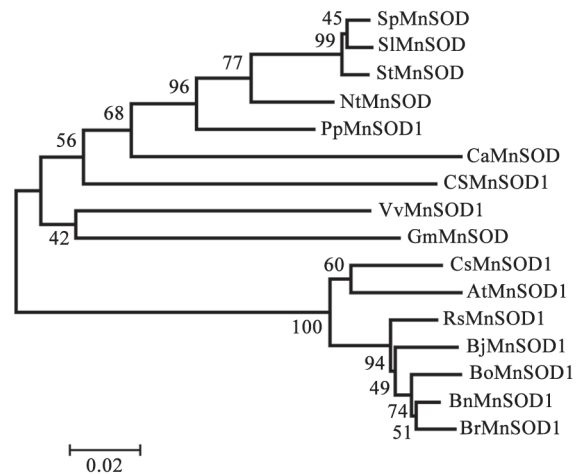
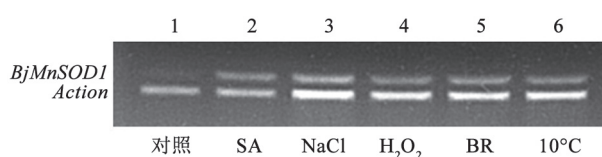


图3 16个植物物种MnSOD蛋白的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the deduced amino acid sequences of MnSOD from 16 species

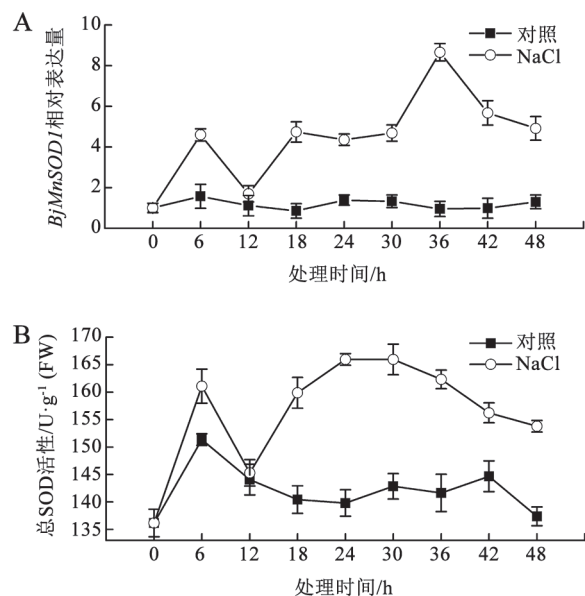
各物种同源蛋白如下: 芜菁BrMnSOD1 (*Brassica rapa*, XP_009122529); 芥菜BjMnSOD1 (*Brassica juncea*, HQ404362); 油菜BnMnSOD1 (*Brassica napus*, NP_001302584); 甘蓝BoMnSOD1 (*Brassica oleracea*, XP_013617540); 萝卜RsMnSOD1 (*Raphanus sativus*, XP_018433955); 芥蓝CsMnSOD1 (*Camelina sativa*, XP_010464784); 拟南芥AtMnSOD1 (*Arabidopsis thaliana*, NP_187703); 葡萄VvMnSOD1 (*Vitis vinifera*, XP_010658132); 大豆GmMnSOD (*Glycine max*, NP_001235066); 碧桃PpMnSOD1 (*Prunus persica*, CAB56851); 辣椒CaMnSOD (*Capsicum annuum*, NP_001311927); 马铃薯StMnSOD (*Solanum tuberosum*, XP_006358755); 番茄SiMnSOD (*Solanum lycopersicum*, XP_004240868); 烟草NtMnSOD (*Nicotiana glauca*, XP_009594521); 番茄SpMnSOD (*Solanum pennellii*, XP_015079488)和野茶树CSMnSOD1 (*Camellia sinensis*, AJW60327)。

图4 *BjMnSOD1*在不同处理下的表达分析Fig.4 Effects of various treatments on the expressions of *BjMnSOD1*

SA: 1 mmol·L⁻¹ SA溶液处理; NaCl: 150 mmol·L⁻¹ NaCl溶液处理; H₂O₂: 5 mmol·L⁻¹ H₂O₂溶液处理; BR: 0.1 μmol·L⁻¹ BR溶液处理。

4 盐胁迫条件下芥菜*BjMnSOD1*基因的表达和总SOD酶活性变化

为了进一步的了解*BjMnSOD1*对逆境的响应情况,我们分析了*BjMnSOD1*在盐胁迫0、6、12、18、24、30、36、42和48 h后的芥菜叶片中的表达情况(图5-A)。*BjMnSOD1*的表达在整个48 h的对照处理过程中几乎没有显著的变化。而在盐胁迫处理的植株中,盐胁迫可以迅速诱导*BjMnSOD1*的表达,除了在12 h *BjMnSOD1*突然下降到接近对照植株的表达水平外,在整个处理过程一直显著高于对照,并在36 h达到高峰,为对照组表达的8.7倍,之后表达量有所下降。总SOD酶活性变化(图

图5 盐胁迫条件下芥菜*BjMnSOD1*基因的表达和总SOD酶活性变化Fig.5 The transcript levels of *BjMnSOD1* and the total superoxide dismutase (SOD) activities in leaves of *Brassica juncea* growing under 150 mmol·L⁻¹ NaCl or control conditions

5-B)和*BjMnSOD1*基因表达的变化基本趋于一致,同样是呈现双峰的变化趋势,SOD酶活性在30 h达到高峰,之后开始下降,除了12 h突然下降到接近对照的水平外,其活性在整个处理过程也是显著的高于对照。

讨 论

本研究中,我们第一次分离到了芥菜中的*BjMnSOD1*基因序列。超氧化物歧化酶(SOD)在植物的生命活动过程中发挥着非常重要的作用。然而,不同细胞器内的SOD所发挥的作用也有所不同。植物线粒体中具有非常保守的Mn-SOD,其在植物线粒体中扮演非常重要的作用(Huseynova等2014)。通过结构预测,我们可以推断*BjMnSOD1*属于线粒体Mn-SOD家族中的一员。原因有以下几点: SOD蛋白质序列在不同的物种中具有相对较高的保守性,尤其是在重要的功能位点上表现的十分一致,*BjMnSOD1*具有典型的MnSOD特征结构,前人的研究也具有相似的结论(Xu等2014; Liu等2016);进化树分析发现,*BjMnSOD1*与十字花科MnSOD氨基酸序列聚为一类;*BjMnSOD1*的氨基酸序列具有定位于线粒体的信号肽。若要确切的了解*BjMnSOD1*在细胞中的位置,可以通过亚细胞定位等技术来完成。

线粒体和叶绿体ROS的产生是对逆境的积极响应,而SOD是植物抗氧化系统第一条防御线(Alscher等2002;汪本勤等2007)。而作为线粒体中一个重要的抗氧化酶,Mn-SOD活性的提高可以减轻线粒体中的氧化胁迫伤害(Polle 2001)。我们的研究发现,*BjMnSOD1*除了响应逆境胁迫外,还可以响应不同信号分子,如SA和BR;前人的研究也发现ABA、NaCl和干旱胁迫均可以诱导MnSOD的表达(Kwon和An 2003; Xu等2014; Liu等2016)。这表明*BjMnSOD1*不但可以参与或介导植物的抗逆性,而且有可能受到多种信号分子的调控(Wang等2005, 2010)。

本研究中,在盐胁迫处理下*BjMnSOD1*基因的表达量逐渐增大,在6 h达到第一个小高峰,表明在胁迫前期*BjMnSOD1*基因就已经被诱导启动,从而提高植物对各种逆境胁迫的抗性。*BjMnSOD1*基因表达在36 h达到最大值,之后随着胁迫时间的延

长出现降低,可能是因为随着盐胁迫的加深使叶片细胞结构逐渐受到不可逆转的伤害,植物的抗氧化能力下降。前人的研究也发现,轻度的温度胁迫会提高ZmMnSOD的活性,但是当温度胁迫达到一定极端时,ZmMnSOD的转录水平和酶活性均会下降(Liu等2016)。

总SOD酶活性变化和*BjMnSOD1*基因表达的变化基本趋于一致。这表明*BjMnSOD1*参与了芥菜对盐胁迫的适应性。本研究中初步明确了*BjMnSOD1*基因在芥菜胁迫的响应机制中的作用,为今后进一步揭示芥菜逆境响应分子机制奠定了重要基础。

参考文献

- Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot*, 53 (372): 1331–1341
- An MI, Choi CY (2010). Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, *Scapharca broughtonii*, exposed to thermal and osmotic stress: effects on hemolymph and biochemical parameters. *Comp Biochem Phys B*, 155 (1): 34–42
- Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55: 373–399
- Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G (1987). Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *Crit Rev Biochem Mol*, 22 (2): 111–180
- Du HM, Zhou P, Huang BR (2013). Antioxidant enzymatic activities and gene expression associated with heat tolerance in a cool-season perennial grass species. *Environ Exp Bot*, 87 (2): 159–166
- Feng X, Lai ZX, Lin YL, Lai GT, Lian CL (2015). Genome-wide identification and characterization of the superoxide dismutase gene family in *Musa acuminata* cv. Tianbaojiao (AAA group). *BMC Genomics*, 16: 823
- Huseynova IM, Aliyeva DR, Aliyev JA (2014). Subcellular localization and responses of superoxide dismutase isoforms in local wheat varieties subjected to continuous soil drought. *Plant Physiol Bioch*, 81: 54–60
- Kwon SI, An CS (2003). Cloning and expression of mitochondrial *MnSOD* from the small radish (*Raphanus sativus* L.). *Mol Cells*, 16 (2): 194–200
- Liu J, Tang XX, Wang Y, Zang Y, Zhou B (2016). A *Zostera marina* manganese superoxide dismutase gene involved in the responses to temperature stress. *Gene*, 575 (2): 718–724
- Livak KJ, Schmittgen TD (2000). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25 (4): 402–408
- Madamanchi NR, Donahue JL, Cramer CL, Alscher RG, Pederson K (1994). Differential response of Cu, Zn superoxide dismutases in two pea cultivars during a short-term exposure to sulfur dioxide. *Plant Mol Biol*, 26 (1): 95–103
- Ma T, Teng YJ, Li CX, Yang YL (2016). Changes of ROS metabolizing enzyme activities in *Limonium aureum* seedlings under salinity stress. *Plant Physiol J*, 52 (2): 177–186 (in Chinese with English abstract) [马婷, 滕玉瑾, 李翠祥, 杨颖丽(2016). 盐胁迫下黄花补血草幼苗ROS代谢酶活性的变化. 植物生理学报, 52 (2): 177–186]
- McCord JM, Fridovich I (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem*, 244 (22): 6049–6055
- Pilon M, Ravet K, Tapken W (2011). The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta*, 1807 (8): 989–998
- Polle A (2001). Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol*, 126 (1): 445–462
- Wang BQ, Chen X, Xiang CB (2007). *Arabidopsis* late-flowering mutants with elevated SOD activities show enhanced tolerance to abiotic stresses. *Chin Bull Bot*, 24 (5): 572–580 (in Chinese with English abstract) [汪本勤, 陈曦, 向成斌(2007). SOD活性增高的拟南芥晚花突变体具有增强的非生物胁迫耐受性. 植物学报, 24 (5): 572–580]
- Wang FZ, Wang QB, Kwon SY, Kwak SS, Su WA (2005). Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *J Plant Physiol*, 162 (4): 465–472
- Wang YC, Qu GZ, Li HY, Wu YJ, Wang C, Liu GF, Yang CP (2010). Enhanced salt tolerance of transgenic poplar plants expressing a manganese superoxide dismutase from *Tamarix androssowii*. *Mol Biol Rep*, 37 (2): 1119–1124
- Xu L, Chen HY, Jiang MM, Liu Y (2016). Cloning and expression analysis of *MnSOD* from *Solanum melongena*. *Plant Physiol J*, 52 (10): 1537–1545 (in Chinese with English abstract) [徐龙, 陈火英, 蒋明敏, 刘杨(2016). 茄子MnSOD基因的克隆及表达分析. 植物生理学报, 52 (10): 1537–1545]
- Xu XJ, Zhou YJ, Ren DT, Bu HH, Feng JC, Wang GY (2014). Cloning and characterization of gene encoding a Mn-containing superoxide dismutase in *Eutrema halophilum*. *Biol Plant*, 58 (1): 105–113

Cloning and analysis of superoxide dismutase gene *BjMnSOD1* from *Brassica juncea*

ZHU Lei¹, HAN Ping¹, ZHANG He², SUN Shou-Ru¹, LI Yan-Man^{1*}

¹College of Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; ²Cruciferae Research Group, Zhengzhou Vegetables Research Institute, Zhengzhou 450002, China

Abstract: In this paper, a full-length cDNA designated as *BjMnSOD1* was isolated from *Brassica juncea* by rapid amplification of cDNA ends (RACE). The full-length cDNA contained a 696 bp open reading frame (ORF), which encoded a protein of 231 amino acids residues with molecular mass of 25.4 kDa and pI value of 8.38. The protein sequence homology comparison showed that the *BjMnSOD1* protein shared 96%, 97% and 97% similarity with the MnSOD1 of *Brassica oleracea*, *Brassica napus*, and *Brassica rapa*, respectively. Analysis of the deduced amino acid revealed conserved features belonging to the MnSOD. Phylogenetic tree analysis indicated that *BjMnSOD1* was closer to the MnSODs from plants in the family of *Brassicaceae* than those from other plants. Semi-quantitative RT-PCR expression analyses and quantitative real-time PCR analysis showed that the transcript of *BjMnSOD1* could be markedly induced by various stress and hormone treatments. The change of total enzymatic activities of SOD seemed to be consistent with the transcriptional levels of *BjMnSOD1* after salt stress treatment. All these results indicated that *BjMnSOD1* belonged to the plant MnSOD family and might play important roles in the response of *Brassica juncea* to stresses.

Key words: *BjMnSOD1*; *Brassica juncea*; gene cloning; gene expression; enzymatic activity; stress

Received 2016-12-12 Accepted 2017-02-27

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31301768) and Key Scientific Research Projects in Colleges and Universities of Henan (Grant No. 16A210031).

*Corresponding author (E-mail: liyanman2004@163.com).