

水稻细胞质铜锌超氧化物歧化酶基因的 序列和表达分析

王 峰^{1,2}, 王宏斌¹, 王金发^{1*}

(1. 中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室、基因工程教育部重点实验室, 生命科学学院, 广州 510275;

2. 暨南大学药学院基因组药物研究所, 广州 510632)

摘要:以水稻(*Oryza sativa*)品种 Cpslo17 幼穗为材料, 通过 RT-PCR 克隆了长度为 698 bp 的编码水稻细胞质铜锌超氧化物歧化酶基因(*OsCu/Zn-SOD*)。序列分析表明其覆盖基因完整编码框, 编码由 152 个氨基酸组成的蛋白, 它与玉米(*Zea mays*) *Cu/Zn-SOD* 基因序列的相似率为 88%。TargetP 和 ChloroP 预测编码蛋白 N 端无信号肽序列, 且此编码区段有 8 个外显子和 7 个内含子。利用 Swiss-Model 站点预测 *OsCu/Zn-SOD* 三维结构, 并分析其铜锌离子结合位点的结构。RT-PCR 结果表明 *OsCu/Zn-SOD* 在水稻不同品种均有表达, 但表达量存在差异, *OsCu/Zn-SOD* 在 Cpslo17 的分裂旺盛的幼嫩组织如幼穗、开花期花序和未成熟种子中表达量较高, 而在叶片中表达量相对较低, 在愈伤组织中表达微弱。

关键词:水稻; 铜锌超氧化物歧化酶; 序列分析; 基因组结构; RT-PCR

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2007)02-0101-06

Sequence and Expression Analysis of Cytoplasmic Copper/zinc Superoxide Dismutase Gene in Rice

WANG Feng^{1,2}, WANG Hong-bin¹, WANG Jin-fa^{1*}

(1. The State Key Laboratory of Biocontrol and the Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education, School of Life Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China; 2. Institute of Genomic Medicine, College of Pharmacy,

Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The 698 bp cytoplasmic copper/zinc-superoxide dismutase gene (*OsCu/Zn-SOD*) was cloned by RT-PCR from young panicles of rice Cpslo17, a wide-compatible rice cultivar (*Oryza sativa*). DNA sequence analysis indicated that the gene consisted of a full-open reading frame and encoded a protein of 152 amino acid residues. The nucleotide sequence of *OsCu/Zn-SOD* shares 88% identity to maize *Cu/Zn-SOD*. No signal peptide was predicted by TargetP and ChloroP. Further analysis of encoding segment of *OsCu/Zn-SOD* revealed that it contained 8 exons and 7 introns. The putative three-dimensional structure of *OsCu/Zn-SOD* was predicted by the Swiss-Model server and Cu^{2+} and Zn^{2+} binding sites of *OsCu/Zn-SOD* were analyzed. RT-PCR results showed differential expression of *OsCu/Zn-SOD* in leaves of both *japonica* and *indica* rice. *OsCu/Zn-SOD* was expressed highly in panicles during young ear and the flowering stages or in immature seeds, however less in leaves and faintly in callus.

Key words: Rice; Sequence analysis; Genomic structure; RT-PCR

收稿日期: 2006-08-18 接受日期: 2006-12-08

基金项目: 科技部植物转基因重大专项资助项目 (J00-A-009), 国家自然科学基金项目 (30370809) 资助

* 通讯作者 Corresponding author

生物在整个生长发育过程中受到各种不良环境的影响,这些非生物和生物胁迫均能导致细胞产生大量的活性氧。另外细胞正常的代谢过程,如酶促反应、电子传递过程及小分子自身氧化等,也能产生活性氧。活性氧具有较高的化学活性,可改变膜的结构和通透性,使许多细胞内成分失去生物活性和功能,它们还可使染色体降解、断裂,对生物细胞具有一定的毒性^[1]。超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD; E.C.1.15.1.1) 是 1 种重要的金属抗氧化酶,它广泛存在于生物体中,能够催化超氧阴离子自由基歧化为过氧化氢与氧气,专一清除体内活性氧,平衡机体氧自由基。根据辅基部位结合的不同金属离子可将 SOD 分为 4 类: 锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD), 铁超氧化物歧化酶(Fe-SOD), 铜锌超氧化物歧化酶(Cu/Zn-SOD)和镍超氧化物歧化酶(Ni-SOD)^[2-3]。在植物中,Cu/Zn-SOD 是 4 种超氧化物歧化酶中含量最丰富的一类。Cu/Zn-SOD 主要位于植物细胞质和叶绿体中,其中叶绿体 Cu/Zn-SOD 由核基因编码,在细胞质中合成后由信号肽引导进入叶绿体内。Cu/Zn-SOD 含有铜离子和锌离子 2 个金属辅基,金属辅基的解离和构象的改变对于 SOD 活性至关重要。Cu/Zn-SOD 在植物抗氧化逆境中发挥着重要作用,它与植物的抗逆性和抗衰老有密切关系,有研究表明在植物中过量表达 Cu/Zn-SOD 能提高植物的抗盐、抗旱、抗寒等抗逆性能^[4-5]。随着国民经济的发展,生态环境的恶化,一些不良环境因子越来越严重地危害着农业生产,提高作物对不良环境的抗性顺应时代的需求。近年来,水稻基因组序列的完成使分析基因的结构成为可能,本实验采用分子生物学方法,从水稻中分离与抗逆性相关的 *OsCu/Zn-SOD* 基因,并对其基因组结构、编码蛋白序列及三维结构、金属辅基结合位点、表达模式进行分析,从而了解 *OsCu/Zn-SOD* 的作用分子机制,并为开展植物抗逆基因工程研究奠定基础。

1 材料和方法

材料 所用水稻(*Oryza sativa*)品种包括广亲和品种 Cpslo17, 粳稻 2 个品种: 中花 11 和丰锦; 籼稻 4 个品种: 粤航、珍紧占、广超丝苗、丰丝占。各品种叶片取自 16 h d⁻¹ 光照、光照强度为 60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的 28℃ 下培养的幼苗, 穗和种子取自田间正常生长的

水稻植株, 水稻愈伤组织诱导和继代培养均在含有 2 mg L⁻¹ 2,4-D 的 N₆B₅ 培养基上进行。取材后迅速投入液氮并保存于 -70℃。克隆载体 pBluescript SK+ 及大肠杆菌菌株 DH5 α 为本室保存。

主要试剂 Concert Plant RNA Reagent 购自 Invitrogen 公司; ReverTra Ace 反转录酶和 RNase Inhibitor 为 Toyobo 公司生产; Oligo(dT)、胶回收试剂盒、焦碳酸二乙酯(DEPC)、Taq DNA 聚合酶购自北京鼎国公司; *pfu* 高保真 DNA 聚合酶购自斯威生公司; 限制性内切酶、DNA Marker、dNTP、T₄ DNA 连接酶等购自 Takara 公司; PCR 引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

总 RNA 的提取 按照 Invitrogen 公司 Concert Plant RNA Reagent 的说明书进行。

第一链 cDNA 合成及 PCR 扩增 参考粳稻日本晴 (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) 铜锌超氧化物歧化酶基因序列^[6] 自主设计引物 P1: 5'CTCCTCCTTCATCCTCCTCGTCGTC3', P2: 5'CATAGTTCATTGGGCGCCAACGATG3'。自主设计看家基因 *actin gene* 引物为 P3: 5'AGAGCTACGAGCTTCCTGATGGAC 3' 和 P4: 5'GAGAGATGCCAAGATGGATCCTCC 3'。取 1 μg 水稻幼穗总 RNA, 第一链 cDNA 合成体系为 20 μl : 2 μg 总 RNA, 1 μl 5 pmol/L Oligo (dT), 4 μl 5 \times Buffer, 2 μl 10 mmol/L dNTP, 100 U ReverTra Ace, 20 U RNase inhibitor。反转录前先将总 RNA 和 Oligo(dT) 于 70℃ 预热 2 min 去除 RNA 的高级结构, 冰上放置 2 min 后于 42℃ 反转录 1 h, 取单链 cDNA 产物按照文献方法进行 RT-PCR 反应^[7]。设定 PCR 扩增程序为: 94℃ 5 min 预变性, 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1.5 min 扩增 30 个循环, 72℃ 延伸 5 min。取 5 μl 产物于 0.8% 琼脂糖凝胶中电泳检测。

PCR 产物的克隆及测序 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳回收后与 pBluescript/*EcoR* V 载体以平末端方式连接, 用氯化钙法将连接产物转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。通过蓝白斑筛选白色单菌落, 按照文献进行菌液 PCR 初步鉴定和酶切鉴定^[7]。将有插入片断的 3 个独立的阳性克隆送交上海博亚公司进行测序。

序列的电子拼接及序列分析 用 BLASTN 程序搜索 GenBank 水稻 EST 数据库, 将同源的 EST 片断拼接得到水稻铜锌超氧化物歧化酶基因的未

端序列。在 TIGR 网站上运行 BLASTN 后寻找与之高度同源的水稻细菌人工染色体 (Bacterial artificial chromosome, BAC) 克隆, 记录 cDNA 与基因组 BAC 克隆的匹配情况, 分析该基因的基因组结构。用 DNASIS(2.5) 软件分析核苷酸及其推导的氨基酸序列。ExPASy PROSITE 网站预测蛋白质的分子量和等电点等性质; N 末端氨基酸信号肽的预测用 TargetP V1.0^[8] 和 ChloroP^[9] 进行; Clustal X (1.81) 和 GeneDoc 用来对蛋白序列进行多重序列联配分析。

三维结构预测 通过 Internet 将 OsCu/Zn-SOD 氨基酸序列传送到 Swiss-Model^[10] 站点, 获得 OsCu/Zn-SOD 的三维空间结构, 用 3D Molecular viewer 软件分析其三维构象及铜锌离子结合部位结构。

2 结果和分析

2.1 OsCu/Zn-SOD 基因的扩增和克隆

以水稻品种 Cpslo17 的叶片 RNA 为模板合成第 1 链 cDNA, 以此单链 cDNA 为模板, 用 *pfu* 高保真酶以 *OsCu/Zn-SOD* 基因特异引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增 (图 1), 得到大小为 700 bp 左右的特异扩增片段, 割胶回收后克隆至 pBluescript/*EcoR* V 载体, 挑取白色菌落, 酶切鉴定后测序。

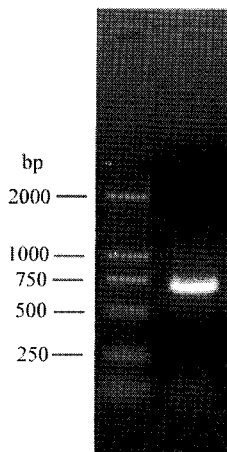


图 1 水稻 *Cu/Zn-SOD* 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *OsCu/Zn-SOD* gene in rice

2.2 OsCu/Zn-SOD 基因序列分析

将所得序列提交 GenBank (序列号为 DQ058108), 并进行同源性比较, 发现它与 Sakamoto 等报道的序列^[6]除 1 个碱基不同外其它都一致, 这

个碱基改变不影响编码氨基酸的改变。此外它和玉米 (*Zea mize*) 的 *Cu/Zn-SOD* 基因相似程度最高, 为 88%, 和菠萝 (*Ananas comosus*) 及泡桐 (*Paulownia kawakamii*) 的 *Cu/Zn-SOD* 基因的 cDNA 相似性分别为 83% 和 82%。此片段覆盖了 *Cu/Zn-SOD* 的开放读码框 (open reading frame, ORF)。得到的 cDNA 起始密码周边序列符合 Kozak 规则, 终止密码下游 107 bp 处有 AATAA 的加尾信号。经过 EST 延伸和电子拼接, 将所得序列向 5' 和 3' 端分别延伸了 46 bp 和 100 bp, 终止密码下游 283 bp 处出现 PolyA 尾巴。考虑到水稻已经有粳稻、籼稻两个亚种的基因组序列公布, 比较了两个亚种间 *OsCu/Zn-SOD* 基因组区段的区别, 发现其两个亚种的 *OsCu/Zn-SOD* 基因组序列除了在第 1 个内含子有几个碱基不一致, 其它序列都一致。进一步分析得知它位于水稻第 3 条染色体上编号为 AC135257 的 BAC 克隆上, 跨越基因组 3.1 kb, 它有 8 个外显子和 7 个内含子 (图 2), 所有外显子和内含子的连接区交接区都符合 “GT-AG” 规则 (表 1)。内含子平均长度为 324.7 bp, 外显子平均长度为 105.5 bp, 内含子平均 GC 百分含量为 40.64%, 外显子平均 GC 百分含量为 51.41%。*OsCu/Zn-SOD* 的内含子富含 U 碱基^[11]和在决定内含子边界中起重要作用的富含 AU 序列的顺式元件^[12]。



图 2 水稻 *Cu/Zn-SOD* 的基因组结构

Fig. 2 Genomic structure of *Cu/Zn-SOD* gene in rice

空心框表示不翻译外显子, 实心框表示编码外显子。Open and full boxes denote untranslated exons and coding exons, respectively.

2.3 OsCu/Zn-SOD 蛋白序列及结构分析

OsCu/Zn-SOD 基因编码 1 个由 152 个氨基酸组成, 等电点为 5.72, 分子量为 15.3 kDa 的 *OsCu/Zn-SOD* 蛋白。对 *OsCu/Zn-SOD* 的氨基酸组成进行分析 (表 2) 得知其富含甘氨酸 (Gly), 且 Gly 平均分布于整个序列中, Gly 的存在对于蛋白质肽链的折叠和形成发夹结构有关, *OsCu/Zn-SOD* 的 Gly 的数目和位置与其它物种的 *Cu/Zn-SOD* 基本一致, 这提示不同物种的 *Cu/Zn-SOD* 在肽链的折叠卷曲即在空间结构上具有同源性。*OsCu/Zn-SOD* 不

含色氨酸,只含 1 个酪氨酸。色氨酸和酪氨酸含量低是 Cu/Zn-SOD 的显著特点,因此这类蛋白具有独特的紫外吸收光谱,在 280 nm 处没有最大吸收峰^[2], Vector NTII Suite 9.0 软件预测 1 mg ml⁻¹ 的 OsCu/Zn-SOD 在 280 nm 下的理论吸收值仅为 0.1。肽链中还有 10 个组氨酸 (His) 和 2 个半胱氨酸 (Cys),它们分别对结合金属离子和形成二硫键至关重要。TargetP V1.0 和 ChloroP 预测结果一致显示 OsCu/Zn-SOD 无信号肽序列,提示该蛋白定位于细胞质中。

蛋白序列对比分析 (图 3) 显示不同来源的 Cu/Zn-SOD 之间表现出高度的序列同源性和明显的进化保守性。OsCu/Zn-SOD 与玉米、凤梨 (*Ananas comosus*)、菠菜 (*Spinacia oleracea*) 等的 Cu/Zn-SOD 有高度同源性,包含保守的铜离子结合位点 (His-45, His-47, His-62 和 His-119) 及保守的锌离子结合位点 (His-62, His-70, His-79 和 Asp-82)^[13]。将 OsCu/Zn-SOD 序列提交给 Swiss-Model, 预测的

OsCu/Zn-SOD 三维结构如图 4A 所示,用 3D Molecular viewer 软件显示其铜锌离子结合位点的结构如图 4B 所示。

2.4 *OsCu/Zn-SOD* 的表达模式分析

Sakamoto^[6]在 1992 年克隆了 *OsCu/Zn-SOD*^[6],但没有分析它的基因组结构,表达模式及在品种间的差异。本研究利用 RT-PCR 检测 *OsCu/Zn-SOD* 的表达情况,结果如图 5 所示,*OsCu/Zn-SOD* 基因扩增产物大小为 698 bp,同时扩增的 *actin* 基因产物大小为 335 bp,*OsCu/Zn-SOD* 在各不同品种的叶片中都有表达,在广亲和品种 Cpslo17 和粳稻品种丰锦中表达量较低,表达量存在品种差异,这可能预示着品种抗逆程度的不同。*OsCu/Zn-SOD* 在 Cpslo17 的各个不同器官中均有表达,但在分裂旺盛的器官如幼穗、开花期花序和未成熟种子中表达量较高,在光合作用器官叶片中表达量相对较低,在愈伤组织中表达微弱。

表 1 水稻铜锌超氧化物歧化酶基因外显子和内含子交接区核苷酸序列分析
Table 1 Nucleotide sequence analysis of exon-intron junctions of *OsCu/Zn-SOD* gene

外显子 Exon	GC含量 GC content (%)	长度 Length	剪接供体位点 Splice donor site	内含子 Intron	GC含量 GC content (%)	T含量 T content (%)	长度 Length	剪接受体位点 Splice acceptor site
1	63.33	90	GTCGCCTGAGgtaggaatcc	1	46.34	34.22	1081	ttgtttacagATCACATTAA
2	44.31	88	GAGGGAGATGgtatgccatc	2	34.77	42.39	92	tgattcttagGTCCCACCAC
3	51.95	102	ATGTCAACTGgtaattatta	3	33.05	40.32	124	ataatgtagGGCCACACTA
4	55.2	96	GGAGAAGATGgttgttctt	4	29.91	46.85	254	ctgctgtagGTGTGCTAA
5	40.62	32	TGACAGTCAGtaagtaaac	5	35.12	39.18	148	tctgtgtagATTCCACTTA
6	47.36	76	CTTGGAAGGgtaattattac	6	37.74	37.74	461	gctcttttagGTGGGCACGA
7	64.8	54	GTTGCTTGCgtaagttcag	7	42.46	32.74	113	tttactcagGGATCATCGG
8	48.36	306	GCTCGTTFCGTCCGTA					

内含子用小写字母表示,外显子用大写字母表示。Intron and exon sequences are shown in small and capital letters, respectively.

表 2 *OsCu/Zn-SOD* 氨基酸组成分析
Table 2 Component analysis of amino acid sequence of *OsCu/Zn-SOD*

氨基酸 Amino acid	数目 Number	出现频率 Frequency (%)	所占重量比(%) % by weight
疏水氨基酸 Hydrophobic	47	30.92	30.86
带电氨基酸 Charged	38	25.00	31.18
极性氨基酸 Polar	32	21.05	21.84
酸性氨基酸 Acidic	16	10.53	12.40
碱性氨基酸 Basic	9	5.92	7.79
甘氨酸 (G)	28	18.42	11.70
缬氨酸 (V)	16	10.53	10.43
苏氨酸 (T)	12	7.89	7.95
丙氨酸 (A)	11	7.24	5.45
组氨酸 (H)	10	6.58	8.63

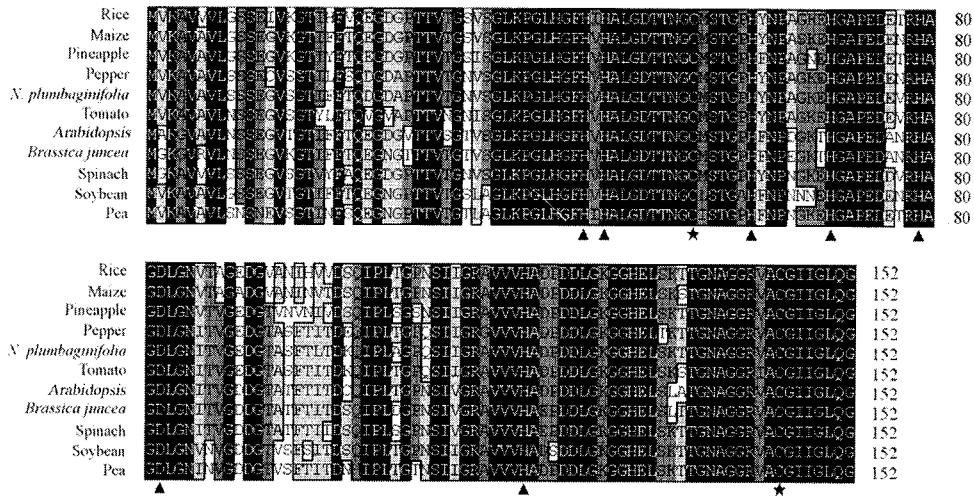


图 3 Cu/Zn-SOD 氨基酸序列对比

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of the Cu/Zn-SODs

黑色描影表示相同的氨基酸, 深灰色描影表示一致性在 75% 以上, 浅灰色描影表示一致性在 50% 以上。▲表示保守的铜离子和锌离子结合位点, ★表示二硫键部位。Residues in black shading indicate identical residues. Residues in dark gray shading indicate highly conserved residues ($\geq 75\%$ identity). Residues in light gray shading indicate conserved residues ($\geq 50\%$ identity). ▲ denotes Cu^{2+} and Zn^{2+} binding sites, and ★ denotes disulfide bond sites.

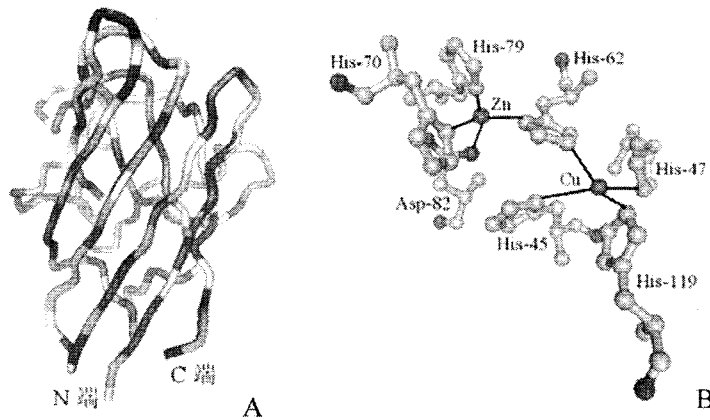


图 4 水稻 Cu/Zn-SOD 三维结构预测

Fig. 4 Prediction of rice Cu/Zn-SOD structure

- A. 水稻 Cu/Zn-SOD 的理论结构 Putative three-dimension structural of rice Cu/Zn-SOD;
- B. 水稻 Cu/Zn-SOD 铜锌离子结合部位结构 Cu^{2+} and Zn^{2+} binding sites of rice Cu/Zn-SOD.

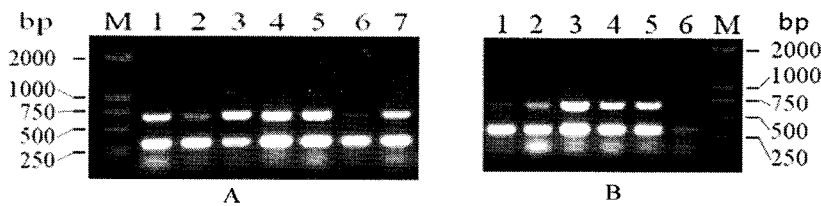


图 5 RT-PCR 分析 *OsCu/Zn-SOD* 的表达

Fig. 5 RT-PCR analysis of *OsCu/Zn-SOD* expression

A: 1-7 为水稻叶片 *OsCu/Zn-SOD* 的 PCR 产物: 1. 粤航; 2. 丰锦; 3. 珍紧占; 4. 广超丝苗; 5. 中花 11; 6. Cpslo17; 7. 丰丝占。Lines 1-7 are PCR products of *OsCu/Zn-SOD* in leaves of rice cultivars. 1. Yuehang; 2. Fengjin; 3. Zhenjinzhan; 4. Guangchaosimiao; 5. Zhonghua 11; 6. Cpslo17; 7. Fengsizhan; M: DL2000 DNA marker. B: Cpslo17: 1. 叶片; 2. 茎; 3. 幼穗; 4. 开花期花序; 5. 未成熟种子; 6. 愈伤组织。Cpslo17. 1. Leaves; 2. Stems; 3. Young panicles; 4. Panicles at the flowering stage; 5. Immature seeds; 6. Callus.

参考文献

- [1] Bowler C, Van Montagu M, Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1992, 43:83-116.
- [2] Bannister J V, Bannister W H, Rotilio G. Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase [J]. *CRC Crit Rev Biochem*, 1987, 22:111-180.
- [3] Youn H D, Kim E J, Roe J H, et al. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. [J]. *Biochem J*, 1996, 318:889-896.
- [4] Sen A, Heinin J L, Holaday S A, et al. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plant that overexpressed chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90:1629-1633.
- [5] Badawi G H, Yamauchi Y, Shimada E, et al. Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts [J]. *Plant Sci*, 2004, 166:919-928.
- [6] 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.) [J]. *Plant Mol Biol*, 1992, 19(2):323-327.
- [7] Wang F(王峰), Huang L Y(黄璐圆), Wang H B(王宏斌), et al. Cloning and sequence analysis of rice mitochondrial phosphate transporter gene by one-step RT-PCR [J]. *J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报)*, 2005, 13(4):303-309.(in Chinese)
- [8] Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, et al. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence [J]. *J Mol Biol*, 2000, 300:1005-1016.
- [9] Emanuelsson O, Nielsen H, Heijne G V. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites [J]. *Protein Sci*, 1999, 8:978-984.
- [10] Schwede T, Kopp J, Guex N, et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server [J]. *Nucl Acids Res*, 2003, 31: 3381-3385.
- [11] Ko C H, Brendel V, Taylor R D, et al. U-richness is a defining feature of plant introns and may function as an intron recognition signal in maize [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 36:573-583.
- [12] Merritt H, McCullough A J, Schuler M A. Internal AU-rich elements modulate activity of two competing 3' splice sites in plant nuclei [J]. *Plant J*, 1997, 12:937-943.
- [13] Landis G N, Tower J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation [J]. *Mech Ageing Dev*, 2005, 126(3):365-379.