

# 雨生红球藻铁型超氧化物酶基因的克隆与序列分析

樊寅卯<sup>1</sup>, 张 蕾<sup>2,3</sup>, 秦 松<sup>2</sup>, 严小军<sup>1</sup>

(1. 宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211; 2. 中国科学院 烟台海岸带可持续发展研究所, 山东 烟台 264003; 3. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

**摘要:** 利用已报道的 *FeSOD* 保守区域, 设计简并引物, 通过简并 PCR 的方法获得了雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*)*FeSOD*(*HpFeSOD*)cDNA 的部分序列, 然后采用 RACE 方法分别克隆到 5'端和 3'端。拼接后得到 *HpFeSOD* cDNA 全长, 该基因全长为 1 138 bp, ORF 为 684 bp, 编码 227 个氨基酸。把已经得到的 *HpFeSOD* 序列推导成氨基酸序列与一些已知物种的 *FeSOD* 氨基酸序列相比较, 雨生红球藻 *FeSOD* 与杜氏藻、衣藻、团藻、石莼、颤藻的同源性为 89%、83%、78%、70%和 63%。分子系统学分析表明, 雨生红球藻 *FeSOD* 与杜氏藻 *FeSOD* 聚在一起, 介于真菌与高等植物之间并且真核微藻 *FeSOD* 与高等植物的同源性更高, 推测其在进化上与高等植物的亲缘关系更近。

**关键词:** 雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*); 超氧化物歧化酶; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: S335; Q785 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2012)04-0079-07

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是体内清除氧自由基反应的第一大酶类, 可以催化  $O_2^-$  发生歧化反应生成  $O_2$  和  $H_2O_2$ , 从而清除体内的  $O_2^-$ 。植物体中主要含有 3 种 SOD: MnSOD, Cu/ZnSOD 和 FeSOD。Cu/ZnSOD 主要存在于细胞浆内; MnSOD 主要存在于细胞浆和线粒体内; FeSOD 存在于过氧化物酶体和叶绿体中。高等植物的 FeSOD 和 MnSOD 的序列和结构上具有较高的同源性, Cu/ZnSOD 与 MnSOD 或 FeSOD 之间不存在同源性<sup>[1]</sup>。FeSOD 在进化中属于一类古老的 SOD, 因为厌氧古细菌中只存在这一种 SOD 酶, 在动物, 真核生物和真菌中一般不含 FeSOD。

FeSOD 是抗氧化代谢途径中关键酶之一。FeSOD 为环境诱导表达型, 表达量高低受到温度、光、激素等环境因子的影响。各种化学物质和逆境胁迫因子都能引起 FeSOD 的高表达, 从而减少氧胁迫对机体的伤害<sup>[2]</sup>。研究表明, FeSOD 与植物的抗病性、抗盐性、耐脱水力、抗热性、耐寒性及抗除草剂的能力密切相关<sup>[3]</sup>。另外, 微藻对低温及亚硫酸盐的抗性也与 FeSOD 的活性相关。

在自然界中, 雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)主要分布在浅水地带或海边的岩石旁。所以雨生红球藻在整个生长的过程中不可避免的要遇到不良的生存环境, 例如: 营养缺乏、高温、干旱、紫外线

伤害、高光强和冷(冻)害等。雨生红球藻能够适应不良的生存环境, 一方面是雨生红球藻可以通过不同细胞形态之间的转变, 即在适宜的环境中, 它以绿色游动细胞的形式出现, 一旦环境不适宜, 其细胞壁加厚形成孢子囊<sup>[4]</sup>。另一方面是通过抗氧化系统, 在雨生红球藻不同类型的细胞中, 抗氧化机制有很大的差异, 雨生红球藻细胞内存在两种抗氧化机制, 一是绿色细胞中的抗氧化酶体系, 二是红色细胞中的抗氧化物质虾青素, 这两种抗氧化机制同时存在, 共同作用<sup>[5]</sup>。对雨生红球藻 *FeSOD* 的克隆和表达分析有助于揭示雨生红球藻对环境的适应机理, 以及抗氧化抗逆性的生理机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 藻种和培养方法

雨生红球藻为中科院烟台海岸带所生物资源实

收稿日期: 2011-09-10; 修回日期: 2011-12-07

基金项目: 山东省杰出青年学者基金项目(JQ200914); 国家自然科学基金项目(31000037); 中国科学院知识创新工程计划项目(KSCX2-YW-G-073, KZCX2-YW-216, KZCX2-YW-209)

作者简介: 樊寅卯(1986-), 女, 甘肃平凉人, 硕士研究生, 研究方向: 藻类抗逆基因的研究, 电话: 18868929071, E-mail: xiaofan0909@163.com; 严小军, 通信作者, 研究员, 电话: 0574-87600458; E-mail: xiaojunyan@hotmail.com

实验室所培养, 在温度为 25°C, 3000 lx 的光照强度, 12h/12h 的光暗周期, 与 MCM<sup>[6]</sup>培养基条件下静置培养, 每天摇动一次。

### 1.1.2 试剂与仪器设备

试剂: Taq DNA 聚合酶(Takara)、pMD-18T (Takara)、The SMART™ RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)、RNAprep pure Plant Kit(Tiangen)、反转录试剂盒(Takara)、氨苄青霉素钠(Sangon)、Marker(Takara)、胶回收试剂盒(Takara)、引物合成和测序送上海生工生物技术有限公司完成、大肠杆菌菌种 top10(*Escherichia coli* top10)由本实验室保存。

主要仪器设备:主要使用仪器: 光照培养箱(江南仪器厂)、PCR 仪(Bio-Rad)、凝胶成像系统(Bio-Rad), 低温台式离心机(ABI)、高压灭菌锅(上海精宏)、恒温水浴锅(上海精宏)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 雨生红球藻总 RNA 的提取

采用 RNA 提取试剂盒(RNAprep pure Plant Kit)提取雨生红球藻的总 RNA, 具体操作参考 RNAprep pure Plant Kit 试剂盒的说明书。用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量。

### 1.2.2 cDNA 第一链的合成

反转录反应体系(20 μL)如下: RNase Inhibitor(40 U/μL)1 μL; MMLV RT Buffer(5×)4 μL; MMLV RNaseH(200 U/μL)0.5 μL; dNTP(10 mmol/L)2μL; Oligo dT<sub>15</sub>(0.2 mmol/L)2 μL; H<sub>2</sub>O(RNase-Free)5.5 μL; 总 RNA(0.5 μg)5 μL。42°C 温育 2 h, 95°C 变性 2 min,

- 20°C 保存备用。

### 1.2.3 RT-PCR 法克隆 *HpFeSOD* cDNA 片段

根据 GenBank 中已注册的 *FeSOD* 氨基酸序列, 用 codehop<sup>[7]</sup>设计雨生红球藻 *FeSOD* 的简并引物。codehop 设计的简并引物 HpFeSODF1(5'-CCCAGATCTGGAACACACCCy-tntaytgga-3') 和 HpFeSODR1 (5'-CGGTAGTCGATGTAGTAGGCGtgytccanac-3')。所有引物均由上海生物工程公司合成, 见表 1。

取第一链反应产物 1 μL, 按下列反应体系(25 μL)PCR 扩增: 10xPCR Buffer 2.5 μL; dNTP 2 μL; 上下游简并 PCR 引物(10 mmol/L)1 μL; Taq DNA 聚合酶(50 μ/L)0.25 μL; 第一链反应的产物 1 μL; H<sub>2</sub>O 17.3 μL。

PCR 扩增的程序是: 94°C 4 min, 1 个循环; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 3 min, 35 个循环; 72°C 10 min, 1 个循环; 4°C 保存。

取 20 μL PCR 反应产物以 1%琼脂糖凝胶电泳进行分析 and 回收; 目的 DNA 片段的胶回收参阅 TAKARA 公司的小量胶回收试剂盒说明书, 凝胶的制备和操作参考分子克隆实验指南(第 3 版)<sup>[8]</sup>。

### 1.2.4 目的 DNA 片段的连接及转化

按照 TaKaRa 公司的 T-A 克隆载体连接试剂盒的说明书, 将目的 DNA 片段与 pMD18-T 质粒载体 16°C 过夜连接; 连接后转化已制备好的大肠杆菌感受态细胞, 37°C 培养箱中过夜培养。大肠杆菌感受态细胞的制备和连接转化等操作参考分子克隆实验指南(第 3 版)<sup>[8]</sup>。

表 1 实验中用到的引物及序列

Tab. 1 Primers used in the experiments

引物名称	引物序列
HpFeSODF1	5'-CCCAGATCTGGAACACACCCy-tntaytgga-3'
HpFeSODR1	5'-CGGTAGTCGATGTAGTAGGCGtgytccanac-3'
HpFeSOD RACE F1	5'-TCACCAAGACGGCTATCGGCACG-3'
UPGSP-3	5'-GACTCAGCAAGGAGGACATTGAGTGC-3'
HpFeSOD RACE R1	5'-CGTGCCGATAGCCGTCTTGGTGA-3'
UPGSP-5	5'-GCTTGGCATCGCGCATGCATGCCTCG-3'

### 1.2.5 阳性克隆的筛选与检测

挑取能在含有 Amp 的 LB 培养基平板上生长的单菌落, 进行 PCR 检测。

### 1.2.6 测序

根据电泳检测结果, 挑取较好的克隆菌液 200 μL 送到上海生工进行测序。

### 1.2.7 RACE 技术扩增 *HpFeSOD* 全序列

#### 1.2.7.1 RACE-PCR 引物的设计和合成

BLAST 比对以上测序得到的 *HpFeSOD* 部分片段序列, 发现它与其他物种 *FeSOD* 同源性很高, 根据所测的序列再设计正向(HpFeSOD RACE F1)、反向(HpFeSOD RACE R1)引物, 用 RACE 技术扩增

*HpFeSOD* 的 cDNA 全长。

### 1.2.7.2 SMART RACE cDNA 的合成

RACE-PCR 操作步骤参照 The SMART™ RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)操作手册。

### 1.2.7.3 3'RACE-PCR 反应体系和扩增条件

3'RACE-PCR 反应体系(50 μL): 50 × Advantage 2 Polymerase Mix 1 μL; 10 mmol/L dNTP Mix 1 μL; 3'-RACE-Ready cDNA 2.5 μL; 10 μmol/L UPM 引物 5 μL; PCR-Grade Water 33.5 μL; 10 × Advantage 2 PCR Buffer 5 μL。

5'RACE-PCR 反应体系(50 μL): 10 × Advantage 2 PCR Buffer 5 μL; 10 mmol/L dNTP Mix 1 μL; 5'-RACE-Ready cDNA 2.5 μL; 10 μmol/L UPM 引物 5 μL; PCR-Grade Water 33.5 μL; 50 × Advantage 2 Polymerase Mix 1 μL。

扩增程序:94°C 30 s, 72°C 2 min, 5 个循环; 94°C 30 s, 70°C 30 s, 72°C 2 min, 5 个循环; 94°C 30 s, 68°C 30 s, 72°C 2 min 28 个循环; 72°C 10 min, 1 个循环; 4°C 保温。

### 1.2.7.4 RACE 产物的纯化、克隆及测序

克隆、测序等方法同前。

## 1.2.8 序列分析

### 1.2.8.1 序列的网上比对与分析

将所测得的序列利用 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上的 BLAST 工具进行序列相似性及同源性查找, 并利用这些序列进行同源性的比较, cDNA 全长序列 ORF 分析用 [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) 网站 ORF finder 在线分析。

### 1.2.8.2 氨基酸序列分析

通过在线翻译软件(<http://www.bio-soft.net/sms/>)把得到的 *HPFeSOD* 序列翻译成氨基酸序列, 序列分析工具(ProtParam)来分析 *HPFeSOD* 蛋白的理化特性和一级的结构。ProtScale 软件来预测 *HPFeSOD* 蛋白的疏水结构, 用 Swiss-model 构建 *HPFeSOD* 蛋白的高级结构模型。

### 1.2.8.3 系统发育分析

选取 GenBank 中不同种类的 *FeSOD* 采用 ClustalW2 软件进行多序列比对分析, 创建一个不同来源的 *FeSOD* 多序列的比对结果; 系统发生和进化的分析在比对的基础上用 MEGA 4.0<sup>[9]</sup>软件完成, 系统树采用 N-J 方法构建。

## 2 结果

### 2.1 总 RNA 提取及检测

从雨生红球藻细胞中提取总 RNA, 1.0%琼脂糖

凝胶电泳检测结果证实获得的总 RNA 完整性较好, 质量高, 可以进行后续实验。

## 2.2 *HpFeSOD* 特异性片段的 RT-PCR 扩增与鉴定

以雨生红球藻总 RNA 反转录后得到的 cDNA 第一条链为模板, 以简并引物 *HpFeSOD*F1/*HpFeSOD*R1 进行 RT-PCR 扩增。PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测获得一个片段。将该片段进行测序, 长度为 393 bp。登录 GenBank 数据库比较发现, 该片段氨基酸序列与杜氏藻(*Dunaliella salina*) *FeSOD*(GenBank 登录号:AAX92665)的相似为 90%, 与莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)*FeSOD*(GenBank 登录号:EDP05850)的相似性为 82%, 与团藻(*Volvox carter f.nagariensis*)*FeSOD*(GenBank 登录号:XP\_002946030)的相似性为 80%, 与石莼(*Ulva fasciata*)*FeSOD*(GenBank 登录号:ABR23159)的相似性为 86%, 与小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)*FeSOD*(GenBank 登录号:ABA71697)的相似为 83%, 表明该片段是所要克隆的目的基因的中间片段。

## 2.3 *HpFeSOD* 3'端和 5'端的克隆

根据克隆获得的 *HpFeSOD* cDNA 部分序列信息, 设计合成雨生红球藻 3'和 5'RACE-PCR 特异性引物(*HpFeSOD* RACE F1, UPGSP-3)和(*HpFeSOD* RACE R1, UPGSP-5), 进行 RACE-PCR 反应。3'RACE-PCR 反应后, 电泳图谱显示在 1200bp 的位置有一条 PCR 条带, 5'RACE-PCR 反应后, 电泳图谱显示在 650 bp 的方位有一条 PCR 条带, 将条带切下并进行胶回收, 克隆到 pMD18-T 体中, 然后筛选阳性克隆送上海生工测序。通过 BLAST 分析表明, 该两个片段编码的氨基酸序列和已报道的 *FeSOD* 有高度的同源性, 表明扩增得到的序列是 *HpFeSOD* 3'和 *HpFeSOD* 5'端的序列。

## 2.4 *HpFeSOD* 全长的克隆

根据所获得的中间片段, 5'端和 3'端拼接出 *HpFeSOD* 的全长 cDNA 序列。GenBank 中 *HPFeSOD* 的序列注册编号是 JN603045, 其中开放阅读框(ORF)有 684 个碱基组成, 其编码的氨基酸有 227 个; 5'非编码区的碱基为 63 个、3'非编码区的碱基为 395 个并含有终止密码子 TAA 和加尾信号。

## 2.5 *HpFeSOD* 编码蛋白的生化特性分析

### 2.5.1 *HpFeSOD* 编码蛋白的理化特性分析

利用 ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)

工具对 *HPFeSOD* 蛋白的理化特性进行分析。在 *HPFeSOD* 的氨基酸中, 其中有 23 个带负电的氨基酸残基(Asp+Glu), 占总数的 10.1%, 编码的氨基酸为 227 个, 24 个带正电的氨基酸残基(Arg+Lys), 占总数的 10.6%。*HPFeSOD* 蛋白的理论等电点为 7.86, 分子质量是 25.5 ku, 在大肠杆菌 *E.coil* 中的半衰期大于 10 h, 稳定系数为 69.40, 所以表明 *HPFeSOD* 是稳定的蛋白质。

### 2.5.2 *HPFeSOD* 蛋白三级结构的预测

*HPFeSOD* 蛋白的高级结构模型依据同源建模的预测方法用 Swiss-model<sup>[10]</sup> 模型构建(图 1)。*HPFeSOD* 蛋白结构: C 端区由 4 个螺旋的超二级结构和一个拧成三股 折叠片组成。*HPFeSOD* 蛋白由 15 个卷曲、3 个 折叠片、10 个转角的结构和 11 个螺旋组成, 其蛋白结构的 N 端区主要是 4 个长的反平行螺旋构成。

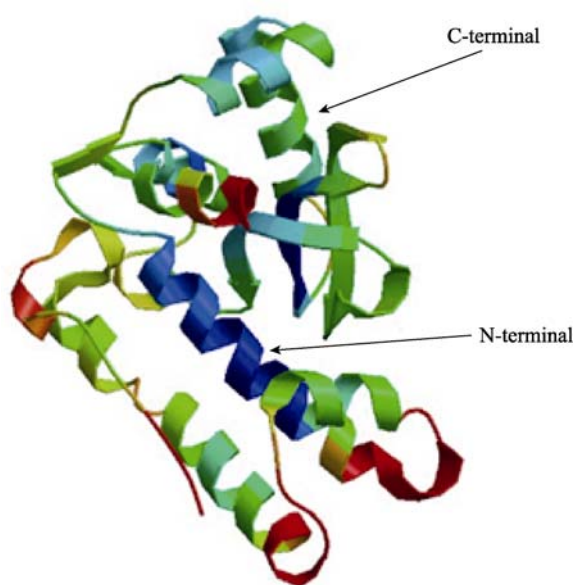


图 1 *HPFeSOD* 空间结构预测

Fig. 1 The predicted dimensional structure of *HPFeSOD*

### 2.6 *HPFeSOD* 与其他真核藻类的 *FeSODs* 多序列比对分析

利用 BLASTX 和 CLUSTALW2 分析软件对克隆得到的 *HPFeSOD* 与已报道的一些藻类的 *FeSODs* 进行同源比对分析。分析表明: 序列之间的同源性比较高, 在多个位点出现连续几个氨基酸一致的情况, 特别是在 3 个保守的氨基酸簇处(NNAAQVWNH-EFFWESMK、AGLTQFGSGWAW、PILTCDMWE-

HAYYIDYQNRDPD)。雨生红球藻(*HPFeSOD*)与杜氏藻(*DsFeSOD*)、衣藻(*CrFeSOD*)、团藻(*VcFeSOD*)、石莼(*UfFeSOD*)、颤藻(*OsFeSOD*)蛋白的同源性为 89%、83%、78%、70%、63%。不同种属的藻类的 *FeSOD* 蛋白都具有较高的同源性, 表明 *FeSOD* 进化的保守性。细胞质定位的 *FeSOD* N 端氨基酸的同源性高于 C 端(图 2)。

### 2.7 *FeSOD* 系统发生进化分析

作者在 Genbank 上下载了 20 条其他物种的 *FeSOD* 氨基酸序列, 通过构建系统发生进化树来研究 *FeSOD* 与其他物种的进化关系。从系统发生进化树图谱(图 3)看到: 绿藻门的 *FeSODs* 聚合在一起, 蓝藻门的 *FeSODs* 聚合在一起, 高等植物的 *FeSODs* 聚合在一起, 细菌的 *FeSODs* 聚合在一起。结果表明: 不同物种的 *FeSOD* 在进化过程中是保守性, 可以很好的反应各物种之间的进化距离。从系统进化树中看到雨生红球藻 *FeSOD* 和杜氏藻 *FeSOD* 在进化关系上最近, 介于真菌与高等植物之间, 并且真核微藻 *FeSOD* 与高等植物的 *FeSOD* 同源性高, 推测雨生红球藻 *FeSOD* 在进化上可能与高等植物的进化关系较近。

## 3 讨论与小结

藻类中尤其是微藻由于其生长环境的特殊性经常受到高氧化环境的胁迫(比如高温, 低温或是冰冻), 这些不良的因素严重的影响藻类的正常生长。藻类拥有一些机制来应对逆境因子的影响并保护藻体免受不可恢复的损伤, 跟藻类抗逆相关的机制有 DNA 修复、光保护物质、抗氧化活性系统等。研究发现, 藻类在经过逆境的胁迫后, SOD 会被诱导并高度表达<sup>[11]</sup>。这是因为 SOD 等内源性的活性氧清除剂能够在逆境胁迫条件下除去过量的活性氧, 从而维持机体的代谢平衡, 保护细胞的膜结构, 缓解植物体发生不良反应的机会, 所以 SOD 与植物耐逆的能力有着非常大的关系<sup>[12]</sup>。

*FeSOD* 是藻类抗逆相关基因之一, 可使藻体抵抗逆境引起的氧化胁迫能力增强。目前, 国内外对于藻类抗逆相关基因 *FeSOD* 的研究为数不多。Desai 等<sup>[12]</sup>的研究表明一些海洋藻类在受到紫外线照射胁迫和温度胁迫后, 它们体内的 MnSOD 会被诱导并高度表达。Slooten 等<sup>[13]</sup>报道了石莼在受到除草剂和紫外线照射胁迫后, MnSOD 和 FeSOD 都受到了诱导并

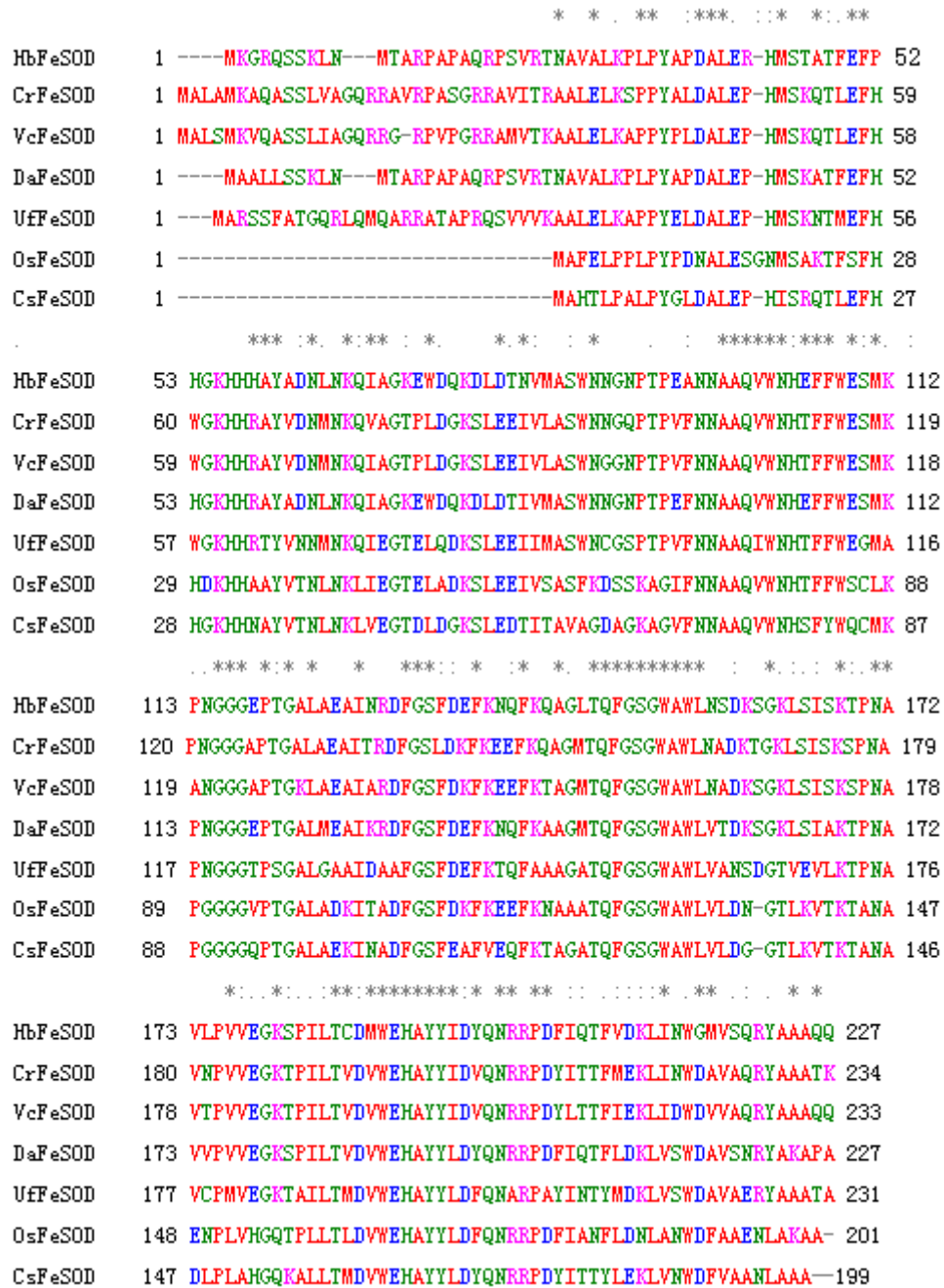


图 2 *HpFeSOD* 与其他真核藻类 *FeSOD* 氨基酸序列比对结果  
 Fig.2 Multiple alignment of amino acid sequences between *HPFeSOD* and other weeds

且得到表达，不同的胁迫方式其的 SOD 的表达水平是不同的。Badawi 等<sup>[14]</sup>的研究发现水稻 FeSOD 受到高度的表达可以提高其的耐冻性，还有他们对番茄进行了抗寒能力的实验，实验结果表明如果番茄在发育期比如花期和苗期用低温胁迫一下，番茄的抗寒力能力显著提高，随之其体内的 SOD 的活性也显著升高，对抗寒力弱的品种进行研究发现其体内的 SOD 活性活性升高不大。

本实验利用简并 PCR 和 RACE 技术从雨生红球藻中克隆了 *FeSOD*，雨生红球藻其他抗逆相关的基因也可以通过类似的方法克隆获得，并利用生物学软件对该序列进行了氨基酸使用频率的统计、同源性比较分析、功能结构域的预测等，为微藻 *FeSOD* 的结构和特性的研究提供参考。并为进一步研究该基因的表达强度与抗逆的相关性和微藻 FeSOD 抗逆的分子机理奠定基础。

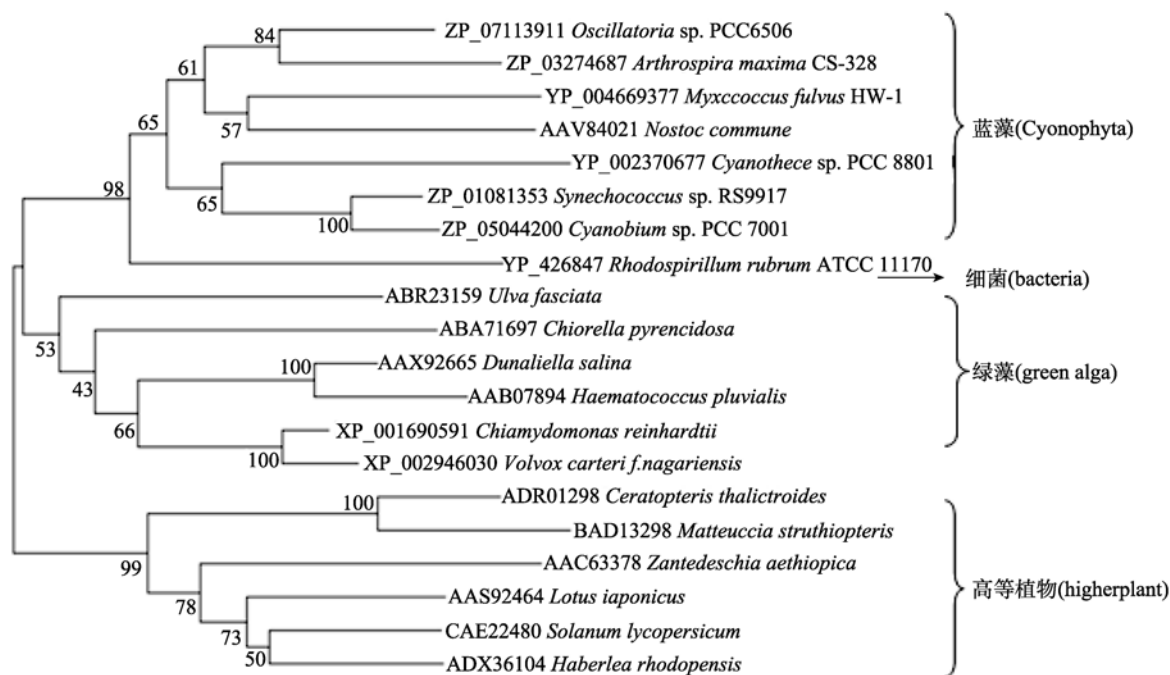


图3 利用邻接法构建藻类、细菌和高等植物 FeSODs 的系统发生进化树  
Fig. 3 Phylogenetic tree of FeSODs constructed with the N-J method

参考文献:

- [1] Bowler C, Van M, Inze D, et al. Superoxide radicals, superoxide dismutases and oxygen toxicity in plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1992, 43: 83-116.
- [2] Bannister J V, Bannister W H, Rotilio G, et al. Aspects of the structure function and applications of superoxide dismutase[J]. *Rev Biochem*, 1987, 22: 111-180.
- [3] 李琳玲, 程华, 许锋, 等. 银杏铁型超氧化物歧化酶基因(GbFeSOD)的克隆与表达[J]. *果树学报*, 2009, 26(6): 840-846.
- [4] Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response[J]. *Physiol Plant*, 2005, 108: 111-117.
- [5] Boussiba S, Wang B, Yuan J P, et al. Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses[J]. *Biotechnol Lett*, 2003, 21: 601-604.
- [6] Sakurai H, Kusumoto N, Kitayama K, et al. Isozymes of superoxide dismutase in *Chlamydomonas* and purification of one of the major isozymes containing Fe. *Plant Cell Physiol*, 2002, 34: 1133-1137.
- [7] 迟晓元, 路延笃, 王明清, 等. 小球藻<sub>12</sub> 脂肪酸去饱和酶基因的克隆与序列分析[J]. *海洋科学*, 2009, 8(33): 11-22.
- [8] 萨姆布鲁克, 拉塞尔. 分子克隆实验指南 [M]. 第 3 版. 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [9] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596-1599.
- [10] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling[J]. *Bioinformatics*, 2006, 22: 195-201.
- [11] McKersie B D, Bowley S R, Jones K S, et al. Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in *Haematococcus pluvialis* [J]. *Plant Physiol*, 2002, 119(3): 839-847.
- [12] Desai K, Sivakami S. Purification and biochemical characterization of a superoxide dismutase from the soluble fraction of the cyanobacterium *Spirulina platensis*[J]. *World Journal of Microbiology and*

- Biotechnology, 2007, 23(12): 1661-1666.
- [13] Slooten L, Capiou K, Camp W V, et al. Factors affecting the Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic *Ulva lactuca* overexpressing manganese superoxide dismutase in the chloroplasts[J]. Plant Physiol, 2007, 107(3): 737-750.
- [14] Badawi G H, Yamauchi Y, Shimada E, et al. Enhanced tolerance to freezing stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in rice chloroplasts[J]. Plant Sci, 2004, 166: 919-928.

## Cloning and sequence analysis of a iron superoxide dismutase from *Haematococcus pluvialis*

FAN Yin-mao<sup>1</sup>, ZHANG Lei<sup>2, 3</sup>, QIN Song<sup>2</sup>, YAN Xiao-jun<sup>1</sup>

(1. Key Laborator of Marine Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. Institute of Coastal Zone Research for Sustainable Development, Yantai 264003, China; 3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Received:** Sep., 10, 2011

**Key words:** *Haematococcus pluvialis*; FeSOD; gene cloning; sequence analysis

**Abstract:** A pair of degenerate primers was designed to amplify specific DNA fragment of *FeSOD* using cDNA of *Haematococcus pluvialis* from the homologous sequences. The middle interesting cDNA fragment was obtained by RT-PCR. The full length of *HPFeSOD* cDNA was obtained by 5'RACE and 3'RACE. The clone contains 1138 bp nucleotides with an open reading frame (ORF) of 684 bp comprising 227 amino acid residues. The sequence shares a high homologue with the following *FeSOD*: *Dunaliella salina*, 89%, *Chlamydomonas reinhardtii*, 83%, *Volvox carteri f.nagariensis*, 78%, *Ulva fasciata*, 70%, and *Cyanobium* sp. PCC 7001, 63%. Phylogenetic analysis shows that the *FeSOD* from *H. pluvialis* and *D. salina* are clustered together with genes between fungi and higherplants. The *FeSOD* of eukaryotic microalgae and higher plants may arise through gene duplication events independently from a common ancestor.

(本文编辑: 梁德海)