

太平洋真宽水蚤(*Eurytemora pacifica*) Cu/Zn SOD 基因克隆及在重金属胁迫下的表达分析*

胡利腾 夏立萍 武敏敏 陈 晋 张建设

(浙江海洋大学海洋科学与技术学院 国家海洋设施养殖工程技术研究中心 舟山 316022)

摘要 铜锌超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)是一种广泛存在于生物体中最主要的抗氧化酶之一,在抵御过多活性氧簇对机体毒害的过程中起重要作用。本研究以太洋真宽水蚤为研究对象,采用 RT-PCR 与 RACE 方法克隆得到太平洋真宽水蚤 Cu/Zn SOD 基因全长 cDNA 序列。Cu/Zn SOD (GenBank 登录号: MF289343)基因序列全长 837bp,其中完全开放阅读框为 456bp 编码 152 个氨基酸,5'非编码区长 297bp,3'非编码区长 84bp,分子量约为 15.050kDa,理论等电点为 5.73。序列比较表明,太平洋真宽水蚤 Cu/Zn SOD cDNA 的氨基酸序列与其他甲壳动物的一致性较高;存在 8 个蛋白翻译后修饰位点及蛋白家族标签序列,无跨膜结构域与信号肽。在重金属铬与镍胁迫下,通过实时荧光定量 PCR 对太平洋真宽水蚤 Cu/Zn SOD mRNA 体内表达特点分析显示,其表达量均呈现先升后降趋势,在暴露 12 小时后表达量达到峰值;铬胁迫下的表达量略高于镍;联合胁迫下呈现出拮抗作用。本研究结果将有利于深入探讨桡足类 Cu/Zn SOD 基因的结构与功能,为进一步研究抗氧化分子机理奠定基础。

关键词 铜锌超氧化物歧化酶;太平洋真宽水蚤;基因克隆;金属胁迫;实时荧光定量

中图分类号 Q789;Q955 **doi:** 10.11693/hyhz20171000261

超氧化物歧化酶(SOD)是一种广泛存在于微生物、动植物细胞的金属酶,根据其本身所相关的金属离子的不同,SOD 可以分为三种类型: Cu/Zn SOD, Mn SOD 以及 Fe SOD (Fridovich, 1986)。不同类型的 SOD 在不同组织或同一个组织不同阶段中的表达均有所不同。其中, Cu/Zn SOD 作为最早被发现的、存在最为广泛的超氧化物歧化酶,具有重要的生理功能和药用前景(Fattman *et al.*, 2003)。一般而言,生物体内存在两种 Cu/Zn SOD 一种是胞外 Cu/Zn SOD (extracellular Cu/Zn SOD),在 N 末端具有信号肽结构,另一种是胞质 Cu/Zn SOD (cytoplasmic Cu/Zn SOD)不带有信号肽结构。Cu/Zn SOD 主要存在于真核细胞的细胞浆内,呈蓝绿色(Shen *et al.*, 1989),分子量在 32kDa 上下,是有两个亚基构成,所有亚基分子量约

为 16kDa,所有亚基具有 1 个 Cu 和 1 个 Zn (Putnam *et al.*, 2000)。来自不同的 Cu/Zn SOD 氨基酸序列,一种来自细菌(Chary *et al.*, 1990)真菌高等植物叶绿体或细胞质(LIN *et al.*, 2002),另一种来自人和高等动物的细胞质(Amano *et al.*, 1990),同源性都比较接近(Arhontaki *et al.*, 2002; Bodył *et al.*, 2007)。在 Cu/Zn SOD 的氨基酸生成中,色氨酸与酪氨酸的含量较低,或者没有。但甘氨酸含量占得比重较高,其中 6 到 8 个氨基酸残基中就含有一个甘氨酸残基。在高级结构中,Cu/Zn SOD 含有 8 股逆向平行 β -折叠,还含有大约 5%的 α -螺旋与环状的无规则结构。Cu/Zn SOD 中仅有的一对键内二硫键,是有 55 位和 144 位的半胱氨酸构成的二硫键,对 Cu/Zn SOD 结构的稳定有着重要的影响。对比活性中心的作用 Cu 和 Zn 离子具

* 国家海洋局公益性行业科研专项, 201505025 号; 海洋科学浙江省重中之重学科开放课题资助, 20130105 号。胡利腾, 硕士研究生, E-mail: yimingtengfei@163.com

通讯作者: 张建设, 博士生导师, 教授, E-mail: zhangjianshe@zjou.edu.cn

收稿日期: 2017-10-15, 收修改稿日期: 2017-11-15

有明显差异, Cu 是必要的, 酶一旦失去 Cu 就会导致失活, 然而 Zn 在被 Co、Hg、Cd 取代后对活性不造成影响。

最近几年, 工业、社会经济的快速崛起, 产生大量生活、工业污水及废物等流入海洋、湖泊、池塘等, 造成了水域生态系统严重破坏。随着海洋环境污染监测要求的提高, 有研究表明, 当污染影响到水生动物时, 其体内会产生氧化应激, 且诱导 ROS 水平明显加大, 加快水生生物体内基因表达或抗氧化酶的酶活力的变化(Nahrgang *et al*, 2010)。Varessa Nairsumic 等人对膝沟藻超氧化物歧化酶在重金属汞、镉、锡、铜胁迫下的表达研究发现, 慢性毒性效应下细胞中 SOD 活性在第一天即开始增加, 增量分别是对照组活性的 1.34、1.48、1.27 及 1.39 倍; 急性毒性下, SOD 值增加幅度大致与慢性毒性胁迫相同, 但上升速度更快、时间更短。推断 SOD 基因在藻类金属毒性胁迫免疫中发挥重要的调节作用(Gressler *et al*, 2010)。Hansen 等(2006)研究了河鲢 SOD 在不同金属浓度下的转录水平表达量, 结果表明各慢性金属胁迫下其表达均有所增强, 其中铜暴露下鲢鱼的氧化应激易感性有所提高, 尤其是肝脏出的表达量较高; 此外, 河鲢对金属胁迫的适应性来自于驯化适应而非遗传(Hansen *et al*, 2006)。赵元凤等(2003)研究了 Cd²⁺、0[#]柴油、二甲苯对毛蚶肌肉超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响, 结果表明 3 种污染物对毛蚶 SOD 表现出不同程度诱导作用, 其中对 Cd²⁺污染反应十分敏感, 且毒性强弱次序为 Cd²⁺、0[#]柴油、二甲苯(赵元凤等, 2003)。因此有研究表明, SODs 可成为鱼类对水环境污染的敏感指标(郑清梅等, 2014), 适用于环境污染的生化分析(Whitfield *et al*, 2002)。

太平洋真宽水蚤(*Eurytemora pacifica*)作为海洋浮游生物的重要组成部分, 作为太平洋东部海域东海海域(特别是舟山海域)优势浮游动物之一, 由于其分布的广泛性与海洋食物链中的特殊地位使得其在海洋海域生态环境状况的指示中具有重要作用, 在海洋生态环境监测与防控中具有举足轻重的地位。然而, 目前对太平洋真宽水蚤 Cu/Zn SOD 基因的克隆与重金属胁迫下的表达研究尚未见报道。本研究以太平洋真宽水蚤为实验材料, 通过 RACE 方法获得 Cu/Zn SOD 基因序列, 利用分子生物学手段对 Ep.Cu/Zn SOD 基因的生物学特性及重金属胁迫下的表达特征进行研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用太平洋真宽水蚤(*Eurytemora pacifica*)采集自浙江省舟山市长峙岛附近海域, 体长为 1.20—1.40mm, 经解剖镜下筛选纯化, 实验室暂养 7d 后取样实验, 暂养条件: 水温(20±0.5)℃, 海水盐度 28, 光暗周期 12h : 12h, 24h 充氧, 定期投喂饵料海水小球藻。实验时, 选取子代中外观形态与附肢完整, 生命活性强且健康的太平洋真宽水蚤的成体为实验对象; 实验样品处理后, 由液氮速冻后, 置于-80℃保存。克隆材料选取是从每组对照组中各随机选取 10 只太平洋真宽水蚤, qRT-PCR 的实验材料为不同金属胁迫处理后的太平洋真宽水蚤的总 RNA, 每个实验组下个体重复 3 次。

1.2 RNA 提取和 cDNA 合成

在对照组中挑取 10mg/μL 组织个体, 放入 1.5mL 的灭菌离心管内作为总 RNA 提取, 实验方法是通过对 TaKaRa 公司的 Trizol Total RNA 提取试剂盒方法进行提取, 得到的总 RNA 以 1.5%非变性琼脂糖凝胶电泳检测, 并放置在紫外分光光度计(Bio-Rad, USA)下检测, 以 TaKaRa M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 试剂盒对所得到的 RNA 反转录, 获取 cDNA。

1.3 RACE 得到目的基因全长序列

通过已知的桡足类 Cu/Zn SOD 全长序列设计并引物获得太平洋真宽水蚤 Cu/Zn-SOD 基因的中间序列片段, 采用 RACE 技术, 设计 Cu/Zn SOD 基因特异性引物, 3'RACE 与 5'cDNA 按照 TaKaRa 的 RACE 试剂盒说明书步骤进行实验, 并将得到的目的片段通过分离纯化后链接到 PMD18-T 载体上, 再转接到 Dh5α 感受态细胞中, 选择阳性克隆送上海美吉生物技术有限公司测序。实验所用引物见表 1。

1.4 太平洋真宽水蚤 Cu/Zn SOD 序列分析

用 DnAMAN8.0 软件将得到的测序结果拼接, 获得太平洋真宽水蚤 Cu/Zn SOD 基因的 cDNA 全长序列。非编码区与编码区的检测采用 NCBI 在线网址 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orf.cgi>)来预测。分子量和等电点在 Expasy 网站(http://web.expasy.org/compute_pi/)进行分析比较, 使用 SignalP 4.1 Server 网址为与 TMHMM Serverv.2.0 分别对其进行信号肽以及跨膜区的预测; 使用 Swissport 在线软件对 Cu/Zn SOD 基因的蛋白质结构进行预测分析 <http://swissmodel.expasy.org/>; 用 SAS 在线序列处理

表 1 研究中普通 PCR 以及 RACE 所用引物
Tab.1 Primers used for PCR and RACE in this study

基因	引物	引物序列(5'—3')	扩增片段(bp)	作用
Cu/Zn SOD	Cu/Zn SOD F	CGAACGGGTGTATGTCTGCT	93	核心序列
	Cu/Zn SOD R	CGTCACTGATGGCGACCTTA		
	Cu/Zn SOD 5'outer	TCACTGATGGCGACCTTAGCAAC	345	5'RACE
	Cu/Zn SOD 5'inner	CGGCAGTAACATTCCCTAAATCG	287	
	Cu/Zn SOD 3'outer	TAACACGAACGGGTGTATGTCTG	254	3'RACE
	Cu/Zn SOD 3'inner	GGCGATTAGGGAATGTTACTGC	192	

工具包对 Cu/Zn SOD 基因氨基酸序列与其他物种进行同源性比对, 使用 MEGA6.0 以 Maximum Likelihood method 构建系统进化树。

1.5 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)表达分析

利用 Prime primer 5.0 软件在 Cu/Zn SOD 基因编码区范围内设计荧光定量 PCR 所需的特异性引物, 内参引物为 18S rRNA。实验所用引物由上海华大生物公司合成, 采用 PAGE 纯化方式。样品经过重金属铬和镍及其联合半致死浓度 LC_{50} , 以及

1/2 LC_{50} 、1/4 LC_{50} 以及 1/8 LC_{50} 暴露处理, 进行总 RNA 提取, 然后反转录得到 cDNA 模板作为实验荧光定量 PCR 的样品。设置 3 个实验重复和 3 个技术重复的内参和目的基因。实验参照数据以未重金属胁迫组太平洋真宽水蚤为对照, 删除每 3 个重复中差异较大的数据, 剩下的数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行 Cu/Zn SOD 基因表达分析, 分析数据使用 Spss 22.0 进行显著性差异分析和单因素方差分析, 当 $P < 0.05$ 时为显著差异。

表 2 研究中荧光定量 PCR 所用引物
Tab.2 Primers used for qRT-PCR in this study

引物	引物序列(5'—3')	扩增片段(bp)	作用
Cu/Zn SOD F	CGAACGGGTGTATGTCTGCT	91	qRT-PCR primer
Cu/Zn SOD R	CGTCACTGATGGCGACCTTA		
18S F	TGCATGGCCGTTCTTAGTTG	209	qRT-PCR control primer
18S R	TCAATTCAGTGTAGCGCGTG		

2 结果与分析

2.1 太平洋真宽水蚤全长 Cu/Zn-SOD 基因序列分析

以太平洋真宽水蚤 RNA 反转录后 cDNA 为模板, 以 Cu/Zn SOD.F/R 为引物扩增获得目的片段, 根据该终极那序列 RACE 引物, 采用 RACE 方法获得 Cu/Zn SOD 基因 351bp 的 5'端序列以及 510bp 的 3'端序列(图 1)。

利用 DNAMAN 8.0 软件将扩增获得到的核心片段以及 351bp 的 5'RACE 和 510bp 的 3'RACE 序列片段进行拼接, 得到太平洋真宽水蚤 Cu/Zn SOD 基因的 cDNA 序列全长(MF289343)为 837bp, ORF 长 456bp, 编码 152 个氨基酸(aa), 5'UTR 与 3'UTR 分别由 297bp, 84bp 的核苷酸组成, 具有典型的 polyA 尾巴以及 AATAAA 加尾信号(图 2)。

2.2 太平洋真宽水蚤 Cu/Zn SOD 氨基酸序列比对以及同源性分析

使用在线分析软件 SMS 多重序列同源比对, 将

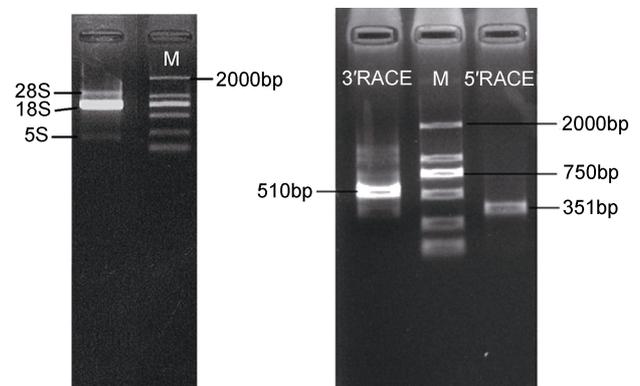


图 1 RNA, Cu/Zn-SOD 5'/3'RACE 电泳图片
Fig.1 Electrophoresis pictures of RNA, and 5'/3'RACE of Cu/Zn-SOD

Ep. Cu/Zn SOD 基因编码的氨基酸序列与目前已经公布的部分甲壳类的 Cu/Zn SOD 基因进行比对(图 3), 并通过 DNAMAN8.0 软件对所有序列与太平洋真宽水蚤 Cu/Zn SOD 蛋白序列之间的同源相似性进行计

```

1      TGGCCACGCGTCTGACTAGTACGGGGGGGGCGTCTAAAACGACCAAGCTAATATTGCTTATTCACTTCTACAAGAGA
79     AAAAAGATCGTTAAGGCAGTTTGTGTACTCAAGGGGGAGGTTGTCAACGGCACCGTTCATTTTGAACAGGAGGAGGT
1      M V K A V C V L K G E V V N G T V H F E Q E E G
157    GGACCTGTTACCTGTCCGGGAAGTACCCGGACTGACAGATGGACTTCATGGATTCCATGATCATAGTTGGTGAT
25     G P V T L S G E L T G L A D G L H G F H V H Q F G D
235    AACACGAACGGGTGTATGCTGCTGGCCCCATTTCAACGTGGATGGTAGTACTCAGCGGCCCAACCGCACGCCAAG
51     N T N G C M S A G P H F F N V D G S T H G A P T D A K
313    GGTTCGCGCCATGCCGGCAGTTTAGGGAATGTTACTGCGGACGGCGCGTTCGTAAGGTCGCCATCAGTGACGCCATG
77     G S R H A G A D L G N V T A D G G V A K V A I S D A M
391    ATCAGCCTGAGCGGGCAGAACTCAGTGCCTGCGCAGCATGGTCCACGCTGATCAGGACGATCTAGGGCAGGGA
103    I S L S G E N S V I G R T M V I H A D Q D D L G Q G
469    GGCCACGAGCTCAGCAAGAGCACGGAATGCTGGGGCTCGTGACGCTGCGGGGTTCATTGGTATTGCTAAGCTAAGGC
129    G H E L S K S T G N A G A R A A C G V I G I A K *
547    CTGTGTTTCTAAGCTGTAGTGGATCCCTAGTCAAGGGCAGACTATATGTAACCCCTAGATGTGATTTCATGGATCA
625    TAAAAAAAAGAAATATATCAATAATTTCTTTCATTTAAATTTTACCAGTTCATTTTCAATTACTTTTCACTGACAAAAC
703    GCAGCATTATTGAAATGCGTTTGTGGATAAATCTCGTAGTGTGTGTCACGTTTCATTTTCAAATTTCCCGCG
781    TTTTATTGTTGAATAATTTGGCCCAAAAAATAATGTGTACTTTTCAGAAAAA

```

图 2 EP. Cu/Zn SOD cDNA 序列及编码氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of Ep. Cu/Zn-SOD

注: 预测的开放阅读框中起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)用黑色线框标出, “*”表示终止密码子

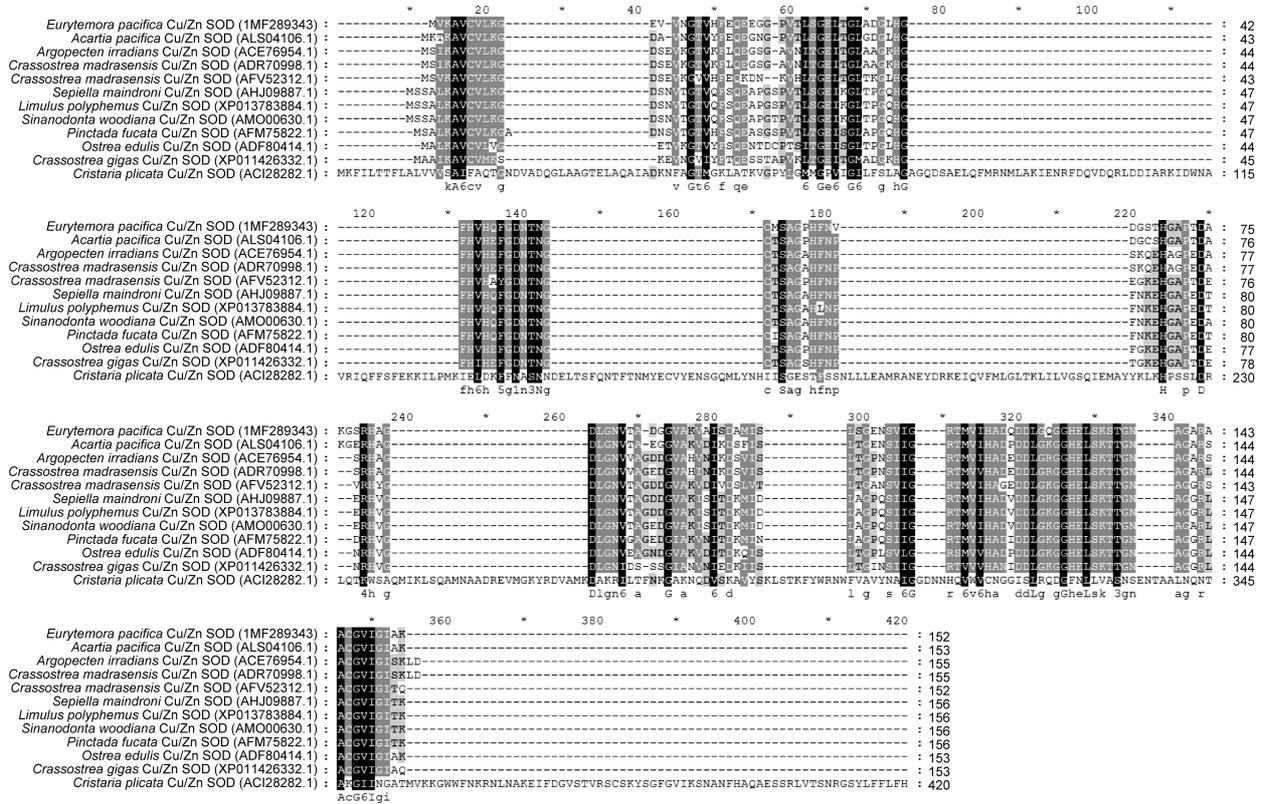


图 3 Ep. Cu/Zn SOD 基因氨基酸序列多重比对

Fig.3 Multiple sequence alignment of deduced amino acid sequence of Ep. Cu/Zn SOD gene

算(表 3)。结果显示, 太平洋真宽水蚤(*Eurytemora pacifica*)与太平洋纺锤水蚤(*Acartia pacifica*)相似度最高为 84%, 与其他甲壳类如海湾扇贝(*Argopecten irradians*)、近江牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)和印地安死水牡蛎(*Crassostrea madrasensis*)等相似度均为 71%。表明 Ep. Cu/Zn SOD 基因为属于 Cu/Zn SOD 家族基因成员。

使用 MEGA 6.0 软件构建系统进化树, 计算方法采用 Maximum likelihood method, 重复计算 10000

次。系统进化树中所用物种名及 GenBank 的登录号等相关信息在表 4 列出。结果如图 4 所示, 太平洋真宽水蚤 Cu/Zn SOD 基因与太平洋纺锤水蚤(*Acartia pacifica*)位于同一进化枝, 氨基酸序列相似度最高, 表明亲缘关系最近; 同曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)和褶纹冠蚌(*Cristaria plicata*)的氨基酸序列相似度较低, 表明亲缘关系相对较远; 总体上, 桡足类(Copepods)与贝类(Shellfish)系统进化发育树聚为一簇, 与鱼类的进化关系较远。

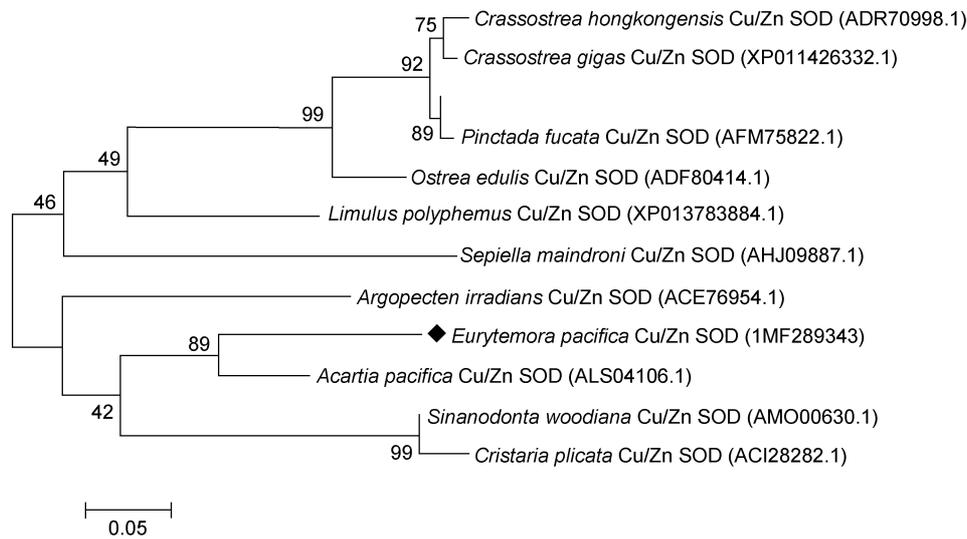


图 4 Cu/Zn SOD 的系统进化树

Fig.4 Molecular phylogenetic analysis of Cu/Zn SOD by maximum likelihood method

表 3 用于序列分析分析的 Cu/Zn SOD 家族基因
Tab.3 Cu/Zn SOD family neuropeptide for sequence analysis

序列名称	登录号	来源物种	同源性/%
太平洋真宽水蚤 Cu-Zn SOD	MF289343	<i>Eurytemora pacifica</i>	
太平洋纺锤水蚤 Cu-Zn SOD	ALS04106.1	<i>Acartia pacifica</i>	84
海湾扇贝 Cu-Zn SOD	ACE76954.1	<i>Argopecten irradians</i>	71
近江牡蛎 Cu-Zn SOD	ADR70998.1	<i>Crassostrea hongkongensis</i>	71
印地安死水牡蛎 Cu-Zn SOD	AFV52312.1	<i>Crassostrea madrasensis</i>	71
曼氏无针乌贼 Cu-Zn SOD	AHJ09887.1	<i>Sepiella maindroni</i>	64
美国鲎 Cu-Zn SOD	XP013783884.1	<i>Limulus polyphemus</i>	69
背角无齿蚌 Cu-Zn SOD	AMO00630.1	<i>Sinanodonta woodiana</i>	70
合浦珠母贝 Cu-Zn SOD	AFM75822.1	<i>Pinctada fucata</i>	70
食用牡蛎 Cu-Zn SOD	ADF80414.1	<i>Ostrea edulis</i>	70
太平洋牡蛎 Cu-Zn SOD	XP011426932.1	<i>Crassostrea gigas</i>	69
褶皱冠蚌 Cu-Zn SOD	ACI28282.1	<i>Cristaria plicata</i>	68

2.3 太平洋真宽水蚤 Cu/Zn SOD 基因的生物信息学分析

分析使用 DNAMAN 软件对 Cu/Zn SOD 蛋白进行氨基酸疏水性分析, 结果如图 5, 氨基酸的疏水性最大为 2.48, 最小值为-2.56, 均值为-0.087368421, 所有多肽链中大多数氨基酸的分值较低, 疏水性氨基酸 70 个, 亲水氨基酸为 82 个, 亲水性氨基酸显著多于疏水性氨基酸, 推测该蛋白为亲水性蛋白。

使用 TMHMM 2.0 在线软件对蛋白进行跨膜区分析, 结果如图 6 所示; 该蛋白的氨基酸没有明显的

跨膜区。使用 Swiss Pdb Viewer4.0.1 软件进行 Cu/Zn SOD 蛋白进行功能位点模式(Prosite pattern)分析, 发现具有 8 个蛋白翻译后修饰位点: PS00001 N-糖基化位点; PS00005 磷酸化位点; PS00006 酪蛋白激酶 II 磷酸化位点; PS00008 豆蔻酰化位点; PS00342 微体 C-末端的定位信号; PS00087/PS00332 铜锌超氧化物歧化酶签名; PS00443 谷氨酸转氨酶的 II 类段位(表 4)。

使用 ExPASy 网站中 Peptide Cutter 软件 (http://web.expasy.org/peptide_cutter/)对蛋白的酶切位点进行分析, 分析结果如下表 5 所示。

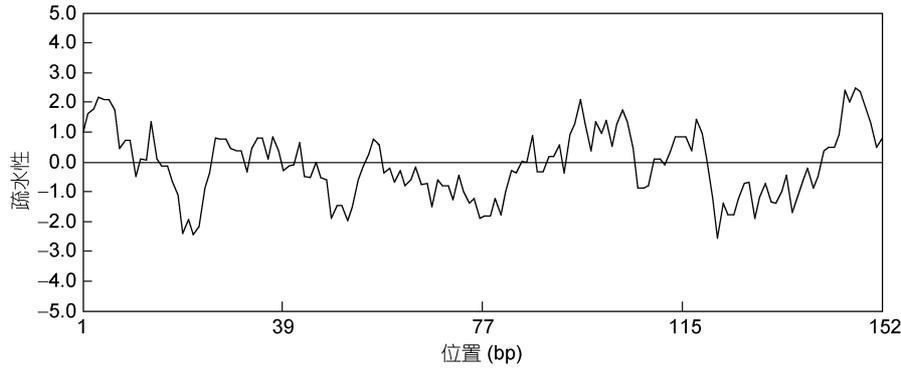


图 5 Cu/Zn SOD 氨基酸疏水性分析

Fig.5 Analysis of Cu/Zn SOD hydrophobic amino acid

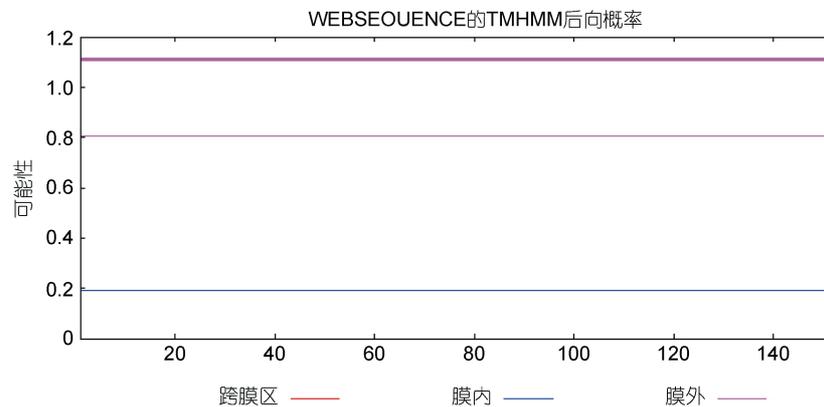


图 6 Cu/Zn SOD 氨基酸序列跨膜区分析

Fig.6 Transmembrane region analysis of Cu/Zn SOD amino acid sequence

表 4 Cu/Zn SOD 蛋白进行功能位点模式(Prosite pattern)分析

Tab.4 Cu/Zn SOD proteins analysis in functional site pattern (Prosite pattern)

位点	名称	序列
PS00001	N-glycosylation site	N-{P}-[ST]-{P}
PS00005	Protein kinase C phosphorylation site	[ST]-x-[RK]
PS00006	Casein kinase II phosphorylation site	[ST]-x(2)-[DE]
PS00008	N-myristoylation site	G-{EDRKHPFYW}-x(2)-[STAGCN]-{P}
PS00342	Microbodies C-terminal targeting signal	[STAGCN]-[RKH]-[LIVMAFY]>
PS00087	Copper/Zinc superoxide dismutase signature	[GA]-[IMFAT]-H-[LIVF]-H-x(2)-[GP]-[SDG]-x-[STAGDE]
PS00332	Copper/Zinc superoxide dismutase signature	G-[GN]-[SGA]-G-x-R-x-[SGA]-C-x(2)-[IV]
PS00443	Glutamine aminotransferases class-II act	<x(0,11)-C-[GS]-[IV]-[LIVMFYW]-[AG]

Swiss model 中在线预测的 Cu/Zn SOD 蛋白质三级结构模型如图 7 所示, 该模型显示太平洋真宽水蚤 Cu/Zn SOD 成熟肽有 2 个明显的 α 螺旋, 以及若干 β 折叠区等组成, 模型中标出两个 α 螺旋, 4 个主要 β 折叠区, 以及 C 末端与 N 末端区。

2.4 太平洋真宽水蚤 Cu/Zn SOD 基因在重金属胁迫下的表达分析

通过 real time PCR 方法对 Ep.Cu/Zn SOD 基因在

重金属铬和镍, 及其联合胁迫下的表达情况进行检测, 以太平洋真宽水蚤 18S rRNA 基因作为内参基因, 选取正常组太平洋真宽水蚤的表达量作为参照, 每个处理下做了 3 个重复, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对表达量, 同时用 SPSS 22.0 软件进行显著性分析。实验结果表明, Ep. Cu/Zn SOD 基因在两种重金属及其联合胁迫下均有表达, 但不同时间段以及不同浓度下的表达量高低有所不同(图 8, 图 9, 图 10)。

表 5 Cu/Zn SOD 蛋白质酶切位点分析表
Tab.5 The restriction site analysis of Cu/Zn SOD

酶	酶切位点
Arg-C proteinase	3
Asp-N endopeptidase	10
Asp-N endopeptidase + N-terminal Glu	17
CNBr	4
Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P)	4
Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	26
Clostripain	3
Formic acid	10
Glutamyl endopeptidase	7
Hydroxylamine	2
LysC	6
LysN	6
NTCB (2-nitro-5-thiocyanobenzoic acid)	3
Pepsin (pH1.3)	22
Pepsin (pH>2)	22
Proteinase K	66
Staphylococcal peptidase I	6
Thermolysin	45
Trypsin	9

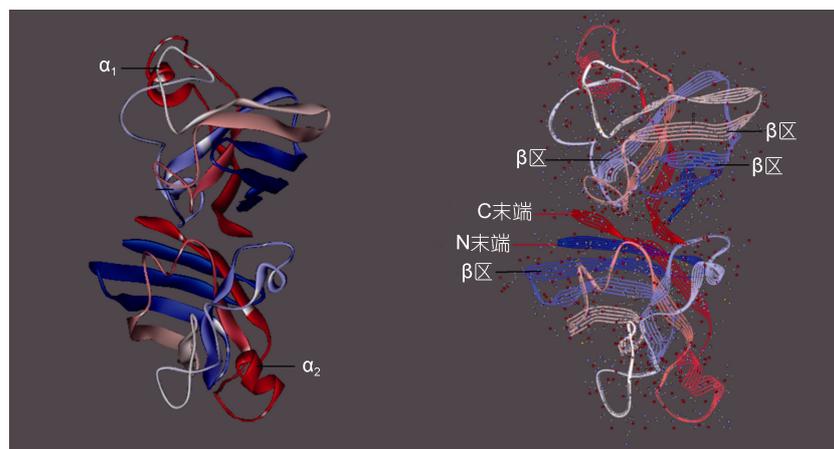


图 7 Cu/Zn SOD 蛋白质三级结构预测图

Fig.7 The 3 dimensional structures of Cu/Zn SOD domain predicted by Cn3D-4.1

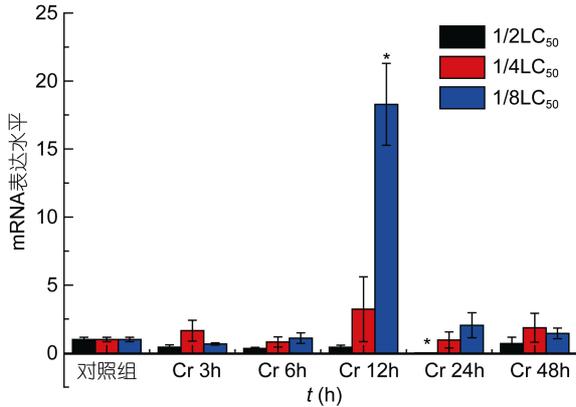


图8 铬暴露下 Ep. Cu/Zn SOD mRNA 表达量水平

Fig.8 The mRNA expression levels of Ep. Cu/Zn SOD under Cr exposure

注: 柱上线表示平均值±标准差, *表示差异显著($P < 0.05$, $n=3$)

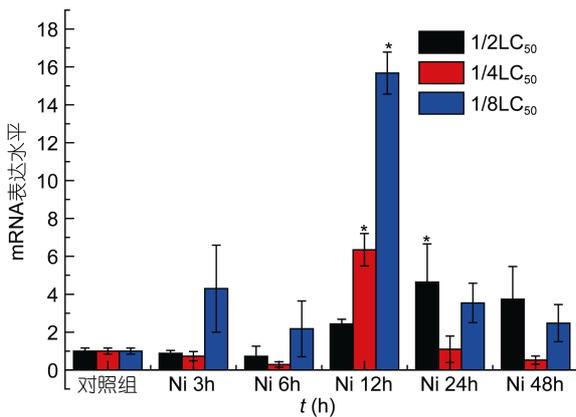


图9 镍暴露下 Ep. Cu/Zn SOD mRNA 表达量水平

Fig.9 The mRNA expression levels of Ep. Cu/Zn SOD under Ni exposure

注: 柱上线表示平均值±标准差, *表示差异显著($P < 0.05$, $n=3$)

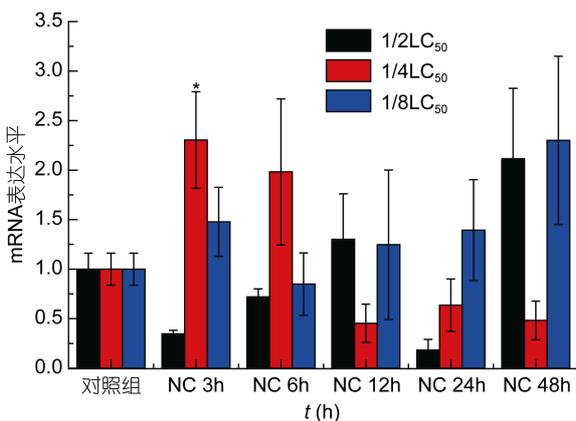


图10 铬与镍联合暴露下 Ep. Cu/Zn SOD mRNA 表达量水平

Fig.10 The mRNA expression levels of Ep. Cu/Zn SOD under Cr-Ni exposure

注: 柱上线表示平均值±标准差, *表示差异显著($P < 0.05$, $n=3$)

分析结果如下: Ep.Cu/Zn SOD 基因 mRNA 表达水平铬胁迫下 1/2LC₅₀ 各个时间段与实验对照组相比, 峰值降低, 尤其在 24 小时有显著变化, 1/4LC₅₀ 与 1/8LC₅₀ 均在 12 小时表达量达到峰值, 尤其 1/8LC₅₀ 表达特别显著(图 8); 镍胁迫下, 12 小时 1/4LC₅₀ 与 1/8LC₅₀ 低浓度表达量峰值, 24 小时 1/2LC₅₀ 高浓度达到峰值(图 9)。铬和镍联合胁迫下, 1/4LC₅₀ 浓度总体呈现先上升后下降的趋势, 在 3 小时表达量达到峰值。1/2LC₅₀ 与 1/8LC₅₀ 随着时间变化总体呈现逐步上升的趋势, 其中在 48 小时达到峰值(图 10)。Ep.Cu/Zn SOD 基因在两种重金属及其联合胁迫下表达量结果表明: 铬对 Cu/Zn SOD 表达的抑制作用要明显的高于镍, 及其两者联合; 联合胁迫明显的低于铬和镍单一胁迫, 表明两种金属有一定的相互抑制作用, 总体表现: 金属胁迫下 Ep.Cu/Zn SOD 基因在低浓度下的表达量高于高浓度下的表达量, 高浓度组金属胁迫对基因的表达抑制性较强, 表明重金属离子对 Ep.Cu/Zn SOD 表达水平的抑制率高浓度高于低浓度; 金属胁迫下, 浓度效应与时间效应趋于明显。

3 讨论

正常生物体内氧自由基的产生和清除处于动态平衡中, 在过程中会出现大量的活性氧自由基, 超出自身的清除能力因此受到伤害, 其中就有 Cu/Zn SOD 在内的抗氧化体系。本研究得到的序列共 837 个核苷酸, 编码 152 个氨基酸, 5'非编码区长 297bp, 3'非编码区长 84bp, 分子量约为 15.050kDa, 理论等电点为 5.73。常见得铜锌超氧化物歧化酶分为两种: 一种是胞外铜锌超氧化物歧化酶, 另一种是胞内铜锌超氧化物歧化酶和(Zelko *et al*, 2002)。胞外铜锌超氧化物歧化酶一般在组织细胞外的基质中存在, 存在 176—251 个氨基酸, 其中 N 末端有一小段信号肽; 胞内铜锌超氧化物歧化酶主要存在于细胞质及细胞核内(Okado-Matsumoto *et al*, 2001), 存在 147—167 个氨基酸, 且 N 末端没有发现信号肽; 通过本实验研究获取太平洋真宽水蚤铜锌超氧化物歧化酶具有 152 个氨基酸, 并且在 N 末端没有发现信号肽, 推测太平洋真宽水蚤铜锌超氧化物歧化酶为胞内铜锌超氧化物歧化酶。胞内铜锌超氧化物歧化酶最重要的特征就是相似性和保守性(胡宝庆等, 2011), 就如 4 个 Zn²⁺ 结合位点(His-61, -69, -78, Asp-81)和 4 个 Cu²⁺ 结合位点(His-44, -46, -61, -118), 其中“咪唑桥”结构的形成就是在 His-61 上 Cu²⁺ 与 Zn²⁺ 相连接构成的; Cys-55 与

Cys-144 组合为一对, 保持酶结构稳定性二硫键具有重要的影响(Ciriolo *et al.*, 2001); 它是有 2 个 α 螺旋和 8 个反向平行的 β 折叠构成 β 桶状结构(Tainer *et al.*, 1983); 两段保守的铜锌超氧化物歧化酶蛋白家族标签序列¹³⁶GNAGGRAACGVI¹⁴⁷ 和⁴²GFHIHQFGDNT⁵²; 接近相同的 C 末端尾序列(GVIGT)和 N 末端头序列(QAVCVL) (Li *et al.*, 2011), 这些都在太平洋真宽水蚤铜锌超氧化物歧化酶中全部存在。通过比较其他甲壳类动物序列表明, 太平洋真宽水蚤 Cu/Zn SOD cDNA 的氨基酸序列与其他甲壳动物的一致性较高; 存在 8 个蛋白翻译后修饰位点及蛋白家族标签序列, 无跨膜结构域与信号肽。说明, 氨基酸序列与其他甲壳动物 Cu/Zn SOD 序列的同源性较高, 存在 8 个蛋白翻译后修饰位点及蛋白家族标签序列。为了比较 Cu/Zn SOD 基因的种系发育情况, 使用 Maximum Likelihood method 法构建系统发育树, 与太平洋纺锤水蚤(*Acartia pacifica*)相似度最高, 表明亲缘关系最近; 与贝类(Shellfish)系统进化发育树聚为一簇, 与鱼类的进化关系较远。结果表现出 Cu/Zn SOD 的系统进化属内相近性相似, 推测与 Cu/Zn SOD 基因高度保守有关。

本研究通过荧光定量 PCR 法(Heid *et al.*, 1996)检测太平洋真宽体内 Cu/Zn SOD 基因在不同金属胁迫下的表达情况, 发现该基因在两种金属单一与联合胁迫下均有表达, 这是由于水中的有害物质能够造成生物体内产生活性氧分子(ROS)和氧自由基, 破坏生物体内的细胞和组织, 使氧化压力不断变化。如果细胞和组织受到严重破坏, 氧化压力超过自身机体的调节能力时, SOD 等抗氧化酶的活性不会再有变化, ROS 没有及时清除就会对机体造成不同程度损伤, 氧化压力如果连续不断或者在短时间内到达相对强度, 生物体正常代谢就会受到影响, 抗氧化酶活性就有可能降低, 甚至失去活性。当细胞和组织受到轻度破坏时, 为清理因受到污染物胁迫而新产生的 ROS, SOD 等抗氧化酶的活性就会加强, 这是机体自身正常的应激反应(王凡等, 2007; 袁晓倩等, 2007; 刘海芳等, 2009)。因此, 生物体中 SOD 活性变化规律和重金属污染物胁迫之间, 通常会共同表现出相应的时间-效应关系和浓度-效应关系, 就像重金属毒性实验中常见的先不断升高然后逐渐下降的趋势, 或者更加普遍的低浓度诱导高浓度相互抑制现象(袁晓倩等, 2007), 表明 Cu/Zn SOD 基因是一种丰度较高、表达广泛的蛋白, 且单一胁迫下均在 12 小时表达量

最高, 在研究污染物特别是重金属对生物体中 SOD 活性变化时, SOD 活性受污染物浓度以及暴露时间的长短会出现先上升然后下降的变化规律是很常见的。这就是生物体中的 SOD 在污染物暴露前期产生“毒物兴奋效应”(Stebbing 1982; 杨丽华等, 2003; 陈志鑫, 2010), 当激活 SOD 后, 诱导表现更加明显, 活性会随之变化上升, 等到暴露时间的不断变长, “毒物兴奋效应”就会消失, 受污染物影响 ROS 会不断产生, 生理机能受到损害, SOD 活性就会受到抑制。这与已知的脊椎动物以及无脊椎动物体内 Cu/Zn SOD 分布情况相类似; 联合胁迫下两种金属胁迫之间存在一定拮抗作用。在单一重金属离子组 SOD 表达量呈现出低中浓度组先升高后降低, 高浓度组先降低后升高在降低的低浓度诱导高浓度抑制的变化趋势。在某些情况下, SOD 活性变化趋势更加复杂, 这是因为实验动物的选择和个体差异、污染物的特点以及作用机理、污染物暴露浓度和取样时间的不同、实验条件等都有关联。本研究不仅是单一的重金属离子的毒性胁迫实验, 还有联合毒性胁迫, 这样使实验动物处于不同污染物的联合毒性胁迫下, SOD 活性的变化趋势相对比较复杂。研究结果表明, Cu/Zn SOD 在阻止金属毒性胁迫、保护细胞免受氧化损伤方面发挥重要作用。推测在重金属氧化损伤中, Cu/Zn SOD 基因可以有效消除过多的氧自由基, 高表达阻止和降低了细胞损伤。

现在大量研究证实了 Cu/Zn SOD 在氧化损伤等免疫防御中发挥显著作用, 但对桡足类免疫调控机制的了解资料不足; 针对太平洋真宽水蚤 Cu/Zn SOD 基因进行序列分析与表达检测, 为研究其他桡足类乃至甲壳类生物体内免疫、防御等提供了重要的参考资料。

4 结论

本研究通过 RACE 技术首次克隆获得太平洋真宽水蚤 Cu/Zn SOD 基因全长 cDNA 序列, 并对其序列生物学特征进行了分析与探讨, 采用荧光定量 RT-PCR 技术检测了重金属胁迫下 Cu/Zn SOD 基因在太平洋真宽水蚤体内的差异表达, 研究结果为进一步探讨太平洋真宽水蚤 Cu/Zn SOD 基因相关功能研究和 SOD 家族其他基因的克隆奠定基础, 为其他桡足类 Cu/Zn SOD 基因的研究及系统演化与分类系统提供借鉴; 同时为 Cu/Zn SOD 作为海洋水体污染监测与防控的有效生物标志物以及桡足类在海洋污

染指示生物中的研究价值与研究意义等提供借鉴。

参 考 文 献

- 王 凡, 赵元凤, 刘长发, 2007. Cu^{2+} 对牙鲆肌肉抗氧化防御系统的影响. 淡水渔业, 37(2): 27—29
- 刘海芳, 王 凡, 2009. 重金属对水产动物污染的生物标志物的研究进展. 水产科学, 28(5): 299—302
- 杨丽华, 方展强, 郑文彪等, 2003. 镉对鲫鱼鳃和肝脏超氧化物歧化酶活性的影响. 安全与环境学报, 3(3): 13—16
- 陈志鑫, 2010. Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 对中华哲水蚤(*Calanus sinicus*)总超氧化物歧化酶(T-SOD)及线粒体COI基因影响的初步研究. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 20—22
- 郝清梅, 温茹淑, 韩春艳等, 2014. 草鱼铜锌超氧化物歧化酶全长 cDNA 的克隆与组织表达. 基因组学与应用生物学, 33(6): 1236—1246
- 胡宝庆, 谢彦海, 王新生等, 2011. 褶纹冠蚌胞内 Cu/Zn-SOD 的 cDNA 克隆及蛋白质三维结构预测. 华中农业大学学报, 30(2): 235—242
- 赵元凤, 吕景才, 李丹彤等, 2003. 海洋污染对毛蚶超氧化物歧化酶影响的研究. 海洋学报, 25(3): 77—82
- 袁晓倩, 许晓路, 申秀英, 2007. 三丁基锡对水生生物毒理学影响的研究进展. 浙江师范大学学报(自然科学版), 30(3): 326—330
- Amano A, Shizukuishi S, Tsunemitsu A *et al*, 1990. The primary structure of superoxide dismutase purified from anaerobically maintained *Bacteroides gingivalis*. FEBS Letters, 272(1-2): 217—220
- Arhontaki K, Eliopoulos E, Goulielmos G *et al*, 2002. Functional constraints of the Cu, Zn superoxide dismutase in species of the *Drosophila melanogaster* subgroup and phylogenetic analysis. Journal of Molecular Evolution, 55(6): 745—756
- Bodył A, Mackiewicz P, 2007. Analysis of the targeting sequences of an iron-containing superoxide dismutase (SOD) of the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* suggests function in multiple cellular compartments. Archives of Microbiology, 187(4): 281—296
- Chary P, Hallewell R A, Natvig D O, 1990. Structure, exon pattern, and chromosome mapping of the gene for cytosolic copper-zinc superoxide dismutase (sod-1) from *Neurospora crassa*. The Journal of Biological Chemistry, 265(31): 18961—18967
- Ciriolo M R, Battistoni A, Falconi M *et al*, 2001. Role of the electrostatic loop of Cu, Zn superoxide dismutase in the copper uptake process. The FEBS Journal, 268(3): 737—742
- Fattman C L, Schaefer L M, Oury T D, 2003. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. Free Radical Biology and Medicine, 35(3): 236—256
- Fridovich I, 1986. Superoxide dismutases. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, 58(6): 61—79
- Gressler V, Yokoya N S, Fujii M T *et al*, 2010. Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. Food Chemistry, 120(2): 585—590
- Hansen B H, Rømme S, Garmo Ø A *et al*, 2006. Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 143(3): 263—274
- Heid C A, Stevens J, Livak K J *et al*, 1996. Real time quantitative PCR. Genome Research, 6(10): 986—994
- Li J M, Su Y L, Gao X L *et al*, 2011. Molecular characterization and oxidative stress response of an intracellular Cu/Zn superoxide dismutase (CuZn SOD) of the whitefly, *Bemisia tabaci*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 77(3): 118—133
- Lin M, Lin M T, Lin C T, 2002. Copper/zinc-superoxide dismutase from lemon cDNA and enzyme stability. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(25): 7264—7270
- Nahrgang J, Camus L, Carls M G *et al*, 2010. Biomarker responses in polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to the water soluble fraction of crude oil. Aquatic Toxicology, 97(3): 234—242
- Okado-Matsumoto A, Fridovich I, 2001. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver Cu, Zn-SOD in mitochondria. Journal of Biological Chemistry, 276(42): 38388—38393
- Putnam C D, Arvai A S, Bourne Y *et al*, 2000. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. Journal of Molecular Biology, 296(1): 295—309
- Shen J, Subramaniam S, Wong C F *et al*, 1989. Superoxide dismutase: fluctuations in the structure and solvation of the active site channel studied by molecular dynamics simulation. Biopolymers, 28(12): 2085—2096
- Stebbing A R D, 1982. Hormesis—the stimulation of growth by low levels of inhibitors. Science of the Total Environment, 22(3): 213—234
- Tainer J A, Getzoff E D, Richardson J S *et al*, 1983. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. Nature, 306(5940): 284—287
- Whitfield A K, Elliott M, 2002. Fishes as indicators of environmental and ecological changes within estuaries: a review of progress and some suggestions for the future. Journal of Fish Biology, 61(SA): 229—250
- Zelko I N, Mariani T J, Folz R J, 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Free Radical Biology and Medicine, 33(3): 337—349

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF Cu/Zn SOD GENE OF *EURYTEMORA PACIFICA* UNDER METAL STRESS

HU Li-Teng, XIA Li-Ping, WU Min-Min, CHEN Jin, ZHANG Jian-She

(Marine Science College of Zhejiang Ocean University, National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Zhoushan 316022, China)

Abstract Copper zinc superoxide dismutase (SOD) is one of the important antioxidant enzymes widely existing in organisms, and plays an important role in preventing excessive reactive oxygen species from poisoning the organism. In this study, *Eurytemora pacifica* was used as the research subject, and the full-length cDNA sequence of Cu/Zn SOD gene was obtained by RT-PCR and RACE methods. The full-sequence of Cu/Zn SOD (GenBank accession number: MF289343) was 837bp, the complete open reading frame of 456bp encoding 152 amino acids, 5'- 3' non encoding region of 297bp encoding region of 84bp, the molecular weight of 15.050kDa and isoelectric point of 5.73. Sequence comparison indicated high consistency between the amino acid sequences of Cu/Zn SOD cDNA with other crustacean animal; there are 8 protein post-translational modification and protein family sequence tagged sites, no signal peptide and transmembrane domain. Cu/Zn SOD mRNA expression analysis of *E. pacifica* under chromium or nickel stress showed that the value of Cu/Zn SOD increased first and then decreased, and reached a peak in 12 hours. The expression in chromium stress is slightly higher than that in nickel stress. In addition, under nickel-chromium joint stress, it showed antagonistic effect. The results could be helpful to explore the structure and function of the copepod Cu/Zn SOD gene, and to offer theoretical basis for studying the molecular mechanism of antioxidant.

Key words copper zinc superoxide dismutase; *Eurytemora pacifica*; gene cloning; metal stress; RT-PCR