

甘薯叶片超氧化物歧化酶基因克隆及测序^{*}

黄明

(广西师范大学生物系, 桂林 541004)

郑学勤 邵寒霜

(热带作物生物技术国家重点实验室, 儋州 571737)

摘要 以甘薯 (*Ipomoea batatas* (L.) Poir) 叶为材料提取植物总 RNA, 经反转录后, 利用多聚酶链式反应技术, 扩增并克隆超氧化物歧化酶基因的 cDNA, 并进行测序分析。该序列全长 482 bp, 其读码框编码 152 个氨基酸, 与国外文献报道的甘薯块根 SOD 基因的 cDNA 序列相比, 具有 99% 的同源性。

关键词 超氧化物歧化酶基因; 序列; 多聚酶链式反应; 甘薯

Cloning and sequencing of a cDNA encoding SOD gene from sweet potato leaf

Huang Ming

(Biology Department, Guangxi Normal University, Guilin 541004)

Zheng Xueqin Shao Hansuan

(National Key Biotechnology Laboratory for Tropic Crops, Danzhou, 571737)

Abstract The total RNA extracted from sweet potato (*Ipomoea batatas*) leaf is reverse transcribed to cDNA. And then a cDNA encoding sweet potato SOD is cloned by PCR technique. Sequencing data shows that the cloned cDNA contains an intact region of sweet potato SOD gene which is 459 bp in length, encoding 152 amino acids. The SOD gene sequence is of 99 percent homology with that from sweet potato tuberous root.

Key words SOD gene; PCR; sequence; sweet potato

超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase 简称 SOD) 是一类广泛存在于生物体内的金属酶。能够催化超氧阴离子 (O_2^-) 发生歧化反应, 从而专一性地清除生物体内的超氧阴离子, 平衡机体组织细胞中的自由基, 在机体衰老、肿瘤发生、自身免疫、辐射防护、抗逆等方面起着重要的作

1997-12-25 收稿

第一作者简介: 黄明, 男, 1962 年出生, 博士生, 主要从事植物分子生物学研究。

* 国家重点实验室基金资助项目

用^[3]。

国内外对 SOD 基因的研究集中于从微生物、动物和人体血液中克隆的 SOD 基因。而植物 SOD 基因的研究刚刚起步, 仅只克隆出几个基因^[1, 4, 6, 7]。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为华南热带农业大学校园内栽培甘薯 (*Ipomoea batatas* (L.) Poir) 的幼嫩叶片。AMV 逆转录酶、各种限制性内切酶、PCR 产物纯化试剂盒、克隆载体 pGEM-T Vector System 和 DNA 序列测定试剂盒均为 Promega 公司产品; 异硫氰酸胍、焦碳酸二乙酯 (DEPC) 和 3-N-吗啡丙磺酸 (MOPS) 为 Fluka 公司产品; PCR Kit 及其余药品购自上海华美生物工程公司。受体菌 DH5 α 由热带作物生物技术国家重点实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 甘薯叶片总 RNA 的提取 按文献^[6]方法稍作改进后进行。提取 RNA 所用的玻璃器皿均经 0.5% DEPC (焦碳酸二乙酯) 水溶液浸泡, 37 °C 温育过夜, 倾液后高压灭菌, 再置烘箱中 160 °C 烘烤 4 h。所用溶液均用经 DEPC 处理过的无菌水配制。

提取的 RNA 样品, 用紫外分光光度计测 230 nm、260 nm、280 nm 波长处的光吸收值, 判断其纯度和含量, 并通过甲醛变性电泳检查样品 RNA 的完整性。符合要求的 RNA 样品置 -70 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 cDNA 第一链的合成 取一个干净的 0.5 ml Eppendorf 管, 依次加入 RNA 5 μ l (约 100 μ g) 和 oligo (dT)₁₅ 3 μ l, 置 65 °C 水浴 5 min, 取出冷却至室温。再向其中加入 5 \times reaction buffer 5 μ l, dNTPs 5 μ l, RNasin 1 μ l, AMV 反转录酶 25U, 补水至总体积 25 μ l。混匀后于 42 °C 水浴 90 min, 转入 95 °C 水浴 10 min, 冰上放置 5 min。最后于 -20 °C 冰箱保存备用。

1.2.3 PCR 扩增 参考甘薯块根等 SOD 基因的 cDNA 序列^[1, 4, 7]设计引物, 并由中国科学院上海生物化学研究所 DNA 合成仪上合成。引物序列为:

5' 端引物: 5'-TCGGATCCAAAAATGGTGAAGGCTGTCGCA...3'

3' 端引物: 5'-AAGTGCACACCTTAACCCTGCAGGCCAAT...3'

取 cDNA 第一链为模板, 按华美公司提供的产品使用说明书要求进行 PCR 反应。反应总体积为 50 μ l。反应条件为: 95 °C 变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 30 个循环。72 °C 条件下 10 min 后, 置 -20 °C 冰箱保存。

1.2.4 PCR 扩增产物的纯化 按纯化试剂盒说明书进行操作。

1.2.5 PCR 产物的克隆

(1) PCR 产物与 T-载体的连接 按 T-载体说明书进行操作。总体积为 10 μ l。4 °C 冰箱中过夜连接。

(2) DH5 α 感受态细胞的制备 按分子克隆实验指南^[2]上的方法, 用 CaCl₂ 制备新鲜感受态细胞。

(3) 转化 取 2 μ l 连接产物, 加入含 60 μ l 感受态细胞的 1.5 ml Eppendorf 管中, 冰上静置 20 min, 42 °C 热冲击 1.5 min, 冰上速冷 2 min。向管中加入不含抗生素的 LB 培养基 800 μ l, 37 °C 200 rpm 条件下摇培 1 h。

取 100 μ l 上述转化细菌, 均匀涂布于已涂有 X-gal 和 IPTG 的含氨苄青霉素的 LB 平板中,

倒置于37 °C温箱培养过夜。

(4) 重组子的筛选鉴定 挑取转化平板上的白色菌落, 接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中于37 °C摇床上培养 12 h 以上。用碱裂解法提取质粒 DNA, 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析, 初步选出重组质粒。进一步进行酶切分析, 确定含目的片段的重组质粒。



图 1 PCR 产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳

1. PCR marker 2. 3. 不同引物浓度的 PCR 产物

Fig. 1 1% Agarose gel electrophoresis of PCR products

1. PCR marker 2. 3 PCR products amplified by primers of different concentrations

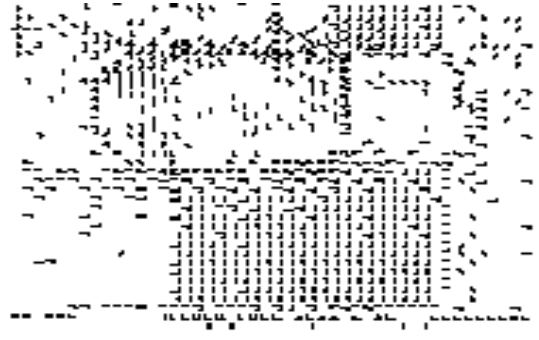


图 2 PCR 纯化产物的 1.2% 琼脂糖凝胶电泳

1. PCR marker 2. PCR 纯化产物

Fig. 2 1.2% Agarose gel electrophoresis of purified PCR products

1. PCR marker 2. purified PCR products

1.2.6 PCR 产物序列测定

按分子克隆实验指南^[2]上的方法大量制备含 PCR 产物片段的重组质粒 DNA。经乙二醇沉淀后, 于 ABI 公司生产的 377 型 DNA 自动测序仪上进行序列测定。按试剂盒说明操作。

2 结果与讨论

2.1 结果

(1) 经琼脂糖凝胶电泳分析, PCR 产物是一长约 480 bp 的 DNA 片段, 特异性很强 (图 1、2)。

(2) 重组质粒 DNA 经 EcoRI 酶切鉴定见图 3。T-载体的末端各含有一个 EcoRI 位点, 经 EcoRI 酶切后, 重组质粒 DNA 中的外源片段即可被切下。

3) 序列测定结果见图 4。图中包括克隆基因的核苷酸序列和由此推导的编码氨基酸序列。



图 3 重组 pGEM-T 质粒 EcoRI 酶切图谱

1, 3. 含有外源 SOD 基因片段的重组质粒 2. 不含外源 SOD 基因片段的重组质粒 4. PCR marker

Fig. 3 Electrophoresis spectrum of recombinant plasmid pGEM-T digested with EcoRI

1, 3. recombinant plasmids containing SOD gene fragment 2. recombinant plasmids containing no SOD gene fragment 4. PCR marker

```

1  TCGGATCCAAAAATGGTGAAGGCTGTGCGAGTTCTTAGCAGCAGTGAAGGTGTCAGCGGC
1      M V K A V A V L S S S E G V S G
61 ACCATTTTCTTCAAGCCAAGAAGGAGATGGTCCAACCACAGTCACTGGAAACGTTTCGGGC
17  T I F F S Q E G D G P T T V T G N V S G
121 CTCAAACCTGGTCTTTCATGGCTTCCATGTCCATGCCCTAGGTGACACAACAAACGGATGC
37  L K P G L H G F H V H A L G D T T N G C
181 ATGTCTACTGGACCACATTTCAATCCTGCTGGAAAGGAGCATGGAGCTCCTGGAGACGAT
57  M S T G P H F N P A G K E H G A P G D D
241 AACC GCCATGCCGGTGATCTTGGAAACATCACGGTTGGAGAAGATGGAAGCTTCAATC
77  N R H A G D L G N I T V G E D G T A S I
301 ACCATCACTGACAAGCAGATTCGCGTTACTGGAGCAAATTCATTATTGGAAGAGCTGTT
97  T I T D K Q I P L T G A N S I I G R A V
361 GTTGTTTCATGGTGATCCCGATGATCTTGGTAAAGGTGGCCATGAGCTCAGCAAAAGCACT
117 V V H G D P D D L G K G G H E L S K S T
421 GGAAATGCTGGCGGGAGGGTTGCCTGCGGTATCATTGGCCTGCAGGGTTAAGGTGTGAC
137 G N A G G R V A C G I I G L Q G *
481 TT

```

图4 甘薯叶片 SOD 基因的核苷酸序列和推导的编码蛋白质的氨基酸序列

Fig. 4 Nucleotide sequence of sweet potato leaf SOD cDNA and the deduced amino acid sequence

2.2 讨论

所克隆的基因包含起始密码子和终止密码子。根据阅读框核苷酸序列推导的编码蛋白质氨基酸 152 个, 该蛋白质分子量约为 16.5 kD。这与从植物组织中提取到的 Cu/Zn-SOD 分子的单体分子量相比。与来源于甘薯块根的 SOD 的 cDNA 序列比较, 具有 98.9% 的核苷酸序列同源性和 98.7% 的编码蛋白的氨基酸序列同源性。

参考文献

- 1 王宇光. 西红柿 Cu/Zn SOD 基因分离克隆和测序研究. 热带作物学报, 1994 (增刊), 15: 71~74
- 2 金冬雁等译. 分子克隆实验指南 (第二版). 北京: 科学出版社, 1992
- 3 袁勤生. 超氧化物歧化酶的研究进展. 中国药理学杂志, 1989, 24 (7): 387~391
- 4 Lin C T, et al. Cloning and characterization of a cDNA encoding the cytosolic copper/zinc-superoxide dismutase from sweet potato tuberous root. *Plant Mol. Biol.*, 1993, 23 (4): 911~913
- 5 Logemann J, Schell J, Wilmitzer L Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry*. 1987, 163: 16~20
- 6 Maria Tera Carri Xenopus laevis Cu/Zn-SOD B cDNA sequence. *Nucleic Acid Research*, 1990, 18 (16): 1641
- 7 Rafael Ped-Treves. Isolation of two cDNA clones from tomato containing two different superoxide dismutase sequence. *Plant Mol. Biol.* 1988, 11: 609~623