

浒苔中 MnSOD 和 CAT 基因克隆和表达分析

范美华^{1,2}, 孙 雪¹, 王日昕¹, 廖 智², 徐年军^{1*}

(1. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211;

2. 浙江海洋学院海洋科学与技术学院, 浙江 舟山 316022)

摘要: 实验以大型绿藻浒苔为材料, 克隆了其抗氧化系统关键酶锰超氧化物歧化酶 (manganese superoxide dismutase, MnSOD) 和过氧化氢酶 (catalase, CAT) 基因的部分片段, 利用荧光定量 PCR 技术研究了 MnSOD 和 CAT 对温度和水杨酸作用的响应规律。结果获得浒苔 318 bp 的 MnSOD 基因, 该 MnSOD 推测的氨基酸序列与裂片石莼 MnSOD 相似性最高为 89%; 获得了 229 bp 的 CAT 基因, 该浒苔 CAT 编码氨基酸序列与裂片石莼和雨生红球藻 CAT 序列相似性分别为 99% 和 93%。在利用 MnSOD 和 CAT 氨基酸序列构建的系统树中, 浒苔均先与裂片石莼聚类, 再与其他绿藻聚在一起。不同温度对浒苔 MnSOD 和 CAT 基因表达影响表明, 35 °C 高温培养对浒苔 MnSOD 和 CAT 基因表达影响最显著, 其表达量分别为 25 °C 培养的 2.18 倍和 2.05 倍; 5 °C 低温培养次之; 而 15 °C 与 25 °C 培养对 MnSOD 和 CAT 基因表达影响差异不显著 ($P > 0.05$)。在高温 35 °C 下, 添加 0.1 mmol/L 水杨酸后 MnSOD 和 CAT 基因表达量分别为各自对照的 2.08 倍和 5.30 倍, 而 0.01 mmol/L 水杨酸添加后基因表达与对照差异不显著 ($P > 0.05$)。研究表明, MnSOD 和 CAT 基因表达的增强不仅是浒苔对高温胁迫的响应, 而且也是水杨酸缓解高温对浒苔不利影响的方式之一。

关键词: 浒苔; MnSOD; CAT; 水杨酸; 高温胁迫

中图分类号: Q 785; S 968.4

文献标志码: A

近年来, 以浒苔 (*Ulva prolifera*) 为主的绿潮频繁爆发, 在欧洲、美国、澳大利亚等地都有过报道。绿潮的爆发与各种生物和非生物因素的影响密切相关。非生物因素主要包括营养盐、温度、盐度和光照辐射等, 对藻类的生长、生理生态及分子机制等都有很大的影响^[1-3]。超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和过氧化氢酶 (catalase, CAT) 具有清除体内氧自由基的功能, 在植物抗氧化、抗逆等方面起着关键的防御作用。如 Dohler^[4] 等研究表明一些藻类受到紫外线照射和温度胁迫后, 其体内的锰超氧化物歧化酶 (manganese superoxide dismutase, MnSOD) 会被诱导并高度表达。Lewis^[5] 等报道石莼 (*Ulva sp.*) 在受到除草剂和紫外线照射后, MnSOD 和

铁超氧化物歧化酶 (iron superoxide dismutase, FeSOD) 都受到了诱导, 不同的胁迫方式致其 SOD 的表达水平不同。高温是植物生长过程中经常遇到的不利因素, 海带 (*Laminaria japonica*) 配子体处于 30 °C 时, MnSOD mRNA 表达量最高, 是 10 °C 时的 3 倍^[6]。钝顶节旋藻 (*Arthrospira platensis*) 在高温条件下培养藻体生长减缓, SOD 和 POD 活性增强^[7]。

水杨酸作为一种植物激素, 能提高植物抗旱、抗寒害、抗盐害、抗重金属的能力^[8-9]。水杨酸可以显著提高菊花江蓠 (*Gracilaria lichenoides*) 在低温环境的生存状态^[10]。一定浓度水杨酸的添加可以提高高温培养龙须菜 (*Gracilariopsis lemaneiformis*) 的生长速率, 高温

收稿日期: 2014-05-12 修回日期: 2014-10-24

资助项目: 国家自然科学基金 (40876073; 41276122); 国家教育部博士点基金 (20123305110002)

通信作者: 徐年军, E-mail: xunianjun@nbu.edu.cn

环境诱导 HSP 热激蛋白的表达^[11]。水杨酸在很大程度上可以通过增加抗氧化机制来缓解盐诱导的光合能力的降低^[12]。

浒苔隶属绿藻门 (Chlorophyta)、绿藻纲 (Chlorophyceae)、石莼目 (Ulvales)、石莼科 (Ulvaaceae), 是一类广温、广盐、耐干性的大型海藻。浒苔自然繁殖能力较强, 在我国近海分布较为广泛, 属黄海与东海海域优势种。浒苔在生长过程中不可避免地会遇到高温、低温和紫外线等不良环境, 其适应机制的研究显得至关重要。浒苔中抗氧化酶 MnSOD 和 CAT 基因的克隆和水杨酸对浒苔不良环境胁迫下抗逆性基因的作用未见报道。本研究以浒苔为材料, 克隆了浒苔的 MnSOD 和 CAT 的部分基因片段, 并运用荧光定量技术研究了不同温度和水杨酸的添加对浒苔 MnSOD 和 CAT 基因表达的影响, 为揭示 MnSOD 和 CAT 在浒苔抗逆胁迫方面的变化规律及水杨酸抗逆机制提供实验支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

浒苔于 2012 年 12 月采自宁波象山黄避岙乡高泥村附近滩涂 (29°32.803N, 121°45.599E)。采集后洗净, 先刷掉附着生物和杂藻, 再用 0.2% KI 消毒 10 min 后用无菌海水冲洗。取处理后新鲜浒苔放在 Provasoli 培养基中培养。在 25 °C、光照强度 18 μmol/(s·m²)、光照周期 12L:12D 的光照培养箱中暂养 4 周以上。

大肠杆菌 DH5α 菌株、pMD-18-T 载体、OMEG plant RNA KIT、Prime script RT reagent kit、DNA marker (100 ~ 2 000 bp)、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Tli RNaseH Plus) kit 购自宝生物 (上海) 有限公司。Genclean 柱式琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自上海捷瑞公司。

1.2 实验方法

简并引物的设计与合成 根据 NCBI 数据库中莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*, ACV41091)、小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*, ABA71697)、裂片石莼 (*U. fasciata*, ABR23158 和 ABR23160) 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, AEE74977) 等的 MnSOD 序列来设计浒苔 MnSOD 引物。根据莱茵衣藻 (ABB70006)、团藻 (*Volvox carterif. nagariensis*, EFJ48656)、雨生红

球藻 (*Haematococcus pluvialis*, ABK41476)、裂片石莼 (ABB88582)、拟南芥 (CAB80226) 和玉米 (*Zea mays*, CAA38588) 的 CAT 序列来设计浒苔 CAT 引物。用 ClustalX1.83 进行比对, 找保守序列, 再通过 Codehop 软件设计修改简并性引物序列 SOD-F1、SOD-R1、CAT-F1 和 CAT-F2 (表 1)。引物合成及序列测定由上海英骏生物技术有限公司 (Invitrogen) 完成。

MnSOD 和 CAT 基因片段的 PCR 扩增 用 OMEG plant RNA 试剂盒提取新鲜浒苔的总 RNA。用 Prime script RT reagent kit 反转录试剂盒将 1 μg RNA 反转录合成第一链 cDNA。以该 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应体系: 10 × PCR buffer 2.5 μL, MgCl₂ 1.5 μL, dNTP mix 2 μL, 5 U/L Taq 酶 0.125 μL, 10 μmol/L 引物各 1 μL, 100 ng/μL DNA 模板 1.25 μL, 加无菌水定容至 25 μL。SOD PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 45 s 进行 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。CAT PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 60 s 进行 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。

SOD 和 CAT 扩增产物回收与测序 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, Genclean 柱式琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的片段, 连接至 pMD-18-T 载体, 连接产物热激转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。将经过 PCR 验证的阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序。

序列分析 序列分析首先使用 NCBI 的 VecScreen 程序去除测序片段中的载体序列, 利用 BLAST 程序进行同源性搜索 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), 用 Mega 5.0 软件进行多序列比对和构建邻接系统进化树 (Neighbor-Joining, NJ), 用 ClustalW 软件进行氨基酸同源比对。

MnSOD 和 CAT 基因的表达定量 不同温度处理: 分别设置 5 °C、15 °C、25 °C 和 35 °C 四个温度组, 各取 1.0 g 新鲜浒苔于不同温度培养箱中培养, 光照强度 18 μmol/(s·m²), 光照周期 12L:12D。培养 24 h 后, 收集藻体, 放置 -80 °C 备用。每个处理 3 个重复。

不同水杨酸处理: 分别取 1.0 g 新鲜浒苔放在 0、0.01 和 0.1 mmol/L 水杨酸的培养基中, 在 35 °C 的条件下培养 24 h 后收集藻体于 -80 °C 保

存备用。每个处理 3 个重复。

根据测序获得的核心片段,设计荧光定量的特异性引物 SOD-F2、SOD-R2、CAT-F2 和 CAT-R2 (表 1)。 β -actin 基因做内参,根据 β -actin cDNA 序列(FJ775527)的保守序列设计引物 β -actin-F 和 β -actin-R 引物序列(表 1)。实时荧光定量 PCR 采用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Tli RNaseH Plus) 试剂盒。SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 12.5 μ L, PCR 正向引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, DNA 模板

2.0 μ L,加 DEPC-H₂O 至 25 μ L。RT-PCR 程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,55 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 20 s,40 个循环;PCR 结束后扩增产物进行熔解曲线分析 95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 15 s,95 $^{\circ}$ C 15 s(1 个循环)。为保证 PCR 结果的准确性,每一个样品重复分析 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对相对定量的结果进行分析,获得浒苔基因的相对表达量。采用 SPSS 13.0 软件的单因素方差分析检测各组间的显著性差异,当 $P < 0.05$ 为存在差异显著。

表 1 浒苔 MnSOD 和 CAT 基因克隆和荧光定量所用引物
Tab.1 Primer sequences of clone and quantitative RT-PCR for MnSOD and CAT

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequences	片段长度 segment length
SOD-F1	5'-CGCGATCCACTTCAACGGNGGNGNCA-3'	321
SOD-R1	5'-GGTAGTAGGCGTGCTCCCANACRTC-3'	
CAT-F1	5'-GCCAAGGGCTTCTTYGARGTNAC-3'	229
CAT-R1	5'-GCGGATGAAGAACACGGGVAVWRTRTT-3'	
SOD-F2	5'-GCGTGCTCCAGACATCA-3'	120
SOD-R2	5'-ACTGGACGGCTGGCGATT-3'	
CAT-F2	5'-CAAGGGCTTCTTCGAGGTGA-3'	105
CAT-R2	5'-GAACTCACCGCAAAGCCAC-3'	
β -actin-F	5'-AGGATGCATACGTTGGTGAA-3'	118
β -actin-R	5'-TTGTGGTGCCAAATCTTCTC-3'	

2 结果

2.1 RNA 的提取及 MnSOD 和 CAT 基因的扩增

提取的浒苔总 RNA 电泳结果中,28SRNA 和 18SRNA 条带清晰,没有降解,也无蛋白质和 DNA 污染。OD260/OD280 在 1.8 和 2.0 之间,说明 RNA 的纯度比较高,可以用于反转录。利用简并引物进行 PCR 扩增,电泳中可见在 250 bp 左右的基因片段(图 1)。

将测序得到的浒苔 MnSOD,去除载体序列,得到 318 bp 的核苷酸片段,从第 3 个碱基开始编码共 105 个氨基酸残基(NCBI 登录号为 KJ095585)。在 NCBI 数据库中经 BLAST 比对,核苷酸序列片段与裂片石莼(EF437244)的 MnSOD 的同源性达到 80%,E-value:9e-74。测序得到的 CAT 片段长 229 bp,编码 76 个氨基酸(NCBI 登录号为 KJ095586)。经 BLAST 比对与裂片石莼(LDQ286544)CAT 核苷酸序列同源性高达 83%,与雨生红球藻(EF043383)和莱茵衣藻(AF016902)CAT 核苷酸序列同源性分别为 82% 和 80%。

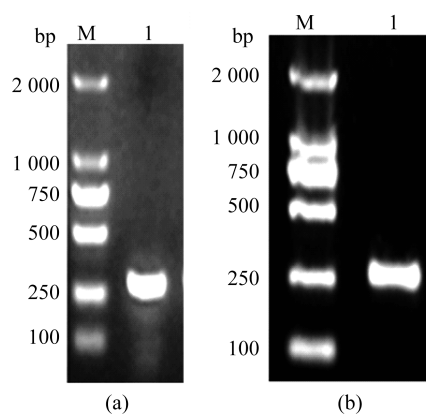


图 1 浒苔 MnSOD(a) 和 CAT(b) PCR 扩增产物电泳图
(a) M. DL2000 DNA 分子量标准; 1. MnSOD 扩增产物; (b) M. DL2000 DNA 分子量标准; 1. CAT 扩增产物

Fig.1 The electrophoresis pattern of PCR products of MnSOD and CAT from *U. prolifera*

(a) M. DL2000 Marker; 1. MnSOD PCR product; (b) M. DL2000 Marker; 1. CAT PCR product

2.2 不同物种 MnSOD 和 CAT 基因的氨基酸序列同源分析

利用 ClustalW 和 Mega 5.0 对浒苔的 MnSOD 氨基酸序列与其他 7 种植物的 MnSOD 氨基酸序

列进行多序列比对(图2)。浒苔 MnSOD 氨基酸序列与裂片石莼 MnSOD 氨基酸序列同源性最高为 89%,其次与细小微胞藻(*Micromonas pusilla*)和衣藻(*Chlamydomonas sp.*)的同源性达 66% 与 65%,与盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*)的同源性达 53%。MnSOD 氨基酸的多序列比对中 GGGH、NHS、FGS、GSGW、NQD 和 DVWEHAYY 连续序列的保守性强(图2)。利用 ClustalW 和 Mega 5.0 对浒苔的 CAT 氨基酸序列与其他 7 种植物的 CAT 进行多序列比对(图3)。浒苔的 CAT 氨基酸序列

与裂片石莼 CAT 的同源性达 99%,只有第 70 个 AA 的 L 被 M 所代替。浒苔的 CAT 氨基酸序列与雨生红球藻同源性达 93%,只有第 30、37、46 和 70 处的 A、I、I 和 L 分别被 I、V、L 和 M 代替。CAT 氨基酸序列与玉米的同源性达 92%,第 12、30、46、63、65 和 70 处的 S、A、I、Y、M 和 L 分别被 T、I、L、W、L 和 F 取代。与莱茵衣藻、拟南芥的同源性也比较高。CAT 氨基酸的多序列比对中 AKGFFEVT、PGVQTPV、VRFSTV、HERGSPET 和 RDPRGFAVKFYTREGN 连续序列的保守性强。

```

Ulva prolifera -----
Ulva fasciata MACSQLSRCSAA---WRQSLARGASTFPAGADVSLPDLPEYSALPEYISAEIMELHH 56
Zea mays MALRTLASKKVLSPFPFGGAGRPLAAAASARGVTTVTLPDLSYDFGALEPAISGEIMRLHH 60
Oryza sativa MALRTLASRKTL---AAAALPLAAAAARGVTTVALPDLPYDYGALPEPAISGEIMRLHH 56
Arabidopsis thaliana MAIRCVASRRTL---AGLKETSSRLRLRIRGIQTFTLPDLPYDYGALPEPAISGEIMQIHH 56
Micromonas pusilla -MLRSTASRLAS-----RIGTVASSRTLVTAKLPDLAYDYGALPEPIVSGEIMQLHH 50
Dunaliella salina -----MAFVLPNLPYAPDALEPYVDTTMTIHH 28
Chlamydomonas sp -----MPYDLPALPYGAELEPYVDATMTNIHH 28

Ulva prolifera -----IHFNGGGHNLNHSIFW 15
Ulva fasciata SKHHQAYVTNYNKALEQWAESESK-----QDAVSAPKISSALHFNGGGHNLNHSIFW 107
Zea mays QKHHATYVANYNKALEQLETAVSK-----GDASAVVQLQAAIKFNGGGHVNHSIFW 111
Oryza sativa QKHHATYVANYNKALEQLDAVAK-----GDAPAIVHLQSAIKFNGGGHVNHSIFW 107
Arabidopsis thaliana QKHHQAYVTNYNKALEQLDQAVNK-----GDASTVVKLQSAIKFNGGGHVNHSIFW 107
Micromonas pusilla AKHHNTYVTNFNLAKEYAEAEAR-----GDYSTMISLQGAIKFNGGGHVNHSIFW 101
Dunaliella salina GKHHATYVNVNNALEKFPKMSLGIVDLKNKAVGTDALPKAIATTVRNNGGGHFNHSFFW 88
Chlamydomonas sp TKHHQAYVTALNGAMDKFPELASLGLADLNKSVGTDKIPKDIATVIRNNGGGHWNHSFFW 88
:::**** **:*

Ulva prolifera KNLCPAKD--AHPCSGNLLDAIKRDFGSMELQSKLSAESAAVQSGGWGLACKRETGRL 73
Ulva fasciata KNLCPAKD--AQPCSGNLLDAIKRDFGSMQQLQTKLAADAAAVQSGGWGLVCKRETGRL 165
Zea mays KNLKPISEGGGPPHKGKLGWAIDEDFGSFEALVKKMNAEGAAFQSGGWVWLLALDKEAKKV 171
Oryza sativa NNLKPISEGGGPPHAKLGAIDEDFGSFEALVKKMSAEGAAALQSGGWVWLLALDKEAKKL 167
Arabidopsis thaliana KNLAPSEGGGPPKGLSGLSAIDAHFGSLEGLVKKMSAEGAAVQSGGWVWLLDKEAKKL 167
Micromonas pusilla KNLAPPKD--CEPPSGELLSMINRDFGSELEKLDKFSQAVTAVQSGGWGLNKAATGKL 159
Dunaliella salina KVMTKPSN--SNGPSAELKAAIDKAFGSEAMKEKFNAAAAGRFSGGWAWLGVKADG-SL 145
Chlamydomonas sp KVMTAPSD--TNGASTELKAAIDSAFGSDEMKTFFNAAAASRFSGGWAWLGVKADG-SL 145
: : .: . * * . *** : : * : * .. **** ** . :

Ulva prolifera AIITSANQD-TVAVHAPG-LDPILGIDVWEHAYY----- 105
Ulva fasciata AIMTSPNQD-TVAVHAPG-FHPILGIDVWEHAYYLQYKNVRPDYLKAIWNVINWQDAAAR 223
Zea mays SVETTANQD-PLVTKGAS-LVPLLGIDVWEHAYYLQYKNVRPDYLNINWKMVWYAGEV 229
Oryza sativa SVETTANQD-PLVTKGAN-LVPLLGIDVWEHAYYLQYKNVRPDYLSNIWKMVWYAGEV 225
Arabidopsis thaliana VVDTTANQD-PLVTKGGS-LVPLVGIDVWEHAYYLQYKNVRPEYLNKVNWVWVWYASEV 225
Micromonas pusilla AIATTANQD-PCVTG---LTPLLGVDVWEHAYYLQYKNVRPDYVNAIWNVWVWYVAAN 215
Dunaliella salina GITSTANQDNPLQVVADEKMIPIPLGLDVWEHAYYLKYQNRREYIAAFWNVWVWYQVNDN 205
Chlamydomonas sp GVTSTPNQDNPLQTVADDQMIPVLALDVWEHAYYLKYQNRREYISAFWNVWVWYQVNNAN 205
: : :*** . . : : :*****

```

图2 浒苔与其他物种的 MnSOD 氨基酸的多序列比对结果

“*”表示保守的氨基酸残基，“:”表示保守替换的氨基酸残基，“.”表示相似性氨基酸

Fig. 2 Alignment of MnSOD amino acid sequences from *U. prolifera* and other species

* is used to indicate highly conserved amino acid residue; : indicates conservative amino acid residue which was replaced, . represents similar amino acid

U. prolifera (浒苔:KJ095585); *U. fasciata* (裂片石莼:ABR23158); *Z. mays* (玉米:AAA33512); *Oryza sativa* (水稻:AAA62657); *A. thaliana* (拟南芥:AEE74977); *D. salina* (盐生杜氏藻:AFF59218); *M. pusilla* (细小微胞藻:EEH58006); *Chlamydomonas sp.* (衣藻:ACX42439)

<i>Ulva prolifera</i>	-----	
<i>Ulva fasciata</i>	MNTDKMRPASANDSRHWTNAGAPVWNNISLTVGERGPVILLEDYHLVEK	50
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MDPYKYRPASSYNSPFETTNSGAPVWNNSSMTVGRGPILLEDYHLVEK	50
<i>Zea mays</i>	MDPYKHRPSSAFNAPYWTNSGAPVWNNSSLTVGARGPILLEDYHLVEK	50
<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	MDPQKYLPSHHDSPYWTNSGAPVWNNSSLTVGQRPILLEDYHLVEK	50
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	MDPAKIRPSSAYNTPYWTNSGAPVWNNSSMTVGRGPILLEDYHLVEK	50
<i>Volvox carteri f.nagariensis</i>	MDPSKVRPSSAYNSPYWTNSGAPVWNNSSMTVGRGPILLEDYHLIEK	50
<i>Haematococcus pluvialis</i>	MDPYKYRPSSAYSADHWTNTGMPVFNSSLTVGSRGPILLEDYHLVEK	50
<i>Ulva prolifera</i>	-----AKGFFEVTHTDISHLTCADFLRAGVQTPVA	30
<i>Ulva fasciata</i>	LANFDRERIPERVVHARGAAAKGFFEVTHTDISHLTCADFLRAGVQTPVA	100
<i>Arabidopsis thaliana</i>	LANFDRERIPERVVHARGASAKGFFEVTHTDISHLTCADFLRAGVQTPVI	100
<i>Zea mays</i>	LANFDRERIPERVVHARGASAKGFFEVTHTDITHLTCADFLRAGVQTPVI	100
<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	LAQFDRERIPERVVHARGASAKGFFEVTHTDISQLTCADCLRSPGVQTPVI	100
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	LAQFDRERIPERVVHARGAAAKGFFEVTHTDISALTAADFLRAGVQTPVI	100
<i>Volvox carteri f.nagariensis</i>	LAQFDRERIPERVVHARGAAAKGFFEVTHTVSHLTAADFLRAGVQTPVI	100
<i>Haematococcus pluvialis</i>	LAQFDRERIPERVVHARGAVAKGFFEVTHTVSHLTCADFLRAGVQTPVI	100
	*****:;: **.* **:******	
<i>Ulva prolifera</i>	VRFSTVIHERGSPETLRDPRGFAVKFYTREGNYDMVGNLVPVFFIR----	76
<i>Ulva fasciata</i>	VRFSTVIHERGSPETLRDPRGFAVKFYTREGNYDMVGNMPPVFFIRDIS	150
<i>Arabidopsis thaliana</i>	VRFSTVIHERGSPETLRDPRGFAVKFYTREGNFDLVGNFPVFFIRDMGK	150
<i>Zea mays</i>	VRFSTVIHERGSPETLRDPRGFAVKFYTREGNFDLVGNFPVFFIRDMGK	150
<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	VRFSTVIHERGSPETLRDPRGFAVKFYTREGNFDLVGNFPVFFIRDMGK	150
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	VRFSTVHERGSPETLRDPRGFAVKFYTREGNFDLVGNMPPVFFIRDMGK	150
<i>Volvox carteri f.nagariensis</i>	VRFSTVHERGSPETLRDPRGFAVKFYTREGNYDMVGNMPPVFFIRDMGK	150
<i>Haematococcus pluvialis</i>	VRFSTVHERGSPETLRDPRGFAVKFYTREGNYDMVGNMPPVFFIRDMGK	150
	*****:*****:*****:*****:*****:*****	

图3 浒苔与其他物种的 CAT 氨基酸的多序列比对结果

“*”表示保守的氨基酸残基，“:”表示保守替换的氨基酸残基，“.”表示相似性氨基酸

Fig.3 Alignment of CAT amino acid sequences from *U. prolifera* and other species

* is used to indicate highly conserved amino acid residue; : indicates conservative amino acid residue which was replaced, . represents similar amino acid

U. prolifera (浒苔: KJ095586); *U. fasciata* (裂片石莼: ABB88582); *A. thaliana* (拟南芥: CAB80226); *Z. mays* (玉米: DAA43177); *C. reinhardtii* (莱茵衣藻: AAB70006); *V. carteri f. nagariensis* (团藻: EFJ48656); *Coccomyxa subellipsoidea* (胶球藻: EIE20533); *H. pluvialis* (雨生红球藻: ABK41476)

2.3 进化树的构建分析

根据上述实验获得的 MnSOD 和 CAT 的氨基酸序列,利用 Mega 5.0 软件中邻接法 NJ 系统构建系统发生树来研究各物种的进化关系。在根据 MnSOD 构建的系统树中,浒苔和裂片石莼进化关系比较接近,聚成一支。高等植物拟南芥、玉米和水稻的进化关系较近(图4)。在根据 CAT 构建的系统树中(图5),浒苔与裂片石莼、雨生红球藻、莱茵衣藻进化关系比较接近,聚为一只;高等植物的 CAT 基因聚在一起(图5)。结果表明:不同物种的 CAT 在进化过程中是保守性,CAT 基因序列的同源性也比较高,可以很好地反映各物种之间的进化距离。

2.4 不同温度对浒苔 MnSOD 和 CAT 基因表达的影响

通过实验研究不同温度对浒苔 MnSOD 和 CAT 基因表达的影响(图6)。以常温 25 °C 基因的表达量作为 1,在 5 °C、15 °C 和 35 °C 条件下,MnSOD 基因表达量分别是 25 °C 表达量的 1.47 ($P > 0.05$)、0.89 ($P > 0.05$) 和 2.18 倍 ($P < 0.05$);而 CAT 的基因的表达量分别是 25 °C 表达量的 1.31 ($P > 0.05$)、1.24 ($P > 0.05$) 和 2.05 倍 ($P < 0.05$)。可见,在 35 °C 高温下,CAT 和 MnSOD 的基因表达显著性增加,5 °C 低温次之,而 15 °C 和 25 °C 两条基因表达变化差异不显著。

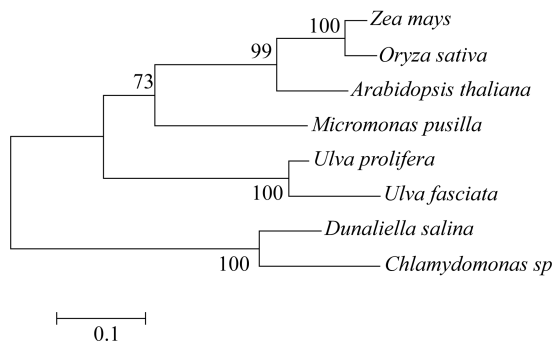


图4 根据 MnSOD 氨基酸序列用 NJ 法构建的系统进化树
Fig. 4 The phylogenetic tree of MnSOD constructed with the Neighbor-Joining method

Z. mays (玉米: AAA33512); *Oryza sativa* (水稻: AAA62657); *A. thaliana* (拟南芥: AEE74977); *M. pusilla* (细小微胞藻: EEH58006); *U. prolifera* (浒苔: KJ095585); *U. fasciata* (裂片石莼: ABR23158); *D. salina* (盐生杜氏藻: AFF59218); *Chlamydomonas sp.* (衣藻: ACX42439)

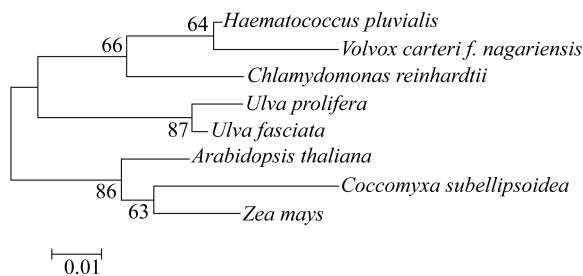


图5 根据 CAT 氨基酸序列用 NJ 法构建的系统进化树
Fig. 5 The phylogenetic tree of CAT constructed with the Neighbor-Joining method

H. pluvialis (雨生红球藻: ABK41476); *V. carteri f. nagariensis* (团藻: EFJ48656); *C. reinhardtii* (莱茵衣藻: AAB70006); *U. prolifera* (浒苔: KJ095586); *U. fasciata* (裂片石莼: ABB88582); *A. thaliana* (拟南芥: CAB80226); *C. subellipsoidea* (胶球藻: EIE20533); *Z. mays* (玉米: DAA43177)

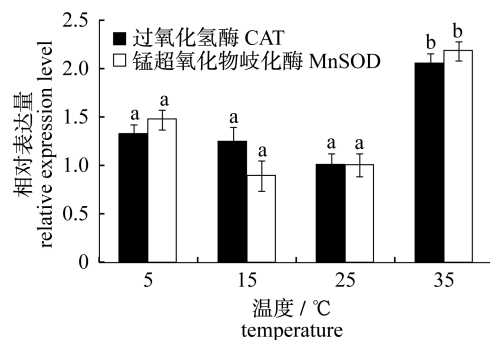


图6 不同温度对浒苔 MnSOD 和 CAT 基因表达的影响
字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 6 The effects of different temperature on the expression of MnSOD and CAT gene from *U. prolifera*
The different letters indicate significant difference ($P < 0.05$)

2.5 不同浓度水杨酸对高温培养下浒苔 MnSOD 和 CAT 基因表达的影响

水杨酸对 MnSOD 和 CAT 基因表达的影响呈现相同的趋势,均是随水杨酸浓度的增高,基因的表达量增加。0.01 和 0.1 mmol/L 水杨酸处理后浒苔 CAT 基因表达量分别是对照组的、1.32 ($P > 0.05$) 和 5.30 ($P < 0.01$) 倍,其中后者差异极显著 ($P < 0.01$)。SOD 基因的表达与 CAT 呈现相同的趋势,0.01 和 0.1 mmol/L 水杨酸处理浒苔 MnSOD 基因表达量为对照的 1.56 ($P > 0.05$) 和 2.08 倍 ($P < 0.05$)。

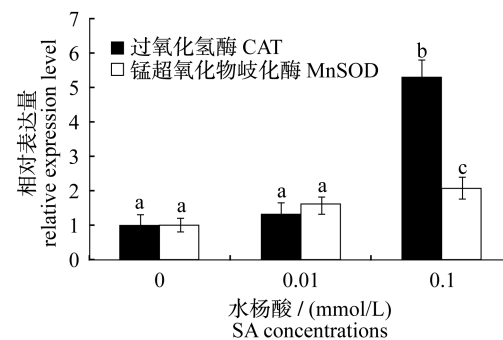


图7 水杨酸对浒苔 MnSOD 和 CAT 表达水平的影响
字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 7 The effects of SA on the expression of SOD and CAT from *U. prolifera*

The different letters indicate significant difference ($P < 0.05$)

3 讨论

在长期的进化过程中,生物体发展了一套复杂的适应环境压力的调节机制,其中抗氧化系统的调节是一种主要的适应方式。植物在逆境条件下体内产生过多的活性氧,主要有超氧阴离子 ($\cdot O_2^-$)、羟自由基 ($\cdot OH$) 和过氧化氢 (H_2O_2)。高浓度的活性氧对植物细胞是有害的,其水平依赖于植物体内的保护酶来调节。超氧阴离子会导致膜不饱和脂肪酸过氧化,从而造成对细胞的伤害,超氧化物歧化酶 (SOD) 是主要的超氧阴离子清除酶类,它催化超氧阴离子歧化为 O_2 和 H_2O_2 ; 过氧化氢酶 (CAT) 催化 H_2O_2 为 O_2 和 H_2O 。

MnSOD 和 CAT 作为抗氧化调节的关键酶,在高等植物中研究较多;而在低等藻类植物中相关研究比较少,目前只有在钝顶螺旋藻 (*Spirulina platensis*)、海带和裂片石莼中有 MnSOD 和 CAT 基因序列的报道^[14-15]。本实验结果表明 MnSOD

和CAT的氨基酸序列在不同物种中保守性较高^[13-16]。如MnSOD的氨基酸序列与裂片石莼的同源性高达89%；而CAT的氨基酸序列与裂片石莼的同源性最高为99%，与雨生红球藻和莱茵衣藻的序列同源性都在90%以上；利用CAT编码氨基酸序列构建的系统树中，浒苔首先与裂片石莼聚为一支，再与雨生红球藻、莱茵衣藻等绿藻聚在一起，CAT基因序列保守性较强。

在非生物逆境条件下，一些海洋藻类在受到除草剂、紫外照射和高温等胁迫时，SOD表达增加^[4,6]。此外，高温热激会导致坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)的热激蛋白(HSP70)、抗坏血酸氧化酶、Mn-SOD等抗逆基因表达量显著升高^[17-19]。植物本身对温度变化非常敏感，在低温的条件下，笋瓜(*Cucurbita maxima*)和苦瓜(*Momordica charantia*)在小于10℃的低温下，就会受到伤害^[13,20]。低温可以诱导SOD和CAT酶活性增加的结果在南极酵母、藻类和动物中都有过报道^[21-22]。本实验结果表明，在高温35℃下MnSOD和CAT基因的表达量增加，该结果与适量浓度水杨酸的添加可以使高温下龙须菜的SOD和CAT活性增加的研究结果一致^[11]。而相对于高温处理，5℃低温对MnSOD和CAT基因表达的影响要小。可见，植物在遭受温度压力时可以通过调节抗氧化基因表达水平来启动自身的氧化防御机制。

水杨酸作为一种植物激素，能提高植物抗干旱、抗寒害、抗盐害和抗重金属的能力，可以提高植物在高温和低温下的生存状态^[10-11]。本实验结果表明在高温35℃条件下，水杨酸(0.01 mmol/L和0.1 mmol/L)的添加可以刺激MnSOD和CAT基因的表达，在0.1 mmol/L水杨酸处理时与对照差异显著或极显著，与朱招波^[11]的研究结果具有一致性。说明通过调节抗氧化酶的基因的表达，来缓解高温对浒苔带来的胁迫作用，可能是水杨酸对抗高温逆境胁迫的一个方式，其具体的机制还需要进一步研究分析。

参考文献：

- [1] Taylor R, Fletcher R, Raven J. Preliminary studies on the growth of selected "green tide" algae in laboratory culture: effects of irradiance, temperature, salinity and nutrients on growth rate [J]. *Botanica Marina*, 2001, 44(4): 327 - 336.

- [2] Merceron M, Antoine V, Aubry I, et al. In situ growth potential of the subtidal part of green-tide forming *Ulva* spp. stocks [J]. *Science of the Total Environment*, 2007, 3(84): 293 - 305.
- [3] Nelson T, Haberlin K, Nelson A, et al. Ecological and physiological controls of species composition in green macroalgal blooms [J]. *Ecology*, 2008, 89(5): 1287 - 1298.
- [4] Dohler R, Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2000, 108(2): 111 - 117.
- [5] Lewis A, Blokhina O, Virolainen E, et al. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review [J]. *Annals of Botany*, 2003, 91(2): 179 - 194.
- [6] Fan Y M. Cloning and expression analysis of superoxide dismutase gene from two species of algae [D]. Ningbo: Ningbo University, 2012. [樊寅卯. 两种藻类中超氧化物歧化酶基因的克隆及表达分析. 宁波: 宁波大学, 2012.]
- [7] Zhou Y L, Zhang X C. Physiological response of *Arthrospira* algal strains and wild-type linear mutants on high temperature stress [J]. *Periodical of Ocean University of China: Natural Science*, 2007, 37 (suppl. 1): 121 - 126. [周亚莉, 张学成. 节旋藻野生型藻株与直线型突变藻株对高温胁迫的生理响应. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2007, 37(增刊1): 121 - 126.]
- [8] Zhang B L, Yan X H, Huang L B. Evaluation of an improved strain of *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) with high-temperature tolerance [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2011, 23(5): 841 - 847.
- [9] Hayat Q, Hayat S, Irfan M, et al. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2010, 68(1): 14 - 25.
- [10] Fan W S, Huang H Z, Xu H F, et al. Effects of additive exogenous salicylic acid on cold resistance of *Gracilaria* [J]. *Marine Sciences*, 2011, 35(2): 38 - 43. [范皖苏, 黄鹤忠, 徐汗福, 等. 外源添加剂水杨酸对菊花江蓠抗寒性的影响. 海洋科学, 2011, 35(2): 38 - 43.]
- [11] Zhu Z B, Sun X, Xu N J, et al. Effects of salicylic acid on the resistance of *Gracilariopsis lemaneiformis* to high temperature [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(8): 1304 - 1309. [朱招波, 孙雪, 徐

- 年军,等. 水杨酸对龙须菜抗高温生理的影响. 水产学报,2012,36(8):1304-1309.]
- [12] Rahat N, Noushina I, Shabina S, *et al.* Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean cultivars [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2011, 168(8):807-815.
- [13] Chiang C M, Kuo W S, Lin K H. Cloning and gene expression analysis of sponge gourd ascorbate peroxidase gene and winter squash superoxide dismutase gene under respective flooding and chilling stresses [J]. *Horticulture Environment Biotechnology*, 2014, 55(2):129-137.
- [14] Chen H F, Wang Q, Fu X C, *et al.* Superoxide dismutase (SOD) molecular biology [J]. *Chemistry of Life*, 2003, 23(4):291-293. [陈惠芳, 王琦, 付学池, 等. 超氧化物歧化酶(SOD)的分子生物学. 生命的化学, 2003, 23(4):291-293.]
- [15] Guo J J, Gong X G, Lu Y W, *et al.* Cloning and sequence analysis of a superoxide dismutase gene from *Spirulina platensis* [J]. *Journal of Zhejiang University: Science Edition*, 2004, 31(6):674-678. [郭建军, 龚兴国, 鲁宇文, 等. 钝顶螺旋藻 Fe-SOD 基因的克隆及序列分析. 浙江大学学报:理学版, 2004, 31(5):674-678.]
- [16] Lu M, Gong X G, Guo J J, *et al.* Cloning and expression of *Nostoc commune* Fe-SOD gene in *E. coli* [J]. *Journal of Zhejiang University: Engineering Science*, 2006, 40(11):2011-2015. [卢敏, 龚兴国, 郭建军, 等. 念珠藻 Fe-SOD 基因的克隆及在大肠杆菌中的表达. 浙江大学学报:工学版, 2006, 40(11):2011-2015.]
- [17] Zhang X L, Yang R, Yi Q Q, *et al.* Molecular cloning and characterization analysis of cytosolic ascorbate peroxidase gene from *Pyropia haitanensis* [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2010, 32(5):165-174. [张小龙, 杨锐, 仪茜茜, 等. 坛紫菜胞质型抗坏血酸过氧化物酶基因的克隆及特征分析. 海洋学报, 2010, 32(5):165-174.]
- [18] Yang R, Liu W, Zhang X L, *et al.* Sequences of Mn-sod gene from *Pyropia haitanensis* and its expression under heat shock [J]. *Botanica Marina*, 2013, 56(3):249-259.
- [19] Wang Y, Wang Y, Zhu L, *et al.* Comparative studies on the ecophysiological differences of two green tide macroalgae under controlled laboratory conditions [J]. *PLOS One*, 2012, 7(8):e38245.
- [20] Salveit M E. Chilling injury is reduced in cucumber and rice seedlings and in tomato pericarp discs by heat-shocks applied after chilling [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2000, 21(2):169-177.
- [21] Arora A, Sairam R K, Srivastava G C. Oxidative stress and antioxidative system in plants [J]. *Current Science India*, 2002, 82(10):1227-1238.
- [22] Boo S Y, Wong C M, Rodrigues K F, *et al.* Thermal stress responses in antarctic yeast, *glaciozyma antarctica* P112, characterized by real-time quantitative PCR [J]. *Polar Biology*, 2013, 36(3):381-389.

Gene cloning and expression analysis of MnSOD and CAT from *Ulva prolifera*

FAN Meihua^{1,2}, SUN Xue¹, WANG Rixin¹, LIAO Zhi², XU Nianjun¹

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Institute of Marine Science and Technology, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract: Manganese superoxide dismutase (MnSOD) and catalase (CAT) are key enzymes in the antioxidant system and important indicators in the resistance study of plants. In this paper, partial cDNA fragments of MnSOD and CAT genes were cloned, and their expression patterns in response to different temperatures and salicylic acid concentrations were investigated by real-time quantitative PCR technique in macroalga *Ulva prolifera* (Chlorophyta). The cloned MnSOD cDNA was 318 bp, which encoded 105 amino acid residues. The putative MnSOD amino acid sequence of *U. prolifera* shared 89% identity with that of *U. fasciata*. Total 229 bp CAT cDNA was obtained, which showed 99% identity with that of *U. fasciata*, and 93% identity with that of *Haematococcus pluvialis* by Blast analysis. The phylogenetic trees suggested that *U. prolifera* clustered with that of *U. fasciata* in the tree constructed with MnSOD amino acid sequences; and *U. prolifera* also clustered with *U. fasciata* firstly, and then clustered with *H. pluvialis* and *Chlamydomonas reinhardtii* in the tree constructed with CAT amino acid sequences. The expression of MnSOD and CAT genes varied in response to different temperatures, of which high temperature showed the most significant effect on the two genes' expression. The expression of MnSOD and CAT was 2.18-fold and 2.05-fold in 35 °C culture condition compared with that at 25 °C, respectively. The expression of MnSOD and CAT was 1.47-fold and 1.31-fold up-regulated at 5 °C compared with that at 25 °C, respectively. However, the expression levels of the two genes in 15 °C and 25 °C culture conditions showed no significant difference. Salicylic acid is one of plant hormones, which not only played an important role in the growth and development in plants, but also showed key roles in the biotic and abiotic stress resistance. In this macroalga *U. prolifera* cultured at 35 °C, 0.1 mmol/L salicylic acid promoted expression of MnSOD and CAT mRNA to 2.08 times and 5.30 times that of the control groups. But the expression levels of MnSOD and CAT mRNAs showed no significant difference from the controls when 0.01 mmol/L salicylic acid was added. In conclusion, the expression levels of MnSOD and CAT mRNAs enhanced in response to high or low temperatures. And the expression enhancement of the two genes was also one way of salicylic acid to alleviate the adverse effect caused by high temperature stress in *U. prolifera*.

Key words: *Ulva prolifera*; MnSOD; CAT; salicylic acid; high temperature stress

Corresponding author: XU Nianjun. E-mail: xunianjun@nbu.edu.cn