

家蚕铜锌超氧化物歧化酶 cDNA 的克隆与测序*

唐云明^① 鲁成^{②**} 向仲怀^② 许禾声^①

(^① 西南师范大学生命科学学院, 重庆 400715)

(^② 西南农业大学农业部蚕桑学重点开放实验室, 重庆 400716)

Cloning and sequencing of the silkworm (*Bombyx mori*) copper zinc-superoxide dismutase cDNA

TANG Yun-Ming^① LU Cheng^{②**} XIANG Zhong-Huai^② XU He-Sheng^②

(^① Faculty of Life Science, Southwest China Normal University, Chongqing 400715, China)

(^② Key Sericultural Laboratory of the Agricultural Ministry, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China)

Abstract The total RNA of the silkworm (*Bombyx mori*) was obtained with chlorinated caesium density gradient centrifugation. mRNA was converted to cDNA by reverse transcription. This cDNA was used as a template for two PCR amplifications by three primers. These were DP1: 5'-ATGGT (GT) GT (GT) AA (AG) GC (TC) GT-3'; DP2: 5'-ATGGT (GT) GT (GT) AA (AG) GC (TC) GT (GT) (CT) T-3' and PA: 5'-GAGGACTCGAGCTCAAGC-3'. Northern blot identification of poly A⁺ mRNA extracted from silkworms by hybridization with the above amplified product detected a single mRNA transcript of approximate 500 bp. This showed that the amplified product was from silkworm mRNA. Amplified products were separated by agarose gel electrophoresis and purified. The purified products were ligated to pUC19-T or pUCm-T vector and transformed into *E. coli* DH5 α competent cells. Recombinant colonies were screened by X-gal. A clone of silkworm CuZn-SOD cDNA was thus obtained. DNA sequencing was done using the Sanger dideoxy method. The result of recombinant plasmid DNA sequencing using a DNA sequencer was 591 bps cloned. Sequencing with DNASTar and DNAClub revealed that 1-3 bp of the 5'-extremity was the initiation codon ATG. 459 bp of the 5'-extremity translated 153 amino acids, 460-462 bp was the termination codon TAA which included the degeneration primer (DP2) derived from the N-terminal amino acid of the 5' end, PA of the 3' end and 73 bp poly A⁺ tail at the front of PA in the 3' end and so on [*Acta Zoologica Sinica* 49 (4): 543-546, 2003].

Key words Silkworm (*Bombyx mori*), Superoxide dismutase, Cloning, Sequencing, cDNA

关键词 家蚕 超氧化物歧化酶 克隆 测序 cDNA

超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 是超氧阴离子自由基 (O₂⁻) 的专一清除剂, 故其在维持生物体内阴离子自由基产生与消除的动态平衡中起着重要的作用。SOD 还可以预防衰老, 在一些疾病 (如肿瘤、炎症及自身免疫疾病等) 的治疗中具有良好的疗效。因此 SOD 的研究与应用, 具有广阔的前景 (袁勤生, 1991)。家蚕 (*Bombyx mori*) 具有强大的合成蛋白的能力, 家蚕核多角体病毒 (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus,

BmNPV) 合成多角体蛋白的能力亦很强。它们的启动子等调节机构有广泛的利用前景; 为了完成变态, 家蚕体液中有蛋白酶抑制物, 可以保存外源基因表达产物不被降解; BmNPV-蚕系统还能识别哺乳动物信号肽, 并能在表达外源基因产物后完成磷酸化或糖基化等步骤。总之, 在个体水平表达外源基因并回收利用基因表达产物方面, BmNPV-蚕系统具有特别重要的意义 (鲁成等, 2000; 崔红娟等, 1999)。为了利用 BmNPV-蚕系统高效表

2002-08-30 收稿, 2002-11-20 修回

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39730370) 和重庆市科委攻关项目 (No. 2000-6212) [This research was funded by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 39730370) and the Key Science Project of the Chongqing Science and Technology Committee (No. 2000-6212)]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: lucheng@swau.edu.cn

第一作者简介 唐云明, 男, 1960年生, 教授, 博士。研究方向: 酶与酶工程。E-mail: tbright@swnu.edu.cn

© 2003 动物学报 *Acta Zoologica Sinica*

达 SOD, 必须首先获得 SOD 基因, 因此我们在进行家蚕 SOD 的分离纯化和 N-末端氨基酸测序 (唐云明等, 2001) 的基础上, 设计、合成简并引物, 通过 RT-PCR 法扩增家蚕 SOD 的 cDNA, 克隆获得 SOD 基因, 为 SOD 的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用家蚕品种为安康 4 号, 5 龄第 3 天, 采自本室基因库。质粒为 pUC19, 宿主菌为大肠杆菌 DH5 α , 均为本室保存。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的制备和 SOD 基因克隆 总 RNA 制备方法所用步骤在 Kwiatowski *et al.* (1989) 的方法基础上进行了适当的改进。取家蚕 10 条背部脂肪组织 0.48 g, 加液氮磨成粉末状, 按 1:10 的比例加入 4.8 ml 组织胍溶液提取。通过 CsCl 密度梯度离心分离纯化、酚 (酸性)/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 等抽提、异丙醇沉淀、75% 乙醇洗涤等。所得 RNA 样品溶于 DEPC 处理的水中, 分装后保存在 -70 °C 的低温冰箱中备用。并对其含量和纯度等进行测定。

用 cDNA 合成试剂盒 (Universal Riboclon^R cDNA Synthesis Kit) 合成 cDNA。但进行反转录时所用接头引物 (dT-adaptor primer) 为: 5'-GAG-GACTCGAGCTCAAGCT15-3'。其操作方法按产品说明书进行。

SOD 密码子翻译的偏好性与引物的设计。在 SWISS-PROT、GenBank 和 EMBL 中有关 SOD 的蛋白质和基因序列的数据 200 多个。其中 Cu-Zn-SOD 的数据有 70 个。但是没有一个关于家蚕 SOD 的蛋白质序列和基因的数据。对既有蛋白质序列、又有基因序列的 CuZn-SOD 进行了密码子偏好性分析 (Ho *et al.*, 1987; Kwiatowski *et al.*, 1994; Kwiatowski *et al.*, 1993; Schinina *et al.*, 1989; Silva *et al.*, 1992; Stanton *et al.*, 1996; Wolf *et al.*, 1993)。同时也考虑了家蚕本身密码子的偏好性。根据氨基酸密码子偏好性和引物设计原则, 以 N-端 10 个氨基酸序列为依据合成了两个上游简并引物 DP1 (Degenerate primer 1): 5'-ATGGT (GT) GT (GT) AA (AG) GC (TC) GT-3' 和 DP2 (Degenerate primer 2): 5'-ATGGT (GT) GT (GT) AA (AG) GC (TC) GT (GT) (CT) T-3'。同时合成一个下游引物 PA (Partial adaptor):

5'-GAGGACTCGAGCTCAAGC-3'。DP1 和 PA 为第一轮扩增引物, DP2 和 PA 为第二轮引物。

在 PCR 扩增中, 为了提高扩增的特异性, 采用两轮 PCR 扩增。第一轮 PCR 扩增的反应体系: 反应总体积为 25 μ l, 含 1 μ l cDNA, 10 \times PCR buffer 2.5 μ l, dNTP (2.5 mmol/L of each) 1 μ l, MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μ l, 引物 DP1 和 PA 各 1 μ l, Taq DNA polymerase 0.2 μ l, 水 16.3 μ l。扩增程序: 98°C 预变性 4 min; 94°C 变性 30 s, 65°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1.5 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min; 4°C 保存待取。第二轮 PCR 扩增: 取第一轮 PCR 扩增产物 1 μ l, 用水稀释到 100 μ l, 取 1 μ l 作为模板。将引物 DP1 改为 DP2。反应体系的其它组成和扩增程序与第一轮扩增相同。

扩增产物经琼脂糖凝胶电泳和 EB 染色后, 蒸馏水漂洗, 凝胶成像系统观察分析。用玻璃珠回收法回收目的片段。

Northern 检测采用地高辛 DNA 标记和检测试剂盒 (Boehringer Mannheim 产品) 进行。

采用 T-A 克隆法对家蚕 SOD 基因进行克隆。本研究所用载体为 pUCm-T 和 pUC19-T。pUCm-T 载体购自上海生工生物工程有限公司。pUC19-T 载体为 pUC19 质粒经酶切纯化后加 T 而成。采用一步法制备和转化感受态细菌 (Sambrook *et al.*, 1989)。

1.2.2 测序与序列分析

测序在测序仪 ABI PRISM 377 DNA Sequencer 上进行。利用 DNAClub 等软件将所得 DNA 序列进行分析。

2 结 果

2.1 总 RNA 的制备和 SOD 基因的克隆

纯化所得总 RNA 样品, 经反转录合成 cDNA 第一链。以 cDNA 第一链为模板, 通过两次 PCR 扩增, 获得一条 500 bp 左右的特异片段。Northern 鉴定结果如图 1 所示。从图 1 中可以看出: 以 PCR 扩增的特异片段制备的探针, 从家蚕脂肪体提取的 RNA 中检测到 mRNA 产物。根据 RNA 分子量参照估算有杂交信号的位置大约为 500 bp, 此大小与扩增片段的大小相似, 说明扩增产物来自于家蚕的 mRNA。

回收纯化所得的目的片段与载体连接后, 进行转化、涂板和筛选, 获得了家蚕 SOD 的 cDNA 克隆。

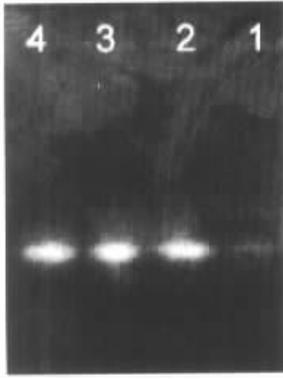


图 1 家蚕 SOD 的 cDNA 的 Northern 杂交结果

Fig.1 Result of Northern blotting of the cDNA of SOD from silkworm

1 : RNA 加样量为 10 μg (The quantity of RNA is 10 μg)
2 ~ 4 : RNA 加样量为 30 μg (The quantity of RNA is 30 μg)

```

001 ATGGTGTTA AAGCTGTGTT GGTCAATAAT GGTGACGCCA AGGGTACCCT ATATTTTGAA
061 CAGGAGGATG CCGGTGCTCC GGTAAGAGTC ACCGGCGACA TCACAGGCCT GGGCCAGGGA
121 TTCCAGGAGC AACATGTGAA GGAATTCGGC GACAACACCA ATGGGTGCAT GTCGTCTGGC
181 CCCCATTTCA ATCCATTGAA TAAGGAGCAT GGTGCCCCCA CAGATGAGAA TCTGCATTTG
241 GGCGACTTAG GCAATATTGA GGCCCTGGC GAGGTCCCCA CTTTTTCCAA TATCAACGAC
301 TCCAAAATTA CTTTGTGGG TGAGAATAGC ATCACAATTC GCACCGTGGT AGTTCTAGCC
361 CCAGATTTAG ATCTGGCTAA GGTTCCTGCA GGTTCGAGCA AAACGACAGG AAATGCTGGT
421 GCCCGCATTG GTTGCGGTGT AATTGGCATT TGCAAGATCT AAAAGTGATT TTATGTTTTT
482 TAAATAAAAA ATTTTACCCC AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
541 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAGCTTGAG CTCGAGTCCT C

```

图 2 家蚕 SOD cDNA 的测序结果

Fig.2 Sequences of the cDNA of SOD from silkworm

3 讨论

本文的测序结果表明：被克隆家蚕超氧化物歧化酶 cDNA 碱基序列长 591 bp。利用 DNASTar、DNAClub 等软件对测序结果进行分析得到以下结果：被克隆碱基 5'端 1~3 为 ATG 起始密码，5'端前的 459 bp，可推导出 153 个氨基酸，460~462 为 TAA 终止密码。测出的序列具有上下游引物，N-端含有已测序的 10 个氨基酸。下游带不翻译的 111 bp，其中包括终止密码子、AATAAA 和末端的 73 碱基多聚腺苷酸。可见是一个完整的 cDNA 基因。

通过同源性分析，家蚕 CuZn-SOD 蛋白质的氨基酸序列与 *Chymomyza amoena* (Kwiatowski *et al.*, 1993) 和 *Drosophila obscura* (Kwiatowski

2.2 测序结果

从测序结果可得到家蚕超氧化物歧化酶 cDNA 克隆碱基 591 bp (如图 2 所示)。

利用 DNASTar、DNAClub 等软件对测序结果进行分析得到以下结果：被克隆基因中 5'端 ATG 为起始密码，5'端的 459 bp，可翻译 153 个氨基酸，460~462 为 TAA 终止密码。

用 DNAClub 软件，由 DNA 序列推导，SOD 蛋白质的 153 个氨基酸序列为：

```

N'-M V V K A V L V I N G D A K G T V Y F
E Q E D A G A P V K V T G D I T G L G Q G F Q
E Q H V K E F G D N T N G C M S S G P H F N
P L N K E H G A P T D E N L H L G D L G N I E
A P G E V P T F S N I N D S K I T L L G E N S I
T I R T V V V L A P D L D L A K G P A G L S K
T T G N A G A R I G C G V I G I C K I - C' .

```

al., 1994) 的同源性为 80.39% 和 75.82%。同时在氨基酸组成上，不含色氨酸 (Trp)，这进一步证明该蛋白质是铜锌超氧化物歧化酶，该基因是 CuZn-SOD 的 cDNA。

通过比较家蚕 SOD 基因与 *Drosophila virilis* (Kwiatowski *et al.*, 1989) *Drosophila willistoni* (Kwiatowski *et al.*, 1994) *Legionella pneumophila* (St John *et al.*, 1996) *Schistosoma mansoni* (Silva *et al.*, 1992) *Xenopus laevis* (Carri *et al.*, 1990) 豚鼠 (Wolf *et al.*, 1993) 和 *Chymomyza amoena* (Kwiatowski *et al.*, 1993) 等 SOD 基因的同源性，从中可以看出：有的 SOD 基因中存在内含子，有的 SOD 基因中无内含子，而且有内含子的 SOD 基因其内含子的数量和长短不同。至于家蚕 SOD 基因中是否存在内含子，其

内含子的长短和数量怎样, 这需要进一步的研究。施惠娟等 (1999) 对人铜锌 SOD 的 cDNA 进行了表达, 结果表明无内含子的 cDNA 同样能够表达, 因此我们获得了家蚕 SOD 的 cDNA 基因。

参考文献 (References)

- Carri, M. T., A. Battistoni, P. Mariottini and G. Rotilio 1990
Xenopus laevis Cu, Zn superoxide dismutase B cDNA sequence. *J. Nucleic Acids Res.* **18**: 1 641 ~ 1 641.
- Cui, H. J. and K. P. Chen 1999 Expression foreign genes using silkworm as a biological responder. *Biotechnology* **9** (3): 31 ~ 34. [崔红娟, 陈克平 1999 家蚕生物反应器表达外源基因. *生物技术* **9** (3): 31 ~ 34.]
- Ho, Y. S. and J. D. Crapo 1987 Sequences of cDNA and deduced amino acid of rat copper-zinc-containing superoxide dismutase. *J. Nucleic Acids Res.* **15**: 6 746 ~ 6 746.
- Kwiatowski, J. and A. Latorre 1989 *Drosophila virilis* Cu-Zn superoxide dismutase gene sequence. *J. Nucleic Acids Res.* **17**: 2 133 ~ 2 133.
- Kwiatowski, J., A. Latorre, D. Skarecky and F. J. Ayala 1994 Characterization of a Cu/Zn superoxide dismutase encoding gene region in *Drosophila willistoni*. *Gene* **147**: 295 ~ 296.
- Kwiatowski, J. M., D. Skarecky, M. Burgos and F. J. Ayala 1993 Structure and sequence of the Cu, Zn superoxide dismutase gene of *Chymomyza amoena*: phylogeny of the genus and codon-use evolution. *Insect Mol. Biol.* **1**: 3 ~ 13.
- Lu, C., Z. H. Xiang and J. T. Huang 2000 Fundamental research trends of sericulture in 21st century. *Acta Sericologica Sinica* **26** (1): 105 ~ 114. [鲁成, 向仲怀, 黄君霆 2000 21 世纪蚕业科学基础研究发展趋势. *蚕业科学* **26** (1): 105 ~ 114.]
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. M. Maniatis 1989 Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schinina, M. E., D. Barra, F. Bossa, L. Calabrese, L. Montesano, M. T. Carri, P. Mariottini, F. Amaldi and G. Rotilio 1989 Primary structure from amino acid and cDNA sequences of two Cu, Zn superoxide dismutase variants from *Xenopus laevis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **272**: 507 ~ 515.
- Shi, H. J., L. Q. Fan, D. Z. Wei and Q. S. Yuan 1999 Cloning, sequencing and expression of human copper, zinc-superoxide dismutase cDNA. *Acta Biochimica et Biophysica Sin.* **31** (1): 16 ~ 18. [施惠娟, 范立强, 魏东芝, 袁勤生 1999 人铜锌超氧化物歧化酶 cDNA 的克隆、测序及表达. *生物化学与生物物理学报* **31** (1): 16 ~ 18.]
- Silva, A., T. Lepresle, A. Capron and R. J. Pierce 1992 Molecular cloning of a 16-kilodalton Cu/Zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **52**: 275 ~ 278.
- Stanton, J. L., S. D. Wilton and N. G. Laing 1996 Characterisation of the chicken Cu, Zn superoxide dismutase gene. *J. DNA Seq.* **6** (6): 357 ~ 360.
- St. John, G. and H. M. Steinman 1996 Periplasmic copper-zinc superoxide dismutase of *Legionella pneumophila*: role in stationary-phase survival. *J. Bacteriol.* **178**: 1 578 ~ 1 584.
- Tang, Y. M., C. Lu and Z. H. Xiang 2001 Isolation, purification and some properties of copper-zinc superoxide dismutase in silkworm. *Acta Sericologica Sin.* **27** (2): 96 ~ 99. [唐云明, 鲁成, 向仲怀 2001 家蚕铜锌超氧化物歧化酶的分离纯化及其部分性质的研究. *蚕业科学* **27** (2): 96 ~ 99.]
- Wolf, B., K. Reinecke, K. D. Aumann, R. Brigelius-flohe and L. Flohe 1993 Taxonomical classification of the guinea pig based on its Cu/Zn superoxide dismutase sequence. *Biol. Chem.* **374**: 641 ~ 649.
- Yuan, Q. S. 1991 Superoxide dismutase: advances and application. *Chin. Pharm. J.* **26** (8): 456 ~ 459. [袁勤生 1991 超氧化物歧化酶的研究现状及应用前景. *中国药学杂志* **26** (8): 456 ~ 469.]