

网络出版时间:2019-04-01 15:19 DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2019.10.009
网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20190401.1518.018.html>

山黧豆抗氧化酶基因的克隆与表达分析

王 辉¹, 刘晓宁¹, 徐全乐²

(1 黄河科技学院 医学院, 河南 郑州 450063; 2 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】【目的】克隆山黧豆抗氧化酶基因, 并对其进行生物信息学及表达模式分析, 为研究抗氧化酶基因在山黧豆中的抗旱机制奠定基础。【方法】以萌发 7 d 的山黧豆叶片为材料, 通过 RT-PCR 克隆山黧豆抗氧化酶基因的编码序列(CDS); 采用荧光定量 PCR 分析抗氧化酶基因的组织表达模式; 利用在线软件 ExPASy ProtParam、SignalP 4.1、TMHMM V. 2.0、TargetP 1.1 分别分析抗氧化酶基因编码的蛋白质理化性质、信号肽、跨膜区域以及亚细胞定位; 利用在线工具 Conserved Domain、SOPMA 预测蛋白质保守结构域和二级结构, 利用 MEGA 6.0 软件构建蛋白系统进化树; 并利用 20% PEG 6000 溶液模拟干旱处理山黧豆, 采用荧光定量 PCR 分析干旱胁迫不同时间抗氧化酶基因在叶片中的相对表达量。【结果】RT-PCR 克隆获得山黧豆抗氧化酶基因 APX、CAT、MnSOD、FeSOD 和 Cu/ZnSOD 的编码序列, 其长度分别为 864, 1 485, 723, 1 005 和 942 bp。生物信息学分析表明, APX、CAT、MnSOD、FeSOD 和 Cu/ZnSOD 抗氧化酶均为酸性不稳定蛋白质, 且均由 α -螺旋、延伸链、 β -转角和无规则卷曲共 4 种二级结构组成; 山黧豆抗氧化酶均包含高度保守的结构域。聚类分析结果表明, 山黧豆的 APX、CAT、MnSOD、FeSOD、Cu/ZnSOD 依次与蕹菜苜蓿、蚕豆、豌豆、豌豆和锦鸡儿具有较高的相似性、较近的亲缘关系和遗传距离。表达分析结果表明, APX、CAT、MnSOD、FeSOD 和 Cu/ZnSOD 基因在山黧豆根、茎、叶组织中均有表达。APX、CAT 和 MnSOD 基因均响应了干旱胁迫, 其中 APX、CAT 基因的表达量在干旱胁迫后迅速升高, 3 h 后达到最高, 分别是 0 h 的 5 和 4.3 倍。【结论】成功克隆了山黧豆抗氧化酶基因 APX、CAT、MnSOD、FeSOD 和 Cu/ZnSOD, 推测其可协同清除干旱胁迫下产生的活性氧。

【关键词】 山黧豆; 抗氧化酶基因; 基因克隆; 生物信息学分析

【中图分类号】 Q785

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2019)10-0071-09

Cloning and expression analysis of antioxidant enzymes in *Lathyrus sativus* L.

WANG Hui¹, LIU Xiaoning¹, XU Quanle²

(1 School of Medicine, Huanghe S&T University, Zhengzhou, Henan 450063, China;

2 College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The antioxidant enzyme genes of *Lathyrus sativus* L. were cloned and the bioinformatics and gene expression patterns were analyzed to provide basis for exploring the drought resistance mechanism of antioxidant enzymes. 【Method】Seven days after germination, the leaves, roots and stems of *Lathyrus sativus* L. were selected. The coding sequences of antioxidant enzyme genes were cloned by RT-PCR, and tissue expression patterns were investigated by qPCR. ExPASy ProtParam, SignalP 4.1, TMHMM V. 2.0, and TargetP 1.1 were used for analyzing protein physicochemical properties, protein signal peptide, protein transmembrane region and subcellular localization. Conserved Domain and SOPMA were

【收稿日期】 2018-09-07

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31401910); 河南省科技厅科技攻关计划项目(172102310208); 河南省教育厅自然科学计划项目(16A180046)

【作者简介】 王 辉(1979—), 男, 河南郑州人, 讲师, 硕士, 主要从事植物抗逆分子生物学研究。E-mail: Wanghui@163.com

【通信作者】 刘晓宁(1985—), 女, 河南郑州人, 讲师, 博士, 主要从事天然药物抗肿瘤机制研究。E-mail: Jingdouer@126.com

used for predicting the conserved domain and secondary structure. The phylogenetic trees were constructed by MEGA 6.0, and qRT-PCR was used for analyzing relative gene expression at different points in *Lathyrus sativus* treated by 20% PEG 6000. 【Result】 The coding sequences of the antioxidant enzyme genes APX, CAT, MnSOD, FeSOD and Cu/ZnSOD with sizes of 864, 1 485, 723, 1 005, and 942 bp were amplified. Bioinformatics analysis indicated that APX, CAT, MnSOD, FeSOD and Cu/ZnSOD were acidic and unstable protein consisted of α -helix, extended strand, β -turn and random coil. Cluster analysis showed that APX, CAT, MnSOD, FeSOD and Cu/ZnSOD with highly conserved domain had high similarity as well as close genetic relationship and genetic distance with *Medicago truncatula*, *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Pisum sativum* and *Caragana jubata*. Gene expression profiles revealed that APX, CAT, MnSOD, FeSOD and Cu/ZnSOD were expressed in roots, stems and leaves. APX, CAT, and MnSOD responded to drought stress. The expression levels of APX and CAT increased fast after drought stress, and their peaks after 3 hours were 5 and 4.3 times of that at 0 h. 【Conclusion】 Antioxidant enzyme genes APX, CAT, MnSOD, FeSOD and Cu/ZnSOD from *Lathyrus sativus* were successfully cloned, and it is speculated that they could scavenge ROS induced by drought stress.

Key words: *Lathyrus sativus* L.; antioxidant enzymes genes; gene cloning; bioinformatics

山黧豆(*Lathyrus sativus* L.)是豆科蝶形花亚科野豌豆族的一年生草本植物。山黧豆具有许多与干旱胁迫相适应的形态特征,如披针状的叶片、发达的茎卷曲和叶卷曲、扁平宽阔状的果荚、庞大且具有发达根瘤的根系等^[1]。在中国、中东和北非的一些干旱和半干旱地区,山黧豆被广泛种植,甚至在年降水量仅有 350~400 mm 的黄土高原,山黧豆仍能保持一定的产量。因此,山黧豆被认为是研究抗旱分子机制的良好材料系统。

活性氧(ROS)作为一种重要信号分子,调控了较广范围的生物学过程,比如生长、发育和响应生物/非生物胁迫^[2-3]。抗氧化防御系统是植物体内清除 ROS、维持植物机体 ROS 平衡的主要途径^[4]。Jiang 等^[5]用 20% PEG 6000 处理 5 d 苗龄的豌豆和山黧豆幼苗,结果显示,山黧豆生长受到的抑制程度较豌豆轻,山黧豆叶片中的过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷氨酸过氧化物酶(GPX)的活性较豌豆叶片高,与此一致的是这些抗氧化酶在转录水平上也均表现出了上调的趋势,表明山黧豆比豌豆具有更强大的抗氧化系统。目前,多种植物的抗氧化酶基因已被克隆并应用于植物抗旱基因工程研究^[6]。相关研究^[7-8]表明,抗氧化酶基因的过量表达能不同程度地提高植物对于干旱胁迫的抵抗能力。然而,迄今为止有关山黧豆抗旱基因分离的研究却屈指可数。鉴于此,本研究从山黧豆抗氧化酶系统中克隆得到 APX、MnSOD、FeSOD、Cu/ZnSOD 和 CAT 抗氧化酶基因,并对其基因结构、蛋白结构、序列同源性

以及进化关系进行了预测和比较分析;同时,运用荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术对 APX、MnSOD、FeSOD、Cu/ZnSOD 和 CAT 抗氧化酶基因在山黧豆不同组织中的表达模式进行分析,为研究抗氧化酶基因在山黧豆中的抗旱机制奠定基础,也为其他农作物改良提供优良的基因资源库。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 山黧豆 试验所用山黧豆种子由西北农林科技大学生命科学院徐全乐副教授提供。将山黧豆种子播于含腐殖土、蛭石、珍珠岩(质量比为 1:1:1)的混和基质中,覆膜以保持相对湿度。

1.1.2 试剂 Trizol,购于康为世纪生物科技有限公司;TransScript® II All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for PCR kit、TransStart® FastPfu DNA 聚合酶、TransStart® FastPfu 缓冲液、dNTP、Easy Pure PCR Purification kit、pEASY®-Blunt 克隆载体、氨苄青霉素,均购自北京全式金生物技术有限公司;SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒,购于宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 山黧豆叶片 RNA 提取及其抗氧化酶基因的克隆 采用 Trizol 法^[9]提取萌发 7 d 山黧豆叶片的总 RNA,使用超微量分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度,采用 1%聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 RNA 质量,使用全式金 TransScript® II All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for PCR kit 试剂

盒合成 cDNA(RT-PCR 反应体系:总 RNA 8 μ L, 5 $\times$ Master mix 4 μ L,Nuclease-free H₂O 8 μ L;扩增程序:25 $^{\circ}$ C 退火 10 min,42 $^{\circ}$ C 延伸 50 min,85 $^{\circ}$ C 失活 5 min)。根据抗氧化酶各基因保守序列,在山黧豆转录组数据库中 进行同源序列搜索,通过编码序列(CDS)预测得到 APX、MnSOD、FeSOD、Cu/ZnSOD 和 CAT 基因的 cDNA 序列。利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物(表 1),以反转录得到的 cDNA 为模板,对抗氧化酶基因进行扩增。PCR 扩增反应体系为:稀释后的 cDNA 1 μ L, TransStart[®] FastPfu DNA 聚合酶(2.5 U/ μ L)0.5

μ L, 5 $\times$ TransStart[®] FastPfu 缓冲液 4 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 2 μ L,上、下游引物各 1 μ L,ddH₂O 10.5 μ L。PCR 扩增程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min;95 $^{\circ}$ C 变性 20 s,退火温度 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,40 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,再使用 Easy Pure PCR Purification 试剂盒纯化,纯化产物连接到 pEASY[®]-Blunt 克隆载体,将重组质粒转化到大肠杆菌 Trans-T1 感受态细胞,涂于含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基中,筛选阳性克隆送至中国农业科学院测序中心测序。

表 1 山黧豆抗氧化酶基因扩增所用引物
Table 1 Primers used for amplifying antioxidant enzyme genes of *Lathyrus sativus* L.

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence	产物大小/bp Fragment size	退火温度/ $^{\circ}$ C Annealing temperature
APX	F:5'-ATGGCGTTACCGGTGGTGGTAGA-3' R:5'-CTACTTCCCTCTTTTGAATGTTCATAC-3'	864	55
CAT	F:5'-ATGGATCCATACAAGCATCGACC-3' R:5'-TTAAATGCTAGGCCTCATGTTCAG-3'	1 485	60
MnSOD	F:5'-ATGGCCGCTCGAACCCCTACTCTGC-3' R:5'-TTAAGAGCTCTCTTTCTCATATAC-3'	723	55
FeSOD	F:5'-ATGAAATTGCTATCTCCTTCCGC-3' R:5'-CTAGTCGTCACTATCACTATCTTC-3'	1 005	55
Cu/ZnSOD	F:5'-ATGGCATTTCTAAGGTCCGTAGTCG-3' R:5'-TCAGAACTTGCTAGTAACAAAATCTG-3'	942	55

1.2.2 山黧豆抗氧化酶的生物信息学分析 通过在线软件 ExPASy ProtParam ([http://www. ex-pasy.org/tools/protparam. html](http://www.ex-pasy.org/tools/protparam.html))对山黧豆抗氧化酶的基本理化性质进行分析;采用 SignalP 4.1 软件、TMHMM V. 2.0 软件和 NCBI 数据库中的 Conserved Domain 工具分别分析山黧豆抗氧化酶蛋白信号肽、跨膜区域和保守结构域;利用 SOPMA ([https://npsa-prabi. ibcp. fr/cgi-bin/npsa _ auto-mat. pl? page=npsa_sopma. html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_auto-mat.pl?page=npsa_sopma.html))在线工具预测蛋白质二级结构;利用 TargetP 1.1 软件预测蛋白质

的亚细胞定位;利用 NCBI 数据库对山黧豆与其他物种抗氧化酶氨基酸序列进行 BLASTn 和 BLASTp 比对,以获得相似性较高的代表性物种;利用 MEGA 6.0 软件对不同物种抗氧化酶的氨基酸序列进行多重比对,构建 Neighbor-joining 系统进化树,设置 Bootstrap 参数为 1 000。

1.2.3 山黧豆抗氧化酶基因的表达分析 山黧豆抗氧化酶基因扩增所用荧光定量 PCR 引物如表 2 所示。

表 2 山黧豆抗氧化酶基因扩增所用荧光定量 PCR 引物
Table 2 qPCR primers used for amplifying antioxidant enzyme genes of *Lathyrus sativus* L.

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence	产物大小/bp Fragment size	退火温度/ $^{\circ}$ C Annealing temperature
APX	F:5'-TGCAGGTGTTGTTGCAAGTTG-3' R:5'-ACTAAAGCCCTGTCCGTTGG -3'	336	60
CAT	F:5'-TCTGGACTACGAACCTCCGGT-3' R:5'-GGGTCCCTCAAGGTTTCAGG-3'	310	60
MnSOD	F:5'-TTGGAGCCTGTCATTAGCGG-3' R:5'-ATCCAGACCCCTGAAGAGCT-3'	337	60
FeSOD	F:5'-TGGATGGACATGGCTTGCAT-3' R:5'-TCCCTCTCTGCAATTACGGC-3'	297	60
Cu/ZnSOD	F:5'-GTGGGCTATCACCAGGGAAG-3' R:5'-CACCCACTGCTGCACTTCTA-3'	297	60
18S rRNA	F:5'-GGTGATGATGCTCCTAGGGC-3' R:5'-TGTTGGCCTTTGGGTTGAGT-3'	280	60

正常条件下培养山黧豆 7 d 后,采集根、茎、叶,保存备用。根据基因序列测序信息设计荧光定量

PCR 引物(表 2),采用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 试剂盒,以 18S rRNA 为内参基因,在 Applied Bio-

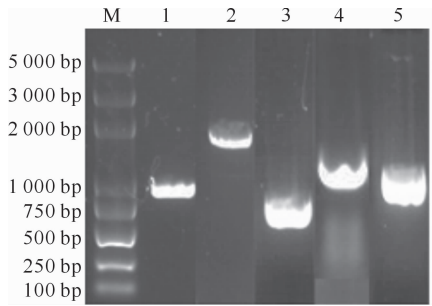
systems 7500 Fast Real-time PCR System 中检测 APX、CAT、MnSOD、FeSOD 和 Cu/ZnSOD 基因在山黧豆不同组织中的表达量。将山黧豆种子播种于湿润的蛭石中,待幼苗长至 14 d 时将其从蛭石中小心取出,水中静置 1 h 以消除创伤刺激。然后将山黧豆幼苗根部浸没在 20% PEG 6000 中,分别干旱胁迫 0,1,3,6,12 和 24 h 后取山黧豆幼苗的叶片,以 APX、CAT 和 MnSOD 基因为代表,检测不同抗氧化酶基因在干旱胁迫处理条件下的相对表达量。qRT-PCR 反应体系:稀释后 cDNA 1 μ L, SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 试剂盒 10 μ L,荧光定量 PCR 校正染料 0.4 μ L,上、下游引物各 0.8 μ L, ddH₂O 7 μ L。设置 3 个重复,采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法分析基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 山黧豆抗氧化酶基因的克隆

以山黧豆叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,得到单一、特异的扩增条带。APX、CAT、MnSOD、FeSOD 和 Cu/ZnSOD 基因片段大小分别约为 864,1 485, 723,1 005 和 942 bp(图 1)。经测序分析,得到含有

完整开放阅读框的 CDS 序列。



M. DNA 标准分子量;1. APX;2. CAT;3. MnSOD;
4. FeSOD;5. Cu/ZnSOD
M. DNA Marker;1. APX;2. CAT;3. MnSOD;
4. FeSOD;5. Cu/ZnSOD

图 1 山黧豆 APX、CAT、MnSOD、FeSOD、
Cu/ZnSOD 基因的 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR amplification products of APX,CAT,MnSOD,
FeSOD,and Cu/ZnSOD genes in *Lathyrus sativus* L.

2.2 山黧豆 SOD、APX、CAT 基因编码蛋白质的生物信息学

2.2.1 理化性质 利用 ExPASy ProtParam 对 SOD、APX、CAT 基因编码蛋白质进行理化性质分析,结果(表 3)显示,APX、CAT、MnSOD、FeSOD 和 Cu/ZnSOD 均为酸性不稳定蛋白质,具有疏水性。

表 3 山黧豆抗氧化酶基因编码蛋白质的理化性质

Table 3 Physicochemical properties of amino acid encoded by antioxidant enzyme genes in *Lathyrus sativus* L.

蛋白质 Protein	分子量/ku Relative molecular mass	分子式 Molecular formula	等电点 pI	不稳定系数 Instable index	平均亲水性 Average hydrophilicity
APX	70	C ₂₅₈₂ H ₄₃₀₂ N ₈₆₄ O ₁₀₈₇ S ₁₈₃	5.11	45.61	0.715
CAT	125	C ₄₅₅₈ H ₇₆₃₃ N ₁₄₈₅ O ₁₉₀₈ S ₃₅₂	4.98	48.87	0.783
MnSOD	59	C ₂₁₇₉ H ₃₆₃₇ N ₇₂₃ O ₉₀₀ S ₁₇₁	5.12	50.42	0.852
FeSOD	82	C ₃₀₃₇ H ₅₀₇₁ N ₁₀₀₅ O ₁₂₆₉ S ₁₈₆	5.11	40.95	0.748
Cu/ZnSOD	78	C ₂₈₆₃ H ₄₇₈₆ N ₉₄₂ O ₁₁₉₄ S ₂₁₂	5.08	50.30	0.792

2.2.2 二级结构预测 利用 SOPMA 对 SOD、APX、CAT 蛋白质的二级结构进行预测,结果如表 4 所示。由表 4 可知,山黧豆 5 种抗氧化酶基因编码的蛋白质

二级结构均涉及到 3 种形态 4 种状态,分别为 H 螺旋:(α -螺旋,h); β 链:E(延伸链,e);卷曲:T(β -转角,t)和 C(无规则卷曲,c)。

表 4 山黧豆抗氧化酶基因编码蛋白质的二级结构组成

Table 4 Secondary structure of antioxidant enzymes in *Lathyrus sativus* L.

蛋白质 Protein	α -螺旋 α -helix	延伸链 Extended strand	无规则卷曲 Random coil	β -转角 β -turn
APX	42.16	12.54	37.98	7.32
CAT	25.91	14.78	53.85	5.47
MnSOD	48.75	12.50	31.67	7.08
FeSOD	44.91	13.17	36.23	5.69
Cu/ZnSOD	26.20	22.04	41.85	41.85

2.2.3 信号肽、跨膜区域及保守结构域预测 利用 SignalP 4.1 软件分析发现,APX、CAT、MnSOD、FeSOD 和 Cu/ZnSOD 蛋白质序列的 mean-s 值均小于 0.5,说明其均不存在信号肽序列。通过 TargetP 1.1 软件预测可知,APX 和 CAT 定位于细胞质中,Mn-

SOD 定位于线粒体中,FeSOD 和 Cu/ZnSOD 定位于叶绿体中。用 TMHMM V. 2.0 软件分析发现,只有 APX 含有 1 个跨膜结构区,分布于第 258—280 位氨基酸,属跨膜蛋白质(图 2);CAT、MnSOD、FeSOD、Cu/ZnSOD 基因编码的肽链位于膜外,不存在跨膜

区,属于可溶性蛋白质。保守结构域分析显示,APX、CAT、MnSOD、FeSOD 和 Cu/ZnSOD 基因编码的蛋白质都含有保守序列。其中 APX 属于植物过氧化物酶家族,含 3 个结合位点,即亚铁血红素结合位点、底物结合位点和 K⁺ 结合位点;CAT 属于植物过氧化氢

酶家族,含亚铁血红素结合位点和四聚体界面;MnSOD、FeSOD 和 Cu/ZnSOD 属于植物超氧化物歧化酶家族,Cu/ZnSOD 同时含激活位点、Cu²⁺ 结合位点和二聚体界面。

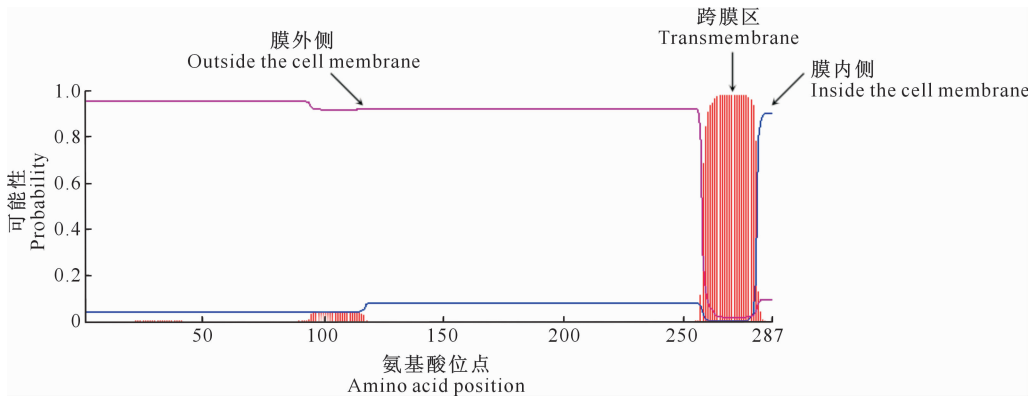


图 2 山黧豆 APX 蛋白的跨膜结构预测

Fig. 2 Transmembrane region of APX in *Lathyrus sativus* L.

2.2.4 氨基酸序列比对及系统进化树构建 通过 NCBI 数据库,对山黧豆 APX、CAT、MnSOD、FeSOD 和 Cu/ZnSOD 进行 BLASTn 和 BLASTp 比对,获得与蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)、刺毛黧豆(*Mucuna pruriens*)、大豆(*Glycine max*)、绿豆(*Vigna radiata* var. *radiata*)、木豆(*Cajanus cajan*)、蚕豆(*Vicia faba*)、豌豆(*Pisum sativum*)、百脉根(*Lotus japonicus*)、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)、红车轴草(*Trifolium pratense*)、野大豆(*Glycine soja*)、紫苜蓿(*Medicago sativa*)以及豇豆(*Vigna unguiculata*)等相似性较高的代表性物种。利用 MEGA 6.0 软件中的 Clustal W 进行蛋白质氨基酸序列多重比对,结果表明,APX 基因编码蛋白质的氨基酸序列与蒺藜苜蓿、刺毛黧豆、大豆、绿豆、木豆和豇豆的相似度分别为 91%,85%,86%,85%,85%和 84%;CAT 基因编码蛋白质的氨基酸序

列与蚕豆、豌豆、箭筈豌豆、蒺藜苜蓿、木豆、百脉根、大豆、刺毛黧豆、绿豆和菜豆的相似度分别为 98%,97%,96%,92%,89%,88%,88%,87%,88%和 87%;MnSOD 基因编码蛋白质的氨基酸序列与豌豆、箭筈豌豆、红车轴草、蒺藜苜蓿、刺毛黧豆、大豆、绿豆和木豆的相似度分别为 98%,98%,93%,91%,87%,86%,85%和 85%;FeSOD 基因编码蛋白质的氨基酸序列与紫苜蓿、蒺藜苜蓿、木豆、豌豆、大豆、百脉根、野大豆、绿豆和白车轴草的相似度分别为 78%,77%,70%,93%,76%,77%,75%,67%和 90%;Cu/ZnSOD 基因编码蛋白质的氨基酸序列与蒺藜苜蓿、大豆、刺毛黧豆、锦鸡儿、木豆和绿豆的相似度分别为 86%,81%,78%,79%,84%和 85%。

利用 MEGA 6.0 软件构建山黧豆抗氧化酶基因编码蛋白质的系统进化树,结果如图 3~7 所示。

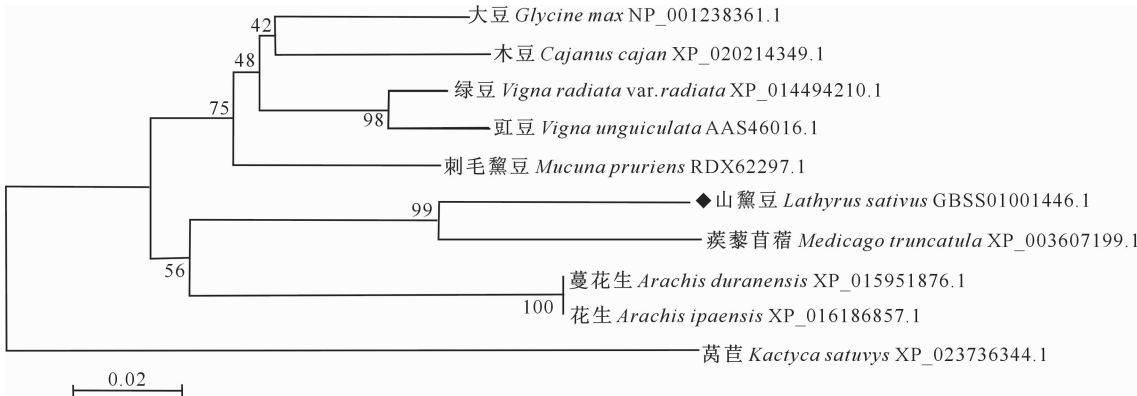


图 3 山黧豆 APX 的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of APX in *Lathyrus sativus* L.

由图 3~7 可知,APX 系统进化树中,山黧豆与蒺藜苜蓿聚集在同一分支上,亲缘关系较高;CAT 系统进化树中,山黧豆与蚕豆聚集在同一分支上,遗传距离为 0.021,亲缘关系较高;MnSOD 和 FeSOD 系统进

化树中,山黧豆与豌豆聚集在同一分支上,遗传距离分别为 0.013 和 0.061,亲缘关系较高;Cu/ZnSOD 系统进化树中,山黧豆与锦鸡儿聚集在同一分支上,遗传距离为 0.404,亲缘关系较近。

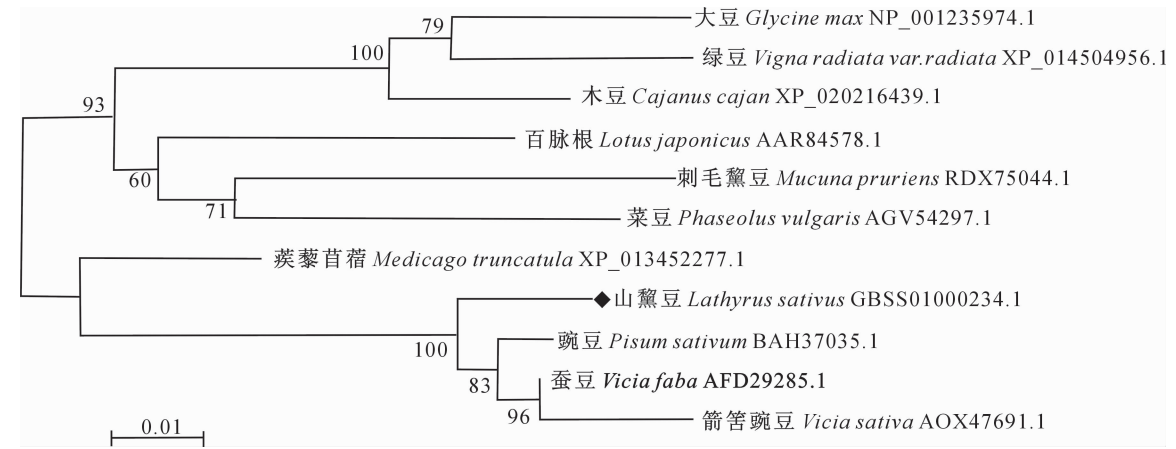


图 4 山黧豆 CAT 的系统进化树
Fig. 4 4 Phylogenetic tree analysis of CAT in *Lathyrus sativus* L.

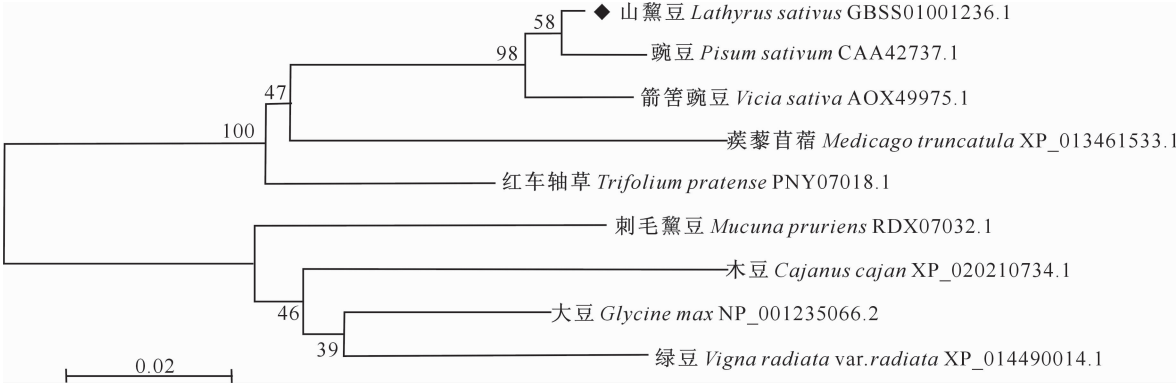


图 5 山黧豆 MnSOD 的系统进化树
Fig. 5 Phylogenetic tree analysis of MnSOD in *Lathyrus sativus* L.

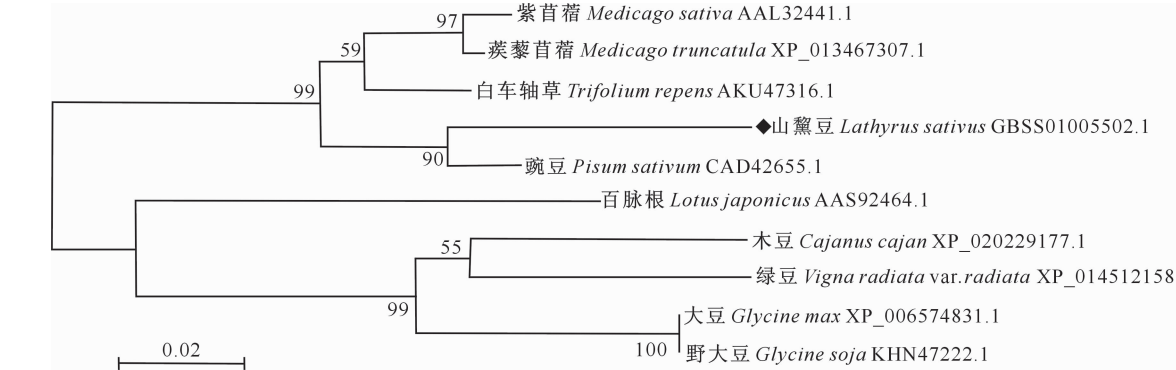


图 6 山黧豆 FeSOD 的系统进化树
Fig. 6 Phylogenetic tree analysis of FeSOD in *Lathyrus sativus* L.

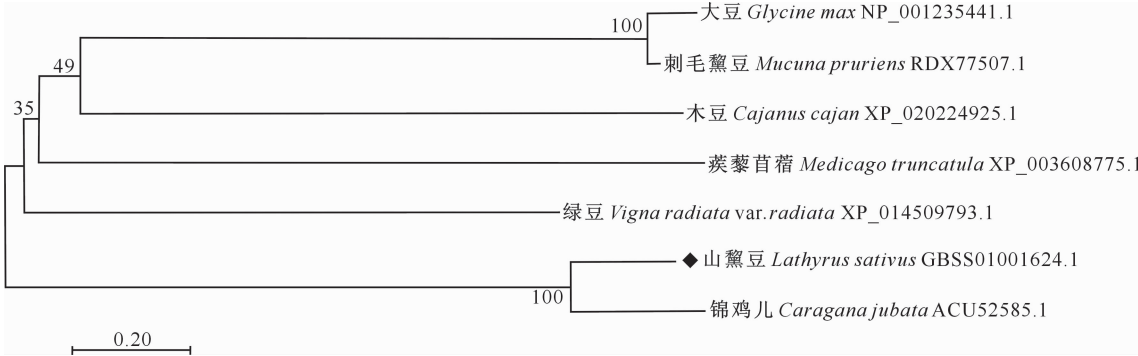


图 7 山黧豆 Cu/ZnSOD 的系统进化树

Fig. 7 Phylogenetic tree analysis of Cu/ZnSOD in *Lathyrus sativus* L.

2.3 山黧豆抗氧化酶基因的表达分析

2.3.1 抗氧化酶基因在不同组织中的表达 利用荧光定量 PCR 检测已克隆山黧豆抗氧化酶基因的组织表达特异性,结果(图 8)表明,抗氧化酶基因在山黧豆根、茎和叶中均有表达,但表达模式不同。APX、Fe-

SOD 基因在山黧豆茎中的表达量最高,根中表达量最低,推测其可能参与茎的生长分化过程。CAT、Cu/ZnSOD、MnSOD 基因在山黧豆叶中的表达量最高,其可能参与了叶的生长分化过程。

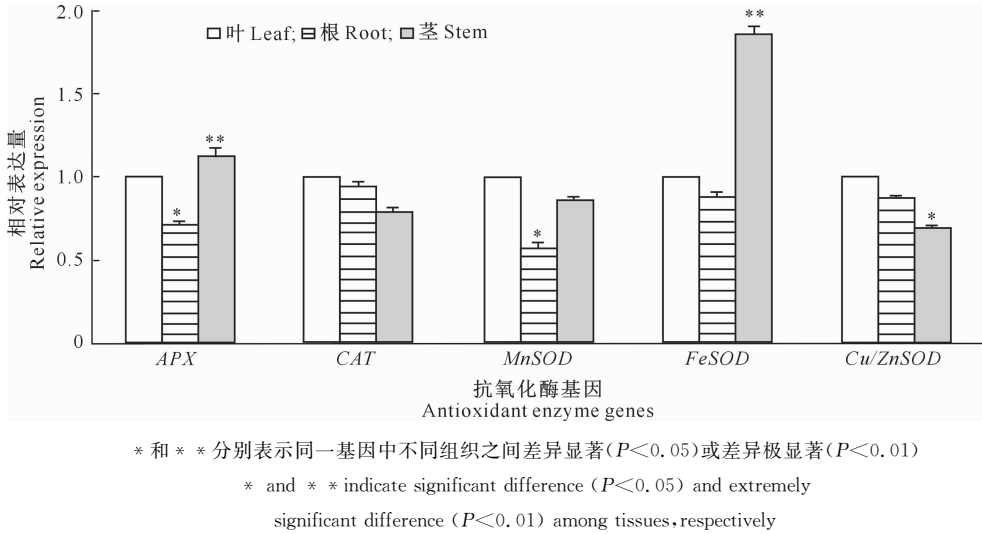


图 8 山黧豆抗氧化酶基因 APX、CAT、MnSOD、FeSOD 和 Cu/ZnSOD 在不同组织中的相对表达量

Fig. 8 Relative expression analysis of APX, CAT, MnSOD, FeSOD, and Cu/ZnSOD genes in different tissues of *Lathyrus sativus* L.

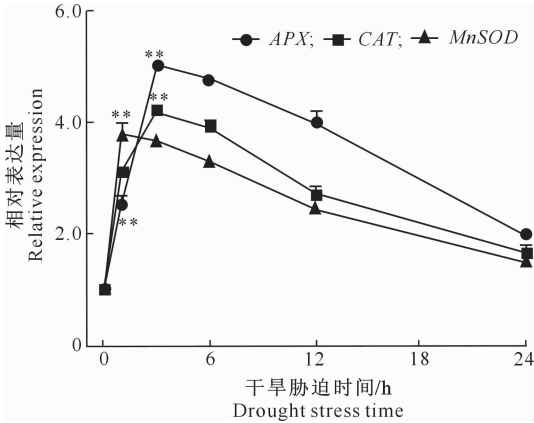
2.3.2 干旱胁迫对抗氧化酶基因表达的影响 为了探究抗氧化酶基因是否受到干旱胁迫的诱导,进一步分析了干旱胁迫不同时间后,APX、CAT 和 MnSOD 基因在山黧豆叶片中的相对表达量,结果见图 9。图 9 显示,干旱胁迫处理后,APX、CAT、MnSOD 基因在山黧豆叶片中的表达都有不同程度的提高,其中 APX、CAT 基因的表达量在胁迫后迅速升高,3 h 后达到最高,分别是 0 h 的 5 和 4.3 倍;MnSOD 基因的表达量在 1 h 时达到最高水平,大约是 0 h 的 4 倍。

3 讨论

ROS 不仅是有氧代谢的毒副产物,也可作为信号分子参与基本的生物过程,如细胞增殖、分化,ROS

过多或过少都会影响植物的生长发育。因此,ROS 基础水平的维持对于促进植物正常生长至关重要。抗氧化酶是植物 ROS 网络中的一类清除酶,其中 SOD 可以清除 O_2^- 产生 H_2O_2 , APX 和 CAT 进一步清除 H_2O_2 。APX、CAT、SOD 广泛存在于植物细胞中,通过维持 ROS 稳态平衡,在 ROS 信号分子介导的细胞氧化还原过程中发挥作用^[10]。近年来,抗氧化酶基因在拟南芥^[11]、水稻^[12]、玉米^[13]、小麦^[14]、油菜^[15]和番茄^[16]中的研究取得重大进展。山黧豆是一种具有广谱抗逆性且营养丰富的豆科作物,尽管已从生理生化、基因表达和蛋白表达水平等不同层次对于干旱胁迫下山黧豆的应答机制进行了探讨^[17-18],但具有应用价值的性状资源如抗性基因的研究却非常少^[19]。为

此,本研究从山黧豆中首次分离得到了 *APX*、*CAT*、*MnSOD*、*FeSOD* 和 *Cu/ZnSOD* 基因的 CDS 序列,其长度比 Jiang 等^[5]所克隆的山黧豆抗氧化酶基因更完整。通过氨基酸序列分析表明,山黧豆抗氧化酶分布于细胞质、线粒体和叶绿体不同区室中,推测其可协同清除干旱胁迫产生的 ROS;山黧豆抗氧化酶与豆科的蒺藜苜蓿、蚕豆、豌豆和锦鸡儿等有极高的同源性,构建的 N-J 系统进化树进一步直观地反映了山黧豆与其他物种之间的亲缘关系和遗传距离。



** 表示同一基因不同胁迫时间间差异极显著 ($P<0.01$)
** indicates extremely significant difference at different time points ($P<0.01$)

图 9 干旱胁迫处理不同时间下山黧豆 *APX*、*CAT* 和 *MnSOD* 基因在叶片中的相对表达量

Fig. 9 Relative expression analysis of *APX*, *CAT*, and *MnSOD* gene at different time points of *Lathyrus sativus* L. with drought stress

氧化胁迫的发生是许多非生物胁迫的共同效应,因此,研究者们都在尝试通过调控抗氧化酶清除 ROS 的能力,从而改善植物的抗旱性^[20]。研究^[21-24]表明,抗氧化酶基因的表达水平和活性与植物抗旱性密切相关。Jiang 等^[5]通过半定量 PCR 检测了干旱胁迫条件下山黧豆抗氧化酶基因 *APX*、*CAT*、*MnSOD*、*FeSOD* 和 *Cu/ZnSOD* 的表达水平,发现除了 *Cu/ZnSOD*、*FeSOD* 基因表达量不变或下降外,*APX*、*CAT* 和 *MnSOD* 基因表达量均增加,与对照相比上调了 2~4 倍。因此,本研究选择 *APX*、*CAT* 和 *MnSOD* 基因,探究已克隆的抗氧化酶基因是否受到干旱胁迫的诱导,结果发现,山黧豆 *APX*、*CAT*、*MnSOD* 基因均响应干旱胁迫,其中 *MnSOD* 基因的表达量在干旱胁迫 1 h 时大幅提高,表明 *MnSOD* 对清除线粒体 ROS 起着至关重要的作用,这与之前报道的 Mn^{2+} 能有效阻止 ROS 毒副作用是一致的^[25]; *APX* 基因的表达量变化最为明显,干旱胁迫 3 h 后表达量增加了约

4 倍,且之后 3 h 仍保持高水平,表明 *APX* 是山黧豆抗氧化酶系统中的关键酶之一。

[参考文献]

[1] 熊俊兰,白雪, Batool A, 等. 山黧豆毒素 β -ODAP 的生态学功能及应用 [J]. 应用生态学报, 2014, 25(4): 1197-1205.
Xiong J L, Bai X, Batool A, et al. Ecological function and application of toxin β -ODAP in grass pea (*Lathyrus sativus*) [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2014, 25(4): 1197-1205.

[2] Baxter A, Mittler R, Suzuki N. ROS as key players in plant stress signaling [J]. J Exp Bot, 2014, 65(5): 1229-1240.

[3] Cruz de Carvalho M H. Drought stress and reactive oxygen species [J]. Plant Signaling and Behavior, 2008, 3(3): 156-165.

[4] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance [J]. Trends Plant Sci, 2002, 7(9): 405-410.

[5] Jiang J L, Su M, Chen Y R, et al. Correlation of drought resistance in grass pea (*Lathyrus sativus*) with reactive oxygen species scavenging and osmotic adjustment [J]. Biologia, 2013, 68(2): 231-240.

[6] 林宇丰,李魏,戴良英. 抗氧化酶在植物抗旱过程中的功能研究进展 [J]. 作物研究, 2015, 29(3): 320-330.
Lin Y F, Li W, Dai L Y. Research progress of antioxidant enzymes functioning in plant drought resistant process [J]. Crop Research, 2015, 29(3): 320-330.

[7] Diaz-Vivancos P, Faize M, Barba-Espin G, et al. Ectopic expression of cytosolic superoxide dismutase and ascorbate peroxidase leads to salt stress tolerance in transgenic plums [J]. Plant Biotechnology Journal, 2013, 11(8): 976-985.

[8] Faize M, Faize L, Petri C, et al. Cu/Zn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase enhanced *in vitro* shoot multiplication in transgenic plum [J]. Journal of Plant Physiology, 2013, 170(7): 625-632.

[9] Stevens R, Grelon M, Vezon D, et al. A CDC45 homolog in *Arabidopsis* is essential for meiosis, as shown by RNA interference-induced gene silencing [J]. Plant Cell, 2004, 16(1): 99-113.

[10] Mittler R. ROS are good [J]. Trends in Plant Science, 2017, 22(1): 11-18.

[11] Davletova S, Rizhsky L, Liang H, et al. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell, 2005, 17(1): 268-281.

[12] Teixeira F K, Menezes-Benavente L, Margis R, et al. Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family; inferences from the rice genome [J]. J Mol Evol, 2004, 59(6): 761-770.

[13] Liu Y J, Yuan Y, Liu Y Y, et al. Gene families of maize glutathione-ascorbate redox cycle respond differently to abiotic stresses [J]. J Plant Physiol, 2012, 169(2): 183-192.

[14] Sheoran S, Thakur V, Narwal S, et al. Differential activity and expression profile of antioxidant enzymes and physiological changes in wheat (*Triticum aestivum* L.) under drought [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2015, 177(6): 1282-1298.

[15] Vansuyt G, Lopez F, Inzé D, et al. Iron triggers a rapid induction of ascorbate peroxidase gene expression in *Brassica napus* [J]. FEBS

Lett,1997,410(2):195-200.

[16] Najami N,Janda T,Barriah W,et al. Ascorbate peroxidase gene family in tomato:its identification and characterization [J]. Mol Genet Genomics,2008,279(2):171-182.

[17] Jiang J,Su M,Wang L,et al. Exogenous hydrogen peroxide reversibly inhibits root gravitropism and induces horizontal curvature of primary root during grass pea germination [J]. Plant Physiol Biochem,2012,4(53):84-93.

[18] Abdelkrim S,Jebara S H,Jebara M. Antioxidant systems responses and the compatible solutes as contributing factors to lead accumulation and tolerance in *Lathyrus sativus* inoculated by plant growth promoting rhizobacteria [J]. Ecotoxicol Environ Saf,2018,166:427-436.

[19] 蒋景龙,李 丽,曹小勇,等. 山黧豆抗逆性研究进展 [J]. 西北植物学报,2013,33(10):2141-2146.

Jiang J L,Li L,Cao X Y,et al. Advancement in research on stress resistance of grass pea [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica,2013,33(10):2141-2146.

[20] Miller G,Suzuki N,Ciftci-Yilmaz S,et al. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses [J]. Plant,Cell and Environment,2010,33(4):453-467.

[21] Diaz-Vivancos P,Faize L,Nicolas E,et al. Transformation of plum plants with a cytosolic ascorbate peroxidase transgene leads to enhanced water stress tolerance [J]. Ann Bot,2016,117(7):1121-1131.

[22] Wang X,Cai J,Jiang D,et al. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase [J]. Journal of Plant Physiology,2005,162(4):465-472.

[23] Kim M D,Kim Y H,Kwon S Y,et al. Enhanced tolerance to methyl viologen-induced oxidative stress and high temperature in transgenic potato plants over expressing the *Cu/ZnSOD*,*APX* and *NDPK2* genes [J]. Physiol Plant,2010,140(2):153-162.

[24] Li Z,Zhang J,Li J,et al. The functional and regulatory mechanisms of the *thellungiella salsuginea* ascorbate peroxidase 6 (*TsAPX6*) in response to salinity and water deficit stresses [J]. PLoS ONE,2016,11(4):e0154042.

[25] Slade D,Radman M. Oxidative stress resistance in *deinococcus radiodurans* [J]. Microbiol Mol Biol Rev,2011,75(1):133-191.

(上接第 70 页)

[24] Kathrin I M. Diversity of myxobacteria-we only see the tip of the iceberg [J]. Microorganisms,2018,6(3):84-106.

[25] Nan B,Zusman D R. Uncovering the mystery of gliding motility in the myxobacteria [J]. Annual Review of Genetics,2011,45:21-39.

[26] Herrmann J,Abou Fayad A,Mülle R. Natural products from myxobacteria;novel metabolites and bioactivities [J]. Natural Product Reports,2017,34(2):135-160.