

# 双齿围沙蚕 Cu/Zn-SOD cDNA 基因的克隆及序列分析

岳宗豪, 樊鑫, 赵欢, 任洪伟, 张旭峰, 周一兵

(大连海洋大学 辽宁省海洋生物资源恢复与生境修复重点实验室, 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 根据已知多毛类 *Alitta succinea* 铜锌超氧化物歧化酶 (Cu/Zn-SOD) 基因序列设计引物, 利用同源克隆及 RACE 方法首次从双齿围沙蚕 *Perinereis aibuhitensis* 中克隆得到 Cu/Zn-SOD 基因全长 cDNA 序列。结果表明: 双齿围沙蚕 Cu/Zn-SOD 基因 cDNA 全长 870 bp, 其中包括 156 bp 的 5' 端非编码区, 261 bp 3' 端非翻译区和 453 bp 开放阅读框, 编码 150 个氨基酸; 该蛋白序列具有典型的 Cu<sup>2+</sup> 和 Zn<sup>2+</sup> 结合位点, 并具有两处 Cu/Zn-SOD 蛋白家族标签序列。通过生物信息学分析表明, 该蛋白属于胞内 Cu/Zn-SOD, 理论相对分子质量为 15 249 900, 等电点为 5.66, 无信号肽和跨膜区, 推测为亲水性蛋白。同源性分析表明, 双齿围沙蚕 Cu/Zn-SOD 氨基酸序列与部分软体动物、鱼类和昆虫的 Cu/Zn-SOD 蛋白序列具有很高的相似性。该研究结果为后续研究 Cu/Zn-SOD 与环境污染物质之间的剂量效应关系奠定了基础, 为研究双齿围沙蚕机体的防御机制提供了基础资料。

**关键词:** 双齿围沙蚕; 铜锌超氧化物歧化酶; 生物信息学分析; 同源性分析

**中图分类号:** Q78; S917 **文献标志码:** A

铜锌超氧化物歧化酶 (copper-zinc superoxide dismutase, Cu/Zn-SOD) 属于超氧化物歧化酶家族, 广泛存在于真核和原核生物中。Cu/Zn-SOD 一般是由 2 个基本相似的亚基组成的二聚体, 且每个亚基含有 1 个铜原子和 1 个锌原子<sup>[1]</sup>。其中铜与催化活性有关, 铜的缺失将会导致其活性完全丧失, 进而危害人类和动物体的健康, 产生多种疾病<sup>[2-5]</sup>。Cu/Zn-SOD 的主要功能是清除体内多余的超氧阴离子自由基, 保护机体免受氧化损伤。由于 Cu/Zn-SOD 的存在, 健康水生动物体内的活性氧自由基能够维持在有利无害的较低水平<sup>[6]</sup>。此外, Cu/Zn-SOD 还与免疫有关。Sook 等<sup>[7]</sup>研究发现, 注射脂多糖的螃蟹 *Callinectes sapidus* 体内 Cu/Zn-SOD 被显著诱导, 表明 Cu/Zn-SOD 与免疫防御系统有关。Bao 等<sup>[8]</sup>研究发现, 对海湾扇贝 *Argopecten irradians* 注射鳃弧菌后, 其血细胞中 Cu/Zn-SOD 表达水平增加, 表明 Cu/Zn-SOD 在对鳃弧菌的免疫反应中可能起着重要作用。

双齿围沙蚕 *Perinereis aibuhitensis* 隶属于环节动物门 Annelida、多毛纲 Polychaeta, 是广泛分布于中国沿海潮间带及河口潮滩的优势底栖动物, 属于重要的经济多毛类<sup>[9]</sup>。由于其生活在极易富集污染物的沉积质中, 更容易受到污染物的影响, 所以双齿围沙蚕常作为污染物暴露的指示生物。目前, 已经在软体动物<sup>[10-12]</sup>、节肢动物<sup>[13-14]</sup>、脊索动物<sup>[15-16]</sup> 等中获得了 Cu/Zn-SOD 序列, 但有关双齿围沙蚕 Cu/Zn-SOD 序列的研究国内外尚未见报道。

从分子水平深入开展沙蚕 Cu/Zn-SOD 基因克隆研究, 有助于探索污染物在沙蚕体内的代谢途径及其解毒机理, 并为进一步研究双齿围沙蚕的生态毒理学提供基础依据和新思路。本研究中, 利用同源克隆及 RACE 方法首次从双齿围沙蚕体壁组织中克隆得到 Cu/Zn-SOD 基因, 并对该基因进行了生物信息学分析。

收稿日期: 2013-12-03

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项 (201305002, 201305043); 国家海洋局重点实验室开放基金资助项目 (201217); 国家自然科学基金资助项目 (41306138)

作者简介: 岳宗豪 (1989—), 男, 硕士研究生。E-mail: yzh642324521@163.com

通信作者: 周一兵 (1957—), 男, 教授。E-mail: ybzhou@dlou.edu.cn

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

试验用双齿围沙蚕采自辽宁省盘锦市双台子河口,挑选体质量为 1.5 ~ 2.5 g 的个体,带回辽宁省海洋生物资源恢复与生境修复重点实验室暂养一周。暂养期间,每 24 h 更换一次海水,水温保持在 (19 ± 0.5) °C,盐度为 31 ~ 32, pH 为 8.25 ± 0.10。试验海水中 Cu(II)、Hg(II)、Zn(II)、Pb(II) 和 Cd(II) 的背景浓度分别为 0.38、0.01、75.00、0.27、0.06 μg/L。

## 1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 剪取 0.1 g 双齿围沙蚕体壁放入预冷灭菌研钵中,加入液氮将组织迅速研磨至粉末状,按照 RNAiso™ Plus (TaKaRa 公司)说明书中的相关步骤提取总 RNA。将提取的总 RNA 溶于 DEPC 处理水中,于 -80 °C 下保存备用。用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性,使用微量分光光度计测定其浓度。

1.2.2 cDNA 第一链的合成 以提取的双齿围沙蚕总 RNA 为模板,按照 Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H<sup>-</sup>) 反转录试剂盒 (TaKaRa 公司)说明书进行第一链的合成。cDNA 第一链合成反应条件如下:70 °C 下反应 10 min,放到冰上急冷 2 min,然后在 42 °C 下反应 60 min,70 °C 下反应 15 min。

1.2.3 引物设计 依据已知多毛类 *Alitta succinea* Cu/Zn-SOD 基因 (HM563679.1) CDS 保守区设计简并引物,利用同源克隆获得双齿围沙蚕 Cu/Zn-SOD 基因的特异性片段。根据得到的 Cu/Zn-SOD 特异性片段设计 3'RACE 和 5'RACE 引物。UPM 由 Clontech SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒提供,其余引物利用 Primer 5.0 软件设计,由 TaKaRa 公司合成。本试验中所用引物见表 1。

1.2.4 特异性片段扩增 按照 TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version 试剂盒说明书,利用设计的简并引物进行特异性片段的扩增。特异性片段 PCR 反应体系共 25 μL,包含: TaKaRa Ex Taq (5 U/μL) 0.2 μL, 10×Ex PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus) 2.5 μL, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2.0 μL, 引物各 0.5 μL, 模板 2.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 17.3 μL。反应条件如下:94 °C 下预变性 2 min; 94 °C 下变性 30 s, 55 °C 下退火 30 s, 72 °C 下延伸 30 s, 共进行 35 个循

表 1 双齿围沙蚕 Cu/Zn-SOD 基因全长扩增引物  
Tab.1 The primers used in the amplification of Cu/Zn-SOD in sandworm *Perinereis aibuhitensis*

引物 primer	序列 sequence(5'-3')
RT-PCR-F	CAYGTNCAYGARTTYGGTG
RT-PCR-R	CCAAYNACACCRCANGCNA
3'RACE-F	ACGGTGCTCCAGAAGACGAGAACCGGC
5'RACE-F	TTTATCGGAGATGTTGATAGGG
UPM-Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGT-GGTATCAACCGCAGACT
UPM-Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC

注: Y 代表 C、T; R 代表 A、G; N 代表 A、T、C、G

Note: Y represents C and T; R represents A and G; N represents A, T, C and G

环;最后在 72 °C 下再延伸 10 min。取 4.0 μL PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,用 TIANgel Midi Purification Kit 切胶回收试剂盒切胶回收目的条带。回收后的产物连接到 pMD™ 18-T Vector (TaKaRa 公司)载体上,连接产物热转化至 DH5α 感受态细胞中,然后涂布于含有 Amp (Ampicillin) 的 LB 平板培养基上,37 °C 下倒置培养 12 ~ 16 h。挑选独立的较大白色单菌落至 LB 液体培养基 (含 Amp) 中,于 37 °C 下培养 4 h,取 1.0 μL 菌液进行菌落 PCR 检测,选取阳性克隆送上海生物工程有限公司测序。

1.2.5 RACE 扩增 按照 Clontech SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 说明书进行 3'RACE 和 5'RACE 扩增。3'RACE 和 5'RACE PCR 反应体系共 50 μL,包含: 10×Adantage 2 PCR Buffer 5.0 μL, dNTP Mix 1.0 μL, 50×Adantage 2 Polymerase Mix 1.0 μL, 3'RACE-Ready cDNA (或 5'RACE-Ready cDNA) 2.5 μL, 3'RACE (或 5'RACE) 引物 1.0 μL, 10×UPM Mix 5.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 34.5 μL。反应条件如下:94 °C 下变性 30 s, 72 °C 下延伸 3 min, 共进行 5 个循环; 94 °C 下变性 30 s, 70 °C 下退火 30 s, 72 °C 下延伸 2 min, 共进行 5 个循环; 94 °C 下变性 30 s, 68 °C 下退火 30 s, 72 °C 下延伸 2 min, 共进行 25 个循环。取 4.0 μL PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,利用“1.2.4”节的方法进行切胶回收和转化连接。挑取阳性克隆送上海生物工程有限公司测序。利用 DNASTar 软件对中间片段、3'RACE 和 5'RACE 测序结果进行拼接。

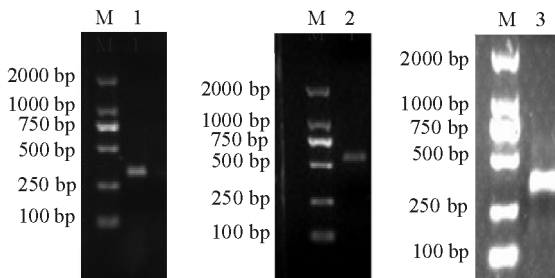
1.2.6 序列分析 应用 DNASTar 软件查找双齿围沙蚕 Cu/Zn-SOD 基因开放阅读框 (ORF),并将其翻译成氨基酸序列;利用 Conserved Domains 软件预测氨基酸序列保守区域,使用 ScanProsite 软件

分析氨基酸序列的潜在修饰位点,使用 ProtParam 工具预测氨基酸序列的理化性质,使用 PSORT II 软件进行细胞内定位预测,使用 Signal P Server 软件进行信号肽预测,使用 TMHMM 软件进行跨膜区分析,使用 ProtScale 工具进行疏水性分析,使用 SOPMA 软件和 SWISS-MODEL 软件分别预测氨基酸序列的二级和三级结构;使用 Clustal 2.1 进行双齿围沙蚕 Cu/Zn-SOD 多重序列比对,使用 Mega 5.0 软件构建同源关系进化树,自展检测重复为 1000 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 特异性片段扩增及 RACE 扩增

依据已知多毛类 *Alitta succinea* CDS 保守区设计简并引物,同源克隆得到 326 bp 的特异性片段。3'RACE 扩增获得一条 512 bp 的条带,5'RACE PCR 产物经切胶回收测序为 453 bp。使用 DNASTar 软件进行序列拼接,得到 870 bp 的双齿围沙蚕 cDNA 全序列,提交至 GenBank,登录号为 KF199864。



注: M 为 DL2000 DNA Marker; 1 为 RT-PCR 产物; 2 为 3'RACE PCR 产物; 3 为 5'RACE PCR 产物

Note: M shows DL2000 DNA Marker; 1 represents the product of RT-PCR; 2 represents the product of 3'RACE; 3 represents the product of 5'RACE

图1 双齿围沙蚕 Cu/Zn-SOD 特异性片段扩增及 RACE 扩增结果

Fig. 1 RACE amplification product of Cu/Zn-SOD fragment from sandworm *Perinereis aibuhitensis*

### 2.2 生物信息学分析

#### 2.2.1 双齿围沙蚕 Cu/Zn-SOD 基本理化信息分析

双齿围沙蚕 Cu/Zn-SOD cDNA 基因全长 870 bp,其中 5'端非翻译区(5' UTR)为 156 bp,3'端非翻译区(3'UTR)为 261 bp,开放阅读框(ORF)为 453 bp,编码一个由 150 个氨基酸组成的蛋白质(图 2)。使用 ProtParam 工具推测 Cu/Zn-SOD 氨基

酸序列分子式为  $C_{655}H_{1043}N_{195}O_{217}S_4$ ,原子数为 2114,理论相对分子质量为 15 249 900,等电点为 5.66,氨基酸序列中带负电荷的氨基酸(Asp+Glu)17 个,占 11.33%,带正电荷的氨基酸(Arg+Lys)11 个,占 7.33%。根据 ProtScale 预测结果,Cu/Zn-SOD 氨基酸疏水性最大值为 2.200,最小值为 -2.644,整个多肽链中亲水性氨基酸多于疏水性氨基酸,推断该蛋白为亲水性蛋白。

2.2.2 双齿围沙蚕 Cu/Zn-SOD 亚细胞定位分析 预测结果显示,该蛋白位于细胞质中的可能性为 65.2%,位于细胞核内的可能性为 21.7%,在其他细胞器中的可能性较小。对 Cu/Zn-SOD 蛋白进行信号肽的预测,未发现明显的信号肽位点,也未发现该蛋白有跨膜区,表明 Cu/Zn-SOD 蛋白既不是跨膜蛋白也不是分泌蛋白。

2.2.3 双齿围沙蚕 Cu/Zn-SOD 功能区预测 通过 Conserved Domains 预测氨基酸序列保守区域发现,该蛋白具有典型的  $Cu^{2+}$  结合位点 His-43、His-45、His-59 和 His-117,以及  $Zn^{2+}$  结合位点 His-59、His-68、His-77 和 Asp-80(图 2)。此外,该氨基酸序列还含有两处 Cu/Zn-SOD 蛋白家族标签序列:GFVHVHQFGDNT(41~51)和 GNAGGRLACGVI(135~146)(图 2)。

2.2.4 双齿围沙蚕 Cu/Zn-SOD 二级和三级结构预测 对双齿围沙蚕 Cu/Zn-SOD 基因编码的蛋白二级结构进行预测,结果显示: $\alpha$ -螺旋(Alpha helix)占整个蛋白质的 4.67%,无规则卷曲(Random coil)占 54.67%,延伸链(Extended strand)占 32.00%,而  $\beta$ -转角(Beta turn)占 8.67%。Cu/Zn-SOD 三级结构预测结果见图 3。

2.2.5 双齿围沙蚕 Cu/Zn-SOD 同源序列比对及系统进化分析 同源性比较结果表明,双齿围沙蚕 Cu/Zn-SOD 与琥珀刺沙蚕 *Alitta succinea* 同源性最高,达 79%,与部分软体动物、鱼类和昆虫也具有较高的同源性,同源性为 71%~78%。其中与太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas* 同源性为 78%,与日本盘鲍 *Haliotis discus discus* 同源性为 76%,与庞贝蠕虫 *Alvinella pompejana* 同源性为 75%,与日本鳗鲡 *Anguilla japonica* 同源性为 72%,与烟粉虱 *Bemisia tabaci* 同源性为 71%(图 4)。系统进化分析结果表明,双齿围沙蚕和琥珀刺沙蚕首先聚为一簇,表明其亲缘关系较近(图 5)。

## 3 讨论

本研究中,首次报道了双齿围沙蚕 Cu/Zn-

```

1 gtaagcagtggtatcataggaaggccatggggcacaggttctctctgaccaccaaaagt
61 gacaggccaagatataccgggacaattctagaagatttaccgcaaaaccaagtcttttga
121 catcgttttggngtgcacagatagctttaaatacaatgatggaaggcgstgtgtttttg
1 M V K A V C V L
181 aagagtgatgcccgtcaatggcactgttctcttgagcagaatggggatactgtcaaaagt
9 K S D A V N G T V F F E Q S G D T V K V
241 acagttgaaattcaggacttactocaggcaagcatggattccatgcatcaatttgg
29 T G E I S G L T P G K H G F H V H Q P G
301 gacaataccaatggatgcaatagtcaggggcccaatcgaatcctcagagaaaagaac
49 D N T N G C T S A G P H F N P A G K E H
361 gggtctccagaagacgagaaccggcatgctggagacttgggaaatgctactgcgggtgac
69 G A P E D B N R H A G D L G N V T A G D
421 caatggatggccctatcaacatctccgataaaagtcatcctcagagcaaaactgattcc
89 N G V A P I N I S D K V I T L T G P D S
481 ataattggtcgcactgtggttattccatgctgatgtagatgacctggaaagggcgacac
109 I I G R T V V I H A D V D D L G K G G H
541 gaattgagcaagactgcaaacctggggcccaatcgaatcctcagagcaaaactgattcc
129 E L S K T T G N A G G R L A C G V I G I
601 actcaatgactttcataaaagtttatttcgatttgcagacaatctgtatttcatgaccta
149 T Q *
661 tcatgtttgtaattgtatataactaagtttacttttagtatactggacatgagcaactgca
721 gataatgcatatgtagctatttggctcatttggattccgatgtgaacatgctattaag
781 tcaaatctgatggaacgagctagcctactagataaagaagcattttaaataacagttac
841 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

注: 1~156 为 5'非翻译区; 610~870 为 3'非翻译区; 157~609 为开放阅读框; \* 为终止子; 方框内为起始密码子、终止密码子和加尾信号; 阴影表示 Cu/Zn-SOD 家族的两个特征序列; 下划线表示氨基酸的铜结合位点 (His-43、His-45、His-59 和 His-117) 和锌结合位点 (His-59、His-68、His-77 和 Asp-80)

Note: 5'-untranslated regions are shown as 1-156, 3'-untranslated regions are shown as 610-870 and the open reading frame is shown as 157-609; Terminator is shown as \*; The start and stop codons and the tailing signal are included in boxes; Two Cu/Zn-SOD family signature sequences are shadowed; Copper (His-43, His-45, His-59 and His-117) and zinc (His-59, His-68, His-77 and Asp-80) binding sites of Cu/Zn SOD are underlined

图 2 双齿围沙蚕 Cu/Zn-SOD cDNA 基因序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of Cu/Zn-SOD cDNA in sandworm *Perinereis aibuhitensis*

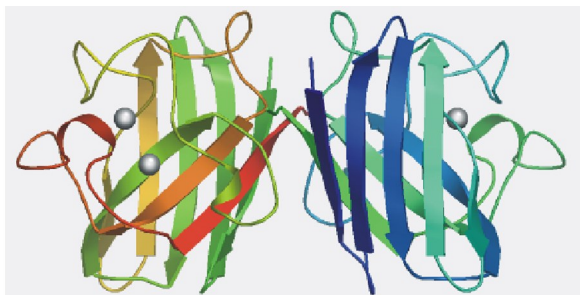


图 3 双齿围沙蚕 Cu/Zn-SOD 三级结构预测图

Fig. 3 Predication of the tertiary structure of Cu/Zn-SOD from sandworm *Perinereis aibuhitensis*

SOD 基因的 cDNA 序列全长。序列分析结果显示, 双齿围沙蚕 Cu/Zn-SOD cDNA 全长 870 bp, 包括 156 bp 的 5'端非翻译区, 261 bp 的 3'端非翻译区和 453 bp 的阅读框, 编码 150 个氨基酸。Rhee 等<sup>[17]</sup>克隆并分析琥珀刺沙蚕 Cu/Zn-SOD 序列时发

```

P.aibuhitensis ---M--VKAVCVLKSID-AVNGTVFFEQSGD--TVKVTGEISGLTFGKHGPHVHQPDNTN 52
A.succinea ---M--LKAVCVLKAQ-DVDGTAFEFQGGEPFVRVHGELISGLTFGLGPHVHQPDNTN 54
H.discus discus ---MS--LKAVCVLKGDSVVKVTFVFSQGLADSPVKVGTGSLTGLTGKHGPHVHQPDNTN 56
M.galloprovincialis MAAM--LKAVCVLKGDSVAVTVAFAVFSQGLADSAVTVTGLTGLAFGEHGFHVFHQPDNTN 58
A.pompejana ---MA--LHAVCVLKGDSPTVTIHLKIG-EGD-MVTVTGEITGLTFGKHGPHVHQPDNTN 54
C.hongkongensis MSSA--LKAVCVLKGDSVPTVGFVFSQGLADSPVTLGKELGLTFGKHGPHVHQPDNTN 58
C.gigas ---MSA--LKAVCVLKGDSVPTVGFVFSQGLADSPVTLGKELGLTFGKHGPHVHQPDNTN 58
P.ficata MSSA--LKAVCVLKGDSVPTVGFVFSQGLADSPVTLGKELGLTFGKHGPHVHQPDNTN 58
A.farreri ---MS--LVAVCVLKGDAVTVVFKRQEDT--VHLTQKIGLTFGKHGPHVHQPDNTN 54
A.irradians ---MS--VKAVCVLKGDSVFKVVFHQRKDK--VHLTGLTGLTFGKHGPHVHQPDNTN 54
A.japonica ---MA--LKAVCVLKGDTGATGVFFEFQSGDPAVHVTGQISGLTFGKHGPHVHQPDNTN 56
H.molitrix ---MV--HKAVCVLKGDSQVTVGVFFEFQSGDPAVHVTGQISGLTFGKHGPHVHQPDNTN 56
B.dorsalis ---MF--AKAVSVLWGD--VKGTVVFFQKDESSPVLVTGEVSGLESLGPHVHQPDNTN 54
B.tabaci ---MD--LHAVCVLKGDSVPTVGFVFSQGLADSPVTVTGLTGLAFGEHGFHVFHQPDNTN 57
I.scapularis ---MS--VKAVCVLKGSEKTTGTVVYVTAQFQNPVTVTGEITGLEQGLGPHVHQPDNTN 55
G.orientalis ---MA--TKAVCVLKGDT--VKGTVVFFEFQSGDPAVHVTGQISGLTFGKHGPHVHQPDNTN 55

```

```

P.aibuhitensis GCTSAGPHFNPAGKHGHPADENHAGLGNVTDGNGVAPINISIVITLTPISLIGR 112
A.succinea GCTSAGAHFNPESHKHPADENHAGLGNVTDGNGVAPINISIVITLTPISLIGR 114
H.discus discus GCTSAGAHFNPESHKHPADENHAGLGNVTDGNGVAPINISIVITLTPISLIGR 116
M.galloprovincialis GCTSAGSHPFNPFGTHGAPDEEHHVCDLGNVLANEAGAEIKTDKSLITGFSGLIGR 118
A.pompejana GCTSAGAHFNPESHKHPADENHAGLGNVTDGNGVAPINISIVITLTPISLIGR 114
C.hongkongensis GCTSAGAHFNPESHKHPADENHAGLGNVTDGNGVAPINISIVITLTPISLIGR 118
C.gigas GCTSAGAHFNPESHKHPADENHAGLGNVTDGNGVAPINISIVITLTPISLIGR 118
P.ficata GCTSAGAHFNPESHKHPADENHAGLGNVTDGNGVAPINISIVITLTPISLIGR 118
A.farreri GCTSAGAHFNPESHKHPADENHAGLGNVTDGNGVAPINISIVITLTPISLIGR 114
A.irradians GCTSAGAHFNPESHKHPADENHAGLGNVTDGNGVAPINISIVITLTPISLIGR 114
A.japonica GCTSAGAHFNPESHKHPADENHAGLGNVTDGNGVAPINISIVITLTPISLIGR 116
H.molitrix GCTSAGAHFNPESHKHPADENHAGLGNVTDGNGVAPINISIVITLTPISLIGR 116
B.dorsalis GCTSAGPHFNPESHKHPADENHAGLGNVTDGNGVAPINISIVITLTPISLIGR 114
B.tabaci GCTSAGPHFNPESHKHPADENHAGLGNVTDGNGVAPINISIVITLTPISLIGR 117
I.scapularis GCTSAGPHFNPESHKHPADENHAGLGNVTDGNGVAPINISIVITLTPISLIGR 116
G.orientalis GCMGSAHFNPKHGHGAPEDSTHVRHGLGNVTDGNGVAPINISIVITLTPISLIGR 115

```

```

P.aibuhitensis TVVIHADVDDLKGGGHELSKTTGNAGRLACGVIGITK- 150
A.succinea TVVVHADPDDLKGGGHELSKTTGNAGRLACGVIGITK- 152
H.discus discus TIVVHAGVDDLKGGGHELSKTTGNAGRLACGVIGITK- 154
M.galloprovincialis TVVIHADVDDLKGGGHELSKTTGNAGRLACGVIGITK- 157
A.pompejana TIVVHVEDDDLKGGGHELSKTTGNAGRLACGVIGITK- 153
C.hongkongensis TMVIHADVDDLKGGGHELSKTTGNAGRLACGVIGITK- 156
C.gigas TVVIHADVDDLKGGGHELSKTTGNAGRLACGVIGITK- 156
P.ficata TMVIHADVDDLKGGGHELSKTTGNAGRLACGVIGITK- 156
A.farreri TMVIHADVDDLKGGGHELSKTTGNAGRLACGVIGITK- 153
A.irradians TMVIHAGEDDDLKGGGHELSKTTGNAGRLACGVIGITK- 152
A.japonica TMVIHEKADDDLKGGGHELSKTTGNAGRLACGVIGITK- 154
H.molitrix TMVIHEKEDDDLKGGGHELSKTTGNAGRLACGVIGITK- 154
B.dorsalis TVVVHADPDDLKGGGHELSKTTGNAGRLACGVIGITK- 153
B.tabaci TIVVHVEDDDLKGGGHELSKTTGNAGRLACGVIGITK- 156
I.scapularis SVVIHADPDDLKGGGHELSKTTGNAGRLACGVIGITK- 154
G.orientalis TLVIHADVDDLKGGGHELSKTTGNAGRLACGVIGITK- 154

```

注: \* 为完全保守氨基酸; ; 为较相似氨基酸; . 为相似氨基酸  
Note: \* shows conserved amino acids; ; shows very similar amino acids; . shows similar amino acids

图 4 双齿围沙蚕 Cu/Zn-SOD 的氨基酸序列与其他物种蛋白氨基酸序列的比对

Fig. 4 Comparison of deduced amino acid sequence alignment of Cu/Zn-SOD in the sandworm with that in the other species

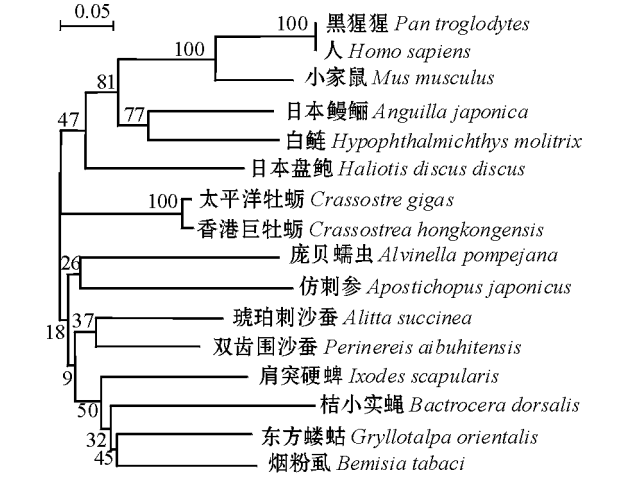


图 5 双齿围沙蚕 Cu/Zn-SOD 的系统进化树  
Fig. 5 Phylogenetic tree of Cu/Zn-SOD from sandworm *Perinereis aibuhitensis*

现,该序列包含4个Cu<sup>2+</sup>结合位点(His-45、His-47、His-62和His-119)和4个Zn<sup>2+</sup>结合位点(His-62、His-70、His-79和Asp-82),同时还具有两个Cu/Zn-SOD特征序列(GFHVHEFGDNT、GNAGGRLACGVI)。Wang等<sup>[18]</sup>在紫贻贝*Mytilus galloprovincialis* Cu/Zn-SOD蛋白序列中也发现,具有Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>结合位点和特征序列。本研究中,在获得的双齿围沙蚕SOD序列中亦发现了4个Cu<sup>2+</sup>结合位点(His-43、His-45、His-59和His-117)和4个Zn<sup>2+</sup>结合位点(His-59、His-68、His-77和Asp-80),并确定具有两处Cu/Zn-SOD蛋白家族标签序列(41~51,135~146)。因此,推断该序列为双齿围沙蚕Cu/Zn-SOD序列。此外,Cu/Zn-SOD氨基酸序列具有色氨酸和酪氨酸缺乏,甘氨酸含量较高的特点<sup>[19-20]</sup>。对获得的序列进行分析发现,不存在色氨酸和酪氨酸,而甘氨酸的比例达到16.7%,这进一步表明获得的序列为双齿围沙蚕Cu/Zn-SOD。

生物体内含有胞外和胞内两种Cu/Zn-SOD序列,其中胞外Cu/Zn-SOD通常含176~251个氨基酸残基,N端具有信号肽序列;而胞内Cu/Zn-SOD含147~167个氨基酸残基,N端无信号肽序列<sup>[21-22]</sup>。本研究中获得的双齿围沙蚕Cu/Zn-SOD蛋白质序列包含150个氨基酸,且N端无信号肽,细胞定位预测其存在于细胞质中的可能性为65.2%,故推测其为胞内Cu/Zn-SOD序列。

多序列同源比对分析结果,通过NJ法进行系统进化树分析。结果显示,多毛类双齿围沙蚕和琥珀刺沙蚕首先聚为一簇,然后与东方蝼蛄、肩突硬蜱、桔小实蝇等昆虫纲聚为一簇,再与软体动物、脊椎动物哺乳类和鱼类聚在一起。这说明Cu/Zn-SOD基因在物种中具有高度保守性,并且在一定程度上是按照该基因所属物种的进化而进化的。但是,姜冰等<sup>[6]</sup>和朱丹等<sup>[23]</sup>的研究表明,Cu/Zn-SOD的系统进化并不严格按照该基因所属物种的进化而进化。这可能是由于物种差异造成的,有的物种中Cu/Zn-SOD是以物种进化而进化的,而有的则不是。

赵双菁等<sup>[24]</sup>研究表明,2.000~8.653 μL/L Pb<sup>2+</sup>能够上调水丝蚓*Limnodilus claparedianu* SOD酶活性,12.481 μL/L Pb<sup>2+</sup>则显著抑制SOD酶活性。据Kim等<sup>[25]</sup>报道,1 μg/L 4-壬基酚(4-NP)能够上调日本虎斑猛水蚤*Tigriopus japonicus* Cu/Zn-SOD和Mn-SOD mRNA的表达。鉴于SOD对环境污染物的敏感性,利用SOD作为分子生物标记已

经成为了近年来的研究热点。双齿围沙蚕Cu/Zn-SOD基因的克隆目前尚属首次,双齿围沙蚕Cu/Zn-SOD基因的获得及对该序列的分析,为研究其体内免疫和机体防御机制提供了基础资料,也为Cu/Zn-SOD作为生物标志物指示和监测环境污染奠定了基础。

## 参考文献:

- [1] 张立颖,赵萌,王跃智.水生生物超氧化物歧化酶的研究进展[J].江西农业大学学报,2012,34(4):800-804.
- [2] Mavelli I, Ciriolo M R, Rossi L, et al. Favism: a haemolytic disease associated with increased superoxide dismutase and decreased glutathione peroxidase activities in red blood cells[J]. European Journal of Biochemistry, 1984, 139(1):13-18.
- [3] Brown D R, Schmidt B, Groschup M H, et al. Prion protein expression in muscle cells and toxicity of a prion protein fragment[J]. European Journal of Cell Biology, 1998, 75(1):29-37.
- [4] Noor R, Mittal S, Iqbal J. Superoxide dismutase—applications and relevance to human diseases[J]. Medical Science Monitor, 2002, 8(9):210-215.
- [5] Anju A, Jeswin J, Thomas P C, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of cytoplasmic Cu/Zn-superoxide dismutase(SOD) from pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(3):946-950.
- [6] 姜冰,鲍相渤,张明,等.虾夷扇贝铜锌超氧化物歧化酶基因的克隆与转录表达特性分析[J].生物技术通报,2011,12:150-156.
- [7] Sook Chung J, Bachvaroff T R, Trant J, et al. A second copper zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) in the blue crab *Callinectes sapidus*: cloning and up-regulated expression in the hemocytes after immune challenge [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 32(1):16-25.
- [8] Bao Y, Li L, Wu Q, et al. Cloning, characterization, and expression analysis of extracellular copper/zinc superoxide dismutase gene from bay scallop *Argopecten irradians* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(1):17-25.
- [9] 李颖,周一兵,万良,等.双齿围沙蚕Hsp70 cDNA基因的克隆及序列分析[J].大连海洋大学学报,2012,27(6):502-507.
- [10] Kim K Y, Lee S Y, Cho Y S, et al. Molecular characterization and mRNA expression during metal exposure and thermal stress of copper/zinc- and manganese superoxide dismutases in disk abalone, *Haliotis discus discus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(5):1043-1059.
- [11] Zhang G, Fang X, Guo X, et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation [J]. Nature, 2012, 490:49-54.
- [12] Ni D, Song L, Gao Q, et al. The cDNA cloning and mRNA expression of cytoplasmic Cu, Zn superoxide dismutase (SOD) gene in scallop *Chlamys farreri* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(5):1032-1042.
- [13] Lyu K, Zhu X, Wang Q, et al. Copper/Zinc superoxide dismutase

- from the cladoceran *Daphnia magna*; molecular cloning and expression in response to different acute environmental stressors [J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(15): 8887-8893.
- [14] Cheng W, Tung Y H, Liu C H, et al. Molecular cloning and characterisation of copper/zinc superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 21(1): 102-112.
- [15] Zhang Z W, Li Z, Liang H W, et al. Molecular cloning and differential expression patterns of copper/zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase in *Hypophthalmichthys molitrix* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(2): 473-479.
- [16] Chakravarthy N, Aravindan K, Kalaimani N, et al. Intracellular copper zinc superoxide dismutase (icCuZnSOD) from Asian seabass (*Lates calcarifer*): molecular cloning, characterization and gene expression with reference to *Vibrio anguillarum* infection [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2012, 36(4): 751-755.
- [17] Rhee J S, Won E J, Kim R O, et al. Expression of superoxide dismutase (SOD) genes from the copper-exposed polychaete, *Neanthes succinea* [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2011, 63(5/12): 277-286.
- [18] Wang Q, Yuan Z Y, Wu H F, et al. Molecular characterization of a manganese superoxide dismutase and copper/zinc superoxide dismutase from the mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(5): 1345-1351.
- [19] 包永波. 海湾扇贝超氧化物歧化酶家族基因结构表达和多态性分析[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2009.
- [20] 田春美, 钟秋平. 超氧化物歧化酶的现状研究进展[J]. *中国热带医学*, 2005, 5(8): 1730-1732.
- [21] Lin Y C, Vaseeharan B, Chen J C. Identification of the extracellular copper-zinc superoxide dismutase (ecCuZnSOD) gene of the mud crab *Scylla serrata* and its expression following  $\beta$ -glucan and peptidoglycan injections [J]. *Molecular Immunology*, 2008, 45(5): 1346-1355.
- [22] Parker J D, Parker K M, Keller L. Molecular phylogenetic evidence for an extracellular Cu Zn superoxide dismutase gene in insects [J]. *Insect Molecular Biology*, 2004, 13(6): 587-594.
- [23] 朱丹, 李宏俊, 高祥刚, 等. 文蛤胞内铜锌超氧化物歧化酶基因的克隆与序列分析 [J]. *生物技术通报*, 2010(11): 123-128.
- [24] 赵双菁, 李艳秋, 柳郁滨, 等.  $Pb^{2+}$  对水丝蚓的急性毒性及超氧化物歧化酶活性的影响 [J]. *中国农学通报*, 2012, 28(8): 87-89.
- [25] Kim B M, Rhee J S, Park G S, et al. Cu/Zn- and Mn-superoxide dismutase (SOD) from the copepod *Tigriopus japonicus*: molecular cloning and expression in response to environmental pollutants [J]. *Chemosphere*, 2011, 84(10): 1467-1475.

## Cloning and sequence analysis of Cu/Zn-SOD cDNA from sandworm *Perinereis aibuhitensis*

YUE Zong-hao, FAN Xin, ZHAO Huan, REN Hong-wei, ZHANG Xu-feng, ZHOU Yi-bing

(Key Laboratory of Marine Bio-resources Restoration and Habitat Repairation in Liaoning Province, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

**Abstract:** A full length cDNA of Cu/Zn-SOD was firstly cloned in sandworm *Perinereis aibuhitensis* by homology cloning and RACE techniques based on the partial copper-zinc superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) gene from polychaete *Alitta succinea*. The full length of the cDNA was found to be 870 bp including a 156 bp 5' untranslated region, a 261 bp 3' untranslated region and 453 bp open reading frame encoding 150 amino acids. There were typical  $Cu^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  binding sites as well as two Cu/Zn-SOD protein family tag sequences in the deduced protein which was within the intracellular Cu/Zn-SOD with relative molecular mass of 15 249 900 and the isoelectric point of 5.66 by bioinformatic analysis. No signal peptide and transmembrane domain were observed in the deduced protein, indicating that it belonged to the hydrophilic protein. Multiple sequences alignment analysis revealed that the deduced amino acids had high homology to the proteins of partial molluscs, fishes and insects. The findings will provide basis for research of dose-response between gene expression and environmental pollutants, and defense mechanism of the sandworm.

**Key words:** *Perinereis aibuhitensis*; Cu/Zn-SOD; bioinformatic analysis; homology analysis