

褶纹冠蚌胞内 Cu/Zn-SOD 的 cDNA 克隆 及蛋白质三维结构预测

胡宝庆 谢彦海 王新生 龚贵如 文春根

南昌大学生物科学系, 南昌 330031

摘要 运用兼并引物结合 RT-PCR 方法从褶纹冠蚌血细胞中克隆出一种细胞内铜锌超氧化物歧化酶 (cpSOD) 的 cDNA, 用半定量 PCR 方法研究了 cpSOD 的 mRNA 在褶纹冠蚌不同组织的表达情况。结果表明: cpSOD cDNA 全长为 891 bp, 包含 1 个 468 bp 的开放阅读框, 编码含 155 个氨基酸的蛋白。预测蛋白质分子质量为 15.8 ku, 等电点为 5.8。含 4 个与铜离子结合的保守的氨基酸残基 (H46, H48, H63 和 H120) 和 4 个与锌离子结合的保守的氨基酸残基 (H63, H71, H80 和 D83) 及 1 个保守的分子内二硫键 (Cys57-Cys146)。氨基酸序列同源性比较显示 cpSOD 与海洋贝类太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas* 及栉孔扇贝 *Chlamys farreri* 的胞内 Cu/Zn-SOD 相似性分别为 70% 和 69%; 半定量 PCR 分析显示在褶纹冠蚌血液、外套膜、鳃、闭壳肌和肝胰腺 5 种组织中均能检测到 cpSOD 的基因表达, 且在鳃和肝胰腺中表达量较大。嗜水气单胞菌刺激后 cpSOD 基因在褶纹冠蚌血细胞中表达上调, 12 h 后达到最大值。由此推断 cpSOD 可能在机体的免疫防御中起着重要的作用。

关键词 褶纹冠蚌; 超氧化物歧化酶; 克隆; 蛋白质结构

中图分类号 Q 959.215 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)02-0235-08

超氧化物歧化酶 (SOD) 是生物体抗氧化系统的主要酶类之一, 能将对生物体有毒性的超氧自由基转化为过氧化氢和分子氧。根据活性中心所含金属离子的不同, SOD 可分为 Cu/Zn-SOD、Mn-SOD、Fe-SOD 3 种类型^[1]。Cu/Zn-SOD 主要存在于真核细胞的细胞质中, Mn-SOD 主要存在于原核细胞和真核细胞线粒体的基质中, Fe-SOD 主要存在于原核细胞及少数植物细胞的叶绿体中^[2]。根据信号肽存在的情况, 还可以将 Cu/Zn-SODs 分为胞外 Cu/Zn-SODs (ec-Cu/Zn-SODs) 和胞内 Cu/Zn-SODs (ic-Cu/Zn-SODs) 2 种类型。ec-Cu/Zn-SODs 存在于组织细胞外基质中, 而 ic-Cu/Zn-SODs 主要存在于细胞质、线粒体的内膜空间^[2] 和细胞核内^[3]。Cu/Zn-SODs 基因已从多种生物体中克隆出来^[4-6]。从软体动物皱纹盘鲍 (*Haliotis discus*)、紫贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*)、栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 等生物中克隆出了 ic-Cu/Zn-SODs^[7-9]; 从太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)、海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) 中克隆了 ic-Cu/Zn-SODs 和 ec-

Cu/Zn-SODs^[10-13]。然而, 还未见有关淡水贝类 Cu/Zn-SODs 的研究报道。

褶纹冠蚌 (*Cristaria plicata*) 是我国重要的“淡水育珠蚌”之一。嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 作为养殖水体中最主要的条件致病菌之一, 可导致贝类呼吸爆发, 也能引起贝类组织和器官的病变^[14]。笔者采用 RT-PCR 结合 RACE-PCR 的方法对褶纹冠蚌 Cu/Zn-SOD (cpSOD) 基因进行了克隆, 分析其在正常组织中的表达模式; 检测嗜水气单胞菌刺激褶纹冠蚌后, cpSOD 的 mRNA 在蚌血细胞中的表达变化, 以期为进一步研究褶纹冠蚌 SOD 基因的调控以及 SOD 蛋白的功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

褶纹冠蚌采自鄱阳湖, 体长 18~25 cm。挑选无损伤、有活力的蚌暂养于水簇箱中, 期间连续充气。

1.2 血细胞总 RNA 的提取及 SMART cDNA 的合成 用 5 mL 注射器于后闭壳肌血窦处取血, 将血

收稿日期: 2010-03-18

基金项目: 国家自然科学基金 (30960296) 和江西省自然科学基金 (GZN1923)

胡宝庆, 硕士, 讲师, 研究方向: 水产动物疾病。E-mail: baoqinghu@sina.com

通讯作者: 文春根, 博士, 教授, 研究方向: 水产动物疾病。E-mail: cgwen@ncu.edu.cn

液于 4 °C、3 600 r/min 离心 5 min;弃上清,获得细胞沉淀用于 RNA 提取。按 Trizol 试剂盒 (Invitrogen) 说明书提取褶纹冠蚌血细胞总 RNA。琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 质量。按照 Clontech 公司 SMART RACE cDNA Amplification Kit 方法进行第一链 cDNA 合成。

1.3 cpSOD cDNA 中间序列的扩增

根据栉孔扇贝和太平洋牡蛎 ic-Cu/Zn-SODs 的保守序列,分别设计正向、反向简并引物(表 1),以 SMART cDNA 为模板,扩增 cpSOD 的 cDNA 中间序列。PCR 反应的扩增参数是:94 °C 变性 5 min后,94 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 60 s 扩增 33 个循环;72 °C 延伸 10 min 后终止反应。PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,切胶回收转入到 pMD18-T (TaKaRa) 载体中,挑选阳性克隆测序。

表 1 扩增 cpSOD 基因的引物序列¹⁾

Table 1 Primers used for amplifying cpSOD in the study

引物 Primer	用途 Usage	序列 Sequence (5'→3')
cpSODF1	Initial PCR	MGACAAYACHAATGGYGTGA
cpSODR1	Initial PCR	CCRATSACHCCACAMGCCA
cpSODF2	3'-RACE	GACCAGAAGATGCATCCAGAC
cpSODR2	5'-RACE	CACCAGCATGCCAGTGTCTTG
cpSODF3	3'-RACE	GCAGGAGAGGATGGAGTGGCTCA
cpSODR3	5'-RACE	CCTGCCAAGGTCATCTTCATCTGC
cpSODF4	RT-PCR	ATGTCCATTAAGGCTGTTTGC
cpSODR4	RT-PCR	TCAATCCAATTTTGAATTCCA CTAATACGACTCACTAT-
Long	3'-RACE	AGGGCAAGCAGTGGTATCAACG- CAGAGT
Short	5'-RACE	CTAATACGAC TCACTATAGGGC
β-actinF	RT-PCR	GTGTGACTCACACCGTCCCC
β-actinR	RT-PCR	CTCCTGCTTGCTGATCCACA

1) M=A/C; Y=C/T; H=A/C/T; R=A/G; S=C/G.

1.4 cpSOD 基因 5'末端和 3'末端 cDNA 扩增

采用 SMART RACE PCR 和巢式 PCR 方法

进行 3'末端及 5'末端克隆。根据获得的中间序列设计特异性引物,引物的退火温度>64 °C,并遵循 BD SMART RACE 的要求。以 UPM 为通用引物,分别用 5'和 3'RACE-PCR 和巢式 PCR 扩增方法来克隆 cpSOD 基因的 5'末端和 3'末端。拼接中间片段,5'和 3'端,得到 cpSOD 基因的 cDNA 的全长序列。

1.5 序列测序和分析

DNA 片段送上海生工生物工程有限公司测序,用 ExPASy 网站(<http://expasy.pku.edu.com>)上的软件进行序列分析(开放阅读框搜索、氨基酸序列的推断等),BLAST 搜索同源基因,ClustalW1.83 软件进行同源性比对分析,SignalP3.0 分析信号肽序列。用 MEGA 4.0 邻接法(neighbor-joining method)构建基于氨基酸序列的系统进化树(表 2),并采用自展法(Bootstrap Method)对其可靠性进行分析验证(1 000 个假重复数)。

1.6 cpSOD 蛋白的三维结构预测

利用 ExPASy 服务器的 SWISS-MODEL(<http://www.expasy.org/swissmod/>)进行。首先在 EXPDB 库中搜索合适的蛋白晶体结构做模板;然后将推导的 cpSOD 氨基酸序列输入 SWISS-MODEL 程序,服务器将自动进行同源建模及修正、优化预测的结果。用 Procheck 程序(<http://biotech.ebi.ac.uk:8400/cgi-bin/sendquery>)验证所建模型立体化学性质的合理性;用 Verify-3D 程序(<http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify-3D/>)对建模结构中氨基酸序列的相容性进行评估。用 Chimera 程序显示并分析其三维构象。

表 2 氨基酸比对及构建发育树所用的 27 个物种的基因登录号

Table 2 GenBank accession number of 27 species used in the alignment and phylogenetic tree

物种 Species	登录号 Accession number	物种 Species	登录号 Accession number
人 <i>Homo sapiens</i>	NP_000445.1	太平洋牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	CAD42722.1
家鼠 <i>Mus musculus</i>	NP_035564.1	近江牡蛎 <i>Crassostrea ariakensis</i>	ABF14366.1
牛 <i>Bos taurus</i>	NP_777040.1	紫贻贝 <i>Mytilus galloprovincialis</i>	CAQ68509.1
狗 <i>Canis lupus familiaris</i>	NP_001003035.1	贻贝 <i>Mytilus edulis</i>	CAE46443.1
猪 <i>Sus scrofa</i>	P04178.2	海湾扇贝 <i>Argopecten irradians</i>	ACM48346.1
鸡 <i>Gallus gallus</i>	NP_990395.1	栉孔扇贝 <i>Chlamys farreri</i>	ABD58974.1
虎皮鹦鹉 <i>Melopsittacus undulatus</i>	AAO72711.1	皱纹盘鲍 <i>Haliotis discus discus</i>	ABF67508.1
斑胸草雀 <i>Taeniopygia guttata</i>	ACH45612.1	九孔鲍 <i>Haliotis diversicolor supertexta</i>	AA118806.1
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	AAH70696.1	秀丽隐杆线虫 <i>Caenorhabditis elegans</i>	NP_001021957.1
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NP_571369.1	旋盘尾丝虫 <i>Onchocerca volvulus</i>	CAA40389.1
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	NP_001117801.1	伪旋毛虫 <i>Trichinella pseudospiralis</i>	AAM76075.1
暗纹东方鲀 <i>Takifugu obscurus</i>	ABV24054.1	鲍曼不动杆菌 <i>Acinetobacter baumannii</i>	YP_001086142.1
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	ACM08615.1	褶纹冠蚌 <i>Cristaria plicata</i>	ACI28282.1
果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	CAA79639.1		

1.7 RT-PCR 检测 cpSOD 在蚌组织中的表达

提取褶纹冠蚌的血液、外套膜、鳃、闭壳肌和胰腺总 RNA 反转录成 cDNA, 然后将它们稀释成相同的浓度, 并以其为模板进行普通 PCR 反应。以 β -actin 作为内参, 反应产物电泳条带的亮度强弱指示亚基 mRNA 表达的高低。通过 Quantity One 软件计算目的条带和 β -actin 条带的光密度比值, 统计分析通过 SPSS13.0 软件进行。

1.8 嗜水气单胞菌刺激后褶纹冠蚌血细胞中 cpSOD 的表达变化

将嗜水气单胞菌接种至 LB 液体培养基中培养 24 h, 离心去除培养基, 沉淀用无菌 PBS (pH 7.2) 清洗 3 次, 离心, 再用无菌 PBS 稀释至浓度为 10^9 cfu/mL 的细菌悬液备用。挑选健康的蚌 15 只, 壳长为 (203.9 ± 17.1) cm, 壳高为 (99.9 ± 7.9) cm, 分成 5 组, 每组 3 只, 1 组作为对照, 其余 4 组用于

试验。试验组分别于闭壳肌注射 $500 \mu\text{L}$ 细菌悬液, 对照组注射等量的 PBS 溶液。4 个试验组分别于注射后 6、12、24、48 h 于闭壳肌取血, 对照组在注射后 12 h 取血。血细胞总 RNA 分别反转录成 cDNA, 以 β -actin 作为内参, RT-PCR 检测表达情况。

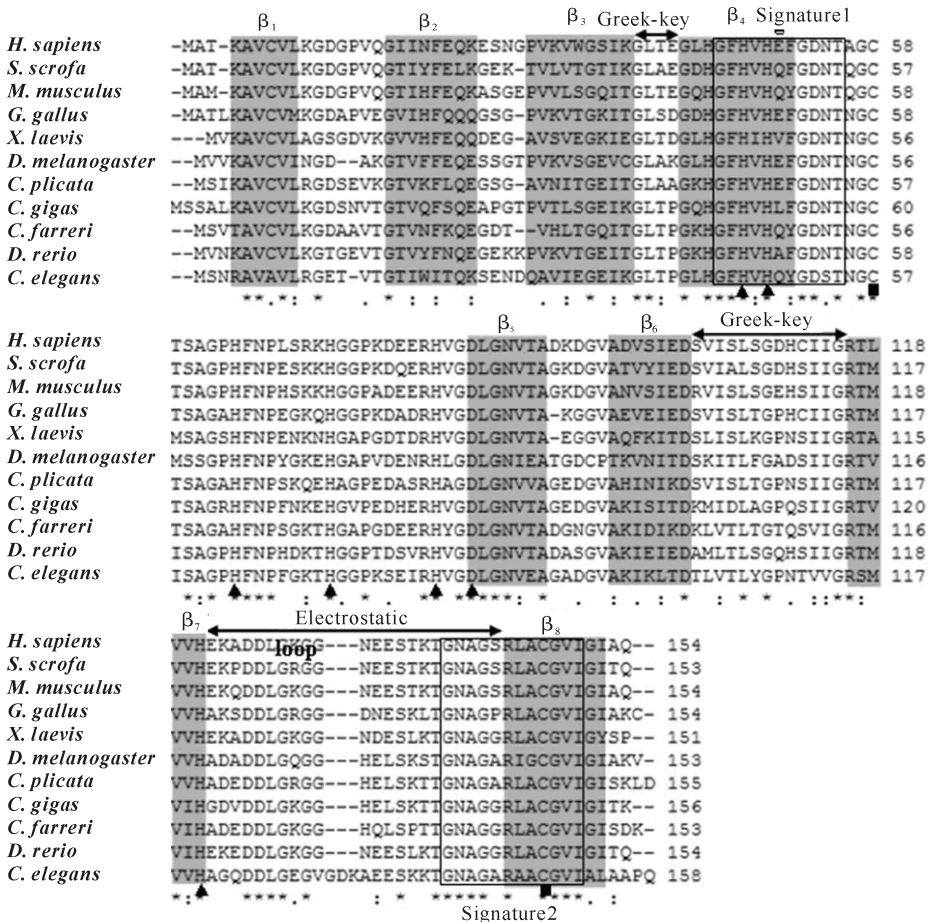
2 结果与分析

2.1 cpSOD 基因的 cDNA 全长

cpSOD 基因的 cDNA 全长为 891 bp, 其中 5'UTR 长度为 83 bp, 3'UTR 长度为 340 bp, 包含 1 个多聚腺苷酸 (polyA) 尾, 开放阅读框长度为 468 bp, 编码 155 个氨基酸, 预测的蛋白质分子质量为 15.8 ku, PI 为 5.80。未发现信号肽。

2.2 cpSOD 的氨基酸序列与其他动物的氨基酸序列比对

褶纹冠蚌 cpSOD 的氨基酸序列与其他动物的



CLUSTAL 比对完全保守的残基用 (*) 表示, 高度保守的残基用 (:) 表示, 替代保守的残基用 (.) 表示。The symbols at the bottom of the sequences correspond to the definitions of the CLUSTAL program: (*) fully conserved; (:) highly conserved; (.) conserved substitution.

图 1 11 种动物 ic-Cu/Zn-SODs 氨基酸序列的多重比较

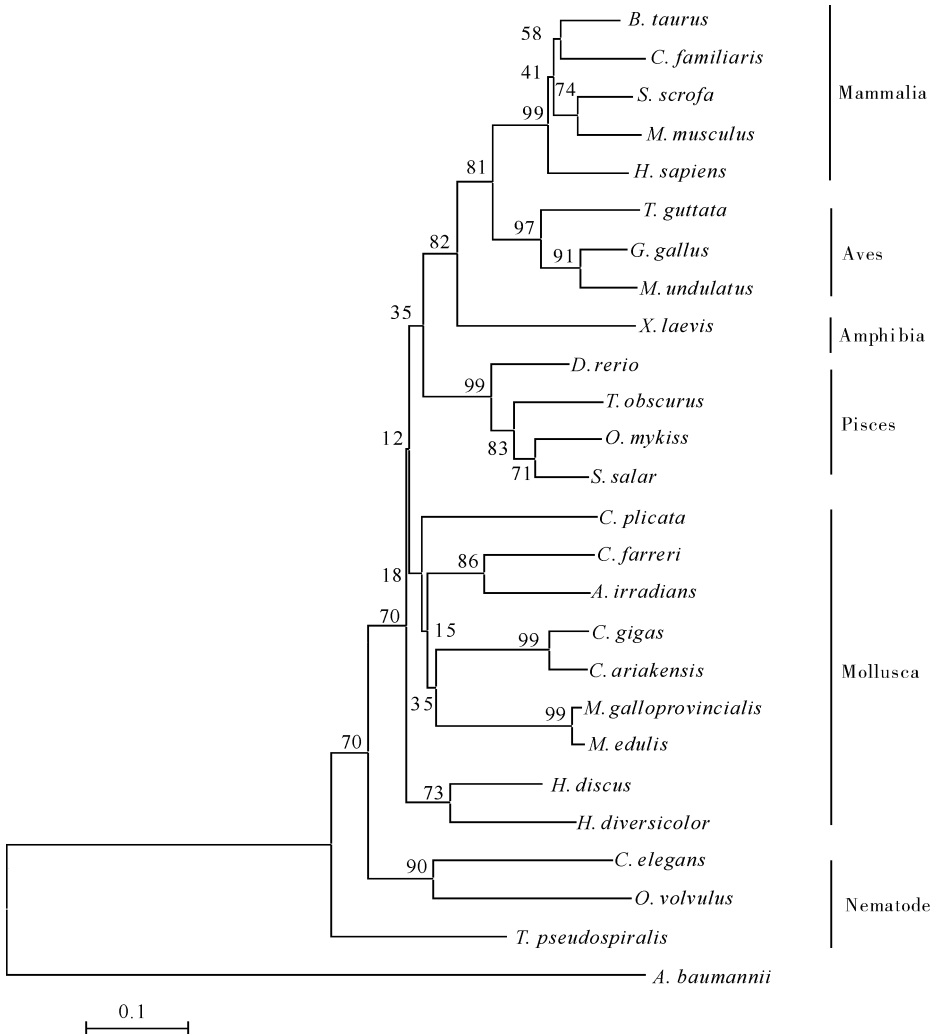
Fig. 1 Multiple alignment of the amino acid sequences of 11 ic-Cu/Zn-SODs

icCu/Zn-SODs 有较高的同源性。与太平洋牡蛎和栉孔扇贝的同源性分别为 70%、69%；与人、鼠、鸡、非洲爪蟾及斑马鱼同源性分别为 63%、64%、69%、63%和 65%；甚至与果蝇、秀丽隐杆线虫的同源性也分别高达 66%、54%。推定的 cpSOD 氨基酸序列含有 2 个 Cu/Zn-SODs 家族特异信号 (GFH-VHEFGDNT; GNAGARLACGVI)；1 个由 His-46,-48,-63 和 His-120 氨基酸残基组成的铜结合位点和 1 个由 His-63,-71,-80 和 Asp-83 氨基酸残基

组成的锌结合位点；1 个分子内二硫键 (Cys57-Cys146)(图 1)。

2.3 基于 cpSOD 编码区序列构建 26 种动物的系统发育树

从构建的 cpSOD 的系统发育树可以看出,哺乳纲、鸟纲、鱼纲、软体动物门各自独立形成 1 个分支。软体动物的腹足纲聚为 1 个小支,瓣鳃纲聚为另 1 支;在瓣鳃纲内,贻贝科、牡蛎科、扇贝科的种类又分别聚为 1 支,然后再与褶纹冠蚌聚在一起(图 2)。



A. baumannii 作为外类群。数字代表自举值。*A. baumannii* was taken as an outgroup. Numbers represent the bootstrap values.

图 2 用邻接法基于 cpSOD 编码区序列构建 26 种动物系统发育树

Fig. 2 Neighbor-joining phylogentic tree of cpSOD and ic-Cu/Zn-SODs amino acid sequences from 26 species of animals

2.4 cpSOD 蛋白质的空间结构

经 SWISS-MODEL (<http://www.expasy.org/swissmod/>) 的搜索,庞贝蠕虫 (*Alvinella pompejana*) Cu/Zn-SOD (PDB 编号: 3f71A.pdb) 与褶纹冠蚌 cpSOD 氨基酸序列相似性高达 73.68%, 被选

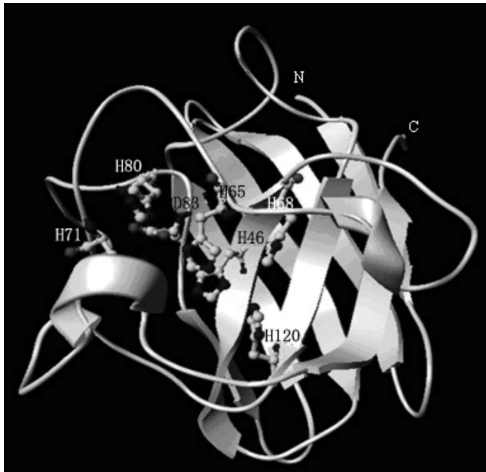
作 cpSOD 同源建模的模板。用 Procheck 程序检测得到的 cpSOD 空间模型与模板的拉氏图 (Ramachandran plot) (表 3); cpSOD 主链二面角 φ - ψ 落于最优区 85.2%, 额外允许区 14.8%, 一般允许区 0.0, 不允许区为 0.0, 表明建模的 cpSOD 结构具有

很好的立体化学性质。Verify-3D 也说明得到的 cpSOD 结构和模板相容性较好(结果未显示)。从预测的 cpSOD 的空间结构(图 3)可以看出,8 股 β 链反向平行折叠围成亚基的桶状结构核心,由 His-46,-48,-63 和 His-120 配位结合的 Cu 离子及 His-63,-71,-80 和 Asp-83 结合的 Zn 离子构成的活性中心位于桶状结构的一侧。此外,还有 2 个 α 螺旋分别位于 Thr58-Ala60 和 Leu133-Thr137 处。

表 3 模型与模板拉氏图的统计比较

Table 3 Comparison of the Ramachandran plot statistics between the model and the template

模型/模板 Model/ Template	拉氏图区域/% Region of the Ramachandran plot			
	最优区 Most favorable	额外允许区 Additional allowed	一般允许区 Generously allowed	不允许区 Disallowed
cpSOD	85.2	14.8	0.0	0.0
3f71A	88.9	11.1	0.0	0.0



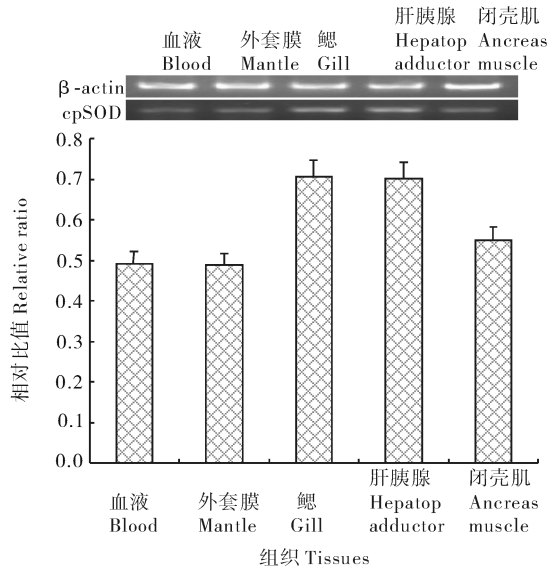
基于庞贝蠕虫(*A. pompejana*)Cu/Zn-SOD(PDB 编号:3f71A. pdb)的晶体结构构建的褶纹冠蚌 cpSOD 的三维结构。图形用 Chimera 程序来显示。cpSOD model was generated based on the crystal structure of *A. pompejana* Cu/Zn-SOD (PDB code:3f71A). The figure displayed was drawn using the program Chimera.

图 3 褶纹冠蚌 cpSOD 的三维结构模型

Fig. 3 3-D model of the cpSOD from *Cristaria plicata*

2.5 cpSOD 基因 mRNA 表达特征

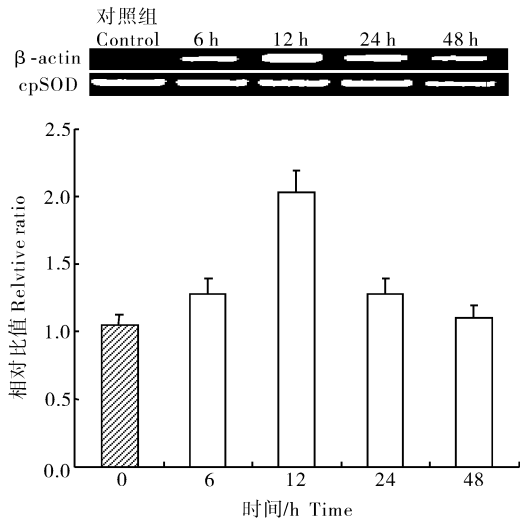
cpSOD 基因 mRNA 在褶纹冠蚌血液、外套膜、鳃、肝胰腺和闭壳肌中均有表达。但是在血液、外套膜和闭壳肌中表达量较少,在鳃和肝胰腺中表达量较大(图 4)。嗜水气单胞菌刺激后 cpSOD 基因在血细胞的表达随时间有较明显的变化,其表达量随着时间一直增加,到 12 h 后达到最大值,然后又开始下降,至 48 h 后接近初始水平(图 5)。



β -actin 产物作为内参,结果用 Quantity-One 软件进行统计分析, $n=3$ 。 β -actin RT-PCR products as an internal control and the result were analyzed using Quantity-One software, $n=3$ 。

图 4 用 RT-PCR 分析 CpSOD 基因在褶纹冠蚌各组织中的表达水平

Fig. 4 Expression level of cpSOD in the different tissues from *C. plicata* as analyzed by RT-PCR



β -actin 产物作为内参,结果用 Quantity-One 软件进行统计分析, $n=3$ 。 β -actin RT-PCR products as an internal control and the result were analyzed using Quantity-One software, $n=3$ 。

图 5 嗜水气单胞菌刺激后 cpSOD 在褶纹冠蚌血细胞中的表达水平

Fig. 5 Expression level of cpSOD in the hemocytes from *C. plicata* after stimulated by *A. hydrophila*

3 讨论

Cu/Zn-SODs在消除细胞正常代谢或氧化压力

产生的氧自由基中承担第一道防线^[1]。ec-Cu/Zn-SODs 的大小为 176 ~ 251 个氨基酸, ic-Cu/Zn-SODs 大小为 147 ~ 167 个氨基酸^[15]。贝类中 ic-Cu/Zn-SODs 所编码的氨基酸数量差别不大; 栉孔扇贝 ic-Cu/Zn-SODs 编码 153 个氨基酸残基^[9]、太平洋牡蛎 ic-Cu/Zn-SODs 编码 156 个氨基酸残基^[11]。cpSOD 基因的 cDNA 编码 155 个氨基酸, 且不含信号肽, 说明本文克隆到的是褶纹冠蚌 ic-Cu/Zn-SODs。氨基酸序列比对分析显示 cpSOD 具有与其他物种的 ic-Cu/Zn-SODs 的氨基酸序列较高的相似性及高度的保守性特征; 如 ic-Cu/Zn-SODs 均含有与铜离子和锌离子配位结合的 7 个保守的氨基酸残基; Arg79-Asp101 形成的盐桥和 Cys57-Cys146 形成的分子内二硫键对维持 Cu/Zn-SODs 的静电环的稳定有重要作用^[16]。此外, 11 个氨基酸残基 (Gln-22; His-43; Ser-59; Asn-65; Arg-79; Asn-86; Ser-111; Arg-115; Asn-131; Ser-134; Arg-143) 对于维持 Cu-Zn/SODs 的构象具有重要作用^[17]; 这些氨基酸残基在所有物种的 ic-Cu/Zn-SODs 中几乎完全保守。ic-Cu/Zn-SODs 的 N 端都有一个共同头序列 (KAVCVL), C 端有一个共同尾序列 (GVIGT)^[15], 这 2 个共同序列在 cpSOD 中同样存在并且也很保守。预测的 cpSOD 空间结构也显示与利用 X 射线衍射技术得到的其他已知的 ic-Cu/Zn-SODs 晶体结构具有很高的相似性; 如 cpSOD 氨基酸序列在二级结构上也形成 8 个 β 折叠链和 7 个 Loop 环, 8 条 β 链反向平行构成 β 桶状核心, 活性中心位于筒状核心一侧; Loop III 和 Loop VI 形成 2 个 Greek-key 结构; Loop VII 形成的静电环 (electrostatic loop) 作为底物进入酶活性中心的通道; 2 个 α 螺旋形成螺旋极子有利于稳定 Zn 离子在活性中心的位置^[17-18]。这些均说明 cpSOD 可能与其他动物的 ic-Cu/Zn-SODs 具有相似的功能和催化机制。

从基于 ic-Cu/Zn-SODs 的系统发育树可以看出, 哺乳动物、鸟类、两栖类、鱼类均分别聚为一支, 这与文献^[9]的观点是一致的, 软体动物的贻贝科、牡蛎科、扇贝科在传统分类中虽然均属于瓣鳃纲的异柱目, 但是它们的亲缘关系较远 (自举值较低)。褶纹冠蚌属于瓣鳃纲真瓣鳃目, 与异柱目形成较弱的单系关系; 这与褶纹冠蚌在经典分类中的阶元一致。

在海湾扇贝的血细胞、性腺、鳃、肝胰脏、外套膜和闭壳肌中可以检测到 ic-Cu/Zn-SODs 的 mRNA 表达, 其中鳃组织中的表达量最大, 外套膜和闭壳肌中表达量较低^[10]; 栉孔扇贝的血细胞、肾脏、鳃、肌肉、生殖腺中也测到了 ic-Cu/Zn-SODs 的表达, 在鳃中表达水平最高, 其次是血细胞^[9]。cpSOD 在褶纹冠蚌的血液、外套膜、鳃、肝胰腺和闭壳肌中也有表达, 同样是在鳃和肝胰腺组织中表达水平最高, 而在血液、外套膜和闭壳肌中表达量较少。鳃作为蚌的呼吸器官, 长期与水体中含有的多种病原体 and 污染物接触, 是抵御病原体或毒素的第一道防线, cp-SOD 在鳃组织中表达量较高说明鳃组织在贝类防御上起着重要的保护作用; 而肝胰腺在一些无脊椎动物被认为是主要的免疫防御组织, 并且是合成杀伤入侵病原体的免疫因子的场所^[19]。cpSOD 在肝胰腺中表达量较高可能是因为肝胰腺参与了主要的免疫防御反应。然而, Northern 杂交结果显示红光熊蜂 (*Bombus ignitus*) ic-Cu/Zn-SODs 的表达模式却与其他无脊椎动物的稍有些不同, 只在脂肪体、中肠、肌肉和头部^[20]检测到。罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 的 ic-Cu/Zn-SODs 仅在肝胰腺和血细胞中能够检测到, 且肝胰腺中的表达量比血细胞中的要大得多^[21]。这些表达模式的差异可能是由于在不同环境中生物产生 ROS 的过程和部位不一样, 从而导致消除过量的 ROS 的过程也不一样。

许多物理、化学因素如热休克、重金属等均可影响 ic-Cu/Zn-SODs 的表达^[7]; 微生物也可以影响多种生物的 ic-Cu/Zn-SODs 的表达; 栉孔扇贝经鳗利斯顿氏菌 (*Listonella anguillarum*) 和滕黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) 免疫刺激后 ic-Cu/Zn-SODs 表达先下调, 然后逐渐恢复; 而在解脂假丝酵母 (*Candida lipolytica*) 刺激后无明显变化^[9]。海湾扇贝经鳗弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 刺激后 ic-Cu/Zn-SODs 表达无明显变化^[10]。罗氏沼虾在注射格氏乳球菌 (*Lactococcus garvieae*) 后 ic-Cu/Zn-SODs 在血细胞中的表达先上调然后恢复, 而在肝胰腺中的表达是先下调后再恢复^[19], 红光熊蜂在注射 LPS 后 ic-Cu/Zn-SODs 的表达也上调^[20]。褶纹冠蚌在注射嗜水气单胞菌后, 血细胞中 cpSOD 表达量一直增加, 到 12 h 后达到最大值。说明 cpSOD 作为机

体内重要的抗氧化酶类,不仅在抗氧化过程中具有重要的作用,也可能在机体抵抗微生物的免疫防御中具有重要的作用。

参 考 文 献

- [1] MRUK D D, SILVESTRINI B, MO M, et al. Antioxidant superoxide dismutase: a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility[J]. *Contraception*, 2002, 65(4): 305-311.
- [2] ZELKO I N, MARIANI T J, FOLZ R J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the Cu/Zn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and ECSOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression[J]. *Free Radic Biol Med*, 2002, 33(3): 337-349.
- [3] OKADO-MATSUMOTO A, FRIDOVICH I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver; Cu, Zn-SOD in mitochondria[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(42): 38388-38393.
- [4] CRAPO J D, OURY T, RABOUILLE C, et al. Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(21): 10405-10409.
- [5] GIBBS L S, SHAFFER J B. Nucleotide sequence of bovine copper/zinc superoxide dismutase cDNA generated by the polymerase chain reaction[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(23): 7171.
- [6] KEN C F, LIN C T, SHAW J F, et al. Characterization of fish Cu/Zn-superoxide dismutase and its protection from oxidative stress[J]. *Mar Biotechnol*, 2003, 5(2): 167-173.
- [7] 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* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 23(5): 1043-1059.
- [8] KOLAITI R M, LUCAS J M, KOUYANOU-KOUTSOUKOU S. Molecular cloning of the ribosomal P-proteins MgP1, MgP2, MgP0, and superoxide dismutase (SOD) in the mussel *Mytilus galloprovincialis* and analysis of MgP0 at stress conditions[J]. *Gene*, 2009, 430(1/2): 77-85.
- [9] NI D J, SONG L S, GAO Q, et al. The cDNA cloning and mRNA expression of cytoplasmic Cu, Zn superoxide (SOD) gene in scallop *Chlamys farreri* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 23(5): 1032-1042.
- [10] BAO Y B, LI L, XU F, et al. Intracellular copper/zinc superoxide dismutase from bay scallop *Argopecten irradians*: its gene structure, mRNA expression and recombinant protein [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 27(2): 210-220.
- [11] BOUTET I, TANGUY A, MORAGA D. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions[J]. *Gene*, 2004, 329: 147-157.
- [12] GONZALEZ M, ROMESTAND B, FIEVET J, et al. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 338(2): 1089-1097.
- [13] BAO Y B, 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 Immunol*, 2009, 27(1): 17-25.
- [14] 文祝友, 刘晓燕, 金婵理, 等. 三角帆蚌嗜水汽单胞菌病的病理研究[J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2001, 27(1): 56-59.
- [15] 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 β -glucan and peptidoglycan injections[J]. *Mol Immunol*, 2008, 45(5): 1346-1355.
- [16] CIRIOLO M R, BATTISTONI A, FALCONI M, et al. Role of the electrostatic loop of Cu, Zn superoxide dismutase in the copper uptake process[J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268(3): 737-742.
- [17] PARGE H E, HALLEWELL R A, TAINER J A. Atomic structures of wild-type and thermostable mutant recombinant human Cu, Zn superoxide dismutase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(13): 6109-6113.
- [18] DJINOVIC K, CODA A, ANTOLINI L, et al. Crystal structure solution and refinement of the semisynthetic cobalt-substituted bovine erythrocyte superoxide dismutase at 2.0 Å resolution [J]. *J Mol Biol*, 1992, 226(1): 227-238.
- [19] GROSS P S, BARTLETT T C, BROWDY C L, et al. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic white shrimp, *L. setiferus* [J]. *Dev Comp Immunol*, 2001, 25(7): 565-577.
- [20] CHOI Y S, LEE K S, YOON H J, et al. *Bombus ignitus* Cu, Zn superoxide dismutase (SOD1): cDNA cloning, gene structure, and up-regulation in response to paraquat, temperature stress, or lipopolysaccharide stimulation[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2006, 144(3): 365-371.
- [21] 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 Immunol*, 2006, 21(1): 102-112.