

于永昂,张 蕾,赵俊杰,等. 小麦锰超氧化物歧化酶基因的克隆与原核表达[J]. 江苏农业科学,2018,46(23):68-71.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.016

小麦锰超氧化物歧化酶基因的克隆与原核表达

于永昂,张 蕾,赵俊杰,贺 杰,马振锋,胡海燕

(河南科技学院生命科技学院/现代生物育种河南省协同创新中心,河南新乡 453003)

摘要:为了深入研究小麦 Mn 超氧化物歧化酶基因(*MnSOD*)的功能,采用逆转录 PCR(RT-PCR)技术扩增 *TaMnSOD* 的开放阅读框(ORF)全长 cDNA,对其进行生物信息学分析。结果表明,该基因开放阅读框长度为 675 bp,编码 224 个氨基酸,蛋白相对分子量为 24.56 ku,等电点为 6.83。构建原核表达载体 pET32a-*TaMnSOD*,对 *TaMnSOD* 基因进行原核表达,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结果表明,所表达蛋白与预测蛋白大小一致。研究结果为进一步研究该蛋白的功能奠定了基础。

关键词:小麦;Mn 超氧歧化酶;原核表达;基因克隆

中图分类号: Q786;S512.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)23-0068-04

植物在自然界中经常会受到病菌、干旱、冷害和高盐等生物和非生物胁迫,引发细胞内部产生大量的活性氧(reactive oxygen species,ROS),大量积累的 ROS 能够对植物体内的核酸、脂质、蛋白质等生物大分子产生伤害^[1]。为了保持细胞内部氧化还原的平衡,植物在长期进化过程中发展出几种酶和非酶系统来缓解由活性氧引起的氧化损伤,其中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)是植物用来清除活性氧的一种关键酶。SOD 能够催化植物体内分子氧活化的中间产物超氧阴离子自由基(O₂⁻)的歧化反应从而生成氧分子和过氧化氢,在逆境胁迫下增强 SOD 基因表达能够提高植物清除活性氧的能力,增强植物的抗逆性^[2]。超氧化物歧化酶按照金属辅基主要分为铁(Fe)SOD、(锰)SOD 和(铜/锌)SOD 3 种。许多研究表明,MnSOD 与作物的抗逆性有着密切的关系。Tanaka 等利用酵母 *MnSOD* 在水稻中过量表达提高了转基因植株对盐胁迫的耐受性,转基因植株的 SOD 和抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase,APX)活性在盐胁迫处理条件下能够提高 1.5~2.0 倍^[3];韩利芳等将烟草 *MnSOD* 基因转入苜蓿中提高了转基因植株的 MnSOD 活性^[4];王丙锋等将柽柳 *MnSOD* 基因转化到酵母基因组中,提高了酵母的抗旱和耐高温的能力^[5];陈莉等在仙客来中过表达 *MnSOD* 基因,提高了转基因植物对高温胁迫的抗性^[6]。

小麦是我国重要的粮食作物之一,但干旱、低温和盐碱等非生物胁迫严重影响其产量^[7]。为此,本研究从小麦叶片中克隆 *MnSOD* 基因全长序列,并对该基因蛋白在生物信息学分析的基础上构建了 pET32-*TaMnSOD* 原核表达载体,在大肠杆菌中用异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)成功诱导表达出目的蛋白,为小麦 MnSOD 蛋白的进一步分离纯化和基因的表

达、提高小麦对逆境胁迫的适应能力奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 本试验小麦品种为矮抗 58,由河南科技学院小麦中心提供。2016 年 5 月选取颗粒饱满、大小一致的种子用 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min 后,用流水冲洗 5 次后置于铺有滤纸的培养皿中发芽,3 d 后选取发芽的小麦种子播种至含有混合营养基质的营养钵内,在 16 h 光照(28 ℃)—8 h 黑暗(25 ℃)培养箱中培养,3 叶期时,取新鲜嫩叶用液氮速冻后,-80 ℃冰箱保存备用。

1.1.2 菌株与试剂 原核表达载体 pET-32a、大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 及表达菌株 BL21(DE3)均由河南科技学院生命科技学院分子生物学实验室保存。pGM-T 载体、DNA 凝胶回收试剂盒、Taq DNA 聚合酶及质粒小量抽提试剂盒均购自 TIANGEN 公司;T4 DNA 连接酶、限制性内切酶购自 TaKaRa 公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 小麦叶片总 RNA 的提取和 cDNA 的合成 参照 Trizol 试剂盒说明书提取小麦叶片的总 RNA。调整提取的 RNA 浓度为 200 ng/ μ L,用 PrimeScriptTM RT reagent Kit (Perfect Real Time)(TaKaRa,大连)按操作说明合成 cDNA 第 1 链。

1.2.2 小麦 *MnSOD* 基因的克隆 根据 GenBank 公布的小麦 *MnSOD* 基因序列(GenBank 登录号:AF092524)设计特异性引物 MnSOD-F1(5'-CCATGCGCTCCGCACGTT-3')和 MnSOD-R1(5'-GTGTCACCTCTATGCAATGT-3')。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应程序:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,33 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,回收纯化 PCR 产物。将回收的目的片段与 pGM-T 载体连接后转化 DH5 α 感受态细胞,挑取阳性克隆进行 PCR 鉴定后送北京三博远志生物技术有限公司进行测序。

1.2.3 小麦 *MnSOD* 基因的生物信息学分析 用 ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析小麦 *MnSOD* 编码

收稿日期:2017-08-20

基金项目:河南省科技计划(编号:142102110041);河南省新乡市重点科技攻关计划(编号:ZG15009)。

作者简介:于永昂(1986—),男,河南新乡人,博士,讲师,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:xkyya@163.com。

通信作者:胡海燕,博士,副教授,主要从事小麦抗逆生物学方面的研究。E-mail:haiyanhuhhy@126.com。

氨基酸序列的物理性质;用 Predict protein 预测 *MnSOD* 基因编码蛋白的二级结构;用 SMATER 分析 *MnSOD* 基因编码蛋白的氨基酸序列的保守结构域;利用 BlastP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 进行同源性搜索,选取与小麦 *MnSOD* 同源性较高的植物的 *MnSOD* 氨基酸序列,利用 DNAMAN 8.0 进行多序列比对,用 Mega 5.0 软件构建系统发育树。

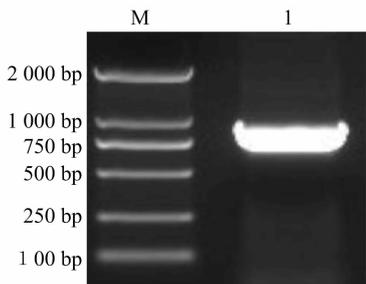
1.2.4 原核表达载体的构建 根据获得的小麦 *MnSOD* 编码区序列设计原核表达引物 *MnSOD* - F2 (5' - CGGGATCC ATGCGCTCCGCACGTTG - 3',下划线部分为 *Bam*H I 酶切位点)和 *MnSOD* - R2 (5' - CCCAAGCTTTCGCAAGCACTTTTTC ATA - 3',下划线部分为 *Hind* III 酶切位点),以小麦叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。用 T4 连接酶将回收纯化的 PCR 产物与 pGM - T 载体于 16 °C 连接过夜,转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,挑取单克隆进行测序分析。将测序正确的 pGM - *TaMnSOD* 质粒与原核表达载体 pET - 32a 分别用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切操作,回收目的片段,经 T4 连接酶连接后,转化 DH5 α 感受态细胞,抽提质粒经 PCR 和双酶切鉴定,获得原核表达载体 pET32a - *TaMnSOD*。

1.2.5 重组质粒融合蛋白的表达 将测序正确的 pET32a - *TaMnSOD* 重组质粒热激转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中,涂布于含有卡那霉素的 LB 平板上。挑取阳性克隆于含有卡那霉素的 5 mL LB 液体培养基中,37 °C、200 r/min 培养 12 h。按 1% 的接种量接种到 10 mL LB 液体培养基中,37 °C、200 r/min 振荡培养至 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.5 左右,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导 3 h。5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,加入 SDS - PAGE (十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳) 上样缓冲液煮沸 10 min,取 10 μ L 进行 SDS - PAGE (5% 浓缩胶,12% 分离胶),分析蛋白表达结果。

2 结果与分析

2.1 小麦 *MnSOD* 基因的克隆

以小麦叶片 cDNA 为模板进行逆转录 PCR (RT - PCR),扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,在分子量相当于 750 bp 左右扩增出 1 条清晰的条带(图 1),与预测大小相符,推断其为小麦 *MnSOD* 基因序列。测序结果表明,该基因全长 813 bp。采用 NCBI (美国国立生物技术信息中心) 的 ORF Finder 分析发现,该序列包含 1 个 675 bp 的开放阅读框,编码 224 个氨基酸,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TGA (图 2)。



M—Marker DL2000; 1—*TaMnSOD* 基因的 PCR 扩增条带

图1 小麦 *TaMnSOD* 的 PCR 扩增

2.2 小麦 *MnSOD* 基因的生物信息学分析

用 ProtParam 预测 *TaMnSOD* 基因编码蛋白的相对分子量

```

1  ATGGCGCTCCGCACGTTGGCCGCGAAGAAAACCTAGGCGCTGGCGCTGGCGGGCCAGG
   M A L R T L A A K K T L G L A L G G A R
61  GGGCTGGCCAGCTTCACGCTCCCGACCTCCCTACGACTACGGCGCGCTGGGACCGGGCC
   G V A T F T L P D L P Y D Y G A L E P A
121 GTCTCCGGGAGATCATGCGCTGCACCACCAGAAGCACCACCCTTACGTGCGCAAC
   V S G E I M R L H H Q K H H A T Y V A N
181 TACAACAAGGCGCTCGACAGCTCGACGCCCGTCCCAAGGGGACCGCTCCGCGCTC
   Y N K A L E Q L D A P Y G A A G D A S A V
241 GTCCACCTCCAGAGGCCATCAAGTTCACGGCGGCGGTGATGTTAACCATTCAATCTC
   V H L Q S A I K F N G G G H V N H S I F
301 TGAAGAACCCTCAAGCCTATCAGTGAGGGTGGTGGTGGGACCTCATGGCAAACCTTGGC
   W K N L K P I S E G G G E A P H G K L G
361 TGGGCATTGATGAGGATTTTGGTTCTATTGAGAACTTATAAAGAAGATGAATGCAGAG
   W A I D E D F G S I E K L I K K M N A E
421 GGTGTGCTTTTACAAGGATCGGATGGTGTGGTGTGCTTTGGATAAAGAGGCCAAAAGG
   G A A L Q G S G W V W L A L D K E A K R
481 CTTTCAGTTGAACTACTCTAATCAGGACCTCTTTGACCAAAGGGTCAAACCTGCAT
   L S V E T T P N G D P L V T G S N L H
541 CCTTTGTGGGAATTGATGTCTGGGAGCATCGCTACTCTCGAGTACAAGAAGCTGAGG
   P L L G I D V W E H A Y Y L Q Y K N V R
601 CCGGACTACCTGACCAACATCTGGAAGTGGTGAACCTGGAAGTATGCTGGGAAGGAT
   P D Y L T N I W K V V N W K Y A G E E Y
661 GAAAAGTCTCGCTGA
   E K V L A *
    
```

M—甲硫氨酸; A—丙氨酸; R—精氨酸; T—苏氨酸; L—亮氨酸; G—甘氨酸; V—缬氨酸; F—苯丙氨酸; P—脯氨酸; D—天冬氨酸; Y—酪氨酸; K—赖氨酸; E—谷氨酸; S—丝氨酸; I—异亮氨酸; H—组氨酸; Q—谷氨酰胺; N—天冬酰胺; W—色氨酸;

* 表示终止密码子; 左侧数据表示碱基位置

图2 *TaMnSOD* 基因的 cDNA 序列及其推导的蛋白质氨基酸序列

为 24.56 ku, 分子式为 $C_{1119}H_{1724}N_{300}O_{318}S_3$, 等电点 (pI) 为 6.83。理论推导其半衰期约为 30 h, 不稳定参数为 29.56, 蛋白质性质稳定 (不稳定参数在 40 以下为稳定蛋白)。总的带负电荷的残基 (Asp + Glu, 即天冬氨酸 + 谷氨酸) 为 24 个, 总的带正电荷的残基 (Arg + Lys, 即精氨酸 + 赖氨酸) 为 23 个。亲水性平均数为 -0.269, 预测该蛋白为亲水性蛋白, 其脂肪指数为 91.52。用 TMHMM - 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) 对 *TaMnSOD* 的氨基酸序列进行分析, 没有跨膜结构域, 没有信号肽, 是一个可溶性蛋白质。*MnSOD* 蛋白二级结构预测结果显示, 在整个蛋白中, α - 螺旋占 35.71%, β - 折叠占 15.18%, 无规则卷曲占 27.23%, 延伸链占 21.88%。将推测的 *TaMnSOD* 氨基酸序列在 GenBank 上进行 Blast 比对后, 采用 DNAMAN 6.0 软件进行多序列比对。将克隆的 *TaMnSOD* 基因编码的氨基酸序列与 GenBank 中其他植物的 *MnSOD* 氨基酸序列进行比对, 发现该基因编码蛋白与大麦 (BAK03227)、二穗短柄草 (XP_010231530)、水稻 (XP_015640127) 的 *MnSOD* 具有较高的同源性, 氨基酸相似性分别达到 95.13%、88.70%、82.68% (图 3)。进一步经 Clustal W 聚类分析后, 利用 Mega 5.0 软件采用相邻连接法绘制进化树, 结果表明, 本研究克隆的小麦 *TaMnSOD* 基因编码的蛋白和大麦的亲缘关系最近 (图 4)。

2.3 原核表达载体的构建与鉴定

使用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切质粒 pET32 - *TaMnSOD*, 切出来的片段与预期结果大小一致, 表明 *TaMnSOD* 基因已经插入载体 pET - 32a 中 (图 5)。酶切鉴定正确的阳性克隆, 经测序后显示插入的外源基因序列与预期片段序列一致, 未出现碱基突变及移码现象。由此表明, pET32 - *TaMnSOD* 原核表达载体构建成功。

2.4 *MnSOD* 基因重组蛋白的 SDS - PAGE 分析

将构建成功的重组表达质粒 pET32 - *TaMnSOD* 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 在 37 °C、IPTG 浓度为

TaMnSOD	MAIRTLAAKKTGLALGGAR.....GVATFDLPDLYDYGALEPAVSGDIMRIHH	50
HvMnSOD	MAIRTLTKRRTGLALGGARR.....GVATFDLPDLYDYGALEPAVSGDIMRIHH	51
BdMnSOD	MAIRTLTKRRTGLALGGARR.....GVATFDLPDLYDYGALEPAVSGDIMRIHH	55
SoMnSOD	MAIRTLASRKA...YFALGGARPLAASS..RGVITVLPDLYDYGALEPAVSGDIMRIHH	58
SbMnSOD	MAIRTLASRKA...YFALGGARPLAASS..RGVITVLPDLYDYGALEPAVSGDIMRIHH	58
SiMnSOD	MAIRTLASRKTSLALGG.ARPLAAGSARGVITVLPDLYDYGALEPAVSGDIMRIHH	59
AtMnSOD	MAIRCVASRKTLAGLKETSSRL...RIRGICTFDLPDLYDYGALEPAVSGDIMRIHH	56
OsMnSOD	MAIRTLASRKT...AAAALPLAAAAAARGVITVLPDLYDYGALEPAVSGDIMRIHH	56
NtMnSOD	MAIRTLVSRRTATGLGFRP.....QLRGIQTFSLPDLYDYGALEPAVSGDIMRIHH	53
ZmMnSOD	MAIRTLASRKA...YFALGGARPLAASS..RGVITVLPDLYDYGALEPAVSGDIMRIHH	60

TaMnSOD	QKHHATYVANYNALEQLDAVAKGDASAVVQLGSAIKFNGGGVNHHSIFWKNLKFPISEG	110
HvMnSOD	QKHHATYVANYNALEQLDAVAKGDASAVVQLGSAIKFNGGGVNHHSIFWKNLKFPISEG	111
BdMnSOD	QKHHATYVANYNALEQLDAVAKGDASAVVQLGSAIKFNGGGVNHHSIFWKNLKFPISEG	115
SoMnSOD	QKHHATYVANYNALEQLDAVAKGDASAVVQLGSAIKFNGGGVNHHSIFWKNLKFPISEG	118
SbMnSOD	QKHHATYVANYNALEQLDAVAKGDASAVVQLGSAIKFNGGGVNHHSIFWKNLKFPISEG	118
SiMnSOD	QKHHATYVANYNALEQLDAVAKGDASAVVQLGSAIKFNGGGVNHHSIFWKNLKFPISEG	119
AtMnSOD	QKHHATYVANYNALEQLDAVAKGDASAVVQLGSAIKFNGGGVNHHSIFWKNLKFPISEG	116
OsMnSOD	QKHHATYVANYNALEQLDAVAKGDASAVVQLGSAIKFNGGGVNHHSIFWKNLKFPISEG	116
NtMnSOD	QKHHATYVANYNALEQLDAVAKGDASAVVQLGSAIKFNGGGVNHHSIFWKNLKFPISEG	113
ZmMnSOD	QKHHATYVANYNALEQLDAVAKGDASAVVQLGSAIKFNGGGVNHHSIFWKNLKFPISEG	120

TaMnSOD	GCEFFHGKLGWAIDELFGSFEAVVKKMNAEGPALCGSGVWVLAIDKDEKRLSVETTANQD	169
HvMnSOD	GCEFFHGKLGWAIDELFGSFEAVVKKMNAEGPALCGSGVWVLAIDKDEKRLSVETTANQD	171
BdMnSOD	GCEFFHGKLGWAIDELFGSFEAVVKKMNAEGPALCGSGVWVLAIDKDEKRLSVETTANQD	175
SoMnSOD	GCEFFHGKLGWAIDELFGSFEAVVKKMNAEGPALCGSGVWVLAIDKDEKRLSVETTANQD	178
SbMnSOD	GCEFFHGKLGWAIDELFGSFEAVVKKMNAEGPALCGSGVWVLAIDKDEKRLSVETTANQD	178
SiMnSOD	GCEFFHGKLGWAIDELFGSFEAVVKKMNAEGPALCGSGVWVLAIDKDEKRLSVETTANQD	179
AtMnSOD	GCEFFHGKLGWAIDELFGSFEAVVKKMNAEGPALCGSGVWVLAIDKDEKRLSVETTANQD	176
OsMnSOD	GCEFFHGKLGWAIDELFGSFEAVVKKMNAEGPALCGSGVWVLAIDKDEKRLSVETTANQD	176
NtMnSOD	GCEFFHGKLGWAIDELFGSFEAVVKKMNAEGPALCGSGVWVLAIDKDEKRLSVETTANQD	173
ZmMnSOD	GCEFFHGKLGWAIDELFGSFEAVVKKMNAEGPALCGSGVWVLAIDKDEKRLSVETTANQD	180

TaMnSOD	PLVTRGANSVPLGIDVWEHAYYLQYKNVREDYLNINWVKVWVNWXYACBVEYKVL	223
HvMnSOD	PLVTRGANSVPLGIDVWEHAYYLQYKNVREDYLNINWVKVWVNWXYACBVEYKVL	225
BdMnSOD	PLVTRGANSVPLGIDVWEHAYYLQYKNVREDYLNINWVKVWVNWXYACBVEYKVL	229
SoMnSOD	PLVTRGANSVPLGIDVWEHAYYLQYKNVREDYLNINWVKVWVNWXYACBVEYKVL	232
SbMnSOD	PLVTRGANSVPLGIDVWEHAYYLQYKNVREDYLNINWVKVWVNWXYACBVEYKVL	232
SiMnSOD	PLVTRGANSVPLGIDVWEHAYYLQYKNVREDYLNINWVKVWVNWXYACBVEYKVL	233
AtMnSOD	PLVTRGANSVPLGIDVWEHAYYLQYKNVREDYLNINWVKVWVNWXYACBVEYKVL	230
OsMnSOD	PLVTRGANSVPLGIDVWEHAYYLQYKNVREDYLNINWVKVWVNWXYACBVEYKVL	230
NtMnSOD	PLVTRGANSVPLGIDVWEHAYYLQYKNVREDYLNINWVKVWVNWXYACBVEYKVL	227
ZmMnSOD	PLVTRGANSVPLGIDVWEHAYYLQYKNVREDYLNINWVKVWVNWXYACBVEYKVL	234

右侧数据表示相应植物的锰 SOD 基因编码氨基酸的数量

图3 TaMnSOD 氨基酸与其他物种氨基酸序列比对

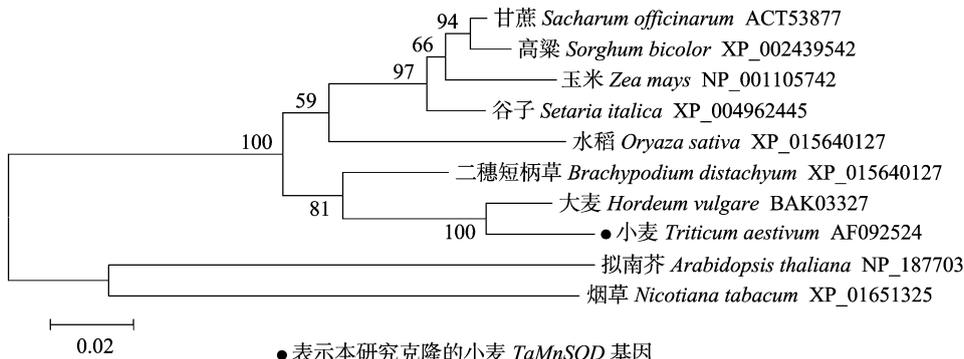


图4 小麦与其他植物 MnSOD 基因编码氨基酸的系统树

0.5 mmol/L 条件下,分别诱导 1、2、3、4 h 后进行 SDS - PAGE 分析。图 6 结果表明,与对照相比,pET32 - TaMnSOD 转化菌经 IPTG 诱导后,在相对分子质量为 45 ku 左右处有 1 条蛋白条带,除去载体 PET32 自身表达的 20 ku 蛋白后,结果与预期的目的蛋白(24.56 ku)大小一致。

3 讨论

植物在不利环境胁迫(盐渍、干旱、高温、低温等)下其细

胞代谢过程不协调会引起 ROS 大量积累,构成氧化胁迫威胁植物的细胞结构^[8-9]。因此,采用分子生物学手段,对植物的氧化代谢进行修饰,提高植物抗氧化胁迫的能力,是植物抗性研究的方向之一^[10-11]。SOD 是植物细胞防御系统中重要的保护酶类,在防御活性氧伤害中起着关键性的作用,其活性高低与植物的抗逆能力密切相关^[12]。目前,植物中许多 MnSOD 基因已经被克隆并用来转化不同植物,获得了 SOD 活性增强的转基因植株。邓婷婷等将极端耐盐的盐生杜氏藻

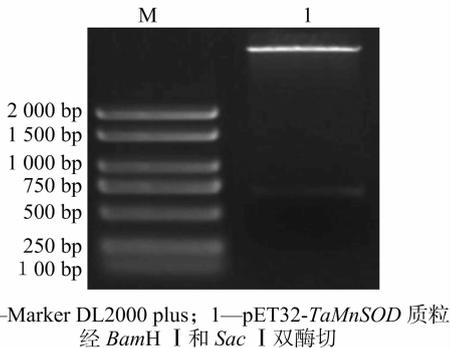


图5 重组 pET32-TaMnSOD 质粒的构建

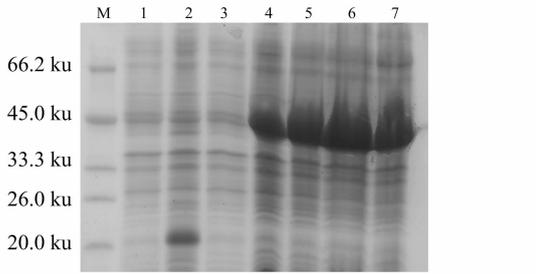


图6 SDS-PAGE 电泳检测 TaMnSOD 蛋白表达

的 *DsMnSOD* 基因转化 *SOD* 缺陷型大肠杆菌并诱导其表达,结果表明,转染后的大肠杆菌在耐盐和抗寒等方面的耐受性明显提高^[13]。付畅等将西伯利亚蓼 *PmMnSOD* 基因转入酵母中,提高了酵母在盐碱胁迫下的 *SOD* 活性,并提高了酵母对盐碱胁迫的抗性,表明 *PmMnSOD* 基因在抵御盐碱胁迫中起到非常重要的作用^[14]。另外, *MnSOD* 在转基因烟草、苜蓿和棉花等植物中的过量表达提高了它们对氧化胁迫的耐受性^[10]。由此表明, *MnSOD* 基因对于增强植物的抗逆能力具有重要作用。

目前,用于表达重组蛋白的外源系统主要有大肠杆菌系统、酵母表达系统和动物细胞表达系统^[15-17]。大肠杆菌表达系统因其具有遗传背景清楚、结构简单、外源蛋白表达量高以及基因表达调控机制明确等优点,已经成为目前最常用的表达宿主^[18]。真核生物基因的原核表达受表达载体、宿主菌、IPTG 浓度、温度、诱导表达时间等因素的影响^[19-20]。本试验采用目前应用最广泛的 pET 大肠杆菌表达系统进行原核表达,该系统能与 Tag (标签)连接进行融合蛋白表达,目的蛋白易于纯化,并且具有操作方便、表达量大等优点^[21]。一般 37 °C、0.5 mmol/L 终浓度的 IPTG 适合绝大多数的蛋白表达,本研究采用该条件进行原核表达,所表达出的融合蛋白与目的蛋白相对分子量一致。

本研究从小麦叶片中克隆到 Mn 超氧化物歧化酶基因 *TaMnSOD*,其编码蛋白与其他植物中的 MnSOD 具有较高的相似性。将 *TaMnSOD* 基因与原核表达载体 PET-32a 构建融合表达载体,在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中成功表达,从而为小麦 *MnSOD* 基因编码蛋白功能研究提供理论基础。

参考文献:

- [1] Song F N, Yang C P, Liu X M, et al. Effect of salt stress on activity of superoxide dismutase (SOD) in *Ulmus pumila* L. [J]. Journal of Forestry Research, 2006, 17(1): 13-16.
- [2] Rabinowitch H D, Fridovich I. Superoxide reoicals, superoxide dismutases and oxygen toxicity in plants [J]. Photochemistry and Photobiology, 1983, 37(6): 679-690.
- [3] Tanaka K, Hibino T, Hayashi Y, et al. Salt tolerance of transgenic rice overexpressing yeast mitochondrial Mn-SOD in chloroplasts [J]. Plant Science, 1999, 148(2): 131-138.
- [4] 韩利芳, 张玉发. 烟草 *MnSOD* 基因在保定苜蓿中的转化 [J]. 生物技术通报, 2004(1): 39-42, 46.
- [5] 王丙锋, 杨传平, 王玉成, 等. 柞柳 *MnSOD* 基因的克隆及功能验证 [J]. 分子植物育种, 2007, 5(5): 709-714.
- [6] 陈莉, 周连霞, 马锋旺, 等. 转 *MnSOD* 基因仙客来植株的获得及其对高温胁迫的抗性 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2008, 36(3): 155-160.
- [7] 张蕾, 于永昂, 张明霞, 等. 小麦 *GPX* 基因的克隆及植物表达载体构建 [J]. 贵州农业科学, 2015, 43(4): 31-34.
- [8] 任瑛, 赵爱美, 郭新梅, 等. 玉米 *APX* 基因的克隆及其原核表达研究 [J]. 华北农学报, 2014, 29(4): 49-55.
- [9] 高世超, 林义章, 钟凤林, 等. 青花菜谷胱甘肽-S-转硫酶基因克隆及其表达分析 [J]. 西北植物学报, 2014, 34(4): 651-657.
- [10] 班巧英, 刘桂丰, 姜静, 等. 紫杆柞柳 *MnSOD* 基因在非生物胁迫中的作用 [J]. 植物生理学报, 2004, 44(2): 211-214.
- [11] 余海霞, 罗聪, 徐趁, 等. 杧果 *Mn-MiSOD* 基因的克隆与表达模式分析 [J]. 植物生理学报, 2015, 51(12): 2214-2222.
- [12] 王广慧. 植物 *SOD* 的分子生物学及其在植物抗逆基因工程中的应用进展 [J]. 北方园艺, 2011(3): 194-197.
- [13] 邓婷婷, 李静, 马根, 等. 盐生杜氏藻锰超氧化物歧化酶 (*MnSOD*) 在大肠杆菌中的功能鉴定 [J]. 四川大学学报(自然科学版), 2007, 44(1): 176-180.
- [14] 付畅, 张恒, 刘关君, 等. 西伯利亚蓼 *PmMnSOD* 基因的耐盐碱性鉴定及其在盐碱胁迫下的表达模式 [J]. 分子植物育种, 2009, 7(5): 861-866.
- [15] Waegeman H, Soetaert W. Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* through metabolic and genetic engineering [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(12): 1891-1910.
- [16] Cox M M J. Recombinant protein vaccines produced in insect cells [J]. Vaccine, 2012, 30(10): 1759-1766.
- [17] Chen R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond [J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(5): 1102-1107.
- [18] 杨加伟, 周玲艳, 庄楚雄. 水稻 *Ose-cop1* 基因的原核表达及多克隆抗体制备 [J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(4): 497-502.
- [19] 葛晓霞. 柑橘 *CuSERK-LIKE* 基因原核表达载体的构建与表达 [J]. 江苏农业科学, 2016, 44(4): 22-24.
- [20] 禄亚洲, 尹秀, 左晓宇, 等. 棉花 *GhGGPase2* 基因克隆、功能序列分析、原核表达及烟草的遗传转化 [J]. 江苏农业科学, 2016, 44(7): 26-30.
- [21] 张晓东, 李彩霞, 王连春, 等. 滇龙胆 *GrSLS1* 基因的克隆与原核表达 [J]. 西北植物学报, 2014, 34(7): 1311-1317.