

河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophila*) *Mn-SOD* 基因的克隆及表达分析*

张宏叶¹ 于兴达¹ 王佩佩¹ 贾秀琪¹ 李欣茹¹
曹全全¹ 尹绍武^{1①} 陈树桥² 周国勤²

(1. 南京师范大学生命科学院 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室 南京 210023;

2. 南京市水产科学研究所 南京 210036)

摘要 本研究采用 cDNA 末端快速扩增(RACE)和实时荧光定量 PCR 等技术,对河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophila*)的 *Mn-SOD* 基因进行了克隆和表达模式分析。结果显示,克隆得到的河川沙塘鳢 *Mn-SOD* 基因的 cDNA 序列全长为 1008 bp,包括 678 bp 的开放阅读框(ORF),15 bp 的 5'UTR 区和 315 bp 的 3'UTR 区,并且具有脊椎动物典型的加尾信号 AATAAA 和 31 bp 的 PolyA 尾巴,推测该序列共编码 225 个氨基酸。该基因包含 Sod_{Fe-N}(28-109)与 Sod_{Fe-C}(116-219)2 个保守的结构域,此结构与其他物种极为相似,表明该基因在物种进化中比较保守。与已知物种 *Mn-SOD* 进行同源性比对发现,河川沙塘鳢 *Mn-SOD* 氨基酸序列与条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)和线鳢(*Channa striata*)相似性最高,均为 90.3%。采用 qRT-PCR 技术检测了 *Mn-SOD* 基因在河川沙塘鳢 8 个组织(肾、肝、肌肉、脑、脾、鳃、眼、心脏)和 8 个发育时期(受精卵期、桑椹胚期、原肠胚期、神经胚期、体节期、口裂期、出膜后 1 d、出膜后 3 d)的表达情况。在检测的 8 个组织中都有 *Mn-SOD* 基因的表达,肌肉中的表达量最高;胚胎到仔鱼的 8 个发育时期都有 *Mn-SOD* 基因的表达,桑椹胚期表达量最高。在急性 NaNO₂ 胁迫处理后,河川沙塘鳢肝组织 *Mn-SOD* 基因的 mRNA 表达呈先升高后降低的趋势。而鳃组织 *Mn-SOD* 基因的 mRNA 表达呈先降低后升高再降低的趋势。研究表明, *Mn-SOD* 很可能在对抗 NaNO₂ 胁迫引起的氧化损伤中起重要作用,这将为控制河川沙塘鳢的人工育苗及养殖条件提供有价值的参考资料。

关键词 河川沙塘鳢; *Mn-SOD* 基因; 基因克隆; mRNA 表达量

中图分类号 S965 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)04-0034-10

动物体内大多需要通过氧化还原反应分解有机物供能,尤其在氧化磷酸化反应旺盛的细胞器,如线粒体等部位往往产生大量的活性氧(Reactive oxygen species, ROS)(Ray *et al.*, 2012)。活性氧的性质不稳定,

可以通过链式反应造成细胞内生物大分子的大规模损伤,如损害蛋白质、核酸、破坏脂膜结构和糖类物质(张文玲等, 2000; Kohen *et al.*, 2002; Bhor *et al.*, 2004)。体内多余的活性氧通过抗氧化系统来清除。

* 江苏省科技支撑计划(农业)项目(BE2013441)、“江苏省六大人才高峰”高层次人才项目(2012-NY-032)、江苏省 2015 年度普通高校研究生实践创新计划项目(SJLX15_0299)和南京市科技计划项目(201505059)共同资助[(This work was supported by the Jiangsu Province Science and Technology (Agricultural) Support Program (BE2013441)), Jiangsu Province Six Talent Peaks of High Level Talents Project (2012-NY-032), the Innovation of Graduate Student Training Project of Jiangsu Province in 2015 (SJLX15_0299), and Science and Technology Plan Projects (201505059)]. 张宏叶. E-mail: 746694069@qq.com

① 通讯作者: 尹绍武, 教授, E-mail: yinshaowu@163.com

收稿日期: 2016-07-25, 收修改稿日期: 2016-08-26

超氧化物歧化酶(SOD)被认为是生物体抗氧化的第一道屏障(Kulkarni-Narla *et al*, 1997), 在消除线粒体内活性氧的过程中起重要的作用(Mollnau *et al*, 2006)。

河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophila*)属鲈形目(Perciformes)、沙塘鳢科(Odontobutidae)、沙塘鳢属(*Odontobutis*)。其肉质鲜美细嫩, 市场价格坚挺, 已成为一种具有较高经济价值的水产养殖品种(伍汉霖等, 1993)。目前, 对 *SOD* 基因的结构、功能以及在抗氧化系统中的作用研究在高等动物如鸡(*Gallus gallus*)(卜友泉等, 2001)、人(*Homo sapiens*)(凌敏等, 2005)、豚鼠(*Cavia porcellus*)(Yuan *et al*, 1996)中研究较多, 在水生动物中研究较少, 但越来越受到重视。Gomez-Andum 等(2012)对细胞质 *Mn-SOD* 基因在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)不同器官中表达差异的研究, 结果显示, 细胞质 *Mn-SOD* 基因在鳃和附肢中表达量最高, 在心和肌肉中表达最低。唐学玺等(2000)对黑鲷(*Sebastes fuscescens*)的研究表明, 不同组织的 *SOD* 活性在葱胁迫下的变化规律不同。洪美玲等(2007)用 NaNO_2 胁迫可导致中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)肝脏 *SOD* 活性下降, 幼体血细胞总数减少, 从而加剧机体内脂质过氧化反应而降低机体的免疫力。目前, 对河川沙塘鳢 *Mn-SOD* 基因的研究尚未见报道。本研究首次克隆得到河川沙塘鳢 *Mn-SOD* 基因的全长, 采用 qRT-PCR 技术对其组织分布及胚胎发育不同阶段的表达进行分析, 并研究了其应对 NaNO_2 胁迫下 mRNA 水平表达变化规律, 以期为今后河川沙塘鳢大规模养殖时的水质管理、健康养殖提供有价值的参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1 龄河川沙塘鳢, 体重为(30.0±1.5) g, 取自江苏省南京市水产科学研究所周岗基地。暂养于玻璃循环缸

中 7 d, 确定健康无病后开始实验。高纯总 RNA 快速抽提试剂盒(离心柱型)购自百泰克公司, 反转录试剂盒 HiScript™ QRT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 购自诺唯赞公司, SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司, 荧光定量试剂盒 Faststart Universal SYBR Green Master 购自罗氏公司, PCR 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

用高纯总 RNA 快速抽提试剂盒(离心柱型)提取健康河川沙塘鳢脾组织总 RNA, 用 RNA 浓度测定仪测定每个样品的 RNA 浓度及纯度, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。以总 RNA 为模板, 根据 HiScript™ 1ST Strand cDNA Synthesis Kit 的说明进行反转录, 获得 cDNA 第一条链。

1.3 *Mn-SOD* 基因片段 cDNA 全长克隆

根据从河川沙塘鳢转录组测序的 cDNA 文库中分别筛选得到 765 bp 的 *Mn-SOD* 基因的 cDNA 中间 EST 序列, 采用 Invitrogen 公司的 5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends Version 2.0 试剂盒获得基因的 5'端序列。采用 Clontech 公司的 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒获得目的基因的 3'端序列。克隆基因所需引物见表 1。

1.4 *Mn-SOD* 基因的生物信息学分析

测序结果的序列总长使用 DNASTar 软件统计分析。核苷酸和氨基酸序列的同源性使用 BLAST 程序(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行检索。蛋白质分析专家系统(Expert Protein Analysis System, ExPASy)(<http://www.expasy.org/>)确定其开放阅读框进而预测氨基酸序列, 理论分子量(MW)和等电点(pI)用 ExPASy-ProtParam 在线工具(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)进行预测。使用在线软件 SMART

表 1 克隆 *Mn-SOD* 基因的所用引物

Tab.1 Primers used for *Mn-SOD* genes cloning

引物名称 Names	引物序列 Primer sequences(5'-3')	应用 Application
Mn-SOD-GSP1	AATGTGAGGCTCCAGA	5'-RACE
Mn-SOD-GSP2	TCAGGTCAGGCAGCGAGT	
Mn-SOD-GSP3	GCCGCGACGTTGTTACCT	
AUPA	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	
Mn-SOD-3'-1	CTGCCTGTCCCAATCAAGACCCACT	3'-RACE
Mn-SOD-3'-2	GGGTATTGATGTTTGGGAGCACGCC	
UPM-Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAT CAACGCAGAGT	
UPM-Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	

(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对预测到的氨基酸序列进行结构和功能的分析,使用 SignalP 4.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行信号肽的预测。使用 MITOPROT 软件(<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>)进行蛋白定位的预测。使用在线软件 ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)进行多序列比对。二级结构经 Predictprotein(<https://www.predictprotein.org/>)进行在线预测。使用同源建模网站 Swiss-model(<http://swissmodel.expasy.org/>)预测蛋白三维结构。用 MEGA 5.0 软件重复 1000 次构建 N-J 系统发育树(Kumar *et al*, 2004)。

1.5 河川沙塘鳢 *Mn-SOD* 基因的表达分析

随机取 3 尾健康实验鱼的 8 种组织(肾、肝、肌肉、脑、脾、鳃、眼、心脏)和 8 个发育阶段(受精卵期、桑椹胚期、原肠胚期、神经胚期、体节期、口裂期、出膜后 1 d、出膜后 3 d)的材料,提取总 RNA 后,反转录获得 cDNA 第一链。根据已获得的 *Mn-SOD* 基因 cDNA 全长序列分别设计特异性引物 Mn-SOD-F、Mn-SOD-R,以及作为内参基因的河川沙塘鳢 β -actin 基因特异性上下游引物 β -actin-F、 β -actin-R(表 2)。分别以 8 种组织和 8 个发育时期的 cDNA 为模板,进行实时荧光定量 PCR 分别检测其 mRNA 的表达。PCR 反应体系为 20 μ l, Faststart Universal SYBR Green Master 10 μ l, 正反向引物各 3 μ l, cDNA 模板 4 μ l。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环,4 $^{\circ}$ C 保存。其中,每条引物配置成浓度为 2 μ mol/ μ l 的工作液, cDNA 模板浓度为 5 ng/ μ l。

表 2 实时荧光定量 PCR 引物

Tab.2 Primers used for quantitative real-time PCR

引物名称 Names	引物序列 Primer sequences(5'-3')
Mn-SOD-F	CACAGCAAGCATCACGCTAC
Mn-SOD-R	AATAGCCTCCATCAGCTCGC
β -actin-F	CTCTTCCAGCCATCCTTCCT
β -actin-R	TCAGGTGGGCAATGATCTT

1.6 NaNO₂ 胁迫对河川沙塘鳢 *Mn-SOD* 基因表达的影响

为进一步研究河川沙塘鳢在受到 NaNO₂ 胁迫后不同组织中 *Mn-SOD* 基因表达水平的变化规律,实验参考半静水方式水生生物急性毒性实验法进行刺激。预实验在 50 L 的水族箱中进行,每个水族箱放入经暂养的河川沙塘鳢 10 条,共设 6 个 NaNO₂ 浓度梯度(210、220、230、240、250、260 mg/L),每个浓度设

3 个平行,实验期间不喂食。在 0、1、3、6、12、24、48、72 h 分别观察测定并记录鱼的活动及死亡情况。实验确定河川沙塘鳢 72 h NaNO₂ 半致死浓度为 250 mg/L。以预实验的结果为基础,实验用鱼随机分为实验组和对照组,每组设 3 个平行。实验于相同规格的水族箱中进行,每个水族箱放入实验用鱼 10 条,对照组注入 20 L 曝气自来水,实验组注入等量的 250 mg/L 的 NaNO₂ 溶液。为保持水中浓度稳定,每 6 h 换水 1 次,换水量为 50%,实验过程中持续充氧。

NaNO₂ 溶液处理后,各实验组分别在 0、1、3、6、12、24、48、72 h 随机取 3 条鱼的肝组织和鳃组织,液氮速冻 10 min 后于 -80 $^{\circ}$ C 保存。提取总 RNA 并检测 *Mn-SOD* 基因相对表达量。

1.7 数据处理与分析

实验结果数据采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法来计算目的基因的相对表达量(Schmittgen *et al*, 2008),应用 SPSS 软件对实验数据进行统计分析、差异显著性检验分析。用 *t* 检验计算 *P* 值,当 *P*<0.05 时为差异显著,*P*<0.01 为差异极显著。数值采用平均值 \pm 标准差(Means \pm SD)表示。使用 Origin 8.6 软件绘制柱状图。

2 结果

2.1 *Mn-SOD* 基因的全长序列分析

利用 RACE 技术克隆得到河川沙塘鳢 *Mn-SOD* 基因的 cDNA 全长序列为 1008 bp(GenBank 登录号: KU845215),包括 678 bp 开放阅读框(ORF)、15 bp 的 5'UTR 区和 315 bp 的 3'UTR 区,共编码 225 个氨基酸,其中,3'UTR 区域具有脊椎动物典型的加尾信号 AATAAA 和 31 bp 的 PolyA 尾巴,表明获得的该 cDNA 全长序列 3'末端序列完整(图 1)。

ExPASy 软件预测的氨基酸分子量为 25153.50,理论等电点为 8.30。同时在 N-端还预测到 1 个 27 bp 的线粒体定位靶序列(Mitochondrial targeting sequence, MTS)(MLCRASQIRRCATGLSHSLSQVTTTSRQ)。MITOPROT 软件进一步证明该序列导向线粒体(概率为 0.9714)。Mn-SOD 编码区经 SignalP 软件分析发现,其不存在信号肽序列,不属于分泌蛋白。利用 SMART 软件对 Mn-SOD 氨基酸序列分析表明,包含有 2 个保守的结构域 Sod_Fe_N(28-109)和 Sod_Fe_C(116-219)。此外,1 个 *Mn-SOD* 基因的特征片段(¹⁸⁶DVWEHAYY¹⁹³)和包括 1 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(³⁰SLPD³³),3 个 N-豆蔻酰基化位点(¹⁴GLSHSL¹⁹, ⁹⁶GGHINH¹⁰¹, ¹⁴⁷GSGWGW¹⁵²)的 4 个蛋白激酶 C-磷

酸化位点(²⁴TSR²⁶, ¹⁵⁹SGR¹⁶¹, ²¹⁷SDR²¹⁹, ²²²TAK²²⁴) 也被预测到, 并且 4 个介导其催化活性的 Mn²⁺结合位点(H⁵³, H¹⁰¹, D¹⁸⁶, H¹⁹⁰)位置依然保守。

使用在线软件 ClustalW2 将河川沙塘鳢的 Mn-SOD 氨基酸序列与另外 7 种已知的 Mn-SOD 序列进行对比分析和同源性检测。结果显示, Mn-SOD 的氨基酸序列除线粒体靶向序列之外, 相似性很高。锰离子结合位点(H⁵³, H¹⁰¹, D¹⁸⁶, H¹⁹⁰)、特征片段(DVWEHAYY)等特征都很保守。河川沙塘鳢的 Mn-

SOD 氨基酸序列与另外 7 种已知物种的 Mn-SOD 序列相似性较高, 为 88.5%–78.9%(图 2)。

2.2 河川沙塘鳢 Mn-SOD 氨基酸序列同源性及其进化分析

推导得到的河川沙塘鳢 Mn-SOD 氨基酸序列分析表明, 河川沙塘鳢和其他物种 Mn-SOD 的氨基酸序列同源性在 51.6%–90.3%之间, 其中, 与同为鲈形目的条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)和线鳢(*Channa striata*)

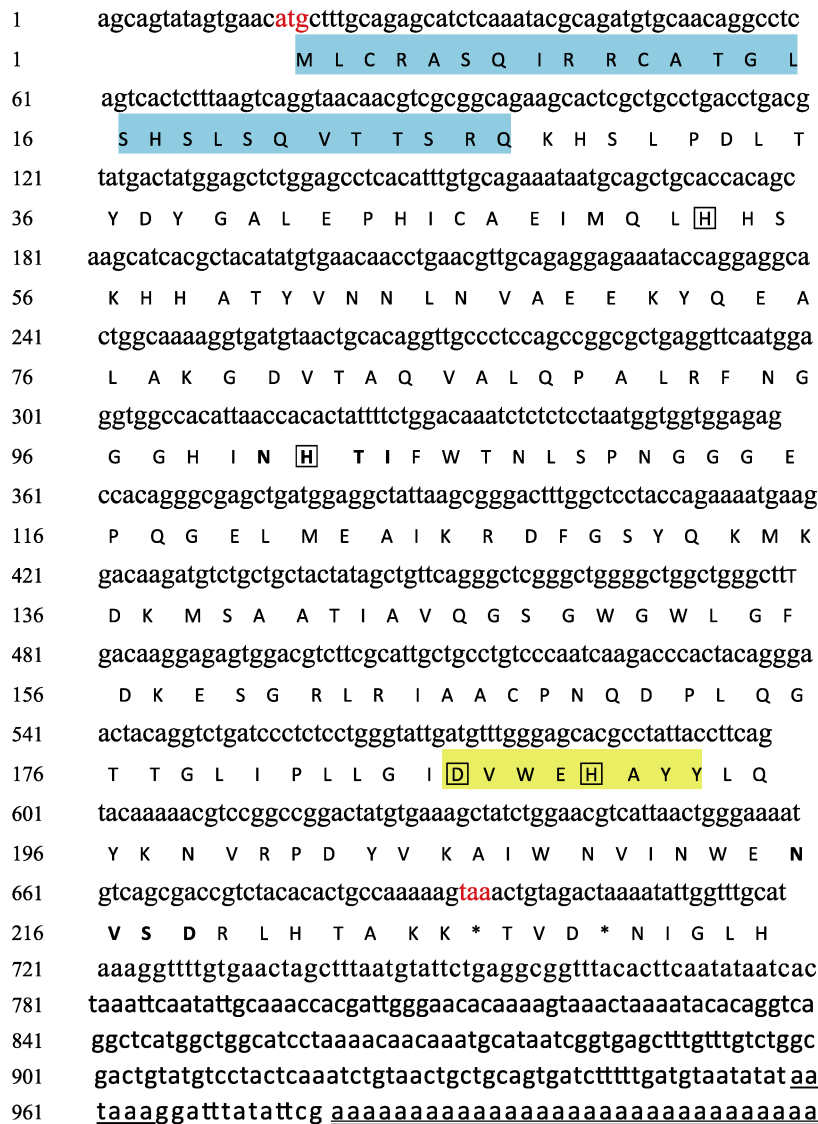


图 1 河川沙塘鳢 Mn-SOD cDNA 序列及推导的氨基酸序列
 Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *O. potamophila* Mn-SOD cDNA

推导的氨基酸序列显示在核苷酸序列下方, 为大写字母; 星号为终止密码子; 预测的 MTS 用青色高亮表示; 下划线为多聚核苷酸信号; 双下划线为 poly(A)尾巴; N-糖基化位点用粗体表示; 预测的特征片段用黄色标出; 预测的 Mn²⁺结合位点用方框框出

Translated amino acid sequence is shown under nucleotide sequence as uppercase; The stop codon was marked by an asterisk. Predicted MTS was shown in cyan highlights. Polyadenylation signal was underlined; The poly(A) signal sequence was double-underlined; Potential N-glycosylation sites were in bold; Putative family signature motifs were in yellow; Potential Mn²⁺-binding sites were boxed

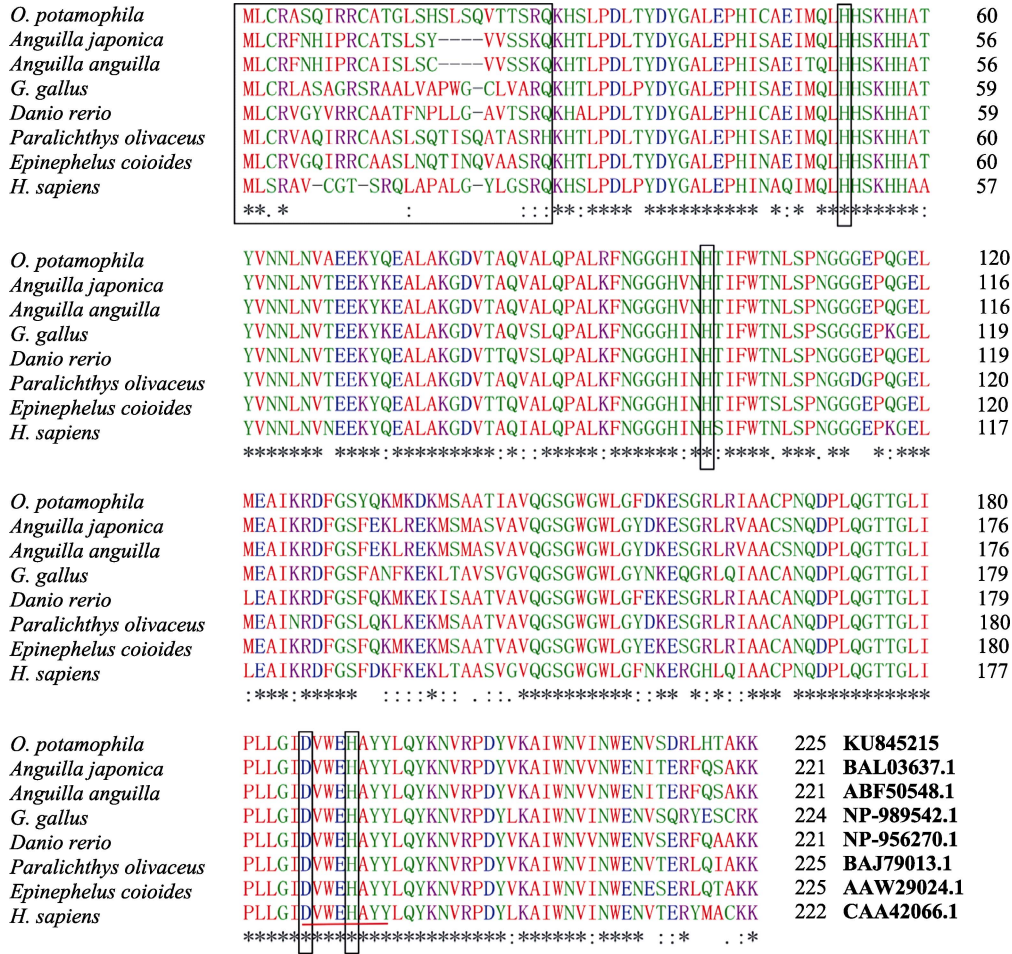


图 2 河川沙塘鳢 Mn-SOD 氨基酸序列与其他已知同源序列对比

Fig.2 Multiple alignment of *O.potamophila* Mn-SOD polypeptide sequences with other known orthologs

氨基酸序列优化对齐后的空白位置用连字符代替,用(*)和(或者:)表示氨基酸残基相同和类似。在每个序列的末端标注有 GenBank 登录号。Mn-SOD 特征序列用红色下划线标识。用方框框出 MTS 序列。预测的 Mn²⁺结合位点用矩形框出 Gaps introduced for optimal alignment were indicated with hyphens. Identical and similar aa residues were indicated by “*” and “:” respectively. GenBank accession number of each sequence were listed last. Conserved Mn-SOD family signature motifs were underlined in red. MTS were boxed. Putative Mn²⁺-binding sites were enclosed in a rectangle

的同源性最高为 90.3%,与鱼类中斑马鱼(*Barchydanio rerio var*) 同源性最低为 87.1%。

采用 MEGA 5.0 以 N-J 法构建基于 Mn-SOD 氨基酸序列的分子系统进化树(图 3)。进化树聚类结果显示,所有的脊椎动物聚为一个大的分支,无脊椎动物聚为另外的分支,植物构成一个分支。脊椎动物分支中,所有鱼类聚成一支,两栖类鸟类和哺乳类动物聚为另外的分支。这与传统的分类系统是一致的。

2.3 Mn-SOD 空间结构预测

使用同源建模网站 Swiss-model,以人类 Mn-SOD 三维结构为模板(PDB, 2adqB)与河川沙塘鳢 Mn-SOD 基因推导的氨基酸序列联配构建其三维结构,结果显示,河川沙塘鳢 Mn-SOD 有 59%的 α-螺旋,10%的

β-折叠,16%的无规则卷曲。其蛋白结构三维飘带结构图与人类的十分相似,都是 N 端 2 个反向平行螺旋和 C 端 3 个折叠片的 α+β 结构(图 4)。

2.4 河川沙塘鳢 Mn-SOD 基因的表达特征分析

qRT-PCR 结果显示, *Mn-SOD* 基因在河川沙塘鳢 8 个组织中均有表达,具有广泛分布表达的特点,其表达量由高到低依次为肌肉 > 肝 > 心 > 脑 > 眼 > 脾 > 肾。其中,在肌肉中的表达量最高,约为肾、脾、鳃组织中 *Mn-SOD* 表达量的 71.01、27.49、61.29 倍(图 5)。

河川沙塘鳢 *Mn-SOD* 基因在胚胎到仔鱼不同发育时期都有表达,表达量随着沙塘鳢发育进程呈先上升后下降的趋势,在桑椹胚时期达到最高值,极显著地高于其他发育阶段($P < 0.01$),之后才逐渐降低,并

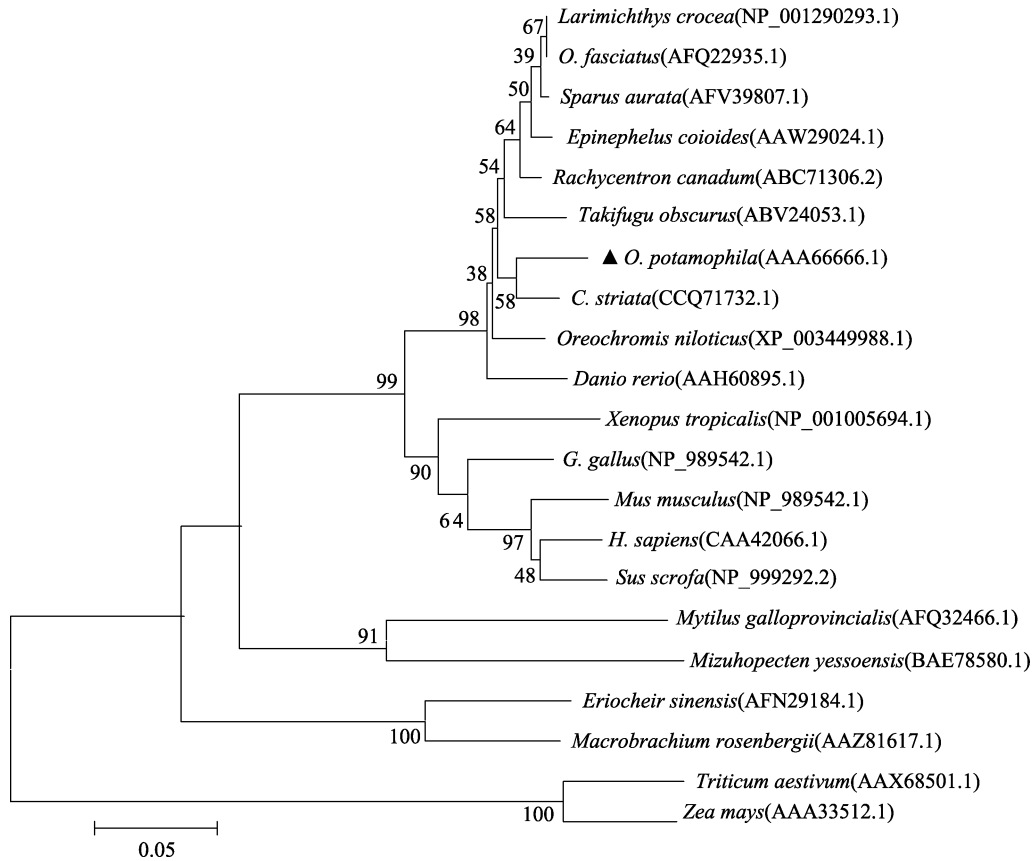


图 3 河川沙塘鳢与其他物种 *Mn-SOD* 基因的系统进化树
Fig.3 Phylogenetic tree of *Mn-SOD* gene of *O.potamophila* and other vertebrates

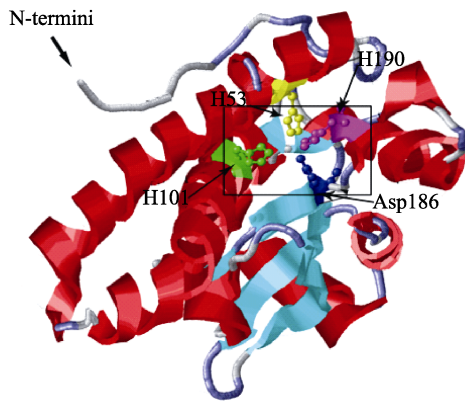


图 4 河川沙塘鳢 *Mn-SOD* 三维结构
Fig.4 Three-dimension structure of *O.potamophila* *Mn-SOD*

基于人 *Mn-SOD* (PDB, 2adqB) 预测的河川沙塘鳢 *Mn-SOD* 蛋白三维结构; α -螺旋标为红色, β -折叠标为青色; Mn^{2+} 结合位点的位置已标出

Three-dimensional structure of *O.potamophila* *Mn-SOD* based on human *MnSOD* (PDB, 2adqB); α -helices are in red and β -strands are in cyan; Ribbon diagram of *O.potamophila* *Mn-SOD* and location of Mn^{2+} ligand active sites are indicated

显著低于受精卵时期, 仔鱼孵化后表达量有上升的趋

势(图 6)。

2.5 河川沙塘鳢 *Mn-SOD* 基因在 $NaNO_2$ 胁迫下 mRNA 水平表达变化

急性 $NaNO_2$ 胁迫后, 肝组织 *Mn-SOD* 基因的 mRNA 表达呈先升高后降低的趋势。在胁迫 1 h 后, 表达水平升高, 但不显著, 在 3 h 后表达量显著升高, 并达到最高值, 之后表达量略有降低, 6–24 h 内相对稳定的保持在较高水平, 48 h 之后表达量开始持续下降, 72 h 后达到最低值(图 7)。

急性 $NaNO_2$ 胁迫后, 鳃组织内 *Mn-SOD* 基因的 mRNA 表达呈先降低后升高然后再降低的变化。其中, 0–6 h 之内的表达量持续降低, 12–48 h 之内略有上升, 在 24 h 其表达量达到最高值, 之后又开始降低, 72 h 之后达到最低值(图 8)。

3 讨论

Mn-SOD 作为催化超氧阴离子自由基发生歧化反应生成 H_2O_2 和 O_2 的酶类抗氧化剂之一, 在生命体抗氧化应激反应过程中和消除机体中活性氧对细胞的损伤中扮演了重要的角色(Whang *et al*, 2012)。本研

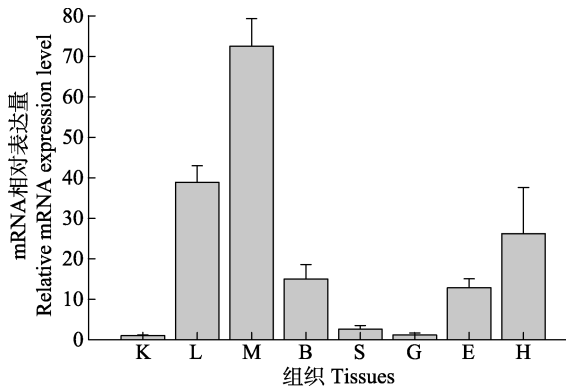


图 5 *Mn-SOD* 在健康河川沙塘鳢不同组织中的表达
Fig. 5 *Mn-SOD* gene expressions in various tissues of healthy *O. potamophila*

K、L、M、B、S、G、E 和 H 分别为肾、肝、肌肉、脑、脾、鳃、眼、心脏

K, L, M, B, S, G, E and H denoted kidney, liver, muscle, brain, spleen, gill, eye, and heart

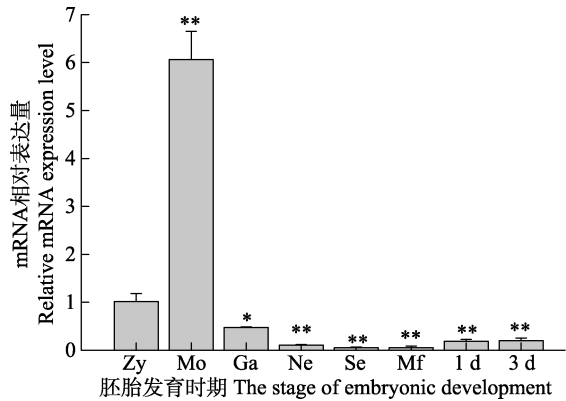


图 6 *Mn-SOD* 在河川沙塘鳢胚胎和仔鱼发育过程中的表达
Fig. 6 *Mn-SOD* gene expressions during the embryonic and larval development of *O. potamophila*

Zy、Mo、Ga、Ne、Se、Mf、1 d 和 3 d 分别为受精卵、桑椹胚、原肠胚、神经胚、体节期、口裂期、出膜后 1 d、出膜后 3 d。* 为显著性差异 ($P < 0.05$), ** 为极显著差异 ($P < 0.01$)
Zy, Mo, Ga, Ne, Se, Mf, 1 d and 3 d denoted zygote, morula, gastrula, neural, segmentation, mouth forming stage, 1 d after hatching and 3 d after hatching. * indicated significant different, ** indicated highly significant different.

究首次获得了河川沙塘鳢 *Mn-SOD* 基因 cDNA 的全长序列, ORF 区序列长度为 678 bp, 编码 225 个氨基酸。经过序列分析发现, 河川沙塘鳢 *Mn-SOD* 基因在分子进化上具有高度的保守性。尤其是保守的序列特征和保守的金属离子结合位点。通过氨基酸序列比对分析, *Mn-SOD* 的氨基酸序列与鲈形目的条石鲷和线鳢相似性高达 90.3%, 与其他哺乳类和鸟类的 *Mn-SOD* 氨基酸序列相比也表现出了高度的同源性, 进一步证实了河川沙塘鳢 *Mn-SOD* 在其序列和功能域上非常

保守。利用 *Mn-SOD* 编码氨基酸序列构建的系统树中, 沙塘鳢首先与线鳢聚为一支, 再与暗纹东方鲀 (*Takifugu obscurus*) 和军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) 聚为一支, 聚类分析产生的进化树基本上与各参考物种的分类进化地位相吻合, 由此可以在一定程度上推测河川沙塘鳢的系统进化地位。

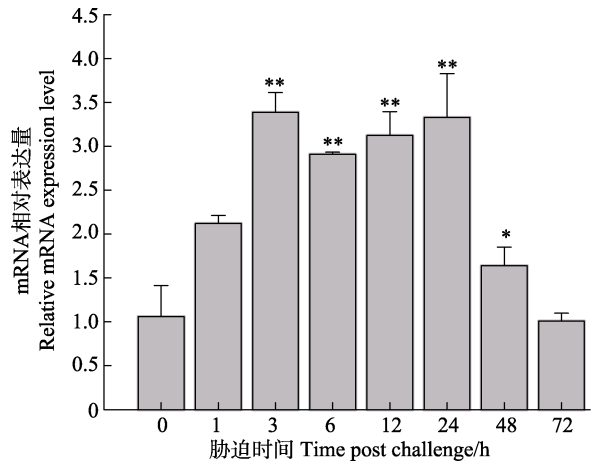


图 7 急性 NaNO_2 胁迫后 *Mn-SOD* 基因在河川沙塘鳢肝组织中的表达变化

Fig. 7 Changes of expression levels of *Mn-SOD* gene in liver of *O. potamophila* after NaNO_2 challenge

注: 图中以 β -actin 为内参基因, 柱状图显示为平均值 \pm 标准差 ($n=3$), * 为显著性差异 ($P < 0.05$), ** 为极显著差异 ($P < 0.01$), 下同

Note: *Mn-SOD* gene mRNA levels were expressed as a ratio relative to β -actin levels in the same samples after real-time PCR. The bars indicate the Mean \pm SD ($n=3$). Statistical significance was considered at * ($P < 0.05$), and ** ($P < 0.01$) when compared with that of the control, the same as below

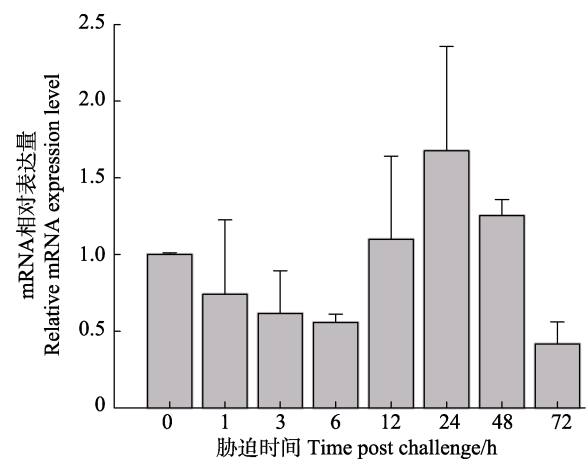


图 8 急性 NaNO_2 胁迫后 *Mn-SOD* 基因在河川沙塘鳢鳃组织中的表达变化

Fig. 8 Changes of expression levels of *Mn-SOD* gene in gill of *O. potamophila* after NaNO_2 challenge

河川沙塘鳢 Mn-SOD 基因具有广泛表达的特点(Zelko *et al*, 2002)。其中, 在肌肉、肝、心、脑、眼等组织的表达量较高, 在肾、脾、鳃中的表达量较低。张志伟(2011)¹⁾对鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)的研究表明, Mn-SOD 基因在鳃中的表达量最高; Cho 等(2009)对朝鲜鲮(*Hemibarbus mylodon*)的研究表明, Mn-SOD 基因表达量大小依次为心脏、脑、鳃、肌肉, 其表达量的差异是由氧化应激承受能力及各组织的能量需求水平决定的; Sun 等(2014)对团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)的研究结果显示, Mn-SOD 基因在肝组织中的表达量最高, 这与 Cheng 等(2006)对罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)、Zhang 等(2007)对中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的研究结果相一致, 但与本研究的结果不一致, 推测可能是因为河川沙塘鳢是一种极耐低氧的鱼类。朱永安等(2005)的研究表明, 水温为 25℃ 时, 沙塘鳢的窒息点为 0.78 mg/L。肌肉的高 SOD 表达量可能与其耐低氧的习性相适应。另外, 对河川沙塘鳢胚胎到仔鱼不同发育时期 Mn-SOD 基因的表达研究显示, 受精后的桑椹胚期表达量最高, 之后逐渐降低, 并显著低于受精卵时期。这与 Mouatassim 等(1999)、Lin 等(2009)、张志伟(2011)¹⁾的研究结果相吻合, 受精卵中 SODs 基因主要产生于卵母细胞, 而在后续的发育过程中其表达水平会逐渐降低。本研究中, Mn-SOD 基因的表达量到桑椹胚期达到最高, 之后才逐渐降低, 说明了在胚胎早期形成过程中, ROS 主要产生于细胞分裂旺盛的时期。但在细胞分化和器官形成的早期阶段胚胎的氧化应激水平相对较低。造成这种现象的另外一个原因可能是, 成熟的卵子从鱼体排入水中, 脱离了原来在母体内相对稳定的环境, 经过受精过程等的刺激, 打破了原有的 ROS 平衡, 从而使得抗氧化基因受到诱导表达(Kadomura *et al*, 2006)。本研究表明了 Mn-SOD 在沙塘鳢胚胎早期中可能扮演重要的角色。

水体中过量的 NaNO₂ 不仅会消耗水体的溶解氧, 还会进入水生生物体内造成更严重的危害。肝脏是维持生物体内环境稳态的重要器官, 鱼类的生活环境多变, 对肝脏的依赖程度更高。本研究的结果显示, 急性 NaNO₂ 胁迫可显著诱导河川沙塘鳢肝脏中的 Mn-SOD 基因的表达, 3 h 后达到最高值。随着胁迫时间的推移, 表达量开始下降, 72 h 后表达恢复到开始时的水平, 但不会造成其死亡。这与 Sun 等(2014)对团头鲂、Xian 等(2012)对斑节对虾(*Penaeus monodon*)、Jensen 等

(1990)对克氏原螯虾(*Astacus astacus*)的研究结果相似。这说明河川沙塘鳢受到 NaNO₂ 胁迫的初期, 其对细胞内稳态的扰乱导致了 ROS 的升高, 机体启动抗氧化防御机制来对抗体内 ROS 的升高。但是随着胁迫时间的延长, 体内的抗氧化平衡被打破, 解剖发现 72 h 胁迫后的河川沙塘鳢肝脏都出现了不同程度的损伤。体内器官的损坏也是 Mn-SOD 基因表达量下降的重要原因。鳃是鱼类的呼吸器官和先天免疫的重要器官, 是鱼类直接与外界接触最紧密的器官, 鳃因其对生命的重要性而被广泛的报道过(Rankin *et al*, 1982; Anderson *et al*, 1997; Lang *et al*, 1987; Smart *et al*, 1976)。河川沙塘鳢 Mn-SOD 基因在鳃中的表达趋势与肝差别很大, NaNO₂ 胁迫后先降低, 到 12 h 后表达量开始上升, 24 h 达到最高值后开始下降, 72 h 后达到最低值。在本研究中, 亚硝酸盐胁迫的初期 Mn-SOD 基因表达量就下降, 12 h 才表现出升高, 体现了鳃对环境变化的敏感性, 而肝组织 Mn-SOD 基因的表达量在 NaNO₂ 胁迫 1 h 即表现出升高。鳃和肝中 Mn-SOD 基因表达量和敏感性的不同, 可能与它们的不同生理功能有关。随着刺激时间的延长, 河川沙塘鳢 Mn-SOD 的表达量在 24 h 后又出现下降, 可能是在 NaNO₂ 长时间胁迫下, 鳃组织中较多的 ROS 超过了 Mn-SOD 清除的能力范围, 使酶蛋白受损, 细胞的新陈代谢能力下降而造成的。这与肝组织在 NaNO₂ 胁迫 24 h 后的变化趋势相一致, 体现了鳃与肝在应对 NaNO₂ 长时间胁迫下其自身代谢水平和抗氧化系统都受到了一定程度的影响, 72 h 后解剖发现河川沙塘鳢的鳃组织颜色变暗, 有出血现象。组织的损伤造成器官功能的紊乱甚至丧失, 必然会导致基因表达量的下降。

NaNO₂ 急性胁迫处理过后的河川沙塘鳢 Mn-SOD 基因在不同器官表现出不同的变化趋势, 但长时间处理后都会造成表达量的下降和鱼体的损伤, 这为以后控制河川沙塘鳢养殖水体 NaNO₂ 含量提供了理论依据。

参 考 文 献

- Anderson DP. 7-Environmental factors in fish health: Immunological aspects. *Fish Physiology*, 1997, 15: 289–310
- Bhor VM, Raghuram N, Sivakami S. Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2004, 36(1): 89–97
- Bu YQ, Lu C, Li YW, *et al*. Cloning and sequence analysis of

1) Zhang ZW. Molecular cloning and differential expression patterns of hypoxic stress related genes in Silver carp. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2011, 31–42 [张志伟. 鲢低氧应激相关基因的克隆与表达分析. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2011, 31–42]

- Manganese-containing superoxide dismutase (MnSOD) cDNA of chickens. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 17(4): 463–467 [卜友泉, 鲁成, 李英文, 等. 鸡含锰超氧化物歧化酶 cDNA 克隆及序列分析. *中国生物化学与分子生物学报*, 2001, 17(4): 463–467]
- Cheng W, Tung YH, Chiou TT, *et al.* Cloning and characterisation of mitochondrial manganese superoxide dismutase (mtMnSOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, 21(4): 453–466
- Cho YS, Lee SY, Bang IC, *et al.* Genomic organization and mRNA expression of manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) from *Hemibarbus mylodon* (Teleostei, Cypriniformes). *Fish and Shellfish Immunology*, 2009, 27(4): 571–576
- Gomez-Anduro GA, Ascencio-Valle F, Peregrino-Urriarte AB, *et al.* Cytosolic manganese superoxide dismutase genes from the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) are differentially expressed in response to lipopolysaccharides, white spot virus and during ontogeny. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry Molecular Biology*, 2012, 162(4): 120–125
- Hong ML, Chen LQ, Gu SZ, *et al.* Effects of ammonia exposure on immunity indicators of haemolymph and histological structure of hepatopancreas in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(3): 412–418 [洪美玲, 陈立侨, 顾顺樟, 等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫指标及肝胰腺组织结构的影响. *中国水产科学*, 2007, 14(3): 412–418]
- Jensen FB. Sublethal physiological changes in freshwater crayfish, *Astacus astacus*, exposed to nitrite: haemolymph and muscle tissue electrolyte status, and haemolymph acid-base balance and gas transport. *Aquatic Toxicology*, 1990, 18(1): 51–60
- Kadamura K, Nakashima T, Kurachi M, *et al.* Production of reactive oxygen species (ROS) by devil stinger (*Inimicus japonicus*) during embryogenesis. *Fish and Shellfish Immunology*, 2006, 21(2): 209–214
- Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*, 2002, 30(6): 620–650
- Kulkarni-Narla A, Getchell TV, Getchell ML. Differential expression of manganese and copper-zinc superoxide dismutases in the olfactory and vomeronasal receptor neurons of rats during ontogeny. *Journal of Comparative Neurology*, 1997, 381(1): 31–40
- Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, 2004, 5(2): 150–163
- Lang T, Peters G, Hoffmann R, *et al.* Experimental investigations on the toxicity of ammonia: Effects on ventilation frequency, growth, epidermal mucous cells, and gill structure of rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1987, 3(3): 85–109
- Li YH. Cloning and bioinformatics analysis of the full cDNA sequence of MnSOD from *Phascolosoma esculenta* bodywall. *Journal of Quanzhou Normal University*, 2012, 30(6): 38–42 [李裕红. 泉州湾可口革囊星虫 MnSOD 全长 cDNA 的克隆及其生物信息学分析. *泉州师范学院学报*, 2012, 30(6): 38–42]
- Lin CT, Tseng WC, Hsiao NW, *et al.* Characterization, molecular modelling and developmental expression of zebrafish manganese superoxide dismutase. *Fish and Shellfish Immunology*, 2009, 27(2): 318–324
- Ling M, Lai XJ, Xie K. Cloning and expression of human manganese superoxide dismutase cDNA in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, 21(3): 478–481 [凌敏, 赖祥进, 谢柯. 人 Mn-SOD cDNA 的克隆及其在巴斯德毕赤酵母中的表达. *生物工程学报*, 2005, 21(3): 478–481]
- Mollnau H, Wenzel P, Oelze M, *et al.* Mitochondrial oxidative stress and nitrate tolerance—comparison of nitroglycerin and pentaerythrityl tetranitrate in *Mn-SOD* +/- mice. *Bmc Cardiovascular Disorders*, 2006, 6(1): 44
- Mouatassim SE, Guérin P, Ménézo Y. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. *Molecular Human Reproduction*, 1999, 5(8): 720–725
- Rankin JC, Stagg RM, Bolis L. Effects of pollutants on gills. *Gills*. London: Cambridge University Press, 1982, 207–220
- Ray PD, Bo-Wen H, Yoshiaki T. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 2012, 24(5): 981–990
- Rost B, Liu JF. The predict protein server. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(3): 3300–3304
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101–1108
- Smart G. The effect of ammonia exposure on gill structure of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Fish Biology*, 1976, 8(6): 471–475
- Sun S, Zhu J, Ge X, *et al.* Identification and mRNA expression of antioxidant enzyme genes associated with the oxidative stress response in the Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) in response to acute nitrite exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2014, 159(2): 69–77
- Sun S, Zhu J, Jiang X, *et al.* Molecular cloning, tissue distribution and expression analysis of amanganese superoxide dismutase in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 38(2): 340–347
- Tang XX, Zhang PY. Effects of anthracene on activity of superoxide dismutase in *Sebastes fuscescens*. *Journal of Fisheries of China*, 2000, 24(3): 217–220 [唐学玺, 张培玉. 蒽对黑鲷超氧化物歧化酶活性的影响. *水产学报*, 2000, 24(3): 217–220]
- Whang I, Choi YC, Lee J, *et al.* A manganese superoxide dismutase (MnSOD) from *Ruditapes philippinarum*: Comparative structural- and expressional-analysis with copper/zinc superoxide dismutase (Cu/Zn SOD) and biochemical analysis of its antioxidant activities. *Fish and*

- Shellfish Immunology, 2012, 33(4): 753–765
- Wu HL, Wu XQ, Xie YH. A revision of the genus *Odontobutis* from China with description of a new species. Journal of Shanghai Fisheries University, 1993, 2(1): 52–61 [伍汉霖, 吴小清, 解玉浩. 中国沙塘鳢属鱼类的整理和一新种的叙述. 上海水产大学学报, 1993, 2(1): 52–61]
- Xian JA, Wang AL, Hao XM, *et al.* In vitro toxicity of nitrite on haemocytes of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using flow cytometric analysis. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 2012, 156(2): 75–79
- Yuan HT, Bingle CD, Kelly FJ. Differential patterns of antioxidant enzyme mRNA expression in guinea pig lung and liver during development. Biochimica et Biophysica Acta, 1996, 1305(3): 163–171
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the *CuZn-SOD* (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Free Radical Biology and Medicine, 2002, 33(3): 337–349
- Zhang Q, Li F, Wang B, *et al.* The mitochondrial manganese superoxide dismutase gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*: Cloning, distribution and expression. Developmental and Comparative Immunology, 2007, 31(5): 429–440
- Zhang WL, Wei LQ, Wang LS, *et al.* Oxidative damage of active oxygen on biomacromolecules. Journal of Henan Normal University (Natural Science), 2000, 28(4): 69–71 [张文玲, 魏丽勤, 王林嵩, 等. 活性氧对生物大分子的氧化性损伤. 河南师范大学学报(自然科学版), 2000, 28(4): 69–71]
- Zhu YA, Wang NM, Yang DX. The measurement of oxygen consumption rate and choke point in *Odontobutis potamophila*. Inland Fisheries, 2005, 30(9): 35–366 [朱永安, 王南明, 杨德先. 沙塘鳢耗氧率与窒息点的测定. 内陆水产, 2005, 30(9): 35–36]

(编辑 陈严)

Cloning and Expression Analysis of *Mn-SOD* Gene of *Odontobutis potamophila*

ZHANG Hongye¹, YU Xingda¹, WANG Peipei¹, JIA Xiuqi¹, LI Xinru¹, CAO Quanquan¹,
YIN Shaowu¹*, CHEN Shuqiao², ZHOU Gouqin²

(1. College of Life Sciences, Key Laboratory of Biodiversity and Biotechnology of Jiangsu Province, Nanjing Normal University, Nanjing 210023; 2. Institute of Fisheries Science of Nanjing city, Nanjing 210036)

Abstract Superoxide dismutase (SOD), the first barrier of antioxidation, protects cells through the removal of excessive superoxide. However, little is known about the function of *SOD* genes in *Odontobutis potamophila*. In the present study, the rapid amplification of cDNA ends (RACE) approach and quantitative real-time PCR were used to clone the full-length cDNA of *Mn-SOD* and analyze its expression patterns. The full length of cDNA *Mn-SOD* was 1008 bp, including an open reading frame (ORF) of 678 bp, a 5'-untranslated regions (UTR) of 15 bp and a 3'UTR of 315 bp. Each 3'UTR possessed a polyadenylation signal sequences of AATAAA and a poly A tail of 31 bp, a phenomenon that vertebrate usually has. It was speculated that the sequence encoded 225 amino acids. The *Mn-SOD* genes contains two conserved domains: the Sod_Fe_N (28-109) and Sod_Fe_C (116-219). The structure was similar with other species, which showed that the gene was conserved in the evolution. The homologous comparison with other species revealed that the Mn-SOD had the highest sequence identity with *Oplegnathus fasciatus* and *Channa striata*, about 90.3 %. Quantitative real-time PCR was used to quantify the tissue-specific expression of *Mn-SOD* gene. Predominant expression of *Mn-SOD* was detected in muscle. Different developmental stages from embryo to larva had *Mn-SOD* gene expressed. Morula stage had the highest expression level. In addition, the expression levels of *Mn-SOD* mRNA in liver increased initially and then declined after the exposure of NaNO₂. In gill, the mRNA expression levels of *Mn-SOD* fluctuated significantly. The findings of this study suggested that the *Mn-SOD* may play an important role in defending oxidative stress and cellular damage induced by nitrite, by detoxifying harmful reactive oxygen. Our study provides valuable reference to optimize the artificial breeding and rearing conditions of *O. potamophila*.

Key words *Odontobutis potamophila*; *Mn-SOD* gene; Gene cloning; mRNA expression level

① Corresponding author: YIN Shaowu, E-mail: yinshaowu@163.com