



文章编号: 1000-4025(2013)11-2147-06

小麦 Fe 超氧歧化酶基因的原核表达分析

李娟¹, 王泽文², 杨利新², 郑文寅³, 武立权³, 王荣富^{1*}

(1 安徽农业大学 生物技术中心, 合肥 230036; 2 安徽农业大学 生命科学学院, 合肥 230036; 3 安徽农业大学 农学院, 合肥 230036)

摘要: 采用 RT-PCR 技术分离小麦 Fe 超氧歧化酶基因 (FeSOD) 的 ORF 全长 cDNA, 然后构建其原核表达载体, 并对其表达的诱导时间、IPTG 浓度、温度进行优化, 以期获得较大量的重组蛋白。结果表明: 实验获得了小麦 FeSOD 基因的 ORF 全长 (600 bp), ORF 全长与原核表达载体 pET-Duet1 相连接构建了原核表达载体 pET-FeSOD, 将 pET-FeSOD 导入宿主菌 Rosetta(DE3) 中, 经 SDS-PAGE 电泳结果显示, 可以高效表达融合蛋白且表达的蛋白均主要以包涵体的形式存在; 重组质粒表达出 25.8 kD 的融合蛋白, 除去载体 pET-Duet1 自身表达的 3.0 kD 蛋白后, 与 FeSOD 编码的约为 22.8 kD 蛋白的大小一致; 对诱导表达条件的优化结果显示, 融合蛋白 pET-FeSOD 最佳的诱导表达条件为: 0.5 mmol/L 的 IPTG 浓度, 37 °C 诱导 5 h。该研究结果为进一步深入研究该基因的特性与功能奠定了基础。

关键词: 小麦; Fe 超氧歧化酶基因; 原核表达

中图分类号: Q786 **文献标志码:** A

Expression of Wheat Fe Superoxide Dismutase (FeSOD) Gene in Prokaryotic Cell

LI Juan¹, WANG Zewen², YANG Lixin², ZHENG Wenyin³, WU Liquan³, WANG Rongfu^{1*}

(1 Biotechnology Center, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2 College of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 3 College of Agronomy, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: In order to construct prokaryotic expression vector and to study the recombinant gene expression in the host bacteria, we cloned complete gene of *Triticum aestivum* FeSOD ORF by the RT-PCR method followed by restriction enzymes cutting and connection. The induced time, IPTG concentration and temperature of prokaryotic expression were optimized using SDS-PAGE. The results showed that the full-length cDNA sequence of *T. aestivum* FeSOD ORF (600 bp) was cloned, then a recombinant of prokaryotic expression vector pET-SOD was constructed successfully. FeSOD protein in inclusion body can express effectively after the expression vector pET-FeSOD was transformed to Rosetta (DE3). The SDS-PAGE results indicated that pET-FeSOD fusion protein was expressed with molecular weight of 25.8 kD, with the pET-Duet1's own induction produced 3.0 kD protein. The result is consistent with the 22.8 kD protein which encoded by FeSOD gene. The optimal expression condition was set as 0.5 mmol/L IPTG, induced temperature 37 °C, and induced time 5 hours. These results are expected to lay a foundation for further studies on the properties and function of this gene.

Key words: *Triticum aestivum*; Fe superoxide dismutase (FeSOD) gene; prokaryotic expression

收稿日期: 2013-06-26; 修改稿收到日期: 2013-09-03

基金项目: 安徽省高等学校省级自然科学基金项目 (KJ2012Z105)

作者简介: 李娟 (1977-), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: lj_welcome_ok@126.com

* 通信作者: 王荣富, 博士, 教授, 主要从事生理生态研究。E-mail: rfwang@ahau.edu.cn

超氧化物歧化酶(SOD)是生物体内一种重要的抗氧化酶,对于清除活性氧自由基(ROS),防止活性氧自由基破坏细胞的组成、结构和功能,保护细胞免受氧化损伤具有十分重要的作用,对生物体防御毒性起着关键作用^[1-2]。根据酶活性中心的辅基部位结合的金属离子的不同,SOD通常分为Cu/ZnSOD、FeSOD和MnSOD等3种类型^[3]。此外,还发现存在NiSOD和Fe/ZnSOD^[4]。进化上FeSOD属于一类古老的SOD,因为在厌氧古细菌中只存在这一种同工酶^[5-6]。在真核生物中,动物和真菌一般不含FeSOD,而在一些植物叶绿体中含有^[7]。FeSOD有很广泛的应用价值,国内对FeSOD的研究长期以来侧重于从动植物细胞中提取、纯化和检测方法的改进,而从分子水平上对FeSOD的研究不多。最近几年对FeSOD的研究才逐渐深入^[8-10]。研究人员陆续从拟南芥、大豆、番茄、银杏、马铃薯、烟草等植物中获得FeSOD基因全序列并对其进行表达分析^[11-13],并成功地将FeSOD导入玉米叶绿体中,使玉米对冷害和盐胁迫的耐受性显著提高^[14],但有关小麦FeSOD分子水平上的研究较少。我们从小麦中克隆了小麦FeSOD基因全长序列,本试验在对该基因蛋白生物信息学分析的基础上,构建了pET-FeSOD原核表达载体,并成功地在宿主菌Rosetta(DE3)中诱导表达,这为小麦FeSOD蛋白的进一步分离纯化以及结构和功能研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

小麦‘烟农19号’种子由安徽农业大学农学院种子实验室提供。将小麦种子用0.1%氯化汞消毒10 min后,播种于铺有滤纸的培养皿中,光照培养箱中培养,三叶期时,取新鲜嫩叶液氮速冻待用。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 根据GenBank中提交的FeSOD(登录号JX398977)序列,在开放阅读框(ORF)两端分别设计引物P₁(5'-CGCGGATC-CGATGAGCAGGCGGGCGGTG-3',下划线为BamH I酶切位点)和P₂(5'-ATAAGAATGCG-GCCGCTCATGCCACTGGGATAGTTG-3',下划线为Not I酶切位点)。鉴定阳性克隆的通用引物为DuetF1(GATGCGTCCGGCGTAGAG)和DuetR1(GATTATGCGCCGTGTACAAT)。

1.2.2 总RNA提取及PCR产物回收与转化 取约2 g小麦新鲜嫩叶,提取总RNA。小麦总RNA

提取采用RNAiso Plus试剂盒(TaKaRa生物公司),具体操作参照说明书进行。cDNA第一链合成利用PrimeScript™ Reverse Transcriptase试剂盒(TaKaRa生物公司)并参考其使用说明进行操作。以合成的cDNA第一链为模板,用高保真酶PrimeSTAR Max DNA Polymerase(TaKaRa生物公司)进行PCR扩增,扩增程序为:98℃预变性1 min,98℃变性10 s,63℃退火5 s,72℃延伸20 s,共30个循环,72℃下延伸2 min。扩增产物采用1.2%琼脂糖电泳检测,凝胶电泳回收纯化PCR产物。

1.2.3 编码蛋白的理化性质分析与结构预测 利用生物信息学数据库(NCBI)和因特网上软件(Protparam、SMARTER和Predict protein)对FeSOD基因进行分析。用Protparam分析FeSOD基因编码蛋白的氨基酸序列组成、相对分子质量、等电点等理化性质;用SMARTER分析FeSOD基因编码蛋白的氨基酸序列的保守结构域;用Predict protein预测FeSOD基因编码蛋白的二级结构。

1.2.4 原核表达载体的构建 用Not I、BamH I分别双酶切FeSOD基因和表达载体pET-Duet1(TaKaRa生物公司),1%琼脂糖凝胶电泳回收、连接,获得重组质粒,并转化至大肠杆菌DH5a感受态细胞,挑取阳性菌落,进行PCR检测鉴定,同时抽提质粒,酶切鉴定插入预期大小外源基因的转化子,并送往Invitrogen测序,确保重组表达载体的正确性。

1.2.5 pET-FeSOD融合蛋白的诱导表达 测序正确的pET-FeSOD重组质粒转化至Rosetta(DE3)(TIANGEN生物公司)感受态细胞,37℃培养16~18 h,挑取单菌落经PCR鉴定得到pET-FeSOD原核表达工程菌,将其接种于5 mL LB液体培养基(含Amp 50 mg/L)中,37℃培养至OD₆₀₀为0.6左右,将其在冰上静置10 min,分别进行以下实验:(1)分别添加IPTG至终浓度为0.1、0.2、0.4、0.6、0.8和1.0 mmol/L,37℃,200 r/min,5 h诱导表达,分别取菌液进行SDS-PAGE电泳检测。(2)添加IPTG至终浓度为0.5 mmol/L,分别于25℃、30℃和37℃,200 r/min,诱导表达5 h,分别取菌液进行SDS-PAGE电泳检测。(3)添加IPTG至终浓度为0.5 mmol/L,37℃,200 r/min,分别诱导表达2、3、4和5 h,分别取菌液进行SDS-PAGE电泳检测。同时设计未加IPTG诱导pET-FeSOD原核表达工程菌、加IPTG诱导的含空载体pET-Duet1工程菌为对照。

1.2.6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测表达产物 各取5.0 mL菌液,12 000 r/min离心1 min,弃上

清液,加入 1 mL 20 mmol/L 的 Tris-HCl,超声破碎(超声功率 400 W,每次处理 3 s,间隔 3 s,共处理 99 次),然后 12 000 r/min,4 °C 离心 20 min。分别取上清和沉淀进行 15% SDS-PAGE 电泳检测,考马斯亮蓝 R-250 染色,脱色液脱色,观察分析结果。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取及 FeSOD 基因 PCR 扩增

按照 TaKaRa 的 RNAsiso Plus 试剂盒说明书提取小麦‘烟农 19 号’幼苗总 RNA,用 1.2% 的琼脂糖凝胶检测。结果表明,RNA 样品呈现 3 条带,分别为 28S、18S 和 5S,其中 28S 条带亮度比 18S 条带要亮(图 1),用核酸测定仪检测 $OD_{260/280}$ 和 $OD_{260/230}$ 比值均在 1.8~2.0 之间,表明 RNA 样品质量和完整性较好,可以用于下一步 cDNA 的合成。总 RNA 样品通过反转录合成单链 cDNA,以 cDNA 为模板, P_1 和 P_2 为引物,用高保真酶扩增出小麦 FeSOD 基因的 ORF(约 600 bp),扩增出的条带与预期一致,且条带清晰(图 2),特异性较好,切胶回收纯化。

2.2 FeSOD 基因编码蛋白的理化性质分析与结构预测

Protparam 预测 FeSOD 基因蛋白的相对分子质量为 22.8 kD,分子式为 $C_{1039}H_{1555}N_{281}O_{295}S_5$,等电点(pI)为 5.43,组成相对较多(超过 10%)的氨基酸为 Leu (21 个),占 10.7%,其余的都小于 9%,没有 Pyl 和 Sec;总的带负电荷残基(Asp+Glu)为 27 个,总的正电荷残基(Arg+Lys)为 18 个;不稳定系数为 43.02,属于不稳定蛋白。SMARTER 预测 FeSOD 基因编码蛋白的氨基酸序列具有 FeSOD 酶家族保守结构域 Sod_Fe_N 和 Sod_Fe_C。利用网络在线预测软件 Predicted Protein 预测编码蛋白的二级结构,显示出在整个蛋白中,螺旋占到 54.3%、

直链占到 9.1%、环占 36.5%,其中 α -螺旋中螺旋大于 45%,直链小于 5%; β -螺旋中螺旋小于 5%,直链大于 45%。小麦 FeSOD 基因编码蛋白的二级结构含有较高级别的 α -螺旋,而 β -折叠较少。

2.3 原核表达载体的构建与鉴定

将目的片段和空载体质粒 pET-Duet1 分别用 Not I 和 BamH I 双酶切(图 3, A、B 泳道)后相连,并将重组质粒 pET-FeSOD 转化至 DH5a 感受态细胞,氨苄青霉素筛选阳性克隆,抽提质粒后经酶切鉴定,目的基因片段长约 600 bp,线状 pET-Duet1 长约 5.7 kb,重组质粒酶切产物分别在 600 bp 和 5.7 kb 处出现条带。酶切鉴定正确的重组质粒经 Invitrogen 公司测序,测序结果分析显示,克隆插入的外源基因序列与预期片段序列一致。将重组质粒 pET-FeSOD 转化入宿主菌 Rosetta(DE3)中,随机挑选 2 个菌斑,用通用引物 DuetF1 和 DuetR1 进行菌液 PCR,经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,PCR 产物条带大小均约为 600 bp(图 3, C 泳道),并抽提质粒后经酶切鉴定(图 3, D 泳道),目的基因片段长约 600 bp,说明重组质粒 pET-FeSOD 已成功转入了原核表达菌株中,获得了 pET-FeSOD 工程菌株。

2.4 FeSOD 基因重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

含有 FeSOD 的重组质粒转入表达菌株 Rosetta(DE3)后经 IPTG 诱导,然后进行 SDS-PAGE,与未被 IPTG 诱导的重组菌及含 pET-FeSOD 空载体对照菌株进行比较,经不同浓度(0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mmol/L)IPTG 处理,在 37 °C 条件下,诱导 5 h 时,样品在 25.8 kD 处出现一条新生蛋白质条带,除去载体自身表达的 3 kD 蛋白,结果与预期目的蛋白(22.8 kD)大小一致。未诱导的重组菌有微量的表达,而空载体对照没有此蛋白的表达。从超声破碎上清和沉淀的蛋白质电泳图可以看出,目

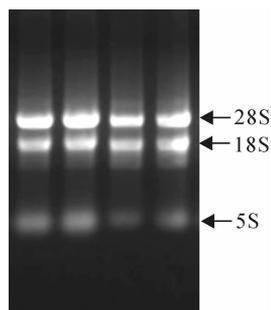


图 1 总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA

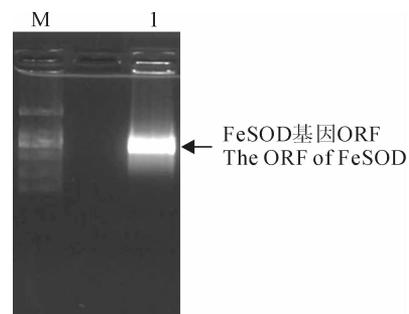


图 2 FeSOD 基因 ORF 琼脂糖凝胶电泳

M. Marker; 1. FeSOD 基因 ORF 全长

Fig. 2 Agarose gel-electrophoresis of FeSOD gene's ORF

M. Marker; 1. The full length of FeSOD gene's ORF

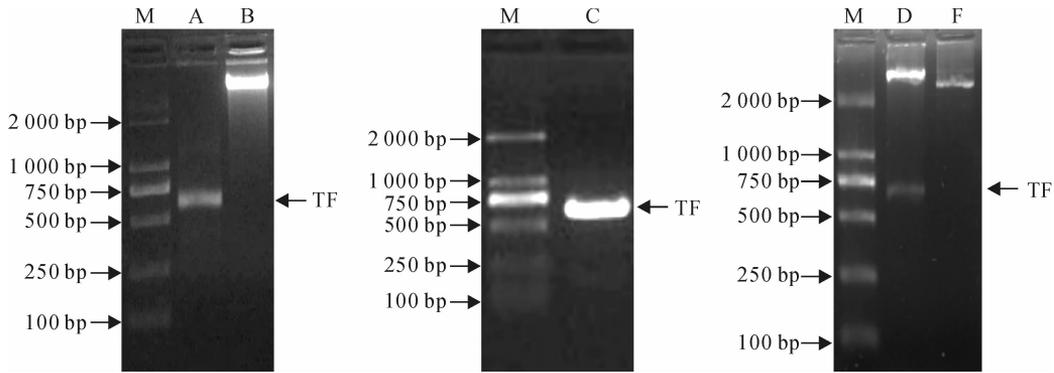


图 3 重组质粒 pET-FeSOD 的酶切鉴定

M. DL2000; A. 目的基因的双酶切; B. pET-Duet1 的双酶切; C. pET-FeSOD 重组质粒 PCR 产物; D. pET-FeSOD 重组质粒酶切产物; F. 未酶切的 pET-Duet1 载体; TF. 目的片段

Fig. 3 Restriction digestion recombinant plasmid pET-FeSOD

M. DL2000 marker; A. Digested FeSOD; B. pET-Duet1; C. The PCR result of pET-FeSOD; D. Digested pET-FeSOD; F. Undigested pET-Duet1; TF. Target fragment

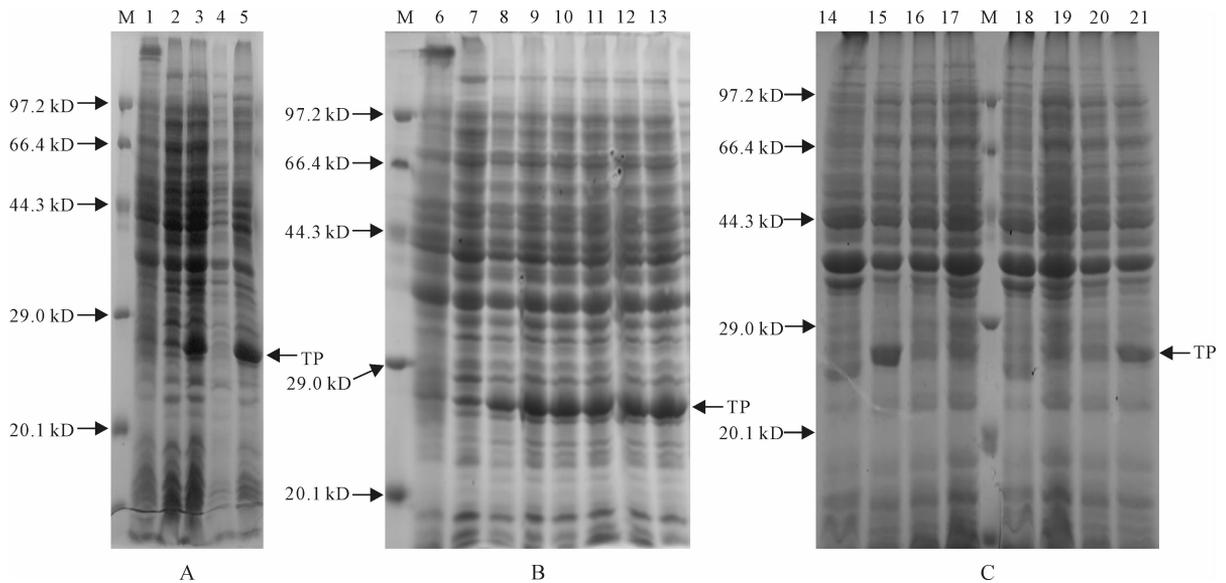


图 4 重组表达质粒 pET-FeSOD 表达产物 SDS-PAGE 电泳图

M. 蛋白质标准分子量; 1, 6. pET-Duet1 空载体表达产物; 2, 7, 14. pET-FeSOD 未诱导表达产物; 3. pET-FeSOD 诱导表达产物; 4. 诱导表达产物超声裂解上清; 5. 诱导表达产物超声裂解沉淀; 8~13. 37 °C 条件下 IPTG 浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mmol/L 下诱导 pET-FeSOD 5 h 表达产物; 15~17. pET-FeSOD 经 0.5 mmol/L IPTG 分别在 37 °C、30 °C、25 °C 诱导 5 h 的表达产物; 18~21. pET-FeSOD 经 0.5 mmol/L IPTG 在 37 °C 分别诱导 2 h、3 h、4 h、5 h 的表达产物; TP. 目的蛋白

Fig. 4 SDS-PAGE electrophoresis analysis for the expression product of recombinant plasmid pET-FeSOD

M. Protein molecular weight standards; 1, 6. Expression product of empty vector of pET-Duet1; 2, 7, 14. Uninduced expression product of pET-FeSOD; 3. Induced expression product of pET-FeSOD; 4. Bacterial sonicated supernatant of induced expression product; 5. Bacterial sonicated precipitate of induced expression product; 8~13. Expression product of pET-FeSOD induced by different IPTG concentration (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 mmol/L) under 37 °C, 5 h; 15~17. Expression product of pET-FeSOD induced by 0.5 mmol/L IPTG under different temperature (37 °C, 30 °C, 25 °C), 5 h; 18~21. Expression product of pET-FeSOD induced by 0.5 mmol/L IPTG under 37 °C, with different induce time (2 h, 3 h, 4 h, 5 h); TP. Target protein

的蛋白主要存在于包涵体中(图 4, A)。在 37 °C, 诱导 5 h 条件下, 当 IPTG 浓度达到 0.2 mmol/L 的时候, 蛋白就开始得到明显的表达, 蛋白的最佳 IPTG 表达浓度在 0.4~0.6 mmol/L 之间; 当 IPTG 浓度

大于 0.6 mmol/L 后, 蛋白并没有增加, 反而有所下降(图 4, B)。IPTG 浓度为 0.5 mmol/L 的条件下, 分别对诱导的温度和时间的优化实验结果表明, 诱导温度为 37 °C 和诱导时间为 5 h 时, 蛋白的表达量

最高(图 4,C)。因此,融合蛋白 pET-FeSOD 最佳的诱导表达条件为:0.5 mmol/L IPTG 浓度下,于 37 °C 诱导 5 h。

3 讨 论

FeSOD 蛋白是一种重要的抗氧化酶,能清除体内的自由基。在植物方面,可以提高植物的抗逆性;在动物方面,可以延缓衰老,抑制肿瘤的产生。国内对 FeSOD 的研究长期以来侧重于从动植物细胞中提取、纯化和检测方法的改进,而从分子水平上对 FeSOD 的研究不多。最近几年对 FeSOD 的研究才逐渐深入。原核表达系统具有产量高、易操作、稳定性好、经济实惠等优点,为研究 FeSOD 蛋白的表达和功能提供了一条有效的途径^[15-17]。高健等^[18]以特异种质烟草 HZNH 的 FeSOD 基因为基础,构建了原核表达载体 pQE-30/FeSOD,在宿主菌 M15 中经 IPTG 诱导成功地得到了表达。

表达载体和宿主菌株的选择是原核表达实验的成功与否的前提条件^[19]。本实验利用原核表达载体 pET-Duet1 带有编码 6 个组氨酸(HIS)的编码序列,能够与目的基因融合表达,有利于目的蛋白的纯化、检测和鉴定。它还具有 T7 启动子,强大的 T7 启动子完全专一受控于 T7 RNA 聚合酶,而高活性的 T7 RNA 聚合酶合成 mRNA 的速度比大肠杆菌 RNA 聚合酶快 5 倍,当二者同时存在时,宿主本身基因的转录竞争不过 T7 表达系统,几乎所有的细胞资源都用于表达目的蛋白;而在诱导表达后仅几个小时目的蛋白通常可以占到细胞总蛋白的 50% 以上,具有很高的表达效率。同时,Rosetta 宿主菌通过一个相容性氯霉素抗性质粒补充密码子 AUA、AGG、AGA、CUA、CCC 和 GGA 的 tRNAs,从而提供了“万能”的翻译,避免因大肠杆菌密码子使用频率导致的表达限制,提高外源基因,尤其是真核基因在原核系统中的表达水平。

在诱导调控型原核表达系统中,IPTG 的浓度、诱导温度和时间对表达效果影响很大,因此,本研究分别做了 IPTG 浓度梯度和时间梯度实验,发现 IPTG 的终浓度为 0.5 mmol/L,37 °C 诱导 5 h 表达效果最好。过低的 IPTG 浓度(终浓度小于 0.1

mmol/L)下,蛋白表达量不高。过高的 IPTG 浓度(终浓度大于 1.0 mmol/L)会对宿主菌有毒害作用,短时间内,高 IPTG 浓度诱导蛋白得到大量表达,但超过一定时间,蛋白表达量急速下降。原核表达的蛋白分为两部分,超声后上清中的可溶性蛋白和超声后沉淀中的包涵体。上清中的可溶性蛋白一般与天然的蛋白分子结构相同,因此常常具有天然蛋白的生物学活性;包涵体的形成往往比较复杂,可能是由于诱导表达产率过高,使表达的产物难以水解,从而使高浓度的表达蛋白形成多聚体,经过折叠形成包涵体,其他因素,如 PH 值、诱导温度、蛋白质自身的化学作用等因素都是包涵体形成的可能原因。有研究结果表明^[20]较高的诱导温度会使原核表达的目的蛋白多以包涵体的形式存在,使用较低的温度(20 °C)诱导,可以抑制包涵体的形成,使得重组蛋白多以可溶性蛋白形式存在。本实验中表达的蛋白主要存在在包涵体中,为了能让重组蛋白以可溶性的形式存在,我们对诱导表达的温度进行了优化,但是发现较低的温度下该蛋白表达量很低,37 °C 时的表达量要明显的增大,可能是由于表达系统以及物种等因素的影响导致与前人的实验结果不同。包涵体形式存在的蛋白限制了进一步对其催化特性的研究^[15],但可以利用尿素变性使其恢复天然蛋白分子的构象,再进行下一步的纯化和分析。

本实验根据已经获得的小麦 FeSOD 基因全长,设计引物扩增得到了小麦 FeSOD 基因的 ORF,并通过生物信息学数据库和因特网上软件对 FeSOD 基因编码蛋白的理化性质和结构进行分析发现,其 α -螺旋结构所占比例远远大于其 β -折叠结构,并具有 FeSOD 酶家族保守结构域 Sod_Fe_N 和 Sod_Fe_C。并利用 Pet-Duet1 原核表达系统,构建了原核表达重组载体 pET-FeSOD,并在 Rosetta 宿主菌中成功诱导表达出 22.8 kD 的目的蛋白。通过对诱导表达条件的优化,发现 0.5 mmol/L 的 IPTG 浓度,37 °C 诱导 5 h 为融合蛋白 pET-FeSOD 最佳的诱导表达条件。下一步要进行的是对原核表达的 pET-FeSOD 蛋白进行纯化和分离,为深入探讨 FeSOD 功能和作用途径提供可能。

参考文献:

- [1] 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): 1 043—1 059.
- [2] TIAN CH M(田春美), ZHONG Q P(钟秋平). Advance in current research of superoxide dismutase[J]. *China Tropical Medicine*(中国热带医学), 2005, **5**(8): 1 730—1 732(in Chinese).
- [3] MA X J(马旭俊), ZHU D H(朱大海). Functional roles of the plant superoxide dismutase[J]. *Heredity*(遗传), 2003, **25**(2): 225—231(in Chinese).
- [4] EUN-JA KIM, HYOUNG-PYO KIM, YUNG CHIL HAH, *et al.* Differential expression of superoxide dismutase containing Ni and Fe/Zn in streptomyces coelicolor[J]. *Eur. J. Biocheml.*, 1996, (241): 178—185.
- [5] BANNISTER J V, BANNISTER W H, ROTILIO G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1987, **22**(2): 111—180.
- [6] ALSCHER R G, ERTURK N, HEATH L S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, **53**(372): 1 331—1 341.
- [7] BOWLER C, VAN CAMP W, VAN MONTAGU M, *et al.* Superoxide dismutase in plants[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1994, **13**(3): 199—218.
- [8] YANG Y Y(杨鸯鸯), LI Y(李云), DING Y(丁勇), *et al.* Cloning of Cu/Zn-superoxide dismutase of *Brassica napus* and its induced expression by *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报), 2009, **35**(1): 71—78(in Chinese).
- [9] CANINI A, ALBERTANO P, CAIOLA M G. Localization of Fe-containing superoxide dismutase in cyanobacteria from the Baltic Sea: depth and light dependency[J]. *New Phytologist*, 1998, **139**(2): 247—254.
- [10] LI L L(李琳玲), CHENG H(程华), XU F(许锋), *et al.* Molecular cloning, characterization and expression of iron superoxide dismutase gene from *Ginkgo biloba*[J]. *Journal of Fruit Science*(果树学报), 2009, **26**(6): 840—846(in Chinese).
- [11] TSANG E W, BOWLER C, HÉROUART D, *et al.* Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress[J]. *The Plant Cell Online*, 1991, **3**(8): 783—792.
- [12] CROWELL D N, AMASINO R M. Nucleotide sequence of an iron superoxide dismutase complementary DNA from soybean[J]. *Plant Physiology*, 1991, **96**(4): 1 393.
- [13] REJEB I B, LENNE C, LEBLANC N, *et al.* Iron-superoxide dismutase and monodehydroascorbate reductase transcripts accumulate in response to internode rubbing in tomato[J]. *Comptes Rendus Biologies*, 2004, **327**(7): 679—686.
- [14] VAN CAMP W, CAPIAU K, VAN MONTAGU M, *et al.* Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts[J]. *Plant Physiology*, 1996, **112**(4): 1 703—1 714.
- [15] ESPOSITO D, CHATTERJEE D K. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, **17**(4): 353—358.
- [16] WAUGH D S. Making the most of affinity tags[J]. *TRENDS in Biotechnology*, 2005, **23**(6): 316—320.
- [17] MA CH Y(马成英), LÜ H P(吕海鹏), LIN ZH(林智), *et al.* Cloning and prokaryotic expression of flavonoid O-methyltransferase from *Camellia sinensis*[J]. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 2013, **46**(2): 325—333(in Chinese).
- [18] 高健. 特异种质烟草全长 cDNA 文库构建及 FeSOD 基因的克隆与表达[D]. 南京: 南京师范大学, 2004.
- [19] LIU Y(刘莹), DING Y(丁燊), JIAN J CH(简纪常), *et al.* Prokaryotic expression and its conditional optimization of glutathione reductase gene of antarctic *Chlamydomonas* sp. ICE-L[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*(海洋与湖沼), 2011, **42**(6): 817—821(in Chinese).
- [20] WANG R(王瑞), SHEN W B(沈维冰), JIANG L(姜丽娜), *et al.* Analysis of lipoxygenase isozymes activity and expression level of rice seeds in developing and germinating stage[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*(南京农业大学学报), 2008, **31**(1): 1—5(in Chinese).