

仿刺参超氧化物歧化酶基因 cDNA 全序列的克隆及其特征分析

田 焱 马增艳 常亚青*

(大连海洋大学 农业部海洋水产增养殖学重点开放实验室, 116023)

摘 要 以仿刺参 *Apostichopus japonicus* 为材料, 利用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 方法首次得到仿刺参 MnSOD 的全长 cDNA。该全长 cDNA 大小为 955bp, 其中 5' 端非编码区 67 bp, 3' 端非编码区 216 bp, 开放阅读框 (ORF) 672bp, 在 3' 端有多聚腺苷酸信号序列 ATTTA, 并有 polyA 加尾, 符合有效翻译的基因全长 cDNA 的特征。MnSOD 全长 cDNA 可编码 223 个氨基酸的前体蛋白, 预测蛋白分子质量为 24.64kD, 理论等电点是 6.66, 为亲水性蛋白。该蛋白序列没有信号肽和跨膜结构, 仅有一段线粒体导肽。其二级结构主要以 α -螺旋为主, 无规则卷曲和延伸链构成了蛋白中量最大的结构元件, 不含 β -折叠。仿刺参 SOD 的氨基酸序列与目前已报道的其他物种如人、牛、斑马鱼、原鸡、非洲爪蟾、中国对虾、皱纹盘鲍、海湾扇贝、果蝇等的 MnSOD 氨基酸序列进行序列比对的结果表明, 相似性均在 61%~69% 之间, 说明该基因在各物种间具有一定的保守性。该段氨基酸序列无 N-糖基化位点, 含有 3 个蛋白激酶 C 磷酸化位点, 1 个酪氨酸蛋白激酶 II 磷酸化位点, 5 个肉豆蔻酰基化位点, 还发现了 1 个 SOD 家族的特征肽段 DVWEHAYY。对磷酸化位点分析发现, 有 1 个丝氨酸 Ser, 3 个苏氨酸 Tyr 可能成为蛋白激酶磷酸化位点。二硫键分析表明, SOD 含有 3 个半胱氨酸 Cys, 形成 1 个二硫键, 连接着第 17 位和第 107 位的 Cys。仿刺参 MnSOD 全长 cDNA 的克隆为更好地理解生物体内防御系统的催化 $O_2^{\cdot-}$ 发生歧化反应、消除活性氧、维持机体活性氧代谢的平衡提供了理论基础。

关键词 仿刺参 MnSOD 基因克隆 序列分析

中图分类号 S968.9 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2011)05-0097-11

Cloning and sequence analysis of superoxide dismutase gene in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka)

TIAN Yi MA Zeng-yan CHANG Ya-qing*

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Agriculture, Dalian Ocean University, 116023)

ABSTRACT One unique and highly compartmentalized sea cucumber superoxide dismutase gene MnSOD has been cloned and characterized. The full-length MnSOD cDNA of sea cucumber was comprised of 955bp, containing a 672bp open reading frame (ORF), 216bp 3'UTR and 67bp 5'UTR. The full-length MnSOD cDNA had an ATTTA deoxyadenosine monophosphate signal sequence in 3' UTR and a polyA in the end, which is consistent with the characteristics of

国家自然科学基金项目(31072230)和国家“863”计划项目(2010AA10A401)共同资助

* 通讯作者。E-mail: yqchang@dlou.edu.cn

收稿日期: 2010-12-25; 接受日期: 2011-06-30

作者简介: 田 焱(1979-), 女, 副教授, 主要从事海洋生物学研究。E-mail: tianyi@dlou.edu.cn, Tel: 15840950229

effective length of gene translation. Sequence comparison showed that the MnSOD shares 61% ~69% similarity with MnSOD of *Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Gallus gallus*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio*, *Haliotis discus*, *Argopecten irradians*, *Fenneropenaeus chinensis*, and *Drosophila melanogaster*. The full-length MnSOD cDNA encoded 223 amino acids with protein molecule of 24.64 kD, and isoelectric of 6.66. The SOD had 17 alkaline amino acids, 20 strongly acidic amino acids, 83 hydrophobic amino acids, and 59 polar amino acids. The protein sequence had no signal peptide or transmembrane structure, only a mitochondrial leading peptide. The secondary structure was mainly comprised of alpha helix, with the largest number of irregular coiling and chain in the whole protein, without folding. The InterPro software analysis showed that the sequence of amino acids contains three protein kinase C phosphorylation sites, one casein kinase II phosphorylation site, 5 nutmeg acylation sites, and an SOD family signature peptide DVWE-HAYY. The protein had 1 serine and 3 threonines, which were possibly protein kinase phosphorylation sites. Disulfide bond analysis showed that MnSOD contained three cysteines, forming a disulfide bond by connecting the 17th and 107th Cysteines. The cloning of MnSOD cDNA would be helpful for better understanding of the body defense system to eliminate active oxygen O_2^- and maintain the metabolism balance.

KEY WORDS Sea cucumber MnSOD Gene cloning Sequence analysis

生物体在正常的生理代谢过程中会产生对细胞有毒害作用的活性氧(ROS),包括超氧阴离子(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基($OH\cdot$)和单线态氧(1O_2)等多种活性氧。当受到外界病原侵染,无脊椎动物会启动机体的多种免疫反应,这些免疫反应会导致氧和能量(ATP)消耗量的骤增,产能的呼吸链会加速运转,由此也会引发与呼吸链相耦联活性氧的大量产生(Roch 1999;Xiang 2001)。这些活性氧具有极强的反应特性,能破坏病原微生物的结构和功能分子,杀灭入侵的病原(Bogdan *et al.* 2000)。同样在逆境胁迫下(如重金属、污染、强光、离子辐射、极端温度、水分胁迫、盐度胁迫等)也会产生大量的活性氧。但由于活性氧分子反应的非特异性,它们会破坏宿主机体细胞内的功能蛋白分子、不饱和脂肪酸分子和核酸等,对细胞造成严重的伤害,进而导致机体生理机能的损伤和免疫系统的破坏(Yu 1994)。为了防止活性氧对细胞蛋白质、膜脂、DNA及其他细胞组分可能造成的严重损伤,及时消除病原感染和环境胁迫情况下机体内产生的过量 ROS,维持相关细胞的正常代谢,对提高机体抵抗力和免疫力具有重要作用。生物体经过长期进化形成了完善而复杂的酶类和非酶类抗氧化保护系统来清除活性氧(杜秀敏等 2001),其中超氧化物歧化酶(Peroxide dismutase, SOD)是生物体抗氧化酶系统中的重要成员,在消除过量 O_2^- 、维持生物体内活性氧分子的代谢平衡和保护机体免受活性氧损伤等方面起着重要的作用。

目前,已经从罗氏沼虾 *Macrobrachium rosenbergii* (AAZ81617)、花蟹 *Charybdis feriata* (Linnaeus) (AAD10640)、凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* (ABC59527、ABC59528 和 ABC59529)、斑节对虾 *Penaeus monodon fabricius* (Fabricius) (B1784454)、日本对虾 Japanese tiger prawn (BAB85211)、蓝蟹 *Portunus pelagicus* (AAF74770)、草虾 *Echinocereus stramineus* (AY211084)、中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis* (DQ205424)、斑马鱼 *Danio rerio* (NP_956270.1)和泥蚶 *Tegillarca granosa* (杜莉莉等 2009)等水产动物中克隆到 MnSOD 基因;并对部分对虾 MnSOD 的分子特征及其在免疫系统中的作用进行了研究。从杂色鲍 *Haliotis diversicolor supertexta* (张克烽等 2007)、皱纹盘鲍 *Haliotis discus discus* (Ekanayake *et al.* 2006)和栉孔扇贝 *Chlamys farreri* (Ni *et al.* 2007)中分别克隆出了 CuZn-SOD。

仿刺参 *Apostichopus japonicus* 具有较高的经济价值和药用价值(樊绘曾 2001),现已成为我国最有经济价值的海水养殖种类之一。近几年由于养殖环境、海水水质变化及冰冻灾害,导致细菌性与病毒性疾病大面

积发生,造成仿刺参养殖产业损失严重(王轶南等 2010;王印庚等 2009;李 彬等 2010)。刺参疾病防御及对环境的适应能力的研究工作已成为当务之急。为深入开展仿刺参免疫及其机制的研究,并在此基础上寻找防治仿刺参疾病的有效方法,本研究采用 RACE 方法,克隆了仿刺参 MnSOD 全长 cDNA,在获得的 MnSOD 序列的基础上,进行了氨基酸序列分析,预测蛋白质的性质、二级结构及高级结构,为 MnSOD 基因表达和蛋白质生物活性研究奠定基础。SOD 基因在海洋生物类中的作用机制和表达情况则尚缺乏系统研究,尤其在海洋生物类免疫反应中的功能和作用机制则更缺乏研究。因此,希望本研究能为下一步探讨仿刺参 SOD 在免疫反应中的功能和作用机制有所裨益。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用仿刺参于 2009 年 6 月取自辽宁省大连市瓦房店海区。主要试剂 Trizol、M-MLV 反转录酶、RNA 酶抑制剂、Marker(DL2000)、dNTP、EX *Taq* DNA 聚合酶、pMD19-T Vector、*Hind*Ⅲ、*Bam*HI 购自大连宝生物技术有限公司,PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。AXYGEN 柱式凝胶回收试剂盒、AXYGEN 小量质粒提取试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 总 RNA 的提取与反转录

抽取仿刺参体腔液,按 Trizol 法提取总 RNA。紫外分光光度计与 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的提取质量及完整性,−80℃ 保存备用。在 PCR 管中加入如下反转录体系:100ng 总 RNA,1μl 引物(dT),5×M-MLV 缓冲液 2μl,dNTP(各 10mmol/L)0.5μl,RNase 抑制剂(40U/μl)0.25μl,RTase M-MLV(200U/μl)0.25μl,使用不含 RNase 的纯水定容至 10μl,混合均匀。步骤:RNA 65℃ 变性 5 min,冰浴 5 min,在冰上迅速加入以上成分,42℃ 水浴 60 min,70℃ 保温 15 min,冰上冷却,得 cDNA 第一条链。

1.3 PCR 扩增、PCR 产物的克隆及测序

应用 Primer Premier 5.0 软件,根据已报道的 SOD 片段鲑鳟鱼(BT060259)、斑马鱼(NM199976)、太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas*(DQ010420),依保守区设计兼并引物 F1 和 R1。RACE 引物的设计,根据 SMART II Oligo nucleotide 提供的接头引物(UPM 和 NUP),利用已获得的基因的部分 cDNA 序列设计 RACE 基因特异性引物 F2、F3、R2、R3(表 1)。所有引物由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 引物序列

Table 1 The sequences of primers used in this study

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence(5'→3')
F1(Forward)	CAAGAAACAYCAYGCMACHT
R1(Reverse)	CCCATCCKGAKCCYTGVA
F2(Forward)	CAGCAGAGGAGAAACTGGCAGCAGCACA
F3 (Reverse)	TATCGCCTCAGGGGGTGGTGTTC
R2(Forward)	GAACCAAAGTCTCTGTTGATGGCGTCTGC
R3(Reverse)	CACCACCCCCTGAGGCGATAG
UPM Short:	CTAATACGACTCACTATAGGGC
Long:	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT
NUP	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT

在 PCR 管中,加入如下 25μl 反应体系:1.25μl cDNA,0.5μl 正向引物,0.5μl 反向引物,10×Ex Tap 缓冲

液(Mg^{2+} Plus)2.5 μ l,dNTP(各 2.5mmol/L)2 μ l, Ex DNA 聚合酶(5U/ μ l)0.125 μ l,灭菌蒸馏水 16.25 μ l。反应条件:94 $^{\circ}C$ 预扩增 2min;94 $^{\circ}C$ 变性 30s,48 $^{\circ}C$ 延伸 30s,72 $^{\circ}C$ 复性 1min,35 个循环;最后 72 $^{\circ}C$ 充分延伸 10 min,4 $^{\circ}C$ 保温。用 1%的琼脂糖凝胶电泳,检测 PCR 扩增产物。按 BD SMARTTM RACE cDNA 扩增试剂盒使用说明的操作步骤,采用巢式 PCR 进行 3'RACE 克隆。用带接头的 cDNA 为模板,用引物 F2、F3 采用巢式 PCR 扩增基因的 3'末端。PCR 反应体系与前述相同,反应条件为:94 $^{\circ}C$ 预扩增 3min;94 $^{\circ}C$ 变性 30s,55 $^{\circ}C$ 延伸 1min,72 $^{\circ}C$ 复性 3min,30 个循环;72 $^{\circ}C$,最后 72 $^{\circ}C$ 充分延伸,4 $^{\circ}C$ 保温。5'RACE:按 BD SMARTTM RACE cDNA Amplificatin Kit User Manual 的操作步骤,以 oligo(dT)为引物,合成 cDNA 第一链。用基因特异性引物 R2、R3 为引物,采用巢式 PCR 扩增基因的 5'末端。PCR 反应体系及条件和前述相同。

用回收试剂盒回收 cDNA 片段,与 pMD19-T Vector 载体连接,将连接好的质粒转化感受态 DH5 α ,通过蓝白斑筛选和菌落 PCR 初步鉴定后,阳性菌落于 37 $^{\circ}C$ 震荡培养过夜。提质粒,将 PCR 和酶切鉴定均为阳性的克隆送大连宝生物技术有限公司进行序列测定。

1.4 序列分析

序列同源性比对和相似性搜索用 BLAST 软件进行;序列拼接和开放阅读框(ORF)的寻找用 DNAMAN 软件进行;导肽查找用 Target P 1.1 Server 程序预测;利用 TMHMM 对跨膜域进行预测;蛋白特征模体查找采用 SMART 软件;蛋白质性质分析采用 ExPASy server 软件;多序列比对采用 ClustalW1.8 软件,在此基础上采用 Mega4.0 软件,以邻位相连法(Neighbor-joining)构建系统进化树;蛋白空间结构预测采用 Swiss-model 软件。

2 结果

2.1 仿刺参 MnSOD 的 cDNA 全长序列分析

将应用兼并引物扩增得到的 cDNA 核心片段和 RACE 获得的 cDNA 片段进行序列测定,得到长度为 955bp 的 cDNA(图 1)。MnSOD 全长 cDNA 的 5'端非编码区长度为 67bp,3'端非编码区为 217bp,开放阅读

```

1      acatggggactctaactgggtgtaaagtcacgtttaggtcctttgcaactacgaagttcac
61     tgcaatcATGTTTTCTCATCGTCTTAACCTCCTCCGAGGCTGGCTGCCAGTACTGCAA
1      M F S H R L N F L P R L A A Q Y C K
121    AGCATCAGCCACAGGAAGCCGATGAAGCACACTCCAGATCGCCATATCGTACAA
19     A S A T G S R M K H T L P D L P Y S Y N
181    TCGGTTGGAACCTGTTATCATAGGACATTATGGAATTACATCACAAGAAACATCACGC
39     A L E P V I I G D I M E L H H K K H H A
241    AACTTACACCAATAACTTGAACGCAGCAGAGGAACTGGCAGCAGCATGCAGAAGG
59     T Y T N N L N A A E E K L A A A H A E G
301    TGACATTTGGTGTATGATCGCTTTGACGCCAGCTTTGAAAITTAACGGTGGAGTTTCAT
79     D I G G M I A L Q P A L K F N G G G F I
361    CAATCATTGTATCTTTGGACAAACCTATCGCCTCAGGGGGTGGTGTCCACAAGGTGA
99     N H C I F W T N L S P Q G G G V P Q G D
421    TCTAGCAGCGCCATCAACAGAGACTTTGGTTCGTTGACAGTTCAAGACTACGTTGAC
119    L A D A I N R D F G S F D S F K T L T
481    AGCGGCCACTGTGGCAATTCAGGATCAGGATGGGGCTGGCTAGGGTTGTATCAGAAGAC
139    A A T V A I Q G S G W G W L G F D Q K T
541    TCACCAGTTGAAAATAGCAACCTGTGCAATCAAGACCCCTCCAGGCCACTACCGGGAT
159    H Q L K I A T C A N Q D P L Q A T T G M
601    GGTGCCTTGGTTCGATGCTCGGAGCATGCTTCAATCTTCAATCAAGAAATGC
179    V P L F G I D V W E H A Y Y L Q Y K N A
661    CAGGCCAGCTACGTCAAAGAAATATTCAAGTGGCTAACTGGGACAACGTCAAGCAACG
199    R P D Y V K E I F Q V A N W D N V S E R
721    TTATCAAGCTGCTTTGAacatgatgggctgccattttctatgagaattcaagagat
219    Y Q A A L *
781    aacaatcaagaactttttgggcattttttccacatttatccggatataaagagtggaa
841    aagcattaaaatgttttggtataaacattgaatccagcaggaagatttgtgctgtaa
901    atcataaacattgttaaatttgatttcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

注:起始密码子 ATG,终止密码子 TGA 和多聚腺苷酸信号序列 attta 用方框标出,SOD 家族的标签序列用下划线标出,导肽序列用灰色背景标出
Note: The letters in box indicated were the start codon (ATG), the stop codon (TGA) and the polyadenylation signal sequence (attta).

The MnSOD signature (-DVWEHAYY-) was underlined and the putative sequence of leading peptide was shaded by gray

图 1 仿刺参 MnSOD 基因全长 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Full-length cDNA of *A. japonicus* MnSOD and the deduced amino acid sequence

框(ORF)为 672bp。在起始密码子 ATG 的-3 位为 A,符合 Kozak 规律。在 3'端有多聚腺苷酸信号序列 ATT-TA,并有终止密码子 TGA 和 polyA 加尾,这些都符合有效翻译的基因全长 cDNA 的特征。

对测序得到的 cDNA 片段序列进行分析,计算碱基 A、T、C、G 的百分含量确定各碱基在 cDNA 中的偏好性。结果表明,该 MnSOD 全长 cDNA 的碱基 A 占 28.12%、G 占 23.81%、T 占 24.85%、C 占 23.21%。A+T 含量(52.97%)高于 G+C 含量(47.02%)。

2.2 仿刺参 MnSOD 的氨基酸组成特征分析

用 DNA Star 分析后发现,MnSOD cDNA 可编码 223 个氨基酸的前体蛋白,预测蛋白分子质量为 24.64kD,理论等电点是 6.66。SOD 的 223 个氨基酸中强碱性氨基酸(K、R)有 17 个,强酸性氨基酸(D、E)有 20 个,疏水氨基酸(A、I、L、F、W、V)有 83 个,不带电荷的极性氨基酸有(N、C、Q、S、T、Y)有 59 个。以 ProtScale 程序对 Mn-SOD cDNA 编码的氨基酸分析,发现第 9~13、40~49、80~89、98~106、136~146、162~165、175~186 残基为疏水性的,6~8、18~39、50~69、71~74、77~79、90~92、95~97、107~135、147~149、151~161、166~174、187~204、208~219 残基为亲水性的(图 2)。亲水性残基所占比例远大于疏水性残基,而且疏水性最大值为 1.778,亲水性最大值为 2.367,因此推测 MnSOD 是亲水性的。

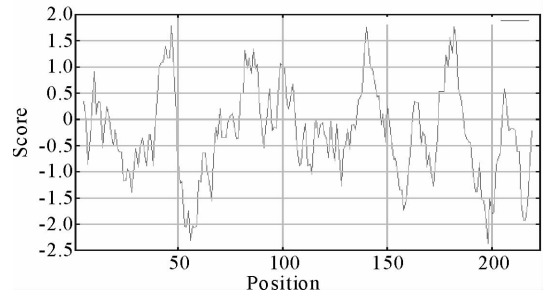


图 2 MnSOD 亲/疏水性分析预测
Fig. 2 The hydrophilicity/hydrophobicity analysis of MnSOD

采用 TargetP1.1 Server 预测 MnSOD 氨基酸序列特征,结果表明,线粒体目标肽及分泌途径信号肽其分值分别为 0.871、0.043,预测可靠性为 2,说明该蛋白不存在信号肽酶切位点,无信号肽,有线粒体目标肽(表 2)。导肽的长度为 26 个氨基酸,这段 MFSHRLNFLPRLAAQYCKASATGSRM 导肽中,带正电荷的碱性氨基酸精氨酸 R 和赖氨酸 L 分散于 A、L、P、F、M 这些不带电荷的氨基酸之间,而且多数氨基酸是疏水性的氨基酸,不含有带负电荷的酸性氨基酸(D、E)。这段导肽主要由 α 螺旋组成。故推测 MnSOD 属于非分泌型蛋白,主要存在于线粒体内,其蛋白前体在细胞液中合成,合成后通过导肽再转运到线粒体中。

表 2 仿刺参 MnSOD 导肽的预测

Table 2 Predicted leading peptide and cleavage site for MnSOD in sea cucumber

名称 Name	氨基酸数 Length	线粒体 mTP	信号肽 SP	其他 Other	位点 Loc	可信率 RC	氨基酸长度 TP length
序列 Sequence	223	0.871	0.043	0.133	M	2	26
截止值 Cutoff		0.000	0.000	0.000			

利用 TMHMM 对 MnSOD 跨膜域进行预测。结果表明,MnSOD 基因无明显的跨膜区,属于非跨膜蛋白类。将氨基酸序列用 InterPro 软件分析,这段序列含有 3 个蛋白激酶 C 磷酸化位点,1 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点,5 个肉豆蔻酰基化位点,还发现了 1 个 MnSOD 家族的签名序列(Signature)DVWEHAYY,此序列位于第 185~192 氨基酸残基之间。对磷酸化位点分析发现,有 1 个丝氨酸 Ser,3 个酪氨酸 Tyr,可能成为蛋白激酶磷酸化位点(图 3)。对糖基化位点分析表明(图 4),无糖基化位点。二硫键分析表明,MnSOD 含有 3 个半胱氨酸 Cys,形成 1 个二硫键,连接着第 17 位和第 107 位的 Cys。MnSOD 蛋白质结构域分析表明,在 C-和 N-各包含 1 个 SOD 特有的结构域(图 5),催化超氧化物转化为过氧化物和氧的保守基序。C 结构域位置为第 113~219 氨基酸,是一个混合的 α/β 折叠,N 结构域位置为第 27~108 氨基酸,是一个长的 α 反向平行的发夹结构。

表 3 3 个物种 MnSOD 的二级结构比较

Table 3 Comparison of the secondary structure of MnSOD in three species

	仿刺参 <i>A. japonicus</i>	人 <i>Homo sapiens</i>	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>
亲/疏水性 Hydrophilicity/hydrophobicity	亲水性 Hydrophilic	亲水性 Hydrophilic	亲水性 Hydrophilic
信号肽 Signal peptide	无 No	无 No	无 No
导肽 Leading peptide	有 Yes	有 Yes	有 Yes
跨膜结构 Transmembrane	无 No	无 No	无 No
亚细胞定位 Location	线粒体 Mitochondrion	线粒体 Mitochondrion	线粒体 Mitochondrion
α -螺旋 Alpha helix	42.15%	40.54%	32.14%
无规则卷曲 Random coil	48.43%	49.10%	44.20%
延伸链 Extended strand	9.42%	10.36%	23.66%
β -折叠 Beta turn	无 No	无 No	无 No

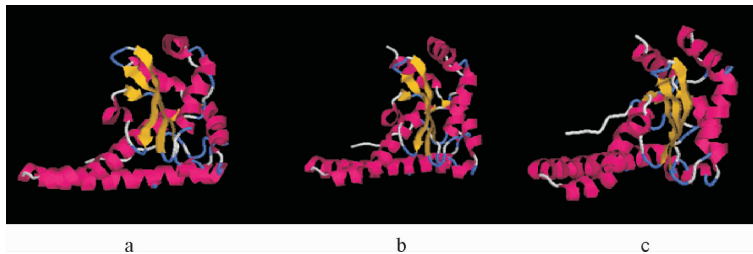
a. 仿刺参 *A. japonicus* MnSOD, b. 人 *H. sapiens* MnSOD, c. 斑马鱼 *D. rerio* MnSOD

图 7 仿刺参 Mn-SOD 空间结构预测

Fig. 7 Predicted spatial structure of MnSOD in *A. japonicus*

2.4 仿刺参 MnSOD 与其他物种 MnSOD 氨基酸序列同源性比较

使用 GenBank 的 Blast 程序检索分析仿刺参 MnSOD 氨基酸序列与目前已报道的其他物种 MnSOD 基因家族氨基酸序列的同源性。选取了人 (P04179)、牛 (NP_963285.2)、斑马鱼 (NP_956270.1)、原鸡 (NP_989542.1)、非洲爪蟾 (NP_001083968.1)、中国对虾 (ABB05539.1)、皱纹盘鲍 (ABF67504.1)、海湾扇贝 (ABW98672.1)、果蝇 (NP_476925.1) 9 个物种的 MnSOD 氨基酸序列进行序列比对。结果发现,相似性均在 61%~69% 之间,仿刺参 mMnSOD 中含有 4 个保守的氨基酸残基 (H₅₂、H₁₀₀、D₁₈₅、H₁₈₉),这 4 个保守的氨基酸残基负责与金属离子 Mn²⁺ 结合;说明该基因在各物种之间有较高的保守性(图 8)。MnSOD 的高度保守性说明它在生命活动中具有重要的作用。

2.5 系统进化树的构建

根据 GenBank 上已注册的 SOD 基因序列,用 Neighbor-joining 方法,使用 MEGA4 软件构建系统进化树,多序列比对等参数的设置采用默认设置值。从系统进化树(图 9)可以看出,仿刺参和皱纹盘鲍及海湾扇贝亲缘关系最近。然后与节肢动物类和鱼类聚在一起。包括人、牛、鸡等在内的哺乳动物和两栖动物等的 SOD 聚为一支。进化树与物种的进化过程相一致。

3 讨论

3.1 仿刺参 SOD 基因全长序列及组成特征分析

研究发现 MnSOD 全长 cDNA 为 955 bp,其中 5' 端非编码区 67 bp,3' 端非编码区 217 bp,开放阅读框

<i>Homo</i>	MLSR .AVCGTSR .QLAPALGYLGSROKHSLPDLFYDYCALPEPHINACIMOLHHSKHHAAYVNNLNVTBEK	68
<i>Bos</i>	MLSR .AACSTSR .RLVPALSVLGSROKHSLPDLFYDYCALPEPHINACIMOLHHSKHHAAYVNNLNVAEBK	68
<i>Gallus</i>	MLCRLASAGRSRAALVAPWGCLVARQKHTLPDLFYDYCALPEPHISAEIMOLHHSKHHAAYVNNLNVTBEK	70
<i>Xenopus</i>	MLCRLSVCGRMRMRCVPALAYSFCKBKHTLPDLFYDYCALQPHISAEIMOLHHSKHHAAYVNNLNVTBEK	70
<i>Danio</i>	MLCRVGYVRRCAATFNPLLGAVTSROKHALPDLTYDYCALPEPHICAEIMOLHHSKHHAAYVNNLNVTBEK	70
<i>Haliotis</i>	MLSATLSAVKRAVPSPAWLATAAVRMKHTLPDLFYDYALPEVYISADIMKLHKKHHNAYVNNLNVAQEK	70
<i>Argopecten</i>	MLSATTTVLKSIKPSVGAFALASRLKHTLPDLFYDYALPEVYISADIMOLHHSKHHAAYVNNLNVAEBK	70
<i>Apostichopus</i>	MFSHRLNFLPRLAAQYCKASATSRMKHTLPDLFYDYALPEVYIIGDIMLHKKHHHAAYVNNLNVAEBK	70
<i>Fenneropenaeus</i>	MLAATRLFSARG...LAALGVR .SQQKHTLPDLAYDYALPEVYICAEIMOLHHSKHHAAYVNNLNVAEBK	66
<i>Drosophila</i>MFVARK...ISQTASLAVRQKHTLPKLFYDYAALPEITCREIMLHKKHHHAAYVNNLNVAEBK	61
Consensus	kh l p l y y a l p i im l h k h h y n l n e	
<i>Homo</i>	YQBALAKGDVTAQIALQPALKFNGGCGHINHSIFWNTLSPNGGGEPKGELEAIAIKRDFGSEFKKKEKLTAA	138
<i>Bos</i>	YREALEKGDVTAQIALQPALKFNGGCGHINHSIFWNTLSPNGGGEPQGELEAIAIKRDFGSEFAKFKKELTAV	138
<i>Gallus</i>	YKBALAKGDVTAQVSLQPALKFNGGCGHINHTIFWNTLSPNGGGEPKGELEAIAIKRDFGSEFANFKKELTAV	140
<i>Xenopus</i>	YAEALAKGDVTTQVSLQAALKFNGGCGHINHTIFWNTLSPNGGGEPQGELEAIAIKRDFGSEFKFKKELNTV	140
<i>Danio</i>	YQBALAKGDVTTQVSLQPALKFNGGCGHINHTIFWNTLSPNGGGEPQGELEAIAIKRDFGSEFKKKEKISAA	140
<i>Haliotis</i>	LSEAEAKNDINSIISLQPSLRFNGGCGHINHSIFWEVLSPPNGGGEPDGLIMHCKIKRDFGSEYDEMKEKLTAS	140
<i>Argopecten</i>	LAEATETKNIINQVTLQPALKFNGGCGHINHSIFWEVLSPPNGGGEPDGLILEVINRDFGSEFAMKTELSSA	140
<i>Apostichopus</i>	LAAHAHEGDIIGMIALQPALKFNGGCGHINHCIFWNTLSPQGGVPEQGLADAINRDFGSEFDSFKTTLTAA	140
<i>Fenneropenaeus</i>	LAEAAKAGDVTNTVLSLAPALKFNGGCGHINHTIFWNTLSPDGG .EPAGDLAAINKDFGSEVDAMKAQLSAA	135
<i>Drosophila</i>	LEEAQKSDTITKLIQLAPALRFNGGCGHINHTIFWNTLSPNKT .QPSDDLKKAIESQWKSLEEFKKEKLTTL	130
Consensus	a l l f n g g g i n h i f w l s p p l i s k	
<i>Homo</i>	SVGVQSGGWLGFNKERGHLQIAACFNQDPLQGTGLIPLLIGIDVWEHAYYLQYKNVREDYLKAIWNVI	208
<i>Bos</i>	SVGVQSGGWLGFNKEQGRQLQIAACSNQDPLQGTGLIPLLIGIDVWEHAYYLQYKNVREDYLKAIWNVI	208
<i>Gallus</i>	SVGVQSGGWLGFYNKEQGRQLQIAACANQDPLQGTGLIPLLIGIDVWEHAYYLQYKNVREDYLKAIWNVI	210
<i>Xenopus</i>	SVGVQSGGWLGFYNKDSNRQLQIAACANQDPLQGTGLIPLLIGIDVWEHAYYLQYKNVREDYLKAIWNVI	210
<i>Danio</i>	TVAVQSGGWLGFPEKESGRRLQIAACANQDPLQGTGLIPLLIGIDVWEHAYYLQYKNVREDYVKAIFWNV	210
<i>Haliotis</i>	AVTVQSGGWLGFNVPVSGRLRVSACANQDPLEATTGLVPLFGIDVWEHAYYLQYKNVREDYVGAIFWNV	210
<i>Argopecten</i>	STAVQSGGWLGFNVPVSKRLRVAACANQDPLQPTGLVPLFGIDVWEHAYYLQYKNVREDYVNAIFWNV	210
<i>Apostichopus</i>	TVAVQSGGWLGFDFQKTHQLKATCANQDPLQATTGMVPLFGIDVWEHAYYLQYKNAREDYVKEIFQVA	210
<i>Fenneropenaeus</i>	TVAVQSGGWLGFNKKQKSLQIATCANQDPLEATTGLVPLFGIDVWEHAYYLQYKNVREDYVNAIFWNV	205
<i>Drosophila</i>	TVAVQSGGWLGFNKKSGKLQIAALFNQDPLEASTGLIPLLIGIDVWEHAYYLQYKNVRESYVAEIMWDTA	200
Consensus	qsggw wlg l nq dpl tg pl gidvwehaya y l q y k n r p y i	
<i>Homo</i>	NWENVTERYMAACK..	222
<i>Bos</i>	NWENVTARYTACSK..	222
<i>Gallus</i>	NWENVSQRYESCRK..	224
<i>Xenopus</i>	NWENVTERYQASKK..	224
<i>Danio</i>	NWENVSERFOAAKK..	224
<i>Haliotis</i>	NWENVAQRLSEAKLAA	226
<i>Argopecten</i>	NWDCVSQKLHDAMMDC	226
<i>Apostichopus</i>	NWDNVSERYQAAL...	223
<i>Fenneropenaeus</i>	NWKDISARFKAASK.	220
<i>Drosophila</i>	NWDDISCRFQEAKKLG	216
Consensus	nw	

注: MnSOD 中 4 个负责与 Mn²⁺ 结合的保守氨基酸残基用★标出

Note: The amino acids responsible for combination with the metal were indicated with asterisks

图 8 不同物种 SOD 多序列比对

Fig. 8 Multiple sequence alignment of SOD genes from different species

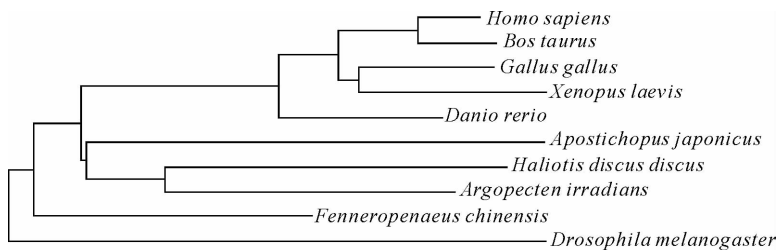


图 9 不同物种 MnSOD 基因的系统进化树

Fig. 9 MnSOD gene phylogenetic tree of different species

(ORF)672bp,可编码 223 个氨基酸的前体蛋白。在 3'端有多聚腺苷酸信号序列 ATTTA,并有终止密码子 TGA 和 polyA 加尾。预测蛋白分子质量为 24.64kD,理论等电点是 6.66。实验结果获得的 MnSOD 的序列组成及其氨基酸特征与其他的 研究结果一致。张庆利等(2008)获得中国对虾 mMnSOD 基因的 cDNA,全长为 1 185 个 bp,其中开放阅读框为 660 个 bp,编码 220 个氨基酸;cDNA 全长中还包含 5'非编码区的 39 个碱基、3'非编码区的 486 个碱基及终止密码子 TAG 和加尾信号 AATAAA,推导分子量为 21 884.68Da,理论等电点为 6.24。另外,Bao 等(2008)获得的 MnSOD 全长 cDNA 为 1 207 个碱基,其中开放阅读框为 678 个碱基,编码 226 个氨基酸;cDNA 全长中还包含 5'非编码区的 28 个碱基、3'非编码区的 501 个碱基及终止密码子 TAG 和加尾信号 AATAAA 以及多聚 A 尾巴。AiMnSOD 的推导分子量为 22.35kD,理论等电点为 5.36。这些 cDNA 序列的高保守性,表明从仿刺参中克隆的这段 cDNA 序列是 SOD 家族的成员。MnSOD 作为参与机体正常生理基础代谢的蛋白,表现为它在结构上有很高的保守性。亲水性残基所占比例大于疏水性残基,而且疏水性最大值为 1.778,亲水性最大值为 2.367。这与大多数 MnSOD 的情况相似,这也是大多数 MnSOD 在做原核表达时容易形成包涵体的原因。这段序列发现了 1 个 MnSOD 家族的签名序列 DVWEHAYY,此序列位于第 185~192 氨基酸残基之间。这也与现有的研究结果相一致,再一次证明这段 cDNA 序列是 MnSOD。在中国对虾、海湾扇贝 mMnSOD 的推导氨基酸序列中也包含 MnSOD 的特征肽段-DVWEHAYY-(张庆利等 2008;Bao *et al.* 2008;王 荣等 2006)。在仿刺参 MnSOD 基因的 3'UTR 中存在 ATTTA 不稳定模体,意味着该基因在免疫反应中是相当活跃的。SOD 基因作为生物体内参与天然免疫的重要细胞因子,它的表达和调控是相当复杂的。可以通过后续的定量表达试验进一步研究 SOD 基因在机体抗感染防御和胁迫环境中的表达模式。

3.2 蛋白质的定位分析

实验预测仿刺参的 MnSOD 氨基酸序列特征表明,该蛋白有线粒体目标肽,无信号肽。导肽的长度为 26 个氨基酸,而且多数氨基酸是疏水性的氨基酸,主要由 α 螺旋组成。这段导肽的这种特征性的结构有利于穿过线粒体的双层膜。MnSOD 基因无明显的跨膜区,属于非跨膜蛋白类。故推测 MnSOD 属于非分泌型蛋白,主要存在于线粒体内,其蛋白前体在细胞液中合成,合成后通过导肽再转运到线粒体中。这与已有的研究结果相符合:MnSOD 主要存在于线粒体内(Kitayama *et al.* 1999)。Bao 等(2008)研究结果表明,AiMnSOD 其前端也含有一个 26 个氨基酸组成的导向线粒体的导肽。中国对虾的 mMnSOD 其前端也存在一段 20 个氨基酸的组成的导肽,而且也是线粒体导肽(张庆利等 2008)。在杂色鲍中发现了 17 个氨基酸组成的导向线粒体的导肽。

3.3 MnSOD 的位点分析和结构域预测

对仿刺参 MnSOD 的氨基酸序列进行磷酸化位点分析,有 1 个 Ser,3 个 Tyr 可能成为蛋白激酶磷酸化位点。推测该蛋白可能在细胞信号传导中发挥作用,它们的生物活性可能接受信号途径中多种信号的调控;它们都含有酪蛋白激酶 II 磷酸化位点,这个位点的磷酸似去磷酸化可能是调节其活性的方式。二硫键分析表明,MnSOD 含有 3 个 Cys,形成 1 个二硫键。绝大多数情况下二硫键是在多肽链的 β 转角附近形成的。二硫键的形成将对 MnSOD 构象起稳定作用,该蛋白含有二硫键也使得该蛋白对热、对蛋白酶降解较为稳定。这些结构对其蛋白功能的发挥,以及在恶劣条件下蛋白结构的稳定是至关重要的(Ni *et al.* 2007)。N-连接的糖基化是一种具有重要生物学意义的翻译后修饰过程。在 N-糖基化的预测中,结果显示存在一个 N 糖基化位点,但被糖基化的 Asn 并不发生在 Asn-Xaa-Ser/Thr 序列中,并且一般只有细胞外的区域可以被 N 糖基化。所以作者预测仿刺参 MnSOD 所编码的蛋白质不含 N-糖基化位点。

3.4 仿刺参 MnSOD 与其他物种 MnSOD 氨基酸序列同源性比较

仿刺参 MnSOD 氨基酸序列与目前已报道的其他物种 MnSOD 基因家族氨基酸序列的相似性在 61%~69%之间,说明该基因在各物种之间有较高的保守性。MnSOD 的高度保守性说明它在生物生命活动中具有

重要的作用,并且仿刺参 MnSOD 与其他物种 MnSOD 具有相同的功能是因为它们有相同的保守区段和功能域。MnSOD 作为参与机体正常生理基础代谢的蛋白,表现为它在结构上有很高的保守性。这些保守的氨基酸可能在基因演化的过程中起到稳定 MnSOD 结构和功能的作用。

MnSOD 呈紫红色,在真核生物中多为四聚体,在原核生物中多为二聚体。每个亚基的分子量一般为 23 kDa。Stallings 等(1991)根据 X 射线结构研究表明,*Thermus thermophilus* 中的 MnSOD,每个亚基含一个 Mn,它与 3 个组氨酸,1 个天冬氨酸及 1 个 H₂O 配位,形成三角双锥结构,处于一个主要由疏水基构成的疏水壳中,并由两个亚基共同形成一个供底物进出的通道。Stallings 等(1991)对 *T. thermophilus* 的 MnSOD 研究揭示,MnSOD 中的金属离子是处于高自旋状态的 3 价锰离子(Mn³⁺),并且一级结构具有较高的一致性。参与形成活性中心及与金属连接的氨基酸在所有 MnSOD 中也都是保守的,而且与金属锰相连的氨基酸也完全一致,它们是组氨酸 26、87、181 和天冬氨酸 185。仿刺参 mMnSOD 中也含有 4 个保守的氨基酸残基(H₅₂、H₁₀₀、D₁₈₅、H₁₈₉),负责与金属离子结合。中国对虾 mMnSOD 中含有 4 个保守的氨基酸残基(H52、H96、D180、H184),负责与金属离子 Mn 的结合(张庆利等 2008)。海湾扇贝的 mMnSOD 也含有 4 个与金属离子 Mn 结合的保守的氨基酸 His28、His52、Asp185、His189,这种保守性说明了 MnSOD 在生物体中应该具有重要的功能(Bao *et al.* 2008)。

3.5 MnSOD 的结构域及高级结构分析

MnSOD 蛋白质的二级结构主要以 α -螺旋为主,不含 β -折叠。二级结构中 α 螺旋所占比例较大,与已知的 MnSOD 结构相符(Stallings *et al.* 1991; Fink *et al.* 2002; Shyu *et al.* 1999)。MnSOD 的 CD 谱表明,其含有较高程度(>32%)的螺旋结构,较少 β -折叠。由一级结构预测的二级结构表明,MnSOD 中不存在 CuZnSOD 中那种八股反向平行的 β -折叠,也不存在长的松散环,整个结构比较紧凑。这些与仿刺参的 MnSOD 氨基酸高级分析结果是一致的。

3.6 仿刺参 MnSOD 的潜在应用价值

功能研究证明,MnSOD 能够增强机体对多种氧化胁迫的抗性(Bowler *et al.* 1991),而且还发现其具有 RNA 结合特性,可能参与基因的表达与调控(Fester *et al.* 1995)。SOD 对于增强吞噬细胞防御能力和整个机体的免疫功能具有重要作用(Yue *et al.* 2007)。许多研究表明 SOD 与生物体抵御病毒、细菌、寄生虫、物理和化学刺激密切相关(Liu *et al.* 2004; Jung *et al.* 2005; Cheng *et al.* 2006; Ekanayake *et al.* 2006; Gomez-Anduro *et al.* 2006),同时 SOD 基因还可以作为环境污染的有效生物学标记,用作检验水产动物健康和检测环境问题的一种重要的生化指标(Choi *et al.* 1991; Bebianno *et al.* 2004)。最近有人提出 SOD 基因因其保守性可作为分类依据和生物进化的遗传学标记(Elliott *et al.* 1998; Yan *et al.* 2004)。许多研究表明,MnSOD 在提高生物的抗逆性方面发挥着重要的作用(李敬玺等 2007)。近几年由于养殖环境、海水水质变化及冰冻灾害,导致细菌性与病毒性疾病大面积发生,造成仿刺参养殖产业损失严重。仿刺参疾病防御及对环境的适应能力的研究工作已成为当务之急。深入开展仿刺参免疫相关基因及其机制研究,并在此基础上寻找仿刺参疾病防治的有效方法,对仿刺参的健康养殖有着重要的意义。通过研究该基因的表达强度与抗逆性的相关性,探讨其在免疫反应中的功能和作用机制,有望为仿刺参抗逆育种提供理论基础。

参 考 文 献

- 王印庚,冷敏,陈霞,荣小军,廖梅杰. 2009. 中草药对刺参腐皮综合征病原菌的体外抑菌试验. 渔业科学进展, 30(2): 1~7
- 王荣,刘涛,周晓君,庄筠均,茅云翔. 2006. 条斑紫菜锰超氧化物歧化酶基因克隆与序列分析. 高技术通讯, 8(4): 522~528
- 王轶南,朱世伟,常亚青. 2010. 刺参肠道及养殖池塘菌群组成的 PCR-DGGE 指纹图谱分析. 渔业科学进展, 31(3): 119~122
- 张庆利,李富花,黄冰心,周茜,相建海. 2008. 中国明对虾线粒体 MnSOD 在大肠杆菌中的重组表达、产物纯化及活性测定. 高技术通讯, 18(8): 868~873
- 张克烽,张子平,陈芸,林鹏,王艺磊. 2007. 动物抗氧化系统中主要抗氧化酶基因的研究进展. 动物学杂志, 42(2): 155~162

- 李 彬, 荣小军, 姜 卓, 王印庚, 薛太山. 2010. 秋、冬季节刺参养殖池塘浮游细菌数量变化规律的研究. 渔业科学进展, 31(3): 44~48
- 李敬玺, 刘继兰, 王选年, 银 梅, 葛亚明, 唐海蓉. 2007. 超氧化物歧化酶研究和应用进展. 动物医学进展, 28(7): 70~75
- 杜秀敏, 殷文璇, 赵彦修. 2001. 植物中活性氧的产生及清除机制. 生物工程学报, 17(2): 121~125
- 杜莉莉, 李太武, 苏秀榕, 李登峰, 潘沙芳. 2009. 泥蜡锰超氧化物歧化酶基因的研究. 海洋科学集刊, 49: 112~118
- 樊绘曾. 2001. 海参: 海中人参——关于海参及其成分保健医疗功能的研究与开发. 中国海洋药物, (4): 37~44
- Bao, Y., Li, L., and Zhang, G. 2008. The manganese superoxide dismutase gene in bay scallop *Argopecten irradians*: Cloning, 3D modelling and mRNA expression. Fish & Shellfish Immunology, 25(4): 425~432
- Bebiano, M. J., G eret, F., Hoarau, P., Serafim, M. A., Coelho, M. R., Gnassia-Barelli, M., and Rom eo, M. 2004. Biomarkers in *Ruditapes decussatus*: a potential bioindicator species. Informa Healthcare, 9(4-5): 305~330
- Bogdan, C., R ollinghoff, M., and Diefenbach, A. 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. Curr. Opin. Immunol. 12(1): 64~76
- Bowler, C., Slooten, L., Vandenbranden, S. et al. 1991. Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. EMBO J. 10(7): 1 723~1 732
- Cheng, W., Tung, Y. H., Chiou, T. T., and Chen, J. C. 2006. Cloning and characterisation of mitochondrial manganese superoxide dismutase (mtMn-SOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Fish & Shellfish Immunology, 21(4): 453~466
- Choi, J. I., Takahashi, N., Kato, T., and Kuramitsu, H. K. 1991. Isolation, expression, and nucleotide sequence of the sod gene from *Porphyromonas gingivalis*. Infection and Immunity, 59(4): 1 564~1 566
- Ekanayake, P. M., Kang, H. S., De-Zyosa, M., Jee, Y., Lee, Y. H., and Lee, J. 2006. Molecular cloning and characterization of Mn-superoxide dismutase from disk abalone (*Haliotis discus discus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 145(3-4): 318~324
- Elliott, N. G., Lowry, P. S., Grewe, P. M., Innes, B. H., Yearsley, G. K., and Ward, R. D. 1998. Genetic evidence for depth and spatially separated stocks of the deep water spiky oreo in Australasian waters. Journal of Fish Biology, 52(4): 796~816
- Fester, T., and Schuster, W. 1995. Potato mitochondrial manganese superoxide dismutase is an RNA-binding protein. Biochem. Mol. Biol. Int. 36(1): 67~75
- Fink, R. C., and Scandalios, J. G. 2002. Molecular evolution and structure-function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. Arch. Biochem. Biophys. 399(1): 19~36
- Gomez-Anduro, G. A., Barillas-Mury, C. V., Peregrino-Uriarte, A. B., Gupta, L., Gollas-Galvan, T., Hernandez-Lopez, J., and Yepiz-Plascencia, G. 2006. The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular cloning and expression. Dev. Comp. Immunol. 30(10): 893~900
- Jung, Y., Nowak, T. S., Zhang, S. M., Hertel, L. A., Loker, E. S., and Adema, C. M. 2005. Manganese superoxide dismutase from *Biomphalaria glabrata*. Journal of Invertebrate Pathology, 90(1): 59~63
- Kitayama, K., Kitayama, M., Osafune, T., and Togasaki, R. K. 1999. Subcellular localization of iron and manganese superoxide dismutase in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). J. Phycol. 35(1): 136~142
- Liu, C. H., Yeh, S. T., Cheng, S. Y., and Chen, J. C. 2004. The immune response of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio* infection in relation with the moult cycle. Fish & Shellfish Immunology, 16(2): 151~161
- Ni, D., Song, L., Gao, Q., Wu, L., Yu, Y., Zhao, J., Qiu, L., Zhang, H., and Shi, F. 2007. The cDNA cloning and mRNA expression of cytoplasmic Cu, Zn superoxide dismutase (SOD) gene in scallop *Chlamys farreri*. Fish & Shellfish Immunology, 23(5): 1 032~1 042
- Roch, P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed invertebrates. Aquaculture, 172(1-2): 125~145
- Shyu, Y. C., and Lin, F. P. 1999. Cloning and characterization of manganese superoxide dismutase gene from *Vibrio parahaemolyticus* and application to preliminary identification of *Vibrio* strains. IUBMB Life, 48(3): 345~352
- Stallings, W. C., Metzger, A. L., Paitridge, K. A., Fee, J. A., and Ludwig, M. L. 1991. Structure-function relationships in iron and manganese superoxide dismutases. Free Radical Research, 12(1): 259~268
- Xiang, J. H. 2001. Disease occurrence and control strategies of mariculture organisms. Ocean Press, 1~4, 78~83
- Yan, Q., and Luo, C. 2004. Genetic and biochemical characteristics of mitochondrial superoxide dismutase in grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. Acta Zoologica Sinica, 50(3): 389~394
- Yu, B. P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiol. Rev. 74(1): 139~162
- Yue, W. F., Liu, J. M., Sun, J. T. et al. 2007. Immunity promotion and proteomic identification in mice upon exposure to manganese superoxide dismutase expressed in silkworm larvae. J. Proteome Res. 6(5): 1 875~1 881