

中华蜜蜂铜锌超氧化物歧化酶基因的克隆、 序列分析及表达特征

刘俊峰 刘亭亭 王欢 王子龙 颜伟玉 曾志将 吴小波*

(江西农业大学蜜蜂研究所, 南昌 330045)

摘要: 本试验旨在克隆中华蜜蜂铜锌超氧化物歧化酶(SOD1)基因,探究中华蜜蜂 SOD1 基因的表达特性。利用巢式 PCR 技术扩增、克隆及分析中华蜜蜂 SOD1 基因,采用实时定量 PCR 检测不同发育时期(3 和 6 日龄幼虫、1 和 4 日龄蛹以及 1 和 7 日龄成蜂)、不同部位(成蜂的头、胸和腹)SOD1 基因的表达量,探究中华蜜蜂 SOD1 基因的表达特性。结果显示:克隆获得中华蜜蜂 SOD1 基因的 cDNA 全长序列,其 cDNA 全长 631 bp(GenBank 登录号 JN700517),编码 152 个氨基酸,预测蛋白质分子质量为 15.65 ku,等电点为 6.21,经氨基酸序列比对,与意大利蜜蜂有 99% 的相似性,与其他典型的昆虫(如果蝇、冈比亚按蚊、斜纹夜蛾、家蚕、熊蜂)也有 67%~85% 的相似性;中华蜜蜂 SOD1 基因在不同发育时期和部位中均有表达特异性,在 6 日龄幼虫表达量达到峰值,而在 4 日龄蛹中最低;头部与腹部表达量显著高于胸部($P < 0.05$)。本研究成功克隆获得中华蜜蜂 SOD1 基因,其 cDNA 全长 631 bp,编码 152 个氨基酸。该基因在中华蜜蜂整个发育时期均有表达,而且不同发育时期以及不同部位的表达量不同。

关键词: 中华蜜蜂;铜锌超氧化物歧化酶;克隆;序列分析;表达特性

中图分类号:S891

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2012)08-1512-08

铜锌超氧化物歧化酶(copper/zinc superoxide dismutase, Cu/Zn-SOD 或 SOD1)是超氧化物歧化酶(SOD)家族中最重要的一种金属抗氧化酶,广泛分布在真核细胞的细胞质、细胞核、过氧化酶体和线粒体膜间隙中;能转移性地清除超氧阴离子($O_2^- \cdot$)自由基,在维持氧自由基平衡方面起着重要的作用^[1]。中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)是东方蜜蜂(*Apis cerana Fabricius*)的指名亚种,简称中蜂,是我国的一种特色经济昆虫,具有嗅觉灵敏、善于采集零星蜜粉源、对蜂螨的抵抗能力强、耐热抗寒的生命力及抗逆性等优点^[2-3]。中华蜜蜂耐热抗寒的生命力及抗逆性是其优良性状的重要体现,这可能与蜜蜂机体抗氧化防御系统的准确调控密切相关,其中 SOD1 能及时与外界应激所产生的超氧阴离子自由基发生化学反应^[4],防

止氧自由基破坏细胞的结构和功能,保护细胞免受氧化损伤。另外,动物营养学相关研究发现,不同营养水平的饲料对动物机体的 SOD 活性影响很大,SOD 可以作为评价机体营养状况的一个指标。而关于中华蜜蜂的各营养素的营养需要量研究才刚兴起。因此,对于中华蜜蜂 SOD1 (Acc-SOD1)蛋白质分子特性的了解及抗氧化机理的研究尤为重要。近些年来,国内外主要对西方蜜蜂的 SOD 进行研究,Weirich 等^[5]试验发现工蜂与蜂王的 SOD 在肌肉、蜜囊及血淋巴液中都有很高活性,且在交尾蜂王的肌肉中活性最大。Corona 等^[6]和肖培新等^[7]研究报道意大利蜜蜂蜂王与工蜂不同发育时期及不同部位中 SOD1 基因的表达量有差异,蜂王头部表达量随着年龄的增长呈衰减的趋势;工蜂蛹期表达量较其他时期低。目前已对熊蜂

收稿日期:2012-02-29

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项“畜禽饲料营养价值与饲养标准研究与应用”(200903006)

作者简介:刘俊峰(1986—),男,江西高安人,硕士研究生,研究方向为蜜蜂营养与饲养。E-mail: mml860mm@126.com

* 通讯作者:吴小波,讲师,E-mail: wuxiaobo21@163.com

(*Bombus ignitus*)^[4]、野桑蚕 (*Bombyx mandarina*)^[8]、柞蚕 (*Antheraea pernyi*)^[9] 及黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)^[10] 等昆虫的 *SOD1* 基因做了较为深入的研究。然而,迄今没有对中华蜜蜂 *SOD1* 基因的相关报道,开展该基因的研究将有助于弄清其抗氧化机理,为以后利用该基因进行中华蜜蜂的抗逆性及营养需要量研究提供技术支持。鉴于此,本研究根据意大利蜜蜂 *SOD1* 基因设计特异引物,克隆中华蜜蜂 *SOD1* 基因并进行序列分析,对不同发育时期,不同部位的基因表达量进行初步探索,为进一步研究中华蜜蜂营养需要以及抗氧化机理奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试昆虫:中华蜜蜂取自江西农业大学蜜蜂研究所蜂群。

蜜蜂不同发育时期及部位样品采集:选用蜂群群势一致的中华蜜蜂 5 群。分别利用蜂王产卵控制器控制蜂王在一空巢脾中产卵 6 h,之后将蜂王移出。6 d 后,从巢脾中获取 3 日龄的幼虫。同理分别获取 6 日龄幼虫、1 日龄蛹、4 日龄蛹、1 日龄成蜂以及 7 日龄成蜂,其中 3 日龄幼虫取 60 只,而其他时期均随机取 6 只个体,每 20 只 3 日龄幼虫或其他时期 2 只个体为 1 个重复,每时期 3 个重复;不同部位取样,分别取 12 只 7 日龄成蜂的头胸腹,每 4 个样品作为 1 个重复,共 3 个重复。样品采集后立即放入液氮速冻,转至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,用于提取总 RNA。

主要试剂:总 RNA 提取试剂盒 (Trizol)、*pGEM-T* Easy 载体和 RNA 酶抑制剂均购自北京全式金公司;DNA 分子质量标准 (DNA marker DL2000)、M-MLV 反转录酶及 SYBR Green II 定量试剂均购自日本 TaKaRa 公司;5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D 半乳糖苷 (X-Gal)、异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)、dNTP、LA-Taq DNA 聚合酶及凝胶回收试剂盒均购自美国 PUEX 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 第 1 链的合成

Trizol 法提取蜜蜂样品的总 RNA,紫外分光光度计测定总 RNA 浓度和纯度。用反转录试剂盒对总 RNA 进行反转录,反应体系为 50 μL :8 μL 总 RNA、10 μL 缓冲液、8 μL dNTP、1.5 μL M-

MLV 反转录酶、3 μL Oligo dT、1 μL RNA 酶抑制剂、18.5 μL 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水。反转录反应条件如下:体系混匀后,42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min,75 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 5 min。反转录产物保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.2 中华蜜蜂 *SOD1* 基因引物设计、PCR 扩增、克隆及测序

引物设计:由于中华蜜蜂和意大利蜜蜂为 2 个亲缘关系最近的物种,同一基因的序列在这 2 物种间变异很小,因此,根据 GenBank 中意大利蜜蜂 *SOD1* 基因序列 (GenBank 登录号 NM_001178027.1),利用 Oligo 3.3 软件,设计 2 对 *SOD1* 基因序列引物 (SOD1-F1 和 SOD1-R1、SOD1-F2 和 SOD1-R2),引物序列见表 1。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

PCR 扩增:在 PCR 扩增中,为了提高扩增的特异性,采用巢式 PCR 扩增。第 1 轮 PCR 扩增的反应体系 (25 μL):4 μL cDNA、2.5 μL 10 \times PCR 缓冲液、2 μL dNTP、引物 SOD1-F1 和 SOD1-R1 各 1 μL 、0.3 μL LA-Taq DNA 聚合酶,14.2 μL 双蒸水。扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存待测。第 2 轮 PCR 扩增:将第 1 轮 PCR 扩增产物用双蒸水稀释 1 倍,取 4 μL 作为模板,将引物换成 SOD1-F2 和 SOD1-R2,反应体系的其他组成和扩增程序与第 1 轮扩增相同。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭 (EB) 染色后,蒸馏水漂洗,凝胶成像系统观察分析。

克隆及测序:将 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳并割胶纯化,克隆于 *pGEM-T* Easy 载体内,最后将鉴定的阳性克隆菌送至上海生工进行测序。

1.2.3 实时定量 PCR

分别以 GenBank 中华蜜蜂 β -肌动蛋白 (β -actin) 基因 (HM640276.1) 及本试验中华蜜蜂 *SOD1* 基因的测序结果作为内参基因与目的基因,采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,设计出中华蜜蜂内参基因引物以及 *SOD1* 基因引物分别为 *Acc*- β -actin-Q-F 和 *Acc*- β -actin-Q-R 以及 *Acc*-*SOD1*-Q-F 和 *Acc*-*SOD1*-Q-R,引物序列见表 1。

实时定量 PCR 反应体系 (20 μL):5 μL 反转录产物、目的基因上游和下游引物各 0.4 μL 、4.2 μL 双蒸水、10 μL SYBR Green II。PCR 扩增程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,

72 °C 40 s, 40 个循环; 72 °C 10 min; 最后以每 5 s 上升 0.5 °C 的速度从 61 ~ 95 °C 记录熔解曲线, 每个反转录样品重复 3 次。使用美国 Bio-Rad 公司

iCycler iQ 实时定量 PCR 检测系统。反应结束后收集目的基因与内参基因的阈值循环 (CT), 数据分析方法参考 Liu 等^[11]。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR

引物功能 Primer function	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'—3')
巢式 PCR Nested PCR	SOD1-F1	GTGATTCAGCAAAACGATAAGTACA
	SOD1-R1	ATTGAAAGCAGATTACATATCTAAAACA
	SOD1-F2	CTATACGAGAATTCTTACGGTGC
	SOD1-R2	TACAAGAAATTAGGAATGATATACTC
实时定量 PCR qRT-PCR	<i>Acc</i> -SOD1-Q-F	AAACTATTCAACTTCAAGGACC
	<i>Acc</i> -SOD1-Q-R	CACAAGCAAGACGAGCACC
	<i>Acc</i> - β -actin-Q-F	GGCTCCCGAAGAACATCC
	<i>Acc</i> - β -actin-Q-R	TGCGAAACACCGTCACCC

1.2.4 数据分析

采用 SPSS 17.0 软件对原始数据 Sqrt 方法转换后, 再进行 one-way ANOVA 方差分析, 多重比较采用 Duncan 氏法, 显著性水平为 $P < 0.05$ 。

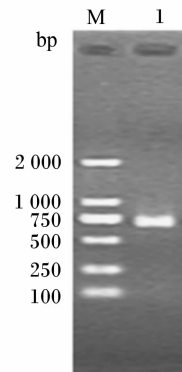
2 结果与分析

2.1 中华蜜蜂 *SOD1* 基因 cDNA 序列扩增及序列分析

以中华蜜蜂总 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 利用引物 SOD1-F1/SOD1-R1 与 SOD1-F2/SOD1-R2 进行巢式 PCR 扩增获得 1 条 631 bp 特异性片段 (图 1), 其目的基因 cDNA 克隆全长为 631 bp, 编码 152 个氨基酸, 在 expasy 网站 (<http://www.expasy.ch>) 预测蛋白质分子质量为 15.65 ku, 等电点为 6.21。利用预测的氨基酸序列在 NCBI 数据库中进行同源性分析显示该基因与其他物种的 *SOD1* 基因高度相似, 表明所克隆的基因正是中华蜜蜂 *SOD1* 基因, 命名为 *Acc*-SOD1, 在 GenBank 登录号为 JN700517。

该 cDNA 全长核苷酸序列如图 2 所示 (推测的氨基酸序列位于核苷酸序列下方)。使用在线软件 Scanprosite (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite>) 分析, 该氨基酸序列中含有 2 个 SOD1 的特异序列 [GFHVHEFGDNT (第 42 ~ 52 位)、GNAGARIACGVI (第 136 ~ 147 位)]。经 NCBI 网站中保守域数据库 (conserved domain database, CDD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 分析 (图 3), 中华蜜蜂 *SOD1* 的氨基酸序列在第 3 ~

147 位包含有铜锌超氧化物歧化酶超家族 (copper/zinc superoxide dismutase superfamily) 的保守结构域。



M: DNA 分子质量标准, 1: 中华蜜蜂 *SOD1* 基因扩增产物。

M: DNA molecular weight maker, 1: PCR product of *Acc*-SOD1 gene.

图 1 中华蜜蜂 *SOD1* 基因的 PCR 产物

Fig. 1 The PCR product of *Acc*-SOD1 gene

2.2 氨基酸序列相似性比较及进化树分析

将中华蜜蜂 *SOD1* 基因所推导的氨基酸序列与已报道的其他昆虫 *SOD1* 基因在 NCBI 网站的在线程序 bl2seq 进行相似性比较 (图 4)。比较中分别选取意大利蜜蜂 (GenBank 登录号 NP_001171498.1)、熊蜂 (GenBank 登录号 AAZ79896.1)、家蚕 (*Bombyx mori*, GenBank 登录号 NP_001037084.1)、野桑蚕 (GenBank 登录号 CAL69462.1)、柞蚕 (GenBank 登录号

ACN80149.1)、斜纹夜蛾(*Spodoptera exigua*, GenBank 登录号 ABX11259.1)、冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*, GenBank 登录号 XP_311594.2)、黑腹果蝇(GenBank 登录号 CAA35210.1)、致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*, GenBank 登录号 XP_001866335.1)和埃及斑蚊(*Aedes aegypti*, GenBank

登录号 XP_001654772.1)。经 Blast 分析发现中华蜜蜂 SOD1 氨基酸序列与意大利蜜蜂的相似性高达 99%,与熊蜂的相似性也有 85%;与致倦库蚊、埃及斑蚊、冈比亚按蚊、斜纹夜蛾、家蚕、野桑蚕及果蝇等典型昆虫的相似性分别为 75%、73%、71%、71%、70%、70%及 67%。

```

1 CTATAACGAGAATTCCTTACAGTGC→CAATATTTTACAAGCACTTGTTCGTTCCGTGAAGTCGAG
SOD1-F2
61 AAATTTTCAAAAATGACTAAAGCAGTGTGCGTTCCTCAGGGTGAAGTCAAAGGAACTATT
M T K A V C V L Q G E V K G T I
121 TTTTTCGAACAACCGGAGAGTACTAATTCTGTGAAGGTCAACGGTCAAGTAACCGGTTTA
F F E Q P E S T N S V K V T G Q V T G L
181 AAAAAAGGATTGCATGGTTTTCATGTTTCATGAATTGCGCGATAATACCAATGGTTGTACA
K K G L H G F H V H E F G D N T N G C T
241 AGTGCTGGTGCACATTTCAACCCATTAGGAAAAGGATCATGGTGGACCTGATTCAGATATA
S A G A H F N P L G K D H G G P D S D I
301 CGTCATGTTGGAGATTTGGGAAATATTGAAGCAGATGCAAGTGGTATTGCTAATGTTAAT
R H V G D L G N I E A D A S G I A N V N
361 ATAACAGATAAACTATTCAACTTCAAGGACCACATAGTGTATTGGCAGAACACTTGTGA
I T D K T I Q L Q G P H S V I G R T L V
421 GTTCATGCTGATCCAGATGATCTTGGTAAAGTGGTGTGAATTATCAAAAACACTACAGGA
V H A D P D D L G K G G V E L S K T T G
481 AATGCTGGTCTCGTCTTGTGGTGTATTGGAATTACAAAAGTCTAAATATATCT
N A G A R L A C G V I G I T K V *
541 TCTGATATAAAATATTATTATTATTAGGAATTATAAAATGTTATAATTATCTCAATTTA
601 AATATGAGTATATCATTCTCAATTTCTTGTA
SOD1-R2

```

下划线表示起始密码子, * 表示终止密码子,下划线箭头分别表示引物,阴影表示特异序列。

Start codon and stop codon were indicated by underline and *, respectively, primers were indicated by arrows, and distinguished sequences were showed in grey background.

图2 中华蜜蜂 SOD1 基因 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 The cDNA and deduced amino acid sequences of *Acc-SOD1* gene

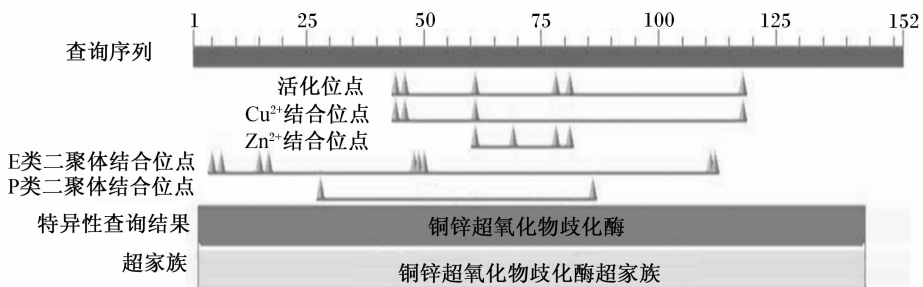


图3 中华蜜蜂 SOD1 功能结构域分析

Fig. 3 Functional domain analysis of *Acc-SOD1*

为了进一步研究中华蜜蜂与其他昆虫的 SOD1 蛋白的系统进化关系,采用 Clustal_X 1.8 进行多序列比对并进行人工矫正^[12];采用

MEGA 4.0 软件中邻位相连法 (neighbor-joining) 构建已知昆虫 SOD1 氨基酸序列的进化树(图 5),系统发生树进行了 2 000 次重复构建^[13]。从系统

进化树发现中华蜜蜂与在同一进化分支上的意大利蜜蜂亲缘关系最近,熊蜂次之,与果蝇的进化关

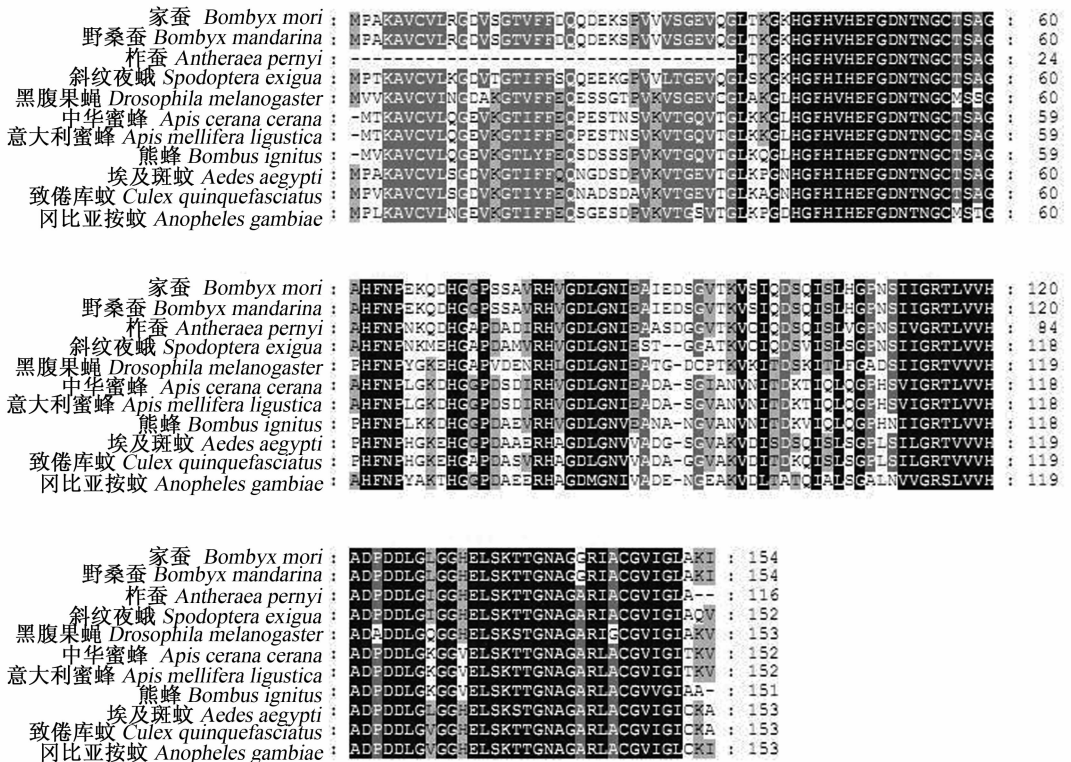


图4 中华蜜蜂与其他昆虫的SOD1氨基酸序列比较
Fig. 4 Comparison of sequences of amino acids of SOD1 between *Apis cerana cerana* and other insects

2.3 中华蜜蜂 SOD1 基因在不同发育时期、不同部位的表达量

为研究中华蜜蜂 SOD1 基因在不同发育阶段的表达特性,以工蜂不同日龄幼虫、蛹和成虫为材料,采用实时定量 PCR 方法进行分析。由图 6 可见,中华蜜蜂 SOD1 基因在蜜蜂整个发育时期均有表达,且不同发育时期的表达量不同,中华蜜蜂 SOD1 基因的表达量在幼虫时期明显升高,在 6 日龄幼虫时期表达量达到峰值,而进入蛹期后逐渐降低,并在 4 日龄蛹期降至最低,在成蜂的 2 个日龄段,该基因的表达量趋于稳定。其中在幼虫时期,6 日龄幼虫 SOD1 基因的表达量显著高于 3 日龄幼虫 ($P < 0.05$);在蛹期,1 日龄蛹显著高于 4 日龄蛹 ($P < 0.05$),而成蜂 2 时期的表达量没有差异 ($P > 0.05$)。

以 7 日龄成年工蜂的头、胸和腹为试验材料,

进一步研究中华蜜蜂不同部位中 SOD1 基因的表达特性。由图 7 可见,该基因在成虫头、胸及腹中均有表达。中华蜜蜂 SOD1 基因在蜜蜂的头部与腹部的表达量均显著高于胸部 ($P < 0.05$),而头部与腹部之间没有差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

蜜蜂与其他昆虫一样,机体的抗氧化系统包括抗氧化酶类抗氧化剂及非酶类抗氧化剂 2 类。SOD 是机体内唯一可清除超氧阴离子自由基的清除剂,能有效地防御过多活性氧自由基对生物体的毒害作用。SOD1 在机体内广泛分布,是 SOD 家族中最重要的成员^[13-15]。对中华蜜蜂 SOD1 功能研究还未见报道。本研究根据意大利蜜蜂 SOD1 基因设计引物,采用巢式 PCR 技术扩增并

获得编码中华蜜蜂 *SOD1* 基因的 cDNA 片段。对预测的氨基酸序列进行分析,结果表明其编码蛋白质呈酸性,理论预测蛋白质分子质量为 15.65 ku。在中华蜜蜂 *SOD1* 氨基酸序列中包含的 2 个特异序列 [GFHVHEFGDNT 和 GNAGAR-IACGVI],与野桑蚕^[8]和柞蚕^[9]的特异序列结构

一致,尤其是该基因氨基酸序列与同为膜翅目的意大利蜜蜂的相似性高达 99%。*SOD1* 基因在昆虫进化中高度保守,揭示了中华蜜蜂 *SOD1* 属于典型的铜锌超氧化物歧化酶超家族成员。系统聚类分析表明,中华蜜蜂与意大利蜜蜂亲缘关系最近,聚类分析与传统分类结果相似。

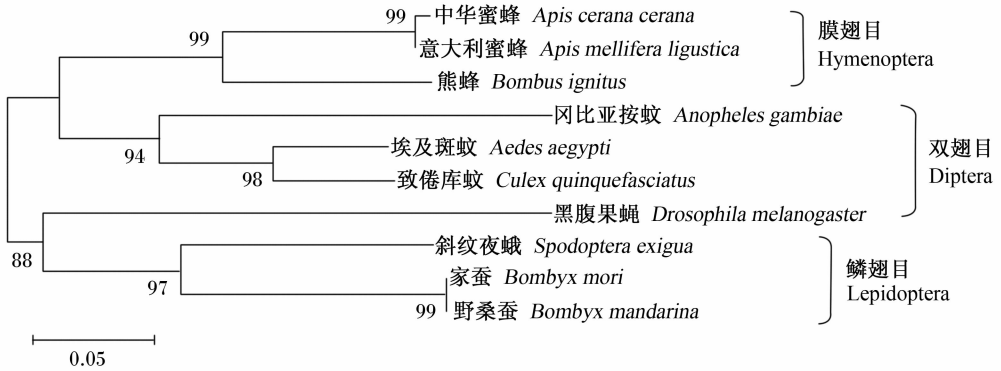
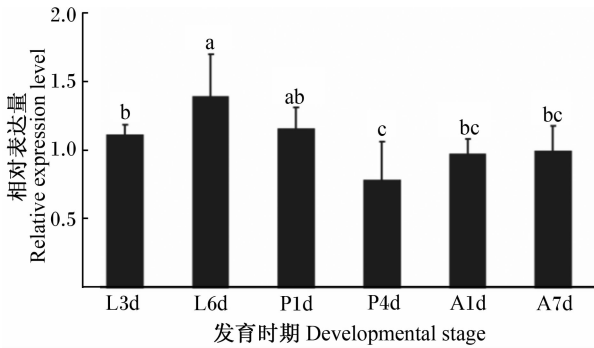


图 5 中华蜜蜂和其他昆虫 *SOD1* 氨基酸序列的系统树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of *SOD1* from *Apis cerana cerana* and other insects



L3d: 3 日龄幼虫, L6d: 6 日龄幼虫, P1d: 1 日龄蛹, P4d: 4 日龄蛹, A1d: 1 日龄成蜂, A7d: 7 日龄成蜂。

L3d: 3-day-old larva instar, L6d: 6-day old larva instar, P1d: 1-day-old pupa, P4d: 4-day-old pupa, A1d: 1-day-old adult, A7d: 7-day-old adult.

数据柱形标注不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 相同小写字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。下图同。

Data columns with different small letters mean significant difference ($P < 0.05$), while with the same letters mean no significant difference ($P > 0.05$). The same as below.

图 6 不同发育时期中华蜜蜂 *SOD1* 基因的表达量

Fig. 6 Expression level of *SOD1* gene in *Apis cerana cerana* at different developmental stages

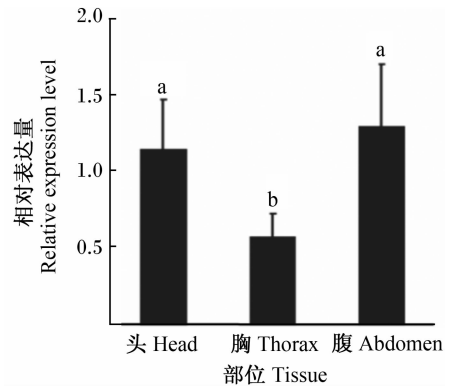


图 7 中华蜜蜂不同部位中 *SOD1* 基因的表达量

Fig. 7 Expression level of *SOD1* gene in different tissues of *Apis cerana cerana*

从发育时期表达特性的结果(图 6)中可以看出, *SOD1* 基因在中华蜜蜂工蜂不同发育时期均有表达,且在整个发育阶段的表达趋势与意大利蜜蜂研究报道^[5]基本一致。其中以 4 日龄蛹期的表达量最低,可能是昆虫在蛹期处于静止不运动的状态,其体内消耗的腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)应该较少^[15],机体中产生的活性氧自由基浓度相应降低,减缓机体内环境氧化应激速率,在氧化与抗氧化之间达到平衡^[16],相应地降低抗氧化酶中 *SOD1* 蛋白的水平。本试验结果中还发现中华蜜蜂工蜂发育时期的表达峰值出现在大幼虫期,可

能是蜜蜂在大幼虫阶段采食量最大^[17], 新陈代谢活动较强, 机体上调抗氧化酶基因的表达, 以清除体内过多的活性氧自由基, 而与意大利蜜蜂 *SOD1* 基因的表达峰值出现在工蜂 1 日龄时期的结果不同^[7], 在已报道的材料中, 由于缺乏对意大利蜜蜂大幼虫时期 *SOD1* 基因表达特性的研究, 也可能是因蜂种不同导致表达特异性不同, 这有待于进一步研究与对比分析。另外, 随着工蜂日龄的增长, 蜜蜂会进行劳动分工, 其劳动强度不一样, 这是否会影响到其基因的表达量也有待于进一步完善。部位特异性表达分析表明, 中华蜜蜂工蜂的头、胸、腹部中均有 *SOD1* 基因的表达, 这与意大利蜜蜂^[6]的报道类似; 中华蜜蜂工蜂头部及腹部 *SOD1* 基因的表达量远高于胸部, 这可能是由于样品采自于 7 日龄工蜂的头胸腹, 6~12 日龄工蜂头部的王浆腺发达, 作为哺育蜂承担着分泌王浆饲喂蜂王与小幼虫的工作, 不出外采集食物^[2], 咽下腺分泌活动能力最强, 王浆和蛋白质分泌量均达高峰^[18], 也使腹部消化系统的负荷加大, 抗氧化酶基因的表达量也随之升高, 其具体原因有待于进一步研究与论证。

4 结 论

① 成功克隆了中华蜜蜂 *SOD1* 基因, cDNA 长度为 631 bp, 编码 152 个氨基酸, 预测蛋白质分子质量为 15.65 ku, 等电点为 6.21。系统发生树显示, 中华蜜蜂与其他昆虫亲缘性越近的物种, *SOD1* 间的同源性也越高。

② 中华蜜蜂 *SOD1* 基因在各发育阶段、各部位均有表达, 但表达量不同, 在 6 日龄幼虫时期表达量达到峰值, 在 4 日龄蛹期降至最低。中华蜜蜂 *SOD1* 基因在中华蜜蜂的头部与腹部表达量均显著高于胸部, 而头部与腹部之间没有差异。

参考文献:

- [1] PARKER J D, PARKER K M, KEER L. Molecular phylogenetic evidence for an extracellular Cu Zn superoxide dismutase gene in insects[J]. *Insect Molecular Biology*, 2004, 13(6): 587-594.
- [2] 曾志将. 养蜂学[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2009.
- [3] 李红亮, 聂文敏, 高其康, 等. 中华蜜蜂气味结合蛋白 ASP2 cDNA 的克隆及原核表达[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(3): 933-938.
- [4] 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]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 144(3): 365-371.
- [5] WEIRICH G F, COLLINS A M, WILLIAMS V P. Antioxidant enzymes in the honey bee (*Apis mellifera*) [J]. *Apidologie*, 2002, 33: 3-14.
- [6] CORONA M, HUGHES K A, WEAVER D B, et al. Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity[J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2005, 126: 1230-1238.
- [7] 肖培新, 吴在富, 刘昭华, 等. 意大利工蜂不同发育时期抗氧化酶基因 mRNA 表达量的变化[J]. *昆虫学报*, 2010, 53(11): 1202-1206.
- [8] 丛海峰, 徐世清, 司马杨虎, 等. 野桑蚕铜锌超氧化物歧化酶基因的克隆分析与原核表达[J]. *蚕业科学*, 2007, 33(2): 234-240.
- [9] 姚立虎, 朱保健, 刘朝良, 等. 柞蚕铜锌超氧化物歧化酶基因的克隆与表达分析[J]. *蚕业科学*, 2009, 35(3): 547-551.
- [10] 蒋芳平, 应琼琼, 顾蔚. 对羟基苯甲酸丙酯对果蝇超氧化物歧化酶(SOD)基因表达的影响[J]. *食品科学*, 2011, 32(19): 170-173.
- [11] LIU W H, SAINT D A. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics[J]. *Analytical Biochemistry*, 2002, 302(1): 52-59.
- [12] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAK F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [13] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596-1599.
- [14] ARHONTAKI K, ELIOPOULOS E, GOULIELMOS G, et al. Functional constraints of the Cu, Zn superoxide dismutase in species of the *Drosophila melanogaster* subgroup and phylogenetic analysis[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2002, 55(6): 745-756.
- [15] 陈永, 龚亮, 左洪亮, 等. 斜纹夜蛾线粒体复合物 III Fe-S 蛋白基因克隆、序列分析及在不同发育阶段的

- 表达特征[J]. 昆虫学报, 2011, 54(7): 762 - 768.
- [16] BOWLER C, MONTAGU M V, INZE D. Superoxide dismutase and stress tolerance [J]. Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1992, 43: 83 - 116.
- [17] 刘光楠, 张飞, 颜伟玉, 等. 蜂王幼虫与工蜂幼虫发育期食物消耗量的研究[J]. 应用昆虫学报, 2011, 48(1): 113 - 115.
- [18] 冯毛, 李建科. 王浆高产蜜蜂和原种意大利蜜蜂咽下腺发育蛋白质组分析[J]. 中国农业科学, 2009, 42(2): 677 - 687.

Cloning, Sequence Analysis and Expression Profile of Copper/Zinc Superoxide Dismutase Gene of *Apis cerana cerana*

LIU Junfeng LIU Tingting WANG Huan WANG Zilong Yan Weiyu ZENG Zhijiang WU Xiaobo*
(Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: This experiment was conducted to clone the cDNA and study the expression profile of copper/zinc superoxide dismutase (*SOD1*) gene of *Apis cerana cerana*. The *SOD1* gene of *Apis cerana cerana* was cloned by nested PCR. The expression level of *SOD1* gene in different tissues (brain, thorax and abdomen of adults) and at different developmental stages (3- and 6-day-old larva instars, 1- and 4-day-old pupas and 1- and 7-day-old adults) of *Apis cerana cerana* was detected using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The results showed that the full length of cDNA of *SOD1* gene of *Apis cerana cerana* (GenBank accession number is JN700517) was 631 bp, encoding 152 amino acids, and the predicted molecular weight and isoelectric point were 15.65 ku and 6.21, respectively. The deduced amino acid sequence of *SOD1* of *Apis cerana cerana* showed the highest similarity (99%) with that of *Apis mellifera ligustica*, and had 67% ~ 85% similarity with other insects (such as *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *Spodoptera exigua*, *Bombyx mori*, *Bombus ignitus* and so on). The expression level of *SOD1* gene was significantly different at different developmental stages of *Apis cerana cerana*, and the peak appeared in 6-day-old larva instar, while the lowest value appeared in 4-day-old pupa. The expression level in the brain and abdomen was significantly higher than that in the thorax ($P < 0.05$). The cDNA of *SOD1* gene of *Apis cerana cerana* is successfully cloned in this study, and the full length is 631 bp, encoding 152 amino acids. The expression profile at different developmental stages and in different tissues is different. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2012, 24(8): 1512-1519]

Key words: *Apis cerana cerana*; copper/zinc superoxide dismutase; cloning; sequence analysis; expression profile