

# 酸土脂环酸芽孢杆菌 Fe-SOD 基因克隆及生物信息学分析

焦凌霞, 华承伟, 徐茜茜, 王俊杰, 赵瑞香

(河南科技学院食品学院, 河南新乡 453003)

**摘要:** 酸土脂环酸芽孢杆菌具有嗜酸耐热的独特生理特性, 从该属细菌中分离到的多种酶类都具有耐酸热稳定性, 是筛选耐酸耐热酶的重要菌种资源。超氧化物歧化酶(SOD)由于具有重要的生理功能而广泛用于食品、药品及化妆品等行业。为了深入探讨酸土脂环酸芽孢杆菌 SOD 的分子生物学特性, 本研究利用同源克隆、交错式热不对称 PCR 技术和生物信息学方法进行 Fe-SOD 基因克隆、测序及序列分析。结果表明, Fe-SOD 基因 (GenBank 序列号: JN614998) ORF 全长为 606 bp, 编码 202 个氨基酸, 其推测氨基酸序列与来源于酸热脂环酸芽孢杆菌 DSM 446 的 Fe-SOD (ACV58017.1) 序列相似性最高, 为 78%。整个蛋白序列含有 FeMnSODs 家族的 5 个模体, SOD 活性中心含有金属离子结合配基 His27、His82、Asp164 和 His168, 具有 FeMnSODs 家族典型的蛋白结构特征。酸土脂环酸芽孢杆菌 Fe-SOD 基因的克隆和生物信息学分析为进一步构建原核表达载体、获得生产耐酸热 Fe-SOD 的基因工程菌株奠定基础。

**关键词:** 酸土脂环酸芽孢杆菌; Fe-SOD; 基因; 克隆; 生物信息学

文章编号: 1673-9078(2015)3-43-49

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.3.008

## Cloning and Bioinformatics Analysis of Fe-SOD Gene in *Alicyclobacillus acidoterrestris*

JIAO Ling-xia, HUA Cheng-wei, XU Xi-xi, WANG Jun-je, ZHAO Rui-xiang

(School of Food Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China)

**Abstract:** *Alicyclobacillus acidoterrestris*, a genus of acidophilic and thermophilic resistant bacteria, is an important microbial resource of heat and acid resistant enzymes, a variety of enzymes isolated from which have acid and thermal stability. Superoxide dismutase (SOD) is widely used in food, clinical treatment, and cosmetic industry for its important physiological functions. In order to deeply explore the molecular properties of SOD gene in *Alicyclobacillus acidoterrestris*, the Fe-SOD gene was cloned, sequenced and analysed using homologous cloning, thermal asymmetric interlaced PCR and bioinformatics. The results showed that Fe-SOD gene (GenBank accession number: JN614998) contains a complete ORF of 606 bp, encoding 202 amino acid, the deduced amino acid sequence shared the highest homology with Fe-SOD from *A. acidocaldarius* DSM 446 (78%). *A. acidoterrestris* Fe-SOD is composed of five motifs and the active site of SOD contains the residues of His27, His82, Asp164, and His168, which has characteristics of protein structures of FeMn SODs family. Cloning and bioinformatics analysis of *A. acidoterrestris* Fe-SOD will provide information for constructing prokaryotic expression vector and obtaining the gene engineering bacteria strains of producing heat and acid resistant SOD.

**Key words:** *Alicyclobacillus acidoterrestris*; Fe-SOD; gene; cloning; bioinformatics

超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 广泛存在于各种需氧生物体的各组织内, 分为 Cu/Zn-SOD (存在于真核生物中), Mn-SOD (存在于原核生物和真核生物中), Fe-SOD (存在于原核生物和高等植物的叶绿体中) 及 Ni-SOD 四种类型<sup>[1]</sup>。目

收稿日期: 2014-07-10

基金项目: 河南省基础与前沿技术研究计划项目 (142300410137); 河南省高等学校青年骨干教师资助计划项目 (2011GGJS-131)

作者简介: 焦凌霞 (1974-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 赵瑞香 (1966-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术

前已证实该酶与生物体内多种生理过程密切相关, 对人体有重要的保健作用, 不仅与多种疾病的防治有关, 而且具有抗衰老、防止皮肤色素沉着等作用, 在医药、保健品、食品添加剂和化妆品等方面都具有重要的应用价值<sup>[2]</sup>。传统制备 SOD 主要来源于植物组织及动物血液和肝脏, 产量低, 成本高, 稳定性差, 限制了其应用。与常温 SOD 相比, 来源于极端微生物的 SOD 不仅对温度具有更高的抗性, 而且在耐受物理和化学变性剂方面也表现出较高的稳定性<sup>[3]</sup>。因此, 具有耐热耐酸双重特性的微生物及其产生的耐热耐酸 SOD

在食品化工方面有着广阔的应用前景。近年来极端微生物中 SOD 提取及其基因克隆与表达备受国内外学者的青睐<sup>[4-5]</sup>。

酸土脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) 是中度嗜酸耐热菌, 生活在特殊的酸热环境中, 生存能力独特, 能经受酸性条件下的巴氏杀菌过程而存活<sup>[6-7]</sup>, 具有很强的抵抗不良环境的能力。目前, 学者们从该属细菌中分离得到的多种酶类均具有耐酸耐高温特性<sup>[8-10]</sup>, 这些独特性质可以作为设计和改造酶类的依据, 在食品化工生产中极具价值。

本文在前期研究发现酸土脂环酸芽孢杆菌SOD粗酶液具有嗜酸耐热独特性质的基础上, 利用同源克隆和交错式热不对称PCR技术克隆酸土脂环酸芽孢杆菌 (DSM 3922T) Fe-SOD基因并进行了生物信息学分析, 为其进一步在大肠杆菌中诱导表达奠定了理论基础, 以期获得高产耐酸热稳定性Fe-SOD的基因工程菌, 增加新的SOD基因资源, 有效开发和利用酸土脂环酸芽孢杆菌。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

ZR Fungal/Bacterial DNA Kit, ZYMO RESEARCH, Los Angeles, California, USA; pMD-18T 载体, TaKaRa, Dalian, China; DNA 凝胶回收试剂盒, Takara, Dalian, China; TaKaRa LA Taq® DNA Polymerase, TaKaRa, Dalian, China; 其他均为分析纯。

### 1.2 主要仪器

HZP-250 型全温振荡培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; SE-CJ-1F 型单人双面净化工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; ES-315 全自动高压灭菌锅, 日本多美公司; TGL-16B 台式高速离心机, 上海安亭科学仪器厂; 梯度 PCR 仪, Bio-Rad PTC-100; DYY-6C 型电泳仪, 北京市六一仪器厂。

### 1.3 菌株和培养基

酸土脂环酸芽孢杆菌 (*A. acidoterrestris* DSM 3922<sup>T</sup>): 购于德国菌种保藏中心。

AAM 液体培养基: 葡萄糖 2.0 g, 酵母浸粉 2.0 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0 g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 g, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.5 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.4 g, 蒸馏水 1000 mL, 调至 pH 4.0, 121 °C、30 min 灭菌备用。

### 1.4 基因组 DNA 提取

按照 ZR Fungal/Bacterial DNA Kit 说明, 将 50~100 mg 湿菌体加入到 BashingBead™ 裂解管中裂解 5 min, ≥8000 r/min 离心 1 min 取上清置于 Zymo-Spin™ IV 过滤器中过滤得细菌 DNA 粗提液, 加入 DNA 结合缓冲液混匀, 再加入到 Zymo-Spin™ IIC 柱 8000 r/min 离心 1 min。向 Zymo-Spin™ IIC 柱中加入预洗缓冲液, 8000 r/min 离心 1 min; 再加入清洗缓冲液, 8000 r/min 离心 1 min。然后, 向 Zymo-Spin™ IIC 柱的中心滤膜处加入 DNA 洗脱液, 8000 r/min 离心 1 min 即可获得纯 DNA。

### 1.5 引物设计及保守区片段克隆

从 GenBank 搜索几种与酸土脂环酸芽孢杆菌属近缘的细菌 Fe-SOD 氨基酸序列, 利用 ClustalW (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalW/>) 搜索得到 Fe-SOD 基因保守区, 再利用 CODEHOP 软件设计兼并引物 SODbs1、SODbs2 (表 1), 以酸土脂环酸芽孢杆菌基因组为模板扩增 Fe-SOD 保守区基因组片段。PCR 反应条件: 94 °C, 5 min; 94 °C, 30 s; 65 °C, 30 s; 72 °C, 2 min; 30 个循环。切胶回收预期大小的片段经纯化连接 pMD-18 T 载体测序, 序列分析采用 BLAST 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)。

### 1.6 交错式热不对称 PCR (TAIL PCR) 技术

获取 Fe-SOD 基因全长

利用交错式热不对称PCR进行三轮扩增反应获取 SOD基因全长序列。

#### 1.6.1 特异性引物设计

根据已获得的Fe-SOD基因保守区DNA序列, 5'末端和3'末端步移分别设计了三条同向且退火温度较高的特异性引物SODFSP1, SODFSP2, SODFSP3和SODRSP1, SODRSP2, SODRSP3 (表1), 与经过独特设计的四条退火温度较低的兼并引物LAD1-LAD4 (表1) 进行热不对称PCR反应。

#### 1.6.2 TAIL-PCR 扩增反应

TAIL-PCR反应体系:

第一轮PCR (20 μL), 2.0 μL 10×LA PCR buffer, 200 μM each of dNTPs, 1.0 μM SODLAD primers, 0.3 μM FSP1 (5'端) 或 RSP1 (3'端), 0.5 U Ex Taq, 20~30 ng DNA, 加水至 20 μL。

第二轮PCR (25 μL) 2.5 μL PCR buffer, 200 μM

each of dNTPs, 0.3 μM SODAC1, 0.3 μM SODFSP2 (5'端)或RSP2 (3'端), 0.6 U Ex Taq, 1 μL40倍稀释的第一轮PCR产物, 加水至25 μL。

each of dNTPs, 0.3 μM SODAC1, 0.3 μM SODFSP3 (5'端)或RSP3 (3'端), 0.5 U Ex Taq, 1 μL 10倍稀释的第二轮PCR产物, 加水至25 μL。

第三轮PCR (25 μL), 2.5 μL PCR buffer, 200 μM

表 1 Fe-SOD 基因扩增引物

Table 1 Oligonucleotide primers of Fe-SOD gene used in PCR

| Primers | Primer sequence (5'→3') <sup>#</sup>                 |
|---------|------------------------------------------------------|
| SODbs1  | AAAATATTAGAACAGCAGTTAGAAATAATggngngnca               |
| SODbs2  | CAATATATCCGGTCTTCTATTTTGATATTTnarrtartangc           |
| SODAC1  | ACGATGGACTCCAGAG                                     |
| SODLAD1 | ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC(G/C/A)N(GCA)NNNGGAA          |
| SODLAD2 | ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC(G/C/T)N(GCT)NNNGGTT          |
| SODLAD3 | ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC(G/C/A)(G/C/A)N(G/C/A)NNNCCAA |
| SODLAD4 | ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC(G/C/T)(G/A/T)N(G/C/T)NNNCGGT |
| SODFSP1 | CCGAGAACAGGCTTTTTCCCTTCCATCAAC                       |
| SODFSP2 | ACGATGGACTCCAGTCCGGCCAGGTAAATTGGCTGAGGCGATTAATAGC    |
| SODFSP3 | CACCATTTGGCGAGAGCAGCTTCCAGAACAG                      |
| SODRSP1 | CCGAGAACAGGCTTTTTCCCTTCCATCAAC                       |
| SODRSP2 | ACGATGGACTCCAGTCCGGCCAGCCACGCCCAACCACTGCCAAAAGC      |
| SODRSP3 | GTTTGGGAACACGCGTATTATCTCAAATATC                      |
| SODqc1  | GAATTCCTCGAGCAGTGCAGTTTCGTAGTTC                      |
| SODqc2  | GAATTCCTCGAGCAGTGCAGTTTCGTAGTTC                      |

表 2 PCR 反应条件

Table 2 PCR reaction conditions

| 第一轮PCR |       |          | 第二轮PCR |       |          | 第三轮PCR |       |          |
|--------|-------|----------|--------|-------|----------|--------|-------|----------|
| 步骤     | 温度/°C | 时间/min:s | 步骤     | 温度/°C | 时间/min:s | 步骤     | 温度/°C | 时间/min:s |
| 1      | 93    | 2:00     | 1      | 94    | 0:20     | 1      | 94    | 0:20     |
| 2      | 95    | 1:00     | 2      | 65    | 1:00     | 2      | 68    | 1:00     |
| 3      | 94    | 0:30     | 3      | 72    | 3:00     | 3      | 72    | 3:00     |
| 4      | 60    | 1:00     | 4      | 到步骤1  | 1个循环     | 4      | 94    | 0:20     |
| 5      | 72    | 3:00     | 5      | 94    | 0:20     | 5      | 68    | 1:00     |
| 6      | 到步骤3  | 10个循环    | 6      | 68    | 1:00     | 6      | 72    | 3:00     |
| 7      | 94    | 0:30     | 7      | 72    | 3:00     | 7      | 94    | 0:20     |
| 8      | 25    | 2:00     | 8      | 94    | 0:20     | 8      | 50    | 1:00     |
| 9      | 72    | 0.5°C/s  | 9      | 68    | 1:00     | 9      | 72    | 3:00     |
| 10     | 72    | 3:00     | 10     | 72    | 3:00     | 10     | 到步骤1  | 6-7个循环   |
| 11     | 94    | 0:20     | 11     | 94    | 0:20     | 11     | 72    | 5:00     |
| 12     | 58    | 1:00     | 12     | 50    | 1:00     | 12     | 结束    |          |
| 13     | 72    | 3:00     | 13     | 72    | 3:00     |        |       |          |
| 14     | 到步骤11 | 25个循环    | 14     | 到步骤5  | 13个循环    |        |       |          |
| 15     | 72    | 5:00     | 15     | 72    | 5:00     |        |       |          |
| 16     | 结束    |          | 16     | 结束    |          |        |       |          |

1.6.3 序列测定及验证

分别回收第二和第三轮PCR5'端和3'端特异性条带

并测序, 拼接全长序列, 根据测序结果设计特异性引物, 以基因组为模板PCR扩增并测序对实验结果进

行验证。

### 1.7 序列及生物信息学分析

核酸和编码蛋白序列利用 ExPASy Proteomics tools ([http://183 www.expasy.ch/tools/](http://183.www.expasy.ch/tools/))。GenBank 同源搜索利用 BLAST 服务器。氨基酸序列同源比对采用 ClustalW program (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalW/>)。信号肽预测利用 SignalP 4.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)。保守区和特征区搜索利用 ScanProsite (<http://www.expasy.ch/tools/ScanProsite>)。启动子预测 ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html))。

## 2 结果与讨论

### 2.1 基因组 DNA 提取

取50 μL冻存于-80 °C的酸土脂环酸芽孢杆菌甘油保藏菌种接种于50 mL AAM液体培养基, 45 °C 220 r/min培养16 h, 12000 r/min离心获取新鲜菌体, 按照真菌/细菌DNA提取试剂盒说明进行基因组DNA提取, 实验结束后取5 μL DNA进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图1所示, 所得DNA完整, 纯度高。

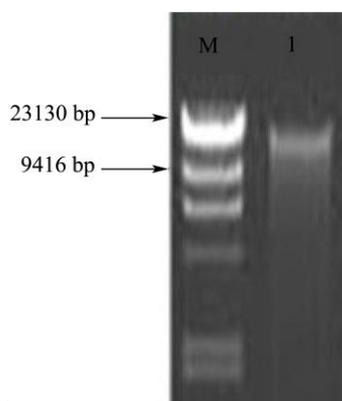


图1 基因组 DNA 电泳图

Fig.1 Electrophoresis detection of genomic DNA

注: M: λ-Hind III digest, 1: 基因组 DNA。

### 2.2 Fe-SOD 基因保守区片段克隆

利用degenerate PCR从基因组DNA扩增得到约280 bp大小的片断, PCR产物亚克隆进pMD-18 T载体并测序。序列经GenBank blast比对分析, 推测氨基酸序列与来源于酸热脂环酸芽孢杆菌 DSM 446 的 Fe-SOD (ACV58017.1)序列相似性最高, 为78%。

### 2.3 Fe-SOD 基因全长克隆及核苷酸序列分析

3'端未知侧翼序列获取: 第一轮3'末端扩增以1 μL

基因组DNA为模板, 分别采用兼并引物LAD1, LAD2, LAD3, LAD4和特异引物SODRSP1 (表1) 进行反应; 第二轮以1 μL 40倍稀释的第一轮PCR产物 (LAD1-RSP1, LAD2-RSP1, LAD3-RSP1, LAD4-RSP1) 为模板, 采用SODAC1和SODRSP2进行反应; 第三轮以1 μL 10倍稀释的第二轮PCR产物为模板 (SODAC1-SODRSP2/LAD1-RSP1, SODAC1-SODRSP2/LAD2-RSP1, SODAC1-SODRSP2/LAD3-RSP1, SODAC1-SODRSP2/LAD4-RSP1), 采用SODAC1和SODRSP3进行扩增反应获取SOD基因3'端侧翼序列。取第二、三轮的PCR产物各5 μL进行琼脂糖凝胶电泳, 结果见图3。

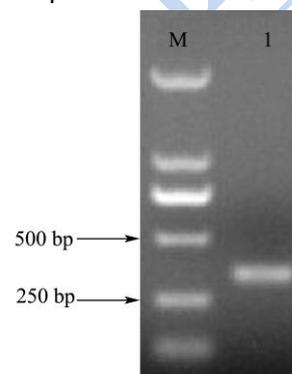


图2 Fe-SOD 基因保守区序列克隆

Fig.2 Electrophoresis detection of conserved region of SOD gene

注: M: DNA marker DL2000, 1: Fe-SOD 保守区片段。

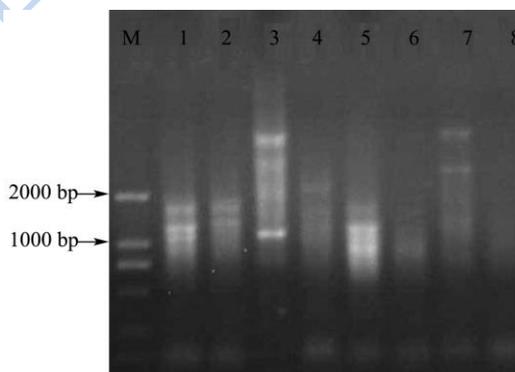


图3 3'端未知侧翼序列 PCR 产物

Fig.3 PCR product 3' of end of unknown flanking sequences

注: M: DL2000, 1-4: 第二轮 PCR 产物, 5-8: 第三轮 PCR 产物。

凝胶回收第二轮以LAD3-RSP1为模板的PCR扩增产物, 经测序分析与保守区序列相比对, 结果符合要求。

5'端未知侧翼序列获取: 以1 μL基因组DNA为模板, 5'末端步移参照3'端扩增方法, 分别采用兼并引物LAD1, LAD2, LAD3, LAD4和特异引物SODFSP1, SODFSP2, SODFSP3 (表 1) 进行扩增反应获取5'端SOD基因侧翼序列。取第二、三轮的PCR产物各5 μL进行琼脂糖凝胶电泳, 结果见图4。

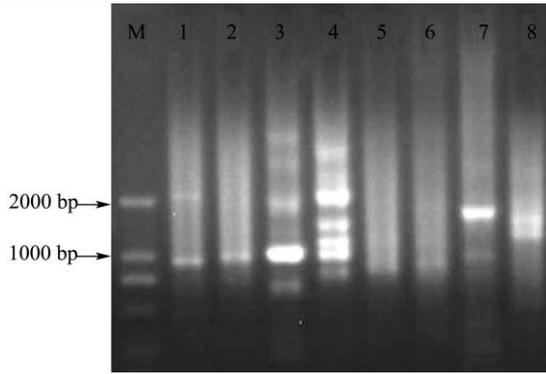


图4 5'端未知侧翼序列 PCR 产物

Fig.4 PCR product of 5' end of unknown flanking sequences

注: M: DL2000, 1-4: 第二轮 PCR 产物, 5-8: 第三轮 PCR 产物。

凝胶回收第二轮以LAD3-FSP1为模板的PCR扩增产物, 经测序分析并与保守区序列相比对, 结果符合要求。

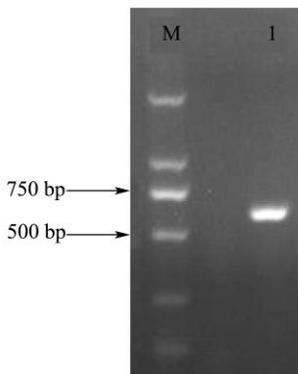


图5 SOD 基因全序列验证

Fig.5 Whole sequence validation of SOD gene

注: M: DNA Marker DL2, 000, 1: SOD 基因全序列 PCR 产物。

全序列验证: 以 1 μL 基因组 DNA 为模板, 以 SODqc1/SODqc2 (表1) 为引物, PCR 扩增验证全序列。取 5 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 结果见图5。

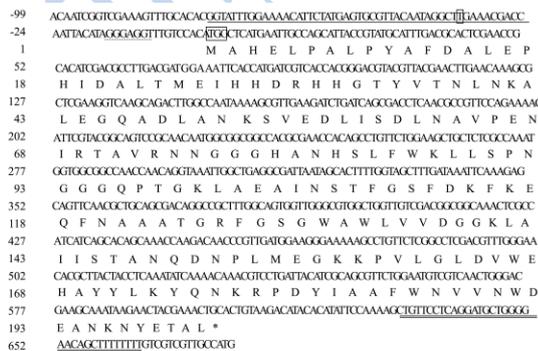


图6 A. acidoterrestis Fe-SOD 核酸及编码氨基酸序列  
Fig.6 The nudeotide and deduced amino acidsequences of Fe-SOD gene for A.acidoterrestis

Note: The promoter is single underlined; the transcription start site and translation initiation site are boxed respectively; the terminator is double underlined; the ribosome binding site is dotted line.

凝胶回收目的片段进行测序及序列分析, 证实所获得的 3'端及 5'端是在同一条链上, 基因大小与 GenBank 中同源蛋白基本一致。

测序结果显示, 经TAIL-PCR得到一含完整开放阅读框(ORF)的基因片段(GenBank序列号: JN614998), 其ORF全长606 bp, 编码202个氨基酸(图6)。起始密码子上游-25 bp预测到一启动子, 转录起始位点为-35 bp的T, -10 bp处有一核糖体结合位点; 3'末端有一富含U的依赖ρ因子终止子。

### 2.4 SOD 氨基酸序列分析

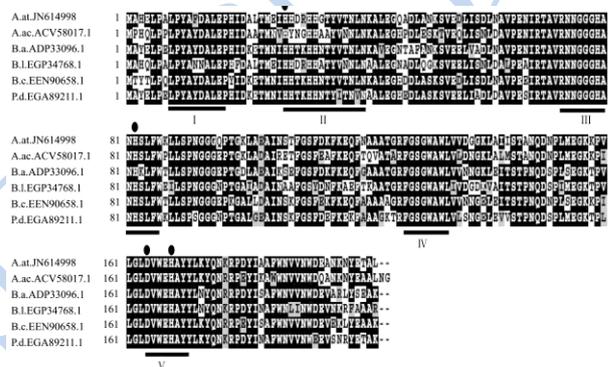


图7 A. acidoterrestis Fe-SOD 氨基酸序列同源比对分析

Fig.7 Multiple alignment of amino acid sequences for A.acidoterrestis Fe-SOD and other SOD

Note: Numbers on the left are the residue number of the first amino acid acid in each line; abbreviations and accession numbers of those SODs are as follows: Alicyclobacillus acidoterrestis DSM 3922 (A. at. JN614998), Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. acidocaldarius DSM 446 (A. ac. ACV58017.1), Bacillus atropheus 1942 (B. a. ADP33096.1), Brevibacillus laterosporus LMG 15441 (B. l. EGP34768.1), Bacillus coagulans 36D1 (B. c. EEN90658.1), Planococcus donghaensis MPA1U2 (P. d. EGA89211.1); identical residues are shaded in black, and conserved residues are shaded in gray; the conserved motif is underlined; the metal-binding site (i.e., His 27, His 82, His 168 and Asp 164) are identified by dot.

蛋白搜索结果表明, 酸土脂环酸芽孢杆菌Fe-SOD与来源于酸热脂环酸芽孢杆菌DSM 446的Fe-SOD(ACV58017.1)氨基酸序列相似度最高, 为78%。单亚基的3-90个氨基酸组成SOD的N端α-螺旋发夹结构域; 95-198个氨基酸组成SOD的C端α/β结构域。整个蛋白序列含有Fe/MnSODs家族典型的5个模体(motif)(图7)。motif II、motif III和motif V分别提供金属离子结合配基 His 27、His 82、His 168和Asp 164, 其中motif V为活性

位点,基本组成为D-x-[WF]-E-H-[STA]-[FY], D和H参与金属离子结合,具有Fe/MnSODs家族典型的蛋白结构特征。SignalP分析没有信号肽,说明酸土脂环酸芽孢杆菌Mn-SOD基因编码的蛋白是非分泌型的蛋白,预测pI 5.67,分子量22.343 ku。

表3 酸土脂环酸芽孢杆菌超氧化物歧化酶 Fe-SOD 的氨基酸组成

Table 3 Composition of amino acid of *A. acidoterrestriis* Iron

| superoxide dismutase |       |       |        |
|----------------------|-------|-------|--------|
| 氨基酸组成                | 氨基酸性质 | 氨基酸数量 | 所占比例/% |
| A (Ala)              | 疏水性   | 24    | 11.88  |
| C (Cys)              | 亲水性   | 0     | 0      |
| D (Asp)              | 亲水性   | 12    | 5.94   |
| E (Glu)              | 亲水性   | 12    | 5.94   |
| F (Phe)              | 疏水性   | 8     | 3.96   |
| G (Gly)              | 亲水性   | 17    | 8.42   |
| H (His)              | 亲水性   | 9     | 4.46   |
| I (Ile)              | 疏水性   | 8     | 3.96   |
| K (Lys)              | 亲水性   | 12    | 5.94   |
| L (Leu)              | 疏水性   | 20    | 9.90   |
| M (Met)              | 疏水性   | 3     | 1.49   |
| N (Asn)              | 亲水性   | 18    | 8.91   |
| P (Pro)              | 疏水性   | 9     | 4.46   |
| Q (Gln)              | 亲水性   | 5     | 2.48   |
| R (Arg)              | 亲水性   | 5     | 2.48   |
| S (Ser)              | 亲水性   | 8     | 3.96   |
| T (Thr)              | 亲水性   | 9     | 4.46   |
| V (Val)              | 疏水性   | 10    | 4.95   |
| W (Trp)              | 疏水性   | 6     | 2.97   |
| Y (Tyr)              | 亲水性   | 7     | 3.47   |

Fe/MnSODs家族包括单一金属和“变化”SOD (cambialistic SOD),后者可分别利用Mn、Fe作为辅因子,Fe/MnSODs一般多含2个或4个亚基即二聚体和四聚体,单体一般由N端5个 $\alpha$ -螺旋和C端的5个 $\alpha$ -螺旋及3个 $\beta$ -折叠组成<sup>[11]</sup>。不同生物来源的Mn-SOD和Fe-SOD的氨基酸序列同源性都很高,均不同于Cu/Zn-SOD序列,推测它们来自于一个共同的祖先<sup>[12-13]</sup>,同时在氨基酸组成上富含酪氨酸和色氨酸,不含半胱氨酸,与Cu/Zn-SOD的富含甘氨酸,没有或含有很少酪氨酸和色氨酸的氨基酸组成具有重要区别<sup>[14]</sup>。根据推测的酸土脂环酸芽孢杆菌Fe-SOD的氨基酸序列,我们分析了其氨基酸组成(表3),富含酪氨酸和色氨酸,不含半胱氨酸,具有Fe/Mn-SOD氨基酸组成的特征,亲水性氨基酸占48.02%,疏水性氨基酸占

39.60%。

不同来源的Mn-SOD和Fe-SOD的分子结构都具有较高的同源性,参与构成活性中心的金属离子及与金属连接的氨基酸一般都是高度保守的<sup>[11]</sup>。它们的活性中心都含有保守的3个His残基和1个ASP残基与金属离子结合,以及1个H<sub>2</sub>O,最终形成“DVWEHAYY”的保守结构<sup>[15]</sup>。对酸土脂环酸芽孢杆菌Fe-SOD氨基酸的序列进行分析发现,整个蛋白序列含有Fe/MnSODs家族典型的5个模体,具有Fe/MnSODs家族典型的蛋白结构特征。

近年来,对SOD的深入研究已充分证明其具有广泛的药用价值和良好的开发前景,作为线粒体的基质酶,在抗衰老、提高细胞对氧应激反应的耐受性及抑制肿瘤发生等方面发挥了重要作用。因此,寻找一种高效、经济、大规模的制备方法,获取新的SOD基因资源已成为国内外众多学者的关注的课题。目前,常温SOD酶的高级结构已经揭示。随着对极端微生物的研究发现,具有特殊环境耐受性的极端酶比常温酶具有不可比拟的优越性,已经成为研究酶的进化、酶的稳定性和活性机理、蛋白结构与功能的关系以及极端环境中的生物催化等问题的模型。

### 3 结论

3.1 本文利用同源克隆和TAIL-PCR技术获取了酸土脂环酸芽孢杆菌(*A. acidoterrestriis* DSM 3922<sup>T</sup>)Fe-SOD基因的编码序列(GenBank登录号为:JN614998),其ORF全长606bp,编码202个氨基酸,总分子量为22.343 kDa,理论等电点为5.67,推测氨基酸序列与来源于酸热脂环酸芽孢杆菌DSM 446的SOD(ACV58017.1)序列相似性最高,为78%。酸土脂环酸芽孢杆菌Fe-SOD含有Fe/MnSODs家族典型的5个模体,活性中心含有金属离子结合配基His27、His82、His168和Asp164,具有Fe/MnSODs家族典型的蛋白结构特征。

3.2 酸土脂环酸芽孢杆菌独特的耐酸热抗性代表着生命对环境的适应能力,是筛选新型极端酶类的重要菌种资源。酸土脂环酸芽孢杆菌Fe-SOD基因的克隆和生物信息学分析为进一步构建原核表达载体、获得基因工程菌株奠定基础。

### 参考文献

- [1] Fink R C, Scandalios J G. Molecular evolution and structure-function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2002, 399(1): 19-36

- [2] Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health [J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2005, 26(4-5): 340-352
- [3] Haki G D, Rakshit S K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review [J]. *Bioresource Technology*, 2003, 89(1): 17-34
- [4] Dolashka P, Moshtanska V, Dolashki A et al. Structural analysis and molecular modeling of the Cu/Zn-SOD from fungal strain *Humicola lutea* 103 [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2011, 83(1): 67-73
- [5] 李鹤宾,洪璇,黄秀梅.近海温泉中嗜热菌*Geobacillus sp.* ZH1 锰超氧化物歧化酶的克隆与表达[J].*台湾海峡*,2012,31(3): 375-379  
LI He-bin, HONG Xuan, HUANG Xiu-mei. Cloning and expression of manganese-containing superoxide dismutase from offshore hot spring *Geobacillus sp.* ZH1 [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2012, 31(3): 375-379
- [6] Cerny G, Hennlich W and Poralla K. Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterization of the spoiling microorganism [J]. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 1984, 179(3): 224-227
- [7] McKnight I C, Eiroa M N U, Sant Ana A S, et al. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in pasteurized exotic Brazilian fruit juices: Isolation, genotypic characterization and heat resistance [J]. *Food Microbiology*, 2010, 27(8): 1016-1022
- [8] Schwermann B, Pfau K, Liliensiek B, et al. Purification, properties and structural aspects of a thermoacidophilic alpha-amylase from *Alicyclobacillus acidocaldarius* ATCC 27009 [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 226(3): 981-991
- [9] Bai Y, Wang J, Zhang Z et al. A new xylanase from thermoacidophilic *Alicyclobacillus sp.* A4 with broad-range pH activity and pH stability [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2010, 37(2): 187-194
- [10] Mandrich L, Merone L, Manco G. Structural and kinetic overview of the carboxylesterase EST2 from *Alicyclobacillus acidocaldarius*: a comparison with the other members of the HSL family [J]. *Protein and Peptide Letter*, 2009, 16(10): 1189-1200
- [11] Parker M W, Blake C C. Iron- and manganese- containing superoxide dismutases can be distinguished by analysis of their primary structures [J]. *FEBS Letters*, 1988, 299(2): 377-382
- [12] Beyer W, Imlay J, Fridovich I. Superoxide dismutase [J]. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 1991, 40: 221-253
- [13] 张艳红,廖晓全,袁勤生.人锰超氧化物歧化酶(hMnSOD)的研究进展[J].*药物生物技术*,2001,8(6):352-356  
ZHANG Yan-hong, LIAO Xiao-quan, YUAN Qin-sheng. Progress in the Studies of Human Manganese Superoxide Dismutase [J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2001, 8(6): 352-356
- [14] 郭芳先.嗜热毛壳菌热稳定超氧化物歧化酶的纯化及基因克隆和表达[D].泰安:山东农业大学,2007  
GUO Fang-xian. Purification, gene cloning and expression of thermostable SOD from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum* [D]. Taian: ShanDong Agricultural University, 2007
- [15] Liu Y D, Gao J, Qiu G Z, et al. Expression, purification and molecular modeling of iron-containing superoxide dismutase from *Acidithiobacillus ferrooxidans* [J]. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 2008, 18(6): 1361-1366