



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113005131 A

(43) 申请公布日 2021.06.22

(21) 申请号 202110427907.6

(22) 申请日 2021.04.21

(71) 申请人 山西大学

地址 030006 山西省太原市坞城路92号

(72) 发明人 吴海花 刘静 张学尧 张建珍  
马恩波

(74) 专利代理机构 太原申立德知识产权代理事  
务所(特殊普通合伙) 14115

代理人 程园园

(51) Int. Cl.

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

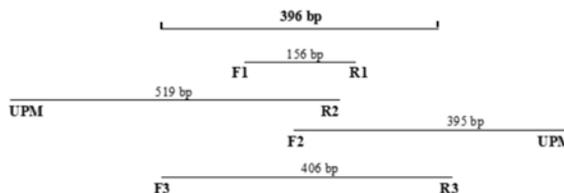
权利要求书1页 说明书5页  
序列表2页 附图3页

(54) 发明名称

一种只包含Cu的SOD基因及编码的蛋白质和其应用

(57) 摘要

本发明属于基因工程领域,具体涉及一种只包含Cu的SOD基因及编码的蛋白质和其应用。所述基因来源于中华稻蝗,命名为Cu-only SOD基因,其核苷酸序列为SEQ ID NO:1所示的序列,其编码的蛋白质的氨基酸序列为SEQ ID NO:2所示的序列,该蛋白质为超氧化物歧化酶。本发明通过基因克隆技术克隆出该基因序列,基于其氨基酸序列对该蛋白的空间结构进行模拟,发现该蛋白中缺少Zn原子,只包含一个Cu原子,这是首次报道的存在于细胞内的Cu-only SOD。利用基因工程技术构建原核表达载体并进行蛋白的分离纯化,在体外对其功能进行研究,发现该蛋白具有抗氧化功能。



1. 一种只包含Cu的SOD基因,其特征在于,所述基因来源于中华稻蝗,其序列如SEQ ID NO:1所示。
2. 一种由权利要求1所述基因编码的蛋白质,其特征在于,所述蛋白质的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,该蛋白质为超氧化物歧化酶。
3. 一种含有权利要求1所述基因的载体,其特征在于,所述载体为原核细胞表达载体。
4. 根据权利要求3所述的载体,其特征在于,所述原核细胞表达载体为pCold I表达载体。
5. 一种含有权利要求1所述基因的基因工程细胞,其特征在于,所述基因工程细胞为大肠杆菌细胞。
6. 一种如权利要求2所述蛋白质的应用,其特征在于,应用在制备自由基清除的产品。

## 一种只包含Cu的SOD基因及编码的蛋白质和其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于基因工程领域,具体涉及一种只包含Cu的SOD基因及编码的蛋白质和其应用。

### 背景技术

[0002] 超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)是一种广泛存在于生物体内的金属蛋白酶,它能够清除生物氧化过程中产生的超氧阴离子自由基( $\cdot O_2^-$ ),是生物体有效清除活性氧的重要抗氧化酶类之一,被称为生物体抗氧化系统的第一道防线。研究发现,SOD在人体的衰老和死亡中发挥着重要作用,有很多疾病的发生与发展均与SOD密切相关,补充SOD可以达到预防和治疗各种疾病、延缓衰老的目的。SOD在多种环境胁迫中发挥着重要的生物学功能,如抵抗重金属、化学污染物、温度、水分、盐分、辐射等产生的氧化胁迫。SOD被广泛地应用于食品、化妆品、日用品、疾病治疗等多方面,因此,SOD在生物抗氧化中的作用越来越受到重视。

[0003] SOD根据与其结合且发挥作用的金属离子的种类,可分为CuZnSOD、MnSOD、FeSOD和NiSOD四大类。CuZnSOD由两个相同的亚基组成,亚基之间通过非共价的疏水作用来相互缔合,肽链内部形成的分子内二硫键对亚基缔合起着重要的作用。每个亚基活性中心包括一个Cu原子和一个Zn原子,Cu参与电子传递,它的存在是CuZnSOD活性所必须的,而Zn与保持酶活性中心构象相关,不直接与超氧阴离子自由基作用,起到稳定活性中心周围环境的作用。

[0004] 近年来,越来越多的CuZnSOD基因及其编码的蛋白质被发现,但是,只包含Cu的SOD基因较少。本发明在中华稻蝗中发现了一种只包含Cu的SOD基因及其蛋白质。该蛋白是否具有清除自由基的功能,本发明运用基因工程技术体外表达并分离纯化该蛋白质,对其功能进行了研究,发现该蛋白具有抗氧化功能。

### 发明内容

[0005] 针对上述问题本发明提供了一种只包含Cu的SOD基因及编码的蛋白质和其应用。

[0006] 为了达到上述目的,本发明采用了下列技术方案:

[0007] 本发明提供的只包含Cu的SOD基因来源于中华稻蝗,其名称为Cu-only SOD,所述Cu-only SOD的基因序列如SEQ ID NO:1所示。该基因序列以中华稻蝗cDNA为模板,通过简并引物获得部分片段,接着通过RACE-PCR方法获得全长,最后利用特异引物进行PCR扩增、克隆测序验证全长序列。

[0008] 一种由上述Cu-only SOD基因编码的蛋白质,其氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,该蛋白质为超氧化物歧化酶,具有抗氧化的功能。

[0009] 一种含有上述Cu-only SOD基因的载体,所述载体为原核细胞表达载体。

[0010] 进一步,所述原核细胞表达载体为pCold I表达载体。

[0011] 一种含有上述Cu-only SOD基因的基因工程细胞,所述基因工程细胞为大肠杆菌

细胞。

[0012] 一种上述Cu-only SOD基因编码的蛋白质的应用,应用在制备自由基清除的产品。

[0013] 与现有技术相比本发明具有以下优点:

[0014] CuZnSOD由两个相同的亚基组成,每个亚基活性中心包括一个Cu原子和一个Zn原子。本发明在中华稻蝗体内发现一种只包含Cu的SOD基因及其蛋白质,该蛋白缺少Zn原子,只包含一个Cu原子。功能研究发现该蛋白具有抗氧化活性。此蛋白为细胞内Cu-only SOD,未在任何物种中报道过只包含Cu的细胞内SOD。

[0015] 本发明只包含Cu的SOD具有抗氧化功能及SOD特性,能够被应用到医药、食品、化妆品、保健品等行业,具有广阔的市场应用前景。

## 附图说明

[0016] 图1为实施例1中Cu-only SOD基因引物设计;

[0017] 图2为实施例1中Cu-only SOD基因全长验证的PCR产物凝胶电泳图;

[0018] 图3为实施例1中Cu-only SOD基因翻译后氨基酸序列的一级结构示意图;

[0019] 图4为实施例2中Cu-only SOD蛋白空间结构模拟图;

[0020] 图5为实施例5中Cu-only SOD蛋白的功能验证图。

## 具体实施方式

[0021] 实施例1:中华稻蝗Cu-only SOD基因序列获得

[0022] 1、中华稻蝗Cu-only SOD基因保守区序列获得

[0023] 根据已公布的其它昆虫物种的CuZnSOD基因序列设计简并引物,位置、长度如图1所示,引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,其引物的序列如下所示:

[0024] 上游引物序列如SEQ ID NO:3所示:

[0025] TTYCAYGTNCAYGARTTYGG;

[0026] 下游引物序列如SEQ ID NO:4所示:

[0027] CKNGCNCCNGCRRTNCC;

[0028] 选取活力良好、大小均匀的中华稻蝗5龄若虫雌雄虫各5头(田间采集4龄若虫实验室内饲养到5龄若虫),迅速于液氮中冷冻,于-80℃中低温保存。根据Trizol试剂盒(TaKaRa公司)说明书的方法提取中华稻蝗整虫的总RNA。采用M-MLV反转录酶(TaKaRa公司)将总RNA反转录成cDNA。以此为模板,利用已合成的简并引物(图1),通过PCR扩增仪进行PCR扩增,并连接、转化、测序,获得Cu-only SOD基因的保守区序列片段。

[0029] 2、中华稻蝗Cu-only SOD基因5'和3'序列获得

[0030] 根据已获得的保守区片段设计3'和5'RACE特异引物(图1),引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,其引物序列如下所示:

[0031] 上游引物序列如SEQ ID NO:5所示:

[0032] AGACCACAACGTCATTGGCCGCAC;

[0033] 下游引物序列如SEQ ID NO:6所示:

[0034] TTCCCAGGTCGTCAGGGTCA;

[0035] 根据PolyAtract®mRNA Isolation Systems试剂盒(Promega公司)说明书分离

mRNA。根据SMARTTM RACE cDNA Amplification kit (Promega公司)说明书合成5'和3'-RACE-Ready cDNA。按照Advantage® 2 Polymerase (Promega公司)说明书的扩增反应体系和反应条件进行Cu-only SOD基因5'和3'末端cDNA序列的扩增,并连接、转化、测序,获得Cu-only SOD基因的5'和3'端序列。

[0036] 3、中华稻蝗Cu-only SOD基因全长序列验证

[0037] 对已获得的Cu-only SOD基因的保守区序列、5'和3'端序列进行拼接,然后设计验证全长序列的特异引物,其序列如下所示:

[0038] 上游引物序列如SEQ ID NO:7所示:

[0039] TTATATTTTCAGACATGACTATYAAAGCAG;

[0040] 下游引物序列如SEQ ID NO:8所示:

[0041] CGCCTTCATGCCTTGCAATGCCGATCA;

[0042] 通过PCR扩增仪进行PCR扩增,凝胶电泳检测(图2),然后连接、转化、测序,验证Cu-only SOD基因的全长序列,其序列为SEQ ID NO:1。利用 ExPASy-Translate tool (<https://www.expasy.org/translate>)将中华稻蝗Cu-only SOD基因序列翻译成氨基酸序列,其序列为SEQ ID NO:2,该基因编码131个氨基酸。Cu-only SOD蛋白的特征序列和N-糖基化位点分别利用PROSITE数据库 (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>)和NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)预测,该蛋白包含2个特征序列,4个Cu结合位点,2个Zn结合位点,无糖基化位点(图3)。

[0043] 实施例2:中华稻蝗Cu-only SOD蛋白的空间结构模拟

[0044] 利用SWISS-MODEL软件 (<http://www.swissmodel.expasy.org/>)和家蚕CuZnSOD蛋白(PDB IDs:319y.1.A)为模板,对中华稻蝗Cu-only SOD蛋白的空间结构进行模拟。空间结构显示,该蛋白中不包括Zn原子,只包含一个Cu原子,包含6个反向平行的β折叠和2个α螺旋(图4)。

[0045] 实验例3:中华稻蝗Cu-only SOD蛋白重组表达载体的构建

[0046] 根据已验证的全长序列设计上游带BamH I和下游带Hind III酶切位点的蛋白表达引物,从已测序确证全长序列的菌液中提取质粒。以质粒为模板,带酶切位点的蛋白表达引物进行PCR扩增,扩增产物经电泳检测后,切胶进行胶回收,将回收产物连接到pEASY-T3载体上(全氏金公司),转化入大肠杆菌感受态细胞Trans-T1(全氏金公司)中,并涂布于含有100mM IPTG、20ng/mL X-gal和100μg/mL氨苄青霉素的LB固体培养基平板上,37℃过夜培养,进行蓝白斑筛选。挑取白斑接种到含有100μg/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中,37℃过夜培养,由生工生物工程(上海)有限公司测序,确定序列的正确性。

[0047] 从测序确证序列的菌液中提取质粒,用BamH I和Hind III内切酶(NEB公司)酶切带目的基因的质粒及pCold I蛋白表达载体,电泳检测酶切产物,切胶并进行胶回收。用T4连接酶(全氏金公司)将经酶切的目的基因和蛋白表达载体进行连接,构建重组质粒,然后转化入大肠杆菌感受态细胞Trans-T1(全氏金公司)中,并涂布于含有100μg/mL氨苄青霉素的LB固体培养基平板上,37℃过夜培养。挑取阳性克隆接种到含有100μg/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中,37℃过夜培养,由生工生物工程(上海)有限公司测序,确定序列的正确性。

[0048] 从测序确证序列的菌液中提取重组质粒,将重组质粒转化入感受态细胞BL21

(DE3) (全氏金公司) 中, 并涂布于含有100 $\mu$ g/mL氨苄青霉素的LB固体培养基平板上, 37 $^{\circ}$ C过夜培养, 挑取阳性克隆接种到含有100 $\mu$ g/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C过夜培养。

[0049] 实施例4: 中华稻蝗Cu-only SOD蛋白的原核表达及纯化

[0050] 1、中华稻蝗Cu-only SOD蛋白的原核表达及鉴定

[0051] 取50 $\mu$ L已将目的基因重组质粒转入到BL21 (DE3) 感受态细胞的菌液于 5mL新鲜的含有100 $\mu$ g/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C培养至菌液 OD<sub>600</sub>为0.6时, 加入终浓度为0.4mM的IPTG, 在16 $^{\circ}$ C、200rpm条件下进行低温诱导, 经14h诱导目的蛋白的表达。

[0052] 在低温冷冻离心机中离心收集已诱导的菌体, 加入含有0.1M NaCl和5%甘油的20mM Tris-HCl (pH 8.0) 裂解液, 在冰上对菌体进行超声破碎, 在4 $^{\circ}$ C、12000g离心10min, 收集上清。制备5%浓缩胶和12%分离胶的聚丙烯酰胺凝胶, 将收集的上清液95 $^{\circ}$ C变性, 上样, 电泳, 拍照, 对凝胶上的电泳条带进行鉴定后为Cu-only SOD蛋白。

[0053] 2、中华稻蝗Cu-only SOD蛋白的分离纯化

[0054] 按照实施例4第1步中的方法诱导500mL菌液, 离心收集菌体, 冰上超声破碎, 低温离心收集上清。将上清液用20mLNi<sup>2+</sup>柱纯化, 100mM咪唑洗脱, 收集洗脱液。洗脱液用2mM Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液4 $^{\circ}$ C过夜透析, 再用超滤离心管低温浓缩, 得到纯化后的蛋白。蛋白含量为2.0mg/mL, 活性为25.2 U/mg蛋白。

[0055] 实施例5: 中华稻蝗Cu-only SOD蛋白的功能验证

[0056] 制备不含抗生素的LB固体培养基平板。将平板于37 $^{\circ}$ C预热30min, 取150  $\mu$ L实施例4第2步中纯化的蛋白滴加于平板上, 对照平板中滴入等体积的2mM Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液, 均匀涂布, 置于37 $^{\circ}$ C培养箱中30min, 让液体充分吸收。设置3个生物学重复。然后取100 $\mu$ L大肠杆菌滴于平板上, 涂布均匀, 置于37 $^{\circ}$ C培养箱中培养1h。最后在平板中放入两块直径6mm已灭菌的滤纸, 在滤纸上分别滴加8 $\mu$ L 5%和15%的过氧化氢溶液, 先将平板正置于37 $^{\circ}$ C培养箱中培养1h, 然后将平板倒置过夜培养。用扫描仪扫描平板, 用直尺量取抑菌圈的直径, 进行统计学分析(图5)。结果显示在15%过氧化氢的胁迫下, 加入纯化的Cu-only SOD蛋白的抑菌圈直径显著小于对照组, 表明该Cu-only SOD 蛋白具有抗氧化功能。

序列表

SEQ ID NO: 1:

atgactattaaagcagtttgcgtgctgaacggggaacaggtgaaaggaacagttcactttgagcaagaggggtcgaattct  
cctgttaaagtaactggagaaataactggcttgacaaagggctctgcatggttccatgtacatgaattgggtataacacaaa  
cggctgcatgagtgccgggtgcacattcaacccacacagcaaggaccacgcaggccccgaggattcggacaagattatc  
tctctaccggagaccacaacgtcattggccgcactcttggtgacgctgaccctgacgacctgggacgtggtggaca  
cgagctgagcaagacgactggcaatgccggggcgcgcgtgcctgtgggggtgatcggcattccaaggcatga

SEQ ID NO: 2:

Met Thr Ile Lys Ala Val Cys Val Leu Asn Gly Glu Gln Val Lys Gly Thr Val His Phe  
Glu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Pro Val Lys Val Thr Gly Glu Ile Thr Gly Leu Thr Lys  
Gly Leu His Gly Phe His Val His Glu Phe Gly Asp Asn Thr Asn Gly Cys Met Ser Ala  
[0057] Gly Ala His Phe Asn Pro His Ser Lys Asp His Ala Gly Pro Glu Asp Ser Asp Lys Ile  
Ile Ser Leu Thr Gly Asp His Asn Val Ile Gly Arg Thr Leu Val Val His Ala Asp Pro  
Asp Asp Leu Gly Arg Gly Gly His Glu Leu Ser Lys Thr Thr Gly Asn Ala Gly Ala Arg  
Val Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile Ala Lys Ala

SEQ ID NO: 3:

ttycaygtncaygarttygg

SEQ ID NO: 4:

ckngcncngcrttncc

SEQ ID NO: 5:

agaccacaacgtcattggccgcac

SEQ ID NO: 6:

ttcccaggtcgtcagggtca

SEQ ID NO: 7:

ttatatttcagacatgactatyaagcag

[0058]

SEQ ID NO: 8:

cgcttcacgcttggaatgccgatca

## 序列表

<110>	山西大学	
<120>	一种只包含Cu的SOD基因及编码的蛋白质和其应用	
<160>	8	
<170>	SIPOSequenceListing 1.0	
<210>	1	
<211>	396	
<212>	DNA	
<213>	中华稻蝗 ( <i>Oxya chinensis</i> )	
<400>	1	
	atgactatta aagcagtttg cgtgctgaac ggtgaacagg tgaaggaac agttcacttt	60
	gagcaagagg gtgcgaattc tctgttaaa gtaactggag aaataactgg cttgacaaag	120
	ggtctgcatg gtttccatgt acatgaattt ggtgataaca caaacggctg catgagtgcg	180
	ggtgcacatt tcaaccaca cagcaaggac cacgcaggcc ccgaggattc ggacaagatt	240
	atctctctca ccggagacca caacgtcatt ggccgcactc ttgtggtgca cgctgaccct	300
	gacgacctgg gacgtggtgg acacgagctg agcaagacga ctggcaatgc cggggcgcgc	360
	gtgcctgtg gggatgatcgg cattgccaag gcatga	396
<210>	3	
<211>	131	
<212>	PRT	
<213>	中华稻蝗 ( <i>Oxya chinensis</i> )	
<400>	3	
	Met Thr Ile Lys Ala Val Cys Val Leu Asn Gly Glu Gln Val Lys Gly	
	1                  5                  10                  15	
	Thr Val His Phe Glu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Pro Val Lys Val Thr	
	20                  25                  30	
	Gly Glu Ile Thr Gly Leu Thr Lys Gly Leu His Gly Phe His Val His	
	35                  40                  45	
	Glu Phe Gly Asp Asn Thr Asn Gly Cys Met Ser Ala Gly Ala His Phe	
	50                  55                  60	
	Asn Pro His Ser Lys Asp His Ala Gly Pro Glu Asp Ser Asp Lys Ile	
	65                  70                  75                  80	
	Ile Ser Leu Thr Gly Asp His Asn Val Ile Gly Arg Thr Leu Val Val	
	85                  90                  95	
	His Ala Asp Pro Asp Asp Leu Gly Arg Gly Gly His Glu Leu Ser Lys	
	100                  105                  110	
	Thr Thr Gly Asn Ala Gly Ala Arg Val Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile	
	115                  120                  125	

Ala Lys Ala	
130	
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 3	
ttycaygtnc aygarttygg	20
<210> 4	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 4	
ckngcncng crttncc	17
<210> 5	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 5	
agaccacaac gtcattggcc gcac	24
<210> 9	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 9	
ttcccaggtc gtcagggtca	20
<210> 7	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 7	
ttatatttca gacatgacta tyaaagcag	29
<210> 8	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 8	
cgccttcatg ccttggaat gccgatca	28

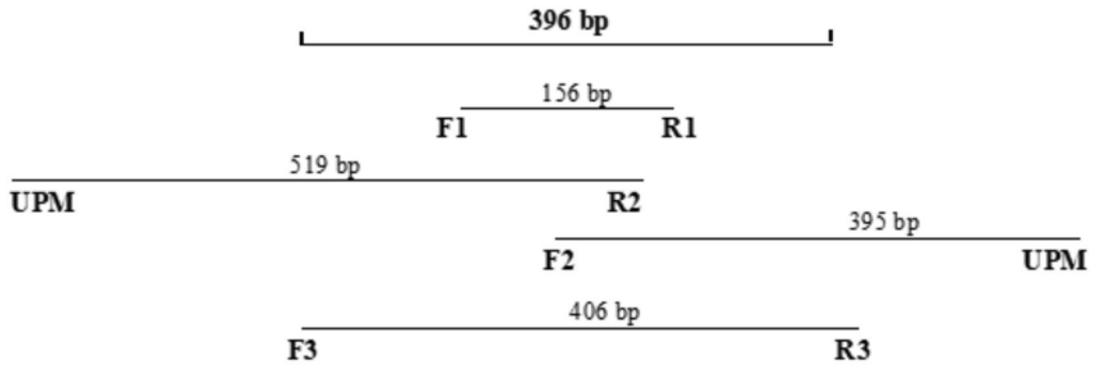


图1

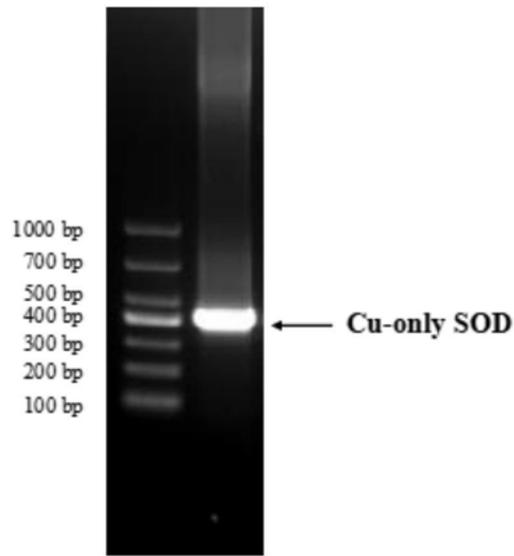


图2

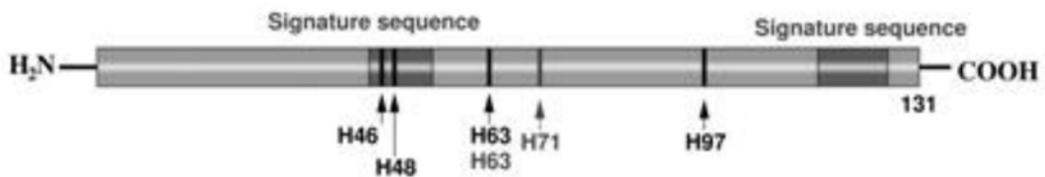


图3

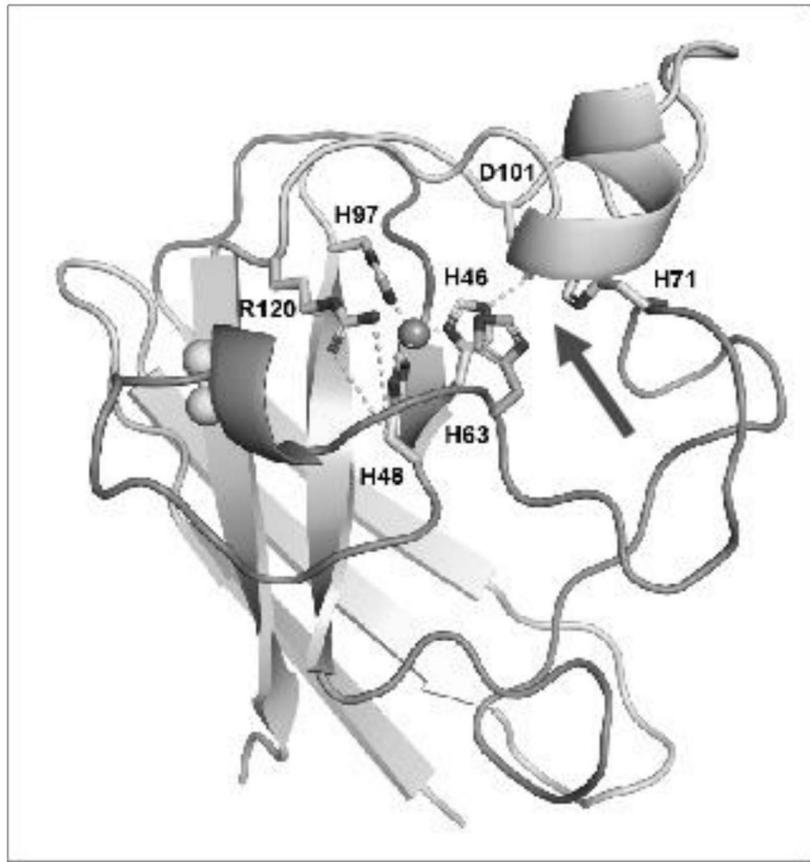


图4

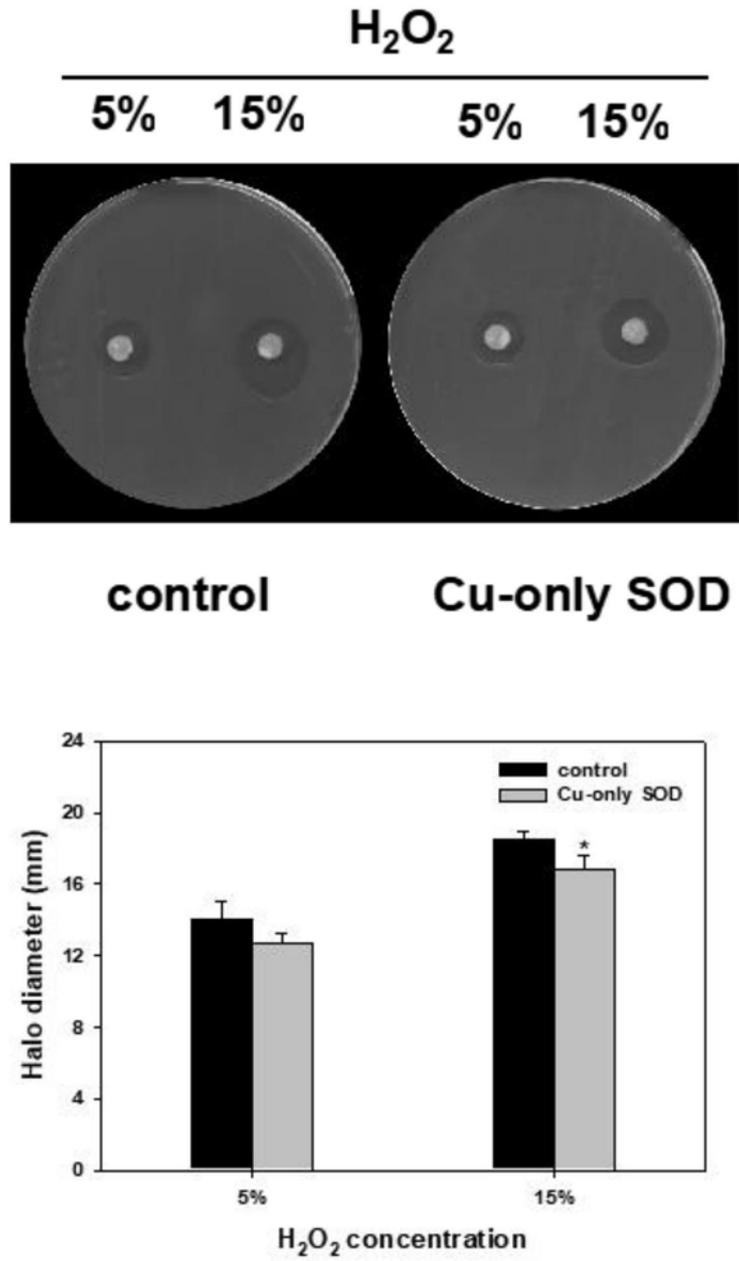


图5