

# 朝鲜碱茅过氧化氢酶基因(*PuCAT*)的克隆及表达分析

任 伟<sup>1,2</sup>, 徐 博<sup>3</sup>, 耿 慧<sup>1</sup>, 王志锋<sup>1</sup>, 徐安凯<sup>1</sup>

(1. 吉林省农业科学院 畜牧科学分院, 吉林 公主岭 136100; 2. 中国科学院 水土保持与生态环境研究中心, 陕西 杨凌 712100;

3. 吉林农业大学, 吉林 长春 130000)

**摘 要:**以朝鲜碱茅(*Puccinellia chinampoensis*)茎叶组织提取的 RNA 为模板, 根据已报道的 CAT 基因同源序列设计引物, 通过 RT-PCR 法扩增出 1 个 CAT 基因的 cDNA 序列并与其它植物 CAT 基因进行同源性比对。结果表明: 该基因全长 1 487 bp, 是一个完整开放阅读框, 编码含 492 个氨基酸的蛋白, Genbank 登陆号为: HM230827, 命名 *PuCAT*; 朝鲜碱茅 CAT 基因的核苷酸和氨基酸序列与大麦、小麦的同源性最高; 并对其信号肽、疏水性、跨膜结构、二级结构和主要功能域做了预测。半定量 RT-PCR 结果表明, *PuCAT* 基因在 4 种胁迫处理条件下, 有着不同的表达规律, 总体而言, 在朝鲜碱茅的根部和叶片均可以表达, 但是在叶片中的表达量要高于在根中的表达。

**关键词:**朝鲜碱茅; 过氧化氢酶; 基因克隆

**中图分类号:**Q 785 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)20-0090-06

过氧化氢酶(Catalase, CAT)是 Locw 于 1901 年首先在烟草中发现的一种能够催化双氧水分解的酶, 并将其命名为 catalase, 它广泛存在于动植物体内, 主要分布于过氧化物酶体、乙醛酸循环体及细胞质中, 少数分布在线粒体内。按照不同理化特性, 可以将其划分为典型性、非典型性和 CAT-过氧化物体 3 种类型<sup>[1]</sup>。其作用是在细胞组织受到伤害之前, 清除光呼吸、线粒体电子传递及脂肪酸氧化等过程中产生的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>[2]</sup>。植物体中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 有双重作用: 一方面, 适量的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作为一种小分子物质, 是复杂信号转导网络中普遍存在的一种信号激发因子, 通过诱导一系列防御机制来保护植物细胞免受环境胁迫; 另一方面, 过量的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 则导致氧化损伤, 产生大量氧化能力极强的羟自由基和单线态氧, 直接引发膜脂过氧化而对细胞造成巨大的伤害<sup>[3]</sup>, 还可以抑制卡尔文循环的关键酶, 对整个植物体造成伤害。而过氧化氢酶可以调节控制细胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的氧还平衡, 进而保证植物体正常的生长发育。此外, 它在增强植物的抗逆能

力<sup>[4]</sup>、提高光合效率<sup>[5]</sup>、增强防御能力<sup>[6]</sup>、延缓衰老<sup>[7]</sup>和诱导细胞全能性<sup>[8]</sup>等方面也起着非常重要的作用。

正因为过氧化氢酶对生物体如此重要, 所以植物在进化过程中形成多种同工酶, 其中拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、小麦(*Triticum aestivum*)、冬枣(*Ziziphus jujuba*)、豌豆(*Pisum sativum* Linn)、棉花(*Gossypium spp*)、玉米(*Zea mays*)、水稻(*Oryza sativa Japonica*)、大麦(*Hordeum vulgare*)、毛果杨(*Populus trichocarpa*)、高粱(*Sorghum bicolor*)、西兰花(*Brassica oleracea*)、甘蔗(*Saccharum*)、盐地碱蓬(*Suaeda salsa*)、银杏(*Ginkgo biloba*)等多种植物的过氧化氢酶同工酶基因均已被克隆<sup>[9-15]</sup>。但是有关碱茅 CAT 基因的研究尚鲜见报道, 而碱茅作为一种重要的盐生种质资源, 具有一般农作物不可比拟的抗盐碱能力, 被誉为盐碱地的先锋植物。前期的生理试验表明, 盐碱胁迫下, 碱茅体内过氧化氢酶的含量显著增加(另文发表), 因此, 为了进一步探究 CAT 基因在碱茅抗盐碱机制中的作用机理, 现以朝鲜碱茅(*Puccinellia chinampoensis*)为试材, 分离克隆了碱茅的 CAT 基因, 命名为 *PuCAT*, 并研究了不同逆境胁迫处理下, 其在碱茅根部和叶片中的表达规律。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试植物材料朝鲜碱茅采自吉林省农业科学院草地所牧草育种试验田。

TRNzol 试剂、PCR-Mix 和大肠杆菌 DH5α 菌株由北京天根生化公司提供, PMD18-T 载体和 DNA 连接酶

**第一作者简介:**任伟(1984-), 男, 博士研究生, 助理研究员, 现主要从事牧草逆境生理与分子生物学领域等研究工作。E-mail: wren84@163.com.

**责任作者:**徐安凯(1959-), 男, 博士, 研究员, 现主要从事牧草遗传育种与恢复生态学领域等研究工作。E-mail: xuankai0167@163.com.

**基金项目:**现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(cars-35-02)。

**收稿日期:**2014-05-27

由 TakaRa 公司提供, cDNA 第一链合成试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒由 Fermentas 公司提供, 其余均为国产分析纯试剂。

## 1.2 试验方法

1.2.1 试验设计 将种子用蒸馏水清洗消毒后, 置于一次性无菌培养皿中, 放入人工气候箱, 15℃ 恒温暗培养。1 周后, 将幼苗移栽至沙培介质中, 每盆 6 株, 于 20℃/15℃(昼/夜) 温室中正常生长, 待其株高长至约 10 cm 时, 用 1.5% NaCl 溶液预处理, 备用。该试验设计了 4 种不同的逆境胁迫处理: 碱胁迫(1.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)、盐胁迫(1.5% NaCl)、干旱胁迫(20% PEG)和盐碱复合胁迫(1.5% NaCl+1.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)。分别于处理的 0、3、6、12、24、48 h 剪取朝鲜碱茅地上部叶片和地下须根, 液氮保存, 以备提取 RNA 之用。

1.2.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成 参照北京天根生化公司的 TRNzol 试剂说明书逐步提取朝鲜碱茅叶片的总 RNA, 采用 1.0% 甲醛变性凝胶电检测其质量和浓度。以总 RNA 为模板, 根据试剂盒的操作程序逆转录合成 cDNA 第一链。

1.2.3 CAT 基因的克隆及测序 通过 NCBI 检索, 根据已发表的 CAT 基因编码区序列设计 1 对简并引物 P1 (5'-GCCATGGATCCCTACAAGCACCGG -3') 和 P2 (5'-CCATCCTACATGTTCGGCTTCA -3'), 由上海生工生物工程技术有限公司合成。以反转录合成的 cDNA 单链为模板, 进行 PCR 扩增, 反应体系为: DNA template 1 μL, P1 1 μL, P2 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 10 μL, PCR-Mix 12 μL; 退火温度 56℃, 30 个循环。经琼脂糖凝胶电泳, 回收目的片段, 与 pMD18-T Vector 连接过夜, 转化感受态大肠杆菌 DH5α, 挑取阳性克隆, 负对照以蒸馏水为 DNA 模板进行 PCR 反应, 测序。

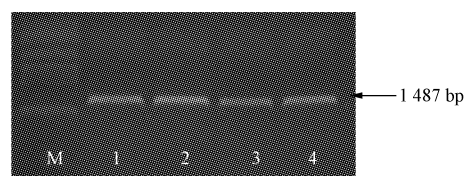
1.2.4 序列分析 由 NCBI 的 BLAST 程序进行核苷酸序列同源性比对。使用 DNAMAN 软件完成氨基酸的多重序列比较, 等电点, 分子量的预测以及进化树的构建。分别使用 ProtScale、TMHMM、HNN、SignalP 和 Smart 程序来预测蛋白质疏水性、跨膜结构、二级结构、信号肽以及蛋白质保守结构域(domains)。

1.2.5 朝鲜碱茅 *PuCAT* 基因在不同胁迫处理下的组织表达分析 以 *Actin* 基因为内标(Genebank 登录号: FJ545641), 采用半定量 RT-PCR 的方法分析 *PuCAT* 基因在朝鲜碱茅叶片或根部的表达情况。根据测序后的全长序列设计 5' 端引物(5'-ACTTTGACCCGCTCGATGTC-3') 和 3' 端引物(5'-CCATCCTACATGTTCGGCTTCA -3')。提取 4 种处理条件下总 RNA, 以反转录合成的 cDNA 单链为模板进行 PCR 扩增, 反应条件为退火温度 57℃, 25 个循环。

## 2 结果与分析

### 2.1 朝鲜碱茅 *PuCAT* 基因全长的克隆

通过 RT-PCR 反应, 获得 1 500 bp 左右的条带(图 1、2)。将此条带进行回收, 连接转化并测序, 结果表明, 获得的 *PuCAT* 基因全长 1 487 bp, 是一个完整的开放阅读框(ORF), 包括起始密码子(ATG)和终止密码子(TAG), 编码 492 个氨基酸的多肽, 蛋白质分子量为 56.67 kDa, 等电点为 6.9, 并登陆 Genebank 获得编号 HM230827。将其核酸序列用 NCBI 的 BLAST 程序检索比对发现, 其与大麦(*Hordeum vulgare* U20777)、小麦(*Triticum aestivum* X94352)、水稻(*Oryza sativa* Japonica D26484)、高粱(*Sorghum bicolor* XM002437586)、玉米(*Zea mays* NM001254879)、马蹄莲(*Zantedeschia aethiopica* AF207906)、木榄(*Bruguiera gymnorhiza* GU433192)、碱蓬(*Suaeda salsa* AF390210)的 CAT 基因的同源性分别为 92%、91%、87%、87%、85%、79%、77%、77%。测序结果和核苷酸序列的同源性比对验证了该基因的准确性。

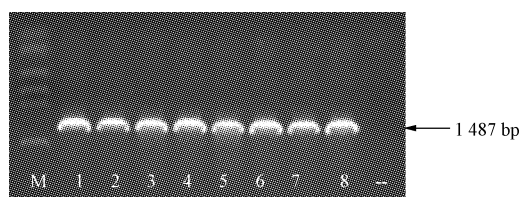


注: M; DL 15 000 Marker, 从上至下: 15.0、10.0、5.0、2.5、1.0 kb。

Note: M; DL 15 000 Marker, from the top to the bottom: 15.0, 10.0, 5.0, 2.5, 1.0 kb.

图 1 RT-PCR 电泳

Fig. 1 The electrophoresis of RT-PCR



注: 一为负对照。

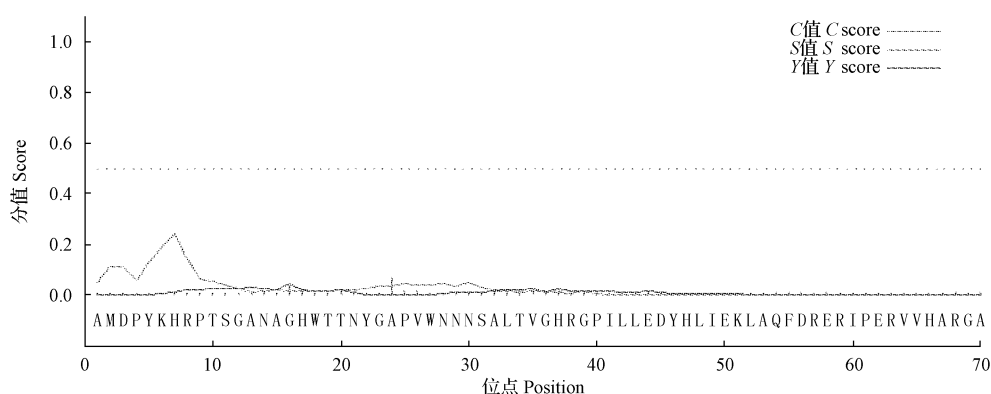
Note: — show negative control.

图 2 阳性克隆 PCR 鉴定

Fig. 2 The PCR of positive cloning

### 2.2 信号肽的预测与分析

由图 3 神经网络算法的预测结果可知, *PuCAT* 基因编码蛋白的 C 值(原始剪切位点分值)、S 值(信号肽分值)和 Y 值(综合剪切位点分值)均比较小, 远远小于 0.5, 无氨基酸残基位点, 可以推测, *PuCAT* 基因编码蛋白可能不存在导肽酶切位点, 没有信号肽, 在细胞质中合成后, 不能进行蛋白转运, 是一个非分泌蛋白。



注: C值: 原始剪切位点的分值; S值: 信号肽的分值; Y值: 综合剪切位点的分值。

Note: C score; Score of cleavage site; S score; Score of signal peptide; Y score; Score of comprehensive cleavage sites.

图3 *PuCAT* 编码蛋白信号肽分析

Fig. 3 Analysis on the signal peptide encoded by *PuCAT*

### 2.3 疏水性的预测与分析

蛋白质疏水性分析对于研究其跨膜特征和二级结构有着重要的指导意义,通常依据蛋白的 *GRAVY* 值来判断:该值为正值,则判定该蛋白为疏水蛋白;该值为负值,则判定为亲水蛋白;氨基酸分值越高疏水性越强,分值越低亲水性越强。由图4可知, *PuCAT* 编码氨基酸序列的第168位氨基酸具有最低分值(-2.456),亲水性最强;第327位氨基酸分值最高(2.122),疏水性最强。但就整体分析而言,没有形成明显的疏水性区域,并且亲水性氨基酸的分布要多于疏水性氨基酸,因此,推测 *PuCAT* 编码蛋白是一个可溶性蛋白。

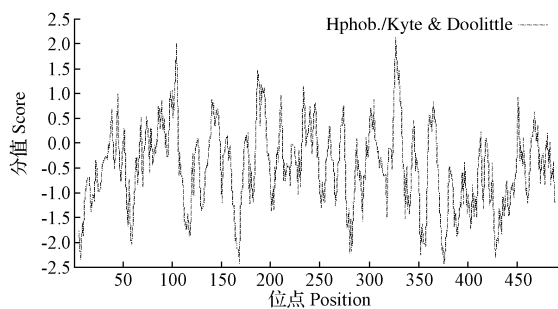


图4 *PuCAT* 编码蛋白的疏水性/亲水性预测

Fig. 4 Predicted hydrophobicity/hydrophilic for *PuCAT*

### 2.4 跨膜结构域的预测

由图5 TMHMM 程序的预测结果可以看出,朝鲜碱茅过氧化氢酶蛋白不具有跨膜结构域,无跨膜螺旋区存在,不是膜蛋白,这与疏水性分析结果相一致。

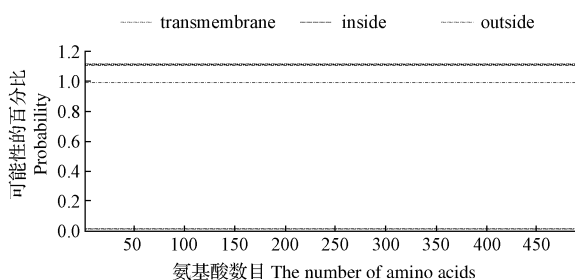
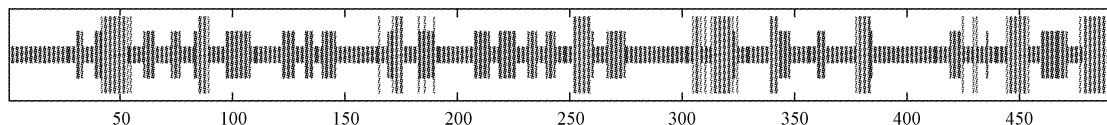


图5 *PuCAT* 编码蛋白跨膜结构域的预测结果

Fig. 5 Trans-membrane domain prediction result of *PuCAT*

### 2.5 二级结构的预测分析

蛋白质二级结构是构成三级结构的基础,对了解其空间结构和功能有着重要意义。图6预测结果表明, *PuCAT* 编码蛋白的肽链有295个氨基酸构成了随机卷曲,占到了59.84%;有112个氨基酸参与了延伸链结构,占到了22.72%;有86个氨基酸参与了 $\alpha$ -螺旋结构,占到了17.44%;其中随机卷曲和延伸链结构占据了大多数。



注:长线: $\alpha$ -螺旋;中线:延伸;短线:随机卷曲。

Note: Long term;  $\alpha$  helix; Line; extension; Short-term; random curl.

图6 *PuCAT* 二级结构预测结果

Fig. 6 Secondary structure prediction result of *PuCAT*

## 2.6 氨基酸序列分析与系统进化树的构建

利用 DNAMAN 6.0 序列分析软件对朝鲜碱茅与大麦(U20777.1)、小麦(X94352.1)、玉米(NM\_001111945.1)、水稻(D26484.1)、马蹄莲(AF207906.1)、木榄(GU433192.1)6种植物的CAT氨基酸序列进行对

比,由图7可知,6种植物C-端均具有与PTS1受体(Pex5p)结合的保守3肽区域(QKL),说明朝鲜碱茅过氧化氢酶可能也是通过PTS1系统进入细胞内的过氧化物酶体。

<i>Bryguiera gymnorhiza</i>	WVEALSDPRV	THEICSIWIS	YWTQCDKFLG	QKLATRLNVR	PSI-
<i>Hordeum vulgare</i>	WVDALTDARV	THEIQSIWVS	YWSQCDASLG	QKLASRLKIK	PNM-
<i>Oryza sativa Japonica</i>	WVDALSDPRI	THELRGIWIS	YWSQCDASLG	QKLASRLNLK	PNM-
<i>Puccinellia chinampoensis</i>	WVDALTDTRV	THEIQGIWIS	YWSQCDASLG	QKLASRLKMK	PNMD
<i>T.aestivum</i>	WVDALTDARV	THEIQSIWVS	YWSQCDASLG	QKLASRLKIK	PNM-
<i>Zanfedeschia aethiopica</i>	WVDALSDPRV	THEIRTIWIT	YWSQCDKFLG	QKLASRLNIK	PTL-
<i>Zea mays</i>	WVDALTDPRV	THEHRTIWIS	YWSQCDAAAG	QKLPSRLNLK	PSM-

图7 C-末端氨基酸序列对比

Fig. 7 Sequence alignment of the C-terminal amino acid

从图8构建的CAT氨基酸序列系统发育树状图可以看出,以0.07为结点,可以分为4组,第1组为:棉花、杨树、李属、木榄、金丝桃、芸薹、盐芥、碱蓬和马蹄莲;第2组为:大麦、小麦、碱茅、水稻、高粱和玉米;第3组为木

薯;第4组是番茄。其中朝鲜碱茅与大麦、小麦的同源关系最近,与同为禾本科的水稻、高粱、玉米的同源关系较为相近,而与其它科植物的同源关系较远,这与前面核苷酸序列的同源性分析结果相一致。

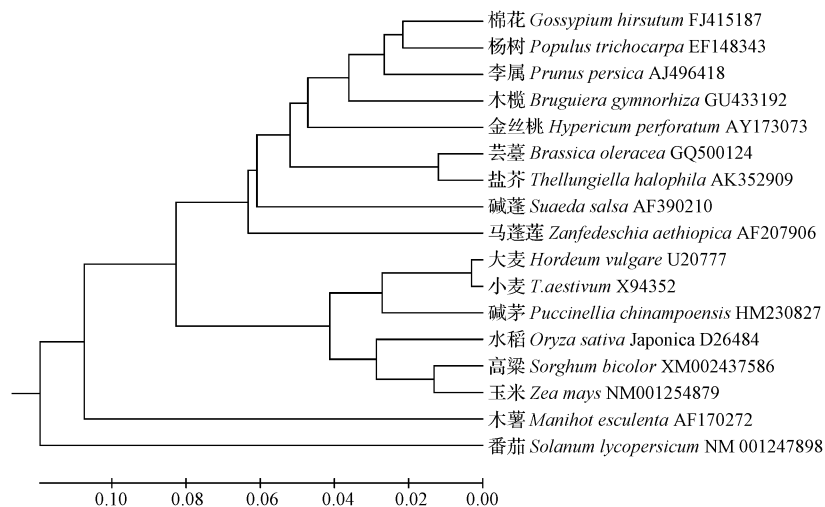


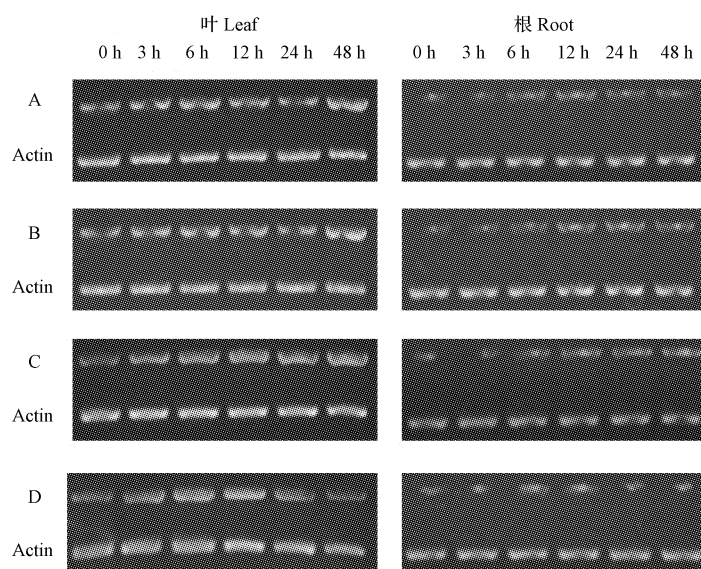
图8 氨基酸进化树分析

Fig. 8 Analysis of amino acid homology-tree

## 2.7 不同胁迫处理下 PuCAT 基因在朝鲜碱茅叶和根中的表达

半定量 RT-PCR 结果表明,PuCAT 基因在朝鲜碱茅的地下部和地上部均可以表达,但是在叶片中的表达量要高于在根中的表达量。4种胁迫处理均可以诱导 PuCAT 基因的表达,但变化规律不同,PuCAT 基因受盐碱复合胁迫诱导的表达量最高,其次是碱胁迫和盐胁迫,受干旱胁迫诱导的表达量最低。在同种胁迫处理下,PuCAT 基因在朝鲜碱茅叶片和根中的表达规律也不相同。由图9可知,在盐胁迫处理条件下,PuCAT 基因在叶片中的表达量,随着处理时间的延长,逐渐增加,

在处理6h之后表现出降低的趋势,而在处理48h时又突然升高;在根中的表达规律则为先增加后降低,在处理12h的表达量最高。在碱胁迫处理条件下,PuCAT 基因在叶片中的表达量与盐胁迫有所不同,处理12h之后表现出降低的趋势,在处理48h时也表现为突然升高;在根中的表达规律与盐胁迫类似。在盐碱复合胁迫处理条件下,PuCAT 基因在朝鲜碱茅叶片和根中的表达量均表现出随着时间延长逐渐升高的变化趋势。在干旱胁迫处理条件下,PuCAT 基因在朝鲜碱茅叶片和根中的表达规律呈现出先增加后降低的变化态势,在处理12h的表达量达到最高。



注: A: 1.5% NaCl; B: 1.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; C: 1.5% NaCl + 1.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; D: 20% PEG; Actin: 内参基因。  
Note: A: 1.5% NaCl; B: 1.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; C: 1.5% NaCl + 1.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; D: 20% PEG; Actin: reference gene.

图9 朝鲜碱茅 *PuCAT* 基因在叶和根中的表达

Fig. 9 Analysis of *PuCAT* gene expression in leaf and root of *Puccinellia chinampoensis*

### 3 讨论

目前,虽然已从许多植物中分离到 *CAT* 基因的 cDNA 序列,但是这些植物大多为甜土植物,抗盐碱能力有限,有关盐生植物 *CAT* 基因的研究较少。该研究从盐碱地先锋植物碱茅中克隆到了过氧化氢酶基因的 cDNA 序列,通过在 NCBI 上进行核酸和氨基酸的序列比对,发现该序列是一个完整的开放阅读框,具有保守的过氧化氢酶结构域,与禾本科植物大麦、小麦、水稻等农作物的同源性很高,说明 *PuCAT* 基因全长序列的克隆是成功的。

已经被学者分离克隆的 *CAT* 基因主要有 3 类: *Cat1*、*Cat2* 和 *Cat3*<sup>[16]</sup>。其中, *Cat1* 主要负责清除光呼吸产生的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,在叶内表达丰富; *Cat2* 的表达受 UV-B、臭氧<sup>[17]</sup>及病原诱导,在植物抗逆中起重要作用,主要在种子萌发后的盾片中表达,在叶和上胚轴内表达量很低; *Cat3* 主要清除脂肪酸氧化代谢产生的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,在种子内表达丰富<sup>[18]</sup>。研究表明 *CATs* 的表达不仅具有组织和器官特异性,还与植物的生长发育以及外界环境影响等诸多因素有关。半定量 RT-PCR 结果表明,该试验分离到的 *PuCAT* 基因在朝鲜碱茅的地下部和地上部均可以表达,但是在叶片中的表达量要明显高于在根中的表达量,同时结合 NCBI 中的序列比对结果,推断朝鲜碱茅 *PuCAT* 基因应该属于 *Cat1* 类基因。

过氧化氢酶主要分布在细胞中的过氧化物酶体。该研究克隆的碱茅 *PuCAT* 基因,其氨基酸序列与其它植物的 *CATs* 都有一个保守的三肽序列(QKL),是一个 PTS1-like motifs,与过氧化物酶体的 PTS1(Peroxisomal

targeting signal)相一致,可能作为内在的 PTS1 发挥作用。而 PTS1 是许多蛋白识别过氧化物酶体,进而进入该细胞器的目标信号,这个信号位于 PTS1 受体(PTS1 receptor-Pex5p)的 C-端。进一步研究表明, *CAT1* 可以与 PTS1 受体(Pex5p)相结合<sup>[19]</sup>,说明碱茅 *PuCAT* 基因合成的过氧化氢酶,可能通过 PTS1 系统进入过氧化物酶体,进而维持体内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的氧还平衡。此外,在 C-末端还具有典型的 SRL 序列(Ser-Arg-Leu),作为典型的 PTS1 motif,该位点可能与增强过氧化氢酶向过氧化物酶体的转运效率有关。

植物分子生物学的飞速发展,为提高作物的抗逆性,培育抗盐碱植物种质资源提供了一条有效途径。已有许多研究将外源过氧化氢酶基因导入到需改良的作物中<sup>[20-21]</sup>,减少了光呼吸产生的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、提高光合效率、促进光合作用,提高了植株的抗逆能力,获得了抗旱、抗盐碱能力显著增强的育种材料。此外,过氧化氢酶还能提高植物对除草剂的抗性<sup>[22]</sup>,增强植物体本身的抗病性、耐低温性等<sup>[23-24]</sup>。同时,也应该看到,有关过氧化氢酶基因在植物体内的具体调节机制尚不清楚,过氧化氢酶与体内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量如何达到最佳的平衡点,正如该研究的试验结果, *PuCAT* 基因在叶片中的表达量,在盐处理前期逐渐增加,处理 6 h 之后逐渐降低,可能是由于朝鲜碱茅体内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的含量在过氧化氢酶的作用下达到了对植物生长有益的浓度范围,而在处理 48 h 时又突然升高,说明此时 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对朝鲜碱茅的伤害作用又进一步加大。碱处理与盐处理的变化规律则有所不同,在处理 12 h 之后才逐渐降低,说明在今后的工作中,应该对碱胁迫和

盐胁迫分别开展研究。随着人们对 CAT 基因研究的深入以及过氧化氢信号传导途径的逐渐明晰,必将促进过氧化氢酶基因在改良牧草和农作物抗逆性方面的应用。

### 参考文献

- [1] 陈珊珊. 甘蔗活性氧代谢途径关键酶基因的克隆与表达分析[D]. 福州:福建农林大学,2012.
- [2] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(9):405-410.
- [3] Magbanua Z V, Moraes C M, Brooks T D, et al. Is catalase activity one of the factor associated with maize resistance to *Aspergillus flavus*[J]. Molecular Plant-microbe Interactions, 2007, 20(6):697-706.
- [4] Liang Y, Chen Q, Liu Q. Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt stressed barley (*Hordeum vulgare* L.)[J]. Journal of Plant Physiology, 2003, 160(10):1157-1164.
- [5] 张霖, 张霖, 安国勇, 等. 共聚焦显微技术研究 ABA 诱导蚕豆气孔保卫细胞  $H_2O_2$  的产生(简报)[J]. 实验生物学报, 2001, 34(1):71-76.
- [6] Mittler R R, Herr E H, Orvar B L. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyper responsive to pathogen infection[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(24):14165-14170.
- [7] Dat J F, Pellinen R, Beeck Man T. Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco[J]. Plant Journal, 2003, 33(4):621-632.
- [8] Hong F S, Song W P, Wan Z G, et al. Effect of La(III) on the growth and aging of root of loquat plantlet *in vitro* [J]. Biological Trace Element Research, 2005, 104(2):185-192.
- [9] Skadsen R W, Schulz-Lefert P, Herbst J M. Molecular cloning, characterization and expression analysis of two catalase isozyme gene in barley[J]. Plant Molecular Biology, 1995, 29:1005-1014.
- [10] Schandalios J G. Regulation and properties of plant catalase. In: Foyer C H, Mullineaux P M eds. Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants[M]. Boca Raton: CRC Press, 1994:275-315.
- [11] 林星谷, 孔德仓, 庞晓明, 等. 冬枣过氧化氢酶基因的克隆及表达分析[J]. 西北植物学报, 2012(6):1086-1092.
- [12] 李夜雨, 杨平. 贯叶金丝桃过氧化氢酶基因的生物信息学分析[J]. 安徽农学通报, 2009(13):34-35.
- [13] 马长乐, 王萍萍, 曹子谊, 等. 盐地碱蓬过氧化氢酶基因的克隆及盐胁迫下的表达分析(英文)[J]. 植物学报, 2003(1):93-97.
- [14] 程华, 李琳玲, 许峰, 等. 银杏过氧化氢酶基因 CAT1 的克隆及表达分析[J]. 林业科学研究, 2010(4):493-499.
- [15] 陈珊珊, 郭晋隆, 李国印, 等. 甘蔗过氧化氢酶基因的电子克隆及生物信息学分析[J]. 生物信息学, 2012(1):65-70.
- [16] Willekens H, Lange B C. Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbagini folia* (L.) [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91:10450-10454.
- [17] Willekens H, Vancamp W, Vanmontag U M. Ozone, sulfur dioxide, and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of anti oxidant genes in *Nicotiana plumbagini folia* (L.) [J]. Plant Physiology, 1994, 106:1007-1014.
- [18] 宋新华, 赵凤云. 植物体内过氧化氢酶的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007(31):9824-9827.
- [19] Kamigaki A, Mano S, Terauchi K. Identification of peroxisomal targeting signal of pumpkin catalase and the binding analysis with PTS1 receptor [J]. Plant Journal, 2003, 33(1):161-175.
- [20] 李思义. 导入小麦过氧化氢酶培育耐低温水稻[J]. 生物技术通报, 2001(3):48-49.
- [21] 杨芳. 豌豆过氧化氢酶基因在玉米中的转化[D]. 济南:山东师范大学, 2006.
- [22] Polidoros A N, Mylona P V, Scandalios J G. Transgenic tobacco plants expressing the maize Cat2 gene have altered catalase levels that affect plant-pathogen interactions and resistance to oxidative stress[J]. Transgenic Research, 2001, 10(6):555-569.
- [23] 余迪求, 岑川, 杨明兰, 等. 玉米不同组织过氧化氢酶水杨酸敏感性的差异和外源水杨酸处理提高玉米抗病性的研究[J]. 植物学报, 1999(12):1293-1298.
- [24] Talarczyk A, Krzymowska M, Borucki W. Effect of yeast CAT1 gene expression on response of tobacco plants to tobacco mosaic virus infection[J]. Plant Physiology, 2002, 129:1032-1044.

## Molecular Cloning and Expression Analysis of Catalase (*PuCAT*) Gene in *Puccinellia chinampoensis*

REN Wei<sup>1,2</sup>, XU Bo<sup>3</sup>, GENG Hui<sup>1</sup>, WANG Zhi-feng<sup>1</sup>, XU An-kai<sup>1</sup>

(1. Animal Science Branch, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling, Jilin 136100; 2. Institute of Soil and Water Conservation, Chinese Academy of Sciences, Yangling, Shaanxi 712100; 3. Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130000)

**Abstract:** The full length cDNA sequence of CAT gene was cloned from *Puccinellia chinampoensis* leaves using RT-PCR method, the primers were designed according to the homologous CAT gene sequences of other plant species. The results showed that the nucleotide sequence of the gene was 1 487 bp, containing a complete open reading frame and encoding 492 amino acids, Genebank: HM230827. Nucleotide and amino acid sequence analysis revealed that *PuCAT* shared high identity with the orthologs from *Triticum aestivum* and *Hordeum vulgare*. And its signal peptide, hydrophobicity/hydrophilic, trans-membrane domain, secondary structure and main functional domains were predicted. Semi-quantitative RT-PCR analysis showed that *PuCAT* expressed in different tissues, but the expression in root was lower, and in leaf much higher. Various elevated levels of *PuCAT* expression had been detected when exposed to 4 different stress experimental treatments, and the results were not the same.

**Keywords:** *Puccinellia chinampoensis*; CAT; gene clone