

結球白菜之銅/鋅超氧化歧化酶(Cu/Zn superoxide dismutase, SOD)基因與過氧化氫酶(Catalase, CAT)基因的選殖與分析¹⁾

尤進欽²⁾ 曾夢蛟³⁾

關鍵字：銅/鋅超氧化歧化酶基因，過氧化氫酶基因，選殖，結球白菜

摘要：超氧化歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 廣泛而普遍的存在所有好氧的生物體內，可有效率地去除氧自由基。許多的生物性及非生物性逆境、光呼吸、脂肪酸 β -氧化作用之中間產物都會產生過氧化氫 (H_2O_2) 危害植物。過氧化氫酶 (catalase, CAT) 能催化 H_2O_2 轉變成 H_2O 及 O_2 ，是葉片過氧化體中去除過氧化氫的最主要酵素。

本試驗以經 800 ppb 二氧化硫 (SO_2) 處理 7 小時之結球白菜 (濱綠) 葉片為材料，萃取其 polyA RNA，構築 cDNA 庫。以玉米 *sod4* 及 *cat1* 基因為探針，篩選結球白菜之 Cu/Zn-*sod* 及 *cat* 基因。篩選的 *Sod62* 之核酸序列為 754 bp，可轉譯成具有一個 152 個胺基酸的 open reading frame (ORF)。而 *cat78* 之核酸序列為 1694 bp，可轉譯成具 492 個胺基酸的 ORF。

將 *sod62* 及 *cat78* 基因分別構築至表現載體 pQE32 及 pQE31，並加入 IPTG 誘導使其大量表現，可在 SDS-PAGE 上 55 kDa 及 57 kDa 處有一明顯條帶。在 native PAGE 上，有多出一 SOD 及 CAT 活性染色條帶出現，證實篩選之 *sod* 及 *cat* 基因可轉譯出 SOD 及 CAT 蛋白質活性。結球白菜生長 4 週的葉片噴灑 200 μ M 巴拉刈 (MV)，進行北方墨點分析之結果顯示，處理結球白菜 1 小時後，即可偵測到 *sod62* RNA 表現，迨 24 小時仍持續增加。而 CAT 的表現情形，未處理前即有表現，但於處理 MV 1 小時後，CAT 的表現量顯著增加，而後也保持很高的表現量，迨 24 小時後仍持續表現。

1) 本文承國家科學委員會研究經費補助，特表謝忱。

2) 國立宜蘭大學園藝學系助理教授。

3) 國立中興大學園藝學系教授，通訊作者。

前 言

所有好氧性器官必須擁有能保護自身免於還原態氧毒化作用的能力，這些活化的還原態氧，包括：過氧化自由基 (superoxide, O_2^-)、過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2)、單分子態氧 (singlet oxygen, 1O_2) 及氫氧自由基 (hydroxyl radicals, $\cdot OH$) (Halliwell and Gutteridge, 1999)。這些高度活化種類能與不飽和脂肪酸作用，引起膜脂質過氧化作用，過氧化作用會破壞膜導致細胞內溶物滲漏，快速乾燥缺水，進而死亡。而細胞內膜的破壞能影響粒線體之呼吸作用，引起色素崩解，並造成葉綠體 CO_2 固定能力的喪失 (Zelitch, 1992)。植物遭遇環境狀況，例如：不適當溫度或/與水分逆境，特別是結合高光強度的情形下，另外，臭氧 (O_3) 或 SO_2 等空氣污染及一些病菌感染皆能經由過量產生的毒性氧物種引起氧化逆境傷害 (Bowler *et al.*, 1992)。

超氧化歧化酶 (superoxide dismutase, SOD; EC 1.15.1.1) 在 1938 年時由 Mann 及 Keilin 從牛的血液中分離出來。SOD 依其酵素作用金屬反應中心，可分成三種：Cu/Zn-SOD、Mn-SOD 及 Fe-SOD。除少數例外，Cu/Zn-SOD 大部分存在於真核生物細胞質、葉綠體及過氧化體中。Mn-SOD 被發現在粒線體基質及原核生物中；而 Fe-SOD 則在原核生物中發現的最多 (Hassan and Fridovich, 1979)。在少數的植物葉綠體中也有 Fe-SOD 的出現 (Duke and Salin, 1985)。分析核酸序列顯示不同種植物間的 Cu/Zn-SOD 有很高的相似性，其中又以葉綠體 Cu/Zn-SOD 較細胞質 Cu/Zn-SOD 具有演化上的高度保存性 (Karpinski *et al.*, 1992)。有關於 SOD 的組成結構方面，Cu/Zn-SOD 氨基酸的金屬鍵結區域在各物種間已被研究出來，其保存性相當高， Cu^{2+} 保持於活化位置與 4 個 histine (氨基酸序列中第 44、46、61 及 118 位置) 的氮結合，而 Zn^{2+} 可在 His69 與 Cu^{2+} 形成鍵結橋。此外， Zn^{2+} 亦可與 His69 及 His78 作用，並與 Asp81 之羧基交互作用，His69 與 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 2 種金屬作用，可能參與歧化作用提供所需之電子 (Tainer *et al.*, 1992)。

過氧化氫酶 (catalase, CAT; H_2O_2 : H_2O_2 oxidoreductase; EC 1.11.1.6) 是一 tetramer，含鐵的 porphyrin 蛋白質，能催化 H_2O_2 轉變成 H_2O 及 O_2 。CAT 普遍存在於微小體，如：peroxisome 及 glyoxysome (Subramani, 1993)。CAT 可與 SOD 及 peroxidase 構成一防禦系統，將 O_2^- 及 H_2O_2 去除 (Beyer and Fridovich, 1987)。活性氧原子存在於大部份細胞，可經由粒線體電子傳遞過程及脂肪酸 β -oxidation 之中間產物產生，因此 C3 植物會產生相當可觀的 H_2O_2 (進行光呼吸時) (Canvin, 1990)，於是擴大了細胞抵抗氧化逆境的需求。所有植物 CAT 皆具有高度的相似性，尤其是 53~150 bp 更是幾乎完全的相像，且 histidine 於 65 及 79 位置是高度保留的，這也是 heme 結合的位置區域，類似於牛肝臟 CAT 之 His⁷⁴ (Reid *et al.*, 1981)。植物 CAT 胺基酸序列從 C 端往內第 6 胺基酸保留有 Ser-Arg-Leu，被認為是 CAT 進入過氧化體的辨識序列 (Gonzalez, 1991)。

目前有關十字花科蕓薹屬蔬菜之 *sod* 及 *cat* 基因的資訊很少，且對其在氧化逆境下之調節表現亦不清楚。結球白菜為臺灣重要的大宗蔬菜，國人攝食的量很多，有必要對此蔬

菜作一深入的研究探討。因此，本試驗嘗試分離結球白菜的細胞質 Cu/Zn-sod 及 cat 基因，並以巴拉刈 (paraquat, methyl viologen, MV) 處理結球白菜，調查其 Cu/Zn-sod 及 cat 基因表現的情形。本試驗的目的為分離及分析結球白菜的 Cu/Zn-sod 及 cat 基因之結構及組成，並探討 Cu/Zn-sod 及 cat 在氧化逆境下之調控表現的情形。

材料與方法

一、植物材料

本試驗以十字花科蕓苔屬蔬菜中之結球白菜`濱綠`品種 (*Brassica campestris* L. ssp. *Pekinensis* cv. Tropical Pride)，作為供試材料。

二、萃取結球白菜總 RNA

取經 800 ppb SO₂ 處理 7 小時的結球白菜葉片 4 g，以液態氮快速研磨成粉末，加入 5 ml 之 Ultraspec™ RNA buffer (Biotecx lab., INC)，於 4°C 靜置 5 分鐘後，加入 5 ml 之 chloroform，經震盪 15 秒後置於冰上 5 分鐘。再以 12,000 g 離心 15 分鐘，取出上層液加入等量的 isopropanol，然後置於 4°C，30 分鐘，再以 75% 酒精振盪清洗沈澱物，離心 5 分鐘後，將 RNA 乾燥，再溶於 20-50 µl 之 DEPC H₂O。

三、結球白菜 polyA RNA 的分離

將 RNA 溶液的濃度控制在 10-15 µg/µl，於 65°C 加熱 5 分鐘後，迅速置於冰上，加入等體積之 2X loading buffer (40 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 M NaCl 及 2 mM EDTA) 混合均勻，使溶液徐徐通過 mAP 濾紙。當 RNA 溶液完全的通過 mAP 濾紙後，將 mAP 濾紙移入 50 ml 燒杯中，加入 10 ml 之 0.5 M NaCl 漂洗 3 次，每次 10 分鐘。再用 5 ml 之 75% 酒精漂洗 2 分鐘，重複 1 次。mAP 濾紙陰乾後，置於含 1 ml 之 DEPC-H₂O 的玻璃管中，70°C 加熱 5 分鐘後迅速移除 mAP 濾紙，並將水溶液移至新的離心管中。以光電比色計定量 mRNA 的濃度後，將 mRNA 溶液加入 1/10 體積的 2 M 醋酸鉀 (pH5.2) 及 2 倍體積的 95% 酒精，置於 -20°C 沉澱隔夜後，以 7,000 rpm 4°C 離心 20 分鐘，倒去上清液，以氮氣吹乾或陰乾後，溶於適量 DEPC 水，使濃度為 1 µg/µl，儲藏於 -70°C 備用。

四、cDNA 庫的構築及篩選

本試驗是以 λ-ZAPIII cDNA synthesis kit (Stratagene) 來進行 cDNA library 構築。cDNA 庫之構築及篩選方法參照邱 (1998)。

五、Sanger dideoxy DNA 定序反應

DNA 定序方法係採用 Sanger 等人 (1977) 所提之方法略加修改。以 USB Sequencing kit 進行定序。

六、巴拉刈處理

將 ICI Agrochemicals 公司製造的剋蕪蹤 (Gramoxone)，稀釋成 200 µM 的溶液，噴灑

約 10 ml 的溶液於結球白菜生長 4 週的葉片，分別經過 1、3、6、12 及 24 小時後萃取其 RNA。

七、*sod62* 及 *cat78* 基因的大量表現

pSOD62 經 *Bam*HI/*Kpn*I 剪切後，構築入表現載體 pQE-30、pQE-31 及 pQE-32，得到 pQE30-*sod62*、pQE30-*sod62* 及 pQE30-*sod62* 重組質體。另外，pCAT78 經 *Bam*HI/*Kpn*I 剪切後，構築入表現載體 pQE-30、pQE-31 及 pQE-32，得到 pQE30-*cat78*、pQE31-*cat78* 及 pQE32-*cat78* 重組質體。將上述的重組質體轉形入 *E. coli* novablue 菌體中，之後加入 1 mM IPTG 誘導基因的大量表現。於 28°C 繼續培養 6 小時後，以 10,000 rpm 離心 10 分鐘，倒掉上清液。回收之菌體以 1 ml 之結合緩衝液 (5 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9) 回溶，再利用超音波磨碎機 (XL-2020, Sonicator) 將細胞打破，接著細胞液以 14,000 rpm 離心 20 分鐘，上層液即為粗酵素萃取液，再以 0.45 μ m 的過濾膜過濾，置於冰上待用。

八、可溶性蛋白質之測定

可溶性蛋白質之測定依據 Bio-Rad protein assay (Bradford, 1976) 方法。取出適量的酵素萃取液與 5 ml Bio-Rad dye reagent 均勻混合，讀取在 595 nm 波長下的吸光度，再與小牛血清蛋白之標準曲線比較，估算其含量。

九、蛋白質電泳分析 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

利用 Mini-Protein II Cell (Bio-Rad) 來進行此項分析工作。製備 10% polyacrylamide 解析凝膠 (resolution gel)，待凝膠凝固後，使玻璃傾斜，以吸水紙將酒精吸出，再注入 5% polyacrylamide 聚焦凝膠 (stacking gel)，接著在聚焦凝膠處插入齒模，約至聚焦凝膠底部 1 公分。待凝膠凝固後，取出齒模，將欲分析之蛋白質與等體積的 2X loading buffer 充分混合後，至於沸水中煮 5 分鐘，再以 12,000 rpm 4°C 離心 10 分鐘，取適量上清液注入凝膠中。最初以 70 V 的電壓分離，使染劑移至兩種凝膠之交界線，再以 90 V 之電壓將染劑完全分離解析凝膠為止。之後，取下凝膠，以 Coomassive Brilliant Blue R-250 染色 10 分鐘後，接著以 destaining solution I (500 ml methanol, 100 ml acetic acid, 400 ml ddH₂O)，緩慢搖動，待背景色褪得很淡，再換 destaining solution II (70 ml methanol, 50 ml acetic acid, 880 ml ddH₂O) 繼續退染，待背景色完全退去，即可以玻璃紙密封，再風乾保存。

十、Native PAGE、SOD 及 CAT 活性染色分析

SOD 同功異構酵素分離是根據 Laemmli (1970) 之方法，將蛋白質置於 nondenaturing polyacrylamide gel (10% T, 3% C) 中，以 40 mA 在 4°C 下進行電泳分離 4 小時，當電泳完成後膠片再以 Rao 等人 (1996) 方法進行染色，將膠片置於 2.5 mM nitroblue tetrazolium (NBT) 25 分鐘，再浸泡於 50 mM potassium phosphate buffer [含 28 μ M riboflavin 及 28 mM tetramethyl ethylenediamine (TEMED) pH 7.8] 30 分鐘於黑暗下，最後膠片置於光箱上照射 2 小時以呈色。CAT 同功異構酵素分離是在 nondenaturing polyacrylamide gels (7% T, 3% C) 進行，以 40 mA 4°C 下電泳 4 小時 (Laemmli, 1970)。電泳後之膠片浸泡於 3.27 mM H₂O₂ 25

分鐘，再以水清洗 10 分鐘，最後置於 1% (w/v) potassium ferricyanide 及 1% (w/v) ferrichloride 溶液中浸泡，於黑暗下 10 分鐘呈色 (Woodbury *et al.*, 1971)。

結 果

一、結球白菜 *sod* 基因的篩選及核酸序列定序

篩選結球白菜中的 *sod* 基因，是以玉米的 *sod4* 基因 (Cu/Zn-*sod*) 片段為探針進行篩選，共篩選了 10 萬顆溶菌斑，第一次篩選中，共有 6 個溶菌斑有較強的雜交訊號。再將這些溶菌斑進行第二次篩選，仍有 5 個溶菌斑具有強烈雜交訊號。在輔助噬菌體的協助下，進行 *in vivo excision*，轉成 phagemid (pBluescript SK⁻)。五個殖系分別為 pSOD5、pSOD17、pSOD20、pSOD49 及 pSOD62。因其片段大小差距不大，故將這五個殖系進行核酸定序及分析。

Sod62 之核酸序列如圖 1 所示。此殖系全長為 754 個核酸，在 671~676 bp 處有 AATAAA site，3'端處有 18 個由 adenine 組成的 polyadenylation site。DNA 序列中最長的 ORF，由第 70~72bp 的 ATG 開始，直到 527~529 bp 的 TAA 結束，共有 456 個的核酸，可演繹出 152 個胺基酸。推測此 ORF 的 152 個胺基酸，其分子量為 15.1 kD，其等電點為 6.41。此外，ORF 的核酸序列中，轉錄成 glycine 的核酸最多，佔 17%，其次為 alanine，佔 9%，20 種胺基酸，tryptophan 及 tyrosine 沒有出現在演繹的胺基酸中。

經由 NCBI Gene Bank 資料庫的比對，發現此殖系的胺基酸序列與植物的 SOD 相似性極高。胺基酸序列的比對結果顯示，以水稻的 SOD 基因胺基酸相似性為最高，高達 93%；次之為玉米的 89%、甘薯、菸草及番茄的 88%、菠菜的 87%，而與甘藍、蘿蔔、芥菜之 SOD 相似性為 84% (圖 2)。比對結果顯示 SOD62 胺基酸具有 6 個植物 SOD 保留的 Cu/Zn 結合位置的 histidine 及 1 個 aspartic acid，另有 2 個與雙硫鍵形成有關的 cysteine。此證實 SOD 胺基酸在相近的物種會有相當高的保存性。

二、結球白菜 *cat* 基因的篩選及核酸序列定序

篩選結球白菜中的 *cat* 基因，是以玉米的全長 *cat1* 基因片段為探針進行篩選所構築之結球白菜 cDNA 庫。共篩選了 20 萬個溶菌斑，第一次篩選中，共有 5 個溶菌斑有較強的雜交訊號。再將這些溶菌斑進行第二次篩選，仍有 4 個溶菌斑具有強烈雜交訊號。四個選殖系分別為 pCAT10、pCAT24、pCAT46 及 pCAT78。

所選出之 4 個選殖系，以 pCAT78 的選殖基因片段最長，約為 1.7 kb。因此，核酸定序的策略是將 *cat78* 以 *HindIII/PstI*、*EcoR I/Xho I* 及 *PstI/XhoI* 3 種組合限制酵素切割成 3 個片段，以進行核酸定序工作。*cat78* 之核酸序列如圖 3 所示。此殖系全長為 1694 個核酸，在 1652~1657 bp 處有 AATAAA 之 polyA 辨識位置，3'端處有 16 個由 adenine 組成的 polyadenylation site，此外，5'端及 3'端各有 42bp 與 176 bp 未轉譯區域。DNA 序列中最長

的 ORF，由第 43 bp 的 ATG 開始，直到 1521 bp 的 TAA 結束，共有 1476 個的核酸，可演繹出 492 個胺基酸。推測此 ORF 的 492 個胺基酸，其分子量為 56.9 kD，其等電點為 7.12。此外，ORF 的核酸序列中，轉錄成 proline 的核酸最多，佔 7.7%，20 種胺基酸中，asparagine 及 glutamine 沒有出現在演繹的胺基酸中。

經由 NCBI Gene Bank 資料庫的比對，發現此殖系的胺基酸序列，與植物的 CAT 相似性極高。比對的結果顯示，以芥菜的 *cat* 基因相似性為最高，高達 98%；其次為阿拉伯芥及蘿蔔的 97%、棉花的 90%、菸草的 87%、豌豆的 86%，而與水稻、玉米之 CAT 相似性為 84% (圖 4)。

```
1 GCACGAGCTCGGACATTGGCACATCTCTCTCTAAGCCATTCGAGGGTGACCTGAGATC
61 ACATACAAGAATGGTGAAGGCCGTCCGAGTTTTGAACAGCAGTGAGGGTGTTAGTGGGAC
      M V K A V A V L N S S E G V S G T 17
121 TATCCTCTTCACCCAAGATGGAGATGCTCCAACCACAGTGAGTGAAATGTTTCTGGCCT
      I L F T Q D G D A P T T V S G N V S G L 37
181 AAAACCTGGTCTTCATGGCTTCCATGTCCATGCCCTTGGTGATACCACCAATGGCCGCAT
      K P G L H G F H V H A L G D T T N G R M 57
241 GTCAACTGGACCACACTTCAATCCTACTGGAAAGGAACATGGGGCACCACAAGATGAGAA
      S T G P H F N P T G K E H G A P Q D E N 77
301 CCGCCATGCCGGTGATCTTGGAAATATAACAGCTGGAGCAGATGGTGTGCTAATGTCAA
      R H A G D L G N I T A G A D G V A N V N 97
361 TGTCACTGACAGCCAGATCCCCCTTACTGGAGCACACTCCATCATTGGCCGAGCTGTTGT
      V T D S Q I P L T G A H S I I G R A V V 117
421 TGTCATGCTGATCCTGATGACCTCGGAAAGGGAGGACATGAACTCAGCAAACCACTGG
      V H A D P D D L G K G G H E L S K T T G 137
481 AAACGCTGGCGGACGTGTTGCTTGTGGCATTATTGGCCTCCAGGGTTAATTGCTCCTGCG
      N A G G R V A C G I I G L Q G * 152
541 GGGTGAGATTGATGTAACACTAGCGGTGGTGGTCTTAGACCTGGGTTTGGTTGGAGCGGCAT
601 AAGCGTTTGTCTCTGTGTATGATGTGACGCTTTTGAATTTTGGCGTTTAATCTCCGTAC
661 TGTATGTTGTAATAATAAAGTTTTTGGCCGATCATTAAACCATAAAAAAATGCCTGCCGTTA
721 GCTTTGCTGGTTTCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

圖 1. *Sod62* 的核酸序列及氨基酸轉譯序列

Fig. 1. Nucleic acid sequence of *sod62* and its deduced amino acid sequence represented by the one letter codes.

1 50 51 100

Arabidopsis ~maKgVaVL nssegVtGti fFtQegdgvT tVsGtvsGLk PG1HGFFvHA LGDTTNGcmS * * ↓ * * * *
 radish ~mgKgVaVL nssegVtGti fFtQengstT tVtGtvsGLk PG1HGFFvHA LGDTTNGcmS TGPHfNPdGK tHGAPeDanR HAGDLGNity GdDGtasfti
 B. rapa ~maKgVaVL nssegVtGti fFtQegdgaT tVtGtvsGLk PGpHGFFvHA LGDTTNGcmS TGPHfNPdGK tHGAPeDanR HAGDLGNiiv GdDGtasfti
 B. juncea ~mgKgVaVL nssegVtGti fFaQegegkT tVtGtvsGLk PG1HGFFvHA LGDTTNGcmS TGPHfNPdGK qHGAPeDanR HAGDLGNiiv GdDGtasfti
 Sod62 ~mvKaVaVL nssegVsGti lFtQgdapT tVsGnvsGLk PG1HGFFvHA LGDTTNGcmS TGPHfNPtGK eHGAPqDenR HAGDLGNita GaDgvanvny
 rice ~mvKaVaVL assegVtGti fFsQegdgpT sVtGsvsGLk PG1HGFFvHA LGDTTNGcmS TGPHfNPtGK eHGAPqDenR HAGDLGNita GaDgvanvny
 maize ~mvKaVaVL agtd.VkGti fFsQegdgpT tVtGsvsGLk PG1HGFFvHA LGDTTNGcmS TGPHfNPvGK eHGAPeDedR HAGDLGNvta GeDgvyvnyi
 Capsicum ~mvKaVaVL ssssegVsGti lFsQgdapT tVtGnvsGLk PG1HGFFvHA LGDTTNGcmS TGPHyNPaGK eHGAPeDenR HAGDLGNity GeDgvasfti
 Nicotiana ~mvKaVaVL ssssegVsGty lFtQgdapT tVtGnvsGLk PG1HGFFvHA LGDTTNGcmS TGPHyNPaGK eHGAPeDevR HAGDLGNity GeDgvasfti
 Tomato ~mvKaVaVL nssegVsGty lFtQgvapT tVnGnvsGLk PG1HGFFvHA LGDTTNGcmS TGPHyNPaGK eHGAPeDevR HAGDLGNity GeDgvasfti
 Populus ~mvKaVaVL nssegVsGti fFtQegdgpT tViGnlsGLk PG1HGFFvHA LGDTTNGcmS TGPHfNPvGK eHGAPeDenR HAGDLGNvty GdDgtaafti
 Sweet potato ~mvKaVaVL ssssegVsGti fFsQegdgpT tVtGnvsGLk PG1HGFFvHA LGDTTNGcmS TGPHfNPaGK eHGAPeDdnR HAGDLGNity GeDgvasfti
 papaya ~mvKaVaVL ssssegVsGti fFtQaadgpT tVtGeisGLk PGhHGFFvHA LGDTTNGcmS TGPHfNPaGK eHGAPeDdiR HAGDLGNvny GdDgkvsfsi
 spinach ~mgKaVvVL ssssegVsGty yFaQegdgpT tVtGnvsGLk PG1HGFFvHA LGDTTNGcmS TGPHyNPnGK eHGAPeDdvR HAGDLGNity GdDGtasfti
 Pea ~mvKaVaVL snssegVsGti nFsQengpT tVtGtlaGLk PG1HGFFvHA LGDTTNGcmS TGPHfNPnGK eHGAPeDetR HAGDLGNiny GdDGtvsfti
 Pine mg1lKaVvVL ngaadVtGvny qFtQegdgpT tVtGkvsGLk PG1HGFFvHA LGDTTNGcmS TGPHfNP1GK eHGAPtDdnR HAGDLGNvty GtDgtvefsi
 Consensus ~--K-V-VL ----V-G-- -F-Q-----T -V-G--GL- PG-HGFF-HA LGDTTNG--S TGPH-NP-GK -HGAP-D--R HAGDLGN---G-DG-----

101 150 151

Arabidopsis tDcqIPLtGp nSivGraVVV HadpDdLGkG GHELs1aTGN AGGRvACGii GLQG * ↓
 radish tDsQIPLdGp nSivGraVVV HadpDdLGkG GHELs1aTGN AGGRvACGii GLQG
 B. rapa tDsQIPLtGp nSivGraVVV HadrDdLGkG GHELs1sTGN AGGRvACGii GLQG
 B. juncea tDcqIPLsGp nSivGraVVV HadpDvLGkG GHELs1tTGN AGGRvACGii GLQG
 Sod62 tDsQIPLtGa hSiiGraVVV HadpDdLGkG GHELsktTGN AGGRvACGii GLQG
 rice sDsQIPLtGa hSiiGraVVV HadpDdLGkG GHELsktTGN AGGRvACGii GLQG
 maize tDsQIPLaGp hSiiGraVVV HadpDdLGkG GHELsktTGN AGGRvACGii GLQG
 Capsicum tDeqIPLtGp qSiiGrvVVV HadpDdLGkG GHELtkTGN AGGRvACGii GLQG
 Nicotiana tDkqIPLaGp qSiiGraVVV HadpDdLGkG GHELsktTGN AGGRvACGii GLQG
 Tomato tDkqIPLtGp qSiiGraVVV HadpDdLGkG GHELsktTGN AGGRvACGii GLQG
 Populus iDkqIPLtGp hSiiGwaVVV HgdpDdLGkG GHELsktTGN AGGRvACGii GLQG
 Sweet potato tDkqIPLtGa nSivGraVVV HgdpDdLGkG GHELsktTGN AGGRvACGii GLQG
 papaya iDsQIPLtGp nSivGraVVV HadpDdLGkG GHELsktTGN AGGRvACGvi GLQG
 spinach iDsQIPLsGp nSivGraVVV HaepDdLGkG GHELsktTGN AGGRvACGii GLQG
 Pea tDnhIPLtGt nSiiGraVVV HadpDdLGkG GHELsktTGN AGGRvACGii GLQG
 Pine tDsQIPLsGp hSivGraVVV HadpDdLGkG GHELsktTGN AGGR1ACGvv GLQG
 Consensus -D--IPL-G- -S--G--VVV H--D-LG-G GHEL---TGN AGGR-ACG-- GLQG

物種	相似性 (identity)
SOD62	100%
水稻	93%
玉米	89%
甘薯	88%
番茄	88%
菸草	88%
蘿蔔	84%

圖 2. Sod62 演譯之氨基酸與其植物 Cu/Zn-SOD 排列比對的情形

* 為 Cu, Zn 鍵結的位置；↓為雙硫鍵的位置

Fig. 2. Alignment of the predicted amino acid sequences of *sod62* and Cu/Zn-SOD of other plants.

* : indicated the binding sites for Cu and Zn.

↓ : indicated the sites of disulfide bond.

1 AAGTCTCTCTCTCTCTCTTTCTCAACTCTCATCTCATCAACCATGGATCCTTACAAGTAT
M D P Y K Y 6
61 CGTCCAGCGAGTTCTTACAACCTCTCCTTTCTTACCACCAACTCCGGTGCTCCTGTATGG
R P A S S Y N S P F F T T N S G A P V W 26
121 AACAACTCCTCCATGACCGTTGGACCCAGAGGTCTATCCTTCTTGAGGATTATCAT
N N N S S M T V G P R G P I L L E D Y H 46
181 CTAGTTGAGAAGCTTGCTCACTTCGACAGGGAGCGTATTCCAGAGCGTGTGGTTCATGCT
L V E K L A H F D R E R I P E R V V H A 66
241 AGAGGAGCCAGTGCAAAGGGTTTCTTTGAGGTCACTCATGATATATCTAACCTCACATGT
R G A S A K G F F E V T H D I S N L T C 86
301 GCTGATTTCTCAGAGCTCCAGGTGTTGACACACCAGTTATTGTTTCGTTTCTCCACTGTT
A D F L R A P G V Q T P V I V R F S T V 106
361 ATCCATGAGCGTGGAAGCCCTGAGACCTTGAGGGATCCTCGTGGTTTTGCAGTCAAGTTC
I H E R G S P E T L R D P R G F A V K F 126
421 TACACCAGAGAGGGTAACTTTGATCTCGTGGGAAACAACCTCCCTGTCTTTTTTCATCCGT
Y T R E G N F D L V G N N F P V F F I R 146
481 GATGGGATGAAATTCCTGACATGGTCCACGCTCTCAAGCCGAACCCAAAGTCACACATC
D G M K F P D M V H A L K P N P K S H I 166
541 CAAGAGAACTGGAGAGTCCCTTGACTTCTTCTCTCACCACCCTGAGAGCTTAAACATGTTC
Q E N W R V L D F F S H H P E S L N M F 186
601 ACTTTCCTCTTCGATGATATCGGTATCCCACAAGACTACAGACACATGGAAGGCTCAGGT
T F L F D D I G I P Q D Y R H M E G S G 206
661 GTCAACACATACATGTTGATCAACAAATTCGGCAAGGCTCACTACGTGAAGTTCCTACTGG
V N T Y M L I N K F G K A H Y V K F H W 226
721 AAACCAACTTGTGGAGTCAAGTCTTTGCTAGAAGAAGATGCAATCCGTGTTGGTGGAAACC
K P T C G V K S L L E E D A I R V G G T 246
781 AACCACAGCCACGCGACTCAGGACTTGTACGACTCCATCGCAGCTGGTAACTACCCTGAG
N H S H A T Q D L Y D S I A A G N Y P E 266
841 TGGAAGCTCTTTGTTTCAGACTATTGATCCGGCTGATGAGGACAAGTTCGACTTTGACCCT
W K L F V Q T I D P A D E D K F D F D P 286
901 CTCGATGTCACCAAGACCTGGCCTGAGGATATCTTGCCCCTGCAGCCCGTTGGGCGTATG
L D V T K T W P E D I L P L Q P V G R M 306
961 GTGTTGAACAAGAACATTGATAACTTCTTTGCGGAGAATGAACAGCTTGCTTTCTGCCCT
V L N K N I D N F F A E N E Q L A F C P 326
1021 GCGATCATTGTTCCGGGAATTCCTACTCTGATGATAAGCTGCTTCAGACACGTGTCTTC
A I I V P G I H Y S D D K L L Q T R V F 346
1081 TCCTATGCTGATACTCAGAGACACCGTCTTGGACCAAACTATCTGCAGCTACCTGTGAAT
S Y A D T Q R H R L G P N Y L Q L P V N 366
1141 GCTCCAAAATGTGCTCACCACAACAACCACCATGAGGGATTTCATGAATTTTCATGCACAGG


```
A P K C A H H N N H H E G F M N F M H R 386
1201 GACGAGGAGGTAACTACTTCCCTTCGAGGTATGACCCGGTTCGCCATGCTGAGAAGTAC
D E E V N Y F P S R Y D P V R H A E K Y 406
1261 CCAACTCCACCTGCTGTCTGCACTGGGAAGCGTGAGAGGTGCATCATTGAGAAGGAGAAC
P T P P A V C T G K R E R C I I E K E N 426
1321 AACTTCAAGGAGCCTGGAGAGAGATAACCGTTCCTTCACACCAGAGAGGCAAGAACGTTTC
N F K E P G E R Y R S F T P E R Q E R F 446
1381 ATCGGTCGATGGATTGATGCTCTGTCTGACACCCCTCGCATCACCCATGAAATCCGCAGCATC
I G R W I D A L S D P R I T H E I R S I 466
1441 TGGATCTCTTACTGGTCTCAGGCGGATAAGTCTCTTGGACAGAAGCTGGCAAGCCGTCTG
W I S Y W S Q A D K S L G Q K L A S R L 486
1501 AACCTGAGACCAAGCATCTAAGGAGAGTGAACAAGATTCTTGATTGGTCGTTGTGTGGTT
N L R P S I * 492
1561 CTAATAGGCAAGAGAAGAAAGATGGGAAGAGATCAGATGTGCCATGGTATAATCTTCATC
1621 ATGTGGATCTTGTGTGTTGTGTTTTGTTCAAAATAAATACATCACAGATTTTATAATAA
1681 AAAAAAAAAAAAAA
```

圖 3. *Cat78* 的核酸序列及氨基酸轉譯序列。S-R-L 為 CAT78 進入過氧化體的辨識序列
Fig. 3. Nucleic acid sequence of *cat78* encoded amino acid being represented by the one letter codes.

	1			50	51			100		
potato	MDpskyRpsS	aydtplftTN	aGgPyyNNvs	s1TVGpRGpv	LLEDYyLiEK	1atFdREkIP	ERVVHARGAS	AKGFFEVTHD	ishLtCADFL	RAPGvQTPvI
tomato	MDpskyRpsS	aydtplftTN	aGgPyyNNvs	s1TVGpRGpv	LLEDYyLiEK	1atFdREkIP	ERVVHARGAS	AKGFFEVTHD	ishLtCADFL	RAPGvQTPvI
eggplant	MDlskyRpsS	aydtplftTN	aGgPyyNNvs	s1TVGpRGpv	LLEDYhLiEK	1atFdRErIP	ERVVHARGAS	AKGFFEVTHD	vshLtCADFL	RAPGvQTPvI
Nicotiana	MDlskfRpsS	aydspflftTN	aGgPyyNNvs	s1TVGpRGpv	LLEDYhLiEK	1atFdRErIP	ERVVHARGAS	AKGFFEVTHD	ishLtCADFL	RAPGvQTPvI
barley	MDpykhRptS	gansaywtTN	sGaPvwNNnn	a1TVGhRGpi	LLEDYhLiEK	1aqFdRErIP	ERVVHARGAS	AKGFFEVTHD	vsqLtCADFL	RAPGvQTPvI
wheat	MDpykhRptS	gansaywtTN	sGaPvwNNnn	a1TVGhRGpi	LLEDYhLiEK	1aqFdRErIP	ERVVHARGAS	AKGFFEVTHD	vsqLtCADFL	RAPGvQTPvI
maize	MDpykhRpsS	gsnsstfwtTN	sGaPvwNNns	a1TVGqRGpi	LLEDYhLiEK	1aqFdRErIP	ERVVHARGAS	AKGFFEVTHD	vshLtCADFL	RAPGvQTPvI
rice	MDpykhRasS	gsnsstfwtTN	sGaPvwNNns	a1TVGqRGpi	LLEDYhLiEK	1aqFdRErIP	ERVVHARGAS	AKGFFEVTHD	ishLtCADFL	RAPGvQTPvI
B. jun	MDpykyRpaS	synspffftTN	fGaPvwNNns	sm1TVGpRGpi	LLEDYhLVEK	1anFdRErIP	ERVVHARGAS	AKGFFEVTHD	isnLtCADFL	RAPGvQTPvI
radish	MDpykyRpaS	synspffftTN	sGaPvwNNns	sm1TVGpRGpi	LLEDYhLVEK	1anFdRErIP	ERVVHARGAS	AKGFFEVTHD	isnLtCADFL	RAPGvQTPvI
cat78	MDpykyRpaS	synspffftTN	sGaPvwNNns	sm1TVGpRGpi	LLEDYhLVEK	1ahFdRErIP	ERVVHARGAS	AKGFFEVTHD	isnLtCADFL	RAPGvQTPvI
Arabidopsis	MDpykyRpaS	synspffftTN	sGaPvwNNns	sm1TVGpRGpi	LLEDYhLVEK	1anFdRErIP	ERVVHARGAS	AKGFFEVTHD	isnLtCADFL	RAPGvQTPvI
cotton	MDpykhRpsS	afnspfwftTN	sGaPvwNNns	s1TVGqRGgy	LLEDYhLVEK	1anFdRErIP	ERVVHARGAS	AKGFFEVTHD	ishLtCADFL	RAPGvQTPvI
pumpkin	MDpyrhRpsS	afnspfwftTN	sGaPvwNNns	sm1TVGpRGpi	LLEDYhLVEK	1anFdRErIP	ERVVHARGAS	AKGFFEVTHD	itnLsCADFL	RAPGvQTPvI
soybean	MDpyknRpsS	afnspfwftTN	sGaPvwNNns	s1TVGsRGpi	LLEDYhLVEK	1anFdRErIP	ERVVHARGAS	AKGFFEVTHD	ishLtCADFL	RAPGvQTPvI
sunflower	MDpykyRpsS	aynspfwftTN	sGaPvwNNnn	s1TVGsRGpi	LLEDYhLVEK	1anFdRErIP	ERVVHARGAS	AKGFFEVTHD	itaLtCADFL	RAPGvQTPvI
pea	MDpykhRpsS	afnspfwftTN	sGaPvwNNns	s1TVGsRGpi	LLEDYhLVEK	1aqFdRErIP	ERVVHARGAS	AKGFFEVTHD	ishLtCADFL	RAPGvQTPvI
sweetpotato	MDpskyRpsS	sfnptpftTN	sGaPvwNNtc	a1TVGsRGpi	LLEDYhLVEK	1qnFtRErIP	ERVVHARGAS	AKGFFEVTHD	ithLtCADFL	RAPGvQTPvI
Consensus	MD---R--S	-----TN	-G-P--NN--	--TVG-RG--	LLEDY-L-EK	---F-RE-IP	ERVVHARGAS	AKGFFEVTHD	--L-CADFL	RAPG-QTP-I

	101			150	151			200		
potato	cRFSTVvHeR	GSPEsIRDiR	GfGvKfYnRg	GNfDLVGNVn	PvFFnrDaks	FpdtiralKP	npkshiQEdW	rtlDdfsf1P	ESLhtFaffy	DDvclPtDYR
tomato	cRFSTVvHeR	GSPEsIRDiR	GfGvKfYtRe	GNfDLVGNVn	PvFFnrDaks	FpdtiralKP	npkshiQEnW	ri1Ddfsf1P	ESLhtFaffy	DDvclPtDYR
eggplant	cRFSTVvHeR	GSPEsIRDiR	GfGvKfYtRe	GNfDLVGNVn	PvFFnrDaks	FpdtiralKP	npkshiQEnW	ki1Ddfsf1P	ESLhtFaffy	DDvclPInYR
Nicotiana	cRFSTVvHeR	GSPEsIRDiR	GfGvKfYtRe	GNfDLVGNVn	PvFFnrDaks	FpdtiralKP	npkshiQEnW	ki1Ddfsf1P	ESLhtFaffy	DDvclPtDYR
barley	vRFSTVvHeR	GSPEtIRDpR	GfGvKfYtRe	GNfDLVGNVn	PvFFnrDgmk	FpdmvhaFKP	spktnmQEnW	rvvDdfshhP	ESLhmFtflf	DDvgiPlnYR
wheat	vRFSTVvHeR	GSPEtIRDpR	GfGvKfYtRe	GNfDLVGNVn	PvFFnrDgmk	FpdmvhaFKP	spktnmQEnW	rvvDdfshhP	ESLhmFtflf	DDvgiPlnYR
maize	vRFSTVvHeR	GSPEtIRDpR	GfGvKfYtRe	GNfDLVGNVn	PvFFnrDgmk	FpdmvhaFKP	spktnmQEnW	rvvDdfshhP	ESLhmFtflf	DDvgiPlnYR
rice	vRFSTVvHeR	GSPEtIRDpR	GfGvKfYtRe	GNfDLVGNVn	PvFFnrDgmk	FpdmvhaFKP	spktnmQEnW	rvvDdfshhP	ESLhmFtflf	DDvgiPlnYR
B. jun	vRFSTVvHeR	GSPEtIRDpR	GfGvKfYtRe	GNfDLVGNVn	PvFFnrDgmk	FpdmvhaFKP	spktnmQEnW	rvvDdfshhP	ESLhmFtflf	DDvgiPlnYR
radish	vRFSTVvHeR	GSPEtIRDpR	GfGvKfYtRe	GNfDLVGNVn	PvFFnrDgmk	FpdmvhaFKP	spktnmQEnW	rvvDdfshhP	ESLhmFtflf	DDvgiPlnYR
cat78	vRFSTVvHeR	GSPEtIRDpR	GfGvKfYtRe	GNfDLVGNVn	PvFFnrDgmk	FpdmvhaFKP	spktnmQEnW	rvvDdfshhP	ESLhmFtflf	DDvgiPlnYR
Arabidopsis	vRFSTVvHeR	GSPEtIRDpR	GfGvKfYtRe	GNfDLVGNVn	PvFFnrDgmk	FpdmvhaFKP	spktnmQEnW	rvvDdfshhP	ESLhmFtflf	DDvgiPlnYR
cotton	vRFSTVvHeR	GSPEtIRDpR	GfGvKfYtRe	GNfDLVGNVn	PvFFnrDgmk	FpdmvhaFKP	spktnmQEnW	rvvDdfshhP	ESLhmFtflf	DDvgiPlnYR
pumpkin	vRFSTVvHeR	GSPEtIRDpR	GfGvKfYtRe	GNfDLVGNVn	PvFFnrDgmk	FpdmvhaFKP	spktnmQEnW	rvvDdfshhP	ESLhmFtflf	DDvgiPlnYR
soybean	vRFSTVvHeR	GSPEtIRDpR	GfGvKfYtRe	GNfDLVGNVn	PvFFnrDgmk	FpdmvhaFKP	spktnmQEnW	rvvDdfshhP	ESLhmFtflf	DDvgiPlnYR
sunflower	vRFSTVvHeR	GSPEtIRDpR	GfGvKfYtRe	GNfDLVGNVn	PvFFnrDgmk	FpdmvhaFKP	spktnmQEnW	rvvDdfshhP	ESLhmFtflf	DDvgiPlnYR
pea	vRFSTVvHeR	GSPEtIRDpR	GfGvKfYtRe	GNfDLVGNVn	PvFFnrDgmk	FpdmvhaFKP	spktnmQEnW	rvvDdfshhP	ESLhmFtflf	DDvgiPlnYR
sweetpotato	vRFSTVvHeR	GSPEtIRDpR	GfGvKfYtRe	GNfDLVGNVn	PvFFnrDgmk	FpdmvhaFKP	spktnmQEnW	rvvDdfshhP	ESLhmFtflf	DDvgiPlnYR
Consensus	-RFSTV-H-R	GSPE--RD-R	GF-VK-Y-R-	GN-DLVGNVn	P-FF--D---	F-----KP	-----QE-W	---D- ----P	ESL--F----	DD---P--YR

	201			250	251			300		
potato	HMeGfGvHay	q1InkeGKah	yVKfHWkPtc	GvKcmseeeA	irvGGtnHsH	ATkDLydSIA	AGNYPEWKLf	iQtmDpedvD	kfdFDPLDvT	KtWPED11PL
tomato	HMeGfGvHay	q1InkeGKah	yVKfHWkPtc	GvKcmseeeA	irvGGtnHsH	ATkDLydSIA	AGNYPEWKLf	iQtmDpedvD	kfdFDPLDvT	KtWPED11PL
eggplant	HMeGfGvHay	q1InkaGKah	yVKfHWkPtc	GvKsmteeeA	irvGGtnHsH	ATkDLydSIA	AGNYPEWKLf	iQimDpedvD	kfdFDPLDvT	KtWPED11PL
Nicotiana	HMeGfGvHay	q1InkaGKah	yVKfHWkPtc	GvKcmseeeA	irvGGtnHsH	ATkDLydSIA	AGNYPEWKLf	iQimDpedvD	kfdFDPLDvT	KtWPED11PL
barley	HMdGfGvNty	t1IsrdGKah	1VKfHWkPtc	GvKcl1ddeA	vtvGGtChsH	ATkDLtdSIA	AGNYPEWKLf	iQtiDadheD	rfdFDPLDvT	KtWPED11PL
wheat	HMdGfGvNty	t1IsrdGKah	1VKfHWkPtc	GvKcl1ddeA	vtvGGtChsH	ATkDLtdSIA	AGNYPEWKLf	iQtiDadheD	rfdFDPLDvT	KtWPED11PL
maize	HMeGfGvNty	s1InrdGKph	1VKfHWkPtc	GvKcl1ddeA	vtvGGtChsH	ATkDLydSIA	AGNYPEWKLf	iQtiD1dheD	kfdFDPLDvT	KtWPED11PL
rice	HMeGfGvNty	t1InkdGKph	1VKfHWkPtc	GvKcl1ddeA	vtvGGtChsH	ATkDLtdSIA	AGNYPEWKLf	iQtiDpdheD	rfdFDPLDvT	KtWPED11PL
B. jun	HMeGfGvNty	m1InksGKah	yVKfHWkPtc	GvKs1leeda	irvGGtnHsH	ATqDLydSIA	AGNYPEWKLf	vQi1DpadeD	rfdFDPLDvT	KtWPED11PL
radish	HMeGfGvNty	m1InksGKah	yVKfHWkPtc	GvKs1leeda	irvGGtnHsH	ATqDLydSIA	AGNYPEWKLf	vQi1DpadeD	rfdFDPLDvT	KtWPED11PL
cat78	HMeGfGvNty	m1InkfGKah	yVKfHWkPtc	GvKs1leeda	irvGGtnHsH	ATqDLydSIA	AGNYPEWKLf	vQi1DpadeD	kfdFDPLDvT	KtWPED11PL
Arabidopsis	HMdGfGvNty	m1InkaGKah	yVKfHWkPtc	GvKs1leeda	irvGGtnHsH	ATqDLydSIA	AGNYPEWKLf	iQi1DpadeD	kfdFDPLDvT	KtWPED11PL
cotton	HMeGfGvNty	t1InkaGKah	yVKfHWkPtc	GvKcl1ddeA	irvGGtnHsH	ATqDLydSIA	AGNYPEWKLf	iQtiDpdheD	kfdFDPLDvT	KtWPED11PL
pumpkin	HMdGfGvNty	t1InkaGKah	yVKfHWkPtc	GvKs1leeda	irvGGtnHsH	ATqDLydSIA	AGNYPEWKLf	iQtiDpdheD	kydFDPLDvT	KtWPED11PL
soybean	HMdGfGvNty	t1InkaGKah	yVKfHWkPtc	GvKs1leeda	irvGGtnHsH	ATqDLydSIA	AGNYPEWKLf	iQtiDpdheD	rfdFDPLDvT	KtWPED11PL
sunflower	HMdGfGvNty	t1InkaGKah	yVKfHWkPtc	GvKs1leeda	irvGGtnHsH	ATqDLydSIA	AGNYPEWKLf	iQtiDpdheD	rfdFDPLDvT	KtWPED11PL
pea	HMdGfGvNty	t1InkaGKah	yVKfHWkPtc	GvKs1leeda	irvGGtnHsH	ATqDLydSIA	AGNYPEWKLf	iQtiDpdheD	rfdFDPLDvT	KtWPED11PL
sweetpotato	HMeGfGvNty	t1InkaGKah	yVKfHWkPtc	GvKs1leeda	irvGGtnHsH	ATqDLydSIA	AGNYPEWKLf	iQtiDpdheD	rfdFDPLDvT	KtWPED11PL
Consensus	HM-G-GV---	--I---GK--	-VKfHW--T-	G-K-----A	---GG--H-H	AT-DL--SIA	AGNYPEWKLf	-Q--D-----D	---FDPLD-T	K-WPE---PL

	301				350	351							400
potato	iPVGR1VLN	NiDNFFAENE	qlAfnPghiv	PGiyySeDK1	LQtRiFaYaD	tqRHRiGPNY	mqLPvNAPKc	ghHNNhrdGa	MNntHRDEE	v	dYfPSrfdPc		
tomato	iPVGR1VLN	NiDNFFAENE	qlAfnPghiv	PGiyySeDK1	LQtRiFaYaD	tqRHRiGPNY	mqLPvNAPKc	ghHNNhrdGa	MNntHRDEE	v	dYfPSrfdPc		
eggplant	mPVGR1VLN	NiDNFFAENE	qlAfnPghiv	PGvyySeDK1	LQtRiFaYaD	tqRHRiGPNY	mqLPvNAPKc	ahHNNhrdGa	MNfmHRDEE	v	dYfPSrfdPc		
Nicotiana	mPVGR1VLN	NiDNFFAENE	qlAfnPghiv	PGiyySeDK1	LQtRiFaYaD	tqRHRiGPNY	mqLPvNAPKc	ahHNNhrdGa	MNfmHRDEE	v	dYfPSrfdPc		
barley	qPVGRmVLNk	NiDNFFAENE	qlAfcPavtv	PGihySdDK1	LQtRiFsYaD	tqRHRiGPNY	lmLPvNAPKc	ahHNNhdG1	MNfiHRDEE	v	nYfPSrfdPt		
wheat	qPVGRmVLNk	NiDNFFAENE	qlAfcPavtv	PGihySdDK1	LQtRiFsYaD	tqRHRiGPNY	lmLPvNAPKc	ahHNNhdG1	MNfiHRDEE	v	nYfPSrfdPt		
maize	qPVGRmVLNk	NvDNFFAENE	qiAfcPaisv	PGihySdDK1	LQtRiFsYaD	tqRHRiGPNY	lmLPvNAPKc	ahHNNhdGf	MNfmHRDEE	v	nYfPSrfdPa		
rice	qPVGRmVLNk	NiDNFFAENE	qlAfcPaiiv	PGihySdDK1	LQtRiFsYaD	tqRHRiGPNY	lmLPvNAPKc	ayHNNhdGs	MNfmHRDEE	v	nYfPSrfdDaa		
B. jun	qPVGRmVLNk	NiDNFFAENE	qlAfcPaiiv	PGihySdDK1	LQtRvFsYaD	tqRHRiGPNY	lqLPvNAPKc	ahHNNhheGf	MNfmHRDEE	v	nYfPSryDpv		
radish	qPVGRmVLNk	NiDNFFAENE	qlAfcPaiiv	PGihySdDK1	LQtRvFsYaD	tqRHRiGPNY	lqLPvNAPKc	ahHNNhheGf	MNfmHRDEE	v	nYfPSryDpv		
cat78	qPVGRmVLNk	NiDNFFAENE	qlAfcPaiiv	PGihySdDK1	LQtRvFsYaD	tqRHRiGPNY	lqLPvNAPKc	ahHNNhheGf	MNfmHRDEE	v	nYfPSryDpv		
Arabidopsis	qPVGRmVLNk	NiDNFFAENE	qlAfcPaiiv	PGihySdDK1	LQtRvFsYaD	tqRHRiGPNY	lqLPvNAPKc	ahHNNhheGf	MNfmHRDEE	v	nYfPSryDqv		
cotton	qPVGR1VLNk	NiDNFFAENE	qlAfcPaiiv	PGiyySdDK1	LQtRiFsYsD	tqRHRiGPNY	lqLPaNAPKc	ahHNNhheGf	MNfmHRDEE	v	nYfPSryDps		
pumpkin	qPVGRmVLNk	NiDNFFAENE	qlAfcPaiiv	PGvyySdDK1	LQtRiFsYaD	tqRHRiGPNY	lqLPaNAPKc	ahHNNhheGf	MNfmHRDEE	v	nYfPSrfdDps		
soybean	qPVGRmVLNk	NiDNFFAENE	qlAfcPaiiv	PGvyySdDK1	LQtRvFsYsD	tqRHRiGPNY	lqLPaNAPKc	ahHNNhdGf	MNfmHRDEE	v	nYfPSryDpv		
sunflower	qPVGR1VLNk	NiDNFFAENE	qlAfcPaiiv	PGiyySdDK1	LQtRiFsYsD	tqRHRiGPNY	lqLPaNAPKc	ahHNNhdGf	MNfmHRDEE	v	dYfPSryDpa		
pea	qPVGRmVLNk	NiDNFFAENE	qlAfcPaiml	PGiyySdDKm	LQtRvFsYaD	sqRHRiGPNY	lqLPvNAPKw	ahHNNhheGf	MNaHRDEE	v	nYfPSrhdTv		
sweetpotato	qPVGRmVLNk	NiDNFFAENE	mlAmdPahiv	PGiyfSdDKm	LQaRvFsYaD	thRHRiGPNY	mlLPvNAPKc	ahHNNsydGy	MNfvHRDEE	v	dYfPSkfdNt		
Consensus	-PVGR-VLN-	N-DNFFAENE	--A--P----	PG---S-DK-	LQ-R-F-Y-D	--RHR-GPNY	--LP-NAPK-	--HNN---G-	MN--HRDEE-	-Y-PS--D--			
	401				450	451							494
potato	RpAEqyPiPa	cvlngRtnc	vIpkeNnskq	aGeRYRswes	dRQdRyinkw	vesLs..dpr	vThEirsiWi	SYlsQaDksc	GQKvasrLtv	kPtm			
tomato	RpAEqyPiPs	cvlngRtnc	vIpkeNnfkq	aGeRYRswep	dRQdRyinkw	vesLs..dpr	vThEirsiWi	SYlsQaDksc	GQKvasrLtv	kPtm			
eggplant	RpAEqyPiPs	cvltgrRekC	vIpkeNnfkq	aGeRYRswep	dRQdRyinkw	vesLs..dpr	vThEirsiWi	SYlsQaDksc	GQKvasrLtv	kPtm			
Nicotiana	RhAEqyPiPs	rvtlgrRemC	vIlekeNnfkq	aGeRYRswep	dRQdRyyskw	vehLs..dpr	vTyEirsiWi	SYlsQaDksc	GQKvasrLtl	kPtm			
barley	RhAEkyPmPp	rvtlgrRekC	iIdkeNnfkq	aGeRYRsfdp	arQdRflqrw	vdaLt..dar	vThEiqsiWv	SYwsQcDasl	GQKlaserLki	kPnm			
wheat	RhAEkdPmPp	rvtlgrRekC	iIdkeNnfkq	aGeRYRsfdp	arQdRflqrw	vdaLt..dar	vThEiqsiWv	SYwsQcDasl	GQKlaserLki	kPnm			
maize	RhAEkvPiPp	rvtlgrRekC	iIqkeNnfkq	aGeRYRsfdp	arQdRflqrw	vdaLt..dpr	vThEhrtiWi	SYwsQcDaal	GQKlpsrLnl	kPsm			
rice	RhAEkvPiPp	rvtlgrRekC	vIdkeNnfq	aGeRYRsfdp	arQdRflqrw	vdaLs..dpr	iThElrgiWi	SYwsQcDasl	GQKlaserLnl	kPnm			
B. jun	RhAEkvPtPp	aicsgkRerC	iIlekeNnfke	pGeRYRsfpt	eRQeRfigrw	idaLs..dpr	iThEirsiWi	SYwsQaDksl	GQKlanrLnv	rPsi			
radish	RhAEkvPtPp	avcsgrRerC	iIlekeNnfke	pGeRYRsfpt	eRQeRfigrw	idaLs..dpr	iThEirsiWi	SYwsQaDksl	GQKlanrLnv	rPsi			
cat78	RhAEkvPtPp	avctgrRekC	iIlekeNnfke	pGeRYRsfpt	eRQeRfigrw	idaLs..dpr	iThEirsiWi	SYwsQaDksl	GQKlanrLnv	rPsi			
Arabidopsis	RhAEkvPtPp	avcsgrRerC	iIlekeNnfke	pGeRYRsfpt	eRQeRfigrw	idaLs..dpr	iThEirsiWi	SYwsQaDksl	GQKlanrLnv	rPsi			
cotton	RhAEkfPiPp	avctgrRekC	iIlekeNnfkq	pGeRYRswaa	dRQeRfrcrw	vdaLs..dpr	vThEirsiWi	SYwsQaDksv	GQKlaserLnv	rPsi			
pumpkin	RhAErvPhPp	avcsgrRerC	iIlekeNnfke	pGeRYRswpt	dRQeRfvrrw	vdaLs..dtr	vThEirsiWi	SYwsQaDrs1	GQKlashLnv	rPsi			
soybean	RhAEkvPvPp	riltgkRekC	mIlekeNnfkq	pGeRYRswps	dRQeRfvrrw	vdaLs..dpr	vThEirsiWi	SYwsQaDrs1	GQKlashLnl	kPsi			
sunflower	RhAEqyPiPp	rvtlgrRekC	vIlekeNnfkq	pGeRYRsfsp	dRQeRfinrv	vvgLs..dpr	vThEvrsiWv	SYwsQaDks1	GQKiasrLnv	kPny			
pea	RhAErvPiPt	thlsarRekC	nIpkqNhfkq	aGeRYRtwap	dRQeRflrrw	veaLsdtdpr	iThEirsiWv	SYwsQaDrs1	GQKlashLnm	rPsi			
sweetpotato	RhAErfPtPl	rvtlgrRdkC	vIlekeNnfkq	pGdRYRswap	dRQdRfinrv	vkaLs..epR	vThEirsiWi	SYltQaDrs1	GQKvasrLni	rPtm			
Consensus	R-AB--P-P-	-----R-C	-I---N----	-G-RYR----	-RQ-R-----	---L-----R	-T-B----W-	SY--Q-D---	GQK----L--	-P--			

物 種	相似性 (identity)
CAT78	100%
芥菜	98%
蘿蔔	97%
阿拉伯芥	97%
棉花	90%
菸草	87%
豌豆	86%
水稻	84%
玉米	84%

圖 4. *Cat78* 演譯之氨基酸與其他植物 CAT 排列比對的情形

Fig. 4. Alignment of the predicted amino acid sequences of *cat78* and that of other plants.

三、Sod62 及 Cat78 在 *E. coli* 菌體內之表現

Sod62 基因構築在以 T5 為啟動子的表現載體 pQE30, pQE31 及 pQE32 上, 得到重組質體 pQE30-sod62, pQE31-sod62 及 pQE32-sod62, 將這些重組質體分別轉形至 *E. coli* novablue, 並以 IPTG 誘導 sod62 基因的表現。其總蛋白質可在 SDS-PAGE 膠片上看到 pQE32-sod62 有大量表現的明顯條帶 (Lanes 3~5), 分子量為 55 kDa (圖 5A)。再以 native PAGE 檢驗其是否具有 SOD 活性, 結果顯示, pQE32-sod62 具有另一 SOD 活性染色條帶 (圖 5B, Lanes 4, 5), 證實 sod62 可表現出 SOD 酵素活性。

將 cat78 基因構築在以 T5 為啟動子的表現載體 pQE30, pQE31 及 pQE32 上, 得到重組質體 pQE30-cat78, pQE31-cat78 及 pQE32-cat78。將這些重組質體分別轉形至 *E. coli* novablue, 並以 IPTG 誘導 cat78 基因的表現。其總蛋白質可在 SDS-PAGE 膠片上看到 pQE31-cat78 有大量表現的明顯條帶 (Lanes 1, 2, 4, 9), 分子量為 57 kDa (圖 6A)。再以 native PAGE 檢驗其是否具有 CAT 活性, 結果顯示, pQE32-cat78 具有另一 CAT 活性染色條帶 (圖 6B, Lanes 4, 5, 6), 證實 cat78 可表現出具有 CAT 活性之蛋白質。

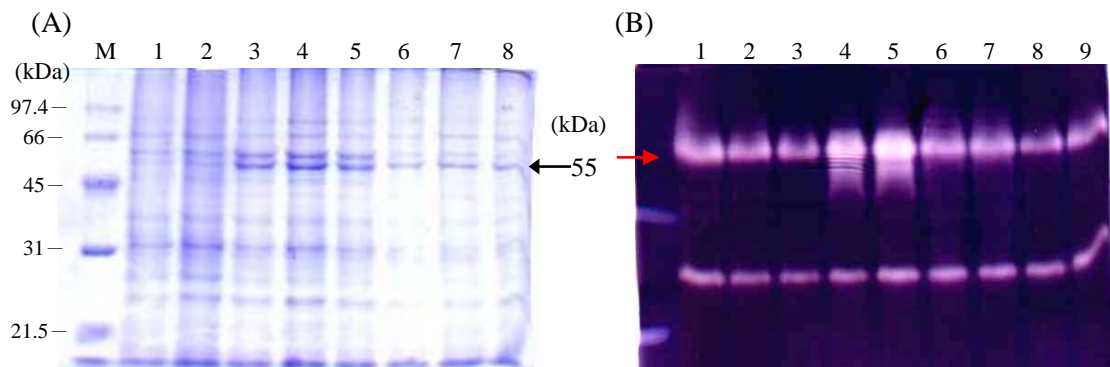


圖 5. 以 SDS-PAGE 分析結球白菜之 sod62 在 *E. coli* novablue 中表現情形 (A)。其蛋白質 (80 μ g) 經 native PAGE 電泳分析後, 進行 SOD 的活性染色情形 (B)。(A) M: marker (100 ng); Lane 1: *E. coli* novablue; Lane 2: pQE32/*E. coli* novablue; Lanes 3~5: pQE32-sod62/*E. coli* novablue; Lane 6: pQE31-sod62/*E. coli* novablue; Lanes 7~8: pQE30-sod62/*E. coli* novablue。Lanes 1-8: 80 μ g。(B) Lane 1: *E. coli* novablue; Lanes 2, 3: pQE32/*E. coli* novablue; Lanes 4, 5: pQE32-sod62/*E. coli* novablue; Lanes 6, 7: pQE31-sod62/*E. coli* novablue; Lanes 8, 9: pQE30-sod62/*E. coli* novablue。

Fig. 5. SDS-PAGE analysis of SOD (A) and native PAGE analysis of SOD activity (B) prepared from *E. coli* novablue harboring sod gene of Chinese cabbage.

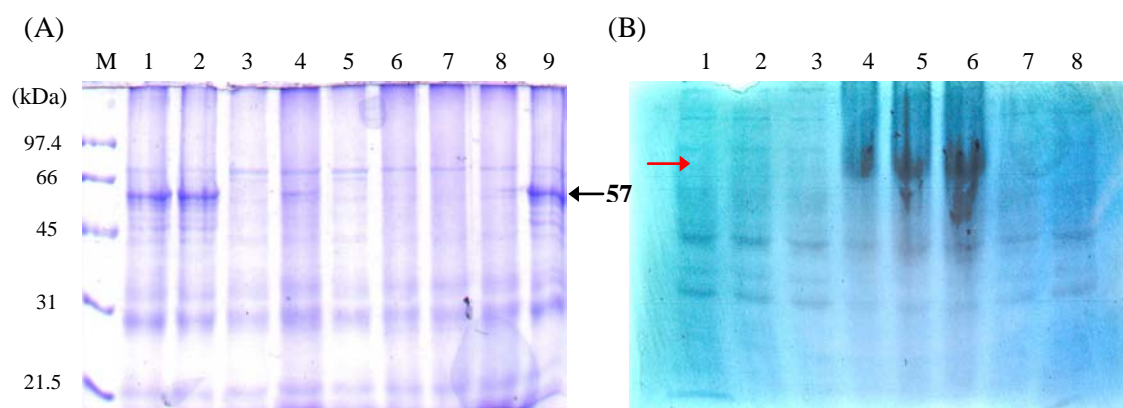


圖 6. 以 SDS-PAGE 分析結球白菜之 *cat78* 在 *E. coli* novablue 中表現情形 (A)。其蛋白質 (80 μ g) 經 native PAGE 電泳分析後，進行 CAT 的活性染色情形 (B)。(A) M: marker (100 ng); Lane 1~2: pQE31-*cat78*/*E. coli* novablue; Lane 3: *E. coli* novablue; Lane 4: pQE31-*cat78*/*E. coli* novablue; Lanes 5~6: pQE30-*cat78*/*E. coli* novablue; Lanes 7~8: pQE32-*cat78*/*E. coli* novablue; Lane 9: pQE31-*cat78*/*E. coli* novablue。Lanes 1-9: 80 μ g。(B) Lane 1: *E. coli* novablue; Lanes 2, 3: pQE32/*E. coli* novablue; Lanes 4, 5, 6: pQE31-*cat78*/*E. coli* novablue; Lane 7: pQE32-*cat78*/*E. coli* novablue; Lane 8: pQE30-*cat78*/*E. coli* novablue. Lanes 1-9: 80 μ g

Fig. 6. SDS-PAGE analysis of CAT (A) and native PAGE analysis of CAT activity (B) prepared from *E. coli* novablue harboring *cat* gene of Chinese cabbage.

四、*sod62* 及 *Cat78* 之表現及特性分析

為了探討 *sod62* 在結球白菜內遭遇氧化逆境時的表現情形，所以將結球白菜以巴拉刈處理，偵測其 RNA 的表現情形。將結球白菜生長 4 週的葉片噴灑 200 μ M 巴拉刈，經過 0, 1, 3, 6, 12 及 24 小時作用後抽取其 RNA，以 *sod62* 為探針，進行北方墨點分析，結果顯示，於 0.7 kb 處有一雜交條帶，雜交訊號於處理 1 小時後即大量增加，而後一直保持大量的表現迨 24 小時 (圖 7A)。

為了探討 *cat78* 在結球白菜內遭遇氧化逆境時的表現情形，所以將結球白菜以巴拉刈處理，偵測其 RNA 的表現情形。將結球白菜生長 4 週的葉片噴灑 200 μ M MV，經過 0, 1, 3, 6, 12 及 24 小時後萃取其 RNA，以 *cat78* 為探針，進行北方墨點分析，結果顯示，未處理前即有表現，但於於處理 MV 1 小時 CAT 的表現量劇增，而後也保持很高的表現量，迨 24 小時後仍持續增加 (圖 7B)。

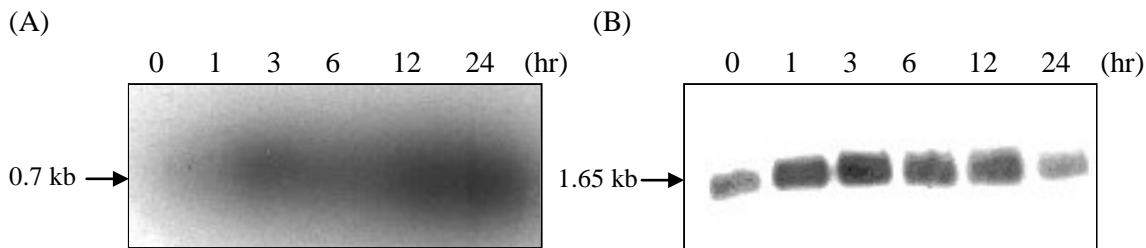


圖 7. 結球白菜植株經 200 μM 巴拉刈處理 1, 3, 6, 12 及 24 小時作用後，萃取葉片 RNA，以 *sod62* (A) 及 *cat78* (B) 為探針進行北方墨點雜交分析之情形。RNA 為 120 μg 。
Fig. 7. Northern-blot hybridization of *sod62* and *cat78*. RNA was extracted from leaves of Chinese cabbage after 1, 3, 6, 12, and 24 hours of 200 μM paraquat treatment.

討 論

一、結球白菜 *sod* 及 *cat* 基因之篩選及分析

為了增加結球白菜 *sod* 基因之篩選機率，因此必須提高 *sod* 及 *cat* 基因 mRNA 的表現量，使之於 cDNA 庫中所佔的比率增加，在前人的報導中發現，*sod* 及 *cat* 基因會隨著逆境的處理而增加轉錄及轉譯 (Higo and Higo, 1996)。因此，本實驗先將結球白菜置於 800 ppb SO_2 下 7 小時，期望能大量誘導 *sod* 及 *cat* 基因 mRNA 之表現。本實驗共篩選了約十萬個溶菌斑，得到了五個核酸序列相似，但長短不同的殖系，且這些殖系的核酸序列與其他物種的 *sod* 基因極為相似。

Sod62 中最長的 ORF 可演譯 152 個胺基酸，一般的 Cu/Zn-SOD 基因的胺基酸，常見者為 152 及 154 個胺基酸，再次為 153 個胺基酸，鮮少 Cu/Zn-SOD 基因胺基酸不是此數目。Cu/Zn-SOD 胺基酸序列具有兩個保存性 (consensus) 的區域：(G,A) (I,F,A,T) H (L,I,V,F) Hx2 (G,P) (S,D,G) x (S,T,A,G,D)、G(G,N) (S,G,A) GxRx (S,G,A) Cx2 (I,V)。第一個區域中的兩個 histidine 是與銅，鋅的結合位置，第二個區域中的 cysteine 與雙硫鍵的形成有關。pSOD62 亦存在這兩個區域基酸序列，其胺基酸序列分別為：³⁹PGLHGFHVHALGDTTNGRM⁵⁷ 及 ¹³²LSKTTGNAGGRVACGI¹⁴⁷ 均存在。除了上述兩個最具保留性的區域外，*sod62* 共有 6 個 histidine 及 1 個於 aspartic acid 與 Cu/Zn 鍵結的位置，及 2 個形成雙硫鍵的 cysteine (Tainer *et al.*, 1992)。這些演化上的保留，使每個物種間的 Cu/Zn-SOD 差距都不大，符合一般基因的演化特性是物種愈接近，則基因就愈相似的原則。

本實驗所篩選之 *cat78* 基因與芥菜、阿拉伯芥及蘿蔔的 *cat* 基因胺基酸序列有 97-98% 的相似性。與其它植物 *cat* 基因胺基酸序列排列比對，發現所有植物 CAT 皆具有高度的相似性，尤其是 53~150 bp 之間的相似度更高，且 Histidine 於 65 及 79 位置是高度保留的，這也是 heme 結合的位置區域 (Reid *et al.*, 1981)。植物 CAT 胺基酸序列從 C 端往內第 6 胺

基酸保留有 Ser-Arg-Leu，被認為是進入過氧化體的辨識序列 (Gonzalez, 1991)。Cat78 亦具有上述的胺基酸。但若將 Ser 置換成 Thr，則 *cat* 基因產物則可進入粒線體中 (Scandalios *et al.*, 1980)。

二、*sod62* 及 *cat78* 基因之表現及特性分析

將 *sod62* 基因構築至 pQE 的表現載體，再利用 IPTG 誘導其大量表現，經萃取蛋白質後，分別以 SDS-PAGE 或 native-PAGE 分析其 *sod62* 蛋白質的表現 (圖 5)。SDS-PAGE 分析的結果發現，結球白菜 Cu/Zn-SOD 蛋白質分子量約為 55 kD，而由電腦推測其蛋白質的大小約為 15 kD，因此，Cu/Zn-SOD 可能呈 tetramer 的形式，這與大部份植物 Cu/Zn-SOD 呈 dimer 的形成不同，而與一些植物粒線體 Mn-SOD 存在的情形較相類似 (Baum and Scandalios, 1979)，是否如 Lin 等人 (1993) 分離甘薯細胞質的 Cu/Zn-SOD 蛋白質發現，dimer 的形式較 monomer 具有酵素活性，尚須進一步的實驗確認。另外，由 native-PAGE 分析發現，*sod62* 基因可轉譯出另一具有活性的條帶，顯示不管 *sod62* 基因轉譯的 Cu/Zn-SOD 蛋白質是否為 tetramer，此酵素具有 SOD 專一的活性。

將 *cat78* 基因構築至 pQE 的表現載體，再利用 IPTG 誘導其大量表現，經萃取蛋白質後，分別以 SDS-PAGE 或 native-PAGE 分析 *cat78* 蛋白質的表現 (圖 6, 6-10)。SDS-PAGE 分析的結果發現，結球白菜 CAT 蛋白質分子量約為 57 kD，這與電腦所推測之蛋白質分子量相似。進一步以 native PAGE 分析，亦發現 *cat78* 基因具有專一性 CAT 活性 (圖 6)，而此 CAT 蛋白質具有活性為何種形式，由前人的研究指出，CAT 若為 monomer 則沒有其專一的活性行 (Beyer and Fridovich, 1987)，而可能須結合成 tetramer 的形式，所以，本實驗篩選的 *cat* 基因可能亦能形成 tetramer 具有專一 CAT 活性之形式。

為了探討 *sod62* 基因於氧化逆境下的表現情形，本實驗以 2×10^{-4} M 巴拉刈處理結球白菜，再偵測細胞質 Cu/Zn-SOD RNA 的誘導轉錄變化。結果顯示，處理 MV 1 小時，Cu/Zn-SOD RNA 便大量增加，而後一直保持在很高的表現量逾 24 小時 (圖 7)。植物 Cu/Zn-SOD 基因在各種逆境下會有不同的調節情形，例如：番茄以 10^{-6} M MV 處理 4 小時，細胞質 Cu/Zn-SOD 基因 RNA 及蛋白質增加 5 倍；而以乾旱處理，植株的 Cu/Zn-SOD RNA 增加 8 倍，但蛋白質只增加 5 倍 (Perl-Treves and Galun, 1991)。另外，Madamanchi 等人 (1994) 報導指出，豌豆以 $0.8 \mu\text{l/l}$ SO_2 處理後 210 分鐘，Cu/Zn-SOD RNA 並未顯著增加，但 Cu/Zn-SOD 蛋白質則增加了 2-3 倍，顯示 Cu/Zn-SOD 基因的調節具有 post-transcription 作用。此外，以不同逆境處理植物，例如：受傷，發現植物在此逆境下 4-6 小時內，Cu/Zn-SOD 轉錄作用增加最多 (Perl-Treves and Galun, 1991; Akkapeddi *et al.*, 1999)，以上這些研究的結果與本實驗相似，Cu/Zn-SOD 於逆境初期均會誘導大量表現，以應付突來的過多氧自由基之危害。其它報告亦有將植物置於長時間的逆境，Cu/Zn-SOD 的調節情形。在 *N. plumbaginifolia* 以 10^{-5} M MV 處理，Cu/Zn-SOD RNA 會隨處理時間之增加而增加，至處理 41 小時達最高，可增加 15 倍的量 (Tsang *et al.*, 1991)。本實驗之 RNA 表現情形亦相似呈現持續表現。

為了探討 *cat78* 在結球白菜內遭遇氧化逆境時的表現情形，所以將結球白菜以 200 μ M MV 處理，偵測其 RNA 的表現情形。結果顯示，未處理前於 1.65 kb 處出現一雜交條帶，雜交訊號於處理 1 小時後即增加 1 倍，之後隨處理時間增加其 RNA 表現量亦都很高 (圖 7B)。植物 *cat* 基因在各種逆境下的調節模式各不相同，例如：水稻植株以 10⁻⁵ M MV 處理後，*CatA* 之 RNA 較未處理者多 4 倍的量 (Higo and Higo, 1996)，因此，CAT 被認為可去除逆境所產生 H₂O₂ (Badiani *et al.*, 1993)。然而，Sharma 及 Davis (1994) 報導發現，阿拉伯芥遭受 O₃ 逆境時，CAT mRNA 之量在前 12 小時快速下降三倍，而後再回昇至接近處理前的 mRNA 量，所以作者認為 O₃ 無法誘導防禦系統中之 CAT，不過，O₃ 之調節可能是位於轉譯或後轉譯作用之層次上，因為作者發現 CAT 活性並未因 mRNA 量降低而減少，反而有些微增加。亦有報導顯示，植物遭受 MV 或 O₃ 傷害時，CAT 活性僅增加 15~20% (Matters and Scandalios, 1986; Rao *et al.*, 1996)。本試驗顯示，結球白菜雖然在 MV 處理後，CAT RNA 量急遽增加，但目前尚不清楚 *cat* 基因之調控是為位於轉譯或後轉譯之層次，或是由啟動子所調節 (Suzuki *et al.*, 1995)，尚待進一步研究。

參 考 文 獻

- 邱奕榮。1998。馬鈴薯超氧化歧化酶之選殖與分析。國立中興大學分子生物研究所碩士論文。台中。84 P。
- Akkapeddi, A. S., A. Noormets, B. K. Deo, D. F. Karnosky, and G. K. Podila. 1999. Gene structure and expression of the aspen cytosolic copper/zinc-superoxide dismutase (PtSod Cc1). *Plant Sci.* 143: 151-162.
- Badiani, M., A. Schenone, R. Paolacci, and I. Fumagalli. 1993. Daily fluctuations of antioxidants in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves as affected by the presence of ambient air pollutants. *Plant Cell Physiol.* 34: 271-279.
- Baum, J. A., and J. G. Scandalios 1979. Developmental expression and intracellular localization of superoxide dismutases in maize. *Differentiation* 13:133-140.
- Beyer, W. F. Jr and I. Fridovich 1987. Catalases-with and without heme. In: *Oxygen Radicals in Biology and Medicine*, M. G. Simic, K. A. Taylor, J. F. Ward, C. Von Sonntag (eds). Plenum, New York, pp651-661.
- Bowler, C., M. Van Montagu, and D. Inzé. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 43: 83-116.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.

- Canvin, D. T. 1990. Photorespiration and CO₂ concentrating mechanisms. In: Plant Physiology. Biochemistry and Molecular Biology. D. T. Dennis, D. H. Turpin (eds.) Longman scientific and Technical. Harlow. Essex. UK. pp253-273.
- Duke, M. V. and M. L. Salin. 1985. Purification and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from the eucaryote, *Ginkgo Biloba*. Arch. Biochem. Biophys. 243: 305-314.
- Gonzalez, E. 1991. The C-terminal domain of plant catalase. Eur. J. Biochem. 199: 211-215.
- Halliwell, B., and J. M. C. Gutteridge. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press, Oxford.
- Hassan, H. M. and Fridovich I. 1979. Paraquat and Escherichia coli Mechanism of production of extracellular superoxide radical. J. Biol. Chem. 245: 10846-10852.
- Higo, K. and H. Higo. 1996. Cloning and characterization of the rice *CatA* catalase gene, a homologue of the maize *Cat3* gene. Plant Mol. Biol. 30: 505-521.
- Karpinski, S., G. Wingsle, O. Olsson, and J. E. Hallgren. 1992. Characterization of cDNAs encoding Cu, Zn-superoxide dismutases in Scots pine. Plant Mol. Biol. 18 (3): 545-555.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Lin, C. T., K. W. Yeh, M. C. Kao, and J. F. Shaw. 1993. Cloning and characterization of a cDNA encoding the cytosolic copper/zinc-superoxide dismutase from sweet potato tuberous root. Plant Mol. Biol. 23 (4): 911-913.
- Madamanchi, N. R., J. Donahue, C. R. Cramer, R. Alscher, and K. Pedersen. 1994. Differential response of Cu, Zn superoxide dismutase in two pea cultivars during a short term exposure to sulfur dioxide. Plant Mol. Biol. 26: 95-103.
- Matters, G. L., and J. G. Scandaiios. 1986. Effect of the free radical-generating herbicide paraquat on the expression of the superoxide dismutase (SOD) genes in maize. Biochim. Biophys. Acta 882: 29-38.
- Perl-Treves, R. and E. Galun. 1991. The tomato Cu, Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. Plant Mol. Biol. 17: 745-760.
- Rao, M. V., G. Paliyath, and D. P. Ormrod. 1996. Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. 110: 125-136.
- Reid T. J. III, M. R.N. Murthy, A. Sicignano, N. Tanaka, W. D. L. Musick, and M. G. Rossmann. 1981. Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5Å resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 4767-4771.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1997. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463

- Scandalios, J. G., W. F. Tong, and D. G. Roupakias. 1980. Cat3, a third gene locus coding for a tissue-specific catalase in maize: genetics, intracellular location, and some biochemical properties. *Mol. Gen. Genet.* 179: 33-41.
- Sharma, Y. and K. R. Davis. 1994. Ozone-induced expression of stress-related genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 105: 1089-1096.
- Subramani, S. 1993. Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9: 445-478.
- Suzuki, M., Y. Koide, T. Hattori, K. Nakamura, and T. Asahi. 1995. Different sets of cis-elements contribute to the expression of a catalase gene from castor bean seed formation and postembryonic development in transgenic tobacco. *Plant Cell Physiol.* 36(6): 1067-1074.
- Tainer, J. A., V. A. Roberts, and E. D. Getzoff. 1992. Protein metal-binding sites. *Curr. Opin. Biotechnol.* 3(4):378-87.
- Tsang, E. W. T., C. Bowler, D. Herouart, W. Van Camp, R. Villarroel, C. Genetello, M. Van Montagu, and D. Inzé. 1991. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *The Plant Cell* 3: 783-792.
- Woodbury, W., A. K. Spencer, and M. A. Stahmann. 1971. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal. Biochem.* 44: 301-305.
- Zelitch, I. 1992. Decreased photorespiration in a tobacco mutant with enhanced catalase activity. In: *Trends in Photosynthesis Research*. J. Barber, M. G. Guerrero, and H. Medreno. (eds.). Intercept, Andover, Hampshire. pp. 185-193.
- Mann T and D. Keilin D. 1938. Homocuprein and hepatocuprein, copper-protein compounds of blood and liver in mammals. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* 126: 303-315.

Molecular Cloning and Analysis of Cu/Zn Superoxide Dismutase and Catalase Gene of Chinese Cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *Pekinensis*)¹⁾

Jinn-Chin Yiu²⁾ Menq-Jiau Tseng³⁾

Key words: Cu/Zn superoxide dismutase gene, Catalase gene, Cloning, Chinese cabbage

Abstract

Superoxide dismutase (SODs) are metalloenzymes that are ubiquitous among aerobic organisms and are very efficient at scavenging O_2^- . Hydrogen peroxide (H_2O_2) is synthesized as a byproduct of photorespiration, β -oxidation of fatty acid, and also as a consequence of biotic and abiotic stresses. Catalase (CAT) is the primary H_2O_2 scavenger in peroxisomes of leaves.

A cDNA library was constructed using polyA RNA from 800 ppb sulfur-dioxide-fumigated Chinese cabbage leaves for 7 hours. The cDNA library was screened for the *sod* and *cat* genes by using a maize *sod4* and *cat1* as probe. The insert of pSOD62 (*sod62*) has 754 bp deduces an open reading frame of 152 amino acids. The longest and complete inserts was found in pCAT78 of 1694 bp containing an open reading frame of 492 amino acids.

The *sod62* and *cat78* protein and SOD and CAT specific activity could be detected using SDS-PAGE and native PAGE by introduction of *sod62* and *cat78* into *E. coli* expression vector. High levels of *sod62* and *cat78* mRNA could be detected in Chinese cabbage after 1 hour of 200 μ M of MV treatment, and remained prominent thereafter till 24 hours.

1) This research was financially supported by the National Science Council of the R.O.C.

2) Assistant Professor, Department of Horticulture, National Ilan University.

3) Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University. Corresponding author.

