

苎麻谷胱甘肽-S-转移酶基因 *BnGSTU1* 的克隆和表达分析

朱守晶, 史文娟

(宜春学院生命科学与资源环境学院, 江西 宜春 336000)

摘要:谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs, Glutathione-S-transferases)是一类存在于动植物中的多功能蛋白,对植物抵御逆境胁迫和解除细胞毒素具有重要作用。为探讨 GST 基因在苎麻耐镉机制中的作用,本研究在苎麻镉胁迫转录组的基础上,采用 RACE 方法从苎麻(*Boehmeria nivea*(L.) Gaudich.)品种中苎一号中克隆到 *BnGSTU1* 基因(GenBank 登录号为 MG941011)的全长 cDNA 序列,该基因开放读码框为 636 bp,编码 211 个氨基酸,蛋白质分子量为 24.07 kD,等电点为 5.29。保守结构域分析表明, *BnGSTU1* 蛋白属于 GST 家族中的 Tau 类,具有 GST 蛋白所特有的 H 位点和 G 位点,以及 N 端和 C 端保守结构域。系统进化树分析表明, *BnGSTU1* 蛋白与拟南芥、橡胶树等物种 Tau 类 GST 蛋白的亲缘关系最近。组织表达特异性分析表明, *BnGSTU1* 在苎麻的叶片中相对表达量最高,其次为茎,根中相对表达量最低,存在明显的组织特异性。胁迫诱导表达分析表明, *BnGSTU1* 的表达显著受镉的诱导,且相对表达量随着镉浓度的升高表现出不断增加的趋势。以上结果表明, *BnGSTU1* 是一个镉应答基因,可能在植物对镉胁迫的适应中发挥重要作用。

关键词:苎麻;谷胱甘肽-S-转移酶;基因克隆;表达分析

Cloning and Expression Analysis of a Glutathione-S-Transferase Gene *BnGSTU1* from Ramie(*Boehmeria nivea* (L.) Gaudich.)

ZHU Shou-jing, SHI Wen-juan

(College of Life Science and Resources and Environment, Yichun University, Yichun Jiangxi 336000)

Abstract: Glutathione-S-transferases (GSTs) belong to the superfamily of multifunctional enzymes which play important roles in stress tolerance and cellular detoxification. In this paper, we identified a ramie GST gene named *BnGSTU1* (GenBank accession: MG941011) by rapid-amplification of cDNA ends (RACE). *BnGSTU1* contains an open reading frame of 636 bp and encodes 211 amino acid residues. The deduced protein was 24.07 kD with isoelectric point of 5.29. Conserved domain search analysis revealed that *BnGSTU1* protein contained substrate binding pockets H and glutathione binding sites G, as well as the conserved N-terminal and C-terminal domain belonged to GST protein, which showed typical characteristics of Tau class GSTs. Phylogenetic tree analysis showed that *BnGSTU1* was assigned to the Tau class GST. By real-time quantitative PCR analysis, the transcripts of *BnGSTU1* were detected in root, stem and leaf, and the expression level in leaf was significantly higher than that in roots. Furthermore, *BnGSTU1* gene was significantly up-regulated under cadmium stress, and the expression level positively correlated with Cd^{2+} concentration. Collectively, the results suggested that *BnGSTU1* is a cadmium-responsive factor and may play potential role in the plant adaption to cadmium stress.

Key words: *Boehmeria nivea* (L.) Gaudich.; glutathione-S-transferases; gene clone; gene expression analysis

收稿日期: 2018-02-28 修回日期: 2018-03-25 网络出版日期: 2018-06-20

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180619.1424.001.html>

基金项目: 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ161008); 江西省作物生长发育调控重点实验室开放基金项目 (KFJJ201703)

第一作者主要从事苎麻耐镉分子机理研究。E-mail: zhushj85@sina.com

谷胱甘肽-S-转移酶 (GSTs, Glutathione S-transferases) 是一种多功能酶,广泛存在于动植物体内,是解毒系统的重要成员。GST 能够催化谷胱甘肽 (GSH, Glutathione) 与亲电、疏水的化合物,如有毒异源物或氧化产物的结合,促进其代谢、清除或区域化隔离反应,从而解除毒害。此外, GST 也可行使过氧化物酶的作用,使细胞中活性氧的浓度得到降低^[1-3]。继 20 世纪 70 年代植物 GST 首次在玉米中被发现后^[4],人们陆续在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)^[5-6]、水稻 (*Oryza sativa* L.)^[7]、小麦 (*Triticum aestivum* L.)^[8]、大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.)^[9] 等植物中克隆到了许多 GST 基因或其类似序列。

近年来,许多研究表明 GST 基因在植物应对干旱、热激、冷害、盐、重金属、创伤、病原菌等多种逆境中起到重要作用。*OsGST1*、*OsGST2* 基因分别被证实在水稻抵御低温和稻瘟病伤害中起到作用^[10-11]。过量表达水稻 *OsGST2* 基因可以增强拟南芥对重金属、干旱及高盐胁迫的抗性^[12]。Xu 等^[13]将番茄 *LeGSTU2* 基因转入拟南芥中表达增强了其对渗透胁迫及盐胁迫的耐受能力。在杨树中过量表达 *GSTU51* 基因可以提高其对除草剂甲基紫精和重金属汞的抗性^[14]。戚元成等^[15]将碱蓬 GST 基因转入拟南芥,增强了其对盐胁迫的耐受能力。小麦 *TaGSTF6* 基因能够响应干旱胁迫的诱导,降低植株体内活性氧 (ROS) 的含量,进而提高植株对于干旱胁迫的耐性^[16]。

苧麻 (*Boehmeria nivea* (L.) Gaudich.) 又称“中国草”,为荨麻科苧麻属多年生宿根性草本植物,其纤维是重要的纺织原料,具有较高的经济价值^[17]。同时,苧麻还具有生物量大、生长迅速、耐瘠薄、适应性强等特点,特别是对重金属镉 (Cd, Cadmium) 具有较强的耐受能力^[18-22]。目前国内外对苧麻耐重金属分子机制的研究尚处起步阶段,分离鉴定耐重金属相关基因,对研究苧麻耐重金属机制具有重要意义。本研究拟在苧麻镉胁迫转录组的基础上^[23],采用 RACE 技术克隆一个苧麻镉响应 GST 基因的全长 cDNA 序列,在生物信息学分析的基础上,利用 Real time RT-PCR (RT-qPCR) 技术研究该基因在苧麻不同组织器官及镉胁迫下的表达,为进一步研究该基因在植物耐镉中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料及其处理

供试植物材料为苧麻栽培品种中苧一号,来自宜春学院苧麻资源圃。在苧麻旺长期,取中苧一号的

根、茎、叶,液氮速冻, -80 ℃ 保存;选取株高 15 cm 左右、均匀一致的中苧一号扦插苗,置于装有 1/2 Hoagland 营养液的三角瓶中,于培养室中进行预培养 (培养条件:温度 28 ℃,湿度 50% ~ 60%,光周期为 12 h 光照/12 h 黑暗,每 2 d 更换 1 次营养液),约 2 周后向营养液中添加 CdCl₂ 进行胁迫处理,以未添加镉为空白对照,镉处理浓度分别为 10 mg/L、30 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、150 mg/L,在处理 24 h 后剪取叶片, -80 ℃ 保存,用于镉胁迫下的基因表达分析。

1.2 生化试剂

pBIOZOL 植物总 RNA 提取试剂购自北京 Bio Flux 公司; PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser、SYBR® Premix Ex Taq™ II、pMD18-T 载体购自 Takara 公司 (日本); SMARTer® RACE 5'/3' Kit 试剂盒购自 Clontech 公司 (日本); TransTaq-T DNA Polymerase、DNA Marker、Trans-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell、质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 TransGen Biotech 公司; PCR 产物测序和引物合成由上海生工生物技术有限公司完成。

1.3 RNA 提取及 cDNA 合成

按照 Bio Flux 公司 pBIOZOL 试剂的说明书,提取苧麻不同组织器官和不同浓度镉处理样品的总 RNA;按照 Takara 公司 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒的操作流程,完成各样品第一链 cDNA 的合成。

1.4 BnGSTU1 基因 3'端的克隆

根据苧麻镉胁迫转录组中的 GST Unigene 序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计 3'RACE 特异性引物 (BnGSTU1-FO: 5'-ACCCTGTCCACAAGAAAGT-TCCG-3', BnGSTU1-FI: 5'-GTAAAGGAATGCCTTCAACCAGAG-3')。将提取到的苧麻根、茎、叶的总 RNA 等量混合,参照 Takara 公司的 SMARTer® RACE 5'/3' Kit 试剂盒的说明书合成 3'RACE 第一链 cDNA (3'-RACE-Ready cDNA),进行 3'端的巢式扩增。第 1 轮扩增反应体系为: 3'-RACE-Ready cDNA 2.5 μL, 2 × SeqAmp Buffer 25 μL, 10 × Universal Primer A Mix 5 μL, BnGSTU1-FO 引物 (10 μmol/L) 1 μL, ddH₂O 15.5 μL, SeqAmp DNA Polymerase 1 μL;第 2 轮扩增体系为: 稀释后的第 1 轮 PCR 产物 5 μL, 2 × SeqAmp Buffer 25 μL, Universal Primer Short 1 μL, BnGSTU1-FI 引物 (10 μmol/L) 1 μL, ddH₂O 17 μL, SeqAmp DNA Polymerase 1 μL;PCR 反应程序为: 94 ℃ 30 s, 68 ℃ 30 s, 72 ℃ 3 min, 共 28 个循环。用 1.5% 的琼脂糖凝

胶电泳检测 PCR 产物,并将产物连接至 pRACE 载体,转化 Stellar Competent Cells 感受态细胞,经 PCR 鉴定后,送上海生工生物技术有限公司测序。

1.5 *BnGSTU1* 基因开放读码框的验证

用 DNAMAN 8 软件将获得的 3' 端序列与原有序列进行拼接,得到 *BnGSTU1* 基因的全长 cDNA 序列,为验证序列的可靠性,在其开放读码框 (ORF) 两侧设计特异引物 (BnGSTU1-F: 5'-GGGCGG-TATCCACTAGTCTCTAAGCC-3', BnGSTU1-R: 5'-TTCTCTCAGGTTTCAATATGATCCATAACTTGG-3'),以中苎一号的根、茎、叶混合 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,并将产物连接到 pMD18-T 载体上,转化 Trans-T1 感受态,PCR 检测阳性克隆后测序。

1.6 *BnGSTU1* 基因的生物信息学分析

利用 NCBI 数据库的 ORF Finder 程序 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 查找 *BnGSTU1* 基因的开放读码框,并对核苷酸序列进行翻译;采用 ExPASy 网站的 ProtParam 程序 (<https://www.expasy.org/>) 对 BnGSTU1 蛋白的基本理化性质进行分析;利用 PRABI 网站的 SOPMA 程序 (<https://npsa-prabi.ibcp.fr>) 对 BnGSTU1 蛋白的二级结构进行预测;亚细胞定位的预测采用 WoLF PSORT II 软件 (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 进行;蛋白跨膜结构域预测通过 TMHMM Server v. 2.0 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) 进行;信号肽序列预测利用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 软件进行;蛋白同源性比对分析在 NCBI 网站利用 BLAST 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行;蛋白保守功能域预测在 NCBI 网站的 Conserved Domain Database 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 中进行;BnGSTU1 蛋白与其他植物物种的多重比对分析用 DNAMAN 8 软件完成;系统进化树的构建利用 MEGA 5.0 软件完成。

1.7 *BnGSTU1* 基因的表达分析

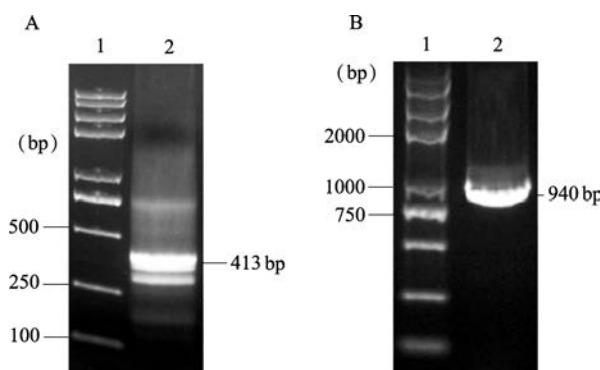
根据 *BnGSTU1* 基因的 cDNA 序列设计实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 引物 (17415 QF: 5'-GGAAAAGGCCATAGAGTCTACCAA-3', 17415 QR: 5'-ATATCCGATACCGTCTCCAGCG-3'),采用 ABI 公司的 StepOnePlus Real-Time PCR System 实时荧光定量 PCR 系统,分析苎麻根、茎、叶中以及不同浓度镉胁迫下 *BnGSTU1* 基因的表达情况。反应体系含 cDNA 2 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.8 μ L, SYBR Premix Ex Taq II 10 μ L, ROX Reference Dye

0.4 μ L, ddH₂O 6 μ L。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 40 个循环 (95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s), 添加熔解曲线。每个处理设置 3 个生物学重复,以苎麻 *Actin* 为内参基因 (BnActin-F: 5'-GTTGAACCCCTAAGGCTAACAGAG-3', BnActin-R: 5'-GGAATCCAGCAGGATAC-CAG-3'),分析 *BnGSTU1* 基因的相对表达特性,数据分析采用 StepOnePlus system 软件、Excel 2007 软件按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行分析。

2 结果与分析

2.1 *BnGSTU1* 基因全长 cDNA 的克隆

提取营养生长期苎麻根、茎、叶的总 RNA,等量混合后反转录为 cDNA 模板,采用 RACE 方法获得大小为 413 bp 的 3' RACE PCR 产物,用 DNAMAN 8.0 软件将其与已知 Unigene 片段进行拼接,得到大小为 1138 bp 的全长 cDNA 序列。为进一步验证序列的可靠性,在开放读码框 (ORF) 两侧设计特异性引物进行 PCR 扩增,获得 1 条大小为 940 bp 的特异扩增条带,测序验证了读码框序列的准确性 (图 1)。GenBank 数据库检索表明该基因与已登录的其他植物的 Tau 类 GST 相似性较高,因此将其命名为 *BnGSTU1*, GenBank 登录号为 MG941011。



A-1: Trans2K Plus II DNA Marker; A-2: 3' RACE-PCR 产物;
B-1: Trans2K Plus II DNA Marker; B-2: 开放读码框 PCR 产物
A-1: Trans2K Plus II DNA Marker, A-2: 3' RACE-PCR product,
B-1: Trans2K Plus II DNA Marker, B-2: ORF PCR product

图 1 苎麻 *BnGSTU1* 基因 cDNA 全长序列扩增

Fig. 1 PCR amplification of *BnGSTU1* cDNA

2.2 *BnGSTU1* 基因生物信息学分析

利用 NCBI 网站的 ORFfinder 软件对获得的序列进行分析,结果表明 *BnGSTU1* 基因的 5' 端非编码区长度为 143 bp, 3' 非编码区长度为 359 bp, 开放读码框长度为 636 bp, 其终止密码子为 TAA, 含有 31 bp 的 PolyA 序列, 编码 211 个氨基酸 (图 2)。应用 ExPASy 网站的 ProtParam 程序对 *BnGSTU1* 基因推

导的氨基酸序列进行分析发现,该蛋白的分子量为 24.07 kD,等电点为 5.29,含有 20 种氨基酸,含量较

高的有 Glu(11.8%)、Leu(10.9%)、Lys(10.9%),含量最低的为 Met(1.4%)。

```

1          ATAAATTAGAAATATTGGCAATTAATATCCTCTTCACGGGGCGGTATTCCAC
54 TAGTCTCTAAGCCTTAATCTCTATCTCACTTAAGTTCGAACCTATTTGTAGATTTCATTATAAGAGATAAAACGAAAGCAAAAAA
144 ATGGTACAAAGTGAAAGTGTTCGGTAACAAGGATAGCTTATTCGCACAAGGATTGAGTGGGCTTTGAAGCTCAAAGGTGTGAGTATGAA
    M V Q V K V F G N K D S L F C T R I E W A L K L K G V E Y E
234 TACTTGCAGAAGATTGTGAAAAACAAGAGCCCTGAACCTCTCAAGTACAACCCCTGTCCACAAGAGTTCGGGTTTTATTGCACGAAGGG
    Y L Q E D L K N K S P E L L K Y N P V H K K V P V L L H E G
324 AAAGCCGTCGCCGAGTCTCTTGTTCATCCTCGAATACATCGACGAGGCTTGAAGCAGAACCCCTTGCTGCCTCAAGATCCTCATGAAAGG
    K A V A E S L V I L E Y I D E A W K Q N P L L P Q D P H E R
414 GCCACTGCTCGATTITGGGCTAAATTCGGCGATGACAAGGTCGTGACTGCGTCAGTGAAGCTTGCTATTCTCAAGGAGAAGTGAAGGAA
    A T A R F W A K F G D D K V V T A S V E A C Y S Q G E V K E
504 AAGGCCATAGAGTCTACCAAGAGTTACTAGCAATACTTGAGAAAGAGATTACGGGGAAGAGTTTTCGCTGGAGACGGTATCGGATAT
    K A I E S T K E L L A I L E K E I T G K K F F A G D G I G Y
594 CTTGACTTAGCGATCGGTTGGGTTCTCTCGGGCTCAGTGTTATAGAAGAAGTTGGGGAATGAAGGTGTTTGAGGCAGATAAGTTCCCA
    L D L A I G W V P L G L S V I E E V G E M K V F E A D K F P
684 TGTCTCCATGAATGGTCTAAGAATTTTATGGACATTCCATTAGTTAAGGAATGCCTTCCAACCAGAGAATCTATTGTGGAGTATTTCCGC
    C L H E W S K N F M D I P L V K E C L P T R E S I V E Y F R
774 GGATAATTCATGAATAAAAAAGAAGTTCCATTAGGCTCATGTAGATGAAGATTATGAAATTAAGTGAAGCAATGGCGATTAGTAGTTTG
    G *
864 TTCAATAAAGTAACTAATTAGTGTCTTGAGGGTGTCTGTGTTTTGGTTATGTGTGTTATTATGATAAAATAATTACGTGCTGGGGCCAAGTTA
954 TGGATCATATTGAAACCCGAGAGAATAAGTATAGCAGTATTAGTAATTAAGGCGTGTCTGGTTACAGTATTAATGCATTGTTTGTTGTA
1044 TTAGATTGTAGAGTTTGTATTGTCTACTAATATTCCTTTAATATAAAAGAAAAGATTGTTTTAAAAA
1134 AAAAA

```

图 2 苎麻 *BnGSTU1* 基因 cDNA 序列全长及推测的氨基酸序列

Fig 2 *BnGSTU1* cDNA full length sequence and the deduced amino acid sequence

利用 PRABI 网站 SOPMA 程序(<https://npsa-prabi.ibcp.fr>)对 *BnGSTU1* 蛋白进行二级结构预测,推测该蛋白主要由 α 螺旋(α -helix)、无规则卷曲(Random coil)、延伸链(Extended strand)和 β 转角(β -turn)结构组成,分别占 44.55%、22.27%、18.01% 和 15.17%。利用 NCBI 网站的 Conserved Domains 程序检索非冗余蛋白数据库,预测 *BnGSTU1* 蛋白的保守功能域,结果显示,该蛋白含有 2 个典型的结构域,氨基酸序列的 4~77 位具有硫氧还蛋白类超家族(Thioredoxin-like superfamily)的特征,属于 GST-N-Tau 结构域,包含由 7 个保守的氨基酸残基(S^{12} 、 F^{14} 、 K^{39} 、 K^{52} 、 V^{53} 、 E^{65} 、 S^{66})构成的 GSH 结合位点(G-Site, GSH binding site),氨基酸序列的 87~211 位为 GST-C-Tau 结构域,包含由 11 个保守的氨基酸残基(D^{101} 、 V^{105} 、 T^{106} 、 V^{109} 、 E^{110} 、 C^{112} 、 Y^{113} 、 V^{158} 、 G^{161} 、 I^{205} 、 Y^{208})构成的底物结合位点(H-Site, substrate binding pocket)(图 3)。利用 SignalP 4.1 Server 软件分析表明,*BnGSTU1* 蛋白不含信号肽序列,不属于分泌型蛋白。TMHMM Server v2.0 软件分析发现,该蛋白不存在跨膜结构域。利用 WoLF PSORT 软件对 *BnGSTU1* 推导的氨基酸进行亚细胞定位预测,结果表明该蛋白有 92.3% 的概率位于细

胞质。

采用 NCBI 数据库的 BLASTp 程序对 *BnGSTU1* 推导的氨基酸序列进行检索,发现 *BnGSTU1* 与多种植物的 GST 蛋白质序列有不同程度的相似性,选择与苎麻 *BnGSTU1* 相似性较高的其他 8 种植物的蛋白进行序列与其进行多重比对。结果表明,苎麻 *BnGSTU1* 蛋白与蓖麻(*Ricinus communis* L.)、莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)、橡胶树(*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.)、梅(*Prunus mume* (Siebold) Siebold & Zucc.)、木薯(*Manihot esculenta* Crantz)、野草莓(*Fragaria vesca* L.)、苹果(*Malus domestica* (Suckow) Borkh.)、桃(*Prunus persica* (L.) Batsch)的 GST 氨基酸序列的相似性分别为 67%、64%、65%、66%、68%、55%、55% 和 52%(图 4)。

利用 MEGA 5.0 软件将 *BnGSTU1* 与来自拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)、橡胶树(*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.)、毛果杨(*Populus trichocarpa* Torr. & A. Gray)、可可树(*Theobroma cacao* L.)、蓖麻(*Ricinus communis* L.)、梅(*Prunus mume* (Siebold) Siebold & Zucc.)、落叶松(*Larix kaempferi* (Lamb.) Carrière)及圆叶锦葵(*Malva pusilla* Sm.)等不同植物物种的 21 个 GST 蛋白的氨基酸序列进行



实线表示 N 端结构域, 虚线表示 C 端结构域, ▲表示 G 位点, △表示 H 位点
Solid line; GST-N-Tau domain, Dotted line; GST-C-Tau domain, ▲; G site, △; H site

图 3 苎麻 *BnGSTU1* 保守结构域分析

Fig. 3 Analysis of conserved domain of *BnGSTU1* in ramie

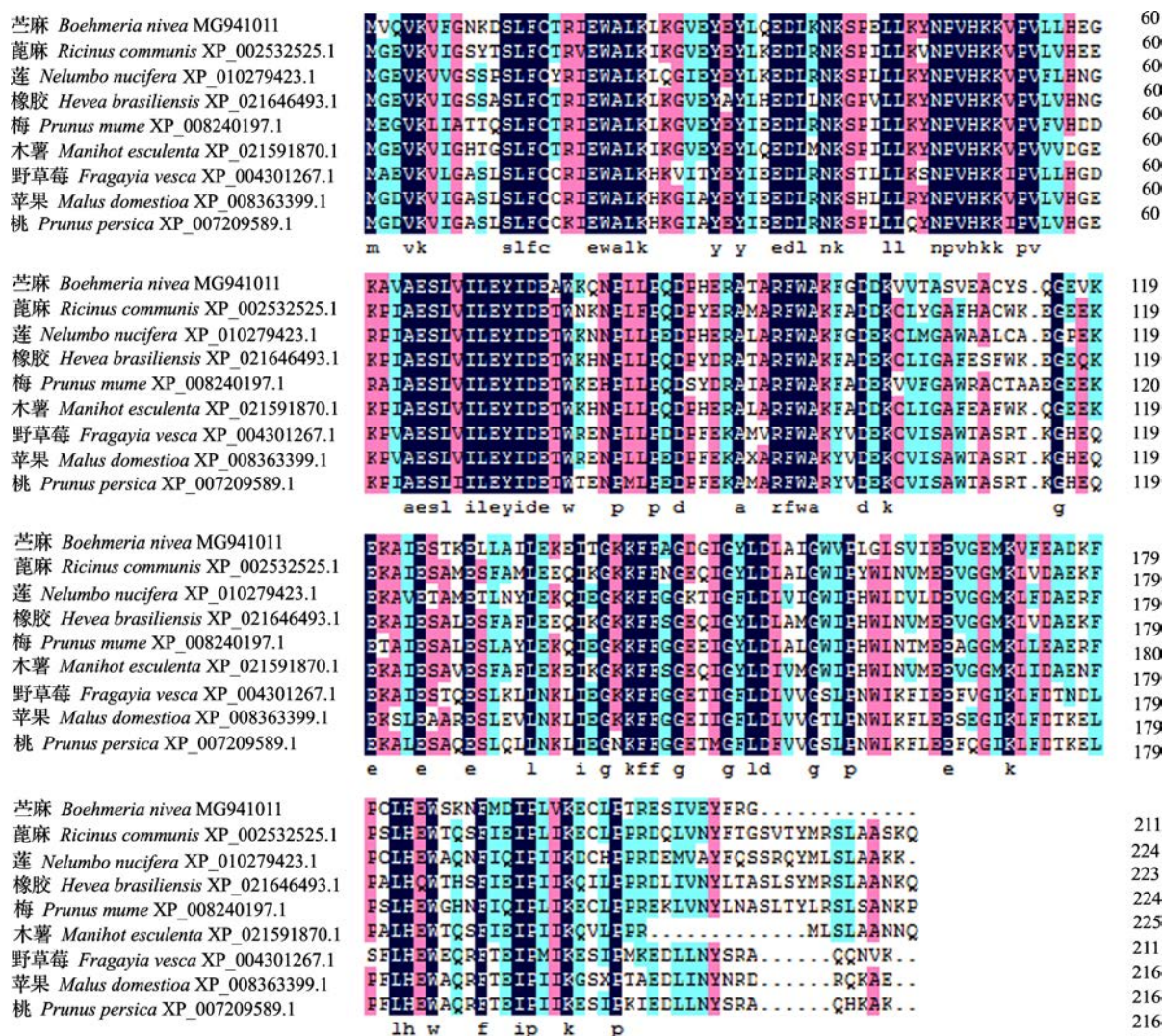
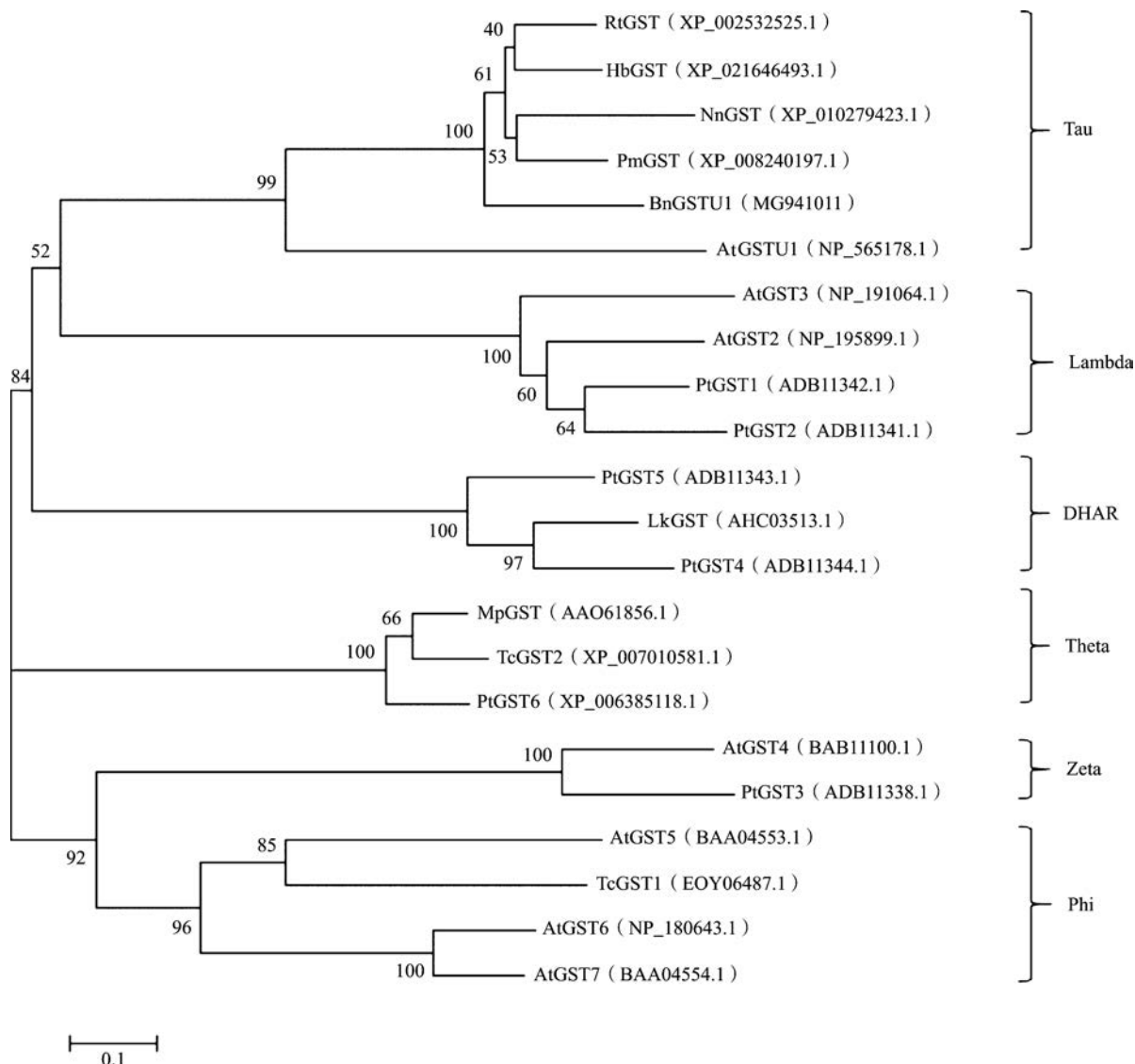


图 4 苎麻 *BnGSTU1* 蛋白与其他植物氨基酸序列同源性比较

Fig. 4 Amino acid sequence alignment between *BnGSTU1* and other plants

多重比对,并构建系统进化树(图5)。这21个GST蛋白可以明显的被聚类为Tau、Lambda、DHAR、Theta、Ze-

ta和Phi六大类群,其中BnGSTU1与GST蛋白的Tau家族蛋白聚为一个类群,亲缘关系最近。



Bn: 苎麻 *Boehmeria nivea* (L.) Gaudich.; At: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.; Rt: 蓖麻 *Ricinus communis* L.;

Nn: 莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn.; Hb: 橡胶树 *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.; Pm: 梅 *Prunus mume* (Siebold & Zucc.);

Pt: 毛果杨 *Populus trichocarpa* Torr. & A. Gray; Tc: 可可 *Theobroma cacao* L.; Lk: 落叶松 *Larix kaempferi* (Lamb.) Carrière; Mp: 圆叶锦葵 *Malva pusilla* Sm.

图5 BnGSTU1 蛋白及其他21种植物GST蛋白的系统进化树

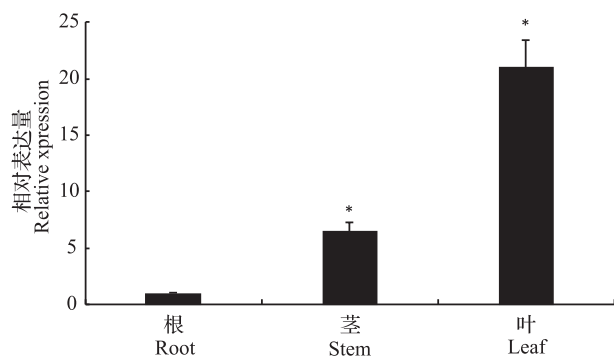
Fig. 5 Phylogenetic tree of BnGSTU1 and 21 GST proteins from other plants

2.3 苎麻 BnGSTU1 基因的表达分析

以中苎一号的根、茎、叶的cDNA为模板,采用荧光定量PCR技术检测BnGSTU1基因在苎麻各器官的表达特异性,本试验将根中的BnGSTU1基因表达量设为1。定量分析结果表明,BnGSTU1基因在苎麻的根、茎、叶中均有表达,但在叶中的相对表达量最高,根部相对表达量最低,叶和茎中BnGSTU1基因的相对表达量分别为根部的21倍和6.5倍(图6)。

为研究苎麻BnGSTU1基因在镉胁迫条件下的

表达,取不同浓度胁迫处理后的叶片提取RNA,进行荧光定量PCR分析,将对照植株BnGSTU1基因的表达量设为1。荧光定量分析结果表明,当苎麻受到镉胁迫时,BnGSTU1基因的相对表达量随着Cd²⁺浓度的增加呈现出逐渐升高的趋势,当Cd²⁺浓度达到150 mg/L时,BnGSTU1基因的相对表达量也达到最高,为对照的5倍左右(图7)。以上结果表明BnGSTU1基因在苎麻响应镉胁迫中可能起到重要作用。



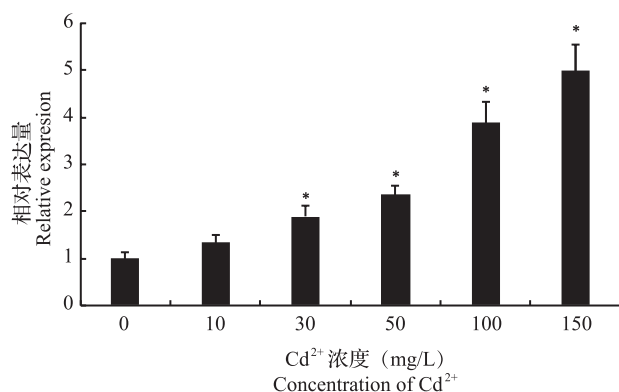
*: 与根相比差异显著 ($P < 0.05$)。内参基因: β -actin, $n = 3$

*: Significant difference at $P < 0.05$ compared with root.

Reference gene: β -actin, $n = 3$

图 6 *BnGSTU1* 在苎麻不同组织中的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of *BnGSTU1* in different tissues of ramie



*: 同 0 mg/L 相比差异显著 ($P < 0.05$)。内参基因: β -actin, $n = 3$

*: Significant difference at $P < 0.05$ compared with

0 mg/L. Reference gene: β -actin, $n = 3$

图 7 *BnGSTU1* 基因在不同浓度镉胁迫下的表达

Fig. 7 The expression patterns of *BnGSTU1* induced by Cd^{2+} of different concentration

3 讨论

镉 (Cd^{2+}) 对生物体具有强毒性, 污染土壤中的镉被植物吸收后会造成植物细胞损伤并影响植物的正常生理代谢活动, 包括破坏细胞膜、诱发氧化胁迫、造成离子失衡等^[24-26]。GST 在植物抵抗逆境胁迫中起到重要作用^[27], 但目前有关苎麻 GST 基因的克隆尚未见报道。本研究从苎麻品种中苎一号中成功克隆了 *BnGSTU1* 基因的完整开放读码框, 进一步分析表明, 该基因编码的氨基酸与其他植物物种的 GST 蛋白相似性较高, 具有典型的谷胱甘肽-S-转移酶 GST-N-Tau 和 GST-C-Tau 结构域, 这与 Edwards 等^[27]报道的 GST 蛋白的基本结构特征相一致。根据蛋白质同源性和基因组织结构, 植物 GST 分为

Phi、Theta、Tau、Lambda、Zeta 以及脱氢抗坏血酸还原酶 (DHAR) 六大类^[28], 其中 Tau 和 Phi 类 GST 是植物所特有的, 也是研究最广泛的。本研究通过系统进化树分析发现, 苎麻 *BnGSTU1* 蛋白与来自拟南芥、蓖麻、莲、橡胶树和梅花的 Tau 类的 GST 聚为一个类群, 亲缘关系最近, 表明 *BnGSTU1* 基因属于 Tau 类 GST 亚家族成员。亚细胞定位预测结果表明, *BnGSTU1* 不含有信号肽序列和跨膜区段, 可能定位于细胞质中。在玉米和向日葵中, Tau 类的 *ZmGST23* 和 *HaGSTU1* 也定位于细胞质中^[29-30]。

同时, GST 基因的表达常常表现出组织特异性。Soranzo 等^[31]研究表明, GST 基因在水稻不同发育时期、不同组织中的表达量存在差异, 其中 Phi 类 GST 基因主要在营养组织中表达, 而 Tau 类 GST 基因主要在愈伤组织和幼芽中表达。Dixon 等^[1]发现, 玉米 *ZmGST II* 只在根系中表达, 而 *ZmGST I* 和 *ZmGST V* 在根部的表达量要高于地上部分。乔光等^[32]从木豆中克隆到一个 *CcGSTI* 基因, 在木豆植株的根、茎和叶片当中均能检测到该基因的表达, 但根中的表达水平最高。马立功等^[29]对向日葵 *HaGSTU1* 基因的研究表明, 该基因在叶中表达量最高, 在其他组织器官中的表达量较低。李永生等^[30]从玉米中克隆到一个 *ZmGST23* 基因, 发现该基因在玉米幼芽和成熟叶片中的表达量较高, 而在幼根、花丝、苞叶、雌穗及雄穗中的表达量较低, 存在明显的组织特异性。本研究采用荧光定量 PCR 分析发现, *BnGSTU1* 基因在苎麻的根、茎、叶中均有表达, 但在叶中的相对表达量最高, 根中的相对表达量最低, 这与向日葵 *HaGSTU1*、玉米 *ZmGST23* 基因的表现相似, 而与玉米 *ZmGST II*、木豆 *CcGSTI* 基因不同, 说明不同 GST 基因的表达存在组织特异性, 推测 *BnGSTU1* 在苎麻叶片的生长发育和抗逆机制中发挥主要作用。

GST 是一种多功能酶, 是抗氧化系统的主要成员, 有许多研究表明, GST 家族基因参与了植物对多种逆境胁迫的应答。Chakrabarty 等^[33]和 Dubey 等^[34]研究发现, 水稻 *OsGSTL16* 基因的表达分别受到重金属砷 (As) 和铬 (Cr) 的诱导, 表达量显著上调。Jain 等^[35]研究表明, 水稻 *OsGSTF5* 基因的表达受到砷的诱导, 且在敏感型和耐受型水稻品种之间存在表达量的差异, 暗示该基因参与调节水稻对砷的耐受能力。Chan 等^[36]研究表明, 大豆 *GmGSTL1* 基因的表达显著受到盐胁迫的诱导。木豆 *CcGSTI* 基因的表达受干旱胁迫的诱导^[32]。安秀红等^[37]研究发现, 苹果 *MdGSTU1* 基因能够被 NaCl、PEG 和落

叶病原菌诱导表达。植物激素(ABA、IAA、GA)及非生物胁迫(高温、低温、盐、水涝、干旱)可显著诱导玉米 *ZmGST23* 基因的表达^[30]。向日葵 *HaGSTU1* 基因受干旱、盐、草酸等逆境胁迫的诱导,表达量出现显著变化^[29]。本研究结果表明,苎麻 *BnGSTU1* 基因的表达受镉的诱导,且相对表达量随着镉浓度的升高表现出不断增加的趋势,暗示 *BnGSTU1* 基因可能在苎麻耐镉反应中具有重要功能。本研究仅对 *BnGSTU1* 基因进行了初步的表达分析,要想全面了解其在植物耐镉中的作用,仍需进一步深入研究。

参考文献

- [1] Dixon D P, Cummins I, Cole D J, Edwards R. Glutathione mediated detoxification system in plants. 1998, 1(3): 258-266
- [2] Marrs K A. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. Annual Review of Plant Biology, 1996, 47(1): 127-158
- [3] Chen J H, Jiang H W, Hsieh E J, Chen H Y, Chien C T, Hsieh H L, Lin T P. Drought and salt stress tolerance of an *Arabidopsis* glutathione S-transferase U17 knockout mutant are attributed to the combined effect of glutathione and abscisic acid. Plant Physiology, 2012, 158(1): 340-351
- [4] Shimabukuro R H, Swanson H R, Walsh W C. Glutathione conjugation: atrazine detoxication mechanism in corn. Plant Physiology, 1970, 46(1): 103-107
- [5] Wagner U, Edwards R, Dixon D P, Mauch F. Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. Plant Molecular Biology, 2002, 49(5): 515-532
- [6] Nutricati E, Miceli A, Blando F, De Bellis L. Characterization of two *Arabidopsis thaliana* glutathione S-transferases. Plant Cell Reports, 2006, 25(9): 997-1005
- [7] Soranzo N, Sari Gorla M, Mizzi L, De Toma G, Fropa C. Organisation and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family. Molecular Genetics and Genomics, 2004, 271(5): 511-521
- [8] Subramaniam K, Ye Z, Buechley G, Shaner G, Solomos T, Ueng P P. Isolation of a zeta class wheat glutathione S-transferase gene. Biochim Biophys Acta, 1999, 1447(2): 348-356
- [9] McGonigle B, Keeler S J, Lau S M C, Koeppe M K, O'Keefe D P. A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. Plant Physiology, 2000, 124(3): 1105-1120
- [10] Binh le T, Oono K. Molecular cloning and characterization of genes related to chilling tolerance in rice. Plant Physiology, 1992, 99(3): 1146-1150
- [11] Agrawal G K, Jwa N S, Rakwal R. A pathogen-induced novel rice (*Oryza sativa* L.) gene encodes a putative protein homologous to type II glutathione S-transferases. Plant Science, 2002, 163(6): 1153-1160
- [12] Kumar S, Asif M H, Chakrabarty D, Tripathi R D, Dubey R S, Trivedi P K. Expression of a rice Lambda class of glutathione S-transferase, *OsGSTL2*, in *Arabidopsis* provides tolerance to heavy metal and other abiotic stresses. Journal of Hazardous Materials, 2013, 15(248): 228-237
- [13] Xu J, Xing X J, Tian Y S, Peng R H, Xue Y, Zhao W, Yao Q H. Transgenic *Arabidopsis* plants expressing tomato glutathione S-transferase showed enhanced resistance to salt and drought stress. PLoS One, 2015, 10(9): e0136960
- [14] Choi Y I, Noh E W, Kim H J, Shim D. Overexpression of poplar *GSTU1* confers selective tolerance to both mercury and methyl viologen but not to CDNB or cadmium in transgenic poplars. Plant Biotechnology Reports, 2013, 7(2): 175-184
- [15] 威元成, 张世敏, 王丽萍, 王明道, 张慧. 谷胱甘肽转移酶基因过量表达能加速盐胁迫下转基因拟南芥的生长. 植物生理与分子生物学报, 2004, 30(5): 517-522
- [16] 毛新国, 王爱萍, 景蕊莲, 吕小平, 贾继增. 小麦抗旱相关基因 *TaGSTF6* 的多态性. 中国农业科学, 2007, 40(2): 225-233
- [17] 李宗道. 麻作的理论与技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1980: 124-256
- [18] 雷梅, 岳庆玲, 陈同斌, 黄泽春, 廖晓勇, 刘颖茹, 郑国砥, 常庆瑞. 湖南柿竹园矿区土壤重金属含量及植物吸收特征. 生态学报, 2005, 25(5): 1146-1151
- [19] 曹德菊, 周世杯, 项剑. 苎麻对土壤中镉的耐受和积累效应研究. 中国麻业科学, 2004, 26(6): 272-274
- [20] 余玮, 揭雨成, 邢虎成, 黄明, 康万利, 鲁雁伟, 王栋. 湖南冷水江锡矿矿区苎麻对重金属的吸收和富集特性. 农业环境科学学报, 2010, 29(1): 91-96
- [21] 朱守晶, 余伟林, 石朝燕, 揭雨成. 苎麻谷胱甘肽还原酶基因 (*BnGRT*) 的克隆和表达分析. 农业生物技术学报, 2015, 23(10): 1318-1326
- [22] 黄益宗, 郝晓伟, 雷鸣, 铁柏清. 重金属污染土壤修复技术及其修复实践. 农业环境科学学报, 2013, 32(3): 409-417
- [23] She W, Zhu S, Jie Y, Xing H, Cui G. Expression profiling of cadmium response genes in ramie (*Boehmeria nivea* L.) root. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2015, 94(4): 453-459
- [24] Pagliano C, Raviolo M, Dalla Vecchia F, Gabbriellini R, Gonnelli C, Rascio N, Barbato R, La Rocca N. Evidence for PSII donor-side damage and photoinhibition induced by cadmium treatment on rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2006(84): 70-78
- [25] Skórzyńska-Polit E, Drązkiewicz M, Krupa Z. Lipid peroxidation and antioxidative response in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium and copper. Acta Physiologiae Plantarum, 2009, 32(1): 169-175
- [26] Lin L, Zhou W, Dai H, Cao F, Zhang G, Wu F. Selenium reduces cadmium uptake and mitigates cadmium toxicity in rice. Journal of Hazardous Materials, 2012, 235-236: 343-351
- [27] Edwards R, Dixon D P, Walbot V. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. Trends in Plant Science, 2000(5): 193-198
- [28] Edwards R, Dixon D P. Plant glutathione transferases. Methods Enzymol, 2005, 401(3): 169-186
- [29] 马立功, 孟庆林, 张匀华, 刘志华, 王志英. 向日葵谷胱甘肽-S-转移酶基因的克隆及抗病功能研究. 中国油料作物学报, 2015, 37(5): 635-643
- [30] 李永生, 方永丰, 李玥, 张同祯, 慕平, 王芳, 彭云玲, 王威, 张金文, 王汉宁. 玉米逆境响应基因 *ZmGST23* 克隆和表达分析. 农业生物技术学报, 2016, 24(5): 667-677
- [31] Soranzo N, Sari Gorla M, Mizzi L, De Toma G, Fropa C. Organisation and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family. Molecular Genetics and Genomics, 2004, 271(5): 511-521
- [32] 乔光, 文晓鹏, 洪怡. 木豆抗旱相关基因 *CcGSTI* 克隆与表达分析. 西南林业大学学报, 2017, 37(4): 1-7
- [33] Chakrabarty D, Trivedi P K, Misra P, Tiwari M, Shri M, Shukla D, Kumar S, Rai A, Pandey A, Nigam D, Tripathi R D, Tuli R. Comparative transcriptome analysis of arsenate and arsenite stresses in rice seedlings. Chemosphere, 2009, 74(5): 688-702
- [34] Dubey S, Misra P, Dwivedi S, Chatterjee S, Bag S K, Mantri S, Asif M H, Rai A, Kumar S, Shri M, Tripathi P, Tripathi R D, Trivedi P K, Chakrabarty D, Tuli R. Transcriptomic and metabolomic shifts in rice roots in response to Cr(VI) stress. BMC Genomics, 2010, 11(1): 648
- [35] Jain M, Ghanashyam C, Bhattacharjee A. Comprehensive expression analysis suggests overlapping and specific roles of rice glutathione S-transferase genes during development and stress responses. BMC Genomics, 2010, 11(1): 73
- [36] Chan C, Lam H M. A putative lambda class glutathione S-transferase enhances plant survival under salinity stress. Plant Cell Physiology, 2014, 55(3): 570-579
- [37] 安秀红, 徐锴, 厉恩茂, 李壮, 李敏, 刘志, 程存刚. 苹果抗性相关的谷胱甘肽转移酶基因 *MdGSTU1* 的生物信息学和表达分析. 中国农业科学, 2014, 47(24): 4868-4877