

西伯利亚蓼 *PsGRX* 基因的克隆及其在 NaHCO_3 胁迫下的表达

那守海, 王垠, 刘关君*

东北林业大学林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040

摘要: 采用 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术从西伯利亚蓼叶 cDNA 文库中克隆到谷氧还蛋白基因(*PsGRX*)的完整编码区 cDNA 序列(GenBank 注册号为 GU139794), 长度为 465 bp, 编码 106 个氨基酸。根据与其他植物谷氧还蛋白的氨基酸序列的比对以及系统进化分析的结果, 初步确定此基因为谷氧还蛋白基因家族成员。实时定量 PCR 的结果显示, *PsGRX* 在西伯利亚蓼的叶、茎、地下茎中均有表达, 叶中表达量最高, 地下茎和茎中较低。在 NaHCO_3 胁迫的过程中, 此基因在叶、茎和地下茎中的表达模式也有较明显的差异。

关键词: 西伯利亚蓼; 谷氧还蛋白; 基因克隆; 实时定量 PCR

Cloning and Analysis of *PsGRX* Gene from *Polygonum sibiricum* Laxm. and Its Expression in Response to NaHCO_3

NA Shou-Hai, WANG Yin, LIU Guan-Jun*

Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: The *PsGRX* gene (GenBank accession No. GU139794) which contained a complete open reading frame (ORF) was obtained using rapid amplification of cDNA ends (RACE) from the cDNA library of *Polygonum sibiricum* leaves. The length of cDNA was 465 bp, encoded a peptide of 106 amino acid residues. Based on the comparison with amino acid sequences of other plant glutaredoxin and the phylogenetic analysis of protein evolution, this gene was divided into glutaredoxin family. Expression analysis with real-time PCR showed that *PsGRX* gene was expressed in leaves, stems and underground stems. The expression level of *PsGRX* gene was higher in leaves than in stems and underground stems. The expression patterns of *PsGRX* gene in different tissues induced by NaHCO_3 stress also had remarkable differences.

Key words: *Polygonum sibiricum*; glutaredoxin; gene cloning; real-time PCR

谷氧还蛋白(glutaredoxin, GRX)是一种能催化谷胱甘肽(glutathione, GSH)与蛋白质二硫键之间进行氧化还原反应的酶, 广泛存在于原核和真核生物中, 它在生物体内与谷胱甘肽和 NADPH 组成谷氧还蛋白系统, 与硫氧还蛋白(thioredoxin, TRX)的功能相似。它还含有一个保守序列(CPY/FC)、还原型谷胱甘肽结合位点和疏水性表面区域, 用于结合谷胱甘肽并共同作用于蛋白质二硫键。它可以催化蛋白质之间形成的二硫键以及蛋白质巯基与小分子巯基化合物之间形成的混合二硫键的还原, 最常见的是蛋白质与谷胱甘肽之间形成的混合二硫键(Pr—S—S—G) (李民等 2007)。谷氧还蛋白系统通过还原蛋白质谷胱甘肽二硫化物或者谷氧还蛋白中半胱氨酸残基上巯基(—SH)与二硫键(—S—S—)之间的可逆转换, 改变蛋白的分子构型, 影响蛋白的正确折叠、稳定性和活性(Carmel-Harel 和 Storz

2000; Rouhier 等 2002, 2003)。

此外, 谷氧还蛋白具有多种生物学功能(Ndamukong 等 2007; Rouhier 等 2008; Xing 和 Zachgo 2008; Li 等 2009), 特别是谷氧还蛋白有抗氧化作用(Rouhier 等 2003, 2005)。细胞暴露在较高的活性氧(如超氧化物、过氧化物和氢过氧化物)产生的氧化胁迫下, 蛋白质中半胱氨酸的巯基产生分子内交联, 或可逆形成亚磺酸以及不可逆形成磺酸和磺酸衍生物。蛋白谷胱甘肽化作用是阻止这些关键残基不可逆氧化的一种机制, 它会导致可逆的蛋白失活, 是蛋白活性的一种自我保护方式, 这些酶可

收稿 2009-11-18 修定 2010-03-29

资助 东北林业大学基本科研业务费专项资金(DL09EA02-3)。
* 通讯作者(E-mail: liuguanjun2003@126.com; Tel: 0451-82190607)。

以在谷氧还蛋白系统的催化下,经去谷胱甘肽化反应而得以活化(Rouhier等2003)。谷氧还蛋白系统可特异地恢复氧化胁迫(oxidative stress)损伤产生的谷胱甘肽化蛋白的活性,在细胞内氧化还原平衡状态的调控及抵抗氧化应激损伤过程中起作用(Holmgren 2000)。

研究证实,盐胁迫下,植物常受到氧化胁迫而造成活性氧伤害(戚元成等2004)。西伯利亚蓼多生于盐碱地,有很强的耐盐碱性,能在盐碱地碱斑上生长。本文从西伯利亚蓼叶cDNA文库中克隆到谷氧还蛋白基因(*PsGRX*)的完整编码区cDNA序列并对其序列进行了生物信息学分析,采用实时定量PCR技术研究了NaHCO₃胁迫下*PsGRX*在西伯利亚蓼不同器官的表达模式,为进一步研究其在植物耐盐碱胁迫中的功能时参考。

材料与amp;方法

西伯利亚蓼(*Polygonum sibiricum* Laxm.)采自黑龙江省肇东市盐碱草地。将西伯利亚蓼地下茎置于腐殖质和细砂混合物(体积比3:1)中于温室培养1个月左右,苗高达15~20 cm,用3% NaHCO₃进行胁迫处理,分别于处理0、8、24、48、72 h取样(叶、茎、地下茎),每个处理30棵,不做胁迫处理的苗为对照,重复3次,在同一时间内取样,立即放入液氮,保存于-70℃冰箱中,以供*PsGRX*基因的实时定量PCR分析用。

各种限制性内切酶、T4 DNA连接酶、Prime-Script™ RT Reagent Kit、克隆载体pMD18-T购自TaKaRa(大连)公司;Taq DNA聚合酶、Taq Plus DNA聚合酶购自TIANGEN公司;Smart™ RACE cDNA Amplification Kit购自Clontech公司;引物合成及测序工作由上海生工生物工程有限公司完成。

从西伯利亚蓼叶cDNA文库中获得1个302 bp的EST序列,经GenBank数据库进行Blast比对分析,推断此cDNA为谷氧还蛋白基因家族成员,为非全长cDNA序列。

参照SDS/苯酚法(王玉成等2003)提取西伯利亚蓼叶总RNA。用Smart™ RACE cDNA Amplification Kit反转录合成cDNA链。根据西伯利亚蓼叶cDNA文库中此基因的EST序列设计引物A1和S1(表1),用引物A1与引物NUP进行5' RACE,用

引物S1和UPM进行3' RACE(具体方法参照Clontech公司的说明书)。将PCR扩增得到的特异性片段通过Promega公司胶回收试剂盒回收,回收产物连接到pMD18-T载体,然后转化大肠杆菌TOP10感受态细胞,在含有Amp/IPTG/X-Gal的平板上进行蓝白斑筛选。挑取白斑,进行PCR检测后,由上海生工生物工程有限公司进行测序。将测序结果用BioEdit软件进行电子拼接,得到*PsGRX*基因的序列,设计此序列全长的引物PsGRX-S1和PsGRX-A1(表1),以西伯利亚蓼叶cDNA为模板进行PCR扩增。

采用NCBI中的BLASTX程序进行同源性比较;NCBI ORF Finder程序查找序列的开放读码框(open reading frame, ORF);软件ClustalW 1.8.1进行多序列比较和分子进化树的绘制;SignalP 3.0预测蛋白的信号肽及可能的切割位点;软件ProtParam(<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>)计算蛋白的分子量、净电荷和理论等电点;BLASTP预测保守区;用Motif Scan程序(<http://au.expasy.org/prosite>)进行结构域和基序分析;用ProScale(<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>)以默认算法(Hphob/Kyte & Doolittle)分析蛋白的疏水性。

对*PsGRX*在西伯利亚蓼不同组织中的表达水平进行实时定量PCR分析时,分别从西伯利亚蓼地下茎、茎和叶中提取总RNA,用紫外分光光度计测定RNA在波长260和280 nm处的光吸收值,确定RNA的纯度及浓度;按照PrimeScript™ RT Reagent Kit试剂盒说明书合成cDNA链;根据*PsGRX* cDNA的ORF序列合成引物PsGRX-S2和PsGRX-A2(表1),分别以西伯利亚蓼地下茎、茎和叶cDNA为模板进行PCR。反应程序为:94℃ 3 min;94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 40 s, 30个循环;72℃ 7 min。PCR产物使用Promega公司胶回收试剂盒纯化后,由上海生工生物工程有限公司进行测序,测序结果与*PsGRX*基因序列完全一致。

测定NaHCO₃胁迫及去胁迫过程中*PsGRX*的表达水平时,将3% NaHCO₃胁迫和去胁迫处理的样品提取RNA并反转录成cDNA。采用*PsGRX*基因的特异引物PsGRX-S2和PsGRX-A2,以西伯利亚蓼18S rDNA基因为内参(引物见表1),对西伯利亚蓼的地下茎、茎及叶中的*PsGRX*基因表达量进

表1 实验用的引物

Table 1 Primers used in the experiment

基因	引物	序列(5' → 3')	注释
<i>PsGRX</i>	NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	<i>PsGRX</i> 5' RACE
	A1	GGGCAGTAACTCTTGCTGAAAAC	<i>PsGRX</i> 5' RACE
	S1	TTGTTTTTCAGCAAGAGTTACTGCC	<i>PsGRX</i> 3' RACE
	UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC	<i>PsGRX</i> 3' RACE
	PsGRX-S1	ATTAGCAGTGGTATCAACGCAG	全长 <i>PsGRX</i> PCR
	PsGRX-A1	ATACAACATTGGGAAACAACAC	全长 <i>PsGRX</i> PCR
	PsGRX-S2	GAGTTACTGCCCTTATTGTG	<i>PsGRX</i> 实时定量 PCR
	PsGRX-A2	CTGTTTAGTCCACTGAGCC	<i>PsGRX</i> 实时定量 PCR
18S rDNA	18S-S	GTATGGTCGCAAGGTGAAAC	18S rDNA 实时定量 PCR
	18S-A	TTAGCAGGCTGAGGTCTCGT	18S rDNA 实时定量 PCR

行分析。在 DNA Engine Opticon™ 实时定量 PCR 仪上进行 PCR。25 μL 的 PCR 反应体系中含有 2 μL 的 cDNA 模版、12.5 μL 的 SYBR Premix Ex Taq™ (2 \times), PsGRX-S2 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 引物 1 μL , PsGRX-A2 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 引物 1 μL 、超纯水 8.5 μL 。PCR 条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s; 94 $^{\circ}\text{C}$ 12 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 45 个循环。读板温度 81 $^{\circ}\text{C}$ 。相对表达量使用软件 Q-Gene (<http://www.biotechniques.com/softlib/qgene.html>) 进行计算, 软件的算法基于 Muller 等(2002)的公式。

结果与讨论

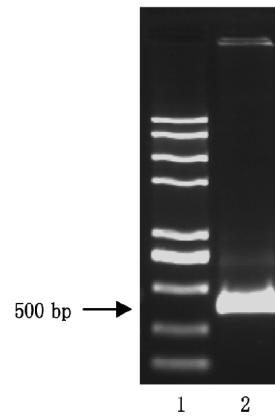
1 西伯利亚蓼 *PsGRX* 基因的扩增

将采用 5' RACE 和 3' RACE 的方法从西伯利亚蓼 cDNA 文库中克隆出的 *PsGRX* 序列进行电子拼接, 设计具有完整编码区的 *PsGRX* 基因的特异引物 PsGRX-S1 和 PsGRX-A1, 西伯利亚蓼叶中 cDNA 进行 PCR 扩增后, 得到 1 条约 500 bp 的 DNA 片段(图 1), 与预期片段的大小一致。

2 西伯利亚蓼 *PsGRX* 基因及其编码蛋白质的序列分析

经测序、去除载体污染、电子拼接后获得具有完整编码区的 cDNA 序列为 465 bp, 采用 NCBI 的 ORF 程序显示 5' 非翻译区为 78 bp, 3' 非翻译区为 66 bp; ORF 为 321 bp, 编码 106 个氨基酸。此基因已登录 GenBank, 登录号为 GU139794。

采用 NCBI 的 BLASTP 在蛋白保守区数据库 (Conserved Domain Database) 对 *PsGRX* 基因进行蛋白保守区预测的结果表明, 与此基因匹配的蛋白保

图1 具有完整编码区的 *PsGRX* 的 PCR 扩增产物Fig.1 PCR amplification product of *PsGRX* with a complete ORF1: DL2000 Marker; 2: *PsGRX* 基因的 PCR 扩增产物。

守区有 2 个, 为谷氧还蛋白超家族 (major intrinsic protein superfamily) 和 TRX 超家族。分析 *PsGRX* 结构域的结果表明, *PsGRX* 具有谷氧还蛋白典型的 CP(Y/F)C 结构域, 此结构域较为保守, 大部分植物的谷氧还蛋白中均含有(图 2)。

用 ProtParam 在线软件预测 *PsGRX* 基因编码蛋白的理化性质。理论分子量为 11.2 kDa, 理论等电点为 8.46, 不稳定系数 34.69, 属于稳定蛋白。经 SignalP 3.0 分析, 没有信号肽切割位点, 说明此蛋白为非分泌蛋白。Motif Scan 程序 (PROSITE patterns 数据库) 分析显示此蛋白的第 17~33 位氨基酸是谷氧还蛋白活性位点, 第 39~41 位氨基酸是一个蛋白激酶 C (protein kinase C) 磷酸化位点, 第 47~50 位氨基酸是一个酪蛋白激酶 II (casein kinase II) 磷

酸化位点, 第78~83位氨基酸是一个N-豆蔻酰化(N-myristoylation)位点。这些位点可能参与调控PsGRX的翻译后修饰过程, 从而影响蛋白活性。

用ProtParam在线软件预测PsGRX基因编码蛋

白的平均亲水性值(grand average of hydropathicity, GRAVY)为0.051。用ProScal以默认算法分析蛋白的疏水性, 结果显示PsGRX两端疏水, 中间亲水(图3)。



图2 PsGRX 推测的氨基酸序列与其他植物谷氧还蛋白的多序列比对与分析

Fig.2 Multiple alignment and analysis of deduced amino acid sequences of PsGRX and other plant GRXs

比对的蛋白质包括: 西伯利亚蓼 PsGRX、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) AtGRX (NP_198853.1)、马铃薯(*Solanum tuberosum*) StGRX (ABU96710.1)、人参(*Panax ginseng*) PgGRX (ABX60201.1)、小麦(*Triticum aestivum*) TaGRX (AAP80853.1)、蓖麻(*Ricinus communis*) RcGRX (XP_002524673.1)、阔叶槲(*Tilia platyphyllos*) TpGRX (AAL04507.1)、水稻(*Oryza sativa*) OsGRX (X77150.1)。

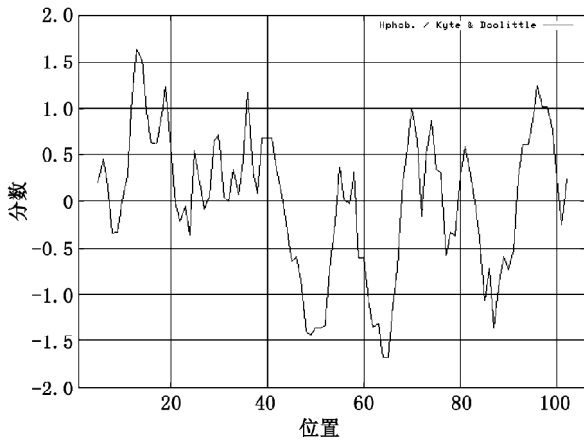


图3 PsGRX 蛋白的疏水性分析

Fig.3 The hydrophobic analysis of PsGRX
用ProScal以默认算法分析蛋白的疏水性。

PsGRX编码的氨基酸序列经比对的结果显示, PsGRX具有典型的谷氧还蛋白酶活性位点CPYC(即Cys-Pro-Tyr-Cys)。谷氧还蛋白催化的、依赖谷胱甘肽的二硫化物氧化还原过程, 通常发生在谷氧还蛋白上被其他氨基酸隔开的两端半胱氨酸上

(一般为CPY/FC)(Rodriguez-Manzanque等2002)。

3 推测的PsGRX氨基酸序列的系统进化树

西伯利亚蓼PsGRX与其他植物谷氧还蛋白家族成员, 如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) AtGRX (NP_198853.1)、马铃薯(*Solanum tuberosum*) StGRX (ABU96710.1)、人参(*Panax ginseng*) PgGRX (ABX60201.1)、小麦(*Triticum aestivum*) TaGRX (AAP80853.1)、蓖麻(*Ricinus communis*) RcGRX (XP_002524673.1)、阔叶槲(*Tilia platyphyllos*) TpGRX (AAL04507.1)、水稻(*Oryza sativa*) OsGRX (X77150.1)等具有较高的同源性(70%~74%)。用ClustalW 1.8.1软件, 按照Neighbor-Joining算法对西伯利亚蓼PsGRX进行系统进化树分析, 结果表明PsGRX与其他植物谷氧还蛋白在进化关系上相对较远(图4)。

4 PsGRX基因在西伯利亚蓼不同器官中的表达

如图5所示, PsGRX基因在西伯利亚蓼的地下茎、茎和叶中均有表达, 叶中的表达量最高, 茎和地下茎中较低且无明显差异。

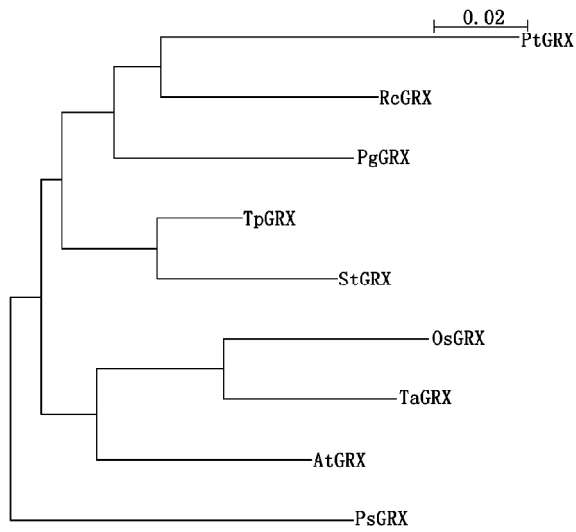


图4 PsGRX 推测的氨基酸序列与其他植物谷氧还蛋白的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of the deduced amino acid of PsGRX and other plant GRXs

进化树根据多序列比对结果, 使用 Neighbor-Joining 算法创建。

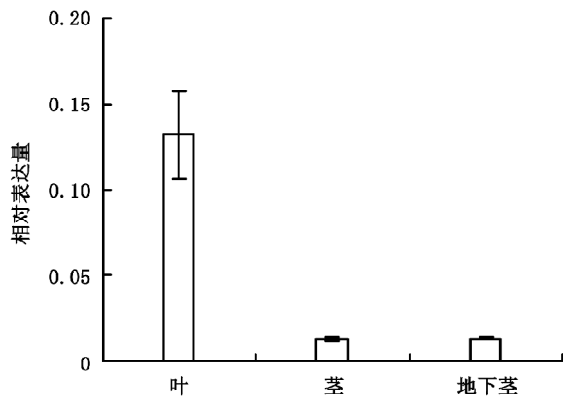


图5 西伯利亚蓼叶、茎、地下茎中 *PsGRX* 基因表达的实时定量 PCR 检测

Fig.5 Real-time PCR analysis of expression levels of *PsGRX* gene in leaves, stems and underground stems in *P. sibiricum*

5 NaHCO₃胁迫过程中 *PsGRX* 基因的表达模式分析

图6显示, *PsGRX* 基因的表达明显响应 NaHCO₃ 胁迫, 且在西伯利亚蓼不同器官中的表达模式存在差异。在地下茎中, *PsGRX* 的表达呈逐渐上升的趋势, 在处理 8 h 后就有响应并在 48 h 显著高于叶和茎中的水平, 72 h 的表达水平大约是叶和茎中的 5 倍(图 6-c), 这可能是由于西伯利亚蓼地下茎细胞最先受到 NaHCO₃ 胁迫; 在茎中, 处理 48 h 后的表达水平相对于 24 h 升高了约 4.13 倍, 72 h 后又升

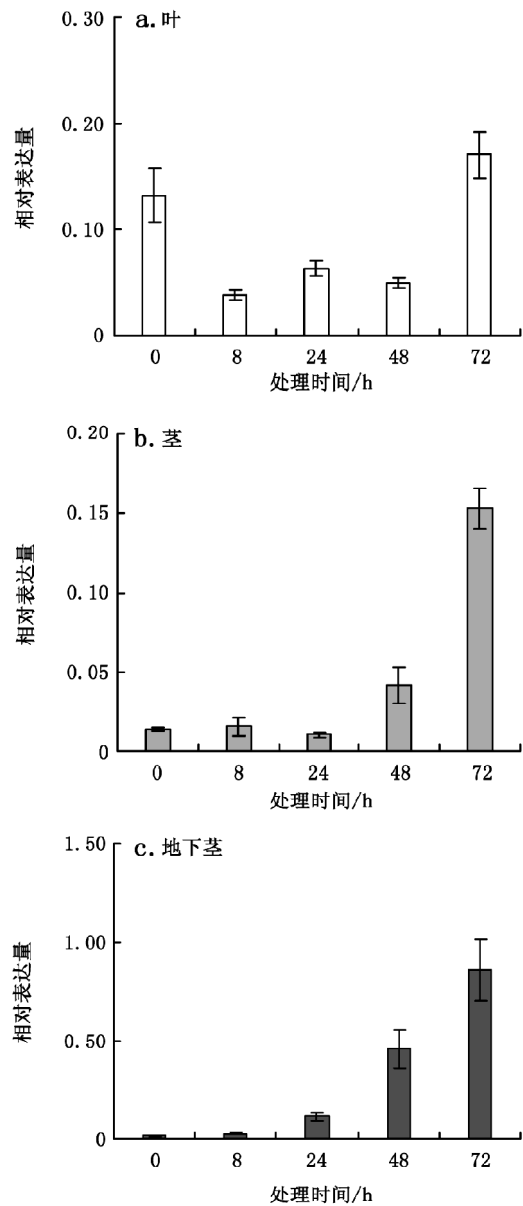


图6 NaHCO₃ 胁迫及去胁迫过程中西伯利亚蓼不同器官中 *PsGRX* 基因的相对表达水平

Fig.6 Relative expression levels of the *PsGRX* gene in response to NaHCO₃ in different organs in *P. sibiricum*

0 (对照)、8、24、48、72 h 为 3% NaHCO₃ 处理后各组织中 *PsGRX* 基因的相对表达水平。图中数据均为 3 次重复的平均值, 垂直线代表平均数的标准差。

高了约 3.68 倍, 接近于叶中的水平(图 6-b); 在叶中, *PsGRX* 基因的本底表达水平较高, 但处理 48 h 内 *PsGRX* 的表达是降低的, 虽然 72 h 的表达水平相对 48 h 显著升高了约 3.43 倍, 但与处理前(对照)之间并无显著差异(图 6-a)。 *PsGRX* 在西伯利亚蓼不

同部位均有表达且胁迫后响应强烈,可能预示着其在缓解氧化胁迫方面发挥着重要的作用。另一方面,*PsGRX*在茎和地下茎中较低的本底表达也降低了植株的物质和能量消耗。在整个处理过程中,不同器官中*PsGRX*基因响应的滞后性可能意味着西伯利亚蓼的地下茎和茎细胞具有某种阻止盐离子向上运输的机制,*PsGRX*及与其具有类似功能的蛋白可能缓解了细胞所受到的氧化胁迫,从而使地下茎和茎中的细胞维持在相对正常的生理状态。

目前对西伯利亚蓼耐盐性的研究较少,陆静梅和李建东(1994)利用电子显微技术对西伯利亚蓼进行了解剖学特征研究。杜军华等(2003)在西伯利亚蓼叶肉细胞中未观察到典型盐生植物细胞叶绿体内类囊体膨大的特征。吕艳芳等(2006)认为西伯利亚蓼通过茎部 Na^+/K^+ 库的转变来保证叶片的正常生理功能。本实验室对西伯利亚蓼分别进行了1%、2%、3%和4%的 NaHCO_3 胁迫处理,观察发现4% NaHCO_3 处理对其造成的损伤过于严重,而西伯利亚蓼对3% NaHCO_3 处理的耐受性较强(数据未列出),因此选择3%的 NaHCO_3 进行实验。在 NaHCO_3 胁迫过程中,*PsGRX*表达响应表明其与西伯利亚蓼的耐盐机制是相关的。因此将*PsGRX*转入其他植物并验证是否能提高其耐盐碱的能力,是本实验室目前正在进行的工作,而其深层的分子调控机制及其与其他植物耐盐相关基因的协同作用尚待研究。

参考文献

- 杜军华, 范平, 马永贵, 刁治民(2003). 青海湖湖滨滩地西伯利亚蓼和水麦冬叶肉细胞超微结构的研究. 草业科学, 20: 12~15
- 李民, 冯银刚, 高杨, 吴庆余(2007). 谷氧还蛋白系统及其对细胞氧化还原态势的调控. 生物物理学报, 23: 343~350
- 陆静梅, 李建东(1994). 西伯利亚蓼解剖结构的扫描电镜观察. 东北师范大学学报自然科学版, 6 (3): 83~87
- 吕艳芳, 王大海, 刘关君, 杨传平, 周颖(2006). 盐碱胁迫下西伯利亚蓼体内无机离子的变化. 广西植物, 26 (3): 304~307
- 戚元成, 张世敏, 王丽萍, 王明道, 张慧(2004). 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, 30: 517~522
- 王玉成, 薄海侠, 杨传平(2003). 胡杨、柽柳总RNA提取方法的建立. 东北林业大学学报, 31: 99~100
- Carmel-Harel O, Storz G (2000). Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. Annu Rev Microbiol, 54: 439~461
- Holmgren A (2000). Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. Antioxid Redox Signal, 2: 811~820
- Li S, Lauri A, Ziemann M, Busch A, Bhawe M, Zachgo S (2009). Nuclear activity of ROXY1, a glutaredoxin interacting with TGA factors, is required for petal development in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell, 21: 429~441
- Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z (2002). Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. Biotechniques, 32: 1372~1379
- Ndamukong I, Abdallat AA, Thurow C, Fode B, Zander M, Weigel R, Gatz C (2007). SA-inducible *Arabidopsis* glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive *PDF1.2* transcription. Plant J, 50 (1): 128~139
- Rodriguez-Manzanque MT, Tamarit J, Belli G, Ros J, Herrero E (2002). Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. Mol Biol Cell, 13: 1109~1121
- Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot JP (2002). Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin from poplar: protein-protein interaction and catalytic mechanism. J Biol Chem, 277: 13609~13614
- Rouhier N, Lemaire SD, Jacquot JP (2008). The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. Annu Rev Plant Biol, 59: 143~166
- Rouhier N, Villarejo A, Srivastava M, Gelhaye E, Keech O, Droux M, Finkemeier I, Samuelsson G, Dietz KJ, Jacquot J-P et al (2005). Identification of plant glutaredoxin targets. Antioxid Redox Signal, 7: 919~929
- Rouhier N, Vlamis-Gardikas A, Lillig CH, Berndt C, Schwenn JD, Holmgren A, Jacquot JP (2003). Characterization of the redox properties of poplar glutaredoxin. Antioxid Redox Signal, 5: 15~22
- Xing SP, Zachgo S (2008). *ROXY1* and *ROXY2*, two *Arabidopsis* glutaredoxin genes, are required for anther development. Plant J, 53 (5): 790~801