

蒋正宁, 赵仁慧, 吴旭江, 等. 簇毛麦谷胱甘肽硫转移酶基因 *HvGSTF* 的原核表达与酶活性鉴定[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(6): 1219-1222.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.06.004

簇毛麦谷胱甘肽硫转移酶基因 *HvGSTF* 的原核表达与酶活性鉴定

蒋正宁¹, 赵仁慧¹, 吴旭江¹, 别同德¹, 高德荣¹, 张伯桥^{1,2}

(1. 江苏里下河地区农业科学研究所/农业部长江中下游小麦生物与遗传改良重点实验室, 江苏 扬州 225007; 2. 江苏里下河地区农业科学研究所/现代作物生产协同创新中心, 江苏 扬州 225007)

摘要: 簇毛麦谷胱甘肽硫转移酶基因 (*HvGSTF*) 是 1 个受白粉病诱导增强表达基因, 本研究将其构建入原核表达载体 pET-28a, 在大肠杆菌中表达后, 分离纯化重组蛋白 HvGSTF, 并对其进行活性鉴定。重组蛋白 HvGSTF 的分子量为 29 200, 浓度为 0.84 mg/ml。重组蛋白 HvGSTF 具有谷胱甘肽硫转移酶 (*GST*) 活性和谷胱甘肽过氧化物酶 (*GPX*) 双重活性, 酶活力分别为 (5.32±0.22) U/mg 和 (20.54±0.42) mU/mg。 *HvGSTF* 可能参与了簇毛麦与白粉病互作, 但是否参与了簇毛麦受白粉菌侵染后产生的活性氧的清除与调节仍需进一步验证。

关键词: 簇毛麦; 谷胱甘肽硫转移酶; *HvGSTF* 基因; 谷胱甘肽过氧化物酶; 活性氧

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)06-1219-04

Prokaryotic expression of a glutathione S-transferase gene *HvGSTF* from *Haynaldia villosa* and the enzyme activity

JIANG Zheng-ning¹, ZHAO Ren-hui¹, WU Xu-jiang, BIE Tong-de¹, GAO De-rong¹, ZHANG Bo-qiao^{1,2}

(1. Key Laboratory of Wheat Biology and Genetic Improvement in Low & Middle Yangtze River Valley Winter Wheat Region, Ministry of Agriculture/Institute of Agricultural Science of the Lixiahe District in Jiangsu Province, Yangzhou 225007, China; 2. Institute of Agricultural Science of the Lixiahe District in Jiangsu Province/Jiangsu Collaborative Innovation Center for Modern Crop Production, Yangzhou 225007, China)

Abstract: *HvGSTF*, a ϕ -class glutathione S-transferase gene from *Haynaldia villosa*, is induced for expression by *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* infection. In this study, *HvGSTF* gene was constructed into the vector pET-28a. After expression in *Escherichia coli*, recombinant protein HvGSTF was purified and detected for enzyme activity. The molecular weight of recombinant HvGSTF was 29 200, and the protein concentration was 0.84 mg/ml. Enzyme assays revealed that HvGSTF was a glutathione S-transferase (*GST*) with the activity of glutathione reductase (*GPX*). The activities of *GST* and *GPX* were (5.32±0.22) U/mg and (20.54±0.42) mU/mg, respectively. The results imply that *HvGSTF* might have participated in the interaction between *Haynaldia villosa* and *B. graminis* f. sp. *tritici* because of its dual activities of both *GST* and *GPX*. It is unclear whether *HvGSTF* might have played a role in scavenging reactive oxygen species after infection.

Key words: *Haynaldia villosa*; glutathione S-transferase (*GST*); *HvGSTF* gene; glutathione peroxidase (*GPX*); reactive oxygen species

收稿日期: 2016-01-28

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK20140500); 江苏省农业科技自主创新资金项目 [CX(13)2022]

作者简介: 蒋正宁 (1979-), 男, 江西乐平人, 博士, 助理研究员, 主要从事小麦分子遗传学研究。(Tel) 13665219751; (E-mail) znjiang79@aliyun.com;

通讯作者: 张伯桥, (E-mail) zqbq@wheat.org.cn

植物受生物和非生物胁迫后体内的活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 含量增加, 对细胞造成毒害, 如 DNA 损伤、蛋白变性及脂类过氧化等, 还会引起植物过敏性坏死反应^[1-6]。植物在进化过程中形成了较完善的 ROS 清除酶系统, 其中谷胱甘肽硫转移酶 (*GST*) 具有谷胱甘肽过氧化物酶 (*GPX*) 活性, 可以

通过参与 ROS 的清除来调节植物体内 ROS 的浓度,在保护叶绿体及其他细胞器免受氧化伤害中起作用。

谷胱甘肽硫转移酶是一个同工酶家族,广泛存在于动物、植物和真菌中^[7]。研究发现,植物 GST 具有去除除草剂等生物体内异源物质毒性的作用,同时还能催化还原型谷胱甘肽(GSH)与多种亲电性底物结合,在细胞胁迫应答过程中起作用,能清除植物抗病过程中积累的还原性氧类(ROS),减少 ROS 的毒性和破坏性作用,参与毒素的分解代谢^[8]。在基因表达调控水平上,植物 GST 基因的表达不仅受到紫外线、脱水、干旱、盐、重金属离子等各种非生物胁迫的诱导^[9-12],还受到稻瘟病菌、小麦白粉菌等生物胁迫的诱导^[13-14],可见 GST 基因在植物抗病和抗逆过程中发挥着重要作用。何华纲等从小麦白粉菌感染的簇毛麦中克隆到 1 个全长的谷胱甘肽硫转移酶基因 *HvGSTF*^[15]。本研究拟将该基因构建到原核表达载体,在大肠杆菌中进行高效表达,检测重组 HvGSTF 的氧化物酶活性,为解析 *HvGSTF* 基因的生物学功能及在小麦与白粉菌互作中的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

含 *HvGSTF* 基因的质粒 pSPORT1-*HvGSTF*,表达载体 pET-28a,大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 和 BL21(DE3)菌株均由本实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器

分子生物学试剂购自 TaKaRa 公司, Ni-NTA 树脂购自北京全式金生物技术有限公司,总谷胱甘肽过氧化物酶试剂盒购自碧云天生物技术研究,1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)购自国药集团。PCR 扩增仪为 Bio-Rad 公司产品, Ultraflex MALDI-TOF-TOF 质谱仪为 Bruker Daltonic 公司产品。

1.3 重组表达载体的构建

根据 *HvGSTF* 基因(GenBank 登录号为 EU070904)设计并合成 1 对引物:上游引物:5'-TAGGGATCCTCTCCGATGAAGGTGTTTC-3';下游引物:5'-GGAAGCTTAAGCGTATACTGGAAGCTAGA-3';下划线分别表示 *Bam* H I 和 *Hind* III 酶切位点。以 pSPORT1-*HvGSTF* 质粒 DNA 作为模板进行 PCR 扩增,扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,32 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后,

进行胶回收和纯化。纯化的 PCR 产物用 *Bam* H I 和 *Hind* III 双酶切,与经相同酶切的 pET-28a 连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,双酶切鉴定重组质粒。基因操作方法按文献[16]进行。重组质粒 pET-*HvGSTF* 送上海生工公司测序。

1.4 重组蛋白 HvGSTF 的诱导表达与分离纯化

将重组质粒 pET-*HvGSTF* 转入大肠杆菌 BL21(DE3)菌株,挑取单菌落于 LB 培养基(含 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 卡那霉素),37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养,取 1 ml 培养物接种于 100 ml LB 培养基(含 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 卡那霉素),37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至 OD_{600} 值为 0.6,加入 0.5 ml 0.1 mol/L IPTG,37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 4 h。离心收集细胞后,加入 8 ml 结合缓冲液(300 mmol/L NaCl, 50 mmol/L NaH_2PO_4 , pH 8.0),超声波破碎细胞,高速离心后保留上清液。使用 Ni-NTA 树脂(Ni-NTA His·Bind[®] Resin)从上清液中分离纯化重组 HvGSTF,操作按产品说明书进行。纯化的重组蛋白 HvGSTF 在 0.1 mol/L PBS(pH 7.0)中过夜透析后,采用 Bradford 法测定其浓度,SDS-PAGE 检测诱导表达产物及纯化的重组蛋白 HvGSTF。

1.5 重组蛋白 HvGSTF 的生物质谱鉴定

从凝胶上切割目的蛋白条带,经胰蛋白酶消化后,采用 MALDI-TOF-TOF 质谱仪分析肽质量指纹图谱,并利用 MASCOT 工具([http://www. matrix-science. com](http://www.matrix-science.com))搜索 NCBI 网站上的蛋白质数据库。

1.6 重组蛋白 HvGSTF 的活性检测

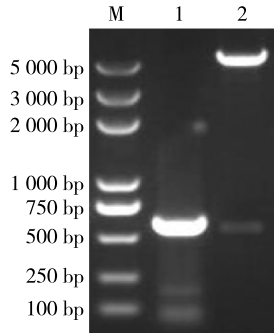
采用 CDNB 法测定 GST 活性^[17],GST 酶活力单位定义为:每分钟催化产生 1 μmol GS-CDNB 的酶量为 1 个单位(U),其中 GS-CDNB 的摩尔消光系数为 0.009 6 $\mu\text{mol}/\text{cm}$ 。采用总谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)试剂盒法测定重组 *HvGSTF* 的 GPX 活性,GPX 酶活力单位定义为:每分钟催化 1 μmol NADPH 转化为 NADP^+ 的酶量为 1 个单位(U)。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pET-HvGSTF 的构建

以簇毛麦 *HvGSTF* 基因的质粒 pSPORT1-*HvGSTF* 为模板,利用 PCR 技术扩增到 1 条与理论大小(690 bp)一致的特异性条带,经 *Bam* H I 和 *Hind* III 双酶切后连入 pET-28a(+)质粒,形成重组质粒 pET-*HvGSTF*,重组质粒 pET-*HvGSTF* 经双酶切得到 1 条 690 bp 左右的片段(图 1),说明目的基因

已经整合到 pET-28a(+) 质粒上,同时,测序结果也表明其 DNA 序列与 *HvGSTF* 基因的原始序列完全一致,插入的目的片段读码框正确。



M: DNA marker; 1: *HvGSTF* 基因 PCR 产物; 2: pET-*HvGSTF* 质粒的 *Bam* HI 和 *Hind* III 双酶切鉴定。

图1 重组 pET-*HvGSTF* 质粒的 PCR 及酶切验证

Fig. 1 PCR and enzymatic digestion of recombinant plasmid pET-*HvGSTF*

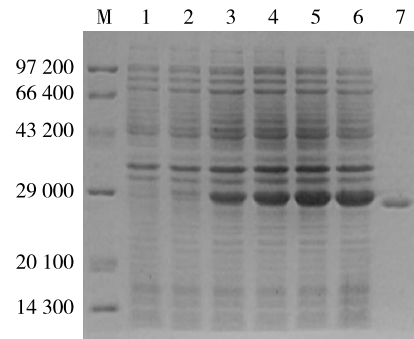
2.2 重组蛋白 HvGSTF 的诱导表达、纯化及鉴定

构建好的载体 pET-*HvGSTF* 转入 *E. coli* BL21 菌株中,经 IPTG 同一浓度诱导并经 SDS-PAGE 电泳检测发现,与对照 pET-28a 空载体相比在 29 000 处有 1 条蛋白质条带,和预期一致(其中 *HvGSTF* 为 25 600, N 端标签为 3 600)(图 2),表明 pET-*HvGSTF* 在 *E. coli* BL21 菌株中得到了正确的表达。在 37 °C, 0.05 mmol/L 浓度的 IPTG 诱导下,随着诱导时间的延长,目的蛋白逐渐积累,在 IPTG 诱导 3 h 时,重组蛋白 *HvGSTF* 约占宿主总蛋白的 36%。采用 Ni-NTA 树脂对重组 *HvGSTF* 蛋白进行纯化,电泳检测在 29 000 处有单一蛋白质条带(图 2),经检测重组蛋白 *HvGSTF* 的浓度为 0.84 mg/ml。

为了进一步鉴定纯化的重组蛋白,对 *HvGSTF* 进行胰蛋白酶消化产物物质谱分析,鉴定出 10 个与数据库中 GSTF 匹配的肽段(图 3),MASCOT 搜索的 MOWSE 值为 85,氨基酸序列覆盖率为 37.6%。表明,所得的重组蛋白即为簇毛麦 *HvGSTF*。

2.3 重组蛋白 HvGSTF 的体外活性分析

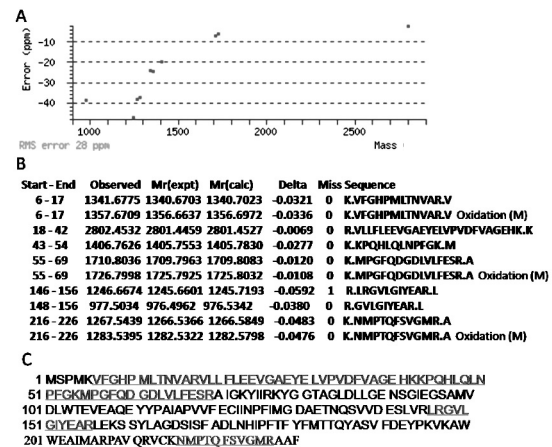
GST 能将还原型 GSH 转移至 CDNB 上,形成 GS-CDNB。本研究以 CDNB 和 GSH 为底物,检测到重组蛋白 *HvGSTF* 的 *GST* 活性为 (5.32 ± 0.22) U/mg。谷胱甘肽过氧化物酶(*GPX*)能催化稳定的有机过氧化物 Cum-OOH 和 GSH 反应,形成 GSSG,在 NADPH 和 H^+ 存在的条件下,谷胱甘肽还原酶



M: 蛋白质 marker; 1: 含空载体 pET-28a 的 BL21 (DE3) 菌株作为对照; 2~6: *HvGSTF* 蛋白在 BL21 (DE3) 菌株中分别诱导 0 h、1 h、2 h、3 h、4 h; 7: 经 Ni-NTA 树脂纯化的 *HvGSTF* 蛋白。

图2 *HvGSTF* 蛋白诱导不同时间的 SDS-PAGE 检测

Fig. 2 SDS-PAGE of *HvGSTF* protein induced for different time



A、B 为匹配肽数值及序列; C 为匹配的肽段(下划线所示)。

图3 *HvGSTF* Mascot 搜索结果

Fig. 3 Mascot search results for *HvGSTF*

(*GR*)可使 GSSG 重新形成 GSH,同时将 NADPH 转变为 $NADP^+$ 。采用试剂盒法检测到重组蛋白 *HvGSTF* 的 *GPX* 活性为 (20.54 ± 0.42) mU/mg。

3 讨论

本研究采用的 pET 原核表达系统是目前应用最广泛的表达系统, pET-28a 携带 His-Tag, 有利于融合蛋白的纯化, 可使以包涵体形式表达的蛋白质亲和纯化在溶解蛋白质完全变性条件下进行, 满足制备体外酶活检测的要求。蛋白表达量可由诱导物 IPTG 控制, 一般选择在 37 °C 用不同的 IPTG 浓度诱导 3~6 h 来确定最佳诱导浓度, 不同的目的蛋白最佳 IPTG 诱导浓度有所不同。本研究选用 IPTG

诱导浓度为 0.05 mmol/L, 37 ℃ 诱导 3 h 重组 HvGSTF 表达量达最大值, 约占宿主总蛋白的 36%。

在病菌与寄主互作中, 植物主要是通过防卫基因的表达、过敏反应和系统获得性抗性来抵抗病菌的入侵。谷胱甘肽硫转移酶(GST)是生物体内一种重要的解毒酶, 在生物界分布广泛, 根据其蛋白质的同源性差异, GST 家族被分为 ϕ (phi, F)、 ξ (zeta, Z)、 τ (tau, U)、 λ (lambda, L) 和 θ (theta, T) 五大类, 其中 τ 类和 ϕ 类 GST 为植物特有^[18]。有报道发现, 一些 ϕ 类 GST 既具有谷胱甘肽硫转移酶(GST)活性, 又具有谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)活性, 如小麦 TaGSTF^[19]、水稻 OsGSTF5^[20]。研究结果表明, GST 和 GPX 都能有效清除各种胁迫下植物体内过高水平的活性氧^[19]。簇毛麦 HvGSTF 的 N 端有一个 GSH 结合位点(G 位点), C 端有一个疏水性底物结合位点(H 位点)。在 N 端的 GSH 结合位点中, 含有与 GST 活性相关的保守性残基 F₃₆、H₄₁、K₄₂ 和 S₆₈, 且存在 ϕ 类 GST 特有的 E₆₆-S₆₇-R₆₈ 三联体, 推测 HvGSTF 具有 GST 活性^[15]。本研究借助大肠杆菌表达系统高效表达并分离纯化了重组蛋白 HvGSTF, 并通过 CDM 法测定 HvGSTF 活性, 证实 HvGSTF 不仅具有 GST 活性, 还检测到它具有 GPX 活性, 与小麦和水稻 GST 具有相同功能。RT-PCR 分析结果表明 HvGSTF 基因在簇毛麦与白粉菌的互作中受诱导表达^[15], 分别在接种后 24 h 达到表达高峰, 与小麦谷胱甘肽硫转移酶基因(GST)表达相似, 与活性 O₂⁻ 和 H₂O₂ 的表达模式基本一致, 表明 HvGSTF 基因的表达与 ROS 的水平调节密切相关。但是对于是否参与了小麦受白粉菌侵染后产生的 ROS 的清除与调节, 仍需进一步验证。

参考文献:

- [1] 张美德, 艾伦强, 何银生, 等. 硒对镉胁迫下白术抗氧化能力的影响[J]. 南方农业学报, 2014, 45(7): 1211-1214.
- [2] 吴敏兰, 贾洋洋, 李荭荭, 等. 铬胁迫对烟草叶片叶绿素荧光特性和活性氧代谢系统的影响[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(8): 92-95.
- [3] MITTLER R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(9): 405-410.
- [4] 苏涛, 司美茹, 王仁君, 等. 酸雨与重金属复合胁迫对绞股蓝抗性生理指标的影响[J]. 山东农业科学, 2014, 46(8): 61-65.
- [5] 张永福, 黄鹤平, 银立新, 等. 冷(热)激对干旱胁迫下玉米活性氧清除及膜脂过氧化的调控机制[J]. 江苏农业科学,

2015, 43(5): 56-60.

- [6] WANG C F, HUANG L L, BUCHENAUER H, et al. Histochemical studies on the accumulation of reactive oxygen species (O₂⁻ and H₂O₂) in the incompatible and compatible interaction of wheat-Puccinia striiformis f. sp. tritici[J]. Physiology Molecular Plant Pathology, 2008, 71(71): 230-239.
- [7] SHEEHAN D, MEADE G, FOLEY V M, et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily[J]. Biochem J, 2001, 360(1): 1-16.
- [8] CUMMINS I, DIXON DP, FREITAG-POHL S, et al. Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification[J]. Drug Metab Rev, 2012, 43(2): 266-280.
- [9] 刘新仿, 李家洋. 紫外线强烈诱导的谷胱甘肽转移酶基因的功能鉴定[J]. 遗传学报, 2002, 29(5): 458-460.
- [10] GALLE A, CSISZAR J, SECENJI M, et al. Glutathione transferase activity and expression patterns during grain filling in flag leaves of wheat genotypes differing in drought tolerance: response to water deficit[J]. J Plant Physiol, 2009, 166(7): 1878-1891.
- [11] GAO L, YAN X, LI X, et al. Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE)[J]. Phytochemistry, 2011, 72(10): 1180-1191.
- [12] VIVEK D, VIVEK P, RADHEY S. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (Pisum sativum L. cv. Azad)[J]. J Exp Bot, 2001, 52(358): 1101-1109.
- [13] DEBONA D, RODRIQUES F A, RIOS J A, et al. Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by Pyricularia oryzae[J]. Phytopathology, 2012, 102(12): 1121-1129.
- [14] 吴金华, 张西平, 胡言光, 等. 小麦抗白粉病相关基因 GST 克隆与表达[J]. 西北植物学报, 2013, 33(1): 34-38.
- [15] 何华纲, 高安礼, 王秀娥, 等. 簇毛麦中谷胱甘肽硫转移酶基因的克隆与表达分析[J]. 河南大学学报: 自然科学版, 2008, 38(4): 387-392.
- [16] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.
- [17] DIXON DP, LAPTHORN A, EDWARDS R. Plant glutathione transferases[J]. Genome Biol, 2002, 3(3): 3001-3010.
- [18] CUMMINS I, O'HAGAN, JABLONKAI I, COLE D J, et al. Cloning, characterization and regulation of a family of phi class glutathione transferases from wheat[J]. Plant Mol Biol, 2003, 52(3): 591-603.
- [19] CHO H Y, LE H J, KONG K H. A phi class glutathione S-transferase from Oryza sativa (OsGSTF5): molecular cloning, expression and biochemical characteristics[J]. J Biochem Mol Biol, 2007, 40(4): 511-516.
- [20] VANDENABEELE J D S, VRANOVA E, MONTAGU M V, et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses[J]. Cell Mol Life Sci, 2000, 57(5): 779-795.

(责任编辑: 陈海霞)