

盐芥谷胱甘肽过氧化物酶基因(*ThGPX6*) 的克隆及表达分析

马亭亭 周宜君 高 飞 赵 竹 隋 欣 刘 楠 刘 冉

(中央民族大学生命与环境科学学院 北京 100081)

摘要:谷胱甘肽过氧化物酶在植物响应盐胁迫中具有重要作用。依据盐芥 EST 序列进行 RACE 实验, 获得 1 个新的谷胱甘肽过氧化物酶基因, 命名为 *ThGPX6* (GenBank 注册号为 FJ357244)。该基因的 cDNA 全长 892 bp, 包含 1 个长为 702bp 的开放读码框, 编码 234 个氨基酸。生物信息学分析表明, 该蛋白具有植物 GPX 的典型结构, 即 GPX 催化活性区 (NVASKCGLT) 和标志性基序 (ILAFPCNQF), 以及 PHGPX 特有序列 (KWNF(S/T) KFL)。实时荧光定量 PCR 分析结果表明, *ThGPX6* 在盐芥叶片和根中表达, 其表达受 NaCl 诱导, 显示 *ThGPX6* 在植物高盐响应中发挥作用。亚细胞定位结果表明, *ThGPX6* 存在于线粒体和内体中的可能性最大, 预示着 *ThGPX6* 在清除 ROS 过程中起着重要作用。

关键词:盐芥; *ThGPX6*; 基因克隆; 表达模式分析; 亚细胞定位

Cloning and Expression Analysis of Glutathione Peroxidase 6 (*ThGPX6*) in *Thellungiella halophila*

MA Ting-ting ZHOU Yi-jun GAO Fei ZHAO Zhu SUI Xin LIU Nan LIU Ran

(College of Life and Environmental Science, Minzu University of China, Beijing 100081)

Abstract: Glutathione peroxidase (GPX) plays an important role in response to salt stress in plant. Through the analysis on EST sequence of *Thellungiella halophila*, a novel gene exhibiting high homology with plant glutathione peroxidase was discovered and named as *ThGPX6* (GenBank accession number: FJ357244). *ThGPX6* consists of 892 nucleotides, including a single 702bp opening reading frame which encodes a 234-amino acid peptide. Bioinformatics analysis showed that *ThGPX6* had typical structures of GPX, such as catalysis region (NVASKCGLT), characteristic motif (ILAFPCNQF) and PHGPX special sequence (KWNF(S/T) KFL). Quantitative real-time PCR analysis revealed that the gene expressed in shoot and root and could be induced by NaCl in *T. halophila*. These results showed that the *ThGPX6* played a crucial role under salt stress in *T. halophila*. *ThGPX6* is most likely localized in the mitochondria and endosome, suggesting importance of *ThGPX6* in the process of cleaning ROS.

Key words: *Thellungiella halophila*; *ThGPX6*; Gene cloning; Gene expression analysis; Subcellular localization

谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPX, EC1.11.1.9, EC1.11.1.2) 是生物体内最主要的具有抗氧化作用的硒蛋白, 能维持细胞内适当的低水平氢过氧化物 (H_2O_2)、减少自由基的潜在性损伤, 保护蛋白质、DNA 及生物膜的完整性。根据亚细胞定位、氨基酸序列不同以及结合底物的特异性, GPXs 分为几种不同的同工酶, 其中磷

脂氢谷胱甘肽过氧化物酶 (phospholip hydroperoxide GPX, PHGPX) 是 GPX 家族中的一个独特成员, 包含一个保守结构域 KWNF(S/T) KFL, 这是 PHGPX 与其他家族成员的区别^[1]。PHGPX 能特异性地还原膜上的磷脂氢过氧化物, 其生物学功能主要是保护磷脂、胆固醇、DNA 和调控细胞凋亡信号等^[2]。

收稿日期: 2011-09-12 修回日期: 2011-10-31

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31070361); 中央高校基本科研业务费专项基金 (0910KYZY43, 1112KYQN31); 中央民族大学“985 工程”项目 (MUC98504-44, MUC98507-08); 国家民委科研项目 (10ZY01)

作者简介: 马亭亭, 硕士研究生, 研究方向: 植物分子生物学。E-mail: ggtg00@163.com

通讯作者: 周宜君, 博士, 教授, 研究方向: 植物分子生物学。E-mail: queenzhou@263.net

与动物的 GPXs 研究相比,植物 GPXs 的研究起步较晚^[3]。最初开展植物 GPXs 的研究是从烟草(*Nicotiana sylvestris*)的叶片中获得了与动物依赖硒的 GPX 有较高同源性的 cDNA^[4]。后来从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)和番茄(*Solanum lycopersicum*)等植物中分离得到了类似的基因^[5-7]。利用拟南芥的多种突变体进行的研究发现,拟南芥 GPXs(*AtGPXs*)具有双重功能:一方面,可控制 H₂O₂ 的稳态^[8];另一方面,转导保卫细胞中的 H₂O₂ 信号,介导细胞应答胁迫条件下的气孔调节^[9]。近年来对植物 GPXs 的研究表明,不同的环境胁迫(如病原菌侵染、高盐和重金属等)下,GPXs 的 mRNA 表达水平稳步提高,因此 GPXs 在植物氧化信号转导过程中可能具有重要作用^[10]。

盐芥(*Thellungiella halophila*, 又称 *T. salsuginea*)是一种可耐受 500 mmol/L NaCl 的耐盐植物。盐芥不仅具有符合实验室操作的特性(如植株矮小、生活周期短、自花授粉、种子多等),而且具备了研究者喜爱的遗传学特征(如自交结实、基因组小、易转化、易诱变等)。此外,EST 分析表明,盐芥和拟南芥的 cDNA 和氨基酸序列平均有 90%~95% 是相同的^[11],但二者在耐盐性方面具有很大差异,盐芥的耐盐生理与分子机制研究受到关注,现已被公认为耐盐性研究的模式植物^[11-13],也被作为一种重要的抗逆基因资源植物。从作物中克隆与抗逆相关基因并研究在逆境条件下的表达,为研究抗逆基因作用的分子机制和功能提供了试验依据^[14-15]。而从盐芥等抗逆植物中克隆与抗逆相关基因并进行基因在逆境条件下的表达分析,有助于研究基因作用的分子机制,可以为挖掘抗逆新基因奠定基础。

对现有的盐芥 ESTs 分析表明,在盐胁迫条件下,编码盐芥 GPXs 的基因(*ThGPXs*)的表达受到影响,说明 *ThGPXs* 在抵御盐胁迫中可能发挥作用。研究表明,拟南芥 GPXs(*AtGPXs*)由 8 个成员组成,其中 *AtGPX6* 编码的蛋白是 PHGPX^[16],而 PHGPX 具有特殊的生物学功能。根据拟南芥与盐芥高度同源特点,推测 *ThGPX6* 编码的蛋白有可能是 PHGPX。因此克隆盐芥编码 PHGPX 基因,并研究其在盐胁迫下的表达,对于研究编码 GPXs 基因在植物响应高盐胁迫中的作用机制具有重要的意义。

本研究采用 RACE 技术从盐芥中克隆一个编码 GPX 的基因,命名为 *ThGPX6*。运用生物信息学对

该基因序列、蛋白特征进行了分析,并利用荧光定量 PCR 技术分析了盐芥中该基因在不同浓度盐胁迫下的不同组织中的表达模式,旨在为植物 GPXs 的理论研究及挖掘抗逆新基因提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

盐芥种子由山东师范大学馈赠。

反转录酶 M-MLV、RNA 酶抑制剂(Rasin Inhibitor)及 T₄ DNA 连接酶购自 Promega 公司。SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司。EasyPure Plant RNA Kit 购自北京全式金生物技术有限公司。Taq 酶、pfu Taq DNA 聚合酶的购置以及引物合成与测序由上海生物工程技术服务有限公司完成。

1.2 处理方法

种子播种于混合土(营养土:蛭石:珍珠岩=2:1:1)中。生长条件:光周期 16 h/d,昼/夜相对湿度 60%/80%,温度为 23℃/18℃。生长 6 周后,转入新的育苗介质(珍珠岩:蛭石=1:1),用 Hoagland 营养液配制 500mmol/L NaCl 溶液,处理 12h 后取样,迅速冻于液氮中,用于基因克隆。用 Hoagland 营养液配制不同浓度的(150mmol/L、300mmol/L) NaCl 溶液,处理 6h、24h 和 48h 后,分别取叶片和根组织,迅速冻于液氮中,用于基因的组织特异性表达分析。

1.3 *ThGPX6* 基因的克隆

以 Trizol 试剂提取经过 500mmol/L NaCl 处理 12h 后盐芥全株苗的总 RNA。提取的总 RNA 经 1% 琼脂糖电泳分离,以检测其完整性。

根据盐芥在 NCBI 注册的 EST 序列(BM985497)设计引物扩增 EST,经生物信息学分析为 *ThGPX6* 的 EST 片段。按照 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 说明,合成 cDNA。用 3'RACE 引物扩增 *ThGPX6* 的 3'端序列。利用盐芥和拟南芥的同源性,设计简并引物扩增 *ThGPX6* 的 5'端片段序列。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖胶分离后回收,连接到 pGEM-T easy system 中,通过蓝白斑筛选,挑取白斑进行测序。

利用 DNASTar 将 *ThGPX6* 基因的 EST 片段、3'RACE 片段和 5'端序列进行拼接,获得基因的 cDNA 序列。用全序列扩增引物扩增基因全长,并将 PCR 产物连接到 pGEM-T easy system 中,进行测序。试验中所用的引物序列如表 1 所示。

表 1 *ThGPX6* 相关的引物序列Table 1 DNA primer sequences of *ThGPX6*

名称 Name	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
<i>ThGPX6</i> EST 扩增引物	ThGPX6F	5'-CAGGTCCTTCTCGATGCTGAG-3'
	ThGPX6R	5'-CGACAACGGGAGCTAAACTTTC-3'
3'RACE 引物	ThGPX6 3'RACE(GSP1)	5'-GATGTGAACGGTGACAAGGCTGCC-3'
5'端扩增引物	ThGPX6FQ	5'-CTTTTGCAAATGCTTCGCTCCTC-3'
	ThGPX6RQ	5'-GTTCCACTTGATGCCATCTCC-3'
全序列扩增引物	ThGPX6FB	5'-GCAAATGCTTCGCTCCTCAATTCG-3'
	ThGPX6RB	5'-CCCAAATACACTCAAGAACTCAGACAG-3'
内参基因 Tublin	ThtublinF1	5'-AGACGCTCCCTAAGCATTGA-3'
	ThtublinR1	5'-GCAGAGATGACTGGTGCCTA-3'
荧光定量 PCR 引物	ThGPX6F1	5'-TCGTCCTCTTCCTTTATCGACAACG-3'
	ThGPX6R1	5'-CGCATCCTTCACGGTGAAATCATAG-3'
亚细胞定位双酶切引物	<i>Xho</i> I ThGPX 6F	5'-CCGCTCGAGAAATGTTGAGATCCTCATTTCGGC-3'
	<i>Xba</i> I ThGPX 6R	5'-GCTCTAGATTAAGCAGTAACCTCCCAACATTTTCTT-3'

1.4 *ThGPX6* 蛋白的生物信息学分析

用 DNASTar 对获得的基因序列进行开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 的查找和翻译, 并进行氨基酸序列的组成、理化性质分析; 分别用在线工具 TMHMM2.0 Server、SignalP 3.0 Server、ProtScale 2.0 Server、SOPMA、PSORT、SWISS-MODEL 进行蛋白质跨膜结构域、信号肽、亲水/疏水性、二级结构、亚细胞定位和三维结构的分析。运用 DNASTar 软件进行系统进化树分析。

1.5 *ThGPX6* 基因的组织特异性表达分析

用 EasyPure Plant RNA Kit 分别提取经过 150mmol/L 和 300mmol/L NaCl 溶液处理 6h、24h 和 48h 后的叶和根组织的总 RNA, 提取的总 RNA 经 1% 琼脂糖电泳分离, 以检测其完整性。反转录得到的 cDNA 稀释 5 倍后用于荧光定量 PCR。依据荧光定量 PCR 的要求, 用 Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) 在线设计引物序列 (表 1)。以盐芥的管家基因 *Thtublin* 为内参基因, 对 *ThGPX6* 在不同浓度 NaCl 处理不同时间的表达量进行荧光定量 PCR 分析。PCR 扩增体系 (20 μ l) 为: 2 \times SsoFast EvaGreen supermix 10 μ l, 正反向引物各 0.4 μ l 和模板 cDNA 1 μ l。PCR 程序为 95 $^{\circ}$ C 30s; 95 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 10s, 共 40 个循环; 65 \sim 95 $^{\circ}$ C (0.5 $^{\circ}$ C 为一个梯度, 一个梯度 10s)。

将未经 NaCl 处理的样品作为对照, 经内参基因均一化处理后, 通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算相对表达量 (即相对于对照的表达倍数), $\Delta\Delta CT = (C_{T-ThGPX6} - C_{T-Thtublin})_{处理} - (C_{T-ThGPX6} - C_{T-Thtublin})_{对照}$ 。其中每个

处理重复 3 次, 每个重复做 3 个平行。

1.6 *ThGPX6* 的亚细胞定位

利用酶切位点 *Xho* I 和 *Xba* I 将 *ThGPX6* 构建入 pRTL2C 端 GFP 载体中, 用基因枪法转化洋葱表皮细胞进行瞬时表达, 并利用激光共聚焦显微镜进行观察。

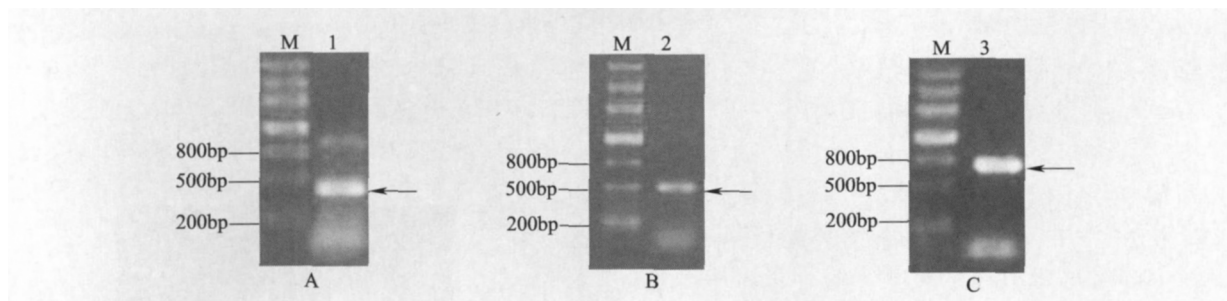
2 结果与分析

2.1 *ThGPX6* 基因的克隆

运用 3'-RACE 引物和通用引物 Ump 进行 PCR 扩增, 获得 460bp 左右的片段 (图 1-A)。通过双向测序并对测序结果进行 Blast 分析, 确认为 *ThGPX6* 基因的 3'端序列。根据盐芥和拟南芥具有较高同源性的特点, 在 *AtGPX6* 起始密码子附近序列设计上游引物, 用 *ThGPX6* 的 EST 片段设计下游引物, 进行 PCR 扩增获得 500bp 左右的片段 (图 1-B)。经过测序并进行 Blast 分析, 推断为 *ThGPX6* 的 5'端序列。运用全序列扩增引物进行 PCR 扩增, 获得 800bp 左右的片段 (图 1-C)。

2.2 *ThGPX6* 核苷酸和氨基酸序列特征分析

将克隆得到的全序列用 DNASTar 软件进行相关分析。*ThGPX6* 的 cDNA 长度为 892bp, 5'~709 为开放读码框 (ORF, 即蛋白质编码区), 710~892 为 3'-UTR 区, 其聚腺苷酸信号 AATAAA 位于终止密码子下游 19bp 处。*ThGPX6* 编码 234 个氨基酸。*ThGPX6* 理论相对分子量为 25937.68Da, 等电点 (pI) 9.35, 在其氨基酸组成中, 碱性氨基酸 32 个, 酸性氨基酸 22 个, 疏水性氨基酸 79 个, 极性氨基酸 68 个。

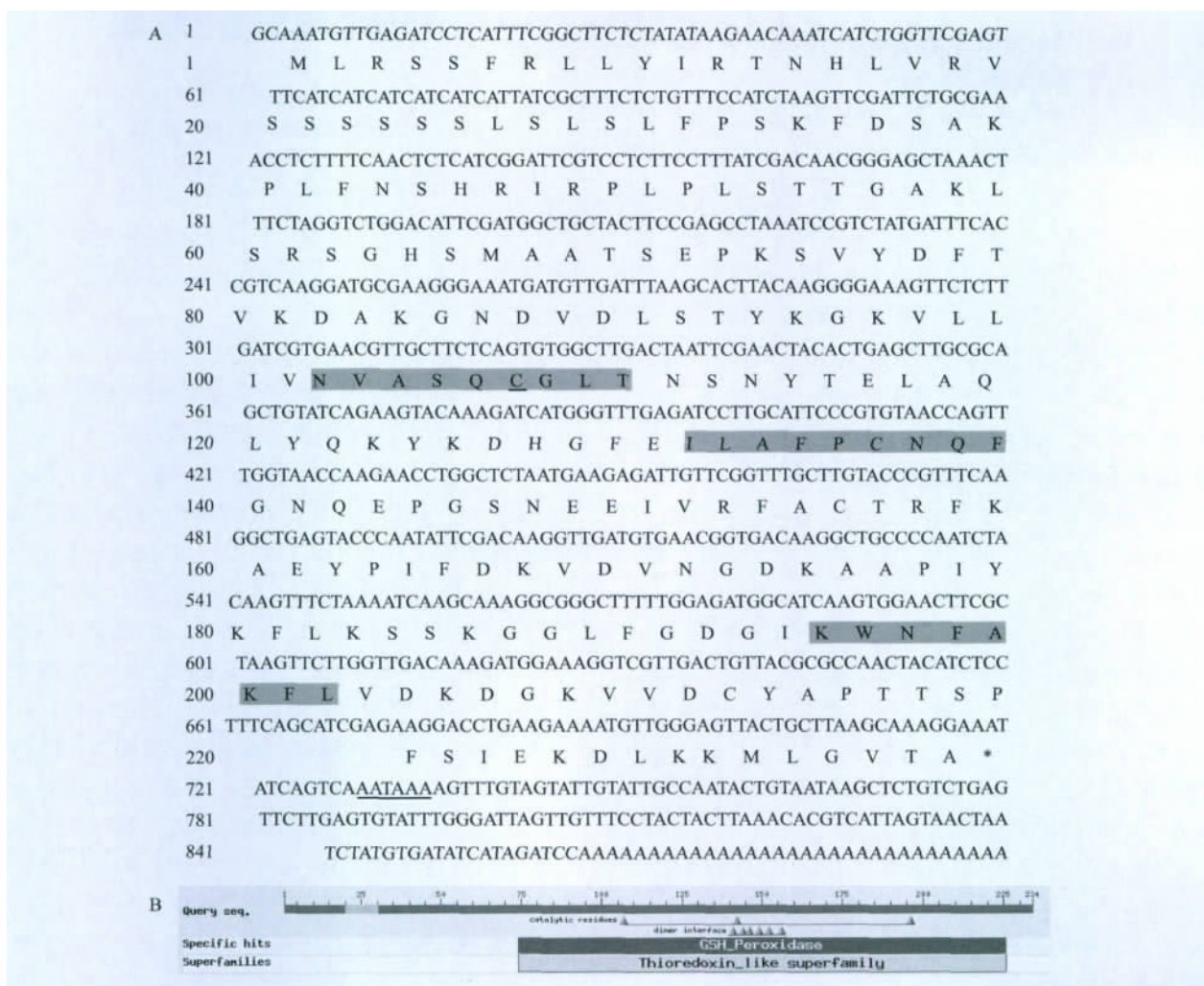
图1 *ThGPX6* 的 PCR 产物电泳图Fig. 1 Electrophoretogram of PCR for *ThGPX6*

M: DNA Marker III; 1 ~ 3 分别表示 *ThGPX6* 的 3'-RACE 扩增基因片段、5'端扩增片段和基因全长序列

M: DNA Marker III 1: 3'-end-*ThGPX6* by 3'-RACE technique 2: 5'-end-*ThGPX6* 3: the full length sequence of the *ThGPX6*

进一步分析发现,第 102 ~ 110 号氨基酸是 GPX 的催化结构域 NVASKGLT,第 131 ~ 139 号氨基酸

是 GPX 的标志性基序 ILAFPCNQF,第 195 ~ 202 号氨基酸是 PHGPX 区别于其他家族成员的结构域

图2 *ThGPX6* 的核苷酸序列及其推测的蛋白质序列特征Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *ThGPX6* and its sequence character

A: *ThGPX6* 的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列,灰色阴影部分依次表示 GPX 的催化活性区、标志性基序及 PHGPX 的特征基序; B: *ThGPX6* 的保守域

A: Nucleotide and deduced amino acid sequence of *ThGPX6*, the gray areas indicate in turn catalysis regions, characteristic motif and PHGPX' special sequence. B: Conserved domains of *ThGPX6*

KWNF(S/T) KFL S/T 被 A 所替代。3 个保守结构域中各含有 1 个催化氨基酸残基,即 C、Q 和 W。*ThGPX6* 所编码的氨基酸序列特征见图 2-A。该基因已经在 NCBI 的 GenBank 注册,注册号为 FJ357244。

利用 NCBI 的蛋白保守区数据库(Conserved Domain Database, CDD)对 *ThGPX6* 进行蛋白质保守结构域预测。结果显示,该蛋白质为谷胱甘肽过氧化物酶,属于硫氧还蛋白类超家族(图 2-B)。该蛋白质具有 3 个 GPX 特有的催化氨基酸残基位点,与图 2-A 中的基因序列分析结果基本一致。*ThGPX6* 与 *AtGPX6* 具有很高的相似性,且特征结构域特点亦相同,而 *AtGPX6* 为 PHGPX,因此初步推测 *ThGPX6* 属于 PHGPX。

2.3 *ThGPX6* 序列的信号肽、跨膜结构域、亲水性分析及亚细胞定位分析

用 SignalP 3.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)分析 *ThGPX6* 编码的氨基酸序列没有信号肽,因此该蛋白质不是分泌蛋白。TM-HMM2.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>)在线软件分析显示该肽链跨膜结构域的可能性为 0,因此盐芥 *ThGPX6* 编码的氨基酸序列不存在跨膜结构,不是跨膜蛋白。ProtScale 2.0 Server(<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>)软件分析显示:最高值为 1,最低值为 -1.85, *ThGPX6* 整条肽链表现为亲水性,是亲水性蛋白。分别用 Predotar v. 1.03(<http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>)和 PSORT(<http://psort.hgc.jp/form.html>)对 *ThGPX6* 的亚细胞定位进行预测,结果显示该蛋白最可能定位在线粒体的基质中,还可能分布在细胞质和过氧化氢体中。因此,根据以上几种生物信息学分析可知, *ThGPX6* 不是分泌蛋白,推测可能在基质中与某些大分子物质相结合发挥作用。

2.4 *ThGPX6* 高级结构预测

基因的功能最终表现在它所编码的蛋白的功能,蛋白质的生物学功能取决于它的高级结构,因此预测蛋白质的高级结构对于理解基因的功能有一定的意义。利用 SOPMA(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_gor4.html)对 *ThGPX6* 的二级结构进行在线分析,结果显示,该蛋白的二级结构由 17.95% 的 α -螺旋、18.8% 的延伸链和 63.25% 的自由卷卷曲组成。不规则卷曲是该蛋白二级结构的主要成分。

用 SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>)对 *ThGPX6* 蛋白的三级结构进行预测,结果表明, *ThGPX6* 蛋白是由 9 个 α -螺旋、11 个 β 折叠片与一些转角和无规则卷曲相互连接而成(图 3)。



图 3 *ThGPX6* 三维结构预测

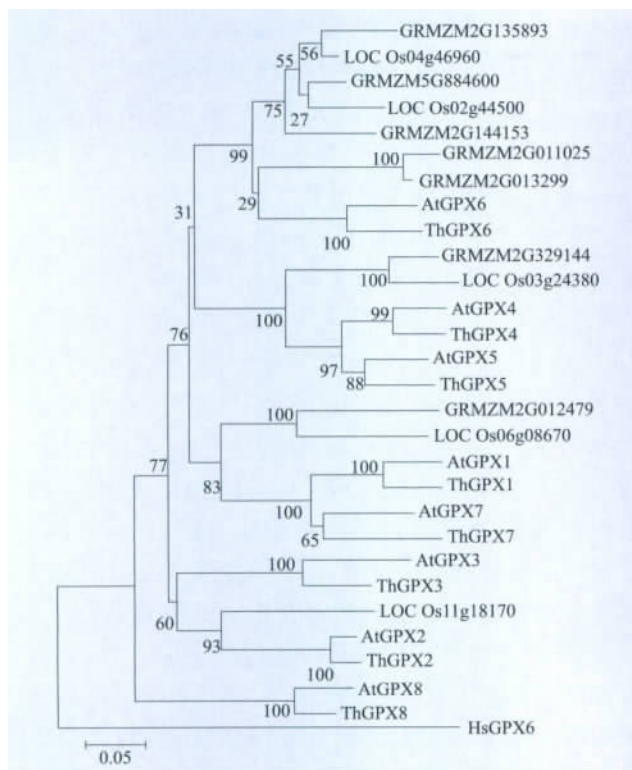
Fig. 3 3-D deduced structure of *ThGPX6*

2.5 *ThGPX6* 的系统进化树分析

为了研究 *ThGPX6* 的进化关系,运用软件 MEGA4.1 对 *ThGPX6*、盐芥 GPX_s 家族其他成员(本实验室已克隆获得)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, At)、水稻(*Oryza sativa*, Os)、玉米(*Zea mays*, Zm)和人(*Homo sapiens*, Hs)的 GPX_s 家族成员的氨基酸序列进行了进化树比较分析,采用的方法是 ClustalW 中的 neighbour-joining, bootstrap 为 1000, Bar 为 0.05。盐芥 GPX_s 家族的其他成员分别表示为 *ThGPX1*、*ThGPX2*、*ThGPX3*、*ThGPX4*、*ThGPX5*、*ThGPX7*、*ThGPX8*; 拟南芥的 GPX_s 家族成员分别以 *AtGPX1*、*AtGPX2*、*AtGPX3*、*AtGPX4*、*AtGPX5*、*AtGPX6*、*AtGPX7*、*AtGPX8* 表示; 玉米的 GPX_s 家族成员分别表示为 GRMZM2G012479、GRMZM2G329144、GRMZM2G144153、GRMZM2G135893、GRMZM2G011025、GRMZM2G013299、GRMZM5G884600; 水稻的 GPX_s 家族成员分别表示为 LOC_Os02g44500、LOC_Os03g24380、LOC_Os04g46960、LOC_Os06g08670、LOC_Os11g18170; 人的 GPX6 表示为 HsGPX6。根据同源性高低,绘出了 GPX 的氨基酸序列系谱图(图 4)。结果显示, *ThGPX6* 与 *AtGPX6* 同源性最高,与部分玉米和水稻的 GPX 也较为相近,但与人的 GPX6 相距较远。

2.6 *ThGPX6* 的组织特异性表达分析

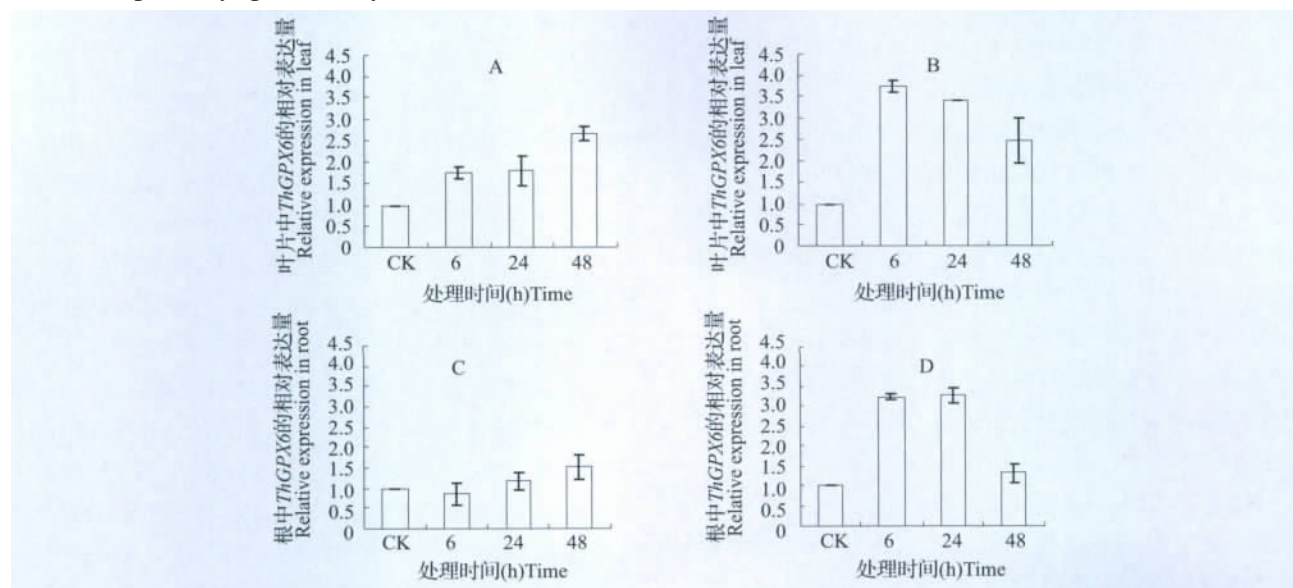
对生长 6 周的盐芥分别用 150mmol/L 和 300mmol/L NaCl 处理不同时间,分别取叶片和根进

图4 *ThGPX6* 系统进化树分析Fig. 4 Phylogenetic analysis of *ThGPX6*

行荧光定量 PCR 分析 *ThGPX6* 的组织特异性表达模式。在 NaCl 处理下, *ThGPX6* 在叶片和根中的表达趋势不尽相同。

从图 5 可以看出, 在 150 mmol/L NaCl 处理条件下, 随着时间的延长, 叶片中 *ThGPX6* 表达量升高, 48h 最高, 为对照水平的 2.66 倍(图 5-A); 在根中, 150 mmol/L NaCl 胁迫处理 6h 时, *ThGPX6* 的表达量略有降低(为对照水平的 0.86 倍), 而处理 24h 和 48h 时, *ThGPX6* 表达量提高, 分别为对照水平的 1.17 和 1.52 倍(图 5-C)。在 300 mmol/L NaCl 处理 6h 时, 叶片中的 *ThGPX6* 表达达到最高水平, 为对照水平的 3.76 倍。随着处理时间延长, *ThGPX6* 表达量降低, 处理 48h 时表达量为对照水平的 2.47 倍, 但仍然高于对照水平(图 5-B); 根中的 *ThGPX6* 在 300mmol/L NaCl 胁迫处理 6h、24h 和 48h 时, 表达都高于对照水平, 分别为对照水平的 3.23、3.28 和 1.33 倍(图 5-D)。

比较 *ThGPX6* 在两种处理浓度下的叶片和根组织中的表达量, *ThGPX6* 在叶片中的表达量高于根。试验结果说明, *ThGPX6* 在高盐处理下诱导表达。

图5 荧光定量 PCR 分析 *ThGPX6* 在不同浓度 NaCl 处理下叶和根中的表达水平Fig. 5 Expression pattern of *ThGPX6* under NaCl treatment by real-time quantitative PCR

CK: 对照, 其相对表达量定义为 1.00; A 和 C: 150 mmol/L NaCl 处理; B 和 D: 300 mmol/L NaCl 处理

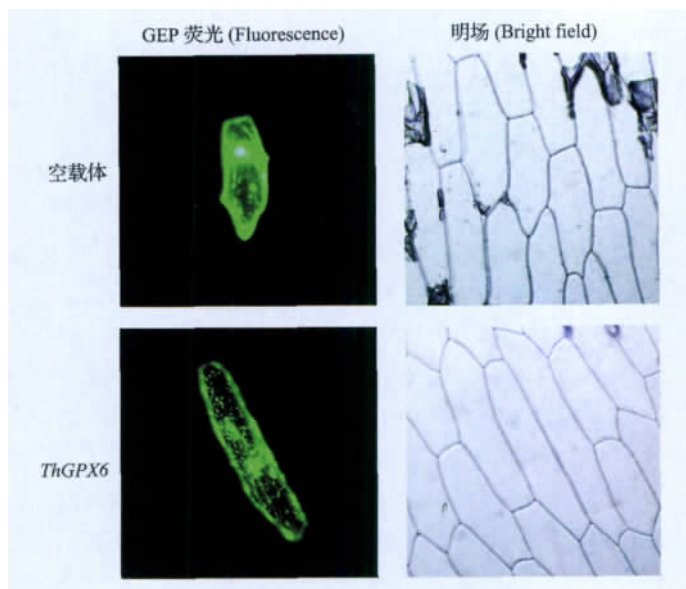
CK: The transcript level at 0h time point(untreated) was used as the calibrator and was given as 1.00. A and

C: Treatment in 150 mmol/L NaCl ; B and D: Treatment in 300 mmol/L NaCl

2.7 *ThGPX6* 的亚细胞定位

利用基因枪法将 pRTL2 空载体及 pRTL2-*ThGPX6* GFP 载体转化洋葱表皮细胞, 定位结果显示 GFP 荧光蛋白在细胞各个部位均有表达; 而 *ThGPX6*:GFP 融合蛋白显示出与 GFP 蛋白不同的定位

模式(图 6), 从定位结果中可以看出, *ThGPX6* 主要分布在细胞器中, 这些细胞器有可能包括线粒体以及内体, 这与 *ThGPX6* 的亚细胞定位预测结果基本一致。另外 *ThGPX6* 也可能少量存在于细胞质中, 也不能排除其可能定位于细胞质膜上。

图 6 *ThGPX6* 的亚细胞定位Fig. 6 Subcellular localization of *ThGPX6*

3 讨论

近年来,对模式植物拟南芥 GPXs 的功能研究取得了一些进展。通过分析拟南芥基因组序列和表达序列标签序列,已发现拟南芥基因组中存在 8 个编码 GPXs 基因序列^[16]。其中 *AtGPX1* 和 *AtGPX6* 编码的 GPXs 属于 PHGPX。根据亚细胞定位, *AtGPX1* 主要在叶绿体、*AtGPX6* 主要在细胞质和线粒体中表达。研究表明, PHGPX 存在于细胞质和线粒体中,在血浆和生物膜上也有分布^[17]。本研究从盐芥中克隆了一个受 NaCl 胁迫诱导的 GPX 基因,命名为 *ThGPX6*,其编码的蛋白与拟南芥 *AtGPX6* 相似性很高,为 86.38%。通过分析其分子特征,属于 PHGPX 编码的蛋白为分布在线粒体和细胞质中、不含跨膜结构域的亲水性的非分泌蛋白。因盐芥是拟南芥的近缘物种,根据 *AtGPX6* 的特点和相关的亚细胞定位研究,进一步说明 *ThGPX6* 属于 PHGPX。

拟南芥 GPXs 基因家族各成员进行组织表达特异性分析发现其不同成员有着各自不同的组织特异性。*AtGPX1* 和 *AtGPX2* 在叶片、茎、花角果中均有表达, *AtGPX1* 在种子、*AtGPX2* 在根中也有表达; *AtGPX3* 和 *AtGPX5* 广泛存在于各组织器官中。而 *AtGPX6* 在叶片、茎、花、角果中都有表达,在根和种子中表达较高^[14]。*AtGPX1*、*AtGPX2* 和 *AtGPX6* 在盐胁迫条件下表达上调, *AtGPX7* 和 *AtGPX8* 只在氧化胁迫条件下才有表达。本研究采用荧光定量 PCR 方法研究 *ThGPX6* 在盐胁迫条件下的表达量表明,不同浓度的 NaCl 胁迫处理, *ThGPX6* 的表达模式不同。

Ramos 等^[18]对莲花 (*Lotus japonicus*) GPXs 家族

成员表达量的研究表明,在 150mmol/L NaCl 胁迫处理下,除 *LjGPX4* 外,其他成员的表达量都没有受到明显的影响,提示莲花 GPXs 家族中的不同成员在应答胁迫时可能具有不同的作用。本研究表明, NaCl 胁迫处理可以诱导提高 *ThGPX6* 表达量,对于盐芥来说,尽管 150mmol/L NaCl 胁迫强度不高,但也可以提高 *ThGPX6* 的表达。在 300mmol/L NaCl 胁迫处理下,无论是叶片和根组织中都能迅速提高 *ThGPX6* 的表达,而随胁迫处理时间延长, *ThGPX6* 的表达降低。编码 PHGPX 的基因是一种能直接还原脂类过氧化物、保护细胞膜不受损伤的基因。PHGPX 能特异性地还原膜上的磷脂氢过氧化物,具有保护磷脂、胆固醇、DNA 和调控细胞凋亡信号的功能。大量体内研究表明,在细胞内过表达 PHGPX 基因能够显著提高细胞抵御氧化胁迫的能力^[17, 19]。因此高盐处理下 *ThGPX6* 表达提高,说明 *ThGPX6* 所编码的蛋白在植物抵御高盐处理引起氧化胁迫方面可能发挥了重要的作用,而且在叶中的表达量高于根组织,这种在不同器官中表达量的差异,预示着其在不同器官中起到的作用不尽相同。

根据蛋白质序列、底物特异性及亚细胞定位,可以将 GPX 家族成员分为五大类^[8]。不同 GPX 基因的亚细胞定位决定了它们特异的生物学功能。*PtGPX1* 定位于叶绿体中,而 *PtGPX3.2* 在线粒体中表达^[20]。本研究中,亚细胞定位结果显示, *ThGPX6* 可能存在于线粒体或内体当中。植物体内的叶绿体和线粒体中存在众多的电子传递链,也是极易产生 ROS 的场所, *ThGPX6* 存在于上述细胞器中,预示着该基因可能参与到细胞器的 ROS 清除过程当中。

植物体内有多种抗氧化酶,其中 GPXs 是一个家族,每个家族成员在不同环境条件下,不同组织内的表达模式和水平可能不同。Herbette 等^[21]研究 GPX 过表达发现, GPX 基因的过表达使转基因烟草对机械损伤胁迫不敏感,导致转基因烟草更易受到生物胁迫。本研究只检测了 *ThGPX6* 的表达模式和水平,表明 *ThGPX6* 在高盐胁迫下表达上调,至于其过表达能否提高植物抵御氧化胁迫的能力以及其他成员的作用都有待进一步研究。

参考文献

- [1] 李文君,刘进元,赵南明,等. 苦瓜谷胱甘肽磷脂氢过氧化物酶 cDNA 的克隆及其特征分析[J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(6): 1-4
- [2] 雷明光,张舒,张冰,等. 谷胱甘肽磷脂氢过氧化物酶研究进展[J]. 生物学通报, 2005, 40(5): 1-3

(下转 270 页)

- dehydration stress 1 promoter[J]. Plant Cell 2004 16: 2481-2498
- [7] Fujita M, Fujita Y, Maruyama K, et al. A dehydration-induced NAC protein RD26 is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway[J]. Plant J 2004 39: 863-876
- [8] Nogueira F T S, Schlögl P S, Camargo S R, et al. SsNAC23, a member of the NAC domain protein family, is associated with cold, herbivory and water stress in sugarcane [J]. Plant Sci, 2005 169(1): 93-106
- [9] Yoo S Y, Kim Y, Kim S Y, et al. Control of flowering time and cold response by a NAC-domain protein in *Arabidopsis* [J]. PLoS ONE 2007 7: 642
- [10] Hu H H, Jun Y, Yu J F, et al. Characterization of transcription factor gene *SNAC2* conferring cold and salt tolerance in rice[J]. Plant Mol Biol 2008 67: 169-181
- [11] Xia N, Zhang G, Sun Y F, et al. *TaVAC8* a novel NAC transcription factor gene in wheat responds to stripe rust pathogen infection and abiotic stresses[J]. Physiol Mol Plant Pathol 2010 74: 394-402
- [12] Chang S, Puryear J, Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees[J]. Plant Mol Biol Rep 1993 11(2): 1-13
- [13] Meng C M, Cai C P, Zhang T Z, et al. Characterization of six novel NAC genes and their responses to abiotic stresses in *Gossypium hirsutum* L.[J]. Plant Sci 2009 176: 352-359
- [14] Duval M, Hsieh T F, Kim S Y, et al. Molecular characterization of *AtNAM*: a member of the *Arabidopsis* NAC domain superfamily [J]. Plant Mol Biol 2002 50: 237-248
- [15] Tao R, Feng Q, Morris T J. HRT gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus[J]. Plant Cell 2000 12: 1917-1926
- [16] Seki M, Kamei A, Yamaguchi-Shinozaki K, et al. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection[J]. Curr Opin Biotechnol 2003 14: 194-199
- [17] Michael F T. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms[J]. Plant Mol Biol 1999 50: 571-599
- [18] Mukhopadhyay A, Vij S, Tyagi A K. Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco [J]. Proc Natl Acad Sci, 2004 101: 6309-6314
- [19] Zhu J K. Salt and drought stress signal transduction in plants[J]. Annu Rev Plant Biol 2002 53: 247-273
- [20] Kim S, Kang J Y, Cho D I, et al. ABF2, an ABRE binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance[J]. Plant J 2004, 40: 75-87
- [21] Kim S. The role of ABF family bZIP class transcription factors in stress response[J]. Physiol Plant 2006 126: 519-527
- [22] Hegedus D, Yu M, Baldwin D, et al. Molecular characterization of *Brassica napus* NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress [J]. Plant Mol Biol 2003, 53: 383-397
- [23] Greve K, Cour T L, Jensen M K, et al. Interactions between plant *RING-H2* and plant-specific NAC (*NAM1/2/CUC2*) proteins: RING-H2 molecular specificity and cellular localization [J]. Biochem J 2003 371: 97-108
- [24] Rhoades M W, Reinhart B J, Lim L P, et al. Prediction of plant microRNA targets[J]. Cell 2002 110: 513-520
- [25] Mallory A C, Dugas D V, Bartel D P, et al. MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs [J]. Curr Biol 2004 14: 1035-1046
- [26] Talmor-Neiman M, Stav R, Frank W, et al. Novel microRNAs and intermediates of micro-RNA biogenesis from moss [J]. Plant J, 2006 47: 25-37
- [27] Ernst H A, Olsen A N, Skriver K, et al. Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors[J]. EMBO Rep 2004 5: 297-303
- ~~~~~
- (上接第 258 页)
- [3] 张景萍, 吴珍岭. 几种植物中谷胱甘肽过氧化物酶活性测定[J]. 广西农业科学 2004 3(35): 177-178
- [4] Criqui M C, Jamet E, Parmentier Y, et al. Isolation and characterization of a plant cDNA showing homology to animal glutathione peroxidases[J]. Plant Mol Biol 1992 18(3): 623-627
- [5] Li W, Feng H, Fan J, et al. Molecular cloning and expression of a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homolog in *Oryza sativa* [J]. Biochim Biophys Acta 2000 1493(1-2): 225-230
- [6] Sugimoto M, Sakamoto W. Putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene from *Arabidopsis thaliana* induced by oxidative stresses [J]. Gene Genet Syst 1997 72(5): 311-316
- [7] Depege N, Drevet J, Boyer N. Molecular cloning and characterization of tomato cDNAs encoding glutathione peroxidase-proteins [J]. Eur J Biochem 1998 253(2): 445-451
- [8] Miao Y, Lv D, Wang P, et al. An *Arabidopsis* glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses [J]. Plant Cell 2006 18(10): 2749-2766
- [9] 戚元成, 张世敏, 王丽萍, 等. 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[J]. 植物生理与分子生物学学报 2004 30(5): 517-522
- [10] 苗雨晨, 白玲, 苗琛, 等. 植物谷胱甘肽过氧化物酶研究进展[J]. 植物学通报 2005 22(3): 350-356
- [11] Amtmann A, Bohnert H J, Bressan R A. Abiotic stress and plant genome evolution search for new models [J]. Plant Physiol, 2005 138(1): 127-130
- [12] Wong C E, Li Y, Whitty B R, et al. Expressed sequence tags from the Yukon ecotype of *Thellungiella* reveal that gene expression in response to cold, drought and salinity shows little overlap [J]. Plant Mol Biol 2005 58(4): 561-574
- [13] Amtmann A. Learning from Evolution: *Thellungiella* generates new knowledge on essential and critical components of abiotic stress tolerance in plants [J]. Mol Plant 2009 2(1): 3-12
- [14] 朱春利, 张登峰, 刘颖慧, 等. 玉米液泡膜焦磷酸酶基因 *Zm-VPPI* 的克隆及逆境下的表达分析[J]. 植物遗传资源学报, 2011 12(1): 107-112
- [15] 吴学闯, 曹新有, 陈明, 等. 大豆 C3HC4 型 RING 锌指蛋白基因 *GmRZFPI* 克隆与表达分析[J]. 植物遗传资源学报 2010, 11(3): 343-348, 359
- [16] 周立敬, 周宜君, 高飞, 等. 拟南芥谷胱甘肽过氧化物酶的生物信息学分析[J]. 中央民族大学学报 2010 19(2): 11-17
- [17] Chen S, Vaghchhipawala Z, Li W, et al. Tomato phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits cell death induced by Bax and oxidative stresses in yeast and plants [J]. Plant Physiol, 2004 135(3): 1630-1641
- [18] Ramos J, Matamoros M A, Naya L, et al. The glutathione peroxidase gene family of *Lotus japonicus*: characterization of genomic clones, expression analyses and immunolocalization in legumes [J]. New Phytol 2009 181(1): 103-114
- [19] Ran Q, Gu M, Remmen H V, et al. Glutathione peroxidase 4 protects cortical neurons from oxidative injury and amyloid toxicity [J]. J Neurosci Res 2006 84(1): 202-208
- [20] Navrot N, Collin V, Gualberto J, et al. Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses [J]. Plant Physiol 2006 142(4): 1364-1379
- [21] Herbet S, de Labrouhe D T, Drevet J R, et al. Transgenic tomatoes showing higher glutathione peroxidase antioxidant activity are more resistant to an abiotic stress but more susceptible to biotic stresses [J]. Plant Sci 2011 180(3): 548-553