

条斑紫菜谷胱甘肽 S-转移酶基因的克隆与表达分析

周向红^{1,2}, 易乐飞^{1,2}, 李信书^{1,2}, 王萍², 阎斌伦^{1*}

(1. 淮海工学院江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005;

2. 淮海工学院海洋学院, 江苏 连云港 222005)

摘要: 谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 是一类多功能蛋白家族, 主要参与解毒和抗氧化防御过程。为了研究 GST 在条斑紫菜叶状体解毒过程中的作用, 克隆并分析了条斑紫菜一个可溶性谷胱甘肽 S-转移酶基因 (命名为 *PyGST*) 的基因组 DNA 序列和 cDNA 序列, 采用实时荧光定量 PCR 研究了其在铅胁迫下的表达规律。*PyGST* 包含一个长 624 bp 的完整开放阅读框, 编码区内含有一个长 248 bp 的内含子。*PyGST* 具有 GST 蛋白家族的保守碱基和保守结构域。*PyGST* 与藻类 GST 的亲缘关系最近, 与动物 Sigma 型 GST 的亲缘关系次之; 在进化树上 *PyGST* 等大多数藻类 GST 与动物 Sigma 型 GST 聚为一簇, 表明 *PyGST* 属类 Sigma 型 GST。铅胁迫能显著诱导 *PyGST* 表达, 说明在叶状体细胞内 *PyGST* 参与了重金属铅的解毒过程。

关键词: 条斑紫菜; 谷胱甘肽 S-转移酶; 克隆; 表达; 铅

中图分类号: S 917; Q 781; Q 786

文献标志码: A

谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST, EC2.5.1.18) 是一组广泛分布于各类生物细胞的多功能蛋白, 作为主要的第二相解毒酶 (phase II detoxification enzyme), 参与了外源性或内源性毒素的解毒过程^[1-2]。GST 能催化各种疏水或亲电的化合物与还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 结合, 这些结合产物会被隔离在植物的液泡或者被转运到质外体 (apoplast), 从而实现解毒目的^[2]。此外, GST 的 GSH 依赖性过氧化物酶活性能清除氢过氧化物 (hydroperoxide), 异构酶活性参与酪氨酸降解, 非催化载体活性参与花色素苷等结合与运输, GST 还能参与胁迫信息转导、细胞凋亡和发育调控过程^[2-4]。除草剂、重金属、冷、热、盐渍等非生物胁迫和病原侵染等生物胁迫都会诱导 GST 表达^[3,5], 表明 GST 在植物解毒、抗逆和抗病过程中起着重要作用。

1970 年首次在植物中发现了 GST^[6], 随着研究深入, 在各类植物中相继报道了大量的 GST 蛋

白家族成员, 例如在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、大豆 (*Glycine max*)、玉米 (*Zea mays*) 和水稻 (*Oryza sativa*) 中分别发现了 48、25、42 和 59 个 GST^[3]。目前植物 GST 可分为两大类型, 即存在于胞质中的可溶性 GST 和结合于膜上的微粒体 GST, 其中可溶性 GST 又可分为 7 类, 分别为 Phi、Tau、Zeta、Theta、Lambda 型 GST 以及脱氢抗坏血酸还原酶 (dehydroascorbate reductase) 和四氯氢醌脱卤素酶 (tetrachlorohydroquinone dehalogenase)^[2]。

条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis* Ueda) 属红藻门大型经济海藻, 味道鲜美、营养丰富, 兼有多种药用和保健功能, 在中国长江口以北、日本和韩国等沿海地区被广泛栽培, 其产量在 2008 年已达 5.5 万吨干重^[7], 紫菜养殖已成为水产养殖中的一个重要产业。但是, 2009 年度的渤海和东海区海洋环境公报显示, 中国北方海洋环境污染形势严峻, 特别是近岸海域污染较重, 各类含铅污染物的不断排放使海州湾等几处近岸海域出现了铅超

收稿日期: 2011-04-04 修回日期: 2011-06-17

资助项目: 江苏省海洋生物技术重点实验室开放课题 (2008HS004); 国家科技支撑计划重大项目 (2006BAD09A01)

通讯作者: 阎斌伦, E-mail: yanbinlun@yahoo.com.cn

<http://www.sxuebao.cn>

标现象。铅不是植物必需的元素,却易被植物吸收和积累;铅污染会抑制各类酶活性、光合作用、呼吸代谢、矿物质吸收、水平衡、膜通透性,加重对植物的氧化胁迫,从而导致植物的生理和生化过程以及超微结构受到损伤,并最终抑制植物生长,甚至导致死亡^[8]。铅还会通过食物链转移到整个生态系统,甚至危及人类健康。因此研究条斑紫菜在铅污染下的解毒机制以及减少条斑紫菜叶状体的铅积累量具有重要的现实意义。生理研究已表明,条斑紫菜叶状体会通过提升其超氧化物歧化酶(superoxide dismutase)和过氧化物酶(peroxidase)活性以及总抗氧化力来缓解铅胁迫引起的氧化损伤^[9]。但在条斑紫菜 GST 解毒研究方面,仅报道了微粒体 GST 克隆^[10],而可溶性 GST 及其在铅胁迫下对叶状体的保护等相关研究未见报道。

本文采用生物信息学和 RT-PCR 相结合的技术,克隆了条斑紫菜 1 个可溶性谷胱甘肽 S-转移酶基因(命名为 *PyGST*)的基因组 DNA 序列和 cDNA 序列,然后采用实时荧光定量 PCR 技术分析了条斑紫菜叶状体在铅胁迫时 *PyGST* 的表达变化。研究 *PyGST* 将有助于探索条斑紫菜叶状体的解毒机制及相关调控过程,为条斑紫菜的抗性育种提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 条斑紫菜叶状体采集与胁迫处理

条斑紫菜叶状体于 2010 年 2—3 月从连云港海区的紫菜养殖场采集。选取健康且无杂藻附着的叶状体在实验室内充气培养,控制海水盐度为 30、温度为 8 ℃、光照为 40 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、光周期为 12 h:12 h(光照:黑暗),每天更换海水和 PES 培养液。暂养 1 周后进行铅胁迫处理,在胁迫处理中保持其它培养条件不变。将叶状体分别转移至含 Pb^{2+} 质量浓度为 0,1,4,7,10 mg/L 的海水中进行不同浓度的短期铅胁迫,处理 2 h 后取样。将健康叶状体转移至含 Pb^{2+} 质量浓度为 10 mg/L 的海水中进行持续铅胁迫,处理 0,2,4,6,8,10,12 h 后取样。

1.2 条斑紫菜基因组 DNA 和总 RNA 的分离纯化

参照 Plant DNA Isolation Reagent (TaKaRa) 说明操作,分离纯化叶状体基因组 DNA。参照 TRIZOL 试剂(Invitrogen)说明操作,分离纯化叶

状体总 RNA,接着按 DNase I (Fermentas)说明书对总 RNA 进行处理,以避免残留的基因组 DNA 影响定量 PCR 的准确性。使用非变性琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白定量仪(Bio-Rad)检测 DNA 和 RNA 的质量。

1.3 条斑紫菜 *PyGST* cDNA 序列的获取

参考易乐飞等^[11]的方法对 *PyGST* 进行了计算机辅助克隆,来自 GenBank 的 28 条条斑紫菜表达序列标签(expressed sequence tag,EST)参与了序列组装,拼接后得到了长 1 104 nt 的 contig。然后据此设计和合成一对克隆用引物,正向引物:5'-CCGCCTTCTCGTCTTCC-3',反向引物:5'-GGTCGGCTCGACTGCTA-3',预期扩增产物长 713 bp。

取 2 μg 总 RNA,以 Oligo(dT)为引物,按 RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas)说明操作,反转录生成第一链 cDNA。PCR 反应在 25 μL 体系中进行,体系中含有 1 $\times$ Dream Buffer(with 2 mmol/L MgCl_2),200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP,0.5 $\mu\text{mol/L}$ 引物,1 U Dream Taq DNA 聚合酶(Fermentas),1 μL 第一链 cDNA。PCR 循环为 95 ℃预变性 3 min;接着 30 个循环,每个循环中 95 ℃变性 30 s,57 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 45 s;最后 72 ℃充分延伸 5 min。扩增产物进行电泳检测和正反双向测序。

1.4 条斑紫菜 *PyGST* 编码区内含子的检验

为了检测 *PyGST* 编码区内部是否存在内含子,以基因组 DNA 为模板进行了扩增,扩增用引物和 PCR 反应体系同条斑紫菜 *PyGST* cDNA 序列的获取中所述,PCR 循环为 95 ℃预变性 3 min;接着 30 个循环,每个循环 95 ℃变性 30 s,57 ℃退火 30 s,68 ℃延伸 5 min;最后 68 ℃充分延伸 10 min。扩增产物进行电泳检测和正反双向测序。

1.5 条斑紫菜 *PyGST* 表达的实时荧光定量 PCR 检测

根据 *PyGST* 的测序结果设计定量 PCR 引物,正向引物:5'-TCTACTACCGCCATCCTGTCC-3',反向引物:5'-CGCTGCCGTTTCGCCTTG-3',预期扩增产物长 142 bp。参考周向红等^[12]的方法,选用 18S rRNA 作内参进行上样误差校正和标准化。根据 GenBank 上条斑紫菜 18S rRNA 序列(DQ666486)设计定量 PCR 引物,正向引物:5'-TGCCAGCACTGCGTTCTTACC-3',反向引物:

5'-AGCCTTCCGACCCAGGACTATC-3', 预期扩增产物长 163 bp。所有引物均由上海生工合成。

按 PrimeScript[®] RT reagent Kit (TaKaRa) 说明操作, 以 Oligo(dT) 和 Random 6 mers 为引物进行反转录反应。实时荧光定量 PCR 反应在 IQ5 PCR 仪 (Bio-Rad) 上进行。25 μ L 的反应体系中包含 12.5 μ L 2 $\times$ SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa)、0.2 μ mol/L 定量 PCR 引物和 2 μ L 反转录产物。采用两步 PCR 法进行扩增, 即首先 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min, 然后进入 45 个循环, 每个循环中 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 62 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 循环结束后, 从 55 $^{\circ}$ C 缓慢升温到 95 $^{\circ}$ C, 制备熔解曲线。以 10 $\times$ 系列稀释的 cDNA 为模板进行定量 PCR, 制作 *PyGST* 和内参的标准曲线。每次反应都设置阴性对照和无模板对照, 每个反应设 3 个复孔。

1.6 数据分析

用 BLAST^[13] 在 GenBank 中进行序列相似性 (similarity) 搜索, 用 ProtParam^[14]、Clustal W^[15]、PhyML^[16] 和 CDD^[17] 对 *PyGST* 的基本理化特性、多序列比对、进化树和功能结构域进行分析。应用 PFAFFL^[18] 建立的数学模型对定量 PCR 数据进行处理, 结果采用平均数 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示。采用 SPSS 进行统计分析, 各组数据都通过了正态性和方差齐性检验, 所以组间差异采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 组间多重比较采用 SNK (Student-Newman-Keuls) 检验, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 条斑紫菜基因组 DNA 和总 RNA 的分离纯化

基因组 DNA 经电泳检测后显示出约 20 kb 以上的条带, 且条带清晰、无拖尾, 其 $A_{260}/A_{280} = 1.79$, $A_{260}/A_{230} = 2.03$ 。所有总 RNA 电泳后显示出明亮且清晰的 28S rRNA 和 18S rRNA 条带以及一些细胞器 rRNA 条带, 条带无弥散, 点样孔无残留, 其 $A_{260}/A_{280} = 1.9 \sim 2.1$, $A_{260}/A_{230} = 2.0 \sim 2.3$ 。表明抽提的基因组 DNA 和总 RNA 片段完整、纯度高, 核酸质量能满足后续实验要求。

2.2 条斑紫菜 *PyGST* 的基因组 DNA 序列和 cDNA 序列

以总 RNA 为模板, 经 RT-PCR 扩增得到了一条大约 700 bp 的特异性扩增条带 (图 1), 与预期扩增产物大小相符。PCR 产物测序后得到了 *PyGST* 的 cDNA 序列 (GQ415054), 与 contig 序

列完全一致 (identity), 且包含一个长 624 nt 的完整编码区。

以基因组 DNA 为模板, 经 PCR 扩增得到了一条大约 1 000 bp 的特异性扩增条带 (图 1), 测序后得到了 *PyGST* 的基因组 DNA 序列 (JF729317)。将基因组 DNA 序列与 cDNA 序列进行比对, 发现在 *PyGST* 的编码区内含有 1 个内含子。内含子位于编码区的第 35 个密码子内, 长 248 bp; 剪接位点符合经典的“GT-AG”法则, 即在内含子的 5' 端为保守碱基 GT, 3' 端为保守碱基 AG。

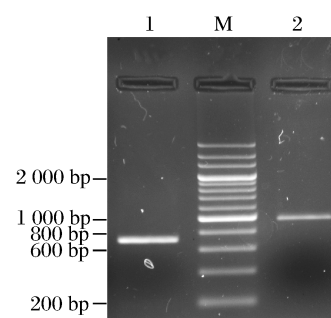


图 1 扩增产物电泳图

1. *PyGST* cDNA 序列的扩增产物; 2. *PyGST* 基因组 DNA 序列的扩增产物; M. 200 bp DNA Marker。

Fig. 1 Electrophoresis of amplicons

1. PCR amplification products of cDNA of *PyGST*; 2. PCR amplification products of genomic DNA of *PyGST*; M. 200 bp DNA Marker.

2.3 条斑紫菜 *PyGST* 蛋白序列、结构和进化树分析

PyGST 含 207 个氨基酸残基, 分子量为 22.6 ku, 其碱性、酸性、疏水性和极性氨基酸数量分别为 30、24、77 和 40 个, 含量最丰富的氨基酸是 Leu 和 Ala, 含量最少的是 Asn 和 His, 理论等电点 (pI) 为 5.0。结构域分析结果表明, *PyGST* 的结构域与 Sigma 型 GST 相似, 其 1~71 位氨基酸构成 N 端结构域, 85~191 位氨基酸构成 C 端结构域。其中, 残基 Y₅, L₁₁, K₄₇, T₄₈, G₄₉, V₆₁ 和 D₆₂ 参与 GSH 的结合, 残基 M₉₆, Q₉₈, E₉₉, S₁₀₂, D₁₀₃, W₁₆₅ 和 H₁₆₈ 参与形成底物结合口袋, 残基 A₄₆, I₆₀, V₆₁, E₆₃, V₆₇, R₇₁, G₈₅, V₈₉, E₉₀, A₉₃, A₉₄ 和 V₉₇ 参与二聚体的形成。

参考 HERVÉ 等^[19] 的方法从 GenBank 选取拟南芥、水稻、人 (*Homo sapiens*)、小鼠 (*Mus musculus*)、果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、斑马鱼 (*Danio rerio*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 等模式生物的各型别可溶性 GST 以及各种藻类

GST 用于多序列比对和进化树的构建。不论动物、植物还是微生物,在进化树上所有 GST 都按不同型别进行聚类,例如所有来自人、小鼠、拟南芥和水稻的 Zeta 型 GST 聚为一簇,它们的 Theta 型 GST 也聚为一簇(图 2)。在进化树上,PyGST 与皱波角叉菜(*Chondrus crispus*, 红藻)等藻类 GST 的亲缘关系最近,与它们的序列一致性绝大部分介于 28.0% ~ 39.6%。PyGST 与人和小鼠的 Sigma, Pi, Mu 和 Alpha 型 GST 的亲缘关系次

之,与它们的序列一致性介于 18.8% ~ 28.5%。PyGST 与大肠杆菌的 Beta 型 GST 的亲缘关系稍远,序列一致性为 23.9%。PyGST 与其它各型 GST 的亲缘关系都较远,与人和小鼠的 Theta, Omega, Zeta 型 GST 的序列一致性介于 16.8% ~ 20.5% 之间,与拟南芥和水稻的各型 GST 的序列一致性介于 13.9% ~ 19.5%,与果蝇的 Delta 和 Epsilon 型 GST 的序列一致性介于 13.2% ~ 18.1%。

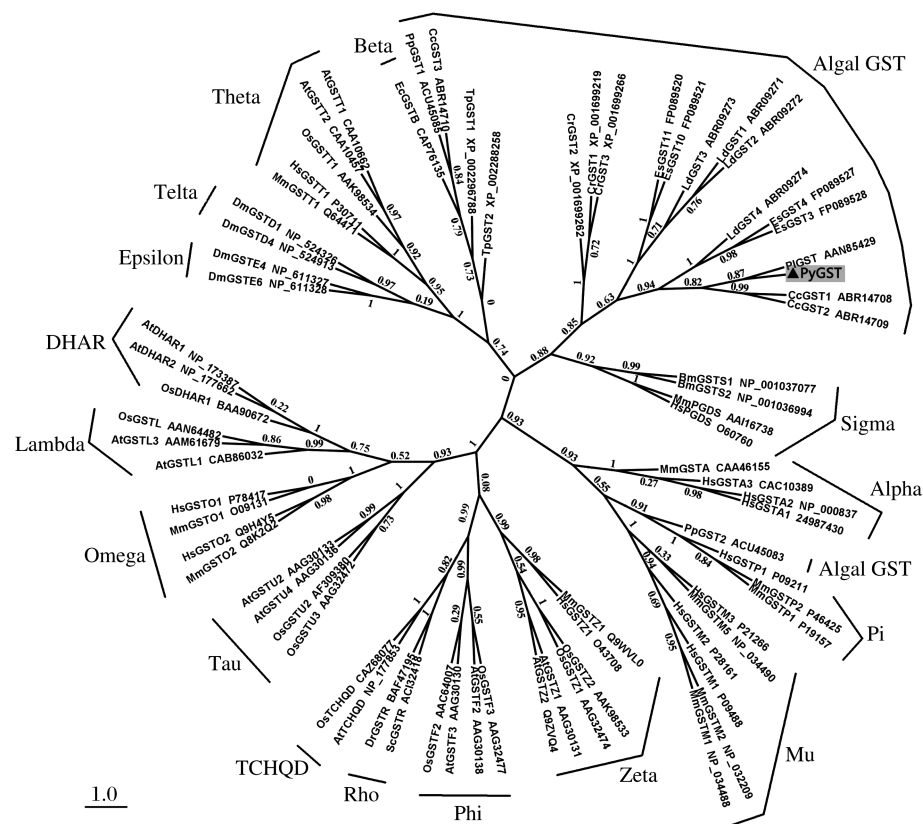


图 2 不同型别 GST 的进化树

利用 PhyML 程序按最大似然法构建 GST 的进化树,节点前小数表示分支支持率,不同型别 GST 都进行了标识。用两字母缩写表示物种来源:Hs、Mm、At、Os、Dm、Bm、Dr、Sc、Pl、Cr、Tp、Cc、Ld、Es、Pp 和 Ec 分别表示人、小鼠、拟南芥、水稻、果蝇、家蚕、斑马鱼、鳕鱼、新月梨甲藻、莱茵衣藻、假微型海链藻、皱波角叉菜、掌状海带、长囊水云、噬鱼费氏藻和大肠杆菌。用一字母缩写表示 GST 的型别:A、M、P、S、T、O、Z、R、B、D、E、U、L 和 F 分别表示 Alpha、Mu、Pi、Sigma、Theta、Omega、Zeta、Rho、Beta、Delta、Epsilon、Tau、Lambda 和 Phi 型 GST,PGDS、TCHQD 和 DHAR 分别表示前列腺素 D 合酶、四氢氢醌脱卤素酶和脱氢抗坏血酸还原酶。GenBank 索引号显示在名称后。

Fig. 2 Phylogenetic tree of GST family members

The maximum-likelihood tree of GSTs was constructed by the PhyML program. Numbers at the nodes indicate statistical support for each branch, according to the approximate likelihood-ratio test (given in decimal values). Clustering of proteins into GST classes is indicated. The names of organisms are prefixed with two letters denoting the source organism; Hs. *Homo sapiens*; Mm. *Mus musculus*; At. *Arabidopsis thaliana*; Os. *Oryza sativa*; Dm. *Drosophila melanogaster*; Bm. *Bombyx mori*; Dr. *Danio rerio*; Sc. *Siniperca chuatsi*; Pl. *Pyrocystis lunula*; Cr. *Chlamydomonas reinhardtii*; Tp. *Thalassiosira pseudonana*; Cc. *Chondrus crispus*; Ld. *Laminaria digitata*; Es. *Ectocarpus siliculosus*; Pp. *Pfiesteria piscicida*; Ec. *Escherichia coli*. The classes of GSTs are suffixed with one letter: A. Alpha; M. Mu; P. Pi; S. Sigma; T. Theta; O. Omega; Z. Zeta; R. Rho; B. Beta; D. Delta; E. Epsilon; U. Tau; L. Lambda; F. Phi. PGDS, TCHQD and DHAR refer to prostaglandin D synthase, tetrachlorohydroquinone dehalogenase and dehydroascorbate reductase, respectively. Accession numbers are shown after name.

2.4 条斑紫菜 *PyGST* 的表达分析

PyGST 和内参的扩增曲线都呈规则的“S”形,基线平整、指数区明显,阴性对照和无模板对照呈水平直线,复孔间扩增曲线基本重叠,熔解曲线均显示单一的特异峰,扩增效率为 $100\% \pm 5\%$ 。说明定量 PCR 反应体系良好,无非特异性扩增,确保了定量结果的准确性。

不同质量浓度铅胁迫能显著诱导条斑紫菜叶状体 *PyGST* 表达(图 3-a)。其中在 1 和 4 mg/L 铅胁迫下, *PyGST* 的表达量较高,分别是对照的 2.11 和 2.54 倍;但在 7 和 10 mg/L 铅胁迫下, *PyGST* 的表达量相对较低,分别是对照的 1.26 和 1.34 倍。持续铅胁迫也显著诱导条斑紫菜叶状体 *PyGST* 表达,且 *PyGST* 表达量在整个持续胁迫过程中呈现波动状态(图 3-b)。在胁迫的前 6 h

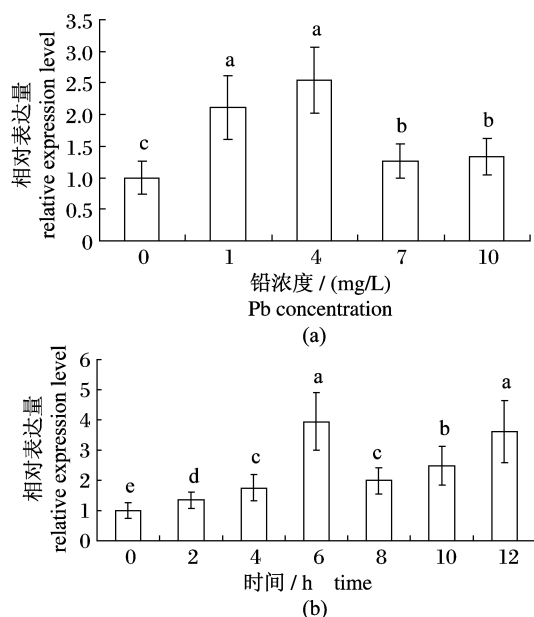


图 3 条斑紫菜 *PyGST* 在胁迫下的相对表达量

采用实时定量 PCR 技术分析了 *PyGST* 在不同质量浓度铅胁迫(a)和持续铅胁迫(b)下的相对表达量。*PyGST* 的相对表达量按 PFAFFL^[18]的方法计算。图中数据表示为平均值 $\pm$ 标准差($n=3$),柱形图上的不同字母表示差异的显著性($P < 0.05$)。

Fig. 3 The relative mRNA expression levels of *PyGST* gene in *P. yezoensis* under Pb stress

The relative expression levels of *PyGST* in response to stress of different concentration of Pb(a) and continuous Pb stress(b) were analyzed using real-time PCR. The relative expression levels of the *PyGST* were determined by the PFAFFL method^[18]. Error bars indicate the mean and standard deviation($n=3$). Different letters above each bar indicate statistical difference($P < 0.05$).

内 *PyGST* 的表达逐步上升,与对照相比其表达量从 2 h 的 1.34 倍上升到 6 h 的 3.94 倍;*PyGST* 的表达量在 8 h 时回落到 1.99 倍,然后再逐步上升,至 12 h 时达第二个峰值,是对照的 3.60 倍。

3 讨论

HERVÉ 等^[19]首先指出皱波角叉菜和掌状海带(*Laminaria digitata*,褐藻)含有类似 Sigma 型的 GST,随后 DE FRANCO 等^[20]认定长囊水云(*Ectocarpus siliculosus*,褐藻)的可溶性 GST 属于 Sigma 型 GST。为了弄清 *PyGST* 的分类,以 *PyGST* 为探针对 GenBank 进行 BLAST 搜索,结果显示 *PyGST* 与藻类 GST 和动物的 Sigma 型 GST 具有较高相似性,但与植物的相似性较低。那么 *PyGST* 的具体型别又如何呢?考虑到 GST 是一个庞大的蛋白家族,型别众多,分布广泛,家族成员间的序列一致性较低,本文采用最大似然算法(maximum-likelihood)和 LG 模型^[21]构建进化树,采用 aLRT (approximate likelihood-ratio test)方法^[22]检测进化树分支。构建的进化树与 DE FRANCO 等^[20]和 HERVÉ 等^[19]的结果基本一致。在进化树上,除了红藻、甲藻和硅藻的少数可溶性 GST 与 Beta 和 Pi 型 GST 聚类在一起外,红藻、褐藻、绿藻和甲藻的大多数可溶性 GST 与 Sigma 型 GST 聚为一大类。因此,可以推断 *PyGST* 属于类 Sigma 型 GST。可是 GST 的进化树与藻类的进化地位不符。虽然 Theta 型被认为是真核生物中最原始的一类 GST^[23],但是藻类 GST 却与之相距较远;虽然陆生植物没有 Sigma 型 GST,但与陆生植物亲缘关系较近的绿藻却含有类 Sigma 型 GST;虽然大多数藻类 GST 与 Sigma 型相似,但也有少数接近原核生物的 Beta 型 GST。这反映藻类 GST 可能存在多种起源,大多数藻类 GST 可能与 Sigma 型 GST 存在趋同进化。

铅等重金属是生物非必需的或需要量极少的元素,过量重金属进入细胞会对生物造成严重损伤,甚至死亡,因此解除重金属毒性对生物生存十分重要。在长期进化过程中,生物逐渐建立了多种重金属解毒机制,能调用金属硫蛋白(metallothionein)、植物络合素(phytochelatin)、GSH、多磷酸体(polyphosphate body)、脯氨酸、热激蛋白(heat shock protein)等分子以及 GST、过

氧化氢酶(catalase)、过氧化物酶、超氧化物歧化酶等酶类来应对重金属胁迫^[24-25]。其中,GST主要通过以下2种方式参与重金属的解毒:GST能催化GSH直接与重金属离子共价结合,从而降低重金属离子毒性并促进重金属向液泡或质外体转运^[26];GST的过氧化物酶活性能利用GSH向氢过氧化物发动亲核攻击,使其还原为低毒的一元醇(monohydroxy alcohol),从而缓解重金属胁迫产生的氧化胁迫^[27]。

定量PCR结果显示,PyGST受铅胁迫的诱导表达,表明PyGST在条斑紫菜叶状体细胞内参与了铅胁迫的解毒过程。在持续铅胁迫下,PyGST的表达量呈现波动状态,这种表达量的高低波动,可能是PyGST的负反馈调控机制的作用结果。虽然具体的负反馈调控机制并不清楚,但在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中已经发现GSH与重金属镉的结合产物在胞质中的积累会抑制GST的活性^[26];在小鼠中也发现GSH与环境致癌物苯并芘代谢产物反式二羟环氧苯并芘[(+)-anti-BPDE]的结合产物在胞质中的积累会抑制Pi型GST活性^[28]。虽然PyGST受铅胁迫诱导表达,但是PyGST的诱导水平并不高。短期高浓度铅胁迫诱导的PyGST表达量小于短期低浓度铅胁迫诱导的表达量,持续高浓度铅胁迫诱导的表达量大于短期高浓度铅胁迫诱导的表达量。这些表达模式表明条斑紫菜叶状体具备多种重金属解毒机制,它们之间存在协同作用,即受到不同强度的铅胁迫,叶状体会组合不同的解毒机制来应对胁迫。在海洋植物茎生波喜荡草(*Posidonia oceanica*)中也发现了类似的结果,低浓度汞胁迫时GST活性上升,但在高浓度汞胁迫时GST活性下降,而植物络合素被诱导合成^[29]。

由于没有排泄系统,植物的解毒系统会将重金属存储在液泡和质外体中,从而导致重金属在植物中的富集。因此培育高重金属抗性且低重金属富集的食用植物显得十分必要。早期研究显示,表达大肠杆菌GST或拟南芥的植物络合素合酶(phytochelatin synthase)等解毒基因的转基因植物的确获得了较高的重金属抗性,但同时也增加了重金属的富集^[30-31]。直到最近,表达绿木霉(*Trichoderma virens*)GST的转基因烟草(*Nicotiana tabacum*)既获得了较强的重金属抗性,又没有增强重金属的富集^[32]。这种特质的具

体机理虽不清楚,却让我们看到了希望。从目前的数据来看,尚不能推断超表达PyGST能否降低重金属富集,这一问题有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] HAYES J D, FLANAGAN J U, JOWSEY I R. Glutathione transferases [J]. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2005, 45: 51-88.
- [2] BASANTANI M, SRIVASTAVA A. Plant glutathione transferases—a decade falls short [J]. Canadian Journal of Botany, 2007, 85 (5): 443-456.
- [3] 胡廷章,周大祥,罗凯. 植物谷胱甘肽转移酶的结构与功能及其基因表达[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(1): 195-200.
- [4] JIANG H W, LIU M J, CHEN I C, et al. A glutathione S-transferase regulated by light and hormones participates in the modulation of Arabidopsis seedling development [J]. Plant Physiology, 2010, 154(4): 1646-1658.
- [5] DUDLER R, HERTIG C, REBMANN G, et al. A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione-S-transferases [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1991, 4 (1): 14-18.
- [6] FREAR D S, SWANSON H R. Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino-2-s-triazino) glutathione: Partial purification and properties of a glutathione S-transferase from corn [J]. Phytochemistry, 1970, 9(10): 2123-2132.
- [7] BLOUIN N A, BRODIE J A, GROSSMAN A C, et al. Porphyra: a marine crop shaped by stress [J]. Trends in Plant Science, 2011, 16(1): 29-37.
- [8] SHARMA P, DUBEY R S. Lead toxicity in plants [J]. Brazilian Journal of Plant Physiology, 2005, 17 (1): 35-52.
- [9] 邵世光,阎斌伦,李廷友,等. Cl^{6+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 胁迫下条斑紫菜保护酶系统的响应[J]. 水生生态学杂志, 2009, 2(4): 94-97.
- [10] 吕妮妮. 条斑紫菜丝状体对重金属胁迫的响应及抗性基因GST的克隆与表达[D]. 沈阳: 辽宁师范大学, 2009.
- [11] 易乐飞,刘楚吾,王萍,等. 条斑紫菜泛素结合酶基因的cDNA序列克隆与分析[J]. 水产学报, 2009, 33(5): 719-726.
- [12] 周向红,李信书,王萍,等. 条斑紫菜HSP90基因的克隆与表达分析[J]. 水产学报, 2010, 34(12):

- 1844 – 1852.
- [13] ALTSCHUL S F, MADDEN T L, SCHAFER A A, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(17): 3389 – 3402.
- [14] WILKINS M R, GASTEIGER E, BAIRCH A, *et al.* Protein identification and analysis tools in the ExPASy server[J]. *Methods in Molecular Biology*, 1999, 112: 531 – 552.
- [15] THOMPSON J D, HIGGINS D G, GIBSON T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(22): 4673 – 4680.
- [16] GUINDON S, GASCUEL O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood [J]. *Systematic Biology*, 2003, 52(5): 696 – 704.
- [17] MARCHLER-BAUER A, LU S, ANDERSON J B, *et al.* CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins [J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(D): 225 – 229.
- [18] PFAFFL M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(9): 2002 – 2007.
- [19] HERVÉ C, DE FRANCO P O, GROISILLIER A, *et al.* New members of the glutathione transferase family discovered in red and brown algae [J]. *Biochemical Journal*, 2008, 412(3): 535 – 544.
- [20] DE FRANCO P O, ROUSVOAL S, TONON T, *et al.* Whole genome survey of the glutathione transferase family in the brown algal model *Ectocarpus siliculosus* [J]. *Marine Genomics*, 2009, 1(3 – 4): 135 – 148.
- [21] LE S Q, GASCUEL O. An improved general amino acid replacement matrix [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2008, 25(7): 1307 – 1320.
- [22] ANISIMOVA M, GASCUEL O. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative [J]. *Systematic Biology*, 2006, 55(4): 539 – 552.
- [23] FROVA C. Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives [J]. *Biomolecular Engineering*, 2006, 23(4): 149 – 169.
- [24] 周文彬, 邱保胜. 藻类对重金属的耐性与解毒机理 [J]. *湖泊科学*, 2004, 16(3): 265 – 272.
- [25] 李磊, 黄小平. 重金属在海草中累积及其对海草生长的影响 [J]. *生态学杂志*, 2009, 28(9): 1897 – 1904.
- [26] ADAMIS P D B, MANNARINO S C, ELEUTHERIO E C A. Glutathione and gamma-glutamyl transferases are involved in the formation of cadmium-glutathione complex [J]. *FEBS Letters*, 2009, 583(9): 1489 – 1492.
- [27] EDWARDS R, DIXON DP, WALBOT V. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health [J]. *Trends in Plant Science*, 2000, 5(5): 193 – 198.
- [28] SRIVASTAVA S K, HU X, XIA H, *et al.* ATP-dependent transport of glutathione conjugate of 7beta, 8alpha-dihydroxy-9alpha, 10alpha-oxy-7, 8, 9, 10-tetrahydrobenzo [a] pyrene in murine hepatic canalicular plasma membrane vesicles [J]. *Biochemical Journal*, 1998, 332(3): 799 – 805.
- [29] FERRAT L, ROMEO M, GNASSIA-BARELLI M, *et al.* Effects of mercury on antioxidant mechanisms in the marine phanerogam *Posidonia oceanica* [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2002, 50(2): 157 – 160.
- [30] LIANG ZHU Y, PILON-SMITS E A, JOUANIN L, *et al.* Overexpression of glutathione synthetase in indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance [J]. *Plant Physiology*, 1999, 119(1): 73 – 80.
- [31] GASIC K, KORBAN S. Transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*) plants expressing an *Arabidopsis* phytochelatin synthase (*AtPCS1*) exhibit enhanced As and Cd tolerance [J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 64(4): 361 – 369.
- [32] DIXIT P, MUKHERJEE P K, RAMACHANDRAN V, *et al.* Glutathione transferase from *Trichoderma virens* enhances cadmium tolerance without enhancing its accumulation in transgenic *Nicotiana tabacum* [J]. *PloS One*, 2011, 6(1): e16360.

Molecular cloning and expression pattern of glutathione S-transferase gene in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta)

ZHOU Xiang-hong^{1,2}, YI Le-fei^{1,2}, LI Xin-shu^{1,2}, WANG Ping², YAN Bin-lun^{1*}

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China;

2. School of Marine Science & Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

Abstract: Glutathione S-transferases (GSTs) are a superfamily of multifunctional proteins present in all organisms. GSTs catalyze the conjugation of reduced glutathione with xenobiotics, to form more soluble, nontoxic compounds, ready to be excreted or compartmentalized. So GSTs are primarily involved in detoxification and antioxidant defense. So far, compared to higher plants and mammals, there is limited information on genes related to detoxification or antioxidant defense from *Porphyra yezoensis* Ueda. In order to investigate the contribution of GST to detoxification in thalli of *P. yezoensis*, molecular cloning and expression analysis of a glutathione S-transferase gene (designated as *PyGST*) from *P. yezoensis* were performed. The genomic DNA and cDNA sequences of *PyGST* were obtained with computer assisted cloning, and characterized using multiple bioinformatic programs. The relative mRNA expression levels of *PyGST* under lead stress were investigated in thalli of *P. yezoensis* using real-time quantitative PCR. The *PyGST* cDNA contained a 624 nt of continuous complete coding region, encoding a polypeptide of 207 amino acids with a calculated molecular mass of 22.6 ku. The alignment of the genomic DNA with the cDNA showed that *PyGST* contained a 248 bp of intron, whose ends were defined by the 5'-GT and 3'-AG rule. *PyGST* contained conserved N- and C-domains of GST family. The amino acids defining the binding sites of glutathione and xenobiotic substrates were also conserved. Sequence comparison of *PyGST* revealed 28.0% – 39.6% and 23.0% – 28.5% identity with most algal GSTs and animal Sigma class GSTs, respectively. *PyGST* was closely clustered with most algal GSTs in the phylogenetic tree. Phylogenetic tree also showed that most algal GSTs including *PyGST* were distinct from previously described GST classes, but were most closely related to the Sigma class. These features indicated that the *PyGST* belongs to Sigma-like GST. Lead stress significantly induced the expression of *PyGST*. The expression levels of *PyGST* induced by low concentrations of lead were higher than those by high concentrations of lead. Upon lead exposure (10 mg/L) for 12 h, the higher expression levels of *PyGST* were observed at 6 h and 12 h. These findings indicated that *PyGST* plays a role in detoxification of lead in thalli of *P. yezoensis*.

Key words: *Porphyra yezoensis* Ueda; glutathione S-transferase (GST); cloning; expression; Pb

Corresponding author: YAN Bin-lun. E-mail: yanbinlun@yahoo.com.cn