

核桃 *JrGSTTau1* 基因的克隆及转入酵母的抗逆功能分析

栗莉圆,李大培,常 远,卢烨彤,康桐铭,杨桂燕*

(西北农林科技大学 林学院 核桃研究中心,陕西 杨陵 712100)

摘 要:为筛选核桃(*Juglans regia*)抗逆相关的功能候选基因,研究克隆获得一条核桃 Tau 亚家族 GST 基因(*JrGSTTau1*),并将该基因插入酵母表达载体 pYES2 中构建重组酵母 pYES2-*JrGSTTau1*,将重组载体转入酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)INVSC1,同时以转化空载体 pYES2 的重组酵母作为阴性对照。在酵母表达系统中研究该基因的抗逆功能。结果表明,*JrGST-Tau1* 的开放读码框(ORF)全长 690 bp,拟推导的蛋白分子量为 26.856 kDa,含有氨基酸数为 229,理论等电点为 6.02。对 2 种酵母进行 NaCl、CdCl₂、-20℃ 和 53℃ 胁迫处理,比较发现 *JrGST-Tau1* 转基因酵母表现出较对照更高的生命力和成活率。表明 *JrGSTTau1* 基因能有效提高酵母的耐盐抗镉及抵抗异常温度的能力,*JrGSTTau1* 可作为核桃逆境应答的候选基因。

关键词:核桃;谷胱甘肽转移酶;酵母表达系统;逆境响应

中图分类号:S718.46 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2016)03-0098-05

Cloning and Stress Tolerance Analysis of a *JrGSTTau1* Gene from *Juglans regia*
in *Saccharomyces cerevisiae*

SU Li-yuan, LI Da-pei, CHANG Yuan, LU Ye-tong, KANG Tong-ming, YANG Gui-yan*

(Laboratory of Walnut Research Center, College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: To screen the stress tolerance related genes in *Juglans regia*, in current study, a Tau sub-family GST gene was cloned (Named as *JrGSTTau1*) and *JrGSTTau1* was inserted into the yeast expression vector pYES2 for constructing recombinant plasmid pYES2-*JrGSTTau1*, which was transformed into the *Saccharomyces cerevisiae* strain INVSC1. The yeast transformed with empty pYES2 was used as a negative control. The yeast expression system was used for studying of the abiotic stress tolerance. The results indicated that the full length open reading frame (ORF) of *JrGSTTau1* was 690 bp, the deduced protein was 26.856 kD with 229 amino acids, and the theoretical pI was 6.02. When both recombinant yeast were treated with NaCl, CdCl₂, -20℃ and 53℃, the *JrGSTTau1* expressed yeast displayed higher vitality and survival rate than control yeast under four stress conditions. It was concluded that *JrGSTTau1* gene could effectively improve the salt, cadmium, cold and heat tolerance of transgenic yeast, *JrGSTTau1* may be an important candidate gene for *J. regia* exposed to adverse stimulus.

Key words: *Juglans regia*; glutathione S-transferase; yeast expression system; stress response

谷胱甘肽转移酶 (glutathione S-transferases, GSTs) 具有植物解毒、清除细胞内活性氧等功能^[1]。目前已经从很多植物中克隆获得 GST 基因,如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[2]、水稻 (*Oryza sativa*)^[3]、杨树 (*Populus spp.*)^[4]、玉米 (*Zea mays*)^[5] 和高粱 (*Sorghum vulgare*)^[6] 等,并对其功能进行

收稿日期:2015-10-03 修回日期:2016-04-18

基金项目:陕西省农业科技创新与攻关项目(2015NY122);西北农林科技大学博士科研启动基金(2014BSJJ038);西北农林科技大学本科生创新训练项目(1201510712045);西北农林科技大学基本科研业务费专项资金项目(2452015171)。

作者简介:栗莉圆,女,侗族,本科,专业:林学。E-mail:826701143@qq.com

*通信作者:杨桂燕,女,苗族,讲师,博士,研究方向:林木遗传育种。E-mail:yangguiyan@nwsuaf.edu.cn

了相应研究,发现来自不同植物的 GST 基因或相同植株的不同 GST 基因,功能具有差异性。其中有些 GST 基因响应盐^[7]、损伤^[8]、除草剂^[9]等逆境胁迫刺激。柞柳 *ThGSTZ1* 基因响应盐、干旱胁迫,过表达时能显著提高转基因株系的抗旱耐盐能力^[10];水稻 *OsGSTl2* 转基因拟南芥表现出较高的重金属耐受力^[11];玉米 *GSTi* 基因能响应胡桃醌诱导的氧化应激胁迫^[5]。表明 GST 基因在植物响应逆境应答及调节中具有多方面的作用,具有重要的研究价值。

目前对 GST 基因的研究主要集中于草本植物,而对木本植物 GST 基因的研究较少,特别是经济果木。从木本果树中克隆和分析 GST 基因并通过基因工程技术分析其抗逆功能将为研究木本植物的抗性机理提供理论依据。

核桃(*Juglans regia*)是中国著名的经济林树种之一,在中国栽培有 2 000 a 以上历史,我国核桃在世界核桃产业中具有重要的地位;但由于核桃产量与气候条件等环境因子具有很大关系,使得核桃效益具有一定的不稳定性。我国核桃种植分布广泛,但分析在‘Web of Science’上以‘*Juglans regia*’为关键词检索出的文章,发现大多数关于核桃的研究主要集中在良种选育、品质鉴定、营养成分等方面,从分子水平对核桃响应外界刺激方面的研究较少。本研究从我国广泛种植的核桃优良栽培品种‘香玲’中克隆获得一条 GST 基因(命名为 *JrGST-Tau1*),并利用酵母表达系统对该基因在酵母中的抗逆功能进行分析。

1 材料与方法

1.1 *JrGSTTau1* 基因的克隆与序列分析

以“glutathione S-transferases”为关键词在‘香玲’叶片转录组中查找相关基因,共获得 12 条 GST 基因。经 Blast 比对,根据注释结果发现 1 条为 Tau 亚家族的 GST 基因,命名为 *JrGSTTau1*。用 ORF finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)确定 *JrGSTTau1* 基因开放读码框(ORF),再根据 ORF 两端序列设计引物 *JrGSTTau1*-YZ-F(5'-ATGGAAGAAGTGAAGGTTC-3')和 *JrGSTTau1*-YZ-R(5'-TTACTTTGAGGTAGGGTTC-3'),进行 PCR 扩增。扩增产物胶回收纯化后,与 pMD-18-T 载体 16℃下连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞,并在氨苄青霉素存在下筛选培养。挑取阳性克隆扩大培养进行菌液 PCR 确认,对能够产生目的片段的克隆进行测序。利用 ExPasy ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)对确认的 *JrGSTTau1* 基因序列特征进行分析。

1.2 酵母表达载体构建

根据 *JrGSTTau1* 基因序列特征及载体 pYES2 酶切位点特性设计酵母表达载体引物,上游引物为 5'-ATCGGGATCCATGGAAGAAGTGAAGGTTC-3' (*Bam*HI),下游引物为 5'-CGATTCTAGATTACTTTGAGGTAGGGTTC-3' (*Xba*I)。通过 PCR 反应获得含有酶切位点的 *JrGSTTau1* 序列,经酶切纯化后与 pYES2 连接获得重组载体 pYES2-*JrGSTTau1*。将 pYES2-*JrGSTTau1* 和空 pYES2 载体分别转入酵母 INVSC1 中^[12],分别记为 INVSC1(pYES2-*JrGSTTau1*)和 INVSC1(pYES2),后者为对照。

1.3 酵母逆境胁迫处理

分别挑取 INVSC1(pYES2)和 INVSC1(pYES2-*JrGSTTau1*)单克隆酵母细胞置于含 2% 葡萄糖的 Sc-Ura 液体培养基中,30℃ 震荡培养 12 h,收集酵母菌体重悬于含 2% 半乳糖的 Sc-Ura 液体培养基中,且使得起始 $OD_{600}=0.5$,继续 30℃ 震荡培养至 $OD_{600}=1.6$,分别收集菌体进行胁迫处理。

1.3.1 酵母逆境胁迫后生长恢复活力试验^[12] 对收集的 INVSC1(pYES2)和 INVSC1(pYES2-*JrGSTTau1*)菌体分别用 $3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、 $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl₂、53℃ 胁迫处理 2 h;−20℃ 处理 12 h。然后对菌液作 10× 稀释,再分别取 2 μL 接种在含 2% 葡萄糖的 Sc-Ura 固体培养基上,30℃ 培养 48 h,观察酵母生长情况。

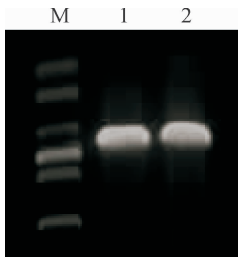
1.3.2 酵母逆境胁迫后成活率测定^[12] 对于 NaCl 和 CdCl₂ 胁迫,调整培养基含 1、2、3、4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl,0.2%、0.4%、0.6%、0.8% 与 1.0% CdCl₂,30℃ 振荡培养 24 h 后测定细胞密度(OD_{600})。对于高温胁迫,取 5 mL 收集的菌体分别进行 36℃、40℃、44℃、48℃ 或 52℃ 水浴处理 1 h 后,30℃ 恢复生长 20 h,测定 OD_{600} 。对于低温胁迫,对 5 mL 收集的菌体−20℃ 胁迫 3、6、9、12 h 或 24 h 后,30℃ 恢复生长 8 h 测定 OD_{600} 。以非处理 30℃ 培养 8、9、10、11 h 和 12 h 的 OD_{600} 值作为对照。各试验重复 3 次。数据使用 SPSS 软件包(SPSS,Chicago,Illinois,USA)分析。

2 结果与分析

2.1 *JrGSTTau1* 基因全长 cDNA 序列分析及酵母载体构建

通过分析核桃转录组得到 12 条 GST 基因,其中 1 条为 *JrGSTTau1*。根据 PCR 验证,确认其 ORF 长 690 bp,拟推导编码的蛋白含 229 个氨基酸,分子量为 26.856 kDa,理论等电点为 6.02。

Blast 分析发现该基因具有 GST 家族蛋白保守域,表明该蛋白为 GST 蛋白(图 1)。经测序确认载体 pYES2-JrGSTTau1 的准确性,用于酵母试验。



注:M;DL Marker 2000,1:*JrGSTTau1* 条带,2:含酶切位点的 *JrGSTTau1* 条带。

图 1 核桃 *JrGSTTau1* 基因克隆及酵母表达载体构建插入酶切位点的 PCR

Fig. 1 PCR analysis of *JrGSTTau1* gene cloning and constructing yeast expression recombinant vector

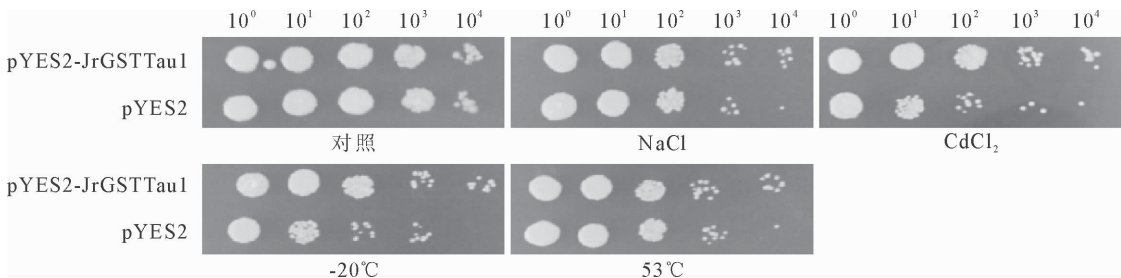
2.2 对照条件下 INVSC1 (pYES2-JrGSTTau1) 和 INVSC1(pYES2)的生长情况

INVSC1(pYES2-JrGSTTau1)和 INVSC1(pYES2)在非胁迫条件下表现出相似的生长力,无明显差异(图2),二者的 OD_{600} 值也几乎相同(图3),表

明 *JrGSTTau1* 基因在酵母中的表达不影响酵母的正常生长。

2.3 NaCl 和 CdCl₂ 胁迫下 INVSC1 (pYES2-JrGSTTau1)和 INVSC1(pYES2)生长比较

NaCl 胁迫下,相同密度的 INVSC1 (pYES2-JrGSTTau1)和 INVSC1 (pYES2)以原浓度和 $10\times$ 稀释后接种于含有 2% 半乳糖的 Sc-Ura 固体培养基上,30℃ 培养 2 d,发现在稀释 1 000 倍时,INVSC1 (pYES2-JrGSTTau1)的酵母菌落数量多于 INVSC1 (pYES2);稀释 10 000 倍时,二者差距更为明显,INVSC1 (pYES2) 几乎无生长,而 INVSC1 (pYES2-JrGSTTau1)依然保持较好的生长数量(图2)。同样,对 2 种酵母进行不同浓度的 NaCl 胁迫下的 OD_{600} 也表现出相似的结果,即 INVSC1 (pYES2-JrGSTTau1)的 OD_{600} 要明显高于 INVSC1 (pYES2),NaCl 浓度大于 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,二者差异显著,在 $4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时差异最大,INVSC1 (pYES2-JrGSTTau1)的 OD_{600} 值为 INVSC1 (pYES2)的 2.5 倍(图3)。表明外源 *JrGSTTau1* 基因的表达明显提高了转基因酵母的耐盐能力。



注: 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 与 10^4 分别表示经处理后的酵母稀释 1、10、100、1 000 倍与 10 000 倍。

图 2 2 种酵母在不同胁迫下的生长情况比较

Fig. 2 The growth activity comparison of INVSC1(pYES2-JrGSTTau1) and INVSC1(pYES2) under different conditions

CdCl₂ 胁迫下 2 种酵母表现与 NaCl 胁迫相似,但点点培养时 INVSC1 (pYES2-JrGSTTau1) 表现出更为突出的酵母数量,在稀释 10 倍时即较 INVSC1 (pYES2) 生长出更多的酵母,稀释 100、1 000 倍及 10 000 倍时,INVSC1 (pYES2) 的酵母数量明显越来越少于 INVSC1 (pYES2-JrGSTTau1) (图2)。对不同浓度下 2 种酵母的生长密度进行测定也发现 INVSC1 (pYES2-JrGSTTau1) 的 OD_{600} 要高于 INVSC1 (pYES2),且随着胁迫浓度增大,差异越大,到 0.8% 时差异最大,INVSC1 (pYES2) 的 OD_{600} 仅为 INVSC1 (pYES2-JrGSTTau1) 的 44.2%,1.0% 浓度下 2 种酵母的生长密度差异与 0.6% 下相似(图3)。表明转基因酵母的抗镉胁迫能力强于非转基因酵母,*JrGSTTau1* 基因有利于细胞应对外源镉刺激。

2.4 异常温度下 INVSC1 (pYES2-JrGSTTau1) 和 INVSC1 (pYES2) 生长比较

对 INVSC1 (pYES2-JrGSTTau1) 和 INVSC1 (pYES2) 分别进行 -20°C 和 53°C 胁迫处理,比较二者的生存活性,探讨其对温度刺激的反应。结果发现, -20°C 胁迫下,经处理后的酵母稀释 10 000 倍时,INVSC1 (pYES2) 无生长,而 INVSC1 (pYES2-JrGSTTau1) 依然有较多酵母生长(图2)。不同时间的 -20°C 胁迫后 INVSC1 (pYES2-JrGSTTau1) 的恢复活性高于 INVSC1 (pYES2) (图3)。 53°C 胁迫下稀释 10 000 倍,INVSC1 (pYES2) 虽有酵母生长,但相对 INVSC1 (pYES2-JrGSTTau1) 数量极少(图2)。高温胁迫下转基因酵母和对照的生长活性差异较大, 48°C 胁迫下 INVSC1 (pYES2-JrGSTTau1) 的 OD_{600} 为 INVSC1 (pYES2) 的 1.5 倍(图3),表明 *JrGSTTau1* 具有调控酵母抵抗异常温度胁迫的能力。

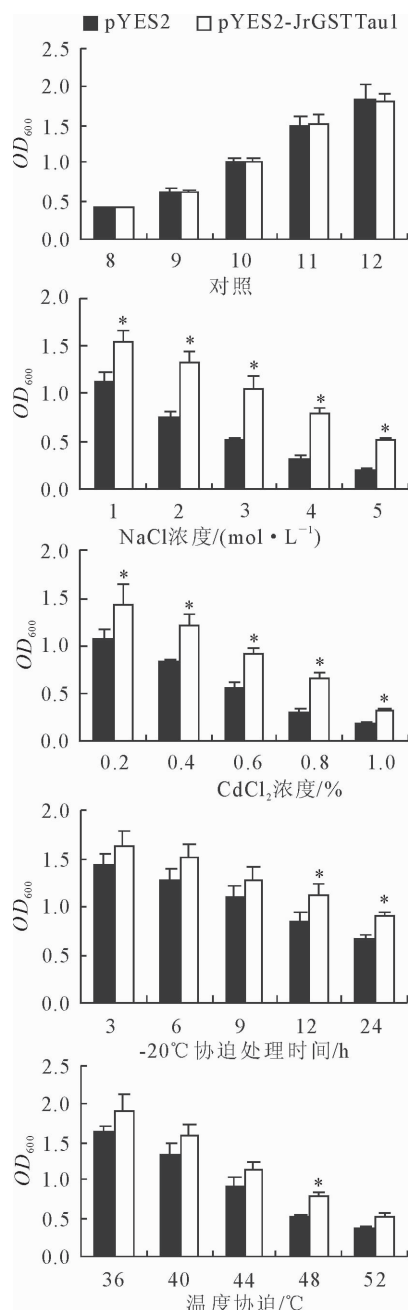


图 3 酵母在不同胁迫下的生长活性

Fig. 3 The growth activity of INVSC1(pYES2-JrGSTTau1) and INVSC1(pYES2) under different treatments

3 结论与讨论

活性氧代谢是植物受外界刺激的主要代谢方式之一,应激条件下,维持活性氧代谢平衡是植物耐受胁迫的主要原因之一。为了保护植株本身的活性氧代谢水平,植物在进化过程中形成了自己的保护或抵制机制,包括一些抗氧化功能基因和保护酶类^[13-15]。GST 家族基因是重要的活性氧清除剂,拟南芥 *AtGST1*、6、11 和 *F2* 能对 NaCl 及其他非生物胁迫作出响应,具有抵抗和清除 ROS 的能力^[16]。水稻 *Osgstu4* 和 *Osgstu3* 能迅速被抗氧化剂和过氧

化氢诱导,表明 *Osgstu4* 和 *Osgstu3* 的应答反应涉及氧化还原反应^[7]。转柃柳 Zeta 家族 GST 基因 (*ThGSTZ1*) 的拟南芥株系在受 NaCl 和甘露醇胁迫时,不仅提高了 GST 酶活性,也提高了 SOD 和 POD 的活性,同时植株体内的活性氧积累明显低于野生型,表明 *ThGSTZ1* 基因通过提高植株体内保护酶活性来减少活性氧的积累进而提高植株的抗逆能力^[10]。

酵母表达系统是现代分子生物学研究不可缺少的重要手段。目前,有不少基因的功能通过酵母表达系统进行了快速验证,为后续开展深入研究提供了很好的基础。如拟南芥 *AtHKT1* 基因^[17]、线粒体热激蛋白 *MtHSP70* 基因^[18]、柃柳 *ThHSP18.3* 基因^[12] 等。通常超出生命体最适宜生长温度范围时受到的刺激为异常温度,酵母的最适生长温度为 30℃,当温度达到极高和极低时,酵母的存活力会明显降低。因此,为了筛选核桃抗逆相关候选基因,快速了解核桃 *JrGSTTau1* 在逆境应答中的功能,本研究采用酵母表达系统对 *JrGSTTau1* 基因在 NaCl、CdCl₂、-20℃ 和 53℃ 胁迫下的抗逆能力进行研究,结果发现,*JrGSTTau1* 基因提高了酵母的耐盐抗镉、抵抗极端高温和低温的能力,与来自木本耐盐碱植物柃柳的 *ThMT3*^[19]、*ThVHAc1*^[20] 基因在酵母表达系统中的抗逆调节表现相似,表明 *JrGSTTau1* 基因具有 NaCl、CdCl₂、-20℃ 和 53℃ 等胁迫的抵抗调节功能。为进一步研究 *JrGSTTau1* 的抗逆机理及其在植物表达系统中的抗逆功能奠定了基础。

参考文献:

- [1] DIXON D P, LAPTHORN A, EDWARDS R. Plant glutathione transferases[J]. *Genome Biology*, 2002, 3(3): 1-10.
- [2] CHEN J H, JIANG H W, HSIEH E J, *et al.* 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[J]. *Plant Physiology*, 2012, 158 (1): 340-351.
- [3] 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[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11 (1): 73.
- [4] LAN T, YANG Z, YANG X, *et al.* Extensive functional diversification of the *populus* glutathione S-transferase supergene family[J]. *The Plant Cell*, 2009, 21(12): 3749-3766.
- [5] SYTYKIEWICZ H. Expression patterns of glutathione transferase gene (GSTI) in maize seedlings under juglone-induced oxidative stress[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12(11): 7982-7995.

[6] CHI Y, CHENG Y, VANITHA J, *et al.* Expansion mechanisms and functional divergence of the glutathione S-transferase family in sorghum and other higher plants[J]. DNA Research, 2011, 18(1): 1-16.

[7] MOONS A. *Osgtu3* and *Osgtu4*, encoding tau class glutathione-S-transferases, are heavy metal- and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots[J]. FEBS Letters, 2003, 553(3): 427-432.

[8] VOLLENWEIDER S, WEBER H, STOLZ S, *et al.* Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased *Arabidopsis* leaves[J]. The Plant Journal, 2000, 24(4): 467-476.

[9] EDWARDS R, DIXON D P, 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.

[10] YANG G, WANG Y, XIA D, *et al.* Overexpression of a GST gene (*ThGSTZ1*) from *Tamarix hispida* improves drought and salinity tolerance by enhancing the ability to scavenge reactive oxygen species[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2014, 117(1): 99-112.

[11] KUMAR S, ASIF M H, CHAKRABARTY D, *et al.* Expression of a rice Lambda class of glutathione S-transferase, *OsGSTL2*, in *Arabidopsis* provides tolerance to heavy metal and other abiotic stresses[J]. Journal of Hazardous Materials, 2013, 248/249: 228-237.

[12] GAO C, JIANG B, WANG Y, *et al.* Overexpression of a heat shock protein (ThHSP18.3) from *Tamarix hispida* confers stress tolerance to yeast[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(4): 4889-4897.

[13] KIM Y H, LIM S, HAN S H, *et al.* Differential expression of 10 sweetpotato peroxidases in response to sulfur dioxide, ozone, and ultraviolet radiation[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2007, 45(12): 908-914.

[14] 刘忠霞, 刘建朝, 胡景江. 干旱胁迫对苹果树苗活性氧代谢及渗透调节的影响[J]. 西北林学院学报, 2013, 28(2): 15-19.

[15] LIU Z X, LIU J C, HU J J. Effects of drought stress on active oxygen metabolism and contents of osmotic adjustment substances in the leaves of apple seedling [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2013, 28(2): 15-19. (in Chinese)

[16] 李桂荣, 朱自果, 马俊伟, 等. 低温胁迫对几种无核葡萄品种抗寒生理指标的影响[J]. 西北林学院学报, 2015, 30(5): 75-78.

[17] LI G R, ZHU Z G, MA J W, *et al.* Effect of low temperature stress on physiological indices of seedless grape specie[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2015, 30(5): 75-78. (in Chinese)

[18] JIANG Y, YANG B, HARRIS N S, *et al.* Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(13): 3591-3607.

[19] MÄSER P, HOSOO Y, GOSHIMA S, *et al.* Glycine residues in potassium channel-like selectivity filters determine potassium selectivity in four-loop-per-subunit HKT transporters from plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 99(9): 6428-6433.

[20] MORO F, OKAMOTO K, DONZEAU M, *et al.* Mitochondrial protein import: molecular basis of the ATP-dependent interaction of MtHsp70 with TIM44[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(9): 6874-6880.

[21] YANG J, WANG Y, LIU G, *et al.* *Tamarix hispida* metallothionein-like *ThMT3*, a reactive oxygen species scavenger, increases tolerance against Cd²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, and NaCl in transgenic yeast[J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(3): 1567-1574.

[22] GAO C, WANG Y, JIANG B, *et al.* A novel vacuolar membrane H⁺-ATPase subunit gene (*ThVHAcl*) from *Tamarix hispida* confers tolerance to several abiotic stresses in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(2): 957-963.