

一个受褐飞虱取食诱导的水稻 GST 类似蛋白基因的克隆 Cloning of a Rice Gene Encoding a Putative BPH-inducible GST-like Protein

袁红雨^{1,2}, 祝莉莉¹, 唐 明¹, 何光存^{1*}

YUAN Hong-Yu^{1,2}, ZHU Li-Li¹, TANG Ming and HE Guang-Cun^{1*}

1. 武汉大学生命科学学院, 武汉大学植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072

2. 信阳师范学院生物系, 信阳 464000

1. Key Laboratory of the Ministry of Education for Plant Developmental Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China

2. Department of biology, Xinyang Normal University, Xinyang 464000, China

摘 要 *BpHi006A* cDNA 长度为 1943bp, 具有一个 795bp 组成的完整的读码框, 其表达受褐飞虱取食的诱导。*BpHi006A* 蛋白含有谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase) 的 N-末端结构域和 C-末端结构域, 为谷胱甘肽 S-转移酶超家族的成员。*BpHi006A* 蛋白与拟南芥四氯氢醌还原性脱卤素酶相关蛋白有 61% 的一致性, 序列分析表明这两种蛋白质构成一类新的植物 GST。

关键词 *BpHi006A*; 褐飞虱; 水稻

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2005)04-0646-03

Abstract *BpHi006A* cDNA is 1 943 bp in length, and contains one putative open reading frame that is 795 bp long. The expression of *BpHi006A* was induced by BPH feeding. *BpHi006A* protein contains a N-terminal domain and a C-terminal domain of glutathione S-transferase, and therefore, it belongs to the superfamily of glutathione S-transferase. *BpHi006A* protein exhibited 61% amino acid sequence identity to tetrachloro-p-hydroquinone reductive dehalogenase-related protein of *Arabidopsis thaliana*. Sequence analysis of these two proteins indicates that they belong to a new group of plant GSTs.

Key words *BpHi006A*, brown planthopper, rice

在许多亚洲国家, 褐飞虱是一种十分重要的水稻害虫。褐飞虱具备刺吸式口器, 是典型的吸食维管束韧皮部汁液的昆虫。褐飞虱除了直接吸食水稻汁液外, 还使光合作用产物向根部的运输受阻, 产卵刺伤植株组织, 传播或诱发水稻病害的发生^[1]。对褐飞虱取食敏感的水稻品系, 褐飞虱的大量取食会导致植株枯萎、死亡。

昆虫的取食作用会激活植株一系列防卫基因的表达, 产

生诱导型抗性抵御植食性昆虫的进一步为害。关于植物防卫基因调节的知识主要来自对咀嚼式口器昆虫和伤信号传递途径的研究^[2]。咀嚼式口器昆虫的取食和机械伤害对植物造成的损伤在性质上比较类似, 两者均会引发细胞膜上的磷脂释放出亚麻酸, 后者通过类十八烷途径转化为茉莉酸 (jasmonic acid, JA)。JA 是一种关键的植物防卫信号分子, 内源 JA 的积累介导多种早期防卫信号的产生和晚期功能性防

Received: December 28, 2004; Accepted: March 17, 2005.

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 30170085).

* Corresponding author. Tel: 86-27-87682384; E-mail: gche@email.whu.edu.cn

国家自然科学基金资助项目 (No.30170085)

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

卫基因的表达^[3]。在受到伤害后,植物体不但产生局部的防卫反应,还会产生系统反应^[4]。系统素被认为是一种可以长距离运输的传递伤信号的激素,在番茄中它可以介导植物的系统性防卫反应^[5]。系统素将伤信号传递给 JA,导致防卫基因的系统性表达。然而,昆虫的取食作用和机械伤害并非完全等同,昆虫取食时产生的专一性引发子能改变植物的伤反应^[2]。

刺吸式口器昆虫对植物组织的伤害较小,植物对刺吸式口器昆虫和病原菌产生相似的防卫反应,说明刺吸式口器昆虫的口针鞘和病原菌的菌丝体对宿主植物有着相似的作用^[6]。为了解植物对刺吸式口器昆虫的防卫反应,我们利用抑制消减杂交分离水稻幼苗的褐飞虱应答基因,获得了一条新的水稻 EST,通过筛选水稻 cDNA 文库得到了其全长 cDNA。通过分析推断的氨基酸顺序,认为该基因编码新的水稻 GST 类似蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料

在直径为 10cm 的塑料杯内均匀播种 20 粒水稻(*Oryza sativa* L.) 明恢 63 的种子。当水稻幼苗长到两叶一心时,每一幼苗上接 10 头 2~3 龄褐飞虱若虫,并把杯子及幼苗用网罩罩上。接虫后 32h 剪取水稻幼苗,并立即浸泡在液氮中,用于 RNA 的提取。

1.2 cDNA 文库的构建与筛选

总 RNA 及 mRNA 的分离提取按照 TRIzol RNA 提取试剂及 MESSAGE MAKER Reagent Assembly 试剂盒(Gibco BRL)说明书进行。利用 ZAP Express cDNA Synthesis Kit 和 ZAP-cDNA Gigapack Gold III (Stratagene)进行 cDNA 文库的构建。cDNA 文库的筛选以及 pBluescript SK 噬菌粒从 Uni-ZAP XR 载体中的删除均按试剂盒说明书进行。采用 Prime-a-Gene 随机引物标记系统,以 α -³²P]dCTP 标记 *BpHi006* 作为探针进行 cDNA 文库筛选。

1.3 Northern 杂交分析

取 20 μ g 总 RNA 进行变性琼脂糖电泳,用 α -³²P]dCTP 标记的 *BpHi006* 作为探针进行 Northern 杂交。

1.4 cDNA 测序及 DNA 序列分析

采用自动法测序。用 BLAST 软件搜索数据库中的同源序列进行比较。

2 结果

BpHi006 为我们利用 SSH 技术分离出的受褐飞虱取食诱导的基因(GenBank 登录号 BQ529299)。以 *BpHi006* cDNA 片段为探针,筛选水稻幼苗 cDNA 文库,分离出一长度为 1 943 bp 的阳性 cDNA 克隆,命名为 *BpHi006A*(GenBank 登录号是 AY256683)。该 cDNA 含有一由 795 bp 组成的完整的阅读框。5'非翻译区 915bp,有一个与 ORF 同框的终止密码子(TGA),由此推断,*BpHi006A* 编码一种由 265 个氨基酸残基组成的蛋白质,分子量为 31.154kD,等电点为 9.80。探针序列位于

cDNA 的第 1 736 位至 1 907 位之间。

水稻 scaffold002263(GenBank 登录号:AAAA01002263)含有 *BpHi006A* 的同源序列,把 *BpHi006A* cDNA 序列与它的基因组序列相比后发现在基因的编码区有一 104 bp 的内含子。*BpHi006A* 蛋白的氨基酸序列与根据基因组序列推导出的序列完全一样。

Northern 杂交结果表明该基因的表达受褐飞虱取食的诱导(图 1)。

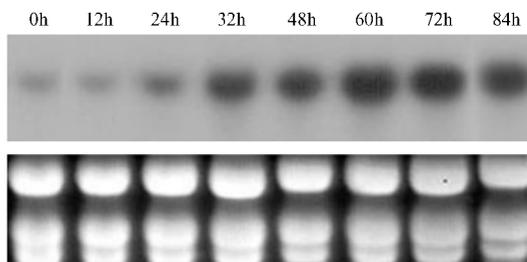


图 1 褐飞虱取食时间对水稻 *BpHi006A* 表达的影响

Fig. 1 Time course of *BpHi006A* transcript accumulation in rice seedlings exposed to BPH for the indicated time intervals

利用 BLASTP 程序对 *BpHi006A* 蛋白质序列进行对库检索,发现该蛋白与 *Sphingobium chlorophenolicum* 的四氯氢醌还原性脱卤素酶(GenBank 登录号是 Q03520)的序列一致性为 27%。这种酶在五氯苯酚的生物降解过程中催化四氯氢醌和三氯氢醌的还原脱卤素作用,反应的氢供体是还原型谷胱甘肽^[7]。在拟南芥中存在一个四氯氢醌还原性脱卤素酶相关蛋白(tetrachloro-p-hydroquinone reductive dehalogenase-related protein)基因(GenBank 登录号是 NP-177853)。*BpHi006A* 蛋白与该蛋白的序列一致性为 61%。与 *BpHi006A* 基因一样,编码拟南芥四氯氢醌还原性脱卤素酶相关蛋白的基因在其编码区内也存在一个由 96 个碱基构成的短的内含子。图 2 表示 *BpHi006A* 蛋白与 *Sphingobium chlorophenolicum* 的四氯氢醌还原性脱卤素酶和拟南芥中的四氯氢醌还原性脱卤素酶相关蛋白的序列比对情况。

简单模块构架搜索工具(Simple Modular Architecture Research Tool, SMART)^[8]是目前较为理想的蛋白质结构功能域分析工具。我们利用 SMART 对 *BpHi006A* 蛋白质序列、拟南芥四氯氢醌还原性脱卤素酶相关蛋白以及 *Sphingobium chlorophenolicum* 的四氯氢醌还原性脱卤素酶的结构功能域进行了分析,结果显示它们都含有谷胱甘肽 S-转移酶(GSTs; EC 2.5.1.18)的 N-末端结构域和 C-末端结构域,因此,它们同为谷胱甘肽 S-转移酶超家族的成员。

植物细胞的 GSTs 分为四类:Phi、Tau、Theta 和 zeta GSTs。Tau 和 Zeta GSTs 同时存在于动植物细胞中,而 Phi 和 Tau GSTs 是植物细胞特有的。已分别从水稻和拟南芥中分离出了 59 个 GSTs 和 47 个 GSTs,其中大多数属于 Phi 和 Tau GSTs^[9]。GST 超家族成员间的序列差异较大,不同类型的 GSTs 之间的序列相似性低于 25%。比较而言,GST 的 N 末端结构域的保守性高于 C 末端结构域,这可能与 N 末端结构域

1 --- MQLYHHYPYSLDSQKVRMALEEKGIIDYTSYHVNP-LTGKNNVAFFRMNPSAKLPVFG 56
 2 --- MQLYHHYPYSDSRVRLALEEKGIIDYTSYHVNP-ITGKHMPSFFRMNPNIAKLPVFR 56
 3 MPEVSLNYTMSICSMKTRLAEMEEFQVDDKQVDFGALENFEPDYVRLNEKAVVPTLV 60
 :*: :*: :*: :*: :* * :* :* :* :* :* :* :* :* :* :*

1 NGAHVIVYRAFDIQYLDRLSVHLSG-EIVPNTVEYQWQKVDSWNPKMFTLHTPIKYR 115
 2 NGSHIILDTIEIEYLERIAEVSSGIEDATFNREVEVMRKRREWESKLFTHLAHPDNRR 116
 3 VGDVRTVNSYIVLEAAKLGKVGIP-ADPVENKAALDNFQKQGVNFQVIYGHGKGVPR 119
 * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : *

1 TFSVKFIRVRLARMAEAPDASMYHAKLREAYETEDKLDKDPIMKQSEELSKLLDDVE 175
 2 LVYSKFLRMVVIRMAESPDLASAYHRKLRAYETEDKLDKDPGARLRKSDHLLRLLDEVE 176
 3 DELLIARRERAKEYAELRKYIP-ADPVENKAALDNFQKQGVNFQVIYGHGKGVPR 179
 * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : *

1 AQLNNGKYLAGEDEFSPADSVFIPIILARIITLLDLDEEYINCRPRLLEYTLVKQRPYKVA 235
 2 TKLEGITTYLAGNEFSMADVMLIPLVARLSLLDLDEEYISSRKNLAEWALVRRRPSYKVV 236
 3 AHLADKPIAGSNYSIADIMWTVLLARIEMLNMT-AWIISERPNNLLAYQRMKARRSFETA 238
 :*: :*: :*: :* * :* * :*: :*: :* :* * :* :* :* :* :* :* :* :*

1 IGKFFGGWKYRTLFKTSFFLQVTRLFRKY 265
 2 IGRYFNGWRKYATLWKTWFMVFRVRLRKY 266
 3 R---VMPNWKGGI----- 248
 :* : : : : : : : : : : : : : : : :

图2 BpHi006A 蛋白与 *Sphingobium chlorophenolicum* 和拟南芥中的四氯氢醌还原性脱卤素酶相关蛋白的多重对齐

Fig. 2 Alignment of deduced amino acid sequence of BpHi006A, tetrachloro-p-hydroquinone reductive dehalogenase-related proteins from *A. thaliana* and *Sphingobium chlorophenolicum*

"*" means that the residues in that column are identical in all sequences in the alignment. ":" means that conserved substitutions have been observed. "." means that semi-conserved substitutions are observed.

包含 GSH 结合位点和激活位点有关。不同 GST 的 C 末端序列的差异则可能与它们结合不同的底物相适应。尽管各成员间的序列变化很大, GST 有三个位点上的氨基酸残基却非常保守。一个是 GST 的激活位点 Ser 15(以 OsGSTU1 为参照)^[9], 该 Ser 残基通过降低 GSH 巯基的 pKa 而使该基团转化为具有催化活性的硫醇阴离子。与绝大多数 GST 一样, BpHi006A、拟南芥的四氯氢醌还原性脱卤素酶相关蛋白均为 Ser。另一个保守的氨基酸残基是 N 末端的 Arg。

OsGSTU1 第 20 位的氨基酸残基(Arg)和第 69 位的氨基酸残基(Ser)也十分保守, 仅有少数例外, 比如 OsGSTMU37 和 OsGSTU38 第 20 位氨基酸残基分别是 Lys 和 Met, OsGSTF9 第 69 位的氨基酸为 Lys。拟南芥的四氯氢醌还原性脱卤素酶相关蛋白第 20 位的氨基酸残基是 Arg, BpHi006A 第 20 位的氨基酸残基则是 Lys, 这显然是碱基代换的结果。而 BpHi006A 和拟南芥的四氯氢醌还原性脱卤素酶相关蛋白第 69 位的氨基酸残基分别为 Ala 和 Thr, 它们也是碱基代换的产物。

3 讨论

GST 基因构成一个大的基因家族, 这与 GST 的功能多样性、底物多样性和催化性质多样性相一致的。GST 的基本功能是催化还原型谷胱苷肽的巯基与底物的亲电基团结合生成谷胱苷肽衍生物, 在植物细胞中谷胱苷肽衍生物借助专一性载体被运送到液泡中, 从而解除反应性亲电化合物对细胞的毒害^[10]。GST 还具有 GSH 过氧化氢酶活性和 maleylacetoacetate 异构酶的活性^[11]。GST 的 GSH 过氧化氢酶活性可以保护细胞免受胁迫诱发的氧化损伤, 而 GST 的 GSH 依赖型 maleylacetoacetate 异构酶活性催化色氨酸降解途径中

maleylacetoacetate 变成 fumarylacetoacetate。至于 BpHi006A 和拟南芥的四氯氢醌还原性脱卤素酶相关蛋白的功能有待进一步研究。

植物的每一类 GST 基因都有固定的外显子/内含子数目, Tau 类 GST 基因含有一个内含子, Phi 类 GST 含有两个内含子, Theta 和 Zeta 类 GST 基因分别含有 7 个和 8 个内含子^[9]。BpHi006A 和拟南芥四氯氢醌还原性脱卤素酶相关蛋白基因在其编码区内含有一个内含子, 按照上述规律这两个基因应该归于 Tau 类 GST。然而, 它们与 Tau 类 GST 的序列一致性很低, BpHi006A 与水稻 Tau 类 GST 的序列一致性为 6% ~ 16%, 拟南芥四氯氢醌还原性脱卤素酶相关蛋白与拟南芥 Tau 类 GST 的序列一致性为 2% ~ 18%。拟南芥和水稻的 Tau 类 GST 基因各成员间的序列一致性分别大于 24% 和 16%, 因此, 我们认为水稻的 BpHi006A 和拟南芥四氯氢醌还原性脱卤素酶相关蛋白构成了一类新的植物 GST。

REFERENCES(参考文献)

[1] Watanabe T, Kitagawa H. Photosynthesis and translocation of assimilates in rice plants following phloem feeding by the planthopper *Nilaparvata lugens*(Homoptera : Delphacidae). *J Econ Entomol* , 2000 , **93** : 1192 - 1198
 [2] Kessler A, Baldwin IT. Plant responses to insect herbivory : the emerging molecular analysis. *Annu Rev Plant Biol* , 2002 , **53** :299 - 328
 [3] Ryan CA. The systemin signaling pathway : differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta* , 2000 , **1477** :112 - 121
 [4] Orozco-Cardenas ML, Narvaez-Vasquez J, Ryan DA. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* , 2001 , **13** :179 - 191
 [5] Ryan CA, Pearce G. Systemin : a polypeptide signal for plant defensive genes. *Annu Rev Cell Dev Biol* , 1998 , **14** :1 - 17
 [6] Zhu-Salzman K, Salzman RA, Ahn JE *et al.* Transcriptional regulation of Sorghum defense determinants against a phloem-feeding aphid. *Plant Physiol* , 2004 , **134** :420 - 413
 [7] Cai M, Xun L. Organization and regulation of pentachlorophenol-degrading genes in *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723. *J Bacteriol* , 2002 , **184** :4672 - 4680
 [8] Letunic I, Goodstadt L, Dickens NJ *et al.* Recent improvements to the SMART domain-based sequence annotation resource. *Nucleic Acids Res* , 2002 , **30** :242 - 244
 [9] Soranzo N, Sari Gorla M, Mizzi L *et al.* Organization and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family. *Mol Genet Genomics* , 2004 , **271** :511 - 521
 [10] Dixon DP, Laphorn A, Edwards R. Plant glutathione transferases. *Genome Biol* , 2002 , **3** : reviews3004.1 - reviews3004.10
 [11] Roxas VP, Smith RK, Allen ER *et al.* Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nat Biotechnol* ,