

• 农业生物技术 •

Foc4 2个谷胱甘肽 S-转移酶基因的克隆、鉴定及其在外源氧化胁迫下的表达

齐兴柱^{1,2}, 汪军³, 刘磊³

1 海南大学 热带生物资源教育部重点实验室, 海南 海口 570228

2 海南大学 海洋学院, 海南 海口 570228

3 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所, 海南 海口 571101

齐兴柱, 汪军, 刘磊. *Foc4* 2个谷胱甘肽 S-转移酶基因的克隆、鉴定及其在外源氧化胁迫下的表达. 生物工程学报, 2017, 33(6): 995-1005.

Qi XZ, Wang J, Liu L. Cloning and characterization of two glutathione S-transferases cDNAs in *Foc4* and expression under exogenous oxidative stress. Chin J Biotech, 2017, 33(6): 995-1005.

摘要: 为鉴定香蕉枯萎病菌 (尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, *Foc4*) 中的2个假想谷胱甘肽 S 转移酶 (GSTs), 采用 RT-PCR 方法克隆了这2个 GSTs 基因 cDNA 编码序列, 随后分别将2个基因定名为 *Fogst1* 和 *Fogst2*。其中, *Fogst1* 的开放阅读框长 609 bp, 编码 202 个氨基酸残基, *Fogst2* 的开放阅读框长 693 bp, 编码 230 个氨基酸残基。进化树分析表明: *Fogst1* 属于 GSTs 超家族的 sigma(σ) 亚型成员, *Fogst2* 属于 GSTs 超家族中目前未知的亚家族成员。为了验证 *Fogst1* 和 *Fogst2* 的表达, 分别构建了 *Fogst1* 和 *Fogst2* 的原核表达重组载体 pET28a-*Fogst1* 和 pET28a-*Fogst2*, 并将 pET28a-*Fogst1* 和 pET28a-*Fogst2* 转化到大肠杆菌表达菌株 BL21, 经 IPTG 诱导后获得以可溶形式表达的重组蛋白 *Fogst1* 和 *Fogst2*。GSTs 活性分析表明, 以 CDNB 为底物检测, 2个重组蛋白均具有 GSTs 酶活性。分别取外源氧化胁迫处理后 1、5、12、24 h 菌丝样品进行相对荧光定量 PCR 分析, 结果表明: *Fogst1* 和 *Fogst2* 在前 5 h 表达量均大幅上调, 表达量随后下调并恢复正常水平。这些结果均暗示 *Fogst1* 和 *Fogst2* 可能参与了 *Foc4* 抗外源氧化胁迫过程。

关键词: *Foc4*, 谷胱甘肽 S 转移酶, 氧化胁迫

Received: December 11, 2016; **Accepted:** March 20, 2017

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31560491), Doctoral Research Start-up Fund of Hainan University (No. kyqd5143).

Corresponding author: Xingzhu Qi. Tel/Fax: +86-898-66279214; E-mail: qixingzhu2013@163.com

国家自然科学基金 (No. 31560491), 海南大学博士科研启动基金 (No. kyqd5143) 资助。

网络出版时间: 2017-04-11

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170411.1712.005.html>

Cloning and characterization of two glutathione *S*-transferases cDNAs in *Foc4* and expression under exogenous oxidative stress

Xingzhu Qi^{1,2}, Jun Wang³, and Lei Liu³

¹ Key Laboratory of Tropic Biological Resources of Ministry of Education, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China

² College of Ocean, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China

³ Institute of Environment and Plant Protection, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, Hainan, China

Abstract: In order to identify two putative glutathione *S*-transferase (GSTs) genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 (*Foc4*), cDNA sequences of the entire coding regions of the two genes were cloned from *Foc4* using RT-PCR method. Subsequently, the two genes were named *Fogst1* and *Fogst2* respectively. The length of open reading frame of *Fogst1* was 609 bp and encoded a protein including 202 amino acid residues, *Fogst2* possessed an open reading frame with 693 bp which encoded a 230-amino acid protein. Phylogenetic analysis showed that *Fogst1* belonged to sigma (σ) subtype members of the GSTs superfamily, and *Fogst2* was a new member of an unknown subfamily in the GSTs superfamily. To verify the expression of *Fogst1* and *Fogst2*, the recombinant prokaryotic expression vector pET28a-*Fogst1* and pET28a-*Fogst2* were constructed and transformed into *Escherichia coli* expression strain BL21(DE3). The soluble recombinant proteins *Fogst1* and *Fogst2* were obtained after being induced by IPTG. GSTs activity assays showed that both of the two recombinant proteins had specific activity with CDNB. For real time RT-PCR analysis, the mycelium samples of *Foc4* were collected after treatment by H₂O₂ for 1, 5, 12, 24 hours. The results showed that the expression of *Fogst1* and *Fogst2* were significantly up-regulated in the first 5 hours, and then decreased and returned to normal level. These results suggested that *Fogst1* and *Fogst2* may be involved in the process of *Foc4* resistance to exogenous oxidative stress.

Keywords: *Foc4*, glutathione *S*-transferase, oxidative stress

尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号小种 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, *Foc4*) 是香蕉枯萎病的病原菌,自 2001 年首次在海南省三亚凤凰镇发现以来,对海南省乃至我国香蕉种植业造成了重大影响。谷胱甘肽 *S*-转移酶 (Glutathione *S*-transferases, GSTs; EC 2.5.1.18) 是一种多功能酶,属于一个超级蛋白家族,广泛存在于动物、植物、真菌和细菌细胞中^[1]。典型的 GSTs 是由两个亚基组成的可溶性蛋白,通过催化毒素与还原性谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 结合,或者被动地与各种内源性或外源性异型生物物质,包括致癌

物、治疗药物、氧化应激产物 (如活性氧等) 结合,参与细胞中的代谢、诱导胁迫、信号转导等过程,然后通过转运蛋白将连有谷胱甘肽的代谢物质转运入液泡,从而达到解毒和保护细胞免受多种外界环境因素的毒害^[2-8]。

近年来,许多研究证据表明,当动植物受病菌感染或寄生虫侵害时,往往会引起寄主细胞内活性氧的升高,而 GSTs 能够调控细胞内氧化还原水平,从而协助保护生物体免受损害^[9-12]。由于 GSTs 对处于逆境胁迫环境中的细胞具有重要的解毒作用,人们对各种动植物的 GSTs 基因进行了

广泛研究。目前许多参与植物抗逆/抗病响应的 *GSTs* 被分离鉴定, 比如水稻的 *OsGST2* 显著响应稻瘟病菌 *Magnaporthe grisea* 的诱导^[13]; 在向日葵中, 干旱、盐、草酸、核盘菌及其代谢物均能诱导向日葵 *HaGSTU1* 基因的表达量出现显著变化^[14]; 在番茄中, 多个 *GSTs* 基因家族成员响应 SA 和盐胁迫^[15]等。在动物中, 也有报道西氏贝蛔虫 *Baylisascaris schroederi* 在侵入大熊猫肠道过程中, *GSTs* 参与清除宿主免疫系统触发的活性氧物质^[16]; 在白菜黑斑病菌 *Alternaria brassicicola* 中, 异硫氰酸盐 (ITC) 诱导的 *GSTs* 活性分析表明, 在白菜黑斑病菌清除寄主有毒代谢物及活性氧物质并成功入侵寄主的过程中, 5 个分别属于 GSTFuA、GTT1、Ure2pB、GSTO 和 MAPEG 亚家族的 *GSTs* 都发挥了必不可少的作用, 比如属于 GSTFuA 亚家族的 *GSTs* 表现出了 GSH 转移酶活性, 而属于 GTT1 亚家族的 *GSTs* 则表现出了过氧化物酶的活性^[17]。

前期的研究表明, *Foc4* 在侵染香蕉苗时, 在入侵位点会遭遇寄主细胞的活性氧进发现象^[18], 同时, 本课题组通过对转录组测序数据分析发现, *Foc4* 中 *GSTs* 基因多达 27 个, 同时也发现, *Foc4* 在有香蕉苗诱导时, 细胞内多个 *GSTs* 的表达上调。而目前国内外文献均未见有关 *Foc4* *GSTs* 功能研究的报道。为了进一步探究 *GSTs* 在 *Foc4* 入侵香蕉苗的过程中是否参与解除寄主细胞产生的强氧化胁迫环境, 本研究克隆了 *Foc4* 中 2 个表达上调最显著的 *GSTs* 基因完整的 cDNA 编码区序列并利用生物信息学方法对其进行了归类和命名, 分析了 2 个 *GSTs* 基因在外源氧化胁迫条件下的表达特性, 为探究它们在 *Foc4* 入侵香蕉苗过程中的功能提供数据。

1 材料与方法

1.1 试验用菌株及培养条件

Foc4 的野生型 B2 菌株从海南省乐东县发病 (香蕉枯萎病) 的田间巴西蕉根部采集, 由本实验室分离鉴定并保存。真菌菌株的培养采用葡萄糖-马铃薯培养基 (固体 PDA、液体 PDB)。为了提取 H_2O_2 处理不同时间的菌体总 RNA, 将在 PDB 液体培养基中培养 6 d 的 *Foc4* B2 菌株在超净工作台中用 6 层擦镜纸过滤收集滤液 (即孢子液), 然后按 1:50 的比例将孢子液接种到新的 PDB 培养基中, 28 °C、120 r/min 振荡培养 12 h, 然后加入 H_2O_2 至终浓度 10 $\mu\text{mol/mL}$, 继续振荡培养, 并分别于 1、5、12 和 24 h 收集菌体, 液氮研磨, 提取总 RNA。克隆用大肠杆菌菌株 DH5 α 和原核表达用菌株 BL21(DE3)均购自北京天根生化科技有限公司。

1.2 试剂和引物

植物总 RNA 提取试剂盒, PCR Mix 反应混合物均购自北京天根生化科技有限公司。反转录试剂盒采用 TaKaRa 公司的 RNA LA PCRTM Kit。荧光定量 PCR 试剂盒采用 2 \times one-step SYBR-Real-time RT-PCR Kit (北京百泰克公司产品)。PCR 引物 (表 1) 由北京三博远志生物技术有限公司合成。*GSTs* 酶活性检测采用北京 EBT 公司的谷胱甘肽 S-转移酶活性检测试剂盒。

1.3 2 个 *GSTs* 的克隆及生物信息学分析

利用 H_2O_2 处理后的野生型 B2 菌株转录组信息获得了 2 个表达上调明显的 *GSTs* 基因的 cDNA 信息, 其编码的假想蛋白 GenBank 登录号分别为 EMT69530.1 和 EMT62696.1。利用其 cDNA 序列信息在其起始密码子和终止密码子附近设计引物

(表 1), 并以 10 $\mu\text{mol/mL}$ H_2O_2 诱导 5 h 的总 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 采用普通 PCR 方法扩增、克隆后获得了 *Foc4* 的 2 个 *GSTs* 基因编码区序列。分别将 2 个 *GSTs* 基因编码区序列预测的蛋白质序列在 NCBI 中进行 Blast, 获得其他相关物种的 *GSTs* 基因的蛋白序列, 参考 Morel 和 Edgar 等^[19]以及 Calmes 等^[17]的文献也获得一部分相关物种的 *GSTs* 基因的蛋白序列。

所应用的生物信息学分析软件包括: NCBI blast 在线软件 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; NCBI 结构域预测在线软件 CDD <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.Cgi>。ClustalX 软件对 *Foc4* 的 2 个 *GSTs* 蛋白序列及所获得的同源蛋白序列进行多重序列比对, 以鉴定它们之间的同源性; MEGA7.0 软件^[20]对所获得的序列构建了邻位相接的系统发育树, 并用 Bootstrap 方法 (1 000 replicates, seed=64 238) 对该树进行分析。

1.4 RT-PCR 分析基因表达

按北京天根公司的植物总 RNA 提取试剂盒说明书提取处理后菌株的总 RNA, 然后利用 2 \times one-step SYBR-Real-time RT-PCR Kit (Biotek Corp. 产品), 以 3 μg 总 RNA 作为反转录模板, RT-PCR 引物为: 5'-*Gst1*、3'-*Gst1*, 5'-*Gst2*、3'-*Gst2*、5'-Actin、3-Actin (表 1)。PCR 反应体系的总体积为 25 μL , 其中含模板 (总 RNA) 1.5 μL , 2 \times one-step SYBR mix 12.5 μL , 引物 1.3 μL (0.2 $\mu\text{mol/L}$), RT-PCR MIX 1.25 μL , RNase-free H_2O 7.15 μL 。PCR 反应在 BIO-RAD 公司的 Mini OpticonTM Rreal-Time PCR System 上进行。PCR 热循环条件如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s; 退火温度设梯度温度 48–50 $^{\circ}\text{C}$, 并退火 15 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s; 然后读取荧光值, 重复 40 个循环; 最后从 45 $^{\circ}\text{C}$ 到 90 $^{\circ}\text{C}$, 每隔 0.2 $^{\circ}\text{C}$ 读取溶解曲线荧光值, 每读数一次, 停留 2 s。运行完毕后, 从 Opticon Monitor 3.1 软件读取 $C(t)$ 值, 以 β -actin 基因作为内参对照, 利用 $2^{-\Delta C(t)}$ 法计算各基因的相对表达水平。

表 1 本研究所用引物名称及序列

Table 1 Primers and their sequences in this study

Primer name	Primer sequence (5'–3')	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Amplified length (bp)
5'- <i>Gst1</i> cds	ATGTCCTCAGACTCAGTCGTTTA	55.9	606
3'- <i>Gst1</i> cds	CTCGGATTTGATGTACTCAGC	54.9	
5'- <i>Gst2</i> cds	GACTTATTCGCTCTTCATCGG	56.9	689
3'- <i>Gst2</i> cds	ACTCCTTGGTCAAGTCCTTGAG	57.6	
5'- <i>Gst1</i>	CCCAATCCTTCGTTTCCTC	56.8	255
3'- <i>Gst1</i>	ATCGCAAAGTCGGTGTAGC	56.0	
5'- <i>Gst2</i>	TACATCGCTGAGCAATACCC	56.1	396
3'- <i>Gst2</i>	CGTCTCCTTGATACCGTCCT	56.5	
5'-Actin	CCGTGACATCAAGGAGAAGC	57.8	431
3'-Actin	GGAAAGTGGACAGGGAAGCA	59.8	
5'- <i>Gst1</i> exp	TACGGATCCATGTCTCAGACTCAGTC	66.9	625
3'- <i>Gst1</i> exp	CACGTCGACACTCGGATTTGATGTACT	67.7	
5'- <i>Gst2</i> exp	CGTGGATCCATGACTTATTCGCTCTTC	68.4	709
3'- <i>Gst2</i> exp	TCAGTCGACACTCCTTGGTCAAGTCCT	68.6	

1.5 *Fogst1* 和 *Fogst2* 基因的原核表达

以含有 *Fogst1* 和 *Fogst2* 基因编码序列的 T 载体为模板, 含有 *Bam*H I 和 *Sal* I 的引物 5'-*Gst1exp*、3'-*Gst1exp*、5'-*Gst2exp*、3'-*Gst2exp* 进行 PCR 扩增并克隆到 PM18-T 载体, 再将质粒 pMT18-T-*Fogst1* 和 pMT18-T-*Fogst2* 用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切, 回收目的片段连接至用同样酶切的表达载体 pET28a, 得到重组表达质粒 pET28a-*Fogst1* 和 pET28a-*Fogst2*, 转入大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3) 中。菌株 BL21(DE3) pET28a-*Fogst1* 和菌株 BL21(DE3) pET28a-*Fogst2* 在 LB 培养基中于 37 °C 培养过夜, 再以 1 : 100 的比例转接到新鲜 LB 培养基中, 在 37 °C 培养至 A_{600} 为 0.4–0.6, 加入 IPTG 至终浓度分别为 0、0.2、1 和 2 mmol/L, 37 °C 诱导目的蛋白表达约 3.5 h。取 10 mL 菌液离心收集菌体, 去上清后加 1 mL PBS 缓冲液, 菌体重新悬浮后超声破碎菌体并离心, 取 16 μ L 上清及 4 μ L 5 \times 蛋白上样缓冲液混匀变性后进行 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色后观察结果。同时以转入空白质粒的大肠杆菌 BL21(DE3) pET28a 作对照。

1.6 *Fogst1* 和 *Fogst2* 的原核表达产物酶活性分析

测定原理为 GSTs 催化 GSH 与 CDNB 结合, 其结合产物的吸收峰波长为 340 nm; 通过测定 340 nm 波长处吸光度上升速率计算 GSTs 的活性。将 H₂O₂ 处理好的菌丝进行冰浴超声波破碎后, 经离心, 取上清作为待测的粗酶液置于冰上。测定方法如下: 空白管: 取 1 支石英比色皿加入 100 μ L 试剂一, 900 μ L 试剂二和 100 μ L 试剂三, 迅速混匀后于 340 nm 测定吸光度变化, 记录 10 s 和 310 s 吸光度为 A_1 和 A_2 ; 测定管: 取 1 支石英比色皿, 加入 100 μ L 待测粗酶液,

900 μ L 试剂二和 100 μ L 试剂三, 迅速混匀后于 340 nm 测定吸光度变化, 记录 10 s 和 310 s 吸光度为 A_3 和 A_4 。活性单位定义为在常温下, 每毫升液体每分钟催化 1 nmol/L CDNB 与 GSH 结合为 1 个酶活单位。GSTs 酶活性计算公式如下:

$$\text{GSTs (nmol/(min}\cdot\text{mL))} = [(A_4 - A_3) - (A_2 - A_1)] \div \varepsilon \div d \times 10^6 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div t = 230 \times [(A_4 - A_3) - (A_2 - A_1)]$$

其中 ε : 产物摩尔消光系数, 9.6×10^3 L/(mol \cdot cm); d : 比色皿光径, 1 cm; 10^6 : 1 mol = 1×10^6 μ mol; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 1 100 μ L = 0.001 L; $V_{\text{样}}$: 加入反应体系中粗酶液体积, 100 μ L = 0.1 mL; t : 反应时间, 5 min。

2 结果与分析

2.1 *Foc4* 2 个 GSTs 酶基因的克隆鉴定

前期的研究工作中发现, *Foc4* 在入侵位点会遭遇寄主细胞因活性氧迸发而产生的强氧化胁迫环境。为探讨 *Foc4* 遭遇外源氧化胁迫时的分子应对机制, 采用 H₂O₂ 模拟外源强氧化胁迫环境, 处理 *Foc4* 野生型 B2 菌株, 并对其转录组测序, 结果发现 2 个编号分别为 *c6215.graph_c0* 和 *c9910.graph_c0* 的基因相对于未用 H₂O₂ 处理 *Foc4* 野生型 B2 菌株的表达显著上调。利用其 cDNA 序列信息在其起始密码子和终止密码子附近设计引物 (表 1), 采用 TaKaRa 公司的反转录试剂盒 (RNA LA PCRTM Kit) 对 *Foc4* 野生型 B2 菌株的总 RNA 进行反转录后 PCR 扩增, 获得了 *c6215.graph_c0* 和 *c9910.graph_c0* 的 cDNA 序列, 其 cDNA 编码序列电泳结果如图 1 所示。将 PCR 扩增获得的 2 个 cDNA 片段克隆后送深圳华大基因研究院测序, 测序结果与现有的 *c6215.graph_c0* 和 *c9910.graph_c0* 的 cDNA 序列比对表明成功获得了 *c6215.graph_c0*

和 *c9910.graph_c0* 的 cDNA 的编码序列。将 2 个基因编码区预测的蛋白质序列输入到 NCBI blast 在线软件, 进行 blast 查询比对和结构域查询, 初步确定 2 个基因均为谷胱甘肽 S 转移酶基因。因此, 分别将 *c6215.graph_c0* 命名为 *Fogst1*, *c9910.graph_c0* 命名为 *Fogst2*。

2.2 2 个 GSTs 酶的分类

通过 Blast 在线查询和参考 Mélanie Morel^[19] 和 Calmes Benoit^[17] 的文献获得部分真菌的 GSTs 基因的蛋白序列。利用 ClustalX 软件对 *Foc4* 野生型 B2 菌株的 2 个 GSTs 酶蛋白序列及同源蛋白序列进行多重序列比对, 以鉴定它们之间的同源性, 并利用 MEGA7.0 软件^[21] 对所获得的多重序列比对结果构建了邻位相接的系统发育树 (NJ-tree), 如图 2 所示。系统发育分析结果表明: *Fogst1* 被归类为 σ 型 (Sigma-class) GSTs 酶, *Fogst2* 被归类为目前功能未知而且尚未命名的一类亚型 (GST_N family unknown subfamily)。

2.3 *Fogst1* 和 *Fogst2* 的原核表达与重组蛋白的活性测定

为了验证 *Fogst1* 和 *Fogst2* 基因编码蛋白的功能, 构建了 *Fogst1* 和 *Fogst2* 的原核表达载体。将 *Fogst1* 和 *Fogst2* 完整的编码区用 *Bam*H I 和 *Sal* I 分别从 pMT18-T-*Fogst1* 和 pMT18-T-*Fogst2* 载体切下, 连入经同样酶切的表达载体 pET28a, 分别得到 pET28a-*Fogst1* 和 pET28a-*Fogst2*。分别将 pET28a-*Fogst1* 和 pET28a-*Fogst2* 转入大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3), 不同浓度 IPTG 诱导 3.5 h 收集菌体, 同时以转入 pET28a 空质粒的菌体作对照。SDS-PAGE 检测显示, 图 3A 的 1、2、3 和 4 号泳道分别为 2、1、0.2 和 0 mmol/L IPTG 诱导后的 BL21(DE3) pET28a-*Fogst1* 总蛋白电泳图, 5 号泳道为 BL21(DE3) pET28a 的总蛋白电

泳图; 图 3B 中, 1、2、3、5 号泳道分别为 2、1、0.2 和 0 mmol/L IPTG 诱导后的 BL21(DE3) pET28a-*Fogst2* 总蛋白电泳图, 4 号泳道为 BL21(DE3) pET28a 的总蛋白电泳图。从图 3 可以看出, 经 IPTG 诱导的 BL21(DE3) pET28a-*Fogst1* 菌株在分子量约为 28 kDa 处有明显的蛋白表达条带, 与预期的 *Fogst1* 分子量基本一致, 而且在 0.2、1 和 2 mmol/L IPTG 诱导下均有大量表达(图 3A)。经 IPTG 诱导的 BL21(DE3) pET28a-*Fogst2* 菌株在分子量约为 30 kDa 处有明显的蛋白表达条带, 与预期的 *Fogst2* 分子量基本一致, 而且也是在 0.2、1 和 2 mmol/L 的 IPTG 诱导下均有较大量的表达。菌体超声破碎离心后, 仅以上清液点样电泳, 即可见清晰表达条带, 说明 2 个重组蛋白主要以可溶形式存在于细胞中。GST 可以催化 CDNB 与 GSH 反应, 其产物在 340 nm 处有特征吸收, 可用分光光度法检测。基于该原理, 以北京 EBT 公司的谷胱甘肽 S 转移酶活性检测试剂盒分别对经 2 mmol/L IPTG 诱导的 BL21(DE3) pET28a-*Fogst1* 和 BL21(DE3) pET28a-*Fogst2* 菌体破碎后的上清液进行了 GSTs 活性检测。结果 2 种菌体上清中, 均检测到了明显的 GSTs 活性(表 2), 证明 *Fogst1* 和 *Fogst2* 编码的蛋白质属于 *Foc4* 的 GSTs 家族。

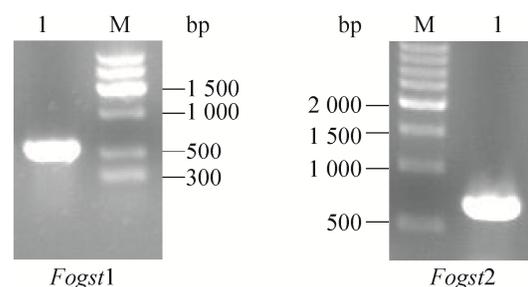


图 1 两个谷胱甘肽 S-转移酶基因 *Fogst1* 和 *Fogst2* cDNA 编码序列的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of cDNA coding sequence of two glutathione S-transferases (*Fogst1* and *Fogst2*).

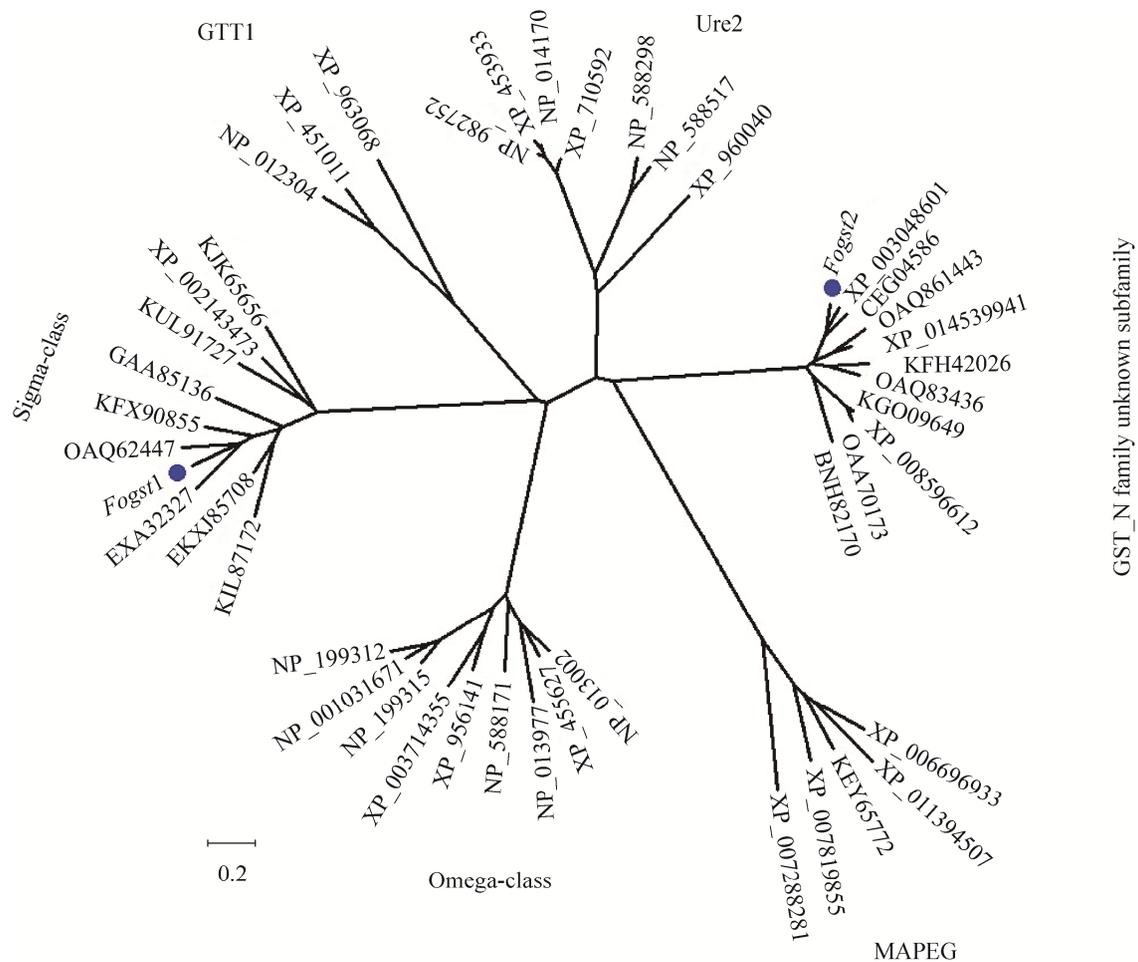


图 2 *Foc4* 2 个谷胱甘肽 S-转移酶蛋白及其同源蛋白的分子进化树 (NJ), Bootstrap (1 000 replicates; seed=64 238) (2 个谷胱甘肽 S-转移酶 Fogst1 和 Fogst2 分别用●标记。系统分析所用的同源蛋白序列均来自 NCBI)

Fig. 2 The Phylogenetic tree (NJ) of the two GSTs of *Foc4* and their homologous, Bootstrap (1 000 replicates; seed=64 238). The two GSTs (Fogst1 and Fogst2) were marked by ● respectively. The homologous protein sequences used in the phylogenetic analysis were derived from NCBI. Accession number of each sequence is as follows: *Saccharomyces cerevisiae* (NP_014170, NP_012304, NP_013977, NP_013002); *Kluyveromyces lactis* (XP_453933, XP_451011, XP_455627); *Eremothecium gossypii* (NP_982752); *Schizosaccharomyces pombe* (NP_588298, NP_588517, NP_588171); *Neurospora crassa* (XP_960040, XP_963068, XP_011394507, XP_956141); *Chaetomium thermophilum* var. (XP_006696933); *Stachybotrys chartarum* IBT (KEY65772); *Metarhizium robertsii* (XP_007819855); *Marssonina brunnea* f. sp. (XP_007288281); *Arabidopsis thaliana* (NP_199312, NP_001031671, NP_199315); *Magnaporthe oryzae* (XP_003714355); *Talaromyces marneffeii* (XP_002143473); *Aspergillus parasiticus* (KJK65656); *Talaromyces verruculosus* (KUL91727); *Aspergillus kawachii* (GAA85136); *Pseudogymnoascus* sp. (KFX90885); *Pochonia chlamydosporia* (OAA62447, OAA61443); *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* (EXA32327); *Microdochium bolleyi* (KXJ85708); *Fusarium avenaceum* (KIL87172); *Nectria haematococca* (XP_003048601); *Fusarium* sp. *FIESC* (CEG04586); *Metarhizium brunneum* (XP_014539941); *Acremonium chrysogenum* (KFH42026); *Purpureocillium lilacinum* (OAAQ83436); *Beauveria bassiana* (KGO09649, XP_008596612); *Cordyceps confragosa* (OAA70173); *Colletotrichum orbiculare* (ENH82170).

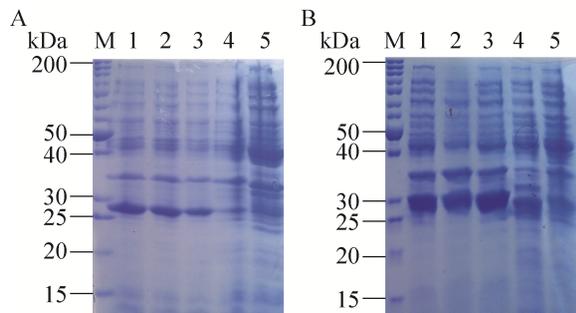


图3 SDS-PAGE分析重组Fogst1(A)和Fogst2(B)蛋白在大肠杆菌BL21(DE3)中的表达

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression of recombinant protein Fogst1 (A) and Fogst2 (B) in *Escherichia coli* (BL21(DE3)).

表2 重组Fogst1和Fogst2蛋白的活性检测

Table 2 Activity analysis of recombinant Fogst1 and Fogst2

Sample	Activity of GSTs (nmol/(min·mL))
Supernatant of BL21(DE3) pET28a	0.69
Supernatant of BL21(DE3) pET28a-Fogst1	10.35
Supernatant of BL21(DE3) pET28a-Fogst2	13.57

2.4 2个GSTs酶的在外源氧化胁迫条件下的mRNA水平表达

前期工作中的外源氧化胁迫条件下的转录组测序表明, *Fogst1*、*Fogst2* 两个基因转录本相对于未处理样品大幅增加, 因此我们推测这两个 *GSTs* 基因在此过程中必定发挥了作用, 为了进一步验证转录组测序数据中关于这两个 *GSTs* 基因的数据是否准确, 利用终浓度为 10 $\mu\text{mol/mL}$ 的外源 H_2O_2 模拟这种强氧化胁迫环境, 采用半定量RT-PCR技术分析了两个 *GSTs* 基因在 H_2O_2 处理 1、5、12、24 h 的相对表达量 (图4)。结果表明: 1) 无论是 *Fogst1* 还是 *Fogst2*, 在前 5 h 的表达均远高于 12 h 和 24 h 的表达, 说明在外源 H_2O_2 存在的情况下, 为参与清除外源 H_2O_2 , *Fogst1* 和 *Fogst2* 基因表达均迅速上调; 2) 在 12–24 h 的时间段, 表达量已经逐渐恢复到对照样品的水平, 说明培养液中外源 H_2O_2 因病原菌的清除及自身的降解已经差不多消失完全, 对 *Foc4* 的菌丝生长的影响已经很轻微了。

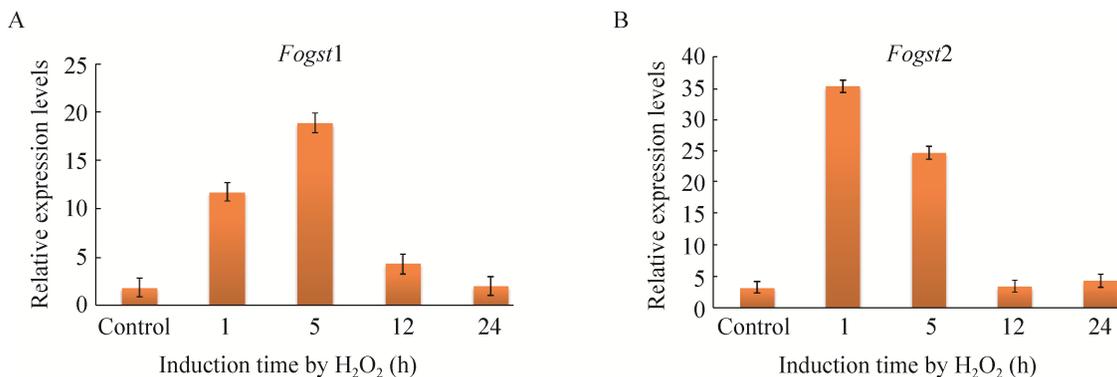


图4 *Foc4* 的2个谷胱甘肽S-转移酶基因 *Fogst1* 和 *Fogst2* 在外源 H_2O_2 诱导条件下的相对表达状况

Fig. 4 The relative expression levels of two GSTs (*Fogst1* and *Fogst2*) of *Foc4* under exogenous oxidative stress.

3 讨论

植物对病原菌入侵的最快防卫反应之一就是活性氧的急促释放,称为氧化爆发(Oxidative burst),这种现象在植物抵抗病原菌入侵过程中具有重要作用。前期的研究工作中我们发现 *Foc4* 在入侵香蕉苗后引起了香蕉苗根部活性氧迸发^[14]。为了应对植物寄主所产生的强氧化胁迫环境并成功入侵寄主,病原菌必须通过自身基因表达调控,细胞代谢改变等一系列变化来应对这种强氧化胁迫环境。为此,以 H_2O_2 模拟外源强氧化胁迫环境处理 *Foc4* 野生型 B2 菌株并对其进行转录组测序,测序结果发现 *Fogst1* 和 *Fogst2* 表达显著上调。因此对这 2 个 GSTs 基因进行了克隆鉴定和表达分析验证。

GSTs 同工酶是一个超级蛋白家族,在其他物种中的研究也相对较多,对 GSTs 酶的分类也比较成熟,但真菌中 GSTs 酶的研究相对较晚。虽然在许多真菌中都有发现 GSTs 基因,但对真菌中 GST 的分类研究相对还很少,根据等电点的不同、底物特异性、对抑制剂的敏感性、免疫学特性和氨基酸序列相似性的不同,GSTs 被分为许多亚型。如哺乳动物中可溶性 GSTs 有 8 种,分别为 α 、 μ 、 π 、 σ 、 θ 、 ζ 、 κ 和 ω 型^[17],植物中的可溶性 GSTs 有 θ 、 ζ 、 φ 、 τ 、 λ 型 5 种,昆虫中的 GST 被划分为 3 类,分别为 σ 、 δ 和 ϵ 型^[22-23]。在真菌中 GST 的研究还相对较少,且已经鉴定的真菌 GSTs 有些与已有的亚型相同,有些与已有的亚型不相同。比如 Morel 和 Ngadin 等^[24]利用已有的基因组数据,通过同源比对及进化分析等方法将 19 种子囊菌、8 种担子菌以及 2 种接合菌的 GSTs 超家族蛋白分为 Omega、GTT1、GTT2、Ure2p、MAK16、EFB γ 和 GTE

七大类,其中粟酒裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 中仅发现 7 个 GSTs,而在褐腐菌 *Postia placenta* 中发现 46 个分属于所有 7 类。而 Morel 和 Edgar 等^[19]又认为,真菌胞浆 GSTs 酶有 8 大类,分别为 GTT 1、GTT 2、URE 2p、MAK 16、EFb1、GSTFuA、GSTO 和 GHR。传统上,两个蛋白质的氨基酸序列一致性超过 40%即认为它们属于同一种类型的蛋白质,当同工酶的氨基酸序列一致性低于 20%即认为它们不属于同一种类型的蛋白质^[25]。然而,如果以这些基本序列作为唯一的标准,仍有许多“非规范的”GSTs 酶在多种真菌中被发现,因而增加了 GSTs 酶分类的复杂性。比如,有几个通常被归为 GSTs 酶 (EF1Bg, MAK16) 的蛋白家族,是基于其在结构上与 GSTs 酶的相似性,而不是以具有谷胱甘肽依赖的活性而被归类为 GSTs 酶。而我们根据氨基酸基本序列采用同源比对及进化分析鉴定的 *Foc4* 的 2 个 GSTs 酶中,*Fogst1* 属于 σ 亚型,*Fogst2* 不属于以上分类中的任何一种亚型。但根据 2 个 GSTs 基因原核表达产物的活性检测表明 *Fogst1* 和 *Fogst2* 均具有 GSTs 酶活性说明两者均为 *Foc4* 的 GSTs 酶。同时也说明真菌 GSTs 酶亚型分类的复杂性,目前的真菌 GSTs 酶亚型分类并不完善。

为了解 *Fogst1* 和 *Fogst2* 是否参与 *Foc4* 与香蕉苗相互作用的过程,本研究运用 RT-PCR 技术分析了利用外源 H_2O_2 模拟香蕉苗根部所处的活性氧迸发环境来诱导 *Fogst1* 和 *Fogst2* 基因的表达情况,结果表明 *Fogst1* 和 *Fogst2* 可能参与了 *Foc4* 清除外源 H_2O_2 的过程。

4 结论

根据以上研究结果,得出如下结论:1) 从

Foc4 中克隆得到 2 个 GSTs 基因 *Fogst1* 和 *Fogst2*, 说明 2 个基因在 *Foc4* 中真实存在, 其中 *Fogst1* 的编码序列长 609 bp, 编码 202 个氨基酸残基, *Fogst2* 的编码序列长 693 bp, 编码 230 个氨基酸残基。2) *Fogst1* 属于 GSTs 酶超蛋白质家族中的 σ 亚型。3) *Fogst1* 和 *Fogst2* 原核表达及活性检测表明两者均具有 GSTs 酶活性, 说明两者均为 *Foc4* 中的 GSTs 酶。4) 在外源氧化胁迫存在的条件下, *Fogst1* 和 *Fogst2* 的表达均有上调, 进一步推测 *Fogst1* 和 *Fogst2* 均可能参与了消除 *Foc4* 入侵香蕉苗时香蕉苗根部因活性氧迸发产生的强氧化胁迫环境。

REFERENCES

- [1] Ren HL, Xu DD, Gopalakrishnan S, et al. Gene cloning of a sigma class glutathione S-transferase from abalone (*Haliotis diversicolor*) and expression analysis upon bacterial challenge. *Dev Comp Immunol*, 2009, 33(9): 980–990.
- [2] Conn S, Curtin C, Bézier A, et al. Purification, molecular cloning, and characterization of glutathione S-transferases (GSTs) from pigmented *Vitis vinifera* L. cell suspension cultures as putative anthocyanin transport proteins. *J Exp Bot*, 2008, 59(13): 3621–3634.
- [3] Olsvik PA, Nordtug T, Altin D, et al. Transcriptional effects on glutathione S-transferases in first feeding Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae exposed to crude oil. *Chemosphere*, 2010, 79(9): 905–913.
- [4] Salinas AE, Wong MG. Glutathione S-transferases -a review. *Curr Med Chem*, 1999, 6(4): 279–309.
- [5] Torres-Rivera A, Landa A. Glutathione transferases from parasites: a biochemical view. *Acta Trop*, 2008, 105(2): 99–112.
- [6] Ding YC, Hawkes N, Meredith J, et al. Characterization of the promoters of Epsilon glutathione transferases in the mosquito *Anopheles gambiae* and their response to oxidative stress. *Biochem J*, 2005, 387(3): 879–888.
- [7] Jowsey IR, Thomson AM, Flanagan JU, et al. Mammalian class Sigma glutathione S-transferases: catalytic properties and tissue-specific expression of human and rat GSH-dependent prostaglandin D-2 synthases. *Biochem J*, 2001, 359(3): 507–516.
- [8] Cho SG, Lee YH, Park HS, et al. Glutathione S-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biol Chem*, 2001, 276(16): 12749–12755.
- [9] Guo M, Chen Y, Du Y, et al. The bZIP Transcription Factor MoAPI Mediates the Oxidative Stress Response and Is Critical for Pathogenicity of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathog*, 2011, 7(2): e1001302.
- [10] Guo M, Guo W, Chen Y, et al. The basic leucine zipper transcription factor Moatf1 mediates oxidative stress responses and is necessary for full virulence of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2010, 23(8): 1053–1068.
- [11] Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1995, 30(6): 445–600.
- [12] Fujita M, Hossain MZ. Molecular cloning of cDNAs for three tau-type glutathione S-transferases in pumpkin (*Cucurbita maxima*) and their expression properties. *Physiol Plant*, 2003, 117(1): 85–92.
- [13] Agrawal GK, Jwa NS, Rakwal R. A pathogen-induced novel rice (*Oryza sativa* L.) gene encodes a putative protein homologous to type II glutathione S-transferases. *Plant Sci*, 2002, 163(6): 1153–1160.
- [14] Ma LG, Meng QL, Zhang YH, et al. Clone and function of a glutathione-S-transferase gene from sunflower (*Helianthus annuus*). *Chin J Oil Crop Sci*, 2015, 37(5): 635–643 (in Chinese).
马立功, 孟庆林, 张匀华, 等. 向日葵谷胱甘肽-S-转移酶基因的克隆及抗病功能研究. *油料作物学报*, 2015, 37(5): 635–643.

- [15] Csiszár J, Horváth E, Váry Z, et al. Glutathione transferase supergene family in tomato: salt stress-regulated expression of representative genes from distinct GST classes in plants primed with salicylic acid. *Plant Physiol Biochem*, 2014, 78: 15–26.
- [16] Xie Y, Zhou X, Chen L, et al. Cloning and characterization of a novel sigma-like glutathione S-transferase from the giant panda parasitic nematode, *Baylisascaris schroederi*. *Parasit Vectors*, 2015, 8: 44.
- [17] Calmes B, Morel-Rouhier M, Bataillé-Simoneau N, et al. Characterization of glutathione transferases involved in the pathogenicity of *Alternaria brassicicola*. *BMC Microbiol*, 2015, 15: 123.
- [18] Qi XZ, Guo LJ, Yang LY, et al. Foatf1, a bZIP transcription factor of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, is involved in pathogenesis by regulating the oxidative stress responses of Cavendish banana (*Musa* spp.). *Physiol Mol Plant Pathol*, 2013, 84: 76–85.
- [19] Morel M, Meux E, Mathieu Y, et al. Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. *Microb Biotechnol*, 2013, 6(3): 248–263.
- [20] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, 4(4): 406–425.
- [21] Sheehan D, Meade G, Foley VM, et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J*, 2001, 360(1): 1–16.
- [22] Edwards R, Dixon DP. Plant glutathione transferases. *Methods Enzymol*, 2005, 401: 169–186.
- [23] Agianian B, Tucker PA, Schouten A, et al. Structure of a *Drosophila* sigma class glutathione S-transferase reveals a novel active site topography suited for lipid peroxidation products. *J Mol Biol*, 2003, 326(1): 151–165.
- [24] Morel M, Ngadin AA, Droux M, et al. The fungal glutathione S-transferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(23): 3711–3725.
- [25] Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005, 45(1): 51–88.

(本文责编 郝丽芳)