

江南卷柏 Phi 类谷胱甘肽 S-转移酶的分子特性

张元杰, 杨志灵, 杨海灵

北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083

张元杰, 杨志灵, 杨海灵. 江南卷柏 Phi 类谷胱甘肽 S-转移酶的分子特性. 生物工程学报, 2016, 32(7): 927-936.

Zhang YJ, Yang ZL, Yang HL. Molecular characteristics of two Phi glutathione S-transferases in *Selaginella moellendorffii*. Chin J Biotech, 2016, 32(7): 927-936.

摘 要: 谷胱甘肽 S-转移酶 (Glutathione S-transferase, GST) 在帮助植物抵抗各种胁迫中发挥重要作用。该研究从江南卷柏 *Selaginella moellendorffii* 中克隆到两个 Phi 类 GST 基因, 分别命名为 *SmGSTF1* 和 *SmGSTF2*, 两个基因均编码 215 个氨基酸残基的蛋白质。表达模式分析发现, 这两个基因在江南卷柏根、茎和叶中均有表达。将这两个基因在大肠杆菌中诱导表达重组蛋白并纯化, 酶学性质分析表明 *SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 对 CDNB、NBD-Cl 和 NBC 等 3 种底物都有活性。*SmGSTF1* 对 Fluorodifen 和 Cum-OOH 也有活性, 而 *SmGSTF2* 对它们没有活性。酶动力学分析表明 *SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 对 GSH 有较高的亲和力, 而对 CDNB 的亲和力都相对较低。在不同 pH 及温度条件下对 *SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 重组蛋白进行活性测定, 发现这两个蛋白在 pH 7-8.5, 45-55 °C 温度范围内有较高的催化活性。研究推测, *SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 可能在江南卷柏的抗逆生理过程中有重要的作用。

关键词: 江南卷柏, 谷胱甘肽 S-转移酶, 基因表达, 酶学性质

Molecular characteristics of two Phi glutathione S-transferases in *Selaginella moellendorffii*

Yuanjie Zhang, Zhiling Yang, and Hailing Yang

College of Life Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: Glutathione S-transferase (GST) is important in plants to resist various stresses. In this study, two Phi GST

Received: October 16, 2015; **Accepted:** January 6, 2016

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31270641).

Corresponding author: Hailing Yang. Tel/Fax +86-10-62590843; E-mail: yhailing77@163.com

国家自然科学基金 (No. 31270641) 资助。

网络出版时间: 2016-01-26

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20160126.0933.002.html>

genes (*SmGSTF1* and *SmGSTF2*) were cloned from *Selaginella moellendorffii*. *SmGSTF1* and *SmGSTF2* genes encode proteins of 215 amino acid residues. Gene expression analysis showed that the two genes were expressed in roots, stems and leaves. The recombinant SmGSTF1 and SmGSTF2 proteins were overexpressed in *Escherichia coli*, and purified by Ni-affinity chromatography. SmGSTF1 and SmGSTF2 had the catalytic activity towards 1-Chloro-2,4-Dieitrobenzene, 4-Chloro-7-nitro-1,2,3-benzoxadiazole (NBD-Cl), and 4-Nitrobenzyl chloride substrates. SmGSTF1 also had the activity towards Fluorodifen and Cumyl hydroperoxide (Cum-OOH), whereas SmGSTF2 not. The enzyme kinetics analysis showed that SmGSTF1 and SmGSTF2 had high affinity towards glutathione, and low affinity towards 1-Chloro-2,4-Dieitrobenzene. The enzymatic activity of SmGSTF1 and SmGSTF2 had high catalytic activity between pH 7 and 8.5, and between 45 and 55 °C. SmGSTF1 and SmGSTF2 may have an important role in the resistance of *Selaginella moellendorffii* against stress.

Keywords: *Selaginella moellendorffii*, glutathione S-transferase, gene expression, enzymatic activity

蕨类植物起源于距今 4 亿年前,相比较苔藓植物,蕨类植物孢子体内部有明显的维管组织的分化,因而在原始维管植物的进化中具有重要意义^[1]。江南卷柏 *Selaginella moellendorffii* 是蕨类植物的现存种之一,在中国广泛分布于长江流域和长江以南各地^[2],是一种常用的具有清热活血作用的药用植物^[3]。对其进行研究有助于理解蕨类植物适应更复杂陆地环境的作用机制。

谷胱甘肽 S-转移酶 (Glutathione S-transferase, GST, EC 2.5.1.18) 是一类具有多种生理功能的蛋白质超家族,广泛存在于哺乳动物、植物、鸟类、昆虫、寄生虫及微生物体内。最早在 20 世纪 70 年代,就在玉米中发现了 GST^[4-6],随后植物 GST 的基因结构、进化分析、表达模式和生物学功能等得到了广泛的研究^[7-10]。GST 在生物体内主要参与植物的解毒代谢,它能催化外源或内源的亲电子化合物与还原型谷胱甘肽 (Reduced glutathione) 结合形成 R-SG 复合物,增加其亲水性,使其能够被转运出细胞膜,达到解毒的作用^[4-6]。植物 GST 基因家族主要分为 8 个类型,分别是 Tau、Phi、DHAR、Zeta、Theta、Lambda、

TCHQD 和 EF1B γ ^[11],其中 Phi 类 GST 是植物特有的类型。植物中 Tau、Phi 和 Zeta 类 GST 的晶体结构已得到解析,蛋白结构比较发现植物 GST 的三维结构都比较保守^[12],但其负责与特异性底物结合的 C 末端区域结构变化较大,这也说明不同的 GST 能结合特定底物而发挥不同的生理功能^[13]。Phi 类 GST 对于植物抵抗逆境胁迫具有重要作用,例如,在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中过量表达一个 Phi 类 GST 基因能显著提高其植株对紫外线的抗性^[14];在烟草 *Nicotiana tabacum* 中过量表达玉米 *Zea mays* 的 Phi 类 GST 基因明显增强了植株对除草剂的抗性^[15]。

先前已经有对苔藓植物(如小立碗藓)、裸子植物(如油松)和被子植物(如杨树)中 Phi 类 GST 的研究^[11,16-17],但缺乏对于蕨类植物中 Phi 类 GST 的相关研究。本研究从江南卷柏中克隆得到两个 Phi 类 GST 基因,对它们的系统发育、基因结构、基因表达模式,以及所编码蛋白的结构和生化活性进行了深入的研究,为揭示 Phi 类 GST 在植物响应环境胁迫中的作用机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用的江南卷柏取自重庆缙云山,用于 RNA 的提取。

1.2 江南卷柏 Phi 类 GST 的鉴定

以已发表的小立碗藓 Phi 类 GST 蛋白序列为模板^[17],在 NCBI 的江南卷柏基因组数据库中进行 TBLASTN 搜索,然后对搜索得到的序列进行保守结构域分析。

1.3 江南卷柏 *SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 基因的克隆

将江南卷柏植株洗净,取约 50 mg 新鲜叶片,按照植物总 RNA 提取试剂盒 (BioTeKe 公司) 说明书提取江南卷柏叶的总 RNA,然后用 TaKaRa 公司的反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。根据 *SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 基因序列,分别设计引物对 *SmGSTF1*-EX1/EX2 和 *SmGSTF2*-EX1/EX2,以江南卷柏叶 cDNA 为模板,用 Q5 高保真 DNA 聚合酶 (NEB 公司) 进行 PCR 扩增,然后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,用 DNA 快速纯化/回收试剂盒 (鼎国公司) 回收目的条带。纯化后的 PCR 片段连接到 pEASY-Blunt 载体 (全式金公司),并

转化 *Trans1-T1* 感受态细胞 (全式金公司)。在 X-gal/IPTG Amp 平板上挑取多个菌落,进行菌落 PCR,并对阳性克隆进行测序。

1.4 Phi 类 GST 系统发生关系分析

将 *SmGSTF1* 和 *SmGSTF2*,以及其他植物 Phi 类 GST 蛋白序列通过 Clustal X 1.83 进行氨基酸序列比对,然后在 BioEdit 中进行手动校对。利用 MEGA 5.0 的 Neighbour-Joining (NJ) 模型构建进化树,Bootstrap 值为 1 000。

1.5 *SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 的表达模式分析

使用植物总 RNA 提取试剂盒 (BioTeKe 公司) 提取江南卷柏根、茎和叶 3 个部位的 RNA,然后将 RNA 用反转录试剂盒 (TaKaRa 公司) 反转录成 cDNA。设计引物 *SmGSTF1*-SP1/SP2 和 *SmGSTF2*-SP1/SP2,分别以江南卷柏根、茎和叶的 cDNA 为模板,以江南卷柏 *Actin* 基因为内参进行半定量 RT-PCR,以研究 *SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 在不同组织的表达情况 (表 1)。PCR 反应程序是:94 °C 预变性 5 min;94 °C 30 s,55 °C 40 s,72 °C 1 min,分别进行 24、26、28 个循环;最后 72 °C 延伸 5 min。对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,并将 PCR 产物送出测序,进一步验证扩增得到的 PCR 产物是否为目的基因。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Gene	Primer name	Sequence (5'-3')
<i>SmGSTF1</i>	<i>SmGSTF1</i> -SP1	GAGCTGGTCCCGTCAATCT
	<i>SmGSTF1</i> -SP2	GATGTCCTGGGAGGCGAGAT
	<i>SmGSTF1</i> -EX1	GCCATGGCTGATATCGGATCCATGGCGATCAAGATCTATGG
	<i>SmGSTF1</i> -EX2	GTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGTTATCACGGAGCAGCAGCGGC
<i>SmGSTF2</i>	<i>SmGSTF2</i> -SP1	CGAGCTGGTCCCGTCAATAT
	<i>SmGSTF2</i> -SP2	GATGTCCTGGGAGGCGAGGT
	<i>SmGSTF2</i> -EX1	GCCATGGCTGATATCGGATCCATGGCGATCAAGATCTATGG
	<i>SmGSTF2</i> -EX2	GTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGTTATCACGGAGCAGCAGCGGCA

1.6 SmGSTF1 和 SmGSTF2 蛋白结构模拟

以拟南芥的 Phi 类 GST (PDB:1GNW) 的 X 射线衍射晶体结构为模板, 在 SWISS-MODEL 上进行蛋白结构模拟, 对模拟结果进一步用 prolife-3D 程序进行验证, 选取最优的模拟结构。

1.7 SmGSTF1 和 SmGSTF2 重组蛋白的表达和纯化

以 SmGSTF1-EX1/EX2、SmGSTF2-EX1/EX2 为引物, 以叶 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增得到目的基因片段。用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 对 PET-30a 载体进行双酶切。利用无缝克隆试剂盒 (中美泰和公司) 将目的基因连接到双酶切后的载体上, 再将重组载体转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中。挑取阳性菌落进行测序, 然后将测序验证无突变的重组表达菌接种到含有卡那霉素的 LB 培养基中过夜培养, 以 1:100 的比例扩大培养至 OD_{600} 为 0.6 左右, 加入 IPTG (终浓度为 0.1 mmol/L) 诱导蛋白在大肠杆菌 BL21 中表达, 37 °C、200 r/min 过夜培养。将诱导表达后的菌液 4 °C、10 000×g 离心 3 min 收集菌体, 加入适量缓冲液 A (20 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Na_3PO_4 , pH 7.5) 进行重悬, 在冰上进行超声波破碎 10 min, 将破碎后的菌液在 4 °C、10 000×g 离心 10 min, 取少量菌液、超声破碎后的离心上清液和沉淀, 经 SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达情况。用缓冲液 A 平衡 Ni 柱 (购自于 Amersham Pharmacia Biotech 公司), 将超声破碎离心后的上清液上柱, 待蛋白结合 30 min 后, 用缓冲液 A 洗脱杂蛋白, 再用缓冲液 B (0.5 mol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Na_3PO_4 , pH 7.5) 洗脱目的蛋白, 收集目的蛋白洗脱峰进行下一步酶学活性分析。

1.8 SmGSTF1 和 SmGSTF2 重组蛋白的酶学活性检测

参照 Habig 等^[18]的方法测定重组蛋白对 CDNB、DCNB 和 NBC 的催化活性, 参照 Ricci 等^[19]的方法测定重组蛋白对 NBD-Cl 的催化活性, 参照 Edwards 等^[20]的方法测定重组蛋白对 DHA、fluorodifen 和 Cum-OOH 的催化活性。在 25 °C 下, 使用紫外分光光度计 (Evolution 300) 进行所有的测活反应。以 CDNB 和 GSH 为底物, 每 5 °C 作为一个梯度, 测定重组蛋白在 15–65 °C 之间的活性。参照 Yuen 等^[21]的方法, 在 pH 5–10 范围内测定重组蛋白在不同 pH 下的催化活性。

通过测定重组蛋白在不同 CDNB 和 GSH 浓度下的催化活性分析其动力学常数。分析重组蛋白对于 GSH 的动力学时, CDNB 的浓度保持 1.0 mmol/L 不变, 测定重组蛋白在不同 GSH 浓度 (0.1–1.0 mmol/L) 时的催化活性。分析重组蛋白对于 CDNB 的动力学时, 保持 GSH 浓度为 1.0 mmol/L 不变, 测定其在不同 CDNB 浓度 (0.6–4.0 mmol/L) 时的催化活性。利用 Hyper32 程序, 通过线性回归分析获得其酶动力学参数。

2 结果与分析

2.1 江南卷柏 Phi 类 GST 基因的克隆与基因结构分析

以江南卷柏 cDNA 为模板, 利用引物 SmGSTF1-EX1/EX2 和 SmGSTF2-EX1/EX2 克隆得到 *SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 的 cDNA 序列。*SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 都包含 648 个碱基的开放阅读框, 编码 215 个氨基酸残基的蛋白质 (图 1), 预测的蛋白分子量分别为 24.03 kDa 和 23.99 kDa。*SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 之间只有 4 个氨基酸差

SmGSTF1	1	MAIKIVGIPMSTCTGRVLYTLKEKSLDYELVPVNAAG	60
SmGSTF2	1	MAIKIVGIPMSTCTGRVLYTLKEKSLDYELVPVNAAG	60
SmGSTF1	61	GLTLFESRAISRYICDLSPKGEPLYGKTPEDRALVEQWLEVESQNFNPPISTIVFQLVFS	120
SmGSTF2	61	GLTLFESRAISRYICDLSPKGEPLYGKTPEDRALVEQWLEVESQNFNPPISTIVFQLVFS	120
SmGSTF1	121	KFRGLTPDQEVVESNLKKLDSVLAIYESHLASQDYLAGSFFSLADLSHVPYLHYLINVAK	180
SmGSTF2	121	KFRGLTPDQEVVESNLKKLDSVLAIYESHLASQDYLAGSFFSLADLSHVPYLHYLINVAK	180
SmGSTF1	181	KGDVVTSSKKNVSAWWEKISSRPAWQEVVAAAAAAP	215
SmGSTF2	181	KGDVVTSSKKNVSAWWEKISSRPAWQEVVAAAAAAP	215

图 1 *SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 的氨基酸序列
Fig. 1 Amino acid sequence of *SmGSTF1* and *SmGSTF2* (Gray means different amino acids).

异，氨基酸序列相似性为 98.14%。通过保守结构域分析发现，扩增得到的 2 个基因都具有 *Phi* 类 GST 的保守结构域，说明我们扩增得到的是 *Phi* 类 GST 基因。*SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 基因组序列全长都是 768 bp，都含有 2 个内含子，2 个内含子长度都为 60 bp。

2.2 江南卷柏 *Phi* 类 GST 基因的系统发生关系分析

将江南卷柏 *Phi* 类 GST 和苔藓植物小立碗藓 *Physcomitrella patens*、裸子植物油松 *Pinus tabulaeformis*、单子叶植物水稻 *Oryza sativa*、以及双子叶植物拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 和毛果杨 *Populus trichocarpa* 的 *Phi* 类 GST 共同进行系统发生分析。系统发育树显示江南卷柏的两个 *Phi* 类 GST 与其他物种的 *Phi* 类 GST 聚在一起，而且其位于系统发育树的内部，说明本研究扩增得到的 2 个基因为 *Phi* 类 GST (图 2)。*SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 聚在一起，说明 *SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 是在江南卷柏与其他物种分化之后通过基因重复产生的。

2.3 江南卷柏 *SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 基因的组织表达模式分析

采用半定量 RT-PCR 方法研究 *SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 基因在江南卷柏不同组织 (根、茎和叶) 中的表达分布。研究发现 *SmGSTF1* 和

SmGSTF2 基因在江南卷柏根、茎和叶中均表达，且这 2 个基因在所有的循环中都有表达 (图 3)，

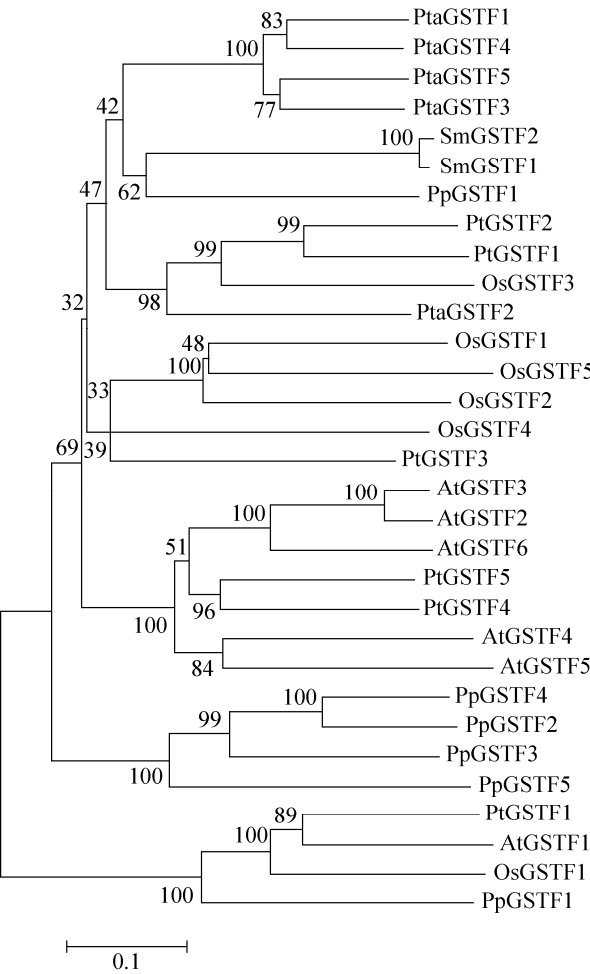


图 2 *Phi* 类 GST 的系统发生分析
Fig. 2 Phylogenetic relationships of *Phi* type GST.

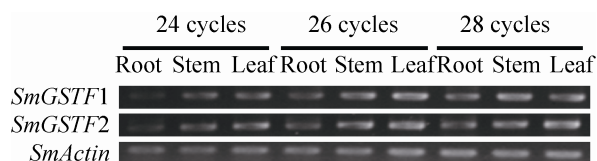


图3 江南卷柏 *SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 基因在不同组织的表达模式

Fig. 3 Expression pattern of the *SmGSTF1* and *SmGSTF2* gene in various tissues of *S. moellendorffii*.

说明 *SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 可能是组成型表达基因, 在江南卷柏的生长发育过程中发挥着重要作用。

2.4 江南卷柏 *SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 蛋白的三维结构

利用 SWISS-MODEL 网站模拟江南卷柏 *SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 的三维结构 (图 4A)。优化后的构象用 Profile-3D 进行校验, 可以看出绝大部分氨基酸残基得分都是正值 (图 4B), 位于合理的范围, 表明模拟的结构具有比较高的可信度。*SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 的三维结构包括 2 个结构域: 由 α 螺旋和 β 折叠组成的 N 末端结构域 (N-domain) 以及由 6 个 α 螺旋组成的 C 末端结构域 (C-domain)。蛋白结构比较发现 2 个蛋白的结构高度相似。

2.5 江南卷柏 *SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 重组蛋白的表达和纯化

将重组表达载体 pET30a/*SmGSTF1* 和 pET30a/*SmGSTF2* 分别转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞, 经 IPTG 诱导, SDS-PAGE 检测发现 *SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 重组蛋白在大肠杆菌中可溶性表达 (图 5)。将重组蛋白经 Ni 柱亲和层析纯化并进行蛋白凝胶电泳, SDS-PAGE 结果显示重组蛋白的分子量与预测的 *SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 蛋白大小一致, 而且杂带较少, 表明纯化蛋白的纯度较高。

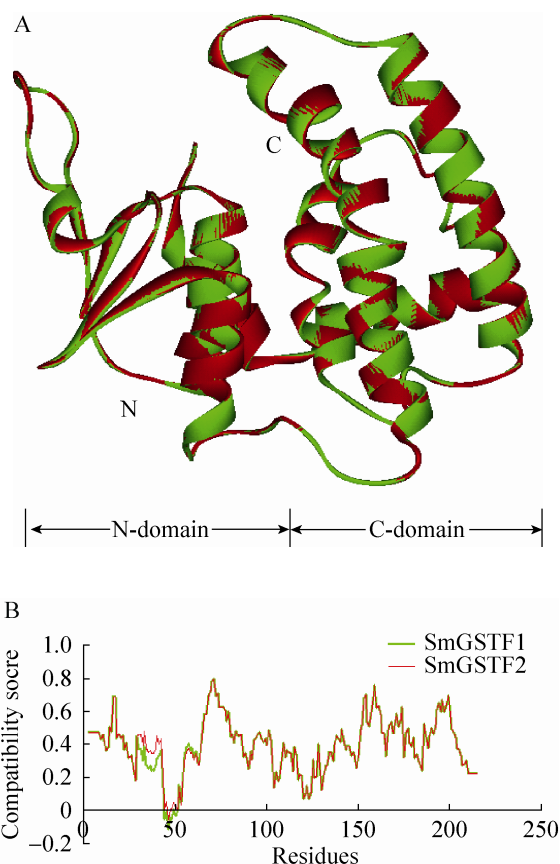


图4 *SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 蛋白三维结构的比较
Fig. 4 Structure modelling of *SmGSTF1* and *SmGSTF2*. (A) Structural comparison of *SmGSTF1* (green) and *SmGSTF2* (red), N: N-terminus; C: C-terminus. (B) Evaluation of the structure of *SmGSTF1* and *SmGSTF2* by Profile-3D program.

2.6 *SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 蛋白的底物活性分析

SmGSTF1 和 *SmGSTF2* 蛋白对不同底物的催化活性如表 2 所示, *SmGSTF1* 和 *SmGSTF2* 对 CDNB、NBD-Cl 和 NBC 都具有酶学活性, 对 DCNB 和 DHA 没有催化活性。另外 *SmGSTF1* 对 Fluorodi 和 Cum-OOH 有活性, 而 *SmGSTF2* 对它们没有活性。我们发现, 同一蛋白对不同底物的活性相差很大, 如 *SmGSTF2* 对 CDNB

的活性是其对 NBC 的 22.3 倍。不同蛋白对同一底物的活性变化也很大,例如,SmGSTF1 和 SmGSTF2 对 CDNB 的活性相差不大,而 SmGSTF1 对 NBC 的活性是 SmGSTF2 的 14.67 倍。

2.7 SmGSTF1 和 SmGSTF2 蛋白的动力学分析

分别以 GSH 和 CDNB 为底物,对 SmGSTF1 和 SmGSTF2 蛋白进行酶动力学分析,结果如表 3 所示。米氏常数 K_m 表示酶对底物的亲和力,我们发现 SmGSTF1 和 SmGSTF2 蛋白对 GSH 的 K_m 值远小于它们对 CDNB 的 K_m 值,说明它们对 GSH 比 CDNB 有更高的亲和力,且 SmGSTF1 相比于 SmGSTF2 对 GSH 有更高的亲和力。 k_{cat}/K_m 表示酶对底物的催化效率,我们发现,SmGSTF1 对 GSH 的催化效率是 SmGSTF2 的 1.94 倍,而它们对 CDNB 的催化效率没有差别。

2.8 SmGSTF1 和 SmGSTF2 蛋白的 pH 依赖性和温度依赖性分析

以 CDNB 和 GSH 为底物,对 SmGSTF1 和 SmGSTF2 蛋白进行 pH 依赖性分析,结果如图 6 所示。pH 依赖性显示,在 pH 5.0–8.0 时,其催化活性逐渐升高,在 pH 7.0–8.5 时,两个

蛋白都可以保持 80% 以上的相对活性,且在 pH 8.0 时达到最高活性,pH 9.5 时仍都能保持 40% 以上的相对活性,说明 SmGSTF1 和 SmGSTF2 蛋白在偏碱性的条件下有更高的催化作用。

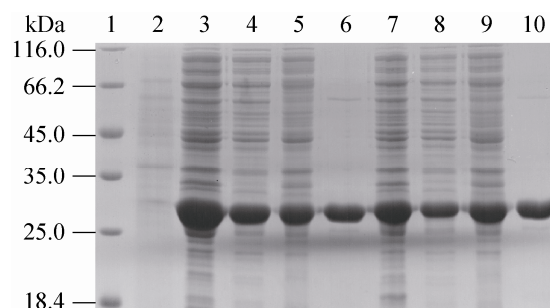


图 5 SmGSTF1 和 SmGSTF2 蛋白在大肠杆菌 BL21 中的表达和纯化

Fig. 5 Overexpression and purification of recombinant SmGSTF1 and SmGSTF2. 1: protein marker; 2: negative control; 3 and 7: total cellular extracts from induced bacteria containing recombinant SmGSTF1 and SmGSTF2, respectively; 4 and 8: supernatant after ultrasonication and centrifugation of cells expressing recombinant SmGSTF1 and SmGSTF2, respectively; 5 and 9: cell pellet after ultrasonication and centrifugation of cells expressing recombinant SmGSTF1 and SmGSTF2, respectively; 6 and 10: the purified recombinant SmGSTF1 and SmGSTF2, respectively.

表 2 SmGSTF1 和 SmGSTF2 蛋白的酶学活性

Table 2 Specific enzymatic activities of the recombinant SmGSTF1 and SmGSTF2 towards different substrates

GST	Specific activities ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$)						
	CDNB	NBD-Cl	DCNB	NBC	Fluorodifen	Cum-OOH	DHA
SmGSTF1	0.51 ± 0.02	0.72 ± 0.03	n.d.	0.44 ± 0.01	0.73 ± 0.04	0.07 ± 0.01	n.d.
SmGSTF2	0.67 ± 0.03	0.38 ± 0.02	n.d.	0.03 ± 0.01	n.d.	n.d.	n.d.

Values shown are $\bar{x} \pm s$, calculated from three replicates, n.d. represents no detected.

表 3 SmGSTF1 和 SmGSTF2 蛋白对 GSH 和 CDNB 的动力学

Table 3 Kinetic constants of SmGSTF1 and SmGSTF2 towards GSH and CDNB (Values shown are $\bar{x} \pm s$, calculated from three replicates)

GST	GSH			CDNB		
	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (mmol/L \cdot s)	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (mmol/L \cdot s)
SmGSTF1	0.07 ± 0.01	0.66	9.77	2.11 ± 0.09	1.18	0.56
SmGSTF2	0.10 ± 0.01	0.49	5.04	5.07 ± 0.12	2.82	0.56

以 CDNB 为底物,检测 SmGSTF1 和 SmGSTF2 蛋白在不同温度下的催化活性,温度依赖性结果如图 7 所示,我们发现 SmGSTF1 和 SmGSTF2 蛋白在较高的温度下有比较高的催化活性,在 15–45 °C 的范围内,SmGSTF1 和 SmGSTF2 蛋白的催化活性不断增高。在 40–55 °C 时,两种蛋白都保持了 80% 以上的相对活性,并在 45 °C 时达到最高活性,且在 65 °C 也仍保持 40% 以上的相对活性。

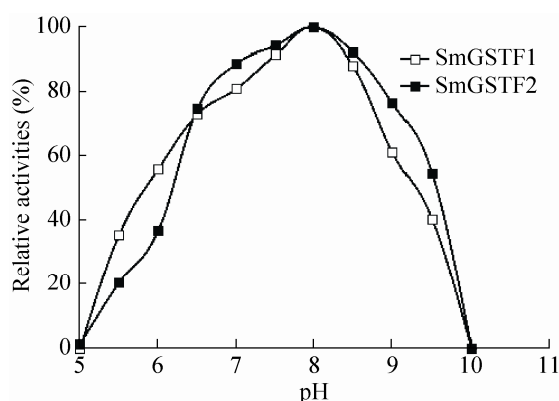


图 6 SmGSTF1 和 SmGSTF2 蛋白在不同 pH 下的活性

Fig. 6 Catalytic activity of SmGSTF1 and SmGSTF2 under different pH conditions.

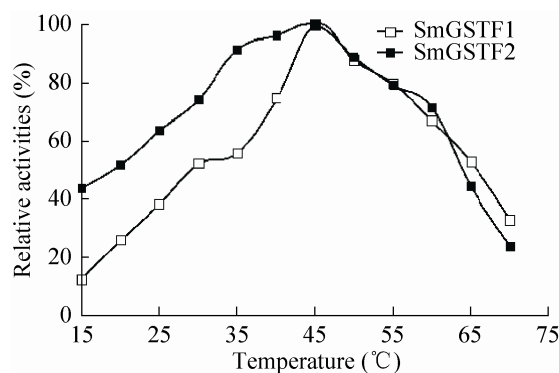


图 7 SmGSTF1 和 SmGSTF2 蛋白在不同温度下的活性

Fig. 7 Catalytic activity of SmGSTF1 and SmGSTF2 under different temperature conditions.

3 讨论

谷胱甘肽转移酶在植物体内发挥着重要作用,如响应环境胁迫,细胞信号转导和抵抗病原菌入侵等^[22-26]。根据我们以前的研究发现,在双子叶植物毛果杨中共有 9 个 Phi 类 GST 基因,单子叶植物水稻中有 17 个 Phi 类 GST 基因,裸子植物油松中有 7 个 Phi 类 GST 基因,苔藓植物小立碗藓中有 10 个 Phi 类 GST 基因^[16-17],而本研究中江南卷柏只有两个 Phi 类 GST 基因,说明相对于其他类型植物,蕨类植物可能需要更少的 Phi 类 GST 基因。另外,在毛果杨的 9 个 Phi 类 GST 基因中有 7 个是组成型表达^[11],油松中的 7 个 Phi 类 GST 基因都是组成型表达^[16],本研究克隆到的 2 个江南卷柏 Phi 类 GST 基因在根、茎和叶中均有表达,可能是组成型表达基因,预示着 Phi 类 GST 基因可能在江南卷柏生长发育过程中发挥着重要的作用。

系统发生关系分析发现,SmGSTF1 和 SmGSTF2 在进化树上聚在一起,而且两个基因的序列高度相似,氨基酸序列相似性为 98.14%,表明它们可能是在江南卷柏与其他类型植物分化之后最近通过基因重复产生的,然而蛋白活性分析发现,SmGSTF1 蛋白对 CDNB、NBD-Cl、NBC、Fluorodifen 和 Cum-OOH 都有活性,而 SmGSTF2 蛋白只对 CDNB、NBD-Cl 和 NBC 有活性,说明这两个蛋白的底物谱已经发生了分化。对 NBD-Cl 的催化活性,SmGSTF1 是 SmGSTF2 的 1.89 倍,对 NBC 的催化活性,SmGSTF1 是 SmGSTF2 的 14.67 倍,蛋白生化活性差异预示着 SmGSTF1 和 SmGSTF2 存在着功能分化。

酶动力学分析发现,SmGSTF1 蛋白对

CDNB 的亲合力是 SmGSTF2 的 2.4 倍,然而由于 SmGSTF1 对 CDNB 的转换数 k_{cat} 值比 SmGSTF2 高,导致两种蛋白对 CDNB 的催化效率 k_{cat}/K_m 值没有差别,说明在 SmGSTF1 和 SmGSTF2 对 CDNB 的催化反应中,与底物结合以及与底物结合后所发生的电子转移或者产物的释放速率对于两个蛋白的催化功能都很重要。

蕨类植物是最早脱离水体束缚,最早适应陆地生态环境和最早出现维管组织的类群。蕨类植物从水生到陆生,体内必然存在一套机制来适应复杂的陆地环境。对 SmGSTF1 和 SmGSTF2 在不同 pH 和温度条件下进行活性分析发现,它们在 pH 6.0–9.5,以及 30–65 °C 范围内均具有较高的催化活性,表明这两个蛋白能在比较宽的环境变化条件下发挥功能,预示着 SmGSTF1 和 SmGSTF2 对于江南卷柏适应复杂的陆地环境具有重要作用。

REFERENCES

- [1] Weng JK, Tanurdzic M, Chapple C. Functional analysis and comparative genomics of expressed sequence tags from the lycophyte *Selaginella moellendorffii*. BMC Genom, 2005, 6(1): 85.
- [2] Cao Y, Tan NH, Chen JJ, et al. Bioactive flavones and biflavones from *Selaginella moellendorffii* Hieron. Fitoterapia, 2010, 81(4): 253–258.
- [3] Wan DR, Chen KL, Zhan YH. Investigations and studies on medicinal plants from *Selaginellaceae* in Hubei province. China J Mater Med, 2005, 30(19): 1507–1510 (in Chinese).
万定荣, 陈科力, 詹亚华. 湖北省卷柏科药用植物调查与研究. 中国中药杂志, 2005, 30(19): 1507–1510.
- [4] Marrs KA. The functions and regulation of glutathione *S*-transferases in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1996, 47(1): 127–158.
- [5] Edwards R, Dixon DP, Walbot V. Plant glutathione *S*-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. Trends Plant Sci, 2000, 5(5): 193–198.
- [6] Dixon DP, Laphorn A, Edwards R. Plant glutathione transferases. Genome Biol, 2002, 3(3): 3004.1–3004.10.
- [7] Dai LL, Ma JN, Ma MY, et al. Characterisation of GST genes from the Chinese white pine beetle *Dendroctonus armandi* (Curculionidae: Scolytinae) and their response to host chemical defence. Pest Manag Sci, 2016, 72(4): 816–827.
- [8] Liu HJ, Tang ZX, Han XM, et al. Divergence in enzymatic activities in the soybean GST supergene family provides new insight into the evolutionary dynamics of whole-genome duplicates. Mol Biol Evol, 2015, 32(11): 2844–2859.
- [9] Yang GY, Wang YC, Xia DA, 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. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2014, 117(1): 99–112.
- [10] Roncalli V, Cieslak MC, Passamaneck Y, et al. Glutathione *S*-transferase (GST) gene diversity in the crustacean *Calanus finmarchicus*—contributors to cellular detoxification. PLoS ONE, 2015, 10(5): e0123322.
- [11] Lan T, Yang ZL, Yang X, et al. Extensive functional diversification of the *Populus* glutathione *S*-transferase supergene family. Plant Cell, 2009, 21(12): 3749–3766.
- [12] Thom R, Cummins I, Dixon DP, et al. Structure of a tau class glutathione *S*-transferase from wheat active in herbicide detoxification. Biochemistry, 2002, 41(22): 7008–7020.
- [13] Basantani M, Srivastava A. Plant glutathione transferases—a decade falls short. Canad J Bot, 2007, 85(5): 443–456.
- [14] Liu XF, Li JY. Characterization of an ultra-violet

- inducible gene that encodes glutathione *S*-transferase in *Arabidopsis thaliana*. Acta Genet Sin, 2002, 29(5): 458–460 (in Chinese).
- 刘新仿, 李家洋. 紫外线强烈诱导的谷胱甘肽转移酶基因的功能鉴定. 遗传学报, 2002, 29(5): 458–460.
- [15] Karavangeli M, Labrou NE, Clonis YD, et al. Development of transgenic tobacco plants overexpressing maize glutathione *S*-transferase I for chloroacetanilide herbicides phytoremediation. Biomol Eng, 2005, 22(4): 121–128.
- [16] Lan T, Wang XR, Zeng QY. Structural and functional evolution of positively selected sites in pine glutathione *S*-transferase enzyme family. J Biol Chem, 2013, 288(34): 24441–24451.
- [17] Liu YJ, Han XM, Ren LL, et al. Functional divergence of the glutathione *S*-transferase supergene family in *Physcomitrella patens* reveals complex patterns of large gene family evolution in land plants. Plant Physiol, 2013, 161(2): 773–786.
- [18] Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione *S*-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem, 1974, 249(22): 7130–7139.
- [19] Ricci G, Caccuri AM, Lobello M, et al. Colorimetric and fluorometric assays of glutathione transferase based on 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. Analyt Biochem, 1994, 218(2): 463–465.
- [20] Edwards R, Dixon DP. Plant glutathione transferases. Methods Enzymol, 2005, 401: 169–186.
- [21] Yuen WK, Ho JW. Purification and characterization of multiple glutathione *S*-transferase isozymes from Chironomidae larvae. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2001, 129(2/3): 631–640.
- [22] 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 part II. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1995, 30(6): 521–600.
- [23] Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005, 45: 51–88.
- [24] Zeng XH, Morgenstern R, Nyström AM. Nanoparticle-directed sub-cellular localization of doxorubicin and the sensitization breast cancer cells by circumventing GST-Mediated drug resistance. Biomaterials, 2014, 35(4): 1227–1239.
- [25] 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.
- [26] Fletcher ME, Boshier PR, Wakabayashi K, et al. Influence of glutathione-*S*-transferase (GST) inhibition on lung epithelial cell injury: role of oxidative stress and metabolism. Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol, 2015, 308(12): L1274–L1285.

(本文责编 陈宏宇)