

条斑紫菜 PyMGST3 基因克隆、表达及功能分析*

佟少明 陈禹先 张 晶 侯和胜

(辽宁师范大学生命科学院辽宁省植物生物工程重点实验室 大连 116081)

摘要 微粒体谷胱甘肽硫转移酶(microsomal glutathione S-transferases, MGST)作为膜结合蛋白之一,具有谷胱甘肽转移酶和过氧化物酶活性,在细胞及细胞器的抗氧化胁迫中扮演着重要角色,但 MGST 基因在紫菜(*Pyropia yezoensis*)中的鉴定与分析还未见报道。本文采用 RACE-PCR 方法首次克隆了条斑紫菜的微粒体 GST 基因的全长,命名为 PyMGST3,同时利用生物信息学及实时定量 PCR 方法对该基因的序列及诱导表达特征进行了分析,并通过原核表达进一步验证了该基因的酶活性及在抗氧化胁迫中的作用。结果表明,PyMGST3 基因的 cDNA 序列全长为 681bp,其中开放阅读框长度 417bp,5'-UTR 长度 80bp,3'-UTR 长度 184bp,在受到 Cd²⁺和 Cu²⁺胁迫时,上调表达;PyMGST3 蛋白具有三个跨膜结构域及跨膜疏水区,与皱波角叉菜的 MGST 蛋白相似性最高为 60%,与其它藻类的 MGST 蛋白的相似性较低;在大肠杆菌中表达及纯化后的 PyMGST3 蛋白具有谷胱甘肽转移酶活性;此外,超表达 PyMGST3 蛋白的重组菌株提高了对抗 Cd²⁺和 Cu²⁺毒害的能力。这些结果暗示 PyMGST3 基因很可能在条斑紫菜遭遇重金属等引起的氧化胁迫时起到重要的保护作用。

关键词 条斑紫菜;微粒体 GST;重金属;原核表达

中图分类号 Q78 **doi:** 10.11693/hyhz20160700160

谷胱甘肽硫转移酶(Glutathione S-transferases, 简称 GST)是一类由多基因编码的具有多种生理功能的同工酶,在细胞内能催化谷胱甘肽的巯基(-SH)与疏水的异源物质结合,使亲电子化合物转变成亲水物质,从而增加其可溶性,有利于将异源物质排出细胞,在生物解毒过程中起到至关重要的作用。GST 广泛存在于哺乳动物、鸟类、昆虫、植物和各种微生物等生物体中。已发现的有活性的 GST 主要有三种类型(Hayes *et al.*, 2005),其中前两类型分别存在于细胞质及线粒体中,为可溶性的 GST 蛋白,其家族成员和原核生物的 GST 蛋白有相似的立体结构,认为它们有共同的起源。第三种类型是存在于微粒体中的 MGST(microsomal glutathione S-transferases),为膜结合蛋白,在进化上不同于前者,被认为是独立分化出来的一类蛋白(Bresell *et al.*, 2005)。目前,在模式植物拟南芥的基因组中共发现 55 个 GST 基因,其中 54 个属于细胞质或线粒体型的可溶性蛋白,只有 1 个微

粒体 GST 基因,但在其它物种中也可能含有多个微粒体 GST 基因(Edwards *et al.*, 2005)。

微粒体 GST 成员组成了 MAPEG(membrane associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism)超基因家族,该家族成员主要参与花生四烯酸及谷胱甘肽的生物代谢过程(Jakobsson *et al.*, 1999a)。人类的 MAPEG 家族共分为三个组,包括六个成员。第一组含有 5-脂肪氧合酶激活蛋白(5-lipoxygenase activating protein, FLAP)和白三烯 C4 合酶(leukotriene C4 synthase, LTC₄)₂ 个成员,主要参与白三烯的生物合成(Jakobsson *et al.*, 1996);第二组含前列腺素 E 合酶(prostaglandin E synthase, PGES),主要催化前列腺素 E 的合成(Jakobsson *et al.*, 1999b);第三组包含 MGST1、MGST2 和 MGST3,具有谷胱甘肽转移酶及过氧化物酶活性(Jakobsson *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2015)。

目前已经分离、纯化得到的三类 MGST 在结构、蛋白质分子性质、生物学功能等方面都有一定的区别

* 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室开放项目, KF2012No06 号。佟少明, 副教授, E-mail: tongsm@163.com
通讯作者: 侯和胜, 教授, 博士生导师, E-mail: hesheng_hou@126.com
收稿日期: 2016-07-27, 收修改稿日期: 2016-10-05

(Lee *et al.*, 1999), 其中人类的 MGST1 和 PGES 在蛋白质序列上有 38% 的相似性, 形成共同的分支, 但在功能上相差很大(Thorén *et al.*, 2003)。同样, MGST2 与 FLAP 和 LTC4 合成酶在氨基酸序列上有更近的相似关系, 而 MGST3 形成另外单独的分支(Bresell *et al.*, 2005)。MGST 各成员的分子质量一般较小, 大约为 17KDa, 正常情况下 MGST 会形成同源三聚体, 三聚体的每个亚基相互依存, 都含有一个半胱氨酸残基, 通过巯基烷化剂, 巯基/二硫键交换, 蛋白水解, 热激活以及氧化应激等方式激活后, 参与并加速毒性物质的代谢(Jakobsson *et al.*, 1996)。MGST 是生物体内重要的解毒酶系之一, 对重金属等环境污染反应灵敏, 具有降解毒物及抗氧化等作用, 也常被作为水体污染的指示分子之一(Guo *et al.*, 2014)。

本研究采用 RACE 技术, 从条斑紫菜的丝状体中克隆获得微粒体 GST(PyMGST3) 的 cDNA 全长序列, 分析了在重金属胁迫下该基因的表达水平。尝试将 PyMGST3 进行原核表达后, 验证其生物学活性和功能, 为条斑紫菜抵抗重金属毒害作用机理的研究提供实验和理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)丝状体由辽宁省植物生物工程重点实验室藻类培养室保存, 实验前接种到 PES 培养液中, 置于环境温度为 18℃, 光强为 50μmol/(m²·s), 光周期为 14/10h 的条件下扩大培养。

以 PES 培养液作为对照, 在 PES 培养液中分别添加 CdCl₂ 及 CuSO₄ 溶液, 使培养液中的 Cd²⁺ 及 Cu²⁺ 的终浓度分别达到 0.5mg/L 及 1mg/L, 将扩大培养后的条斑紫菜的丝状体分别接种到 PES 培养液及含有 Cd²⁺ 及 Cu²⁺ 的培养液中, 分别培养 1、2、4、8、12 h 后取样, 每个处理做三次重复。

1.2 条斑紫菜总 RNA 提取及 cDNA 合成

采用 RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue 试剂盒(TaKaRa, 大连)进行条斑紫菜总 RNA 的提取, 提取过程完全参照说明书进行; 总 RNA 用 DNase (TaKaRa, 大连)去除剩余的基因组 DNA 后, 采用 Nanodrop 2000C 核酸蛋白检测仪和 1%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 浓度及完整性; cDNA 合成采用 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, 大连)试剂盒, 按照使用说明书进行操作, 反转录后合成的 cDNA 保存在-20℃作为基因克隆和实时定量

PCR 的模板备用。

1.3 PyMGST3 基因全长 cDNA 的克隆及测序

在 NCBI 的 EST 数据库中(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/>)搜索条斑紫菜 GST 基因 EST 序列, 将搜索结果下载存盘后, 采用 Sequencher 软件进行序列拼接, 获得较长的拼接 EST 序列, 利用 NCBI 的 CD-search 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)验证该拼接片段编码的氨基酸序列是否含有 GST 基因编码的功能域。以含有 GST 功能域的 cDNA 序列为模板, 设计合成正反向引物 PyMGST3-F 及 PyMGST3-R(见表 1)进行 PCR 扩增。回收 PCR 产物进行克隆和测序。

以获得的片段为模板, 设计合成 5'和 3'端的 outer 和 inner 特异性引物(见表 1), 采用 Clontech 公司的 SMARTer™ RACE 5'/3'Kit 试剂盒, 按试剂盒的操作指南进行实验。PCR 扩增获得该基因的 5'及 3'端的 cDNA 片段, 扩增产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳分离, 切胶回收目的片段, 克隆后送上海生工生物工程有限公司测序。

表 1 引物名称及序列
Tab.1 Name and sequence of the primers

引物名称	序列(5'-3')
基因克隆	
PyMGST3-F	ATGACGTCGGCTTTTGTC
PyMGST3-R	ACGACAGCAGCACCTTAC
PyMGST3-3'-outer	TGTGTTTCTTCTAATCGGCGG
PyMGST3-3'-inner	TTCTTCTAATCGGCGGGCTGAG
PyMGST3-5'-outer	TGACCTTGTTCTCGTACAGCAGCG
PyMGST3-5'-inner	AACGCCATCCACATCAACACGAACCAGT
实时荧光 PCR	
qPyMGST3-F	GGTCTGCACGCAAGGAAC
qPyMGST3-R	CCGCCGATTAGAAGAAACA
qPyActin-F	CGCCAAGGACGAGTATGTG
qPyActin-R	TCCGAGTAGAAAGCGTGGTG

1.4 PyMGST3 基因的序列分析

将测序获得的 GST 基因序列拼接后, 提交到 NCBI。采用 ORF Finder 程序在线分析开放阅读框; 同时采用 SignalP 3.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>)、TMHMM 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)、ProtScale(<http://web.expasy.org/protscale/>)软件分别进行蛋白质的信号肽、跨膜结构域和氨基酸疏水区域的分析; 利用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的 Blast P 程序进行相似蛋白查找, 并采用 Clustal X 软件对预测的氨基酸序列进行多序列比对; 采用 SWISS-MODEL 工作平台 (

2.2 PyMGST3 蛋白的跨膜结构域、疏水区域、信号肽及三级结构预测

PyMGST3 作为膜结合蛋白, 一般具有一个以上的跨膜结构域, TMHMM 2.0 Server 分析的结果如图 2a 所示, PyMGST3 蛋白存在 3 个跨膜结构域, 第一个跨膜区域在第 10—30 氨基酸处, 第二个跨膜区域在第 74—96 氨基酸处, 第三个跨膜区域在 115—133 氨基酸处。另外, 位于 1—9 及 97—114 区域内的氨基酸位于膜外侧, 位于 31—73 区域内的氨基酸位于膜内侧。

跨膜结构域的疏水跨膜区一般由 20 个左右的疏水性氨基酸残基组成, ProtScale 在线分析 PyMGST3 蛋白的疏水性的结果如图 2b 所示, PyMGST3 蛋白具有 3 个明显的疏水区域, 与推测形成跨膜结构的氨基酸位置一致, 这也和跨膜结构域的预测结果相互印证。

SignalP 3.0 Server 对 PyMGST3 蛋白的信号肽分析的结果表明, 在第 36 与 37 位氨基酸之间可能存在信号肽剪切位点(图 2c), 最大切割位点概率为 0.766, 可以推测 PyMGST3 蛋白的 N 端 1—36 个氨基酸可能为信号肽序列。PyMGST3 蛋白一般定位于微粒体, 其 N-端含有 36 个氨基酸作为跨膜信号, 在引导膜蛋白跨膜时, 由于疏水跨膜区的存在可以使膜蛋白停留在细胞膜中。

PyMGST3 蛋白的三级结构预测在 SWISS-MODEL 平台上在线完成, 根据序列相似性共发现了 26 个模板, 我们选择了与 PyMGST3 序列相似性最高的 Leukotriene C4 synthase(模板号为 4jrz.1.A)作为模板来模拟 PyMGST3 蛋白的三级结构(图 2d), 其中 GMQE(global model quality estimation)值为 0.61, 也说明了预测的三级结构相对准确。

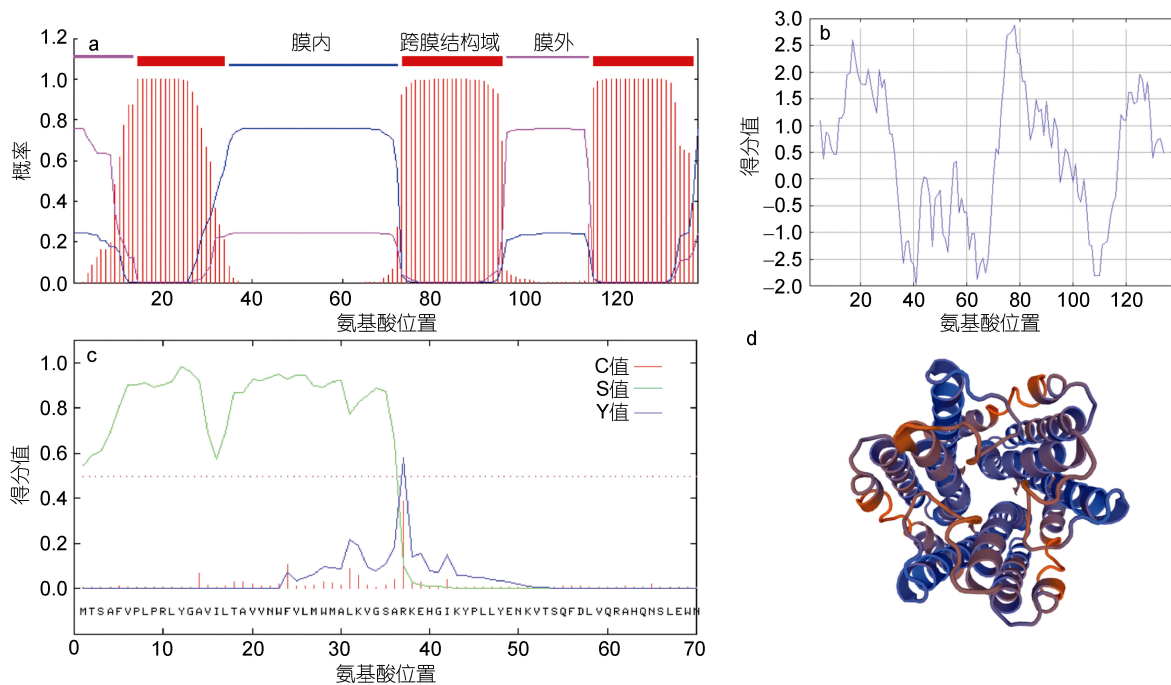


图 2 PyMGST3 跨膜结构域、疏水性、蛋白信号肽及三级结构预测

Fig.2 The prediction of transmembrane domains, hydrophobicity profile, signal peptide, and three-dimensional structure in PyMGST3
注: 子图 a: PyMGST3 跨膜结构域预测; b: PyMGST3 疏水性分析; c: PyMGST3 蛋白信号肽预测; d: PyMGST3 蛋白的三级结构预测

2.3 PyMGST3 蛋白的多序列比对

将条斑紫菜 PyMGST3 基因编码区推测的氨基酸序列提交到 NCBI 中采用 Blast P 程序进行相似性搜索。结果表明, 与该序列相似性高的其它物种 GST 均为 MGST3 家族成员。选择了 6 个相似性较高的其它藻类的 MGST 蛋白, 用 ClustalX 进行多序列比对分析。结果如图 3 所示, 在所选取的序列中, 与

PyMGST3 蛋白相似性最高的是皱波角叉菜 (*Chondrus crispus*), 序列的相似性为 60%, 其次为衣藻相似性为 39%, 与其它藻类的相似性在 25%—35% 之间, 与细小微胞藻的相似性最低为 25%。

2.4 PyMGST3 基因在 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 胁迫条件下的表达变化

采用实时荧光定量 PCR 方法, 检测了条斑紫

菜丝状体的 PyMGST3 基因在 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 胁迫下的转录水平变化。结果表明: 在 $0.5mg/LCd^{2+}$ (图 4a) 的条件下, PyMGST3 基因的表达逐步上升, 4h 表达量为对照组的 3 倍, 8h 表达量最高, 是对照表达量的 7 倍, 随后下降。在 $1mg/LCu^{2+}$ (图 4b) 的处理下,

PyMGST3 基因的表达变化趋势与 $0.5mg/LCd^{2+}$ 处理的表达变化类似, 不同的是在处理 1h 后, PyMGST3 基因的表达量变化就已经是对照组的 2 倍以上, 8h 时表达量达到最高, 是对照表达量的 6 倍, 随后下降。

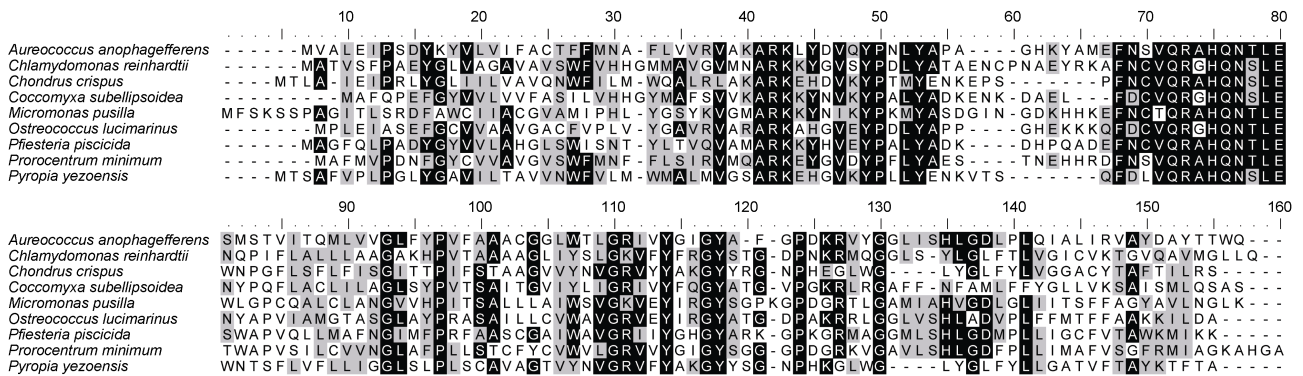


图 3 PyMGST3 蛋白与其他藻类 MGST 蛋白的多序列比对

Fig.3 Multiple alignment of PyMGST3 and MGSTs from other species

注: *Aureococcus anophagefferens* (褐潮藻): EGB09335.1; *Chlamydomonas reinhardtii* (衣藻): XP_001703138.1; *Chondrus crispus* (皱波角叉菜): XP_005715962.1; *Coccomyxa subellipsoidea* (胶球藻): EIE25236.1; *Micromonas pusilla* (细小微胞藻): XP_003055323.1; *Ostreococcus lucimarinus* (绿色鞭毛藻): XP_001420836.1; *Pfiesteria piscicida* (有毒赤潮藻, 甲藻): ACU45089.1; *Prorocentrum minimum* (微小原甲藻): AFO84301.1; *Pyropia yezoensis* (条斑紫菜): KX447713

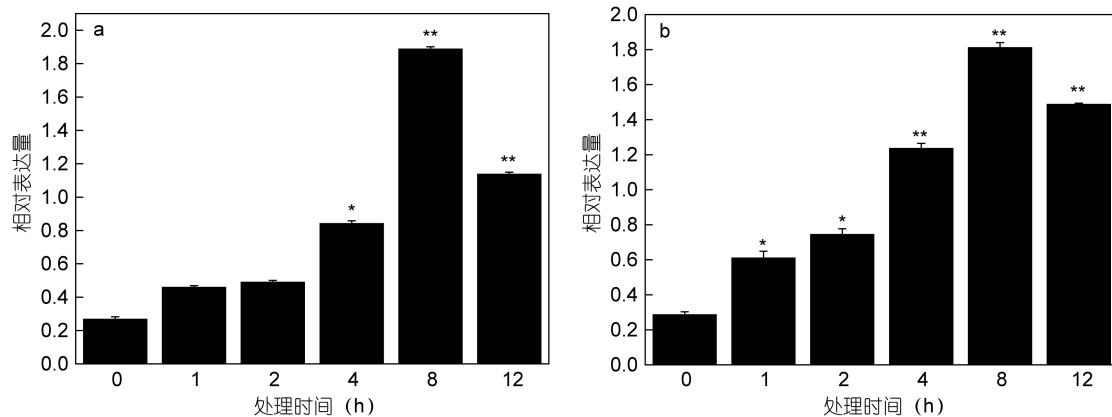


图 4 PyMGST3 基因在 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 胁迫下不同时间(1、2、4、8 和 12h)的表达变化

Fig.4 The transcription levels of PyMGST3 at different time points under Cd^{2+} 和 Cu^{2+} stresses

注: 子图 a: Cd^{2+} 处理; b: Cu^{2+} 处理; *和**分别代表显著性差异($P<0.05$)和极显著性差异($P<0.01$)

2.5 纯化后的 PyMGST3 蛋白具有谷胱甘肽 S-转移酶活性

含有表达载体 pET-28a/PyMGST3 的 *E. coli* BL21(DE3)菌株经 IPTG 诱导表达 4h 后, 分别取表达产物进行 SDS-PAGE 检测(图 5)。结果表明, 与未诱导的对照组(图 5 中的 2 泳道)比对, IPTG 诱导的重组菌在 20KDa 左右出现一条特异的条带(图 5 中的 3、4 泳道), 在大约 21KDa 处成功表达了带有 His 标签的融合蛋白, 与预测的 PyMGST3 蛋白相对分子质量

15.3KDa 的结果相一致。

SDS-PAGE 电泳后, 将 PyMGST3 蛋白进行纯化, 用试剂盒进行谷胱甘肽 S-转移酶活性的测定, 结果显示, 酶活性为 $0.17\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。

2.6 PyMGST3 基因过表达提高了重组菌株的重金属耐受性

用较高浓度的 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 两种重金属离子处理 pET-28a/PyMGST3 重组菌和 pET-28a 空载体对照菌, 探索 pET-28a/PyMGST3 重组菌对这两种重金属离子

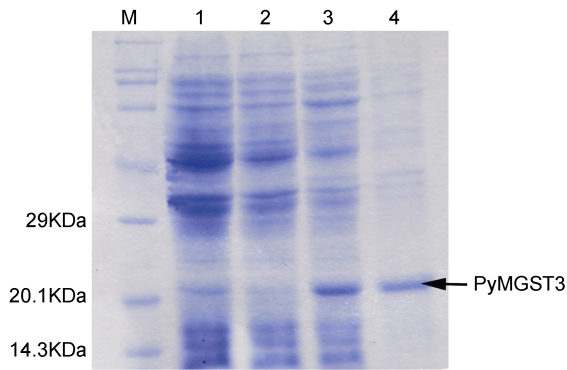


图5 PyMGST3融合蛋白在 *E. coli* BL21(DE3)中表达的 SDS-PAGE

Fig.5 SDS-PAGE of PyMGST3 fusion protein

注: 图中字符 M: 蛋白质分子量标准; 1: 未经 IPTG 诱导的 BL21(DE3)/pET-28a-PyMGST3; 2: 未经 IPTG 诱导的 BL21(DE3)/pET-28a; 3: 经 IPTG 诱导的 BL21(DE3)/pET-28a-PyMGST3; 4: 纯化后的 PyMGST3 蛋白

的耐受能力。结果表明, 培养液中不添加重金属时, 重组菌和对照菌的生长情况基本一致(图 6a)。在加入 $400\mu\text{mol/L Cd}^{2+}$ 和 $200\mu\text{mol/L Cu}^{2+}$ 后, 重组菌对两种重金属胁迫响应的生长曲线基本相似。但与对照菌相比, 二者的生长出现了明显的差异, 如图 6b 所示, 在 IPTG 诱导后的前 1h 内, 重组菌和对照菌生长差异不显著, 1h 后, 重组菌生长速度明显高于对照菌 ($P < 0.01$), 差异极显著。在处理 8h 和 9h 后, 重组菌生长进入平台期, 随后增长速度缓慢下降, 对照菌在 6h 左右进入平台期, 增长速度开始下降, 且下降幅度更大。

3 讨论

活性 GST 是一种多功能酶, 主要存在细胞质、线

粒体及微粒体中, 其中胞质 GST 的种类最多, 也是研究得最为深入的一类 GST。动物细胞的胞质 GST 分为 Alpha、Mu、Pi、Omega、和 Sigma 等类型, 植物细胞的胞质 GST 分为 Lambda、Phi、Zeta、Theta、Tau 和 DHAR 等类型, 其中 Tau 和 Phi 是植物特有的两种类型(Hu *et al*, 2016)。本文通过 RACE 技术, 克隆得到条斑紫菜的 PyMGST3 基因的全长 cDNA 序列, 经过序列的比对分析, 并结合蛋白质的跨膜结构域及疏水性等的分析, 表明我们分离到的条斑紫菜的 GST 基因作为一种新型的微粒体 GST 基因, 与其它物种的 MGST3 蛋白相似性很高, 因此命名该基因为 PyMGST3, 有关条斑紫菜的微粒体 GST3 基因的序列及功能研究还未见报道。先前的研究表明, 哺乳动物及高等绿色植物中的 MGST3 基因的保守结构域的模式为 F-N-C-[AIV]-Q-R-[AGS]-H-[AQ]-[NQ]-x(2)-E-x(2,3)-P, 本文克隆得到的 PyMGST3 蛋白也具有相似的保守结构域, 但是第二及第三位的氨基酸“N”及“C”分别被“D”及“L”所取代, 以及最后一位的“P”被“W”所取代。同样的氨基酸替代现象也在微小原甲藻 (*Prorocentrum minimum*) 的 PmMGST3 序列中发现, 如第三位的“C”被“S”所替代。因此, MGST3 基因保守结构域的模式应改写为 F-[DN]-[CSL]-[AIV]-Q-R-[AGS]-H-[AQ]-[NQ]-x(2)-E-x(2,3)-[PW]。

海洋生物暴露在 Cd^{2+} 等重金属的胁迫下, 可诱导机体产生大量的诸如 H_2O_2 、 O_2^- 等活性氧自由基, 引起生物体的氧化损伤, 机体抗氧化防御系统作为活性氧自由基平衡的重要调节体系, 在减轻或解除重金属等引起的氧化胁迫中扮演着重要角色, 也常被作为监测海洋重金属污染物的候选生物标记(陈晓

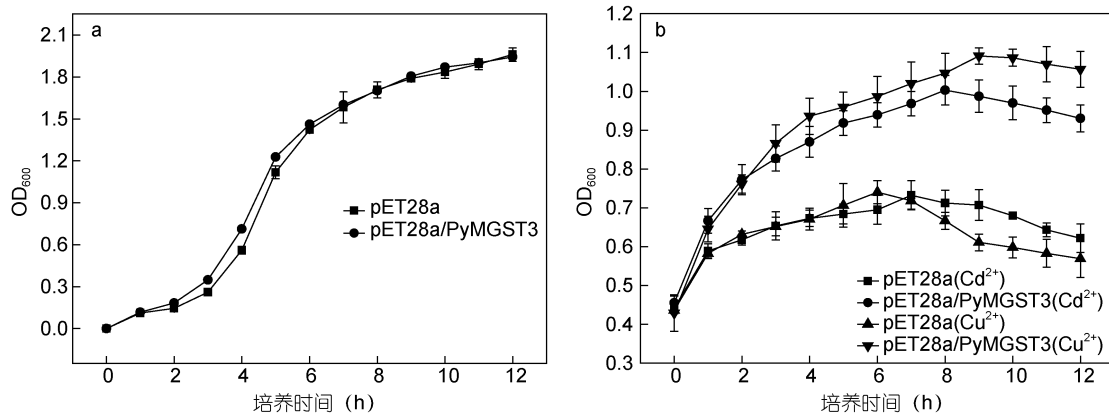


图6 不同大肠杆菌菌株 BL21(DE3)在不同条件下的生长曲线

Fig.6 Growth of different *E. coli* BL21 (DE3) cells under different conditions

注: 子图 a: 无 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 胁迫下, pET-28a/PyMGST3 重组菌和 pET-28a 空载体对照菌的生长曲线; b: 在 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 胁迫下, 经 IPTG 诱导后的 pET-28a/PyMGST3 重组菌和 pET-28a 空载体对照菌的生长曲线

聪等, 2015; Tiwari *et al.*, 2016)。GST 作为机体抗氧化防御系统的第二阶段的解毒酶一般是通过两种方式来对污染物的解毒: 一是催化还原型谷胱甘肽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; 二是 GST 的过氧化物酶活性能利用还原型谷胱甘肽向氢过氧化物发动亲核攻击, 使其还原为低毒的一元醇, 从而缓解重金属胁迫产生的氧化胁迫(Li *et al.*, 2017)。作为抗氧化酶 GST 家族成员之一, MGST 的主要作用也是清除氧化胁迫过程中产生的有毒物质(Hayes *et al.*, 2005), 且 MGST 多以脂溶性的亲电子化合物为底物, 比可溶性 GST 更易于与底物结合。此外, 凡由 P-450 氧化酶催化的外源性化合物都可以直接由 MGST 排出体外, 而可溶性 GST 的催化作用需要亲电子基团通过微粒体膜到胞浆才能得以实现(Regoli *et al.*, 2014; 郑英等, 2003), 因此, 微粒体 GST 相比之下可能比胞质 GST 去除污染物的效率更高。研究发现, 重金属胁迫下的 GST 基因均呈现先上升后下降的“毒物兴奋效应”的表达模式(顾海龙等, 2013), 但不同物种中的 GST 家族的不同成员对于不同的氧化胁迫都有各自不同的表达模式(Guo *et al.*, 2014)。在本研究中, 实时荧光定量表达分析发现, Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 胁迫均能使条斑紫菜丝状体的 PyMGST3 基因表达水平在短时间内升高(Cd^{2+} 4h, Cu^{2+} 1h), 且随时间的延长表达量增加, 随后下降(Cd^{2+} 12h, Cu^{2+} 12h), 说明 PyMGST3 基因很可能在参与清除 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 胁迫所产生的氧化胁迫中起作用。另外, 周向红等人(2011)用不同浓度铅处理条斑紫菜叶状体时, 发现胞质 PyGST 基因的转录表达也与 PyMGST3 基因呈现相似的结果, 推测 MGST 和可溶性 GST 协同作用来清除重金属离子等的毒害, 相信在进一步确定其调控位点后, 将为利用该基因提高藻类抵抗重金属污染的分子机制奠定基础。基于条斑紫菜 PyMGST3 基因对 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 的敏感性, 可以考虑将其作为环境污染指示分子之一用于环境污染的评估和监测。

GST 具有催化还原型谷胱甘肽(GSH)与 1-氯-2, 4-二硝基苯(CDNB)结合的能力, 在本研究中通过在大肠杆菌中表达并纯化的紫菜 PyMGST 蛋白的具有 GST 活性, 能催化 GSH 与 CDNB 的结合, 也说明了 PyMGST 是一个功能酶。另外, PyMGST3 的重组菌株对 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 胁迫的耐受性都显著高于对照菌, 表明由于外源 PyMGST3 基因的诱导表达, 降低或解除了重金属离子 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 对重组菌的毒性, 使其表

现出更强的重金属离子耐受能力。越来越多的研究结果表明, 超表达 GST 基因会增加生物体对抗重金属胁迫的能力, 如超表达水稻 GST 基因提高了转基因水稻抗 Cd^{2+} 的能力(Zhao *et al.*, 2009)。近年来, 随着重金属对土壤及水域污染的逐渐加重, 尝试通过超表达及异位表达氧化胁迫相关基因, 如 GST 及过氧化物酶(Catalase, CAT)等方法来增加植物体对重金属的吸收, 获得了抗重金属的转基因植物来增加对重金属离子的吸收, 以期通过生物修复的方法来减轻重金属的伤害, 但在研究中也发现在植物体获得重金属抗性的同时也会造成重金属在植物体内的大量积累, 使其应用受到了很大的限制。但最近的报道表明, 在烟草中(*Nicotiana tabacum*)超表达绿木霉(*Trichoderma virens*)GST 基因, 在使烟草获得了较强重金属抗性的同时, 没有增加重金属的富集(Dixit *et al.*, 2012)。这为利用 GST 基因来培育即抗重金属胁迫又没有富集的新品种提供了理论支持。

4 结论

MGST 是存在于除古细菌以外的所有原核及真核生物中的高度保守的基因, 本研究从条斑紫菜的丝状体中首次克隆得到 PyMGST3 基因, 该基因隶属于 MAPEG 超基因家族, 其编码蛋白与其他物种 MGST3 蛋白含有相似的结构域, 具有谷胱甘肽 S-转移酶活性。在 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 等重金属离子存在的环境中, PyMGST 基因上调表达, 减轻由重金属离子产生的氧化胁迫, 保护细胞免受伤害。MGST 在藻类及高等植物中除了参与抗氧化胁迫等生物代谢以外, 其他生物学功能的研究还有待于进一步深入。

参 考 文 献

- 陈晓聪, 张 冉, 李成华等, 2015. 菲律宾蛤仔(*Venerupis philippinarum*)对重金属 Hg^{2+} 的富集及相关生物标记物的识别. 海洋与湖沼, 46(4): 928—936
- 周向红, 易乐飞, 李信书等, 2011. 条斑紫菜谷胱甘肽 S-转移酶基因的克隆与表达分析. 水产学报, 35(9): 1354—1361
- 郑 英, 楼宜嘉, 2003. 微粒体谷胱甘肽 S-转移酶与药物代谢. 中国药学杂志, 38(7): 484—487
- 顾海龙, 沈伟良, 孙长森等, 2013. 低浓度 Cd^{2+} 长期胁迫对泥蚶抗氧化防御系统及 MDA 含量的影响. 海洋环境科学, 32(5): 741—745
- Bresell A, Weinander R, Lundqvist G *et al.*, 2005. Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily. The FEBS Journal, 272(7): 1688—1703
- Dixit P, Mukherjee P K, Ramachandran V *et al.*, 2012. Glutathione transferase from *Trichoderma virens* enhances cadmium tolerance without enhancing its accumulation in

- transgenic *Nicotiana tabacum*. PLoS One, 6(1): e16360
- Edwards R, Dixon D P, 2005. Plant glutathione transferases. *Methods in Enzymology*, 401: 169—186
- Guo R Y, Ebenezer V, Ki J S, 2014. *PmMGST3*, a novel microsomal glutathione S-transferase gene in the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*, is a potential biomarker of oxidative stress. *Gene*, 546(2): 378—385
- Hayes J D, Flanagan J U, Jowsey I R, 2005. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1): 51—88
- Hu B, Zhao J T, Lai B *et al*, 2016. *LcGST4* is an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene in *Litchi chinensis* Sonn. *Plant Cell Reports*, 35(4): 831—843
- Jakobsson P J, Mancini J A, Ford-Hutchinson A W, 1996. Identification and characterization of a novel human microsomal glutathione S-transferase with leukotriene C₄ synthase activity and significant sequence identity to 5-lipoxygenase-activating protein and leukotriene C₄ synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 271(36): 22203—22210
- Jakobsson P J, Mancini J A, Riendeau D *et al*, 1997. Identification and characterization of a novel microsomal enzyme with glutathione-dependent transferase and peroxidase activities. *Journal of Biological Chemistry*, 272(36): 22934—22939
- Jakobsson P J, Morgenstern R, Mancini J *et al*, 1999a. Common structural features of mapeg—a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Science*, 8(3): 689—692
- Jakobsson P J, Thorén S, Morgenstern R *et al*, 1999b. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 96(13): 7220—7225
- Lee S H, DeJong J, 1999. Microsomal GST-I: genomic organization, expression, and alternative splicing of the human gene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1446(3): 389—396
- Li D Z, Xu L, Pang S *et al*, 2017. Variable levels of glutathione S-transferases are responsible for the differential tolerance to metolachlor between maize (*Zea mays*) shoots and roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(1): 39—44
- Regoli F, Giuliani M E, 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine Environmental Research*, 93: 106—117
- Thorén S, Weinander R, Saha S *et al*, 2003. Human microsomal prostaglandin E synthase—1: purification, functional characterization, and projection structure determination. *Journal of Biological Chemistry*, 278(25): 22199—22209
- Tiwari V, Patel M K, Chaturvedi A K *et al*, 2016. Functional characterization of the tau class glutathione-S-transferases gene (*SbGSTU*) promoter of *Salicornia brachiata* under salinity and osmotic stress. *PLoS One*, 11(2): e0148494
- Xu Z B, Zou X P, Zhang N *et al*, 2015. Detoxification of insecticides, allechemicals and heavy metals by glutathione S-transferase SIGSTE1 in the gut of *Spodoptera litura*. *Insect Science*, 22(4): 503—511
- Zhao F Y, Liu W, Zhang S Y, 2009. Different responses of plant growth and antioxidant system to the combination of cadmium and heat stress in transgenic and non—transgenic rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51(10): 942—950

EXPRESSION AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF MICROSOMAL GLUTATHIONE S-TRANSFERASE GENE IN *PYROPIA YEZOENSIS* UNDER HEAVY METAL STRESSES

TONG Shao-Ming, CHEN Yu-Xian, ZHANG Jing, HOU He-Sheng
(School of Life Science, Liaoning Normal University, the Key Laboratory of Plant Biotechnology of Liaoning Province, Dalian 116081, China)

Abstract Microsomal glutathione s-transferase is one of membrane-bound enzymes. It has activities of glutathione transferase and peroxidase for playing important protection roles in cell and organelle under oxidative stress. However, this gene has never been studied in *Pyropia yezoensis*. In this study, a novel microsomal glutathione S-transferase 3 (designated as PyMGST3) gene was cloned from *P. yezoensis*. The full length of PyMGST3 gene was 681bp with a polyA tail. The gene had a 417bp ORF, 80bp 5'-UTR, and 184bp 3'-UTR. The PyMGST3 protein contained three transmembrane and hydrophobic domains and the sequence of PyMGST3 shared higher similarities with the MGST proteins of other species. The results of the real-time PCR show that the PyMGST3 gene was up-regulated under Cd²⁺ and Cu²⁺ stresses. The purified PyMGST3 protein showed the activity of glutathione transferase after expressed in *E. coli* cells. The analysis results of transformed *E. coli* cells with PyMGST protein indicate that the abilities to resist Cd²⁺ and Cu²⁺ stresses were improved. Therefore, the PyMGST3 gene may have defense mechanisms associated with oxidative stress in *P. yezoensis*.

Key words *Pyropia yezoensis*; MGST; heavy metal; prokaryotic expression