

文章编号:1000-8551(2019)06-1088-08

大蒜谷胱甘肽硫转移酶基因 *AsGST* 的克隆及其对盐胁迫的响应

梁志乐¹ 尚珂含¹ 王立辉¹ 周瑾¹ 王广龙^{1,*} 熊爱生²¹淮阴工学院生命科学与食品工程学院,江苏淮安 223003;²南京农业大学园艺学院/作物遗传

与种质创新国家重点实验室/农业农村部华东地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室,江苏南京 210095)

摘要:为了解大蒜 *GST* 基因及其编码的蛋白质的结构特征,分析 *GST* 基因在不同组织及盐胁迫条件下的表达特性,采用 RT-PCR 方法克隆得到大蒜苍山四六瓣 *GST* 基因,采用 BLAST、DNAMAN、ProtParam、MEGA5、Swiss-Model 等生物信息工具分析其序列特征,利用实时荧光定量 PCR 方法,分析 *AsGST* 基因在大蒜根、鳞茎和叶片中的表达差异及其对盐胁迫的响应情况。结果表明,大蒜 *AsGST* 基因全长 663 bp,编码 220 个氨基酸,推测蛋白质分子质量为 25.58 kDa,理论等电点为 6.55,属于 *tau* 类 *GST* 家族。植物 *GST* 的序列相似性较低,但在结构上相对保守。在蛋白的 N 端含有谷胱甘肽特异结合位点(G 位点),C 端含有可变性较大的疏水底物结合位点(H 位点),在进化关系上 *AsGST* 与茄科作物较近。空间结构分析表明,大蒜 *GST* 的三级结构由 3 个 β -折叠和 11 个 α -螺旋构成。实时荧光定量 PCR 显示,苍山四六瓣中 *GST* 基因在根中的表达量最高,其次是叶,在鳞茎中的表达量较低,具有明显的组织特异性。盐胁迫处理 4 h 后,各组织内 *AsGST* 基因的表达量均升至最高,说明该基因可响应盐胁迫逆境信号。本研究结果为进一步研究大蒜 *GST* 基因的功能奠定了一定的理论基础。

关键词:大蒜;盐胁迫;*AsGST* 基因;基因克隆;表达分析

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2019.06.1088

盐胁迫是限制作物生长发育,影响作物产量和品质的重要环境因子之一^[1]。在长期的进化过程中,植物逐渐形成了一系列的抗逆机制,其中,谷胱甘肽途径在此过程中发挥着重要作用^[2]。因此,研究谷胱甘肽途径及其关键基因对揭示植物抗逆机制具有非常重要的意义。

谷胱甘肽硫转移酶(Glutathione S-transferases, GSTs)是一种广泛存在于自然界中的小分子多功能型水溶性蛋白^[3]。GSTs 一般通过促进还原型谷胱甘肽与各种含亲电基团底物的相互作用,形成复合物,将有害物质运输至体外,从而起到解毒消毒作用^[4]。此外,GSTs 参与细胞内激素信号传导、花青素的合成和运输等进程,同时受外界多种逆境胁迫因子的诱导,在植物生长发育、次生代谢等过程中也发挥着重要作用^[5]。

研究表明,在植物体中,*GST* 表达受到各种非生物胁迫,如缺磷^[6]、盐胁迫^[7]的诱导。当植物遭受逆境胁迫时,GSTs 通过解毒和抗氧化作用避免植物细胞免受逆境伤害^[4]。赵风云等^[8]采用农杆菌侵染法将盐地碱蓬 *GST* 基因转入对低温敏感的水稻幼苗品种中花 11 中,发现转基因植株应对低温胁迫的抗性明显增强。戚元成等^[9]发现盐地碱蓬 *GST* 基因在拟南芥中过量表达后,转基因植株的抗旱能力较对照明显提高。此外,*GST* 基因还能响应真菌和其他一些病原物的侵染^[10],以及植物激素如生长素^[11]、乙烯^[12]和脱落酸^[13]等的诱导。上述研究表明,*GST* 基因在植物抵御各种生物和非生物胁迫的进程中均起着非常重要的作用。

大蒜(*Allium sativum* L.)为百合科葱属蔬菜作物,既可以作为调味,又具有较强的防病抗病功能。目前,

收稿日期:2018-08-22 接受日期:2018-10-13

基金项目:江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20170460),淮阴工学院博士科研启动基金(Z301B16531),教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-11-0670),江苏省自然科学基金杰出青年基金(BK20130027)

作者简介:梁志乐,男,主要从事蔬菜生理与分子生物学研究。E-mail: lzl19970321@163.com

* 通讯作者:王广龙,男,讲师,主要从事蔬菜生理与分子生物学研究。E-mail: 11160021@hyit.edu.cn

在拟南芥^[14]、水稻^[15]、杨树^[16]、大豆^[17]和甜橙^[18]中已分别鉴定到55、79、81、94和23个*GST*基因,但关于大蒜中*GST*基因的研究尚未见报道。本研究以苍山四六瓣为试验材料,克隆获得大蒜*GST*基因,对其核苷酸和氨基酸序列进行分析,并利用实时荧光定量PCR技术对该基因在盐胁迫下的表达进行研究,旨在探讨基因与大蒜耐盐能力的关系,为进一步研究*AsGST*基因的生物功能奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料:大蒜品种苍山四六瓣,来源于淮阴工学院生命科学与食品工程学院玻璃温室。大肠杆菌菌株由南京农业大学园艺学院伞形科蔬菜作物实验室保存。

仪器设备:GenoSens 1850 凝胶成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司)、DYCP-32B 电泳仪(北京六一仪器厂)、Centrifuge 5810R 离心机(Eppendorf,美国)、Veriti 96-well Thermal Cycler PCR 扩增仪(Applied Biosystems,美国)、CFX96 Touch 荧光定量PCR仪(Bio-rad,美国)。

主要试剂:植物总RNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]、DNA回收试剂盒(杭州唯特洁公司)、质粒载体pMD19-T(大连TaKaRa公司)、Green Taq Mix(南京诺唯赞生物科技有限公司)、引物(南京金斯瑞生物科技有限公司)、反转录试剂盒HiScript II Q RT SuperMix for qPCR(南京诺唯赞生物科技有限公司)、荧光定量试剂盒ChamQ SYBR qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物科技有限公司)。

1.2 方法

将苍山四六瓣于2017年10月3日播种于按蛭石:有机质=1:1(体积比)比例混合的基质中,20 d后将大蒜幼苗转移至60 cm×40 cm×20 cm水培箱(山东荣泉塑料制品有限公司)中进行培养,营养液为Hogland标准配方。7 d后对大蒜植株进行盐胁迫(200 mmol·L⁻¹ NaCl)处理,处理时间分别为1、4、12 h,以未经盐胁迫处理的大蒜植株作为对照(CK),每个处理设3次生物学重复。分别取大蒜叶片、根和鳞茎,立即用液氮速冻后,-80℃保存备用,用于RNA的提取及cDNA的合成。

1.2.1 RNA的提取及cDNA的合成 采用总RNA试剂盒提取总RNA,利用反转录试剂盒将提取的总RNA反转录成cDNA。

1.2.2 大蒜*GST*基因的克隆 根据大蒜苍山四六瓣

转录组数据(未公布),检索并拼接出*GST*基因序列,设计1对引物*GST-F*和*GST-R*,序列分别为5'-ATGTC TGAAGAAGTACTGTTGCTG-3'和5'-TTACTCTTCTATC CCAAGCTTCTT-3',以苍山四六瓣cDNA为模板进行扩增。PCR反应程序:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸50 s,共35个循环;72℃延伸10 min。PCR产物用1.2%琼脂糖凝胶电泳回收,与pMD19-T载体连接,并转化至大肠杆菌DH5α中,提取质粒经PCR鉴定后,送至南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

1.2.3 序列分析 其他植物的*GST*序列均来自于NCBI数据库,使用BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行序列比对。利用软件DNAMAN进行氨基酸序列比对和蛋白质疏水性/亲水性分析;采用ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)软件对氨基酸基本成分、蛋白质相对分子质量和等电点进行计算;利用MEGA5对系统进化树进行测试和编辑,生成报告图形^[19];利用SOPMA软件分析蛋白质二级结构(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html);通过Swiss-Model软件预测蛋白三级结构^[20]。

1.2.4 实时荧光定量PCR 采用CFX 96 Touch系统(Bio-rad,美国)进行实时荧光定量PCR。以大蒜*SAND*基因为内参基因,与目标基因一起扩增,每个处理设3次生物学重复,表达检测引物为BD-SAND-F:5'-GCGTCAACGAATGTTCCAATTACCA-3'和BD-SAND-R:5'-TCTCTTCAGTCTCAACTTCATCAGCAT-3'。根据从苍山四六瓣中扩增的*GST*基因序列设计表达检测引物BD-GST-F:5'-GCTAGGATCGCACTGGAAGAGA-3'和BD-GST-R:5'-GGTATCTCCTTCTCCGCATGA-3'。按照ChamQ SYBR qPCR Master Mix试剂盒的操作说明进行实时荧光定量PCR。

1.3 数据分析

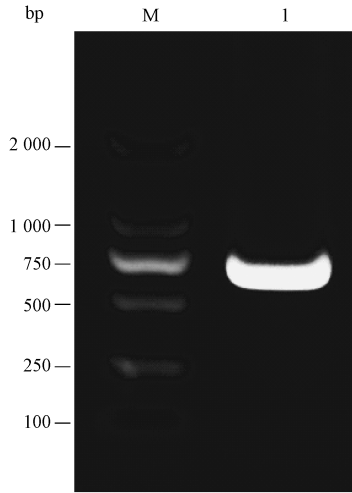
以大蒜*SAND*基因的转录表达水平作为内参,采用2^{-ΔΔCT}法^[21]计算目的基因的相对表达水平。

2 结果与分析

2.1 大蒜*GST*基因的克隆

以苍山四六瓣的cDNA为模板,分别以*GST-F*和*GST-R*作为上游和下游引物,PCR扩增后得到1条长度约为700 bp的片段(图1)。序列测定与分析表明,苍山四六瓣的*GST*基因含有1个663 bp的开放阅读框,编码220个氨基酸(图2),将该基因序列上传至

GenBank, 获得登录号 MH892343。预测该基因编码的蛋白质相对分子质量为 25.58 kDa, 等电点为 6.55。



注: M: DNA 分子量标准(2 000 bp); 1: *AsGST* 基因。

Note: M: DNA marker(2 000 bp). 1: *AsGST* gene.

图 1 大蒜 *AsGST* 基因的 RT-PCR 扩增图谱

Fig.1 RT-PCR amplification patterns of *AsGST* gene from garlic

2.2 大蒜 *AsGST* 的氨基酸序列和理化性质分析

将大蒜 *AsGST* 的氨基酸序列进行 BLAST 比对, 结果显示, 该蛋白属于 *tau* 类 GST 蛋白(图 3)。将该蛋

白分别与苹果 (*Malus domestica*, XP_008358506)、桃 (*Prunus persica*, XP_007200430)、海枣 (*Phoenix dactylifera*, XP_008775488)、油棕 (*Elaeis guineensis*, XP_010923805)、番茄 (*Solanum lycopersicum*, XP_004240536)、辣椒 (*Capsicum annuum*, XP_016576141)、马铃薯 (*Solanum tuberosum*, XP_006355799)、萝卜 (*Raphanus sativus*, XP_018455003)、芥菜 (*Brassica juncea*, AAP58393)、油菜 (*Brassica napus*, XP_022547908)、黄瓜 (*Cucumis sativus*, KGN53533) 和 苦 瓜 (*Momordica charantia*, XP_022142875) 等植物的 *tau* 类 GST 的氨基酸序列进行 BLAST 比对, 发现大蒜的 *GST* 基因编码的蛋白序列与其他物种的 *GST* 氨基酸序列同源性较低, 但在结构上相对保守。在蛋白的 N 端含有谷胱甘肽特异结合位点(G 位点), C 端含有可变性较大的疏水底物结合位点(H 位点)(图 4)。

对大蒜和其他植物的 *GST* 氨基酸序列进行理化性质分析。由表 1 可知, 这些植物中的 *GST* 氨基酸残基数为 213 ~ 222 个, 相对分子质量为 23.72 ~ 25.67 kDa。碱性氨基酸(包括精氨酸, 赖氨酸和组氨酸)略多于酸性氨基酸(包括天冬氨酸和谷氨酸), 脂肪族氨基酸数量远高于芳香族氨基酸, 不同氨基酸序列物理性质存在差异。

```

ATGTCTGAAGAAGTACTGTTGCTGGAAACATGGGTAAGCCATTCGCCACAGAGCTAGGATCGCACTGGAAGAG
1  M S E E V L L L E T W V S P F A H R A R I A L E E
AAAGGATCAAATTCATCACAAAGCAGGAGAATATCCACGATAAGAGCGACCTGCTTCTGAAATCGAATCCGATT
26  K G I K F I T K Q E N I H D K S D L L L K S N P I
CACAAAACGATCCCGTTTTGTTTACAAATGGCAAAGTTGTTTGTGAATCTACTTTGATCGTTGAGTACATCGAT
51  H K T I P V L F H N G K V V C E S T L I V E Y I D
GACGCTTGGAGTACCGTTGCTCCATTTTTCCCAAAAACCCTTATGAGAAATACCAAGTTAAATTTGGGCTAAC
76  D A W S T V A P F F P K N P Y E K Y Q V K F W A N
TACGTTGAGAGCAAGGTATGGGGAGCTGGAGTGAAGATATGGCAAGAGAAAGGGGAAGCAAGGGAGGAAGCGAAA
101 Y V E S K V W G A G V K I W Q E K G E A R E E A K
AAGGCATACATCGACATTCTCAAGGTTTTAGAGACGGAGCTCGGAGACAAGAAGTACTTTGGAGGAGAGACGTTCT
126 K A Y I D I L K V L E T E L G D K K Y F G G E T F
AACTACGTGGACATCGTGTCTGTCCTTCAATGTCTTTTTGTACACGTACGAGAAGCACGCGAACTTCAGTGCG
151 N Y V D I V F C P F N V F L Y T Y E K H A N F S A
GAGAAGGAGATACCGAAGCTGGTGGCTTATGCAAATCGGTGTTTGGAGAGGCCTAGCGTTGCAAAGACGTTGCC
176 E K E I P K L V A Y A N R C L E R P S V A K T L P
GATCCGAAGAAGACGTACGAGTACATCCTCGAGCTCAAGAAGAAGCTTGGGATAGAAGAGTAA
201 D P K K T Y E Y I L E L K K K L G I E E *

```

图 2 大蒜 *AsGST* 基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide acid sequences and predicted amino acid sequences of *AsGST* gene from garlic

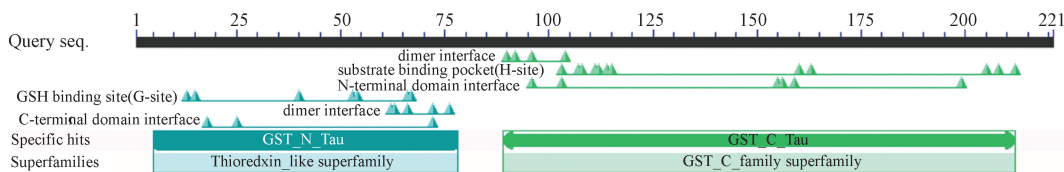


图3 大蒜 AsGST 氨基酸序列保守域预测

Fig.3 Prediction of conserved domain of amino acid sequences of AsGST from garlic

大蒜 <i>Allium sativum</i>	..MSEVLLLEITWSPFAHRRARIEEERGIKFKITRQENIH...DKSLLLKSNHIIHRTFVLFHNGKVVGESRLVVEYHDDAWSTV.AF	83
苹果 <i>Malus domestica</i>	...MEEVVLVIGAWSPYNERVWVPEELRGVKYEEIENLV...NKSDDLHYNEVHKKHFLVHNGKPFITESAVLIDYIETWFG..NF	81
桃 <i>Pruus persica</i>	...MEEVVLFGAWSPYNERVWVPEELRGVKYEEIENLV...NKSDDLQYNEVHKKHFLVHNGKPFITESAVLIDYIETWFG..NF	81
海枣 <i>Phoenix dactylifera</i>	MATAAKGVLLDFWYSPFGQCRIPDABRGVEYEEENLW...DKSPLLKKNHVKHKKHFLVHNGKPFITESAVLIDYIETWFG..NF	85
油棕 <i>Elaeis guineensis</i>	MATERGEVLLLDLWVSVFQCRIPDABRGVEYEEESLL...DKSPLLKKNHVKHKKHFLVHNGKPFITESAVLIDYIETWFG..NF	85
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	...MA.IKVHGEFMSPAVNRVVAITKRDLDLDFELVFNVMQAGDHRKEPFIISINFEF.QVBAFEDGDLKLFESRMTQYIAHTYADKGNQ	84
辣椒 <i>Capiscum annuum</i>	...MA.IKVHGEFMSPAVNRVVAITKRDLDLDFELVFNVMQAGDHRKEPFIISINFEF.QVBAFEDGDLKLFESRMTQYIAHTYADKGNQ	84
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	...MV.IKVHGEFMSPAVNRVVAITKRDLDLDFELVFNVMQAGDHRKEPFIISINFEF.QVBAFEDGDLKLFESRMTQYIAHTYADKGNQ	84
萝卜 <i>Raphanus sativus</i>	...MAGIKVFGNARSISTRVLLAHEBRNLDLDFELVFNVMQAGDHRKEPFIISINFEF.QVBAFEDGDLKLFESRMTQYIAHTYADKGNQ	85
芥菜 <i>Brassica juncea</i>	...MAGIKVFGNARSISTRVLLAHEBRNLDLDFELVFNVMQAGDHRKEPFIISINFEF.QVBAFEDGDLKLFESRMTQYIAHTYADKGNQ	85
油菜 <i>Brassica napus</i>	...MAGIKVFGNARSISTRVLLAHEBRNLDLDFELVFNVMQAGDHRKEPFIISINFEF.QVBAFEDGDLKLFESRMTQYIAHTYADKGNQ	85
黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	...MADQEVKLLDFWVSMFGMRIPDABRGVAYEYEDDLR...NKSPLLLEMHIIHKKHFLVHNGKPFITESAVLIDYIETWFG..NF	84
苦瓜 <i>Momordica charantia</i>	...MADQEVKLLDFWVSMFGMRIPDABRGVAYEYEDDLR...NKSPLLLEMHIIHKKHFLVHNGKPFITESAVLIDYIETWFG..NF	84
大蒜 <i>Allium sativum</i>	FEFKPYEK...YQKVFANVYESRVWGAQVKI...WQEKGEAREEAKKAYIDILKVIDT.EFGDKKVFEGEETFNVDIVFC	158
苹果 <i>Malus domestica</i>	LLSDDPHER...ALARFNTKFIDEKGLPYLK...FMADGEEHEKAAKEIRIDVFKIIDEPQAGDEDDFFGNEIIGLADLALG	155
桃 <i>Pruus persica</i>	LLSDDPHER...ALARFNTKFIDEKGLPYLK...FMADGEEHEKAAKEIRIDVFKIIDEPQAGDEDDFFGNEIIGLADLALG	156
海枣 <i>Phoenix dactylifera</i>	LLSDDEYER...AQRARFVADFEVKKVSECWTRL...WKVKGAEQEEARKDMIEDLKLDEG.EFGDKKVFEGEETFGFVDVAFM	160
油棕 <i>Elaeis guineensis</i>	LLSPSYER...AKARFVADFEVKKIYECGKTL...WRLKGEAHEAARKDMIEILKLLDG.EFGDKKVFEGEETFGFMDIAFV	160
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	LLPNDPKK...MAMVSVNMEVEAQRFDPVGSKLAYEIAKPMMGKVTDDAVVAENEERKGLKLDVDS.RFKESKYLGGESFTLADLHHA	170
辣椒 <i>Capiscum annuum</i>	LLPNDPKK...MAMVSVNMEVEAQRFDPVGSKLAYEIAKPMMGKVTDDAVVAENEERKGLKLDVDS.RFKESKYLGGESFTLADLHHA	170
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	LLPNDPKK...MAMVSVNMEVEAQRFDPVGSKLAYEIAKPMMGKVTDDAVVAENEERKGLKLDVDS.RFKESKYLGGESFTLADLHHA	170
萝卜 <i>Raphanus sativus</i>	LLPNDPKK...MAMVSVNMEVEAQRFDPVGSKLAYEIAKPMMGKVTDDAVVAENEERKGLKLDVDS.RFKESKYLGGESFTLADLHHA	170
芥菜 <i>Brassica juncea</i>	LLPNDPKK...MAMVSVNMEVEAQRFDPVGSKLAYEIAKPMMGKVTDDAVVAENEERKGLKLDVDS.RFKESKYLGGESFTLADLHHA	170
油菜 <i>Brassica napus</i>	LLPNDPKK...MAMVSVNMEVEAQRFDPVGSKLAYEIAKPMMGKVTDDAVVAENEERKGLKLDVDS.RFKESKYLGGESFTLADLHHA	170
黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	LLSPHFDYR...AQRARFVVDVIDKLYGFTRKI...WATKGEHEEAGKKEFIEILKQIDFQ.VGGERKVFEGESLGEIDTALI	159
苦瓜 <i>Momordica charantia</i>	LLSPHFDYR...AQRARFVVDVIDKLYGFTRKI...WATKGEHEEAGKKEFIEILKQIDFQ.VGGERKVFEGESLGEIDTALI	159
大蒜 <i>Allium sativum</i>	EFNVLYTYEKHA...NFSAEKEHKLVAANRCLREFSVAKTLPDPKKTYYEYLLELKKKLKGLIEE.	220
苹果 <i>Malus domestica</i>	FIASSFGVIEQVVGKVLHATEHRLCNWINKFRENFAIKXS.LHPDKMFVYKQRREMLIASRP	219
桃 <i>Pruus persica</i>	FIASSFGVIEQVVGKVLHATEHRLCNWINKFRENFAIKQNLNHDQMFVYKQRREMLIASRT	221
海枣 <i>Phoenix dactylifera</i>	PLSAWFYTFETCG...NFSVEKECKLVAWAKRCMERESVSKSLDHPHKVYEVVQKLLKGLVD.	221
油棕 <i>Elaeis guineensis</i>	PFTAWFYSYETLGL...NFSSTENECGLVAWAKRCMERESVTSIHPHYKVVYVVKLKRFGVE.	221
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	PSLHLYSGSKVKS...LFDAREHVSAMWADILARFANSKTIELSKQ.	213
辣椒 <i>Capiscum annuum</i>	PGLHLYSGTKVKS...LFDAREHVTARWADVILARFANSKTIELLNKQ.	213
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	PSLHLYMGSKVKKS...LFDAREHVSAMCADILARFANSKTIELSKQ.	213
萝卜 <i>Raphanus sativus</i>	PVIQYLLGTPTTK...LFTERFRVNEVVAEITKRFASQILQ.	213
芥菜 <i>Brassica juncea</i>	PVIQYLLGTPTTK...LFTERFRVNEVVAEITKRFASQILQ.	213
油菜 <i>Brassica napus</i>	PVIQYLLGTPTTK...LFTERFRVNEVVAEITKRFASQILQ.	213
黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	FFVSYLLTPTTVG...KFSIEAECIKIISWGRKCLQNESVAKSILPDSKKIYDFVQVQRALGII.	220
苦瓜 <i>Momordica charantia</i>	GCFTWVDVYESFG...NFSIEAECIKMLGWRRKCLQNESVAKTLPDPKRVHDFVLQWKKKGLGL.	219

注: # 表示 GSH 结合位点; * 表示疏水底物结合位点。

Note: # indicates the GSH binding site. * indicates the substrate binding site.

图4 大蒜 GST 与其他植物 GST 氨基酸序列的多重比对

Fig.4 The alignment of amino acid sequences of GST from garlic and other plant species

2.3 大蒜 GST 的氨基酸亲水性和疏水性预测

对苍山四六瓣 GST 基因推导的氨基酸序列进行疏水性/亲水性分析。结果表明,该蛋白的第 123 位谷氨酸 (Glu) 亲水性最强,其次为第 118 和第 119 位的甘氨酸 (Gly) 和谷氨酸 (Glu);疏水性最强的位点为第 157 位的异丙氨酸 (Phe),其次为第 155 位的异亮氨酸 (Ile) (图 5)。

2.4 大蒜 GST 的进化树分析

由图 6 可知,苍山四六瓣 GST 与茄科作物的进化关系较为接近,十字花科中萝卜、芥菜、油菜的 GST 属

于同一个分支,蔷薇科中苹果和桃的 GST 属于同一个分支,棕榈科中海枣、油棕的 GST 属于同一个分支,葫芦科中黄瓜和苦瓜的 GST 属于同一个分支,茄科中的辣椒、番茄、马铃薯的 GST 属于同 1 个分支。

2.5 大蒜 GST 三级结构分析

利用在线软件 SOPMA 分析二级结构,结果表明 AsGST 蛋白质中 α-螺旋占 55.00%,延伸链占 11.82%,β-转角占 5.45%,无规则卷曲占 27.73%。以玉米 GST (PDB ID: 4chs.1.B) 为模板,通过 SWISS-MODEL 在线软件对该蛋白进行三级结构分析,其 N

表 1 不同物种的 GST 氨基酸组成成分及理化性质分析

Table 1 Comparison of composition and physico chemical features of amino acid sequences of GST from different plant species

植物种类 Plant species	氨基酸残基数 Number of amino acid	理论相对分子质量 Theoretical relative molecular mass/kDa	理论等电点 Theoretical pI	碱性氨基酸比例 Rate of basic amino acid/%	酸性氨基酸比例 Rate of acidic amino acid/%	脂肪族氨基酸比例 Rate of aliphatic amino acid/%	芳香族氨基酸比例 Rate of aromatic amino acid/%
大蒜 <i>A. sativum</i>	220	25.58	6.55	16.9	15.0	76.0	11.0
苹果 <i>M. domestica</i>	219	25.34	5.71	16.0	15.6	66.3	9.1
桃 <i>P. persica</i>	222	25.53	5.34	14.5	15.3	75.6	9.5
海枣 <i>P. dactylifera</i>	221	25.53	5.54	15.4	15.8	75.6	8.6
油棕 <i>E. guineensis</i>	221	25.67	6.16	16.8	15.9	78.5	9.5
番茄 <i>S. lycopersicum</i>	213	23.72	5.98	15.0	13.6	73.5	6.5
辣椒 <i>C. annuum</i>	213	23.77	6.39	15.5	13.1	76.6	6.6
马铃薯 <i>S. tuberosum</i>	213	23.83	5.98	15.0	13.6	76.0	6.5
萝卜 <i>R. sativus</i>	213	24.19	6.67	16.4	13.6	77.4	9.4
芥菜 <i>B. juncea</i>	213	24.08	6.40	16.0	13.6	78.0	8.9
油菜 <i>B. napus</i>	213	24.09	6.67	16.4	13.6	78.0	8.0
黄瓜 <i>C. sativus</i>	220	25.46	5.90	15.0	14.5	75.7	10.0
苦瓜 <i>M. charantia</i>	219	25.25	5.90	15.5	15.1	75.1	8.7

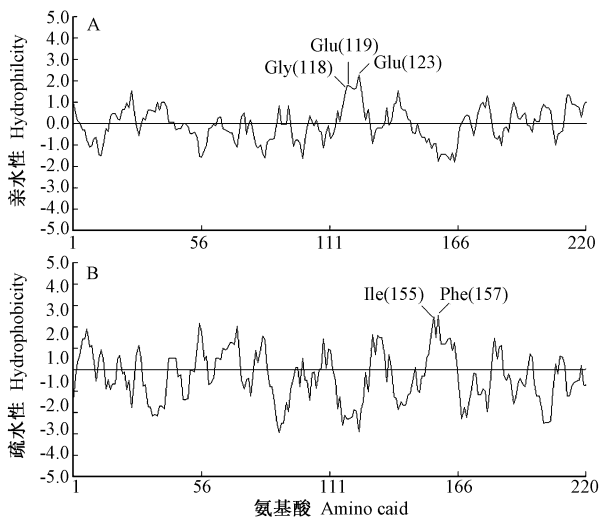


图 5 大蒜 AsGST 氨基酸序列的亲水性和疏水性分析
Fig.5 Analysis of hydrophilicity and hydrophobicity of amino acid sequences of AsGST from garlic

端主要由 β -折叠和 α -螺旋构成 ($\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$), C 端由 8 个 α -螺旋构成,通过一个约 10 个氨基酸的短序列与 N 端结构域连接(图 7)。

2.6 盐胁迫条件下大蒜 GST 基因的表达分析

由图 8 可知,正常条件下,苍山四六瓣中 GST 在鳞茎、叶和根中均有表达,在根中的表达量最高,其次是叶,在鳞茎中的表达量较低。盐胁迫处理 1 h 时,

AsGST 基因的表达量较 CK 无明显变化,但随着盐胁迫处理时间的延长,苍山四六瓣中 GST 基因在鳞茎、叶和根中的表达量均呈上升趋势,且在处理 4 h 时达到最高。盐胁迫处理 12 h 时,AsGST 基因在叶和根中的表达量较处理 4 h 有明显下降,但鳞茎中的表达量变化不明显。

3 讨论

研究表明,遭遇逆境胁迫时,植物体内活性氧含量会大量升高,对细胞结构和代谢物质造成氧化伤害,严重影响甚至扰乱植物的正常生长、发育和代谢^[22-24]。而由 GST、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 和过氧化物酶 (peroxidase, POD) 等形成的保护酶系统,能够有效地清除植物体内的活性氧及其他自由基,消除细胞内的有害代谢物质,从而保护植物免受或减缓伤害^[25]。其中, GST 作为一个大的基因家族,在植物生长发育、响应环境变化的过程中发挥重要的调节作用^[26]。因此,研究 GST 有助于阐明植物生长和抵御胁迫的分子机制,对改善胁迫下植物的生存能力具有实际意义。

GSTs 一般以 25~27 kDa 的 2 条亚基以同源或异源的方式聚合而成,每个亚基都含有 2 个空间结构不

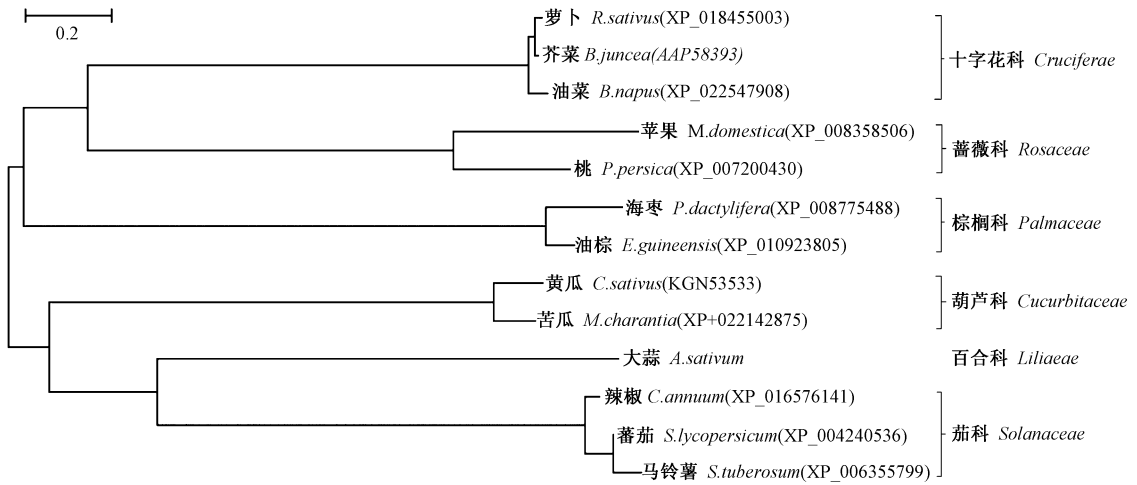
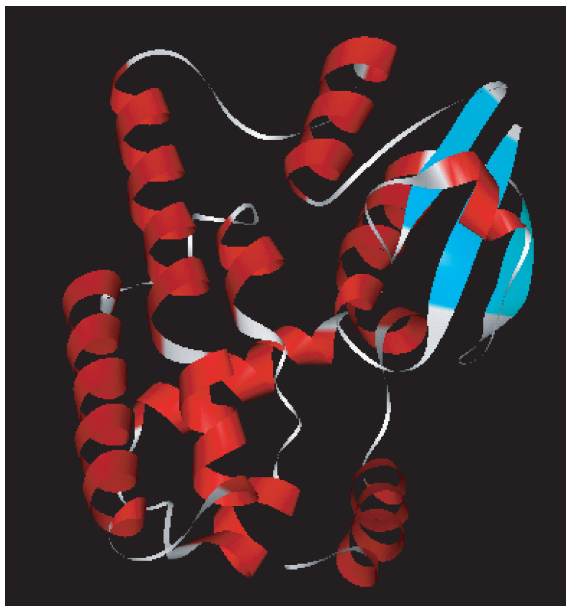


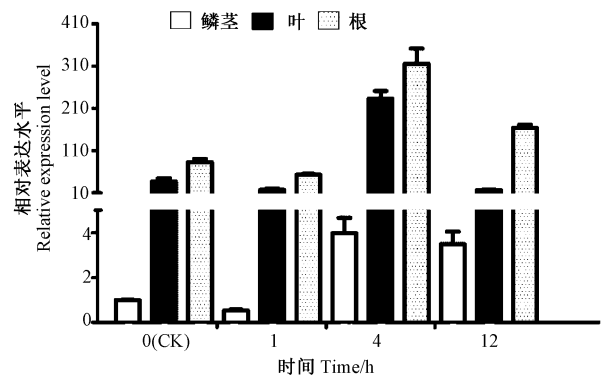
图 6 大蒜与其他植物 GST 氨基酸序列的系统进化树

Fig.6 Phylogenetic tree of GST from garlic and other plant species

图 7 *AsGST* 蛋白质三级结构预测Fig.7 The deduced three-dimensional structure of *AsGST*

同的结构域: N 端由 β 折叠和 α 螺旋构成; C 端主要由 α 螺旋构成^[27]。本研究克隆获得的大蒜 *AsGST* 基因属于 *tau* 类 GST 家族成员, 其编码的蛋白质与其他 12 种植物中 GST 序列相似性较低, 但在结构上相对保守, N 端具有保守的结合谷胱甘肽的 G 位点, C 端的 H 位点可结合疏水底物^[3], 在空间结构上与前人研究结果类似^[26], N 端主要由 β 折叠和 α 螺旋构成 ($\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$), C 端由 8 个 α 螺旋构成, 通过 1 个约 10 个氨基酸的短序列与 N 端结构域连接。

在玉米 (*Zea mays* L.) 的研究中发现, 大多数 GST 基因在根中表达水平较高, 而在其他组织中表达相对较低^[28]。本研究中, *AsGST* 基因在大蒜各组织中的表

图 8 大蒜 *AsGST* 基因在盐胁迫条件下的表达分析Fig.8 Expression analysis of *AsGST* gene under salt stress from garlic

达水平差异明显, 在根中的表达量最高, 其次是叶, 在鳞茎中的表达量较低, 呈现明显的组织特异性。GSTs 不仅在细胞代谢和异源化合物的解毒过程中发挥重要作用, 对植物抵御不良环境和损伤等方面同样起着重要作用。前人研究表明, 干旱、真菌攻击、盐胁迫等均能诱导 GSTs 的表达^[29-31]。过表达大豆 *GmGSTL1* 基因提高了烟草 BY-2 细胞和拟南芥在盐胁迫下的存活率和抗性^[32]。类似地, 拟南芥中过表达番茄 GST 基因增强了其在盐胁迫和干旱胁迫条件下的生长势^[33]。本研究中, 盐胁迫后, 大蒜各组织均可响应诱导, 盐胁迫处理 4 h 时, 各组织内该基因的表达量升至最高, 与前人研究结果一致, 说明 GST 参与植物抵御盐胁迫的具体途径可能是通过将盐胁迫产生的有毒害作用的活性氧还原, 从而减少对细胞结构和功能的损坏, 保护细胞免受氧化损伤。

4 结论

本研究结果表明,克隆的大蒜 *AsGST* 基因属于 *tau* 类 GST 家族成员,在根中的表达量最高,其次是叶,在鳞茎中的表达量较低,具有明显的组织特异性。盐胁迫处理 4 h 时,各组织内 *AsGST* 基因的表达量均升至最高,说明 *AsGST* 基因可能与植物耐盐性有着密切的关系,其可能在大蒜抵御盐胁迫的机制中发挥重要的调控作用,但其具体的作用机制还有待进一步研究。本研究结果为鉴定大蒜 GST 基因功能的奠定了一定的理论基础。

参考文献:

- [1] 杨秀艳,李焕勇,朱建峰,陈军华,刘正祥,唐晓倩,张华新. NaCl 胁迫下 2 种白刺光合特性适应性研究 [J]. 核农学报, 2017, 31(10): 2047-2054
- [2] Cheng M C, Ko K, Chang W L, Kuo W C, Chen G H, Lin T P. Increased glutathione contributes to stress tolerance and global translational changes in Arabidopsis [J]. Plant Journal, 2015, 83(5): 926-939
- [3] Kumar S, Trivedi P K. Glutathione S-transferases: Role in combating abiotic stresses including arsenic detoxification in plants [J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 751
- [4] Nianiou-Obeidat I, Madesis P, Kissoudis C, Voulgari G, Chronopoulou E, Tsaftaris A, Labrou N E. Plant glutathione transferase-mediated stress tolerance: Functions and biotechnological applications [J]. Plant Cell Reports, 2017, 36(6): 791-805
- [5] Islam S, Rahman I A, Islam T, Ghosh A. Genome-wide identification and expression analysis of glutathione S-transferase gene family in tomato: Gaining an insight to their physiological and stress-specific roles [J]. PLoS One, 2017, 12(11): e0187504
- [6] Shukla T, Kumar S, Khare R, Tripathi R D, Trivedi P K. Natural variations in expression of regulatory and detoxification related genes under limiting phosphate and arsenate stress in *Arabidopsis thaliana* [J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 898
- [7] Jia B, Sun M, Sun X, Li R, Wang Z, Wu J, Wei Z, DuanMu H, Xiao J, Zhu Y. Overexpression of *GsGSTU13* and *SCMRP* in *Medicago sativa* confers increased salt-alkaline tolerance and methionine content [J]. Physiologia Plantarum, 2016, 156(2): 176-189
- [8] 赵风云,王晓云,赵彦修,张慧. 转入盐地碱蓬谷胱甘肽转移酶和过氧化氢酶基因增强水稻幼苗对低温胁迫的抗性 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2006, 32(2): 231-238
- [9] 戚元成,张小强,刘卫群,邱立友. 过量表达谷胱甘肽转移酶基因对转基因拟南芥抗旱能力的影响 [J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(2): 268-270
- [10] Liao W, Ji L, Wang J, Chen Z, Ye M, Ma H, An X. Identification of glutathione S-transferase genes responding to pathogen infestation in *Populus tomentosa* [J]. Functional Integrative Genomics, 2014, 14(3): 517-529
- [11] Shi H Y, Li Z H, Zhang Y X, Chen L, Xiang D Y, Zhang Y F. Two pear glutathione S-transferases genes are regulated during fruit development and involved in response to salicylic acid, auxin, and glucose signaling [J]. PLoS One, 2014, 9(2): e89926
- [12] Zhou J, Goldsbrough P B. An Arabidopsis gene with homology to glutathione S-transferases is regulated by ethylene [J]. Plant Molecular Biology, 1993, 22(3): 517-523
- [13] Xu F, Lagudah E S, Moose S P, Riechers D E. Tandemly duplicated Safener-induced glutathione S-transferase genes from *Triticum tauschii* contribute to genome-and organ-specific expression in hexaploid wheat [J]. Plant Physiology, 2002, 130(1): 362-373
- [14] Sappl P G, Carroll A J, Clifton R, Lister R, Whelan J, Harvey Millar A, Singh K B. The Arabidopsis glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress [J]. Plant Journal, 2009, 58(1): 53-68
- [15] 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
- [16] Lan T, Yang Z L, Yang X, Liu Y J, Wang X R, Zeng Q Y. Extensive functional diversification of the *Populus* glutathione S-transferase supergene family [J]. Plant Cell, 2009, 21(12): 3749-3766
- [17] 江董丽,才华,端木慧子,朱延明. 大豆 GST 基因家族全基因组筛选、分类和表达 [J]. 分子植物育种, 2013, 11(5): 465-475
- [18] Licciardello C, D'Agostino N, Traini A, Recupero G R, Frusciantè L, Chiusano M L. Characterization of the glutathione S-transferase gene family through ESTs and expression analyses within common and pigmented cultivars of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck [J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 39
- [19] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739
- [20] Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer F T, de Beer T A P, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T. SWISS-MODEL: Homology modeling of protein structures and complexes [J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(W1): 296-303
- [21] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25: 402-408
- [22] 王广龙,王枫,徐志胜,蒋倩,谭国飞,熊爱生. 芹菜衔接蛋白基因 *AgMu2* 的克隆与表达分析 [J]. 园艺学报, 2014, 41(7): 1369-1378
- [23] 徐丽,陈新,宗晓娟,魏海蓉,张力思,刘庆忠. 甜樱桃砧木 *PcDHN1* 的克隆及其对非生物胁迫的响应 [J]. 核农学报, 2017, 31(1): 14-20
- [24] 李静文,马静,却枫,王枫,徐志胜,熊爱生. 芹菜中类胡萝卜

- 素合成相关番茄红素 ϵ -环化酶基因 *AgLCYE* 的克隆与表达分析 [J]. 园艺学报, 2018, 45(2): 341-350
- [25] 张馨月, 王广龙, 黄蔚, 王枫, 倪桢焱, 熊爱生. 胡萝卜抗坏血酸过氧化物酶基因的分离及其对非生物胁迫的响应 [J]. 南京农业大学学报, 2016, 39(1): 55-62
- [26] Wagner U, Edwards R, Dixon D P, Mauch F. Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione *S-transferase* gene family [J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 49(5): 515-532
- [27] Dirr H, Reinemer P, Huber R. X-ray crystal structures of cytosolic glutathione *S-transferases*. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 220(3): 645-661
- [28] Li D, Xu L, Pang S, Liu Z, Wang K, Wang C. Variable levels of glutathione *S-transferases* are responsible for the differential tolerance to metolachlor between maize (*Zea mays*) shoots and roots [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(1): 39-44
- [29] Rezaei M K, Shobbar Z S, Shahbazi M, Abedini R, Zare S. Glutathione *S-transferase* (GST) family in barley: identification of members, enzyme activity, and gene expression pattern [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2013, 170(14): 1277-1284
- [30] Sue M, Yajima S. Crystal structure of the delta-class glutathione transferase in *Musca domestica* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 502(3): 345-350
- [31] Liang D, Gao F, Ni Z, Lin L, Deng Q, Tang Y, Wang X, Luo X, Xia H. Melatonin improves heat tolerance in kiwifruit seedlings through promoting antioxidant enzymatic activity and glutathione *S-transferase* transcription [J]. *Molecules*, 2018, 23(3): 584
- [32] Chan C, Lam H M. A putative lambda class glutathione *S-transferase* enhances plant survival under salinity stress [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2014, 55(3): 570-579
- [33] Xu J, Xing X J, Tian Y S, Peng R H, Xue Y, Zhao W, Yao Q H. Transgenic *Arabidopsis* plants expressing tomato glutathione *S-transferase* showed enhanced resistance to salt and drought stress [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0136960

Cloning and Expression Analysis of the *AsGST* Gene in Garlic Exposed to Salinity Stress

LIANG Zhile¹ SHANG Kehan¹ WANG Lihui¹ ZHOU Jin¹
WANG Guanglong^{1,*} XIONG Aisheng²

¹ School of Life Science and Food Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huaian, Jiangsu 223003;

² Key Laboratory of Biology and Germplasm Enhancement of Horticulture Crops in East China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement/College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095)

Abstract: In order to investigate *GST* gene from garlic and structural features of its encoding protein and analyze its expression in different tissues and under salt stress. The *GST* gene was cloned from Cangshan siliuban by RT-PCR method. Bioinformatics software including BLAST, DNAMAN, ProtParam, MEGA5 and Swiss-Model were used to analyze its sequence characteristics, and real-time quantitative PCR was used to analyze the expression differences of *AsGST* gene in garlic roots, bulbs, and leaves and its response to salt stress. The length of *AsGST* gene was 663 bp, which encoded 220 amino acids. It was predicted that the molecular mass of its protein was 25.58 kDa, and its pI was 6.55, which can be classified into the *tau* subgroup in GST family. Plant GSTs showed low similarity in sequence, whereas highly conserved structure was observed. The GST active site was composed of a specific GSH binding site (G-site) at the N terminal domain and a nonspecific substrate binding site (H-site) from the C terminal domain. The evolutionary relationship of *AsGST* was more close to Solanaceae plants. Analysis on three-dimension structure revealed that *AsGST* was made of three β -sheet strands and 11- α helices. Real-time quantitative PCR analysis demonstrated that *AsGST* was highest expressed in garlic was roots, following by leaves, the lowest expression was bulbs, showing evident tissue specificity. The transcript level of *GST* reached the highest value after salt treatment for 4 h in every tissue, indicating that this gene could respond to salt stress. The results of this study provide a theoretical basis for function characterization of *GST* genes in garlic.

Keywords: *Allium sativum* L., salt stress, *AsGST* gene, gene cloning, expression analysis