

水稻谷胱甘肽过氧化物酶基因 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 的分子特性研究

韦金池^{1,2}, 杨海灵^{1,2*}

(1. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; 2. 国家林业局树木花卉育种与生物工程重点开放实验室, 北京 100083)

摘要: 植物谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPX) 是清除体内活性氧的一种关键酶, 在植物抗逆反应中发挥重要作用。本研究从水稻中克隆到 2 个 GPX 基因, 分别为 *OsGPX3* 和 *OsGPX4*。*OsGPX3* 和 *OsGPX4* 分别编码 238 和 234 个氨基酸组成的蛋白质, 预测分子量分别是 25.84 kD 和 25.07 kD。两个基因都包含 5 个内含子, 但是两个基因所对应的内含子长度具有较大变异。组织表达谱分析发现这 2 个基因在根、茎、叶和叶鞘中均表达, 是组成型表达基因。在大肠杆菌中表达并纯化了这 2 个基因的重组蛋白, 酶活性分析显示 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 蛋白对底物 H_2O_2 、tBOOH 和 COOH 具有较高活性, 但是 *OsGPX3* 对 3 种底物的活性均高于 *OsGPX4*, 蛋白质酶活性的差异预示着这 2 个基因可能存在功能上的分化。

关键词: 谷胱甘肽过氧化物酶; 水稻; 克隆; 蛋白结构; 酶活性分析

中图分类号: Q946.54+6

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2013)01-0064-09

Functional Divergence of Two Glutathione Peroxidase Genes in *Oryza sativa*

WEI Jin-Chi^{1,2}, YANG Hai-Ling^{1,2*}

(1. College of Life Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

2. Key Laboratory of Tree and Ornamental Plant Breeding and Biotechnology of State Forestry Administration, Beijing 100083, China)

Abstract: Plant glutathione peroxidases (GPX) are a group of enzymes that regulate levels of reactive oxygen species in cells and tissues, and protect them against oxidative damage. In this study, two GPX genes (*OsGPX3* and *OsGPX4*) were cloned from *Oryza sativa*. The *OsGPX3* and *OsGPX4* genes encoded two proteins of 238 and 234 amino acid residues, with calculated molecular masses of 25.84 kDa and 25.07 kDa, respectively. Genomic sequence analysis showed *OsGPX3* and *OsGPX4* contained five introns. Reverse transcription PCR revealed that *OsGPX3* and *OsGPX4* were constitutive expression genes in *O. sativa*. The *OsGPX3* and *OsGPX4* proteins were overexpressed in *E. coli*, and were purified by Ni-affinity chromatography. The *OsGPX3* and *OsGPX4* proteins showed enzymatic activities towards substrates H_2O_2 , tBOOH and COOH. However, *OsGPX3* showed higher enzymatic activities to the three substrates than did *OsGPX4*, suggesting functional divergence between the *OsGPX3* and *OsGPX4* genes.

Key words: Glutathione peroxidase; *Oryza sativa*; Cloning; Protein structure; Enzyme activity

植物在自然界中经常会受到病菌、干旱、冷害和高盐等生物和非生物胁迫, 当植物受到胁迫时体内

的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平会大大升高。大量积累的 ROS 能够对植物体内的核

收稿日期: 2012-06-13, 修回日期: 2012-10-21。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (2009CB119104)。

作者简介: 韦金池 (1988 -), 女, 硕士研究生, 研究方向为蛋白质结构与功能 (E-mail: weijc2010@163.com)。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: yhailing@yahoo.com.cn)。

酸、脂质、蛋白质等生物大分子产生伤害^[1]。植物在长期进化过程中发展出几种酶和非酶系统来缓解由活性氧引起的氧化损伤,其中谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPX) 是植物用来清除活性氧的一种关键酶^[2]。GPX 通过催化过氧化氢、有机氢过氧化物和脂质过氧化物的还原来保护细胞免受氧化损伤^[3],例如,将拟南芥中的 *AtGPX3* 基因敲除掉之后,拟南芥的抗氧化和抗旱能力显著下降^[4];降低拟南芥 *AtGPX1* 和 *AtGPX7* 的表达量,拟南芥抗光氧化胁迫的能力明显下降^[5];而过量表达番茄 *LePHGPX* 基因能显著提高转基因植株对高盐和高温胁迫的耐受性^[6]。这一系列研究表明植物谷胱甘肽过氧化物酶对抵抗胁迫具有重要作用。

最初开展植物体内 GPX 的研究是从烟草中克隆了一个 *GPX* 基因^[7],随后从拟南芥、菠菜、番茄、水稻等植物中克隆了一系列 *GPX* 基因^[4,6-9]。虽然目前大量的 *GPX* 基因被克隆,但是主要集中于双子叶植物 GPX,对单子叶植物 GPX 的研究相对较少,尤其是对其生化功能的研究还很缺乏。水稻属于单子叶植物,是我国重要的粮食作物,但在水稻生产中,由于干旱、低温等非生物逆境胁迫严重制约了水稻的高产、稳产,而 *GPX* 基因对植物抵抗非生物逆境胁迫具有重要作用。目前通过序列分析从水稻基因组中鉴定出了 5 个 *GPX* 基因^[10],但只对其中两个成员进行了克隆 (*OsGPX1* 和 *OsGPX2*)^[11,12],缺乏对其它几个基因的研究。本研究以水稻 *GPX* 基因为研究目标,从水稻中克隆到另外 2 个 *GPX* 基因,并对其基因结构、表达模式、所编码蛋白的结构与生化功能进行了详细研究,为深入揭示 GPX 在植物逆境胁迫中的作用机理奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用材料为水稻日本晴 (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare)。

1.2 工具酶和试剂

总 RNA 提取试剂盒 Aurum Total RNA Kit 和蛋白 Marker 购自 Bio-Rad 公司,质粒提取试剂盒以及 DNA marker 购自 Qiagen 公司,反转录试剂盒

RNA PCR Kit (AMV) version 3.0、Taq DNA 聚合酶和其他 PCR 试剂购自 TaKaRa 公司, pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司,限制性内切酶购自 Invitrogen 公司, GSH reductase (GR)、 H_2O_2 、tertiary-butylhydroperoxide (tBOOH)、cumene hydroperoxide (COOH) 购自 Sigma 公司, DNA 凝胶回收与纯化试剂盒及其它生化试剂 (均为分析纯) 购自北京鼎国公司,大肠杆菌感受态细胞 JM109 与 tuner 均为本实验室制备并于 $-80^{\circ}C$ 保存。

1.3 水稻 *GPX* 基因序列的鉴定与命名

根据已知的拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 全长 GPX 蛋白序列 (GenBank accession No. NP_192897.2), 利用 TBLASTN 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 检索 GenBank 中水稻 (*Oryza sativa*) 的全基因组数据库, 获得了 2 组与拟南芥 GPX 序列具有较高相似性的序列。获得的序列经过 Pfam 判读, 确定该序列编码的蛋白具有 GPX 典型结构域特征。我们将这 2 组序列分别命名为 *OsGPX3* (GenBank accession No. Os02g0664000) 和 *OsGPX4* (GenBank accession No. Os06g0185900)。

1.4 水稻 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 基因的克隆

水稻于培养室 $32^{\circ}C$ 下, 光照培养 (光照 16 h/黑暗 8 h) 3 个月, 取新鲜叶片 0.05 g, 按照试剂盒说明书步骤提取叶片的总 RNA, 用 DNase I 处理总 RNA 以去除基因组 DNA, 并以处理后的总 RNA 为模板, 用 Revert Aid First Stand cDNA 试剂盒合成 cDNA。根据 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* cDNA 序列分别设计引物 *OsGPX3*-EX1/2、*OsGPX4*-EX1/2 (表 1)。引物均由 Invitrogen 公司合成。以水稻叶片 cDNA 为模板, 利用引物 *OsGPX3*-EX1/2 和 *OsGPX4*-EX1/2 分别进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μ L: 含有 1 μ L 水稻叶片 cDNA、2.5 μ L TaKaRa 10 $\times$ PCR buffer、0.125 μ L TaKaRa Ex Taq (5 U/ μ L)、2 μ L dNTP (每种 dNTP 浓度为 2.5 mmol/L), 以及浓度为 10 μ mol/L 的引物各 1 μ L, 剩余体积以去离子水补足。PCR 反应程序是: $94^{\circ}C$ 预变性 3 min; $94^{\circ}C$ 30 s、 $55^{\circ}C$ 40 s、 $72^{\circ}C$ 1 min, 35 个循环; 最后 $72^{\circ}C$ 延伸 3 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收纯化目的条带, 纯

表 1 研究所用的引物
Table 1 Primers used in this study

基因 Gene	引物名称 Primer names	序列(5'—3') Sequence(5'—3')
<i>OsGPX3</i>	OsGPX3-EX1	TGGATCCGGGTTCGCGCTGT-TCAGC
	OsGPX3-EX2	TAAGCTTTTAAGAACTTCCAAG-CAGCTTCTTGAT
	OsGPX3-SP1	AGTCCTCCTTATCGTCAATGTTG
	OsGPX3-SP2	CCATGCTGAGTGGAAGTAGTT
<i>OsGPX4</i>	OsGPX4-EX1	TGGATCCAGGTGGGCGC-CAGGGGTC
	OsGPX4-EX2	TGTCGACTTATGCCGCAAG-GAGTTTCTGGAT
	OsGPX4-SP1	CATTGATGGAAAAGATGTTGCG
	OsGPX4-SP2	GGAATGGTGAAGTTGTAGGTGG
<i>OsActin</i>	OsActin-CL1	GTCTGCGATAATGGAAGTGGTA
	OsActin-CL2	CAGGGCGATGTAGGAAAGC

化产物连接到 pGEM-T 载体中。将构建好的重组质粒转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞,在 X-gal/IPTG/Amp 平板上挑取多个阳性克隆进行双向测序。构建好的质粒分别命名为 pGEM-T/*OsGPX3* 和 pGEM-T/*OsGPX4*。

1.5 系统发生关系分析

将克隆获得的 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 基因编码的蛋白序列与其他植物 GPX 序列通过 Bioedit 进行氨基酸序列比对,并手动校对。利用 MEGA v. 4.0 软件的 neighbour-joining (NJ) 模型构建进化树,Bootstrap 值为 1000。

1.6 水稻 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 蛋白结构模拟

选取杨树 PtGPX5 蛋白(PDB:2p5qD)的 X 衍射晶体结构为模板,以 Align 2D 程序(Insight II 的 Homology 模块)进行序列比对,运用 Insight II 的 Modeler 模块构建蛋白质三维结构,产生 5 个结构。每个结构再产生 5 个不同的环区结构,优化水平为高等,以 Profile-3D 对各结构进行评价,选取最优的蛋白结构。

1.7 水稻 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 基因的组织表达谱

为了解 *GPX* 基因在水稻不同部位中的表达谱,取培养室 32℃下,光照培养(光照 16 h/黑暗 8 h)3 个月的水稻,按照试剂盒说明书步骤提取根、茎、成熟叶、幼叶和叶鞘的总 RNA,用 DNase I 处理总

RNA,以去除基因组 DNA,并以处理后的总 RNA 为模板分别反转录合成 cDNA。根据 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 的基因序列分别设计特异性引物 *OsGPX3*-SP1/2 和 *OsGPX4*-SP1/2(表 1),进行 RT-PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μL: 含有 1 μL 水稻 cDNA、2.5 μL TaKaRa 10× PCR buffer、0.125 μL TaKaRa Ex Taq (5 U/μL)、2 μL dNTP (每种 dNTP 浓度为 2.5 mmol/L),以及浓度为 10 μmol/L 的引物各 1 μL,剩余体积以去离子水补足。以水稻 *Actin* 基因作为内标。PCR 反应程序是: 94℃预变性 3 min; 94℃ 30 s、60℃ 40 s、72℃ 1 min,35 个循环;最后 72℃延伸 3 min。PCR 结束后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,电泳上样量为 2 μL,为了进一步验证所扩增到的是否为目的基因,对 PCR 产物进行测序。

1.8 水稻 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 基因表达载体的构建、融合蛋白的表达与纯化

将 pGEM-T/*OsGPX3* 和 pGEM-T/*OsGPX4* 质粒用限制性内切酶进行酶切。目的基因片段经试剂盒回收后连接到带有 6 × His 标签的 PET30a (ΔPET30a)表达载体中^[13],转化大肠杆菌 tuner 感受态细胞。将测序验证无突变的重组表达菌于含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中进行培养,过夜,将其以 1:100 倍稀释后扩大培养至 OD₆₀₀ 为 0.5,加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L,37℃诱导过夜。诱导表达后的菌液于 4℃、6500 g 离心 10 min 后收获菌体,用缓冲液 A (20 mmol/L 咪唑、0.5 mol/L NaCl、20 mmol/L Na₃PO₄, pH7.5) 重悬,冰上超声破碎裂解。然后将原菌液 4℃、10000 g 离心 10 min,取少量超声破碎后离心的上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 检测 (SDS-PAGE 检测采用 12% 的分离胶,5% 的浓缩胶),经检测具有目的蛋白峰带。蛋白质纯化用 Ni 亲和柱(购自于 Amersham Pharmacia Biotech 公司)。首先用缓冲液 A 平衡 Ni 亲和柱,将超声破碎后离心得到的上清液上样,然后以缓冲液 A 洗脱杂蛋白,最后用缓冲液 B (0.5 mol/L 咪唑、0.5 mol/L NaCl、20 mmol/L Na₃PO₄, pH7.5) 洗脱目的蛋白,收集目的蛋白洗脱峰,进一步进行酶活性分析。

1.9 水稻 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 蛋白的酶活性测定

本实验的酶活性测定参照 Jung BG 等的方法^[14],因反应过程中 NADPH 被氧化, NADPH 在 A_{340} 处有最大吸光值,因此本实验通过检测 A_{340} 处吸光度的降低测定过氧化物酶活性。3 mL 的反应体系包括: 150 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、7.5 mmol/L EDTA、1 mmol/L H_2O_2 、GPX 蛋白,以及电子供体系统。当应用 Trx 电子供体系统时,电子供体系统包括: 0.2 mmol/L NADPH、9 μ mol/L *E. coli* Trx、0.5 μ mol/L *E. coli* TR (Trx reductase); 当应用 GSH 电子供体系统时,电子供体系统包括: 0.2 mmol/L NADPH、2 mmol/L GSH、1.5 U GR。测定 GPX 蛋白对 tBOOH 或 COOH 的活性时,则将反应体系中的 H_2O_2 换为 tBOOH 或 COOH。对照反应以 GPX 蛋白的溶解缓冲液替代 GPX 蛋白溶液,其它成分一致,每种反应设 3 次独立重复实验。酶活性以消光系数 $6220\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 进行计算。

2 结果与分析

2.1 水稻 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 基因的克隆及基因结构分析

以水稻叶片 cDNA 为模板,利用引物 *OsGPX3*-EX1/2 和 *OsGPX4*-EX1/2,分别克隆得到 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 的 cDNA 序列。*OsGPX3* cDNA 序列包括 717 bp 的开放阅读框(包括终止密码子),编码 238 个氨基酸组成的蛋白,预测分子量为 25.84 kD。*OsGPX4* cDNA 序列包括 705 bp 的开放阅读框,编码 234 个氨基酸组成的蛋白,预测分子量为 25.07 kD。将 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 蛋白进行 Pfam 结构域预测,发现这两个蛋白均含有 GPX 结构域,这说明克隆得到的基因是 GPX 基因。

分别将 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 的 cDNA 序列与基因组序列 (GenBank accession No. 分别是 Os02g0664000 和 Os06g0185900) 进行比较(图 1),结果发现两个基因都包含 6 个外显子和 5 个内含子。两个基因的第 2 到第 5 个外显子长度相同,但是两个基因所对应的内含子长度变化较大,*OsGPX3* 的 5 个内含子长度分别是 310、689、138、410、93 bp,而 *OsGPX4* 的 5 个内含子长度分别是 810、

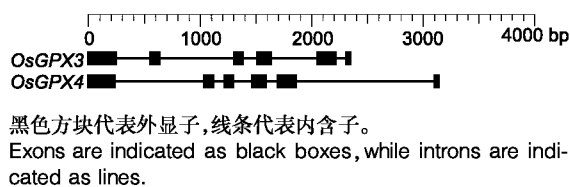


图 1 水稻 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 的基因结构
Fig. 1 Gene structures of *OsGPX3* and *OsGPX4*

109、180、102、1235 bp。

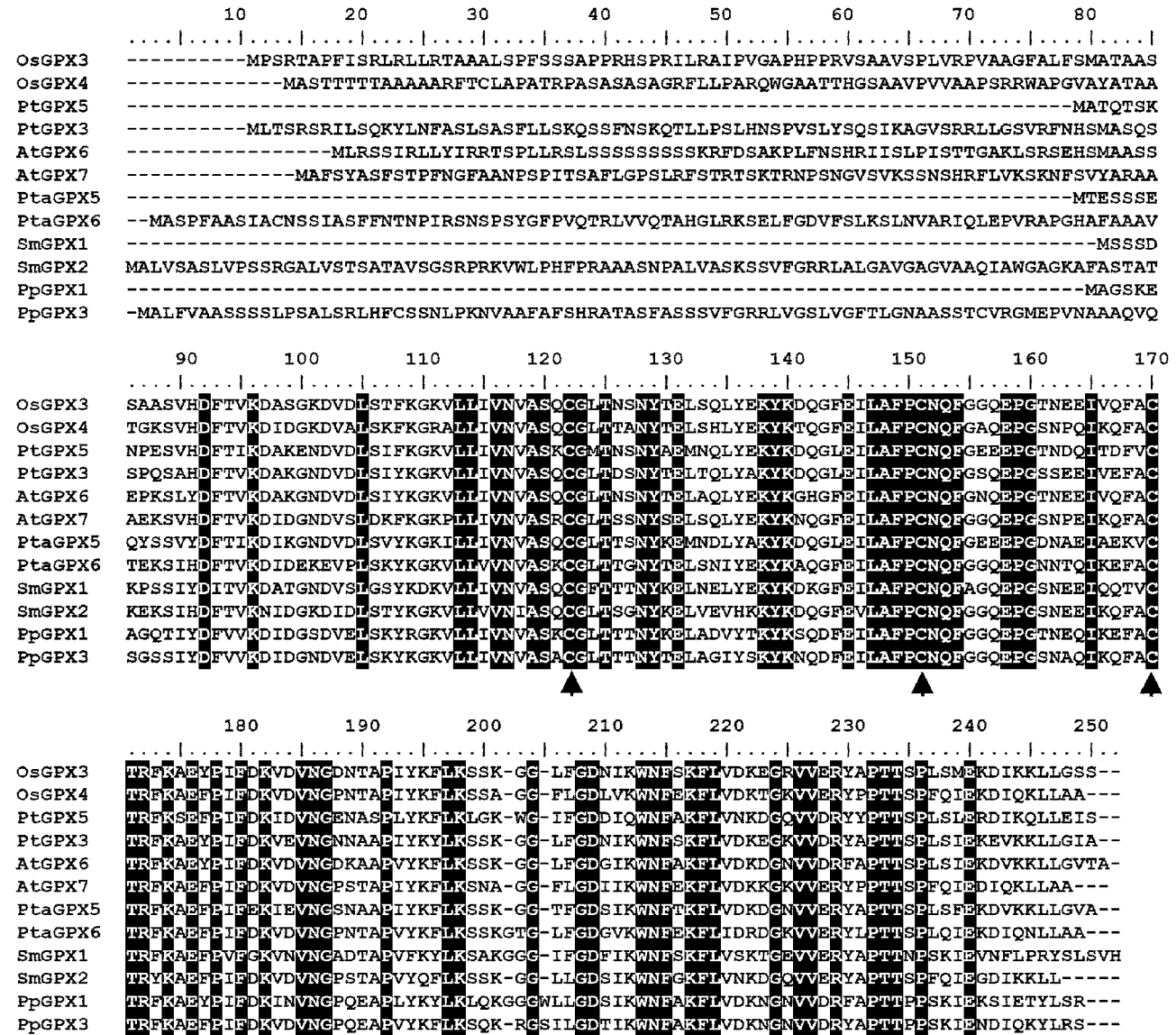
2.2 水稻 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 基因的序列与系统发生关系分析

为了研究水稻 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 基因与其他植物 GPX 基因的序列相似性,选取 5 个代表不同进化历史的陆地植物物种 GPX 基因为研究对象,包括苔藓植物小立碗藓 (*Physcomitrella patens*),蕨类植物江南卷柏 (*Selaginella moellendorffii*),裸子植物火炬松 (*Pinus taeda*),双子叶植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和毛果杨 (*Populus trichocarpa*)。序列比对分析发现(图 2),GPX 蛋白之间的序列相似性都比较高,其序列相似性范围是 40.1%~70.5%。其中,火炬松 PtaGPX5 蛋白和毛果杨 PtGPX5 蛋白序列相似性最高为 70.5%,江南卷柏 SmGPX1 蛋白和火炬松 PtaGPX6 蛋白序列相似性最低为 40.1%,而 *OsGPX3* 与 *OsGPX4* 蛋白序列相似性为 57.1% (表 2)。

GPX 属于硫氧还蛋白 (TRX) 超基因家族的成员,以 TRX 基因为外类群,对 GPX 进行系统发生分析,结果显示, *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 与其它所有 GPX 聚成一枝,其支持率为 100% (图 3)。

2.3 水稻 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 蛋白的结构模拟

图 4:A 和图 4:B 展示了用 Insight II 软件模拟的水稻 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 蛋白的三维结构。优化后的构象用 Profile-3D 进行氨基酸残基兼容性检验, Profile-3D 的分析结果如图 4:D 所示,所有的氨基酸检验得分都是正值,位于合理的范围,说明模拟得到的结构是可信的。结构比较发现 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 蛋白的三维结构高度保守(图 4:C)。*OsGPX3* 和 *OsGPX4* 蛋白的三维结构具有典型的硫氧还蛋白结构域结构,包含 6 个 β 折叠和 4 个 α 螺旋结构,其中有 4 个 β 折叠(β 3-6)形成反向重复的 β 折叠片层结构。



在所有植物 GPX 蛋白中均保守的氨基酸残基用黑色背景标示。植物 GPX 蛋白 3 个保守的半胱氨酸残基用黑色箭头标示。序列比对用以下序列构建: OsGPX3 (GenBank accession No. NP_001047659.1), OsGPX4 (GenBank accession No. BAH01597.1), PtGPX5 (GenBank accession No. XP_002299535.1), PtGPX3 (GenBank accession No. XP_002303583.1), AtGPX6 (GenBank accession No. NP_192897.2), AtGPX7 (GenBank accession No. NP_194915.2), PtaGPX5 (GenBank accession No. CX649990.1), PtaGPX6 (GenBank accession No. DR181825.1), SmGPX1 (GenBank accession No. XP_002983372.1), SmGPX2 (GenBank accession No. XP_002979231.1), PpGPX1 (GenBank accession No. XP_001767952.1), PpGPX3 (GenBank accession No. XP_001769487.1)。

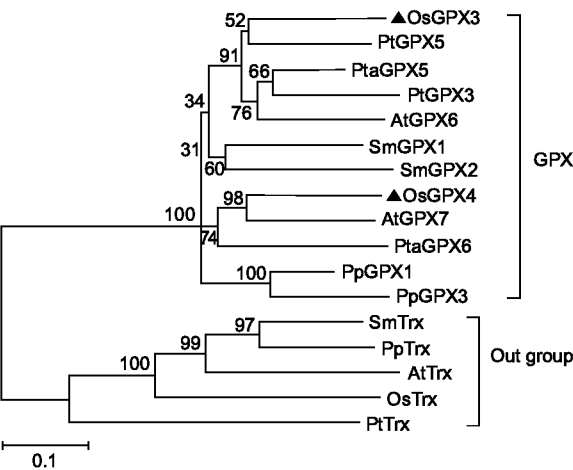
Conserved residues in all plant GPX proteins are marked in black. The three conserved cysteine residues of plant GPX proteins are marked with black arrows. This sequence alignment was created using the following sequences: OsGPX3 (GenBank accession No. NP_001047659.1), OsGPX4 (GenBank accession No. BAH01597.1), PtGPX5 (GenBank accession No. XP_002299535.1), PtGPX3 (GenBank accession No. XP_002303583.1), AtGPX6 (GenBank accession No. NP_192897.2), AtGPX7 (GenBank accession No. NP_194915.2), PtaGPX5 (GenBank accession No. CX649990.1), PtaGPX6 (GenBank accession No. DR181825.1), SmGPX1 (GenBank accession No. XP_002983372.1), SmGPX2 (GenBank accession No. XP_002979231.1), PpGPX1 (GenBank accession No. XP_001767952.1), PpGPX3 (GenBank accession No. XP_001769487.1)。

图 2 植物 GPX 蛋白的序列比对分析

Fig.2 Sequence alignment of plant GPX proteins

表 2 植物 GPX 蛋白的序列相似性分析
Table 2 Protein sequence identity of plant GPXs

蛋白名称 Protein name	OsGPX3	OsGPX4	PtGPX5	PtGPX3	AtGPX6	AtGPX7	PtaGPX5	PtaGPX6	SmGPX1	SmGPX2	PpGPX1	PpGPX3
OsGPX3												
OsGPX4	57.1											
PtGPX5	49.5	45.1										
PtGPX3	61.7	51.6	48.3									
AtGPX6	61.5	52.9	50.8	63.5								
AtGPX7	56.7	64.1	45.2	52.5	53.6							
PtaGPX5	51.2	47.6	70.5	53.7	53.8	47.8						
PtaGPX6	50.6	57.3	42.9	49.3	49.1	53.6	43.7					
SmGPX1	45.6	42.8	56	45.6	47.4	44.3	62.4	40.1				
SmGPX2	53.6	53.8	40.7	47.5	48.5	51.4	44.3	52.4	42.2			
PpGPX1	46.2	46.1	56.9	46.2	48.7	46.3	62.2	44.9	60.6	43.7		
PpGPX3	49.1	52.6	41.5	47.1	51	51.8	43.9	52	43.4	50.8	53.6	



构建系统发生树用的植物 GPX 序列见图 2 所示。植物 TRX 蛋白作为外类群。三角形用来突出显示 *OsGPX3* 和 *OsGPX4*。Affiliations of plant GPX sequences used in tree reconstruction are specified in the legend of Figure 2. Plant TRX proteins were used as out group. The triangles were used to show *OsGPX3* and *OsGPX4* extrusively.

图 3 植物 GPX 基因的系统发生分析
Fig. 3 Phylogenetic tree of plant GPX genes

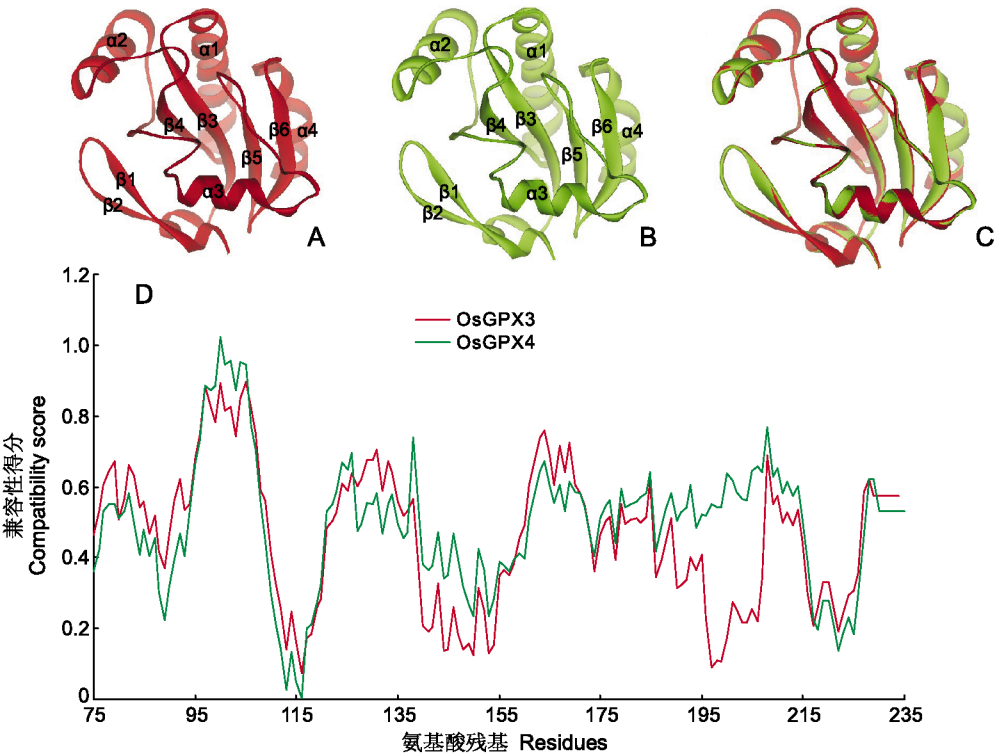
2.4 水稻 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 基因的表达谱

通过 RT-PCR 的方法检测了 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 基因在水稻正常生长条件下不同部位(根、茎、成熟叶、幼叶和叶鞘)中的表达分布,并对扩增产物进行了测序验证。结果表明(图 5), *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 基因在水稻所有检测的部位均表达,可能是组成型表达的基因。

2.5 水稻 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 蛋白表达、纯化及酶活性分析

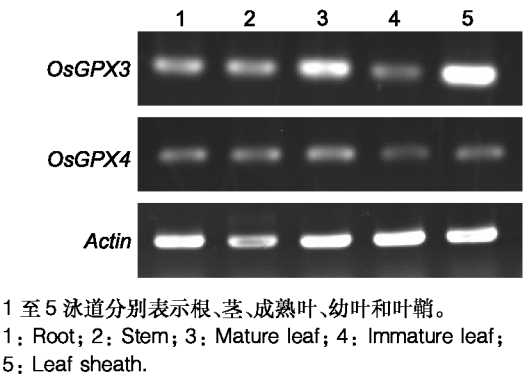
将 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 成熟蛋白的 cDNA 序列与 Δ PET30a 载体连接,构建了表达载体 PET30/*OsGPX3* 和 PET30/*OsGPX4*。 Δ PET30a 载体含有 6 的 His 标签,所以理论上表达的蛋白其 N 末端含有 6 个组氨酸^[13]。将构建的表达载体 PET30/*OsGPX3* 和 PET30/*OsGPX4* 分别转化到大肠杆菌 tuner 感受态细胞中,经 IPTG 诱导后发现,成熟的 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 蛋白都能够在大肠杆菌中高效表达(图 6)。通过镍柱亲和和层析纯化后,获得纯化的重组蛋白,SDS-PAGE 结果显示,蛋白分子量与预测的 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 成熟蛋白的分子量大小一致。

分别以 GSH 和 *E. coli* Trx 为还原剂,检测 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 蛋白对 3 种底物 H_2O_2 、tBOOH 和 COOH 的活性。结果表明,在以 GSH 为还原剂时,没有检测到 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 蛋白对 3 种氧化剂的活性。而当以 *E. coli* Trx 为还原剂时,能够检测到重组成熟 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 蛋白对 3 种氧化剂的活性。*OsGPX3* 对 H_2O_2 、tBOOH 和 COOH 底物的活性分别是 2.80 ± 0.03 、 1.19 ± 0.04 、 2.99 ± 0.05 $\mu\text{mol}/\text{min per mg}$, *OsGPX4* 对这 3 种底物的活性分别是 1.26 ± 0.01 、 0.70 ± 0.01 、 1.31 ± 0.02 $\mu\text{mol}/\text{min per mg}$, *OsGPX3* 对 3 种底物的活性均高于 *OsGPX4* (图 7)。



A 和 B 分别为 OsGPX3 和 OsGPX4 蛋白的结构；C 为 OsGPX3 (红色) 和 OsGPX4 (绿色) 蛋白的结构比较；D 为用 Profile-3D 程序对 OsGPX3 和 OsGPX4 蛋白结构的评估结果。
A and B: Structures of OsGPX3 and OsGPX4; C: Structural comparison of OsGPX3 (red) and OsGPX4 (green); D: Evaluation of structure of OsGPX3 (red) and OsGPX4 (green) by Profile-3D program.

图 4 水稻 OsGPX3 和 OsGPX4 蛋白三维结构模拟
Fig. 4 Structure modeling of OsGPX3 and OsGPX4 proteins

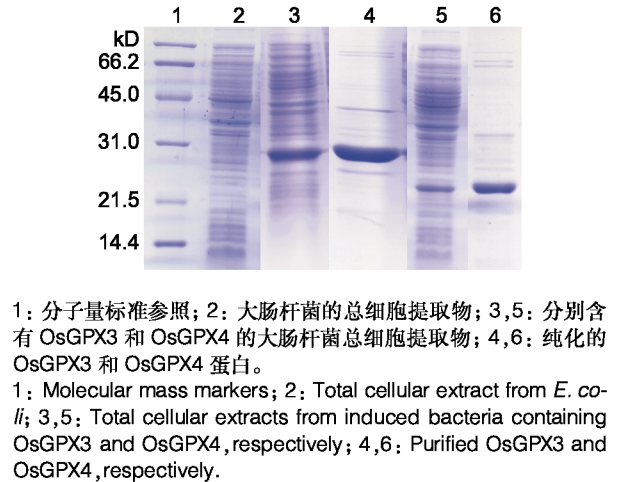


1 至 5 泳道分别表示根、茎、成熟叶、幼叶和叶鞘。
1: Root; 2: Stem; 3: Mature leaf; 4: Immature leaf; 5: Leaf sheath.
图 5 水稻 OsGPX3 和 OsGPX4 基因的表达谱
Fig. 5 Expression pattern of the *OsGPX3* and *OsGPX4* genes in various tissues of rice

3 讨论

植物在逆境胁迫下会产生大量活性氧,大量积累的活性氧会对植物细胞产生氧化损伤^[1],GPX 是植物用来清除活性氧的一种关键酶,对于保护细胞免受

胁迫下的氧化损伤具有重要作用^[15]。水稻是我国重要的粮食作物,但它的高产、稳产受到各种非生物逆境胁迫的制约,而 GPX 基因对植物抵抗非生物逆



1: 分子量标准参照; 2: 大肠杆菌的总细胞提取物; 3,5: 分别含有 OsGPX3 和 OsGPX4 的大肠杆菌总细胞提取物; 4,6: 纯化的 OsGPX3 和 OsGPX4 蛋白。
1: Molecular mass markers; 2: Total cellular extract from *E. coli*; 3,5: Total cellular extracts from induced bacteria containing *OsGPX3* and *OsGPX4*, respectively; 4,6: Purified *OsGPX3* and *OsGPX4*, respectively.
图 6 OsGPX3 和 OsGPX4 蛋白在大肠杆菌中的表达和纯化
Fig. 6 Overexpression and purification of GPX proteins

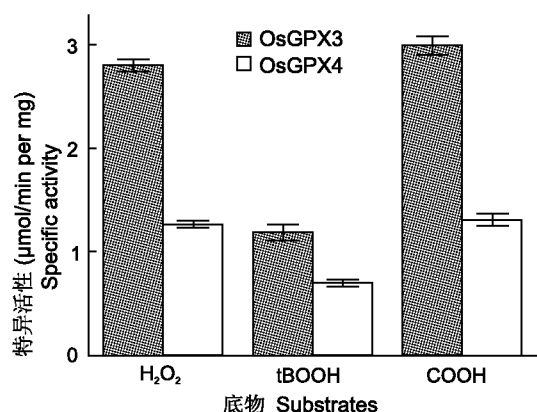


图7 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 蛋白的酶活性分析

Fig. 7 Enzymatic activity analysis of *OsGPX3* and *OsGPX4* proteins

境胁迫具有重要作用,因此在水稻中研究与抗性相关的 *GPX* 基因具有重要的理论意义与应用价值。

已有研究发现,在正常生长条件下,*OsGPX1* 基因在水稻叶和花中均表达,在盐、冷、干旱胁迫下,在叶中的表达量明显升高^[12]。*OsGPX2* 基因在水稻根、茎、叶、种子和幼苗中均表达,且在 H_2O_2 和铝离子诱导下,在芽中的表达量明显升高^[11]。在本研究中,我们发现水稻 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 在根、茎、成熟叶、幼叶和叶鞘中均表达,是组成型表达基因,预示着 *GPX* 基因可能在水稻的正常生长发育过程中及胁迫条件下均发挥着重要的作用。

序列比对分析发现,植物 *GPX* 蛋白序列中有 3 个保守的 Cys 残基,根据 Navrot 等的研究^[2],第 1 个和第 3 个 Cys 残基参与到 *GPX* 的催化过程中(图 2 中的第 122 和 170 位箭头处),在催化过程中,首先由第 1 个 Cys 残基与过氧化物反应,形成 Cys-SOH,然后 Cys-SOH 与第 3 个 Cys 残基形成一个分子内二硫键,再通过与 Trx 反应将二硫键还原,使 *GPX* 回到还原态。而在动物 *GPX* 中第 1 个 Cys 残基为硒代 Cys 残基取代,且不存在第 3 个保守的 Cys。根据活性测定结果,*OsGPX3* 和 *OsGPX4* 只能以 Trx 电子供体系统进行氧化还原反应,不能利用 GSH 电子供体系统,而在动物中则利用 GSH 电子供体系统进行氧化还原反应,这说明植物和动物 *GPX* 具有不同的催化机制。

水稻 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 蛋白不仅对 H_2O_2 有较高的活性,而且对复杂的氢过氧化物(tBOOH 和 COOH)也具有较高的活性,这说明 *GPX* 蛋白具

有比较宽的底物谱。由于过氧化氢酶和抗坏血酸过氧化物酶比 *GPX* 对 H_2O_2 具有更高的催化活性,但它们只是特异性地催化 H_2O_2 ,这可能预示着 *GPX* 在催化复杂的氢过氧化物方面具有独特的功能。

OsGPX3 与 *OsGPX4* 对 H_2O_2 、tBOOH 和 COOH 三种底物均有活性,根据 Zebin Wang 等的研究^[9],*OsGPX2* 在以 Trx 作为电子供体时,只对 phosphatidylcholine hydroperoxide 具有活性,而对 H_2O_2 和 tBOOH 没有活性。*OsGPX3* 对三种底物的活性均高于 *OsGPX4*,对 H_2O_2 、tBOOH 和 COOH 三种底物的活性,*OsGPX3* 分别是 *OsGPX4* 的 2.2、1.7 和 2.3 倍,两个蛋白的催化活性有较大差异。这说明水稻 *GPX* 家族的不同成员之间已经发生了较大的功能分化。

本研究经过整合序列分析、基因表达、酶活性及蛋白质三维结构数据,在水稻中鉴定出了组成型表达的具有广谱抗过氧化物功能的 *OsGPX3* 和 *OsGPX4* 基因,为深入揭示 *GPX* 在植物抗氧化胁迫中的独特作用,及利用具有广谱抗过氧化物功能的 *GPX* 对植物进行遗传改良,提高其抗氧化胁迫的能力奠定了基础。

参考文献:

- [1] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species; metabolism, oxidative stress, and signal transduction[J]. *Ann Rev Plant Biol*, 2004, 55: 373–399.
- [2] Navrot N, Collin V, Gualberto J, Gelhaye E, Hirasawa M, Rey P, Knaff D B, Issakidis E, Jacquot J P, Rouhier N. Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses[J]. *Plant Physiol*, 2006, 142: 1364–1379.
- [3] Arthur J R. The glutathione peroxidases[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57: 1825–1835.
- [4] Miao Y, Lv D, Wang P, Wang X C, Chen J, Miao C, Song C P. An *Arabidopsis* glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses[J]. *Plant Cell*, 2006, 18: 2749–2766.
- [5] Chang C C, Slesak I, Jorda L, Sotnikov A, Melzer M, Misalski Z, Mullineaux P M, Parker J E, Karpin-

- ska B, Karpinski S. *Arabidopsis* chloroplastic glutathione peroxidases play a role in cross talk between photooxidative stress and immune responses[J]. *Plant Physiol*, 2009, 150: 670–683.
- [6] Chen S, Vaghchhipawala Z, Li W, Asard H, Dickman M B. Tomato phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits cell death induced by Bax and oxidative stresses in yeast and plants [J]. *Plant Physiol*, 2004, 135: 1630–1641.
- [7] Criqui M C, Jamet E, Parmentier Y, Marbach J, Durr A, Fleck J. Isolation and characterization of a plant cDNA showing homology to animal glutathione peroxidases[J]. *Plant Mol Biol*, 1992, 18: 623–627.
- [8] Sugimoto M, Furui S, Suzuki Y. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from spinach [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, 61: 1379–1381.
- [9] Wang Z, Wang F, Duan R, Liu J Y. Purification and physicochemical characterization of a recombinant phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from *Oryza sativa*[J]. *J Biochem Mol Biol*, 2007, 40: 412–418.
- [10] Margis R, Dunand C, Teixeira F K, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family — an evolutionary overview[J]. *FEBS J*, 2008, 275: 3959–3970.
- [11] Li W J, Feng H, Fan J H, Zhang R Q, Zhao N M, Liu J Y. Molecular cloning and expression of a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homolog in *Oryza sativa* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1493: 225–230.
- [12] Kang S G, Jeong H K, Suh H S. Characterization of a new member of the glutathione peroxidase gene family in *Oryza sativa*[J]. *Mol Cells*, 2004, 17: 23–28.
- [13] Yang X, Sun W, Liu J P, Liu Y J, Zeng Q Y. Biochemical and physiological characterization of a tau class glutathione transferase from rice (*Oryza sativa*) [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2009, 47: 1061–1068.
- [14] Jung B G, Lee KO, Lee S S, Chi Y H, Jang H H, Kang S S, Lee K, Lim D, Yoon S C, Yun D J, Inoue Y, Cho M J, Lee S Y. A Chinese cabbage cDNA with high sequence identity to phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases encodes a novel isoform of thioredoxin-dependent peroxidase [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 12572–12578.
- [15] 苗雨晨, 白玲, 苗琛, 陈珈, 宋纯鹏. 植物谷胱甘肽过氧化物酶研究进展[J]. 植物学通报, 2005, 22(3): 350–356.

(责任编辑: 张平)