



毛白杨 *PtoGSTF4* 基因克隆及相关特性鉴定

韩学敏, 杨志灵, 杨海灵*

(北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要: 该研究从毛白杨中克隆到 1 个 Phi 类谷胱甘肽 S-转移酶(GST)基因(*PtoGSTF4*), 编码 213 个氨基酸。表达模式分析发现, *PtoGSTF4* 在正常生长、 H_2O_2 和莠去津处理后的茎、叶以及茎的韧皮部均表达, 属于组成型表达基因。在大肠杆菌中表达并纯化了 PtoGSTF4 重组蛋白, 酶学性质分析表明 PtoGSTF4 对 CDNB、NBD-Cl、NBC 和 Cum-OOH 等 4 种底物均有活性。动力学分析发现, PtoGSTF4 对 GSH 具有较高的亲和力, 而对 CDNB 的亲和力相对较低。在不同 pH 及温度条件下对 PtoGSTF4 蛋白进行活性检测, 发现 PtoGSTF4 在 pH 7.5~10.5 范围内或 30℃~60℃ 温度范围内有较高的活性。研究推测, PtoGSTF4 可能在毛白杨的抗逆生理中发挥重要作用。

关键词: 谷胱甘肽 S-转移酶; 毛白杨; 表达模式; 酶学性质分析

中图分类号: Q785; Q786

文献标志码: A

Cloning and Characterization of *PtoGSTF4* from *Populus tomentosa*

HAN Xuemin, YANG Zhiling, YANG Hailing*

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

Abstract: In this study, a Phi class GST named *PtoGSTF4* was cloned from *Populus tomentosa*. *PtoGSTF4* encodes a protein of 213 amino acid residues. RT-PCR revealed that *PtoGSTF4* was a constitutively expressed gene that is expressed in stem, leaf and phloem of stem of *P. tomentosa* under normal growth condition, and H_2O_2 and atrazine stressed conditions. The recombinant PtoGSTF4 was expressed in *E. coli* and purified by Ni^{2+} sepharose affinity chromatography. PtoGSTF4 showed enzymatic activities towards substrates CDNB, NBD-Cl, NBC and Cum-OOH. Kinetic analysis found that the affinity of PtoGSTF4 to GSH was higher than that to CDNB. PtoGSTF4 had optimal pH ranging from 7.5~10.5 and optimal temperature ranging from 30℃~60℃. Our results indicated that PtoGSTF4 may play important roles in stress tolerance in *P. tomentosa*.

Key words: glutathione S-transferase; *Populus tomentosa*; expression pattern; enzymatic characterization

植物在生长发育过程中经常遭遇各种逆境胁迫, 如干旱、高温、低温、高盐和各种有毒物质等, 这些逆境条件能够抑制植物的正常生长发育^[1]。植物在长期的进化过程中已经发展出多种系统来抵抗逆境胁迫的危害, 包括各种酶类和非酶类物质, 如抗氧化酶类、谷胱甘肽 S-转移酶、晚期胚胎发生富集蛋白(LEA)、甜菜碱和海藻糖等^[2-6]。谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST, EC. 2. 5. 1.

18) 是一类具有解毒、抗逆、催化细胞内的多种复合物与还原型谷胱甘肽(GSH)结合和信号转导等多种生理功能的蛋白质超家族, 广泛分布于植物、动物、真菌和细菌中。植物谷胱甘肽 S-转移酶的主要功能是参与植物的解毒代谢, 它催化生物体内源或外源的亲电子化合物与还原型谷胱甘肽(GSH)结合, 使其能够被转运进液泡, 达到解毒的功能^[3]。植物 GST 基因家族主要包含 8 种类型: Tau、Phi、

收稿日期: 2013-08-23; 修改稿收到日期: 2013-10-22

基金项目: 国家自然科学基金(31270641)

作者简介: 韩学敏(1987—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事蛋白质结构与生化性质研究。E-mail: hxm.19870824@163.com

* 通信作者: 杨海灵, 博士, 副教授, 主要从事植物蛋白质结构与功能研究。E-mail: yhailing@yahoo.com.cn

Theta、Zeta、DHAR、Lambda、TCHQD 和 EF1B γ 。Phi 类是植物特有的 GST 类型,在植物抵抗逆境胁迫以及生长发育过程中发挥重要作用^[7]。例如,在烟草(*Nicotiana tabacum*)中过量表达玉米(*Zea mays*)的一个 Phi 类 GST 后,转基因烟草对除草剂甲草胺的抗性增强^[8];在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中过量表达一个 Phi 类 GST 可以明显增强转基因植株对紫外线辐射损伤的耐受性^[9]。

毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.)为杨柳科,杨属大乔木,广泛分布于中国北方地区,其树干端直,高大挺拔,适应性强,是优良的园林绿化及造林树种,且其生长迅速,木材轻而细密,是优良的用材树种^[10]。对毛白杨中抗性相关基因的研究将有助于揭示毛白杨的抗逆机理,并将有助于利用抗性基因对毛白杨进行遗传改良。先前已从毛白杨中克隆到 2 个 Phi 类 GST 基因,并对其表达分布和编码蛋白质的生化性质进行了鉴定^[11],然而在毛白杨中是否还存在其他 Phi 类 GST 基因,其编码蛋白的生化性质如何并不清楚。在本研究中,从毛白杨中克隆到另外 1 个 Phi 类 GST 基因,并对其进行了系统发生关系、表达模式、蛋白结构和生化性质等方面的分析,为深入揭示毛白杨的抗逆机理奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验材料毛白杨取自中国科学院北京植物园。

1.2 毛白杨 *PtoGSTF4* 基因的克隆

取新鲜的毛白杨叶片组织约 0.1 g,按照 BioTeKe 公司植物总 RNA 提取试剂盒说明书提取毛白杨叶片的总 RNA,并用 TaKaRa 公司反转录试剂盒将总 RNA 反转录合成 cDNA。根据毛果杨 *PtGSTF4* 基因序列设计引物 PtoGSTF4-EX1(AGGATCCATGGCAGAAATCATTAAGT)和 PtoGSTF4-EX2(TAAGCTTTTACTTGTTCATGGCAACGA)。以毛白杨叶 cDNA 为模板,利用引物 PtoGSTF4-EX1/EX2 进行 PCR 扩增。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,用鼎国公司的 DNA 纯化回收试剂盒纯化回收目的条带,将纯化产物接入全式金公司的 pEASY-T3 载体。将构建好的重组质粒转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞,挑选多个阳性克隆进行测序。

1.3 系统发生关系分析

将 *PtoGSTF4* 基因编码的氨基酸序列与其他植物 GST 的氨基酸序列通过 MUSCLE 网站(ht-

tp://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/)进行比对,并手动校对。利用 MEGA v. 5.2.1 软件构建 NJ 进化树,Bootstrap 值为 1000。

1.4 毛白杨 *PtoGSTF4* 基因的组织表达分析

分别用 5.0% H₂O₂ 和 1.5% 莠去津喷洒毛白杨植株。处理 12 h 后,用 BioTeKe 公司植物总 RNA 提取试剂盒分别提取毛白杨茎、叶和茎韧皮部的总 RNA,并用 TaKaRa 公司反转录试剂盒反转录合成 cDNA。根据测序得到的 *PtoGSTF4* 基因的序列,设计引物 PtoGSTF4-SP1(CTCTCAACAGCTACGCAACG)和 PtoGSTF4-SP2(GCTCCCAGTTCAGCTTTGA),进行组织表达分布检测。RT-PCR 反应程序:94 °C 预变性 3 min;94 °C 30 s,55 °C 40 s,72 °C 1 min,35 个循环;最后 72 °C 延伸 3 min,内标为毛白杨 *Actin* 基因,引物为 PtActin-1(GAGACCTTCAACACTCCTGCTATG)和 PtActin-2(CAGGTCAAGACGAAGAATGGC)。

1.5 *PtoGSTF4* 蛋白结构模拟

以拟南芥 Phi 类 GST(PDB:1GNW)晶体结构为模板,以分子模拟软件 Insight II 中的 Align 2D 程序进行序列比对。运用蛋白结构模拟模块 Modeler 进行三维结构模拟,并用 profile-3D 程序对模拟的结构进行校验,挑选校验值最高的模拟结构。

1.6 *PtoGSTF4* 蛋白的表达和纯化

用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切 *PtoGSTF4*/pEASY-T3 重组质粒,将酶切后的 *PtoGSTF4* 基因片段连接到 pET30a 表达载体中,使表达的 *PtoGSTF4* 蛋白前端带有 6×His 的标签,将构建好的重组质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞。将 *PtoGSTF4* 重组表达菌接种于含有卡那霉素的 LB 培养基中培养过夜,然后按 1:100 比例将菌液稀释后扩大培养至 A₆₀₀ 为 0.5,加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol·L⁻¹,37 °C 培养过夜。将诱导蛋白表达后的菌液于 4 °C、6 500×g 离心 10 min,收集菌体,用缓冲液 A(20 mmol·L⁻¹ 咪唑、0.5 mol·L⁻¹ NaCl、20 mmol·L⁻¹ Na₃PO₄, pH 7.5)重悬菌体,将重悬后的菌体置于冰上进行超声破碎裂解。4 °C、10 000×g 离心 10 min,分别取少量菌体、超声破碎离心后的上清液和沉淀,经 SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达情况。用缓冲液 A 平衡 Ni 亲和层析柱(购自于 Amersham Pharmacia Biotech 公司),将超声破碎离心后得到的上清液上样至平衡后的 Ni 亲和柱,结合 30 min 后以缓冲液 A 洗脱杂蛋白,最后用缓冲液 B(0.5 mol·L⁻¹

咪唑、0.5 mol · L⁻¹ NaCl、20 mmol · L⁻¹ Na₃PO₄, pH 7.5)洗脱目的蛋白,收集目的蛋白洗脱峰进行蛋白的生化性质检测。

1.7 PtoGSTF4 蛋白生化特性检测

选用 CDNB、DCNB、NBC、NBD-Cl、HED、DHA、fluorodifen 和 Cum-OOH 等 8 种底物对 PtoGSTF4 进行酶学性质分析。PtoGSTF4 对 CDNB、DCNB 和 NBC 的催化活性参照 Habig 等^[12]的方法,对 NBD-Cl 的催化活性参照 Ricci 等^[13]的方法,对 HED、DHA、fluorodifen 和 Cum-OOH 的催化活性参照 Edwards 等^[14]的方法。所有的测活反应都在 25 °C 进行,活性测定用 Evolution 300 紫外可见分光光度计(Thermo)。以 CDNB 为底物,参照 Yuen 等^[15]的方法测定 PtoGSTF4 在不同 pH 下的催化活性。在 15 °C ~ 70 °C 范围内,以 5 °C 为间隔测定 PtoGSTF4 在不同温度下的催化活性。蛋白浓度通过测量蛋白溶液在 A₂₈₀ 的吸光度值确定。

动力学常数通过测量 PtoGSTF4 在不同浓度 GSH 和 CDNB 条件下的催化活性进行分析。在 PtoGSTF4 对 GSH 的动力学分析时,固定 CDNB 的浓度为 1.0 mmol · L⁻¹,通过测量 GSH 浓度范围为 0.1 ~ 1.0 mmol · L⁻¹ 时 PtoGSTF4 在不同 GSH 浓度条件下的催化活性获得。在 PtoGSTF4 对 CDNB 的动力学分析时,固定 GSH 的浓度为 1.0 mmol · L⁻¹,通过测量 CDNB 浓度范围为 0.6 ~ 2.0 mmol · L⁻¹ 时 PtoGSTF4 在不同 CDNB 浓度条件下的催化活性获得。酶动力学参数利用 Hyper32 程序(<http://homepage.ntlworld.com/john.east-erby/hyper32.html>),通过非线性回归分析获得。

2 结果与分析

2.1 毛白杨 *PtoGSTF4* 基因克隆

以毛白杨叶 cDNA 为模板,利用引物 PtoGSTF4-EX1/2 克隆得到 *PtoGSTF4* 的 cDNA 序列。*PtoGSTF4* 的 cDNA 序列包含 642 bp 的开放阅读框(包括终止密码子),编码 213 个氨基酸(图 1),预测分子量为 23.7 kD,与毛白杨 *PtGSTF4* 的氨基酸序列相似性为 94.4%。保守结构域分析发现,*PtoGSTF4* 基因所编码的蛋白含有 Phi 类 GST 结构域,表明本研究克隆到的基因是 Phi 类 GST 基因。

2.2 植物 Phi 类 GST 基因的系统发生关系分析

选取代表不同进化历史的苔藓植物小立碗藓(*Physcomitrella patens*)、蕨类植物江南卷柏(*Selaginella moellendorffii*)、裸子植物油松(*Pinus*

tabulaformis)、单子叶植物水稻和玉米,以及双子叶植物拟南芥和毛果杨(*Populus trichocarpa*)的 Phi 类 GST 基因为研究对象,并将其他类型的植物 GST 基因,包括 Theta、DHAR、Zeta、Tau 和 Lambda 等类型加入到系统发生关系分析中。系统发生关系分析发现,所有的植物 Phi 类 GST 基因聚为一支,支持率为 98%,支持本研究克隆到的基因为 Phi 类 GST 基因。*PtoGSTF4* 与毛果杨的 *PtGSTF4* 聚在一起,且支持率为 100%,表明 *PtoGSTF4* 为 *PtGSTF4* 的直系同源基因(图 2)。

2.3 毛白杨 *PtoGSTF4* 基因的表达模式分析

利用反转录 PCR 方法研究 *PtoGSTF4* 基因在正常生长条件,以及 H₂O₂ 和 莠去津胁迫处理条件下在不同部位(茎、叶和茎韧皮部)的表达分布。结果发现,*PtoGSTF4* 基因在检测的所有生长条件下的所有部位均表达(图 3),表明 *PtoGSTF4* 基因是组成型表达基因,可能在毛白杨的生长发育过程中,在各种生长条件下的各个部位均发挥重要作用。

2.4 毛白杨 *PtoGSTF4* 蛋白的三维结构模拟

用 InsightII 软件对 *PtoGSTF4* 蛋白进行三维结构模拟(图 4,A),用 Profile-3D 对模拟结构进行校验,发现除 C 末端的 6 个氨基酸残基得分为负值外,其余位点的得分均为正值,表明模拟结构具有较高的可信度(图 4,B)。*PtoGSTF4* 蛋白含有 2 个结构域:由 α 螺旋和 β 折叠组成的 N 端结构域(N-domain)以及由多个 α 螺旋组成的 C 端结构域(C-domain)。N 端结构域含有与 GSH 结合的位点,在不

```
ATGGCAGAAATCATTAAAGTCCACGGAAGCGCCCTCTCAACAGCTACGCAACGAGTTTGG
M A E I I K V H G S A L S T A T Q R V L
GCTTGCCTTCATGAGAAGGAGCTTGAGTTCGAGTTTATTCCTGTCAACATGGCGGTAGGG
A C L H E K E L E F E F I P V N M A V G
GAGCACAGAAAGAGCCATTCTTGCCTCAATCCATTGGTCAAGTCCAGCTTTTGAA
E H K K E P F L A L N P F G Q V P A F E
CAGGGAGATCTTAAGCTCTTGAATCAAGGGCAATCACTCAATACATTGCCACGGGTAT
Q G D L K L F E S R A I T Q Y I A H G Y
ACAGACAAGGGACTCTCTTGTATCCAGGCAAGCAGATGGCGACATTATCGGTGTGG
T D K G T P L V I P G K Q M A T L S V W
ATGGAGGTGAGGCTCACCAATTTGACCCAGTAGCTTCAAGCTGAAGTGGGAGTACTT
M E V E A H Q F D P V A S K L N W E L L
TTTAAGCCAATGTTTGAATTCACAGATAATGACGCGGTGGAGGAAACAGGCTAAG
F K P M F G I P T D N A A V E E N E A K
CTCGGTAAGTTCTCGATATCTACGAGTCAAGTTGGCTCAGTCCAAGTACTTGGGAGGC
L G K V L D I Y E S R L A Q S K Y L G G
GATGTCTTACCTTGGCTGATTTGCACCATCTCCCAACATATCTGGCGCGATGAGGACA
D V F T L A D L H H L P N I S G A M R T
CAGGTGAAGAACTATTTGATTCTCGACCCCATGTTAGCGCCTGGGTAGCGGATATCAC
Q V K K L F D S R P H V S A W V A D I T
TCGAGGACAGCTTGGGCAAGGTCGTGCCATGAACAAGTAA
S R T A W A K V V A M N K *
```

图 1 毛白杨 *PtoGSTF4* 基因的核苷酸序列和推测的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *PtoGSTF4*

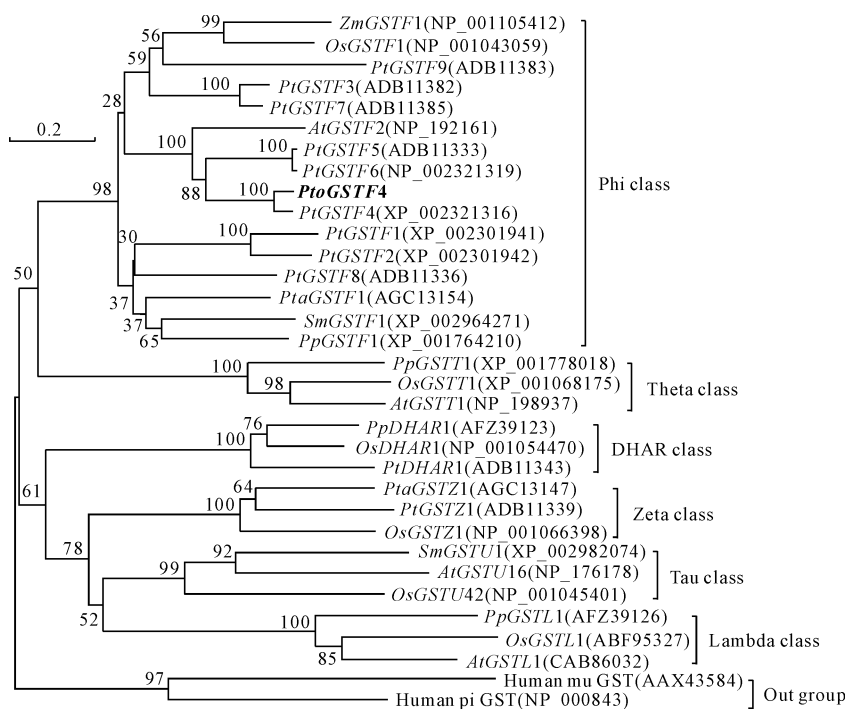


图 2 毛白杨 *PtoGSTF4* 基因的系统发育分析

标尺代表遗传距离;节点处的数字代表从 1000 次重复计算得到的 bootstrap 百分比值

Fig. 2 Phylogenetic tree of *P. tomentosa* *PtoGSTF4*

The scale bar represents genetic distance; Numbers on branches indicate the bootstrap percentage values calculated from 1000 replicates

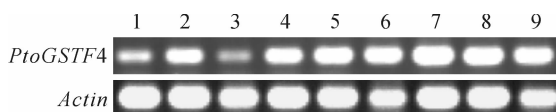


图 3 毛白杨 *PtoGSTF4* 基因的表达分布

1~9 分别是正常生长条件下(1~3)、 H_2O_2 处理(4~6)和莠去津处理(7~9)后, *PtoGSTF4* 基因分别在茎(1、4、7)、叶(2、5、8)和茎韧皮部(3、6、9)中的表达情况

Fig. 3 Expression pattern of *P. tomentosa* *PtoGSTF4* in various tissues under different conditions

1~9 represent the expression pattern of *PtoGSTF4* in stem(1,4,7), leaf (2,5,8) and phloem(3,6,9) of stem under normal growth condition(1~3), H_2O_2 (4~6) and atrazine(7~9) stressed conditions, respectively

同类型的 GST 中通常比较保守, C 端结构域含有与第二底物结合的位点, 在不同 GST 中变化相对较大。

2.5 毛白杨 *PtoGSTF4* 蛋白的酶学性质分析

将重组质粒 pET30a/*PtoGSTF4* 转化大肠杆菌感受态细胞, 经 IPTG 诱导蛋白表达, 发现 *PtoGSTF4* 为可溶性表达, 通过亲和层析纯化后获得纯化的重组蛋白(图 5)。

测定了 *PtoGSTF4* 对 CDNB、NBD-Cl、NBC、fluorodifen、Cum-OOH、HED、DHA 和 DCNB 等多

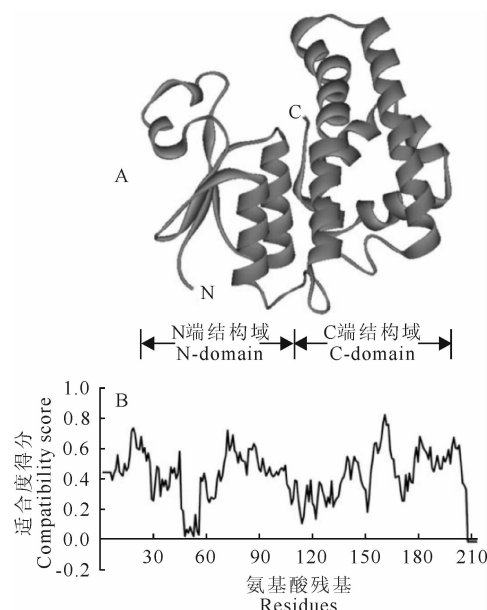


图 4 毛白杨 *PtoGSTF4* 蛋白三维结构的模拟

A. *PtoGSTF4* 的三维结构; B. 用 Profile-3D 对模拟蛋白的评估结果

Fig. 4 Structure modeling of *PtoGSTF4* protein
A. Structure of *PtoGSTF4* protein; B. Evaluation of the structure of *PtoGSTF4* by Profile-3D

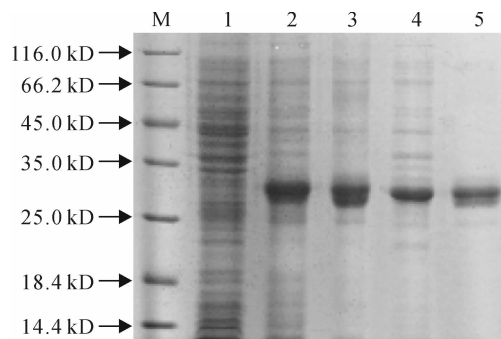


图5 毛白杨 *PtoGSTF4* 蛋白在大肠杆菌中的表达和纯化
M. 蛋白分子量标准;1. BL21;2. pET30a/*PtoGSTF4* 诱导表达;
3. pET30a/*PtoGSTF4* 诱导表达,超声破碎并离心后的上清;
4. pET30a/*PtoGSTF4* 诱导表达,超声破碎并离心后的沉淀;
5. 纯化的 *PtoGSTF4* 重组蛋白

Fig. 5 Overexpression and purification of *P. tomentosa* *PtoGSTF4* protein in *E. coli*

M. Molecular mass marker;1. *E. coli* BL21;2. Induced *E. coli* cells harboring pET30a/*PtoGSTF4* plasmid;3. Supernatant after ultrasonication and centrifugation of induced *E. coli* cells harboring pET30a/*PtoGSTF4* plasmid;4. Cell pellet after ultrasonication and centrifugation of induced *E. coli* cells harboring pET30a/*PtoGSTF4* plasmid;5. Purified recombinant *PtoGSTF4* protein

种底物的活性。*PtoGSTF4* 对 DCNB、fluorodifen、HED 和 DHA 等 4 种底物均没有催化活性。*PtoGSTF4* 对 CDNB、NBD-Cl、NBC 和 Cum-OOH 的催化活性分别为 (0.504 ± 0.007) 、 (0.596 ± 0.005) 、 (1.668 ± 0.105) 和 $(0.093 \pm 0.008) \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

以 CDNB 和 GSH 为底物,对 *PtoGSTF4* 进行动力学分析。动力学分析发现,*PtoGSTF4* 对 GSH 有比较高的亲和力,对 GSH 的 K_m 值为 $(0.098 \pm 0.006) \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,对 GSH 的催化效率为 $2.796 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$ 。相对于对 GSH 的亲和力,*PtoGSTF4* 对 CDNB 的亲和力较低,对 CDNB 的 K_m 值为 $(18.807 \pm 1.987) \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,对 CDNB 的催化效率为 $0.275 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$ 。

以 CDNB 和 GSH 为底物检测了 *PtoGSTF4* 在不同 pH 下的催化活性,发现 *PtoGSTF4* 在碱性 pH 范围内有比较高的催化活性。当检测的 pH 为 5~10 时,*PtoGSTF4* 的催化活性随 pH 的升高而增加,*PtoGSTF4* 在 pH 为 10 时催化活性最高。在 pH 为 7.5~10.5 时,*PtoGSTF4* 的活性值均高于最高活性的 66%。当 pH 低于 5 时,*PtoGSTF4* 不能够进行催化(图6,A),说明 *PtoGSTF4* 能在碱性的细胞环境中

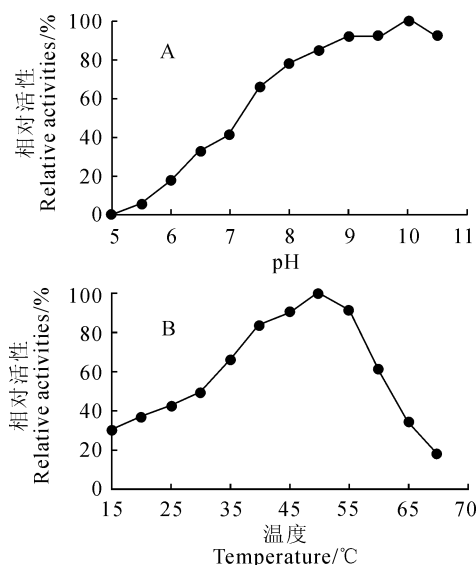


图6 *PtoGSTF4* 在不同 pH(A)和温度条件下(B)的活性分析

Fig. 6 Catalytic activity analysis of *PtoGSTF4* protein under different pH(A) and temperature conditions(B)

发挥作用,而在酸性的细胞环境中则不能发挥作用。

检测 *PtoGSTF4* 在不同温度下的催化活性,发现 *PtoGSTF4* 在高温下有比较高的催化活性。在 $15^\circ\text{C} \sim 50^\circ\text{C}$ 的范围内,随着温度的升高,*PtoGSTF4* 的催化活性不断增加,当温度为 50°C 时,*PtoGSTF4* 催化活性最高。在温度范围为 $30^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ 之间时,*PtoGSTF4* 的活性值均高于最高活性的 49% (图6,B),这预示着 *PtoGSTF4* 对于植物在高温条件下抵抗逆境胁迫具有作用。

3 讨论

植物 GST 基因家族包含 8 种类型^[7],其中 Tau 和 Phi 是最大的 2 种类型,如拟南芥中含有 28 个 Tau 和 13 个 Phi 类 GST,毛果杨中含有 58 个 Tau 和 9 个 Phi 类 GST^[16]。本研究对保守结构域分析发现,*PtoGSTF4* 蛋白具有 Phi 类 GST 结构域。另外,选取苔藓植物、蕨类植物、裸子植物、被子植物中的双子叶和单子叶植物 Phi 类 GST,以及其他类型 GST 共同进行系统发生关系分析发现,*PtoGSTF4* 与所有其他植物的 Phi 类 GST 聚成一枝。因此,保守结构域和系统发生关系分析都支持本研究克隆得到的 *PtoGSTF4* 基因是 Phi 类 GST 基因。包括先前从毛白杨中克隆到 2 个 Phi 类 GST 基因^[11],已经从毛白杨中克隆得到 3 个 Phi 类 GST 基因,而与毛白杨亲缘关系很近的毛果杨中含有 9 个 Phi 类 GST,因此,在毛白杨中可能还存在其他 Phi 类 GST 同源基因。

先前对其他物种中 GST 的研究发现,毛果杨的 9 个 Phi 类 GST 中有 7 个是组成型表达基因^[17],油松中 7 个 Phi 类 GST 都是组成型表达^[18],毛白杨的 *PtoGSTF1* 和 *PtoGSTF2* 也是组成型表达^[11]。本研究发现,*PtoGSTF4* 在各种生长条件下的茎、叶和茎的韧皮部中均表达,说明 *PtoGSTF4* 也是组成型表达基因。这表明在裸子植物和被子植物的不同物种中,大多数 Phi 类 GST 可能都是组成型表达的基因,可能在植物的生长发育过程中,在不同生长条件下,不同部位均发挥重要作用。

系统发生关系分析发现,毛白杨 *PtoGSTF4* 与毛果杨 *PtGSTF4* 是直系同源基因,序列高度相似。

催化活性比较发现,*PtoGSTF4* 与 *PtGSTF4* 对 CDNB、NBD-Cl 和 NBC 均有酶学活性,而对 DCNB 和 DHA 均没有酶学活性;但两者的催化活性不同,*PtGSTF4* 对 CDNB、NBD-Cl 和 NBC 等 3 种底物的催化活性分别是 *PtoGSTF4* 的 7.2、1.8 和 1.8 倍,对 3 种底物的催化活性,2 个蛋白之间均存在显著性差异。而且 *PtoGSTF4* 与 *PtGSTF4* 对 GSH 的亲和力不同,*PtoGSTF4* 对 GSH 的亲和力是 *PtGSTF4* 的 20.6 倍,2 个蛋白对 GSH 的亲和力存在显著性差异^[17]。这说明毛白杨的 *PtoGSTF4* 和毛果杨中的直系同源基因 *PtGSTF4* 已经发生了功能的分化。

参考文献:

- [1] WANG W, VINOCUR B, ALTMAN A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance[J]. *Planta*, 2003, **218**(1): 1—14.
- [2] MISHRA N P, MISHRA R K, SINGHAL G S. Changes in the activities of anti-oxidant enzymes during exposure of intact wheat leaves to strong visible light at different temperatures in the presence of protein synthesis inhibitors[J]. *Plant Physiology*, 1993, **102**(3): 903—910.
- [3] EDWARDS R, DIXON D P, WALBOT V. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health[J]. *Trends in Plant Science*, 2000, **5**(5): 193—198.
- [4] ESPELUND M, SAEBOE-LARSEN S, HUGHES D W, et al. Late embryogenesis-abundant genes encoding proteins with different numbers of hydrophilic repeats are regulated differentially by abscisic acid and osmotic stress[J]. *Plant Journal*, 1992, **2**(2): 241—252.
- [5] GIRI J. Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, **6**(11): 1 746—1 751.
- [6] GARG A K, KIM J K, OWENS T G, et al. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, **99**(25): 15 898—15 903.
- [7] SMITH A P, DERIDDER B P, GUO W J, et al. Proteomic analysis of *Arabidopsis* glutathione S-transferases from benoxacor- and copper-treated seedlings[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, **279**: 26 098—26 104.
- [8] KARAVANGELI M, LABROU N E, CLONIS Y D, et al. Development of transgenic tobacco plants overexpressing maize glutathione S-transferase I for chloroacetanilide herbicides phytoremediation[J]. *Biomolecular Engineering*, 2005, **22**(4): 121—128.
- [9] LIU X F(刘新仿), LI J Y(李家洋). Characterization of an ultra-violet inducible gene that encodes glutathione S-transferase in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), 2002, **29**(5): 458—460(in Chinese).
- [10] ZHAO H Y(赵华燕), WEI J H(魏建华), LU J(路 静), et al. Lignin reduction in transgenic poplars by expressing antisense *CCoAOMT* gene[J]. *Progress in Natural Science* (自然科学进展), 2004, **14**(9): 1067—1071(in Chinese).
- [11] LI D(李 迪), TANG ZH X(唐振鑫), LIU H J(刘海静), et al. Molecular characterization of two Phi glutathione S-transferases from *Populus tomentosa*[J]. *Chinese Bulletin of Botany* (植物学报), 2012, **47**(3): 248—256(in Chinese).
- [12] HABIG W H, PABST M J, JAKOBY W B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1974, **249**(22): 7 130—7 139.
- [13] RICCI G, CACCURI A M, LO BELLO M, et al. Colorimetric and fluorometric assays of glutathione transferase based on 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole[J]. *Analytical Biochemistry*, 1994, **218**(2): 463—465.
- [14] EDWARDS R, DIXON D P. Plant glutathione transferases[J]. *Methods in Enzymology*, 2005, **401**: 169—186.
- [15] YUEN W K, HO J W. Purification and characterization of multiple glutathione S-transferase isozymes from *Chironomidae* larvae[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2001, **129**(2—3): 631—640.
- [16] LIU Y J, HAN X M, REN L L, 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[J]. *Plant Physiology*, 2013, **161**(2): 773—786.
- [17] LAN T, YANG Z L, YANG X, et al. Extensive functional diversification of the *Populus* glutathione S-transferase supergene family[J]. *The Plant Cell*, 2009, **21**(12): 3 749—3 766.
- [18] LAN T, WANG X R, ZENG Q Y. Structural and functional evolution of positively selected sites in pine glutathione S-transferase enzyme family[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, **288**(34): 24 441—24 451.