

毛白杨细胞质抗坏血酸过氧化物酶 基因的克隆及表达分析

张 蕾, 王昱堃, 刘 蕾, 尹 玢, 曹 山, 陆 海*

(北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘 要: 利用同源克隆技术得到 1 个毛白杨细胞质抗坏血酸过氧化物酶基因, 命名为 *PcAPX*。该基因编码 249 个氨基酸残基, 预测分子量为 33.01 kD。采用原核表达技术在大肠杆菌中表达并纯化该蛋白并进行酶活性分析, 结果表明: 重组 *PcAPX* 蛋白对抗坏血酸(AsA)和过氧化氢(H_2O_2)有很高的活性, 其对抗坏血酸的米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_{max})分别为 $(0.71 \pm 0.03) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(0.41 \pm 0.02) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$; 对过氧化氢的 K_m 和 V_{max} 分别为 $(0.60 \pm 0.21) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(0.35 \pm 0.12) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, 表明 *PcAPX* 对 AsA 和 H_2O_2 拥有较高的催化底物的能力和催化效率。利用实时定量 RT-PCR 分析毛白杨 *PcAPX* 基因的表达模式, 结果表明其在老叶中表达量高于新叶、韧皮部、形成层和根部。该研究结果将进一步促进毛白杨 *APX* 基因家族成员参与植物生长调控的研究。

关键词: 毛白杨; 细胞质抗坏血酸过氧化物酶; 克隆; 原核表达; 酶学分析

中图分类号: Q785; Q786

文献标志码: A

Cloning and Expression of an Cytosolic Ascorbate Peroxidase Gene from *Populus tomentosa*

ZHANG Lei, WANG Yukun, LIU Lei, YIN Bin, CAO Shan, LU Hai*

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

Abstract: In this study, a *Populus tomentosa* cytosolic *APX* gene, named as *PcAPX*, was identified and characterized. The recombinant *PcAPX* protein, encoding a 249-residue protein with a calculated mass of 33.01 kD, showed high activity towards ascorbic acid (AsA) and H_2O_2 . At fixed H_2O_2 concentration, the K_m and V_{max} values were $(0.71 \pm 0.03) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $(0.41 \pm 0.02) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ for AsA. And at fixed AsA concentration, the K_m and V_{max} values were $(0.60 \pm 0.21) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $(0.35 \pm 0.12) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ for H_2O_2 . These data showed that the protein was active with AsA and H_2O_2 and had high catalytic efficiency. Real-time PCR analysis showed that the expression levels of *PcAPX* was higher in the mesophyll of aged leaves than that of other tissues. This research provided the theoretical support to investigate roles of *APX* gene family in plant growth regulation.

Key words: *Populus tomentosa*; cytosolic ascorbate peroxidase; cloning; prokaryotic expression; enzymatic characteristics

作为植物生长的生理指标, 活性氧在植物细胞 信号传导、生长发育、生物胁迫与非生物胁迫应激中

收稿日期: 2013-11-20; 修改稿收到日期: 2013-12-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31170574); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-08-0730)

作者简介: 张 蕾(1988—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事植物分子生物学工作。E-mail: pooh00winnie@sina.com

* 通信作者: 陆 海, 博士, 教授, 主要从事杨树抗胁迫和木质素合成工作。E-mail: luhai1974@bjfu.edu.cn

发挥着重要作用,主要包括过氧化氢(H_2O_2)、超氧根离子(O_2^-)等^[1-3]。在正常条件下,植物细胞内活性氧含量很低,不会对植物造成损伤^[4]。但是在干旱^[5]、高盐^[6]、冷害^[7]和部分生物胁迫条件下^[8-9],生理代谢紊乱导致的活性氧含量升高会造成细胞内活性氧稳态的破坏。过量的活性氧不能及时清除会对细胞造成严重损伤,甚至导致细胞凋亡。植物体内的活性氧消除包括依赖超氧化物歧化酶(SOD)、依赖抗坏血酸过氧化物酶(APX, EC 1.11.1.1)和依赖过氧化氢酶(Hydrogen peroxidase)等多种机制。

APX 是活性氧消除机制中的重要组成部分,其通过参与抗坏血酸循环反应来消除 H_2O_2 ^[2]。APX 利用抗坏血酸(AsA)作为电子媒介,将 H_2O_2 还原成 H_2O 并生成单脱氢抗坏血酸(MDAsA),而由 MDAsA 生成 AsA 的过程依靠 NAD(P)H 作电子媒介^[10]。

已有研究表明在多种植物中存在不同的 APX 亚型,这些亚型定位在细胞质^[11]、过氧化物酶体、线粒体和叶绿体^[12]等不同的细胞器中。在这些亚型中,细胞质 APX 发挥着不可替代的作用。目前,已经从烟草^[13]、拟南芥^[14]、菠菜^[15]和大豆^[16]等多种植物中分离得到了细胞质 APX。文献报道细胞质 APX 重组蛋白分子量大小在 27~35 kD,最适 pH 在 4.0~7.0。对抗坏血酸和过氧化氢的米氏常数(K_m)分别为 0.5~4.5 mmol·L⁻¹和 0.1~1.0 mmol·L⁻¹。还有研究认为在植物遇到干旱、盐、冷冻、涝、高温以及其他生物胁迫时,细胞质抗坏血酸过氧化物酶活性会增强^[17]。

目前对细胞质抗坏血酸过氧化物酶调控植物氧化还原反应机制的研究主要集中在拟南芥和水稻上。在对模式生物拟南芥的研究中发现,与线粒体 APX 相比,细胞质 APX 在过氧化氢消除中发挥着不可或缺的作用^[3]。缺失细胞质 APX 基因的拟南芥在正常条件下,对环境更加敏感并生长缓慢^[2]。相似的,缺失细胞质 APX 功能水稻在生长、幼苗发育等方面受到影响,造成植株半矮化、叶片损伤、种子不育等多种现象^[18]。有报道指出,在水稻细胞中,随着 H_2O_2 含量的增加,则细胞质 APX 的表达上调^[19]。

作为绿化和木材产品中的重要树种,已经有一些研究在探寻 APX 基因对毛白杨生长的作用,并有研究克隆了毛白杨过氧化物酶体 APX 基因^[20-21],而细胞质 APX 基因在毛白杨生长发育中的作用尚不明确。为此,本研究利用同源克隆技术

获得了一个毛白杨细胞质 APX 基因,并对其进行了原核表达和酶活性分析,以了解其对抗坏血酸和过氧化氢的活性,为进一步揭示其功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 毛白杨细胞质 APX 基因的克隆

按照总 RNA 提取试剂盒(科百奥生物科技有限公司)说明的步骤提取 8 周龄毛白杨组培苗叶片总 RNA,使用紫外分光光度计测定总 RNA 浓度,于-80℃冰箱保存备用。

以拟南芥细胞质 APX 基因序列(GenBank 序列号 NC_003070)为靶序列,对毛白杨基因组数据库进行 Blast,得到一个与其高度相似的序列片段。利用 Primer 5.0 软件设计引物 APX-F(5'-AAT-GACGAAGAACTATCCAACTG)和 APX-R(5'-CATCTGAATCCTAGGCATCAGC)。以毛白杨总 RNA 反转录合成的 cDNA 为模板,采用 PCR 技术扩增目的基因片段。反应体系(25 μL)为正反向引物(5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 1.5 μL ,cDNA 模板 2 μL ,dNTP(Promega, 2.5 mmol·L⁻¹)2 μL ,Taq 酶(Promega)0.2 μL ,Buffer 2.5 μL ,ddH₂O 16.8 μL 。PCR 反应的条件为 94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,30 个循环,最后 72℃再延伸 10 min。

PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶检测分离后,使用琼脂糖凝胶回收试剂盒(天根)回收目的片段,产物纯化后与 pMD18-T 载体(TaKaRa)14℃连接过夜,转化到大肠杆菌 JM109 感受态细胞(TaKaRa)。使用含氨苄青霉素(100 mg·L⁻¹)的 LB 固体培养基 37℃倒置培养 12 h,随机挑选 12 个白色菌落,PCR 菌液检测阳性克隆,将阳性克隆测序并进行相应的序列分析。

1.2 APX 基因的原核表达与纯化

根据克隆出的毛白杨细胞质 APX 基因序列,设计带有酶切位点的 PCR 引物 APX2-F:(5'-CG-GAATTC ATGACGAAGAACTATCCAAC)和 APX2-R(5'-GCGTCGACTCTGAATCCTAGGCATCAG)。以含有毛白杨细胞质 APX 基因的 pMD18-T 载体质粒为模板,扩增毛白杨细胞质 APX 基因片段。回收纯化扩增产物,与 pMD18-T 载体连接,转化大肠杆菌 JM109,并鉴定测序正确后,与 pET30a(+) (TaKaRa)同时进行双酶切,回收酶切片段进行连接后转化大肠杆菌 BL21(TaKaRa)。按 1:50 的比例对过夜培养的菌液进行稀释,37℃培养至 A₆₀₀ 为

0.5,取出 1 mL 作为诱导菌液。在菌液中加入 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG,使终浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 28°C 继续培养 3 h。在 4°C 以 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集菌体,用 Lysis Buffer ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ASA, pH 8.0) 重悬菌体,于冰浴中超声波裂解菌体, $15000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,收集菌体裂解上清液。取 1.6 mL 的菌体裂解上清液与 0.5 mL 50% 的 Ni-NTA 亲和层析填料在 4°C 、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床上充分混合 60 min,将混合物上柱。用 $2 \times 1 \text{ mL}$ 的 Wash Buffer ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 , $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑, pH 8.0) 淋洗除去杂质蛋白质,分别收集淋洗液。用 $3 \times 0.5 \text{ mL}$ 的 Elution Buffer ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 , $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑, pH 8.0) 洗脱并收集带有 His 标签的重组的毛白杨细胞质 APX 蛋白,收集重组的毛白杨细胞质 APX 蛋白上清液,并进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.3 APX 酶学特性测定

取 3 mL 酶反应混合液 ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS pH 7.0, $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ AsA), 加入适量收集的上清,反应以加入 H_2O_2 为起始,通过测定 2 min 内其 A_{290} 吸收值的下降来测定 APX 的活性(每 20 s 记录读数)。分别固定底物 AsA 和 H_2O_2 其中一种的浓度,使其相对过量,测定另一种底物不同浓度梯度下 APX 的活性。用 OriginPro 8.0 软件非线性拟合的方法,将测得的反应速率拟合至米氏方程,计算得到 PcAPX 两种底物对应的 K_m 和 V_{\max} 值。 H_2O_2 浓度过量 ($0.16 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 时,取不同浓度的 AsA (0.025 、 0.05 、 0.075 、 0.1 、 0.2 、 0.4 、 0.5 、 0.75 和 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 分别测定 2 min 内 A_{290} 的降低值,求 APX 对 AsA 的 K_m 和 V_{\max} 值;AsA 浓度过量 ($0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 时,取不同浓度的 H_2O_2 (0.01 、 0.02 、 0.04 、 0.08 、 0.12 、 0.16 、 0.2 、 0.3 、 0.4 和 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 分别测定 2 min 内 A_{290} 的降低值,求 APX 对 H_2O_2 的 K_m 和 V_{\max} 值;保证 2 个底物 AsA ($0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 H_2O_2 ($0.16 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 都过量,改变反应混合液的温度 (20°C 、 25°C 、 30°C 、 35°C 、 40°C 、 45°C 、 50°C 和 55°C), 测定最适温度;改变反应混合液的 pH 值 (4.5 、 5.0 、 5.5 、 6.0 、 6.5 、 7.0 、 7.5 、 8.0 和 8.5), 测定最适 pH 值。

1.4 毛白杨细胞质 APX 的表达定量分析

取 8 年生毛白杨成熟叶片、韧皮部、根和形成层

分别作为 RNA 提取植物材料,反转录得到的 cDNA。使用 Primer 5.0 软件设计 RT-PCR 引物 APX-RT-F: ($5'$ -CTACAATTGCCATCTGACAAGG) 和 APX-RT-R: ($5'$ -GGCATCAGCAAATCCCAGTTCG) 以及毛白杨内参基因 *Tublin* 引物 Tub-F: ($5'$ -CAGGACTG-GAGCATACCGCCAGC) 和 Tub-R: ($5'$ -TGAAGGC-CAGTGCAGTTATCAGC)。反应体系 ($15 \mu\text{L}$) 包括 SYBR Green QPCR super Mix (Promega) $7.5 \mu\text{L}$, 正反向引物 ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 $0.3 \mu\text{L}$, cDNA 模板 $1 \mu\text{L}$, 参比染料 ROX $0.3 \mu\text{L}$, ddH₂O $5.6 \mu\text{L}$ 。反应条件 (STRATAGENE 公司 Mx3000P): 第一步 95°C 预变性 10 min; 第二步, 95°C 变性 30 s, 60°C 退火 45 s, 72°C 30 s, 40 个循环,在每一循环的退火阶段收集荧光进行实时检测。反应结束后, 95°C 1 min, 然后降至 60°C 30 s, 缓慢升温 ($0.2^\circ\text{C}/\text{s}$) 至 95°C , 该过程时刻记录荧光信号的变化,从而得出扩增产物的溶解曲线。每个样品重复 3 次,根据标准曲线计算结果及校正值,计算其平均值,并用 OriginPro 8 作图。

2 结果与分析

2.1 PcAPX 的克隆与序列分析

通过 PCR 从毛白杨中扩增得到一条 750 bp 的 cDNA 序列(图 1), 序列分析表明其中含有一个编码 249 个氨基酸残基的开放阅读框。序列比对分析显示该序列编码的氨基酸残基与拟南芥细胞质 APX 基因的一致性达 $80\% \sim 90\%$, 与过氧化物酶体 APX 基因的一致性达 $60\% \sim 70\%$, 与叶绿体 APX 基因的一致性达 $50\% \sim 60\%$ 。确定该序列为毛白杨的 APX 基因,命名为 PcAPX (GenBank 序列号 KF780856)。利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析显示,该 APX 蛋白序列没有信号肽和跨膜结构。

进化树聚类分析结果(图2)表明,毛白杨细胞质

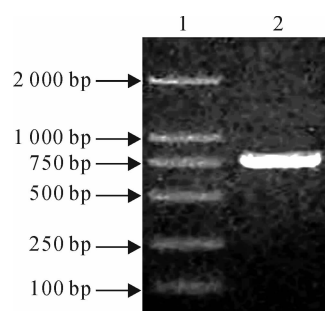


图 1 毛白杨 PcAPX 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of PcAPX gene from *P. tomentosa*

1. DL2000; 2. cDNA

APX 与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 细胞质 APX、苜蓿 (*Medicago truncatula*) 细胞质 APX、大豆 (*Glycine max*) 细胞质 APX 有较高一致性, 而大豆过氧化物酶体 APX 与拟南芥过氧化物酶体 APX、玉米 (*Zea mays*) 过氧化物酶体 APX 的一致性较高。另外, 拟南芥线粒体 APX、拟南芥叶绿体 APX、番茄 (*Solanum lycopersicum*) 线粒体 APX、番茄叶绿体 APX 聚为一类。这个结果说明毛白杨细胞质 APX 与其他物种细胞质 APX 亲缘关系较近, 而过氧化物酶体 APX 和质体 APX 各成一组, 说明 PcAPX 可能是细胞质 APX (图 2)。

2.2 PcAPX 蛋白的原核表达、纯化与酶活性分析

重组 PcAPX 蛋白诱导及纯化的 SDS-PAGE 电泳结果如图 3。根据蛋白 Marker 可以看出, PcAPX 被成功诱导, 蛋白的分子量大约为 33.01 kD。

根据 Michaelis-Menton 机理, 重组 PcAPX 对抗坏血酸的 K_m 和 V_{max} 分别为 $(0.71 \pm 0.03) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(0.41 \pm 0.02) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, 催化常数 (k_{cat}) 为 $(0.743 \times 10^3) \text{ min}^{-1}$, k_{cat}/K_m 为 $(1.047 \times 10^3) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 重组 PcAPX 对过氧化氢的 K_m 和 V_{max} 分别为 $(0.6 \pm 0.21) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(0.35 \pm 0.12) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, k_{cat} 为 $(8.464 \times 10^3) \text{ min}^{-1}$, k_{cat}/K_m 为 $(1.41 \times 10^4) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (表 1)。

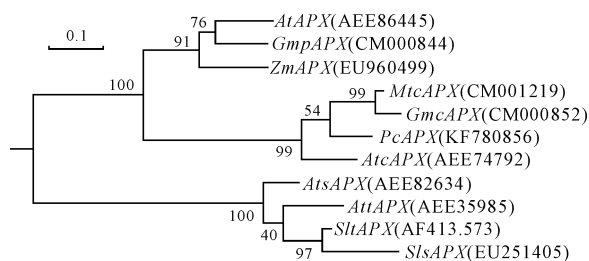


图 2 PcAPX 与其他物种 APX 的进化关系

AtcAPX. 拟南芥细胞质 APX; MtcAPX. 苜蓿细胞质 APX; GmcAPX. 大豆细胞质 APX; GmpAPX. 大豆过氧化物酶体 APX; AtpAPX. 拟南芥过氧化物酶体 APX; ZmpAPX. 玉米过氧化物酶体 APX; AtsAPX. 拟南芥线粒体 APX; AttAPX. 拟南芥叶绿体 APX; SltAPX. 番茄线粒体 APX; SlsAPX. 番茄叶绿体 APX
Fig. 2 Phylogenetic tree showing relationships between PcAPX and other APX from some plants
AtcAPX. *Arabidopsis thaliana* cytosolic APX; MtcAPX. *Medicago truncatula* cytosolic APX; GmcAPX. *Glycine max* cytosolic APX; GmpAPX. *Glycine max* peroxisomal APX; AtpAPX. *Arabidopsis thaliana* peroxisomal APX; ZmpAPX. *Zea mays* peroxisomal APX; AtsAPX. *A. thaliana* stromal APX; AttAPX. *A. thaliana* thylakoid APX; SltAPX. *Solanum lycopersicum* thylakoid APX; SlsAPX. *S. lycopersicum* stromal APX

图 4 显示, PcAPX 酶活的最适 pH 为 5.0~5.5, 当 pH 为 8.0 时, APX 酶活只有最高值的 20% 左右; PcAPX 在 45 °C 活性最高, 20 °C 和 50 °C 时活性降低 40%, 55 °C 时活性只有最适温度的 35%; 在底物中 AsA 缺失的条件下, PcAPX 的活性为 AsA 存在情况下 PcAPX 活性最大值的 6%。

2.3 PcAPX 在毛白杨不同组织中的表达

使用实时定量 RT-PCR 对 PcAPX 在毛白杨不同组织表达特异性进行分析。通过内参基因 (*Tublin*) 与目的基因的扩增曲线计算得到 PcAPX 基因在新叶、老叶、韧皮部、根和形成层的相对表达量。结果 (图 5) 表明, PcAPX 在毛白杨的各个部位都有表达, 其中老叶中的表达量最高, 为韧皮部和新叶表达量的 2~2.5 倍, 根中表达量较低, 尤其是在形成层组织中 PcAPX 的表达量极低。RT-PCR 结果表明在成熟组织中 PcAPX 的表达量明显高于新生的各个组织器官。

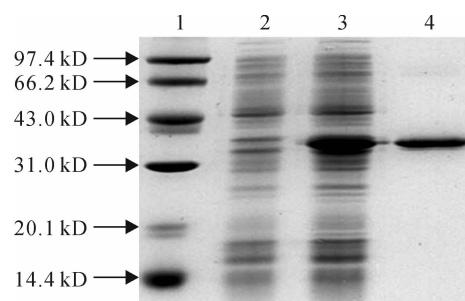


图 3 PcAPX 重组蛋白 SDS-PAGE 分析

1. Marker; 2. 未诱导阴性对照; 3. 重组 PcAPX 表达菌株诱导后的全细胞蛋白; 4. 纯化的重组 PcAPX 蛋白

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the recombinant PcAPX
1. Marker; 2. Negative control without inducing; 3. Total protein of recombinant PcAPX; 4. Purified recombinant PcAPX

表 1 PcAPX 重组蛋白的酶活特性

Table 1 Enzymatic properties of PcAPX over-expressed in *E. coli*

参数 Parameter	PcAPX
相对分子量 Molecular mass/kD	33.01
$K_m/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	0.71 ± 0.03
$V_{max}/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1})$	0.41 ± 0.02
$k_{cat}/(\text{min}^{-1})$	743.6
$k_{cat}/K_m/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	1 047.3
$K_m/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	0.6 ± 0.21
$V_{max}/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1})$	0.35 ± 0.12
$k_{cat}/(\text{min}^{-1})$	8 464.6
$k_{cat}/K_m/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	14 107.7
最适 pH Optimal pH	5.0~5.5
最适温度 Optimal temperature/°C	45

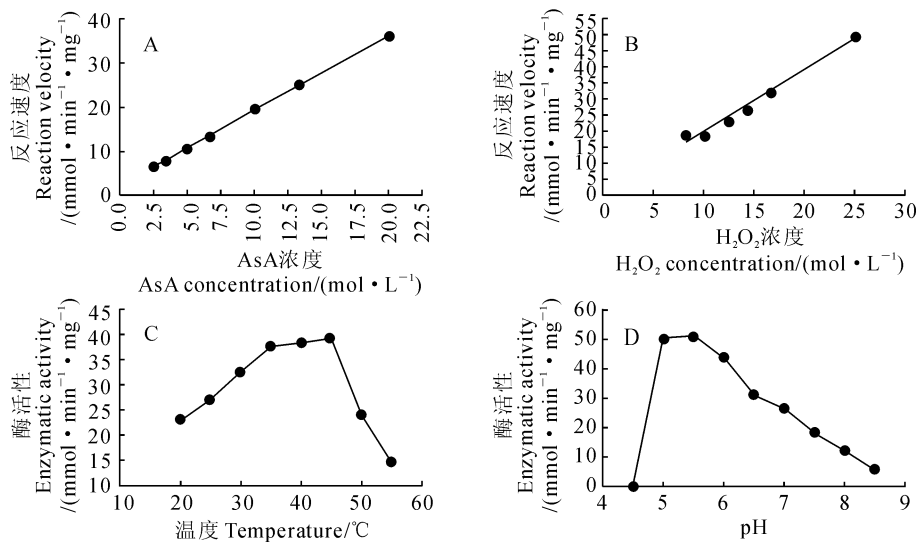


图 4 PcAPX 的酶学特性
A、B 表示 PcAPX 重组蛋白对 AsA(A)和 H₂O₂(B)的双倒数图;C、D 表示以 ASA 为底物时
PcAPX 重组蛋白在不同温度(C)和 pH(D)时的活性

Fig. 4 Enzymatic properties of PcAPX

Lineweaver-Burk double reciprocal plots of APX using AsA(A) and H₂O₂(B) as substrates;

The temperature(C) and pH(D) stability of PcAPX based on the enzymatic activity using ASA as a substrate

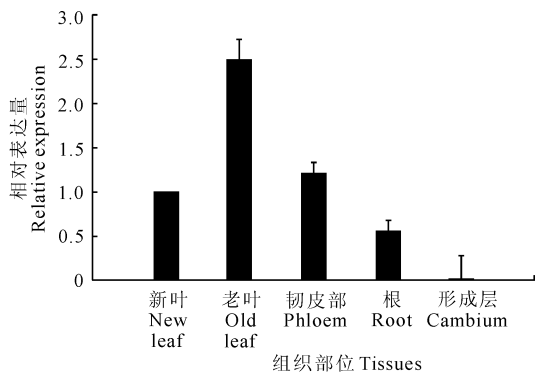


图 5 PcAPX 在毛白杨不同组织的表达差异

Fig. 5 Real-time PCR detection of the PcAPX expression in *P. tomentosa*

3 讨 论

据报道,细胞质 APX 在植物面临氧化胁迫^[22]、干旱^[23]、高盐等多种不良环境胁迫下的活性氧清除方面发挥重要作用。尽管细胞质 APX 在许多高等植物中已经被广泛研究,但在毛白杨中的相关研究讨论还不明确。本研究成功克隆了一个毛白杨细胞质 APX 基因,预测的蛋白序列与植物细胞质 APX 家族高度一致。原核高效表达的毛白杨重组 PcAPX 的分子量为 33.01 kD,这与其他物种的分子量区间(27~35 kD)相吻合^[13-16]。对重组毛白杨 PcAPX 的酶活生化特性分析发现,其对 AsA 和 H₂O₂ 这两种

底物具有较强的活性。

本研究获得的毛白杨 PcAPX 与已报道的毛白杨过氧化物酶 APX(PpAPX)^[21]相比在蛋白质结构上有所区别,蛋白质二级结构分析显示 PcAPX 蛋白序列无信号肽和跨膜结构域,表明毛白杨 PcAPX 可能是细胞质 APX。定位于不同细胞器的 APX 可能在植物消除活性氧的反应中发挥不同作用。

作用于相同底物的 PcAPX 的 *K_m* 值是 PpAPX^[21]的一半,这说明其与底物 AsA 和 H₂O₂ 具有较高的亲和力。并且,PcAPX 具有很高的 *k_{cat}* 和 *k_{cat}/K_m* 值,说明 PcAPX 在对 AsA 和 H₂O₂ 的反应中拥有更高的催化底物的能力和催化效率。PcAPX 的最适 pH 和最适温度分别为 5.0~5.5 和 45 °C,而 PpAPX^[21]的最适 pH 和最适温度分别为 7.0~7.4 和 28 °C,这种较大的差别表明植物在不同生长环境中,各个 APX 亚型功能不同,其发挥特定的作用以适应变化的环境,这种同工酶之间的相互补充和协调更有助于植物在逆境中的生长。

实时定量 PCR 结果中,PcAPX 和 PpAPX 相对表达量差别不大,这说明在组织定位中,这 2 种亚型 APX 有相似之处,其都在老叶中表达量较高,在新叶和根等位置表达量较低,尤其是在形成层组织中表达量极低,说明细胞质 APX 和过氧化物酶体 APX 清除 H₂O₂ 的反应在老叶中活性最高,可能是成熟叶片组织次生代谢物积累增多,活性氧成分含

量较高,导致细胞内抗氧化反应较为活跃,这种细胞的自我调节能力对植物成熟组织的抗逆和抗凋亡能力来说至关重要。

APX 在植物抗逆中的作用已经引起越来越多的

关注。本研究克隆得到了一个毛白杨细胞质 APX 基因,并对其序列和生理生化特性进行了分析,这为以后进一步讨论其在细胞中的作用机制和对植物生长发育以及抗逆影响提供了较为明确的方向。

参考文献:

- [1] LUO X L, WU J H, LI Y B, *et al.* Effects of GhSOD1 and GhCAT1 overexpression in cotton chloroplasts on enhancing tolerance to methyl viologen and salt stresses[J]. *PLoS One*, 2013, **8**(1):doi:ARTN e54002.
- [2] MILLER G, SUZUKI N, RIZHSKY L, *et al.* Double mutants deficient in cytosolic and thylakoid ascorbate peroxidase reveal a complex mode of interaction between reactive oxygen species, plant development, and response to abiotic stresses(1[W][OA])[J]. *Plant Physiology*, 2007, **144**(4):1 777—1 785.
- [3] DAVLETOVA S, RIZHSKY L, LIANG H J, *et al.* Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2005, **17**(1):268—281.
- [4] LI Y J, HAI R L, DU X H, *et al.* Over-expression of a *Populus* peroxisomal ascorbate peroxidase(*PpAPX*) gene in tobacco plants enhances stress tolerance[J]. *Plant Breeding*, 2009, **128**(4):404—410.
- [5] YANG F, WANG Y, MIAO L F. Comparative physiological and proteomic responses to drought stress in two poplar species originating from different altitudes[J]. *Physiologia Plantarum*, 2010, **139**(4):388—400.
- [6] MISHRA P, BHOO MIKA K, DUBEY R S. Differential responses of antioxidative defense system to prolonged salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive Indica rice(*Oryza sativa* L.) seedlings[J]. *Protoplasma*, 2013, **250**(1):3—19.
- [7] GENISEL M, TURK H, ERDAL S. Exogenous progesterone application protects chickpea seedlings against chilling-induced oxidative stress[J]. *Acta Physiol. Plant*, 2013, **35**(1):241—251.
- [8] SILVA E N, VIEIRA S A, RIBEIRO R V, *et al.* Contrasting physiological responses of *Jatropha curcas* plants to single and combined stresses of salinity and heat[J]. *Plant Growth Regul.*, 2013, **32**(1):159—169.
- [9] LIU P Q, SUN F, GAO R, *et al.* RAP2. 6L overexpression delays waterlogging induced premature senescence by increasing stomatal closure more than antioxidant enzyme activity[J]. *Plant Mol. Biol.*, 2012, **79**(6):609—622.
- [10] WANG L Y, ZHANG Q Y, WANG F, *et al.* Ascorbate plays a key role in alleviating low temperature-induced oxidative stress in *Arabidopsis*[J]. *Photosynthetica*, 2012, **50**(4):602—612.
- [11] ORVAR B L, ELLIS B E. Isolation of a cDNA encoding cytosolic ascorbate peroxidase in tobacco[J]. *Plant Physiology*, 1995, **108**(2):839—840.
- [12] NAJAMI N, JANDA T, BARRIAH W, *et al.* Ascorbate peroxidase gene family in tomato: its identification and characterization[J]. *Mol. Genet Genomics*, 2008, **279**(2):171—182.
- [13] HOQUE M A, URAJI M, TORII A, *et al.* Methylglyoxal inhibition of cytosolic ascorbate peroxidase from *Nicotiana tabacum*[J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2012, **26**(8):315—321.
- [14] MITTLER R, ZILINSKAS B A. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium[J]. *Analytical Biochemistry*, 1993, **212**(2):540—546.
- [15] WEBB R P, ALLEN R D. Isolation and characterization of a cDNA for spinach cytosolic ascorbate peroxidase[J]. *Plant Physiology*, 1995, **108**(3):1325.
- [16] DALTON D A, DIAZ D, CASTILLO L, *et al.* Heterologous expression and characterization of soybean cytosolic ascorbate peroxidase[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1996, **328**(1):1—8.
- [17] PARK S Y, RYU S H, JANG I C, *et al.* Molecular cloning of a cytosolic ascorbate peroxidase cDNA from cell cultures of sweetpotato and its expression in response to stress[J]. *Mol. Genet Genomics*, 2004, **271**(3):339—346.
- [18] ZHANG Z G, ZHANG Q, WU J X, *et al.* Gene knockout study reveals that cytosolic ascorbate peroxidase 2(OsAPX2) plays a critical role in growth and reproduction in rice under drought, salt and cold stresses[J]. *PLoS One*, 2013, **8**(2):e57472. doi:10. 1371.
- [19] BONIFACIO A, MARTINS M O, RIBEIRO C W, *et al.* Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knock-down in rice plants under abiotic stress[J]. *Plant Cell and Environment*, 2011, **34**(10):1 705—1 722.
- [20] LU H, HAN R L, JIANG X N. Heterologous expression and characterization of a peroxisomal ascorbate peroxidase from *Populus tomentosa*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2009, **36**(1):21—27.
- [21] PAN X(潘 翔), LI N(李 娜), LU H(陆 海), *et al.* Cloning expression and characterization of an ascorbate peroxidase gene *PtAPX2* from *Populus tomentosa*[J]. *Journal of Beijing Forestry University*(北京林业大学学报), 2013, **35**(1):36—44(in Chinese).
- [22] SAROWAR S, KIM E N, KIM Y J, *et al.* Overexpression of a pepper ascorbate peroxidase-like 1 gene in tobacco plants enhances tolerance to oxidative stress and pathogens[J]. *Plant Science*, 2005, **169**(1):55—63.
- [23] HU X L, LU M H, LI C H, *et al.* Differential expression of proteins in maize roots in response to abscisic acid and drought[J]. *Acta Physiol. Plant*, 2011, **33**(6):2 437—2 446.