

乔新荣,张继英. 茶树 *CsGPX* 基因克隆及干旱胁迫下的表达分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(8):42-44.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.08.010

# 茶树 *CsGPX* 基因克隆及干旱胁迫下的表达分析

乔新荣,张继英

(信阳农林学院,河南信阳 464000)

**摘要:**采用反转录-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction,简称 RT-PCR)技术,从茶树叶片中克隆长 387 bp 的 *CsGPX* 基因片段,生物信息学分析结果表明该基因片段编码的氨基酸序列为 GPX 蛋白的保守序列,系统进化树分析结果揭示该蛋白与拟南芥 AtGPX6、杨树 PtGPX6 等亲缘关系较近。定量 PCR 分析结果表明,干旱胁迫处理 12 h 内,GPX 表达量明显上升,初步分析茶树 *CsGPX* 基因在干旱胁迫反应中发挥重要作用。

**关键词:**茶树;GPX 基因;RT-PCR 技术;干旱胁迫

**中图分类号:** Q344<sup>+</sup>.13;S571.101

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1002-1302(2018)08-0042-03

谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,简称 GPX)是生物体内重要的抗氧化酶,它可以清除机体内的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及脂质过氧化物,阻断活性氧自由基对机体的进一步损伤,保护细胞免受氧化胁迫,提高植物的抗逆能力<sup>[1-2]</sup>。谷胱甘肽过氧化物酶也可以作为信号分子,与激素交联,调节植物的生长发育<sup>[3-4]</sup>。因此,对谷胱甘肽过氧化物酶进行开发和利用具有重要的意义,现已从烟草、柑橘、拟南芥、大白菜、番茄、豌豆、水稻、龙眼等许多植物中分离和鉴定<sup>[5]</sup>。

茶树[*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]属于山茶科双子叶植物,茶叶具有高效的抗癌、抗衰老、抗辐射、抗氧化、清除

人体自由基、降血糖和血脂等一系列药理功能。我国茶区地形分布复杂,包括平原、丘陵、山地和高原。这些地区经常出现季节性干旱、高温、低温等逆境,导致茶芽萌发迟、生长瘦弱,造成茶产量和品质下降。本研究拟克隆茶树 *CsGPX* 基因,并对其生物信息学方面及干旱胁迫下的转录表达进行初步分析,旨在为今后通过基因工程研究 *CsGPX* 基因的表达,探究茶树依赖 *CsGPX* 途径清除活性氧的分子基础,以期鉴定和选育茶树抗逆品种提供分子水平上的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本研究所使用的茶树材料为河南省信阳茶叶示范园区信阳群体种。选取健壮茶树的新梢幼叶,提取总 RNA 并反转录得到 cDNA 模板,利用 RT-PCR 技术克隆 *CsGPX* 基因片段。

选取长势一致的茶树健壮植株枝条,于人工气候箱内进

收稿日期:2016-11-06

基金项目:河南省教育厅重点科研项目(编号:15A180058)。

作者简介:乔新荣(1972—),女,河南新密人,博士,副教授,主要从事植物生理及分子生物学研究。Tel: (0376) 6698023; E-mail: xinrong806@163.com。

[2] 袁素霞. 甘蓝和青花菜小孢子培养及早期胚胎形成相关基因差异表达分析[D]. 北京:中国农业科学院,2009.

[3] Lichter R. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different Brassicaceae species[J]. Plant Breeding, 1989,103(2):119-123.

[4] Sato T, Nishio T, Hiraim M. Plant regeneration from isolation microspore cultures of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*)[J]. Plant Cell Reports,1989,8(8):486-488.

[5] Takahata Y, Brown D C W, Keller W A, et al. Dry artificial seeds and desiccation tolerance induction in microspore-derived embryos of broccoli[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1993,35(2):121-129.

[6] 蒋武生,原玉香,张晓伟,等. 芜菁游离小孢子胚和植株的形成[C]//河南省科学技术协会. 河南省植物生理学会三十周年庆典暨学术研讨会论文集. 郑州:河南省农业科学院园艺研究所,2010:243-245.

[7] 乔丽桃,高杰. 芜菁花蕾长度与花粉小孢子单核靠边期关系的研究[J]. 新疆农业科学,2013,50(4):620-624.

[8] 王娜,贾凯,妥秀兰,等. 芜菁小孢子培养及其胚状体离体发育过程[J]. 西北农业学报,2016,25(9):1392-1398.

[9] 刘公社,李岩,刘凡,等. 高温对大白菜小孢子培养的影响[J]. 植物生态学报(英文版),1995,37(2):140-146.

[10] 桑玉芳,张恩慧,杨安平,等. 甘蓝游离小孢子培养中影响胚状体形成的主要因素[J]. 西北农业学报,2007,16(2):125-129.

[11] 方淑桂,曾小玲,朱朝辉,等. 结球甘蓝游离小孢子胚胎发生[J]. 植物科学学报,2005,23(6):530-534.

[12] 韩阳,叶雪凌,冯辉. 大白菜小孢子培养影响因素研究[J]. 中国蔬菜,2006(7):16-18.

[13] 王玉书. 羽衣甘蓝小孢子培养及红叶性状的 SRAP 标记[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2012.

[14] 周英,冯辉,王超楠,等. 大白菜小孢子胚诱导和植株再生[J]. 沈阳农业大学学报,2006,37(6):816-820.

[15] 蒋武生,原玉香,张晓伟,等. 提高大白菜游离小孢子胚诱导率的研究[J]. 华北农学报,2005,20(6):34-37.

[16] 朱守亮,张恩慧,杨安平,等. 2 个甘蓝 F<sub>1</sub> 小孢子培养中高出胚率的诱导技术研究[J]. 西北农业学报,2009,18(6):237-241.

[17] 李岩,刘凡,曹鸣庆. 通过游离小孢子培养方法获得小白菜三个变种的胚胎和植株[J]. 华北农学报,1993,8(3):92-97.

[18] 戴希刚,施雪萍,包满珠. 基因型与培养条件对羽衣甘蓝小孢子胚胎发生的影响[J]. 植物生理学报,2012,48(11):1113-1119.

行 Hoagland 完全营养液水培,每 3 d 更换 1 次营养液,1 周后进行干旱处理。用渗透势为  $-1.0$  MPa 的聚乙二醇 6000 模拟干旱胁迫进行培养,分别收集胁迫 0、3、6、9、12、18、24 h 的茶树幼叶,液氮冷冻后保存,分别提取总 RNA 并反转录得到不同的 cDNA 模板,利用 real-time PCR 技术检测 *CsGPX* 基因转录表达量。

### 1.2 试验试剂

DNA 分子量标准、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、克隆载体 pMD18-T、DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒、反转录试剂盒,均购自天根生化科技(北京)有限公司;Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司;荧光定量试剂盒 SYBR Premix Ex *Taq*, 购自 TaKaRa 公司;在 Primer Premier 5.0 中进行引物设计;引物合成及测序由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

### 1.3 引物序列

*CsGPX* 基因克隆引物为 F1:5'-GTCAATGTTGCCCTCACA ATGTGG-3', R1:5'-CAGCTTCTTCACGTCCTTCTCAAT-3'。茶树  $\beta$ -*Actin* 基因 real-time PCR 引物为 F2:5'-AGGGTAT GCTCCTCCTCAT-3', R2:5'-TCAGCAGTGCTGTTGAACAT-3'。*CsGPX* 基因 real-time PCR 引物为 F3:5'-GAGCCAGGG AATAATGAGC-3', R3:5'-ATTGGAGCAGCATTCTCAC-3'。

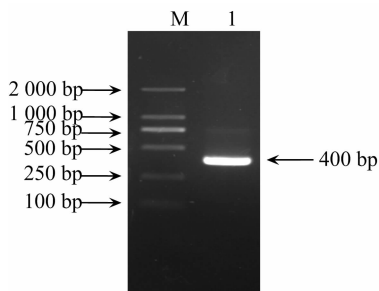
### 1.4 *CsGPX* 基因片段的信息学分析

分别利用 DNAMAN 6.0、Clustal X 1.81 及 MEGA 5.2 对 *CsGPX* 基因片段进行氨基酸序列推断、保守序列分析、进化树构建。

## 2 结果与分析

### 2.1 茶树 *CsGPX* 基因片段的克隆

根据其他物种 *GPX* 基因的保守序列设计特异扩增引物 F1 和 R1,利用 Trizol 试剂提取茶树幼叶总 RNA,检测 RNA 的质量后,进行反转录获得 cDNA 第 1 链,以此为模板,经 PCR 扩增获得 1 条大小约为 400 bp 的目的片段(图 1)。反应程序为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 50 s,32 个循环;72 °C 延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,用 DNA 凝胶回收试剂盒将目的片段回收纯化,连接于克隆载体 pMD18-T 上,热激转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。菌落 PCR 扩增鉴定后,挑取阳性克隆进行测序,经测序克隆到的基因片段长 387 bp,利用 DNAMAN 6.0 软件推断其编码 129 个氨基酸(图 2)。



M—marker; 1—RT-PCR 产物  
图 1 茶树 *CsGPX* 基因片段的克隆结果

### 2.2 茶树 *CsGPX* 基因片段的生物信息学分析

从 GenBank 和 PeroxiBase 数据库中下载拟南芥(*AtGPX 1* ~ *AtGPX 8*)、杨树(*PtGPX 1*、2、5、8, *PtGPX 6-1*、*PtGPX 6-2*)、

水稻(*OsGPX1*)、玉米(*ZmGPX1*)、番茄(*SIGPX*)、小麦(*TaGPX*)等蛋白质的氨基酸序列,利用 DNAMAN 6.0 和 Clustal X 1.81 软件,与推断的 *CsGPX* 基因片段编码的氨基酸序列进行同源性比对。由图 3 可知,*CsGPX* 编码的氨基酸序列具有 GPX 蛋白保守特征序列,即具有 3 个保守结构域(I、II、III)以及酶活性中心的 3 个保守的半胱氨酸(C)残基。初步推断其克隆的基因序列是茶树 *CsGPX* 基因片段。

```

1  GTCATGTTGCTCACAATGTGGCCTGACCAATTCAAATTACAAGGAGTTGAGCCAGTTG
2  V N V A S Q C G L T N S N Y K E L S Q L
61  TATGGAAGTACAAAGATCAAGGGCTGAGATTGGCAATCCCATGCAATCAGTTTGGT
21  Y E K Y K D Q G L E I L A F P C N Q F G
121  GGCCAGGAGCCAGGAATAATGAGCAGATAGTGGAGTTTGCTTGCACTCGATTAAAGGCT
41  G Q E P G N N E Q I V E F A C T R F K A
181  GAATTTCCTCATTTTGATAAGGTTGACGTGAATGGTGAAGTGTGCTGCTCCAATATACAAG
61  E F P I F D K V D V N G E N A A P I Y K
241  TTCTAAATCAAGTAAAGTGGATTTTTGGTATGGAATTAGTGGAAATTTCTCCAAA
81  L K S S K G G F F G D G I K W N F S K
301  TTCCGGCAGATCAAGATGGGAATTCATTGGTCTTATGCTCCCACTACTTCTCACTC
101  F L A D Q D G N V I G R Y A P T T S P L
361  AGCATTGAGAAGGACGTGAAGAAGCTG
121  S I E K D V K K L

```

图 2 茶树 *CsGPX* 基因片段编码的氨基酸序列

利用 MEGA 5.2 软件,按 Neighbor-Joining 方案对 *CsGPX* 及部分植物 GPX 蛋白的氨基酸序列进行分子系统进化分析,由图 4 可知,*CsGPX* 保守序列区域与拟南芥 *AtGPX6*、杨树 *PtGPX6-1*、杨树 *PtGPX6-2* 等亲缘关系较近。

### 2.3 *CsGPX* 基因在干旱胁迫下的转录表达分析

使用 ABI7300 荧光定量 PCR 仪进行表达量分析,采用 20  $\mu$ L 反应体系:10  $\mu$ L SYBR Premix Ex *Taq*,正、反向引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.5  $\mu$ L,0.4  $\mu$ L ROX Reference Dye(50 $\times$ ),2.0  $\mu$ L cDNA 模板,6.6  $\mu$ L ddH $_2$ O。反应程序为 95 °C 预变性 90 s;PCR 反应:95 °C 15 s,60 °C 40 s,共 40 个循环,每个样品进行 3 次重复检测,使用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法求得待测样品的相对表达量。分别提取干旱胁迫处理 0、3、6、9、12、18、24 h 茶树幼叶的 RNA,反转录为 cDNA,以此为模板,利用 Primer Premier 5.0 设计茶树  $\beta$ -*Actin* 定量 PCR 引物为 F2、R2,*CsGPX* 基因定量 PCR 引物为 F3、R3,以茶树  $\beta$ -*Actin* 片段为内参,检测 *CsGPX* 在干旱胁迫下的转录表达量变化。由图 5 可知,随着干旱胁迫处理时间的延长,相对表达量呈现先升后降的变化趋势,在处理 12 h 时,*CsGPX* 转录相对表达量达到最大值,约是对照的 6 倍。随后又降低,24 h 后逐渐恢复至处理前的水平。

## 3 结论与讨论

本研究中克隆茶树 *CsGPX* 基因片段所编码的氨基酸序列具有植物 GPX 的 3 个特征保守结构域,且含有 GPX 活性中心的 3 个保守的半胱氨酸残基,因此,所克隆的 *CsGPX* 基因属于植物 GPX 家族成员。且与已报道的 *AtGPX6*、*PtGPX6*、*TaGPX* 等亲缘关系较近。初步研究 *CsGPX* 的转录表达受干旱胁迫诱导,表明 *CsGPX* 参与茶树抗旱信号转导途径。已报道 *AtGPX6* 定位于线粒体和胞质,在多种组织的整个发育过程中都高度表达<sup>[3]</sup>,盐、铁、铝胁迫增强了 *AtGPX6* 的 mRNA 表达水平<sup>[6]</sup>。利用水杨酸(SA)、生长素(IAA)、脱落酸(ABA)、茉莉酸(JA)等处理后,也引起 *AtGPX6* 转录表达量的增加<sup>[3]</sup>。在 *AtGPX6* 基因的启动子区含有 ABA、SA、IAA 响应元件。另外,定位于小麦叶绿体中的 *TaGPX* 基因转入拟南芥超表达后,表现出对盐、H $_2$ O $_2$ 、ABA 胁迫的强耐性,且盐、H $_2$ O $_2$ 、ABA 信号转导通路中的关键调节子基因(*SOS1*、*RbohD*、*ABI1/ABI2*)的表达水平也在转基因株系中改变<sup>[7]</sup>。

CsGPX	.....VNVASCGGLTNSNYKELSQLERKDKQGLEILAFPCNCFGGCEPGNNEQIVEFAC	55
PtGPX6-1	SVHDFIVKDAARENDVDSIYKGVLLIVNVASCGGLTNSNYTELTDKRDQGLEILAFPCNCFGGCEPGNNEQIVEFAC	90
ZmGPX1	SVHDFIVKDAAGKDVDSLSTYKGVLLIVNVASCGGLTNSNYTELAQLEKRYKQDQGLEILAFPCNCFGGCEPGTNEEIVQFAC	90
OsGPX1	SVHDFIVKDAAGKDVNLSTYKGVLLIVNVASCGGLTNSNYTELSQLERKRYKQDQGLEILAFPCNCFGGCEPGSNEEIVQFAC	90
AtGPX6	SLYDFTVKDAKGNVDLSIYKGVLLIVNVASCGGLTNSNYTELAQLEKRYKQDQGLEILAFPCNCFGGCEPGTNEEIVQFAC	153
SlGPX	SVYDFTVKDAKGNVDLSIYKGVLLIVNVASCGGLTNSNYTMDTELEKRYKQDQGLEILAFPCNCFGGCEPGTNEEIVQFAC	91
AtGPX2	SIYDFTVKDIDGNDVSLDQYKGTLLVNVASCGGLTNSNYTELNELEKRYKQDQGLEILAFPCNCFGGCEPGTNEEIVQFAC	89
PtGPX2	SIYDFTVKDIDGNDTSLSEYSGKVLLIVNVASCGGLTNSNYTELNELEKRYKQDQGLEILAFPCNCFGGCEPGTNEEIVQFAC	89
AtGPX3	SIYNISVKDIEGKDVSLSKFTGKVLLIVNVASCGGLTNSNYTELNELEKRYKQDQGLEILAFPCNCFGGCEPGTNEEIVQFAC	128
AtGPX8	SVYELSIDAKGNLNLALSKYKDKVLLIVNVASCGGLTNSNYTELNELEKRYKQDQGLEILAFPCNCFGGCEPGTNEEIVQFAC	89
AtGPX4	SVHQFTVKDSSSGKDLNMSIYQGVLLIVNVASCGGLTNSNYTELNELEKRYKQDQGLEILAFPCNCFGGCEPGTNEEIVQFAC	92
AtGPX5	SIHQFTVKDSSSGKDLNMSIYQGVLLIVNVASCGGLTNSNYTELNELEKRYKQDQGLEILAFPCNCFGGCEPGTNEEIVQFAC	94
AtGPX1	TVHDFIVKDIKGNVSLNFKFGKVLIVNVASCGGLTNSNYSELSHLEKRYKQDQGLEILAFPCNCFGGCEPGTNEEIVQFAC	159
AtGPX7	SVHDFIVKDIKGNVSLNFKFGKVLIVNVASCGGLTNSNYSELSHLEKRYKQDQGLEILAFPCNCFGGCEPGTNEEIVQFAC	156
PtGPX1	SVHDFIVKDIKGNVSLNFKFGKALLIVNVASCGGLTNSNYSELTHLEKRYKQDQGLEILAFPCNCFGGCEPGTNEEIVQFAC	155

CsGPX	TRFKAEFFIFDQVDVNGENAAPIKFKLSSKGGFFGDCIKWNFSKFLADQDGNVICRYAPTTPSLSIEKDKVKKL....	129
PtGPX6-1	TRFKADYIFDQVDVNGENAAPIKFKLSSKGGFFGDCIKWNFSKFLADQDGNVICRYAPTTPSLSIEKDKVKKLGLIA.	168
ZmGPX1	TRFKAEYIFDQVDVNGENAAPIKFKLSSKGGFFGDCIKWNFSKFLADQDGNVICRYAPTTPSLSIEKDKVKKLGLSS.	168
OsGPX1	TRFKAEYIFDQVDVNGENAAPIKFKLSSKGGFFGDCIKWNFSKFLADQDGNVICRYAPTTPSLSIEKDKVKKLGLSS.	168
AtGPX6	TRFKAEYIFDQVDVNGENAAPIKFKLSSKGGFFGDCIKWNFSKFLADQDGNVICRYAPTTPSLSIEKDKVKKLGLVIA.	232
SlGPX	TRFKAEYIFDQVDVNGENAAPIKFKLSSKGGFFGDCIKWNFSKFLADQDGNVICRYAPTTPSLSIEKDKVKKLGLVA.	169
AtGPX2	TRFKAEYIFDQVDVNGENAAPIKFKLSSKGGFFGDCIKWNFSKFLADQDGNVICRYAPTTPSLSIEKDKVKKLGLQA.	168
PtGPX2	TIFKAEFFIFDQVDVNGENAAPIKFKLSSKGGFFGDCIKWNFSKFLADQDGNVICRYAPTTPSLSIEKDKVKKLGLSS.	167
AtGPX3	NIFKAEFFIFDQVDVNGENAAPIKFKLSSKGGFFGDCIKWNFSKFLADQDGNVICRYAPTTPSLSIEKDKVKKLGLSA.	206
AtGPX8	TRFKAEYIFDQVDVNGENAAPIKFKLSSKGGFFGDCIKWNFSKFLADQDGNVICRYAPTTPSLSIEKDKVKKLGLNS.	167
AtGPX4	ERFKAEYIFDQVDVNGENAAPIKFKLSSKGGFFGDCIKWNFSKFLADQDGNVICRYAPTTPSLSIEKDKVKKLEDA.	170
AtGPX5	TRFKAEYIFDQVDVNGENAAPIKFKLSSKGGFFGDCIKWNFSKFLADQDGNVICRYAPTTPSLSIEKDKVKKLQEL.	173
AtGPX1	TRFKAEYIFDQVDVNGENAAPIKFKLSSKGGFFGDCIKWNFSKFLADQDGNVICRYAPTTPSLSIEKDKVKKLLAA.	236
AtGPX7	TRFKAEYIFDQVDVNGENAAPIKFKLSSKGGFFGDCIKWNFSKFLADQDGNVICRYAPTTPSLSIEKDKVKKLLAA.	233
PtGPX1	TRYKAEFFIFDQVDVNGENAAPIKFKLSSKGGFFGDCIKWNFSKFLADQDGNVICRYAPTTPSLSIEKDKVKKLLAA.	232

I、II、III表示 GPX 的保守结构域；倒黑三角所指“C”是 GPX 酶的活性中心残基

图3 CsGPX 基因编码的部分氨基酸序列与其他植物 GPX 蛋白的氨基酸同源性分析

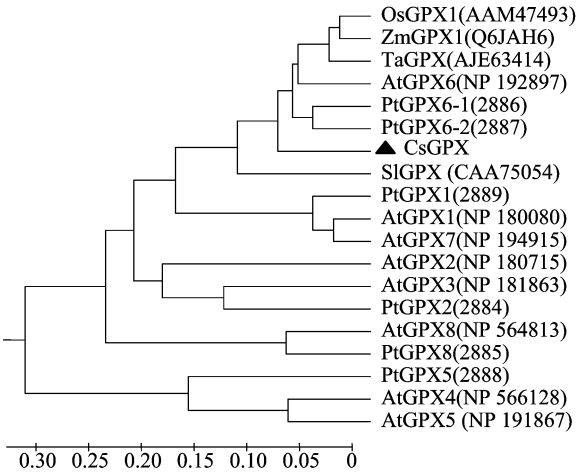


图4 部分植物 GPX 蛋白的氨基酸序列系统进化树

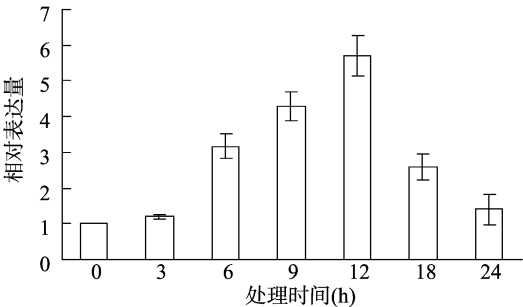


图5 定量 PCR 分析CsGPX在干旱胁迫下幼叶中的表达水平

干旱胁迫下水稻的 GPX 酶活性也增强<sup>[8]</sup>。这些植物 GPX 的功能研究为 CsGPX 的深入研究提供了参考。将来对 CsGPX 基因的全长进行克隆,将其原核表达,检测其亚细胞定位。也将进一步研究 CsGPX 酶活性在干旱胁迫中的变化以及其作

用底物的特异性,为阐明 CsGPX 在干旱胁迫信号转导中的作用机制奠定基础。

参考文献:

[1] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance [J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(9): 405-410.

[2] Yang X D, Li W J, Liu J Y. Isolation and characterization of a novel PHGPx gene in *Raphanus sativus* [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2005, 1728(3): 199-205.

[3] Rodriguez Milla M A, Maurer A, Rodriguez Huete A, et al. Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways [J]. Plant Journal, 2003, 36(5): 602-615.

[4] Gaber A, Ogata T, Maruta T, et al. The involvement of *Arabidopsis* glutathione peroxidase 8 in the suppression of oxidative damage in the nucleus and cytosol [J]. Plant & Cell Physiology, 2012, 53(9): 1596-1606.

[5] 肖蓉, 罗慧珍, 张小娟, 等. 干旱和盐胁迫条件下枣树谷胱甘肽过氧化物酶基因 (*ZjGPX*) 的差异表达及功能分析 [J]. 中国农业科学, 2015, 48(14): 2806-2817.

[6] Sugimoto M, Sakamoto W. Putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene from *Arabidopsis thaliana* induced by oxidative stress [J]. Genes & Genetic Systems, 1997, 72(5): 311-316.

[7] Zhai C Z, Zhao L, Yin L J, et al. Two wheat glutathione peroxidase genes whose products are located in chloroplasts improve salt and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerances in *Arabidopsis* [J]. PLoS One, 2013, 8(10): e73989.

[8] Goswami A, Banerjee R, Raha S. Drought resistance in rice seedlings conferred by seed priming: role of the anti-oxidant defense mechanisms [J]. Protoplasma, 2013, 250(5): 1115-1129.