

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15403

坛紫菜谷胱甘肽过氧化物酶基因的克隆及表达特征

张晗晗, 徐燕, 纪德华, 陈昌生, 许凯, 谢潮添

集美大学 水产学院, 福建 厦门 361021

摘要: 谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)是植物活性氧(ROS)清除酶促系统的重要成员之一, 在植物逆境胁迫应答中发挥着重要作用。本研究以坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)为研究材料采用 RACE 技术克隆获得了一条坛紫菜的 GPX 全长基因序列, 命名为 *PhGPX*(GenBank 收录号: JX673908)。该基因序列全长 1027 bp, 包含 555 bp 的开放阅读框, 所编码的多肽包含 184 个氨基酸, 分子量为 19.9 kD, 等电点为 8.76。多序列比对和系统进化树分析结果表明 *PhGPX* 属于植物 GPX 基因家族成员。基因表达水平的 qPCR 分析结果表明 *PhGPX* 基因在坛紫菜叶状体和丝状体世代中的表达水平没有显著差异; 高温胁迫不同时间水平下, *PhGPX* 基因的表达水平呈现为先上调后下调的趋势; 不同失水胁迫条件下, *PhGPX* 基因的表达不受低水平的失水胁迫影响, 但可被高水平(>40%)的失水胁迫所抑制, 且在复水 30 min 后仍然无法恢复失水胁迫前的水平。由此推测坛紫菜体内的 GPX 也可能存在多种家族成员, 不同的逆境胁迫条件、甚至不同的逆境胁迫水平可能需要不同家族成员的 GPX 参与 ROS 的清除和防御。

关键词: 坛紫菜; 谷胱甘肽过氧化物酶; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)04-0791-09

植物的生长发育过程均离不开氧气, 在其进行呼吸和光合作用的过程中, 线粒体、叶绿体和过氧化物酶体等细胞器均可产生各种形式的活性氧(ROS)。通常情况下, 植物细胞内 ROS 的产生和清除处于相对平衡状态, 少量 ROS 分子可以作为细胞信号转导分子参与植物正常的生理、生化代谢过程, 然而逆境胁迫等条件下过量积累的 ROS 则会对植物造成多种氧化损伤, 致使代谢功能不可修复的丧失, 最终导致细胞死亡^[1]。长期的进化过程中, 植物形成了一套精密且复杂的抗氧化防御机制(包括抗氧化酶的酶促系统和抗氧化剂的非酶促系统)来抵制 ROS 的伤害^[2]。谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPX)是 ROS 清除酶促系统的重要成员, 参与体内 H₂O₂ 和脂质过氧化物的清除, 其作用机理是通过催化谷胱甘

肽(GSH)与脂质类过氧化物(ROOH)或游离的 H₂O₂ 反应, 使 ROS 还原, 从而阻断自由基的产生, 抑制细胞的过氧化进程, 同时保护一些巯基酶的活性^[3]。已有的研究结果认为 GPX 活性的高低与植物对逆境的适应能力呈正相关, 因此控制 GPX 合成的相关基因被认为是重要的抗逆相关基因。研究这些基因对于全面阐释植物的抗逆机制, 进行抗逆基因工程育种等工作具有重要意义。

GPX 的研究最早是从动物中开始的, 研究表明动物的 GPX 可以分为两类: 含硒半胱氨酸和不含硒半胱氨酸, 其中含硒半胱氨酸 GPX 具有更强的过氧化物酶活性^[4]。而植物中 GPX 的研究起步较晚, 且迄今为止发现的植物 GPX 均属于不含硒的 GPX^[5]。近年来, 研究人员采用各种方法已经从拟南芥^[6]、番茄^[7]、水稻^[8]等几十种植物中克隆

收稿日期: 2015-10-26; 修订日期: 2015-12-16。

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA10A411); 国家自然科学基金项目(41176151, 41276177); 福建省种业创新与产业化工程资助项目(2014S1477-10); 福建省自然科学基金项目(2014J05041, 2014J07006)。

作者简介: 张晗晗(1991-), 女, 硕士研究生, 主要从事坛紫菜遗传育种研究。E-mail: zhanghanhan9213@163.com

通信作者: 谢潮添, 教授。E-mail: ctxie@jmu.edu.cn

获得了 *GPX* 基因的全长。然而藻类中 *GPX* 的研究相对较少, Overbaugh 等^[9]从眼虫藻中分离出了 *GPX*, 并测定了其特性; Leisinger 等^[10]研究了莱茵衣藻中 *GPX* 同源基因的序列及特性; 此外, Dayer 等^[11]的研究结果表明莱茵衣藻同时存在含硒半胱氨酸和不含硒半胱氨酸两种 *GPX*; 目前, 大型海藻中尚没有出现关于 *GPX* 的报导。

坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)自然生长于我国闽、浙、粤沿海潮间带中高潮区的岩礁或筏架上, 是人工养殖大型海藻中重要的经济藻类, 目前, 坛紫菜产量已占全国紫菜总产量的 75%以上^[12-13]。由于潮间带特殊的生长环境, 坛紫菜叶状体需经受随潮汐变化的周期性失水和复水过程, 因此必须具备极强的逆境适应性^[14]。同时, 伴随着温室效应的增强, 全球气候日趋变暖, 海水温度过高造成紫菜幼苗或成菜发生病烂、脱苗, 影响了坛紫菜栽培工作的正常进行, 致使坛紫菜严重减产^[15-17]。课题组前期在高温和失水胁迫条件下对坛紫菜生理和分子响应^[18-19]的研究中均发现 *GPX* 在其中发挥着重要作用。因此, 本研究从分子生物学水平出发, 采用 RACE 技术克隆坛紫菜 *GPX* 全长基因, 并通过实时荧光定量 PCR 技术(qPCR)检测该基因在坛紫菜生活史不同世代, 不同时间高温和不同程度失水胁迫条件下的表达水平变化, 以摸清该基因的表达特征, 为坛紫菜逆境胁迫响应机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料及胁迫处理

实验材料为福建省坛紫菜种质改良与应用实验室经选育获得性状稳定遗传的坛紫菜耐高温型品系 Z-61^[20]。叶状体和丝状体的正常培养条件为: 水温(21±0.5)℃, 光照强度 50~60 μmol/(m²·s), 光照周期 12L:12D, 每隔两天更换新鲜过滤除菌海水。取长度为 16~20 cm 且生长健康的叶状体, 提取总 RNA 并逆转录为 cDNA, 用于 *GPX* 基因的全长克隆。

取处于旺盛生长期的丝状体与叶状体, 分别提取总 RNA, 并逆转录为 cDNA, 用于生活史不

同世代间 *GPX* 基因表达水平的 qPCR 分析。

另取一组 16~20 cm 的坛紫菜 Z-61 品系叶状体, 置于(29±0.5)℃的恒温光照培养箱中进行高温胁迫处理(除温度外, 其余培养条件同正常条件)。高温时间梯度设置为 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h, 分别对已处理样品提取总 RNA 并逆转录为 cDNA, 用于不同时间高温胁迫条件下 *GPX* 基因表达水平的定量实验。

再取一组长为 16~20 cm 的健康 Z-61 叶状体进行失水胁迫处理, 具体操作方法如下:

用多层干纱布将藻体轻压并吸干表面水分后, 转移至温度 21℃, 光照强度 50~60 μmol/(m²·s)的干燥箱内自然干燥失水, 取失水率分别为 0, 10%, 40%, 60%, 90%的样品和失水率达 90%后再转移至新鲜灭菌海水中复水 30 min 后的样品提取总 RNA, 并逆转录为 cDNA, 用于不同程度失水胁迫及复水条件下 *GPX* 基因表达水平的 qPCR 分析。本实验中, 失水率计算公式为:

失水率=(鲜重-失水后藻体重)/(鲜重-干重)×100%

以上处理的样品均设置 3 个生物学重复。

1.2 引物及其序列

本实验中用于 *GPX* 基因的 RACE 扩增、阳性克隆筛选以及基因表达水平 qPCR 分析的引物及其序列如表 1 所示, 由大连宝生物工程有限公司合成。

1.3 总 RNA 的分离纯化

选取健康坛紫菜叶状体, 重约 0.1 g, 纱布轻压并吸干表面水分后, 经液氮研磨并使用 E.Z.N.A 植物 RNA 提取试剂盒(OMEGA, 德国), 按照其操作流程提取各样品的总 RNA。配置 1%琼脂糖凝胶电泳用于检测所提取总 RNA 的完整性, 并在 Multiskan GO 3.2 全波长酶标仪上测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值及总 RNA 浓度, 判断样品中核酸与蛋白质的污染情况。

1.4 *PhGPX* 基因的全长克隆及验证

由实验室已知的坛紫菜转录组数据库中, 筛选出一条注释结果为莱茵衣藻 *GPX* 基因的 unigene 序列。将该序列作为 *PhGPX* 基因克隆的核心序列, 设计 5'和 3'RACE 扩增特异性引物

表 1 实验所用引物的名称和序列
Tab. 1 Name and sequence of primers in this experiment

用途 purpose	引物名称 primer name	引物序列(5'-3') sequence(5'-3')
3'RACE gene specific primer	RGPXF1	GGTGACAAGCGCCCGTTTGATATCG
3'RACE nested primer	RGPXF2	ACGATGGAAAGCGGATAGAGTGGA
5'RACE gene specific primer	RGPXR1	TCTGCGGGCAAGCAACTCCACTTCCACC
qPCR	qGPXF	AAGTCGAGCATTGAGTCCACGTTTGG
	qGPXR	TGCCCGTCCGCGTTCACAGA
内参 internal control	UBCF	TCACAACGAGGATTTACCACC
	UBCR	GAGGAGCACCTTGGAACG
阳性克隆筛选 validate of positive clone	RV-M	GAGCGGATAACAATTTACACAGG
	M13-20	CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT

及巢式扩增引物(表 1)。参照 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒(Clontech, 美国)的操作流程分别进行目的基因的 5'和 3'RACE 扩增。对 RACE 扩增样品进行琼脂糖凝胶电泳检测后,将目的条带割胶回收,连接 PMD19-T 载体后转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,经阳性克隆验证后送至大连宝生物工程有限公司测序。并对测序结果采用 DNAMAN 软件进行拼接,获取 *PhGPX* 基因全长序列。

1.5 *PhGPX* 基因的生物信息学分析

采用 NCBI Blastn 程序对所获得的 *PhGPX* 基因全长序列进行同源性比对分析,并使用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)在线程序分析该基因的开放阅读框(ORF 区),预测所编码的氨基酸序列;有关蛋白质的序列分析通过以下软件进行:

理化参数分析: ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>);

跨膜结构分析: TMHMM Serverv.2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>);

二级结构分析: PredictProtein(<https://www.predictprotein.org/>);

三级结构预测: SWISS-MODEL(<http://swiss-model.expasy.org/>);

亚细胞定位预测: WoLFPSORT(<http://www.wolfpsort.org/>);

信号肽预测: SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>);

另使用 Clustal X^[21]软件对 *PhGPX* 基因编码氨基酸进行多序列比对分析,并使用 MEGA

6.0^[22]软件基于邻接法构建 *PhGPX* 蛋白的系统进化树。

1.6 *PhGPX* 基因表达水平的 qPCR 分析

根据已获得的 *PhGPX* 基因序列设计荧光定量 PCR 引物,并以 *PhUBC* 作为内参基因,分别进行 *PhGPX* 在生活史不同世代、不同时间高温及不同程度失水胁迫条件下基因表达水平的 qPCR 分析。

按 PrimeScript[®] RT reagent kit(TaKaRa, 大连)的操作流程将已提取获得的各样品总 RNA,反转录为 cDNA 定量模板。单位定量反应孔体系为 20 μ L,其中包含: 10 μ L 2 $\times$ SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa), 0.2 μ mol/L 定量引物和 2 μ L 反转录模板。qPCR 扩增在 ABI7300 型定量 PCR 仪(Applied Biosystems, 美国)上进行。程序设置为 95 $^{\circ}$ C 变性 30s; 95 $^{\circ}$ C 5s, 62 $^{\circ}$ C 31s, 并运行 40 个循环。待循环结束后,将温度缓慢升至 95 $^{\circ}$ C,绘制熔解曲线。以 5 $\times$ 梯度稀释的 cDNA 为模板进行 qPCR 扩增,并制作 *PhGPX* 和内参基因 *PhUBC* 的标准曲线。每个反应设 3 个平行复孔。

1.7 数据处理与分析

实验所得数据采用 SPSS18.0 软件进行统计学分析,并根据单因素方差分析法(One-Way ANOVA)和最小显著差异法(LSD)比较不同数据组间的差异, $P<0.05$ 和 $P>0.05$ 分别表明数据间存在差异显著和无显著差异。

2 结果与分析

2.1 *PhGPX* 基因的全长克隆及序列分析

采用根据坛紫菜 CL181.Contig1 序列设计的

基因特异性引物 RGPXR1 和 RGPXF1/F2(表 1) 分别进行 5'和 3'RACE 扩增, 得到 885 bp 的 5'RACE 扩增产物和 422 bp 的 3'RACE 扩增产物(图 1), 测序后将两条所得序列拼接, 获得一条长度为 1027 bp 的全长序列。经 ORF finder 软件分析, 该序列包含完整的开放阅读框(ORF)(272~826 bp)和较长的 polyA 结构, 可编码 184 个氨基酸的多肽。BLAST 比对发现该基因编码的蛋白属于 GPX 家族。该基因序列已提交到 GenBank 数据库中, 登录号为 JX673908。

ExPASy ProtParam 程序一级结构分析结果表明,

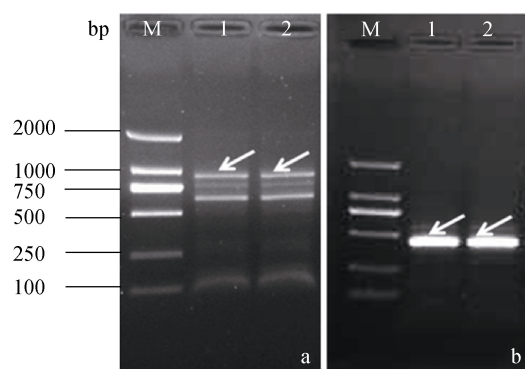


图 1 *PhGPX* 基因克隆产物电泳图

a: *PhGPX* 基因的 5'-RACE 扩增产物; b: *PhGPX* 基因的 3'-RACE 扩增产物; M: DL2000 DNA Marker.

Fig. 1 Agarose electrophoresis of RACE of *PhGPX* gene
a: 5'-RACE products of *PhGPX*; b: 3'-RACE products of *PhGPX*; M: DL2000 DNA Marker.

该基因编码的蛋白质分子式为 $C_{911}H_{1404}N_{242}O_{252}S_5$, 分子量约为 19.9 kD, 等电点为 8.76, 正电荷氨基酸残基(Arg+Lys)总数为 21, 负电荷氨基酸残基(Asp+Glu)总数为 18, 不稳定系数为 34.95, 脂肪系数为 81.68, 总平均疏水度为-0.018, 说明 *PhGPX* 性质稳定, 易溶于水。采用 PredictProtein 程序对编码蛋白进行二级结构分析, 结果表明二级结构中构成螺旋(H)、片层(E)和环状(L)的氨基酸残基占总氨基酸的比例分别为 25%、24.46%与 50.54%。利用在线软件 Swiss-Model 自动同源建模方式, 对 *PhGPX* 氨基酸序列的三级空间结构进行预测, 结果如图 2 所示, 从图中可以看出 *PhGPX* 由 3 个螺旋, 7 个片层组成。signalIP4.0 和 TMHMM 软件在该蛋白中未检测到信号肽序列和跨膜结构域。亚细胞定位软件 WoLFPSORT 预测 *PhGPX* 定位于叶绿体中。

多序列比对结果表明 *PhGPX* 编码的氨基酸序列与其他藻类 GPX 蛋白的氨基酸序列同源性较高, 特别是 *PhGPX* 含有 GPX 家族的两个高度保守的特征基序(NVASKCGLT 是 GPX 的催化活性区, LAFPCNQF 是 GPX 的标志性基序)和磷脂氢谷胱甘肽 GPX 的保守结构域 KWNF(S/T)KFL(图 3)。而在这 3 个保守基序中, 包含构成 GPX 催化三联体的 Cys⁴²、Gln⁷⁶、Trp¹³⁴ 等 3 个保守氨基酸残基位点。

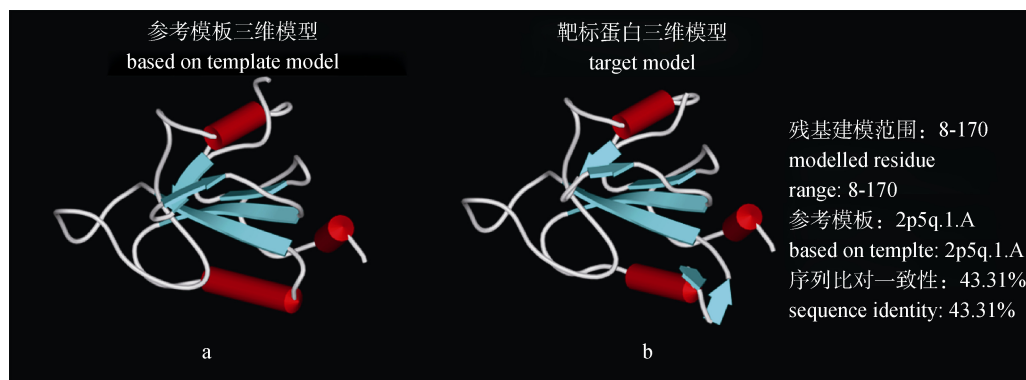


图 2 坛紫菜 GPX 蛋白的三维结构预测

a: Swiss-Model 数据库中收录的 GPX 三维结构; b: Swiss-Model 预测的坛紫菜 GPX 三维结构。

Fig. 2 The three-dimensional structure of deduced GPX protein of *Pyropia haitanensis*

a: The three-dimensional structure of GPX stored in SWISS-MODEL template library; b: The three-dimensional structure of GPX protein of *Pyropia haitanensis* deduced by SWISS-MODEL.

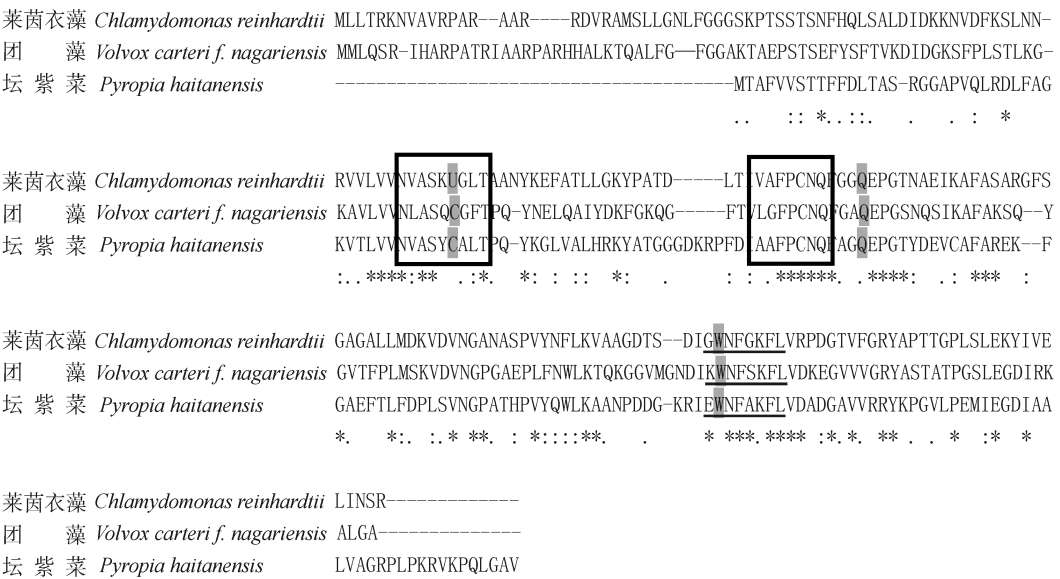


图 3 坛紫菜 GPX 氨基酸序列的多重比对

方框表示 GPX 家族的特征基序, 下划线表示磷脂氢谷胱甘肽 GPX 特有的保守结构域, 灰色背景表示构成 GPX 催化三联体的 3 个保守氨基酸(Cys42、Gln76、Trp134). “*”和“:”分别表示一致性和相似性氨基酸残基. 莱茵衣藻: AAL14348.1, 团藻(XP_002950450).

Fig. 3 Multi-alignment of amino acid sequence of GPX

The conserved amino acids motif of GPX are boxed, the conserved amino acids motif of phospholip hydroperoxide GPX is underlined and amino acid residues (Cys42, Gln76, Trp134) which formed the catalytic triad in GPX are marked with gray background. Asterisks (*) and colons (:) indicate identical and similar amino acid residues, respectively. *V.carteri*, XP_002950450; *C.reinhardtii*, AAL14348.1.

2.2 PhGPX 蛋白的系统进化分析

为进一步分析 *PhGPX* 与其他物种的亲缘关系, 采用邻接法构建了 GPX 蛋白的系统进化树(图 4), 结果显示该进化树分为两个大的分支, 拟南芥、玉米等高等植物聚为一支, 莱茵衣藻、团藻等藻类聚为一支, 进化分析表明 *PhGPX* 属于典

型的藻类 GPX, 其与高等植物的亲缘关系较远, 而与莱茵衣藻等藻类亲缘关系较近。

2.3 PhGPX 表达水平的 qPCR 分析

为全面了解 *PhGPX* 基因在不同生活史世代间及逆境胁迫下的功能, 本研究中对基因表达水平进行了定量检测。在不同世代、不同时间

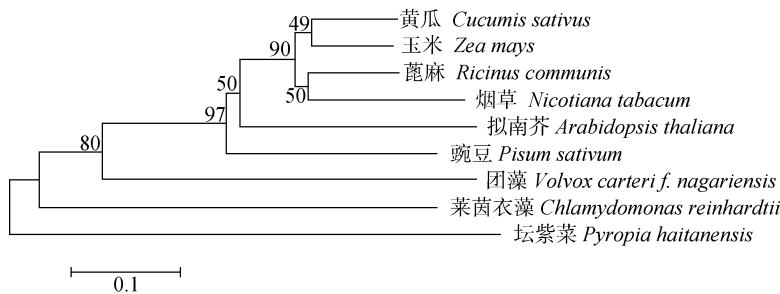


图 4 GPX 蛋白系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of GPX constructed with the neighbor-joining method

豌豆(*Pisum sativum*, AJ000508), 蓖麻(*Ricinus communis*, EF620778), 玉米(*Zea mays*, AF520911), 烟草(*Nicotiana tabacum*, AB041518), 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, NM_128714), 黄瓜(*Cucumis sativus*, FJ036896), 团藻(*Volvox carteri f. nagariensis*, XM_002950404), 莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*, AY051144).

高温胁迫以及不同程度失水胁迫条件下, 采用实时荧光定量 PCR 技术, 对已克隆获得的 *PhGPX* 基因进行了表达水平分析(图 5~6)。结果表明, 在坛紫菜生活史不同世代(叶状体世代和丝状体世代)比较中, *PhGPX* 的表达水平未出现显著差异($P>0.05$)(图 5); 29℃ 高温胁迫下的结果显示, 短时间(<6h)的高温胁迫不会致使 *PhGPX* 基因表达水平发生显著变化($P>0.05$), 而当高温胁迫时间超过 6 h 时, 表达水平开始显著上调($P<0.05$), 并在胁迫时间为 12h 时表达量达到最高值, 为胁迫前表达水平的 6.04 倍, 而后 *PhGPX* 基因显著下调表达($P<0.05$), 至高温胁迫 48 h 时, 其表达量下调至初始水平($P>0.05$)(图 6a); 而在失水胁迫过程中, 轻度失水(即失水率为 0%~40%)时, *PhGPX* 基因的表达水平不发生显著变化($P>0.05$), 当失水率大于 40% 时, *PhGPX* 基因开始显著下调表达($P<0.05$), 并在较高失水程度(失水率为 60%~90%)时维持一个

相对稳定状态, 且在复水 30 min 后, *PhGPX* 基因的表达水平仍无法恢复至失水胁迫前水平(图 6b)。

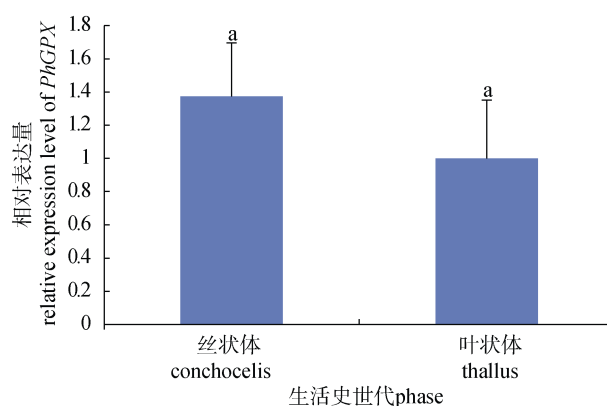


图 5 坛紫菜不同生活史世代 *PhGPX* 基因的相对表达水平不具有相同字母标记的数据间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 5 The relative expression levels of *PhGPX* gene in different phase of *Pyropia haitanensis* life cycle Bar of each column with different letters mean significant difference ($P<0.05$).

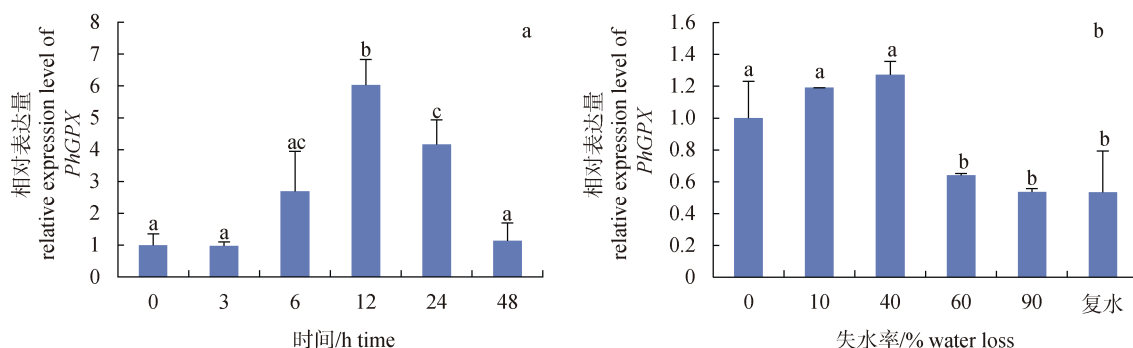


图 6 不同水平高温和失水胁迫下 *PhGPX* 的相对表达水平

a: 高温胁迫; b: 失水胁迫。不具有相同字母上标的数据间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 6 The relative expression levels of *PhGPX* gene in different level of high temperature or desiccation stress a: high temperature stress; b: desiccation stress. Bar of each column with different letters mean significant difference ($P<0.05$).

3 讨论

植物在有氧代谢过程中产生的少量 ROS 可以作为细胞信号转导分子参与植物正常的生理、生化代谢过程, 然而过量积累的 ROS 则会对植物造成氧化损伤^[2]。GPX 是保护细胞免受活性氧化损伤的一类重要的抗氧化物酶, 是由多基因编码的小基因家族酶类, 根据底物结合的特异性和亚细胞定位、氨基酸序列的不同, 可分为几种不同

的同工酶, 而动物的 GPX 又可根据其包含的半胱氨酸不同, 分为含硒和不含硒两大类, 但在植物中迄今还未发现含硒 GPX。如 Milla 等^[23]在拟南芥的基因组和 EST 序列分析中发现有 7 种推测为 GPX 的同功酶, 分布在 3 条染色体上, 分别定位于胞质、叶绿体、线粒体和类囊体等亚细胞器中。本研究采用 RACE 扩增技术, 成功克隆获得了一条坛紫菜 GPX 基因的全长, 命名为 *PhGPX*。对其编码氨基酸进行多序列比对和系统进化树分析,

结果显示其与藻类 GPX 序列同源性较高。该序列具有 GPX 家族的两个保守特征基序(催化活性区 NVASKCGLT 和标志性基序 LAFPCNQF), 和磷脂氢谷胱甘肽 GPX 特有的保守结构域 KWNF(S/T) KFL, 且具有 3 个 GPX 活性中心保守残基位点(如图 3 所示), 这些保守性位点成分说明所克隆的 *PhGPX* 属于植物 GPX 家族成员。生物信息学分析表明, *PhGPX* 没有明显的信号肽和跨膜区, 亚细胞定位于叶绿体中, 推测该基因编码定位于叶绿体中的非分泌性蛋白。

植物在遭受干旱、盐碱、高低温、病虫害等生物或非生物胁迫时, 首先是识别胁迫信号, 随后是氧化爆发, 出现 ROS 的大量释放和累积, 为维持细胞内氧化还原的动态平衡, 植物在长期的进化过程中形成了一套复杂且精细的 ROS 清除和防御机制, 其中最为关键的就是激活抗氧化酶基因的表达式和增强抗氧化酶活性, 从而清除 ROS。已有的大量研究结果表明, *GPX* 基因的表达式在受到逆境胁迫刺激时会发生表达水平的显著上调^[9, 24–25]。在对转基因植物的研究中也发现, *GPX* 的过量表达可以增强植物对非生物胁迫的耐受力^[26–27], 因此植物的 *GPX* 基因被视为胁迫诱导基因, 在各种逆境胁迫应答中发挥重要的作用。本研究结果发现在 29℃ 高温胁迫条件下, 随着胁迫时间的增加, *PhGPX* 基因表达式水平呈现为先上调后下调的趋势, 当高温胁迫时间为 12 h 时, 该基因表达式水平最高; 而在较低水平($\leq 40\%$)的失水胁迫条件下, *PhGPX* 基因的表达式没有发生显著变化, 而随着失水程度加剧, 当失水率大于 40% 时, *PhGPX* 基因便开始显著下调表达式, 且在复水 30 min 后仍无法恢复到失水胁迫前的水平。这一结果说明 *PhGPX* 的表达式随胁迫种类和胁迫水平的不同而呈现出不同的表达式水平变化, 这与香蕉 *MaGPX* 在 NaCl 胁迫、干旱胁迫和涝害胁迫下的表达式水平变化是基本一致的^[28]。从这些结果中可以推测坛紫菜体内的 GPX 也可能存在多种家族成员, 不同的逆境胁迫条件、甚至不同的逆境胁迫水平可能需要不同家族成员的 GPX 参与 ROS 的清除和防御。

坛紫菜的生活史包括两个世代, 即丝状体世代和叶状体世代^[29]。由于坛紫菜丝状体和叶状体的自然分布环境不同, 丝状体生长于潮下带贝壳的石灰质层中, 环境条件相对稳定; 而叶状体则生长于环境条件发生周期性激烈变化的潮间带中高潮区, 因此一般认为坛紫菜叶状体的抗逆能力要显著高于丝状体。而本研究却发现 *PhGPX* 基因的表达式水平在坛紫菜不同生活史世代中没有显著差异, 由此说明 *PhGPX* 可能不是体现坛紫菜叶状体和丝状体抗逆性差异的主要基因。

参考文献:

- [1] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 373–399.
- [2] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. *Trends in Plant Science*, 2002, 7(1): 405–410.
- [3] Miao Y C, Bai L, Miao C, et al. Progress in Plant Glutathione Peroxidase[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2005, 22(3): 350–356. [苗雨晨, 白玲, 苗琛, 等. 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.]
- [4] Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe R, et al. Diversity of glutathione peroxidase[J]. *Methods Enzymol*, 1995, 252: 38–52.
- [5] Faltin Z, Holland D, Velcheva M, et al. Glutathione peroxidase regulation of reactive oxygen species level is crucial for in vitro plant differentiation[J]. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51(7): 1151–1162.
- [6] Sugimoto M, Sakamoto W. Putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene from *Arabidopsis thaliana* induced by oxidative stresses[J]. *Genes Genet Syst*, 1997, 72(5): 311–316.
- [7] Depege N, Drevet J, Boyer N. Molecular cloning and characterization of tomato cDNAs encoding glutathione peroxidase-like proteins[J]. *Eur J Biochem*, 1998, 253(2): 445–451.
- [8] Li W J, Feng H, Fan J H, et al. Molecular cloning and expression of a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homolog in *Oryza sativa*[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1493(1–2): 225–230.
- [9] Overbaugh J M, Fall R. Characterization of a selenium-independent glutathione peroxidase from *Euglena gracilis*[J]. *Plant Physiol*, 1985, 77(2): 437–442.
- [10] Leisinger U, Rüfenacht K, Zehnder A J B, et al. Structure of a glutathione peroxidase homologous gene involved in the oxidative stress response in *Chlamydomonas reinhardtii*[J].

- Plant Sci, 1999, 149(2): 139–149.
- [11] Dayer R, Fischer B B, Eggen R I L, et al. The peroxiredoxin and glutathione peroxidase families in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Genetics, 2008, 179(1): 41–57.
- [12] Yan X H, Li L, Chen J H, et al. Genetics and breeding of *Porphyra haitanensis* Cheng et Zheng (Bangiales, Rhodophyta)[C]. Proceedings of the first National Marine Biotechnology Forum of the national “863” plan of China, 2003: 107–113. [严兴洪, 李琳, 陈俊华, 等. 坛紫菜的遗传与育种[C]. 国家“863”计划资源环境技术领域第一届海洋生物技术论坛论文集, 2003: 107–113.]
- [13] Blouin N A, Brodie J A, Grossman A C, et al. *Porphyra*: a marine crop shaped by stress[J]. Trends Plant Sci, 2011, 16(1): 29–37.
- [14] Xie J, Xu Y, Ji D H, et al. Physiological response of the antioxidant system in *Pyropia haitanensis* to desiccation stress[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(2): 405–412. [谢佳, 徐燕, 纪德华, 等. 坛紫菜叶状体对失水胁迫的抗氧化生理响应[J]. 中国水产科学, 2014, 21(2): 405–412.]
- [15] Zhang Y, Xie C T, Chen C S, et al. Physiological responses of gametophytic blades of *Porphyra haitanensis* to rising temperature stresses[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(3): 379–386. [张元, 谢潮添, 陈昌生, 等. 高温胁迫下坛紫菜叶状体的生理响应[J]. 水产学报, 2011, 35(3): 379–386.]
- [16] Li B, Xu Y, Ji D H, et al. Effects of high temperature and non-aeration stress on the quality of *Prophyra haitanensis*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(3): 43–49. [李兵, 徐燕, 纪德华, 等. 高温静水胁迫培养对坛紫菜品质的影响[J]. 渔业科学进展, 2013, 34(3): 43–49.]
- [17] Xu Y, Chen C S, Ji D H, et al. Proteomic profile analysis of *Pyropia haitanensis* in response to high-temperature stress[J]. J Appl Phycol, 2014, 26(1): 607–618.
- [18] Li B. The global transcriptome of *Pyropia haitanensis* and digital gene expression profile analysis under high-temperature stress[D]. Xiamen: Jimei University, 2013: 1–135. [李兵. 坛紫菜转录组及应答高温胁迫的表达谱分析[D]. 厦门: 集美大学, 2013: 1–135.]
- [19] Xie J. Preliminary study of proteomics of *Pyropia haitanensis* in response to desiccation stress[D]. Xiamen: Jimei University, 2014: 1–79. [谢佳. 失水胁迫下坛紫菜差异蛋白质组的初步研究[D]. 厦门: 集美大学, 2014: 1–79.]
- [20] Chen C S, Ji D H, Xie C T, et al. Preliminary study on selecting the high temperature resistance strains and economic traits of *Porphyra haitanensis*[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2008, 30(5): 100–106. [陈昌生, 纪德华, 谢潮添, 等. 坛紫菜耐高温品系选育及经济性状的初步研究[J]. 海洋学报, 2008, 30(5): 100–106.]
- [21] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucl Acids Res, 1997, 25(24): 4876–4882.
- [22] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Mol Biol Evol, 2013, 30(12): 2725–2729.
- [23] Milla MAR, Maurer A, Huete A R, et al. Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways[J]. Plant J, 2003, 36(5): 602–615.
- [24] Sreenivasulu N, Miranda M, Prakash H S, et al. Transcriptome changes in foxtail millet genotypes at high salinity: Identification and characterization of a PHGPX gene specifically up-regulated by NaCl in a salt-tolerant line[J]. J Plant Physiol, 2004, 161(4): 467–477.
- [25] Avsian-Kretchmer O, Gueta-Dahan Y, Lev-Yadun S, et al. The salt-stress signal transduction pathway that activates the gpx1 promoter is mediated by intracellular H₂O₂, different from the pathway induced by extracellular H₂O₂[J]. Plant Physiol, 2004, 135(3): 1685–1696.
- [26] Yoshimura K, Miyao K, Gaber A, et al. Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing *Chlamydomonas* glutathione peroxidase in chloroplasts or cytosol[J]. Plant J, 2004, 37(1): 21–33.
- [27] Gaber A, Yoshimura K, Yamamoto T, et al. Glutathione peroxidase-like protein of *Synechocystis* PCC 6803 confers tolerance to oxidative and environmental stresses in transgenic *Arabidopsis*[J]. Physiol Plantarum, 2006, 128(2): 251–262.
- [28] Zhang L L, Xu B Y, Liu J H, et al. Isolation and expression analysis of a cDNA encoding glutathione peroxidase from Banana[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2012, 39(8): 1471–1481. [张丽丽, 徐碧玉, 刘菊华, 等. 香蕉谷胱甘肽过氧化物酶基因 *MaGPX* 的克隆和表达分析[J]. 园艺学报, 2012, 39(8): 1471–1481.]
- [29] Xu P, Zhang X C, Wang S J, et al. Reproduction and development of major economic marine algae in China[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2013: 139–164. [许璞, 张学成, 王素娟, 等. 中国主要经济海藻的繁殖与发育[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013: 139–164.]

Cloning and expression analysis of the glutathione peroxidase gene from *Pyropia haitanensis*

ZHANG Hanhan, XU Yan, JI Dehua, CHEN Changsheng, XU Kai, XIE Chaotian

Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China

Abstract: At normal situation, algae maintain a balance between reactive oxygen species (ROS) production and scavenging states, and a little amount of ROS molecules can be used as intracellular signal transduction molecules involved in biochemical metabolic processes. But under abiotic stress conditions, excessive accumulation of ROS will cause oxidative damage to cell membrane, then resulting in irreparable loss of metabolic function and eventually leading to cell death. Algae evolved a complex antioxidant defense mechanism (including non-enzymatic system of antioxidant enzymes and antioxidant enzymatic systems) to resist the damages of ROS. Glutathione peroxidase (GPX) is an important member of the ROS scavenging enzymatic system, which can clean the lipid peroxide and H_2O_2 , its mechanism is to reduce ROS through catalytic the reactions between glutathione (GSH) and lipid peroxides (ROOH) or free H_2O_2 , thereby blocking the production of free radicals, inhibiting the peroxidation processes of cells and protecting the enzyme activity of some sulfhydryl. Previous studies have concluded that the level of GPX activity has a positive correlation with the ability of plants to adapt to adversity. So GPX synthesis-related gene has been considered as an important stress resistance-related gene. *Pyropia haitanensis*, naturally growth in coastal intertidal zone, is an important economic macroalgae in Fujian, Zhejiang, Guangdong provinces. With tidal changes, the thallus required to undergo periodic dehydration and rehydration process, therefore it should has a very strong adaptability to adversity. Simultaneously, with global warming, the temperature of sea water increases, which causes damages to seedling of *P. haitanensis* and lead to big economic loss for aquaculture industry. As for the physiological and molecular response of *P. haitanensis* to high temperature and dehydration stress conditions, our previous studies found GPX plays an important role in stress resistance. In this study, the full-length of *GPX* gene from *Pyropia haitanensis* was cloned by using rapid amplification of cDNA ends (RACE) technology, which named *PhGPX* (GenBank accession: JX673908). The nucleotide sequence of *PhGPX* consists of 1027 bp, including an open reading frame (ORF) of 555 bp, which can be translate into a 184-amino-acid putative peptides with a molecular mass of 19.91 kD and a theoretical PI of 8.76. Multiple sequence alignment and Phylogenetic analysis indicated that the protein belong to the plant GPX enzyme family. Expression patterns analyzed by qPCR revealed that the expression of *PhGPX* gene between the thallus phage and conchocelis phage was not significantly different; during high-temperature stress, the expression levels of *PhGPX* significantly upregulated firstly and then decreased; However, during desiccation, the expression levels of *PhGPX* had no significantly change when the water loss was $\leq 40\%$, but as the desiccation continue, the expression levels of *PhGPX* were significantly downregulated. These results suggested that the expression of *PhGPX* was induced by different stress at different levels.

Key words: *Pyropia haitanensis*; glutathione peroxidase; gene cloning; expression analysis

Corresponding author: XIE Chaotian. E-mail: ctxie@jmu.edu.cn