植物学通报 *Chinese Bulletin of Botany* 2008, **25** (6): 687–694, www.chinbullbotany.com

·实验简报·

西伯利亚蓼谷胱甘肽转移酶和半胱氨酸合成酶基因在酿酒酵母中的共表达

刘明坤, 刘关君*, 阎秀峰

东北林业大学林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040

摘要 谷胱甘肽转移酶和半胱氨酸合成酶在清除活性氧(reactive oxygen species, ROS)中起重要作用。采用0.36 mol·L^{-1} $NaHCO_3$对西伯利亚蓼(*Polygonum sibiricum*)进行胁迫处理, 荧光定量PCR分析表明这2个基因的表达受盐胁迫强烈诱导。为了分析2个基因是否具有抗盐能力以及其相互协同能力, 从cDNA文库中获得谷胱甘肽转移酶(*GST*)和半胱氨酸合成酶(*CS*) 2个基因, 分别将*GST*、*CS*和*GST+CS*转入酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中, 并分别命名转基因酵母为*ty-gst*、*ty-cs*和*ty-gc*。在1 mol·L^{-1} Na_2CO_3和5 mol·L^{-1} NaCl胁迫处理下, 转基因酵母(*ty-gst*、*ty-cs*和*ty-gc*)的耐盐能力均明显高于野生型酵母(*wy*), 而三者之间并无显著差别。在0.4 mol·L^{-1} NaCl胁迫处理下, 转基因酵母(*ty-gst*、*ty-cs*和*ty-gc*)的抗氧化酶类相关基因*SOD1*、*SOD2*、*GPX1*和*GPX3*的表达量均低于野生型酵母(对照)(*wy*), 而*CTA1*表达量均高于野生型酵母(对照)(*wy*)。转基因酵母*ty-cs*在0.4 mol·L^{-1} NaCl胁迫处理前后其超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPX)的活性均表现为最高。

关键词 半胱氨酸合成酶, 谷胱甘肽硫转移酶, 活性氧, 酿酒酵母, 盐胁迫

刘明坤, 刘关君, 阎秀峰 (2008). 西伯利亚蓼谷胱甘肽转移酶和半胱氨酸合成酶基因在酿酒酵母中的共表达. 植物学通报 **25**, 687-694.

酵母和植物一样, 在新陈代谢和氧化胁迫时能够产生活性氧(reactive oxygen species, ROS), 如超氧阴离子自由基(O^{2-})、过氧化氢(H_2O_2)和羟自由基(OH^-)等。这些活性氧可以损伤细胞内大分子物质(如脂类、蛋白质和DNA), 从而引起细胞结构和功能的破坏, 甚至造成细胞死亡。酵母体内清除活性氧的机制可分为两类: 酶促抗氧化系统与非酶促抗氧化系统。酶促系统包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽转移酶(glutathione transferases, GST)和过氧化氢酶(catalase, CAT)等。非酶促抗氧化系统由谷胱甘肽(GSH)和维生素等组成(Jaleel et al., 2007)。

在酿酒酵母中ROS和与之相关的防御系统已经得到了广泛的研究(Cozat et al., 2005)。酶促系统中的*GST*是编码多功能蛋白的一个超基因家族, 其在保护组织抗氧化胁迫中起重要作用, GST通过催化还原型谷胱甘肽(GSH)淬灭活性氧分子(如氢过氧化物), 使细胞免受氧化损伤。在酵母中表达番茄的*GST*可以抑制Bax(哺乳动物促凋亡蛋白)引起的细胞死亡, 增强酵母对H_2O_2诱导胁迫的抗性(Kanpranis et al., 2000)。

GSH是非酶促抗氧化系统中重要的抗氧化物质, 其合成受半胱氨酸强烈调节(Strohm et al.,1995)。Noji等(2001)研究表明, 半胱氨酸合成酶(CS)作为半胱氨酸(Cys)合成的限速酶, 其过量表达能够增加半胱氨酸的含量, 进而增加 GSH 在体内的含量, 使其在清除细胞内 ROS 中起重要作用。Barroso 等(1999)研究表明, 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)半胱氨酸合成酶在盐胁迫下受到显著诱导, 而在酵母中过量表达此基因, 可使酵母在高浓度 NaCl 下正常生长(Romero et al., 2001)。

GST 发挥作用依赖于其底物 GSH, GSH 的合成受到 Cys 的调节, CS 是 Cys 合成的限速酶, 而 GST和CS在逆境中是否具有协同作用尚未见报道。本实验室从西伯利亚蓼(*Polygonum sibiricum*)的cDNA文库中获得

收稿日期: 2008-05-26; **接受日期**: 2008-10-11
基金项目: 黑龙江省科技重点攻关项目(No.GB06B303)和黑龙江省国际合作项目(No. WB07N02)
*通讯作者。E-mail: liuguanjun2003@126.com

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t2008-687

GST 和 *CS* 基因，并将 *GST* 单基因、*CS* 单基因和 *GST+CS* 双基因转入酿酒酵母中，通过对抗氧化酶类(CAT、SOD 和 GPX)活性的测定及相应基因表达的定量分析，并观察盐胁迫下酵母的表型变化，比较单、双价基因转化子在盐胁迫下的抗逆能力，为研究 *GST* 和 *CS* 基因的相互作用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

西伯利亚蓼(*Polygonum sibiricum* Laxm.)采自黑龙江省肇东盐碱地。取西伯利亚蓼地下茎段为繁殖材料，用腐殖质和细砂混合物(v:v=3:1)作为培养基质，温室内培养1个月。待苗高 10-15 cm 时，用 0.36 mol·L^{-1} $NaHCO_3$ 对西伯利亚蓼进行胁迫处理，浇灌 3 天。处理结束后分别选取处理 0、1、2 和 3 天的叶、茎和地下茎立即放入液氮中，于 -70°C 下保存备用。

1.2 RNA提取及*GST*和*CS*基因的实时定量PCR分析

按照 SDS/苯酚法(王玉成等, 2003)提取西伯利亚蓼叶、茎和地下茎中的总 RNA。为了分析西伯利亚蓼在 $NaHCO_3$ 胁迫下 *GST* 和 *CS* 的表达情况，根据 *GST* 和 *CS* 的 cDNA 序列合成引物，以西伯利亚蓼 18S rRNA-1 基因作为内参(引物序列见表 1)，对西伯利亚蓼的叶、茎和地下茎的 *GST* 和 *CS* 表达量在 DNA Engine Opticon^{TM}2 实时定量 PCR 仪上进行 RT-PCR 分析。20 μL 的 PCR 反应体系中含有 3 μL 的第一链 cDNA、10 μL 的 SYBR Premix Ex *Taq*^{TM}(2×)、1 μL *GST-S*(或 *CYC-S*)(10 pmol)引物、1 μL *GST-A*(或 *CYC-A*)(10 pmol)引物和 5 μL 去离子水。PCR 反应条件为 94°C 30 秒，94°C 12 秒，58°C 30 秒，72°C 40 秒，45 个循环。读板温度 81°C。采用常用的 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法(Livak and Schmittgen, 2001)对数据进行分析。

1.3 菌株与试剂

大肠杆菌 Top10 为本实验室保存。酿酒酵母尿嘧啶营养缺陷型 INVSc1 及质粒 pYES2 购自 Invitrogen 公司。PCR 引物合成及测序由大连宝生物工程公司完成。限制性内切酶和 T_4 DNA 连接酶购自大连宝生物工程公司。YNB 购自 Bebco 公司。酵母提取物与胰蛋白胨购自 OXOID 公司。其它试剂均为国产分析纯。YPD 和 SC-U 培养基的组分和酿酒酵母感受态细胞的制备及转化方法见 Invitrogen 公司操作手册。

1.4 酵母单、双价表达载体的构建

GST(GenBank: EU597480)和 *CS*(GenBank: EU597481)均来自西伯利亚蓼 cDNA 文库。分别以 *GST-S*、*GST-A*、*CYC-S* 和 *CYC-A* 为引物(表 2)进行 PCR 扩增。用限制性内切酶 *Kpn*I 和 *Hin*dIII 双酶切回收产物 *GST* 及质粒 pYES2。双酶切后回收目的片段并连接，转化大肠杆菌 Top10 感受态，提取转化子质粒

表 1 RT-PCR 所用引物

Table 1 Primers used for RT-PCR

Gene	Primer sequences (5'-3')	
	Forward primer	Reverse primer
18S rRNA-1	GTATGGTCGCAAGGTGAAAC	TTAGCAGGCTGAGGTCTCGT
GST	AGTAATGTTGTATGGAATGTGGGC	TTCGGCTATGGGTTTGTCGT
CS	GTCGGGTCCTCTTCGCTCAC	GCAGCAGGGCTCCATAATCT
18S rRNA-2	AGGAATTGACGGAAGGGCAC	GCACATCTAAGGGCATCACA
SOD1	ATCCGAGCCAACCACTGTC	CGACGCTTCTGCCTACAAC
SOD2	CGAGCAGTTTGGCAGTCTG	GTGTTCCCAGGCGTCAATG
CTA1	ATCTGCGGGTCTGCTATG	GTTGGTTTGTGGGTTTCTC
GPX1	ATCCATTCCCCTTCAACTCC	TCCAGACTTCCCGCTTAC
GPX3	TAAAGGGAAAAGTGGTGC	TTCATAATGGGGAAAGTCA

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t2008-687

表 2 酵母表达载体构建所用引物

Table 2 Primers used for construction of yeast expression vector

Gene	Names	Primer sequences (5'-3')	Restriction enzyme cutting site
GST	*GST-S*	CCAAGCTTACCATGGCAACCACCATAGACAGAG	*Hin*dIII
	GST-A	GGGGTACCTCACTTCTTCCCGAAGGCCTTGAAG	*Kpn*I
CS	*CYC-S*	CATGCATGCACAATGGCGTCTCTGGTCAACTTC	*Sph*I
	CYC-A	CCGGAATTCTCAAACCTCGGGTTGCATTTTTTCG	*Eco*RI
PGAL1	*PGAL1-S1*	ACGGATTAGAAGCCGCCGAGCGGGTGACAG	
	PGAL1-A1	CCGGAATTCGGTTTTTTCTCCTTGACGTTAA	*Eco*RI
CYC1	*CYC1-S1*	CGCGGATCCATCATGTAATTAGTTATGTCACG	*Bam*HI
	CYC1-A1	TGCTCTAGAAGCTTGCAAATTAAAGCCTTCG	*Xba*I

进行酶切和 PCR 鉴定, 得到酵母单价表达载体 pYES2-*GST*(图 1A)。用限制性内切酶 *Sph*I 和 *Eco*RI 双酶切回收产物 *CS* 及质粒 pYES2。双酶切后回收目的片段并连接, 转化大肠杆菌 Top10 感受态, 提取转化子质粒进行酶切和PCR鉴定, 得到酵母单价表达载体pYES2-*CS*(图 1B)。以 pYES2 质粒为模板, 分别以 *PGAL1-S1*、*PGAL1-A1*、*CYC1-S1* 和 *CYC1-A1* 为引物(表 2)进行 PCR 扩增, 得到的 PGAL1 和 CYC1 两个片段分别通过 T_4DNA 连接酶连接到 pMD18-T 载体上, 得到 pMD18-T-PC。用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切 pMD18-T-PC 和质粒 pYES2, 双酶切后回收目的片段并连接, 获得中间表达载体 pYES2-PC(图 1C)。*Sph*I 和 *Eco*RI 双酶切 pYES2-PC 和 *CS*, 双酶切后回收目的片段并连接, 得到 pYES2-PC-*CS*。用 *Kpn*I 酶切 pYES2-PC-*CS* 和 *GST*, 连接获得酵母双价表达载体 pYES2-*GST*-*CS* (图 1D)。

1.5 转基因酵母的耐盐性分析

将质粒 pYES2-*GST*、pYES2-*CS* 和 pYES2-*GST*-*CS* 转入酿酒酵母中, 分别命名为 *ty-gst*、*ty-cs* 和 *ty-gc*。在无菌条件下, 分别挑取 *ty-gst*、*ty-cs*、*ty-gc* 和 *wy*(野生型)酵母接种于 SC-U 液体选择培养基中, 在 30°C, 每分钟 200 转振荡培养 24 小时, 测定其 OD_{600} 值。计算出所需的菌液量, 使 20 mL 的诱导培养基中, 菌液的 OD_{600} 值为 0.4, 30°C 诱导表达 30 小时。取 100 μL 诱导的酵母菌液, 离心 10 秒, 弃上清, 菌体分别重悬于 1 mL 的 1 mol·L^{-1} Na_2CO_3 和 5 mol·L^{-1} NaCl 中, 放置于 30°C 下进行胁迫处理。胁迫后, 用无菌水重悬菌体, 涂布于 SC-U 固体培养基上(以 2% 葡萄糖为碳源)。以未受胁迫的 *ty-gst*、*ty-cs*、*ty-gc* 和 *wy* 酵母作为对照, 30°C 下培养直至长出单菌落, 照相并记录结果。

1.6 转基因酵母抗氧化酶类相关基因的定量RT-PCR分析及相应酶活性检测

将 3 个酿酒酵母转化子接种到 SC-U 筛选培养液中, 30°C 过夜振荡培养, 离心收集菌体。将菌体接种到半乳糖诱导培养液中, 使其初始 OD_{600} 值为 0.4。30°C 培养 48 小时后, 将其分成 2 份, 1 份为对照, 另 1 份放入含 0.4 mol·L^{-1} NaCl 的诱导培养基中, 胁迫处理 30 分钟。5 000 ×*g* 4°C下离心收集菌体, 菌体经液氮冷冻研磨后取一半提取 RNA, 用于抗氧化酶类相关基因(*SOD1*、*SOD2*、*CTA1*、*GPX1* 和 *GPX3*)的定量 RT-PCR 分析(引物序列见表1), 以酵母18S rRNA-2基因为内参, 具体过程见 1.2 节; 另一半转入 50 mmol·L^{-1} 磷酸缓冲液(pH7.4)中悬浮, 经 15 000 ×*g* 4°C 下离心 20 分钟, 上清液即为酶粗提液。粗提液蛋白含量的测定采用 Bradford(1976)的方法。SOD 酶活性测定采用氮蓝四唑(nitro blue tetrazolium, NBT)光化学抑制法(Stewart and Bewley, 1980)。CAT 活性测定采用 Ahmad 等(2000)的方法。GPX 活性测定参考 Rong 等(1994)的方法。

2 结果与讨论

2.1 *GST*和*CS*表达的荧光定量RT-PCR分析

为了分析*GST*和*CS*在西伯利亚蓼中对盐胁迫的转录应答, 在 0.36 mol·L^{-1} $NaHCO_3$ 胁迫处理 3 天后进行定量

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t2008-687

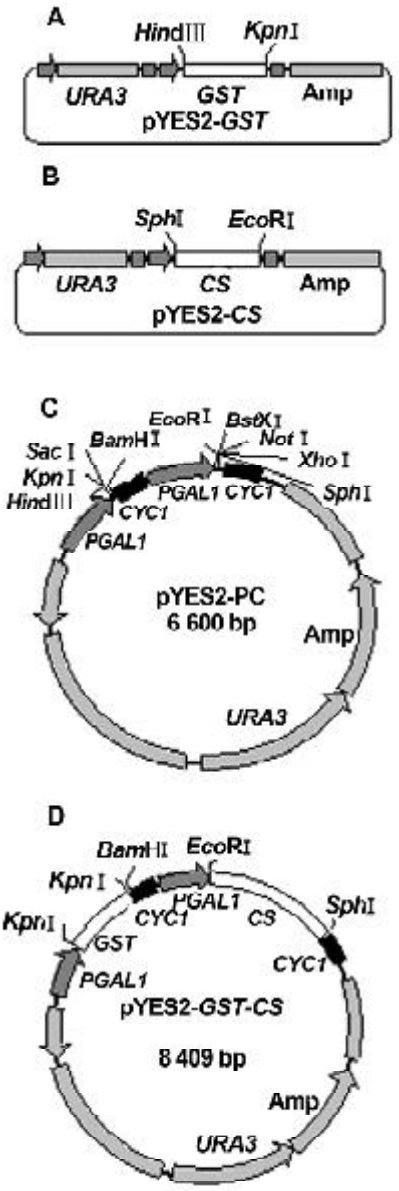


图 1 重组质粒pYES2-*GST*、pYES2-*CS*和pYES2-*GST*-*CS*的构建

(A) 单价表达载体pYES2-*GST*; (**B**) 单价表达载体pYES2-*CS*; **(C)** 中间表达载体pYES2-PC; (**D**) 双价表达载体pYES2-*GST*-*CS*

Figure 1 Construction of three recombinant plasmids pYES2-*GST*, pYES2-*CS* and pYES2-*GST*-*CS*

(A) Plasmid pYES2-*GST*; (**B**) Plasmid pYES2-*CS*; **(C)** Intermediate plasmid pYES2-PC; (**D**) Plasmid pYES2-*GST*-*CS*

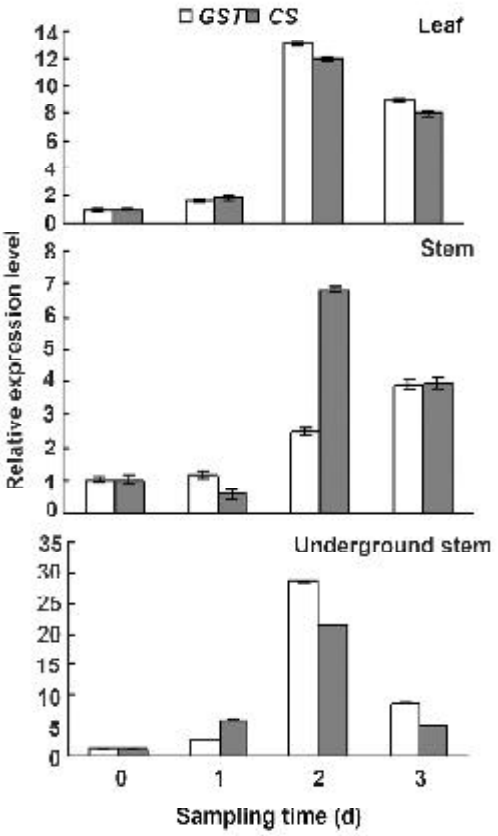


图 2 $NaHCO_3$ (0.36 mol·L^{-1})胁迫下*GST*和*CS*在西伯利亚蓼叶、茎和地下茎中的表达

Figure 2 Analysis of the expression of *GST* and *CS* gene in leaf, stem and underground stem of *Polygonum sibiricum* under 0.36 mol·L^{-1} $NaHCO_3$ stress

RT-PCR分析, 结果显示*GST*和*CS*在叶、茎和地下茎中受到强烈诱导表达(图2)。*GST*和*CS*在叶和地下茎中最大表达量出现在第2天。在茎中*CS*最大表达量也是在第2天出现, 而*GST*最大表达量则出现在处理后第3天。本实验结果与Barroso等(1999)对拟南芥半胱氨酸合成酶在盐诱导下的研究结果相一致。

在盐胁迫下植物会受到氧化胁迫损伤, 活性氧迅速合成, 植物需要加速抗氧化胁迫物质的生成。半胱氨酸是合成谷胱甘肽的重要前体物之一, 在高浓度盐胁迫时植物需要合成大量的半胱氨酸和其它硫代谢物(如GSH)

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t2008-687

来保护植物以适应和抵抗 Na^+ 浓度的升高。GST 作用的发挥依赖于底物 GSH, 大量 GSH 能够刺激 GST 活性增高, 从而催化还原型 GSH 淬灭活性氧分子, 使细胞免受氧化损伤。因此, 在盐胁迫下植物 *GST* 和 *CS* 的表达量均提高。

2.2 双价酵母表达质粒pYES2-*GST-CS*的构建

分别使用引物 *CYC-S*、*CYC-A*、*GST-S* 和 *GST-A* 对质粒 pYES2-*GST-CS* 进行 PCR 扩增, 可以得到 *GST* 和 *CS* 的目的片段, 实验结果(图 3)与预期一致。分别用 *Sph*I 和 *Eco*RI 双酶切质粒 pYES2-*GST-CS*, 能够得到目的片段 CS; *Kpn*I 酶切质粒 pYES2-*GST-CS*, 能够得到目的片段 GST(图 3)。因此说明双价酵母表达质粒 pYES2-*GST-CS* 构建成功。

本实验构建的酵母中间表达载体 pYES2-PC具有2个独立的启动子和终止子完整表达框(图 1C), 在此基础上只需分别连入 2 个基因, 就能构建酵母双价表达载体。因此这是一种快速、高效构建酵母双价表达载体的方法, 并且此中间载体为研究 2 个基因的相互作用奠定了基础。

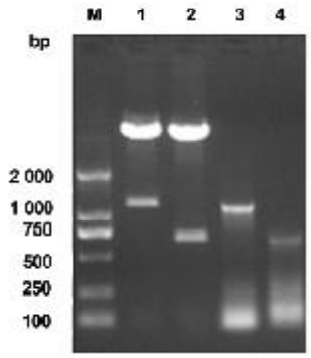


图 3 双价表达载体 pYES2-*GST-CS* 的酶切及 PCR 鉴定

M: DL2000标记; 1: *Sph*I 和*Eco*RI双酶切; 2: *Kpn*I单酶切; 3: 用引物 *CYC-S* 和 *CYC-A* 对质粒 pYES2-*GST-CS* 进行 PCR扩增的产物; 4: 用引物*GST-S* 和*GST-A*对质粒pYES2-*GST-CS*进行PCR扩增的产物

Figure 3 Enzyme digestion and PCR products of plasmid pYES2-*GST-CS*

M: DL2000 marker; 1: *Sph*I and *Eco*RI double digestion; 2: *Kpn*I single digestion; 3: PCR by primers *CYC-S* and *CYC-A*; 4: PCR by primers *GST-S* and *GST-A*

2.3 转基因酵母耐盐性分析

如图 4 所示, 在正常条件下, 转基因酵母(*ty-gst*、*ty-cs* 和 *ty-gc*)和对照酵母(*wy*)的存活率都很高, 而在 1 mol·L^{-1} Na_2CO_3 胁迫处理 4 小时后, 对照酵母 (*wy*)的存活率稍低于转基因酵母(*ty-gst*、*ty-cs* 和 *ty-gc*)。在 1 mol·L^{-1} Na_2CO_3 胁迫处理 12 小时后, 对照酵母(*wy*)的存活率为 0, 而转基因酵母依然有一部分存活。在同样胁迫处理 24 小时后, 转基因酵母仍有个别菌株存活。另外, 采用 5 mol·L^{-1} NaCl 胁迫 24 小时后, 对照酵母(*wy*)的存活率显著低于转基因酵母(*ty-gst*、*ty-cs* 和 *ty-gc*)。在 NaCl 胁迫 48 小时后对照酵母(*wy*)的存活率为 0, 而转基因酵母依然有一部分存活。但是在盐胁迫后, 转基因酵母间的耐盐胁迫能力并无明显差异。说明在半乳糖的诱导

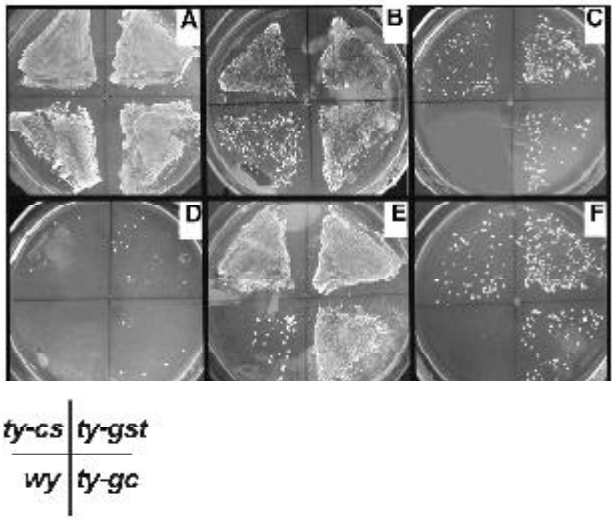


图 4 转基因酵母在 Na_2CO_3 和 NaCl 胁迫下的生长

(A) 未经胁迫处理的酵母; **(B)** 1 mol·L^{-1} Na_2CO_3胁迫处理4小时; **(C)** 1 mol·L^{-1} Na_2CO_3 胁迫处理12 小时; **(D)** 1 mol·L^{-1} Na_2CO_3胁迫处理 24 小时; **(E)** 5 mol·L^{-1} NaCl 胁迫处理 24 小时; **(F)** 5 mol·L^{-1}NaCl 胁迫处理 48 小时

Figure 4 Phenomenon of yeast cells transformed with *GST* and *CS* under Na_2CO_3 and NaCl stresses

(A) Yeast cells without stress treatment; **(B)** Yeast cells incubated in 1 mol·L^{-1} Na_2CO_3 for 4 h; **(C)** Yeast cells incubated in 1 mol·L^{-1} Na_2CO_3 for 12 h; **(D)** Yeast cells incubated in 1 mol·L^{-1} Na_2CO_3 for 24 h; **(E)** Yeast cells incubated in 5 mol·L^{-1} NaCl for 24 h; **(F)** Yeast cells incubated in 5 mol·L^{-1} NaCl for 48 h

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t2008-687

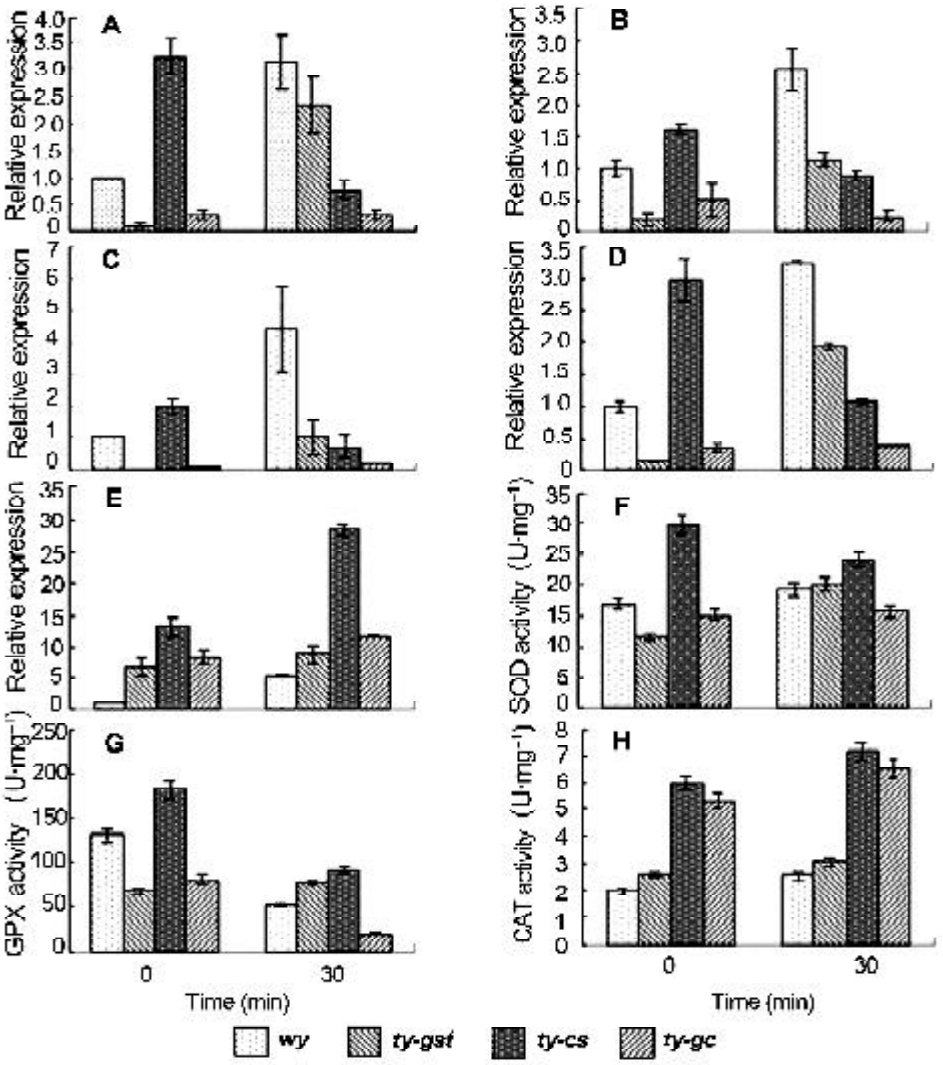


图 5 NaCl (0.4 mol·L^{-1})胁迫处理后酵母抗氧化酶类相关基因*SOD1* **(A)**、*GPX1* **(B)**、*SOD2* **(C)**、*GPX3* **(D)**和*CTA1* **(E)**表达的荧光定量RT-PCR分析及抗氧化酶类SOD **(F)**、GPX **(G)**和CAT **(H)**的活性检测

Figure 5 RT-PCR quantitative analysis of relative expression of yeast antioxidative enzyme genes *SOD1* **(A)**, *GPX1* **(B)**, *SOD2* **(C)**, *GPX3* **(D)** and *CTA1* **(E)** and detection activity of SOD **(F)**, GPX **(G)** and CAT **(H)** in transgenic yeast under 0.4 mol·L^{-1} NaCl stress

下, *GST* 和 *CS* 均赋予了转基因酵母(*ty-gst*、*ty-cs* 和 *ty-gc*)菌株抗 Na_2CO_3 和 NaCl 胁迫的能力。

2.4 转基因酵母抗氧化酶类相关基因的定量RT-PCR分析

盐胁迫能够产生大量的活性氧(ROS), 为了防御氧自由基造成的损伤和破坏, 植物在组织和细胞中建立和形成了一整套抗氧化防御体系, 如酶系统的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)等。SOD 和 CAT 的共同作用能有效消除植物体内过量的氧自由基。首先 SOD 催化超氧化物自由基歧化为氧和过氧化氢, 然后过氧化氢酶催化过氧化氢还原为氧和水。酿酒酵母中主要包括 2 类 SOD: 细胞质 Cu/Zn-SOD(SOD1)和线粒体 Mn-SOD(SOD2)。GPX 在酵

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t2008-687

母中有3个编码基因, 即*GPX1*、*GPX2*和*GPX3*, 其中GPX3主要调节抗氧化胁迫反应相关基因的表达(Delaunay et al., 2002)。而*GPX1*和*GPX2*则有助于提高酵母对金属毒性的抗性(Avery et al., 2004; Basu et al., 2004)。如图5所示, 用0.4 mol·L^{-1} NaCl胁迫处理酵母前后, *SOD1*、*SOD2*、*GPX1*和*GPX3*的表达模式相同。在未受胁迫时, *SOD1*、*SOD2*、*GPX1*和*GPX3*的表达量表现为*ty-cs*>*wy*>*ty-gc*>*ty-gst*, 而用0.4 mol·L^{-1} NaCl胁迫处理30分钟后, 它们的表达量则表现为*wy*>*ty-gst*>*ty-cs*>*ty-gc*。相应的SOD和GPX酶活性在胁迫前也表现为*ty-cs*>*wy*>*ty-gc*>*ty-gst*, 但胁迫后则表现为*ty-cs*>*ty-gst*>*wy*>*ty-gc*。在酵母中含有2种过氧化氢酶(CAT), 分别为定位于过氧化物酶体上的CTA1和细胞溶质中的CTT1。CTA1主要与氢过氧化物去毒作用有关(Hiltunen et al., 2003)。用0.4 mol·L^{-1} NaCl胁迫后转基因酵母(*ty-gst*、*ty-cs*和*ty-gc*)和对照酵母(*wy*)的*CTA1*表达量均有所增加(图5), 并表现为*ty-cs*>*ty-gc*>*ty-gst*>*wy*, 并且相对应的CAT活性也表现为同样的趋势, 说明高表达*CTA1*对于酵母耐盐能力的提高有一定的作用。

关于酿酒酵母*SOD*已经得到了广泛研究。酵母*SOD1*的表达主要受氧和ROS的产物(如H_2O_2等)所诱导。而*SOD2*在热、氧化和渗透胁迫处理后表达量上调(Jamieson, 1998)。本实验中转基因酵母(*ty-gst*、*ty-cs*和*ty-gc*)的*SOD1*和*SOD2*在盐胁迫处理后的表达量不仅没有上调反而均低于对照水平, 可能是由于半胱氨酸合成酶和谷胱甘肽转移酶基因表达产物参与了谷胱甘肽的代谢调节。在酵母中过量表达*GST*和*CS*会抑制内源*SOD*基因的表达, 而转基因酵母(*ty-gst*、*ty-cs*和*ty-gc*)在盐胁迫后的存活率明显高于对照很可能是由于酵母表达这2个基因的产物赋予了其抗盐性。在酿酒酵母中过氧化氢(H_2O_2)的清除机制主要分为2种途径: 一种是过氧化氢在过氧化氢酶(CAT)的作用下分解为水和氧气; 另一种是在谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)的作用下, 2个谷胱甘肽(GSH)与过氧化氢反应生成氧化型谷胱甘肽(GSSG), 后者在谷胱甘肽还原酶的作用下得以还原, 正常细胞一般具有较高的GSH/GSSG比值。酿酒酵母主要是通过第一种途径分解过氧化氢(赵保路, 1999)。本实验中*GPX1*和*GPX3*的定量PCR分析结果表明, 在NaCl胁迫处理后, 转基因酵母(*ty-gst*、*ty-cs*和*ty-gc*)的*GPX1*和*GPX3*表达量显著低于对照, 而它们的*CTA1*表达量却均高于对照; CAT的活性也显著高于对照。这进一步证明, 在盐胁迫处理后酵母中的过氧化氢(H_2O_2)是在过氧化氢酶(CAT)的催化下分解的。

参考文献

王玉成, 薄海侠, 杨传平 (2003). **胡杨、柽柳总RNA提取方法的建立**. **东北林业大学学报 31**, 99-100.

赵保路 (1999). **氧自由基和天然抗氧化剂**. **北京**: **科学出版社**. pp. 1-20.

Ahmad I, Hamid T, Fatima M, Chand HS, Jain SK, Athar M, Raisuddin S (2000). Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochim Biophys Acta* **1523**, 37-48.

Avery AM, Willetts SA, Avery SV (2004). Genetic dissection of the phospholipid hydroperoxidase activity of yeast GPX3 reveals its functional importance. *J Biol Chem* **279**, 46652-46658.

Barroso C, Romero LC, Cejudo FJ, Vega JM, Gotor C (1999). Salt-specific regulation of the cytosolic O-acetylserine (thiol) lyase gene from *Arabidopsis thaliana* is dependent on abscisic acid. *Plant Mol Biol* **40**, 729-736.

Basu U, Southron JL, Stephens JL, Taylor GJ (2004). Reverse genetic analysis of the glutathione metabolic pathway suggests a novel role of *PHGPX* and *URE2* genes in aluminium resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* **271**, 627-637.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.

Cozatl DM, Tavera HL, Navarro AH, Sanchez RM (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 653-671.

Delaunay A, Pflieger D, Barrault MB, Vinh J, Toledano MB (2002). A thiol peroxidase is an H_2O_2 receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* **111**, 471-481.

Hiltunen JK, Mursula AM, Rottensteiner H, Wierenga RK,

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t2008-687

Kastaniotis AJ, Gurvitz A (2003). The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 35-64.

Jaleel CA, Gopi R, Manivannan P, Panneerselvam R (2007). Antioxidative potentials as a protective mechanism in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. plants under salinity stress. *Turk J Bot* **31**, 245-251.

Jamieson DJ (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 1511-1527.

Kanpranis SC, Damianova R, Atallah M (2000). A novel plant glutathione S-transferase/peroxidase suppresses Bax lethality in yeast. *J Biol Chem* **275**, 29207-29216.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\triangle\triangle Ct}$ method. *Methods* **25**, 402-408.

Noji M, Saito M, Nakamura M, Aono M, Saji H, Saito K (2001). Cysteine synthase overexpression in tobacco confers tolerance to sulfur-containing environment pollutants. *Plant Physiol* **126**, 973-980.

Romero LC, Dominguez-Solis JR, Gutierrez-Alcala G, Gotor C (2001). Salt regulation of O-acetylserine(thiol)lyase in *Arabidopsis thaliana* and increased tolerance in yeast. *Plant Physiol Biochem* **39**, 643-647.

Rong ZX, Liu HZ, Bao JQ, Cheng HZ, Sun YY, Sun T (1994). Measurement of glutathione peroxidase activity in the whole blood of mice. *Prog Biochem Biophys* **21**, 362-366.

Stewart RC, Bewley JD (1980). Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol* **65**, 245-248.

Strohm M, Jouanin L, Kunert KJ, Pruvost C, Polle A, Foyer CH, Rennenberg H (1995). Regulation of glutathione synthesis in leaves of transgenic poplar (*Populus tremula* x *P. alba*) overexpressing glutathione synthetase. *Plant J* **7**, 141-145.

Co-expression of *Polygonum sibiricum* Glutathione Transferase and Cysteine Synthase Genes in *Saccharomyces cerevisiae*

Mingkun Liu, Guanjun Liu*, Xiufeng Yan

The Laboratory of Forest Genetics and Breeding and Biotechnology of Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract Glutathione transferase (GST) and cysteine synthase (CS) play an important role in plant elimination of active oxygen (reactive oxygen species, ROS). RT-PCR analysis of *GST* and *CS* in *Polygonum sibiricum* Laxm. showed remarkable change in expression induced by 3% $NaHCO_3$ stress. We transformed *GST*, *CS* and the *GST+CS* combination into yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*), designated transgenic yeast (*ty*) *ty-gst*, *ty-cs* and *ty-gc*. The survival rate of *ty-gst*, *ty-cs* and *ty-gc* was higher than that of wild-type yeast (*wy*) under 1 mol·L^{-1} Na_2CO_3 and 5 mol·L^{-1} NaCl stress, with essentially no difference in rate between the three *tys*. With 0.4 mol·L^{-1} NaCl, the activity of superoxide dismutase 1 (*SOD1*), *SOD2*, glutathione peroxidase 1 (*GPX1*) and *GPX3* were lower and that of catalase 1 (*CTA1*) higher in *ty* than in *wy*. However, the activity of the *ty-cs* SOD, CAT and GPX showed the highest with 0.4 mol·L^{-1} NaCl stress.

Key words cysteine synthase, glutathione transferase, reactive oxygen species, *Saccharomyces cerevisiae*, salt stress

Liu MK, Liu GJ, Yan XF (2008). Co-expression of *Polygonum sibiricum* glutathione transferase and cysteine synthase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chin Bull Bot* **25**, 687–694.

* Author for correspondence. E-mail: liuguanjun2003@126.com

(**责任编辑**: **白羽红**)

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t2008-687