

胡康, 金晓雨, 张雪, 等. 大豆 *GmGST7* 基因耐酸铝功能研究 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(5): 769-779.
HU Kang, JIN Xiaoyu, ZHANG Xue, et al. Study on the tolerant function of soybean *GmGST7* gene to acidic aluminum stress[J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(5): 769-779.

大豆 *GmGST7* 基因耐酸铝功能研究

胡康✉, 金晓雨, 张雪, 王金玉, 程艳波, 连腾祥, 年海, 马启彬✉

(华南农业大学 农学院/国家大豆改良中心广东分中心/亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室/
广东省分子育种重点实验室/岭南现代农业科学与技术广东省实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】耐酸铝基因 *GsMYB7* 过表达转化大豆品种‘华春6号’后, 从转基因株系的表达谱中获得目标基因 *GmGST7*, 该基因受酸铝胁迫诱导上调, 且位于 *GsMYB7* 基因下游, 进一步分析其耐酸铝功能, 以期提高大豆酸铝耐受能力。【方法】采用生物信息学方法分析 *GmGST7* 基因的碱基序列、蛋白结构域和构建系统进化树。通过烟草叶片瞬时转化法完成亚细胞定位。通过 RT-qPCR 分析该基因组织表达特异性。设计 0、25、50、75 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 5 个 AlCl_3 浓度梯度, 研究 *GmGST7* 对酸铝胁迫的响应。在 50 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 处理下, 设计 0、4、8、12、16、24、36、48 和 72 h 共 9 个时间梯度, 对 *GmGST7* 的表达模式进行分析。过表达 *GmGST7* 基因遗传转化拟南芥, 鉴定阳性植株, 并对转基因株系进行耐酸铝表型验证、氧化水平测定、耐酸铝标志基因及下游基因的表达分析。【结果】*GmGST7* 基因位于大豆第 7 号染色体, 序列全长为 1 128 bp。该基因含有 2 个外显子和 1 个内含子, 2 个外显子分别编码 GST 高度保守的 N 端和不保守的 C 端; *GmGST7* 基因编码 226 个氨基酸, 编码的蛋白为大豆 GST 蛋白的 tau 类家族成员, 定位于细胞质和细胞核中; *GmGST7* 基因在大豆根、茎、叶、花和幼荚中均有表达, 且在根中的表达量最高; *GmGST7* 基因在 50 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 处理 24 h 时表达最高; AlCl_3 处理后, 野生型拟南芥相对根伸长显著低于转基因株系的, 野生型拟南芥氧化水平高于转基因株系的, 耐酸铝标志基因和下游基因的表达量在转基因株系中较高。【结论】*GmGST7* 基因属于大豆 GST tau 类家族成员, 在细胞核和细胞质中行使功能, 呈组成型表达模式, 且在大豆根中表达最高, 对酸铝胁迫响应显著; *GmGST7* 过表达通过激活酸铝胁迫标志基因及其下游基因的表达提高拟南芥的酸铝耐受能力。

关键词: 大豆; *GmGST7*; 酸铝胁迫; 遗传转化

中图分类号: S565.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)05-0769-11

Study on the tolerant function of soybean *GmGST7* gene to acidic aluminum stress

HU Kang✉, JIN Xiaoyu, ZHANG Xue, WANG Jinyu, CHENG Yanbo, LIAN Tengxiang, NIAN Hai, MA Qibin✉

(College of Agriculture, South China Agricultural University/Guangdong Subcenter of National Center for Soybean Improvement/
State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources/Guangdong Provincial Key Laboratory
of Plant Molecular Breeding/Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】The *GmGST7* gene was obtained from the gene expression profile of the *GsMYB7* overexpressed lines of soybean ‘Huachun 6’ which was tolerant to acidic aluminum stress. *GmGST7* lied

收稿日期: 2023-09-11 网络首发时间: 2023-09-19 12:25:16

首发网址: <https://link.cnki.net/urlid/44.1110.S.20230919.0913.002>

作者简介: 胡康, 硕士研究生, 主要从事大豆耐酸铝基因功能研究, E-mail: 1264936727@qq.com; 通信作者: 马启彬, 教授, 博士, 主要从事大豆遗传育种研究, E-mail: maqibin@scau.edu.cn

基金项目: 2022—2023 年乡村振兴战略专项省级种业振兴行动项目 (2022-NPY-00-021); 中乌联合实验室合作项目 (SQ2018YFE010044); 广东省科技创新战略项目 (2020B122060062); 国家自然科学基金 (31771816, 31971965); 转基因生物新品种培育 (2016ZX08004002-007); 国家大豆产业技术体系岗位专家专项 (CARS-04-PS11)

downstream of the *GsMYB7* gene, and was up-regulated by acidic aluminum stress. Its function of acidic aluminum resistance was further investigated to enhance the tolerance to aluminum stress in soybean. 【Method】 The bioinformatics of the *GmGST7* gene was analyzed using the base sequence, protein domain and phylogenetic tree. Subcellular localization of GmGST7 protein was accomplished by transient transformation in tobacco leaves. The tissue expression specificity of the *GmGST7* gene was analyzed by RT-qPCR. Five AlCl_3 concentration gradients of 0, 25, 50, 75 and 100 $\mu\text{mol/L}$ were designed to study the response of *GmGST7* to aluminum stress. Under the treatment of 50 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 , nine time gradients of 0, 4, 8, 12, 16, 24, 36, 48 and 72 h were designed to investigate the expression patterns of *GmGST7*. Arabidopsis (Col-0) was transformed by overexpression of *GmGST7*, positive plants were identified by molecular technology. The phenotype identification of Arabidopsis tolerant to acidic aluminum stress were performed with the oxidation level determination, the expression analysis of the genes response to aluminum stress and downstream genes of *GmGST7*. 【Result】 The full-length sequence of *GmGST7* located on chromosome 7 of soybean was 1 128 bp. The *GmGST7* gene contained two exons and one intron which encodes a highly conserved N domain and a unconserved C domain of GST, respectively. *GmGST7* encoded 226 amino acids. The GmGST7 protein was a tau member of the GST family in soybean, and localized in the nuclear and cytoplasm. *GmGST7* was expressed in soybean root, stem, leaf, flower and young pod, and rich in root. The *GmGST7* gene was up-regulated by AlCl_3 with the highest relative expression under 50 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 for 24 h. The relative root elongation of wild type was significantly lower than that of the transgenic lines, the oxidation level was higher, and the expression levels of acidic aluminum stress response genes and downstream genes were higher. 【Conclusion】 The *GmGST7* gene is a tau member of the GST family in soybean, locates in the nucleus and cytoplasm. The *GmGST7* gene holds a constitutive expression pattern, and is rich in soybean root. *GmGST7* is significantly up-regulated by acidic aluminum stress. Overexpression of *GmGST7* enhances the tolerance to aluminum stress in Arabidopsis by activating the expression of the marker genes response to acidic aluminum stress and its downstream genes.

Key words: Soybean; *GmGST7*; Acidic aluminum stress; Genetic transformation

据统计, 全球范围内有超过 50% 的潜在可耕地可能是酸性的, 世界上多达 60% 的酸性土壤在发展中国家, 我国南方土地酸化也面临严峻的形势^[1]。铝毒是世界范围内限制作物生产的一个重要因素, 当土壤 pH 下降到 5 以下时, 铝在土壤中以八面体六水 $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ 形式存在, 通常称为 Al^{3+} 。这种形式的铝溶解到土壤溶液中后, 对植物的根系造成严重胁迫^[2-3]。酸铝胁迫对植物影响最快最主要的是根系, 尤其是对根尖生长的抑制^[4-6]。植物根尖与酸铝接触后在极短的几分钟内便可快速进入细胞质^[7-9]。当细胞质内进入大量铝元素后, 会抑制细胞分裂, 迅速破坏根系细胞的扩张和伸长^[10]。植物根系若长期暴露在酸铝胁迫下, 根系的延伸会受到抑制, 根尖膨胀, 侧根、根毛的数量显著下降^[11]。酸铝胁迫下损伤后的根系对水和矿物质等养分的吸收能力显著下降^[12-13]。酸性条件下的铝离子具有较高的活性, 对细胞壁、细胞膜、细胞质和细胞核的生理功能都会产生影响^[14]。

华南农业大学国家大豆改良中心广东分中心前期研究发现, *GsMYB7* 受酸铝胁迫诱导表达, 在酸铝敏感大豆品种 ‘华春 6 号’ 中过表达, 可增强植株对耐酸铝胁迫的抗性。对野生型和 *GsMYB7* 过表达株系进行酸铝处理后, RNA-Seq 测序结果分析和 RT-qPCR 检测结果发现, 有 9 个候选基因被 *GsMYB7* 间接或直接调控, 其中, *GmGST7* 对酸铝胁迫响应比较明显^[15]。

谷胱甘肽转移酶 (Glutathione S-transferase, GST) 家族成员起源于一个古老的祖先基因, 在漫长的进化过程中, 经历了外显子改组、基因复制、选择性剪接、交换、突变和其他未知机制, 导致了 GST 的序列多样化和功能多样性^[16-18]。根据氨基酸序列的相似性和外显子的个数, GST 家族在植物中主要分为 4 个类型: phi 型、zeta 型、tau 型和 theta 型^[19]。在结构上, GST 含有 N 端和 C 端保守域。GST 通过将谷胱甘肽偶联到疏水底物上, 对内源性和外源性化合物进行解毒^[20]。解毒包括 3 个阶

段: 转化、结合和分隔^[21]。经典的 GST 有 2 个结合位点, 位于 N 端的 GSH 结合位点 (G-site) 和由 C 端形成的亲电底物结合位点 (H-site)。

GST 在植物中参与除草剂解毒、激素生物合成、酪氨酸降解、过氧化物分解等过程, 且环境应激反应比较敏感^[2 2], 如除草剂和低温诱导 *AtGSTU26* 表达^[23], 病原体感染诱导 *AtGSTU16* 表达^[24]。研究发现, GST 可通过调解氧化还原信号参与植物根系的发育^[25-26]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大豆 *Glycine max* L. ‘华春 6 号’、本氏烟草 *Nicotiana* L. 以及野生型拟南芥 (Col-0) *Arabidopsis thaliana* L., 均由国家大豆改良中心广东分中心提供。所用菌株为大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5α、根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101。

1.2 生物信息学分析

使用 NCBI 大豆 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 Phytozome 数据库 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>), 查询基因序列、蛋白家族, 使用 MEGA11 软件对 *GmGST7* 进行 cDNA 和氨基酸序列比对, 完成进化树分析。

1.3 大豆试验样品处理

选取饱满无病害的 ‘华春 6 号’ 种子, 用营养土在人工气候培养间进行培育, 在其幼荚期取幼

荚、花、叶、茎和根样品, 用锡纸包裹, 迅速放置液氮中, -80 ℃ 保存。

挑选健康、同批收获的 ‘华春 6 号’ 种子, 放在吸水饱满的蛭石上萌发 3~4 d, 至芽生长至 2~3 cm 时, 从蛭石中取出, 用清水洗净根部, 固定在漂浮板上, 让根部完全浸泡在 pH 为 4.3 的 0.5 mmol/L 简单钙离子溶液中, 预培养 24 h; 在该培养液基础上, 梯度设置 AlCl₃ 浓度为 0、25、50、75 和 100 μmol/L, 培养 24 h。在 pH 为 4.3 的简单钙离子溶液且 AlCl₃ 浓度都为 50 μmol/L 的基础上, 设置 0、4、8、12、16、24、48、36 和 72 h 的时间梯度。选取预处理后根部长势一致的材料进行处理; 上述材料处理完后, 取大豆根部样品, 用锡纸包裹后迅速放入液氮中, -80 ℃ 保存。

使用 RNA 提取试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 分别提取各组织和处理根部 RNA, 统一浓度后完成反转录, 将反转录后的 cDNA 放于 -20 ℃ 保存, 作为 RT-qPCR 和载体的模板。

1.4 RT-qPCR 分析

以各处理 cDNA 为模板, 试剂使用 SYBR 荧光定量酶 (苏州近岸蛋白质科技股份有限公司), 仪器使用 CFX96 实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad), PCR 程序设置为 95 ℃ 3 min; 95 ℃ 10 s、58 ℃ 10 s、95 ℃ 30 s, 39 个循环; 95 ℃ 30 s。相关引物序列见表 1, 以 *β-actin* 为内参基因。目的基因的相对表达量用 2^{-ΔΔCt} 法计算。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence
pTF101-GmGST7-F	gagaacacgggggactctagaATGGCTGCTAATCAGGAAGATGTG
pTF101-GmGST7-R	cgatcggggaaattcgagctcTTTGAAGCAGAAAGACTTTCATGG
Super1300-GmGST7-F	acgggggactcttgaccatggCTATGGCTGCTAATCAGGAAGATGTG
Super1300-GmGST7-R	aagtctctctcctttactagfTTTGAAGCAGAAAGACTTTCATGG
GmGST7-F	GTCCTGATTCCCGGCTCAAT
GmGST7-R	AACTCACAAATGAGAGACCAGT
RT-GmGST7-F	TCAACCACCCTGTTGTCAAAC
RT-GmGST7-R	AAGACTTTCATGGCAGGCTTTGT

1.5 载体构建

以 ‘华春 6 号’ 根部的 cDNA 为模板, 用 *GmGST7* 的克隆引物 (GmGST7-F/R) 进行 PCR 扩增。50 μL PCR 反应体系为: 2×Phanta Max Buffer 25 μL、dNTP Mix 1 μL、正反向引物各 2 μL、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 μL、模板 cDNA 2 μL、ddH₂O 17 μL。PCR 反应程序为 95 ℃

预变性 3 min; 95 ℃ 变性 15 s、57 ℃ 退火 15 s、72 ℃ 延伸 40 s, 34 个循环; 72 ℃ 保温 5 min。

构建 *GmGST7* 过表达载体 GmGST7-pTF101。使用 *Xba* I 和 *Sac* I 对 pTF101 进行双酶切, 通过重组引物 (pTF101-GmGST7-F/R) 将 *GmGST7* 基因 cDNA 序列连入 pTF101, 测序无误后转化农杆菌 GV3101。

构建亚细胞定位载体 GmGST7-Super1300, 将 *GmGST7* 基因连接 Super1300 亚细胞定位载体, 使用 *Xba* I 和 *Spe* I 酶对 Super1300 进行双酶切, 通过重组引物 (Super1300-GmGST7-F/R) 将 *GmGST7* 基因 cDNA 连到载体, 测序无误后转化农杆菌 GV3101。引物序列见表 1。

1.6 亚细胞定位

将含有质粒 GmGST7-Super1300 的 GV3101 农杆菌和 Super1300 空载体的 GV3101 农杆菌扩播至 $D_{600\text{ nm}}=0.6$, 离心重悬。选择生长 4~5 周、健壮的烟草, 侵染前强白光照射 2~3 h, 使叶片气孔充分张开。从叶片下表皮注射菌液, 注射完成后密封保湿、暗处理 1 d, 正常培养 2 d 后, 使用激光共聚焦显微镜 (德国徕卡, 激光共聚焦 TCS-SP8 SR) 观察, 叶绿体荧光信号激发波长 640 nm, 检测波长 675 nm, 绿色荧光蛋白 GFP 激发波长 488 nm, 检测波长 510 nm。

1.7 拟南芥遗传转化

在营养土中种植野生型拟南芥。第 1 次抽苔时剪去主苔, 在侧苔快要开花时准备侵染, 如第 1 次侵染有结荚, 则去除。侵染每周 1 次, 共侵染 3 次。将载体 GmGST7-pTF101 转化 GV3101, 鉴定阳性菌后扩播至 $D_{600\text{ nm}}=0.6$, 离心后用重悬液重悬后准备侵染。将拟南芥花浸泡 1 min 左右, 密封保湿、暗培养 1 d 后, 正常培养。

1.8 拟南芥酸铝处理及表型鉴定

在营养土中种植侵染后收获的拟南芥种子, 2 片真叶完全长开后定期多次喷洒除草剂, 去除假阳性苗。待植株生长健壮后选取鲜嫩的叶片, 用 TPS 抽提液快提 DNA, 设计包含 35S 启动子区域的引物进行 DNA 分子水平鉴定。以此方法鉴定并加代至 T₃ 代。提取不同株系拟南芥 RNA, 通过荧光定量鉴定, 选择表达量高的株系大量繁种。

将拟南芥种子用 10%(φ) 次氯酸钠溶液浸泡震荡 10 min 消毒, 然后用无菌水清洗 5 遍。种植于 1/2 MS 培养基上, 将播种后的培养基放于 4℃ 冰箱春化 3 d, 然后转移至培养室竖直培养, 待根长至 1 cm 左右, 进行铝处理。

设置 0、50、100 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 浓度梯度的 1/2 MS 培养基, pH 调至 4.3。将长势一致的拟南芥转移至该培养基上, 保持根的伸长状态。竖直培养 1 周左右, 拍照记录, 测量根长, 计算根相对伸长。提取 RNA, 对拟南芥中酸铝胁迫响应的标志基因和 *GmGST7* 同源基因 *At2G29420* 的下游基因进行荧光定量分析。酸铝标志基因为铝激活苹果酸盐转

运体 *AtALMT* (*At1G08430*)^[27]; *AtMATE* (*At1G51340*)^[27] 参与铝离子外排; *AtALS3* (*At2G37330*)^[27] 编码 ABC 转运蛋白, 参与铝离子在体内的运转, 减少铝对根的伤害; *AtWAK1* (*At1G21250*)^[28] 是一种细胞质相关激酶, 参与细胞壁的修复。通过 Phytozome 搜索 *At2G29420* 基因下游基因, 得到 3 个谷氨酰胺水解酶基因 (*At1G78660*、*At1G78670*、*At1G78680*) 和 1 个氨基肽酶基因 (*At4G33090*)。引物见表 2。测定植株中 MDA 含量、 H_2O_2 含量、POD 活性 (参考科铭生物试剂盒说明书)。

表 2 荧光定量引物序列
Table 2 qPCR primer sequence

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence
<i>AtALMT</i>	F: TCCCATGGGTAAAGACAAAG R: ATAGTCTGCTTTCTGCCAA
<i>AtMATE</i>	F: CATTCTGAATCCATCGAGATT R: CGAATGTTGCACTCTGTTTT
<i>AtALS3</i>	F: AGCTTCGAGATGACATCAAA R: ACGGTTTTGCAGCTATCTAA
<i>AtWAK1</i>	F: TGGCCGCTGATATTACAAAT R: CAGATTGGCTACTGGTTAGT
<i>At1G78660</i>	F: CAGGTTTGAGTGTATCGGTG R: CATCTGATTCTTCTGCCCAA
<i>At1G78670</i>	F: TCCTCTGAGATGTGGAGATT R: TAGTTGAGGTTTGGATCAGC
<i>At1G78680</i>	F: AAAATGGTGGATTTTGCAGG R: ATAGGCTGACGTTCAAAGTT
<i>At4G33090</i>	F: TGGATCAGTTCAAAGGTGAG R: GACTATGTCGAGATCGATGG

2 结果与分析

2.1 GmGST7 蛋白保守结构域

GmGST7 基因在大豆第 7 号染色体上 (基因登录号码为 LOC547578), 该基因周围存在基因簇。*GmGST7* 基因含有 2 个外显子、1 个内含子; 基因组全长 1 128 bp, 转录本 986 bp, cDNA 全长 678 bp, 编码 226 个氨基酸。*GmGST7* 编码典型的 tau 类 GST 蛋白, 含有 2 个 GST 保守结构域, 分别为高度保守的 N 端和不保守的 C 端, 如图 1 所示。N 端三维结构的组成是 $\beta_1\alpha_1\beta_2(\alpha_2)\beta_3\beta_4\alpha_3$, C 端是一个完全 α -螺旋结构。

2.2 GST tau 类家族进化树构建

GST 家族中 tau 类在植物物种之间的差异较为明显。选择拟南芥和大豆中同源基因进行蛋白序列比对, 在 NCBI 中找到相似度最高的 17 个基因进行蛋白序列比对, N 端和 C 端序列相似度都较高, 总

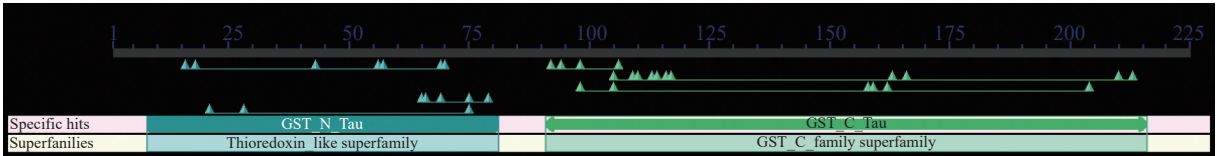


图 1 *GmGST7* 蛋白结构域
Fig. 1 Protein domain of *GmGST7*

体序列相似度为 80%~99%。在不同物种中, 只有 N 端相对保守, C 端差异较大, 总体序列相似度为 44%~52%, 如图 2A 所示。在构建进化树时, 大豆同源基因之间的遗传距离相对较近, 和拟南芥的同源基因间的遗传距离相对较远, 如图 2B 所示。

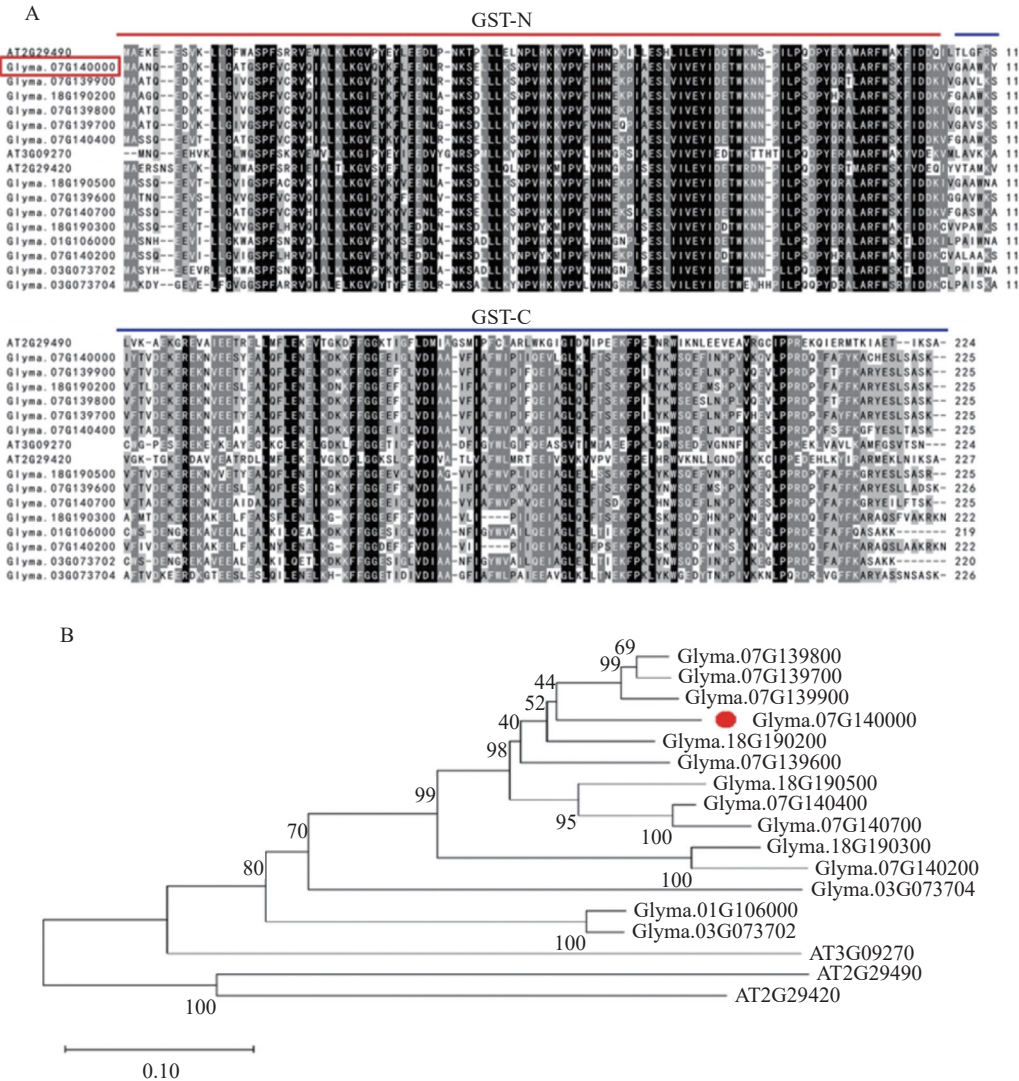
2.3 *GmGST7* 互作蛋白预测

通过 STRING 网站对 *GmGST7* 的互作蛋白进行预测, 发现有 5 个候选蛋白可能与 *GmGST7* (LOC547578) 互作 (图 3)。其中, LOC732557

(GLYMA07G16850) 和 DHAR1(GLYMA10G43730) 属于 GST 家族蛋白, 和 *GmGST7* 属于同一个家族。GLYMA03G40050 和 HGS(GLYMA19G42610) 属于 HGS(谷胱甘肽合成酶) 家族蛋白。

2.4 *GmGST7* 基因组织表达模式

为了检测 *GmGST7* 基因的组织表达模式, 采集 ‘华春 6 号’ 结荚初期的根、茎、叶、花、幼荚样品, 定量检测结果 (图 4) 表明, *GmGST7* 基因呈组成型表达模式, *GmGST7* 基因在叶、花和幼荚中的



红色横线代表 GST-N, 蓝色横线代表 GST-C, 红色点标注为目标基因 *GmGST7*
The red horizontal line represents GST-N, the blue horizontal line represents GST-C, and the red dot is labeled as the target gene *GmGST7*
图 2 *GmGST7* 蛋白序列对比 (A) 和进化树 (B) 分析
Fig. 2 Sequence comparison (A) and evolutionary tree (B) analysis of *GmGST7* protein

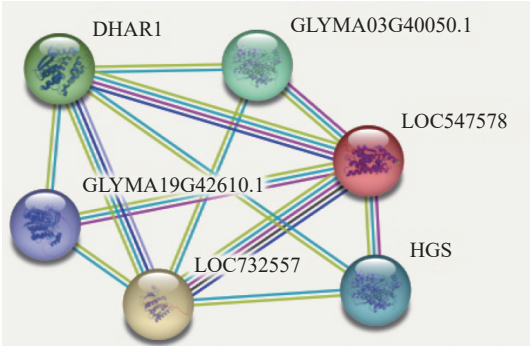
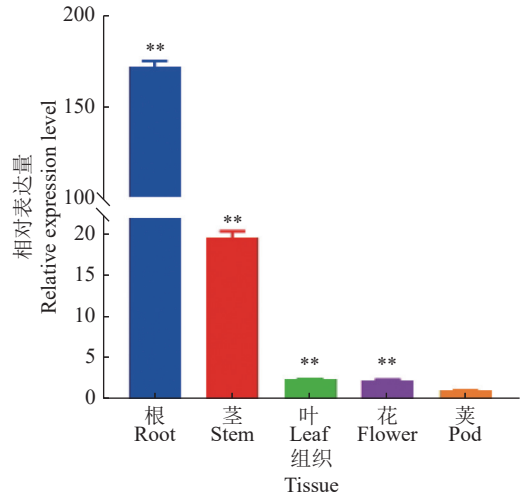


图 3 GmGST7 互作蛋白预测

Fig. 3 Interaction protein prediction of GmGST7

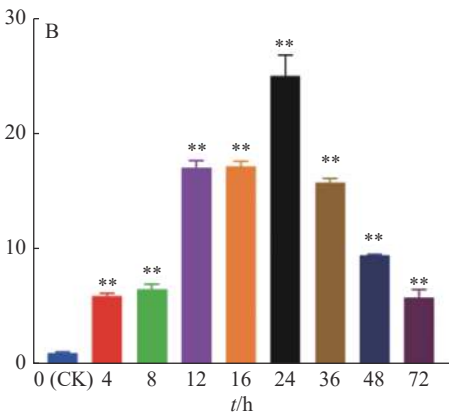
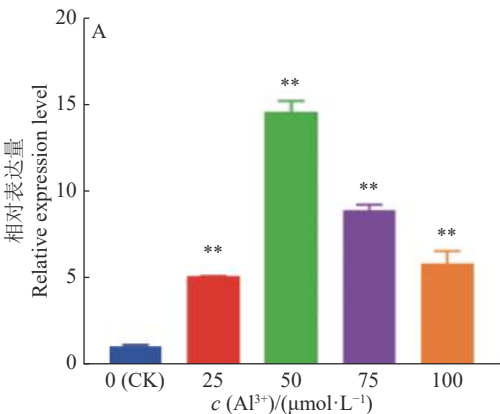


“**” 表示该组织与幼荚在 $P < 0.01$ 水平差异显著 (t 检验)
“***” indicates that the tissue differed from the young pod at $P < 0.01$ level (t test)

图 4 GmGST7 基因的组织表达模式分析

Fig. 4 Analysis of tissue expression pattern of the GmGST7 gene

表达量相对偏低, 在根中的表达量明显高于在其他组织中的; 以幼荚的表达量为对照, *GmGST7* 基因



各图中, “**” 表示处理与对照 (CK) 在 $P < 0.01$ 水平差异显著 (t 检验)
“***” indicates that the treatment differed from the control (CK) at $P < 0.01$ level in each figure (t test)

图 5 GmGST7 基因酸铝胁迫响应

Fig. 5 Response of the GmGST7 gene to acidic aluminum stress

在根中的表达量是幼荚中的 171.8 倍, 是茎中的 8.6 倍。

2.5 GmGST7 基因酸铝胁迫响应

为了进一步分析 *GmGST7* 在铝胁迫下的表达特征, 对 *GmGST7* 基因进行不同浓度梯度和时间梯度的表达分析。定量结果表明, 随 AlCl_3 浓度的增加, *GmGST7* 的相对表达量先升高后降低, 在 $50 \mu\text{mol/L}$ AlCl_3 溶液中的相对表达量最高, 是对照的 14.5 倍 (图 5A)。在时间梯度处理中, 随着处理时间的推移, *GmGST7* 基因表达量先升高后降低, 在处理 24 h 时表达量最高, 为对照的 24.9 倍 (图 5B)。

2.6 GmGST7 基因载体构建

以 ‘华春 6 号’ 转录组为模板, 设计特异引物, PCR 扩增包含 *GmGST7* 整个 cDNA 序列的产物。PCR 后通过琼脂糖凝胶电泳, 获得大小为 742 bp 的 DNA 片段 (图 6A), 符合引物设计产物长度。将 PCR 产物纯化后进行测序, 测序序列与 NCBI 数据库中目标基因的序列一致。

为验证亚细胞定位载体转化农杆菌 GV3101 是否成功, 选取培养皿上单菌落, 扩摇至浑浊后用载体上的鉴定引物进行 PCR 菌液鉴定, 琼脂糖凝胶电泳结果 (图 6B) 显示具有预期大小的目的条带, DNA 片段大小为 1 416 bp, 选择阳性克隆测序, 将测序序列与 *GmGST7* 基因 cDNA 序列进行比对, 全 cDNA 序列都存在, 且序列一致。

为验证过表达载体转化农杆菌 GV3101 是否成功, 选取培养皿上单菌落, 扩摇至浑浊后用载体上的鉴定引物进行 PCR 菌液鉴定, 琼脂糖凝胶电泳结果 (图 6C) 显示鉴定到预期大小的目的条带, 片段大小为 870 bp, 表明这些菌落为阳性克隆。随后, 挑选阳性克隆进行目的片段测序验证, 将测序序列

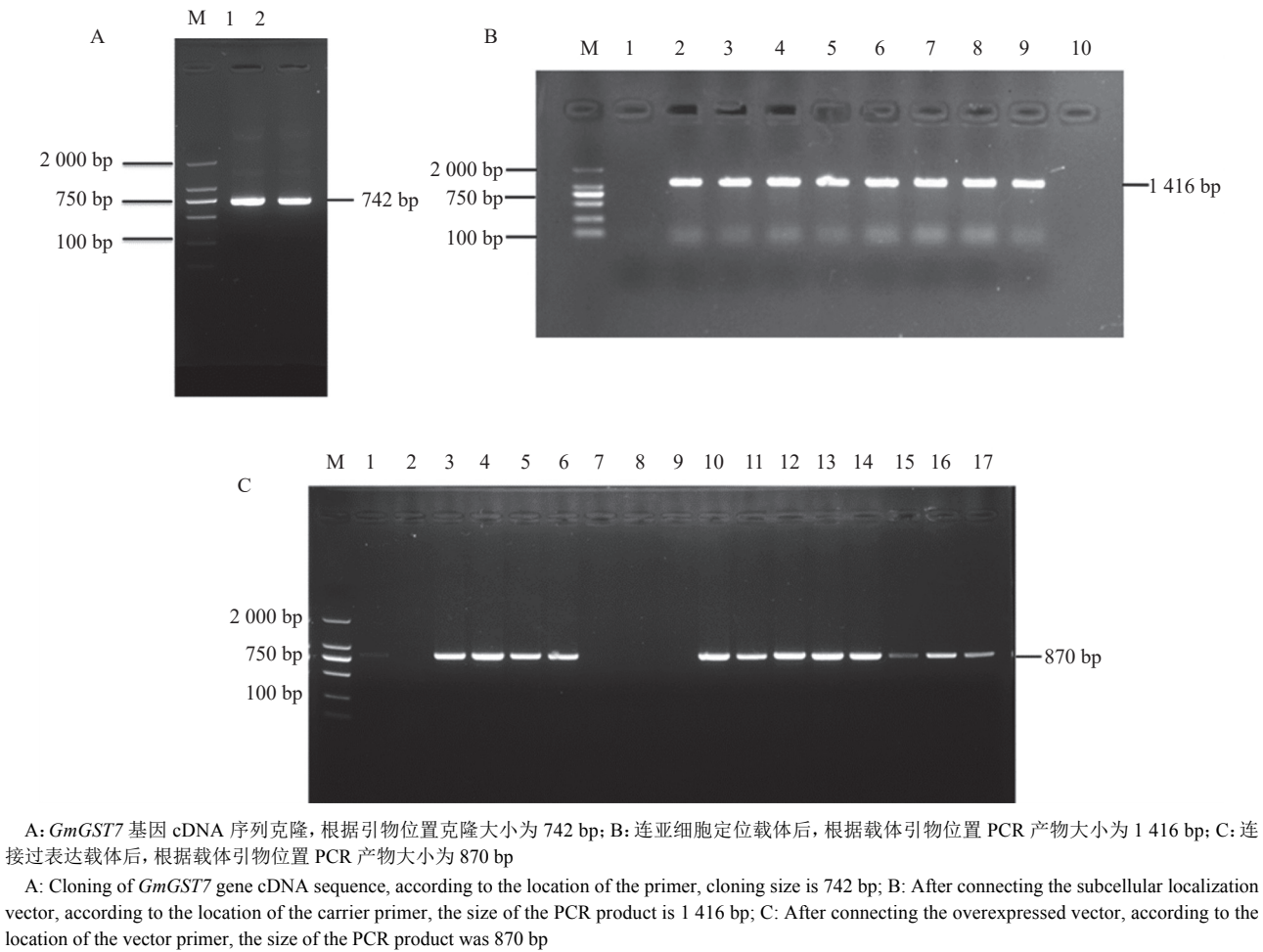


图 6 *GmGST7* 基因克隆及载体构建

Fig. 6 Cloning and vector construction of the *GmGST7* gene

与 *GmGST7* 基因 cDNA 序列进行比对, 全 cDNA 序列都存在, 且序列一致。

2.7 *GmGST7* 蛋白亚细胞定位

利用烟草研究 *GmGST7* 蛋白的细胞定位, 将 *GmGST7*-GFP 和 GFP 载体转化烟草, 荧光检测结

果 (图 7) 表明, 转化 GFP 载体的细胞只有细胞核和细胞膜有荧光; 在转化 *GmGST7*-GFP 载体的细胞中, 在细胞核和细胞质都存在荧光信号, 由于细胞中央大液泡的存在, 细胞质的荧光信号被挤压至细胞膜周围, 且不与叶绿体信号重叠。荧光检测结果

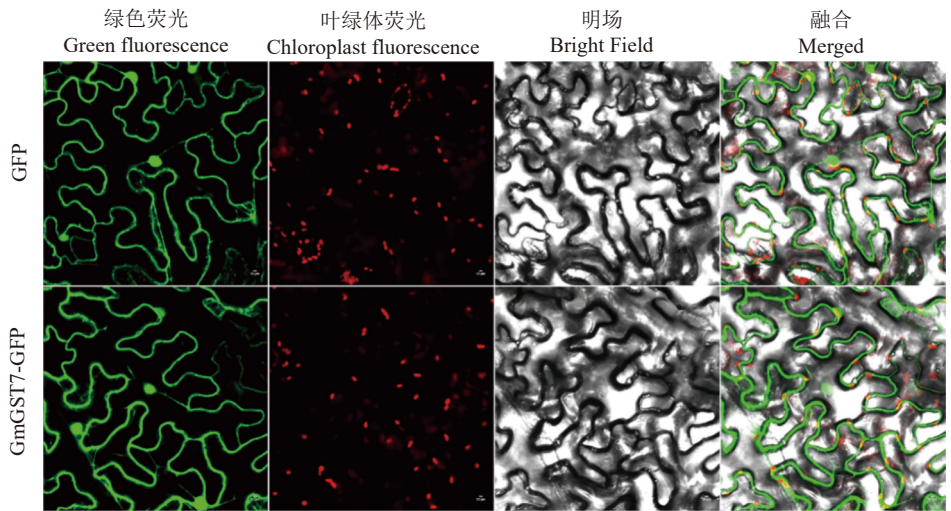


图 7 *GmGST7* 蛋白亚细胞定位分析

Fig. 7 Subcellular localization analysis of *GmGST7* protein

表明, *GmGST7* 基因的蛋白定位于细胞质和细胞核, 与网站 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 预测的结果一致。

2.8 拟南芥遗传转化鉴定

用除草剂喷施拟南芥, 非转基因植株枯萎, *GmGST7* 转基因阳性苗则正常生长 (图 8)。利用载体引物和 *GmGST7* 基因定量引物组成 2 对引物, 双向鉴定, PCR 产物经凝胶电泳检测后分别出现 204 和 753 bp 的目的条带 (图 9), 通过该方法检测转基因阳性苗直至 T₃ 代。在 T₃ 代进一步通过定量 PCR 检测转基因阳性株系, 获得表达量较高的 3 个株系 (L5、L13、L14)(图 10)。



阳性苗正常生长, 假阳性苗则枯萎

Positive seedlings grow normally, false positive seedlings wilt

图 8 *GmGST7* 转基因拟南芥阳性苗除草剂喷洒鉴定
Fig. 8 Herbicide spraying identification of *GmGST7* transgenic *Arabidopsis* positive seedlings

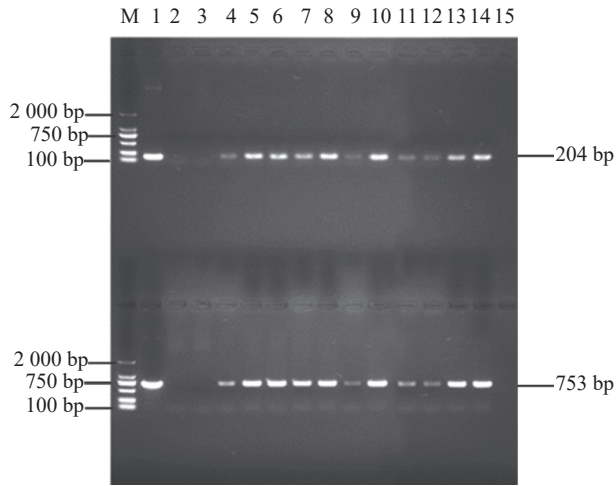
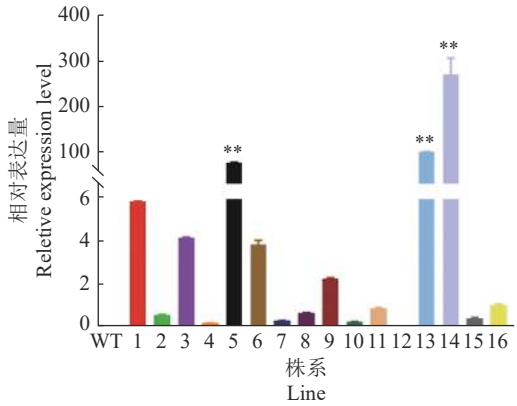


图 9 *GmGST7* 转基因拟南芥阳性苗 DNA 鉴定
Fig. 9 DNA identification of *GmGST7* transgenic *Arabidopsis* seedlings

2.9 拟南芥耐酸铝表型鉴定

以 WT 为对照, 选择 L5、L13、L14 3 个株系, 设置 3 个 AlCl₃ 浓度梯度进行耐酸铝表型鉴定。结果 (图 11) 表明, 随着 AlCl₃ 浓度的增加, 拟南芥根



“**” 表示株系与 WT 在 0.01 水平差异显著 (*t* 检验)

“***” indicates that the line differed from the WT at 0.01 level (*t* test)

图 10 转基因拟南芥 T₃ 代株系中 *GmGST7* 基因表达量
Fig. 10 Expression of *GmGST7* gene in T₃ transgenic *Arabidopsis thaliana*

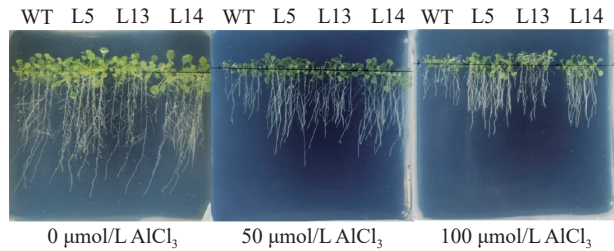


图 11 过表达 *GmGST7* 拟南芥耐酸铝表型

Fig. 11 Overexpressed *GmGST7* *Arabidopsis* aluminium-resistant phenotype

系伸长受到抑制, 野生型受到的抑制更加明显。在 50 μmol/L AlCl₃ 浓度下, *GmGST7* 转基因株系的相对根伸长高于 60%, 在 100 μmol/L AlCl₃ 浓度下, 相对根伸长均高于 50%, 均与野生型差异极显著。

在 1/2 MS 培养基上, H₂O₂、MDA 含量和 POD 活性在野生型和转基因拟南芥中无显著差异。在酸铝培养基上, H₂O₂ 和 MDA 含量在野生型和转基因拟南芥中均显著升高, 其中, 野生型 H₂O₂ 含量增加幅度明显大于转基因株系, 为对照处理的 1.69 倍; 转基因株系 L5、L13、L14 H₂O₂ 含量分别为对照处理的 1.29、1.38、1.23 倍。野生型 MDA 含量比对照处理增加了 1.80 倍, 转基因株系比对照处理分别增加了 1.30、1.23、1.21 倍。在酸铝培养基上, 野生型 POD 活性比对照处理增加了 1.10 倍, 3 个转基因株系比对照处理分别增加了 1.22、1.19、1.37 倍。因此, 在过表达 *GmGST7* 后, 转基因拟南芥体内的氧化损伤要弱于野生型, 增强了对酸铝胁迫的耐受能力。

2.10 拟南芥耐酸铝分子调控分析

利用酸铝胁迫响应的标志基因分析 *GmGST7* 转基因拟南芥耐酸铝的调控机制。在过表达

GmGST7 拟南芥中, 酸铝条件下 *AtALMT*、*AtMATE*、*AtALS3* 表达量都有提高, 分别为对照的 1.36、1.33、1.34 倍, *AtWAK1* 表达量提高最多, 是对照的 2.5 倍。因此, 推测 *GmGST7* 可能通过清除植株内有毒物质、降低植物体内的氧化水平、促进各耐酸铝基因的表, 进而加强植株在逆境下的耐受能力。

2.11 GST 下游基因的表达分析

使用 NCBI 数据库, 对 *GmGST7* 进行蛋白比对, 在拟南芥中得到序列相似度最高的基因 *At2G29420*。通过 Phytozome 数据库搜索 *At2G29420*, 得到该基因下游主要有 2 个家族, 分别是谷氨酰胺水解酶 (*At1G78660*、*At1G78670*、*At1G78680*) 和氨基肽酶 (*At4G33090*), 这 2 个蛋白在 GST 催化谷胱甘肽和毒性物质结合后, 参与下一步的分解工作。荧光定量分析结果表明, 这 4 个基因受酸铝胁迫诱导上调, 并受 *GmGST7* 激活表达。在酸铝胁迫下, *At1G78660*、*At1G78670*、*At1G78680*、*At4G33090* 在转基因株系中的表达量为野生型的 1.71、1.45、1.44、1.26 倍。

3 讨论与结论

GST 是一个多功能的家族, 是由硫氧化还原蛋白进化而来, 目前已知的功能包括解毒、代谢、运输、隔离内源或者外源有毒成分等^[29-30]; 对许多非生物胁迫产生应激反应, 包括盐碱胁迫、低温高温胁迫、干旱胁迫^[31-34], 也对许多生物胁迫产生应激反应, 如病原体攻击、重金属胁迫、过氧化物胁迫、紫外辐射等^[35-38]; 参与催化或修饰各种酶促反应和小分子物质, 包括谷胱甘肽 (GSH) 偶联、过氧化物酶、巯基转移酶、谷胱甘肽酰化和脱氢抗坏血酸还原酶等^[39-42]。

GST tau 类蛋白有 2 个结合域, N 端序列高度保守, 负责 GSH 的识别和结合。C 端序列不保守, 负责各种有毒物质或者植物体内一些信号的识别和结合^[43-44]; C 端在同物种间高度保守, 不同物种间的氨基酸序列差异明显, 当面对胁迫环境时, C 端会发生有利或有害突变, 发生有利突变后, 会增加其在基因组序列的高度重复, 进而解释 tau 类 GST 在植物中的成簇出现和不同物种之间的差异^[45-47]。在构建进化树时, 大豆和拟南芥有许多相似的同源基因, 由于 C 端序列差异较大, 拟南芥和大豆遗传距离相隔较远, 而在大豆中的同源基因遗传距离较近。

GmGST7 基因翻译典型的 GST 家族 tau 类蛋白, 有 2 个外显子分别是 N 端和 C 端。通过对 *GmGST7*

蛋白的氨基酸序列进行分析, 发现 N 端含有 Ser 羟基, 为 GSH 巯基的氢键供体, 对 GSH 的催化激活起重要作用。C 端能促进高活性硫酸阴离子的形成和稳定, 为亲电底物亲核攻击提供目标, 这些亲电底物是植物在逆境胁迫中产生的过氧化物、活性氧等一些有毒物质。所以 *GmGST7* 蛋白拥有 GST 家族 tau 类蛋白的典型功能, 即能够促进氧化物与 GSH 的结合, 进而降低植物的氧化水平, 这与过表达拟南芥的表型一致。在 50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 处理下, *GmGST7* 转基因株系比野生型的相对根伸长要高出 50%。植株的氧化水平的测量结果也得出相同的结论, 转基因株系的氧化水平要显著低于野生型, 表现在 H_2O_2 和 MDA 含量增幅低于野生型, POD 活性增幅低于野生型。当 *GmGST7* 基因过表达遗传转化拟南芥后, 植株表现出酸铝胁迫, 植株整体抗逆能力提高, 相关下游基因表达量提高, 氧化水平降低, 进而减轻酸铝胁迫对植物生理功能的抑制。

许多研究都发现 GST 家族基因响应逆境胁迫, 并有相关研究显示通过遗传转化的手段能提高植物对逆境的耐受能力。如通过遗传转化野生大豆中 *GsGST14* 提高栽培大豆的盐碱胁迫能力; 向日葵中 *HaGSTU1* 对核盘菌的侵染响应^[48]; 在大豆中过表达 *GmGST12* 降低雄性不育大豆小孢子中的活性氧, 提高其存活率^[49]; 玉米中 *ZmGST23* 对干旱、高温、低温盐碱胁迫的响应^[50]; *ZmGST31* 在玉米中对除草剂的解毒作用^[51]。

研究表明, GST 家族基因在植物抵抗逆境胁迫时发挥了重要作用, 大量关于 GST 家族基因对作物品种改良的研究都取得了成功, 因此, 对 *GmGST7* 的深入研究将有助于解析大豆对酸铝胁迫的响应机制, 为大豆抗逆分子育种提供理论依据和基因资源。

综上所述, *GmGST7* 基因位于大豆第 7 号染色体上, 该基因含有 2 个外显子和 1 个内含子, 2 个外显子分别编码 GST 高度保守的 N 端和不保守的 C 端。*GmGST7* 蛋白定位于细胞质和细胞核中; *GmGST7* 基因受酸铝胁迫诱导表达上调且具有时空表达模式; *GmGST7* 基因呈现组成型表达模式, 在根中富集表达; *GmGST7* 基因过表达拟南芥后, 可降低酸铝胁迫后的氧化水平, 酸铝胁迫响应相关基因表达增强, 根伸长的抑制得到缓解, 拟南芥对酸铝胁迫的耐受能力显著提高。

参考文献:

[1] VON UEXKÜLL H R, MUTERT E. Global extent, de-

- velopment and economic impact of acid soils[J]. *Plant and Soil*, 1995, 171(1): 1-15.
- [2] KINRAIDE T B, PARKER D R. Cation amelioration of aluminum toxicity in wheat[J]. *Plant Physiology*, 1987, 83(3): 546-551.
 - [3] KINRAIDE T B. Assessing the rhizotoxicity of the aluminum ion, $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ [J]. *Plant Physiology*, 1990, 93(4): 1620-1625.
 - [4] DELHAIZE E, RYAN P R, RANDALL P J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) II: Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices[J]. *Plant Physiology*, 1993, 103(3): 695-702.
 - [5] SIVAGURU M, BALUSKA F, VOLKMANN D, et al. Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. short-term effects on the distal part of the transition zone[J]. *Plant Physiology*, 1999, 119(3): 1073-1082.
 - [6] KOLLMEIER M, FELLE H H, HORST W J. Genotypic differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum?[J]. *Plant Physiology*, 2000, 122(3): 945-956.
 - [7] VAZQUEZ M D, POSCHENRIEDER C, et al. Change in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety[J]. *Plant Physiology*, 1999, 119(2): 435-444.
 - [8] SILVA I R, SMYTH T J, MOXLEY D F, et al. Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy[J]. *Plant Physiology*, 2000, 123(2): 543-552.
 - [9] TAYLOR G J, MCDONALD-STEPHENS J L, HUNTER D B, et al. Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*[J]. *Plant Physiology*, 2000, 123(3): 987-996.
 - [10] FRANTZIOS G, GALATIS B, APOSTOLAKOS P. Aluminium causes variable responses in actin filament cytoskeleton of the root tip cells of *Triticum turgidum*[J]. *Protoplasma*, 2005, 225(3/4): 129-140.
 - [11] ČIAMPOROVÁ M. Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue, and cellular levels[J]. *Biologia Plantarum*, 2002, 45(2): 161-171.
 - [12] JONES D L, KOCHIAN L V. Aluminum inhibition of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate signal transduction pathway in wheat roots: A role in aluminum toxicity?[J]. *The Plant Cell*, 1995: 1913-1922.
 - [13] BARCELÓ J, POSCHENRIEDER C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: A review[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2002, 48(1): 75-92.
 - [14] KOCHIAN L V, PIÑEROS M A, HOEKENGA O A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity[J]. *Plant and Soil*, 2005, 274(1/2): 175-195.
 - [15] WANG H J. *GsMYB7* encoding a R2R3-type MYB transcription factor enhances the tolerance to aluminum stress in soybean (*Glycine max* L.) [J]. *BMC Genomics*, 2022, 23(1): 529. doi: 10.1186/s12864-022-08744-w.
 - [16] SHEEHAN D, MEADE G, FOLEY V M, et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: Implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily[J]. *The Biochemical Journal*, 2001, 360(Pt1): 1-16.
 - [17] SAADAT M, MOHABATKAR H. Polymorphisms of glutathione S-transferases M1 and T1 do not account for inter individual differences for smoking behavior[J]. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2004, 77(4): 793-795.
 - [18] SASAN M, BABAK S, HASSAN M. A new member of tau-class glutathione S-transferase from barley leaves[J]. *Excli Journal*, 2009, 8: 190-194.
 - [19] DROOG F, HOOYKAAS P, VAN DER ZAAL B J. 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and related chlorinated compounds inhibit two auxin-regulated type-III tobacco glutathione S-transferases[J]. *Plant Physiology*, 1995, 107(4): 1139-1146.
 - [20] ÖZTETİK E. A tale of plant glutathione S-transferases: Since 1970[J]. *The Botanical Review*, 2008, 74(3): 419-437.
 - [21] LIGHT G G, MAHAN J R, ROXAS V P, et al. Transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedlings expressing a tobacco glutathione S-transferase fail to provide improved stress tolerance[J]. *Planta*, 2005, 222(2): 346-354.
 - [22] DIXON D P, CUMMINS I, COLE D J, et al. Glutathione-mediated detoxification systems in plants[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 1998, 1(3): 258-266.
 - [23] NUTRICATI E, MICELI A, BLANDO F, et al. Characterization of two *Arabidopsis thaliana* glutathione S-transferases[J]. *Plant Cell Reports*, 2006, 25(9): 997-1005.
 - [24] PANTELIDES I S, TJAMOS S E, PAPLOMATAS E J. Ethylene perception via ETR1 is required in *Arabidopsis* infection by *Verticillium dahliae*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2010, 11(2): 191-202.
 - [25] BELA K, HORVÁTH E, GALLÉ Á, et al. Plant glutathione peroxidases: Emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2015, 176: 192-201.
 - [26] BIELACH A, HRTYAN M, TOGNETTI V. Plants under stress: Involvement of auxin and cytokinin[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(7): 1427. doi: 10.3390/ijms18071427.
 - [27] LIU J P, LUO X Y, SHAFF J, et al. A promoter-swap strategy between the AtALMT and AtMATE genes increased *Arabidopsis* aluminum resistance and improved

- carbon-use efficiency for aluminum resistance[J]. *The Plant Journal*, 2012, 71(2): 327-337.
- [28] MANGEON A, PARDAL R, MENEZES-SALGUEIRO A D, et al. AtGRP3 is implicated in root size and aluminum response pathways in *Arabidopsis*[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0150583. doi: 10.1371/journal.pone.0150583.
- [29] MINERVA B. Five decades with glutathione and the GSTome[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(9): 6072-6083.
- [30] LABROU N E, PAPAGEORGIOU A C, PAVLI O, et al. Plant GSTome: Structure and functional role in xenome network and plant stress response[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 32: 186-194.
- [31] JHA B, SHARMA A, MISHRA A. Expression of SbGSTU (tau class glutathione *S*-transferase) gene isolated from *Salicornia brachiata* in tobacco for salt tolerance[J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(7): 4823-4832.
- [32] TIWARI V, PATEL M K, CHATURVEDI A K, et al. Functional characterization of the tau class glutathione-*S*-transferases gene (SbGSTU) promoter of *Salicornia brachiata* under salinity and osmotic stress[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0148494. doi: 10.1371/journal.pone.0148494.
- [33] XU J, ZHENG A Q, XING X J, et al. Transgenic *Arabidopsis* plants expressing grape glutathione *S*-transferase gene (*VvGSTF13*) show enhanced tolerance to abiotic stress[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2018, 83(6): 755-765.
- [34] SRIVASTAVA D, VERMA G, CHAUHAN A S, et al. Rice (*Oryza sativa* L.) tau class glutathione *S*-transferase (*OsGSTU30*) overexpression in *Arabidopsis thaliana* modulates a regulatory network leading to heavy metal and drought stress tolerance[J]. *Metallomics*, 2019, 11(2): 375-389.
- [35] KAMPRANIS S C, DAMIANOVA R, ATALLAH M, et al. A novel plant glutathione *S*-transferase/peroxidase suppresses bax lethality in yeast[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(38): 29207-29216.
- [36] LOYALL L, UCHIDA K, BRAUN S, et al. Glutathione and a UV light-induced glutathione *S*-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures[J]. *The Plant Cell*, 2000, 12(10): 1939-1950.
- [37] MUELLER L A, GOODMAN C D, SILADY R A, et al. AN9, a petunia glutathione *S*-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein[J]. *Plant Physiology*, 2000, 123(4): 1561-1570.
- [38] WEISERBS K F, JACOBSON J S, BEGG M D, et al. A cross-sectional study of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and polymorphism of glutathione *S*-transferases among heavy smokers by race/ethnicity[J]. *Biomarkers*, 2003, 8(2): 142-155.
- [39] GARCERÁ A, BARRETO L, PIEDRAFITA L, et al. *Saccharomyces cerevisiae* cells have three *Omega* class glutathione *S*-transferases acting as 1-cys thiol transferases[J]. *The Biochemical Journal*, 2006, 398(2): 187-196.
- [40] FEDERICI L, MASULLI M, GIANNI S, et al. A conserved hydrogen-bond network stabilizes the structure of Beta class glutathione *S*-transferases[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 382(3): 525-529.
- [41] LALLEMENT P A, RORET T, TSAN P, et al. Insights into ascorbate regeneration in plants: Investigating the redox and structural properties of dehydroascorbate reductases from *Populus trichocarpa*[J]. *Biochemical Journal*, 2016, 473(6): 717-731.
- [42] GONZALEZ D, FRAICHARD S, GRASSEIN P, et al. Characterization of a *Drosophila* glutathione transferase involved in isothiocyanate detoxification[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 95: 33-43.
- [43] TAJC S G, TOLBERT B S, BASAVAPPA R, et al. Direct determination of thiol pK_a by isothermal titration microcalorimetry[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(34): 10508-10509.
- [44] ATKINSON H J, BABBITT P C. Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold[J]. *Biochemistry*, 2009, 48(46): 11108-11116.
- [45] OHNO S. Patterns in genome evolution[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 1993, 3(6): 911-914.
- [46] FORCE A, LYNCH M, PICKETT F B, et al. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations[J]. *Genetics*, 1999, 151(4): 1531-1545.
- [47] TANAKA K M, TAKAHASI K R, TAKANO-SHIMIZU T. Enhanced fixation and preservation of a newly arisen duplicate gene by masking deleterious loss-of-function mutations[J]. *Genetics Research*, 2009, 91(4): 267-280.
- [48] 马立功, 孟庆林, 张匀华, 等. 向日葵谷胱甘肽-*S*-转移酶基因的克隆及抗病功能研究[J]. *中国油料作物学报*, 2015, 37(5): 635-643.
- [49] 韩少怀, 李佳佳, 张璟曜, 等. 大豆 *GmGST12* 基因的克隆及表达分析[J]. *大豆科学*, 2015, 34(5): 782-788.
- [50] 李永生, 方永丰, 李玥, 等. 玉米逆境响应基因 *ZmGST23* 克隆和表达分析[J]. *农业生物技术学报*, 2016, 24(5): 667-677.
- [51] 孙兰兰, 麻荣慧, 薛飞, 等. 玉米 *GST31* 基因的克隆与表达分析[J]. *作物学报*, 2023, 49(10): 2717-2726.

【责任编辑 霍 欢, 李庆玲】