

谷氧还蛋白(AbGrx-1)对水稻干尖线虫在氧化胁迫下的保护作用

冯辉² 范亚磊² 张金凤² 朱红利¹ 魏利辉^{1,2,*}

(¹南京农业大学 植物保护学院, 南京 210095; ²江苏省农业科学院 植物保护研究所, 南京 210014; *通讯联系人, E-mail: weilihui@jaas.ac.cn)

Protective Effect of Glutaredoxin (AbGrx-1) on *Aphelenchoides besseyi* Under Oxidative Stress

FENG Hui², FAN Yalei², ZHANG Jinfeng², ZHU Hongli¹, WEI Lihui^{1,2,*}

(¹College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ²Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; *Corresponding author, E-mail: weilihui@jaas.ac.cn)

Abstract: 【Objective】 The antioxidant glutaredoxin (Grx) plays a crucial role in regulating intracellular redox homeostasis via scavenging of excess reactive oxygen species. The white-tip nematode *Aphelenchoides besseyi* can survive in adverse environments including high temperature, osmosis and oxidative stresses. To reveal the antioxidant function of Grx in *A. besseyi*, **【Method】** herein the full-length cDNA of glutaredoxin (named AbGrx-1) from *A. besseyi* was cloned by using rapid amplification of cDNA ends (RACE), and AbGrx-1 protein and evolutionary relationship were characterized; differential gene expression level was detected in the nematodes under oxidant and temperature stresses by using quantitative real-time PCR; the effect of the recombinant AbGrx-1 protein on *A. besseyi* survival was also tested.

【Result】 The full-length *AbGrx-1* cDNA contains a 5' UTR of 90, an ORF of 321 bp encoding a polypeptide of 106 amino acids and a 3' UTR of 97 bp. The deduced amino acid sequence of AbGrx-1 shares a high similarity with other nematodes' Grxs, and the catalytic residue (CPYC) and glutathione binding sites (RSVP and GGDD) indicate that AbGrx-1 is categorized into Class I Grx. The phylogenetic tree showed AbGrx-1 is located in the same clade with the plant parasitic nematode *Aphelenchus avenae*. AbGrx-1 mRNA is highly induced in *A. besseyi* exposed to H₂O₂ solution and 12°C, but is suppressed in the nematodes at 0, 4, 37 and 45°C. The high concentration H₂O₂ solutions and high temperature are adverse to survival of *A. besseyi*, but the survival rate increases with the nematodes pre-soaked in AbGrx-1 recombinant protein solution. **【Conclusion】** AbGrx-1 is required for *A. besseyi* antioxidative immunity, and plays an essential role in overcoming oxidative damage and nematode survival.

Key words: *Aphelenchoides besseyi*; glutaredoxin; gene cloning; recombinant protein; antioxidation

摘要: 【目的】谷氧还蛋白(glutaredoxin, Grx)作为一种抗氧化酶,在通过清除多余活性氧来维持生物细胞氧化还原平衡、降低细胞膜损伤过程中发挥重要作用。水稻干尖线虫(*Aphelenchoides besseyi*)能在高温、渗透及氧化胁迫等多种逆境压力中存活。本研究旨在探究 Grx 在水稻干尖线虫抗氧化胁迫中的作用。**【方法】**通过 cDNA 末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE),获得了一个水稻干尖线虫谷氧还蛋白基因 *AbGrx-1*,进行了序列比对和遗传进化分析;通过 qRT-PCR 检测了 *AbGrx-1* 在线虫响应氧化和温度胁迫中的表达差异,通过原核表达获得了 AbGrx-1 的重组蛋白,并分析了 AbGrx-1 蛋白浸泡对水稻干尖线虫在氧化和高温胁迫下存活的影响。

【结果】*AbGrx-1* 基因全长包括 90 bp 的 5' 非翻译区(UTR)、321 bp 的编码区和 97 bp 的 3' UTR,开发阅读框(横跨 91 至 411 位)编码 106 个氨基酸。AbGrx-1 蛋白的第 24 至 27 位点具有谷氧还蛋白催化残基(CPYC),分别在第 69 至第 72 和第 83 至第 86 位点存在保守的谷胱甘肽结合位点 RSVP 和 GGDD,归为 I 类谷氧还蛋白。遗传进化树显示 AbGrx-1 与燕麦真滑刃线虫(*Aphelenchus avenae*)Grx 亲缘关系最近,位于同一进化分支。*AbGrx-1* 在 H₂O₂ 处理和 12°C 下时显著上调表达,但在 0°C、4°C、37°C 和 45°C 极端温度中下调表达。高浓度 H₂O₂ 和高温导致水稻干尖线虫死亡率增加,AbGrx-1 重组蛋白能显著提高暴露于高浓度 H₂O₂ 中线虫的存活率,但不影响高温下线虫的存活率。**【结论】**AbGrx-1 参与调控水稻干尖线虫的抗氧化免疫反应,在抵抗氧化损伤、维持线虫生存方面具有重要功能。

关键词: 水稻干尖线虫; 谷氧还蛋白; 基因克隆; 重组蛋白; 抗氧化

中图分类号: S435.111.4⁺8

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2019)06-0565-10

收稿日期: 2019-01-28; 修改稿收到日期: 2019-05-07。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31401728); 江苏省农业自主创新资金资助项目[cx(17)3023]。

活性氧(ROS)是生物体在呼吸、代谢时因氧分子的不完全还原而产生的,在需氧生物发育过程中十分重要。除此之外,生物体还会受到外界氧化胁迫压力导致细胞内 ROS 水平升高。ROS 的过度积累会损伤生物大分子 DNA、蛋白质和脂类^[1]。为了避免氧化损伤,生物体利用酶和非酶抗氧化系统调节自身氧化平衡。谷氧还蛋白(Grx)是维持胞间氧化平衡的关键酶,利用谷胱甘肽的还原能力维持和调控细胞氧化还原状态和氧化还原信号途径,在胞内 ROS 清除、蛋白和脂类氧化损伤修复等抗氧化过程中发挥重要功能^[2,3]。

Grx 是热稳定和小分子量(10~16 kD)蛋白,具有 3 个活性结构域,即二硫键活性中心、GSH 结合位点和一个疏水性表面区域。Grx 活性中心的氨基酸序列为-Cys-Pro-Tyr-Cys-,其中,半胱氨酸(Cys)为催化基团。根据序列特点,Grx 可分为六类(I-VI),其中,二硫基(I类)和单硫基(I或II类)在所有生物中均存在,III类在高等植物中存在,IV类在光合作用的真核生物中存在,V类存在于蓝藻细菌和变形菌中,VI类存在于蓝藻细菌中^[1]。

目前仅有少数几个种类线虫的 Grx 基因被克隆和研究,这些 Grx 在维持线虫细胞活性氧稳态、降低细胞膜损伤发挥重要作用。模式生物秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)谷氧还蛋白 GLRX-21 能阻止硒诱导的氧化胁迫对线虫的损害^[4]。动物寄生线虫克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)谷氧还蛋白 TcGrx 参与二硫谷胱甘肽还原反应以及靶标蛋白的去谷胱甘肽化^[5]。草莓芽线虫(*Aphelenchoides fragariae*)的谷氧还蛋白 AF-GLX-1 受脱水干燥和渗透压胁迫诱导表达,并参与调控线虫在逆境下越冬和存活^[6]。

水稻干尖线虫(*Aphelenchoides besseyi*)是水稻上的迁移性寄生线虫,在进入水稻颖花后迅速繁殖,在 25℃最适温度下 10 d 就可繁殖一代,并伴随着水稻的成熟逐渐进入低湿休眠状态^[7]。基于这种特性,水稻干尖线虫具有忍受脱水干燥的能力,在干燥种子中能进入休眠状态,两三年内仍保持很强的活力。水稻干尖线虫还有抵抗温度逆境的能力。Tenent 等^[8]发现水稻干尖线虫在贮存于-18℃的稻种中可存活 30 个月;同时,由于水稻干尖线虫侵染水稻地上组织,在水稻生长季节的大田环境中,常常暴露于高温环境中,因此水稻干尖线虫也具有极强的耐高温能力。此外,之前的一些研究利用氧化剂(H₂O₂)对水稻干尖线虫进行表面消毒而不影响线虫的运动和侵染,暗示水稻干尖线虫具有强

大的抵抗氧化胁迫能力。目前参与水稻干尖线虫的抗逆反应多个基因被克隆,包括钙网膜蛋白^[9]、热激蛋白 HSP90^[10]、海藻糖酶^[11]和胚胎发育晚期丰富蛋白基因等^[12]。这些基因在水稻干尖线虫应对温度胁迫、渗透胁迫、氧化胁迫以及取食等过程中发挥作用,但有关 Grx 的功能仍未见报道。

本研究克隆了一个水稻干尖线虫抗谷氧还蛋白基因 *AbGrx-1*,并对其在线虫响应氧化和温度胁迫过程中的表达情况进行了监测,同时对 *AbGrx-1* 进行了原核表达,分析了 *AbGrx-1* 重组蛋白对氧化胁迫和高温胁迫下线虫存活的影响,以期阐明水稻干尖线虫的逆境适应机理,为防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 线虫准备

线虫最初分离自水稻病穗,后在长满灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)的平板上培养扩繁。将在平板上培养 20 d 左右的线虫用无菌水洗涤下来,用 35% 蔗糖溶液进行收集纯化,并用消毒液(含 100 μg/mL 两性霉素 B、100 μg/mL 硫酸链霉素和 100 μg/mL 氨苄青霉素)洗涤虫体 3 次,最后用 ddH₂O 洗涤保存备用。

1.2 RNA 提取和 cDNA 合成

收集 50 μL 活性良好的线虫在液氮中速冻 30s,然后用一次性研磨棒迅速研磨成匀浆,采用 TRIzol 试剂(Invitrogen,美国)进行 RNA 提取。RNA 质量和产量通过 1.2%琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 2000 分光光度计(OD_{260/280})进行评估。

cDNA 合成按照反转录试剂盒(HiscriptII 1st Strand cDNA Synthesis Kit, 南京)说明书进行:将含有 1 μL RNA(1 μg/μL),1 μL Oligo dT₂₃ 引物(10 μmol/L)和 6 μL ddH₂O 的无核酸酶的 PCR 管,于 65℃下孵育 5 min,立即冰上放置 2 min,然后向 PCR 管中加入 10 μL 2×RT Mix 和 2 μL 反转录酶(HiscriptII Enzyme),混匀后 50℃下孵育 45 min,最后在 85℃下孵育 5 min。

1.3 基因克隆

根据 NCBI 数据库中登录的多种线虫保守序列信息,应用 CODEHOP 程序(<http://blocks.fhcr.org/codehop.html>)设计简并引物 degGrx-F/R,并进行 PCR 扩增^[13]。根据获得的部分序列信息应用 Primer 3 软件(<http://primer3.ut.ee/>)设计特异引物。

3' 和 5' 端序列根据 cDNA 末端快速扩增试剂盒(SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit, Clontech, 美国)进行扩增。对于 3' 端,25 μL 反应

表 1 本研究引物列表

Table 1. Primers used in this study.

引物名	序列
Primer name	Sequences (5'→3')
degGrx-F	TGTCCYACTGCRASAARGCSAAG
degGrx-R	GTGTCGTCGTCGTCRCCTCCRCCKAWGAA
AbGrx-F1	ATCCTTCAATCTAAAGCCCGGAG
AbGrx-R1	TGGCACCAACGTCTTTCAACT
AbGrx-R2	TATCATCACCTCCTCCTAAGAA
AbGrx-fullF	GGGAAAGTAAACACCGAAATCG
AbGrx-fullR	TCCCAACACTGATTATTTGCC
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT (long); CTAATACGACTCACTATAGGGC (short)
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
Ab-18S-F	TGCGGTAATTCTGGAGCAA
Ab-18S-R	CCCGTTAGAACCATGGCAGT
AbGrx-28aF	CATG <u>CATATG</u> TCCGTCAAGAGTTTTGTGCGA
AbGrx-28aR	CATG <u>CTCGAG</u> TTAGATGGCACCAACGTCTTTCAA

下划线为限制性内切酶 *Nde* I/*Xho* I 的酶切位点。

The underlined refer to the digestion site by *Nde* I/*Xho* I.

体系如下：2.5 μ L 10 \times PCR 缓冲液，2 μ L MgCl₂ (25 mmol/L)，2 μ L dNTP (10 mmol/L)，引物 AbGrx-F1 和 UPM (10 μ mol/L)各 2 μ L，0.25 μ g cDNA 模板和 1 个单位的 *ExTaq* 聚合酶(TaKaRa,大连)。PCR 条件如下：95 $^{\circ}$ C 下预变性 5 min；95 $^{\circ}$ C 下变性 30 s，62 $^{\circ}$ C 下退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 下延伸 2.5 min，38 个循环；最后 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10 min。5' 端采用巢式 PCR 进行扩增。第一轮采用引物 AbGrx-R1 和 UPM 进行降落 PCR，体系和条件参照试剂盒说明。第二轮采用引物 AbGrx-R2 和 NUP，反应模板为稀释 50 倍的第一轮 PCR 产物，反应条件同 3' 端 RACE。完整序列采用包含开放阅读框的引物 AbGrx-fullF 和 AbGrx-fullR 进行扩增，除退火温度变为 55 $^{\circ}$ C，其余反应条件同前。所用引物见表 1。

1.4 序列和遗传分析

水稻干尖线虫谷氧还蛋白(AbGrx-1)氨基酸序列、等电点 pI 及分子量通过 Lasergene 7.1 进行预测。AbGrx-1 基序特征通过保守域数据库(conserved domain database, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)进行分析。蛋白信号肽、跨膜特征和亚细胞定位分别用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、TMHMM Server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)和 SubLoc1.0 (http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/Sub_Loc/)进行预测。采用 Clustal O 1.2.4(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)进行序列比对分析，并用 BoxShade 3.21 (http://ch.embnet.org/software/BOX_form.html)进行图像修饰。应用 MEGA 7 构建临近树(Neighbor-joint)，采用步靴值(Bootstrap)进行计算，重复 1000 次。

1.5 线虫氧化胁迫和温度逆境存活监测

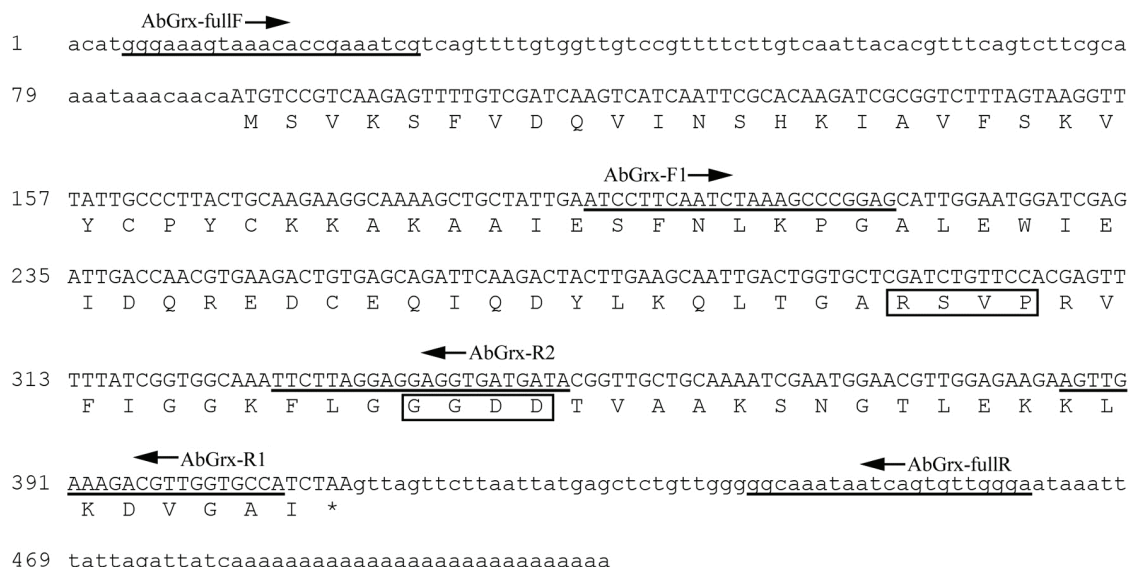
为监测在不同程度氧化胁迫和温度逆境下水稻干尖线虫的存活率，设置以下实验：对于氧化胁迫，将约 100 条活性良好的线虫分别浸泡于含有 0、5、10、25、50、100 和 250 mmol/L H₂O₂ 溶液的 96 孔细胞培养板中，室温静置 48 h，每 12 h 在体式显微镜下统计线虫存活率；对于温度胁迫，将每孔含有约 100 条线虫水悬液的 96 孔细胞培养板分别置于 0 $^{\circ}$ C、4 $^{\circ}$ C、12 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 和 45 $^{\circ}$ C 孵育箱中，每 12 h 统计线虫的存活率。每个处理重复 6 次。

1.6 基因差异表达分析

基于氧化胁迫和温度逆境存活结果，在处理 12 h 后分别收集不同浓度 H₂O₂ 和温度胁迫条件下的线虫，并进行 RNA 提取。利用 TRIzol 试剂提取线虫总 RNA，过程同前。采用反转录试剂盒 [PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time), TaKaRa, 大连] 进行 cDNA 合成；采用荧光定量试剂盒 (SsoFast EvaGreen Supermix, Bio-Rad, 美国) 进行定量 PCR(qRT-PCR)，并通过 Bio-Rad IQ5 系统进行数据采集分析。以水稻干尖线虫 18S rDNA 为内参基因，利用特异引物 Ab-18S-F 和 Ab-18S-R 进行 *AbGrx-1* 的转录丰度检测。共 3 次生物学重复。相对表达水平用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法进行计算^[14]，并采用 *t* 检验统计差异显著性。

1.7 AbGrx-1 蛋白原核表达和纯化

利用分别含有 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点引物 AbGrx-28a 和 AbGrx-28a 扩增 AbGrx1 编码区序列，连接到 pET28a 表达载体上，转入大肠杆菌 Top10



5' 和 3' 非翻译区用小写字母表示, 开放阅读框用大写字母表示; 谷氧还蛋白催化残基用方框表示; 用于扩增全长序列的基因特异引物用下划线标注; 终止子 (TAA) 用星号表示。

The 5' - and 3' -UTR are shown in lowercase letters and the open reading frame (ORF) is shown in uppercase letters. The predicted catalytic residues of glutaredoxin is boxed, and the gene-specific primers used for full sequence amplification of AbGrx-1 are underlined. The stop codon (TAA) is marked with an asterisk.

图1 AbGrx-1 完整 cDNA 和推测的氨基酸序列

Fig. 1. Complete nucleotide and deduced amino acid sequences of the AbGrx-1 cDNA (GenBank Accession No. KP190142).

感受态细胞并进行转化子筛选, 测序正确转化子进行质粒提取, 并将融合质粒转入 BL21(DE3)感受态细胞中, 提取阳性克隆进行蛋白表达, 加入终浓度为 0.5 mmol/L IPTG 进行表达诱导。融合菌株在 15℃ 下诱导 15 h 后进行超声破碎, 含有重组蛋白的上清用 6×His 标签蛋白纯化试剂盒(ProbeGene, 徐州) 进行洗脱纯化。洗脱的蛋白在 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液中透析浓缩, 并通过 BCA 试剂盒(ProbeGene, 徐州)测定蛋白浓度。

1.8 AbGrx-1 蛋白溶液对逆境胁迫下的线虫存活的影响

为检测纯化蛋白是否影响线虫的存活, 将线虫置于含有不同浓度(0、5、10、25 和 50 μmol/L)的 AbGrx-1 蛋白溶液中, 室温浸泡 48 h, 每 12 h 观察线虫存活率。为明确 AbGrx-1 能否增强线虫对氧化胁迫和高温胁迫的能力, 将约 100 条线虫加入终浓度为 5 μmol/L AbGrx-1 蛋白溶液中, 室温孵育 48 h, 将线虫用 ddH₂O 漂洗 2 次, 再分别转移至 50 mmol/L H₂O₂ 溶液和 45℃ 孵育箱, 12 h 后统计线虫存活率。每处理重复 3 次。

2 结果与分析

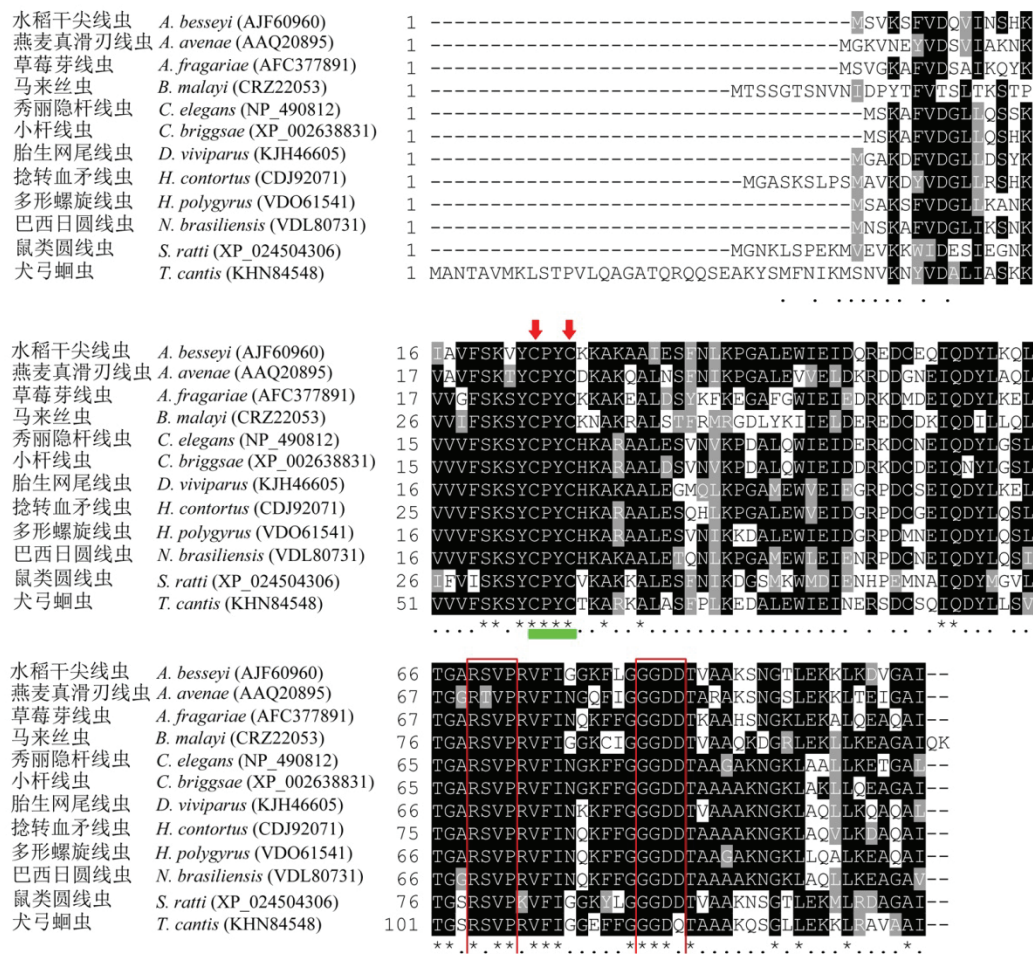
2.1 AbGrx-1 基因序列和进化树分析

水稻干尖线虫谷氧还蛋白 AbGrx-1 的 cDNA 序

列(GeneBank 登录号: KP190142)共 508 bp, 包括 90 bp 的 5' 非翻译区(UTR)、318 bp 的编码区和 97 bp 的 3' UTR(图 1)。ProtParam 预测开发阅读框 ORF(横跨 91 至 411 位)编码 106 个氨基酸, 相对分子质量为 11.65 kD, 理论等电点(pI)为 8.77。AbGrx-1 无信号肽和跨膜结构, 定位于细胞质。通过与 NCBI 上登录的其他 11 种线虫的 Grx 序列进行序列比对, 发现 AbGrx-1 第 24 至 27 位点具有 Grx 催化残基 CYPC, 分别在第 69 至第 72 和第 83 至第 86 位点存在保守的谷胱甘肽结合位点 RSVP 和 GGDD(图 2)。

通过 NCBI/BLASTP 发现谷氧还蛋白在人类、动植物、昆虫和线虫等生物有机体中保守存在。AbGrx-1 (AJE60960)与线虫的 Grx 具有很高的相似性, 其中与动物寄生线虫捻转血矛线虫(*Haemon chus contortus*, CDJ92071)蛋白序列相似度最高, 达 68%($E=5 \times 10^{-47}$), 而棘唇线虫(*Acanthocheil onema viteae*, VBB32303)相似度最低, 为 57%($E=2 \times 10^{-43}$); 与植物寄生线虫燕麦真滑刃线虫(*Aphelenchus avenae*, AAQ20895)和草莓芽线虫(*A. fragariae*, AFC377891)分别有 67%($E=2 \times 10^{-54}$)和 64%($E=4 \times 10^{-49}$)的相似性; 与三种自由生活线虫 *C. briggsae* (CAP38709)、*C. remanei* (EFO84822)和 *C. brenneri* (EGT47413)相似性分别为 67%、66%和 64%。

以二斑叶螨(*Tetranychus urticae*, XP_015784727)谷氧还蛋白为外围群体, 将 NCBI 上登录的



方框表示谷胱甘肽结合位点, 向下箭头表示谷氧还蛋白的催化残基; 一致和相似的序列分别用星号和圆点表示。
Boxed amino acids are glutathione (GSH) binding sites, and arrows indicate catalytic residues of glutaredoxin. Consensus and similar sequences similarity are separately shaded with dark (asterisks) and gray (dots) shadows.

图2 水稻干尖线虫和其他线虫谷氧还蛋白序列比对
Fig. 2. Sequences alignment of *A. besseyi* and other nematode glutaredoxin proteins.

23 个线虫的谷氧还蛋白进行进化树分析。系统发育树将线虫的谷氧还蛋白划分为 2 个大的分支, 一个分支由罗阿丝虫(*L. loa*, XP 020304614)、曲折盘尾丝虫(*Onchocerca flexuosa*, OZC08115)、棘唇线虫(*A. viteae*, VBB32303)、马来丝虫(*B. malayi*, CRZ22053)以及吴策线虫(*W. bancrofti*)等人类和动物寄生丝状线虫组成, 另一个分支则包括自由生活线虫、植物寄生线虫以及人类和动物寄生线虫。在目前已知的三种植物寄生线虫中, 水稻干尖线虫 AbGrx-1 与燕麦真滑刃线虫(*A. avenae*, AAQ20895)划归于同一个次级分支, 而与草莓芽线虫(*A. fragariae*, AFC 377891)分属不同次级分支(图 3)。

2.2 逆境胁迫下线虫 *AbGrx-1* 表达水平检测

为了检测氧化和温度胁迫对 *AbGrx-1* 基因表达水平的影响, 首先分析了不同浓度 H_2O_2 溶液和不同温度处理对线虫存活率的影响。结果显示, 随着 H_2O_2 浓度的逐渐升高, 线虫的存活率逐渐下降。浸

泡于 100 mmol/L 和 250 mmol/L H_2O_2 中 24 h 可导致 80% 供试线虫死亡, 48 h 则导致供试线虫全部死亡; 而 5 mmol/L 和 10 mmol/L H_2O_2 溶液对于线虫存活无较大影响, 在 48 h 时仍有 90% 以上的存活率。浸泡于中间浓度 25 mmol/L 和 50 mmol/L 的 H_2O_2 溶液中, 线虫的存活率存在较大差异: 浸泡于 25 mmol/L H_2O_2 24 h, 超过 85% 线虫存活, 而在 50 mmol/L H_2O_2 中, 线虫存活为 38.6% (图 4-A)。在温度逆境下, 线虫在 0、4、12、25℃ 等较低温度中保持较高存活率, 在处理 48 h 时仍有超过 95% 存活率。随着时间的推移和温度的升高, 暴露于 37℃ 和 45℃ 高温环境下 48 h, 线虫的存活率分别为 54.6% 和 4.2% (图 4-B)。

线虫浸泡于 H_2O_2 溶液中 12 h, *AbGrx1* 表达水平显著提高, 在 5 mmol/L H_2O_2 溶液中, *AbGrx1* 表达水平为对照组的 19.3 倍, 随着 H_2O_2 浓度的提高, *AbGrx1* 的表达水平下降, 但都显著高于对照组

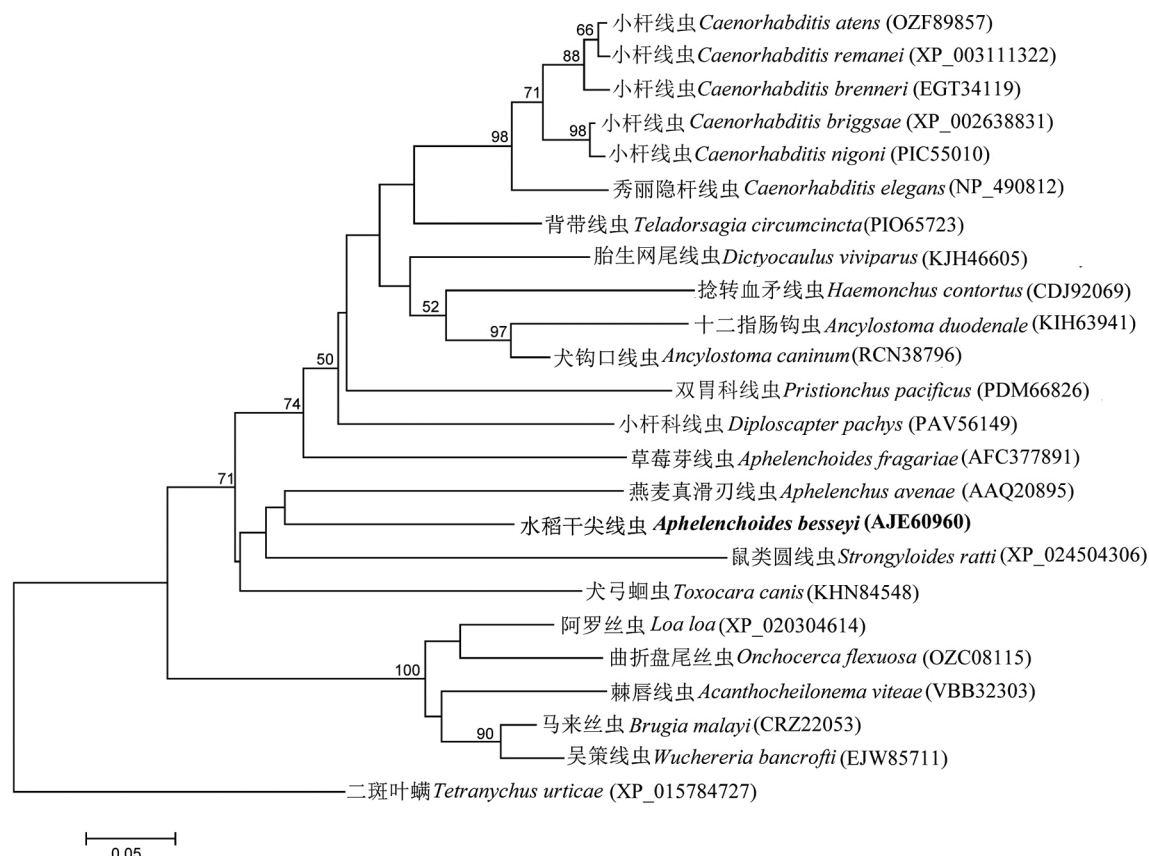


图3 线虫谷氧还蛋白的遗传发育树

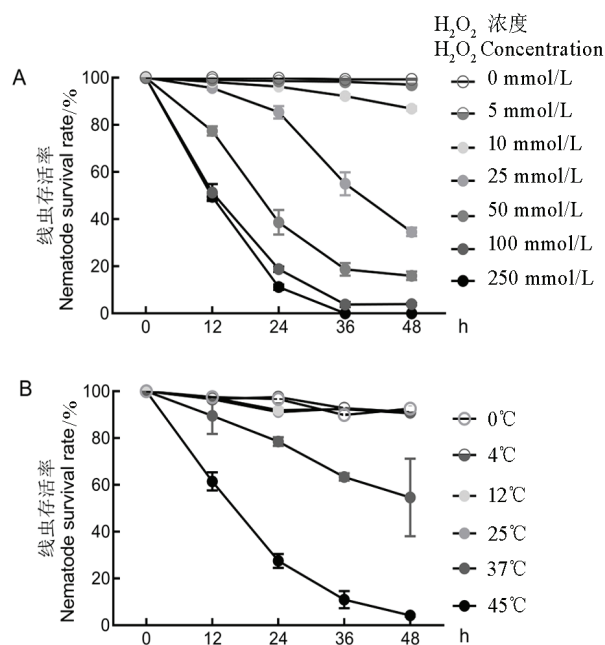
Fig. 3. Phylogenetic relationship among different glutaredoxin proteins in the known nematodes species.

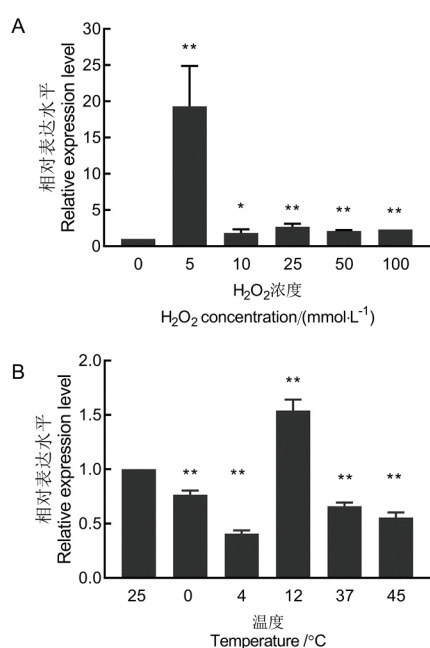
($P < 0.01$) (图 5-A)。当线虫处于温度逆境中, 相比 25℃, *AbGrx1* 的表达水平在 0℃、4℃、37℃和 45℃ 下对显著降低, 而在 12℃时表达水平显著提高, 为 25℃环境中的 1.5 倍($P < 0.01$)。

2.3 *AbGrx-1* 蛋白提高线虫在逆境胁迫中的存活率

为了研究 *AbGrx-1* 蛋白功能, 构建了融合表达载体进行原核表达。通过 IPTG 诱导, SDS-PAGE 电泳获得一条约 14 kD 的蛋白条带, 与理论分子量相当, 通过 Ni-IDA 柱进行洗脱纯化获得高纯度的 *AbGrx-1* 蛋白(图 6-A)。将线虫浸泡于不同浓度的 *AbGrx-1* 蛋白溶液中, 随着时间的推移和蛋白浓度的升高线虫的存活率逐渐下降。48 h 时, 浸泡于 50 $\mu\text{mol/L}$ 蛋白溶液超过 13% 的线虫死亡, 而在低浓度 5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 溶液中, 线虫的存活率超过 90% (图 6-B)。为了检测 *AbGrx* 蛋白是否增强线虫的抗逆能力, 选择 5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度进行后续处理。

将预先浸泡在 5 $\mu\text{mol/L}$ *AbGrx-1* 蛋白溶液中的线虫分别置于氧化和高温逆境 12 h, 结果显示, *AbGrx-1* 蛋白预处理的线虫在 50 mmol/L H_2O_2 溶液中的存活率为 64.73%, 显著高于未预处理的 41.28%

图4 氧化胁迫(A, H_2O_2 处理)和温度胁迫(B)下水稻干尖线虫的存活率Fig. 4. Cumulative survival rates of *A. besseyi* exposed to H_2O_2 (A) and temperature (B) stress.



柱条表示标准误; *, **分别表示与对照(0mmol/L 或 25℃)差异达 0.05, 0.01 显著水平。

Bars are standard error. *, ** indicate significant difference between the treatment and the CK(0mmol/L or 25℃) at 0.05 and 0.01 levels. The same as in figures below.

图 5 暴露于不同浓度 H₂O₂ 和不同温度 12 h AbGrx-1 的相对表达水平

Fig. 5. Relative expression level of AbGrx-1 in *A. besseyi* exposed to H₂O₂ and temperature stress for 12 hours.

($P < 0.01$)(图 6-C)。45℃高温胁迫下, 预处理的线虫存活率为 79.81%, 高于未处理的 65.61%, 但差异不显著; 而处于 25℃环境中线虫的存活率不受影响(图 6-D)。

3 讨论

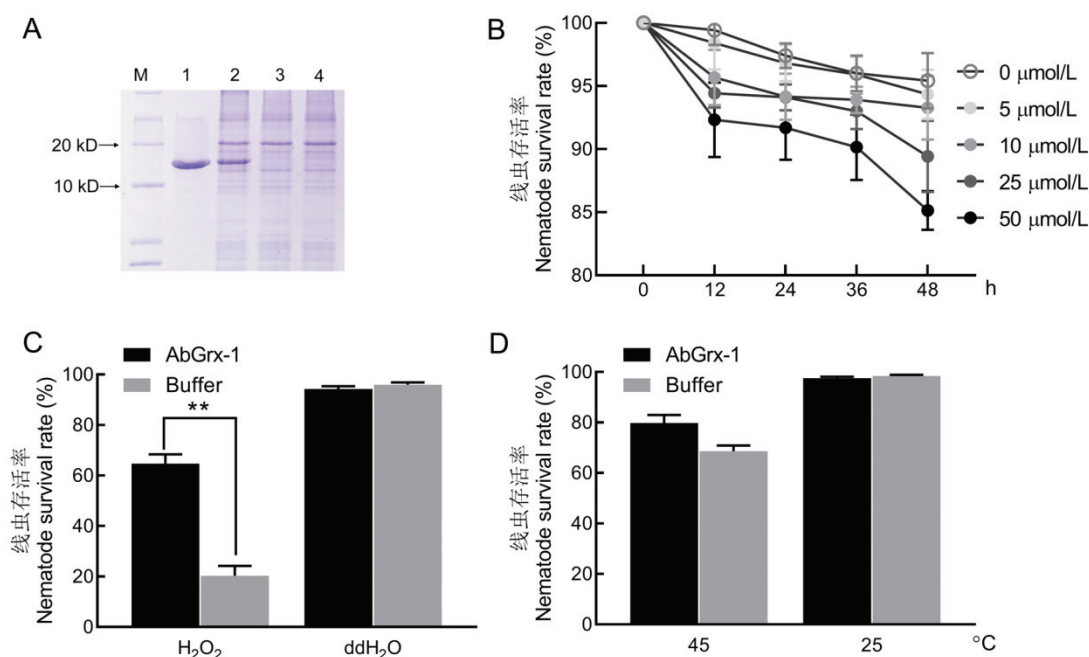
作为氧化还原酶, Grxs 参与维持和调控胞间氧化还原平衡。目前, 已有许多昆虫的 Grx 基因被克隆, 表达分析也已完成。当遭受饥饿、紫外光照射、机械损伤及高低温逆境时, 亚洲玉米螟(*Ostrinia furnacalis*) Grx2 迅速被诱导表达^[15]。中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*) AccGrx1 和 AccGrx2 受高低温、H₂O₂、杀虫剂、汞等极端因子的诱导^[16]。棉铃虫(*Helicoverpa armigera*) HaGrx、HaGrx3 和 HaGrx5 受不同温度和 H₂O₂ 的诱导^[17], 进一步检测发现这些 Grxs 具有抗氧化防御的功能。然而有关植物寄生线虫 Grx 的研究十分有限。

本研究通过 RACE-PCR 技术克隆了水稻干尖线虫的谷氧还蛋白 AbGrx-1。从氨基酸序列和结构上来说, AbGrx-1 蛋白在所有线虫中都高度保守。

基于活性位点^[1], AbGrx-1 与已经报道的草莓芽线虫谷氧还蛋白 AF-GLX-1 一样, 归属于 I 类 Grx^[6]。尽管如此, 在进化关系上, 其中一些 Grx 在分类上可能存在变异。NJ 进化树分析显示, 尽管位于一个大的进化分支, 但 AbGrx-1 与 AF-GLX-1 分属不同的次级分支, 而与燕麦真滑刃线虫、鼠类圆线虫(*Strongyloides ratti*)和犬弓蛔虫(*Toxocara canis*)的谷氧还蛋白属于同一次级分支。

前期已有文献报道, 自由生活线虫 *C. elegans* 对 H₂O₂ 十分敏感, 低浓度 H₂O₂ 浸泡能快速造成虫体死亡^[4, 18, 19]; 而植物线虫对氧化胁迫具有较强的适应性, 例如南方根结线虫(*M. incognita*) J2 在 100 mmol/L H₂O₂ 溶液中浸泡 30 min, 仅有 10% 的线虫死亡^[20]。相比根结线虫, 水稻干尖线虫对 H₂O₂ 极不敏感, 在 100 mmol/L 和 250 mmol/L 的 H₂O₂ 溶液中浸泡 24 h 仍不会全部死亡(图 4-A)。之前有研究利用 H₂O₂ 溶液对水稻干尖线虫进行表面消毒却不影响线虫的活性^[21, 22], 暗示水稻干尖线虫可能利用特殊的抗氧化机制来克服外界的氧化胁迫。线虫对温度改变的适应是其生存的关键。例如, 昆虫病原线虫小卷蛾斯氏线虫(*Steinernema carpocapsae*) 在低温(5~25℃)下的存活率和致病性显著高于高温 35℃^[23]; 肾型线虫(*Rotylenchulus reniformis*) 在 10℃ 时不能侵染植物, 但在零下低温环境中仍能存活 6 个月^[24]。本研究发现, 适度的低温胁迫不能显著影响水稻干尖线虫的存活, 短期的高温胁迫也不能造成全体供试线虫死亡(图 4-B), 表明水稻干尖线虫对温度逆境具有极强的耐受力。

之前的研究表明, 燕麦真滑刃线虫(*A. avenae*) *Aav-glxl* 的表达不受 H₂O₂ 和低温诱导, 而受高温抑制^[25]; 而低温能抑制草莓芽线虫(*A. fragariae*) *Af-glxl* 的表达^[6]。这些结果说明不同线虫的 Grx 对于氧化和温度压力的反应存在差异。通过监测 H₂O₂ 处理和温度逆境下水稻干尖线虫基因表达水平, 发现 H₂O₂ 能显著诱导 AbGrx-1 的表达, 并且低浓度(5 mmol/L) H₂O₂ 下 AbGrx-1 表达水平最高(图 5-A)。考虑到低浓度 H₂O₂ 对线虫存活率的影响较小, 推测 5 mmol/L H₂O₂ 是水稻干尖线虫虫体损伤的临界浓度, 水稻干尖线虫能通过诱导 AbGrx-1 的高表达激发自身的抗氧化免疫反应。各温度胁迫下 AbGrx-1 表达水平最多被诱导 1.54 倍(图 5-B)。当培养温度从 25℃ 上升到 31℃~33℃ 时, *C. elegans* 热激蛋白 Hsp90、Hsp70 和小分子 Hsp 蛋白迅速被诱导合成, 表现出典型的热休克反应^[26]; 而低温和高温能显著诱导水稻干尖线虫 Hsp90 基因上调表达^[10]。



A, AbGrx-1 蛋白的表达和纯化; M, 标记; 1, 纯化的蛋白; 2, IPTG 诱导表达的蛋白; 3, 未诱导蛋白; 4, 空载; B, 不同浓度 AbGrx1 溶液浸泡对线虫存活率的影响; C~D, AbGrx-1 蛋白预处理的线虫在氧化 (C) 和高温逆境 (D) 处理中的存活率。**表示处理与对照间差异达 0.01 显著水平。

图 6 AbGrx-1 蛋白预处理对水稻干尖线虫在氧化和高温逆境下存活率的影响

Fig. 6. Role of AbGrx-1 protein in the response of *A. besseyi* to oxidation and temperature stresses.

因此, 水稻干尖线虫可能不通过诱导 AbGrx-1 的表达应对温度逆境。

Li 等^[27]发现利用荞麦谷氧还蛋白 rbGrx 溶液浸泡 *C. elegans* 能降低氧化胁迫和高温逆境下虫体内活性氧水平, 增强 SOD、CAT 等氧化酶的活性, 从而提高线虫对氧化胁迫和高温逆境下的存活率, 并延长线虫的寿命。与之不同, AbGrx-1 原核表达蛋白溶液预处理能显著提高氧化胁迫下水稻干尖线虫的存活率, 但不能显著降低高温逆境导致的线虫死亡率(图 6)。通过体外酶活测试, 证实 AbGrx-1 蛋白能有效清除反应溶液中 H₂O₂(数据未发表)。因此, AbGrx-1 蛋白能通过降低虫体活性氧水平以减少细胞的氧化损伤, 从而提高线虫存活率。

在线虫与寄主互作过程中, 寄主能产生活性氧以抵御线虫的侵染取食; 为了存活, 线虫常常分泌一系列抗氧化酶抑制寄主活性氧信号的免疫反应^[20]。例如, 动物病原线虫通过 SOD、GPX 和 CAT 等抵抗 ROS 对其造成的损伤^[28]。松材线虫(*B. xylophilus*)能利用半胱氨酸过氧化物还原酶(Prx2s)弱化寄主防卫反应, 促进侵染^[29]。根结线虫能分泌转甲状腺素蛋白(MjTTL5)与寄主植物铁(硫)氧还蛋

白还原酶催化亚基互作, 清除侵染细胞活性氧完成侵染^[30]。AbGrx-1 作为水稻干尖线虫抵抗氧化胁迫重要蛋白, 在侵染寄主早期高度表达(结果未显示), 暗示 AbGrx-1 可能参与水稻干尖线虫与寄主互作。因此, AbGrx-1 可能是水稻干尖线虫潜在的防控靶点, 通过抑制 *AbGrx-1* 的表达将有助于水稻干尖线虫病的高效防控。

参考文献:

- [1] Kalinina E V, Chernov N N, Novichkova M D. Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochemistry (Moscow)*, 2014, 79(13): 1562-1583.
- [2] Lillig C H, Berndt C, Holmgren A. Glutaredoxin systems. *BBA-Gen Subjects*, 2008, 1780(11): 1304-1317.
- [3] Morita S, Yamashita Y, Fujiki M, Todaka R, Nishikawa Y, Hosoki A, Yabe C, Nakamura J I, Kawamura K, Suwastika I N, Sato M H, Masumura T, Ogihara Y, Tanaka K, Satoh S. Expression of a rice glutaredoxin in aleurone layers of developing and mature seeds: Subcellular localization and possible functions in antioxidant defense. *Planta*, 2015, 242(5): 1195-1206.

- [4] Morgan K L, Estevez A O, Mueller C L, Cacho-Valadez B, Miranda-Vizuete A, Szweczyk N J, Estevez M. The glutaredoxin GLRX-21 functions to prevent selenium-induced oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Toxicol Sci*, 2010, 118(2): 530-543.
- [5] Vanina E, Marquez, Diego G, Arias, Claudia V, Piattoni, Carlos Robello, Alberto A, Iglesias, Guerrero A S A. Cloning, expression, and characterization of a dithiol glutaredoxin from *Trypanosoma cruzi*. *Antioxid Redox Sign*, 2010, 12(6): 787-791.
- [6] Fu Z, Agudelo P, Wells C E. Induction of glutaredoxin expression in response to desiccation stress in the foliar nematode *Aphelenchoides fragariae*. *J Nematol*, 2012, 44(4): 370-367.
- [7] Shigeru H, Katsumi T. Effect of water-soaking and air-drying on survival of *Aphelenchoides besseyi* in *Oryza sativa* seeds. *J Nematol*, 2000, 32(3): 303-308
- [8] Tenente R V V, Wetzel M M V S, Manso E S B G, Marques A S A. Survival of *Aphelenchoides besseyi* in infested rice seeds stored under controlled conditions. *Nematol Bras*, 1994, 18: 85-92.
- [9] Feng H, Wei L, Chen H, Zhou Y. Calreticulin is required for responding to stress, foraging, and fertility in the white-tip nematode, *Aphelenchoides besseyi*. *Exp Parasitol*, 2015, 155: 58-67.
- [10] 冯辉, 陈曦, 束兆林, 姚克兵, 魏利辉. 水稻干尖线虫 *Hsp90* 基因克隆及在不同逆境、侵染早期和取食过程的表达差异. 农业生物技术学报, 2016, 24(11): 1741-1753.
Feng H, Chen X, Shu Z L, Yao K B, Wei L H. Characterization of the *Hsp90* Gene in the white tip nematode (*Aphelenchoides besseyi*) and its expression in response to environmental stresses, early infection and feeding. *Chin J Agric Biotechnol*, 2016, 24(11): 1741-1753. (in Chinese with English abstract)
- [11] 陈曦, 冯辉, 束兆林, 姚克兵, 魏利辉. 水稻干尖线虫海藻糖酶 *Ab-tre-1* 基因克隆与逆境条件下的表达分析. 核农学报, 2016, 30(12): 2304-2311.
Chen X, Feng H, Shu Z L, Yao K B, Wei L H. Isolation and expression analysis of a trehalase gene from white tip nematode. *J Nucl Agric Sci*, 2016, 30(12): 2304-2311. (in Chinese with English abstract)
- [12] 陈俏丽, 王峰, 李丹蕾, 零雅茗, 张瑞芝. 水稻干尖线虫 *Ab-lea* 基因在高渗透压下的表达. 中国水稻科学, 2017, 31(6): 652-657.
Chen Q L, Wang F, Li D L, Ling Y M, Zhang R Z. Expression under hypertonic osmotic stress of *Ab-lea* from *Aphelenchoides besseyi*. *Chin J Rice Sci*, 2017, 31(6): 652-657. (in Chinese with English abstract)
- [13] Staheli J P, Boyce R, Kovarik D, Rose T M. CODEHOP PCR and CODEHOP PCR Primer Design. In: PARK D J, *PCR Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press 2011: 57-73.
- [14] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [15] An S, Zhang Y, Wang T, Luo M, Li C. Molecular characterization of glutaredoxin 2 from *Ostrinia furnacalis*. *Integr Zool*, 2013, 8 (Suppl 1): 30-38.
- [16] Yao P, Chen X, Yan Y, Liu F, Zhang Y, Guo X, Xu B. Glutaredoxin 1, glutaredoxin 2, thioredoxin 1, and thioredoxin peroxidase 3 play important roles in antioxidant defense in *Apis cerana cerana*. *Free Radical Bio Med*, 2014, 68: 335-346.
- [17] Zhang S D, Shen Z J, Liu X M, Li Z, Zhang Q W, Liu X X. Molecular identification of three novel glutaredoxin genes that play important roles in antioxidant defense in *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2016, 75: 107-116.
- [18] Olahova M, Taylor S R, Khazaipoul S, Wang J, Morgan B A, Matsumoto K, Blackwell T K, Veal E A. A redox-sensitive peroxiredoxin that is important for longevity has tissue- and stress-specific roles in stress resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(50): 19839-19844.
- [19] Isermann K, Liebau E, Roeder T, Bruchhaus I. A peroxiredoxin specifically expressed in two types of pharyngeal neurons is required for normal growth and egg production in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol*, 2004, 338(4): 745-755.
- [20] Dubreuil G, Deleury E, Magliano M, Jaouannet M, Abad P, Rosso M N. Peroxiredoxins from the plant parasitic root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, are required for successful development within the host. *Int J Parasitol*, 2011, 41(3-4): 385-396.
- [21] Zhou T, Gao C, Du L, Feng H, Wang L, Lan Y, Sun F, Wei L, Fan Y, Shen W, Zhou Y. Genetic analysis and QTL detection for resistance to white tip disease in rice. *PLoS One*, 2014, 9(8): e106099.
- [22] Sun M J, Liu W H, Lin M S. Effects of temperature, humidity and different rice growth stages on vertical migration of *Aphelenchoides besseyi*. *Rice Sci*, 2009, 16(4): 301-306.
- [23] Kung S-P, Gaugler R, Kaya H K. Effects of soil temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. *J Invertebr Pathol*, 1991, 57(2): 242-249.
- [24] Heald C M, Inserra R N. Effect of Temperature on Infection and Survival of *Rotylenchulus reniformis*. *J Nematol*, 1988, 20(3): 356-361.
- [25] Browne J A, Dolan K M, Tyson T, Goyal K, Tunnacliffe A, Burnell A M. Dehydration-specific induction of hydrophilic protein genes in the anhydrobiotic nematode *Aphelenchus avenae*. *Eukaryot Cell*, 2004, 3(4): 966-975.
- [26] Stringham E G, Candido E P M. Transgenic hsp 16-LacZ

- strains of the soil nematode *Caenorhabditis elegans* as biological monitors of environmental stress. *Environ Toxicol Chem*, 1994, 13(8): 1211-1220.
- [27] Li F, Ma X, Cui X, Li J, Wang Z. Recombinant buckwheat glutaredoxin intake increases lifespan and stress resistance via hsf-1 upregulation in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol*, 2018, 104: 86-97.
- [28] Henkle-Duhrsen K, Kampkotter A. Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. *Mol Biochem Parasitol*, 2001, 114: 129-142.
- [29] Zhen L, Xiaoxia L, Yanna C, Yan W, Qingwen Z, Xuguo Z. Cloning and characterization of a 2-Cys peroxiredoxin in the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, a putative genetic factor facilitating the infestation. *Int J Biol Sci*, 2011, 7(6): 823-836.
- [30] Lin B, Zhuo K, Chen S, Hu L, Sun L, Wang X, Zhang L H, Liao J. A novel nematode effector suppresses plant immunity by activating host reactive oxygen species-scavenging system. *New Phytol*, 2016, 209(3): 1159-1173.