

大豆脂质转运蛋白基因 *GmLTP3* 的特征分析

李彩云^{1,2}, 余永亮², 杨红旗², 董 薇², 田保明¹, 梁慧珍²

(1. 郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450001; 2. 河南省农业科学院 芝麻研究中心, 河南 郑州 450002)

摘要: 将芝麻的 *SiLTP3* 序列与大豆的核苷酸序列进行 blast 比对, 发现大豆含有与芝麻该基因同源性高达 94% 的序列, 克隆该基因并命名为 *GmLTP3*。通过 *GmLTP3* 的核苷酸序列推测出其氨基酸序列, 利用软件进行多重序列比对和系统发育树构建, 发现该氨基酸序列与已确定功能的大豆脂质转运蛋白同源性高达 99%, 与蒺藜苜蓿和巴旦杏的进化距离最近。采用实时荧光定量 PCR 法对 *GmLTP3* 基因进行定量检测, 组织表达分析表明, *GmLTP3* 属于组成性表达基因, 在大豆的根、茎、叶、花、萌发的种子中均有表达, 并且在花蕾、茎和萌发的种子中表达量较高, 在根、叶中表达量较低。非生物胁迫诱导表达分析表明, *GmLTP3* 基因能够对 IAA、ABA、PEG、NaCl 和冷害作出应答。胁迫处理 2 h 后, *GmLTP3* 表达量均有下调趋势; 胁迫处理 12 h 后, IAA、ABA、PEG、NaCl 诱导 *GmLTP3* 的表达量均有不同程度的上调, 冷害处理则继续下调表达量。

关键词: 大豆; 脂质转运蛋白; 非生物胁迫; 表达分析

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841(2013)01-0008-04

Characteristics of a Lipid-transfer Protein Gene *GmLTP3* in *Glycine max*

LI Cai-yun^{1,2}, YU Yong-liang², YANG Hong-qi², DONG Wei², TIAN Bao-ming¹, LIANG Hui-zhen²

(1. Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan; 2. Sesame Research Center, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, Henan, China)

Abstract: In this study, a gene which have 94% identity with the *SiLTP3* was cloned and named as *GmLTP3*. *GmLTP3* encodes a lipid-transfer protein (LTP) that have 99% identity with the known *Glycine max* lipid transfer protein. The transcriptional level of *GmLTP3* was quantitatively determined using realtime-PCR, it was expressed in almost all the tissues, such as root, stem, leave, flower and seed. It was highly expressed in alabastrum, 7-days old stem and 3-days germinating seed, while it was lowly expressed in root and leave. When treated by abiotic stress, such as IAA, ABA, PEG and NaCl, the expression level was down-regulated after treated 2 hours, but was up-regulated after treated 12 hours, while it was down-regulated consistently after treated by cold stress.

Key words: *Glycine max*; Lipid-transfer proteins; Abiotic stress; Expression analysis

在植物中, 脂质是结构膜脂的基本元件、生物能量贮藏的载体、植物自身防护物质(蜡质)和植物逆境反应代谢中的前体信号分子, 同时也是种子萌发的必需物质之一。脂质转运蛋白(Lipid transfer proteins, LTPs)在体外能够可逆地结合和转运多种类型的疏水分子, 如脂肪酸、磷脂、糖脂、乙酰辅酶A/类固醇、芳香衍生物及角质单体等脂类复合物^[1]。高等植物中 LTPs 含量较高, 占可溶性蛋白的 4% 左右。研究表明 LTP 分子的三维结构具有一个向内的疏水腔, Kader^[2]推测 LTPs 疏水腔和磷脂分子酰基链的结合是实现磷脂在膜之间转运的基础。LTPs 基因的表达有较强的发育和组织特异性, 对拟南芥、水稻、蓖麻的免疫细胞学研究表明, LTPs 定位于细胞壁上^[3,4], 可能是一类胞外分泌型蛋白, 在内质网中形成, 然后通过高尔基体分泌到细胞

外^[2,5-6]。目前研究认为, LTPs 主要参与转运角质单体和蜡质的形成^[7-9]、植物有性生殖^[10-11]、花粉发育^[1]、信号转导^[12]、对生物和非生物胁迫的应答等多种生物学功能。不同物种 LTP 基因的表达模式迥异, 在拟南芥和水稻等植物基因组中存在多种亚型结构, 这表明 LTPs 的多个异构体具有不同的生物学功能。

大豆油脂是大豆的主要经济产品之一。近年来, 利用基因工程技术调控植物脂肪酸代谢途径, 改善植物油的营养价值, 获得高品质的食用油已成为具有一定研究价值和应用前景的领域^[13]。因此, 本文利用 RT-PCR 技术研究脂质转运蛋白基因在大豆各组织和各种胁迫条件下的表达量信息, 为大豆油脂形成的分子生物学基础研究提供有益信息, 推动大豆转基因育种的进程。

收稿日期: 2012-12-03

基金项目: 河南省科技创新人才计划(114200510002); 转基因生物新品种培育科技重大专项(2011ZX08004-005); 引进国际先进农业科学技术计划“948 计划”项目(2011-G1-13)。

第一作者简介: 李彩云(1987-), 女, 在读硕士, 研究方向为作物育种。E-mail: 503600139@qq.com。

通讯作者: 梁慧珍(1968-), 女, 研究员, 博士, 主要从事大豆遗传育种工作。E-mail: lhzh66666@163.com。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 大豆品种 Williams82,由中国农业科学院作物科学研究所惠赠。

1.1.2 主要试剂 吲哚乙酸 (IAA)、脱落酸 (ABA)、PEG、NaCl、TaKaRa PrimeScript™ RT reagent Kit 反转录酶、TaKaRa SYBR Green II 荧光染料,均由宝生物工程(大连)有限公司提供。

1.2 试验方法

1.2.1 生物信息学分析 利用美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 中 BLAST program 在蛋白数据库中进行相似性搜索,对 *GmLTP3* 编码蛋白功能域进行预测;利用 DNASTAR (version 7.1) 软件完成 ORF 预测;用 Mega 5.05 软件进行多重序列比对和进化树分析。

1.2.2 材料处理 2012 年将大豆品种 Williams82 种植于河南省农业科学院试验田,根、茎和叶取自出苗 7 d 的大豆幼苗,花取自早晨刚露白的花蕾 (花瓣没有打开),种子是在土壤中萌发 3 d (胚长为 5 mm 左右) 后取样。试验材料采集后用锡箔纸包裹,迅速置于液氮中,并于 -70℃ 下保存。

出苗 7 d 进行取样,取样时把植株连土一同挖出,然后用水冲掉泥土,并保证植株根系的完整。然后在室温条件下,对幼苗分别进行吲哚乙酸 (IAA, 10 μmol·L⁻¹)、脱落酸 (ABA, 100 μmol·L⁻¹)、干旱 (20% PEG)、高盐 (NaCl, 250 mmol·L⁻¹)、低温 (4℃) 5 种胁迫处理,其中前 4 种胁迫处理是采用

相应浓度的溶液水培整株大豆幼苗;低温胁迫是将整株大豆幼苗置于 4℃ 冰箱,以正常生长和水溶液水培处理的大豆幼苗作为对照。分别于胁迫处理 2 和 12 h 后进行整株取样,用锡箔纸包裹后快速投入液氮中冷冻, -70℃ 保存备用。

1.2.3 植物总 RNA 的提取及纯化 采用热酚法^[14]提取大豆根、茎、叶、花、种子以及各种胁迫处理后的总 RNA。

1.2.4 实时荧光定量逆转录 PCR 将提取的植株总 RNA 经 DNaseI 消化,反转录合成 cDNA 后稀释 6 倍,进行 Real-Time qRT-PCR 反应,采用 SYBR Green II 作荧光染料,选择大豆 *Lectin* 基因为内参基因。

Real-Time qRT-PCR 反应体系 (20 μL): 稀释后的 SYBR Premix Ex Taq (2 ×) 10 μL、ddH₂O 4.2 μL、cDNA 5 μL、Primer-F (100 μmol L⁻¹) 0.4 μL、Primer-R (100 μmol L⁻¹) 0.4 μL,引物序列见表 1。混匀后放入 Eppendorf 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad USA) 上进行反应,每个样品重复 3 次。

Real-Time qRT-PCR 反应条件: 95℃ 预变性 2 min, 95℃ 变性 15 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s 并收集荧光,读板程序进行 40 个循环。57 ~ 95℃ 生成溶解曲线,此过程为 20 min,每个样品 3 个重复,溶解曲线为单峰时用于后续分析。

基因相对表达量计算公式: 1) 目的基因相对表达量 = 2^{-ΔCt}, ΔCt = Ct_{目的基因} - Ct_{Lectin}; 2) 目的基因诱导表达量 = 2^{-ΔΔCt}, ΔΔCt = (Ct_{目的基因} - Ct_{Lectin})_{胁迫处理} - (Ct_{目的基因} - Ct_{Lectin})_{对照}

表 1 用于 *GmLTP3* 基因表达分析的引物

Table 1 All primers designed for expression analysis of the *GmLTP3* gene

基因名称 Gene name	用途 Purpose	引物序列 Sequences information (5' - 3')
<i>Lectin</i>	内参引物	F: CCTCCTCGGAAAGTTACAA
	Internal primers	R: GGGCATAGAAGGTGAAGTT
<i>GmLTP3</i>	简并引物	F: AAACCACAACCACCACCATCT
	Degenerate primers	R: TTCCTAACACCGTTCCTTGATGC

2 结果与分析

2.1 *GmLTP3* 相关基因的生物信息学分析

通过分析脂质代谢途径,根据拟南芥和芝麻等植物的 LTPs 编码基因的保守序列设计简并引物,扩增大豆的根、茎、叶、花以及萌发种子的 cDNA。结果发现在大豆中含有与芝麻 LTPs 基因同源性高达 90% 以上的基因序列,以上述序列信息作为靶序列,

在大豆 EST 数据库中进行 Blastn 比对,获得了 1 个与大豆 LTPs 合成相关的全长 cDNA 序列,该序列与已报道的芝麻 *SiLTP3* (登录号为 EF581316.1) 有 94% 的同源性。因此,将从大豆中提取得到的这个基因命名为 *GmLTP3*,其生物学信息如下: GenBank 登录号为 NM_001248233、ORF 长度 369 bp、编码氨基酸数目 122、分子量 13.238 kDa、等电点 (pI) 为 8.247 (图 1)。

```

1 acaccacaccttcaaacctaacctagaagaagaaaaaaccaaccaccaccatcta
61 gsgttttttctttttctcATGGCTAGTTGTCAACTAGGATTTTCTCATCATGTCCTGT
      M A S L S T R I F F I M S L 15
121 TGTGCTGGCTCTCGTCCAAATGGCACAAGGGAAATGACATGTGGCCAGTTGTGAGCA
      V C L A L G P M A Q G E M T C G Q V V S 35
181 ACCTGACCCCATGCATCTCCTATGTGGTGTATGGTGAACCAATGTTCTGAACAGTGCT
      N L T P C I S Y V V Y G G T N V P E Q C 55
241 GCAATGGGATAAGAAATCTCTATGGCATGGCTCAGACCAACCAGCCCAAGCTGTTT
      C N G I R N L Y G M A Q T K P D R Q A V 75
301 GCAACTGCATCAAGAAGCGTGTAGGAACAGTGGCTCACTACTCTGACTTCAACCTCA
      C N C I K N G V R N S G F N Y S D F N L 95
361 ACCTTGTCTAAACCTCCCAAGAAATGTTGGGTCAACATCCCTACCAGATCAGCCCA
      N L A A N L P K K C G V N I P Y Q I S P 115
421 ACACAGACTGCATAGGGTGCAGTAgggttgatcatatgatgtttatgttagcagttt
      N T D C T R V Q * 122
481 agaataagaggccacgtgacatgacaaggaatgctagaattgcttctttaatgact
541 agtgctcttgtattatgtctgtggttatatatattatagtgtaactgaggttatgg
601 tgcgtctgtgtagcatgcatatgtagcattagtagatcataggaagcctatgggaa
661 gaaacatatggttgtgaagctgttgttcacttattatgatgatgacagctttgg
    
```

图1 *GmLTP3* 的核苷酸和推测的氨基酸序列
Fig.1 The nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of the *GmLTP3*

将比对获得的 *GmLTP3* 相关基因提交到 GeneBank 数据库,利用 Mega 5.05 软件进行多重序列比对和系统发育树构建,结果表明, *GmLTP3* 的氨基酸序列与已确定功能的大豆脂质转运蛋白 XP_003522081.1 的同源性高达 99%,与蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 和巴旦杏 (*Prunus dulcis*) 的进化距离最近(图 2)。

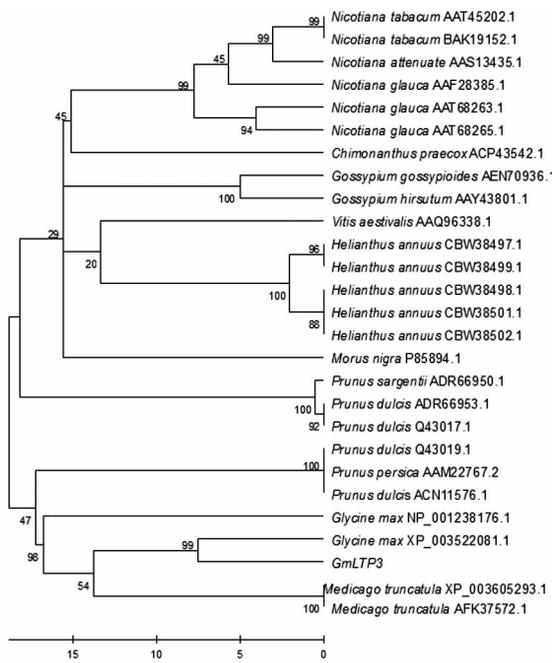


图2 *GmLTP3* 和其他物种来源 LTPs 的系统发育树
Fig.2 Phylogenetic tree of *GmLTP3* with LTPs from other species

2.2 *GmLTP3* 基因的组织表达分析

如图 3 所示,在正常生长条件下, *GmLTP3* 基因在根、茎、叶、花和种子中均有表达,其中,在根中表达量最低。以在根中的表达量作为对照,在花器官中表达量最高,相当于在根中表达量的 50 倍;在茎中和种子中的表达量也较高,分别为在根中表达量

的 20.6 倍和 12 倍;在叶中的表达量相当于根中表达量的 1.8 倍。

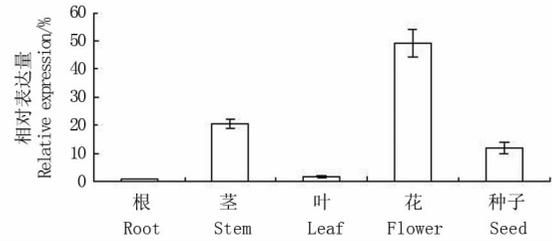


图3 *GmLTP3* 相关基因在不同组织中的表达分析
Fig.3 Tissue expression analysis of *GmLTP3* in soybean

2.3 *GmLTP3* 相关基因的胁迫处理诱导表达分析

如图 4 所示,胁迫处理 2 h 后, *GmLTP3* 相关基因相对于对照均下调表达;胁迫处理 12 h 后, IAA、ABA、PEG、NaCl 均诱导 *GmLTP3* 基因的表达量不同程度的上调,而冷害处理 12 h 后的表达量继续下调。上述结果表明 *GmLTP3* 基因有可能在大豆非生物胁迫调控中起着重要作用。

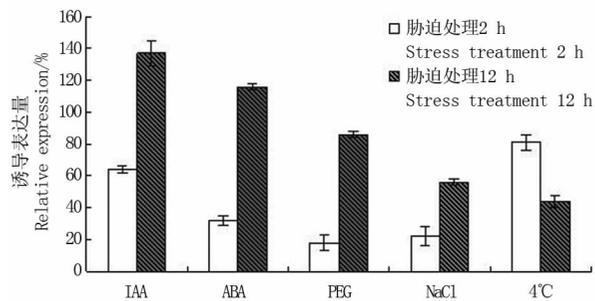


图4 *GmLTP3* 相关基因在不同非生物胁迫下的表达分析
Fig.4 Expression analysis of *GmLTP3* in soybean treated by abiotic stress

3 讨论

LTPs 基因是一类在植物生长发育方面具有重要作用的多功能基因家族^[2,15],能够结合和转运脂肪酸、酰基-CoA、半乳糖、磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰甘油(PG)等^[16]。通过实时荧光定量 RT-PCR 分析表明, *GmLTP3* 基因在大豆的不同组织器官中均有表达,在花蕾中表达量最高,茎和萌发的种子中表达量次之,说明 *GmLTP3* 基因参与多种生物学进程,如大豆种子的萌发、亲脂性物质的沉积、大豆的生殖发育以及信号转导等过程。

LTPs 是植物抵抗逆境胁迫的蛋白,参与抗逆信号传导过程^[17],与植物的抗逆性和抗病性均有一定关系^[18-19]。LTPs 在烟草叶片周期性脱水 mRNA 表达增加,参与角质层沉积;外源 ABA 能显著诱导 *SiLTP2* 和 *SiLTP4* 异构体基因的表达,调解芝麻对冷害或水分胁迫的耐受性^[16]。NaCl、ABA 处理番

茄可诱导 LTPs 基因在茎中的表达;大麦、棉花的 LTPs 基因则可受低温和 ABA 诱导表达^[2,5,20]。本研究发现, *GmLTP3* 相关基因能够对多种环境胁迫作出应答,在受到 IAA、ABA、干旱、高盐等逆境因子诱导后表达量增加,在 4℃ 低温条件下表达量有下调的趋势,表明在发育过程中 *GmLTP3* 有助于大豆植株适应水资源短缺的环境,预示着该基因在大豆抗逆和适应不良环境中扮演着重要角色。综上所述, *GmLTP3* 是组成性表达基因,不仅参与脂质相关代谢的活动,而且也参与植物的抗逆反应。

参考文献

- [1] 田爱梅,曹家树. 植物脂质转移蛋白[J]. 细胞生物学杂志, 2008(4):483-488. (Tian A M, Cao J S. Lipid transfer proteins in plants[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2008(4):483-488.)
- [2] Kader J C. Lipid-transfer proteins in plants[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1996, 47:627-654.
- [3] Canevascini S, Caderas D, Mandel T, et al. Tissue-specific expression and promoter analysis of the tobacco *ltp1* gene[J]. Plant Physiology, 1996, 112:513-524.
- [4] Thoma S, Hecht U, Kippers A, et al. Tissue-specific expression of a gene encoding a cell wall-localized lipid transfer protein from *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 1994, 105:35-36.
- [5] Kader J C. Lipid transfer proteins: a puzzling family of plant proteins[J]. Trends in Plant Science, 1997, 2:66-70.
- [6] Sossountzov L, Ruiz-Avila L, Vignols F, et al. Spatial and temporal expression of a maize lipid transfer protein gene[J]. Plant Cell, 1991, 3:923-933.
- [7] Pyee J, Kolattukudy P E. The gene for the major cuticular wax-associated protein and three homologous genes from broccoli (*Brassica oleracea*) and their expression patterns[J]. The Plant Journal, 1995, 7:49-59.
- [8] Cameron K D, Teece M A, Smart L B, et al. Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco[J]. Plant Physiology, 2006, 140:176-183.
- [9] Bernhard W R, Thoma S, Botella J, et al. Isolation of a cDNA clone for spinach lipid transfer protein and evidence that the protein is synthesized by the secretory pathway[J]. Plant Physiology, 1991, 95:164-170.
- [10] Sang Y P, Guang Y J, Jean C M, et al. A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix[J]. Plant Cell, 2000, 12:151-164.
- [11] Jeroen N, Richard F, Bastiaan A H, et al. Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco[J]. Plant Cell, 2005, 17:2009-2019.
- [12] Maldonado A M, Doerner P, Dixon R A, et al. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signaling in *Arabidopsis*[J]. Nature, 2001, 419:399-403.
- [13] 蔡一荣,李望丰,刘立侠,等. 大豆品质改良的基因工程育种概况[J]. 大豆科学, 2006, 25(1):62-66. (Cai Y R, Li W F, Liu L X, et al. Genetic engineering on improving soybean quality traits in breeding[J]. Soybean Science, 2006, 25(1):62-66.)
- [14] 王友华,卢孟柱,段留生. 棉花幼苗根总 RNA 提取的改进热酚法[J]. 西北植物学报, 2005, 25(4):723-726. (Wang Y H, Lu M Z, Duan L S. Modified hot phenol method for extracting total RNA from seedling root of cotton[J]. Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica, 2005, 25(4):723-726.)
- [15] Kader J C. Proteins and the intracellular exchange of lipids I. Stimulation of phospholipid exchange between mitochondria and microsomal fractions by proteins isolated from potato tuber[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1975, 380:31-44.
- [16] Choi A M, Lee S B, Cho S H, et al. Isolation and characterization of multiple abundant lipid transfer protein isoforms in developing sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2008, 46:127-139.
- [17] Nathalie B, Eric G, Marie L M, et al. Modulation of the biological activity of a tobacco LTP1 by lipid complexation[J]. Molecular Biology of the Cell, 2004, 15:5047-5052.
- [18] Aardra K, Ludmila L, Hirotada F, et al. Fatty acid signaling modulates salicylic acid- and jasmonic acid-mediated defense pathways in the *Arabidopsis* *ssi2* mutant [J]. Plant Cell, 2003, 15:2952-2965.
- [19] Fleming A J, Mandel T, Roth I. The patterns of gene expression in the tomato shoot apical meristem[J]. Plant cell, 1993, 5:297-309.
- [20] Torres S, Godoy J A, Pintor J A. A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants[J]. Plant Molecular Biology, 1992, 18:749-757.