

大豆 *SbPRP1* 和 *SbPRP2* 基因在非生物胁迫下的表达及载体构建

翟莹¹, 张军², 赵艳¹, 任巍巍¹, 张闯¹

(1. 齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2. 黑龙江省兽医科学研究所, 黑龙江 齐齐哈尔 161005)

摘要: 为研究大豆细胞壁脯氨酸富集蛋白基因在非生物胁迫下发挥的作用, 利用实时荧光定量 PCR, 对大豆中的两个脯氨酸富集蛋白基因 *SbPRP1* 和 *SbPRP2* 在非生物胁迫下的表达情况进行检测。结果显示: *SbPRP1* 在高盐和低温处理下表达量下降, 分别在处理后 1 和 24 h 达到最低值; 在模拟干旱处理下表达量先下降后升高, 处理后 24 h 达到最大值。 *SbPRP2* 在高盐、模拟干旱和低温处理下表达量均有所升高, 分别在处理后 24, 1 和 5 h 达到最大值。表明 *SbPRP1* 和 *SbPRP2* 可能参与了大豆对不利环境的适应性调控。通过 RT-PCR 从大豆叶片中扩增 *SbPRP1* 和 *SbPRP2* 的基因全序列并构建到植物表达载体 pRII01-AN 上。

关键词: 大豆; 脯氨酸富集蛋白; 表达分析; 载体构建; 抗逆性

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2017.01.0024

Expression and Vector Construction of *SbPRP1* and *SbPRP2* in Soybean Under Abiotic Stresses

ZHAI Ying¹, ZHANG Jun², ZHAO Yan¹, REN Wei-wei¹, ZHANG Chuang¹

(1. College of Life Science and Agro-Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China; 2. Heilongjiang Institute of Veterinary Science, Qiqihar 161005, China)

Abstract: Plant proline-rich proteins (PRPs) are putative cell wall proteins, which are usually associated with abiotic stress. The expression of *SbPRP1* and *SbPRP2* under abiotic stress treatments in soybean was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The expression of *SbPRP1* was decreased under salt and cold treatments, reaching the minimum expression at 1 and 24 h, respectively. While it increased firstly and thereafter declined under simulated drought treatment, reaching the maximum expression at 24 h. The expression of *SbPRP2* was increased under salt, simulated drought and cold treatments, reaching the maximum expression at 24, 1 and 5 h, respectively. These results indicate that *SbPRP1* and *SbPRP2* may involve in the regulation of adapting to adverse environment in soybean. The *SbPRP1* and *SbPRP2* were amplified through RT-PCR from soybean leaves and constructed to plant expression vector of pRII01-AN.

Keywords: Soybean; Proline-rich protein; Expression analysis; Vector construction; Stress resistance

大豆是我国重要的经济作物, 然而环境胁迫(例如干旱、盐碱、极端温度)和病虫害等每年都会严重影响大豆产量。大豆是分子生物技术应用最为成功的作物之一, 其转基因品种的种植面积和比例一直位居大田作物之首^[1]。所以, 能否发掘有效的抗逆候选基因就成为大豆抗逆分子育种的关键之一。

植物细胞壁中的结构蛋白主要包括 5 类: 茄科凝集素(solanaceous lectins)、羟脯氨酸富集糖蛋白(hydroxyprolin-rich glycoproteins, HRGPs)、阿拉伯半乳糖蛋白(arabinogalactan proteins, AGPs)、甘氨酸富集蛋白(glycine-rich proteins, GRPs)和脯氨酸富集蛋白(proline-rich proteins, PRPs)^[2-3]。这些蛋白的含量在植物细胞应对不良环境因子时会发生显著变化。例如, 真菌感染和伤害可以调控 *HRGPs* 基因的表达^[4-5]。重金属胁迫等可以调控 *GRPs* 基因的表达^[6-7]。PRPs 因其氨基酸序列中富含大量的 Pro-Pro 重复而得名, 其序列中也含有大量的羟脯氨酸^[8-9]。编码 PRPs 的基因的表达主要受到高盐、冷

害以及真菌感染的影响。这些不良的环境因子可以促使植物细胞壁中 PRPs 分子间的快速交联, 或与木质素、多糖等其它成分交联, 从而形成有效的保护层来应对不良环境^[10-11]。例如, 将木豆的 *CcHyPRP* 基因异源表达可以提高转基因拟南芥对干旱、高盐和高湿的抵抗能力^[12]。将水稻的 *Os-PRP3* 基因超表达可以提高转基因水稻对低温的抵抗能力^[13]。相反, 将拟南芥中编码 PRPs 的 *EARL1* 基因敲除后, 突变植株的细胞与正常细胞相比对冷胁迫更加敏感^[14]。同样将拟南芥中的另一个编码 PRPs 的 *SICKLE* (*SIC*) 基因敲除后, 突变植株对冷胁迫和盐胁迫都更加敏感^[15]。

尽管在 20 世纪 80 年代人们已在植物中发现了 PRPs, 但功能已经研究清楚的基因数量并不多^[16]。*SbPRP1*、*SbPRP2* 和 *SbPRP3* 是大豆中最早分离出的 3 个 PRPs 编码基因。前人只对它们在不同发育阶段及组织中的表达情况进行检测^[17-20], 但有关这 3 个基因在逆境条件下的表达情况及在大豆抗逆中发挥的作用并未见报道。本试验对大豆 *SbPRP1* 和

收稿日期: 2016-09-20

基金项目: 国家自然科学基金(31301335); 黑龙江省教育厅科学技术研究(12541889); 黑龙江省自然科学基金项目(C201458); 黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划(UNPYSCT_2016090)。

第一作者简介: 翟莹(1982-), 女, 博士, 副教授, 主要从事大豆分子育种研究。E-mail: fairy39809079@126.com。

SbPRP2 (*SbPRP3* 另文发表)在非生物胁迫下的表达情况进行实时荧光定量 PCR 检测并构建植物表达载体,为后续 *SbPRP1* 和 *SbPRP2* 在大豆抗逆育种中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 非生物胁迫处理

将合丰 46 大豆种子种于营养钵中,待幼苗生长到四叶期时进行非生物胁迫处理。将幼苗从营养钵中移出,置于含有 200 mmol·L⁻¹ NaCl 的 MS 培养液中进行高盐处理;将幼苗从营养钵中移出,置于含有 20% PEG8000 的 MS 培养液中进行模拟干旱处理;连同营养钵一起置于 4℃ 培养箱中进行低温处理。分别在处理的 1,2,5,10 和 24 h 取样,剪取 0.1 g 叶片迅速置于液氮中,同时剪取 0.1 g 未处理(处理 0 h)大豆幼苗叶片作为对照。

1.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成

大豆不同处理时间点及对照叶片总 RNA 的提

取按照鼎国生物公司 Plant RNAzol 试剂盒说明书进行操作,随后按照鼎国生物公司 cDNA 第一链合成试剂盒说明书反转录合成第一链 cDNA。

1.3 实时荧光定量 PCR

根据 *SbPRP1* (GeneBank 登录号:J02746) 和 *SbPRP2* (GeneBank 登录号:J05208) 基因序列设计实时荧光定量 PCR 引物(表 1)。以大豆组成型表达基因 β -*Tubulin* (GeneBank 登录号:GMU12286) 作为内参基因,以不同处理时间点叶片 cDNA 为模板。实时荧光定量 PCR 反应体系为 2 × SYBR Premix Ex Taq (Takara 公司) 10 μL、ROX Reference Dye II (Takara 公司) 0.2 μL、cDNA 2 μL、上游引物 0.4 μL、下游引物 0.4 μL,补水至总体积 20 μL。在 BIO-RAD CFX96 Real-Time PCR 仪上设置反应程序:95℃ 预变性 10 s;95℃ 20 s,58℃ 20 s,72℃ 30 s,共计 40 个循环。各处理均做 3 次重复,采用 2^{-ΔΔCT} 法计算基因的相对表达量。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of real-time fluorescence quantitative PCR

基因 Gene	上游引物 5'→3' Forward primer	下游引物 5'→3' Reverse primer
<i>SbPRP1</i>	CCTCATTAGTGCTGCTCCTTG	GGAGGCTTGTAACAGGTGGT
<i>SbPRP2</i>	TTACAAGCCACCTGTTGAGAAG	GGTGTCA TCAGTTGGAGGGTAC
β - <i>Tubulin</i>	GGAAGGCTTCTTCGATTGGTA	ACTGGCATCCTGCTACTGC

1.4 植物表达载体构建

根据 *SbPRP1* 和 *SbPRP2* 基因全序列设计引物,以大豆叶片 cDNA 为模板扩增基因全长序列。扩增引物序列如下(下划线代表酶切位点):*SbPRP1*-F: ACGCGTCGACATGAGGAATATGGCTTCCTTA, *Sal* I; *SbPRP1*-R: GGAATCTCAGTTGGAGCCTGGAGG, *EcoR* I, 退火温度 54℃。 *SbPRP2*-F: ACGCGTCGACATGGC-TTCCTTAAGCTCCTTA, *Sal* I; *SbPRP2*-R: GGAAT-TCTCAGAAATGGGTGTCATCAGTT, *EcoR* I, 退火温度 56℃。将扩增片段分别连接到克隆载体 pMD18-T 上,送上海生工公司测序。测序正确后,分别将连接目的基因的克隆载体用 *Sal* I 和 *EcoR* I 双酶切,回收纯化后,与用 *Sal* I 和 *EcoR* I 双酶切的植物表达载体 pRI101-AN (Takara 公司) 连接,构建成由 CaMV35S 启动子驱动目的基因的植物表达载体 PRI101-*SbPRP1* 和 PRI101-*SbPRP2*。

1.5 数据分析

采用 Excel 2003 进行数据处理及作图。

2 结果与分析

2.1 *SbPRP1* 和 *SbPRP2* 在高盐处理下的表达分析

为研究 *SbPRP1* 和 *SbPRP2* 在大豆非生物胁迫过程中的功能,通过实时荧光定量 PCR 分别检测了大豆叶片中 *SbPRP1* 和 *SbPRP2* 在高盐处理下的表达动态。结果显示(图 1),高盐处理后,*SbPRP1* 的表达量下降,均低于对照(处理 0 h)水平,在 1 h 时

表达量最低;*SbPRP2* 的表达量在处理后续升高,在 24 h 达到最大值,较对照上调 8 倍。

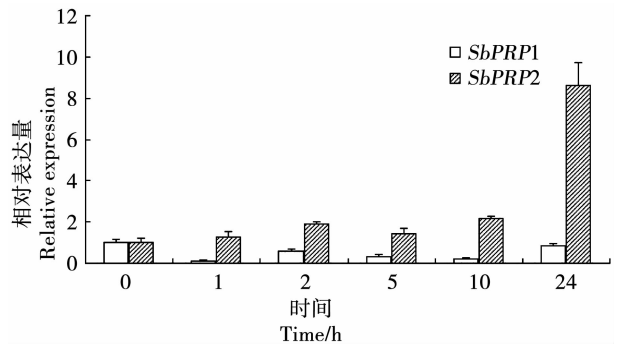


图 1 *SbPRP1* 和 *SbPRP2* 基因在盐胁迫下的表达情况
Fig. 1 Expression profile of *SbPRP1* and *SbPRP2* under salt treatment

2.2 *SbPRP1* 和 *SbPRP2* 在模拟干旱处理下的表达分析

大豆叶片中 *SbPRP1* 和 *SbPRP2* 在 PEG8000 模拟的干旱处理下的表达结果显示(图 2),*SbPRP1* 的表达量先下降后升高,在 10 h 时高于对照,到 24 h 达到最大值,较对照上调 28 倍;*SbPRP2* 在处理后的表达量迅速升高,在 1 h 时表达量达到最大值,较对照上调 10 倍,之后表达量下降并低于对照。

2.3 *SbPRP1* 和 *SbPRP2* 在低温处理下的表达分析

大豆叶片中 *SbPRP1* 和 *SbPRP2* 在低温处理下的表达结果显示(图 3),*SbPRP1* 的表达量持续下降,在 24 h 时达到最低值,低于对照 24 倍;*SbPRP2*

在处理 后 表 达 量 上 升, 到 5 h 时 达 到 最 大 值, 高 于 对 照 1.8 倍, 之 后 下 降 并 低 于 对 照。

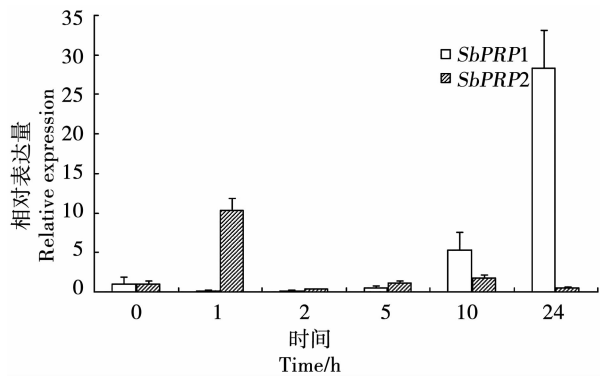


图 2 *SbPRP1* 和 *SbPRP2* 基因在干旱胁迫下的表达情况
Fig.2 Expression profile of *SbPRP1* and *SbPRP2* under drought treatment

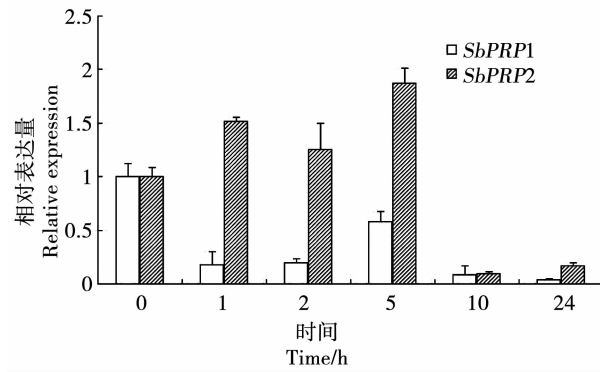


图 3 *SbPRP1* 和 *SbPRP2* 基因在低温胁迫下的表达情况
Fig.3 Expression profile of *SbPRP1* and *SbPRP2* under cold treatment

2.4 *SbPRP1* 和 *SbPRP2* 植物表达载体构建

通过 RT-PCR 分别从大豆叶片中扩增出 771 bp 的 *SbPRP1* 基因全序列和 693 bp 的 *SbPRP2* 基因全序列 (图 4), 测序结果与原序列完全一致。将 *SbPRP1* 和 *SbPRP2* 分别构建到植物表达载体 PRI101-AN 上, 经质粒双酶切鉴定 (图 5), 酶切条带与期望值一致, 说明目的基因均已整合进植物表达载体中。

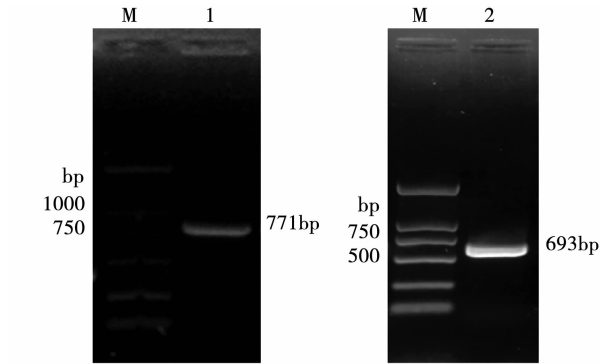
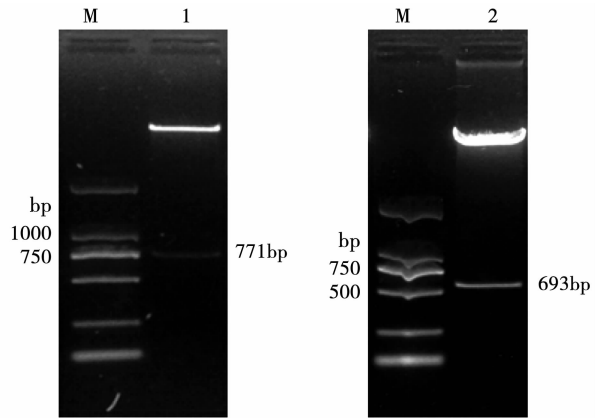


图 4 *SbPRP1* 和 *SbPRP2* 基因扩增结果
Fig.4 PCR products of *SbPRP1* and *SbPRP2*



M: DL2000 Marker; 1: *SbPRP1* 质粒双酶切产物; 2: *SbPRP2* 质粒双酶切产物。
M: DL2000Marker; 1: Products of *SbPRP1* plasmid double digestion; 2: Products of *SbPRP2* plasmid double digestion.

图 5 *SbPRP1* 和 *SbPRP2* 质粒双酶切结果
Fig.5 Products of *SbPRP1* and *SbPRP2* plasmid double digestion

3 结论与讨论

植物细胞壁直接与外界接触, 是植物应对不良环境的最初屏障, 因此可以预见植物细胞壁蛋白可能在植物抵御非生物胁迫过程中发挥重要作用。本研究对大豆中最早克隆的两个细胞壁脯氨酸富集蛋白基因 *SbPRP1* 和 *SbPRP2* 在非生物胁迫处理下的表达情况进行检测, 结果显示两个基因对非生物胁迫处理后的响应不一致。*SbPRP1* 在干旱在处理后期大量诱导表达。PRPs 的大量表达有助于细胞壁的加厚和损伤的修复^[21], 也可能通过参与调控植物中胁迫相关基因的表达来参与植物抗逆反应^[22]。而高盐和低温则抑制了 *SbPRP1* 表达。关于表达量下降的原因推测有两个, 其一可能不是 *SbPRP1* 基因转录水平下降, 而是 mRNA 分子不稳定所致, 例如菜豆 *PoPRP1* 基因的转录物在诱导剂处理后迅速下降^[23], 其二可能是 *SbPRP1* 在高盐和低温胁迫过程中发挥负调控作用, 例如海岛棉 *Gb-HyPRP1* 基因受黄萎病菌胁迫后表达量显著下调^[24]。*SbPRP2* 则可以被高盐、干旱和低温在不同时间不同程度的诱导表达, 其中高盐、干旱的诱导效果较明显。在其他植物中, PRPs 编码基因同样对各种环境胁迫存在不同形式的应答。例如, 拟南芥的 *PRP4*、*PRP11* 和 *PRP16* 可以被线虫感染诱导表达, 而 *PRP9* 和 *PRP10* 则被假单胞菌侵染诱导表达^[25]。油菜的 *BnPRP* 能够被低温诱导表达, 而高温、干旱和伤害未影响其表达^[26]。大豆中的另一个 *SbPRP* 基因, 能够被干旱和高盐诱导表达, 而脱落酸、激动素和茉莉酸甲酯则抑制其表达^[27]。由此推测 *SbPRP1* 和 *SbPRP2* 可能在大豆应对不同的非生物胁迫过程中发挥不同的作用。虽然已有的研究资料表明脯氨酸富集蛋白家族参与多种逆境胁迫,

但其介导的植物抗逆机制还未有深入研究和阐述,有待于进一步探索。

鉴于 *SbPRP1* 和 *SbPRP2* 可能在大豆应对非生物胁迫时发挥功能,将其成功构建到植物表达载体上,目前转基因烟草的转化和筛选工作正在进行中。本研究为进一步深入探讨大豆细胞壁结构蛋白中脯氨酸富集蛋白的抗逆机制及应用奠定良好基础。

参考文献

[1] 蒋炳军,岳岩磊,王彩洁,等. 大豆分子育种研究进展[J]. 大豆科学, 2012, 31(4): 662-667. (Jiang B J, Yue Y L, Wang C J, et al. Recent advances in molecular breeding of soybean[J]. Soybean Science, 2012, 31(4): 662-667.)

[2] 韩青,陈瑞,杨野,等. 植物富含脯氨酸蛋白的研究进展[J]. 植物生理学报, 2015, 51(8): 1179-1184. (Han Q, Chen R, Yang Y, et al. Progress on plant proline-rich protein[J]. Plant Physiology Journal, 2015, 51(8): 1179-1184.)

[3] 翟莹,张军,陈阳,等. 大豆 *GmPRP* 转基因拟南芥抗盐性鉴定[J]. 大豆科学, 2015, 34(2): 345-348. (Zhai Y, Zhang J, Chen Y, et al. Salt tolerance identification of soybean *GmPRP* transgenic *Arabidopsis*[J]. Soybean Science, 2015, 34(2): 345-348.)

[4] Lawton M, Lamb C. Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding and infection[J]. Molecular and Cellular Biology, 1987, 7(1): 335-341.

[5] Showalter A, Butt A, Kim S. Molecular details of tomato extensin and glycine-rich protein gene expression[J]. Plant Molecular Biology, 1992, 19(2): 205-215.

[6] Didierjean L, Frendo P, Burkard G. Stress responses in maize; Sequence analysis of cDNAs encoding glycine-rich proteins[J]. Plant Molecular Biology, 1992, 18(4): 847-849.

[7] Didierjean L, Frendo P, Nasser W, et al. Heavy metal-responsive genes in maize; Identification and comparison of their expression upon various forms of abiotic stress[J]. Planta, 1996, 199(1): 1-8.

[8] Datta K, Schmidt A, Marcus A. Characterization of two soybean repetitive proline-rich proteins and a cognate cDNA from germinated axes[J]. The Plant Cell, 1989, 1: 945-952.

[9] Kleis S, Tierney M. Isolation and characterization of a proline-rich cell wall protein from soybean seedling[J]. Plant Physiology, 1990, 94: 1897-1902.

[10] Bradley D, Kjellbom P, Lamb C. Elicitor-and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response[J]. Cell, 1992, 70(1): 21-30.

[11] Brisson L, Tenhaken R, Lamb C. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance[J]. The Plant Cell, 1994, 6(12): 1703-1712.

[12] Priyanka B, Sekhar K, Sunita T, et al. Characterization of expressed sequence tags (ESTs) of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) and functional validation of selected genes for abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2010, 283(3): 273-287.

[13] Gothandam K, Nalini E, Karthikeyan S, et al. OsPRP3, a flower specific proline-rich protein of rice, determines extracellular matrix structure of floral organs and its overexpression confers cold-toler-

ance[J]. Plant Molecular Biology, 2010, 72(1): 125-135.

[14] Zhang Y, Schläppi M. Cold responsive EARL1 type HyPRPs improve freezing survival of yeast cells and form higher order complexes in plants[J]. Planta, 2007, 227(1): 233-243.

[15] Zhan X, Wang B, Li H, et al. *Arabidopsis* proline-rich protein important for development and abiotic stress tolerance is involved in microRNA biogenesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(44): 18198-18203.

[16] 吕高强,吴向阳,王心宇. 芝麻中一个富含脯氨酸新基因的克隆与特征分析[J]. 作物学报, 2015, 41(12): 1810-1818. (Lyu G Q, Wu X Y, Wang X Y. Cloning and characterization of a novel gene encoding proline-rich protein in sesame[J]. Acta Agronomica Sinica, 2015, 41(12): 1810-1818.)

[17] Hong J, Nagao R, Key J. Characterization and sequence analysis of a developmentally regulated putative cell wall protein gene isolated from soybean[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1987, 262(17): 8367-8376.

[18] Hong J, Nagao R, Key J. Characterization of a proline-rich cell wall protein gene family of soybean[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(5): 2470-2475.

[19] Hong J, Nagao R, Key J. Developmentally regulated expression of soybean proline-rich cell wall protein genes[J]. The Plant Cell, 1989, 1: 937-943.

[20] Wyatt R, Nagao R, Key J. Patterns of soybean proline-rich protein gene expression[J]. The Plant Cell, 1992, 4: 99-110.

[21] 柴团耀,张玉秀. 菜豆富含脯氨酸蛋白质基因在生物和非生物胁迫下的表达[J]. 植物学报, 1999, 41(1): 111-113. (Chai T Y, Zhang Y X. Gene expression analysis of a proline-rich protein from bean under biotic and abiotic stress[J]. Acta Botanica Sinica, 1999, 41(1): 111-113.)

[22] 张德静,秦丽霞,李龙,等. 异源表达棉花 *GhPRP5* 基因增强了拟南芥对盐和 ABA 的敏感性[J]. 作物学报, 2013, 39(3): 563-569. (Zhang D J, Qin L X, Li L, et al. Expression of cotton *GhPRP5* gene in *Arabidopsis* enhances susceptibility to ABA and salt stresses[J]. Acta Agronomica Sinica, 2013, 39(3): 563-569.)

[23] Sheng J, Dovidio R, Mehdy M. Negative and positive regulation of a novel proline-rich protein mRNA by fungal elicitor and wounding[J]. The Plant Journal, 1991, 1(3): 345-354.

[24] 杨君,张艳,王伟巧,等. 海岛棉 *GbHyPRP1* 克隆及其转基因拟南芥抗黄萎病验证[J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(3): 594-602. (Yang J, Zhang Y, Wang W Q, et al. Cloning of *Gb-HyPRP1* from *Gossypium barbadense* and validation of *Verticillium* wilt resistance in transgenic *Arabidopsis*[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2015, 16(3): 594-602.)

[25] Showalter A, Keppler B, Lichtenberg J, et al. A bioinformatics approach to the identification, classification, and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins[J]. Plant Physiology, 2010, 153(2): 485-513.

[26] Goodwin W, Pallas J, Jenkins G. Transcripts of a gene encoding a putative cell wall-plasma membrane linker protein are specifically cold-induced in *Brassica napus* [J]. Plant Molecular Biology, 1996, 31(4): 771-781.

[27] He C, Zhang J, Chen S. A soybean gene encoding a proline-rich protein is regulated by salicylic acid, an endogenous circadian rhythm and by various stresses[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 104(6-7): 1125-1131.