

GmHs1^{pro-1} 多样性分析及蛋白互作预测

杨若巍¹,赵思阳²,李帆¹,于佰双³,陈井生⁴,王惠¹,段玉玺²

(1. 沈阳农业大学 生物科学技术学院,辽宁 沈阳 110866; 2. 沈阳农业大学 植物保护学院,辽宁 沈阳 110866; 3. 黑龙江省农业科学院,黑龙江 哈尔滨 150086; 4. 黑龙江省农业科学院 大庆分院,黑龙江 大庆 163319)

摘要: *GmHs1^{pro-1}* 是 *Hs1^{pro-1}* 同源的抗线虫候选基因,通过使用不同的大豆品种克隆 *GmHs1^{pro-1}* CDS 区研究了其多样性、建立了进化树,并利用在线数据库分析预测了与其互作的蛋白。结果表明:在 24 种大豆品种中均克隆到长度约 1 400 bp 的 *GmHs1^{pro-1}* CDS 区,同已有数据合并后该区段共有 20 个突变点,5 个新突变点中的 3 个引起了编码氨基酸的变化。*GmHs1^{pro-1}* 可能主要同 glyma18g04770 编码的蛋白互作,该蛋白受 syringolide 诱导。*GmHs1^{pro-1}* 定位在胞浆内,具有 1 个吡啶化合物双加氧酶类似结构域,可能参与吡啶相关通路影响线虫发育。

关键词: 抗性基因; *GmHs1^{pro-1}*; 互作预测

中图分类号: **文献标识码:** A **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2017. 02. 0208

GmHs1^{pro-1} Diversity Analysis and Interaction Protein Prediction

YANG Ruo-wei¹, ZHAO Si-yang², LI Fan¹, YU Bai-shuang³, CHEN Jing-sheng⁴, WANG Hui¹, DUAN Yu-xi²

(1. College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 3. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 4. Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: *GmHs1^{pro-1}* is a homology candidate gene of *Hs1^{pro-1}*. We cloned its CDS region in different soybean varieties to discuss its diversity. And then we established cladograms, predicted its interaction proteins. The results showed that we cloned the CDS of *GmHs1^{pro-1}* successfully. There were 20 mutations in all sequences and 3 of the 5 novel mutations altered its primary structure. *GmHs1^{pro-1}* may interact with a protein encoding by glyma18g04770. This protein was induced by syringolide. *GmHs1^{pro-1}* located in cytoplasm, contains an indolic compounds 2,3-dioxygenase-like domain. It may restrain nematodes growth by the indole relevant pathways.

Keywords: Resistant gene; *GmHs1^{pro-1}*; Interaction prediction

大豆是最重要的油料作物之一,产量受到大豆胞囊线虫制约严重。现有抗性基因远不能满足大豆育种的需求,发掘新抗性基因十分重要。

Hs1^{pro-1} 是第一个被确定的抗线虫基因, *Hs* 源于 *Heterodera schachtii*, *pro-1* 说明该片段源自 *Beta procumbens* 的 1 号染色体^[1-3]。转入该基因的甜菜根内雌虫数量下降且发育受到严重的抑制,胞囊小而瘪^[4]。*Hs1^{pro-1}* 的表达不受茉莉酸、水杨酸等分子的诱导,仅线虫侵入可以诱导该基因的上调表达^[5], 这点不同于其它参与防卫反应的基因,可能在植物寄生线虫与寄主互作过程中存在一个新的通路。

GmHs1^{pro-1} 作为 *Hs1^{pro-1}* 同源基因,通过比较基因组学被发现,编码 437 个氨基酸,蛋白质一级结构被识别出 1 个与 *Hs1^{pro-1}* 相似的 LRR 域,该结构域的存在被认为与抗线虫活性相关^[6]。*GmHs1^{pro-1}* 在线虫侵入后短期即高倍的上调表达^[7-8],但其参与的生化过程和相关互作蛋白仍未明确。

本文在前人工作的基础上,选择 24 个大豆品种克隆 *GmHs1^{pro-1}* CDS 区检测多样性,预测功能与互作网络,旨在为 *GmHs1^{pro-1}* 的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

抗线虫大豆品种(表 1)及大豆胞囊线虫 3 号生理小种(race 3)由沈阳农业大学北方线虫研究所保存。RNA 提取试剂盒 Ultrapure RNA Kit 购自康为世纪,GoTaq® Green Master Mix 购自沈阳汇佰生物科技有限公司。反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Master Mix、pMD™ 19 克隆载体及 *E. coli* JM109 感受态细胞购自 Takara 公司,引物合成及测序交由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 样品准备 繁育大豆胞囊线虫二龄幼虫(J2)后制备 1 000 条·mL⁻¹ 的幼虫悬液用于接种。

收稿日期:2016-12-15
基金项目:国家自然科学基金(31330063)。
第一作者简介:杨若巍(1992-),男,硕士,主要从事大豆胞囊线虫抗性基因相关研究。E-mail:414042232@qq.com。
通讯作者:王惠(1972-),女,博士,副教授,主要从事大豆抗病、抗逆机制和分子生物学研究。E-mail:wanghuisyau@sina.com;
段玉玺(1964-),男,教授,博导,主要从事植物病理学和植物线虫学研究。E-mail:duanyx6407@163.com。

大豆种子表面经次氯酸钠消毒后无菌水冲洗 5 次后种植于沙土比 1:1 的灭菌沙土内,长出 2 片真叶后每株苗接种 2 mL 二龄幼虫悬液,接种后 20 d (20 dpi) 取样,液氮速冻 -82℃ 保存。

表 1 参试大豆品种
Table 1 Tested soybean varieties

种名	国家编号	种名	国家编号
Cultivar	Serial No.	Cultivar	Serial No.
Peking	WDD467	应县小黑豆	ZDD2226
黑豆	ZDD10253	Yingxianxiaoheidou	ZDD2255
Heidou		五寨黑豆	
蒙 81104	ZDD11461	Wuzhaiheidou	ZDD2315
Meng 81104		灰皮支黑豆	
长粒黑豆	ZDD1400	Huipizhiheidou	ZDD2341
Changliheidou		平顶山黑豆	
延庆大黑豆	ZDD1519	Pingdingshanheidou	ZDD2344
Yanqingdaheidou		平顶山黑豆	
薄地鞑黑豆	ZDD1818	Pingdingshanheidou	ZDD2450
Bodijiangheidou		小粒黑豆	
黑豆	ZDD1858	Xiaoliheidou	ZDD3458
Heidou		商丘滚龙珠	
小白黑豆	ZDD1884	Shangqiugunlongzhu	ZDD7748
Xiaobaiheidou		磨石豆	
小白花黑豆	ZDD1889	Moshidou	ZDD8459
Xiaobaihuaheidou		小粒黑豆	
黑豆	ZDD1897	Xiaoliheidou	ZDD8483
Heidou		黑豆	
黑豆	ZDD1898	Heidou	ZDD8750
Heidou		大屯小黑豆	
黑豆	ZDD1910	Datunxiaohaidou	ZDD9462
Heidou		二黑豆	
		Erheidou	

表 2 *GmHs1^{pro-1}* 类似蛋白信息
Table 2 The proteins *GmHs1^{pro-1}* like

基因编号	物种	基因编号	物种
GeneBank ID	Species	GeneBank ID	Species
NP_191143.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	XP_009760237.1	<i>Nicotiana sylvestris</i>
XP_013663480.1	<i>Brassica napus</i>	XP_006645040.1	<i>Oryza brachyantha</i>
XP_009143261.1	<i>Brassica rapa</i>	XP_015638006.1	<i>Oryza sativa</i>
XP_010504453.1	<i>Camelina sativa</i>	AAB48305.1	<i>Patellifolia procumbens</i>
XP_004503236.1	<i>Cicer arietinum</i>	XP_007163524.1	<i>Phaseolus vulgaris</i>
XP_008441443.1	<i>Cucumis melo</i>	XP_011042484.1	<i>Populus euphratica</i>
XP_011656406.1	<i>Cucumis sativus</i>	XP_002312148.2	<i>Populus trichocarpa</i>
XP_010923088.1	<i>Elaeis guineensis</i>	XP_002526872.1	<i>Ricinus communis</i>
XP_011469897.1	<i>Fragaria vesca</i>	XP_010554653.1	<i>Tarenaya hassleriana</i>
XP_012448078.1	<i>Gossypium raimondii</i>	XP_007009053.1	<i>Theobroma cacao</i>
XP_012087761.1	<i>Jatropha curcas</i>	XP_014505425.1	<i>Vigna radiata</i>
XP_008392934.1	<i>Malus domestica</i>	XP_002268520.1	<i>Vitis vinifera</i>
XP_003600866.1	<i>Medicago truncatula</i>	NP_001151109.2	<i>Zea mays</i>
XP_009419729.1	<i>Musa acuminata</i>	NP_001236610.1	<i>Glycine max</i>
XP_010262802.1	<i>Nelumbo nucifera</i>		

1.2.2 RNA 提取及反转录 按照 Ultrapure RNA Kit 说明提取大豆根部总 RNA, NanoVue 检测 RNA 质量,使用 PrimeScript™ RT Master Mix 反转录获得 cDNA,反转录体系 20 μL 内含 1 μg 总 RNA。

1.2.3 *GmHs1^{pro-1}* 编码区序列克隆测序 根据 Yuan 等^[6] 的文献合成引物,使用 GoTaq® Green Master Mix 进行 PCR,每样品 50 μL 体系,纯化后连接 pMD™19 载体,连接产物 10 μL 全部转入感受态细胞,热激转化后 37℃ 金属浴上 300 r·min 孵育 1 h 后涂布 Amp⁺ LB 平板 (IPTG X-Gal)。37℃ 培养过夜后 4℃ 保存 4 h 后挑取阳克隆菌液 PCR 后 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,有条带的菌液样品送由苏州金唯智生物科技有限公司测序。

1.2.4 *GmHs1^{pro-1}* 编码区多样性分析 于 NCBI 上下载 *GmHs1^{pro-1}* 基因 CDS 区 (NM_001249681.1) SNP 信息,设置 SNP 组 Ref_SNP_SEQ 和参考序列 Ref_SEQ 用于组内对照。测序结果使用 CExpress 拼接并截取 CDS 区进行 Clustal Ω 多重序列比对后导入 MEGA7 分析多样性位点后建立 NJ 树,Bootstrap 法检验设置 1 000 重复。

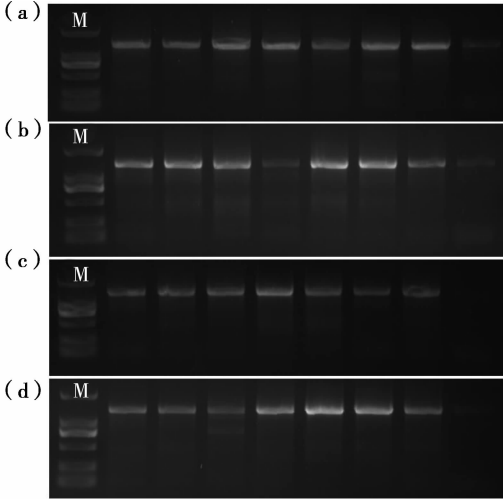
使用 NM_001249681.1 进行 BLASTx,下载包括大豆 *GmHs1^{pro-1}* 在内的 29 条与 *GmHs1^{pro-1}* 类似的蛋白一级结构数据 (表 2) 进行 Clustal Ω 比对并建立 NJ 树,Bootstrap 法检验设置 1 000 重复。

1.2.5 *GmHs1^{pro-1}* 蛋白互作、GO 注释及亚细胞定位预测 在 String 10 数据库预测 *GmHs1^{pro-1}* 蛋白的互作信息,利用 Soybase 与 NCBI 添加注释后使用 Cytoscape 排列互作蛋白信息,预测 *GmHs1^{pro-1}* 蛋白功能,使用 AmiGO 2 及 WEGO 对互作蛋白进行 GO 注释及富集。利用 WoLF PSORT 与 Cell-PLoc 对 *GmHs1^{pro-1}* 蛋白进行亚细胞定位预测。

2 结果与分析

2.1 *GmHs1^{pro-1}* 编码区序列克隆

使用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测阳克隆(图 1), 在 1 000 ~ 2 000 bp 处有均一条带出现, 指示出的大小与编码区(1 477 bp)大小一致, 说明已克隆到 *GmHs1^{pro-1}* 基因编码区序列。



M: Marker D2000; Bands arranged in descending order are 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp in turn.

图 1 电泳检测 *GmHs1*^{pro-1} 克隆

Fig. 1 Electrophoresis results with *GmHs1*^{pro-1} cloning

2.2 *GmHs1^{pro-1}* 编码区多样性分析

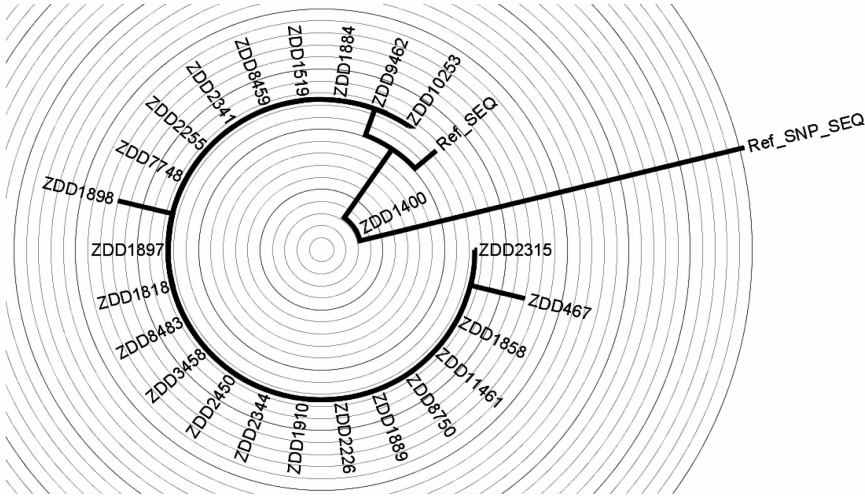
测序结果与 NCBI 数据合并比对后发现在 12,

109,150,167,185,323,325,441,460,551,569,591,592,837,838,968,1 009,1 017,1 236 和 1 302 bp 处有变异存在,11 个位点引发氨基酸改变(表 3)。在 109,551 和 569 bp 3 个位点处的氨基酸改变未报道(表 3 实心圆点),441 和 591 bp 的同义突变之前未见报道(表 3 空心圆点)。

建立 NJ 树(图 2)表明 *GmHs1^{pro-1}* 基因编码的蛋白质一级结构在不同品种大豆中保守性极强,仅存在个别位点的变异。其同源蛋白在豆科(*Leguminosae*)、十字花科(*Brassicaceae*)、禾本科(*Gramineae*)等不同植物间分别聚类(图 3),表明其结构仍较为保守。

表 3 *GmHs1^{pro-1}* 多样性分析
Table 3 The diversity analysis of *GmHs1^{pro-1}*

位置	碱基	氨基酸		位置	碱基	氨基酸	
Site	N-Base	Amino acid		Site	N-Base	Amino acid	
12	A→T	L		569	G→A	G→E	●
109	C→A	L→I	●	591	T→C	G	○
150	T→A	P		592	T→C	L	
167	A→G	D→G		837	G→A	A	
185	C→T	P→L		838	G→T	V→L	
323	A→G	N→S		968	T→G	F→C	
325	A→C	K→Q		1009	A→G	N→D	
441	T→C	T	○	1017	G→A	R	
460	G→A	G→S		1236	C→T	T	
551	C→T	S→L	●	1302	C→T	Y	



Ref_SEQ: *GmHs1*^{pro-1} 基因 NCBI 参考序列; REF_SNP_SEQ: 含有已知 SNP 位点的 *GmHs1*^{pro-1} 序列。
Ref_SEQ: NCBI reference sequence of *GmHs1*^{pro-1}; REF_SNP_SEQ: *GmHs1*^{pro-1} sequence including SNP.

图2 NJ 树验证 *GmHs1^{pro-1}* 多样性

Fig. 2 The NJ-cladogram proving *GmHs1*^{pro-1} diversity

2.3 GmHsl^{pro-1} 蛋白互作、GO 注释及亚细胞定位预测

通过预测发现 GmHsl^{pro-1} 与 5 个蛋白有共表达 (图 4), 这些蛋白的功能与干旱、机械损伤等功能相

关(表4)。互作富集于 glymal18g04770,该基因编码受 syringolide 诱导的蛋白,Smith 等^[9-11]的研究表明 syringolide 诱导植物细胞 Ca^{2+} 离子流入与防卫反应,参与抗病过程。其蛋白产物与 GmHsl1^{pro-1} 共表达

可能在识别病原入侵信号后联合 WRKY 转录因子 (glyma08g02580) 和 SCOF-1 (glyma17g35430) 调控并影响 *GmHs1^{pro-1}* 积累量, 而 *GmHs1^{pro-1}* 甜菜内的表达严重抑制甜菜胞囊线虫的发育^[4], 这或许是造成寄生线虫的发育受到抑制的原因。

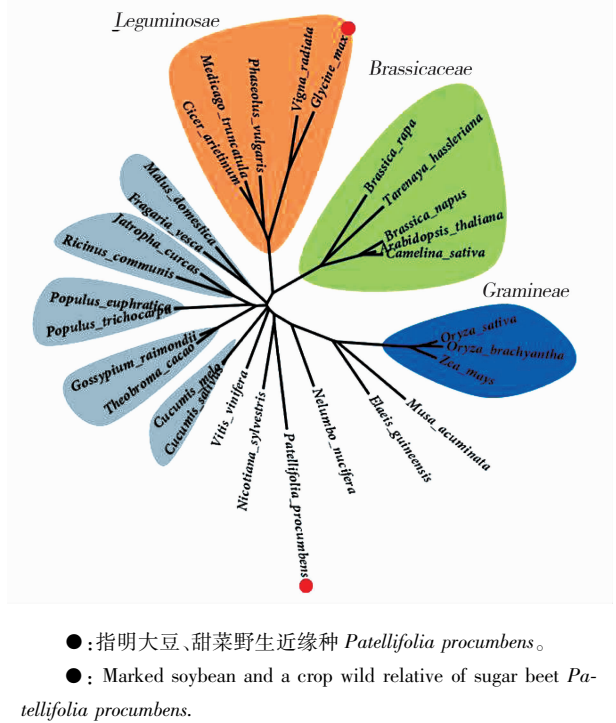


图 3 *Hs1^{pro-1}* 在不同物种间的 NJ 进化树

Fig. 3 The NJ-cladogram of *Hs1^{pro-1}* in different species

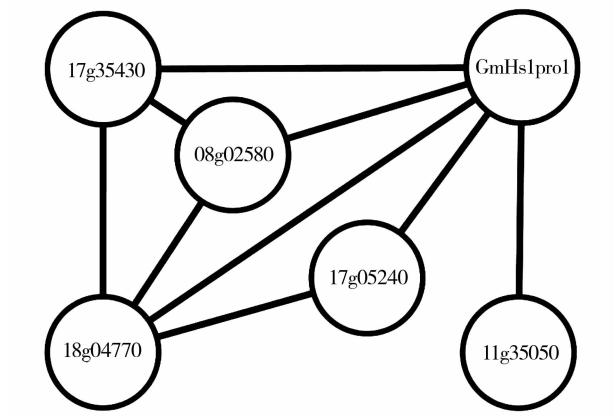


图 4 *GmHs1^{pro-1}* 互作分析

Fig. 4 Interaction analysis of *GmHs1^{pro-1}*

表 4 与 *GmHs1^{pro-1}* 共表达的基因

Table 4 The co-expression genes with *GmHs1^{pro-1}*

基因号	登录号	描述
Gene call	Accession	Definition
glyma08g02580	XM_003530331.3	WRKY 候选转录因子 41
glyma11g35050	XM_003552422.3	抗线虫蛋白 HSPRO2
glyma17g05240	NM_001251571.1	脱水反应元件结合蛋白 3
glyma17g35430	NM_001248684.1	scof - 1 蛋白
glyma18g04770	NM_001251665.1	syringolide 响应蛋白 13 - 1 - 1

使用 AmiGO 2 注释互作基因功能, 得到以下 GO term: GO:0006355、GO:0003700、GO:0043565、GO:0006952、GO:0003677、GO:0046872、GO:0016567、GO:0004842、GO:0005488。使用 WEGO 对得到的 GO term 进行富集后 (图 5), *GmHs1^{pro-1}* 及其互作基因在防卫反应、结合等功能下富集。

利用 WoLF PSORT 与 Cell-PLoc 预测 *GmHs1^{pro-1}* 蛋白在植物胞浆内定位 (图 6), 因线虫通过口针取食由普通细胞发育成的合胞体内的养分, 取食分子量大小 20 kD, 而 *GmHs1^{pro-1}* 的分子量近 50 kD, 显然不能被线虫直接取食。

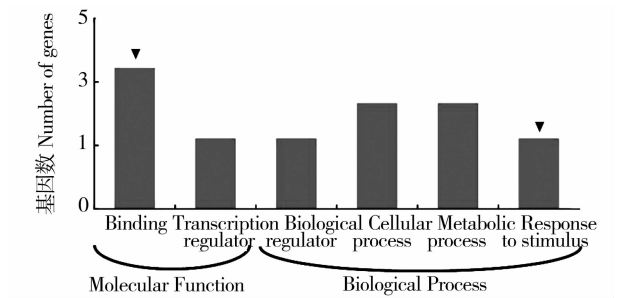


图 5 *GmHs1^{pro-1}* 互作蛋白的 GO 注释富集

Fig. 5 GO enrich of interaction proteins with *GmHs1^{pro-1}*

----- Plant-PLoc Computation Result -----

Accession number	Predicted location(s)	Prediction approach
PGmHs1	Cytoplasm	By fusing PseAA composition

WoLF PSORT Prediction

k used for kNN is:14

148066717511626 details cyto:12,chlo:2

图 6 利用软件预测 *GmHs1^{pro-1}* 亚细胞定位

Fig. 6 Subcellular localization predicted of *GmHs1^{pro-1}*

3 结论与讨论

3.1 *GmHs1^{pro-1}* 种内保守, 发现 5 个新的变异位点

对于变异的检测新发现了在 109,441,551,569 和 591 bp 的变异, 这些变异在品种间似乎并不存在规律; 其中位于 109,551 和 569 bp 的变异引起编码氨基酸的改变, 或许会对蛋白质功能产生影响。 *GmHs1^{pro-1}* 与 *Hs1^{pro-1}* 在 LRR 域上较为保守但在遗传距离上较远, 与豆科 (Leguminosae) 其它种距离很近。

3.2 *GmHs1^{pro-1}* 可能调控其它基因

GmHs1^{pro-1} 作为通过比较基因组学发现的新抗线虫候选基因, 其功能应与其同源的甜菜 *Hs1^{pro-1}* 基因一致, 但是仍能发现 *Hs1^{pro-1}* 在大豆 (*Glycine max*) 与 *Patellifolia procumbens* (*Beta procumbens*) 遗传距离较远 (图 3 圆形标记)。虽然 *GmHs1^{pro-1}* 含有与 *Hs1^{pro-1}* 较为相似的 LRR 域^[6] 但没有 *Hs1^{pro-1}* 类似的跨膜结构域。所以其在细胞内的定位很可能影响线虫能量摄入与能量代谢, 通过调控糖类等能量物

质供给抑制线虫发育。

3.3 GmHs1^{pro-1}抗线虫机理仍待研究

GmHs1^{pro-1}更多的被注释到防卫反应、结合(图5倒三角标记)等功能,表明很可能存在一个新的代谢通路,使得 GmHs1^{pro-1} 在不受茉莉酸、水杨酸等物质的诱导表达^[5]的前提下参与更多的胁迫响应与防卫反应。利用蛋白数据库 InterPro 注释 GmHs1^{pro-1}功能时,在 GmHs1^{pro-1}_C 结构域内识别出吡啶化合物双加氧酶(indolic compounds 2,3-dioxygenase)类似域,据此推测该代谢通路可能与吡啶化合物相关,以色氨酸或吡啶为着手点或有助于解释其功能。GmHs1^{pro-1}作用机理仍未明确,通过表达与干扰、敲除等手段验证其功也是较好的研究方法。

现有蛋白与互作数据库仍不完善,以 GmHs1^{pro-1}为代表许多新功能的蛋白仍无法很好的通过生物信息学预测其功能与上下游互作网络,但仍可以通过数据库推测其功能。

参考文献

[1] Lange W, Müller J, Bock T S M De. Virulence in the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii*) versus some alien genes for resistance in beet[J]. Fundamental & Applied Nematology, 1993, 16 (5): 447-454.

[2] Salentijn E, Sandal N N, Klein-Lankhorst R, et al. Long-range organization of a satellite DNA family flanking the beet cyst nema-

tode resistance locus (Hs1) on chromosome-1 of *B. patellaris* and *B. procumbens*[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1994, 89: 459-466.

[3] Salentijn E M J. Molecular characterization of the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii*) resistance locus Hs1 [D]. Wageningen: CPRO-DLO, 1995.

[4] Cai D, Kleine M, Kifle S, et al. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet[J]. Science, 1997, 275: 832-834.

[5] Thurauf T, Kifle S, Jung C, et al. The promoter of the nematode resistance gene *Hs1^{pro-1}* activates a nematode-responsive and feeding site-specific gene expression in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Molecular Biology, 2003, 52: 643-660.

[6] Yuan C P, Zhou G A, Li Y H et al. Cloning and sequence diversity analysis of *GmHs1^{pro-1}* in Chinese domesticated and wild soybeans[J]. Molecular Breeding, 2008, 22: 593-602.

[7] Wei L, Li Y H, Lu W G, et al. Inducing expression analysis of *Gmhs1^{pro-1}* by inoculating soybean cyst nematode 4 race[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2011, 19: 77-84.

[8] Wang F. Xiaohaidou SSH-cDNA library construction and expression analysis of important genes under *Heterodera glycines* infection [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2012.

[9] Smith M J, Mazzola E P. The syringolides: Bacterial C-glycosyl lipids that trigger plant disease resistance [J]. ChemInform, 1993, 34: 223-226.

[10] Keen N, Midland S, Boyd C L, et al. Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions [M]. Netherlands: Springer, 1994, 41-48.

大豆异黄酮的营养价值和相关功效

大豆异黄酮是黄酮类化合物,是大豆生长中形成的一类次级代谢产物,是一种生物活性物质。由于是从植物中提取,与雌激素有相似结构,因此大豆异黄酮又称植物雌激素。异黄酮是一种弱的植物雌规划计划经济激素,大豆是人类获得异黄酮的惟一有效来源。在每 100 g 大豆样品中,含异黄酮 128 mg,传统方法生产的分离蛋白含异黄酮 102 mg,而豆乳中含 9.65 mg,因为豆乳含水 93.27%,相当于干物质中每 100 g 也含异黄酮 100 mg 以上。豆腐中含异黄酮 27.74 mg,其干物质含异黄酮 200 mg 以上。日本食品科学家的研究证实,大豆的刚刚发育的胚芽中,异黄酮的含量与活性最高,其雌激素最容易被人体吸收。

大豆异黄酮可防治一些和雌激素水平下降有关的疾病,延缓女性衰老、改善更年期症状、骨质疏松、血脂升高、乳腺癌、前列腺癌、心脏病、疏松症、心血管疾病等。在雌激素生理活性强的情况下,异黄酮能起抗雌激素作用,降低受雌激素激活的癌症如乳腺癌的风险,而当妇女绝经时期雌激素水平降低,异黄酮能起到替代作用,避免潮热等停经期症状发生。异黄酮的抗癌特性十分突出,能阻碍癌细胞的生长和扩散,而且只对癌细胞有作用,对正常细胞并无影响。异黄酮还是一种有效的抗氧化剂,能阻止氧自由基的生成,而氧自由基是一种强致癌因素,异黄酮的抗癌作用有多种方式和途径。对于高雌激素水平者,表现为抗激素活性,可防治乳腺、子宫内膜、结肠、前列腺、肺、皮肤等癌细胞的生长和白血病,及其它心血管疾病。大豆异黄酮显著的降低了乳腺癌的发病率,产生这种结果被认为是与它的产物植物雌激素有关。研究还指出在平时多食用富含大豆异黄酮的食物有助于抑制前列腺癌细胞的生长,那些多吃低脂肪,富含大豆蛋白食品的人患前列腺癌的概率会更低。