

大豆脯氨酸生物合成相关基因 *Glyma01g24530* 的功能预测及表达分析

陈 薇,王 涛,李冬梅,李 悦,李永光,李文滨

(东北农业大学 大豆研究所/大豆生物学教育部重点实验室/农业部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要:干旱胁迫下的脯氨酸积累在许多植物中都存在,人们普遍认为脯氨酸含量的提高促进了植物对干旱胁迫的抵抗能力。拟南芥中研究发现, Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸合成酶基因 *P5CS1* 是一种限速酶用来催化脯氨酸生物合成,对脯氨酸非常重要。本研究通过生物信息学及荧光定量 PCR 对大豆中的 *P5CS1* 同源基因 *Glyma01g24530* 进行了初步的功能分析和表达模式验证。结果发现:*Glyma01g24530* 具有保守的 N 端乙酰谷氨酸合成酶激酶结构域和 N 端乙酰谷氨酸合成酶激酶结构域,系统进化树显示与各植物中 *P5CS* 家族成员相似性很高,启动子顺式作用元件序列分析表明该基因存在逆境胁迫、光反应等元件。表达模式分析显示 *Glyma01g24530* 可以被干旱、盐诱导表达,并在多数组织中表达。

关键词:大豆; 脯氨酸;*Glyma06g28890*;植物抗逆

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2017.05.0705

Functional Prediction and Expression Analysis of Proline Synthetase Related Gene *Glyma01g24530*

CHEN Wei, WANG Tao, LI Dong-mei, LI Yue, LI Yong-guang, LI Wen-bin

(Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education/Key Laboratory of Soybean Biology and Breeding(Genetics) of Chinese Agriculture Ministry, Soybean Research Institute, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Free proline can accumulate to high levels under drought-stress in many plants, and it is widely acknowledged that the increase of proline content could promote the plant resistant to drought stress. The study in *Arabidopsis thaliana* found that Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase (*P5CS*) catalyzed the rate-limiting enzyme in the biosynthesis of proline and played an important role in the biosynthesis of proline. In this study, function and expression of *P5CS1* homologous gene in soybean *Glyma01g24530* was analyzed through bioinformatics and real-time quantitative PCR. We found that *Glyma01g24530* had conservative N-acetylglutamate synthase, kinase-like domain and Aldehyde dehydrogenase domain structure. Phylogenetic tree showed that *Glyma01g24530* had high similarity with *P5CS1* family members in many plants. We also found that there were multiple cis-elements about abiotic stress responses, light responsiveness in its promoter sequence region through the statistics of promoter cis-elements. Expression pattern analysis showed *Glyma01g24530* could be induced by drought and salt, it could express in many tissues.

Keywords: Soybean; Proline; *Glyma06g28890*; Plant stress resistance

植物在干旱等胁迫压力下会积累高水平的游离脯氨酸。脯氨酸具有很多化学特性,包括高溶解性和两性离子结构,是常见的起保护作用的细胞相容性物质^[1]。植物体内脯氨酸的含量,往往在逆境条件时会显著增加。因此,可将脯氨酸在植物体内的含量多少作为反映植物是否具有抗逆性的一个指标,然而以往植物体内脯氨酸含量较多的品种大多是抗旱性强的品种,因此植物体内脯氨酸的含量常常被用来当作检测抗旱性的生理指标^[2]。

在 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸合成酶(*P5CS*)和 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸还原酶的作用下(*P5CR*),谷氨酸被合成了脯氨酸。相反,植物通过脯氨酸脱氢酶(*PDH*)和 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸脱氢酶(*P5CDH*)

将脯氨酸分解代谢为谷氨酸^[3-4]。拟南芥 *P5CS1* 和 *PDH1* 基因的表达模式表明在逆境胁迫期间,光合组织中的脯氨酸合成得到促进而脯氨酸分解代谢受到了抑制;不过在根和茎分生组织区域脯氨酸的分解代谢依然有很高的速率^[5]。

近些年来,*P5CS* 基因的功能在许多物种中得到了发现和证实。拟南芥 *P5CS1* 的表达可以被各种类型的非生物胁迫诱导^[6-8]。拟南芥 *p5cs1* 突变体中脯氨酸的积累受到了限制,过表达 *P5CS1* 植株的脯氨酸的积累得到了促进,对 *P5CS1* 的酶性质研究表明 *P5CS1* 是脯氨酸积累合成过程中的一种限速酶^[9]。研究人员利用水稻高脯氨酸变异系为材料进行试验,发现 *P5CS* 基因的存在及其转录水平的

收稿日期:2017-03-28
基金项目:黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划(UNPYSCT-2016005);抗逆转基因大豆新品种培育(2016ZX08004002)。
第一作者简介:陈薇(1991-),女,硕士,主要从事作物遗传育种研究。E-mail:573972148qqcom@sina.com。
通讯作者:李文滨(1958-),男,教授,博导,主要从事作物遗传育种研究。E-mail:wenbinli@neau.edu.cn。

提高与水稻高脯氨酸特性和高耐盐性有相关性^[10]。罗布麻和胡杨属于沙生植物,能够合成并积累大量的渗透胁迫调节物质,对于干旱胁迫具有极强的耐受能力,研究人员从它们体内分离克隆新的 *P5CS* 基因并转入到烟草中,发现在逆境条件下,转基因烟草与对照烟草体内游离脯氨酸水平均有较大幅度的提高^[11]。除了在植物逆境胁迫中发挥作用外,最近的研究还发现过表达拟南芥 *P5CS* 基因可以促进植物开花,这一发现拓展了对 *P5CS* 基因功能的认识^[12]。

虽然在各类植物中 *P5CS* 及其同源基因都已有广泛研究,但是在大豆中鲜有报道。本研究对拟南芥 *P5CS1* 在大豆中的同源基因 *Glyma01g24530* 进行了一系列生物信息学的分析,为大豆该基因的深入研究和应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆品种为东农 50,由东北农业大学大豆研究所保存。

DNA 序列的测定以及引物由上海生工公司完成;实时荧光定量、cDNA 试剂盒均购自天根公司。

1.2 大豆 Glyma01g24530 序列分析

分析启动子顺式作用元件:在植物基因组数据库 phytome (<https://phytozome.jgi.doe.gov>) 上搜索 *Glyma01g24530* 起始密码子上游 2 000 bp 作为目的序列用来分析启动子顺式作用元件,而后利用 Soft-Berry 网站进行转录起始位点的预测,再利用在线启动子分析网站 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行启动子顺式作用元件的搜索分析。利用 TSSP (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=tssp&group=help&subgroup=promoter>) 进行转录起始位点的在线预测;利用网站 <http://www.ebi.ac.uk/interpro/> 进行蛋白质结构的在线预测;氨基酸序列比对软件:DNAMAN;同源比对、进化树的分析软件:MEGA5.1。

1.3 Glyma06g28890 基因的表达模式分析

1.3.1 *Glyma06g28890* 基因在不同处理条件下的表达 将挑选好的东农 50 大豆种子接种于蛭石中,大约 14 d 后待幼苗长出三出复叶时开始做水培处理。在培养液中分别加入 50 mmol·L⁻¹ NaCl、4% PEG,水营养液作为对照。分别取不同时间(0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h)处理的叶片进行 RNA 提取,反转

录成 cDNA。

1.3.2 *Glyma06g28890* 基因组织特异性分析

(1)材料准备:将挑选好的东农 50 大豆种子置于 25℃ 光照培养箱中进行培养,光照条件为:250 μmol·m⁻²·s⁻¹ 白光,长日照(16 h 光照/8 h 黑暗)处理,萌发 20 d 左右后,对大豆的各个部位进行取材,待开花后取花,成熟后再取莢及种子,分别提取 RNA,后置于 -80 冰箱冻存。

(2)定量分析:定量机器为 Chromas 4 (BioRad, USA),定量 PCR 试剂为 SuperRealPreMix (SYBR Green) (Tiangen, 中国)。

将提取的 RNA 进行反转录 cDNA,之后分析基因的表达水平。定量引物序列如下:*Glyma01g24530*-F: 5'-TTCGTCAGCATCAAACCCTCC-3', *Glyma01g24530*-R: 5'-TGCCAAGACCAACAGCACCT-3';定量内参基因采用 *Actin4*, 其引物序列为:*Actin4*-F: 5' GTGTCAGC-CATACTGTCCCCATTT3', *Actin4*-R: 5' GTTTCAGCTCT-TGCTCGTAATCA3'。

每个组织样品做 3 次重复,PCR 检测反应程序:94℃ 10 min 预变性;94℃ 10 s 变性;60℃ 30 s 复性;72℃ 30 s 延伸;35 个循环;4℃ 终止反应。再将基因在不同组织中的相对表达量按照 2^{-ΔΔCt} 方法计算。

2 结果与分析

2.1 *Glyma01g24530* 序列分析

大豆 *Glyma01g24530* 基因位于 1 号染色体上,cDNA 的全长是 2 848 bp,包含 1 个 2 268 bp 的开放阅读框,编码 755 个氨基酸,估计分子量 82 135.1 Da,理论等电点 6.32;不稳定参数 38.18,属于稳定蛋白。

如图 1 所示, *Glyma01g24530* 序列与拟南芥 *P5CS1*、黄瓜、水稻、杨树、番茄、玉米中同源基因编码氨基酸分别有 71.39%、64.77%、71.13%、73.32%、72.23%、70.37% 的相似度。氨基酸序列结构域分析显示,存在 1 个 N-acetylglutamate synthase, kinase-like domain (N 端乙酰谷氨酸合成酶激酶结构域)和 1 个 Aldehyde dehydrogenase domain (醛脱氢酶结构域)。

系统进化树分析大豆和其它物种 *P5CS1* 基因,分析证实 *Glyma01g24530* 属于植物 *P5CS1* 家族,属于 *P5CS1* 家族的植物分为两类,一类包含单子叶植物玉米和水稻,另一类由双子叶植物组成。

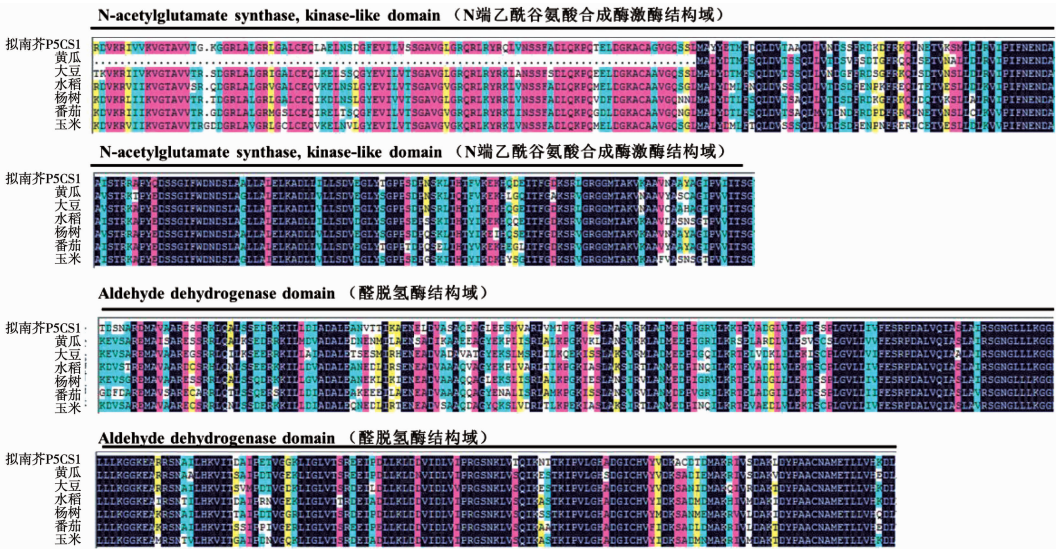


图1 大豆和其它物种中 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸合成酶氨基酸序列比对

Fig. 1 Alignment of deduced amino acid sequences Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS1) in soybean and other different organisms

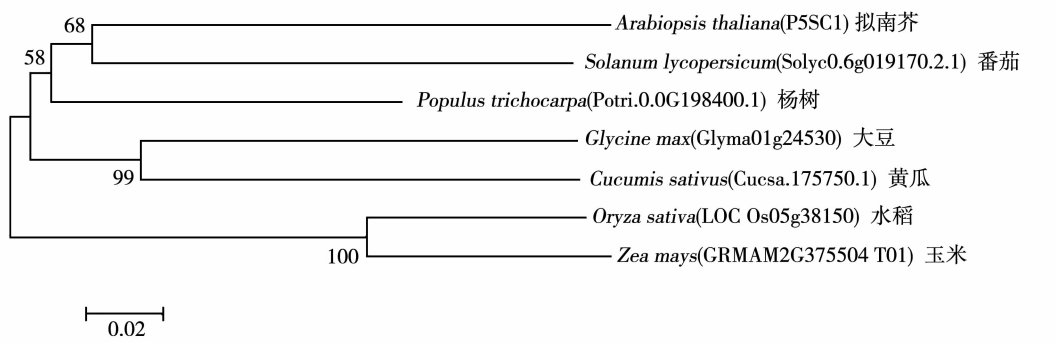


图2 大豆和其它物种中 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸合成酶进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS1) in soybean and other different organisms

2.2 *Glyma01g24530* 的启动子序列分析

由于基因一方面具有的特异性蛋白结构域会使其功能具有特异性,另一方面启动子序列上的特异性顺式作用元件也会在一定程度上影响基因的功能。将获取的 *Glyma01g24530* 基因的 ATG 上游 2 000 bp 序列用来分析启动子元件,通过 SoftBerry TSSP 预测,找到 *Glyma01g24530* 启动子序列的转录起始位点,结果表明在起始密码子上游 324 和 38 bp 处分别是该基因的转录起始位点以及 TATA-Box 位点。然后再将启动子原件在网站 PlantCARE 上进行分析(表 1)。

发现在 *Glyma01g24530* 启动子上除了基本的元件外,还广泛分布了光反应、厌氧诱导、分生组织表达以及干旱和激素响应相关的元件,说明该基因的

表达可能参与了光相关生理过程、植物防御以及逆境胁迫等生理过程。

2.3 *Glyma01g24530* 的组织特异性表达分析

为了明确 *Glyma01g24530* 基因在逆境胁迫反应中的表达模式,利用 50 mmol·L⁻¹ NaCl 和 4% PEG 对大豆进行 24 h 胁迫处理,分析 *Glyma01g24530* 在胁迫下的表达情况。

如图 3 所示,在 PEG 处理下,基因表达量先增加后缓慢下降,其中在 4 h 时达到了峰值,说明 *Glyma01g24530* 受 PEG 干旱胁迫诱导,参与大豆植株的抗干旱反应。在 NaCl 处理下,基因表达量同样先增加,在 8 h 后表达达到峰值,而后表达量缓慢降低,推测 *Glyma01g24530* 可能也受 NaCl 盐胁迫诱导,是参与盐胁迫反应的基因。

表 1 *Glyma01g24530* 启动子元件
Table 1 Promoter elements of *Glyma01g24530*

名称 Name	数量 Amount	功能 Function
ARE	2	厌氧诱导的必须响应元件 Anaerobic induction must respond to components
Box 4	4	光响应元件 Light responsive element
Box 1	2	光反应元件 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
CAT-box	1	分生组织的表达元件 Expression of meristems
MBS	1	干旱诱导结合位点 MYB binding site involved in drought-inducibility
Skn-1_motif	5	胚乳表达所需元件 Cis-acting regulatory element required for endosperm expression
TC-rich repeats	2	植物防御及胁迫响应元件 Cis-acting element involved

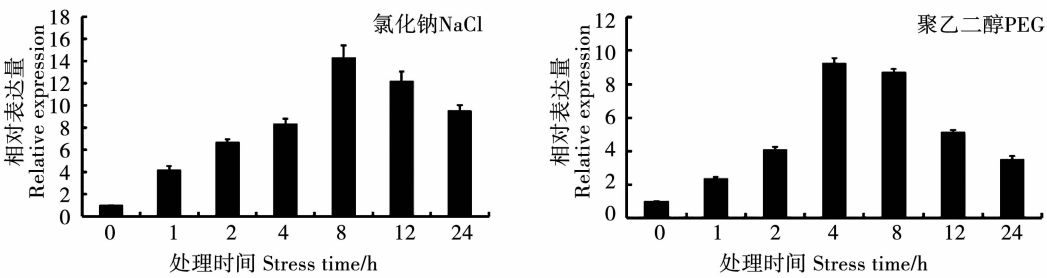


图 3 不同处理的大豆 *Glyma01g24530* 基因的相对表达量

Fig. 3 qRT-PCR analysis for the expression of *Glyma01g24530* in soybean with different treatments

为了探索 *Glyma01g24530* 基因在大豆组织中的特异性表达模式，分别提取大豆三出复叶、茎、根、花、豆荚及种子 RNA，然后采用荧光实时定量 PCR 分析在大豆不同组织中的 *Glyma01g24530* 基因表达量差异。

如图 4 所示，与在其它物种中的表达情况类似，*Glyma01g24530* 基因在各个组织中都有所分布，在花、豆荚、茎等组织表达量较高，而在叶片中表达水平相对较低。

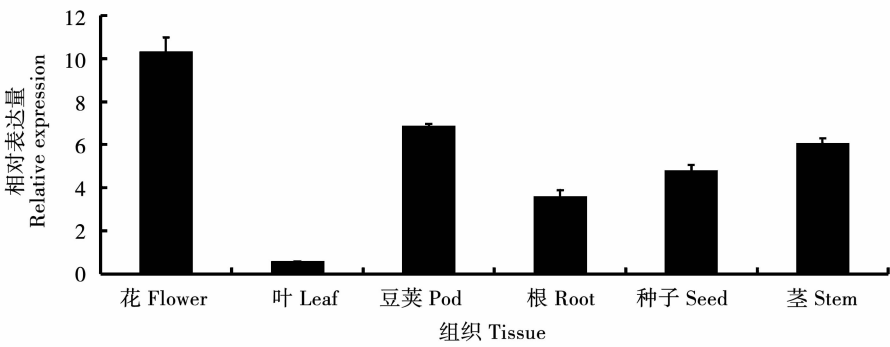


图 4 大豆不同组织中 *Glyma01g24530* 基因的相对表达量

Fig. 4 Relative expression of *Glyma01g24530* gene in different tissues of soybean

3 结论与讨论

在植物体内,谷氨酸在 Δ^1 - 吡咯啉 - 5 - 羧酸合成酶 (P5CS) 和 Δ^1 - 吡咯啉 - 5 - 羧酸还原酶的作用下 (P5CR) 被合成脯氨酸,因此植物 P5CS 家族都具有保守的 N 端乙酰谷氨酸合成酶激酶结构域和醛脱氢酶结构域。将获得的 *Glyma01g24530* 氨基酸序列进行蛋白结构域的检测,发现一个植物 N 端乙酰谷氨酸合成酶激酶结构域在其第 53 和 298 个氨基酸间、在 330 和 594 个氨基酸间存在一个醛脱氢酶结构域,表明 *Glyma01g24530* 属于植物 P5CS 家族。

植物在逆境胁迫下会累积一些相容性溶质来增加抗逆能力,在这些溶质中,以脯氨酸最常见。因此植物体内游离脯氨酸的含量常作为判断作物抗逆能力的一个生理指标。作为脯氨酸积累合成过程中的一种限速酶,P5CS1 基因的表达情况也从分子表达水平反映了植物抵抗逆境胁迫的能力。在高盐、干旱等环境胁迫下,一些植物相关响应原件基因(酶,转录因子)都可以被诱导表达^[13],通过对 *Glyma01g24530* 启动子分析发现其含有与逆境胁迫相关的元件。通过对大豆进行模拟逆境处理,发现 PEG 对大豆进行胁迫处理后,基因表达量先是迅速增加后缓慢下降,并且在 4 h 时达到峰值,表明了该基因可以被干旱胁迫诱导,可能参与植物的抗旱反应。在高盐处理后,基因表达量也是先快速增加,在 8 h 后表达量达到峰值,而后表达量再缓慢下降,推测 *Glyma01g24530* 可能是参与盐胁迫反应的基因。

之前的研究还发现过表达拟南芥 *P5CS* 基因可以促进植物开花,在本研究中发现 *Glyma01g24530* 基因的启动子上含有大量的光反应相关的元件,同时组织特异性表达分析也显示 *Glyma01g24530* 在花中有很高的表达水平,因此大豆 *Glyma01g24530* 基因有可能像拟南芥 *P5CS* 一样,参与了植物开花调控途径,该推测还需要后续的试验证实。

参考文献

[1] Yancey P H, Clark M E, Hand S C, et al. Living with water stress: Evolution of osmolyte systems[J]. Science, 1982, 217: 1214-1222.

[2] 汤章城. 逆境条件下植物脯氨酸的累积及其可能的意义[J].

植物生理学通讯,1984(1):15-21. (Tang Z C. Plant proline accumulation and its meaning in stress conditon[J]. Plant Physiology Communications,1984(1):15-21.)

[3] Szabados L, Savouré A. Proline: A multifunctional amino acid [J]. Trends in Plant Science, 2010,15(2): 89-97.

[4] Verslues P E, Sharma S. Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction[J]. *Arabidopsis Book*, 2010, 8: e0140.

[5] Sharma S, Villamor J G, Verslues P E. Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential[J]. Plant Physiology, 2011, 157:292-304.

[6] Savoure A, Jaoua S, Hua X J, et al. Isolation, characterization and chromosomal location of a gene encoding the Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*[J]. FEBS Letters, 1995,372:13-19.

[7] Yoshiba Y, Nanjo T, Miura S, et al. Stress-responsive and developmental regulation of Δ^1 -pyrroline -5- carboxylate synthetase 1 (P5CS1) gene expression in *Arabidopsis thaliana*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999, 261: 766-772.

[8] Peng Z, Lu Q, Verma D P S. Reciprocal regulation of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants [J]. Molecular and General Genetics, 1996,253:334-341.

[9] Szekely G, Abraham E, Cselo A, et al. Duplicated *P5CS* genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis[J]. The Plant Journal, 2008,53(1): 11-28.

[10] 曲雪萍,贺道耀,余叔文. 水稻中 *p5cs* 基因的存在及其在高脯氨酸变异系中的作用[J]. 植物生理学报,1998, 24(1): 49-54. (Qu X. P, He D Y, Yu S W, The presence of *p5cs* gene in rice and its role in the high proline mutation system [J]. Acta Phytophysiological Sinica, 1998, 24(1): 49-54.)

[11] 郭旭. 罗布麻、胡杨 *P5CS* 基因的克隆及其功能初步分析 [D]. 北京:中国农业科学院,2007:43-47. (Guo X. Cloning and functional analysis of *P5CS* from *Apocynum venetum* L and *Populus euphratica* Oliv [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2007:43-47.)

[12] Mattioli R, Falasca G, Sabatini S, et al. The proline biosynthetic genes *P5CS1* and *P5CS2* play overlapping roles in *Arabidopsis* flower transition but not in embryo development[J]. Plant Physiology, 2009, 137(1): 72-85.

[13] 檀叶青,邓澍荣,孙苑玲,等. 胡杨 *PeAPY1* 和 *PePY2* 在提高植物抗旱耐盐性上的功能解析[J]. 基因组学与应用生物学, 2014,33(4): 860-868. (Tan Y Q, Deng S R, Sun Y L, et al. Functional analysis of *Populus euphratica* *PeAPY1* and *PeAPY2* in enhancing salt and drought tolerance[J]. Genomics and Applied Biology,2014,33(4): 860-868.)