大豆 RING/U-box 蛋白 Glyma. 13G115900 的克隆及其对非生物胁迫的应答

张沿政,陈 龙,李永光,李文滨

(东北农业大学 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:课题组前期对干旱胁迫下大豆转录组的数据分析发现大豆 *Glyma*. 13*G*115900 基因编码一个 RING/U-box 蛋白,其表达水平受干旱胁迫影响显著。本研究以垦丰 16 大豆为试验材料,克隆 *Glyma*. 13*G*115900 基因。氨基酸多重序列比对表明其编码的蛋白与其它物种都具有高度保守的 RING/U-box 结构域。构建原核表达载体 pET-29b-*Glyma*. 13*G*115900 转化到大肠杆菌中,Glyma. 13G115900 蛋白在大肠杆菌中能够表达。荧光定量 PCR 分析表明 *Glyma*. 13*G*115900 基因的表达量受 PEG、NaCl 和 ABA 的影响显著,但基本不受冷胁迫的诱导。经 PEG 和 NaCl 处理后,该基因表达量与 CK 相比呈现出显著下降的趋势,PEG 处理的表达量变化比 NaCl 下调的更明显;在 ABA 诱导下与 CK 相比该基因的 mRNA 丰度呈现出先上升后下降的趋势,在 4 h 表达量出现峰值,推测该基因可能通过依赖于 ABA 途径参与非生物胁迫应答。以上结果为进一步深入研究该基因的调控途径奠定基础。

关键词:大豆;RING/U-box 蛋白;*Glyma*. 13*G*115900;基因克隆;胁迫响应

中图分类号:S565.1 **文献标识码**:A **DOI**:10.11861/j.issn.1000-9841.2017.06.0851

Cloning and Expression Analysis of A RING/U-box Protein of Glyma. 13G115900 from Soybean under Abiotic Stress

ZHANG Yan-zheng, CHEN Long, LI Yong-guang, LI Wen-bin

(Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education/Agricultural Ministry's Northeast Areal Key Laboratory of Soybean Biology and Genetic Breeding, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Based on the analysis of the transcriptome data of soybean drought stress, it was found that the soybean *Glyma*. 13*G*115900 gene encodes a RING/U-box protein, and its expression level is affected by drought stress. In this study, *Glyma*. 13*G*115900 gene was cloned from soybean. Amino acid multiplex sequence alignment indicated that the encoded protein had the same highly conserved RING/U-box domain as the other species. The prokaryotic expression vector pET-29b-*Glyma*. 13*G*115900 was constructed and found to express Glyma13G115900 protein in *Escherichia coli*. Fluorescence quantitative PCR analysis showed that the expression level of *Glyma*. 13*G*115900 gene was significantly affected by PEG, NaCl and ABA, and was not induced by cold stress. After treatment of PEG and NaCl, the expression level of this gene showed a significant decrease compared with CK, and the change of PEG expression was more obvious than that of NaCl, compared with CK, the mRNA abundance of the gene increased firstly and then decreased after ABA induction, and peaked at 4 h, suggesting that the gene may be involved in the abiotic response relying on the ABA pathway. The above results lay the foundation for further study of the gene.

Keywords: Soybean; RING/U-box protein; *Glyma*. 13*G*115900; Gene cloning; Stress response

干旱、高盐和极端温度等非生物胁迫会严重影响植物的生长、发育和产量。大豆是一种重要的作物,在世界各地广泛种植,为人类食物、动物饲料和生物燃料提供了宝贵的资源。随着全球气候的恶化,大豆的生长和生产力受到各种环境胁迫的不利影响,如寒冷、炎热、干旱和高盐。植物通过信号转导的方式调整其细胞生理生化过程,从而导致应激相关基因的表达变化来抵御逆境。虽然许多被干旱和盐胁迫所诱导的基因已经被发现和研究[1-2],然而这些基因的许多生物学功能在高等植物中基本上是未知的。

泛素化是一种翻译后修饰过程。真核生物中,

收稿日期:2016-07-21
基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08004-002)。
第一作者简介:张沿政(1992 -),男,硕士,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:903395331@qq.com。
通讯作者:李文滨(1958 -),男,教授,博导,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:wenbinli@neau.edu.cn。

通过激活泛素化系统中泛素与靶蛋白的共价连接，介导了真核生物的多种细胞功能，如生物和非生物胁迫反应、细胞周期进程等[3-6]。泛素与靶蛋白结合需要有 3 种酶：E1（泛素激活酶）、E2（泛素结合酶）、E3（泛素连接酶）以及渐进多步反应[7]。基因组测序显示，超过 6% 的拟南芥基因编码的蛋白都直接或间接地作用于泛素 26S 蛋白酶体系统。并且在拟南芥中还发现有超过1 400个基因编码 E3，远远超过 E1（2 个基因）和 E2（37 个基因）[8]。如此大量的 E3 泛素连接酶证明它们在确定目标底物的特异性过程中起着至关重要的作用。E3 泛素连接酶包含以 HECT（与 E6 相关蛋白 C 末端同源），RING 或 U-box（没有 Zn^{2+} 结合残基的修饰的 RING 结构域）结构域为特征的大而多样的组别[9]。U-box结构域含有 70 个氨基酸，具有类似于 RING 结构域的三级结构[10]。在拟南芥基因组中有 64 个预测的 U-box 基因，并且在水稻基因组中已注释到 77 个 U-box 基因[11]。虽然植物 U-box 蛋白只是植物 E3s 的一小部分，但它们比其它生物体如酵母和动物丰富得多，其中每个都编码少于 10 个 U-box E3[11-12]。根据拟南芥中一些其它保守模体的存在，U-box 蛋白亚组又可以分为 5 个不同的类别，ARM/HEAT、UFD2、GKL、TPR 和 WD40[13]。

本课题组前期对大豆干旱胁迫下转录组数据分析的结果发现大豆 *Glyma*. 13*G*115900 基因编码一个 RING/U-box 蛋白，其表达水平受旱胁迫显著影响。本研究克隆该基因 CDS 区域，并分析在逆境胁迫下 *Glyma*. 13*G*115900 基因表达量的变化，初探该基因参与大豆抗逆过程的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆品种垦丰 16，由东北农业大学大豆研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 使用 TRizol（天根）试剂提取大豆叶片的总 RNA，后采用试剂盒 QuantScript^{RT} Kit（天根）反转录以获得 cDNA 第一链。根据实验室前期大豆旱处理转录组数据中获得的基因登录号（*Glyma*. 13*G*115900），利用 Phytozome 查找得到其转录组序列，利用 Prime 5.0 设计特异性引物（表 1）进行扩增。PCR 反应条件为：95℃ 预变性 3 min；95℃ 变性 5 s，58℃ 退火 20 s，72℃ 延伸 1 min，35 个循环；72℃ 保温 10 min。PCR 产物回收纯化后连接 pGM-T 载体并测序。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

名称 Name	上游引物 Upstream primer (5′→3′)	下游引物 Downstream primer (5′→3′)
Glyma. 13*G*115900	CATATGGCTTCTTCCTTCT	GAAGTCCTCTACGAATGTGTGC
pET-29b-*Glyma*. 13*G*115900	CATATGGCTTCTTCCTTCTCTCCAA	CTCGAGCGAATGTGTGCATTCGAGTG
q*Glyma*. 13*G*115900	CCGCAAAAAAGAAAGAACCTA	CCATCTCAGAACCGCAATCA
*Actin*4	CGTCCCTGCCCTTTGTACAC	CGAACACTTCACCGGATCATT

1.2.2 生物信息学分析 利用在线工具 ExPASy-ProtParam（http://web.expasy.org/protparam）分析 *Glyma*. 13*G*115900 编码蛋白的理化性质。利用 NCBI 数据库（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）对 *Glyma*. 13*G*115900 进行同源基因的检索；用 Clustral X 1.83 比对全长氨基酸序列；利用 MEGA 7.0，采取邻接法（neighborjoining, NJ）构建系统进化树；利用 Genebank 筛选并下载其它植物的 9 种 RING/U-box 蛋白同源序列；利用 DNAMAN V 5.22 对相关序列进行多重序列比对。

1.2.3 Glyma. 13G115900 蛋白的原核表达 以垦丰 16 大豆叶片 cDNA 为模板，通过 Prime 5.0 设计引物，上游引物添加 *Nde* I 酶切位点，下游引物添加 *Xho* I 酶切位点并去除终止密码子，进行 PCR 扩增。将胶回收产物与 pET-29b 原核表达载体连接，测序比对。将该质粒转化 Rosetta-gami 2（DE3）（唯地生物）感受态细胞中，菌株在含卡那霉素（100 μg·mL^{-1}）和氯霉素（30 μg·mL^{-1}）抗性的 10 mL LB 培养基中，37℃ 培养过夜。在含有卡那霉素（100 μg·mL^{-1}）和氯霉素（30 μg·mL^{-1}）的 LB 培养基（4 mL）中加入过夜培养液。37℃ 震荡培养至 OD_{600} 为 0.5。取一半菌液作为对照组，另一半菌液加入 1.0 mmol·L^{-1}

的 IPTG,在 28℃进行蛋白诱导。诱导 6 h 时后,取菌体各 1 mL,12 000 r·min^{-1}离心 5 min,倒上清,加入 200 μL 5×蛋白 Loading buffer,重悬混匀,沸水煮 10 min。12 000 r·min^{-1}离心 3 min,取上清进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.4　*Glyma*. 13*G*115900 基因在胁迫处理下的应答　将垦丰 16 于长日照条件(16 h 光照/8 h 黑暗)、250 μmol·m^{-2}·s^{-1}白光,25℃下培养,当第二片三出复叶完全展开时,将大豆分成两份,一份用作对照(CK),一份进行胁迫处理。将大豆幼苗根部分别浸泡于含有 5% PEG6000、150 mmol·L^{-1} NaCl,100 μmol·L^{-1} ABA 的 1/4 MS 营养液中,分别模拟干旱、盐和 ABA 胁迫,分别在 0,2,4,8,12,24,48 h 收集第一片三出复叶。低温处理在 4℃培养箱里进行,分别在 0,1,2,4,8 h 收集第一片三出复叶。所取叶片立即液氮冷冻,-80℃冰箱保存,用于 RNA 的提取,进行 qRT-PCR 分析,3 次重复试验。

1.2.5　qRT-PCR　植物叶片总 RNA 的提取和反转录合成 cDNA 第一链,方法同 1.2.1。根据该基因的序列,利用 Prime 5.0 设计荧光定量 PCR 引物(表 1)。Chromo 4 四色实时 PCR 检测系统(Bio-Rad, USA)用于进行实时定量 RT-PCR。通过 qRT-PCR 测定样本 Ct 值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算 mRNA 的相对丰度。将 *Actin*4 基因用作大豆的内源对照。

2　结果与分析

2.1　*Glyma*. 13*G*115900 基因 CDS 的克隆

提取大豆总 RNA(图 1),以垦丰 16 大豆叶片总 cDNA 为模板,经 PCR 扩增得到 1 条约 875 bp 的条带(图 2)。胶回收后连接 pGM-T 载体,进行测序比对。测序结果表明成功扩增出 *Glyma*. 13*G*115900 基因。

2.2　*Glyma*. 13*G*115900 的分子鉴定

在线工具 ExPASy-ProtParam 鉴定结果表明:*Glyma*. 13*G*115900 基因编码 170 个氨基酸,相对分子量为19 506.39 kDa,pI4.92。Blast 结果显示:在靠近其 N 末端 84~130 氨基酸部位具有 RING/U-box 结构域,所得序列属于 RING/U-box super family(图 3)。其编码的 RING/U-box 结构域的氨基酸序列为:AVCLSQLSVEDEVRELMNCYHVFHRECIERW-LEHEHENHIPTCPLC。与其它物种 RING/U-box 蛋白序列多重比对结果表明:RING/U-box 结构域保守性较强,有 22 个氨基酸完全一致(图 4)。

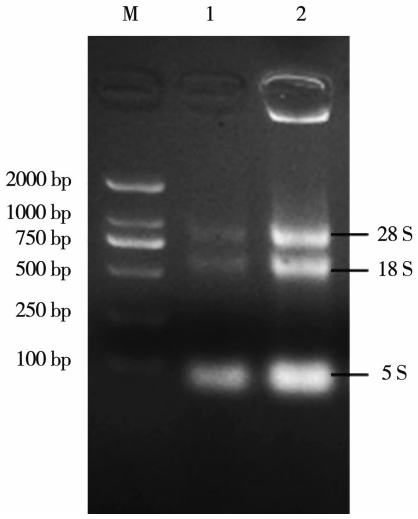


图 1　大豆叶片总 RNA

Fig. 1　Total RNA of soybean leaf

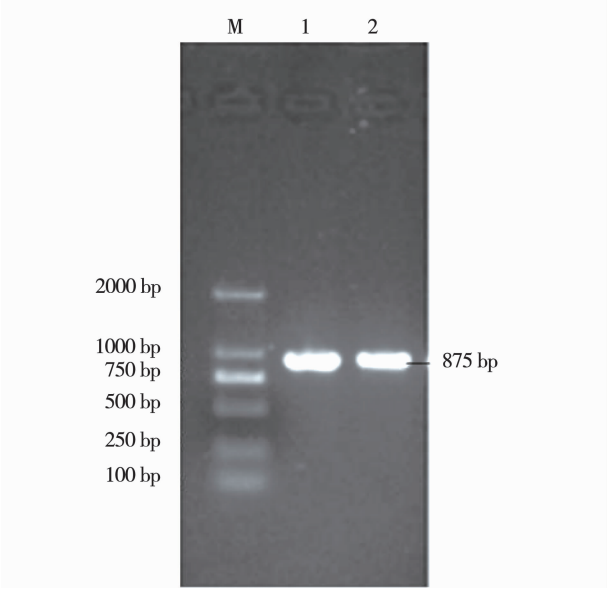


图 2　PCR 扩增片段电泳检测

Fig. 2　Electrophoresis of PCR amplified fragments

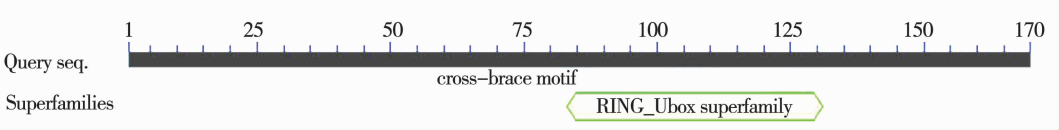
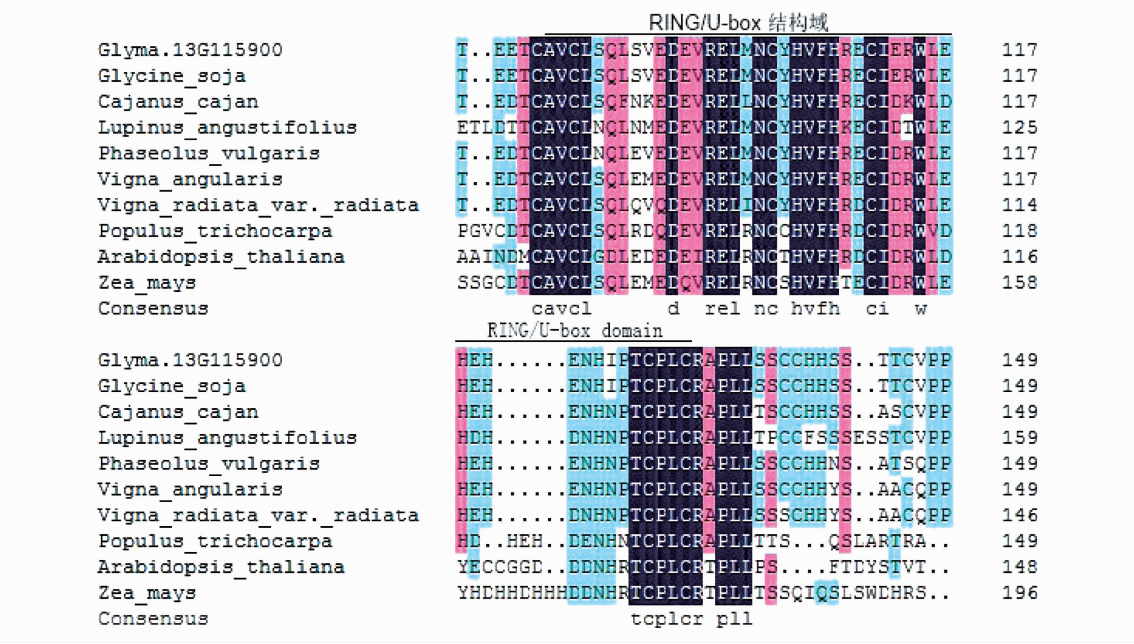


图 3　*Glyma*. 13*G*115900 的 RING/U-box 结构域位置

Fig. 3　Position of RING/U-box domain of *Glyma*. 13*G*115900



Glycine soja:野生大豆; *Vigna angularis*:赤豆; *Phaseolus vulgaris*:菜豆;*Virgna radiatevar. radiata*:绿豆;*Cajanus cajan*:木豆;*Lupinus angustifolius*:狭叶羽扇豆; *Populus trichocarpa*:杨树;*Arabidopsis thaliana*:拟南芥;*Zea mays*:玉米。

图 4 Glyma. 13G115900 与其它植物 RING/U-box 蛋白氨基酸保守区序列多重对比分析

Fig. 4 Multiple alignment analysis of Glyma. 13G115900 conserved domain with other plants of the homologous

2.3 大豆 *Glyma*. 13*G*115900 系统进化树分析

应用 MEGA 7.0 软件构建 *Glyma*. 13*G*115900 同源系统进化树,我们发现 *Glyma*. 13*G*115900 与豆科植物聚成一簇,说明该基因在豆科植物中的进化比较保守(图 5)。

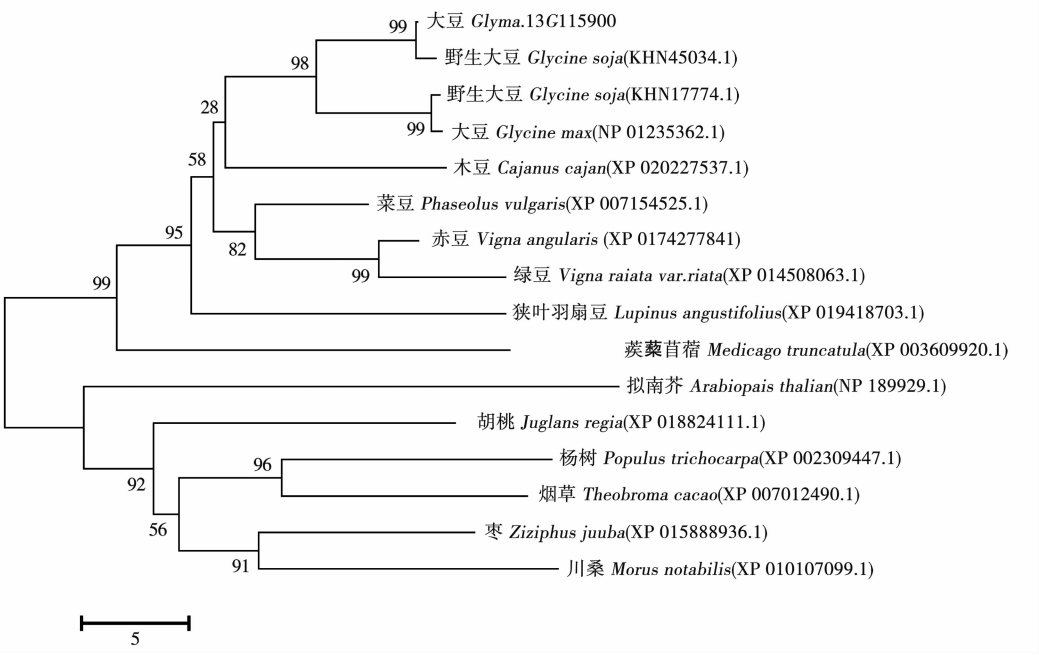


图 5 大豆 *Glyma*. 13*G*115900 系统进化树分析

Fig. 5 Phylogenetic tree analysis of *Glyma*. 13*G*115900 in soybean

2.4 *Glyma*. 13*G*115900 基因编码蛋白原核表达

构建原核表达载体 pET-29b-*Glyma*. 13*G*115900,利用 *Nde* I 和 *Xho* I 进行双酶切验证(图 6)。用 1.0 mmol·L^{-1}的 IPTG 诱导蛋白表达。SDS-PAGE 结果显示,该诱导蛋白在 19 kDa 处有条带,与预期结果相符,可用于以后蛋白方面的研究(图 7)。

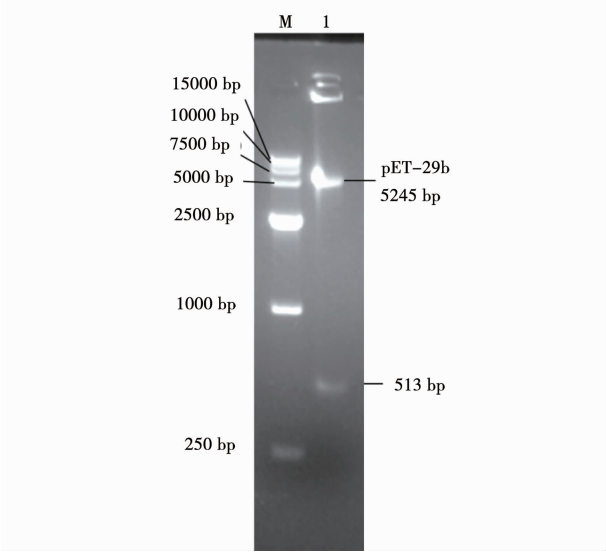


图 6　pET-29b- *Glyma*. 13*G*115900 原核表达载体酶切验证

Fig. 6　Identification of prokaryotic expression vector pET-29b-*Glyma*. 13*G*115900 by enzyme digestion

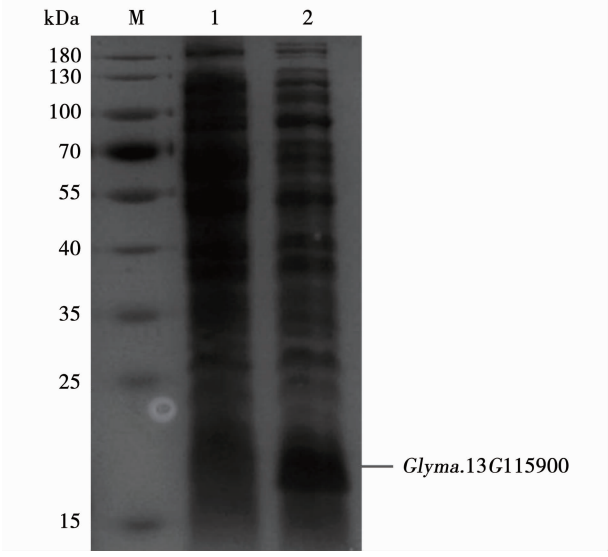
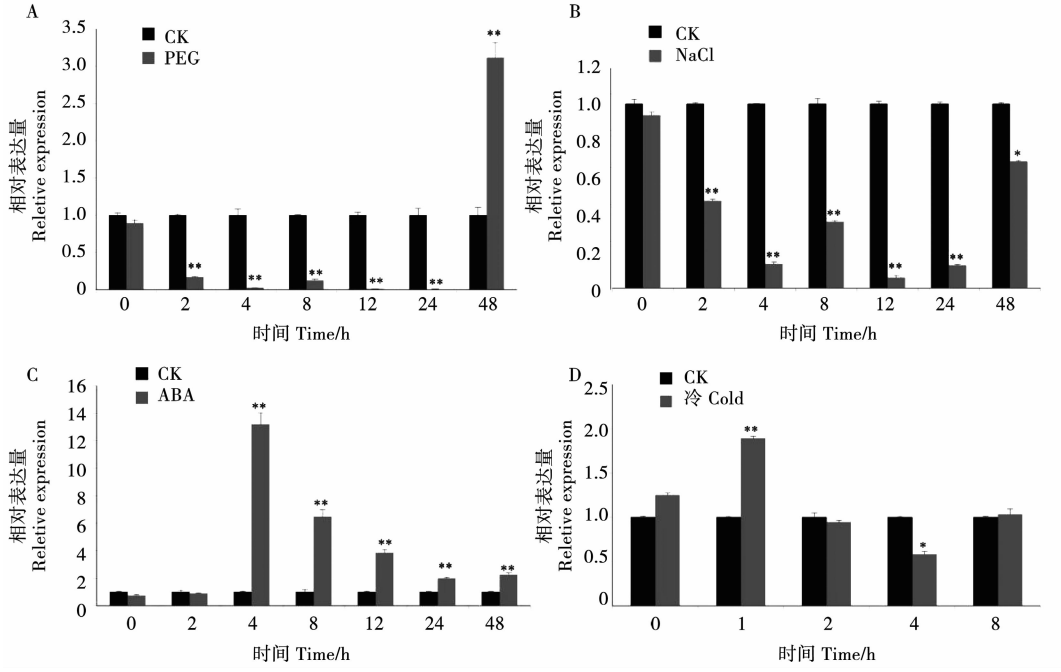


图 7　Glyma. 13G115900 蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 7　SDS-PAGE of Glyma. 13G115900 protein in E. coli

2.5　*Glyma*. 13*G*115900 基因对逆境胁迫的响应分析

荧光定量分析 *Glyma*. 13*G*115900 基因的 mRNA 水平(图 8)。结果显示,经 PEG 和 NaCl 处理后,该基因表达量与 CK 相比呈现出显著下降的趋势,分别在 24 和 12 h 达到极小值,PEG 处理的表达量变化比 NaCl 处理下调明显(图 8A、B)。在 ABA 诱导下,与 CK 相比该基因的 mRNA 丰度呈现出先上升后下降的趋势,在 4 h 表达量出现峰值,其表达量是 CK 的 13 倍;8 h 后表达量出现下降,然而在 8,12,24 和 48 h 时间点该基因的表达量依旧显著高于 CK(图 8C)。在低温处理后,1 h 时表达量稍微上升,随后表达量出现下降,处理 4 h 时表达量降到最低,低于 CK,2 h 时恢复至 0 h 水平 (图 8D)。



A:PEG 处理;B:NaCl 处理; C:脱落酸处理; D:4℃低温处理。* 和 ** 分别表示 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平下与对照组相比有显著差异。

A: PEG treatment; B: NaCl treatment; C: ABA treatment; D: 4℃ treatment. * and ** indicate significant difference at $P<0.05$ and $P<0.01$ level respectively.

图 8　PEG、NaCl、ABA 和 4℃低温处理下 *Glyma*. 13*G*115900 基因的应答

Fig. 8　The response of *Glyma*. 13*G*115900 treated with PEG, NaCl, ABA and 4℃

从以上结果说明除了冷胁迫对 *Glyma*. 13*G*115900 基因的表达量没有显著影响外,其它 3 种处理条件下,该基因的表达量都呈现出显著变化,推测该基因可能依赖 ABA 途径参与非生物胁迫应答。

3 结论与讨论

近年来,随着植物逆境分子研究的迅速发展,大量参与应激反应的基因被发现和研究[14]。然而一些新发现的 U-box 家族基因对参与逆境应答反应的机制还不是很明确。过去已经在几种植物中对 U-box 基因家族的特征和功能进行了鉴定和分析。例如,在拟南芥基因组和水稻基因组中注释到很多 U-box 基因[11]。最近,还进行了模型微藻莱茵衣藻和大白菜中 U-box 基因的全基因组分析[15]。王宁等[16]搜索大豆全基因组序列发现 125 个基因编码含有 U-box 结构域的蛋白质。在本研究中,通过对不同物种间编码 RING/U-box 蛋白的氨基酸序列进行多重比对发现,RING/U-box 结构域在各个物种间是相对保守的。大豆 *Glyma*. 13*G*115900 系统进化树显示,该基因在豆科植物中的进化也是保守的,与野生大豆同源性最高。

最近的研究表明,U-box 泛素连接酶完整的参与生物和非生物胁迫的响应。在拟南芥中,*AtACRE*276(*AtPUB*17)被确定为一种 U-box E3 泛素连接酶,它作为高敏感反应(HR)的一种正调节因子,对致病性感染起作用[17]。在干旱反应中,AtPUB18 / AtPUB19 和 AtPUB22/AtPUB23 分别作为 ABA 依赖和 ABA 非依赖途径的负调控因子[18]。王瑶等[19]使用启动子 GUS 活性测定分析发现生物和非生物胁迫能诱导 *VpPUB*24 基因的表达,特别是通过冷处理。王宁等[16]发现大豆 *GmPUB*8 基因在拟南芥中的过表达抑制 ABA 和甘露醇介导的气孔闭合,应激和 ABA 相关响应基因的表达也受到非生物处理的影响。在本研究中,*Glyma*. 13*G*115900 基因表达量受逆境胁迫影响显著,其中在 PEG 和 NaCl 信号途径中起负调控作用,并且受 PEG 影响的程度强于 NaCl,*Glyma*. 13*G*115900 基因受 ABA 诱导后显著上调。综上所述,我们推测该基因可能通过依赖于 ABA 途径参与非生物胁迫应答,具体的调控机制有待于我们进一步研究。

参考文献

[1] Xiong L, Schumaker K S, Zhu J K. Cell Signaling during cold, drought, and salt stress[J]. Plant Cell, 2002, 14(S): 165-183.

[2] Zhu J K. Salt and drought stress signal transduction in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2002, 53(53): 247-273.

[3] Callis J, Vierstra R D. Protein degradation in signaling[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2000, 3(5): 381-386.

[4] Hellmann H, Estelle M. Plant development: Regulation by protein degradation[J]. Science, 2002, 297(5582): 793.

[5] Zhang S, Qi Y, Liu M, et al. SUMO E3 ligase *AtMMS*21 regulates drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2013, 55(1):83-95.

[6] Stone S L, Hauksdóttir H, Troy A, et al. Functional analysis of the ring-type ubiquitin ligase family of *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2005, 137(1):13-30.

[7] Vierstra R D. The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009, 10(6):385-397.

[8] Stone S L, Hauksdóttir H, Troy A, et al. Functional Analysis of the ring-type ubiquitin ligase family of *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2005, 137(1):13-30.

[9] Duplan V, Rivas S. E3 ubiquitin-ligases and their target proteins during the regulation of plant innate immunity[J]. Frontiers in Plant Science, 2014, 5(3):42.

[10] Ohi M D, Vander Kooi C W, Rosenberg J A, et al. Structural insights into the U-box, a domain associated with multi-ubiquitination[J]. Nature Structural Biology, 2003, 10(4): 250-255.

[11] Azevedo C, Santos-Rosa M J, Shirasu K. The U-box protein family in plants[J]. Trends in Plant Science, 2001, 6(8): 354.

[12] Wiborg J, O'Shea C, Skriver K. Biochemical function of typical and variant *Arabidopsis thaliana* U-box E3 ubiquitin-protein ligases [J]. Biochemical Journal, 2008, 413(3): 447-457.

[13] Mazzucotelli E, Belloni S, Marone D, et al. The E3 ubiquitin ligase gene family in plants: Regulation by degradation[J]. Current Genomics, 2006, 7(8): 509-522.

[14] 李媛媛, 南海洋, 刘宝辉, 等. 大豆 *GmFDL*06 基因抗干旱及耐盐性研究[J]. 大豆科学, 2017, 36(3):351-359. (Li Y Y, Nan H Y, Liu B H, et al. Study on drought resistance and salt tolerance of soybean *GmFDL*06 gene[J]. Soybean Science, 2017, 36 (3): 351-359.)

[15] Wang C, Duan W, Riquicho A R, et al. Genome-wide survey and expression analysis of the PUB family in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. pekinesis)[J]. Molecular Genetics & Genomics, 2015, 290(6): 2241-2260.

[16] Wang N, Liu Y, Cong Y, et al. Genome-wide identification of soybean U-Box E3 ubiquitin ligases and roles of *GmPUB*8 in negative regulation of drought stress, response in *Arabidopsis*[J]. Plant & Cell Physiology, 2016, 57(6):1189.

[17] Yang C W, González-Lamothe R, Ewan R A, et al. The E3 ubiquitin ligase activity of *Arabidopsis* PLANT U-BOX17 and its functional tobacco homolog *ACRE*276 are required for cell death and defense[J]. Plant Cell, 2006, 18(4): 1084-1098.

[18] Seo D H, Ryu M Y, Jammes F, et al. Roles of four *Arabidopsis* U-box E3 ubiquitin ligases in negative regulation of abscisic acid-mediated drought stress responses[J]. Plant Physiology, 2012, 160 (1): 556-568.

[19] Yao W, Wang L, Wang J, et al. *VpPUB*24, a novel gene from Chinese grapevine, vitis pseudoreticulata, targets *VpICE*1 to enhance cold tolerance[J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(11): 2933-2949.