



大豆耐胁迫相关蛋白编码基因 *GmSAMDC1* 的克隆及表达分析

任 锐^{1,2}, 杨凤玺², 王 涛^{1,3}, 高 乐¹, 智海剑¹, 李 凯¹

(1. 南京农业大学 大豆研究所/农业部大豆生物学与遗传育种重点实验室/国家大豆改良中心/作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095; 2. 广东省农业科学院 环境园艺研究所, 广东 广州 510640; 3. 邯郸市农业科学院 粮油作物研究所, 河北 邯郸 056001)

摘 要: S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶(S-adenosine methionine decarboxylase, SAMDC)是亚精胺和精胺合成的关键酶,更是多胺生物合成的限速酶之一,在植物耐胁迫反应中发挥重要调控作用。为研究大豆 SAMDC 编码基因的结构和表达特性,本研究从抗病大豆品种科丰 1 号中克隆了位于大豆基因组 2 号染色体上的 *GmSAMDC1* (Glyma. 02G128000) 基因,分析结果表明:其完整 ORF 长度为 1 068 bp,编码一个由 355 个氨基酸组成的包含 1 个 SAM_{decarbox} 结构域的蛋白;*GmSAMDC1* 基因所编码蛋白的理论等电点为 4.86,相对分子质量为 38 987.13 Da,为亲水性蛋白,不含跨膜区;大豆中共有 8 个 *GmSAMDC1* 的同源基因,*GmSAMDC1* 与红车轴草 (PNY09439.1, 82.64%) 和拟南芥 (AtSAMDC3, 67.22%) 中的 SAMDC 蛋白编码基因亲缘关系最近;*GmSAMDC1* 启动子序列包含防卫和胁迫响应元件、植物激素应答元件、光应答元件等许多顺式作用元件;*GmSAMDC1* 在花中的表达量最高,与其大豆同源基因 Glyma. 01G071300 (序列相似性为 94.6%)、Glyma. 18G278800 (66.8%) 和 Glyma. 08G25580 (66.5%) 的组织特异性表达模式比较相似;Glyma. 02G128000-GFP 融合蛋白在细胞膜和细胞质上表达。本研究结果为进一步阐明大豆 *GmSAMDC1* 基因在大豆耐胁迫过程中的作用提供了理论依据。

关键词: 大豆; *GmSAMDC1*; 耐胁迫; 顺式作用元件; 亚细胞定位

Cloning and Expression Analysis of Soybean *GmSAMDC1*-encoding Gene

REN Rui^{1,2}, YANG Feng-xi², WANG Tao^{1,3}, GAO Le¹, ZHI Hai-jian¹, LI Kai¹

(1. Soybean Research Institute of Nanjing Agricultural University/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Soybean, Ministry of Agriculture /National Center for Soybean Improvement/National Key Laboratory for Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China; 2. Environmental Horticulture Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China; 3. Institute of Cereal and Oil Crops, Handan Academy of Agricultural Sciences, Handan 056001, China)

Abstract: S-adenosine methionine decarboxylase (SAMDC), the key enzyme of spermine biosynthesis, is one of the speed-limit enzymes in the biosynthesis of polyamine playing an important regulatory role in plant tolerance to stress. To explore the structure and expression characteristics of soybean SAMDC-encoding genes, the gene *GmSAMDC1* (Glyma. 02G128000) located on chromosome 2 was cloned from the resistance soybean cultivar Kefeng 1 in this study. Results showed that the gene *GmSAMDC1*, of which complete ORF length was 1 068 bp, and encoded a protein of 355 amino acids containing a ‘SAM_{decarbox}’ domain. For this protein, its isoelectric point (pI) was 4.86, and the relative molecular mass was 38 987.13 Da, containing no transmembrane region as the hydrophilic protein. There were 8 *GmSAMDC1* homologous in soybean, and the genetic relationship of the SAMDC protein-coding genes in red clover (PNY09439.1, 82.64%) and *Arabidopsis thaliana* (AtSAMDC3, 67.22%) was closest. The *GmSAMDC1* promoter sequence contains many cis-acting elements such as defense and stress response elements, plant hormone response elements, and light response components. The expression of *GmSAMDC1* in flowers was the highest, which was similar to the tissue specific expression pattern of Glyma. 01G071300 (sequence similarity is 94.6%), Glyma. 18G278800 (66.8%) and Glyma. 08G25580 (66.5%). Fusion protein Glyma. 02G128000-GFP was expressed in cell membrane and cytoplasm. The results of this study lay a theoretical basis for further elucidation of the role of soybean *GmSAMDC1* in the process of soybean tolerance to stresses.

Keywords: Soybean; *GmSAMDC1*; Tolerance to stress; Cis-acting elements; Subcellular localization

大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] 是世界上重要的油料和粮食作物。干旱、盐碱和极端温度等非生物胁迫以及病虫害等生物胁迫是影响大豆生长发育和产量形成的主要因素。多胺 (polyamines, PAs)

收稿日期: 2018-05-29

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFD0101504); 中央高校基本科研业务费 (Y0201600115); 国家自然科学基金 (31671718, 31371646, 31571690); 现代农业产业技术体系 (CARS-04); 转基因生物新品种培育科技重大专项 (2016ZX08004-004); 江苏省现代作物生产协同创新项目 (JCIC-MCP)。

第一作者简介: 任锐 (1986 -), 男, 博士, 主要从事大豆抗病遗传育种研究。E-mail: 2014201076@njau.edu.cn。

通讯作者: 智海剑 (1957 -), 男, 教授, 博导, 主要从事大豆抗病遗传育种研究。E-mail: zhj@njau.edu.cn。

李凯 (1979 -), 男, 副教授, 硕导, 主要从事大豆抗病遗传育种研究。E-mail: kail@njau.edu.cn。

是一类生物代谢过程中产生的广泛存在于动植物体内的低分子量的脂肪族含氮碱^[1],它能促进植物的生长和发育,在植物的性型分化、形态建成以及对外界生物和非生物逆境反应中发挥重要调控作用^[2-4]。S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶(S-adenosine methionine decarboxylase, SAMDC)是亚精胺和精胺合成的关键酶,更是多胺生物合成的限速酶之一^[5]。

目前,已从水稻(*OsSAMDC1*、*OsSAMDC2*、*BG10SGA029738-PA*和*OB09G17450.1*)、玉米(*ZmSAMDC1*和*ZmSAMDC2*)和拟南芥(*AtSAMDC*、*AtSAMDC1*、*AtSAMDC2*和*AtSAMDC3*)等植物中克隆出来20多个SAMDC蛋白编码基因^[6-8]。该类蛋白对于维持拟南芥和水稻的正常植物生长、发育和胁迫耐受是必需的^[9-10]。Wi等^[11]将康乃馨(*Dianthus caryophyllus* L.)的SAMDC编码基因在烟草中过表达时,转基因烟草对冷害和盐害等多种非生物胁迫的耐受性增强;当番茄中SAMDC编码基因被沉默后,其对叶斑病(*Cladosporium fulvum*)的抗性减弱^[12],当棉花(*Gossypium*)SAMDC编码基因在拟南芥中过表达时,其对棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)的抗性增强^[13]。以上研究结果表明,SAMDC不仅可以参与调控植物对多种非生物胁迫的耐逆调控,而且还可参与植物对真菌和细菌等病害的抗病过程。

Tian等^[14]从大豆中克隆得到*GmSAMDC1*基因,表达分析表明该基因能够响应高盐、干旱和冷害等多种胁迫的诱导。大豆品种科丰1号抗病性强、耐逆性好,是大豆遗传改良的优势亲本。Li等^[15]把科丰1号对大豆花叶病毒(*Soybean mosaic virus*, SMV)株系SC18的抗病基因定位于大豆2号染色体上约80 kb的区段内,*GmSAMDC1*(*Glyma.02G128000*)基因位于该区段内,且被作为6个抗病候选基因之一。以上表明,大豆*GmSAMDC1*基因极有可能在大豆耐逆抗病过程中发挥重要作用。

为进一步探究大豆*GmSAMDC1*基因在大豆耐胁迫过程中的表达调控机制和功能,本研究从科丰1号中克隆了该基因,以此为基础,对其所编码蛋白进行了结构及功能预测、系统进化分析、启动子序列分析和亚细胞定位表达分析。本研究将对下一步分析该基因功能、阐明该基因在大豆耐胁迫调控机制和抗逆基因工程育种具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 大豆品种科丰1号和烟草品种本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)均由国家大豆改良

中心提供。

1.1.2 克隆载体与转化菌株 TA克隆载体pMD19-T Vector,购自TAKARA公司;入门载体pDONR221和终端载体pGWB5-GFP Vector(瞬时表达载体)由本实验室保存;大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 感受态细胞购自Tiangen公司;根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)EHA105感受态细胞由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 大豆*GmSAMDC1*基因的扩增和测序 用Total RNA Kit进行植物总RNA提取;用Oligo(dT) primers和PrimeScript TM II 1st strand cDNA Synthesis Kit进行cDNA第一链的合成。

根据ORF预测结果,用软件Primer Premier 5.0设计扩增基因编码序列的引物,并分别在上下游引物两端加上特异性重组位点attB1和attB2(下划线标注的序列)。引物序列为*C-Glyma.02G128000-F*: AAAAAGCAGGCTACATGGCCATGGCGGTTTCC和*C-Glyma.02G128000-R*: AGAAAGCTGGGTACTCTTCCTCATCTTCCTC,由华大公司合成。

以SMV抗病品种科丰1号的cDNA为模版,用基因特异引物和PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase进行PCR扩增。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,得到预期大小片段。预期大小产物经回收、纯化和加A后连到pMD19-T载体上,转化大肠杆菌DH5 α ,挑阳性克隆,经菌液PCR检测后,挑取阳性单克隆,由华大基因进行测序。最终,获得大豆*GmSAMDC*基因的含attB重组位点的编码区全序列片段。

1.2.2 *GmSAMDC1*基因序列的生物信息学分析 用NCBI网站的ORF finder程序,对大豆*GmSAMDC1*基因cDNA克隆片段的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)进行预测;用ProtParam在线软件(<http://expasy.org/tools/protparam.html>)分析*GmSAMDC1*基因所编码蛋白质的理化性质;用ProtScale在线软件(<http://web.expasy.org/protscale/>)进行氨基酸序列亲水性与疏水性分析;用TMPred(http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)和MEMSAT-SVM在线软件(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/?memsatsvm=1>)进行蛋白质跨膜结构域预测;用SoPMA在线软件(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)进行蛋白质二级结构预测;用SMART在线软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进行蛋白质结构域分析;用在线软件YLoc(<http://abi.inf.uni-tuebin>

gen. de/Services/YLoc/webloc. cgi) 和 Plant-PLoc (http://www. csbio. sjtu. edu. cn/bioinf/plant/) 进行蛋白质亚细胞定位预测;用 Plant CARE 在线软件 (http://bioinformatics. psb. ugent. be/webtools/plantcare/html/)进行启动子序列分析;用 DNAMANTM 软件 (LynnonBiosoft version 8. 0, Pointe-Claire, Canada) 进行氨基酸序列比对;用 MEGA 5. 10 软件进行系统进化分析,用 Neighbor-joining 方法构建系统进化树,bootstrap 值为 1 000,并隐藏可信度小于 70% 的值。

1. 2. 3 *GmSAMDC1* 基因的组织特异性表达分析
根据植物基因组在线数据库 Phytozome 中的基因表达信息,对大豆 *GmSAMDC1* 基因及其大豆同源基因在根、茎、叶、花和幼荚等不同组织中的特异性表达模式进行分析。

1. 2. 4 *GmSAMDC1* 基因的亚细胞定位

(1) 植物表达载体构建

根据 Gateway 载体构建技术,使目的片段先后经 BP 反应和 LR 反应,分别克隆入门载体和终端载体,完成亚细胞定位的瞬时表达载体构建。首先,将 BP 反应产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,并涂布于 LB 固体培养基(含有 50 mg·L⁻¹ Kan),过夜培养。挑取单克隆,扩大培养并进行 PCR 检测,阳性单克隆进行测序验证。测序正确的单克隆,扩大培养、提取质粒,获得入门克隆 pDONR221-Glyma. 02G128000。然后,将 LR 反应产物转化大肠杆菌,经菌液 PCR 检测后,挑取阳性单克隆进行测序比对,最终获得重组质粒 pGWB5 :: Glyma. 02G128000 :: GFP。

(2) 融合蛋白的瞬时表达及亚细胞定位分析

采用冻融法将瞬时表达载体转化到农杆菌中。将测序成功的菌株在含有 Kan、Hyg 以及 Rif 抗生素 (100 mg·L⁻¹) 的 YEB 液体培养基中,培养至对数期 (OD600 为 0. 6 ~ 1. 0)。在离心机中以 1 000 g 的转速离心 10 min,去上清,加入 5 mL 渗透液悬浮菌体,避光常温条件下放置 2 ~ 3 h。选择生长健康的烟草放置于白炽灯下 2 h,使烟草叶片气孔打开。针头刺穿烟草的倒三叶或者倒四叶,用 1 mL 注射器吸取的悬浮菌液,轻轻的从烟草背面注射入烟草叶片。将注射区域标注好,然后放在培养室中 48 ~ 72 h 在激光共聚焦显微镜(蔡司,LSM800)下进行观察并拍照记录。

2 结果与分析

2. 1 大豆 *GmSAMDC* 基因的扩增

图 1 为扩增得到的大豆 *GmSAMDC1* (*Glyma. 02G128000*)

基因完整 ORF 的 cDNA 片段的电泳检测结果,片段长度为 1 068 bp。

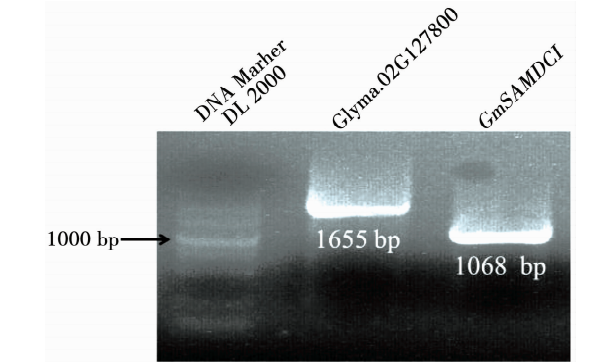


图 1 大豆 *GmSAMDC1* 基因 PCR 扩增条带
Fig. 1 PCR amplification products of soybean *GmSAMDC1* gene

2. 2 大豆 *GmSAMDC1* 基因编码蛋白的结构及功能预测

2. 2. 1 大豆 *GmSAMDC1* 基因 ORF 分析 经 NCBI 网站的 ORF finder 程序预测,如图 2 所示,大豆 *GmSAMDC1* 的基因组编码序列包含 3 个内含子和 4 个外显子,其 cDNA 克隆片段具有一个完整的编码 S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶的开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF),起始密码 ATG 和终止密码 TAG 分别位于开放阅读框的首部和尾部;同时在该 ORF 的 5' 端还有一个小的编码 53 个氨基酸残基组成的多肽前体的上游 ORF (upstream ORF, uORF)。大豆 *GmSAMDC1* 基因 cDNA 克隆片段包含的完整的 ORF 长度为 1 068 bp,编码一个由 355 个氨基酸组成的 S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶的蛋白。

2. 2. 2 大豆 *GmSAMDC1* 基因编码蛋白质理化性质的分析 分析结果显示:基因 *GmSAMDC1* 的预测编码蛋白的理论等电点为 4. 86,相对分子质量为 38 987. 13 Da,分子式为 C₁₇₃₃ H₂₆₆₅ N₄₄₃ O₅₃₈ S₂₁;其氨基酸序列中,丙氨酸 (Ala) 含量最多,占总数的 7. 9%,色氨酸 (Trp) 含量最少,占总数的 0. 6%;总正电和负电残基数分别为 45 和 30,不稳定系数为 39. 33,表明该蛋白较稳定;脂溶性指数为 76. 37,GRAVY 值为 -0. 092,说明该蛋白为亲水性蛋白。该基因所编码的蛋白不含跨膜区,不是跨膜蛋白,无明显的疏水结构域。

该基因的二级结构由 α -螺旋 (32. 39%)、片层结构 (19. 72%)、 β -转角 (6. 20%) 和无规则卷曲 (41. 69%) 构成。*GmSAMDC1* 所编码的蛋白质包含 1 个 SAM₂ decarbox 结构域,位置为 7 ~ 333 位氨基酸,具有亚精胺生物合成活性。亚细胞定位预测结果显示 *GmSAMDC1* 主要定位在细胞质内。

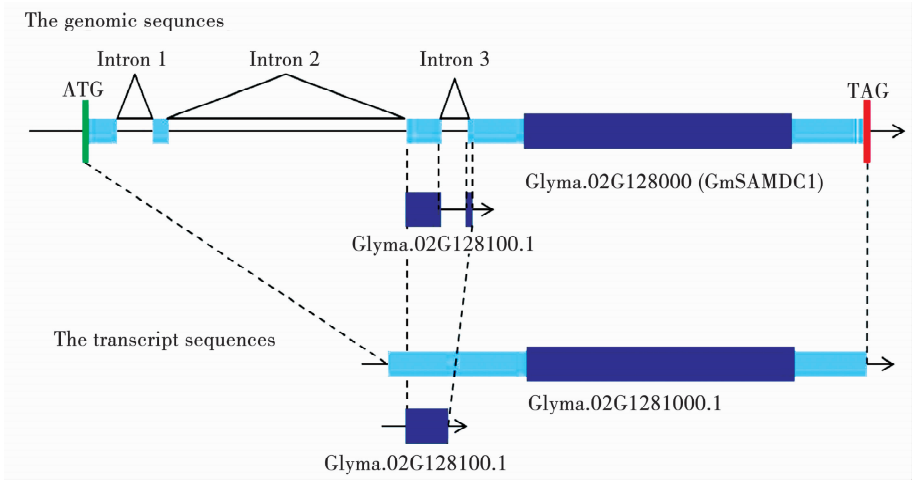


图2 大豆 *GmSAMDC1* 基因的基因组和转录序列结构示意图

Fig. 2 Schematic representation of the structure of the *GmSAMDC1* genomic and transcript sequences

2.3 大豆 *GmSAMDC1* 同源基因的系统进化分析

用大豆 *GmSAMDC1* 基因所编码的蛋白氨基酸序列,在大豆参考基因组在线数据库 Soybase 中进行 Blast 比对,发现 *GmSAMDC1* 在大豆(Williams 82)中共有 8 个编码 S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶活性蛋白的同源基因(图 3)。*GmSAMDC1* 与其 8 个同源基因所编码的蛋白质氨基酸序列同源性分别为 94.6% (Glyma. 01G071300)、66.8% (Glyma. 18G278800)、66.5% (Glyma. 08G255800)、49.6% (Glyma. 17G070500)、42.7% (Glyma. 07G254000)、42.5% (Glyma. 17G020300)、40.0% (Glyma. 15G101000)和 40.0% (Glyma. 13G211700)。大豆中的这 9 个编码 SAMDC 活性蛋白的基因分布于大豆第 1、7、8、10、13、15、17 和 18 号染色体上。大豆 *GmSAMDC1* 基因及其同源基因所编码的蛋白氨基酸序列与已报道的几个物种的 SAMDC 蛋白序列可以被分为 A(Sub-Group A)、B(Sub-Group B)和 C(Sub-Group C)3 个亚群(图 3)。亚群 A 包括 5 个大豆 SAMDC 蛋白的编码基因(Glyma. 17G070500、Glyma. 07G254000、Glyma. 17G020300、Glyma. 15G101000 和 Glyma. 13G211700),这 5 个基因与其它物种的已经报道的 SAMDC 蛋白编码基因的亲缘关系均较远。亚群 B 不包含任何大豆 SAMDC 蛋白的基因,其它同源基因包括水稻的 *OsSAMDC1* (Y07766)、*OsSAMDC2* (AJ251899)、*BGIOS-GA029738-PA* 和 *OB09G17450.1*,玉米的 *ZmSAMDC1* (ACF87816)和 *ZmSAMDC2* (CAA69075)、小麦的 *TmSAMDC1* (ABJ15728)、二穗短柄草的 *BRA-DI3G48490.1*、小果野芭蕉的 *GSMUA_Achr3P04790_001* 及高粱的 *Sb02g025110.1*。聚类在亚群 C 的 SAMDC 蛋白编码基因有 20 个,包括 *GmSAMDC1* 及其 3 个大豆同源基因 Glyma. 01G071300、Glyma. 08G255800 和 Glyma. 18G278800,拟南芥的 4 个

同源基因 *AtSAMDC* (At3g02470)、*AtSAMDC1* (At3g02470)、*AtSAMDC2* (At5g15950)和 *AtSAMDC3* (At5g18930),番茄的 2 个同源基因 *SISAMDC1* (EU196515)和 *SISAMDC* (ABY55855),烟草的同源基因 *NtSAMDC* (U91924)、胡萝卜的同源基因 *DeSAMDC* (AAL16065)、三角叶杨的同源基因 *PtSAMDC* (EEF07896)、三叶橡胶的同源基因 *HbSAMDC1* (KT454961)、蓖麻的同源基因 *ReSAMDC* (XP_002514534)、葡萄的同源基因 *VvSAMDC* (CAD98785.2)、红车轴草的同源基因 *TpSAMDC* (PNY09439.1)、毛果杨的同源基因 *POPTR_0004s10660.1*、芜菁的同源基因 *Bra008662.1-P*。

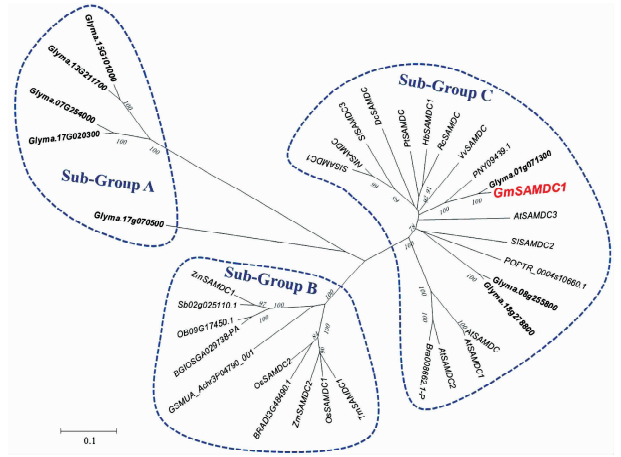


图3 *GmSAMDC1* 与大豆及其它物种同源基因的系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *GmSAMDC1* with its homologous in soybean and other species

图4为 *GmSAMDC1* 与大豆及其它物种同源基因的氨基酸序列比对结果。*GmSAMDC1* 与红车轴草(PNY09439.1)和拟南芥(*AtSAMDC3*)中的 *SAMDC* 蛋白编码基因亲缘关系最近,同源性达到 82.64% 和 67.22%。

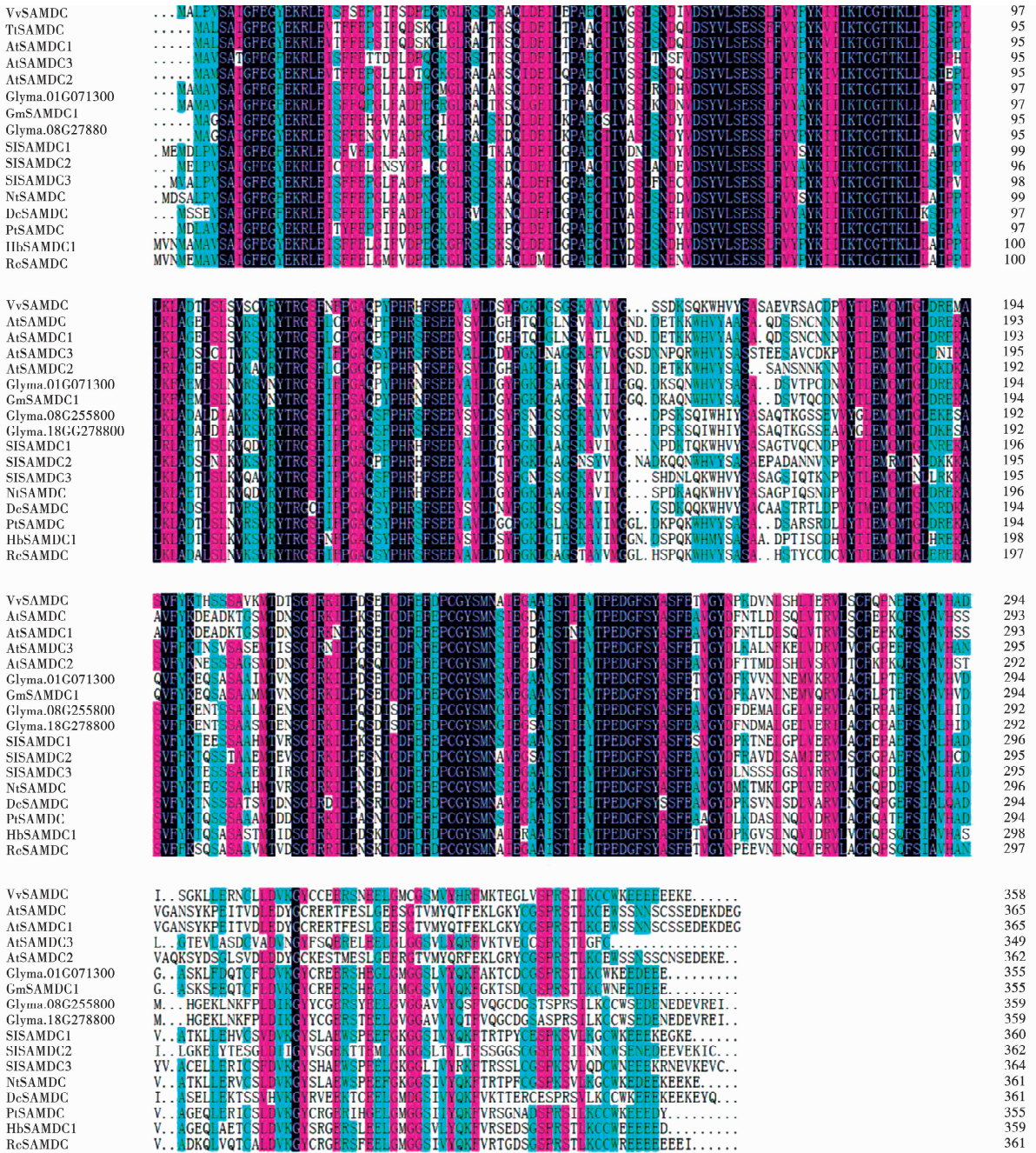


图4 *GmSAMDC1* 与大豆及其它物种同源基因的氨基酸序列比对

Fig. 4 Alignment of AA sequences of *GmSAMDC1* with its homologous in soybean and other species

2.4 大豆 *GmSAMDC1* 基因的启动子序列分析

启动子序列通常是指位于结构基因起始密码子(ATG)上游约1 500~2 000 bp的DNA序列,包含启动子、增强子、调控元件及可诱导元件等顺式作用元件(cis-acting element)。这些顺式作用元件通过与转录因子蛋白结合而控制基因的转录起始时间和表达的程度。因此,对大豆 *GmSAMDC1* 基因的启动子序列进行分析,可为其表达模式及功能预测提供支持。

本研究根据大豆基因组参考序列,选取大豆 *GmSAMDC1* 基因起始密码子(ATG)上游1 500 bp

的DNA序列,用Plant CARE在线软件对其进行分析,结果如表1所示,该启动子序列不仅包含必须的起始转录位点、TATA-BOX等,而且还包含许多顺式作用元件,如防卫和胁迫响应元件TC-rich repeats、Box-W1、MBS、ARE和MBSI;植物激素应答元件TCA-element、CGTCA-motif、TGACG-motif、GARE-motif和P-box;光应答元件Box 4、GATA-motif、I-box、TCT-motif、GT1-motif、ACE和MRE;以及基因表达调控和生理节律调控元件Skn-1_motif、circadian、5'-UTR Py-rich stretch和CCAAT-box等。

表 1 *GmSAMDC1* 基因启动子顺式调控元件的位置与推测功能

Table 1 Promoter cis-form regulatory sequence position and function of *GmSAMDC1* gene

调控元件 Regulatory sequence	位置 Position	核心序列 Core sequence	预测功能 Predicted Functions
TC-rich repeats	40 (-) ;	ATTTTCTTCA	防卫和胁迫响应元件
	418 (+)		Cis-acting element involved in defense and stress responsiveness
Box-W1	494 (+) ;	TTGACC	真菌诱导子反应元件
	1065 (-)		Fungal elicitor responsive element
MBS	1326 (+)	TAACTG	干旱诱导的 MYB 结合位点
ARE	904 (+) ;	TGCTTT	低氧胁迫诱导元件
	1125 (-)		Cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction
MBSI	1326 (-)	TTTTTACGGTTA	调控异黄酮生物合成的 MYB 结合位点
			MYB binding site involved in flavonoid biosynthetic genes regulation
TCA-element	42 (+) ;	CAGAAAAGGA	水杨酸应答元件
	335 (-)		Cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness
CGTCA-motif	398 (+) ;	CGTCA	茉莉酸响应元件
	1156 (+)		Cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
TGACG-motif	398 (-) ;	TGACG	茉莉酸响应元件
	1156 (-)		Cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
GARE-motif	348 (-)	AAACAGA	赤霉素响应元件
			Gibberellin-responsive element
P-box	376 (+)	CCTTTTG	赤霉素响应元件
			Gibberellin-responsive element
Box 4	152 (+) ;	ATTAAT	光响应模块
	239 (+) ;		Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
	926 (-)		
GATA-motif	686(+) ;	GATAGGA	光响应模块
	1406(+)		Part of a light responsive element
I-box	688 (+)	GATAAGATT	光响应模块
			Part of a light responsive element
TCT-motif	268 (+)	TCTTAC	光响应模块
			Part of a light responsive element
GT1-motif	135 (+) ;	GGTTAA	光应答元件
	1274 (-) ;		Light responsive element
	937 (+)		
ACE	710 (+)	AAAACGTTTA	光应答元件
			Cis-acting element involved in light responsiveness
MRE	1276 (+)	AACCTAA	光响应的 MYB 转录因子结合位点
			MYB binding site involved in light responsiveness
Skn-1_motif	1454 (+)	GTCAT	胚乳表达所需的调节元件
circadian	1172(+) ;	CAANNNNATC	生理节律调控元件
	1178(-)		Cis-acting regulatory element involved in circadian control
5'-UTR Py-rich stretch	573 (+) ;	TTTCTTCTCT	高转录水平元件
	876 (+)		Cis-acting element conferring high transcription levels
CCAAT-box	1068 (+)	CAACGG	MYBHv1 转录因子结合位点
			MYBHv1 binding site

2.5 大豆 *GmSAMDC1* 基因的表达分析

2.5.1 大豆 *GmSAMDC1* 基因的组织特异性表达分析 为了进一步探究该基因的时空表达模式,对大豆 *GmSAMDC1* 基因及其大豆同源基因的组织特异性表达模式进行了分析。如图 5 所示,基因 *GmSAMDC1* (Glyma. 02G128000)在花(Flowers)中的表达量最高,其次是根毛(Root hairs)、节(Nodules)、叶(Leaves)和茎(Stem)等,说明该基因可能参与对多种生理代谢过程的调控。*GmSAMDC1* (Glyma. 02G128000)与其大豆

同源基因 Glyma. 01G071300(序列相似性为 94.6%)、Glyma. 18G278800 (66.8%) 和 Glyma. 08G25580 (66.5%)的亲缘关系最近(图 5),且它们的组织特异性表达模式比较相似,说明基因 Glyma. 01G071300、Glyma. 18G278800 和 Glyma. 08G25580 可能具有与 *GmSAMDC1* (Glyma. 02G128000)相似的时空表达模式和功能。*GmSAMDC1* 与其它大豆同源的组织特异性表达模式相差较大。

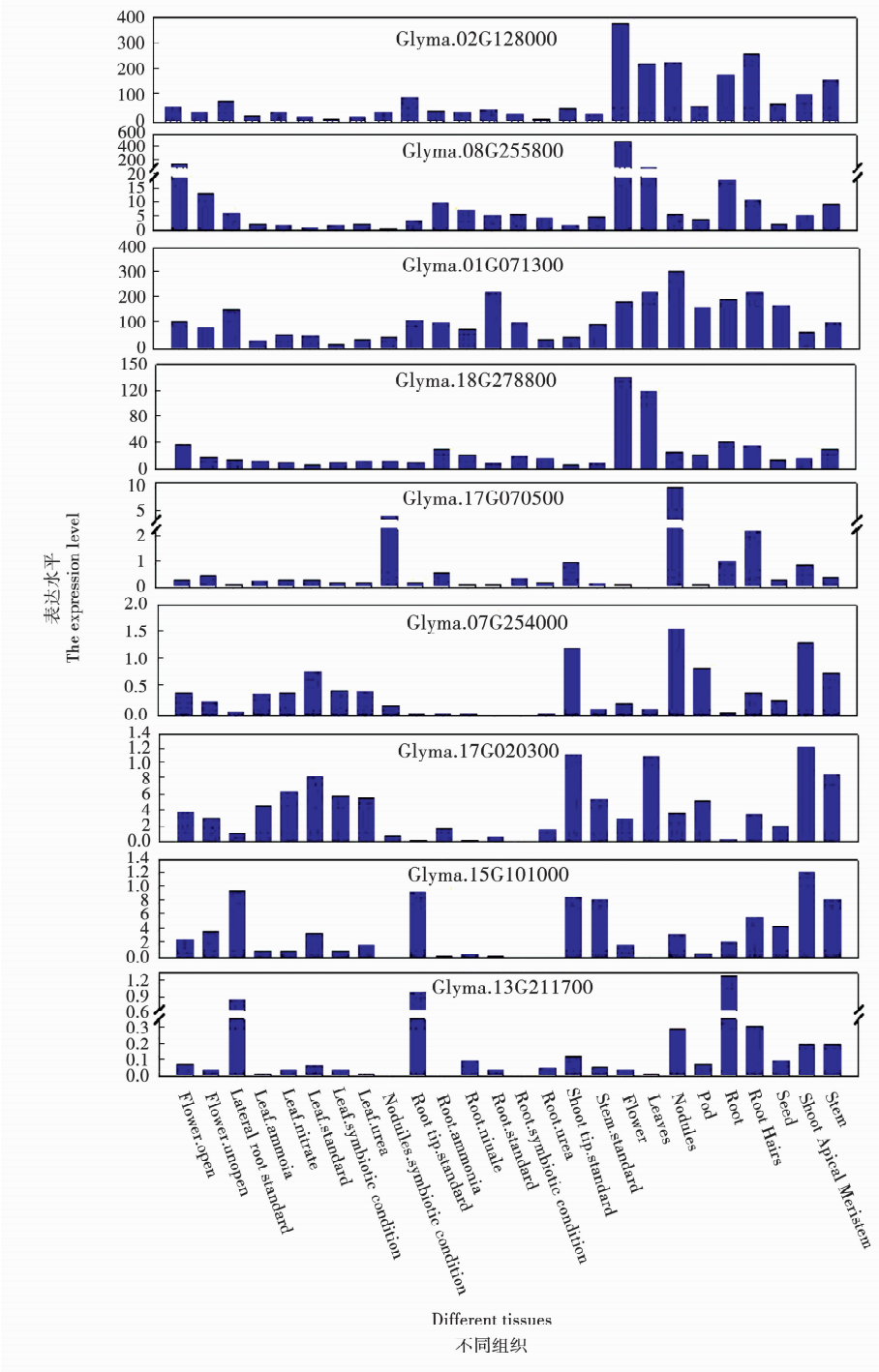


图 5 大豆 *GmSAMDC1* 基因及其大豆同源基因的组织特异性表达分析

Fig. 5 Tissue-specific expression analyses of soybean *GmSAMDC1* gene and its soybean homologous

2.5.2 大豆 *GmSAMDC* 基因的亚细胞定位 用激光共聚焦显微镜观察发现,融合蛋白 Glyma.02G128000-GFP 在细胞膜和细胞质上均可以观察到荧光信号,而空载体 pGWB5-GFP 表达的 GFP 蛋白

在整个细胞(细胞膜,细胞质和细胞核)中都有表达,说明基因 *GmSAMDC1* 所表达的蛋白可以在细胞膜和细胞质上发挥作用(图 6)。

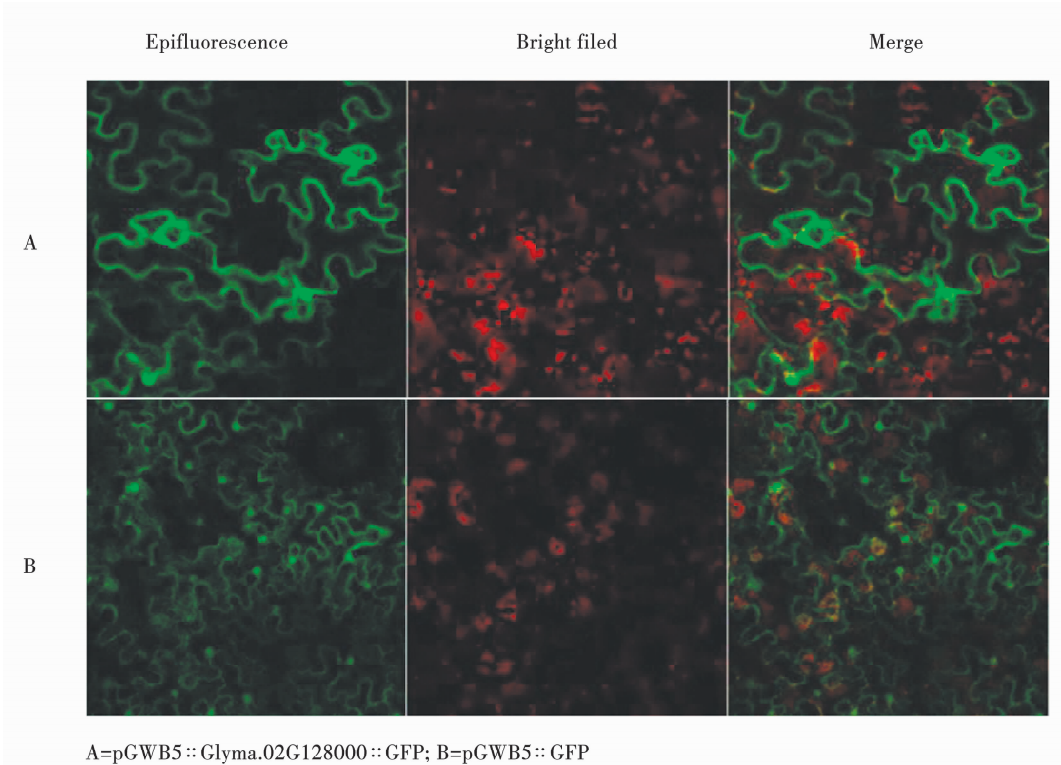


图 6 融合蛋白 pGWB5-Glyma.02G128000-GFP 在激光共聚焦显微镜下的表达情况
Fig. 6 Expression of pGWB5-Glyma.02G128000-GFP fusion protein under laser confocal microscopy

3 讨 论

SAMDC 可以参与植物对多种耐逆和抗病过程的调控^[11-13]。大豆 *GmSAMDC1* 基因首次由 Tian 等^[14]克隆,并且可能在大豆抗 SMV 过程中发挥重要作用^[15]。本研究发现 *GmSAMDC1* (Glyma.02G128000) 所编码的蛋白是包含 1 个 SAM_{decarbox} 结构域的较稳定的亲水性蛋白,理论等电点为 4.86,相对分子质量为 38 987.13 Da。*GmSAMDC1* 与其 8 个大豆同源基因的氨基酸序列相似性最低为 40.0%,最高 94.6%,但其与红车轴草和拟南芥的同源基因氨基酸序列相似性则高达 82.64% 和 67.22%,说明序列相似性较低的大豆同源基因与 *GmSAMDC1* 属于不同的类别,可能具有不同的功能。

GmSAMDC1 基因能够响应高盐、干旱和冷害的诱导,但不能被损伤和 SMV 诱导^[14-15]。本研究发现 *GmSAMDC1* 在花、叶和根等不同组织中的表达水平存在显著差异。*GmSAMDC1* 启动子序列包含许多防卫和胁迫响应元件、植物激素应答元件和光应答元件等顺式调控元件(表 1)。Li 等^[15]研究表明 *GmSAMDC1* 在 SMV 抗、感亲本科丰 1 号(抗)和南

农 1138-2(感)及 Williams 82 参考序列之间高度保守,且其在接种 SMV 后 2 h 在南农 1138-2 中的表达上调,而在科丰 1 号中无显著变化。以上表明,*GmSAMDC1* 启动子序列上的顺式调控元件可能是决定其是否受不同胁迫诱导表达的因素,启动子序列变异与其表达调控及功能的关系有待进一步研究。

跨膜结构域预测表明 *GmSAMDC1* 编码蛋白不含跨膜区,不是跨膜蛋白,无明显的疏水结构域,且亚细胞定位预测结果显示 *GmSAMDC1* 编码蛋白在细胞质内表达。但本研究亚细胞定位表达分析显示融合蛋白 Glyma.02G128000-GFP 在细胞膜和细胞质上表达。瞬时表达体系的不同可能是造成 *GmSAMDC1* 编码蛋白预测结果与实际亚细胞定位结果差异的原因之一。*GmSAMDC1* 编码蛋白的确切表达位置和时空表达模式待进一步研究。

4 结 论

大豆 *GmSAMDC1* 基因的完整 ORF 长度为 1 068 bp,编码一个由 355 个氨基酸组成的包含 1 个 SAM_{decarbox} 结构域的蛋白的亲水性蛋白,无跨膜区;大豆中共有 8 个 *GmSAMDC1* 的同源基因,其与红车轴

草和拟南芥中的 SAMDC 蛋白编码基因亲缘关系最近;其启动子序列包含防卫和胁迫响应等许多顺式作用元件;*GmSAMDC1* 在花中的表达量最高,其融合蛋白在细胞膜和细胞质上表达。大豆 *GmSAMDC1* 基因极有可能在大豆耐逆抗病过程中发挥重要作用,本研究对下一步分析该基因功能、阐明该基因在大豆耐胁迫调控机制和抗逆基因工程育种具有重要意义。

参考文献

[1] Kumar A, Altabella T, Taylor M A, et al. Recent advances in polyamine research[J]. Trends Plant Science, 1997, 2(4): 124-130.

[2] Agudelo-Romero P, Bortolotti C, Pais M S, et al. Study of polyamines during grape ripening indicate an important role of polyamine catabolism[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2013, 67: 105-119.

[3] Pál M, Szalai G, Janda T. Speculation: Polyamines are important in abiotic stress signaling[J]. Plant Science, 2015, 237: 16-23.

[4] Sequera-Mutiozabal M I, Erban A, Kopka J, et al. Global metabolic profiling of *Arabidopsis* polyamine oxidase 4 (AtPAO4) loss-of-function mutants exhibiting delayed dark-induced senescence [J]. Front Plant Science, 2016, 7:173.

[5] Tiburcio A F, Altabella T, Borrell A, et al. Polyamine metabolism and its regulation[J]. Physiology Plant, 1997, 100 (3): 664-674.

[6] Wi S J, Kin S J, Kim W T, et al. Constitutive S-adenosylmethionine decarboxylase gene expression increases drought tolerance through inhibition of reactive oxygen species accumulation in *Arabidopsis*[J]. Planta, 2014, 239 (5): 979-988.

[7] Rodríguez-Kessler M, Jiménez-Bremont J F. Ustilago maydis induced accumulation of putrescine in maize leaves[J]. Plant Signaling & Behavior, 2009, 4(4): 310-312.

[8] Majumdar R. Polyamine metabolism in *Arabidopsis*: Transgenic manipulation and gene expression [D]. Durham: University of New Hampshire, 2011, 645. <https://scholars.unh.edu/dissertation/645>.

[9] Ge C M, Cui X, Wang Y H, et al. BUD2, encoding an S-adenosylmethionine decarboxylase, is required for *Arabidopsis* growth and development[J]. Cell Research, 2006, 16:446-456.

[10] Chen M J, Chen J, Fang J Y, et al. Down-regulation of S-adenosylmethionine decarboxylase genes results in reduced plant length, pollen viability, and abiotic stress tolerance[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2014, 116:311-322.

[11] Wi S J, Kim W T, Park K Y. Overexpression of carnation S-adenosylmethionine decarboxylase gene generates a broad-spectrum tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants[J]. Plant Cell Reports, 2006, 25(10): 1111-1121.

[12] Zhao T, Yang H, Jiang J, et al. Silencing of the SAMDC gene decreases resistance of tomato to *Cladosporium fulvum*[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2018, 102: 1-7.

[13] Mo H J, Sun Y X, Zhu X L, et al. Cotton S-adenosylmethionine decarboxylase-mediated spermine biosynthesis is required for salicylic acid-and leucine-correlated signaling in the defense response to *Verticillium dahliae*[J]. Planta, 2016, 243(4): 1023-1039.

[14] Tian A G, Zhao J Y, Zhang J S, et al. Genomic characterization of the S-adenosylmethionine decarboxylase genes from soybean [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 108: 842-850.

[15] Li K, Ren R, Adhimoolam K, et al. Genetic analysis and identification of two soybean mosaic virus resistance genes in soybean [*Glycine max* (L.) Merr][J]. Plant Breeding, 2015, 134(6): 684-695.