



大豆 *BBX32* 基因生物信息学分析及基因编辑靶点设计

李 泰¹, 杜 浩¹, 黎永力¹, 程玉汉², 南海洋¹, 侯智红¹, 程 群¹, 刘宝辉¹

(1. 广州大学 生命科学学院, 广东 广州 510006; 2. 北京中农富通园艺有限公司, 北京 100083)

摘 要: *BBX32* 基因是一种含锌指结构的转录因子, 广泛的参与植物生长和发育过程, 但在大豆中, *BBX32* 基因的具体生物学功能还尚未被解析。为研究大豆 *BBX32* 基因在大豆中的分子机理和生物学功能, 本研究通过同源比对分析发现, 大豆中含有两个与拟南芥 *BBX32* 同源的基因, 分别命名为 *GmBBX32a* 和 *GmBBX32b*。同时, 通过检索 RNA-seq 数据库, 对 *GmBBX32a* 和 *GmBBX32b* 在大豆中不同组织的表达部位进行分析, 结果发现 *GmBBX32a* 在花、叶和豆荚中具有较高的表达量, 而 *GmBBX32b* 在豆荚和花中具有较高的表达量, 说明 *GmBBX32a* 和 *GmBBX32b* 可能参与大豆的开花和籽粒大小形成。此外, 利用 CRISPR/Cas9 技术, 构建 *GmBBX32a* 和 *GmBBX32b* 基因的敲除载体, 并转化到大豆毛根中进行靶点检测, 最终获得了有编辑效率的基因编辑载体, 为接下来获得稳定转基因材料提供有效编辑靶点信息。

关键词: 大豆; *BBX32* 基因; 生物信息学分析; CRISPR/Cas9 技术; 编辑靶点

Bioinformatics Analysis and Gene Editing Target Design of *BBX32* Gene in Soybean

LI Tai¹, DU Hao¹, LI Yong-li¹, CHENG Yu-han², NAN Hai-yang¹, HOU Zhi-hong¹, CHENG Qun¹, LIU Bao-hui¹

(1. School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China; 2. Beijing Zhongnong Futong Horticulture Co., Ltd., Beijing 100083, China)

Abstract: *BBX32* genes belong zinc finger transcription factor, which are widely involved in plant growth and development. However, the biological function of *BBX32* genes had not been resolved in soybean. To investigate the molecular mechanism of *BBX32* genes in soybean, homology alignment analysis was performed. The result showed that the two homologous of *Arabidopsis BBX32* were found in soybean, and named *GmBBX32a* and *GmBBX32b*. The expression levels *GmBBX32a* and *GmBBX32b* in different tissues of soybean were analyzed by using the RNA-seq database. The result showed that the expression level of *GmBBX32a* was higher in flower, leaf and pod, while the expression level of *GmBBX32b* was higher in pod and flower, indicating that *GmBBX32a* and *GmBBX32b* might be involved in flowering and seed size formation in soybean. In addition, the knockout vectors of *GmBBX32a* and *GmBBX32b* were constructed and transformed into soybean hair roots for target detection by using CRISPR/Cas9 technology, which should be provide efficient editing target information for the next generation of stable transgenic materials. Our work provides a theoretical basis for in-depth analysis of the complex molecular mechanisms in regulating soybean yield traits.

Keywords: Soybean; *BBX32* genes; Bioinformatics analysis; CRISPR/Cas9 technology; Edit target

随着世界人口的不断增长, 人类对粮食的需求也在不断升高, 预计 30 年后, 人类对粮食的总体需求将会上升 70%^[1-2]。大豆作为全球重要的经济作物之一, 蛋白质的含量十分丰富^[3-4]。但由于大豆是典型的短日照作物, 对光周期反应极其明显^[5], 以至于我国大豆单产较低, 大豆产业面临严重依赖进口的危机^[6]。分子辅助育种是通过将传统的育种技术与现代分子生物学技术相结合, 培育出高

产优质新品种的新方法, 利用该方法能够大大加快大豆育种进程, 并实现精准育种^[7]。因此, 深入挖掘产量相关性状的关键基因并应用到大豆分子育种中是解决我国大豆产业现状的重要举措之一。

锌指蛋白 (Zinc finger protein, ZFP) 类转录因子是生物中一类重要的转录因子家族, 因其含有由组氨酸 (His)、半胱氨酸 (Cys) 和锌离子构成的指状结构特征而得名, 它可以通过结合特异的 DNA 和

收稿日期: 2021-04-22

基金项目: 国家自然科学基金 (31801384, 31930083)。

第一作者: 李泰 (1999—), 女, 在读硕士, 主要从事光周期调控大豆开花研究。E-mail: litai990511@163.com。

通讯作者: 刘宝辉 (1964—), 博士, 教授, 主要从事光周期调控大豆开花研究。E-mail: liubh@gzhu.edu.cn。

RNA 序列,发挥对转录、RNA 包装等调控作用,同时,也能够与蛋白质相互作用,在细胞凋亡、蛋白折叠组装等方面发挥重要的调控作用^[8]。BBX 蛋白通过调控下游基因的表达而参与植物的生长发育、光形态建成等生命过程^[9-12]。在拟南芥中,*AtBBX24* 和 *AtBBX25* 能够抑制 *HY5* (Elongated hypocotyl 5) 的表达,进而抑制下游基因 *AtBBX22/LZF1* (Light-regulated Zinc Finger protein 1) 的表达,最终影响幼苗的光形态建成过程^[13]。此外,*AtBBX24* 还可以通过与 *HY5* 形成异源二聚体,影响 *HY5* 与花青素合成酶基因启动子的结合活性,从而抑制它们的表达^[14]。同时,BBX 家族蛋白在植物蛋白中的功能也较为保守,例如,将拟南芥 *AtBBX32* 转入到大豆植株中也能发挥功能,最终提高大豆产量。锌指蛋白根据与指状结构中锌离子结合的组氨酸和半胱氨酸的数量和顺序不同分为 9 大类: C_2H_2 、 C_8 、 C_6 、 C_3 、 HC_4 、 C_2HC 、 C_2HC_5 、 C_4 、 C_4HC_3 和 $CCCH$ ^[15]。其中,BBX 蛋白是一类 C_3HC_4 家族蛋白,一般包含 1 或 2 个参与蛋白质-蛋白质间互作的 B-box 基序^[16]。BBX 蛋白在植物中普遍存在,例如,在拟南芥中含有 32 个 BBX 蛋白^[17],水稻中含有 30 个 BBX 蛋白^[18],而在大豆中的 BBX 蛋白数量还鲜有报道。

CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9) 基因编辑技术通过人工设计的 sgRNA (single guide RNA) 来识别目的基因组序列,并引导 Cas9 蛋白酶有效切割 DNA 双链,形成双链断裂,损伤后修复会造成基因敲除或插入等,最终达到对基因组 DNA 进行修饰的目的^[19-20]。近年来,该技术被广泛应用于植物中。例如,2013 年 Shan 等^[21]首次将 CRISPR/Cas9 技术利用在水稻中,成功靶向敲除了水稻中的 *OsPDS* (Phytoene Desaturase) 基因,使水稻获得白粉病抗性。在大豆中,应用 CRISPR/Cas9 技术成功敲除 *GmGASA6* (Gibberellic Acid Stimulated *Arabidopsis* 6) 基因后,发现突变体植株的胚根伸长受到显著抑制,说明 *GmGASA6* 基因能够促进种子萌发和胚根的伸长^[22]。

研究发现,将拟南芥 *AtBBX32* 转入到大豆中,能够影响清晨表达大豆生物钟基因 *GmTOC1* (Timing of Cab Expression 1) 和 *GmLCL2* (Late elongated hypocotyl 1/Circadian clock associated 1 like 2) 的转录水平,最终显著提高大豆的单株产量^[1],然而大豆中的 *BBX32* 基因与大豆产量是否具有直接的关系

还不清楚,因此,本研究前期通过与拟南芥 *AtBBX32* 基因进行同源比对以及进化树分析,并通过转录组数据库预测主要 *GmBBX32* 基因的具体表达部位,为验证主要 *GmBBX32* 基因的功能奠定理论基础。同时,为进一步深入解析 *GmBBX32* 基因的功能,利用 CRISPR-Cas9 技术设计敲除主要 *GmBBX32* 基因靶点,并利用大豆发根转化对靶点效率进行检测,为获得稳定的大豆突变体材料奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以大豆品种 Williams 82 为根毛转基因受体材料,发根农杆菌菌株为 K599,由广州大学分子遗传与进化创新研究中心实验室保存。CRISPR/Cas9 载体构建质粒 AtU3d、AtU3b、AtU6-1、AtU6-29 和 CRISPR/Cas9,由华南农业大学刘耀光实验室提供。DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒均购买自北京康为世纪生物科技有限公司,*Bsa* I 内切酶和 T4 DNA 连接酶购买自 New England Biolabs 公司,DH5 α 感受态细胞购买自深圳康体生命科技有限公司,大豆萌发培养基和发根培养基配方参考甘卓然等^[23]。

1.2 试验设计

在 Phytozome 12 数据库 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) 中搜索并下载与拟南芥 *AtBBX32* (*AT3G21150*) 同源的大豆基因的氨基酸序列。为确定 *BBX32* 基因家族蛋白在豆科作物中的功能保守性,将大豆 *BBX32* 基因与 7 种豆科作物进行多序列比对。同时,分别预测主要 *GmBBX32* 蛋白的二级结构与三级结构,并分析主要 *GmBBX32* 蛋白在大豆测序品种 Williams 82 不同组织部位的表达情况,以确定其功能及是否发生功能分化。此外,为研究主要 *GmBBX32* 基因在大豆中的生物学功能,利用 CRISPR/Cas9 技术进行基因编辑的载体构建,再通过大豆根毛转化对各个靶点编辑的有效性进行验证。

1.3 同源比对及进化树分析

分别在 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载豆科作物相思子、绿豆、菜豆、赤豆、豇豆、蠶豆和密花豆的氨基酸序列;使用 BLAST 中 blastp (protein-protein BLAST) 与 CD-Search 功能获取与大豆中 *BBX* 家族基因同源性较高的其他豆

科基因序列及其结构域相关信息;利用 MEGA_X 软件构建系统进化树;利用 DNAMAN 软件对豆科作物中的 BBX32 氨基酸序列进行同源比对。

1.4 蛋白质二级及三级结构预测

为进一步分析 GmBBX32a 和 GmBBX32b 蛋白之间是否存在功能分化,利用 SOPMA 在线软件工具 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 与 SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>) 网站预测大豆 *GmBBX32a*、*GmBBX32b* 编码蛋白质的二级与三级结构,并进行对比分析。

1.5 组织特异性表达分析

基因的具体表达部位与其功能密切相关,因此为了更深入地了解 GmBBX32a 和 GmBBX32b 蛋白的功能,参照 Machado 等^[24]构建的 RNA-seq 数据库

信息,获取 *GmBBX32a* 和 *GmBBX32b* 基因在大豆不同组织(叶、茎、根、花、种子、荚和子叶)中的表达数据。利用 TBtools^[25]将 *GmBBX32a* 和 *GmBBX32b* 基因在大豆中的具体表达部位进行可视化分析。

1.6 靶点引物设计

为获得 *GmBBX32a/b* 基因大豆突变体植株,首先利用 CRISPR/Cas9 技术构建基因编辑载体,再利用 CRISPR direct(<http://crispr.dbcls.jp/>)在线网站设计 4 个 *GmBBX32a*、*GmBBX32b* 基因的敲除靶点,其中靶点 T1 和 T2 能够同时敲除 *GmBBX32a* 和 *GmBBX32b* 基因,T3 只能够敲除 *GmBBX32a* 基因,T4 只能够敲除 *GmBBX32b* 基因。靶点序列引物参如表 1 所示。所有寡核苷酸链引物均由广州擎科测序服务公司合成。

表 1 基因靶点引物名称和序列
Table 1 The name and sequence of gene target primers

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	用途 Usage
BBX32T1F	GTCACAGAGAAATGCGGAATCGGA	构建基因编辑载体
BBX32T1R	AAACTCCGATTCCGCATTCTCTG	构建基因编辑载体
BBX32T2F	GTCAGATGCGTCGTCGGTCACGG	构建基因编辑载体
BBX32T2R	AAACCCGTGACCGACGACGCATC	构建基因编辑载体
BBX32T3F	ATTGAGGAAGTTGGCGGCCTGGA	构建基因编辑载体
BBX32T3R	AAACTCCACGCCGCCAACTTCCT	构建基因编辑载体
BBX32T4F	ATTGAGAAAGTTGGCGGCCTGCA	构建基因编辑载体
BBX32T4R	AAACTGCACGCCGCCAACTTTCT	构建基因编辑载体
SP3	GTCGTGCTCCACATGTTGACCGG	筛选 CRISPR/Cas9 阳性单克隆
SP1	GAAGTTATTGCATCTATGTCGGG	筛选 CRISPR/Cas9 阳性单克隆
GmBBX32aF	GATATGATGGGTTGAGTGCTACT	检测靶点是否编辑
GmBBX32aR	TTGGCTTCGGTTGGGTCA	检测靶点是否编辑
GmBBX32bF	AAGTCAAGGGAAGAATAACGCAA	检测靶点是否编辑
GmBBX32bR	TTTGTTTGGCTAATGAGACGAT	检测靶点是否编辑

1.7 CRISPR/Cas9 载体构建与根毛转化

参照曾栋昌等^[26]的方法构建 CRISPR/Cas9 载体,具体步骤如下:首先,将靶点引物放置 PCR 仪中

90 ℃退火 30 s,再使用 T₄ DNA Ligase 酶和 *Bsa* I 酶将靶点引物与对应的 gRNA 连接起来。进行两轮 PCR 反应^[26]并使用胶回收试剂盒 (Omega, D2500-

02)回收产物。然后,将上步所获得靶标 gRNA 表达盒胶回收产物与 pYLCRISPR/Cas9 载体连接。最后,将连接产物转化到大肠杆菌感受态 DH5 α 中,并使用 Cas9 特异引物 SP3 和 SP1(表 1)进行菌落 PCR^[26]筛选单克隆,阳性单克隆送往广州天一辉远测序服务公司测序。测序验证成功后参照质粒试剂盒说明书提取质粒并转化到农杆菌 K599 感受态细胞中。

CRISPR/Cas9 技术在多基因敲除中存在一定的脱靶效率。为了确定大豆稳定转基因的有效编辑靶点,通过大豆根毛转化验证各个靶点编辑的有效性。首先,参照 Cheng 等^[27]方法进行根毛转化,具体步骤如下:采用氯气灭菌法(次氯酸钠:浓盐酸 = 24:1)对大豆品种 Williams 82 灭菌 20 ~ 24 h,于超净工作台吹 2 h 后均匀撒在大豆萌发培养基中,每皿大约 10 颗,将其放置在温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 、光照 16 h 的无菌培养室中进行萌发培养。约 7 d 后,在超净工作台里用高温灭菌手术刀片在大豆子叶背面制造伤口,并向伤口处滴加 10 ~ 15 μL 含有目的载体的 K599 菌液,并继续放入无菌室中培养,直到伤口处长出根毛。

1.8 基因靶点编辑有效性检测

收集大豆根毛并使用 DNA 提取试剂盒提取大豆根毛 DNA,利用载体特异引物 SP3 和 SP1(表 1)进行 PCR 反应^[27],检测是否为转基因根毛。利用 Primer 5.0 软件设计 *GmBBX32a* 和 *GmBBX32b* 基因的特异检测引物(表 1),并对已检测为阳性的转基

因根毛进一步进行 PCR 检测^[27],并将 PCR 产物送至广州天一辉远测序服务公司测序。对测序峰图进行分析比对,在靶点处产生套峰的样品已经发生基因编辑,而未在靶点处产生套峰的样品未发生基因编辑。

2 结果与分析

2.1 进化树及同源比对分析

以拟南芥 *AtBBX32* 氨基酸序列进行同源比对及进化分析结果表明,大豆中含有 32 个 BBX 蛋白 (Glyma. 07G020400、Glyma. 08G221600、Glyma. 12-G198400、Glyma. 12G103800、Glyma. 15G065900、Glyma. 13G248000、Glyma. 06G300900、Glyma. 13-G303700、Glyma. 10G269400、Glyma. 06G059600、Glyma. 06G255300、Glyma. 19G039000、Glyma. 13-G050300、Glyma. 03G209800、Glyma. 19G207100、Glyma. 20G121700、Glyma. 04G058900、Glyma. 02-G223700、Glyma. 01G168500、Glyma. 02G152900、Glyma. 10G021400、Glyma. 11G074900、Glyma. 11-G110900、Glyma. 13G009300、Glyma. 13G093800、Glyma. 14G190400、Glyma. 16G050900、Glyma. 17-G066600、Glyma. 19G099700、Glyma. 20G060400、Glyma. 12G196200、Glyma. 13G306300), 其中 2 个 BBX 蛋白分别位于第 7 号和第 8 号染色体上,并能够与 *AtBBX32* 聚类在一起,将其分别命名为 *GmBBX32a* 和 *GmBBX32b*(图 1)。

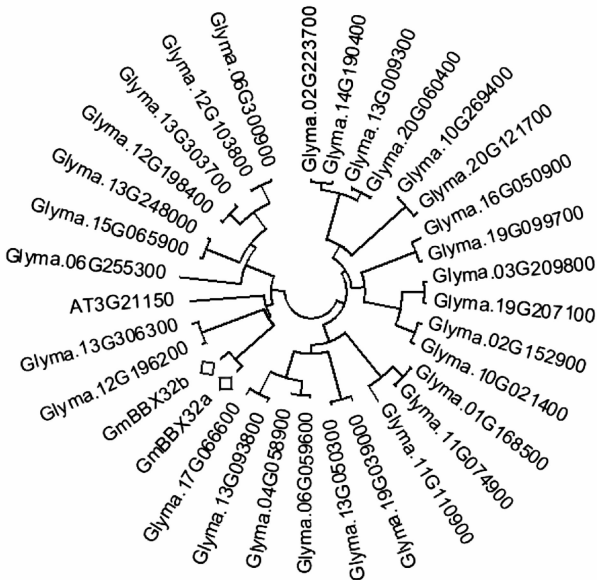


图 1 大豆 BBX 家族蛋白的系统进化树

Fig. 1 The phylogenetic tree of soybean BBX family proteins

通过同源性比对分析后发现,GmBBX32a 和 GmBBX32b 与拟南芥的 AtBBX32 同源性较高,分别为 50.7% 和 52.4%,说明 BBX32 蛋白在大豆和拟南芥中的功能可能较为保守(图 2a)。同时,为分析 BBX32 基因家族蛋白在其他豆科作物中的功能是否保守,分别与豆科作物相思子(XP_027344729.1)、绿豆(XP_014489838.1)、菜豆(XP_007142121.1)、

赤豆(XP_017429555.1)、豇豆(XP_027939463.1)、蠶豆(RDX73001.1)、密花豆(TKY64668.1)的氨基酸序列进行比对。多序列比对结果表明,在不同的豆科作物中,BBX32 蛋白均存在 1 个保守结构域:Bbox1_BBX-like 结构域,位于 647 位氨基酸,保守率约为 86.05%(图 2a 和图 2b),说明在豆科作物中 BBX32 的功能可能高度保守。

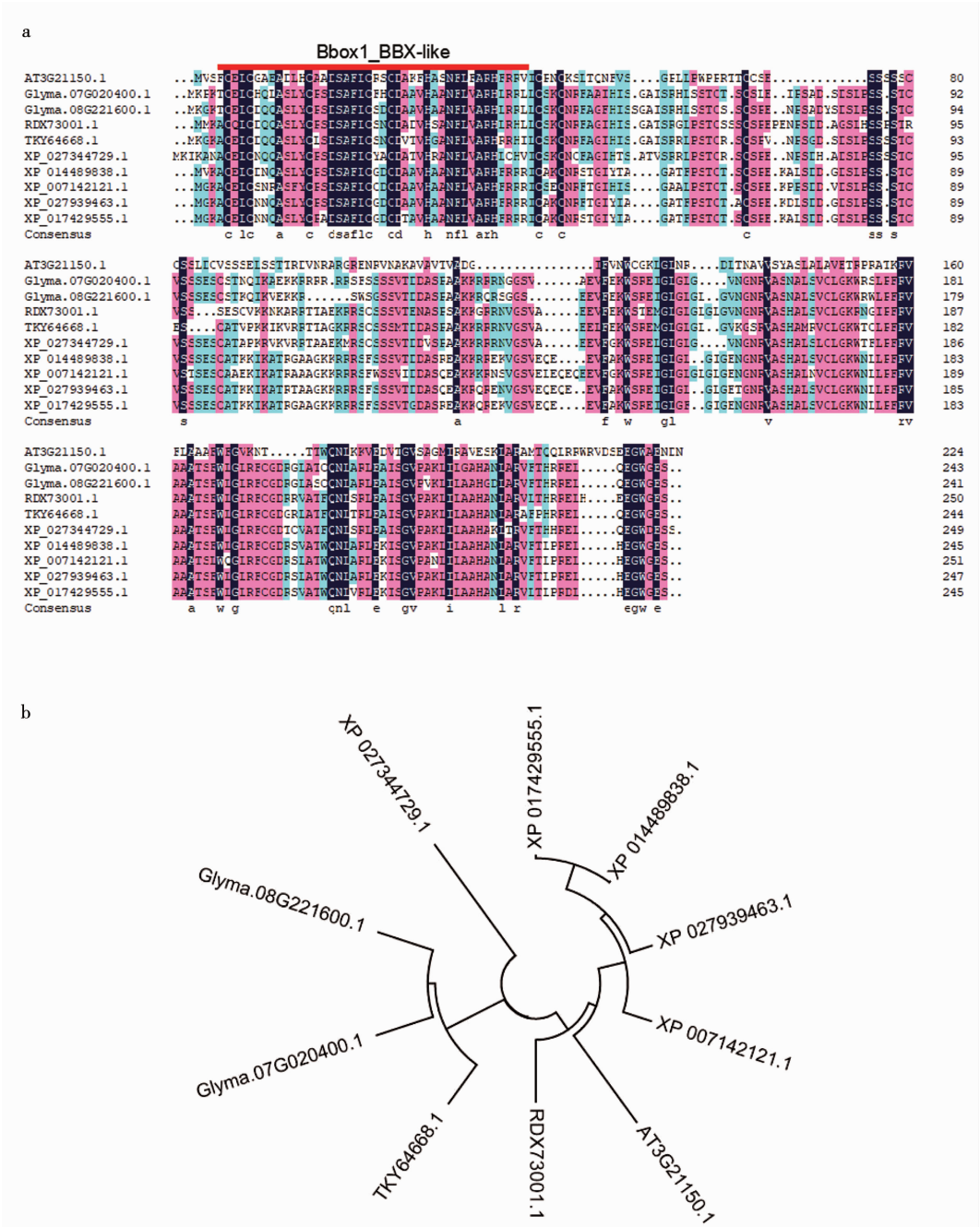


图 2 豆科作物的 BBX 同源比对 (a) 及进化树 (b) 分析

Fig.2 The sequence homology comparison (a) and phylogenetic tree (b)

2.2 GmBBX32 的蛋白质二级与三级结构预测

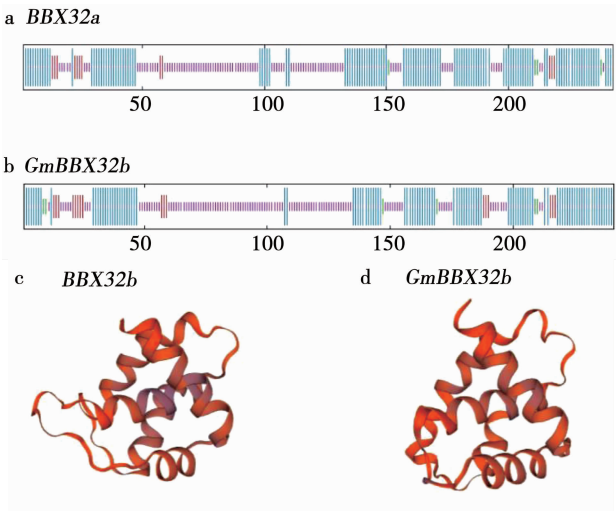
蛋白结构分析结果表明,GmBBX32a 与 GmBBX32b 蛋白的二级结构中, α -螺旋与 β -转角的数量相差不大,具有一定的保守性,但分布位置上存在着一定差异(表 2、图 3a 和图 3b)。

GmBBX32a 和 GmBBX32b 的蛋白三级结构较为保守,整体结构上无太大差异(图 3c 和图 3d),以上结果说明 GmBBX32a 和 GmBBX32b 蛋白功能可能较为保守。

表 2 GmBBX32 蛋白二级结构的主要形式

Table 2 The main secondary structure of GmBBX32 protein

基因名称 Gene name	氨基酸数 Number of amino acids	α 螺旋 α -helix		β 转角 β -turn		无规卷曲 Random coil		延伸链 Extended strand	
		数量 Number	比例 Proportion/%	数量 Number	比例 Proportion/%	数量 Number	比例 Proportion/%	数量 Number	比例 Proportion/%
GmBBX32a	243	125	51.44	4	1.65	102	41.98	12	4.94
GmBBX32b	241	104	43.15	6	2.49	114	47.30	17	7.05



a ~ b. 大豆 GmBBX32a 和 GmBBX32b 编码蛋白质的二级结构;c ~ d. 大豆 GmBBX32a 和 GmBBX32b 编码蛋白质的三级结构;蓝色区域表示 α -螺旋结构;红色区域表示延伸链结构;绿色区域表示 β -转角结构;紫色区域表示无规卷曲结构。

a-b. Secondary structure for protein encoded by soybean *GmBBX32a*, *GmBBX32b*; c-d. Tertiary structure for protein encoded by soybean *GmBBX32a*, *GmBBX32b*; The blue area represents the α - helix structure; The red area represents the extended strand structure; The green area represents the β -turn structure; The and the purple area represents the random coil structure.

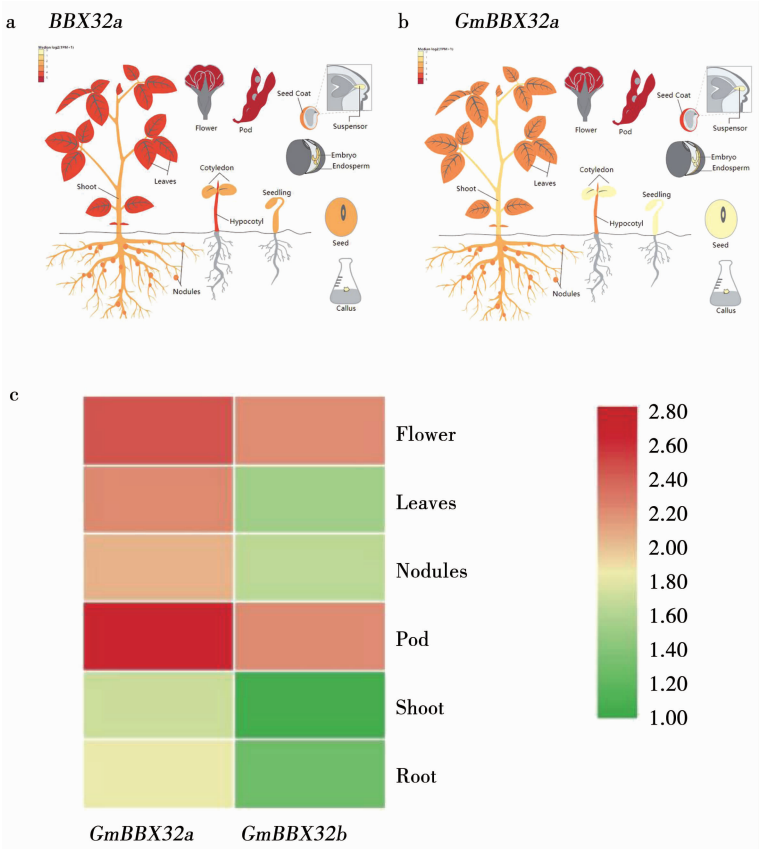
图 3 GmBBX32 蛋白质二级和三级结构预测

Fig. 3 The prediction of secondary and tertiary structure of GmBBX32 protein

2.3 组织特异性表达分析

分析结果显示,*GmBBX32a* 在大豆中各个组织中的表达量均显著高于 *GmBBX32b*(图 4a ~ c),推测 *GmBBX32a* 在大豆中的功能可能强于 *GmBBX32b*。其中,*GmBBX32a* 在花、叶和豆荚中具

有较高的表达量(图 4a 和 4c),*GmBBX32b* 在豆荚和花中具有较高的表达量(图 4b 和 4c),说明 *GmBBX32a* 和 *GmBBX32b* 可能与大豆的开花和籽粒大小形成相关。



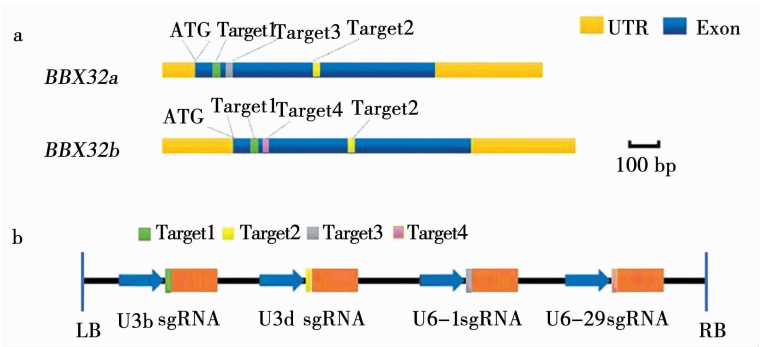
a ~ b. 大豆不同组织中的表达;c. 大豆不同组织表达量(花、叶、荚、茎、结节、种子和根)热图;红色代表高转录水平;绿色代表低转录水平。
a-b. The expression in different soybean tissues;c. The heatmap according to RNA-seq database;The red represents high transcript level;The green represents low transcript level.

图4 大豆 *GmBBX32a* 和 *GmBBX32b* 基因在不同组织中的表达差异

Fig. 4 The differential expression of *GmBBX32a* and *GmBBX32b* genes in different tissues

2.4 *GmBBX32a/b* 基因编辑载体构建及有效性检测
2.4.1 CRISPR/Cas9 载体的构建及鉴定
CRISPR/Cas9 基因编辑载体的靶点位置及载体构建

信息如图 5a 和 5b 所示。测序验证结果证明载体已构建成功,能够用于后续大豆根毛转化试验。



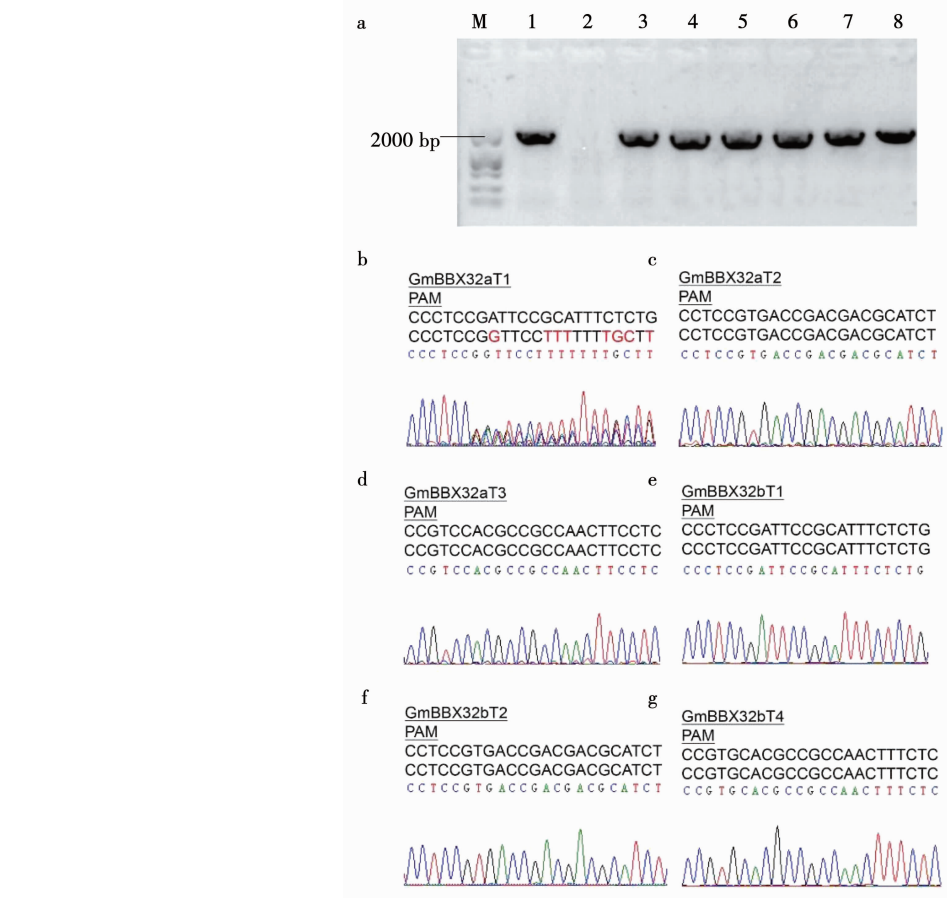
a. Cas9 载体靶点位置信息;b. Cas9 载体结构信息。
a. The target location information of the Cas9 vector;b. The structure information of Cas9 vector.

图5 靶点位置及载体构建信息

Fig. 5 The target location and vector construction information

2.4.2 *GmBBX32a/b* 基因靶点有效性检测 利用载体通用引物对转基因大豆根毛的检测结果如图 6a 所示,共检测出 6 棵阳性转基因根毛,*GmBBX32a* 基因在 T1 靶点附近出现了双峰,T1 靶点能够有效编

辑,而在靶点 T2 和 T3 处均未产生双峰,说明 T2 和 T3 靶点无效。尽管 *GmBBX32b* 与 *GmBBX32a* 共享靶点 T1 和 T2,但在 *GmBBX32b* 基因上,T1 和 T2 靶点并未发生编辑,T4 靶点也未发生编辑(图 6b ~ g)。



a. 阳性转基因根毛检测;b ~ d. *GmBBX32a* 的靶点 T1、T2 和 T3 的突变情况;e ~ g. *GmBBX32b* 的靶点 T1、T2 和 T4 的突变情况;M. DNA marker (DM2000);1. 阳性对照;2. H₂O 空白对照;3 ~ 8: 阳性转基因根毛。
a. Detection of positive transgenic roots;b-d. Mutations of T1, T2 and T3 of *GmBBX32a*;e-g. Mutations of T1, T2 and T4 of *GmBBX32b*;M. DNA marker (DM2000);1. Positive control;2. H₂O blank control;3-8. Positive transgenic roots.

图6 编辑靶点测序峰图

Fig. 6 The detailed sequence of the targets site in the transgenic soybean hairy roots

3 讨论

BBX32 作为锌指结构转录因子中的重要成员之一,广泛参与植物生长发育,并响应逆境胁迫反应等过程^[28-30]。BBX32 不仅存在转录活性的调控,同时能够通过复杂的蛋白互作效应发挥作用,在调控同一个生理过程时,同一个基因家族不同成员的正效应和负效应共存,对于植物生长、发育的精准调控非常有利^[31]。在拟南芥中,*AtBBX32* 能够参与调节拟南芥的光信号转导,同时,将 *AtBBX32* 转入大豆中后,能够显著延迟 R3 到 R5 期的时间,从而增加豆瓣数量、种子数量和单个种子重量,促进大

豆产量的提高^[1]。本研究为挖掘大豆中 BBX32 的生物学功能,通过与 *AtBBX32* 进行进化分析及同源比对分析,鉴定出大豆中的 2 个 BBX32。通过组织特异性表达分析发现,*GmBBX32a* 和 *GmBBX32b* 主要在大豆花和荚中表达,说明其可能在大豆花和荚中发挥作用,从而影响大豆开花时间和籽粒大小或形状。
CRISPR/Cas9 系统目前已经成功应用于大豆中。例如,在大豆中同时敲除 4 个核心生物钟基因 *LHY/CCA1* 可导致大豆株高显著降低^[32]。尽管 CRISPR/Cas9 技术具有高效便捷等优点,但是在多基因敲除应用于大豆中时,仍然会出现编辑效率较

低的情况^[33]。为保证大豆稳定转基因的效率,本研究首先利用大豆根毛转化系统检测不同靶点的编辑效率并成功验证出有效的编辑靶点,为接下来的研究提供了有效的分子理论基础。结果表明在两个*BBX32* 基因上的6个靶点中只有1个靶点能够有效编辑,并且尽管*GmBBX32a* 和*GmBBX32b* 共享同一个靶点,但该靶点仅能够敲除*GmBBX32a*,不能够敲除*GmBBX32b*,说明相同的靶点在不同的基因上的编辑效率也是不同的。后续研究将继续深入开发*GmBBX32a* 和*GmBBX32b* 的其他有效编辑靶点。

4 结 论

本研究鉴定出大豆中含有2个*BBX32* 基因,分别为*GmBBX32a* 和*GmBBX32b*。通过氨基酸序列比对分析、蛋白结构分析及组织特异表达分析推测出*GmBBX32a* 和*GmBBX32b* 主要在大豆开花和籽粒大小等方面存在功能,且*BBX32* 家族蛋白的功能较为保守。本研究成功构建*GmBBX32a/b* 基因的敲除载体,并通过大豆根毛转化试验确定了*GmBBX32a* 的有效基因编辑靶点,为接下来深入分析*BBX32* 在大豆中的功能提供了有效信息和理论基础。

参考文献

[1] Preuss S B, Meister R, Xu Q, et al. Expression of the *Arabidopsis thaliana* *BBX32* gene in soybean increases grain yield[J]. PLOS One, 2012, 7(2): e30717.

[2] Alston J M, Beddow J M, Pardey P G. Agricultural research, productivity, and food prices in the long run[J]. Science, 2009, 325(5945): 1209-1210.

[3] Schmidt M A, Herman E M. Characterization and functional biology of the soybean aleurone layer[J]. BMC Plant Biology, 2018, 18(1): 354.

[4] Ravi R, Taheri A, Khandekar D, et al. Rapid profiling of soybean aromatic compounds using electronic nose[J]. Biosensors, 2019, 9(2): 66.

[5] 林晓雅, 刘宝辉, 孔凡江. 大豆适应性的分子遗传基础[J]. 自然杂志, 2019, 41(3): 174-182. (Lin X Y, Liu B H, Kong F J. Molecular basis of soybean adaptation to long days and short days [J]. Chinese Journal of Nature, 2019, 41(3): 174-182.)

[6] 查霆, 钟宣伯, 周启政, 等. 我国大豆产业发展现状及振兴策略[J]. 大豆科学, 2018, 37(3): 458-463. (Cha T, Zhong X B, Zhou Q Z, et al. Development status of China's soybean industry and strategies of revitalizing [J]. Soybean Science, 2018, 37(3): 458-463.)

[7] Zhang Y H, Liu M F, He J B, et al. Marker-assisted breeding for transgressive seed protein content in soybean[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2015, 128(6): 1061-1072.

[8] Laity J H, Lee B M, Wright P E. Zinc finger proteins: New insights into structural and functional diversity[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2001, 11(1): 39-46.

[9] 杨宁, 从青, 程龙军. 植物*BBX* 转录因子基因家族的研究进展[J]. 生物工程学报, 2020, 36(4): 666-677. (Yang N, Cong Q, Cheng L J. *BBX* transcriptional factors family in plants - A review [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(4): 666-677.)

[10] 房鸿成. B-box 转录因子介导 UV-B 和温度调控苹果果实着色的机理[D]. 泰安: 山东农业大学, 2019. (Fang H C. Mechanisms of B-box transcription factor mediated UV-B and temperature regulation on apple fruit coloring[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2019.

[11] 王伟平, 张超, 黎妮. 水稻锌指蛋白基因*OsBBX6* 的克隆、表达及生物信息学分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(5): 2120-2127. (Wang W P, Zhang C, Li N. Cloning, expression and bioinformatics analysis of zinc finger protein *OsBBX6* in rice[J]. Genomics and Applied Biology, 2019, 38(5): 2120-2127.)

[12] 韩久盼. *AtBBX21* 在拟南芥 UV-B 光形态建成中的功能研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2018. (Han J P. Function of *AtBBX21* in UV-B-Induced photomorphogenesis in *Arabidopsis* [D]. Xiamen: Xiamen University, 2018.)

[13] Gangappa S N, Crocco C D, Johansson H, et al. The *Arabidopsis* B-BOX protein *BBX25* interacts with *HY5*, negatively regulating *BBX22* expression to suppress seedling photomorphogenesis[J]. The Plant Cell, 2013, 25(4): 1243-1257.

[14] Job N, Yadukri shnan P, Bursch K, et al. Two B-box proteins regulate photomorphogenesis by oppositely modulating *HY5* through their diverse C-terminal domains[J]. Plant Physiology, 2018, 176(4): 2963-2976.

[15] 李琳, 丁峰, 潘介春, 等. 植物锌指蛋白转录因子家族研究进展[J]. 热带农业科学, 2020, 40(2): 65-75. (Li L, Ding F, Pan J C, et al. Research progress on family of plant zinc-finger protein transcription factors[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2020, 40(2): 65-75.)

[16] Gangappa S N, Botto J F. The *BBX* family of plant transcription factors[J]. Trends in Plant Science, 2014, 19(7): 460-470.

[17] Khanna R, Kronmiller B, Maszle D R, et al. The *Arabidopsis* B-box zinc finger family[J]. The Plant Cell, 2009, 21(11): 3416-3420.

[18] Huang J Y, Zhao X B, Weng X Y, et al. The rice B-box zinc finger gene family: Genomic identification, characterization, expression profiling and diurnal analysis [J]. PLoS One, 2012, 7(10): e48242.

[19] 冯江浩, 魏思昂, 闫丽欢, 等. CRISPR/Cas9 基因编辑技术及应用研究概述[J]. 动物医学进展, 2021, 42(3): 123-126. (Feng J H, Wei S A, Yan L H, et al. Progress on gene editing technology and application of CRISPR/Cas9 [J]. Progress in Veterinary

Medicine,2021,42(3):123-126.)

[20] 罗银,刘峰. CRISPR/Cas9 技术在作物中的研究及应用进展[J]. 作物研究,2020,34(6):588-596. (Luo Y, Liu F. Research and application progress of CRISPR/Cas9 in crops [J]. Crop Research,2020,34(6):588-596.)

[21] Shan Q W, Wang Y P, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system[J]. Nature Biotechnology, 2013,31(8):686-688.

[22] 张敏,徐胜利,贺红利,等. *GmGASA6* 基因 CRISPR-Cas9 载体构建及大豆的遗传转化[J]. 吉林师范大学学报(自然科学版), 2021,42(1):104-110. (Zhang M, Xu S L, He H L, et al. Construction of *GmGASA6* CRISPR-Cas9 vector and genetic transformation of soybean[J]. Journal of Jilin Normal University (Natural Science Edition), 2021,42(1):104-110.)

[23] 甘卓然,石文茜,黎永力,等. 大豆生物钟基因 *GmLNK1/2*、*GmRVE4/8* 和 *GmTOC1* CRISPR/Cas9 组织表达分析及敲除靶点的鉴定[J]. 作物学报,2020,46(8):1291-1300. (Gan Z R, Shi W Q, Li Y L, et al. Identification of CRISPR/Cas9 knockout targets and tissue expression analysis of circadian clock genes *GmLNK1/2*, *GmRVE4/8*, and *GmTOC1* in soybean [J]. Acta Agronomica Sinica,2020,46(8):1291-1300.)

[24] Machado F B, Moharana K C, Fabricio A S, et al. Systematic analysis of 1,298 RNA-Seq samples and construction of a comprehensive soybean (*Glycine max*) expression atlas[J]. The Plant Journal,2020,103:1894-1909.

[25] Chen C, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: An integrative Toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. Molecular Plant,2020,13:1194-1202.

[26] 曾栋昌,马兴亮,谢先荣,等. 植物 CRISPR/Cas9 多基因编辑载体构建和突变分析的操作方法[J]. 中国科学:生命科学, 2018,48(7):783-794. (Zeng D C, Ma X L, Xie X R, et al. A protocol for CRISPR/Cas9-based multi-gene editing and sequence decoding of mutant sites in plants [J]. Scientia Sinica (Vitae), 2018,48:783-794.)

[27] Cheng Q, Dong L, Gao T, et al. The bHLH transcription factor GmPIB1 facilitates resistance to *Phytophthora sojae* in *Glycine max* [J]. Journal of Experimental Botany,2018,69(10):2527-2541.

[28] Holtan H E, Bandong S, Marion C M, et al. BBX32, an *Arabidopsis* B-Box protein, functions in light signaling by suppressing HY5-regulated gene expression and interacting with STH2/BBX21 [J]. Plant Physiology,2011,156(4):2109-2123.

[29] Tripathi P, Carvallo M, Hamilton E E, et al. *Arabidopsis* B-BOX32 interacts with CONSTANS-LIKE3 to regulate flowering [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2017,114(1):172-177.

[30] 冯蓝萍. 梅花锌指蛋白基因 *PmZAT12* 和 *PmBBX32* 在低温胁迫下的功能研究[D]. 武汉:华中农业大学,2019. (Feng L P. Functional analysis of zinc finger protein genes *PMZAT12* and *PMBBX32* in *prunus mume* under low the perature stress [D]. Wuhan:Huazhong Agricultural University,2019.)

[31] Qi Q, Gibson A, Fu X, et al. Involvement of the N-terminal B-box domain of *Arabidopsis* BBX32 protein in interaction with soybean BBX62 protein [J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(37):31482-31493.

[32] Cheng Q, Dong L, Su T, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of *GmLHY* genes alters plant height and internode length in soybean[J]. BMC Plant Biology,2019,19(1):562.

[33] 关贝贝,王燕娟,陈海峰,等. CRISPR/Cas9 介导的多基因编辑系统在大豆中的应用[J]. 中国油料作物学报,2021,43(1):149-160. (Guan B B, Wang Y J, Chen H F, et al. Application of CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing system in soybean genome editing[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2021,43(1):149-160.)