



## 大豆 *GmPM31* 基因的功能分析及拟南芥转化

刘骥骅<sup>1</sup>, 李昕雨<sup>1</sup>, 王泽博<sup>1</sup>, 刘燕敏<sup>1</sup>, 刘春冬<sup>1</sup>, 沈英姿<sup>2</sup>, 李 阳<sup>3</sup>, 吴酬飞<sup>3</sup>

(1. 湖州学院 理工学院, 浙江 湖州 313000; 2. 南京农业大学 农学院/作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095; 3. 湖州师范学院 生命科学学院, 浙江 湖州 313000)

**摘 要:**大豆 *GmPM31* 基因编码蛋白属于植物小分子热激蛋白 sHSP-CI (Class I) 亚家族的成员, 为研究其在大豆抗逆过程中的生物学功能, 对 *GmPM31* 蛋白进行亚细胞定位分析; 采用酵母双杂交和双分子荧光互补方法验证 Gm2-MMP 与 *GmPM31* 蛋白在体内的互作关系; 构建 *GmPM31* 启动子 5' 端不同缺失片段的植物表达载体, 通过烟草叶片瞬时表达系统分析其驱动 *GUS* 基因的表达水平; 利用农杆菌侵染法将 *GmPM31* 基因转化拟南芥。结果表明: 大豆基质金属蛋白酶 Gm2-MMP 与小分子热激蛋白 *GmPM31* 存在体内互作关系。经 40 ℃ 高温高湿胁迫处理, 与对照组相比, P2062 与 P1800 启动子驱动表达的 *GUS* 活性显著增加, 说明 -1 800 ~ -1 535 bp 区段对 *GmPM31* 基因响应高温高湿胁迫信号起关键作用。繁种过表达 *GmPM31* 转基因拟南芥植株, 筛选得到 5 株 T<sub>2</sub> 代拟南芥阳性植株。

**关键词:** 大豆; *GmPM31* 基因; 蛋白互作; 启动子分析; 过表达

## Functional Analysis of Soybean *GmPM31* Gene and Transformation into *Arabidopsis thaliana*

LIU Su-shuang<sup>1</sup>, LI Xin-yu<sup>1</sup>, WANG Ze-bo<sup>1</sup>, LIU Yan-min<sup>1</sup>, LIU Chun-dong<sup>1</sup>, SHEN Ying-zi<sup>2</sup>, LI Yang<sup>3</sup>, WU Chou-fei<sup>3</sup>

(1. Institute of Science and Technology, Huzhou College, Huzhou 313000, China; 2. State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, College of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. School of Life Sciences, Huzhou Normal University, Huzhou 313000, China)

**Abstract:** Soybean *GmPM31* gene encoding protein is a member of sHSP-CI (Class I) subfamily of plant small molecule heat shock protein. In order to study the biological function of *GmPM31* protein in soybean stress tolerance, subcellular localization analysis of *GmPM31* protein was performed. Yeast two-hybrid and Bimolecular Fluorescent Complimentary methods were used to verify the interaction between Gm2-MMP and *GmPM31* protein *in vivo*. Plant expression vectors with different missing fragments at the 5' end of *GmPM31* promoter were constructed, and the expression level of driven *GUS* gene was analyzed by transient expression system in tobacco leaves. *GmPM31* gene was transformed into *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium tumefaciens* infection. The results showed that soybean matrix metalloproteinase Gm2-MMP interacts with small molecule heat shock protein *GmPM31* *in vivo*. Compared with the control group, the activity of *GUS* driven by the P2062 and P1800 promoters was significantly increased under high temperature and high humidity stress at 40 ℃, indicating that -1 800 ~ -1 535 bp region plays a key role in the response of the *GmPM31* gene to high temperature and high humidity stress signals. Transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing *GmPM31* were propagated, and five T<sub>2</sub>-generation *Arabidopsis* positive plants were screened.

**Keywords:** soybean; *GmPM31* gene; protein interaction; promoter analysis; overexpression

大豆 (*Glycine max* L.) 是重要的高蛋白粮饲兼用作物, 在我国栽培历史悠久, 种植区域广泛<sup>[1]</sup>。在大豆的生长发育周期中, 生理成熟期的种子活力最高, 而南方春大豆的种子成熟期正值高热多雨的夏季, 使得种子极易发生田间劣变<sup>[2]</sup>。由田间劣变导致种子活力下降的过程是不可逆的, 严重制约了春大豆在我国南方的生产与推广<sup>[3,4]</sup>。有研究表明, 选育遗传稳定的具有高活力种子的春大豆品种是提高种子种用和商用价值最为经济有效的途径

之一<sup>[5-7]</sup>。迄今为止, 国内外研究人员对田间劣变的发生、表现及预防等做了相关研究<sup>[8-11]</sup>。然而, 对高活力种子在发育时期具有良好的抗田间劣变的分子机制的研究鲜有报道, 因此, 开展关于高活力种子遗传特性的研究具有重要意义。

近年来, 许多研究学者通过 QTL 定位、蛋白质组学、代谢组学和生理生化等试验技术分析种子活力和抗逆性<sup>[12-15]</sup>。本课题组前期研究发现, 大豆基质金属蛋白酶 Gm2-MMP 参与调控高温高湿胁迫下

收稿日期: 2022-02-13

基金项目: 浙江省自然科学基金 (LQ20C130003); 浙江省教育厅一般科研项目 (Y202248468); 国家级大学生创新训练计划项目 (202113287102, 202213287008); 湖州学院大学生创新创业训练计划项目 (2022CXCY19); 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划项目 (2022R485A003)。

第一作者: 刘骥骅 (1990—), 男, 博士, 讲师, 主要从事种子学、植物耐逆分子生物学研究。E-mail: 837870552@qq.com。

通讯作者: 吴酬飞 (1980—), 男, 博士, 副教授, 主要从事农业微生物生态研究。E-mail: loginst6@163.com。

春大豆种子活力的形成<sup>[16]</sup>。为进一步了解其功能,以高活力种质湘豆 3 号为试验材料,构建了大豆种子酵母双杂交 cDNA 文库,筛选到可能与 Gm2-MMP 互作的大豆小分子热激蛋白 GmPM31<sup>[17]</sup>。GmPM31 属于小分子热激蛋白(sHSP),sHSP 具有保护细胞、调节植株发育的功能,在果实成熟、花粉发育、种子萌发和胚胎发生等时期表达,并且响应多种外界胁迫信号<sup>[18-21]</sup>。sHSP 几乎存在于所有生物中,植物中首先报道了大豆(*Glycine max* L.)和烟草(*Nicotiana tabacum* L.)中的 sHSP<sup>[22]</sup>,之后在葡萄(*Vitis vinifera* L.)<sup>[23]</sup>、马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)<sup>[24]</sup>、番茄(*Lycopersicon esculentum* Miller)<sup>[25]</sup>等作物中鉴定出 sHSP。例如,花楸树 *SpHSP23.8* 基因在不同器官中均有表达<sup>[26]</sup>,*VvHSP20s* 参与调控葡萄果实的成熟<sup>[23]</sup>,豌豆叶片中的线粒体 *sHSP2* 基因受热胁迫诱导表达<sup>[27]</sup>。张弛等<sup>[28]</sup>研究发现 *HSP40s* 可提高植物抗性,降低外部条件对植物细胞的损伤。45 ℃ 高热胁迫下,玉米叶片组织中热激蛋白的含量是 25 ℃ 时的 2~7 倍,*ZmHSP16.9* 基因通过保护抗氧化酶提高植株的耐热性和抗氧化性<sup>[29]</sup>。高等植物中的 GmPM31 蛋白具有保守的  $\alpha$ -结构域,与 CI(Class I) 亚家族的 sHSPs 同源性较高,并且 *GmPM31* 基因启动子包含多个反式因子和顺式元件,通过 qRT-PCR 分析 *GmPM31* 的表达情况,发现在成熟种子中 *GmPM31* 表达量最高并受高温胁迫诱导上调表达<sup>[30]</sup>。但目前鲜有关于 *GmPM31* 基因功能的报道。

为解析大豆 *GmPM31* 在抗逆过程中的生物学功能,本研究利用酵母双杂交和双分子荧光互补(BiFC)试验验证 Gm2-MMP 与 GmPM31 蛋白的体内互作关系,构建植物表达载体,分析 *GmPM31* 基因启动子对高温高湿胁迫的响应,旨在为揭示

*GmPM31* 基因功能奠定基础,同时为推动高活力春大豆的分子育种提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

本氏烟草,野生型(WT)拟南芥,酵母菌 NMY32、农杆菌 EHA105 和表达载体 pA7-GFP、pEGPro、pBII21 由本实验室保存,大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  购自 TIANGEN 公司;限制性内切酶和 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser 等购自 Takara 公司;产物测序和引物合成由上海桑尼生物科技有限公司完成;其他试剂为国产分析纯。

1.2 试验设计

将成熟的本氏烟草种子均匀播种于装有湿润土壤(蛭石:营养土=1:1)的花盆中,置于白天(14 h、RH80%、22 ℃)/黑夜(10 h、RH70%、20 ℃)的人工气候箱内培养,叶片直径为 5~8 cm 时进行高温高湿胁迫处理,设置为 42 ℃、湿度 95% $\pm$ 5%。

拟南芥种子消毒、洗涤,布种于 MS 固体培养基,黑暗处理 48 h 后正常培养,白天(14 h、RH80%、22 ℃)/黑夜(10 h、RH70%、20 ℃)。待长出第二对真叶时,植株移栽至蛭石:营养土为 2:1 的花盆中继续培养,生长条件为:白天(16 h、RH80%、22 ℃)/黑夜(8 h、RH70%、20 ℃),5~6 d 浇 1 次水。

采用同源重组法构建亚细胞定位载体 pA7-GmPM31-GFP(图 1),观察含绿色荧光蛋白的烟草叶片细胞。分析 GmPM31 编码蛋白的亚细胞定位情况。

设计并构建 nEYFP-GmPM31、nEYFP-Gm2-MMP 载体(图 2),进行双分子荧光互补试验(BiFC),再利用酵母双杂交系统测定蛋白质在细胞内的结合作用,验证 GmPM31 与 Gm2-MMP 的相互作用。

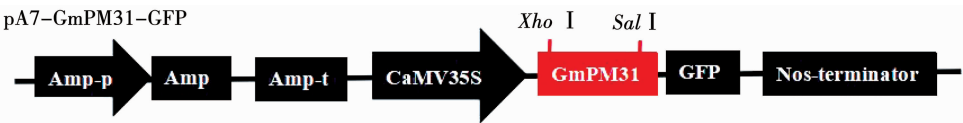


图 1 亚细胞定位载体示意图  
Fig. 1 Schematic diagram of subcellular localization vector

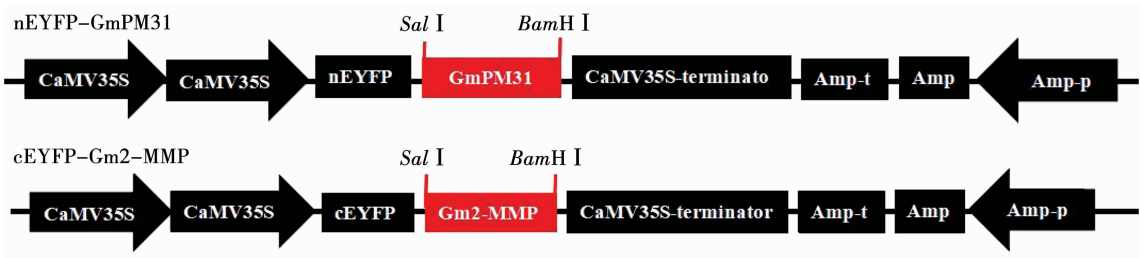


图 2 双分子荧光互补重组载体示意图  
Fig. 2 Schematic diagram of bilimolecular fluorescent complementary recombinant vector

根据 PLACE 和 PlantCARE 软件对 *GmPM31* 基因启动子 DNA 序列上基因表达调控元件的分析结果,设计各 5' 端缺失片段,以正常叶片为阴性对照,定性研究烟草叶片中 *GUS* 基因的表达水平,分析 *GmPM31* 基因启动子对高温高湿胁迫的响应。

以 *GmPM31* CDS 序列为模板,采用 PCR 技术扩增目的片段,构建过表达 *GmPM31* 基因植物表达载体,转化拟南芥,获得过表达 *GmPM31* 基因拟南芥植株。

表 1 试验所用引物  
Table 1 Sequences of primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'-3')	用途 Usage
pA7-Gm-PM31- <i>Xho</i> I-F	CATTTACGAACGATACTCGAGATGGATTGGATCGGAGCGT	亚细胞定位载体构建和检测
pA7-Gm-PM31- <i>Sal</i> I-R	TCACCATCACTAGTAGCTCGACAACCACATCAATCTGCCT	
pA7-F	AAGCAATCAAGCATTCTACTTCTAT	
pA7-R	GGTAGCGGCTGAAGCACTG	
nEYFP-Gm-PM31- <i>Sal</i> I-F	GCTTCGAATTCTGCAGTCGACATGGATTGGATCGGAGCGT	BiFC 载体构建和检测
nEYFP-Gm-PM31- <i>Bam</i> H I-R	GGACTCTAGATCAGGTGGATCCAACCACATCAATCTGCCT	
cEYFP-Gm2-MMP- <i>Sal</i> I-F	GCTTCGAATTCTGCAGTCGACATTAGAACTCGGTACGCGC	
cEYFP-Gm2-MMP- <i>Bam</i> H I-R	GGACTCTAGATCAGGTGGATCCTTTTGCACGCCTGCCGTTT	
nEYFP-F	GAAGAACGGCATCAAGGT	
nEYFP-R	CGACAGGTTTCCCGACTG	
cEYFP-F	CACTACCAGCAGAACACCC	
cEYFP-R	CAGCTATGACCATGATTAC	
P-GmPM31-F	TCACACTCTTTTATCACTTTTATT	全长启动子( -2 062 ~ -1 bp) 载体构建
P-GmPM31-R	TCAGTCTCAGGCCAGTCAAC	
GmPM31-P-750-F	ActagggtctcGcaccAAGTTTGTGATCAACTCACTCACT	启动子 -750 ~ -1 bp 区段缺失载体构建
GmPM31-P-1535-F	ActagggtctcGcaccAATAAGTGATATGATGAGATAATCAATTTTTTTTAAAG	启动子 -1 535 ~ -751 bp 区段缺失载体构建
GmPM31-P-1800-F	ActagggtctcGcaccGATAACAAAAGTGACGTTGATTAAAAATTTTAAT	启动子 -1 800 ~ -1 535 bp 区段缺失载体构建
GmPM31-P-R	ActagggtctcGcaccCTTAGTTCTTATATTCCTATATTCTCTTCTCTCGATG	启动子缺失载体构建下游引物 重组载体检测
Lac-F	TCACTCATTAGGCACCCAG	
GUS-R	GGGTCCTAACCAAGAAAATGAA	

注:小写字母为酶切位点序列。  
Note: Lowercase mean the sequence of restriction sites.

提取 *E. coli* DH5 $\alpha$  菌液中的 pA7-GFP 质粒 DNA,并利用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Sal* I 进行双酶切。使用 OMEGA 胶回收试剂盒回收 PCR 反应目的片段,37  $^{\circ}$ C 恒温水浴 30 min,与酶切质粒进行同源重组。使用热激法<sup>[16]</sup>转化大肠杆菌,置于 50  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup> Amp 的 LB 固体培养基上,37  $^{\circ}$ C 培养 12 ~ 18 h。随后 PCR 检测阳性单克隆,选取阳性菌液送至上海桑尼生物技术有限公司完成测序。

1.3.2 基因枪转化 *GmPM31* 基因至烟草叶片细胞  
采用基因枪法<sup>[16]</sup>轰击含 pA7-GFP 质粒、pA7-

1.3 方法

1.3.1 亚细胞定位载体的构建 设计含 *Xho* I 和 *Sal* I 酶切位点的引物(表 1),PCR 扩增目的片段。以前期已分离的 *GmPM31* 基因 ORF 序列作为模板<sup>[30]</sup>进行 PCR 反应。PCR 反应条件为:95  $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94  $^{\circ}$ C 变性 45 s,56  $^{\circ}$ C 退火 45 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 35 s(30 个循环);72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min;4  $^{\circ}$ C 保存。使用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测并分离目的条带。

GmPM31-GFP 质粒的金粉进入烟草叶片细胞,25  $^{\circ}$ C 黑暗培养 16 ~ 18 h。以不含目的基因的空载体为阴性对照,在 ZEISS LSM 78 型激光共聚焦显微镜下观察绿色荧光的位置,分析 *GmPM31* 编码产物的亚细胞定位情况。

1.3.3 酵母双杂交检测 Gm2-MMP 与 GmPM31 蛋白的互作 提取 pNubG-Fe65、pTSU2-APP、pPR3N、pOST1-NubI、pBT3-SUC 质粒,将质粒按照表 2 组合转入酵母 NMY32 中,分别涂布于 SD-TL 和 SD-TLHA 缺陷型培养基上,30  $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养 2 ~ 3 d,

观察酵母细胞在 SD-TL 和 SD-TLHA 缺陷型固体培养基上的生长情况。向 SD-TLHA 缺陷型培养基中

的每个菌斑滴加 3  $\mu$ L X- $\alpha$ -Gal 稀释液,30 min后记录显色情况,鉴定互作结果。

表 2 酵母双杂交转化组合

Table 2 Transformation combination of yeast two-hybrid

编号 Code	AD 质粒 AD plasmid	BD 质粒 BD plasmid	培养基 Medium
1	pNubG-Fe65	pTSU2-APP	SD-TL、SD-TLHA
2	pPR3N	pTSU2-APP	SD-TL、SD-TLHA
3	pPR3N-PM31	pBT3-SUC-Gm2-MMP	SD-TL、SD-TLHA
4	pPR3N-PM31	pBT3-SUC	SD-TL、SD-TLHA
5	pPR3N	pBT3-SUC-Gm2-MMP	SD-TL、SD-TLHA
6	pPR3N	pBT3-SUC	SD-TL、SD-TLHA

1.3.4  $\beta$ -半乳糖苷酶活性的半定量测定 采用 Dualsystems Biotech P01002 HTX Kit 半定量测定  $\beta$ -半乳糖苷酶活性。将通过 *HIS3* 和 *ADE2* 报告基因检测的初始酵母阳性单克隆制备成酵母裂解液,使用酶标仪测定样品的 OD<sub>615</sub> 和 OD<sub>546</sub> 值,并计算  $\beta$ -半乳糖苷酶活性。计算公式: $\beta$ -Galactosidase activity = OD<sub>615</sub>/OD<sub>546</sub>。对比  $\beta$ -半乳糖苷酶活性值与阴性对照值,若  $\beta$ -半乳糖苷酶活性值大,则说明通过 *Mel* 报告基因的检测。

1.3.5 双分子荧光互补载体的构建 使用 Primer Premier 5.0 设计引物(表 1),利用 PCR 方法扩增 *GmPM31* 和 *Gm2-MMP* 目的片段,并使用胶回收试剂盒进行回收。利用质粒提取试剂盒(Takara)分别提取 *E. coli*. DH5 $\alpha$  中的 cEYFP 和 nEYFP 质粒。在 37  $^{\circ}$ C 水浴锅中,利用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I 分别将质粒和胶回收产物酶切 3~4 h。使用重组酶 Exnase2 分别将 *GmPM31* 和 *Gm2-MMP* 片段与 nEYFP 和 cEYFP 酶切载体连接,然后分别转化至 *E. coli*. DH5 $\alpha$  中,并在含有 50  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup> Amp 的 LB 液体培养基中,37  $^{\circ}$ C、220 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 培养 8~10 h,选取阳性菌液进行序列比对分析。将阳性克隆质粒与 25% 灭菌甘油(体积比 1:1)涡旋混匀,-20  $^{\circ}$ C 保存。

1.3.6 基因枪转化双分子荧光互补载体至烟草叶片 烟草叶片剪去主脉,置于 MS 固体培养基中 25  $^{\circ}$ C 黑暗培养 4~5 h。将冷冻干燥的 cEYFP、nEYFP 质粒和 cEYFP-Gm2-MMP、nEYFP-GmPM31 质粒与金粉充分悬浮。3  $\mu$ L 组合质粒(cEYFP-Gm2-MMP + nEYFP-GmPM31、cEYFP + nEYFP、cEYFP + nEYFP-GmPM31、nEYFP + cEYFP-Gm2-MMP)中分别加入 10  $\mu$ L 2.5 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>,4  $\mu$ L 0.1 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 亚精胺,吸打混匀,制得包裹 DNA 的金粉粒。

采用基因枪(BIO-RAD)轰击法<sup>[16]</sup>将补载体转化到烟草叶片细胞中,黑暗培养 20~24 h,再使用激光共聚焦显微镜观察载玻片上烟草细胞中的 GFP 荧光蛋白,拍照并记录。

1.3.7 各启动子 5' 端片段缺失载体的构建和烟草侵染 根据前期试验对启动子 DNA 序列上基因表达调控元件的分析结果设计各 5' 端缺失片段<sup>[30]</sup>。PCR 扩增 *GmPM31* 启动子全长(-2 062~-1 bp)及 3 个 5' 端缺失 P750(-750~-1 bp)、P1535(-1 535~-751 bp)和 P1800(-1 800~-1 535 bp)片段序列(表 1)。采用同源重组法连接载体 pEGProGUS 与不同长度的 DNA 序列,提取测序正确的重组质粒并分别转化 EHA105 农杆菌感受态。渗透液(10 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> MES-KOH, 10 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 乙酰丁香酮)重悬 OD<sub>600</sub> 为 0.8~1.0 的阳性菌液,采用注射法<sup>[16]</sup>将重组载体和阳性对照 *CMV35S* 启动子载体注射于两叶脉之间侵染烟草叶片的下表皮蜡质并标记渗透液的扩散范围。试验组进行高温高湿胁迫,42  $^{\circ}$ C,湿度 95% $\pm$ 5% 处理 3 h 后置于与对照组相同的生长条件下,继续培养至 48 h。

1.3.8 GUS 组织化学染色和荧光活性检测 使用 GUS 染色液(10 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> EDTA、1 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 铁氰化钾、1 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 亚铁氰化钾、50 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 磷酸钠、1 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup> X-Gluc、0.1% Triton X-100)浸泡烟草样品并抽真空 1 h,37  $^{\circ}$ C 染色过夜。用梯度乙醇溶液漂洗并用脱色液(乙醇和冰醋酸体积比为 9:1)浸泡叶片,直至完全脱色。

使用考马斯亮蓝 G250 染液测定蛋白含量,取 3 次重复的平均值。液氮研磨组织提取蛋白,测定提取液 OD<sub>595</sub> 的吸光值。利用荧光分光光度计测定梯度标准溶液 4-MU 的 OD<sub>365</sub>、OD<sub>455</sub> 的荧光值,作标准曲线。将烟草 GUS 提取缓冲液和反应终止液于 37  $^{\circ}$ C 条件下进行酶活反应,测定荧光强度并根据标准曲线计算样品 4-MU 含量。以酶反应时间对 4-MU 含量作图,斜率即酶反应初始阶段的速度。酶活力单位定义为:每 1 min 水解 4-MUG 生成 1 pmol 4-MU 的酶量为一个活力单位。将酶活最小的记为 1,其余的为其酶活的倍数。



1.3.9 过表达载体的构建及拟南芥遗传转化 以 *GmPM31* CDS 序列为模板,特异性引物详见表 1,将 PCR 得到的 750 bp 产物连接至 *Hind* III 和 *Sma* I 酶切的 pBI121-GUS 载体。提取测序正确的阳性克隆的重组质粒 DNA,用 100 mmol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> 溶液处理农杆菌 EHA105 感受态细胞,将转化细胞涂布于含 50 μg·mL<sup>-1</sup> Kan 和 25 μg·mL<sup>-1</sup> Rif 的 YEB 固体培养基上,28 ℃ 培养 2~3 d。

采用蘸花法<sup>[16]</sup>侵染野生型 (WT) 拟南芥, T<sub>0</sub> 代种子布种于含 50 μg·mL<sup>-1</sup> Kan 的 MS 固体培养基上。若植株能正常生长且长出真叶,颜色呈绿色,

初步筛选获得阳性植株 T<sub>1</sub>。使用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物,分别提取 T<sub>2</sub> 代拟南芥的叶片 DNA 和 RNA,从分子水平鉴定阳性植株<sup>[16]</sup>,收获成熟种子并繁种。

2 结果与分析

2.1 GmPM31 编码蛋白的亚细胞定位

如图 3 所示,成功构建亚细胞定位载体 pA7-GmPM31-GFP,对含绿色荧光蛋白 GFP 的烟草叶片细胞的观察结果显示, *GmPM31* 编码蛋白主要定位于细胞质中。

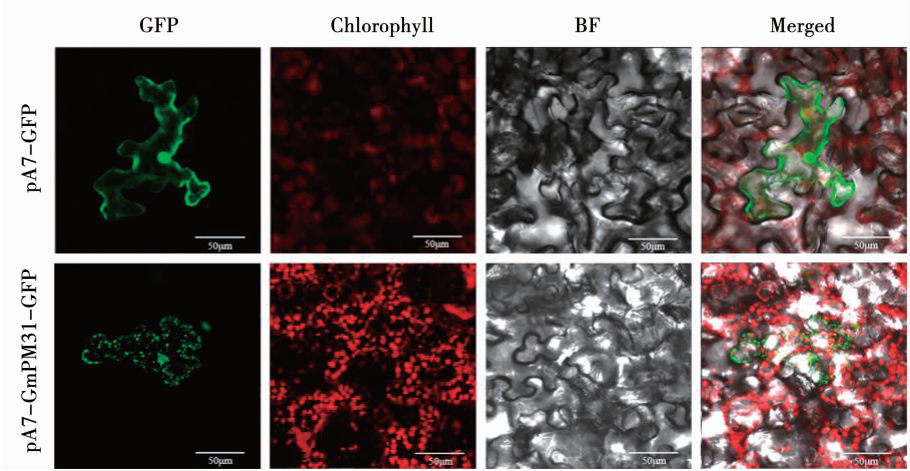


图 3 *GmPM31* 编码产物的亚细胞定位

Fig. 3 Subcellular localization of *GmPM31* encoding products

2.2 Gm2-MMP 与 GmPM31 蛋白互作分析

2.2.1 酵母双杂交 如图 4 可知,在 SD-TL 缺陷型固体培养基上,全部质粒组合酵母都正常生长,说明质粒成功转化到酵母 NMY32 中;在 SD-TLHA 缺陷型固体培养基上,只有含 pNubG-Fe65 + pTSU2-APP 质粒 (阳性对照) 和 pPR3N-GmPM31 + pBT3-SUC-Gm2-MMP 质粒的酵母细胞正常生长,而含有 pPR3N + pTSU2-APP (阴性对照)、pPR3N-GmPM31 + pBT3-SUC、pPR3N + pBT3-SUC-Gm2-MMP 和 pPR3N + pBT3-SUC 质粒的各酵母细胞均不能正常生长。

对 SD-TLHA 缺陷型固体培养基上正常生长的菌落进行 X-α-Gal 染色,显示阳性对照和 Gm2-MMP + GmPM31 质粒的菌落通过 *Mel* 基因检测。测定 SD-TLHA 缺陷型固体培养基中菌落的 β-半乳糖苷酶活性值,结果显示,含 pPR3N-GmPM31 + pBT3-SUC-Gm2-MMP 质粒的转化细胞的 β-半乳糖苷酶活性与阳性对照的酶活相比较低,但远高于阴性对照和其他组合,说明 Gm2-MMP 与 GmPM31 蛋白在酵母体内互作。

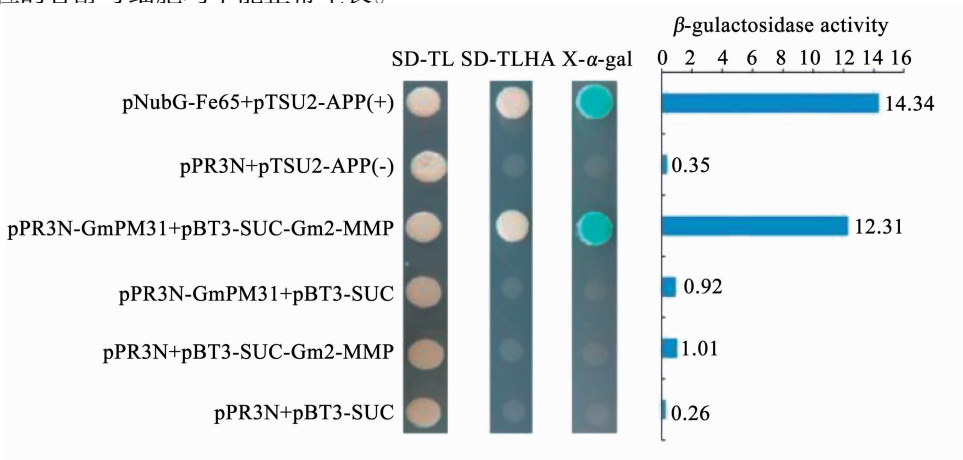
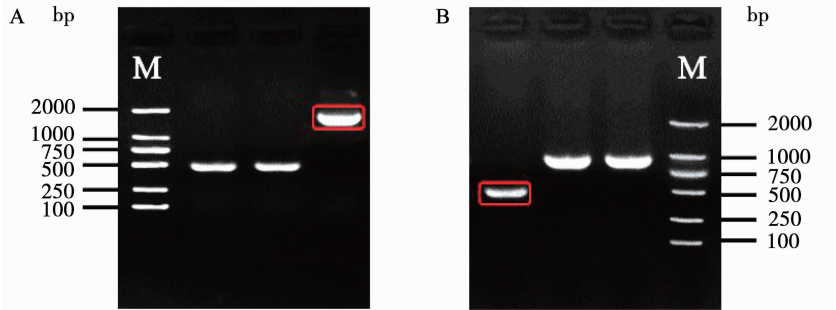


图 4 酵母双杂交验证 Gm2-MMP 与 GmPM31 蛋白的互作

Fig. 4 Interaction between Gm2-MMP and GmPM31 protein verified by yeast two-hybrid

2.2.2 烟草叶片双分子荧光互补试验 经测序鉴定,得到 cEYFP-Gm2-MMP 和 nEYFP-GmPM31 重组载体(图 2),PCR 鉴定结果如图 5 所示。双分子荧光互补试验进一步验证了 Gm2-MMP 与 GmPM31 蛋白在烟草细胞内的互作关系,发现 cEYFP-Gm2-MMP 和

nEYFP-GmPM31 质粒共转化的烟草叶片细胞质中分布有黄色荧光,而 cEYFP-Gm2-MMP + nEYFP 组合、cEYFP + nEYFP-GmPM31 组合及 cEYFP + nEYFP 组合质粒在细胞中没有黄色荧光,说明 Gm2-MMP 与 GmPM31 蛋白在细胞质上发生互作(图 6)。



注: M. DL2000 Marker; A. cEYFP-Gm2-MMP; B. nEYFP-GmPM31。  
Note: M. DL2000 Marker; A. cEYFP-Gm2-MMP; B. nEYFP-GmPM31.

图 5 重组载体的 PCR 鉴定结果

Fig. 5 PCR identification results of recombinant vectors

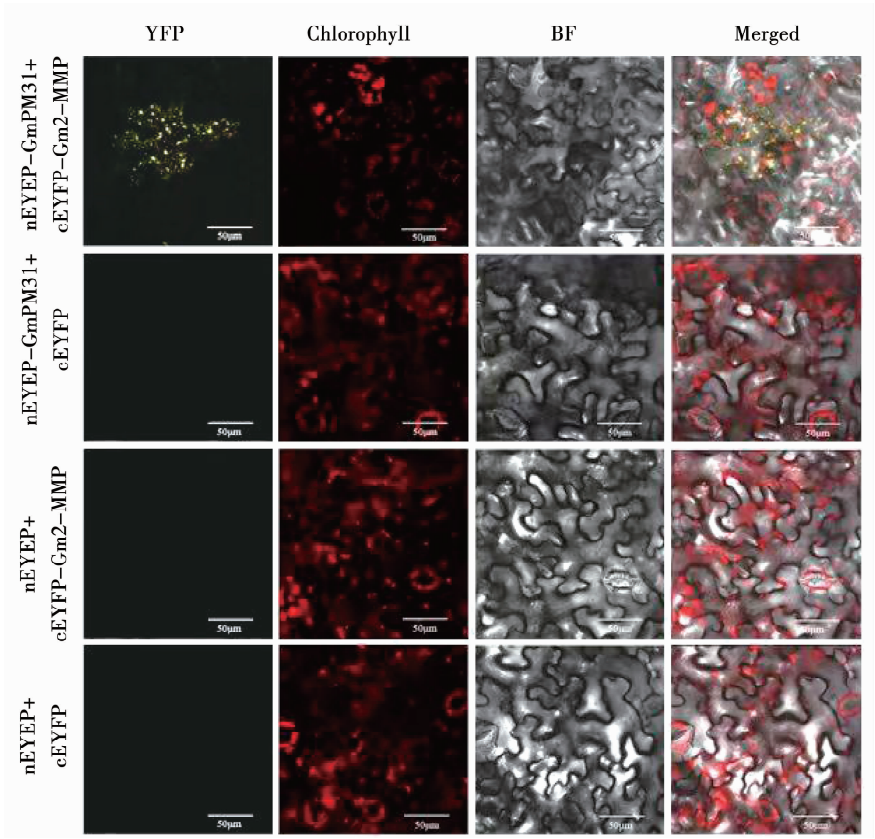


图 6 BiFC 验证 Gm2-MMP 与 GmPM31 蛋白在烟草叶片中互作试验

Fig. 6 Interaction between Gm2-MMP and GmPM31 protein *in vivo* verified by BiFC

2.3 *GmPM31* 启动子的高温高湿胁迫响应区段分析

测序结果显示获得正确的 *GmPM31* 基因全长启动子及各启动子缺失片段(图 7)融合表达载体 P2062、P1800、P1535、P750。GUS 组织化学染色结果说明 4 种不同长度的启动子片段均能驱动 *GUS*

基因表达,但表达水平存在差异(图 8)。经 40 ℃ 高温处理过夜后,与对照组相比,P2062 与 P1800 驱动的 GUS 活性显著增强,而 P1535 和 P750 驱动的 GUS 活性无显著差异,结果说明 -1 800 ~ -1 535 bp 区段对于 *GmPM31* 基因响应高温高湿胁迫具有至关重要的作用(图 9)。

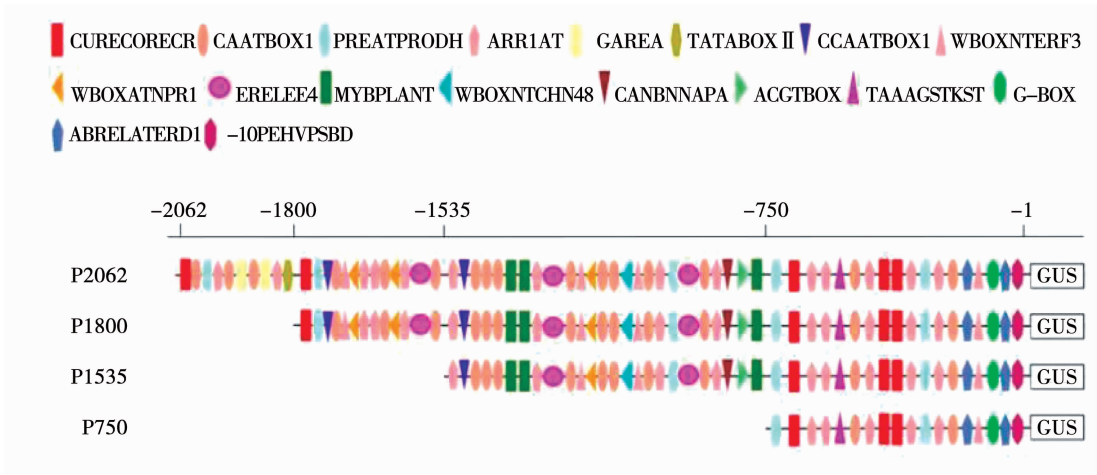


图 7 *GmPM31* 基因启动子各缺失片段示意图  
Fig. 7 Schematic diagram of missing fragments of *GmPM31* gene promoter

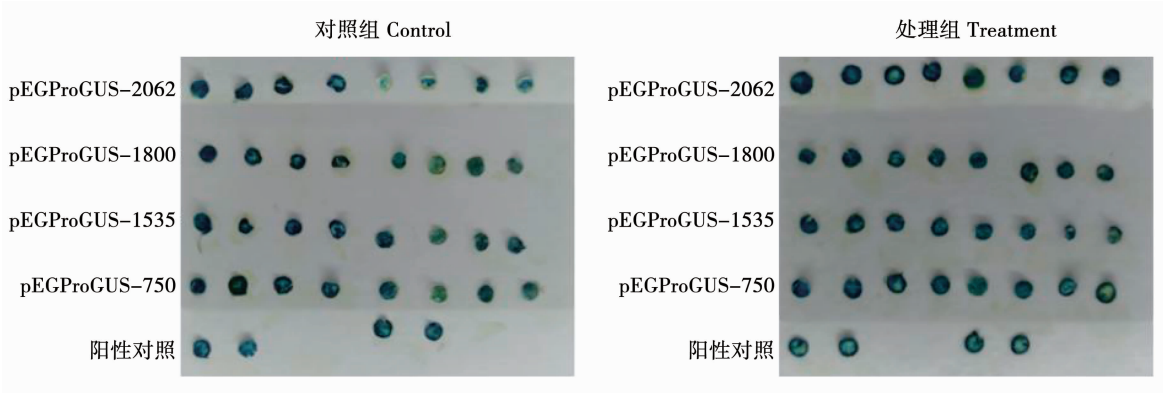
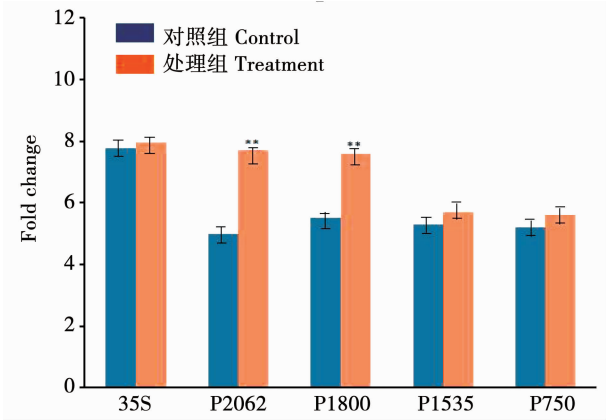


图 8 各 *GmPM31* 启动子 5' 端缺失体烟草叶片的 GUS 组织化学染色  
Fig. 8 GUS histochemical staining of *GmPM31* promoter 5'-terminus deletion in tobacco leaves



注: \*\* 表示对照组与处理组存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。  
Note: \*\* indicated significant difference between control group and treatment group ( $P < 0.05$ ).

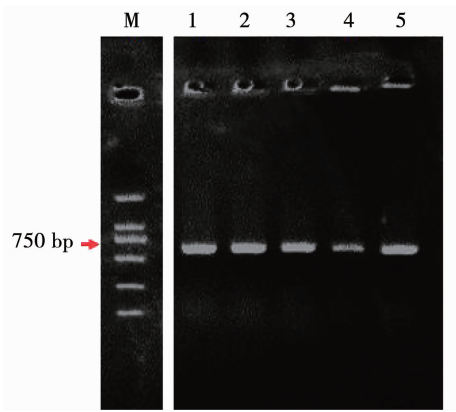
图 9 各 *GmPM31* 基因启动子 5' 端缺失载体转化烟草叶片中的 GUS 酶活性  
Fig. 9 GUS activity in tobacco leaves transformed with 5' end deletion *GmPM31* gene promoter plasmid

2.4 *GmPM31* 基因转化拟南芥

对 pBI121-GUS 重组载体进行 PCR 检测的结果如图 10 所示,表明重组载体构建成功。采用蘸花法处理野生型 (WT) 拟南芥,待种子成熟后,收获  $T_0$  代

种子,通过 Kan 抗性检验筛选阳性植株 (图 11)。待  $T_1$  代阳性拟南芥植株生长至抽薹期,以基因组 DNA 为模板进行 PCR 检验,从分子水平鉴定出 5 株阳性植株 (图 12),培养并收获  $T_2$  代种子。





注:M. DL2000 Marker;1~5. 阳性克隆。  
Note:M. DL2000 Marker; 1-5. Positive clone.

图 10 *GmPM31* 基因过表达载体的 PCR 鉴定结果  
Fig. 10 PCR identification of *GmPM31* gene overexpression vector

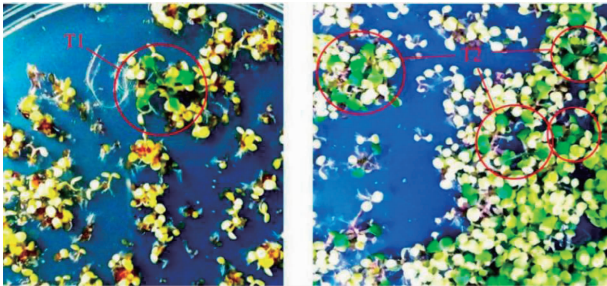
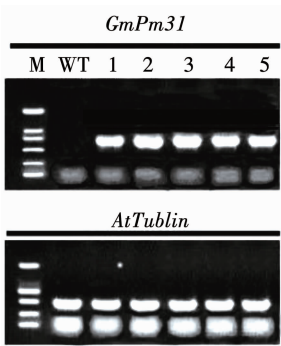


图 11 *GmPM31* 基因过表达  $T_0$  拟南芥阳性植株的筛选  
Fig. 11 Screening of  $T_0$  *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing *GmPM31* gene



注:M. DL2000 Marker;1~5. 转基因拟南芥。  
Note:M. DL2000 Marker; 1-5. Transgenic *Arabidopsis* plants.

图 12 *GmPM31* 基因过表达  $T_1$  拟南芥植株的基因组 PCR 检测

Fig. 12 Genomic PCR detection of  $T_1$  *Arabidopsis thaliana* overexpressing *GmPM31*

3 讨论

前期结果表明 *GmPM31* 与 *ZmHSP16.9*、*OsHSP16.9A* 蛋白同源性较高,属于胞质 I 类小分子热激蛋白(sHSP-CI)<sup>[30]</sup>。sHSP-CI 是植物中含量的最丰富的 sHSP,热休克蛋白在苗期、颖果发育期

和开花期等过程发挥着重要作用。*DnaJ* 蛋白属于 sHSP-CI,宋蒙飞等<sup>[31]</sup>研究发现黄瓜 *DnaJ* 蛋白亚细胞定位于叶绿体中。本研究构建含 GFP 绿色荧光蛋白的亚细胞定位载体,研究发现 *GmPM31* 蛋白定位于细胞质,说明 *GmPM31* 编码产物在细胞质中行使调控功能。

本研究利用酵母双杂交系统验证 *GmPM31* 与大豆基质金属蛋白酶 *Gm2-MMP* 在体内的互作关系,研究表明 *GmPM31* 与 *Gm2-MMP* 蛋白在酵母 NMY32 体内发生相互作用。利用双分子荧光互补(BiFC)试验进一步验证了 *GmPM31* 与 *Gm2-MMP* 在烟草叶片中存在相互作用。但是 *Gm2-MMP* 是否通过与 *GmPM31* 互作共同参与春大豆种子活力的形成尚需进一步研究。

启动子的功能分析是基因功能研究的主要任务,Chen 等<sup>[32]</sup>研究发现 *OsHAK1* 基因启动子经干旱胁迫后能驱动下游基因表达。Zheng 等<sup>[33]</sup>研究表明 *PtDrl02* 启动子的 -669 ~ -467 bp 和 -244 ~ 0 bp 是创伤基因诱导表达的核心序列。经高温胁迫处理后,*PgAPXPro*、*PgDhnPro* 和 *PgHsc70Pro* 启动子均能够驱动 *uidA* 报告基因的表达<sup>[34]</sup>。*VaCIPK02* 基因上游 2 269 bp 启动子转化拟南芥的研究结果表明 *VaCIPK02* 启动子受 NaCl、4 ℃ 低温、ABA 等胁迫诱导,并且 *VaCIPK02* 过表达拟南芥株系对 ABA 胁迫超敏感<sup>[35]</sup>。本研究设计 *GmPM31* 基因启动子 5' 端各缺失片段,通过农杆菌介导的 GUS 瞬时表达系统研究发现 *GmPM31* 基因启动子响应高温高湿胁迫信号,且 -1 800 ~ -1 535 bp 是响应高温高湿胁迫的核心片段。

外界环境改变植物细胞结构、信号传导、代谢进程和渗透调节等,小热激蛋白 sHSP 能够稳定新蛋白以确保正确折叠或帮助重新折叠因细胞压力而受损的蛋白,是保护细胞免受高温和其他胁迫影响的分子伴侣。胁迫处理后的细胞溶质 AtHsp90s 能起到固定 Hsp90 突变株生物膜的作用<sup>[36-37]</sup>。Huang 等<sup>[38]</sup>发现辣椒 *CaHSP16.4* 基因过表达拟南芥植株的存活率上升,电导渗漏率下降,说明 *CaHSP16.4* 赋予了植株对高热胁迫的耐受性。这种防御机制由基因表达模式的改变而形成:蛋白质的质和量变化调节某些代谢和防御途径。本研究通过抗性筛选得到了 5 株 *GmPM31* 基因过表达的拟南芥阳性植株,为进一步研究 *GmPM31* 基因的功能提供材料基础,同时为创制具有稳定遗传特性的高抗种子提供帮助。



## 4 结论

本研究发现 *GmPM31* 编码产物亚细胞定位于细胞质;酵母双杂交和双分子荧光互补(BiFC)试验结果显示,*GmPM31* 蛋白主要定位于细胞质中,基因上游-1 800 ~ -1 535 bp 对高温高湿胁迫响应具有关键调控作用。本研究共获得 5 株过表达 *GmPM31* 基因拟南芥阳性植株。研究结果可为分析 *GmPM31* 基因参与高温高湿胁迫下大豆种子活力形成的机制奠定基础。

## 参考文献

[1] 王曙明, 孟凡凡, 郑宇宏, 等. 大豆高产育种研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(9): 162-166. (WANG S M, MENG F F, ZHENG Y H, et al. Progress of soybean breeding for high yield [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(9): 162-166. )

[2] 舒英杰, 陶源, 王爽, 等. 高等植物种子活力的生物学研究进展[J]. 西北植物学报, 2013, 33(8): 1709-1716. (SHU Y J, TAO Y, WANG S, et al. Research progress on seed vigor biology of higher plant [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2013, 33(8): 1709-1716. )

[3] CHEN W L, ZHOU Q, LI L, et al. Comparing ultraweak bio-chemiluminescence emission in wounded green and etiolated soybean cotyledons[C]. Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues IV. International Society for Optics and Photonics, 2006.

[4] 陈志英, 胡健, 王长进, 等. 利用转录组测序对不同贮藏温度处理玉米种子的苗期差异表达基因分析[J]. 玉米科学, 2021, 29(6): 35-40, 49. (CHEN Z Y, HU J, WANG C J, et al. Analysis of differentially expressed genes in seedling stage of maize seeds treated with different storage temperatures by transcriptome sequencing[J]. Journal of Maize Sciences, 2021, 29(6): 35-40, 49. )

[5] 宋利茹, 王爽, 牛娟, 等. 春大豆种子田间劣变性和劣变抗性的差异蛋白质组学研究[J]. 中国农业科学, 2015, 48(1): 23-32. (SONG L R, WANG S, NIU J, et al. Differentially proteomics analysis of pre-harvest seed deterioration and deterioration resistance in spring soybean[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2015, 48(1): 23-32. )

[6] REN C, BILYEU K D, BEUSELINK P R. Composition, vigor, and proteome of mature soybean seeds developed under high temperature[J]. Proteomics Center Publications (MU), 2009, 49(3): 1010-1022.

[7] SAHA R R, SULTANA W. Influence of seed ageing on growth and yield of soybean[J]. Bangladesh Journal of Botany, 2008, 37(1): 21-26.

[8] KEBEDE H, SMITH J R, RAY J D. A new gene that controls seed coat wrinkling in soybean[J]. Euphytica, 2013, 189(2): 309-320.

[9] 王依隆, 赵海红, 沈英姿, 等. 大豆 *GmPHD3* 基因的克隆及逆境表达分析[J]. 大豆科学, 2020, 39(4): 500-508. (WANG Y L, ZHAO H H, SHEN Y Z, et al. Cloning and abiotic expression analysis of *GmPHD3* gene in soybean [J]. Soybean Science, 2020, 39(4): 500-508. )

[10] 朱雅婧, 周亚丽, 刘骥骅, 等. *GmHMADP* 参与高温高湿下大豆种子活力形成及铜镉胁迫响应的研究[J]. 中国农业科学, 2018, 51(14): 2642-2654. (ZHU Y J, ZHOU Y L, LIU S S, et al. *GmHMADP* involved in seed vigor formation of soybean under high temperature and humidity stress and its study responsive to copper and cadmium stress [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2018, 51(14): 2642-2654. )

[11] LUCIANO A E, ANDREIA C, ALBERTO T, et al. Soybean seed vigor: Uniformity and growth as key factors to improve yield[J]. Agronomy, 2020, 10(4): 545.

[12] ZHOU Q Q, FU Z Y, LIU H J, et al. Mining novel kernel size related genes by pQTL mapping and multi-omics integrative analysis in developing maize kernels [J]. Plant Biotechnology Journal, 2021, 19(8): 1489-1491.

[13] HENRIET C, BALLIAU T, AIME D, et al. Proteomics of developing pea seeds reveals a complex antioxidant network underlying the response to sulfur deficiency and water stress[J]. Journal of Experimental Botany, 2021, 72(7): 2611-2626.

[14] 万会娜, 于月华, 王怡, 等. 大豆 *GmNAC131* 基因的生物信息学及表达分析[J]. 大豆科学, 2021, 40(2): 186-194. (WAN H N, YU Y H, WANG Y, et al. Bioinformatics and expression analysis of *GmNAC131* gene in soybean [J]. Soybean Science, 2021, 40(2): 186-194. )

[15] 柏锡, 陈云, 杨雪, 等. *GmSTK12* 基因转化大豆及对转化体生物量影响的研究[J]. 东北农业大学学报, 2021, 52(9): 10-18, 46. (BAI X, CHEN Y, YANG X, et al. Research on biomass production by overexpression of a serine/threonine protein kinase, *GmSTK12* in soybean [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2021, 52(9): 10-18, 46. )

[16] 刘骥骅. 大豆基质金属蛋白酶基因 *Gm1-MMP* 和 *Gm2-MMP* 的分离以及响应高温高湿胁迫的功能分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2017. (LIU S S. Isolation and functional analysis of soybean matrix metalloproteinases *Gm1-MMP* and *Gm2-MMP* involved in high temperature and high humidity stress response [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017. )

[17] LIU S S, JIA Y H, ZHU Y J, et al. Soybean matrix metalloproteinase *Gm2-MMP* relates to growth and development and confers enhanced tolerance to high temperature and humidity stress in transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2018, 36(1): 94-106.

[18] WATERS E R. The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(2): 391-403.

[19] 杨芳, 杨仕梅, 罗雪, 等. 百脉根 *Hsp70s* 基因家族的生物信息学分析[J]. 山地农业生物学报, 2020, 39(5): 1-8. (YANG F, YANG S M, LUO X, et al. Bioinformatics analysis of *Hsp70s* gene family in *Lotus japonicus* [J]. Journal of Mountain Agriculture

and Biology, 2020, 39(5): 1-8. )

[20] ZHANG N, SHI J W, ZHAO H Y, et al. Activation of small heat shock protein (SIHSP17.7) gene by cell wall invertase inhibitor (SICIF1) gene involved in sugar metabolism in tomato[J]. Gene, 2018, 679: 90-99.

[21] 栗振义, 龙瑞才, 张铁军, 等. 植物热激蛋白研究进展[J]. 生物技术通报, 2016, 32(2): 7-13. ( LI Z Y, LONG R C, ZHANG T J, et al. Research progress on plant heat shock protein [J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(2): 7-13. )

[22] KEY J L, LIN C Y, CHEN Y M. Heat shock proteins of higher plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1981, 78(6): 3526-3530.

[23] JI X R, YU Y H, NI P Y, et al. Genome-wide identification of small heat-shock protein (HSP20) gene family in grape and expression profile during berry development [J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 433.

[24] ZHAO P, WANG D D, WANG R Q, et al. Genome-wide analysis of the potato *Hsp20* gene family: Identification, genomic organization and expression profiles in response to heat stress[J]. BMC genomics, 2018, 19(1): 61.

[25] 张宁, 姜晶, 史洁玮. 番茄 *HSP20* 基因家族的全基因组鉴定、系统进化及表达分析[J]. 沈阳农业大学学报, 2017, 48(2): 137-144. (ZHANG N, JIANG J, SHI J W, et al. Genome-wide identification, phyletic evolution and expression analysis of the *HSP20* gene family in tomato[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2017, 48(2): 137-144. )

[26] 张泽, 裴鑫, 鲁仪增, 等. 花椒树小热激蛋白 23.8 基因 (*SPHSP23.8*) 克隆与表达分析[J]. 植物资源与环境学报, 2020, 29(5): 9-20. (ZHANG Z, PEI X, LU Y Z, et al. Cloning and expression analysis on small heat shock protein 23.8 gene (*SpHSP23.8*) in *Sorbus pohuashanensis* [J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2020, 29(5): 9-20. )

[27] MARIE H A M, AURELIA R, MARIE P H, et al. The mitochondrial small heat shock protein HSP22 from pea is a thermosoluble chaperone prone to co-precipitate with unfolding client proteins[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 21(1): 97.

[28] 张驰, 刘丹丹, 刘建中. 植物 J 蛋白的生物学功能及其作用机制[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2018, 44(3): 275-282. (ZHANG C, LIU D D, LIU J Z. Biological functions and action mechanisms of J-domain proteins in plants[J]. Journal of Zhejiang University(Agriculture and Life Sciences), 2018, 44(3): 275-282. )

[29] RASHED M A S, ABOU-DEIF M H, KHALIL K M, et al. Expression levels of heat shock proteins through western blot and real-time polymerase chain reaction in maize[J]. Jordan Journal of Biological Sciences, 2021, 14(4): 671-676.

[30] 刘骥骅, 邱颖胜, 刘燕敏, 等. 大豆 *GmPM31* 基因生物学、组织表达及高温高湿响应分析[J]. 大豆科学, 2021, 40(5): 612-619. (LIU S S, QIU Y S, LIU Y M, et al. Analysis of soybean *GmPM31* bioinformatics, tissue expression and response to high temperature and high humidity[J]. Soybean Science, 2021, 40(5): 612-619. )

[31] 宋蒙飞, 王星, 张开京, 等. 黄瓜 DnaJ 基因家族鉴定及对高温胁迫的表达响应[J]. 南京农业大学学报, 2021, 44(2): 267-277. ( SONG M F, WANG X, ZHANG K J, et al. Identification of DnaJ gene family in cucumber and its expression response to high temperature stress [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2021, 44(2): 267-277. )

[32] CHEN G, HU J, LIAN J, et al. Functional characterization of *OsHAK1* promoter in response to osmotic/drought stress by deletion analysis in transgenic rice[J]. Plant Growth Regulation, 2019, 88(3): 241-251.

[33] ZHENG J, LIN S, ZHANG Q, et al. Functional identification and regulation of the *PtDrl02* gene promoter from triploid white poplar [J]. Plant Cell Reports, 2010, 29(5): 449-460.

[34] DIVYA K, KISHOR P B K, BHATNAGAR M P, et al. Isolation and functional characterization of three abiotic stress-inducible (Apx, Dhn and Hsc70) promoters from pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) [J]. Molecular Biology Reports, 2019, 46(6): 6039-6052.

[35] 申威. 山葡萄 CBL-CIPKs 调控网络中两个关键基因响应逆境胁迫的功能分析[D]. 宁夏: 宁夏大学, 2019. (SHEN W. Functional analysis of two key stress-related genes in CBL-CIPKs regulatory network in *Vitis Amurensis* [D]. Ningxia: Ningxia University, 2019. )

[36] SONG H M, FAN P X, SHI W L, et al. Expression of five *AtHsp90* genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals functional differences of *AtHsp90s* under abiotic stresses[J]. Journal of Plant Physiology, 2010, 167(14): 1172-1178.

[37] FU X M. Chaperone function and mechanism of small heat-shock proteins[J]. Acta Biochimica Et Biophysica Sinica, 2014, 46(5): 347-356.

[38] HUANG L J, CHENG G X, KHAN A, et al. Ca HSP16.4, a small heat shock gene in pepper, is involved in heat and drought tolerance[J]. Protoplasma, 2018, 256(1): 39-51.