



大豆 E3 泛素连接酶基因 *GmHOS1a* 和 *GmHOS1b* 生物信息学分析和敲除载体构建

王 昕^{1,2}, 李 聪^{1,3}, 许志永^{1,4}, 刘 斌¹, 赵 涛¹, 刘 军¹, 李宏宇¹

(1. 中国农业科学院 作物科学研究所, 北京 100081; 2. 山东省德州市农产品质量检测中心, 山东 德州 253000; 3. 广东省科学院 南繁种业研究所, 广东 广州 510316; 4. 黑龙江省金色北农种业科技有限公司, 黑龙江 哈尔滨 150028)

摘要: *HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 1 (HOS1)* 是植物中多种信号途径的整合因子, 在植物发育、胁迫反应、光形态建成和开花调控中发挥至关重要的作用, 是很有潜力的作物工程育种目标基因, 但其在大豆中的功能尚未被揭示。为了揭示其在大豆中的功能, 本研究利用反向遗传学, 成功克隆了两个大豆 *HOS1* 基因, *GmHOS1a* 和 *GmHOS1b*, 并通过生物信息学技术, 对其蛋白结构、表达模式和功能进行了分析。进化树和结构域分析表明, *GmHOS1a* 和 *GmHOS1b* 具有 N 端的环指结构域和与 ELYS 高度相似的保守基序, 与拟南芥和水稻 *HOS1* 蛋白高度同源。亚细胞定位结果显示, *GmHOS1a* 和 *GmHOS1b* 定位在细胞核中。Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) 结果表明, *GmHOS1a* 和 *GmHOS1b* 的基因表达模式相似, 均在三出复叶中高度表达。48 h 光周期 RNA-sequencing (RNA-seq) 和 qRT-PCR 分析表明, *GmHOS1a* 和 *GmHOS1b* 基因的表达具有生物钟昼夜节律性, 其中 *GmHOS1a* 的表达量显著高于 *GmHOS1b*, *GmHOS1a* 见光后表达量升高, 黑暗前表达量达到峰值。为进一步探索 *GmHOS1a* 和 *GmHOS1b* 蛋白的功能, 利用 CRISPR/Cas9 系统构建了 9 个 *GmHOS1a* 和 *GmHOS1b* 基因敲除载体, 通过发根检测实验, 筛选出 6 个高效工作载体, 可供后续遗传转化实验使用。本研究为阐明该基因的功能和作用机理奠定了理论基础, 并提供了可供遗传转化的载体材料。

关键词: 大豆; *GmHOS1s*; CRISPR/Cas9; E3 泛素连接酶; 亚细胞定位; 生物钟

Bioinformatics Analysis and Knockout Vector Construction of Soybean E3 Ubiquitin Ligase Gene *GmHOS1a* and *GmHOS1b*

WANG Xin^{1,2}, LI Cong^{1,3}, XU Zhi-yong^{1,4}, LIU Bin¹, ZHAO Tao¹, LIU Jun¹, LI Hong-yu¹

(1. Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 2. Shandong Dezhou Agricultural Product Quality Inspection Center, Dezhou 253000, China; 3. Institute of Nanfan & Seed Industry, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510316, China; 4. Heilongjiang JSBN Seed S & T. Co., Ltd, Harbin 150028, China)

Abstract: *HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 1 (HOS1)* is an integration factor of several signaling pathways in plants, it plays important roles in processes such as growth and development, stress response, photomorphogenesis and flowering time regulation etc., but its function in soybean has not been revealed. By using reverse genetics, we cloned two *HOS1* homologous genes in soybean, *GmHOS1a* and *GmHOS1b*, and analyzed their protein structures, expression patterns and functions by bioinformatics analysis. Through phylogenetic analysis, we found that *GmHOS1a* and *GmHOS1b* are highly conserved to *Arabidopsis* and rice *HOS1* proteins, both of which have N-terminal ring finger domain and conserved motif ELYS-like. This suggests that *GmHOS1a* and *GmHOS1b* may have similar functions to *Arabidopsis* *HOS1*. However, subcellular localization showed that *GmHOS1a* and *GmHOS1b* proteins were only localized in the nucleus, which was different from that of *Arabidopsis* *HOS1* protein. Therefore, we speculated that the action mode of *GmHOS1a* and *GmHOS1b* may be different from that of *Arabidopsis*. Further analysis showed that the expression patterns of *GmHOS1a* and *GmHOS1b* were similar, the highest expression of *GmHOS1a* and *GmHOS1b* existed in trifoliate leaves, followed by flowers and single leaves. The expression pattern of *GmHOS1a* and *GmHOS1b* were rhythmically. The expression of *GmHOS1a* increased after exposure to light and reached a peak before darkness. These results suggest that *GmHOS1a* and *GmHOS1b* in soybean may be involved in the regulation of circadian rhythm. To further explore the function of *GmHOS1a* and *GmHOS1b*, we constructed nine knockout vectors of *GmHOS1a* and *GmHOS1b* using CRISPR/Cas9 system, and screened out six efficient vectors through hair root experiments, which will be used in the future soybean genetic transformation. This study provides a theory basis for exploring the function of *GmHOS1a* and *GmHOS1b*, and provides vector materials for further genetic analysis.

Keywords: soybean; *GmHOS1s*; CRISPR/Cas9; E3 ubiquitin ligase; subcellular localization; biological clock

大豆是人类食用油和蛋白质的主要来源, 我国是世界大豆需求量最大的国家之一。大豆是典型的短日照植物, 光照和温度是制约大豆适应性和推广的重要因素, 如何提高大豆的单产和抗逆性是大

收稿日期: 2022-11-16

基金项目: 国家自然科学基金 (32072091); 湛江市领航计划项目 (211207157080997)。

第一作者: 王昕 (1994—), 女, 硕士研究生, 主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: WX940709@163.com。

通讯作者: 李宏宇 (1970—), 女, 博士, 研究员, 主要从事植物分子生物学与基因工程研究。E-mail: lihongyu@caas.cn。

豆亟待解决的问题。通过对大豆关键基因功能的研究,尤其是对影响多个调控通路的关键基因功能及调控网络的解析可为解决大豆的产量和抗逆提供理论和应用支持。在植物发育过程中 *EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 1 (HOS1)* 参与调控低温反应、开花时间、下胚轴伸长和保持昼夜节律,表明 *HOS1* 作为信号整合因子联系着植物发育与胁迫反应,在调控低温反应、光形态建成和开花时间中发挥至关重要的作用,是很有潜力的作物工程育种目标。

拟南芥中,*HOS1* 编码的蛋白质靠近氨基酸黏性末端为环指结构^[1],在所有植物组织中都能表达。在正常的生长温度范围内,*HOS1* 蛋白定位于细胞质,而在低温条件下则在细胞核内积累^[1]。*HOS1* 是一种 E3 泛素连接酶,为高尔基体膜上的跨膜蛋白,参与蛋白质泛素化降解过程。*HOS1* 能促进 INDUCER OF CBF EXPRESSION 1 (ICE1) 蛋白的泛素化降解,而失活的 ICE1 降低了 C-REPEAT BINDING FACTOR (CBF) 诱导的很多冷胁迫应答蛋白的活性^[2-5]。此外,生物钟也可以直接或间接地(通过影响 *HOS1* 活性)调控 *CBF3* 基因的表达^[6]。

HOS1 参与调节拟南芥开花时间。不同光照和温度下,*HOS1* 通过调节 CONSTANS (CO) 蛋白稳定性来调节光周期开花。长日照条件下 *HOS1* 泛素化降解 CO,当 CO 突变时,*hos1* 突变体的早花表型受到抑制,进一步支持了光周期开花中 *HOS1* 介导 CO 降解^[7]。此外,*PHYTOCHROME B (PHYB)* 可以介导红光诱导的 CO 蛋白降解来调控开花时间,研究发现 *PHYB* 可以和 *HOS1*,CO 产生互作,这 3 个蛋白在拟南芥中可能以复合体形式协调光周期反应^[8]。常温下 *hos1* 突变体呈现早花,因为 *HOS1* 突变诱导了 *FT* 基因表达^[9];拟南芥植株一旦暴露于低温下,*HOS1* 促进 CO 蛋白迅速降解,且降解作用是独立于 *PHYB* 的^[10]。*HOS1* 整合了光和温度信号通过调节 CO 的丰度调节与温度有关的光周期开花。*HOS1* 也是染色质重塑因子,独立于其 E3 酶活性。在短时间低温条件下,*HOS1* 影响开花抑制子 *FLC* 的染色质状态,以调节低温条件下的开花时间^[11-12]。

研究发现,*HOS1* 在调节昼夜节律周期中,可以与核膜上的核孔复合体 NUCLEAR PORE COMPLEXES (NPCs) 相互作用,NPC-*HOS1* 复合体促进生物钟基因的 mRNA 出核^[13],因此拟南芥 *HOS1* 突变后导致生物钟核心振荡器关键基因的昼夜交替周期延长,并且在细胞核中积累多聚腺苷酸 mRNA^[14-15],然而目前还不知道 NPC-*HOS1* 复合体是否调节细胞质中合成的生物钟基因转运到核中,

这进一步扩展了 *HOS1* 在植物发育和环境适应途径中的分子和生物化学功能。Kim 等^[16] 的研究提供了分子和生化证据证实了 *HOS1* 与下胚轴长度紧密相关。光照条件下 *PHYB* 激活 *HOS1* 并促进其与 *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 (PIF4)* 互作,抑制了 *PIF4* 的转录激活活性,从而抑制下游生长素合成基因的表达,促进光形态建成^[17-19]。

综上所述目前拟南芥 *HOS1* 基因的研究较为全面,而对大豆 *HOS1* 基因的研究尚鲜见报道。鉴于两物种蛋白结构的相似性,猜测大豆 *HOS1* 有很多与 *AtHOS1* 类似的功能,但大豆 *HOS1* 的调控机理是否与拟南芥有不同之处,是有待探究的问题。研究大豆中 *HOS1* 的功能将可为揭示拟南芥与大豆之间,长日短日植物之间的光形态建成及开花调控机制上的差异提供理论依据。

为解析大豆 *GmHOS1a* 和 *GmHOS1b* 的基本功能,本研究利用 qRT-PCR 技术分析基因的表达模式,利用大豆原生质体瞬时表达系统,对 *GmHOS1s* 蛋白进行亚细胞定位分析,构建高效的 CRISPR/Cas9 基因敲除载体,旨在为揭示 *GmHOS1a* 和 *GmHOS1b* 基因功能奠定基础,为研究大豆抗逆育种提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆品种为 Williams 82,种植在中国农业科学院 103 人工气候室和重大楼实验室植物培养箱中;利用天隆 1 号大豆品种进行大豆发根试验。大肠杆菌 *TOP10* 菌株和发根农杆菌 *K599* 均来自中国农业科学院作物科学研究所大豆光信号转导实验室。

1.2 试验设计

为了检测 *GmHOS1a* 和 *GmHOS1b* 基因的组织特异性表达,将饱满健康的 Williams 82 种子播种于装有配制土壤(蛭石:营养土 = 1:1)的花盆中,共计 10~20 株,置于长日光照条件(16 h 光照/8 h 黑暗)下的人工气候室中培养,温度设置为 25 ℃,待生长 14 d 后分别对根、下胚轴、子叶、单叶、三出复叶、节等部位进行取材,待开花后取花部位。每个部位取 3 个重复,置于液氮中保存备用。

为了确定 *GmHOS1a* 和 *GmHOS1b* 基因的表达是否具有生物钟昼夜节律性,按照上述方法种植约 30 株 Williams 82,置于中日照条件下(12 h 光照/12 h 黑暗,25 ℃左右)的植物培养箱中,培养至第二片三出复叶完全展开,从见光的 0 h 开始取样,每 4 h 取 1 次(取完前 24 h 后改变光周期条件为持续光照再取 48 h),共取 72 h^[20],每 3 株幼苗混取为 1 个

样品,每个样品取 3 个重复,置于液氮中保存备用。

为了探索 *GmHOS1a* 和 *GmHOS1b* 蛋白的亚细胞定位,将种植的 Williams 82 置于短日照培养箱中(8 h 光照/16 h 黑暗,温度 25 ℃ 左右,光照强度 120 ~ 180 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$),待生长至第二片三出复叶完全展开,取已完全展开的真叶、第一片三出复叶或第二片三出复叶 0.2 g,用刀片将其切成约 0.5 ~ 1 mm 宽的细条,迅速放入配置好的 10 mL 酶解液^[21]中,室温黑暗条件下置于水平摇床上缓慢裂解 4 ~ 5 h,以待提取原生质体。以 Williams 82 cDNA 为模板,采用 PCR 技术扩增 *GmHOS1a* 和 *GmHOS1b* 全长编码(CDS)序列,根据同源重组法构建亚细胞定位载体 *PA7-GmHOS1a-YFP* 和 *PA7-GmHOS1b-YFP*,观察大豆叶片原生质体荧光蛋白在细胞中的分布情况。

为了验证 *GmHOS1a* 和 *GmHOS1b* 基因敲除载体在大豆中的工作效率,利用同源重组方法构建 *GmHOS1a* 和 *GmHOS1b* 基因敲除载体。通过大豆发根检测实验筛选出高效工作载体。

1.3 方法

1.3.1 基因克隆 在拟南芥网站(<https://www.Arabidopsis.org/>)下载 *AtHOS1* 基因的氨基酸序列,在(<https://phytozome.jgi.doe.gov>)网站中选取大豆 Williams 82 蛋白数据库(*Glycine max* Wm82. a2. v1),使用 BLASTP 工具,利用 *AtHOS1* 氨基酸序列进行同源比对,从同源比对结果中得到与 *AtHOS1* 相似度最高的大豆 *HOS1* 同源蛋白,下载 *GmHOS1a* 和 *GmHOS1b* 的基因组(genomic sequence)、转录(transcript sequence)、编码(coding sequence)和蛋白(peptide sequence)序列。使用 Primer Premier 5 软件设计克隆基因引物(表 1),引物合成由北京睿博兴科生物技术有限公司完成,以 Williams 82 cDNA 为模板,使用高保真酶 KOD FX(购自 TOYOBO 公司)扩增 *GmHOS1a*、*GmHOS1b* 基因。用 *Xma* I 和 *Bam*H I 对 *PA7-YFP* 载体进行酶切,回收 PCR 产物后,利用 In-fusion(TaKaRa)体系连接,重组质粒转化大肠杆菌,筛选阳性克隆,保存菌株,送至北京睿博兴科生物技术有限公司测序验证。

表 1 载体构建引物序列
Table 1 Oligonucleotide primers used in constructing vector

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	用途 Usage
PA7-HOS1a-F	ATTCCTGCAGCCCGGGATGGATAAGAGGCTCAATGGACC	<i>PA7-YFP</i> 载体
PA7-HOS1a-R	CCATACTAGTGGATCCTCTCCTGGAAACTCTGCTTCGTCTTG	<i>PA7-YFP</i> 载体
PA7-HOS1b-F	ATTCCTGCAGCCCGGGATGAAGAAAAAGAAAAACAAAAAAGC	<i>PA7-YFP</i> 载体
PA7-HOS1b-R	CCATACTAGTGGATCCTCTCCTGGAAACTCTGCTTCGTCTTG	<i>PA7-YFP</i> 载体
gRNA- <i>Xba</i> I-R	GCTCGGCAACGCGTTCTAGAAAAAAAGCACCGACTCGGT	CRISPR/Cas9 载体
U6- <i>Xba</i> I-F	GGAAGCTTAGGCCTTCTAGAAAAATAATGGTAAAATGTC	CRISPR/Cas9 载体
U6-R	CAATCCATGTGTTGGCACAT	CRISPR/Cas9 载体
S- <i>Stu</i> I-F1	TAGATCGGAAGCTTAGGCCTAAAATAAATGGTAAAATGTC	CRISPR/Cas9 载体
S- <i>Eco</i> R I-R1	TCTCGAATTTCGAGACCAAAAAAGCACCGACTCGGTGC	CRISPR/Cas9 载体
S- <i>Eco</i> R I-F2	TCTCGAATTTCGAGACCAAAAAATAATGGTAAAATGTCAA	CRISPR/Cas9 载体
S- <i>Xba</i> I-R2	GGCAACGCGTTCTAGAAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTT	CRISPR/Cas9 载体

1.3.2 生物信息学分析 在(<https://phytozome.jgi.doe.gov>)网站中选取番茄(*Solanum lycopersicum* ITAG4.0)、小麦(*Triticum aestivum* v2.2)、水稻(*Oryza sativa* v7.0)、苔藓(*Physcomitrium patens* v3.3)数据库,在(<https://solgenomics.net/>)网站中选取烟草(*N. benthamiana* Genome v. 1.0.1)数据库,使用 BLASTP 工具,利用 *AtHOS1* 氨基酸序列分别进行同源比对,从同源比对结果中得到与 *AtHOS1* 相似度最高的 *HOS1* 同源蛋白,并下载蛋白序列。使用 Vector NTI 10 软件比对基因序列和核苷酸序列。使用 ClustalX 2.0、GENEDOC 软件进行氨基酸序列比对,使用 MEGA5.1 软件进行比对(选择比对方法

为 ClustalW),选择 Neighbor-joining 方法构建 *HOS1s* 进化树,Bootstrap 设置为 1 000。

1.3.3 组织特异性表达分析 使用 TRIzol(TIANGEN)法提取上述获得的各部位样品 RNA。使用全式金公司的反转录试剂盒 TransScript[®] II One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 对提取的 RNA 进行反转录,使用 Primer Premier 5 软件设计 qRT-PCR 引物(表 2),以大豆 *Actin* 为内参基因(登录号: Glyma. 18G290800),进行 qRT-PCR 检测^[22],qRT-PCR 所用试剂为 TaKaRa 公司的 2 × SYBR Premix Ex *Taq*。各样品 3 次重复,采用 2^{-ΔΔCT}法^[23]计算各部位相对表达量。

表2 qRT-PCR 引物
Table 2 Primers used in qRT-PCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	用途 Usage
GmActin-qF	CGGTGGTTCTATCTTGGCATC	qRT-PCR
GmActin-qR	GTCITTCGCTTCAATAACCCTA	qRT-PCR
GmHOS1a-qF	TGATGATGCGAGTGATGA	qRT-PCR
GmHOS1a-qR	TCTGAGTTGGAGGAGTTG	qRT-PCR
GmHOS1b-qF	AATCTTCGTTCTGCTGTT	qRT-PCR
GmHOS1b-qR	TATGTATCTCCATTCCTCTTC	qRT-PCR

1.3.4 生物钟昼夜节律分析 根据本实验室前期 RNA-seq 结果^[24]分析 *GmHOS1s* 基因在长日照和短日照条件下的表达是否具有生物钟昼夜节律。并用同上方方法提取各时间点样品 RNA, 反转录获取 cDNA, 再通过 qRT-PCR 检测各时间点样品 *GmHOS1s* 的相对表达量。

1.3.5 亚细胞定位分析 利用构建的 *PA7-YFP* 表达载体, 将 YFP 荧光蛋白融合在 GmHOS1a 与

GmHOS1b 蛋白的 C 端; 并和 RFP 核定位标记 GmMYB29-RFP(登录号: Glyma. 10G180800) 共转入大豆原生质体中进行瞬时表达, 对 GmHOS1s 蛋白进行亚细胞定位分析^[21]。

1.3.6 构建 CRISPR/Cas9 载体 本研究使用的 CRISPR/Cas9 载体为本实验室自主构建的 *JRH0645-RPS5A*。利用 CRISPR/Cas9 靶点设计网站 (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>) 设计 *GmHOS1a* 和 *GmHOS1b* 基因敲除靶标位点。载体结构如图 1 所示, 使用 KOD FX 扩增得到带有 *U6* 和 *gRNA* 的片段。第一轮扩增引物为 GmHOS1s - F/*gRNA-Xba* I-R(扩增含有不同 *gRNA* 的片段)、*U6-Xba* I-F/*U6*-R(扩增 *U6* 片段), 第二轮以第 1 轮 PCR 产物为模板, 扩增引物为 *S-Stu* I-F1 和 *S-EcoR* I-R1(扩增含有 *U6*、*gRNA1* 的片段)、*S-EcoR* I-F2 和 *S-Xba* I-R2(扩增含有 *U6*、*gRNA2* 的片段)。通过载体上的 *Stu* I 和 *Xba* I 位点, T4(NEB) 连接酶将片段插入到 *JRH0645 - RPS5A* 载体上^[25]。引物序列详见表 1 和表 3。

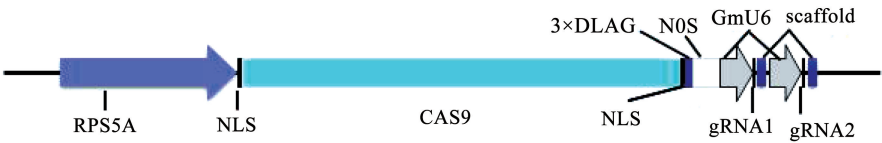


图1 CRISPR/Cas9 载体示意图
Fig.1 Map of CRISPR/Cas9 vector

表3 CRISPR/Cas9 载体构建所用引物
Table 3 Primers used in constructing CRISPR/Cas9 vector

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
GmHOS1a-1-F	AATGTGCCACCACATGGATTGTTTCGTCCAGCTCTAACGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA
GmHOS1a-2-F	AATGTGCCACCACATGGATTGGGAGAAGATCGTCCCACGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA
GmHOS1a-3-F	AATGTGCCACCACATGGATTGAGAAGCAATTAGACGTGCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA
GmHOS1a-4-F	AATGTGCCACCACATGGATTGTGCATAAAGATCATCCAACGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA
GmHOS1a-5-F	AATGTGCCACCACATGGATTGTCGTTCTGTCATCTGAGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA
GmHOS1b-1-F	AATGTGCCACCACATGGATTGACAACTCTGTGTCTCGTAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA
GmHOS1b-2-F	AATGTGCCACCACATGGATTGCTACATTCTTCGCATAAAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA
GmHOS1b-3-F	AATGTGCCACCACATGGATTGGAATGGAGATACATACTGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA
GmHOS1b-4-F	AATGTGCCACCACATGGATTGTCATGGTCTTGAGGTGGCGCTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA
GmHOS1b-5-F	AATGTGCCACCACATGGATTGCGACAAGAAATCCTGAATCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA
GmHOS1b-6-F	AATGTGCCACCACATGGATTGTGCATAAAGATCATCCGACGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA
GmHOS1a/b-1-F	AATGTGCCACCACATGGATTGCACAACTCAATCAGATCAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA
GmHOS1a/b-2-F	AATGTGCCACCACATGGATTGCTCGAGACTTGAGAAGCTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA
GmHOS1a/b-3-F	AATGTGCCACCACATGGATTGTTGGATGAAGTGCTAGTGAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA
GmHOS1a/b-4-F	AATGTGCCACCACATGGATTGAACATCATTGCTGAAGTGGCTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA
GmHOS1a/b-5-F	AATGTGCCACCACATGGATTGAATAATCTTGATCTGGAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA
GmHOS1a/b-6-F	AATGTGCCACCACATGGATTGTTTAGGAATGAAATTGTAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA

1.3.7 发根试验 将构建好的 *GmHOS1a*、*GmHOS1b* 敲除载体转入发根农杆菌 *K599* 菌株, 用菌液侵染大豆子叶节方法^[25] 进行发根试验, 生长 15 d 后取发状根, 用 CTAB 法提取 DNA, PCR 检测并测序, 引物序列如表 4 所示, 比较载体的工作效率。

表 4 发根检测所用引物
Table 4 Primers used in hair root detection

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
GmHOS1a-1/2-F	TAAGGAGTTTCCCCTCTACGA	S-GmHOS1a-1/2-R	TGTCCCCATCTTCTATTCTTGTG
GmHOS1a-1/2-R-2	TGACGCAAGCAGCAAACCATTT	S-GmHOS1a-3/4-F	GATAAGGCTTTGTCTCAGTAAT
GmHOS1a-2/3-R	TGAAGGGATAGTAACCCAGAAT	S-GmHOS1a-3/4-R	AACCAAACCTGCTTTGTCTTCA
GmHOS1a-4/5-F	TTAGACTGAATTTGTGGACGAT	S-GmHOS1a-5/6-F	ATAAAGAGTGGTTTGTCTGGATT
GmHOS1a-4/5-R	TATTAGCTGCACAACAGACACC	S-GmHOS1a-5/6-R	ATCACCATATCAGAGCCTCCAC
GmHOS1b-1/2-F	AAACCTCCAATTCCAATCTGT	S-GmHOS1b-1/2-F	TAAAGTGAACGCTTGGCATCTG
GmHOS1b-1/2-R	CATCAGCAGTTAGGCTTTTCTC	S-GmHOS1b-1/2-R	TAGGTCTTTCTCCCCATCTTCT
GmHOS1b-3/4-F	ATTTTATGTGGGTGTAGAACT	S-GmHOS1b-3/4-F	TCTGTCTGTCACTGTCTCCGCTTTC
GmHOS1b-3/4-R	AGATTTCCTGATGTCCTTAGAG	S-GmHOS1b-3/4-R	CATTGATATGCCCTTCAAGTA
GmHOS1b-5/6-F-2	TTAGAGGCAATTTGATTGTAAG	S-GmHOS1b-5/6-F	AGGTCACGTTTTACTGATGGTT
GmHOS1b-5/6-R-3	GGTGATGCCTATTAATACCCCT	S-GmHOS1b-5/6-R	ACAGTTCTACACCCACAATAAA
S-GmHOS1a-1/2-F	TGTGGGAACCTGTTATGCTGAG		

1.4 数据分析

使用 Excel 2010 处理数据及绘制基因表达量分析图,使用 Adobe Illustrator CS5 处理图表。

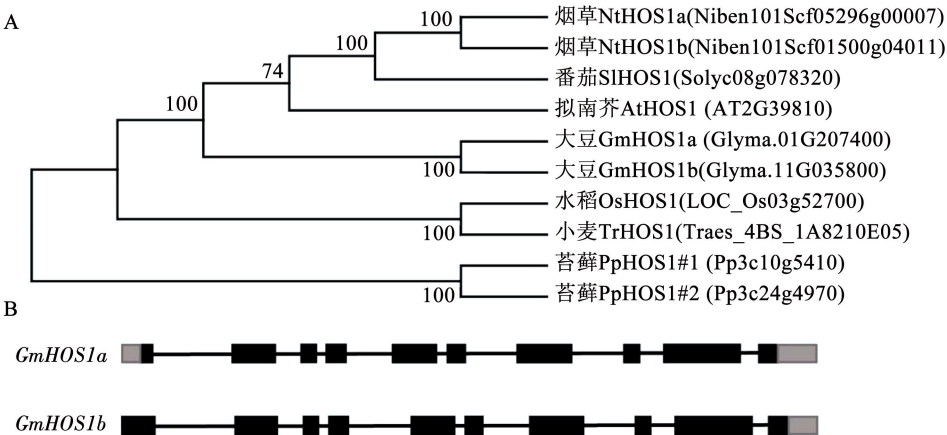
2 结果与分析

2.1 GmHOS1a 和 GmHOS1b 进化分析

通过大豆 Williams 82 参考基因组网站 BLASTP 工具,利用拟南芥 HOS1 蛋白序列进行同源比对,搜索发现大豆存在两个 *GmHOS1* 基因,分别命名为 *GmHOS1a* (*Glyma. 01G207400*) 和 *GmHOS1b* (*Glyma. 11G035800*)。与此同时,通过同源比对发现,水稻、小麦和番茄等物种中分别只存在 1 个 *HOS1* 基因,而苔藓、烟草和大豆物种中分别存在两个拷贝的 *HOS1* 基因。对比水稻、小麦、番茄、苔藓、烟草、拟

南芥和大豆 *GmHOS1s* 蛋白氨基酸序列,构建系统进化树如图 2A 所示,番茄 *SlHOS1* 和烟草 *NtHOS1* 同源最高,水稻 *OsHOS1* 和小麦 *TrHOS1* 同源性最高。大豆 *GmHOS1a* 与拟南芥 *HOS1* 同源性为 49. 48%, *GmHOS1b* 与拟南芥 *HOS1* 同源性为 45. 31%。

GmHOS1a 基因位于大豆 1 号染色体上,基因组全长 6 429 bp,具有 3 个剪接本,其中剪接本 1 具有 10 个外显子,9 个内含子,转录本全长为 3 409 bp,编码区(CDS)长度为 2 886 bp,编码含有 961 个氨基酸的蛋白质。*GmHOS1b* 基因位于大豆 11 号染色体上,基因组全长 6 521 bp,只有 1 个转录本,具有 10 个外显子,9 个内含子,转录本全长为 3 360 bp,编码区长度为 3 093 bp,编码含有 1 030 个氨基酸的蛋白质(图 2B)。*GmHOS1a* 和 *GmHOS1b* 同源性高达 86. 80%。



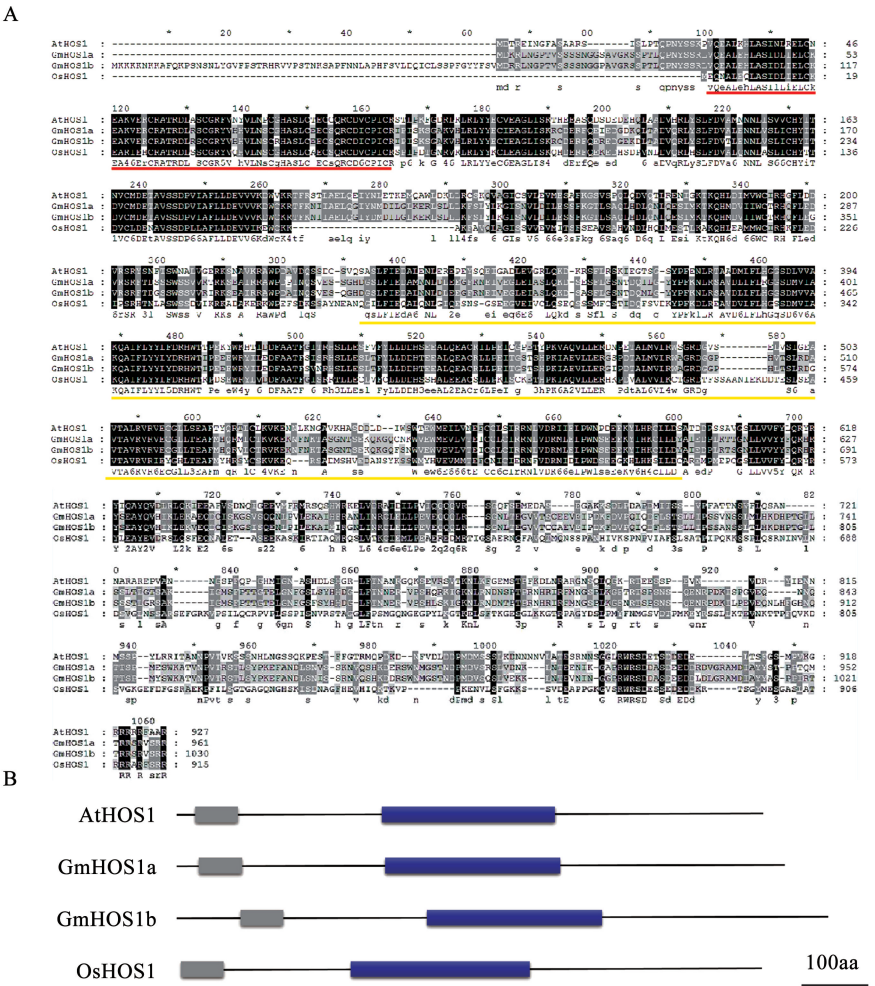
注:图 B 中矩形代表外显子,水平线代表内含子,开放阅读框和非翻译区分别用黑色方框和灰色方框表示。
Note:In fig. 2B, the rectangle represents the exons, the horizontal line represents the introns, and the open reading frame and noncoding sequences are represented by black boxes and gray boxes, respectively.

图 2 HOS1s 的进化树分析(A)和 *GmHOS1a*、*GmHOS1b* 基因结构比较(B)
Fig.2 Phylogenetic analysis of HOS1s(A) and genomic structure of *GmHOS1a* and *GmHOS1b*(B)

2.2 HOS1s 蛋白结构域分析

如图3所示,拟南芥、大豆和水稻 HOS1s 蛋白结构域高度保守,都具有 N 端的环指结构域和中间区域的与脊椎动物核孔复合体成分 EMBRYONIC LAGE MOLECULE DERIVED YOLK SAC (ELYS) 高度相似的保守基序,其中 N 端结构域是 E3 泛素连

接酶发挥功能的必要成分,中间区域承担着 HOS1s 非蛋白水解作用(如 mRNA 转运,染色质重塑等)^[26]。进一步分析发现,GmHOS1b 在蛋白起始部分非保守区域比 GmHOS1a 多了 63 个氨基酸,而 GmHOS1a 和 GmHOS1b 在蛋白保守区域内只分散存在数个氨基酸差异(图3A)。



注:A. HOS1s 氨基酸序列比对,环指结构域用红色下划线表示,ELYS 结构域用黄色下划线表示;B. HOS1s 蛋白结构示意图,灰色矩形代表环指结构域,蓝色矩形代表 ELYS 结构域。

Note:A. HOS1s amino acid sequence alignment, the ring finger domain was indicated by red underline, the ELYS domain was indicated by yellow underline; B. HOS1s protein structure schematic diagram, gray rectangles represent the ring finger domain, and the blue rectangles represent the ELYS domain.

图3 HOS1s 蛋白结构域分析
Fig.3 Protein structure analysis of HOS1s

2.3 不同部位 GmHOS1s 表达量分析

如图4所示,GmHOS1a 在三出复叶中表达量最高,其次在下胚轴和花中有较高表达;GmHOS1b 和 GmHOS1a 的基因表达模式相似,均在三出复叶中表

达最高,其次是花和单叶;与此同时 GmHOS1a 在大豆下胚轴中也有表达,而 GmHOS1b 在下胚轴几乎不表达,总体上, GmHOS1b 的表达量比 GmHOS1a 低。

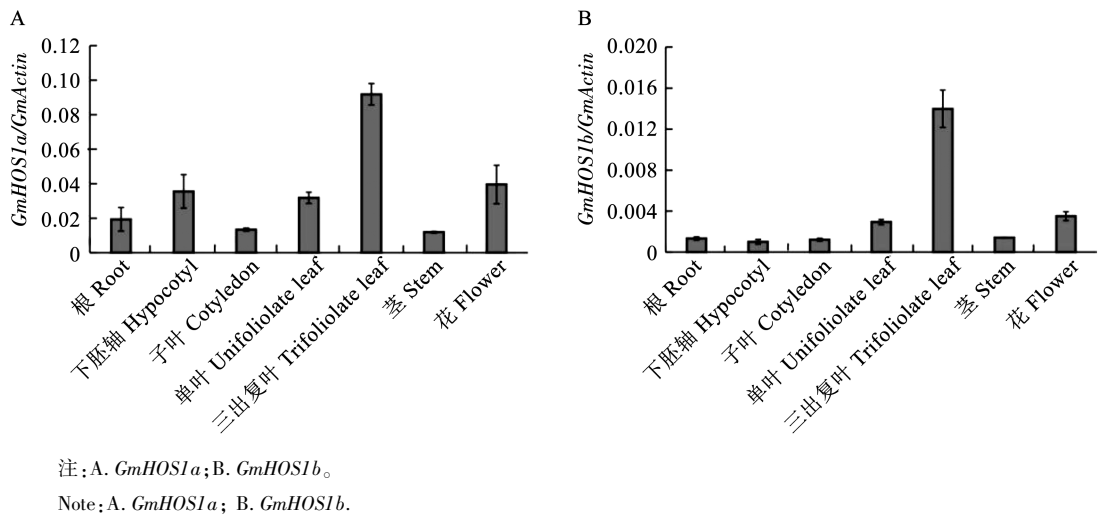


图 4 *GmHOS1s* 组织特异性表达分析

Fig. 4 Tissue specific expression analysis of *GmHOS1s*

2.4 *GmHOS1s* 表达具有昼夜节律

如图 5 所示,根据本实验室前期 RNA-seq 结果^[24]分析发现大豆 *GmHOS1s* 基因在长日照和短日照条件下都具有生物钟昼夜节律,且 *GmHOS1a* 和 *GmHOS1b* 基因之间表达节律基本一样,都是在黑暗前表达量达到峰值。qRT-PCR 结果表明, *GmHOS1a*

呈现昼夜节律性表达,见光表达量升高,黑暗前表达达到峰值,黑暗下表达量下降, *GmHOS1b* 的表达也具有一定的节律,但因其表达量极低,表达模式有待验证(图 6)。以上结果说明 *GmHOS1s* 可能是大豆生物钟中的重要组分并受其调控。

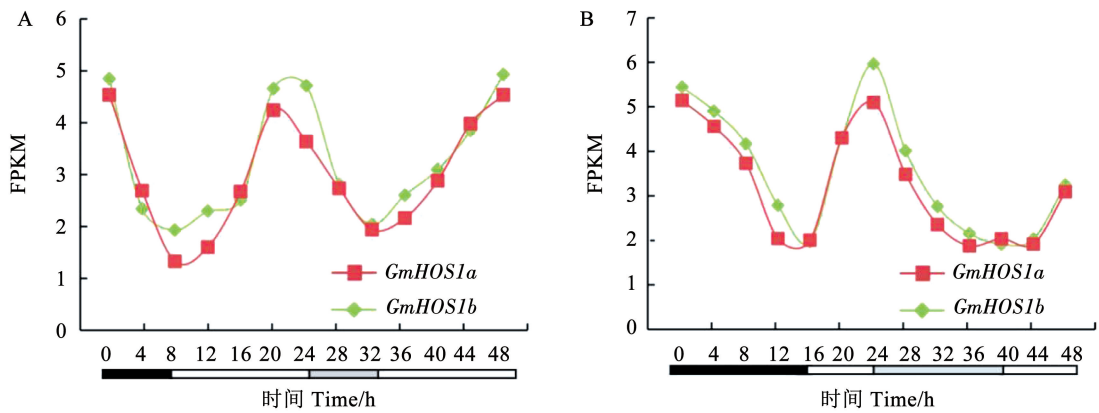


图 5 RNA-seq 结果中 *GmHOS1s* 基因表达模式分析

Fig. 5 Analysis of expression patterns of *GmHOS1s* in RNA-seq results

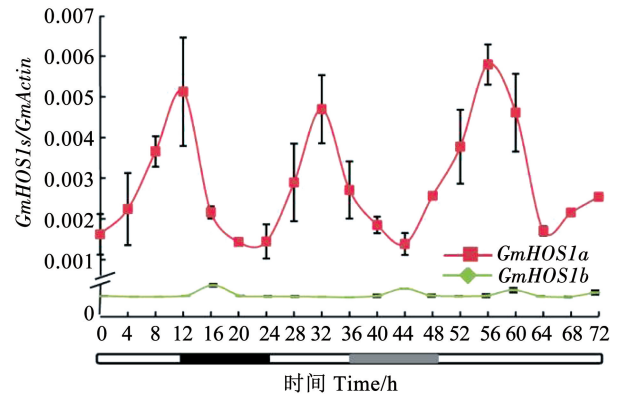
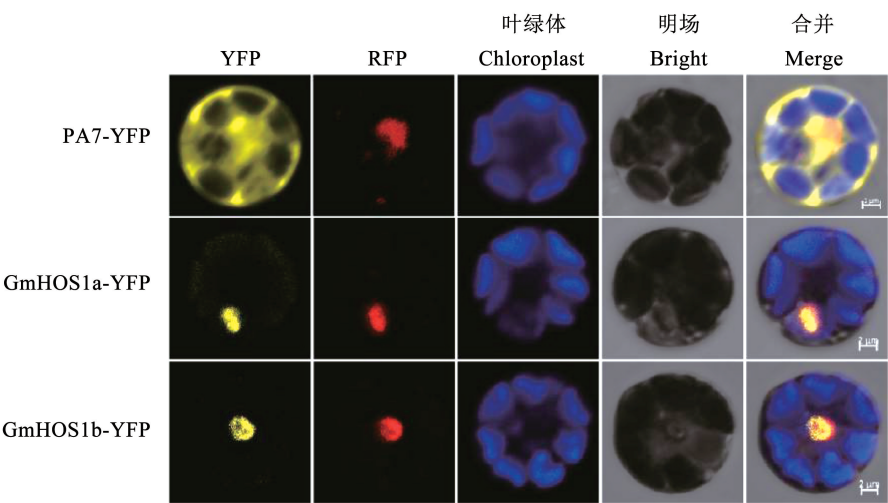


图 6 中日照条件下 *GmHOS1s* 基因表达模式 qRT-PCR 验证

Fig. 6 Verification of *GmHOS1s* expression patterns under zeitgebers time by qRT-PCR

2.5 *GmHOS1s* 蛋白质的亚细胞定位

原生质体中瞬时表达结果如图 7 所示,在黑暗条件下作为对照的 YFP 荧光蛋白在细胞核、细胞质和细胞膜都可以表达, *GmHOS1a* 与 *GmHOS1b* C 端融合 YFP 蛋白定位在细胞核中。与拟南芥中 *HOS1* 蛋白有着不同的亚细胞定位结果,证明 *GmHOS1s* 与 *AtHOS1* 的功能可能存在一定的差别,拟南芥 *HOS1* 蛋白在细胞质中发挥的功能在大豆中是否存在或改变也未可知。



注:RFP 为核定位标记,标尺为 2 μm。
Note:RFP is a nuclear maker,bars =2 μm.

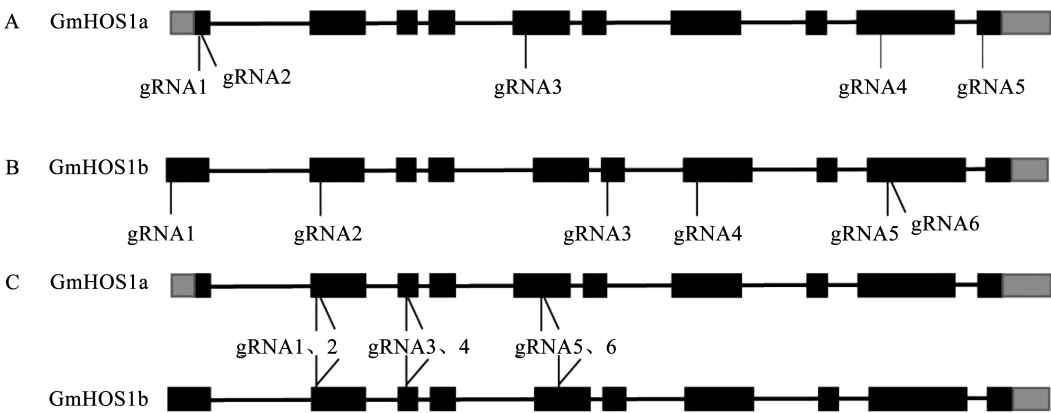
图 7 GmHOS1a 与 GmHOS1b 亚细胞定位分析

Fig. 7 Subcellular localization of GmHOS1a and GmHOS1b

2.6 GmHOS1s CRISPR/Cas9 载体构建及发根验证

在 *GmHOS1a* 基因序列中选取 5 个基因敲除靶标位点,在 *GmHOS1b* 基因序列中选取 6 个基因敲除靶标位点,设计能同时敲除 *GmHOS1a*、*GmHOS1b* 的 6 个靶标位点,靶位点在基因的位置如图 8 所示。1 个敲除载体上连接两个靶位点 (*gRNA1* +

gRNA2),以提高载体工作效率。最终构建了 3 个 *GmHOS1a* 敲除载体 (*GmHOS1a-1*、*GmHOS1a-2*、*GmHOS1a-3*),3 个 *GmHOS1b* 敲除载体 (*GmHOS1b-1*、*GmHOS1b-2*、*GmHOS1b-3*),3 个同时敲除 *GmHOS1s* 的敲除载体 (*GmHOS1a/b-1*、*GmHOS1a/b-2*、*GmHOS1a/b-3*)。



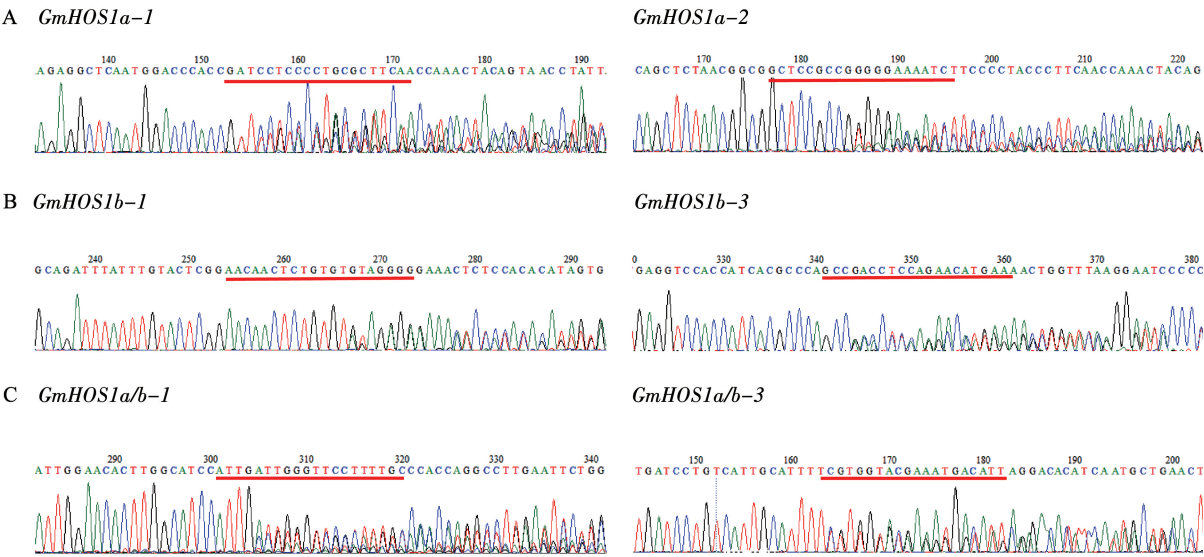
注:A. *GmHOS1a* 靶位点位置;B. *GmHOS1b* 靶位点位置;C. 同时敲除 *GmHOS1a*、*GmHOS1b* 的靶位点位置。
Note:A. Target sites location diagram of *GmHOS1a*; B. Target sites location diagram of *GmHOS1b*; C. Target sites location diagram of *GmHOS1a* and *GmHOS1b*.

图 8 靶位点位置示意图

Fig. 8 Diagram of target location

比较发根实验空白对照和转入载体发状根的靶位点之后的载体靶位点序列。靶位点后的峰图为双峰或者多个高峰较好,便于较快分离出纯合株系。确定了 6 个工作较好的载体,载体工作效率可达

80% 以上;单独敲除 *GmHOS1a*、*GmHOS1b* 载体各两个 (*GmHOS1a-1*、*GmHOS1a-2* 和 *GmHOS1b-1*、*GmHOS1b-3*),同时敲除 *GmHOS1a/b* 的载体两个 (*GmHOS1a/b-1*、*GmHOS1a/b-3*),可用于大豆转化(图 9)。



注: A. *GmHOS1a-1* 和 *GmHOS1a-2* 载体靶位点测序峰图; B. *GmHOS1b-1* 和 *GmHOS1b-3* 载体靶位点测序峰图; C. *GmHOS1a/b-1* 和 *GmHOS1a/b-3* 载体靶位点测序峰图。

Note: A. The target site sequencing map of *GmHOS1a-1* and *GmHOS1a-2* vectors; B. The target site sequencing map of *GmHOS1b-1* and *GmHOS1b-2* vectors; C. The target site sequencing map of *GmHOS1a/b-1* and *GmHOS1a/b-3* vectors.

图9 农杆菌介导大豆发状根验证载体工作效率

Fig.9 *Agrobacterium tumefaciens* mediated soybean hair roots transformation to verify the work efficiency of the CRISPR/Cas 9 vectors

3 讨论

前人研究显示 HOS1 蛋白在大多数陆生植物中高度保守。大多数物种的 HOS1 蛋白是单拷贝,有几种植物有多于两个拷贝^[26]。HOS1 蛋白结构域在不同物种中也高度保守,都具有环指结构域和与 ELYS 高度相似的保守基序。HOS1 蛋白环指结构域是 E3 泛素连接酶发挥功能的必要成分,但其并不存在于所有物种中。ELYS 序列是绝对保守的,在所有鉴定的陆生物种中都存在该结构域^[26],这表明 *HOS1* 的非蛋白水解作用(如 mRNA 转运,染色质重塑等)相对更重要。这两个结构域在拟南芥、大豆和水稻中都存在,表明 *HOS1* 的泛素化活性和非蛋白水解作用在这 3 个植物中都发挥着重要作用。

拟南芥 HOS1 可以与核孔复合体共同参与生物钟相关基因的转运^[14-15],*HOS1* 的表达具有生物钟节律。本研究初步得出 *GmHOS1s* 基因表达具有较好的生物钟昼夜节律性。在光照条件下表达量不断升高,见光 12 h 时达到峰值,转入黑暗后表达量下降。说明 *GmHOS1s* 可能是大豆生物钟中的重要组分并受其调控。*GmHOS1s* 定位在细胞核中,这与拟南芥 *AtHOS1* 定位在细胞核和细胞质中不同,可

能在调节生物钟节律表达过程中起着不同于拟南芥的作用。后续研究 *GmHOS1s* 与核孔复合体是否共定位,细化分析 *GmHOS1s* 的定位情况。

由于完整的大豆遗传转化耗时长、阳性率低,而一次发根检测的周期只有 18 ~ 22 d,因此本研究在大豆子叶节转化之前用子叶节发根检测技术验证植物表达载体工作效率,选取获得的工作效率高的载体可用于下一步大豆遗传转化试验,以获得 *Gmhos1s* 基因敲除突变体,从而进一步研究 *GmHOS1s* 在调控低温响应、光形态建成和生物钟节律中发挥的作用。

4 结论

克隆得到 *GmHOS1a*、*GmHOS1b* 基因,两者高度同源,基因组都具有 10 个外显子、9 个内含子,蛋白都具有环指结构域和与 ELYS 高度相似的保守基序。qRT-PCR 结果表明 *GmHOS1s* 在三出复叶和花中表达量较高,且 *GmHOS1s* 表达具有昼夜节律。亚细胞定位分析表明 *GmHOS1s* 定位在细胞核中。构建 *GmHOS1s* CRISPR/Cas9 载体,通过发根实验验证其工作效率,得到可用于 *GmHOS1s* 基因遗传转化的植物表达载体。

参考文献

[1] LEE H, XIONG L M, GONG Z Z, et al. The *Arabidopsis* *HOS1* gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleocytoplasmic partitioning [J]. *Genes & Development*, 2001, 15 (7): 912-924.

[2] CHINNUSAMY V, ZHU J H, ZHU J K. Gene regulation during cold acclimation in plants [J]. *Physiology Plant*, 2006, 126: 52-61.

[3] LOURENCO T, SAPETA H, FIGUEIREDO D D, et al. Isolation and characterization of rice (*Oryza sativa* L.) E3-ubiquitin ligase *OsHOS1* gene in the modulation of cold stress response [J]. *Plant Molecular Biology*, 2013, 83(4): 351-363.

[4] DING Y, LI H, ZHANG X, et al. OST1 kinase modulates freezing tolerance by enhancing ICE1 stability in *Arabidopsis* [J]. *Development Cell*, 2015, 32(3): 278-289.

[5] KIM Y S, LEE M, LEE J H, et al. The unified *ICE-CBF* pathway provides a transcriptional feedback control of freezing tolerance during cold acclimation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2015, 89(1): 187-201.

[6] VISWANATHAN C, ZHU J K. Molecular genetic analysis of cold-regulated gene transcription [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 2002, 357 (1423): 877-886.

[7] ANA L, FEDERICO V, MANUEL P, et al. The *Arabidopsis* E3 ubiquitin ligase *HOS1* negatively regulates *CONSTANS* abundance in the photoperiodic control of flowering [J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(3): 982-999.

[8] LAZARO A, MOURIZ A, PINEIRO M, et al. Red light-mediated degradation of *CONSTANS* by the E3 ubiquitin ligase *HOS1* regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(9): 2437-2454.

[9] CHENG Z, ZHANG X, HUANG P, et al. Nup96 and *HOS1* are mutually stabilized and gate *CONSTANS* protein level, conferring long-day photoperiodic flowering regulation in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2020, 32(2): 374-391.

[10] ENDO M, TANIGAWA Y, MURAKAMI T, et al. PHYTOCHROME-DEPENDENT LATE-FLOWERING accelerates flowering through physical interactions with Phytochrome B and *CONSTANS* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(44): 18017-18022.

[11] JUNG J H, PARK C M. *HOS1*-mediated activation of *FLC* via chromatin remodeling under cold stress [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2013, 8(12): e27342.

[12] JUNG J H, PARK J H, LEE S, et al. The cold signaling attenuator *HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENE1* activates *FLOWERING LOCUS C* transcription via chromatin remodeling under short-term cold stress in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2013, 25(11): 4378-4390.

[13] MACGREGOR D R, GOULD P, FOREMAN J, et al. HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES1 is required for circadian periodicity through the promotion of nucleocytoplasmic mRNA export in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2013, 25(11): 4391-4404.

[14] TAMURA K, FUKAO Y, IWAMOTO M, et al. Identification and characterization of nuclear pore complex components in *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Cell*, 2010, 22(12): 4084-4097.

[15] PARRY G. Components of the *Arabidopsis* nuclear pore complex play multiple diverse roles in control of plant growth [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(20): 6057-6067.

[16] KIM J H, LEE H J, PARK C M. *HOS1* acts as a key modulator of hypocotyl photomorphogenesis [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2017, 12(5): e1315497.

[17] HUANG H, YOO C Y, BINDBEUTEL R, et al. *PCHI* integrates circadian and light-signaling pathways to control photoperiod-responsive growth in *Arabidopsis* [J]. *Elife*, 2016, 5: e13292.

[18] KIM J H, LEE H J, JUNG J H, et al. *HOS1* facilitates the phytochrome B-mediated inhibition of *PIF4* function during hypocotyl growth in *Arabidopsis* [J]. *Molecular Plant*, 2017, 10 (2): 274-284.

[19] HUAI J, ZHANG X, LI J, et al. *SEUSS* and *PIF4* coordinately regulate light and temperature signaling pathways to control plant growth [J]. *Molecular Plant*, 2018, 11(7): 928-942.

[20] LI C, LI Y H, LI Y F, et al. A domestication-associated gene *GmPRR3b* regulates the circadian clock and flowering time in soybean [J]. *Molecular Plant*, 2020, 4(13): 745-759.

[21] XIONG L, LI C, LI H, et al. A transient expression system in soybean mesophyll protoplasts reveals the formation of cytoplasmic GmCRY1 photobody-like structures [J]. *Science China Life Sciences*, 2019, 62(8): 1070-1077.

[22] 郭亚蓉, 王艳艳, 刘军, 等. 拟南芥隐花色素 CRY2 调控因子 *PRP8* 基因的功能分析 [J]. *生物技术进展*, 2019, 9(2): 169-177. (GUO Y R, WANG Y Y, LIU J, et al. Function analysis of *PRP8* gene of regulating cryptochrome CRY2 in *Arabidopsis* [J]. *Current Biotechnology*, 2019, 9(2): 169-177.)

[23] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.

[24] ZHANG S R, WANG H, WANG Z, et al. Photoperiodism dynamics during the domestication and improvement of soybean [J]. *Science China Life Sciences*, 2017, 60 (12): 1416-1427.

[25] 徐昕, 秦超, 赵涛, 等. *GmELF3s* 调控大豆开花时间和生物钟节律的功能分析 [J]. *作物学报*, 2022, 48(4): 812-824. (XU X, QIN C, ZHAO T, et al. Function analysis of *GmELF3s* in regulating soybean flowering time and circadian rhythm [J]. *Journal of Crops*, 2022, 48(4): 812-824.)

[26] JUNG J H, LEE H J, PARK M J, et al. Beyond ubiquitination: Proteolytic and nonproteolytic roles of *HOS1* [J]. *Trends in Plant Science*, 2014, 19(8): 538-545.