大豆硫氧还蛋白基因的克隆与分析

王伟旗,侯文胜

(中国农业科学院 作物科学研究所 国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程,北京 100081)

摘 要:通过对大豆耐盐品种文丰7盐处理抑制差减文库的筛选,获得了一些差异表达的EST序列,与NCBI中EST数据库进行比对分析后发现,其中1个与硫氧还蛋白相关。据此预测了大豆硫氧还蛋白(Thioredoxin,Trx)基因的cDNA序列,并采用RT-PCR方法克隆了大豆*Trx*基因。生物信息学分析表明:该基因包含1个354 bp的完整开放阅读框,编码118个氨基酸,与拟南芥和烟草的同源性分别为72%和76%。Real-time PCR结果显示:盐处理后,*Trx*基因在耐盐和盐敏感品种中的表达量均有所提高,但耐盐品种的上调幅度显著高于盐敏感品种,说明其可能具有提高大豆品种耐盐性的作用。

关键词:大豆;硫氧还蛋白基因;基因克隆

中图分类号:S565.1 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-9841(2011)03-0351-05

Clone and Analysis of Thioredoxin Gene from Soybean (*Glycine max* L.)

WANG Wei-qi, HOU Wen-sheng

(National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement (NFCRI), Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Based on screening the suppression subtractive hybridization library which constructed by soybean cultivar '*wenfeng*7' (salt-tolerant) after salt treatment, we obtained some differentially expressed EST sequences. The EST sequences were compared with the NCBI databases, analysis result showed that one EST sequence related to thioredoxin. A novel *thioredoxin* gene (*Trx*) of *Glycine max* was cloned and identified with the EST obtained from suppression subtractive hybridization library. Bioinformatics analysis showed that the full length of the *GmTrx* gene cDNA was 354 bp, coded 118 amino acids. Compared with several plants, this gene showed 72% and 76% homology to thioredoxin protein in *Arabidopsis* and tobacco, respectively. The expression of different soybean varieties under salt and common treatment was analyzed by Real-time PCR method. The result showed that, the expression of *Trx* gene was up-regulated in both salt-tolerant and sensitive soybean cultivars after salt treatment, although the expression in salt-tolerant cultivars was much higher than that in salt-sensitive cultivars. This gene may be very important for improving the salt tolerance of soybean.

Key words: Soybean; Salt; Thioredoxin gene; Gene clone

盐碱土是陆地上广泛分布的一种土壤类型,约占陆地总面积的25%。2007年中国环境状况公报[1]显示,我国是盐碱化土地分布广泛的国家之一,从滨海到内陆,从低地到高原都分布着不同类型的盐碱土壤,仅海岸带和滩涂盐碱地面积就高达660万hm^2以上。而且由于灌溉不当、植被破坏和海水入侵等因素,土地盐渍化的面积还在逐年增加。因此,利用分子育种的方法培育耐盐品种显得尤为迫切。大豆是重要的粮食作物,也是我国主要的油料作物。尽管大豆属于中度耐盐作物,但在盐渍条件下产量也会明显下降,而盐敏感品种较耐盐品种受盐害胁迫的影响更大[2]。虽然在大豆中发现了一些与耐盐相关的基因,但是能够显著提高耐盐性的基因还很少,对大豆耐盐基因的表达分析研究也非常有限,深入了解和获得大豆耐盐相关基因对大豆耐盐分子育种具有重要意义。

通过对植物盐处理前后差异表达基因的分析来获取耐盐基因,是一种十分有效的方法,据此发展的抑制差减杂交技术(SSH)在基因差异表达研究中已取得了很大进展[3-5],并在耐盐基因克隆研究中发挥了一定作用。宋艳丽等[6]采用SSH技术构建了棉花耐盐抑制差减文库,克隆了1个与耐盐相关的*GhVP*基因;Wei等[7]通过构建野生大豆盐胁迫的抑制差减文库,也得到了盐诱导表达的基因片

收稿日期:2011-03-15
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30771358)。
第一作者简介:王伟旗(1984-),男,在读硕士,研究方向为大豆基因克隆和功能验证。E-mail:wangwq8439@163.com。
通讯作者:侯文胜(1969-),男,研究员,博士,主要从事大豆基因工程研究。E-mail:houwsh@caas.net.cn。

段;Wu 等[8]则应用此技术探讨了水稻耐盐胁迫基因的表达特点。

硫氧还蛋白(Thioredoxin, Trx)是一种低分子量、热稳定的酸性蛋白。它们在多种反应中通过可逆的双硫键和硫醇变化起到氧化还原载体的作用,是重要的酶活力调节蛋白[9]。植物中的 *Trx* 基因最初是在叶绿体中发现的,被认为是光合作用中一些关键酶的活化调节蛋白,后来在细胞质和线粒体中也发现了硫氧还蛋白,它们在结构和功能上都有所差异。自发现硫氧还蛋白以来的几十年里,人们对它的种类、特点、功能等方面有了越来越多的认识,为其利用奠定了必要的基础[10]。

该试验以盐处理前后的耐盐大豆品种文丰 7 为材料,构建了大豆耐盐抑制差减文库。利用 Dot blot 方法对构建的文库进行差异筛选分析,获得了一些差异表达的 EST 序列,与 NCBI 中 EST 数据库进行比对分析后发现,其中 1 个与硫氧还蛋白相关,据此预测了大豆硫氧还蛋白(Thioredoxin,Trx)基因的 cDNA 序列,采用 RT-PCR 方法克隆了大豆 *Trx* 基因,并分析了其特征和表达特性,为利用该基因开展大豆耐盐性改良研究打下了基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料与试剂

耐盐大豆品种文丰 7 与盐敏感大豆品种 Union 由该实验室保存;大肠杆菌 DH5α 购自天根公司;总 RNA 抽提所用的 Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司;M-MLV 反转录试剂盒为 TaKaRa 公司产品;各种酶制剂均来自 Promega;pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆幼苗的盐处理 将大豆品种播种在蛭石中,温度控制在 25 ~ 29℃,湿度保持在 60% ~ 80%,待真叶完全展开时,利用含 0.9% NaCl 的 1/2 Hoagland 溶液进行处理,对照采用 1/2 Hoagland 营养液培养,待处理 24 h 后取其根作为试验材料。

1.2.2 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成 总 RNA 的提取采用 Trizol 试剂(Invitrogen, 上海)。取 1 μg 经 DNase 消化的总 RNA 用于 cDNA 第一链的合成,具体步骤参考 M-MLV (TaKaRa, 大连)说明书进行。

1.2.3 引物设计及合成 根据预测的结果设计 PCR 引物 Trx-F: 5′-GTTCTAGAATGGCGGAAGAGGGACAAGT-3′, Trx-R: 5′-TAGAGCTCTCAAGCAGCAGCAATTGCGG-3′,特异引物由上海生工生物公司合成。

1.2.4 基因克隆与序列测定 用所设计的特异引物,以文丰 7 盐处理后的 cDNA 为模板扩增特异片段。PCR 程序为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s,57℃ 复性 30 s,72℃ 延伸 1.5 min,共 30 个循环;72℃ 延伸10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖电泳检测。将 PCR 产物切胶回收后,与 pMD18-T 载体连接,转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5α,经 LB/Amp 平板培养后,挑选白色克隆,由上海生工生物公司完成序列测定。

1.2.5 Real-time PCR 分析 采用 TaKaRa 的 SYBR Premix Ex Taq™ Ⅱ(perfect real time)试剂盒进行定量 RT-PCR 分析,具体方法参照说明书。根据已经获得的大豆 *Trx* 基因和内参 *Actin* 基因序列分别设计定量 RT-PCR 正反向引物。按如下程序进行 PCR:94℃ 预变性 10 s,接下来进行 94℃ 预变性5 s, 60℃ 预变性 34 s,共 40 个循环,导出数据,进行熔解曲线分析。检测每份样品中 *Trx* 基因和*Actin*基因的 CT 值,每份样品重复 3 次,然后根据 $2^{-\Delta\Delta t}$ 计算平均值和标准差[11]。

2 结果与分析

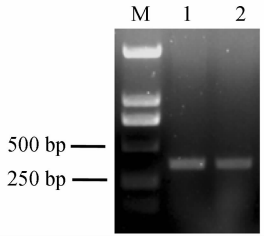
2.1 大豆 *Trx* 基因的克隆与序列分析

以耐盐品种文丰 7 为材料,构建了大豆耐盐抑制差减文库。利用 Dot blot 方法对构建的文库进行差异筛选分析,得到了一些差异表达的 EST 序列。从中选取了一个与硫氧还蛋白相关的 EST 序列,通过与 NCBI 中的 EST 数据库进行比对分析,预测了大豆硫氧还蛋白基因序列。序列分析表明预测的大豆硫氧还蛋白基因全长 576 bp,其中 5′非编码区长 56 bp,3′非编码区长 166 bp,开放阅读框长354 bp,编码 118 个氨基酸。

以盐处理后文丰 7 的 cDNA 为模板,用设计好的特异引物进行扩增,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 1),在 350 bp 左右出现单一条带,与预计大小相符。回收该条带 DNA 与 pMD18-T 载体连接,转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5α,经 LB/Amp 平板培养后,挑选阳性克隆,送上海生工生物公司测序。经比对,测序结果与预测的序列完全一致。

2.2 *Trx* 基因在不同物种间蛋白同源性比较分析

通过对几种植物 *Trx* 基因的比对发现,大豆 *Trx* 基因与拟南芥、蒺藜状苜蓿、豌豆、烟草、蓖麻和葡萄的 *Trx* 基因在氨基酸水平上有很高的同源性,分别为 72%、78%、76%、69%、72% 和 70%(图 2)。



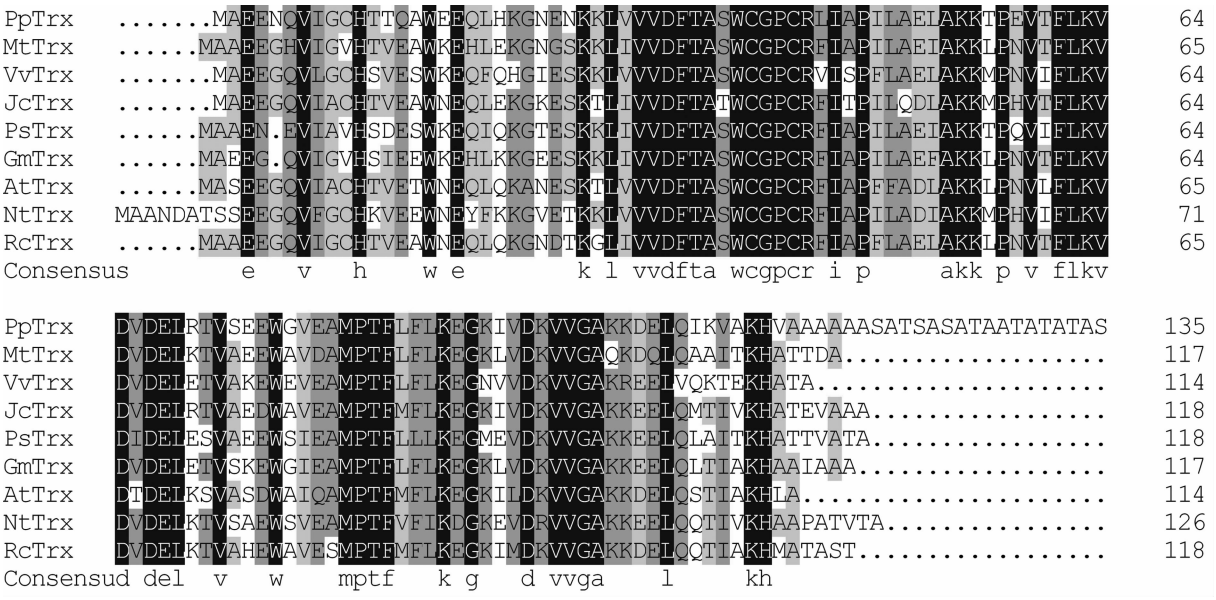
M: DNA 标准分子量(DL2000)　1、2: RT-PCR 产物

M: DNA markers (DL2000)　1,2: RT-PCR product

图 1　大豆 *Trx* cDNA RT-PCR 产物的电泳分析鉴定

Fig. 1　Identification of the RT-PCR product of *GmTrx* cDNA by agarose gel electropresis

通过对几种植物 *Trx* 系统发育树分析可以看出(图 3),同为豆科的大豆、豌豆和蒺藜状苜蓿同源性最高;而均为大戟科的蓖麻和麻风树形成了同一分支,与大豆的同源性较低;茄科的烟草和葡萄科的葡萄被分到同一支,与大豆的同源性略低;桃树虽单列为一支,但与大豆比较也显示了一定的同源性。对系统发育树的分析说明:该基因在亲缘关系近的物种间同源性最高,即使亲缘关系较远的物种间也具有一定的同源性。这说明 *Trx* 基因在不同物种间具有较强的保守性。



AtTrx (*Arabidopsis thaliana*, NP_190672. 1), *MtTrx* (*Medicago truncatula*, AAZ98842. 1), *PsTrx* (*Pisum sativum*, CAC42084. 1), *NtTxr* (*Nicotiana tobacum*, P29449. 1), *RcTrx* (*Ricinus communis*, XP_002534131. 1), *VvTrx* (*Vitis vinifera*, ADN96594. 1), *PpTrx* (*Prunus persica*, AAL26915. 1), *GmTrx* (*Glycine max*, ABV71991. 1), *JcTrx* (*Jatropha curcas*, ADU56183. 1)

图 2　大豆 *Trx* 基因蛋白序列与其它物种同源蛋白序列的比较

Fig. 2　Sequence comparison between soybean *Trx* gene protein and other species´homologus protein

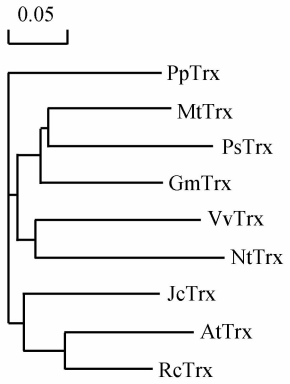


图 3　植物 *Trx* 基因的系统发育树(图上线段表示进化距离)

Fig. 3　Phylogenetic tree of plant *Trx* gene (the length of segments means evolution distance)

2.3　Real-time PCR 分析 *Trx* 基因在文丰 7 和Union 中的差异表达

以耐盐品种文丰 7 和盐敏感品种 Union 盐处理前后的 cDNA 为模板,采用 Real-time PCR 方法对大豆 *Trx* 基因在不同品种盐处理前后的表达特性进行了分析。结果表明:盐处理后,大豆 *Trx* 基因在耐盐品种文丰 7 与盐敏感品种 Union 表达量均有所提高,但耐盐品种的上调幅度要显著高于盐敏感品种,说明其可能具有提高大豆耐盐性的作用(图 4)。

3　讨　论

目前研究基因差异表达的主要方法有抑制性差减杂交(Suppression Subtractive Hybridization,

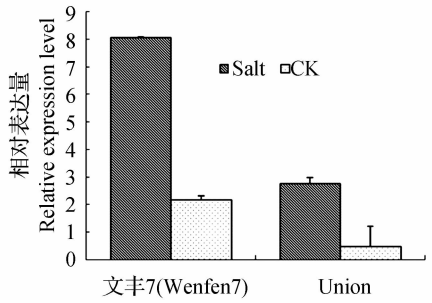


图 4 Real-time 分析在文丰 7 与 Union 中的差异表达

Fig. 4 Analysis of the expression in Wenfeng7 and Union by real-time PCR

SSH)、cDNA 微阵列技术、差异显示 PCR (DD-PCR)、代表性差异分析(RDA)、表达序列标签(ESTs)、基因表达连续性分析(SAGE)、cDNA 扩增片段长度多态性(cDNA-AFLP)等。SSH 技术具有以下优点:假阳性率较低、高度灵敏性、背景低、重复性强;在一次 SSH 反应中,可以同时分离出上百个差异表达基因,极大地提高了检测效率[12-13]。因此,SSH 技术在基因差异表达研究方面得到了广泛的应用,尤其是在植物抵抗各种胁迫(生物和非生物)的领域中,已成为研究基因差异表达的一种普遍技术。

该试验在构建耐盐品种文丰 7 抑制差减文库、进行差异表达筛选的基础上,预测并克隆了大豆 *Trx* 基因。生物信息学分析表明:该基因包含 1 个 354 bp 的完整开放阅读框,编码 118 个氨基酸,与拟南芥和烟草的同源性分别为 72% 和 76%。系统发育树分析可以看出 *Trx* 基因在不同物种间具有较强的保守性。Real-time PCR 分析结果显示:盐处理后,*Trx* 基因在耐盐和盐敏感品种中的表达量均有所提高,但耐盐品种的上调幅度显著高于盐敏感品种,说明其可能具有提高大豆品种耐盐性的作用,可利用该基因开展大豆耐盐性改良研究。

硫氧还蛋白是一类广泛存在于生物体内的多功能性蛋白,分子量约 12 kD,均有 1 个保守的活性中心,活性中心有 2 个具有氧化还原活性的半胱氨酸残基。通过二硫键(S-S)与巯基(-SH)的可逆变化,Trx 在多种反应中起氧化还原载体的作用,参与生物体内水解酶活性调节、信号传导、转录因子调控等许多重要的生命活动过程[14]。自 20 世纪 60 年代 Laurent 等[15]在大肠杆菌中发现硫氧还蛋白作为核苷酸还原酶的氢供体以来,人们相继在动物、植物中发现了硫氧还蛋白,并对其功能进行了研究。

越来越多的研究表明,Trx 可以通过多种途径参与植物抗氧化胁迫:Trx 是重要的氧化还原剂[16];*Trx* 基因的表达常常与活性氧的增加有关[17];Trx 的靶蛋白参与抗氧化调控,如超氧化物歧化酶(SOD)、甲硫氨酸亚砜还原酶(Msr)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)和过氧还蛋白(Prx)等,这些抗氧化酶大都含有保守的半胱氨酸[16];Trx 参与氧化损伤蛋白的修复[18]等。这些研究为 *Trxs* 基因在植物耐盐改良上的应用提供了重要的理论依据。Schenk 等研究表明,硫氧还蛋白在转录过程中起到重要的调控作用,调节转录因子 NF-kappa B 和AP-1的活性,而这 2 种转录因子能够诱导植物抗氧化胁迫和细胞防御反应基因的表达。说明硫氧还蛋白对植物抗逆基因的表达起到了重要的调控作用[19]。在逆境胁迫下,硫氧还蛋白还具有调节细胞程序死亡的功能。当氧化胁迫较弱时,植物细胞内的 Trx 以还原态为主体,还原态的 Trx 能与细胞程序死亡信号激酶(ASK1)结合形成复合物,阻碍相关信号的传递,细胞程序死亡受到抑制,反之则启动细胞程序死亡[20]。2002 年,Reichheld 等[21]发现拟南芥中 *AtTrxh5* 参与了氧化胁迫反应和对真菌的抗病反应。李巧云等[22]研究表明:在大麦中转入外源 *Trxs* 基因,转基因大麦一方面能增强抗氧化酶活性、有效清除过量的活性氧;另一方面能促进铁蛋白含量的增加,从而提高了转基因大麦幼苗的耐盐能力。Broin 等[23]的研究表明,干旱诱导产生的硫氧还蛋白 CDSP32,其 mRNA 和蛋白因氧胁迫的诱导而大量聚集,并认为该蛋白是通过保护叶绿体结构的方式来对抗由干旱引起的氧化胁迫。植物体内的硫氧还蛋白不仅本身具有耐逆境胁迫能力,同时还可以对耐逆基因的表达进行调控,在植物的耐逆系统中起着重要的作用。因此,硫氧还蛋白基因在植物耐逆机理的揭示和植物耐逆基因工程中具有较高的研究价值。

参考文献

[1] 国家环保总局. 2007 年中国环境状况公报公布[R]. (State Environmental Protection Administration. China environmental state bulletins announced in 2007[R].)

[2] Phang T, Shao G, Lam H. Salt tolerance in soybean[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2008, 50(10):1196-1212.

[3] Kim M, Kim S. Isolation of cDNA clones differentially accumulated in the placenta of pungent pepper by suppression subtractive hybridization[J]. Molecular Cells, 2001, 11(2):213-219.

[4] Sahu B, Shaw B. Isolation, identification and expression analysis of salt-induced genes in *Suaeda maritima*, a natural halophyte, using PCR-based suppression subtractive hybridization[J]. BMC Plant Biology, 2009, 9(1):69.

[5] Sahi C, Agarwal M, Reddy M, et al. Isolation and expression analysis of salt stress-associated ESTs from contrasting rice cultivars using a PCR-based subtraction method[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 106(4):620-628.

[6] 宋丽艳, 叶武威, 赵云雷,等. 陆地棉耐盐相关基因(*GhVP*)的克隆及分析[J]. 棉花学报, 2010, 22(3):285-288. (Song L Y, Ye W W, Zhao Y L, et al. Isolation and analysis of salt tolerance related gene (*GhVP*) from *Gossypium hirsutum* L. [J]. Cotton Science, 2010, 22(3):285-288.

[7] Ji W, Li Y, Li J, et al. Generation and analysis of expressed sequence tags from NaCl-treated *Glycine soja* [J]. BMC Plant Biology, 2006, 6(1):4.

[8] Wu Y R, Wang Q Y, Ma Y M, et al. Isolation and expression analysis of salt up-regulated ESTs in upland rice using PCR-based subtractive suppression hybridization method[J]. Plant Science, 2004, 168: 847-853.

[9] Holmgren A. Thioredoxin and giutaredoxin systems[J]. Journal of Biological Chemistry, 1989, 264:13963-13966.

[10] Laughner B J, Sehnke P C, Ferl R J. A novel nuclear member of the thioredoxin superfamily[J]. Plant Physiology, 1998, 118: 987-996.

[11] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29: e45.

[12] 李亮,侯文胜. 抑制差减杂交技术在大豆研究中的应用[J]. 大豆科学,2010, 29(4):702-706. (Li L, Hou W S. Application of suppression subtractive hybridization in soybean research [J]. Soybean Science, 2010, 29 (4):702-706.

[13] Diatchenko L, Lukyanov S, Lau Y F, et al. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for indentifying differentially expressed genes[J]. Methods Enzymology, 1999, 303:349-389.

[14] Li X M, Nield J, Hayman D, et al. Thioredoxin activity in the C terminus of Phalaris S protein[J]. The Plant Journal, 1995, 8: 133-138.

[15] Laurent T C, Moore E C, Reichard P. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides[J]. Journal of Biological Chemistry, 1964, 239(10):3436-3444.

[16] Wong J H, Cai N, Balmer Y, et al. Thioredoxin targets of developing wheat seeds identified by complementary proteomic approaches[J]. Phytochemistry, 2004, 65:1629-1640.

[17] Vieira Dos Santos C, Rey P. Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response[J]. Trends in Plant Science, 2006, 11:329-334.

[18] Lundstrom J, Holmgren A. Protein disulfide-isomerase is a substrate for thioredoxin reductase and has thioredoxin-like activity [J]. Journal of Biological Chemistry, 1990, 265:9114-9120.

[19] Schenk H, Klein M, Erdbrugger W, et al. Distinct effects of thioredoxin and anthoxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91(5):1672-1676.

[20] Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, et al. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK1)[J]. The EMBO Journal, 1998, 17(9):2596-2606.

[21] Reichheld J P, Mestres-Ortega D, Christophe L, et al. The multigenic family of thioredoxin h in *Arabidopsis thaliana*: specific expression and stress response[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2002, 40:685-690.

[22] 李巧云, 牛洪斌, 任江萍, 等. 转外源 *Trxs* 基因大麦耐盐性有关生理生化特性分析[J]. 作物杂志, 2009(5):7-10. (Li Q Y, Niu H B, Ren J P, et al. Effects of exogenous *Trxs* on physiological and biochemical characteristics of salt tolerance in transgenic barley seedlings[J]. Crops, 2009(5):7-10.

[23] Broin M, Cuin S, Peltier G, et al. Involvement of CDSP32, a drought-induced thioredoxin, in the response to oxidative stress in potato plants[J]. FEBS letters, 2000, 467:245-248.