

大豆 *Usp1* 基因的克隆和表达分析

黄 珊, 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, 农业部北京大豆生物学重点实验室, 北京 100081)

摘 要: 在对大豆根系盐胁迫抑制差减杂交文库 EST 序列分析的基础上, 利用 RT-PCR 技术克隆得到了一个大豆 *UspA* 基因, 命名为 *GmUsp1*, 其编码一个包含 164 个氨基酸残基的多肽链。多序列比对和编码蛋白结构分析表明, *GmUsp1* 属于泛应激蛋白(Universal Stress Protein)家族成员之一。其氨基酸序列与蚕豆 *Vf_enod18* 序列相似度最高, 属于 MJ-0577 类中含有 ATP 结合位点的 *UspA* 亚族, 与 MJ-0577 有相似的蛋白二级结构。分别采用 250 mmol·L⁻¹ NaCl、100 μmol·L⁻¹ ABA 和 30% PEG 6000 进行胁迫处理, 耐盐品种文丰 7 号和盐敏感品种 Union 的 *GmUsp1* 均被诱导表达, 二者对胁迫诱导响应时间和表达量存在差异, 说明 *GmUsp1* 可能参与大豆对非生物逆境胁迫的应答调控。

关键词: 大豆; *UspA*; 序列分析; 基因表达

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)04-0546-06

Cloning and Expression Analysis of *Usp1* Gene from Soybean

HUANG Shan, WANG Wei-qi, HOU Wen-sheng

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

Abstract: According to the EST sequences of the Suppression Subtractive Hybridization (SSH) cDNA libraries, a soybean *UspA* gene named by *GmUsp1* was cloned from the soybean by RT-PCR. The complete cDNA of *GmUsp1* was 1 047 bp, it encoded a peptide which contained 164 amino acid residues. The 495 bp CDS showed that it belonged to the universal stress protein (*UspA*) family, by using the BLASTp tool of NCBI database. Homology analysis showed *GmUsp1* had the highest similarity with the bean *Vf_enod18*, and it belonged to the group of *UspA*, which represented by the ATP-binding structure of the MJ-0577 protein from *Methanococcus jannaschii*. It also had the similar protein secondary structure with MJ-0577. In the salt sensitive variety Union and tolerant variety Wenfeng No. 7, the expression of *GmUsp1* was induced by 250 mmol·L⁻¹ NaCl, 100 μmol·L⁻¹ ABA and 30% PEG-600 treatment, however, it had different response time and expression level. So *GmUsp1* might be involved in plant stress adaptation, it suggested that *GmUsp1* may play a role in salt stress adaptation in soybean.

Key words: Soybean; *UspA*; Sequence analysis; Gene expression

泛应激蛋白(Universal stress protein, *UspA*)是一类在细胞质中普遍存在的小分子蛋白, 通常由 111~167 个氨基酸残基组成。*UspA* 最早在大肠杆菌中发现, 其表达受多种胁迫影响。研究表明该类蛋白在碳、氮、磷、硫酸盐、氨基酸等缺乏时, 以及在高温、氧化、紫外线、环丝氨酸、抗生素等刺激下能积累表达^[1-3]。Freestone 等^[4]的研究结果显示, *UspA* 作用于丝氨酸、苏氨酸的蛋白磷酸化, 对细胞稳定期的生长有重要作用, 但其作用机理尚不明确。

泛应激蛋白可分为 2 个亚类, 一类包含 ATP 结合位点, 如 *Methanococcus jannaschii* MJ-0577^[5]; 另一类不包含 ATP 结合位点, 如 *Haemophilus influenza* 和

Escherichia coli 的 *UspA* 家族蛋白^[6]。David 等^[7]分析了拟南芥基因组 44 个 *UspA* 家族蛋白, 认为拟南芥中的该家族蛋白全部由近似于 1MJH (MJ0577) 的祖先演变而来。

大豆是世界上重要的粮油兼用作物, 具有中度耐盐特性, 但在盐碱条件下生长发育也会受到明显影响, 造成产量和品质的下降。与耐盐品种相比, 盐敏感品种受盐胁迫的影响则更为严重。该研究在前期对大豆耐盐品种文丰 7 号根系盐诱导表达基因进行分析的基础上^[8-9], 比对大豆基因组数据库, 利用 RT-PCR 方法, 克隆得到了一个新的 *UspA* 家族成员 *GmUsp1*, 并进一步研究了其结构特征、在不同胁迫条件下的表达变化, 为深入研究大豆 *UspA*

收稿日期: 2012-03-22

基金项目: 国家自然科学基金(30771358)。

第一作者简介: 黄珊(1987-), 女, 在读硕士, 研究方向为大豆生物技术。E-mail: shanshanxm@126.com。

通讯作者: 侯文胜(1969-), 男, 博士, 研究员, 主要从事大豆基因工程研究。E-mail: houwsh@caas.net.cn。

基因家族的功能提供了基础信息。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试材料大豆耐盐品种文丰 7 号和盐敏感品种 Union^[10-11] 由实验室保存提供。

1.1.2 菌株和质粒 pEASY-T1 克隆载体和 Trans₁-T₁ phage Resistant 感受态细胞均购自全式金公司。发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogene*) K599 由实验室保存。

1.1.3 试剂 限制性内切酶, NEB 公司; Trizol 试剂, Invitrogen 公司; Ex Taq DNA 聚合酶, 反转录酶, Realtime PCR 试剂盒, TaKaRa 公司; DNA Marker, 天根公司; 小量质粒提取试剂盒, New Industry 公司。

1.2 方法

1.2.1 大豆根系的获得 大豆耐盐品种文丰 7 号, 在装有蛭石和营养土的盆中培养至真叶展开, 在 1/2 hoagland 营养液中加入 0.9% NaCl (M/V) 水培法处理幼苗, 待 24 h 后取盐处理材料根系, -80℃ 冻存, 备用。以盐敏感品种 Union 和耐盐品种文丰 7 号作为受体, 利用 K599 侵染, 诱导培养获得大豆发状根作为胁迫处理材料。

1.2.2 大豆总 RNA 的提取及反转录 大豆总 RNA 参照 Invitrogen 公司 Trizol 试剂说明提取, mRNA 反转录参照 TaKaRa Realtime RT-PCR 反转录试剂盒说明。

1.2.3 引物设计和扩增条件 利用大豆根系盐胁迫基因文库中的 EST 序列, 比对基因组得到预测的 CDS 序列信息设计引物, 引物设计工具为 Primer Premier 5.0。引物序列如下:

上游引物: 5'-ATGAGCAGTGATAGGAATATTGG-3'

下游引物: 5'-TCAGTTAGTAGAAGGGGCAGAGT-3'

以文丰 7 号根系总 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 进行 RT-PCR 扩增, 扩增条件为: 94℃, 4 min; 94℃, 30 s; 49℃, 40 s; 72℃, 45 s; 30 个循环; 72℃, 10 min。

1.2.4 PCR 产物回收、连接和克隆 PCR 电泳产物回收使用 OMEGA 核酸回收试剂盒回收, 并将回收产物连接 pEASY-T₁ 克隆载体, 转化 Trans₁-T₁ phage Resistant 感受态细胞, 重组载体经鉴定后送深圳华大基因公司测序。

1.2.5 序列分析 将测序得到的 *GmUsp1* 序列比对 NCBI 数据库, 利用 DNAMAN 进行多序列比对和进化树分析, PredictProtein 网站工具分析二级结构

<https://www.predictprotein.org/>。

1.2.6 *GmUsp1* 胁迫表达分析 挑选生长状态一致的大豆发状根, 放置在 1/2MS (pH 7.0) 的基础平板和加入 250 mmol·L⁻¹ NaCl、100 μmol·L⁻¹ ABA、30% (W/V) PEG 6000 的 3 种诱导平板中进行处理。于处理 0、1、3、8、24 h 取样, -80℃ 冷冻保存样品。

提取样品总 RNA, 参照 TaKaRa 的 SYBR Premix Ex Taq[™] II 试剂盒进行定量 RT-PCR, 具体方法参照说明书。每份样品 3 次重复, 利用 2^{-Δct} 计算标准差和均值^[12]。

RT-PCR 引物序列为:

内参基因 *GmCYP2*^[13] 上游引物: 5'-CGGGAC-CAGTGTGCTTCTTCA-3'

下游引物: 5'-CCCCTCCACTACAAAGGCTCG-3'

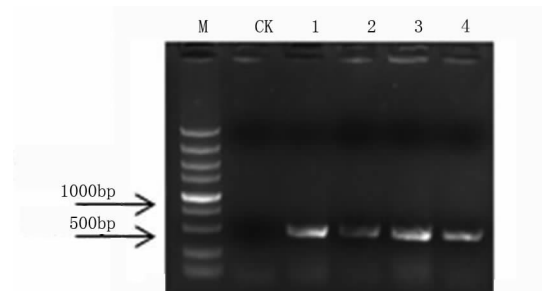
GmUsp1 上游引物: 5'-TATTGGGGTTGCCTTG-GACTT-3'

下游引物: 5'-GGCTTGATGTGGACGATGTAGAG-3'

2 结果与分析

2.1 大豆 *Usp1* 基因的克隆

以大豆盐胁迫根系总 RNA 为模板, 利用 RT-PCR 方法得到大豆 *UspA* 基因的 CDS 编码序列, 其核苷酸长度为 495 bp (图 1), 编码 1 个包含 164 个氨基酸残基的多肽链, 命名为 *GmUsp1*。将克隆得到的基因比对大豆基因组数据库 (<http://www.phytozome.net>), 发现其在大豆 Gm11、Gm12 染色体上各有 1 个拷贝, 且编码序列信息完全相同, 说明该基因在大豆中有一定的保守性。如图 2 所示, *GmUsp1* 基因组序列长度为 2 109 bp, 包含 3 个内含子, 编码区域为 1 047 bp, 其中含 109 bp 5' UTR、495 bp CDS 和 443 bp 3' UTR。

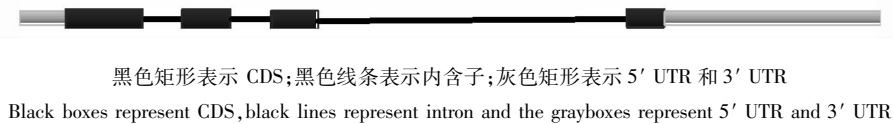


M: DL5000 Marker; 1~4: CDS PCR 产物

M: DL5000 Marker; 1~4: CDS PCR product

图 1 *GmUsp1* RT-PCR 扩增产物

Fig. 1 Amplification of *GmUsp1* CDS sequence

图2 *GmUsp1* 基因结构图Fig.2 *GmUsp1* genome sequence model

2.2 序列分析

2.2.1 UspA 蛋白分子进化树分析 选取微生物、单子叶和双子叶植物多个物种共 11 个报道过的 UspA 家族蛋白序列进行对比分析。将 *GmUsp1* 编码蛋白序列与上述序列比对,用 Clastal X 比对,构建进化树(图 3)。

进化树分析结果显示,*GmUsp1* 与豆科植物蚕豆 *Vf_enod18*、紫云英 *AsD243* 亲缘关系较近,与其

它植物相对较远。UspA 家族蛋白根据其蛋白结构和生物化学信息主要分为 2 个亚族,一个为包含 ATP 结合位点的亚族,另一个则没有 ATP 结合位点。进化树分析结果显示 *GmUsp1* 与包含 ATP 结合位点的代表蛋白流感嗜血杆菌 MJ_0577 亲缘关系更近,如图 5 中显示,具有 ATP 磷酸化位点 P 和 ATP 核酸糖位点 R。

图3 *GmUsp1* 蛋白的分子进化树分析

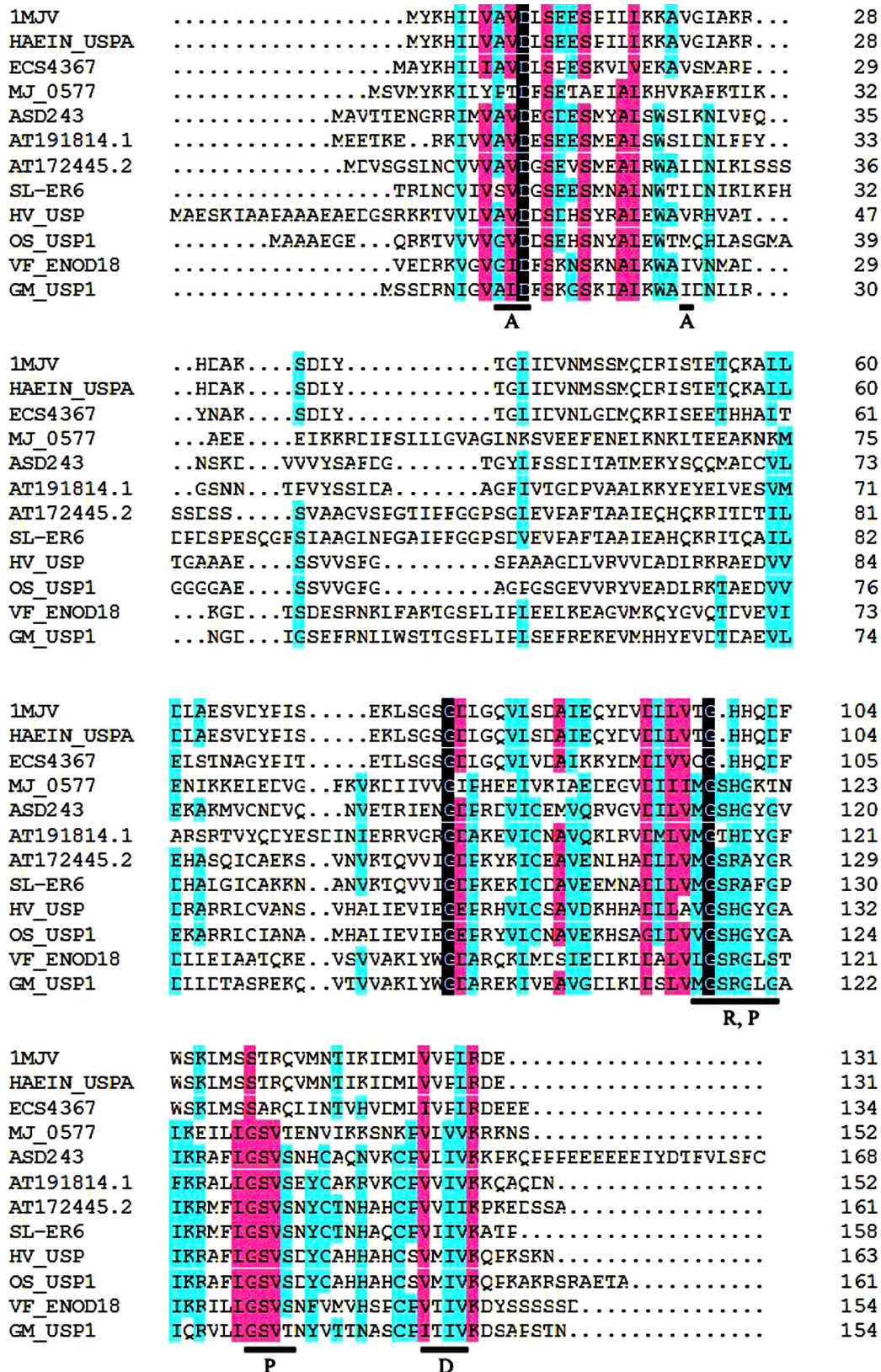
Fig.3 Phylogenetic relationship of UspA superfamily proteins

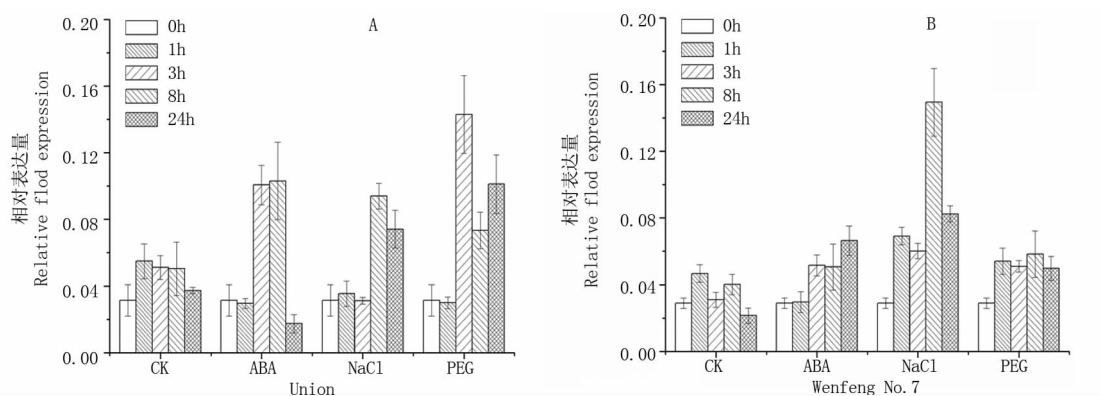
2.2.2 蛋白结构域分析 对 *GmUsp1* 蛋白序列结构域分析表明,该蛋白包含 1 个 N-糖基化位点 NASC(N-glycosylation site),蛋白激酶 C 磷酸化位点 SDR,(Protein kinase C phosphorylation site),酪蛋白 II 磷酸化位点 TDAE(Casein kinase II phosphorylation site),酪氨酸激酶磷酸化位点 RNGDILY(Tyrosinekinase phosphorylation site) 和 2 个 N-豆蔻酰化位点 GSKIAL, GSVTNY(N-myristoylation site)。预测蛋白二级结构(图 4)包含 4 个 α 螺旋结构、6 个 β 折叠结构和 11 个转角结构,分别为 35.4%、23.2%、41.5%,与 MJ_0577 相似。

2.3 大豆 *Usp1* 基因在胁迫下的表达分析

分别对盐敏感品种 Union 和耐盐品种文丰 7 号发状根进行 ABA、NaCl、PEG 处理,利用 Realtime-PCR 对目的基因进行表达分析。在不同胁迫处理后 *GmUsp1* 均有一定程度的诱导上调表达(图 6)。在盐敏感品种 Union 中,在 ABA 和 PEG 处理时均为 3 h 后上调表达,在 NaCl 处理后 8 h 上调表达。在耐盐品种文丰 7 号中,在 ABA 处理 3 h 后一直为上调表达,在 NaCl 和 PEG 处理 1 h 时开始上调表达,其对胁迫条件的应答速度明显快于敏盐品种 Union,文丰 7 号在胁迫处理后,上调表达持续时间长于 Union。

loop:转角;strand: β 折叠;helix: α 螺旋;seq:编码蛋白序列;str:二级结构图4 *GmUsp1* 二级结构预测结果Fig.4 Secondary structure of *GmUsp1*





A: 敏盐品种 Union; B: 耐盐品种文丰 7 号

A: Salt sensitive variety Union; B: Salt tolerance variety Wenfeng No. 7

图 6 *GmUsp1* RealTime-PCR 表达分析Fig. 6 Expression analysis of *GmUsp1* in different stress treatment and different time

UspA 被认为在胁迫响应、结瘤、细胞分化和膨胀过程中发挥作用, *GmUsp1* 在 2 个品种中的表达方式, 说明其受到 ABA、NaCl、PEG 诱导调控。

3 讨论

本研究根据耐盐品种文丰 7 号根系抑制差减杂交文库的 EST 序列信息, 克隆得到 1 个大豆的 *UspA* 基因, 命名为 *GmUsp1*。该基因属于 *UspA* 家族成员之一, 并且该类基因被发现普遍存在于细菌和植物中。进化树结果显示 *GmUsp1* 与蚕豆 *VfENOD18* 和紫云英 *AsD243d* 有较高的相似性, 分析预测该基因的蛋白二级结构与 MJ_0577 相似, 据此推断该基因为 *UspA* 家族 ATP 结合蛋白成员之一。

在细菌和植物中, 只有少数该类基因蛋白被克隆和分离^[14-17], 如结瘤素蛋白蚕豆 *VfENOD18*^[14] 和紫云英 *AsD243d*^[15] 等。关于该类基因的功能研究还较少, 但是已知其表达可能受多种条件诱导。如从大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中克隆的 *UspA* 在生长停滞条件下诱导表达^[18], 西红柿中 *ER6* (Ethylene Responsive) 基因在根和叶部位为组成型的表达模式, 而在乙烯对果实的后熟处理时, 被诱导上调表达^[19], 水稻的 *OsUsp1* 受涝害和乙烯诱导表达^[17], 陆地棉 *GUSP1* 和 *GUSP2* 在干旱条件下的叶片、茎、根中也具有很高的表达量^[16], 结瘤素蛋白 *VfENOD18*^[14] 在接种根瘤菌后在根瘤固氮区域Ⅲ特异表达。*UspA* 蛋白在细菌和植物中普遍存在, 其表达受多种逆境如干旱、涝害、结瘤等条件调控, 被认为与植物胁迫反应有关。

ABA 作为信号分子参与植物种子发芽休眠、气孔闭合、盐胁迫、干旱等多种代谢调控途径, NaCl 处理引起的盐胁迫分为渗透胁迫和离子毒害, PEG 产生的渗透胁迫能模拟植物的干旱胁迫反应^[20]。该

研究利用上述 3 种胁迫处理, 研究 *GmUsp1* 基因的表达模式, 发现在耐盐品种文丰 7 号中, *GmUsp1* 在胁迫处理后持续上调表达, 而在盐敏感品种 Union 中则没有表现出这种规律性。有研究表明, 水稻 *OsUsp1* 在乙烯利的处理下被瞬时上调表达, 推测 *OsUsp1* 可能作为一个分子开关调节水稻在涝害胁迫下的适应性^[17]。*GmUsp1* 在 2 个品种中的表达模式显示其可能参与了耐逆性的调控过程, 以应对胁迫威胁。而在 2 个品种中, *GmUsp1* 对胁迫响应的快慢和持续时间存在差异, 推测其表达可能还受到上游基因的调控, 这些上游基因可能通过对胁迫产生应答反应, 进而调控 *GmUsp1* 的表达, 使植物产生对逆境的抗性。

参考文献

- [1] Nystrom T, Neidhardt F C. Expression and role of the universal stress protein, *UspA*, of *Escherichia coli* during growth arrest[J]. Molecular Microbiology, 1994, 11: 537-544.
- [2] Nystrom T, Neidhardt F C. Isolation and properties of a mutant of *Escherichia coli* with an insertional inactivation of the *UspA* gene, which encodes a universal stress protein[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175: 3949-3956.
- [3] Liu W T, Karavolos M H, Bulmer D M, et al. Role of the universal stress protein *UspA* of *Salmonella* in growth arrest, stress and virulence[J]. Microbial Pathogenesis, 2007, 42: 2-10.
- [4] Freestone P, Nystrom T, Trinei M, et al. The universal stress protein, *UspA*, of *Escherichia coli* is phosphorylated in response to stress[J]. Journal of Molecular Biology, 1997, 274: 318-324.
- [5] Zarembinski T I, Hung L W, Mueller-Dieckmann H J, et al. Structure-based assignment of the biochemical function of a hypothetical protein: a test case of structural genomics[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95: 15189-15193.
- [6] Sousa M C, McKay D B. Structure of the universal stress protein from *Haemophilus influenzae*[J]. Structure, 2001, 9: 1135-1141.
- [7] David K, Joshua B, Douglas W S, et al. *Arabidopsis* proteins contain

- ning similarity to the universal stress protein domain of bacteria [J]. *Plant Physiology*, 2003, 131: 1209-1219.
- [8] Wang W Q, Li L, Huang S, et al. A secondary suppression subtractive hybridization method for isolation and identification of some salt-induced genes in soybean (*Glycine max* L. Merr.) [J]. *Australian Journal of Crop Science*, 2012, 6: 46-55.
- [9] 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.)
- [10] 常汝镇, 陈一舞, 邵桂花, 等. 盐对大豆农艺性状及籽粒品质的影响[J]. *大豆科学*, 1994, 13(2): 101-105. (Chang R Z, Chen Y W, Shao G H, et al. Effect of salt on agricultural characters and chemical quality of seed in soybeans[J]. *Soybean Science*, 1994, 13(2): 101-105.)
- [11] 郭蓓, 邱丽娟, 邵桂花, 等. 大豆耐盐基因的 PCR 标记[J]. *中国农业科学*, 2000, 33(1): 10-16. (Guo B, Qiu L J, Shao G H, et al. Tagging salt tolerant gene using PCR markers in soybean[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2000, 33(1): 10-16)
- [12] Jian B, Liu B, Bi Y, et al. Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR[J]. *BioMed Central: Molecular Biology*, 2008, 9: 59.
- [13] Kenneth J L, Thomas D S. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [14] Hohnjec N, Kuster H, Albus U, et al. The broad bean nodulin VtENOD18 is a member of a novel family of plant proteins with homologies to the bacterial MJ0577 superfamily[J]. *Molecular and General Genetics*, 2000, 264: 241-250.
- [15] Chou M X, Wei X Y, Chen D S, et al. A novel nodule-enhanced gene encoding a putative universal stress protein from *Astragalus sinicus*[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2007, 164: 764-772.
- [16] Maqbool A, Zahur M, Husnain T, et al. *GUSP1* and *GUSP2*, two drought-responsive genes in *Gossypium arboreum* have homology to universal stress proteins[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2009, 27: 109-114.
- [17] Sauter M, Rzewuski G, Marwedel T, et al. The novel ethylene-regulated gene *OsUsp1* from rice encodes a member of a plant protein family related to prokaryotic universal stress proteins[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53: 2325-2331.
- [18] Nystrom T, Neidhardt F C. Effects of overproducing the universal stress protein UspA, in *Escherichia coli* K-12[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178: 927-930.
- [19] Zegzouti H, Jones B, Frasse P, et al. Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene-responsive and ripening-related genes isolated by differential display[J]. *Plant Journal*, 1999, 18: 589-600.
- [20] Zhu J K. Plant salt tolerance[J]. *Trends in Plant Science*, 2001, 6(2): 66-71.

(上接第 545 页)

- [7] Jansen R C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci [J]. *Genetics*, 1993, 135: 205-211.
- [8] Rodolphe F, Lefort M. A multi-marker model for detecting chromosomal segments displaying QTL activity[J]. *Genetics*, 1993, 134: 1277-1288.
- [9] Kao C H, Zeng Z B, Teasdale R D. Multiple interval mapping for quantitative trait loci[J]. *Genetics*, 1999, 152: 1203-1216
- [10] Wang C G, Chen S, Yu S B. Functional markers developed from multiple loci in GS3 for fine marker-assisted selection of grain length in rice[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, 122: 905-913.
- [11] Tian X X, Qian Q, Liu Q Q, et al. Allelic diversities in rice starch biosynthesis lead to a diverse array of rice eating and cooking qualities[J]. *PNAS*, 2009, 51: 21760 - 21765.
- [12] 蒋洪蔚, 李灿东, 刘春燕, 等. 大豆导入系群体芽期耐低温位点的基因型分析及 QTL 定位[J]. *作物学报*, 2009, 35(7): 1268-1273. (Jiang H W, Li C D, Liu C Y, et al. Genotype analysis and QTL mapping for tolerance to low temperature in germination by introgression lines in soybean[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2009, 35(7): 1268-1273).
- [13] 刘冠明, 李文涛, 曾瑞珍, 等. 水稻单片段代换系代换片段的 QTL 鉴定[J]. *遗传学报*, 2004, 31(12): 1395-1400. (Liu G M, Li W T, Zeng R Z, et al. Identification of QTLs on substituted segments in single segment substitution lines of rice[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(12): 1395-1400).
- [14] Song Q J, Marek L F, Shoemaker R C, et al. A new integrated genetic linkage map of the soybean[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109(1): 122-128.
- [15] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8: 4321-4325.
- [16] Ji Y T, Qu C Q, Cao B Y. An optimal method of DNA silver staining in polyacrylamide gels [J]. *Electrophoresis*, 2007, 28: 1173-1175.