

# 大豆 *GmABCG40* 基因的功能预测及表达分析

李悦<sup>1</sup>, 张宇航<sup>1</sup>, 李冬梅<sup>1</sup>, 王涛<sup>1</sup>, 陈薇<sup>1</sup>, 王珣<sup>2</sup>, 李永光<sup>1</sup>, 李文滨<sup>1</sup>

(1. 东北农业大学 农学院/大豆生物学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院 生物技术研究, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:** 通过在大豆基因组数据库中检索拟南芥 *AtABCG40* 在大豆中的同源基因, 获得了 *GmABCG40* 基因序列。通过对 *GmABCG40* 基因编码的氨基酸序列及启动子序列进行生物信息学分析, 结果表明: *GmABCG40* 基因 CDS 序列全长 4 284 bp, 编码 1 427 个氨基酸。 *GmABCG40* 编码的蛋白为疏水性蛋白, 具有多个 N-糖基化位点、激酶磷酸化位点、N-豆蔻酰化位点、2 个 ATP/GTP 结合位点基序 A 和 1 个速激肽家族信号。结构域分析表明 *GmABCG40* 含有 2 个核苷酸结合域与 2 个跨膜结构域, 形成 NBD1-TMD1-NBD2-TMD2 结构, 属于 ABCG 亚家族的成员。 *GmABCG40* 预测的启动子区域含有与激素、胁迫、光应答、胚乳表达和转录因子结合相关的顺式作用元件。系统进化分析表明 *GmABCG40* 与菜豆、红豆、木豆、百脉根等豆科植物亲缘关系较近。组织特异性表达分析结果显示 *GmDABCG40* 在叶片中表达量最低, 在根中表达量最高, 推测其可能参与根中 ABA 的转运过程。

**关键词:** 大豆; ABCG 转运蛋白; 表达分析; 功能; 生物信息学

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2017.04.0502

## Functional Prediction and Expression Analysis of *GmABCG40*

LI Yue<sup>1</sup>, ZHANG Yu-hang<sup>1</sup>, LI Dong-mei<sup>1</sup>, WANG Tao<sup>1</sup>, CHEN Wei<sup>1</sup>, WANG Xun<sup>2</sup>, LI Yong-guang<sup>1</sup>, LI Wen-bin<sup>1</sup>

(Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education/Key Laboratory of Soybean Biology and Genetics Breeding of Chinese Agriculture Ministry/College of Agriculture of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** *GmABCG40* gene sequence was obtained by searching the homologous gene of *AtABCG40* in the soybean genome database. Bioinformatics analysis of amino acid sequence encoded by *GmABCG40* and promoter sequence showed that the full-length CDS sequence of *GmABCG40* was 4 284 bp, encoding a 1 427 amino acids protein. *GmABCG40* was a hydrophobic protein, possessed multiple N-glycosylation sites, kinase phosphorylation sites, N-myristoylation sites, two ATP/AGP binding site motif A and one tachykinin family signal. Structure domains analysis indicated that *GmABCG40* contained two nucleotide binding domains and two trans membrane domains, which constituted NBD1-TMD1-NBD2-TMD2 structure and belonging to the ABCG subfamily. Cis-elements associated with hormones, stresses, light responses, endosperm expression and transcription factors binding were existed in the predicted promoter region. Phylogenetic analysis results suggested that *GmABCG40* had the highest genetic relationship with leguminous plants such as *Phaseolus vulgaris*, *Vigna angularis*, *Cajanus cajan* and *Lotus japonicus*. Results of tissue specific expression analysis revealed that expression level of *GmABCG40* was lowest in leaves, however, highest in roots, it was speculated to participate in the ABA transport process in roots.

**Keywords:** Soybean; ABCG transporters; Expression analysis; Function; Bioinformatics

ABCG 转运蛋白是广泛存在于植物体内的 ABC 蛋白亚家族成员, ABCG 亚家族由半分子转运蛋白和全分子转运蛋白组成, 其作用底物类型分布广泛, 包括木质素单体、金属离子、植物激素、抗生素、脂质及次生代谢产物等<sup>[1]</sup>, 植物体内 ABCG 转运蛋白参与植物生长、发育、离子通道调控及应对生物与非生物胁迫等重要的生物学过程<sup>[2-4]</sup>。

随着大豆全基因组测序的完成, 越来越多的大豆 ABCG 转运蛋白被发现和研究。但是由于 ABCG 转运蛋白的功能受底物特异性的限制, 导致 ABCG 转运蛋白家族不同成员间的功能表现出很大的差异<sup>[5-8]</sup>。本研究通过在大豆基因组数据库中检索得到与拟南芥 *AtABCG40* 高度同源的基因, 将其命名

为 *GmABCG40*, 通过对 *GmABCG40* 基因及其编码氨基酸的理化性质与结构域进行分析, 并根据 *GmABCG40* 启动子区域存在的顺式作用元件以及该基因在不同组织中的表达水平对其功能进行预测, 为 *GmABCG40* 基因功能的深入研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选用大豆品种垦丰 16 作为试验材料; RNA 提取试剂 Trizol、cDNA 第一链合成试剂盒、SYBR Green 荧光定量试剂盒购自 Invitrogen 公司; 引物合成由上海生工生物公司完成。

收稿日期: 2016-03-28

基金项目: 黑龙江普通本科高等学校青年创新人才培养计划 (UNPYSCT-2016005); 抗逆转基因大豆新品培育 (2016ZX0804002)。

第一作者简介: 李悦 (1992-), 女, 硕士, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: 364544346@qq.com。

通讯作者: 李文滨 (1958-), 男, 教授, 博导, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: wenbinli@neau.edu.cn。

1.2 方法

1.2.1 大豆 *GmABCG40* 基因的生物信息学分析

采用 ProtParam 在线网站 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测 *GmABCG40* 氨基酸的理化性质<sup>[9]</sup>。采用 TMPred Server 软件([http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED\\_form.html](http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html)) 对蛋白的跨膜螺旋区进行预测。采用 PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/>) 数据库对 *GmABCG40* 蛋白的二级结构进行预测。NCBI 在线预测 *GmABCG40* 蛋白质的保守结构域, SWISS MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org/>) 在线预测 *GmABCG40* 蛋白质的三级结构。PlantCare 在线网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 预测 *GmABCG40* 启动子区域顺式作用元件。SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测 *GmABCG40* 蛋白可能存在的信号肽。利用 NCBI 数据库 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行 *GmABCG40* 同源基因的检索, ClustalX2 软件进行氨基酸序列的比对, MEGA 7.0 构建系统进化树。

1.2.2 大豆 *GmABCG40* 基因的组织特异性分析

对不同生长时期的大豆组织进行取材,液氮研磨后提取 RNA, 反转录合成 cDNA。根据基因 *GmABCG40* 的编码序列设计定量 PCR 引物, *GmABCG40* *DL-F*: GTATTGGTTAGGCTTAGG; *GmABCG40* *DL-R*: TTCATCTTCAGTTATTGTTG; 使用大豆 *GmTUB3* 基因作为内参, *GmTUB3-F*: CAGCAGCCAAT-

AGAGAATTTCGG; *GmTUB3-R*: TCACTGGGTTGTGAT-TACCAAAC。

以 cDNA 第一链为模板进行荧光定量 PCR 分析。反应体系包括 1 μL cDNA, 10 μL 2 × SYBR Mix, 1 μL *GmABCG40* 基因特异性引物, 8 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR 反应按以下条件进行: 95℃, 15 min 预变性; 95℃, 20 s 变性, 60℃, 20 s 退火, 72℃, 30 s 延伸, 38 个循环。采用 Bio-Rad CFX Manager 软件分析数据, 统计 *GmABCG40* 基因在不同组织中的转录本丰度。

2 结果与分析

2.1 *GmABCG40* 基因启动子序列分析

在大豆基因组数据库中选取 *GmABCG40* 基因编码区上游1 500 bp 的序列进行启动子序列分析, 利用 PlantCARE 网站在线预测启动子区域所包含的顺式作用元件, 结果表明: *GmABCG40* 基因预测的启动子区域含有多个与激素相关的顺式作用元件, 包括脱落酸应答元件、茉莉酸应答调控元件、水杨酸应答元件、赤霉素应答元件; 参与逆境胁迫诱导相关的顺式作用元件, 包括低温应答元件、高温胁迫应答元件、防御与胁迫应答元件、厌氧诱导调控元件、真菌诱导子应答元件、诱导子应答元件和创伤应答元件; 以及光应答与胚乳表达相关的顺式作用元件(表 1)。预测结果表明: *GmABCG40* 基因可能响应多种激素的诱导, 在大豆抵御逆境胁迫与生长发育过程中发挥重要作用。

表 1 *GmABCG40* 基因启动子顺式调控元件的位置与功能预测

Table 1 Location and putative function of cis-elements in *GmABCG40* promoter

基序 Motif	正(+)反(-)链 Sense(+) antisense(-) strand	位置 Location/bp	序列 Sequence	预测功能 Putative function
ABRE	+	-1204	TACGTG	脱落酸应答元件
ARE	- +	-596, -1242	TGGTTT	厌氧诱导调控元件
Box-W1	-	-1014	TTGACC	真菌诱导子应答元件
CGTCA-motif	-	-527	CGTCA	MeJA 应答调控元件
EIRE	+	-1156	TTCGACC	诱导子应答元件
G-Box	+ -	-572, -445	CACGAC	光应答调控元件
GARE-motif	-	-765	AAACAGA	赤霉素应答元件
HSE	-	-981	AAAAAATTTTC	高温胁迫应答元件
LTR	-	-676	CCGAAA	低温应答元件
Skn-1_motif	- +	-153, -471	GTCAT	胚乳表达调控元件
TC-rich repeats	-	-427	GTTTTCTTAC	防御与胁迫应答元件
TCA-element	-	-167, -1234	CAGAAAAGGA	水杨酸应答元件
TGACG-motif	+	-527	TGACG	MeJA 应答调控元件
WUN-motif	- +	-1136, -1139	AAATTTTCCT	创伤应答元件

2.2 GmABCG40 氨基酸序列比对及结构域分析

对 *GmABCG40* 编码的氨基酸序列进行结构域分析,结果表明:*GmABCG40* 属于 ABCG 亚家族的成员,*GmABCG40* 包含 2 个核苷酸结合域(NBD)与 2 个跨膜结构域(TMD),形成 NBD1-TMD1-NBD2-TMD2 结构(图 1),*GmABCG40* 与拟南芥、百脉根、花生 ABCG 蛋白高度同源,同源性分别为 71.78%、83.54% 和 81.81%;氨基酸序列比对结果显示 *GmABCG40* 蛋白的 NBD 结构域中包含高度保守的氨基酸基序 N-Walker A [GPP(GS)(SCA)GK

(TS)]、N-ABC signature [(IV)SGG(QE)(KR)(KR)R(VL)TT(GA)]、N-Walker B [(ATV)(LF)(FL)MDE]、C-Walker A [G(VIS)SG(AR)GKT]、C-ABC signature [(LV)(ST)(TIA)EQQRK(LM)T(IV)A] 和 C-Walker B [I(ILV)F(ML)DE](图 2),NBD 结构域的作用是参与结合水解 ATP,为跨膜运输提供能量;*GmABCG40* 蛋白 N 段与 C 端跨膜结构域分别由 7 个和 6 个  $\alpha$  螺旋构成,参与形成跨膜通道,并且能够识别底物的特异性。

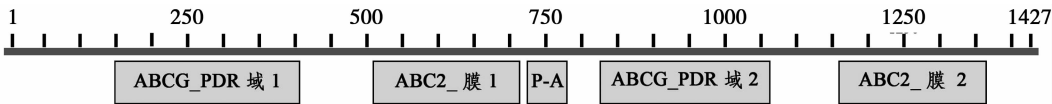
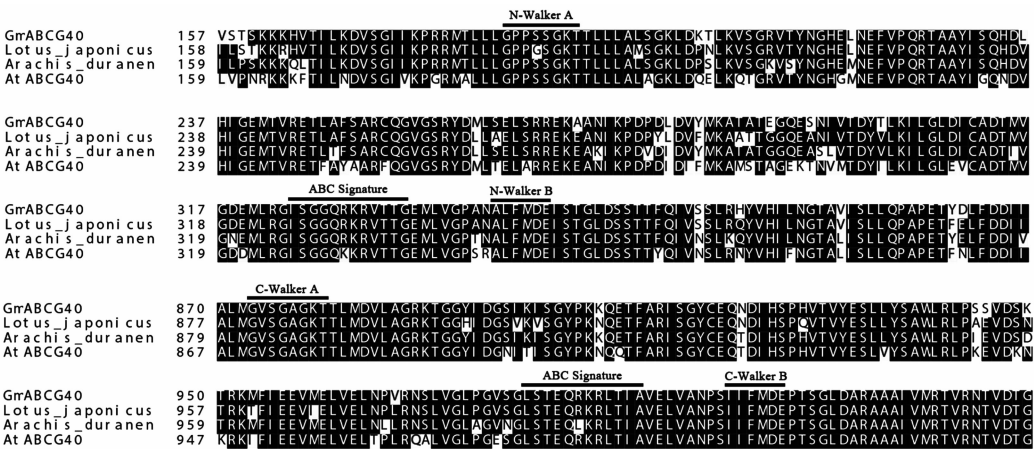


图 1 *GmABCG40* 蛋白的结构域分析  
Fig. 1 Domain analysis of *GmABCG40*



基因序列号分别为:*GmABCG40* (XP\_003546230.1); *Lotus japonicus* (BAP90384.1); *Arachis duranensis* (XP\_015938120.1); *AtABCG40* (NP\_173005.1)。  
Genbank accession numbers: *GmABCG40* (XP\_003546230.1); *Lotus japonicus* (BAP90384.1); *Arachis duranensis* (XP\_015938120.1); *AtABCG40* (NP\_173005.1)。

图 2 *GmABCG40* 蛋白与其它 ABCG 蛋白的氨基酸比对

Fig. 2 Alignment of amino acid sequences of *GmABCG40* with other ABCG proteins

2.3 GmABCG40 氨基酸的理化性质分析

ProtParam 网站分析结果显示 *GmABCG40* 编码的氨基酸理论等电点为 6.51,预测分子质量为 160.786 kD。其中氨基酸含量最高的为亮氨酸(Leu),占 10.2%;半胱氨酸(Cys)含量最少,占 0.5%;负电荷总数为 147;正电荷总数为 140;*GmABCG40* 具有 13 个跨膜螺旋,氨基酸残基亲疏水性总和 GRAVY(grand average of hydropathicity)为 0.049,编码的蛋白为疏水性蛋白(图 3)。WoLFPSORT 的亚细胞定位预测结果显示 *GmABCG40* 定位

在质膜上,不含有信号肽和核定位信号,为多通道膜蛋白。分子式为 C(7356)H(11343)N(1883)O(2064)S(50),原子总数为 22 696。理论推导半衰期为 30 h,不稳定系数为 37.81,属于稳定蛋白。

2.4 GmABCG40 氨基酸的高级结构预测

蛋白质二级结构预测结果显示 *GmABCG40* 的二级结构中  $\alpha$  螺旋结构占 42.26%, $\beta$  转角结构占 7.71%,不规则卷曲结构占 28.31%,延伸链结构占 21.72%(图 4)。在 *GmABCG40* 中存在多种可能的翻译后修饰位点,分别是 6 个 N-糖基化位点、3 个

cAMP 与 cGMP 依赖的蛋白激酶磷酸化位点、21 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、19 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、3 个酪氨酸激酶磷酸化位点、17 个 N-豆蔻酰化位点、3 个酰胺化位点、2 个 ATP/GTP 结合位点基

序 A 与 1 个速激肽家族信号。*GmABCG40* 蛋白三维结构分析结果显示其内部存在由多个  $\alpha$  螺旋形成的较大的疏水结构域,可能通过与底物之间形成疏水效应或静电吸引来参与底物的结合(图 5)。

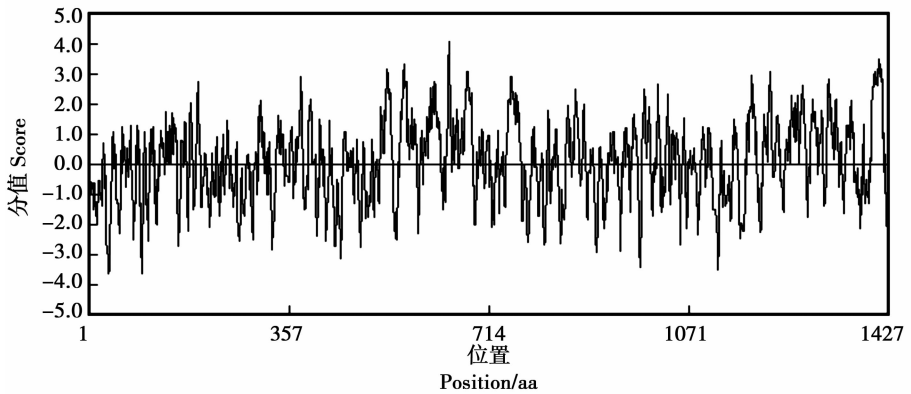


图 3 *GmABCG40* 氨基酸的亲疏水性分析

Fig. 3 Hydrophilic and hydrophobic analysis of *GmABCG40* protein

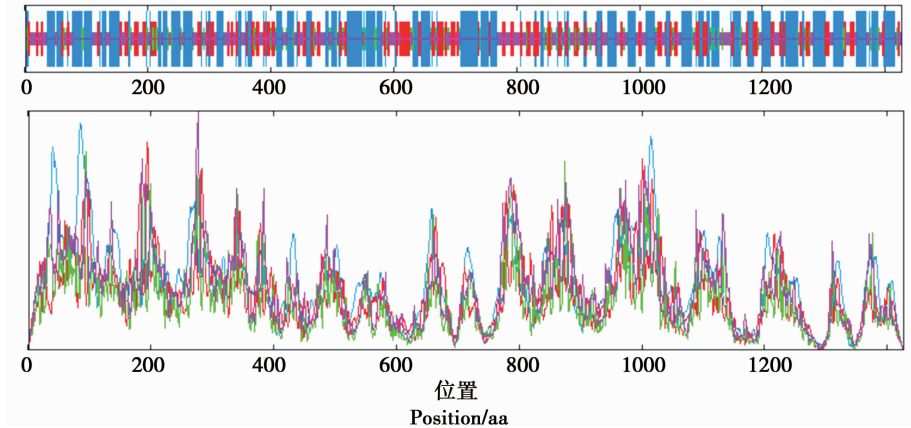


图 4 *GmABCG40* 编码蛋白的二级结构

Fig. 4 Secondary structure of the protein encoded by *GmABCG40*

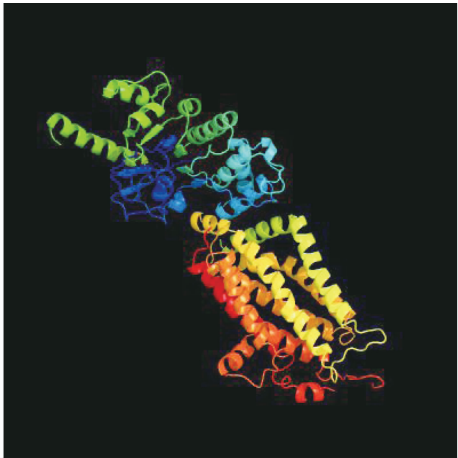


图 5 大豆 *GmABCG40* 蛋白的三维结构

Fig. 5 3-D structure of *GmABCG40* protein in soybean

2.5 大豆 *GmABCG40* 蛋白的系统进化树分析

本研究通过将 *GmABCG40* 蛋白序列与 NCBI 中相似度较高的其它物种 ABCG 蛋白进行同源性比

对,并构建系统发生树(图 6)。结果表明:*GmABCG40* 与菜豆、红豆、木豆、百脉根等豆科植物亲缘关系较近,可以看出该类蛋白在豆科植物进化过程中比较保守。

2.6 *GmABCG40* 基因的表达分析

分别对大豆的根、叶片、花和荚进行取材,利用荧光定量 PCR 的方法分析了 *GmABCG40* 基因在大豆不同组织中的表达水平,结果表明:*GmABCG40* 在根中表达水平最高,其次是荚和花,在叶片中检测不到表达(图 7)。外源喷施 ABA 处理后的不同时间对大豆根进行取材,荧光定量 PCR 分析 *GmABCG40* 在 ABA 处理后不同时间的表达规律,结果表明:*GmABCG40* 在 ABA 处理后被迅速诱导表达,在 3 h 表达水平最高,随后逐渐降低,以上结果可以说明 *GmABCG40* 可能作为 ABA 转运蛋白参与根中 ABA 的运输过程(图 8)。

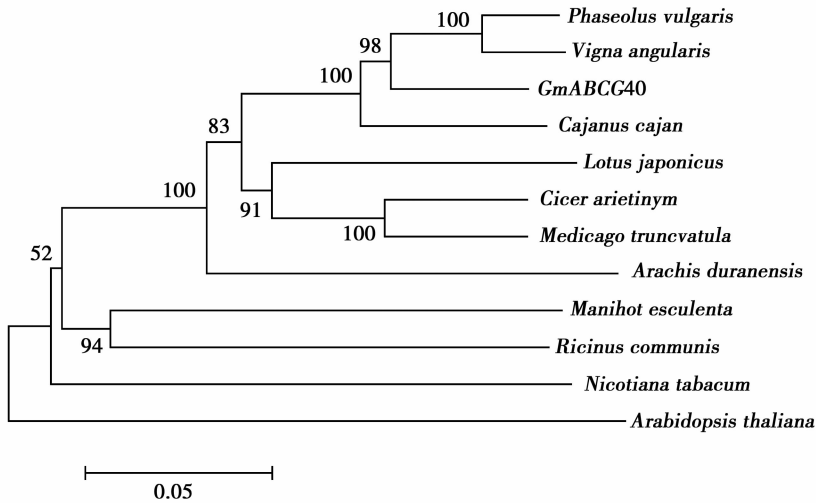


图 6 GmABCG40 的系统进化树分析  
Fig. 6 The phylogenetic tree of GmABCG40

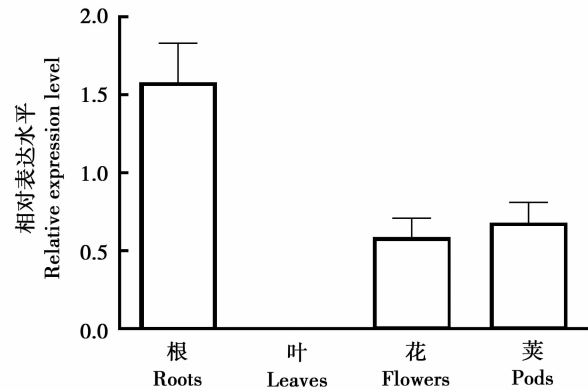


图 7 GmABCG40 的组织特异性表达分析  
Fig. 7 Tissue-specific expression analysis of GmABCG40

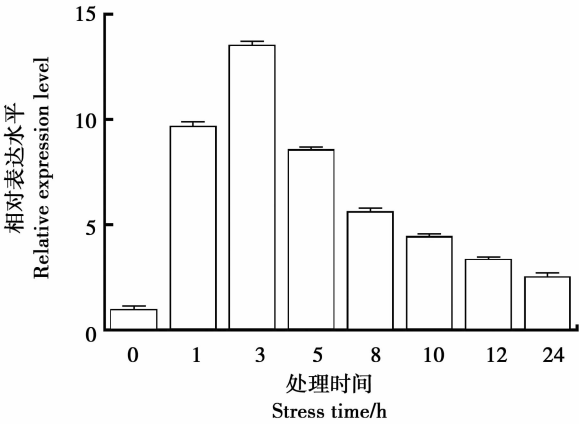


图 8 ABA 处理下的 GmABCG40 基因表达规律分析  
Fig. 8 Analysis of expression patterns of GmABCG40 under ABA treatment

3 讨论

ABCG 转运蛋白在不同植物中都包含有众多的成员。近年来,越来越多的 ABCG 转运蛋白基因被发现和鉴定,但是由于不同物种中代谢途径不尽相同,且 ABCG 转运蛋白数量上差异显著,可能造成 ABCG 转运蛋白在底物和功能上的千差万别<sup>[10-14]</sup>。

脱落酸(ABA)是植物体内普遍存在的参与植物生长发育与胁迫应答的重要激素之一,目前关于 ABA 胞内受体的研究已被广泛报道,但是关于 ABA 转运机制的研究尚未被深入解析<sup>[15-16]</sup>。最近的研究发现拟南芥 ABCG 亚家族成员 *AtABCG40* 参与 ABA 在质膜上的运输过程,*ABCG40* 基因突变后减少了 ABA 的摄取,降低了胞内 ABA 水平,气孔关闭速度变慢,降低了对于干旱胁迫的耐受性<sup>[17]</sup>。

本研究通过检索得到拟南芥 *AtABCG40* 在大豆中的同源基因 *GmABCG40*,生物信息学分析发现 *GmABCG40* 具有 ABCG 亚家族保守结构域和与其它已知 ABCG 亚家族蛋白类似的高级结构<sup>[18]</sup>。*GmABCG40* 在大豆根中表达水平最高,与拟南芥 *AtABCG40* 的表达模式类似,因此推测 *GmAGCG40* 可能参与大豆 ABA 的转运过程。此外,*GmABCG40* 预测启动子区域含有多个与激素、逆境胁迫、光反应、胚乳表达和转录因子结合相关等一系列顺式作用元件,预示 *GmABCG40* 可能在植物抵御逆境胁迫与大豆生长发育等重要的生物学过程中发挥重要作用。但是 *GmABCG40* 蛋白的具体功能及其作用的分子机制还有待于进一步研究。

参考文献

[1] 张婧,陈梦词,马清,等. 植物 ABCG 转运蛋白研究进展[J]. 草业学报, 2015, 24(7):180-188. (Zhang J, Chen M C, Ma Q, et al. Review of advances in the study of plant ABCG transporters[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2015, 24(7):180-188. )

[2] 马云芳,梁国鲁,裴得胜,等. ABC 转运蛋白研究的新进展[J]. 生物技术通报, 2008(5):35-41. (Ma Y F, Liang G L, Pei D S. Advancement of studies on ABC transporter proteins[J]. Biotechnology Bulletin, 2008(5):35-41. )

[3] 朱璐,许杰,张大兵. 拟南芥 ABC 转运类蛋白家族的分子进化、表达模式和蛋白功能网络预测分析[J]. 植物生理学报, 2012(12):1151-1166. (Zhu L, Xu J, Zhang D B. Molecular evolution, expression and functional network prediction analysis of ABC transporter gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiology Journal, 2012(12):1151-1166. )

[4] 王利国,李玲. 拟南芥中 ABC 转运蛋白的研究进展[J]. 生命科学研究, 2002(S1):13-17. (Wang L G, Li L. Research advances of ABC transporters in *Arabidopsis*[J]. Life Science Research, 2002(S1):13-17. )

[5] 金宏滨,刘东辉,左开井,等. 植物 ABC 转运蛋白与次生代谢产物的跨膜转运[J]. 中国农业科技导报, 2007, 9(3):32-37. (Jin H B, Liu D H, Zuo K J, et al. Plant ABC transporters and their roles in the transmembrane transport of secondary metabolites[J]. Journal of Agricultural Science & Technology, 2007, 9(3):32-37. )

[6] 邵若玄,沈忆珂,周文彬,等. 植物 ATP 结合盒(ABC)转运蛋白研究进展[J]. 浙江农林大学学报, 2013, 30(5):761-768. (Shao R X, Shen Y K, Zhou W B, et al. Recent advances for plant ATP-binding cassette transporters[J]. Journal of Zhejiang A & F University, 2013,30(5):761-768. )

[7] 谢小芳,陈志伟,吴为人. 植物 PDR 蛋白家族的进化分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2012(6):617-623. (Xie X F, Chen Z W, Wu W R. Phylogenetic analysis of the PDR protein family in plant[J]. Genomics & Applied Biology, 2012(6):617-623. )

[8] 谢小雷,张儒,谭小宁,等. 植物 PDR 蛋白转运机制及功能的研究进展[J]. 生命科学, 2011(10):945-950. (Xie X L, Zhang R, Tan X N, et al. The progress of research on transfer mechanism and function of the plant PDR[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2011(10):945-950. )

[9] 赵琳,罗秋兰,高阳,等. 大豆基因组 *GmRAV* 同源基因的生物信息学分析[J]. 中国油料作物学报, 2011, 33(6):550-554. (Zhao L, Luo Q L, Gao Y, et al. Bioinformatics analysis of *GmRAV* homologs in soybean genome[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2011, 33(6):550-554. )

[10] Piper P, Mahé Y, Thompson S, et al. The pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. [J]. EMBO Journal, 1998, 17(15):4257-4265.

[11] Sasabe M, Toyoda K, Shiraiishi T, et al. cDNA cloning and characterization of tobacco ABC transporter; NtPDR1 is a novel elicitor-responsive gene [J]. FEBS Letters, 2002, 518(1-3):164-168.

[12] Stukkens Y, Bultreys A, Grec S, et al. NpPDR1, a pleiotropic drug resistance-type ATP-binding cassette transporter from *Nicotiana glauca*, plays a major role in plant pathogen defense [J]. Plant Physiology, 2005, 139(1):341-352.

[13] Yazaki K. ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites [J]. FEBS Letters, 2006, 580(4):1183-1191.

[14] Jiang F, Hartung W. Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): The factors regulating the intensity of the ABA signal [J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(1):37-43.

[15] Park S Y, Fung P, Nishimura N, et al. Absciscic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins[J]. Science, 2009, 324(5930):1068-1071.

[16] Verrier P J, Bird D, Burla B, et al. Plant ABC proteins-a unified nomenclature and updated inventory[J]. Trends in Plant Science, 2008, 13(4):151-159.

[17] Kang J, Hwang J U, Lee M, et al. PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(5):2355-2360.

[18] Campbell E J, Manners J M. Pathogen-responsive expression of a putative ATP-binding cassette transporter gene conferring resistance to the diterpenoid sclareol is regulated by multiple defense signaling pathways in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2003, 133(3):1272-1284.