

大豆 UV-B 光受体 *GmUVR8* 基因的生物信息学分析

罗秋兰^{1,2,3}, 王潮岗^{1,3}, 胡章立^{1,3}

(1. 深圳大学 生命与海洋科学学院/深圳市海洋生物资源与生态环境重点实验室, 广东 深圳 518060; 2. 深圳大学 光电工程学院/光电子器件与系统(教育部/广东省)重点实验室, 广东 深圳 518060; 3. 深圳大学 龙华生物产业创新研究院/深圳市海洋藻类生物工程技术研究中心, 广东 深圳 518060)

摘 要:UV-B 影响大豆的生长发育,降低大豆的产量,但能够促进大豆类黄酮化合物合成,提高植物对病虫害的抵抗力。本研究利用生物信息学方法系统分析了大豆 UV-B 光受体 *UVR8* 基因及其编码蛋白质的特性。结果显示,大豆中存在 4 个 *GmUVR8* 蛋白质,均为亲水性蛋白质,位于细胞核中,尽管它们在大小上存在差异,但是都包含多个保守的 RCC1 结构域,形成了完整或不完整的七叶 β -折叠的结构,与拟南芥的折叠方式极为相似。大豆基因组中这 4 个 *GmUVR8* 编码基因长度不一,分别位于 4 条染色体上,含有相同的外显子数,具有相同的编码方式。同源序列比对显示 *GmUVR8c* 与拟南芥最为相似,而聚类分析显示 *GmUVR8* 具有一定特异性。本研究为后期系统分析大豆 UV-B 光形态建成分子机制和 *GmUVR8* 基因功能提供了理论依据。

关键词:大豆;紫外光 B;UVR8 光受体;结构域;进化树分析

中图分类号:S565.1;Q751 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2018.02.0192

Bioinformatics Analysis on UV-B Photoreceptor Gene of *GmUVR8* in Soybean

LUO Qiu-lan^{1,2,3}, WANG Chao-gang^{1,3}, HU Zhang-li^{1,3}

(1. Shenzhen Key Laboratory of Marine Bioresource & Eco-environmental Sciences/College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China; 2. Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province/College of Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China; 3. Shenzhen Engineering Laboratory for Marine Algal Biotechnology/Longhua Innovation Institute for Biotechnology, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract: UV-B affected the growth and development of soybean, and caused a decline of yield. However, UV-B could promote the synthesis of flavonoids in soybean and enhance its resistance to insect pests. In this study, the characteristics of soybean UV-B photoreceptor *GmUVR8* genes and their encoded proteins were systematically analyzed by bioinformatics methods. The results showed that there were four *GmUVR8* proteins with different sizes in soybean. *GmUVR8* which located in nucleus were hydrophilic proteins. All *GmUVR8* proteins had several RCC1 domains, formed a complete or incomplete seven-bladed β -propeller which similar with *AtUVR8* protein. Four *GmUVR8* genes with different lengths and genome locations had the same exons numbers and coding modes. Homologous sequence alignment showed that *GmUVR8c* was most homologues with *AtUVR8*. But the cluster analysis showed *GmUVR8* had its specificity. This study provides a theoretical basis for analysis of the molecular mechanisms of soybean UV-B morphogenesis and *GmUVR8* genes functions in future.

Keywords: Soybean; Ultraviolet-B; UVR8 photoreceptor; Domains; Phylogenetic tree analysis

大豆是重要的经济作物,同时又是典型的短日照作物,光决定了大豆的产量、品质和适应性^[1-2]。光照影响着大豆的光合作用效率、呼吸作用强度、开花诱导和向光性运动等^[3]。紫外光 UV-B 被认为是大豆生长的不利因素。太阳光中的紫外线根据波长可以分为短波紫外线 UV-C(<280 nm)、中波紫外线 UV-B(280~320 nm)和长波紫外线 UV-A(320~400 nm),其中 UV-B 光谱由于不能被臭氧层完全吸收,对地球上植物造成很多影响。低强度的 UV-B 可以作为一种信号被传递,调节植物的光形态建成;高强度的 UV-B,植物细胞无法吸收,往往造成植物细胞的永久性损伤,是种逆境因子^[3]。高强

度的 UV-B 破坏植物的光系统 II,阻断电子传递链,从而抑制光合作用效率,UV-B 对大豆的叶绿体也有同样的破坏作用,同时还可造成叶绿体 DNA 不可恢复的损伤^[4],极大程度地降低了大豆叶片的光合效率。同时,生产上 UV-B 不利于大豆生长和干物质累积,UV-B 辐照下大豆的叶片变小,种子粒数和质量都有所下降^[5-6]。不同品种的大豆对紫外光 UV-B 的敏感度也不相同,大豆对 UV-B 的耐受性存在着品种间差异^[7]。很多对 UV-B 敏感和不敏感的大豆品系也逐渐被培育出来,如 Essex 和 Keunol(UV-B 敏感株),Williams 和 Iksan10(UV-B 非敏感株)等。也有研究表明,低剂量的 UV-B 对大豆生产

收稿日期:2017-01-04
基金项目:国家自然科学基金(31700309, 31470389, 31470431);广东省自然科学基金(2014A030308017, 2017A030310255)。
第一作者简介:罗秋兰(1984-),女,博士,博士后,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:luoqiulan_79@szu.edu.cn。
通讯作者:胡章立(1964-),男,博士,教授,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:huzl@szu.edu.cn。

也有一定益处,如促进类黄酮化合物的合成^[8];提高大豆的抗虫能力,UV-B 可诱导大豆合成酚类化合物和胰蛋白酶抑制剂(TPI),对黎豆夜蛾幼虫产生致死效应^[9]等。

相对于植物中其它光谱吸收的光受体,UV-B 光受体的发现较晚。直到 2002 年,Kliebenstein 等在研究 UV-B 超敏感的拟南芥突变株 *uvr8-1* 时,才发现 UVR8 蛋白质是植物中的 UV-B 光受体^[10]。晶体结构分析显示 UVR8 蛋白质的典型特征是具有一个七面的 β 螺旋桨结构。UVR8 蛋白质里的带电氨基酸通过盐桥键形成同源二聚体。色氨酸(Trp)是已知的 UVR8 吸收 UV-B 的发色团,在维持二聚体的稳定结构中发挥着重要作用^[11]。在 UV-B 的辐照下,UVR8 二聚体解聚形成单体,但是这个生化过程具体是怎样发生的,迄今还不是十分清楚。解聚后的 UVR8 单体与 E3 泛素连接酶 COP1 (constitutively photomorphogenic 1) 结合^[12],复合物再与 SPA (suppressor of phyA-105) 蛋白结合,启动转录因子 HY5 (Long Hypocotyl 5)、HYH (HY5 Homolog) 等转录表达^[13],从而控制植物的 UV-B 光形态建成。在大豆中也发现了一个抗 UV-B 的数量性状基因座 (QTL),位于 19 号染色体的 *Satt495* 和 *Satt238* 之间^[14],但是还没有关于大豆 UV-B 受体 UVR8 遗传信息的详细报道。夏季 UV-B 辐照增强时,影响了大豆的开花、结荚,了解大豆的 UV-B 光受体 GmUVR8,降低它们的敏感性,有可能是提高大豆产量的有效途径。基于 UVR8 具有很高的保守性,本研究利用生物信息学的方法,对大豆的 UV-B 光受体 *GmUVR8* 基因进行了电子克隆,并进行了详细的分析,旨在为后期研究大豆的 UV-B 光受体 GmUVR8 的分子功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆(*Glycine max*)的基因组和蛋白质组序列 Wm82. a2. V1 版本从植物基因组学网站 JGI V12.0 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 中下载。以拟南芥 UV-B 光受体 AtUVR8 氨基酸序列 (GenBank: AAD43920. 1) 为种子序列,对大豆蛋白质组数据库进行同源搜索,选取 E 值为 0.0 的同源序列,去除冗余序列,获得大豆的 UV-B 光受体 GmUVR8 蛋白质序列,在基因组数据库中找到相应的编码基因序列。

1.2 方法

1.2.1 大豆 *GmUVR8* 基因的结构分析 *GmUVR8* 基因的染色体位置参考大豆基因组 Wm82. a2. V1

版本;基因结构图用 GSDS 2.0 软件绘制^[15]。

1.2.2 *GmUVR8* 蛋白质的特性分析 通过 ExPASy 平台 (<http://www.expasy.org/>) 对 *GmUVR8* 蛋白质的分子量大小、等电点和亲疏水性等特性进行分析。*GmUVR8* 蛋白质的结构域运用 PROSITE 软件 (<http://prosite.expasy.org/>) 进行预测。同时采用 WoLF PSORT 软件 (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 对 *GmUVR8* 蛋白质在细胞中定位进行预测。

1.2.3 *GmUVR8* 进化树分析 *GmUVR8* 蛋白质的同源序列,通过 BLASTp 在 NCBI 数据库进行同源性搜索获取。多序列比对利用 ClustalX 2.1 软件进行,通过 GeneDoc 2.7 序列编辑软件进行编辑。进化树通过 MEGA7.0 软件构建,采用邻接法则 (NJ) 的 P - 距离 (P-distance) 模型,Bootstrap method 值为 1 000。

1.2.4 *GmUVR8* 蛋白质的三维结构建模 大豆 UVR8 蛋白质二级结构用 SAS 软件 (<http://www.ebi.ac.uk/thorntonsrv/databases/sas>) 进行预测。蛋白质的三级结构用 Phyre2 软件 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/>) 进行分析,以拟南芥 AtUVR8 为模板。

2 结果与分析

2.1 *GmUVR8* 蛋白质特征

以拟南芥 AtUVR8 蛋白质序列为种子序列对大豆蛋白质组数据库,进行 BLASTp 检索,去除冗余序列后,共获得 4 个高度同源的 *GmUVR8* 蛋白质序列,分别命名为 *GmUVR8a*,*GmUVR8b*,*GmUVR8c* 和 *GmUVR8d* (表 1)。4 个 *GmUVR8* 蛋白质所含氨基酸数目在 338 ~ 482 范围间不等,氨基酸数目最多的为 *GmUVR8a* 共 482 个,分子量大小为 36.9 ~ 52.1;除了 *GmUVR8d* 等电点为 7.16,其它 3 个 *GmUVR8* 都极为相近且呈弱酸性。亲疏性分析显示 4 个 *GmUVR* 蛋白质均为亲水性蛋白质。*GmUVR8* 二级结构以 RCC1 结构域为主。亚细胞定位预测显示除了 *GmUVR8c*,其它 *GmUVR8* 蛋白质都定位在细胞核。此外,除了 *GmUVR8a* 含有 3 个跨膜结构,其它 *GmUVR8* 蛋白质不具有跨膜结构。

2.2 *GmUVR8* 基因特征

GmUVR8 编码基因序列从大豆(*Glycine max*)基因组 Wm82. a2. V1 中获取。具体的编码基因序列信息见表 2,4 个 *GmUVR8* 基因分别位于 4、5、6 和 8 号染色体,由不同长度的基因编码着高度同源的 4 个 *GmUVR8* 蛋白质,*GmUVR8c* 长度最长,为 10 220 bp,但是 ORF 长度是 *GmUVR8a* 最长,为 1 449 bp。

表 1 GmUVR8 蛋白质序列信息
Table 1 The sequence information of GmUVR8 proteins

蛋白质名称 Protein name	氨基酸数 No. of amino acids	分子量 Molecular weight/kD	等电点 pI	细胞定位预测 Prediction of subcellular localization	跨膜区数 No. of transmembrane regions
GmUVR8a	482	52.1	5.67	细胞核	3
GmUVR8b	437	39.2	5.69	细胞核	0
GmUVR8c	474	50.8	5.57	叶绿体	0
GmUVR8d	338	36.9	7.16	细胞核	0

表 2 GmUVR8 编码基因序列信息
Table 2 The information of GmUVR8 genes

基因名称 Gene name	基因序号 Gene ID	染色体定位 Genome locations	基因长度 Length of gene/bp	ORF 长度 Length of ORF/bp
GmUVR8a	Glyma.04G209600.1	第 4 号染色体	8239	1449
GmUVR8b	Glyma.05G194400.1	第 5 号染色体	6694	1314
GmUVR8c	Glyma.06G156400.1	第 6 号染色体	10220	1425
GmUVR8d	Glyma.08G002200.1	第 8 号染色体	6435	1017

采用 GSDS2.0 软件对 GmUVR8 基因结构进行分析,发现尽管 4 个 GmUVR8 基因位于不同的染色体,基因长度也不一致,但是外显子的数目是一致的,均为 12 个(图 1),显示 4 个 GmUVR8 基因可能具有相同的编码方式。

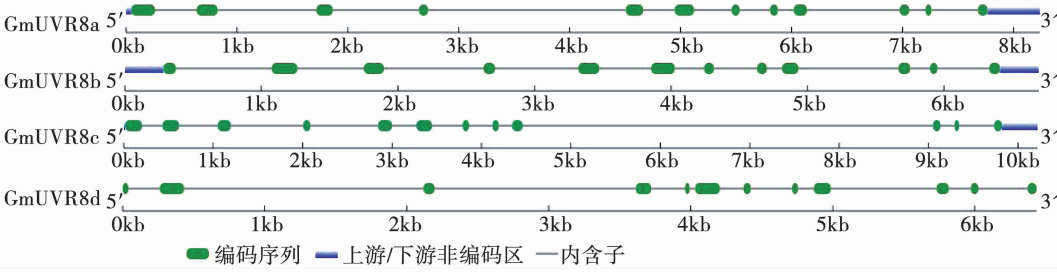


图 1 GmUVR8 基因结构图
Fig. 1 The structures of GmUVR8 genes

2.3 GmUVR8 蛋白质的同源性比较

采用 ClustalW 软件对 GmUVR8 蛋白质和拟南芥 AtUVR8 序列进行多序列比对,结果如图 2 所示, GmUVR8c 和拟南芥 AtUVR8 序列相似度最高, UVR8 蛋白质的 C 端保守性要强于 N 端。

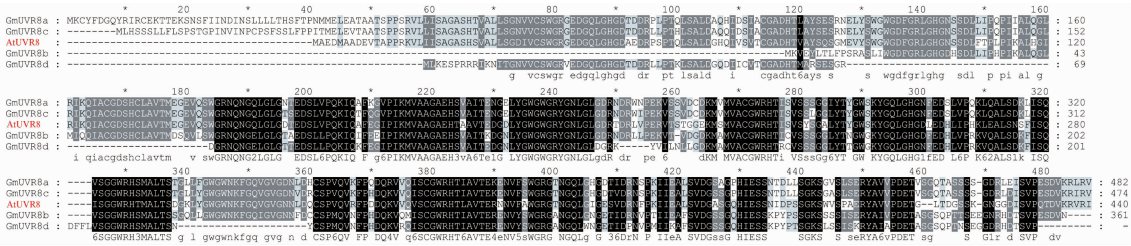


图 2 GmUVR8 和 AtUVR8 蛋白质多序列比对
Fig. 2 The sequences alignment of UVR8 amino acids from Glycine max and Arabidopsis

利用 *GmUVR8* 的氨基酸序列在 NCBI 上进行同源比对,找到 19 个物种的 19 个同源序列,通过 MEGA 7.0 软件,采用邻接法构建了系统进化树。结果如图 3 所示,*GmUVR8a* 和 *GmUVR8c* 与豆科植物来源的 UVR8 蛋白质最相似,而 *GmUVR8b* 和 *GmUVR8d* 在同一个独立的分支上,可能 *GmUVR8b* 和 *GmUVR8d* 具有一定的独特性。

2.4 GmUVR8 蛋白质的三级结构

拟南芥 UVR8 蛋白质 Parent PDB:c4d9sA 为模板对 *GmUVR8* 蛋白质进行了同源模建。结果如图 4 所示,*GmUVR8a* 和 *GmUVR8d* 蛋白质的结构同 AtUVR8 蛋白质类似,都是由 7 个相同的 RCC1 结构域形成七叶 β -折叠的结构。UVR8b 和 UVR8c 由于缺少了 RCC1 结构,形成了不完整的 β -折叠结构。

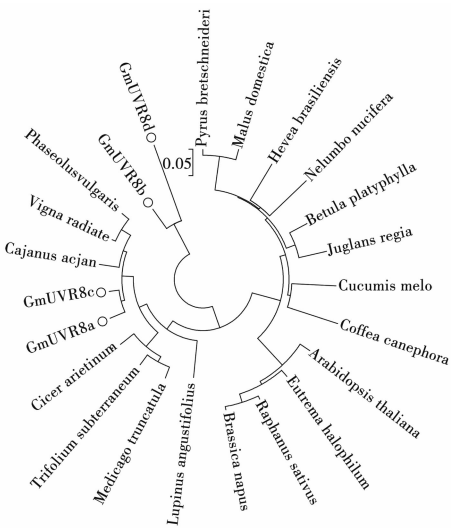


图 3 GmUVR8 蛋白质进化树分析 (NJ 法)
Fig. 3 Phylogenetic tree of *GmUVR8* protein based on neighbor joining methods

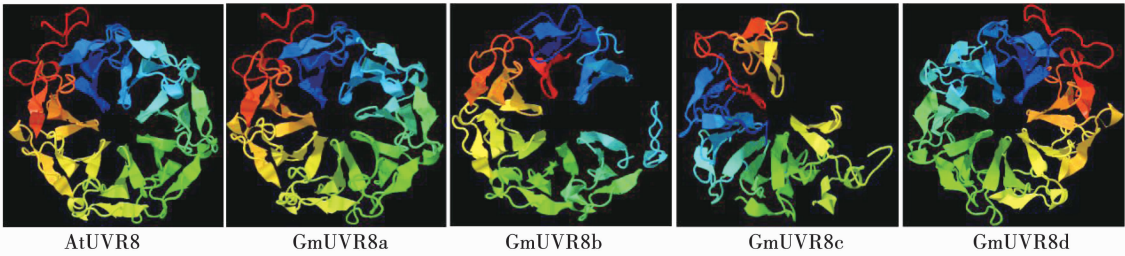


图 4 GmUVR8 蛋白质三维结构图
Fig. 4 3D structure of soybean *GmUVR8*

3 讨论

紫外光 UV-B 辐照下,大豆叶片中的抗氧化酶含量显著上升^[16],转录组分析发现 UV-B 辐照下大豆叶片中的免疫反应、胁迫抵御信号和活性氧清除途径中的相关基因大量上调。不同大豆品种 UV-B 辐照反应存在许多差异,抗 UV-B 大豆品种的叶片在 UV-B 胁迫下,磷脂酸依赖的信号途径迅速启动以调节下游生理生化反应,包括 ABA 信号途径,ROS 清除机制等^[17]。但是大豆中 UV-B 光受体 UVR8 基因及其作用的分子机制还不是很清楚。

Shim 等^[14]在 2015 年发现一个大豆的抗 UV-B 数量性状基因座 (QTL),位于 19 号染色体的 *Satt495* 和 *Satt238* 之间,但是本研究通过同源序列比对的方法获得候选的 UV-B 光受体 *GmUVR8* 基因没有位于这个染色体,可能是由于抵御紫外光 UV-B 是个十分复杂的过程,在其它染色体上的基因也同样参与其中,本研究发现的 4 个 *GmUVR8* 基因功能也需要进一步验证。

自从 UVR8 光受体基因在拟南芥中被发现以来,已经有很多研究来揭示其作用机制。拟南芥

UVR8 在正常情况下以二聚体的形式存在于细胞中,只有在 UV-B 辐照剂量达到一定程度时,二聚体才会解离成单体,与细胞内其它蛋白质复合体结合,调节植物生长发育。在拟南芥中 UVR8 是单拷贝形式存在的^[18],并且具有很多种生理功能,调节植株大小、光合速率等^[12],还有一些其它未知功能。大豆是古四倍体植物,许多基因都以多拷贝形式存在,而在大豆基因组中本研究发现了 4 个可能编码 UVR8 蛋白质的基因,分别位于不同的染色体位置,它们 mRNA 的剪切方式十分类似。序列的同源性分析显示,*GmUVR8c* 和拟南芥 UVR8 是最相似的,但是它们的三维结构却不是最接近的。大豆中 4 个 *GmUVR8* 基因可能存在 1 个或者 2 个主效基因,其它两个可能在进化过程中逐渐退化,究竟是哪个 *GmUVR8* 在起主要作用,后期将进一步通过试验来证明。

4 结论

大豆中含有 4 个不同的 *GmUVR8* 蛋白质,分别由位于 4 条染色体上的不同基因编码。*GmUVR8* 具有保守的 RCC1 结构域,形成了完整或不完整的

七叶 β - 折叠的结构。大豆 *GmUVR8* 与拟南芥 UVR8 蛋白质具有序列和结构上的相似度,但是又具有豆科植物独特性。

参考文献

[1] Slattery R A, Vanlooocke A, Bernacchi C J, et al. Photosynthesis, light use efficiency, and yield of reduced-chlorophyll soybean mutants in field conditions[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 549.

[2] Meng Y, Li H, Wang Q, et al. Blue light-dependent interaction between cryptochrome 2 and CIB1 regulates transcription and leaf senescence in soybean [J]. *Plant Cell*, 2013, 25 (11): 4405-4420.

[3] Carpenter B H, Hamner K C. Effect of light quality on rhythmic flowering response of biloxi soybean[J]. *Plant Physiology*, 1963, 38(6) : 698-703.

[4] Wei H, Cai Q, Rahn R O. Inhibition of UV light- and fenton reaction-induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein[J]. *Carcinogenesis*, 1996, 17(1):73-77.

[5] Guruprasad K, Bhattacharjee S, Kataria S, et al. Growth enhancement of soybean(*Glycine max*) upon exclusion of UV-B and UV-B/A components of solar radiation; Characterization of photosynthetic parameters in leaves [J]. *Photosynthesis Research*, 2008, 96(1) : 115-115.

[6] 郑有飞, 胡会芳, 吴荣军, 等. O₃和 UV-B 共同作用对大豆干物质和产量的影响[J]. *环境科学研究*, 2013, 26(6) : 624-630. (Zheng Y F, Hu H F, Wu R J, et al. Effects of enhance of UV-B radiation and O₃ concentration on dry matter and yield of soybean[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2013, 26(6) : 624-630.)

[7] 冯虎元, 徐世健, 安黎哲, 等. UV-B 辐射对 8 个大豆品种种子萌发率和幼苗生长的影响[J]. *西北植物学报*, 2001, 21(1):14-20. (Feng H Y, Xu S J, An L Z, et al. Effects of increased UV-B radiation on seed germination and seedlings growth of eight cultivars of *Glycine max* [J]. *Acta BotBoreal Occident Sin*, 2001, 21(1) : 14-20.)

[8] Kirakosyan A, Kaufman P, Nelson R L, et al. Isoflavone levels in five soybean(*Glycine max*) genotypes are altered by phytochrome-

mediated light treatments [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2006, 54(1) : 54-58.

[9] Dillon F M, Chludil H D, Zavala J A. Solar UV-B radiation modulates chemical defenses against *Anticarsia gemmatalis* larvae in leaves of field-grown soybean [J]. *Phytochemistry*, 2017, 141: 27-36.

[10] Kliebenstein D J, Lim J E, Landry L G, et al. *Arabidopsis* UVR8 regulates ultraviolet-B signal transduction and tolerance and contains sequence similarity to human regulator of chromatin condensation 1 [J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(1) : 234-243.

[11] Li X, Chung L W, Morokuma K, et al. Theoretical study on the UVR8 photoreceptor: Sensing ultraviolet-b by tryptophan and dissociation of homodimer[J]. *Journal of Chemical Theory & Computation*, 2014, 10(8) : 3319-3330.

[12] Huang X, Yang P, Ouyang X, et al. Photoactivated UVR8-COP1 module determines photomorphogenic UV-B signaling output in *Arabidopsis* [J]. *PLoS Genetics*, 2014, 10(3) : e1004218.

[13] Brown B A, Jenkins G I. UV-B signaling pathways with different fluence-rate response profiles are distinguished in mature *Arabidopsis* leaf tissue by requirement for UVR8, HY5 and HYH [J]. *Plant Physiology*, 2008, 146(2) : 576-588.

[14] Shim H C, Ha B K, Yoo M, et al. Detection of quantitative trait loci controlling UV-B resistance in soybean [J]. *Euphytica*, 2015, 202(1) : 109-118.

[15] Hu B, Jin J, Guo A Y, et al. GSDS 2.0: An upgraded gene feature visualization server [J]. *Bioinformatics*, 2015, 31 (8): 1296-1297.

[16] Gao N, Yang L. Responses of three soybean cultivars exposed to UV-B radiation [J]. *International Journal of Environmental & Agriculture Research*, 2016, 2(2) : 149-156.

[17] Yoon M Y, Kim M Y, Shim S, et al. Transcriptomic profiling of soybean in response to high-intensity UV-B irradiation reveals stress defense signaling [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1917.

[18] Fernández M B, Tossi V, Lamattina L, et al. A comprehensive phylogeny reveals functional conservation of the UV-B photoreceptor UVR8 from green algae to higher plants [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7(119) : 1698.