



大豆脂肪酶 *SDPI* 生物信息学分析和基因编辑

谷心如, 刘新宇, 韩旭达, 赵长江, 费志宏, 魏金鹏, 徐晶宇*, 李佐同*

(黑龙江八一农垦大学 农学院, 黑龙江 大庆 163319)

摘要: 三酰甘油脂肪酶 (Sugar-dependent1, *SDPI*) 是一种脂解酶, 在植物发育过程中发挥重要作用。为发掘大豆 *SDPI* 基因的生物学功能, 利用生物信息学分析方法对大豆 *GmSDPI* 基因的进化关系、保守基序和启动子区域的顺式作用元件等进行分析。利用基因编辑技术创制大豆 *gmsdp1-1^{CR}* 突变体, 对其编辑事件、含油量以及脂肪酸含量进行分析。结果表明: 4 个大豆 *GmSDPI* 基因与双子叶植物亲缘关系较近, 保守结构域和蛋白二级结构高度相似, 启动子区域含有抗逆境胁迫以及激素相关的调控元件。对 *GmSDPI* 在不同组织部位的表达量分析发现, *GmSDPI* 在子叶、叶片和花等部位表达较高。运用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术创制大豆 Willimas 82 品种的 *gmsdp1-1^{CR}* 突变体, 设计 1 条靶向目的基因 *GmSDPI-1* 的特异靶点, 构建 pGES201-*GmSDPI-1* 敲除载体。毛根转化试验的阳性大豆毛状根编辑效率达到 56.52%。大豆稳定转化的 T₁ 代基因编辑阳性植株编辑效率为 1.5%, 选取 *gmsdp1-1^{CR}* 突变体做进一步表型分析表明, 油酸含量极显著降低, 亚麻酸含量极显著升高。研究结果为深入研究 *GmSDPI* 基因的功能和调控机制提供了参考依据。

关键词: 大豆; *SDPI* 基因; CRISPR/Cas9 技术; 生物信息学分析; 组织特异性表达

Bioinformatics Analysis and Gene Editing of Soybean *SDPI* Lipase

GU Xinru, LIU Xinyu, HAN Xuda, ZHAO Changjiang, FEI Zhihong, WEI Jinpeng, XU Jingyu*, LI Zuotong*

(College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: Triglyceride lipase (*SDPI*) is a lipolytic enzyme, which plays an important role in plant development. In order to explore the biological function of soybean *SDPI* gene, we analysed the evolutionary relationship, conserved motifs and cis-elements of soybean *GmSDPI* genes analyzed by bioinformatics analysis method. We created the soybean *gmsdp1-1^{CR}* mutant by gene editing technology, and analyzed its editing events, oil content and fatty acid content. The results showed that four soybean *GmSDPI* genes were closely related to dicotyledonous plants, and the conserved domain and protein secondary structure were highly similar. The promoter region contained stress-resistant and hormone-related regulatory elements. Analysis of the expression level of *GmSDPI* in different tissues showed that *GmSDPI* was highly expressed in cotyledons, leaves and flowers. We created the *gmsdp1-1^{CR}* mutant of soybean Willimas 82 using CRISPR-Cas9 gene editing technology, designed a specific target targeting the target gene *GmSDPI-1*, and constructed a pGES201-*GmSDPI-1* knockout vector. Through hairy root transformation test, the editing efficiency of hairy roots of positive soybean reached 56.52%. The results of stable transformation of soybean showed that the editing efficiency of T₁ gene editing positive plants was 1.5%. Further phenotypic analysis of *gmsdp1-1^{CR}* mutant showed that oleic acid content was significantly reduced and linolenic acid content was significantly increased. The result provides a reference for further study on the function and regulation mechanism of *GmSDPI* gene.

Keywords: soybean (*Glycine max* L.); *SDPI* gene; CRISPR/Cas9 technology; bioinformatics analysis; tissue specificity expression

大豆中含有大量的油脂, 被称为油料作物^[1]。籽粒中的油脂主要以三酰甘油 (triacylglycerol, TAG) 的形式存在, 具有 3 个脂肪酸分子与 1 个甘油分子酯键结合的结构, 是一种中性脂质^[2]。三酰甘油以被单层磷脂膜包围的油体 (Oil Bods, OB) 或脂滴 (Lipid Droplets, LD) 的形式存在^[3]。植物油脂的生物合成途径包括: 质体中脂肪酸的合成、酰基的转移和内质网中三酰甘油的合成^[4]。三酰甘

油的生物合成主要是通过肯尼迪途径, 在内质网中发生 3 步酰基化反应: 第一步, 甘油-3-磷酸酰基转移酶酰基化 3-磷酸甘油, 生成溶血磷脂酸; 第二步, 溶血磷脂酸酰基转移酶催化产生磷脂酸, 在磷脂酸磷酸酶催化产生二酰甘油; 第三步, 酰基辅酶 A: 二酰甘油酰基转移酶酰基化二酰甘油, 产生三酰甘油^[5-7]。

植物三酰甘油主要储存在种子和花瓣等组织

收稿日期: 2024-10-12

基金项目: 科技创新 2030 重大项目子课题 (2023ZD0403202-03); 黑龙江省自然科学基金重点项目 (ZD2020C007); 黑龙江八一农垦大学三横三纵重点专项 (ZDZX202101)。

第一作者: 谷心如, 女, 硕士研究生, 主要从事作物分子育种研究。E-mail: 1770609696@qq.com。

通讯作者: 李佐同, 男, 博士, 教授, 主要从事作物栽培耕作研究。E-mail: lizuotong6212@163.com;

徐晶宇, 女, 博士, 教授, 主要从事作物分子育种研究。E-mail: XujingyuHbau@163.com。

中^[8-10]。植物在进行光合作用自养之前,通过分解三酰甘油为种子萌发和幼苗发育提供能量^[2]。三酰甘油的水解是由三酰甘油脂肪酶(Sugar-Dependent1,SDP1)催化三酰甘油分解产生游离脂肪酸(Fatty Acids,FFA)和甘油^[11],游离脂肪酸再被转移到乙二醛体,转化为酰基辅酶A,最终通过乙醛酸循环和糖异生作用转化为糖^[12-14]。SDP1是催化三酰甘油降解的关键酶,在植物油脂代谢调控中起着重要作用^[15]。

根据植物脂肪酶保守序列的特点,将脂肪酶分为两个亚族:一个亚族含有GDSL-motif结构;另一个亚族包含GXSXG-motif,丝氨酸是GXSXG-motif的活性中心和催化位点^[16]。从结构上来说,SDP1具有两种结构域:SDP1编码的酶蛋白拥有特异性的patatin结构域和未知功能的DUF3336^[15],patatin结构域包含GXSXG-motif,因此SDP1是归类于GXSXG-motif亚族的脂肪酶。Patatin是一种储存蛋白,具有脂酰基水解酶的酶活性,催化膜脂质中脂肪酸的裂解^[17],能够被丝氨酸酯酶抑制剂和钙非依赖性磷酸脂酶A2抑制剂所抑制^[18]。AtSDP1定位在油体表面^[19],拟南芥*sdp1*突变体影响幼苗萌发后的生长速率^[11]。RNAi抑制油菜*BnSDP1*的表达,影响种子活力,使油含量增高8%^[20]。RNAi抑制麻风树*JcSDP1*,使三酰甘油含量增加30%,蛋白质和游离脂肪酸含量减少^[21]。RNAi抑制烟草中*NtSDP1*,使淀粉含量下降,三酰甘油含量增加至29.8%^[22]。利用RNAi抑制大豆*GmSDP1-1*和*GmSDP1-2*,使种子重量、总脂质和脂肪酸含量增加;利用RNAi抑制大豆*GmSDP1-3*和*GmSDP1-4*,使脂肪酸含量增加^[23]。

前人对大豆*GmSDP1*的生物信息学分析及利用CRISPR/Cas9基因编辑技术编辑大豆*GmSDP1-1*基因的相关研究较少。本研究通过生物信息学鉴定*GmSDP1*基因家族成员,并对其进化关系、蛋白结构、启动子区顺式作用元件和组织特异性表达情况等进行分析,利用CRISPR/Cas9基因编辑技术编辑*GmSDP1-1*基因,转化大豆毛状根,验证编辑靶点的有效性,对其进行稳定转化,分析T₁代*gmsdp1-1^{CR}*突变体含油量和脂肪酸含量的变化,为进一步发掘*GmSDP1*基因生物学功能提供参考,为提高大豆产量和质量提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

用于毛根转化的受体大豆品种为东农50,稳定转化的受体大豆品种为Williams 82。菌株DH5 α 、

EHA105和K599购自上海唯地公司。高保真聚合酶KOD为日本东洋纺公司生产,C115连接酶购自诺唯赞公司,*Pme*I酶和*Bsa*I酶购自NEB公司,试剂盒购自天根公司,B5培养基等植物培养基均购自Coolaber公司,化学试剂购自鑫宝来公司和泉瑞试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 SDP1基因家族进化树分析 为了比较植物中SDP1基因家族的进化关系,在Tair(<https://www.arabidopsis.org>)数据库下载拟南芥AtSDP1蛋白序列,利用NCBI(<https://ncbi.nlm.nih.gov/>)基因组数据库和Phytozome v13(<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)在线网站进行BLAST,下载植物SDP1基因序列以及蛋白质序列,利用MEGA 7.0软件的邻接法构建SDP1的进化树,bootstrap值设置为1000次。

1.2.2 GmSDP1理化性质分析、染色体定位以及亚细胞定位预测 在Phytozome v13数据库查找大豆*GmSDP1*基因染色体位置。利用ExPASy Proteomics在线网站(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析大豆GmSDP1的蛋白等电点、相对分子质量、不稳定指数、脂肪系数、平均亲疏水性和氨基酸数目。利用WoLF PSORT(<https://wolfpsort.hgc.jp/>)在线网站对大豆SDP1蛋白进行亚细胞定位预测。

1.2.3 *GmSDP1*基因结构和保守基序分析 使用GSDS软件(<http://gsds.gao-lab.org/>)绘制大豆*GmSDP1*基因结构图,分析*GmSDP1*基因的结构特征。利用在线软件MEME(<https://meme-suite.org/>)对*GmSDP1*的保守序列进行预测,采用TBtools软件绘制保守序列图。

1.2.4 GmSDP1蛋白质二级、三级结构预测 利用SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)在线网站预测和分析GmSDP1蛋白的二级结构。利用SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>)构建GmSDP1蛋白的三级结构模型。

1.2.5 *GmSDP1*启动子顺式作用元件分析 在Phytozome v13数据库下载大豆的*GmSDP1*转录起始位点上游1500 bp序列作为基因的启动子区。利用plantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)在线数据库预测*GmSDP1*启动子包含的光响应及激素响应等相关顺式作用元件。

1.2.6 *GmSDP1*组织特异性表达分析 在SoyOmics(<https://ngdc.cnbc.ac.cn/soyomics/transcriptome/tissues>)数据库中进行*GmSDP1*基因的组织部位表

达分析,查询并下载大豆 *GmSDPI* 不同发育阶段表达谱的数据。对 *GmSDPI* 基因表达量进行归一化 (Z-score) 处理,利用 TBtools 和 Adobe Illustrator 软件绘制 *GmSDPI* 组织特异性表达热图。

1.2.7 pGES201-GmSDPI-1 载体构建 利用同源重组方法^[24]进行 CRISPR/Cas9 载体构建,将连接成功的载体转入大肠杆菌菌株 DH5 α ,加 700 μ L 液体 LB 培养基培养 1 h,利用特异性引物 GmSDPI-1-F 和 JPCR-R 进行菌液 PCR 鉴定阳性单克隆^[24],Sanger 测序(六合华大测序公司)。将测序正确的阳性菌液提取质粒(所用试剂盒为天根质粒小提试剂盒)。

1.2.8 大豆毛根转化 将测序正确的大肠杆菌质

粒转入 K599 感受态细胞中。使用氯气对大豆东农 50 种子灭菌后播种在萌发培养基^[24]中,置于无菌培养室中培养约 7 d,切取培养后大豆的子叶,放入 pGES201-GmSDPI-1 农杆菌菌液中,暗培养约 5 d,转入发根培养基^[24]中,培养至伤口处长出一定量的根毛,收获 46 条转基因毛状根。

1.2.9 编辑靶点有效性检测 利用 NCBI 在线网站和 SnapGene 软件,根据 *GmSDPI-1* 基因 DNA 序列设计特异的靶点检测引物 TYKZ1-F 和 TYKZ1-R (表 1)。使用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取毛状根的 DNA 并进行 PCR 反应^[25],统计编辑事件以及靶点的编辑效率。对 PCR 产物进行测序,并对测序结果进行峰图和序列比对分析。

表 1 供试引物序列

Table 1 Primer sequences for text

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Purpose
GmSDPI-1-F	GTCAAACACTGATAGTTTAAACTGAAGG	载体构建
GmSDPI-1-R	TATTTCTAGCTCTAAAACAATCAGAGTTGCAGACCATTCAATCCATGTGGTGGCAC	载体构建
JPCR-R	AATTGGCGCACGGCTAC	菌液 PCR
TYKZ1-F	TATCATATACTTTTTGTGCTGTCGAA	特异扩增 <i>GmSDPI-1</i> 靶点
TYKZ1-R	GTGATTGACGTTGAACAACCTC	特异扩增 <i>GmSDPI-1</i> 靶点

1.2.10 pGES201-GmSDPI-1 载体稳定转化 采用农杆菌介导大豆子叶节稳定转化方法^[25],将 pGES201-GmSDPI-1 质粒转至农杆菌 EHA105 感受态细胞中,将灭菌过的大豆 Williams 82 种子放置在萌发培养基上培养 16 h,取培养后的大豆子叶,放入 EHA105 菌液摇 1 h,置于共培养培养基^[24],25 $^{\circ}$ C 培养约 5 d,进行继代培养,外植体生根后进行移栽,直至收获 T₁转基因种子。

1.2.11 转基因种子含油量和脂肪酸含量分析 利用气相色谱仪(岛津,GCMS-QP201PLUS)测定 T₁代 *gmsdp1-1*^{CR}大豆种子的含油量和脂肪酸含量,以 Williams 82 种子作为对照,3 次生物学重复,分析棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和亚麻酸含量。

2 结果与分析

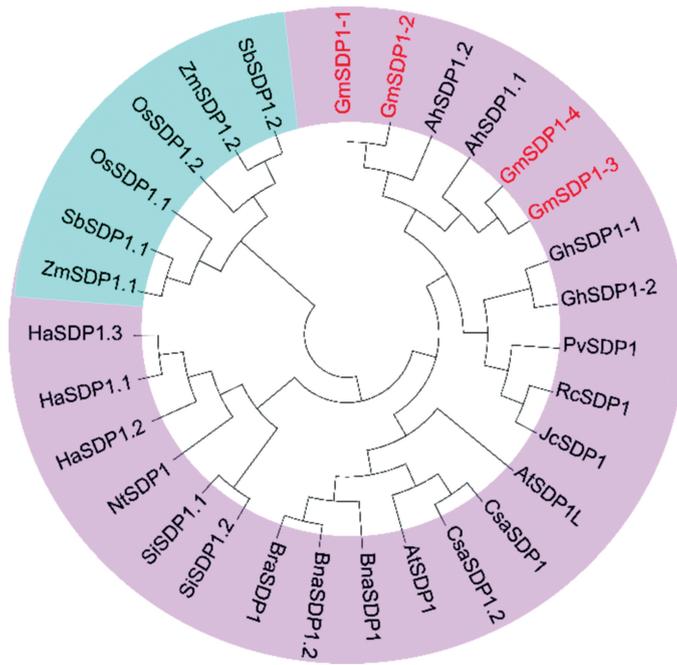
2.1 植物 SDPI 基因家族的进化树分析

以拟南芥 *AtSDPI* 作为参考序列,鉴定出 16 种作物的 *SDPI* 基因。利用鉴定出的蛋白序列构建的 *SDPI* 基因家族系统发育树如图 1 所示。由于对 *SDPI* 基因家族相关研究较少,因此部分物种参照前人文献命名方式,例如拟南芥^[19]、大豆^[23]以及油菜 *BnaSDPI*^[20]等,另一部分依据与模式植物拟南芥 *AtSDPI* 的同源性进行命名。大多数物种包含 2 个

SDPI 基因,向日葵包含 3 个 *HaSDPI* 基因,大豆 *GmSDPI* 因成员较多,在大豆全基因组中共鉴定了 4 个 *GmSDPI* 基因,这可能与大豆的全基因组复制有关。通过 *SDPI* 基因家族的系统发育进化树分析发现,16 种作物总计 30 个基因,共分为 2 个亚族,单子叶作物一个亚族,双子叶作物一个亚族,其中,大豆分属于双子叶的亚族,大豆 *GmSDPI-1* 和 *GmSDPI-2* 同源性较高,*GmSDPI-3* 和 *GmSDPI-4* 同源性较高,4 个 *GmSDPI* 基因与拟南芥和向日葵等双子叶植物亲缘关系较近,与水稻和高粱等单子叶植物亲缘关系较远。

2.2 GmSDPI 蛋白质理化性质分析以及亚细胞定位预测

如表 2 所示,4 个大豆 *GmSDPI* 基因分布在 4 条不同的染色体上。*GmSDPI* 基因编码蛋白的氨基酸数量为 805 ~ 854 aa,分子量为 91.037 ~ 96.187 kDa,等电点为 6.39 ~ 8.57。*GmSDPI-1* 和 *GmSDPI-2* 蛋白呈弱酸性,*GmSDPI-3* 和 *GmSDPI-4* 蛋白呈弱碱性。大豆 *GmSDPI* 基因所编码的蛋白质均为亲水性蛋白,平均亲疏水性值约 -0.305 5。亚细胞定位预测显示 4 个 *GmSDPI* 蛋白被定位到细胞核、细胞质以及内质网,说明 *GmSDPI* 蛋白可能在多种细胞器中发挥功能。



注:红色字体表示大豆 GmSDP1 蛋白。At. 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*); Ah. 花生 (*Arachis hypogaea*); Bna. 油菜 (*Brassica napus*); Bra. 白菜 (*Brassica rapa*); Gh. 陆地棉 (*Gossypium hirsutum*); Gm. 大豆 (*Glycine max*); Jc. 麻风树 (*Jatropha curcas*); Rc. 蓖麻 (*Ricinus communis*); Csa. 亚麻芥 (*Camelina sativa*); Si. 芝麻 (*Sesamum indicum*); Ha. 向日葵 (*Helianthus annuus*); Nt. 烟草 (*Nicotiana tabacum*); Sb. 高粱 (*Sorghum bicolor*); Os. 水稻 (*Oryza sativa*); Pv. 开心果 (*Pistacia vera*); Zm. 玉米 (*Zea mays*)。

Note: The red font represents soybean GmSDP1 protein. At. *Arabidopsis thaliana*; Ah. Peanut (*Arachis hypogaea*); Bna. Rapeseed (*Brassica napus*); Bra. Eurasian plan (*Brassica rapa*); Gh. Cotton (*Gossypium hirsutum*); Gm. Soybean (*Glycine max*); Jc. *Jatropha curcas*; Rc. Castor (*Ricinus communis*); Csa. *Camelina sativa*; Si. *Sesamum indicum*; Ha. Sunflower (*Helianthus annuus*); Nt. Tobacco (*Nicotiana tabacum*); Sb. *Sorghum bicolor*; Os. Rice (*Oryza sativa*); Pv. *Pistacia vera*; Zm. Corn (*Zea mays*).

图1 植物 SDP1 基因家族系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of plant SDP1 gene family

表2 GmSDP1 家族蛋白理化性质分析

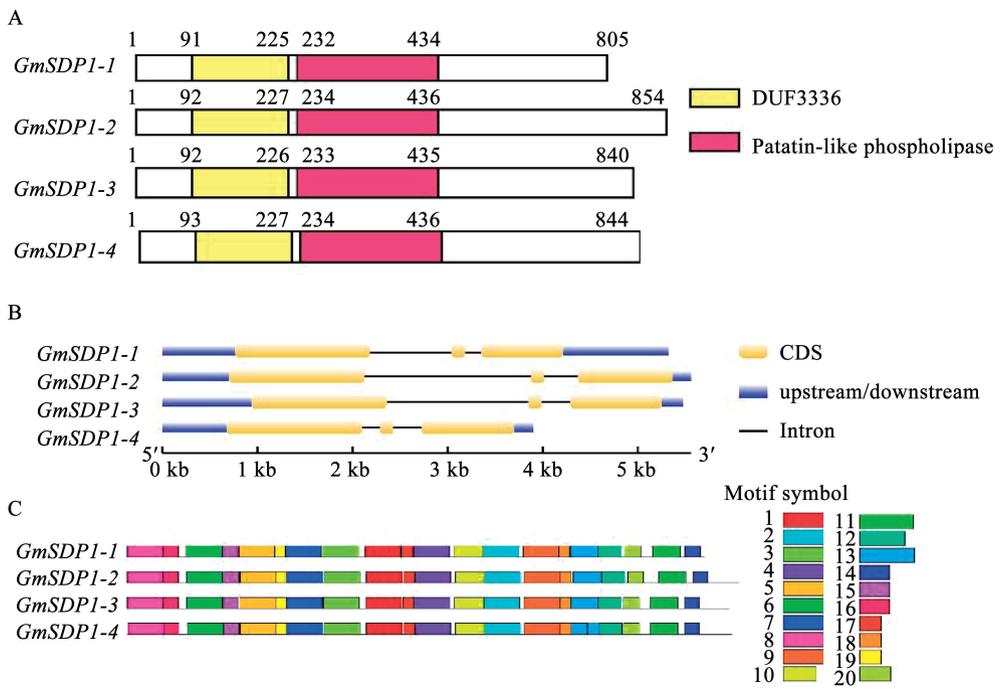
Table 2 Physical and chemical properties of GmSDP1 protein

基因名 Gene	登录号 Gene ID	染色体 编号 Chromosome No.	氨基酸 长度 Length/aa	分子量 Molecular weight/kDa	等电点 Isoelectric point	疏水性 平均值 GRAVY	亚细胞定位 Subcellular localization
GmSDP1-1	<i>Glyma.02G190000.1</i>	Chr02	805	91.037	8.57	-0.289	细胞核、细胞质、叶绿体
GmSDP1-2	<i>Glyma.10G105200.1</i>	Chr10	854	96.187	7.67	-0.346	细胞核、质膜、叶绿体
GmSDP1-3	<i>Glyma.19G132900.1</i>	Chr19	840	94.561	6.39	-0.302	细胞核、内质网、细胞质
GmSDP1-4	<i>Glyma.03G130900.1</i>	Chr03	844	94.826	6.39	-0.285	细胞核、内质网、细胞质

2.3 GmSDP1 基因结构和保守基序分析

GmSDP1 ~ 4 基因编码的蛋白均含有 2 个结构域:一个是 C 端的 DUF3336 (PF11815) 结构域,由 143 ~ 227 个左右氨基酸残基组成,具有未知功能;另一个是 N 端的 Patatin (PF01734) 结构域,由 224

个左右氨基酸残基组成,且含有高度保守的脂肪酶基序 (GX SXG),只是出现的位置略有差异 (图 2A)。分析 GmSDP1 的基因结构发现外显子数量均为 3 个 (图 2B)。分析 GmSDP1 氨基酸序列进行共鉴定出 20 个相似结构保守基序 (motif) (图 2C)。



注:A.大豆 *GmSDP1* 蛋白的保守结构域分析;B.大豆 *GmSDP1* 基因结构分析;C.大豆 *GmSDP1* 蛋白保守基序分析。

Note: A. The conserved structural domain analysis of soybean *GmSDP1* protein; B. The gene structure analysis of soybean *GmSDP1*; C. The conserved motif analysis of soybean *GmSDP1* protein.

图2 *GmSDP1* 家族成员保守结构域、基因结构和保守基序分析

Fig. 2 Analysis of conserved structural domains, gene structure and conserved motifs of *GmSDP1* family members

2.4 *GmSDP1* 蛋白质二级和三级结构预测

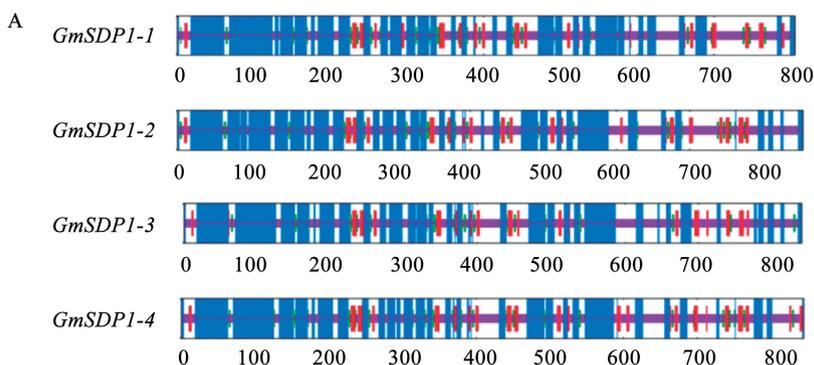
大豆 *GmSDP1* 蛋白的二级结构预测结果如表 3 和图 3A 所示, α -螺旋与 β -折叠的分布位置均存在一定差异。 α -螺旋占 47.51% ~ 49.69%, 无规则卷曲占 35.90% ~ 38.76%, 延长链占 8.57% ~ 10.31%,

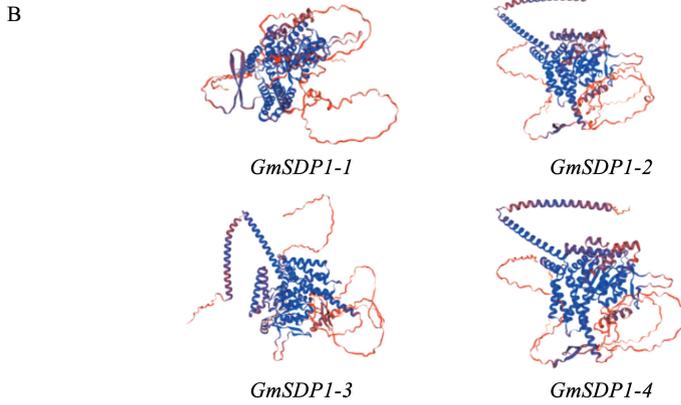
β -折叠占 3.93% ~ 4.84%, 大豆 *GmSDP1* 蛋白以 α -螺旋和无规则卷曲为主。由图 3B 可知, 大豆 *GmSDP1* 家族中 *GmSDP1-3* 和 *GmSDP1-4* 蛋白的二级结构相似, *GmSDP1-2*、*GmSDP1-3* 和 *GmSDP1-4* 蛋白的三级结构相似。

表 3 大豆 *GmSDP1* 蛋白二级结构的氨基酸数目和比例

Table 3 Amino acid number and percentage of secondary structure of *GmSDP1* proteins in soybean 单位:%

蛋白质名称 Protein name	α -螺旋占比 α -helix percentage	延长链占比 Extended strand percentage	β -折叠占比 β -turn percentage	无规则卷曲占比 Random coil percentage
<i>GmSDP1-1</i>	49.69	9.57	4.84	35.90
<i>GmSDP1-2</i>	47.54	8.90	4.80	38.76
<i>GmSDP1-3</i>	48.81	8.57	3.93	38.69
<i>GmSDP1-4</i>	47.51	10.31	4.62	37.56





注: A. GmSDP1 蛋白的二级结构; B. GmSDP1 蛋白的三级结构。蓝色区域为 α -螺旋结构; 红色区域为延伸链结构; 绿色区域为 β -折叠结构; 紫色区域为无规则卷曲结构。

Note: A. Secondary structure of GmSDP1 protein; B. Tertiary structure of GmSDP1 protein. Blue region is α -helical structure; red region is extended chain structure; green region is β -folded structure; purple region is randomly coiled structure.

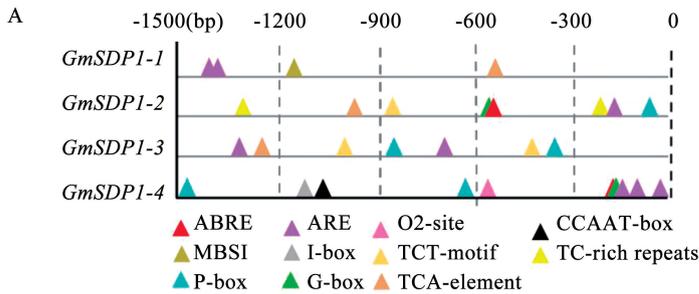
图3 GmSDP1 蛋白的二级结构与三级结构预测

Fig. 3 Prediction of secondary structure and tertiary structure of GmSDP1 protein

2.5 GmSDP1 启动子顺式作用元件分析

如图4所示, *GmSDP1* 基因启动子中顺式作用元件中有4类响应元件, 包括: 激素响应元件22个(1个 ABRE、5个 CGTCA-motif、5个 P-box、1个 TCA、5个 TGACG-motif、2个 TGA-element 和3个

TCA-element); 胁迫响应元件11个(9个 ARE 和2个 TC-rich repeats); 组织特异性表达响应元件2个(1个 CCAAT-box 和1个 O2-site); 光响应元件6个(2个 G-box、1个 I-box、2个 Myb-binding site 和1个 TCT-motif)。



Element	GmSDP1-1	GmSDP1-2	GmSDP1-3	GmSDP1-4	Category
ABRE	1				激素响应元件 Phytohormone response elements
CGTCA-motif	1	3	1		
P-box		1	2	2	
TCA	1				
TGACG-motif	1	3	1		
TGA-element		1		1	
TCA-element	1	1	1		组织特异性表达响应元件 Tissue-specific expression response elements
CCAAT-box				1	
O2-site				1	胁迫响应元件 Stress responsiveness response elements
ARE	3	1	2	3	
TC-rich repeats		2			
G box	1			1	光响应元件 Light responsiveness response elements
I-box				1	
MYB-binding site				2	
TCT-motif	1				

注: A. *GmSDP1-1* 启动子顺式作用元件所在具体位置; B. *GmSDP1-1* 启动子顺式作用元件中响应元件的数量。

Note: A. The location of the *GmSDP1-1* promoter *cis*-acting element; B. Number of response elements in the *GmSDP1-1* promoter *cis*-acting element.

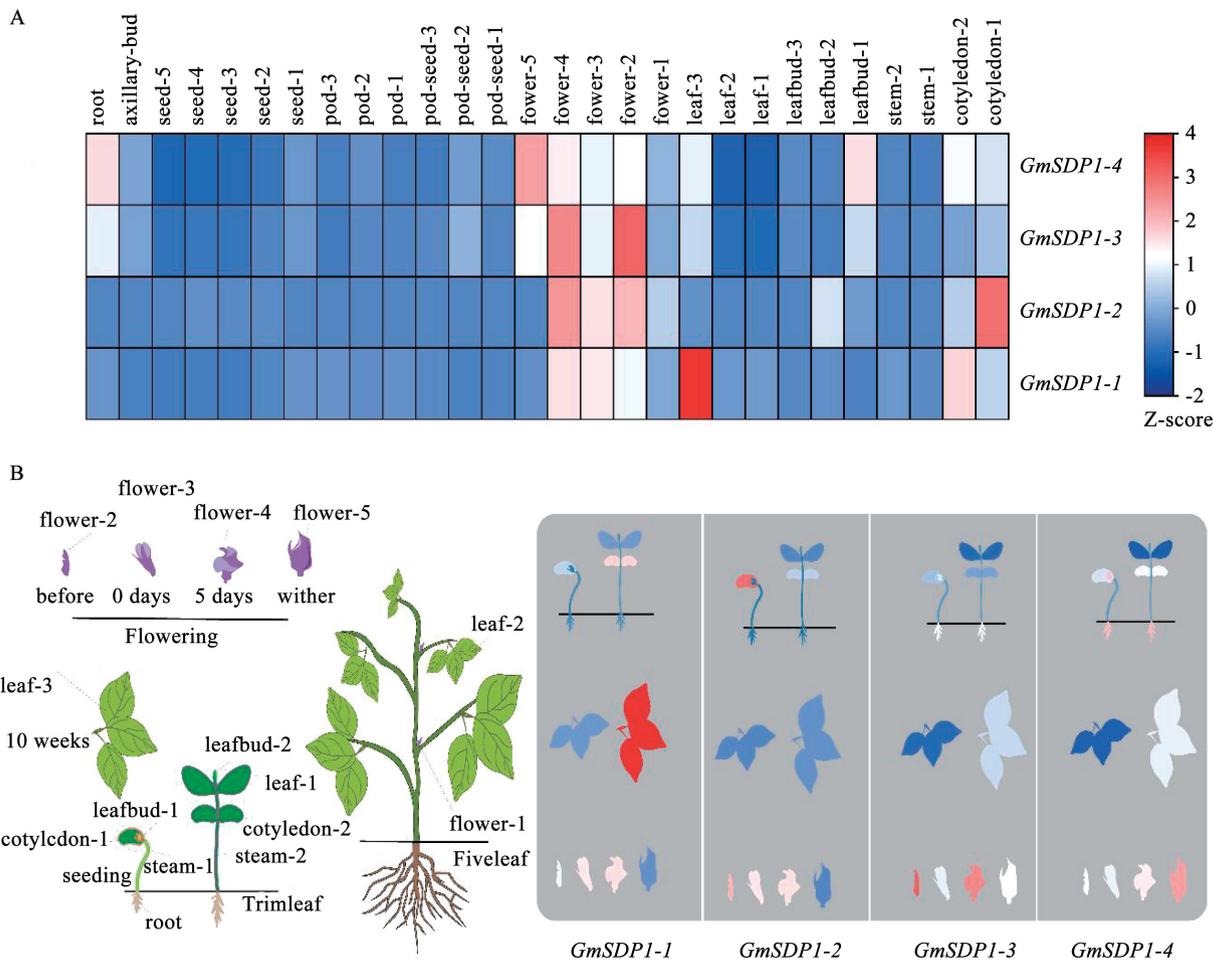
图4 GmSDP1 家族成员启动子顺式作用元件

Fig. 4 The *cis*-elements in promoters of *GmSDP1* family members

2.6 *GmSDP1* 基因的组织特异性表达分析

如图 5 所示,4 个 *GmSDP1* 在不同组织部位均有表达。*GmSDP1-1* 在花的发育过程中的表达量较高,最高的时期是在叶片发育的第 3 阶段;*GmSDP1-2* 在花和子叶发育过程中表达量较高,最高的时期是在子叶发育的第 1 阶段;*GmSDP1-3* 在花的发育过程中的第 2 阶段表达量最高;*GmSDP1-4* 在根和花

的发育过程中表达量较高,最高的时期是在花发育的第 5 阶段。4 个 *GmSDP1* 基因在花的发育过程中均为高表达。*GmSDP1-1* 和 *GmSDP1-2* 在根中的表达量较低,而 *GmSDP1-3* 和 *GmSDP1-4* 在根中表达量较高。*GmSDP1-1* 和 *GmSDP1-4* 在子叶脱落过程中表达量均增加,而 *GmSDP1-2* 和 *GmSDP1-3* 在子叶脱落过程中表达量均降低。



注: A. *GmSDP1* 在不同组织部位的表达热图; B. *GmSDP1* 在不同组织部位的表达模式图。

Note: A. Heatmap of *GmSDP1* expression in different tissue of soybean; B. Model of *GmSDP1* expression in different tissue sites of soybean.

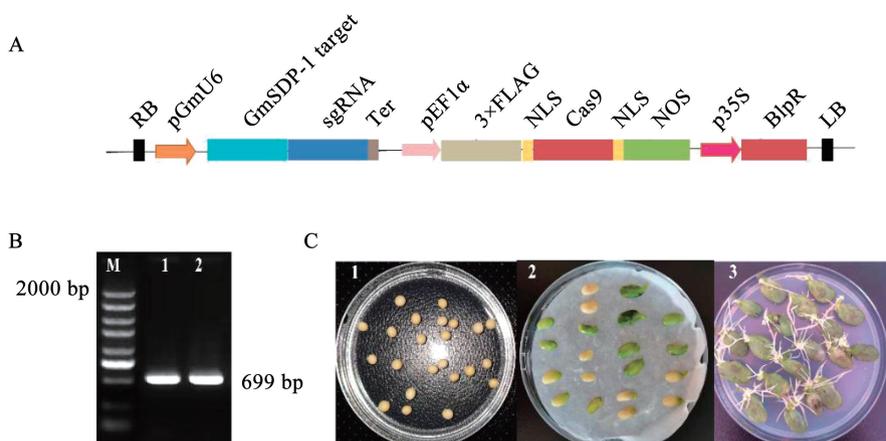
图 5 *GmSDP1* 基因的组织特异性表达分析

Fig. 5 Tissue-specific expression analysis of *GmSDP1* genes

2.7 基因敲除载体毛状根转化及编辑靶点有效性

通过 CRISPR/Cas9 技术构建 pGES201-*GmSDP1-1* 敲除载体,线性载体如图 6A 所示。利用特异性引物 *GmSDP1-1-F* 和 *JPCR-R* 对转化后的大肠杆菌进行菌液 PCR,检测出 2 个阳性单克隆的 pGES201-*GmSDP1-1* 载体(图 6B)。测序结果证明载体已构建成功,并用于后续的大豆毛状根转化(图 6C)。

以转化得到的 46 条转基因大豆毛状根 DNA 为模板,利用引物 *TYKZ1-F* 和 *TYKZ1-R* 扩增靶基因目的片段,Sanger 测序结果显示,46 条大豆毛状根中有 26 条呈现阳性结果,在 *GmSDP1-1* 的靶点处出现不同的编辑结果,说明此靶点能被有效编辑,且编辑效率为 56.52%,其中碱基的替换和碱基的插入和缺失的效率均为 28.26%(表 4)。



注: A. pGES201-GmSDP1-1 线性载体图谱; B. PCR 验证重组质粒 (M 为 DNA marker DL 2 kb, 1~2 泳道是阳性单克隆菌落); C. 载体 pGES201-GmSDP1-1 转化大豆毛状根 (1 为大豆萌发, 2 为共培养, 3 为毛状根的生长)。

Note: A. pGES201-GmSDP1-1 linear vector mapping; B. PCR validation of the recombinant plasmid (M; 2 kb ladder DNA marker, Lanes 1-2 are positive monoclonal colonies); C. Vector pGES201-GmSDP1-1 transformed soybean hairy roots (1 is soybean germination, 2 is co-culture, 3 is hairy root growth).

图 6 pGES201-GmSDP1-1 载体构建与大豆毛状根的转化

Fig. 6 pGES201-GmSDP1-1 vector construction and transformation of soybean hairy roots

表 4 pGES201-GmSDP1 毛状根编辑结果统计

Table 4 pGES201-GmSDP1 hairy root editing result statistics

编辑载体 Editorial vector	测序样品数量和效率 Number of sequencing samples and efficiency	编辑类型 (5'-3') Edit type (5'-3')	编辑序列变化分析 Edit sequence change analysis
pGES201-GmSDP1-1	东农 50 碱基替换 (13/46 = 28.26%)	AATGGTCTGCAACTCTGATTCGGA	
		AATGGTCTGCAACTCTGATGGGA	C-G
		AATGGTCTGCAACTCTGATCGGG	A-G
		AATGGTCTGCAACTCTGAATGGGG	T-A, C-G, A-G
		AATGGTCTGCAACTCTGATGCGGG	T-A, T-G, A-G
		AATGGTCTGCAACTCTGAATCGGG	T-A, A-G
		AATGGTCTGCAACTCTGATTCGGC	A-C
		AATGGTCTGCAACTCTGAATGGGT	T-A, A-T
		AATGGTCTGCAACTCTGATTGGAA	C-G
		AATGGTCTGCAA----ATTTCGG	-5 bp
		AATGGTCTGCAACTA---TT CGTG	-3 bp
		AATGGTCTGCAAAATTTGC + +//--TTCTGT	+73 bp, +6 bp
		AATGGTCTGCAACTCTG-TTCGGG	-1 bp
		AATGGTCTGCAACTTTGA---GG-G	-4 bp
		AATGGTCTGCAACTCTGAATT CGGA	+1 bp
		AATGGTCTGCAACTCTGA-----GG	-6 bp
AATGGTCTGCAACTCTGA-----A	-5 bp		
AATGGTCTGCAACTCTGAATTCGAGGGAG-TT	+1 bp, -1 bp		
AATGGTCTGCAACTCTGAATCGGGGGGGCTTTGAATGAA-----AA	+8 bp, -7 bp		

注: 红色字体代表碱基替换; --代表碱基缺失; + +//--代表既缺失又插入; 下划线代表靶点。

Note: Red font represents base substitution; -- represents base deletion; + +//-- represents both deletion and insertion; underline represents target site.

2.8 pGES201-GmSDPI-1 稳定转化编辑结果和油分含量分析

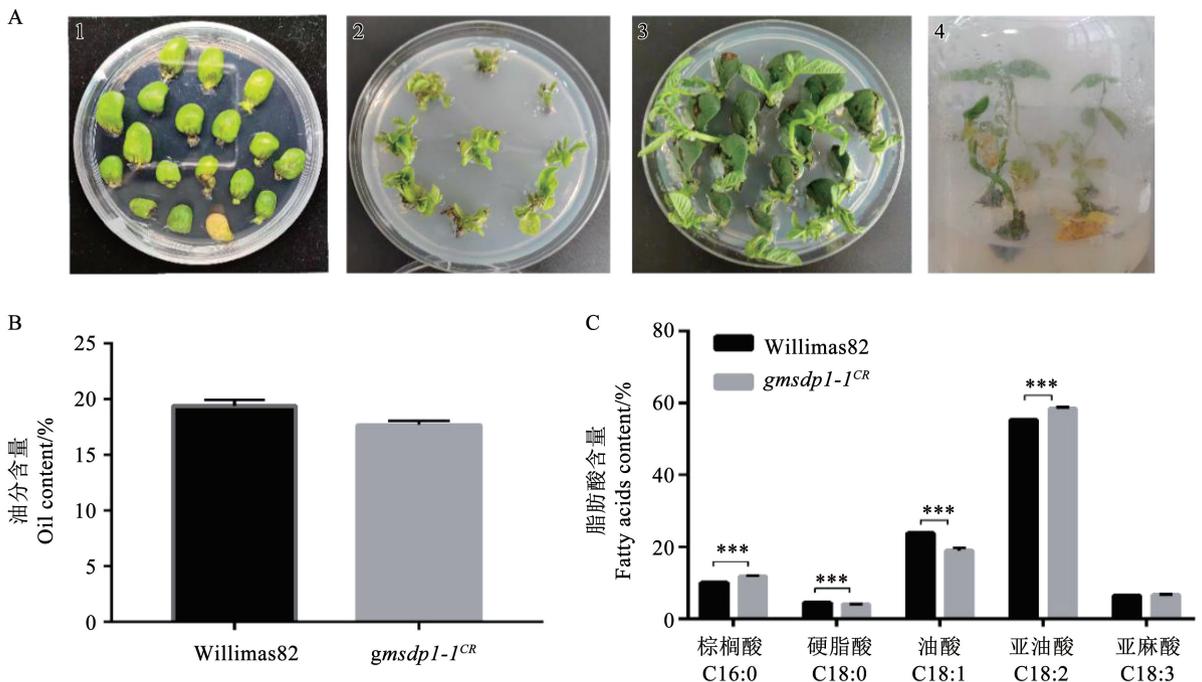
利用农杆菌介导大豆子叶节法稳定转化大豆受体 Williams 82, 得到的 24 份大豆阳性植株 T_0 叶片 (图 7A)。利用引物 TYKZ1-F 和 TYKZ1-R 扩增其 DNA, 测序结果显示: 24 株大豆阳性植株 T_0 叶片中有 3 株呈现阳性结果, 在 *GmSDPI-1* 的靶点处出现

不同的编辑结果, 说明此靶点能被有效编辑, 且编辑效率为 1.5%, 其中碱基替换的编辑效率为 4.17%, 碱基的插入和缺失的编辑效率为 8.33% (表 5)。气相色谱分析表明, T_1 种子 *gmsdp1-1^{CR}* 相较于 Williams 82 含油量变化不明显, 棕榈酸 (C18:0)、亚油酸 (C18:2) 极显著增加, 硬脂酸 (C16:0) 和油酸 (C18:1) 极显著下降 (图 7B 和 C)。

表 5 pGES201-GmSDPI 稳定转化大豆受体 Williams 82 T_0 叶片编辑结果统计

Table 5 T_0 leaf editing statistics of pGES201-GmSDPI transformation of soybean Williams 82

编辑载体 Editorial vector	测序样品数量和效率 Number of sequencing samples and efficiency	编辑类型(5'-3') Edit type(5'-3')	编辑序列变化分析 Edit sequence change analysis
pGES201-GmSDPI-1	Williams 82	GAATGGTCTGCAACTCTGATT CGG	原序列
	碱基替换 (1/24 = 4.17%)	CAATGGTCTGCAACTCTGATT CGG	G-C
	碱基的插入和缺失 (2/24 = 8.33%)	GAATGGTCTGCAACTCTGAATG CAG	+1 bp
		GAATGGTCTGCAACTCTGAATG CGA	+1 bp



注: A. 农杆菌介导的大豆子叶节转化 pGES201 - GmSDPI-1 载体 (1 为共培养, 2 为丛生芽的诱导, 3 为芽的伸长, 4 为生根); B. *gmsdp1-1^{CR}* 的油分含量变化; C. *gmsdp1-1^{CR}* 的脂肪酸含量变化。

Note: A. Agrobacterium-mediated transformation of soybean cotyledonary nodes with pGES201-GmSDPI-1 vectors (1 means co-cultivation, 2 means clump shoot induction, 3 means shoot elongation, and 4 means rooting); B. Change in oil content of *gmsdp1-1^{CR}*; C. Change in fatty acid content of *gmsdp1-1^{CR}*.

图 7 *gmsdp1-1^{CR}* 稳定转化、油分含量和脂肪酸含量分析

Fig. 7 Analysis of *gmsdp1-1^{CR}* transformation, oil content and fatty acid content

3 讨论

大豆产物大豆油以三酰甘油的形式存在,大豆油脂含量的提高主要通过促进三酰甘油的合成和抑制三酰甘油的分解,而SDPI是参与三酰甘油分解的主要脂肪酶^[18]。目前SDPI基因家族成员在大豆中的功能性和应答环境胁迫中的作用的研究尚少,通过在数据库搜索大豆SDPI发现4个SDPI基因家族成员。2006年Eastmond等^[11]在拟南芥中报道过2个SDPI基因,*AtSDPI*和*AtSDPI1L*。2019年Kanai等^[26]在大豆中报道过4个*GmSDPI*基因,分别被命名为*GmSDPI-1*、*GmSDPI-2*、*GmSDPI-3*和*GmSDPI-4*,4个*GmSDPI*基因与拟南芥*AtSDPI*亲缘关系较近。本研究以单双子叶植物为划分依据,将SDPI基因家族划分为两个亚家族。4个*GmSDPI*基因与拟南芥和向日葵等双子叶植物亲缘关系较近,与水稻和高粱等单子叶植物亲缘关系较远。大豆*GmSDPI*的基因结构和蛋白结构域较为保守,都含有patatin结构域和未知功能的DUF3336结构域。CRISPR/Cas9基因编辑技术已成功应用在大豆中,但通过编辑*GmSDPI*基因并探究其功能还未见报道。

2016年Cui等^[27]研究发现,与野生型相比,*sdp1*幼苗表现出油体积量增加与过氧化物酶体之间的物理相互作用,其中蔗糖可以作为油体和过氧化物酶体相互作用的负信号微调脂肪分解。2015年Thazar-Poulot等^[18]的研究发现,GFP-SDPI转化拟南芥野生型后进行尼罗红染色,通过转盘共聚焦的延时成像观察第4天的拟南芥下胚轴,发现SDPI蛋白通过过氧化物酶体膜的延伸部分与脂滴接触从而分解三酰甘油,产生的脂肪酸被带入过氧化物酶体,通过 β 氧化作用降解^[28]。本研究通过WoLFPSORT在线网站预测大豆*GmSDPI*的亚细胞定位,发现大豆*GmSDPI*定位在细胞核、细胞质以及内质网等细胞器,大豆*GmSDPI*的精确定位还需要进一步试验确定。在拟南芥中,*AtSDPI*和*AtSDPI1L*负责水解种子中约95%的三酰甘油,*AtSDPI1L*负责*sdp1*突变体种子萌发后几乎所有剩余三酰甘油的水解^[29]。Eastmond等^[11]的研究表明*AtSDPI*在种子成熟前期到种子干燥期以及种子萌发吸胀时期表达量较高。本研究发现大豆*GmSDPI-2*、*GmSDPI-3*和*GmSDPI-4*在种子萌发早期表达量较高,大豆*GmSDPI-1*在种子萌发后期表达量较高,大豆*GmSDPI*在种子萌发的不同时期发挥作用,水解三

酰甘油为植物提供能量,与Eastmond等^[11]的研究结果部分一致,后续需要更进一步研究*GmSDPI*的表达和功能。本研究利用CRISPR/Cas9技术编辑大豆*GmSDPI-1*基因,功能分析发现敲除*GmSDPI-1*仅使亚油酸显著增加,油酸显著下降,含油量下降与RNAi抑制*GmSDPI*^[23]使油酸显著增加,需要加代繁殖至纯合大豆*gmsdp1-1*突变体,或创制多重突变体进行进一步研究。

4 结论

本研究对*GmSDPI*基因在单双子叶中的进化关系进行探讨,结果表明其在不同物种进化过程中比较保守,并发现大豆*GmSDPI*基因的结构域、外显子/内含子以及保守基序的分布模式较为相似。*GmSDPI*启动子包含光响应及激素响应等多种相关顺式作用元件,表明大豆*GmSDPI*可能参与多种非生物胁迫应答。基因表达谱显示大豆*GmSDPI*基因在种子萌发过程中表达量较高,利用CRISPR/Cas9技术靶*GmSDPI-1*基因,分析功能发现敲除*GmSDPI-1*仅使亚油酸极显著增加,油酸极显著下降,说明大豆*GmSDPI*可能在大豆三酰甘油的分解过程中起重要作用,但具体调控模式和功能需更深入的研究。

参考文献

- [1] 陈贝贝. 大豆二酰甘油酰基转移酶(DGAT)和转录因子WRINKLED1(WRI1)功能研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2019: 14-15.
CHEN B B. Study on the function of soybean diacylglycerol acyltransferase (DGAT) and transcription factor WRINKLED1 (WRI1) [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019: 14-15.
- [2] PARK M E, KIM H U. Applications and prospects of genome editing in plant fatty acid and triacylglycerol biosynthesis [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 969844.
- [3] XU X Y, YANG H K, SINGH S P, et al. Genetic manipulation of non-classic oilseed plants for enhancement of their potential as a biofactory for triacylglycerol production [J]. *Engineering*, 2018, 4 (4): 523-533.
- [4] 徐孝兰. 调控DGATI和FAD2-I基因改良棉籽油的含量和品质[D]. 武汉:华中农业大学, 2019: 2-3.
XU X L. Improving the content and quality of cottonseed oil by regulating DGATI and FAD2-I genes [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019: 2-3.
- [5] JAIN R K, COFFEY M, LAI K, et al. Enhancement of seed oil content by expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase genes

- [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2000, 28(6): 958-961.
- [6] JAKO C, KUMAR A, WEI Y, et al. Seed-specific over-expression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight [J]. *Plant Physiology*, 2001, 126(2): 861-874.
- [7] BOURGIS F, KADER J C, BARRET P, et al. A plastidial lysophosphatidic acid acyltransferase from oilseed rape [J]. *Plant Physiology*, 1999, 120(3): 913-922.
- [8] SHOCKEY J M, GIDDA S K, CHAPITAL D C, et al. Tung tree DGAT1 and DGAT2 have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum [J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(9): 2294-2313.
- [9] ZHANG M, FAN J, TAYLOR D C, et al. DGAT1 and PDAT1 acyltransferases have overlapping functions in *Arabidopsis* triacylglycerol biosynthesis and are essential for normal pollen and seed development [J]. *The Plant Cell*, 2009, 21(12): 3885-3901.
- [10] BANILAS G, KARAMELIAS M, MAKARITI I, et al. The olive *DGAT2* gene is developmentally regulated and shares overlapping but distinct expression patterns with *DGAT1* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(2): 521-532.
- [11] EASTMOND P J. SUGAR-DEPENDENT1 encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating *Arabidopsis* seeds [J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(3): 665-675.
- [12] CORNAH J E, SMITH S M. Synthesis and function of glyoxylate cycle enzymes [M]//BAKER A, GRAHAM I A. *Plant peroxisomes, biochemistry, cell biology and biotechnological applications*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2002, 57-101.
- [13] GRAHAM I A, EASTMOND P J. Pathways of straight and branched chain fatty acid catabolism in higher plants [J]. *Progress in Lipid Research*, 2002, 41(2): 156-181.
- [14] BAKER A, GRAHAM I A, HOLDSWORTH M, et al. Chewing the fat: β -oxidation in signalling and development [J]. *Trends in Plant Science*, 2006, 11(3): 124-132.
- [15] 刘萌萌, 韩立军, 刘宝玲, 等. 陆地棉 GhSDPI 及其启动子的克隆与表达分析 [J]. *生物技术通报*, 2022, 38(2): 34-43.
- LIU M M, HAN L J, LIU B L, et al. Cloning and expression analysis of GhSDPI and its promoter in *Gossypium hirsutum* [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(2): 34-43.
- [16] 郝晓云, 蔡永智, 钱雯婕, 等. 植物 GDSL 脂肪酶家族研究进展 [J]. *植物生理学报*, 2013, 49(12): 1286-1290.
- HAO X Y, CAI Y Z, QIAN W J, et al. Advances in research of GDSL-lipase family in plants [J]. *Plant Physiology Journal*, 2013, 49(12): 1286-1290.
- [17] MIGNERY G A, PIKAARD C S, PARK W D. Molecular characterization of the patatin multigene family of potato [J]. *Gene*, 1988, 62(1): 27-44.
- [18] THAZAR-POULOT N, MIQUEL M, FOBIS-LOISY I, et al. Peroxisome extensions deliver the *Arabidopsis* SDPI lipase to oil bodies [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(13): 4158-4163.
- [19] 李亚军, 费小雯, 邓晓东. 三酰甘油酯酶研究进展 [J]. *热带生物学报*, 2011, 2(3): 282-286.
- LI Y J, FEI X W, DENG X D. Research progresses on triacylglycerol lipase [J]. *Journal of Tropical Biology*, 2011, 2(3): 282-286.
- [20] KELLY A A, SHAW E, POWERS S J, et al. Suppression of the SUGARDEPENDENT1 triacylglycerol lipase family during seed development enhances oil yield in oilseed rape (*Brassica napus* L.) [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2012, 11(3): 355-361.
- [21] KIM M J, YANG S W, MAO H Z, et al. Gene silencing of Sugar-dependent 1 (JcSDPI), encoding a patatin-domain triacylglycerol lipase, enhances seed oil accumulation in *Jatropha curcas* [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 36.
- [22] VANHERCKE T, DIVI U K, EL TAHCHY A, et al. Step changes in leaf oil accumulation *via* iterative metabolic engineering [J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 39: 237-246.
- [23] AZNAR-MORENO J A, MUKHERJEE T, MORLEY S A, et al. Suppression of SDPI improves soybean seed composition by increasing oil and reducing undigestible oligosaccharides [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 863254.
- [24] 柏梦焱, 袁珏慧, 孙嘉丰, 等. 基于 CRISPR-Cas9 基因编辑技术创制大豆 gmnrk 超结瘤突变体 [J]. *大豆科学*, 2019, 38(4): 525-532.
- BAI M Y, YUAN J H, SUN J F, et al. Generation of gmnrk mutant with supernodulation *via* CRISPR-Cas9 in soybean [J]. *Soybean Science*, 2019, 38(4): 525-532.
- [25] 徐扬. 大豆 *GmDGATI-2* 和花生 *AhDGAT3* 基因的克隆与功能分析 [D]. 长春: 吉林大学, 2021: 77-78.
- XU Y. Cloning and functional analysis of soybean *GmDGATI-2* and peanut *AhDGAT3* genes [D]. Changchun: Jilin University, 2021: 77-78.
- [26] KANAI M, YAMADA T, HAYASHI M, et al. Soybean (*Glycine max* L.) triacylglycerol lipase GmSDPI regulates the quality and quantity of seed oil [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 8924.
- [27] CUI S, HAYASHI Y, OTOMO M, et al. Sucrose production mediated by lipid metabolism suppresses the physical interaction of peroxisomes and oil bodies during germination of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(38): 19734-19745.
- [28] ISCHEBECK T, KRAWCZYK H E, MULLEN R T, et al. Lipid droplets in plants and algae: Distribution, formation, turnover and function [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2020, 108: 82-93.
- [29] KELLY A A, QUETTIER A L, SHAW E, et al. Seed storage oil mobilization is important but not essential for germination or seedling establishment in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(2): 866-875.