

大豆 UBC 基因家族鉴定及 *GmUBC46* 基因的功能初步分析

陈超, 乔艳花, 井常煦, 卢文秀, 金晓霞, 于丽杰

(哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 哈尔滨 150025)

摘要: 泛素/26S 蛋白酶体途径在植物响应非生物胁迫反应中起着重要的作用。E2(泛素结合酶, UBC)是蛋白质泛素化中重要的泛素结合酶,与 E1 和 E3 共同参与蛋白降解途径。本研究通过构建隐马尔可夫模型,鉴定了 54 个大豆 UBC 基因,通过进化树分析将该家族成员分为 11 个亚家族(A-K)。蛋白保守结构域分析表明,GmUBC 家族蛋白成员大部分含有保守 Motif 1、Motif 2 与 Motif 3,且均属于泛素结合酶保守结构域。组织定位分析表明大部分 GmUBC 家族基因成员在大豆根、茎、叶、花等组织中有所表达。转录组数据表明有 20 个 GmUBC 基因在干旱、盐或冷胁迫下具有不同的表达模式,启动子顺式作用元件分析发现其胁迫响应过程可能与激素信号转导相关。进一步通过 qRT-PCR 发现 *GmUBC46* 基因能积极响应干旱、盐或冷胁迫诱导上调表达。通过酵母功能验证表明,*GmUBC46* 基因降低了对干旱或盐胁迫的耐受性。综上所述,本研究初步阐明了大豆 UBC 基因家族的基本特性及 *GmUBC46* 基因的耐逆功能,为后续研究提供了重要依据和参考价值。

关键词: UBC 家族; 大豆; *GmUBC46*; 干旱; 盐

Identification of Soybean UBC Gene Family and Preliminary Functional Analysis of *GmUBC46*

CHEN Chao, QIAO Yan-hua, JING Chang-xu, LU Wen-xiu, JIN Xiao-xia, YU Li-jie

(School of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025)

Abstract: The ubiquitin/26S proteasome pathway plays an important role in response to abiotic stress in plants. E2(ubiquitin-binding enzyme, UBC), which is an ubiquitin-binding enzyme involved in protein ubiquitination, participates in the protein degradation pathway in a complex with E1 and E3. In this study, we identified 54 soybean UBC genes using hidden Markov model, and the family members were divided into 8 subfamilies(A-K) according to the phylogenetic tree analysis. Protein conserved domain analysis indicated that most of GmUBC family proteins contain conserved domains 1, 2 and 3, which belong to the conserved domain of ubiquitin-binding enzymes. Tissue expression analysis indicated that the transcripts of most GmUBC family genes were detected in soybean roots, stems, leaves, flowers and other tissues. Transcriptome data indicated that a diversifying expressional pattern was observed for 20 GmUBC genes under drought, salt or cold stress treatments. Analysis for *cis*-elements in the promoter suggests that some of GmUBC genes may be involved in hormonal signaling. Furthermore, qRT-PCR analysis showed that *GmUBC46* was inducible under drought, salt and cold stresses. Expressing the *GmUBC46* gene in yeast showed a decreased tolerance in responses to drought and salt stress treatments. In summary, this study revealed the basic characteristics of UBC gene family in soybean and the

收稿日期: 2019-04-23 修回日期: 2019-05-26 网络出版日期: 2019-07-23

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190423002>

第一作者研究方向为植物分子生物学, E-mail: chenchaochencao09@163.com

通信作者: 于丽杰, 研究方向为植物分子生物学, E-mail: chchao@hrbnu.edu.cn

基金项目: 黑龙江省自然科学基金面上项目(C2017039); 黑龙江省教育厅面上项目(12531178)

Foundation project: Heilongjiang Provincial Natural Science Foundation Project(C2017039), Heilongjiang Provincial Education Department Project(12531178)

preliminary functional insight of *GmUBC46*, and gain of datasets might provide considerable basis and reference value for future research.

Key words: UBC family; soybean; *GmUBC46*; drought; salt

泛素 /26S 蛋白酶体是高效降解细胞内异常蛋白与短寿命调节蛋白的特异性降解途径之一,广泛参与了植物的生理生化过程,如植物的发育与衰老、光形态建成、激素信号转导、生物与非生物胁迫等^[1-3]。植物蛋白泛素化酶系统主要由 Ub- 激活酶 (E1)、Ub- 结合酶 (E2)、Ub- 连接酶 (E3) 及 26S 蛋白酶体组成。其中, Ub 泛素蛋白分子首先通过 ATP 依赖性反应,通过硫酯键与 E1 相连,随后转移到 E2 的半胱氨酸残基上,底物由 E2 转移到 E3 连接酶上,最终通过 26S 蛋白酶体降解底物蛋白^[4]。在泛素 /26S 蛋白酶体系统中, E2 结合酶与 E3 连接酶能特异性的结合底物蛋白^[5]。其中, E2 结合酶包含 1 个大约 150 个氨基酸的保守结构域,为 UBC 保守结构域。

随着 E3 连接酶在植物应答非生物胁迫方面取得大量的研究进展^[6-7], E2 结合酶在非生物胁迫方面的研究也逐渐展开。在水稻 (*Oryza sativa* L.) 中已鉴定出了 40 个 E2 结合酶,其中有 11 个 E2 结合酶能与 ARM-U-box E3 连接酶相互作用^[8]。对玉米 (*Zea mays* L.) 中 75 个 E2 结合酶成员分析表明,该基因家族具有高度保守的 UBC 结构域,其中 75 个 E2 结合酶基因在盐胁迫下显著表达, 34 个基因在干旱 (PEG6000) 胁迫下显著上调表达, 28 个基因在低温 (4 °C) 胁迫下显著上调表达^[9]。此外,对龙眼 (*Dimocarpus longan* Lour.) 中 40 个 UBC 基因家族成员分析得知除受热胁迫与冷胁迫外, 13 个 UBC 基因受水杨酸诱导表达, 7 个受茉莉酸甲酯诱导表达,表明其可能参与了激素介导的信号转导通路^[10]。近期研究表明,拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 中的 *AtUBC32*、*AtUBC33* 与 *AtUBC34* 基因能介导 ABA 参与调控气孔开闭的过程,进而使植物降低对干旱胁迫的耐受性^[11]。烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 中的 *NtUBC1* 基因能通过泛素 /26S 蛋白酶体依赖途径降解 Cd 损伤蛋白,或通过泛素 /26S 蛋白酶体非依赖途径激活抗氧化酶活性,进而增加对 Cd 胁迫与氧化胁迫的耐受性^[12]。因此, UBC 基因家族在植物响应非生物胁迫反应中起着重要的作用。

大豆是我国重要的粮食作物,也是植物蛋白与

油料的主要来源。但是大豆的产量在自然环境中易受干旱、高盐与低温等非生物胁迫的影响。因此,筛选功能显著的耐逆基因对培育优良大豆品种具有重要经济价值。以上研究表明, E2 结合酶 (UBC) 在调控植物非生物胁迫方面起着重要的作用。然而,在大豆中对 UBC 基因家族及在非生物胁迫方面的研究报道较少。

本研究通过构建隐马尔可夫模型 (HMM) 与本地 blast 比对,筛选获得了 54 个非冗余的大豆 UBC 基因家族成员,并对其进行了蛋白理化性质、系统进化关系、保守结构域、组织定位及启动子顺式作用元件分析;进一步通过在干旱、盐及冷胁迫下的表达模式分析,确定了积极响应干旱、盐及冷胁迫的应答基因 *GmUBC46*,通过功能验证 *GmUBC46* 在酵母中降低了对干旱与盐胁迫的耐受性。该研究为 GmUBC 家族基因及 *GmUBC46* 基因功能后续的研究提供了重要依据和参考价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 品种 DN50; 酵母菌为 AH109。大豆种子与酵母菌种均由哈尔滨师范大学植物分子生物学研究室保存。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆 UBC 基因家族成员的鉴定 拟南芥 UBC 家族成员蛋白序列下载自 Phytozome 在线数据库 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)。大豆全基因组蛋白数据下载于 NCBI 在线数据库 (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/Glycine_max)。

利用拟南芥 UBC 基因家族成员的 UBC 保守结构域,运用 HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer>) 软件构建隐马尔可夫模型,本地 blast 后得到含有 UBC 保守结构域的大豆 UBC 蛋白。进一步,通过 PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 及 SMART (<http://smart.emblheidelberg.de>) 在线数据库去除冗余序列及 UBC 保守结构域不完整序列。利用 ExPASy (<http://expasy.org/>) 在线数据库对所得大豆 UBC 蛋白氨基酸序列进行相对分子量与理论等电点预测。

1.2.2 大豆 UBC 基因家族系统进化树的构建及保守结构域分析 利用 MEGA5 软件对大豆 UBC 基因家族蛋白进行全长序列比对,采用邻接法 (Neighbor-Joining) 构建 UBC 基因家族的系统进化树,校验参数设置为 1000 次。通过 Clustal X 软件与 MEME (<http://meme-suite.org/>) 在线软件分别对 GmUBC 家族蛋白氨基酸序列进行序列比对与保守结构域分析。

1.2.3 大豆 UBC 基因启动子顺式作用元件的预测 利用 Phytozome 在线数据库下载大豆 UBC 基因启动子序列,通过 PLANT CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线软件预测启动子上的胁迫相关顺式作用元件。

1.2.4 大豆 UBC 基因家族成员的表达量分析 从 NCBI 数据库中下载大豆组织表达转录组数据 (GSE29163),搜索 GmUBC 基因在根、茎、叶、花、种子与豆荚中的表达量。从 NCBI 数据库中下载大豆在冷 (GSE117686)、盐与干旱 (GSE57252) 胁迫下的转录组数据,搜索 GmUBC 基因在各胁迫下的表达量。采用 MeV4 软件聚类表达结果并作热图,进行表达量分析。

1.2.5 *GmUBC46* 基因的表达特性分析及功能验证 将生长 2 周的水培大豆幼苗分别在 4 °C 光照培养箱、含有 200 mmol/L NaCl 与 300 mmol/L 甘露醇的营养液中进行处理,处理 0、1、6 与 12 h 后分别取材,用液氮冷冻,并保存于 -80 °C 冰箱。大豆 RNA 提取采用 RNAPrep Pure 试剂盒 (天根)。反转录采用 All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR 试剂盒 (全式金) 操作说明进行。

qRT-PCR 采用 UltraSYBR (LOW ROX) 试剂盒 (百奥莱博) 操作说明进行。*GmUBC46* 基因的特异性引物为:上游引物 5'-GCTGCATTTCCATTCCTTCG-3';下游引物 5'-CACATCTCCGTTCCCTTCC-3'。内参基因 *GmRSP.s20e* (NM_001251117.1) 的特异性引物为:上游引物 5'-CGATGAAGCCCAATAAGCCT-3';下游引物 5'-TTTGCACCACGAACCAAGTC-3'。所有试验均设 3 次生物学重复,数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法。

根据 *GmUBC46* 基因 CDS 区设计基因特异性引物:上游引物 5'-AAGGATCCACATGAAAGAGTG-GAAAA TCCTGGAG-3';下游引物 5'-AGAGCTCT-TAAGA ACTTTGAAGACTGCGATCTC-3'。将扩增后的 PCR 产物经 *Bam*H I 与 *Sac* I 双酶切后与 pGADT7 载体连接,构建 pGADT7-*GmUBC46* 酵母

表达载体。采用 PEG/LiAc 法分别将 pGADT7 (阴性对照) 与表达载体 pGADT7-*GmUBC46* 转化酵母菌 AH109,在 SD/-leu 培养基中筛选获得阳性菌。

将含有 pGADT7 的阴性对照菌与 pGADT7-*GmUBC46* 重组菌在 SD/-leu 液体培养基中培养,二次活化后将菌液调至一致,分别用含有 1.2 mol/L NaCl 的 SD/-leu 培养液,1.4 mol/L 甘露醇的 SD/-leu 培养液重悬,30 °C 200 r/min 条件下胁迫培养 5 h 后,在 OD600 下测定菌落浓度。

2 结果与分析

2.1 大豆 UBC 基因家族成员的鉴定

利用拟南芥 UBC 家族成员蛋白序列,通过 blast 比对鉴定出了 41 个大豆 UBC 基因家族成员。利用已鉴定出的 41 个大豆 UBC 家族成员泛素结合酶保守结构域 (Ubiquitin-conjugating enzyme conserved domain),通过构建隐马尔可夫模型 (HMM) 及本地 blast 比对,获得了 214 个 UBC 基因家族成员。进一步通过 PFAM 及 SMART 在线数据库分析蛋白序列及泛素结合酶保守结构域,去掉 152 个重叠基因及 8 个不完整的泛素结合酶保守结构域基因,共鉴定出 54 个非冗余的大豆 UBC 基因家族成员。如表 1 所示,GmUBC 基因家族成员 CDS 区分布在 447~3387 bp 之间,差异较大,同样,蛋白相对分子质量与理论等电点也分别有较大差异,如相对分子质量为 16411.90~124205.20 Da,理论等电点为 4.26~9.65。以上结果表明,GmUBC 家族成员在基因编码序列及理化性质方面存在较大的差异。此外,除第 14 条染色体,GmUBC 基因家族成员均匀地分布在大豆的染色体上。

2.2 大豆 UBC 基因家族的系统进化分析

利用 MEGA 软件构建了拟南芥 UBC 家族基因与该家族的系统进化树 (图 1),54 个 GmUBC 家族基因被分为 11 个亚家族,并且每个亚家族之间的进化关系较远,表明该基因家族在进化过程中可能存在功能分化。其中,编码序列大于 1000 bp 的基因全部分布于 A 亚家族,说明 A 亚家族基因可能相对于其他亚家族基因具有特有的生物学功能。此外,11 个亚家族中都具有进化关系极高的基因,如 B 亚家族的 *GmUBC41* 与 *GmUBC16*、A 亚家族的 *GmUBC27* 与 *GmUBC53*、C 亚家族的 *GmUBC1* 与 *GmUBC4* 等,表明 GmUBC 基因家族可能存在着大量的基因复制现象。

表 1 大豆 UBC 基因家族信息

Table 1 Information of the identified UBC genes in soybean

序号 Number	基因号 Gene ID	基因名 Gene name	编码序列 CDS	氨基酸残基 Amino acid residues	相对分子量 (Da) MW	等电点 pI	染色体 Chromosome
1	<i>Glyma.01G043600</i>	<i>GmUBC1</i>	459	152	17255.50	5.07	1
2	<i>Glyma.01G169700</i>	<i>GmUBC2</i>	486	161	18432.91	7.72	1
3	<i>Glyma.01G188900</i>	<i>GmUBC3</i>	480	159	17987.49	8.43	1
4	<i>Glyma.02G020000</i>	<i>GmUBC4</i>	459	152	17291.51	5.07	2
5	<i>Glyma.03G004200</i>	<i>GmUBC5</i>	777	258	27820.73	9.07	3
6	<i>Glyma.03G255400</i>	<i>GmUBC6</i>	447	148	16548.13	7.72	3
7	<i>Glyma.04G081200</i>	<i>GmUBC7</i>	474	157	17785.58	8.69	4
8	<i>Glyma.04G199200</i>	<i>GmUBC8</i>	579	192	21120.23	4.80	4
9	<i>Glyma.05G035700</i>	<i>GmUBC9</i>	558	185	20897.28	4.31	5
10	<i>Glyma.05G140200</i>	<i>GmUBC10</i>	1353	450	50264.54	4.65	5
11	<i>Glyma.05G209400</i>	<i>GmUBC11</i>	552	183	20632.99	4.27	5
12	<i>Glyma.06G082900</i>	<i>GmUBC12</i>	474	157	17753.54	8.70	6
13	<i>Glyma.06G166300</i>	<i>GmUBC13</i>	579	192	47690.47	5.17	6
14	<i>Glyma.06G230300</i>	<i>GmUBC14</i>	462	153	17191.82	6.14	6
15	<i>Glyma.06G243300</i>	<i>GmUBC15</i>	2610	869	92699.06	5.36	6
16	<i>Glyma.07G046200</i>	<i>GmUBC16</i>	717	283	27112.31	9.25	7
17	<i>Glyma.07G196500</i>	<i>GmUBC17</i>	2784	927	104379.50	5.13	7
18	<i>Glyma.07G239100</i>	<i>GmUBC18</i>	975	324	37156.36	9.65	7
19	<i>Glyma.07G240600</i>	<i>GmUBC19</i>	930	309	34433.99	5.24	7
20	<i>Glyma.08G016100</i>	<i>GmUBC20</i>	552	183	20621.98	4.26	8
21	<i>Glyma.08G095600</i>	<i>GmUBC21</i>	1425	474	53028.58	4.70	8
22	<i>Glyma.08G267400</i>	<i>GmUBC22</i>	447	148	16411.90	6.88	8
23	<i>Glyma.09G036300</i>	<i>GmUBC23</i>	927	308	34552.00	5.26	9
24	<i>Glyma.09G257800</i>	<i>GmUBC24</i>	558	185	21079.49	4.32	9
25	<i>Glyma.10G096200</i>	<i>GmUBC25</i>	447	148	16541.95	6.39	10
26	<i>Glyma.10G212200</i>	<i>GmUBC26</i>	561	186	20758.42	8.70	10
27	<i>Glyma.10G282000</i>	<i>GmUBC27</i>	3387	1128	124205.20	4.66	10
28	<i>Glyma.11G053300</i>	<i>GmUBC28</i>	480	159	18003.49	8.43	11
29	<i>Glyma.11G064000</i>	<i>GmUBC29</i>	552	183	20865.00	7.67	11
30	<i>Glyma.11G095700</i>	<i>GmUBC30</i>	546	181	20052.92	5.49	11
31	<i>Glyma.11G107800</i>	<i>GmUBC31</i>	447	148	16528.08	7.68	11
32	<i>Glyma.11G140900</i>	<i>GmUBC32</i>	501	166	18600.04	5.05	11
33	<i>Glyma.12G021800</i>	<i>GmUBC33</i>	543	180	20191.77	5.54	12
34	<i>Glyma.12G224200</i>	<i>GmUBC34</i>	2115	704	78510.16	5.92	12
35	<i>Glyma.12G228900</i>	<i>GmUBC35</i>	456	151	17433.56	9.59	12
36	<i>Glyma.13G040500</i>	<i>GmUBC36</i>	450	149	16673.26	7.72	13
37	<i>Glyma.13G179600</i>	<i>GmUBC37</i>	2802	933	104609.77	5.00	13
38	<i>Glyma.13G239100</i>	<i>GmUBC38</i>	2760	919	102807.79	5.09	13
39	<i>Glyma.15G074200</i>	<i>GmUBC39</i>	2775	924	103642.60	5.00	15
40	<i>Glyma.15G141200</i>	<i>GmUBC40</i>	921	306	34309.72	5.32	15
41	<i>Glyma.16G014400</i>	<i>GmUBC41</i>	717	238	27092.35	9.24	16
42	<i>Glyma.16G035000</i>	<i>GmUBC42</i>	552	183	20938.42	4.44	16
43	<i>Glyma.16G103100</i>	<i>GmUBC43</i>	447	148	16469.03	8.44	16
44	<i>Glyma.17G032800</i>	<i>GmUBC44</i>	936	311	34778.29	5.40	17
45	<i>Glyma.17G034200</i>	<i>GmUBC45</i>	1017	338	38913.39	6.02	17
46	<i>Glyma.17G034300</i>	<i>GmUBC46</i>	888	295	34219.45	9.57	17
47	<i>Glyma.17G034400</i>	<i>GmUBC47</i>	1002	333	38263.84	9.30	17
48	<i>Glyma.17G091700</i>	<i>GmUBC48</i>	555	184	20807.23	4.38	17
49	<i>Glyma.17G169700</i>	<i>GmUBC49</i>	483	160	18070.57	8.43	17
50	<i>Glyma.18G051400</i>	<i>GmUBC50</i>	447	148	16446.03	7.71	18
51	<i>Glyma.19G072800</i>	<i>GmUBC51</i>	801	266	28860.05	9.12	19
52	<i>Glyma.19G121700</i>	<i>GmUBC52</i>	780	259	27973.99	9.07	19
53	<i>Glyma.20G107300</i>	<i>GmUBC53</i>	3375	1124	123662.38	4.61	20
54	<i>Glyma.20G178900</i>	<i>GmUBC54</i>	561	186	20929.68	4.95	20

CDS: Coding sequences, MW: Molecular weights, pI: Isoelectric points

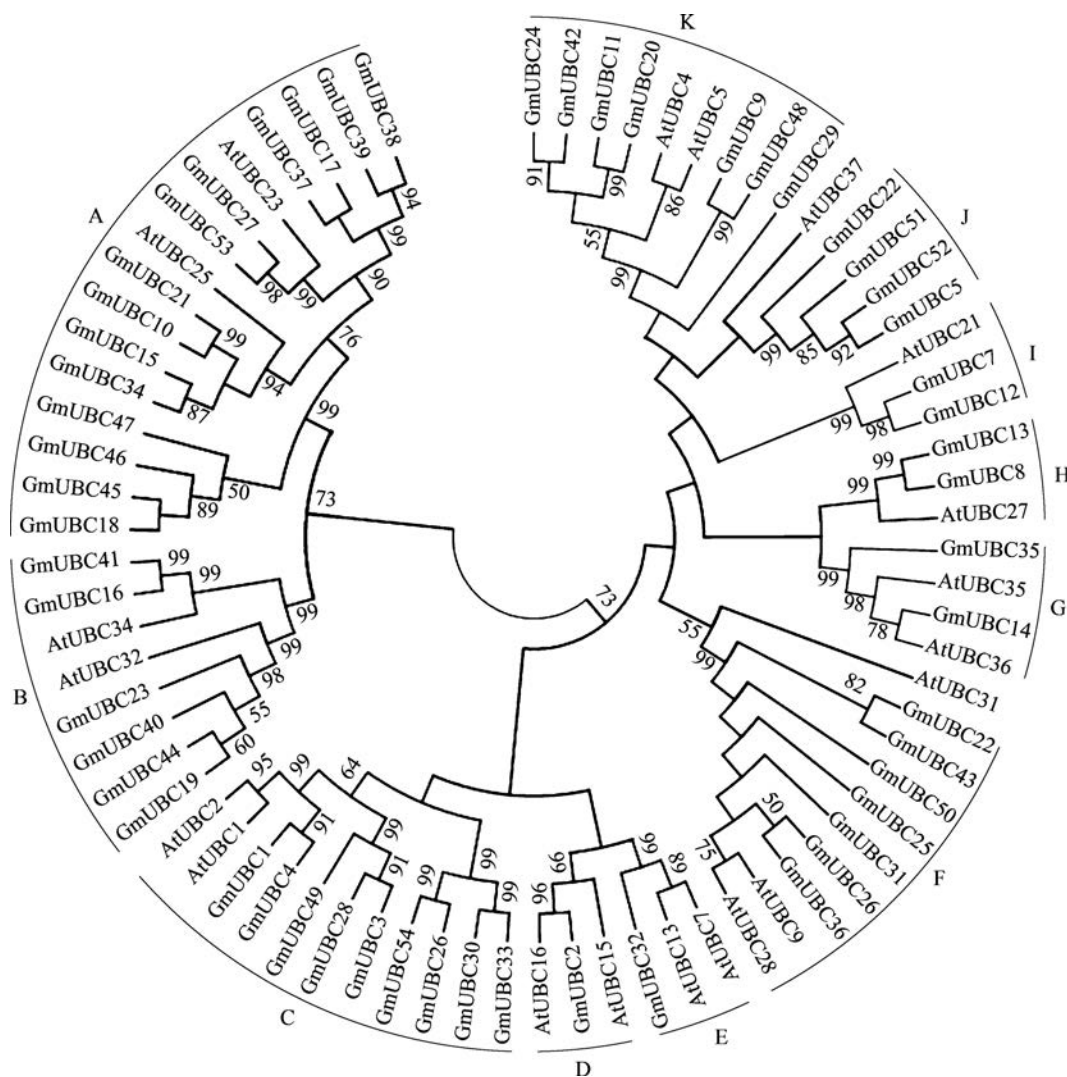


图1 大豆 UBC 基因家族系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of UBC gene family members in soybean

2.3 大豆 UBC 家族的蛋白保守结构域分析

利用 MEME 在线软件进行 GmUBC 家族蛋白序列的保守结构域分析比较(图 2),除 *GmUBC35* 不含 Motif 1 外,其余 GmUBC 家族蛋白均含有保守 Motif 1、Motif 2 与 Motif 3,且保守 Motif 1、Motif 2 和 Motif 3 均属于泛素结合酶保守结构域。结果表明,尽管 GmUBC 家族蛋白序列大小存在较大的差异,但其具有高度的序列保守性。

2.4 大豆 UBC 基因家族的组织定位分析

利用 Phytozome 中大豆基因表达数据库,分析 UBC 基因在大豆根、茎、叶、花、种子与豆荚中的表达量(图 3)。结果表明,除 *GmUBC43*、*GmUBC45* 与 *GmUBC47* 基因外,UBC 家族成员在大豆各组织中均有所表达,且在各组织表达量均有差异性。其中,*GmUBC1*、*GmUBC15*、*GmUBC18* 与 *GmUBC46* 在各组织中表达量较低,*GmUBC6* 在各组织中的表

达量最高。以上结果表明,GmUBC 基因家族成员可能在植物的生长发育过程中发挥着不同的作用。

2.5 干旱、盐与冷胁迫应答的大豆 UBC 基因筛选

通过 NCBI 数据库中的大豆在干旱、盐与冷胁迫下的转录组数据,分析大豆 UBC 家族基因在胁迫下的表达量。结果如图 4 所示,共有 20 个大豆 UBC 基因在冷、盐与干旱胁迫下具有不同的响应模式。其中,有 6 个 UBC 基因响应干旱胁迫上调或下调表达;10 个 UBC 基因响应盐胁迫上调或下调表达,其中 *GmUBC18* 基因在盐胁迫下胁迫 1 h 与 6 h 表达量最显著;在冷胁迫下,*GmUBC2/16/23/31/40/44/46* 在 12 h 显著上调表达,而 *GmUBC24/30/37/48/54* 下调表达,预示着这两类基因可能在冷胁迫下参与了不同的信号转导途径。我们发现 *GmUBC46* 基因在干旱、盐与冷胁迫下均上调表达,推测 *GmUBC46* 基因在胁迫反应中起着重要的作用。

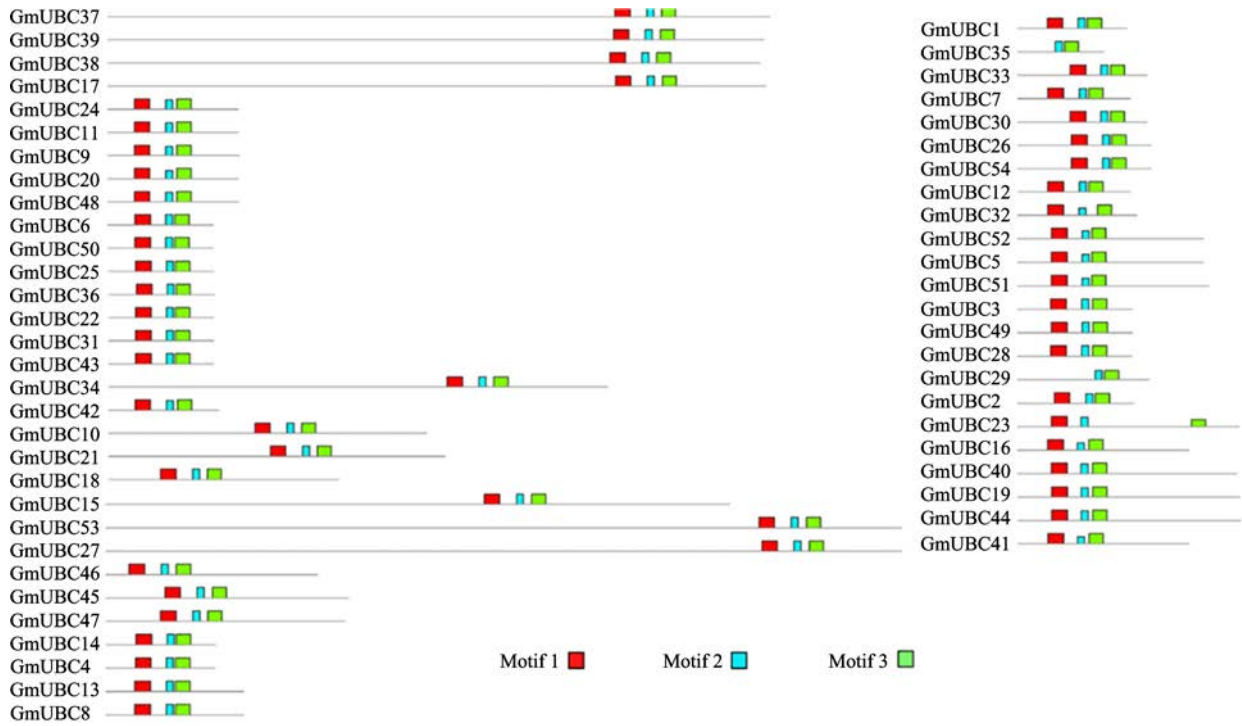


图 2 大豆 UBC 基因家族保守结构域

Fig.2 Conserved motifs of UBC gene family members in soybean

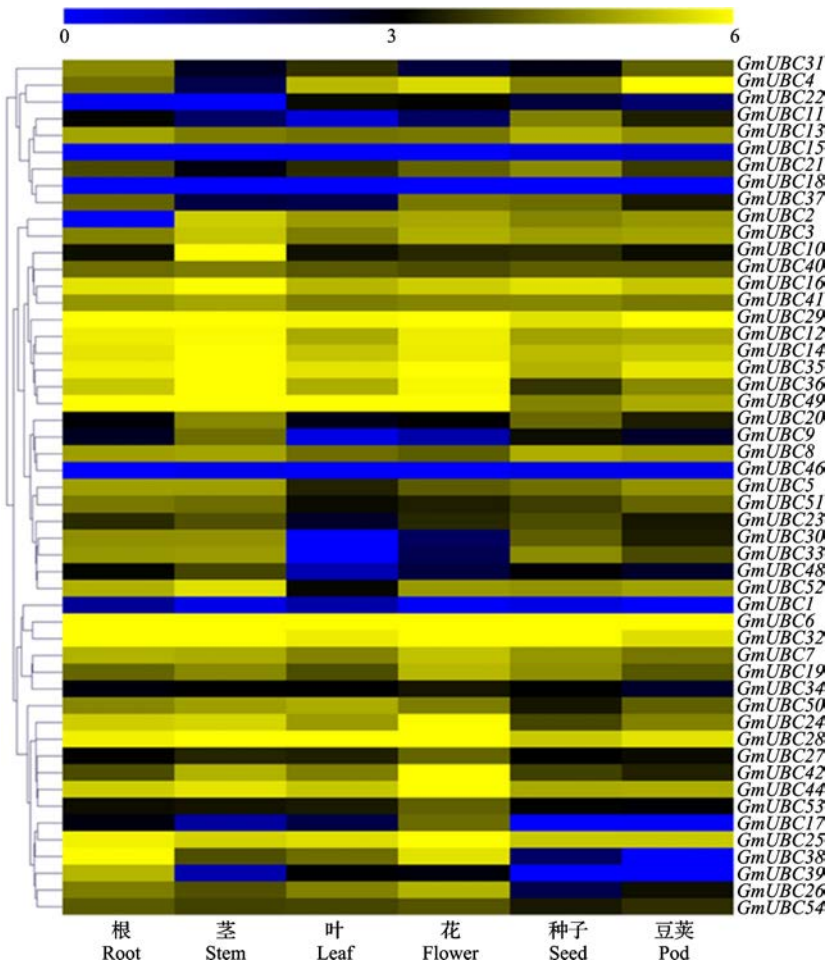


图 3 大豆 UBC 基因家族的组织定位分析

Fig.3 Tissue expression analysis of UBC gene family members in soybean

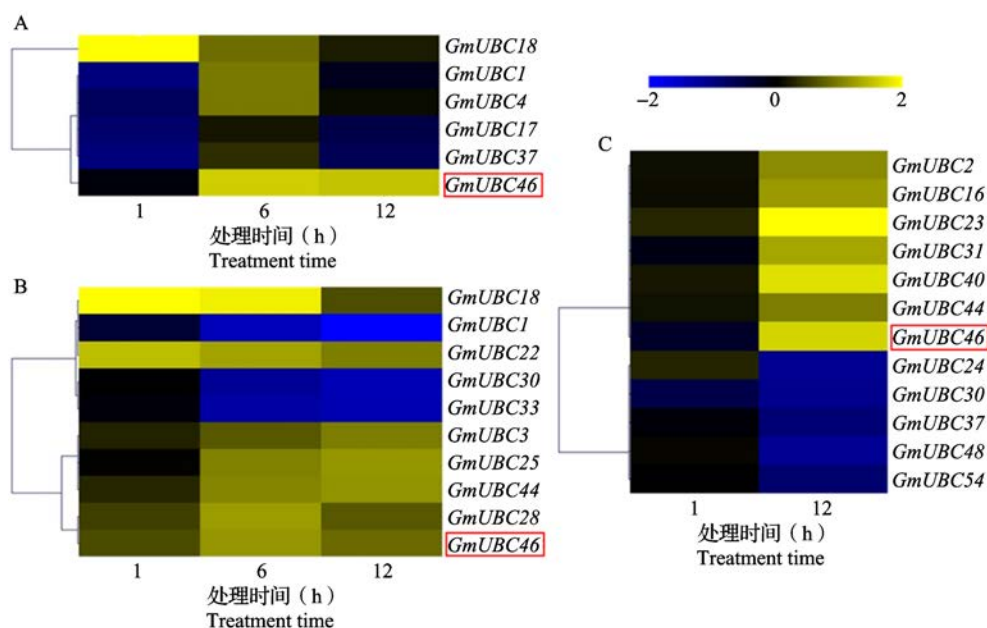


图4 大豆 UBC 家族基因在干旱 (A)、盐 (B) 及冷胁迫 (C) 下的表达分析
Fig.4 Expression analysis in subset of UBC gene family members under drought (A), salt (B) and cold (C) stresses in soybean

2.6 大豆 UBC 基因启动子元件的分析

植物激素响应及非生物胁迫响应的顺式作用元件在胁迫应答反应中起着重要的作用^[13]。为了阐明参与干旱、盐与冷胁迫反应的大豆 UBC 基因可能参与的胁迫应答途径,利用 PLANTCARE 在线数据库分析其启动子序列。结果如图 5 所示,响应干旱、盐与冷胁迫反应的 UBC 基因均含有不同的与激素相关的顺式作用元件,如 ABA (ABRE)、茉莉酸甲

酯 (MeJA)、水杨酸 (SA) 与赤霉素 (GA); 或生物胁迫与非生物胁迫相关的顺式作用元件,如冷胁迫 (LTR)、干旱胁迫 (MBS) 或防御胁迫 (Defense and Stress) 等。其中,全部的 UBC 基因均含有 ABA 信号转导相关的顺式作用元件,预测参与干旱、盐与冷胁迫反应的 UBC 基因可能与 ABA 信号转导通路有着重要的关系。

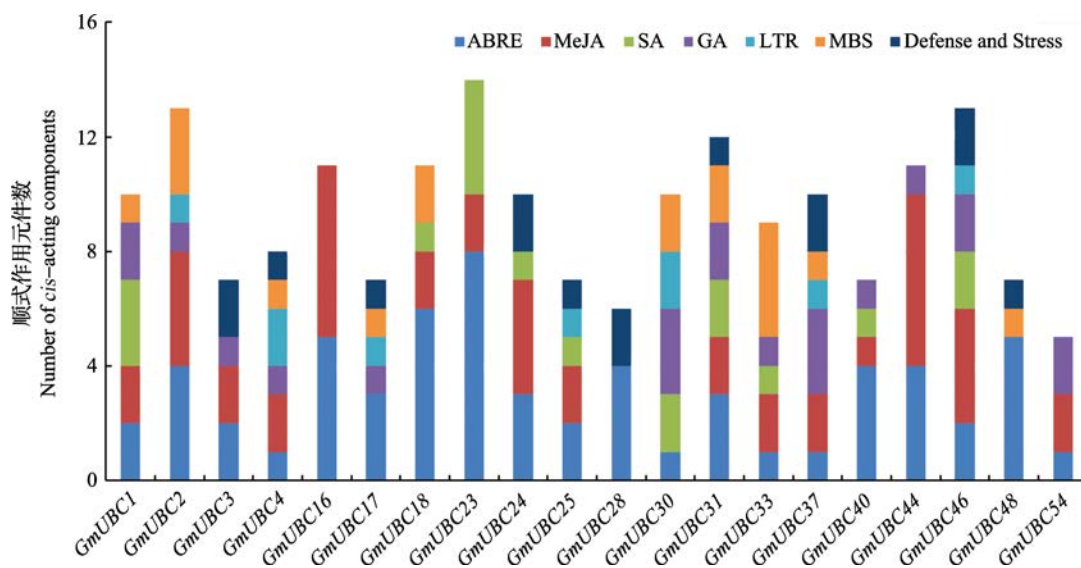


图5 启动子顺式作用元件分析
Fig.5 Analysis of promoter *cis*-acting elements

2.7 *GmUBC46* 基因在干旱、盐与冷胁迫下的表达特性及功能分析

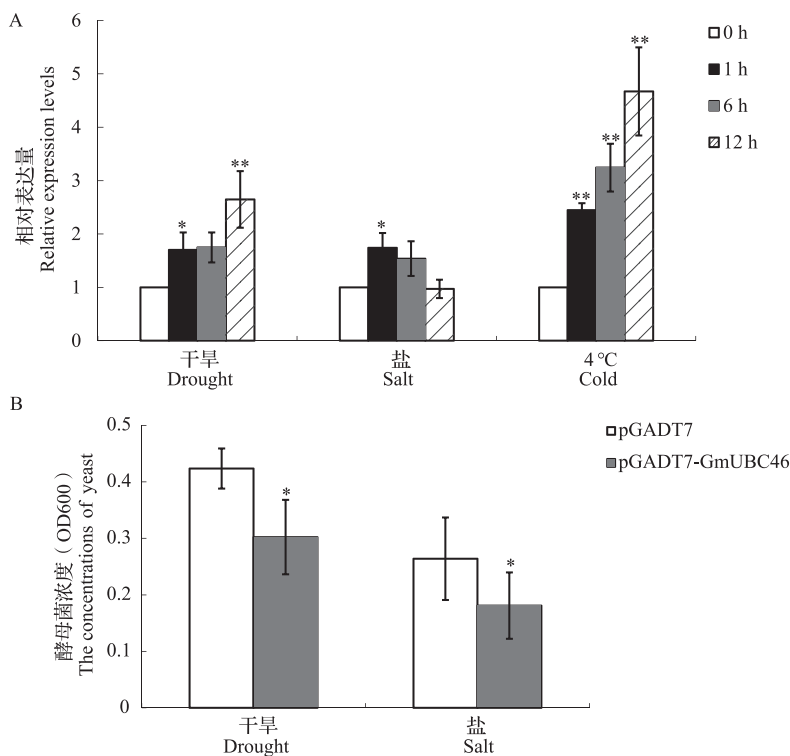
利用 qRT-PCR 分析大豆在 300 mmol/L 甘露醇、200 mmol/L NaCl 与 4 °C 处理下的 *GmUBC46* 基因的表达特性。结果如图 6A 所示, *GmUBC46* 基因在 6 h 与 12 h 受干旱胁迫上调表达, 在 1 h 受盐胁迫诱导上调表达, 在 1 h、6 h 与 12 h 受冷胁迫诱导显著上调表达。结果进一步表明 *GmUBC46* 基因可能在干旱、盐与冷胁迫中起着重要的作用。

为了进一步确定 *GmUBC46* 基因的功能, 挑取含有 *GmUBC46* 基因的重组酵母菌与对照菌, 在 SD/-leu 筛选培养液中培养, 将重组酵母菌与对照组菌液调至一致后, 分别用含有 1.2 mol/L 的 NaCl 或 1.4 mol/L 的甘露醇 SD/-leu 培养液胁迫培养 5 h, 测定菌液浓度。结果如图 6B 所示, 在盐胁迫下含 *GmUBC46* 基因的重组酵母菌存活率显著低于对照, 在甘露醇胁迫处理下的重组酵母菌也显著低于对照。结果表明, *GmUBC46* 基因在酵母菌中的超量表达降低了对盐和干旱的耐受性。

3 讨论

大豆是重要的粮食与油料作物, 其含有丰富的蛋白质和不饱和脂肪酸。同时, 干旱、盐与冷等非生物胁迫严重影响着大豆的产量与品质。因此, 培育耐非生物胁迫的优良大豆品种, 对提高大豆产量具有重要的意义。随着大豆基因组测序的完成, 越来越多的响应大豆非生物胁迫的基因家族被鉴定出来, 如大豆 DREB 转录因子^[14]、YABBY 转录因子^[15]、ANK^[16]与 CDPK 蛋白激酶基因家族^[17]。已有研究表明, 大豆 UBC 基因家族在植物响应非生物胁迫方面起着重要的作用^[9-11], 但是还未有从基因家族角度系统分析研究大豆 UBC 基因的特性及对非生物胁迫的响应。

本研究通过构建隐马尔可夫模型 (HMM) 及本地 blast 比对, 筛选获得了 54 个非冗余的大豆 UBC 基因家族成员。结合已有研究发现, 拟南芥中含有 28 个 UBC 基因^[18], 本研究中的大豆 UBC 基因数量远远多于拟南芥, 说明大豆基因组在复制过程中增加了 UBC 基因数, 结合基因家族系统进化树分



A: *GmUBC46* 基因分别在 300 mmol/L 甘露醇、200 mmol/L NaCl 与 4 °C 处理下的表达特性;

B: *GmUBC46* 基因在 1.2 mol/L NaCl 或

1.4 mol/L 甘露醇胁迫后的存活率; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$

A: Expression analysis of *GmUBC46* under 300 mmol/L mannitol, 200 mmol/L NaCl and 4 °C treatments,

B: Survival rate of *GmUBC46* under 1.2 mol/L NaCl or 1.4 mol/L mannitol stress, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$

图 6 *GmUBC46* 基因表达分析及功能分析

Fig.6 Expression and function analysis of *GmUBC46*

析,表明大豆 UBC 基因存在基因复制关系。已有研究表明番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 中含有 56 个 UBC 基因,并存在大量的基因复制现象^[19],这与大豆中的 UBC 基因复制现象一致。

对大豆 UBC 基因家族保守结构域分析,发现该家族成员均具有保守的泛素结合酶保守结构域。但对其基因信息分析发现,该家族成员氨基酸残基数、蛋白相对分子质量与理论等电点等存在较大差异。进一步通过系统进化树分析表明,该家族分为 A~K 等 11 个亚家族,并且每个亚家族之间的进化关系较远。说明大豆 UBC 基因家族在进化过程中可能存在较大的功能分化,这一结果与该基因家族在大豆根、茎、叶、花、种子与豆荚等组织中的表达量差异性大的结果一致。以上结果表明,大豆 UBC 基因家族在进化过程中可能存在功能分化,在植物生长发育的各个过程中起着重要的作用,但该基因家族在进化过程中保留了保守的泛素结合酶结构域。

已有研究结果指出 UBC 基因广泛参与了植物对非生物胁迫的响应^[9-10],表明该基因家族与逆境调控有关。本研究发现,大豆 UBC 家族基因中分别有 6 个、10 个和 12 个基因在干旱、盐或冷胁迫下诱导上调或下调表达,说明该基因家族部分成员积极参与了胁迫应答过程。为了进一步对响应干旱、盐与冷胁迫的应答基因研究提供一定的理论支持,本研究对其进行了启动子元件分析。结果发现响应干旱、盐或冷胁迫反应的 UBC 基因均含有不同的与激素相关,或与生物与非生物胁迫相关的顺式作用元件,说明 UBC 基因响应胁迫反应的途径依赖于这些顺式作用元件的作用。研究发现 ABA 依赖的信号转导途径能通过调控下游基因的表达,对干旱或盐等胁迫反应起着重要的调控作用^[20-21]。本研究发现这些 UBC 基因均含有 ABA 响应的顺式作用元件,推测其胁迫反应过程可能与 ABA 信号转导通路有着重要的关系。

研究发现拟南芥的 *AtUBC32* 基因能提高对盐胁迫的耐受性^[22],异源表达大豆 *GmUBC2* 基因于拟南芥中能显著提高植株对干旱与盐的耐受性^[23]。为了探究大豆 UBC 基因在干旱、盐与冷胁迫下的功能,在大豆 UBC 家族基因的转录组数据中发现,仅 *GmUBC46* 基因在干旱、盐与冷胁迫诱导下均上调表达,我们进一步通过 qRT-PCR 验证了该结果。将 *GmUBC46* 基因异源表达在酵母中,发现该基因

降低了对干旱与盐胁迫的耐受性,表明 *GmUBC46* 基因在胁迫反应中起着负调控的作用,这与拟南芥 *AtUBC32*、*AtUBC33* 与 *AtUBC34* 基因能降低对干旱耐受性的结果一致^[11]。同时,本研究发现,虽然 *GmUBC46* 基因积极响应冷胁迫诱导上调表达,但初步证明该基因在酵母细胞中未表现出耐冷胁迫表型。以上结果表明 UBC 基因在非生物胁迫反应中的重要作用,也进一步说明该基因家族广泛参与了植物的不同的生物学过程。

综上,本研究从基因家族角度系统分析了大豆 UBC 基因的蛋白理化性质、系统进化关系、保守结构域及启动子顺式作用元件;进一步利用测序数据库分析了大豆 UBC 家族基因的组织定位及在干旱、盐及冷胁迫下的表达模式;通过 Real-time PCR 确定了积极响应干旱、盐及冷胁迫的应答基因 *GmUBC46*,通过功能验证显示 *GmUBC46* 在酵母中降低了对干旱与盐胁迫的耐受性。在后续研究中,我们将进一步在植物中探究 *GmUBC46* 的功能及分子机制。综上,本研究为大豆 UBC 基因后续研究提供了重要依据和参考价值。

参考文献

- [1] Kurepa J, Wang S, Li Y, Smalle J. Proteasome regulation, plant growth and stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior*, 2009, 4(10): 924-927
- [2] 王瑞同,王景一,毛新国,吕小平,刘惠民,景蕊莲. 小麦 RING 型 E3 泛素连接酶基因 *TaSDIR1-D* 克隆与功能分析. *植物遗传资源学报*, 2018, 19(5): 951-958
Wang R T, Wang J Y, Mao X G, Chang X P, Liu H M, Jin R L. Cloning and functional analysis of a RING-type E3 ubiquitin ligase gene *TaSDIR1-D* in wheat. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2018, 19(5): 951-958
- [3] Sharma B, Joshi D, Yadav P K, Gupta A K, Bhatt T K. Role of ubiquitin-mediated degradation system in plant biology. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 806
- [4] Hellmann H, Estelle M. Plant development: regulation by protein degradation. *Science*, 2012, 297(5582): 793-797
- [5] 朱美娇,张海玲,徐香玲,张会新,姚琳,王全伟,张必弦. 泛素/26S 蛋白酶体途径调节非生物胁迫的研究进展. *北方园艺*, 2015(3): 188-192
Zhu M J, Zhang H L, Xu X L, Zhang H X, Yao L, Wang Q W, Zhang B X. Research advance in the ubiquitin/26S proteasome pathway regulating abiotic stress. *Northern Horticulture*, 2015, (3): 188-192
- [6] 李会勇. 拟南芥中 RING 型 E3 泛素连接酶基因 *AtGW2* 的克隆和功能分析. *植物遗传资源学报*, 2011, 12(3): 448-454
Li H Y. Cloning and functional analysis of *Arabidopsis thaliana* *AtGW2*, a RING-type E3 ubiquitin ligase protein. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2011, 12(3): 448-454

- [7] 范锡麟,杜强,杨珍珍,何艳冰,王国梁,王志龙. 水稻泛素连接酶基因 *OsRING6* 的克隆及表达分析. 植物遗传资源学报, 2016, 17(2): 337-343
Fan X L, Du Q, Yang Z Z, He Y B, Wang G L, Wang Z L. Cloning and expression analysis of the rice ubiquitin ligase gene *OsRING6*. Journal of Plant Genetic Resources, 2016, 17(2): 337-343
- [8] Bae H, Kim W T. Classification and interaction modes of 40 rice E2 ubiquitin-conjugating enzymes with 17 rice ARM-U-box E3 ubiquitin ligases. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 444(4): 575-580
- [9] Jue D W, Sang X, Lu S, Dong C, Zhao Q, Chen H, Jia L. Genome-Wide identification, phylogenetic and expression analyses of the ubiquitin conjugating enzyme gene family in maize. PLoS One, 2015, 10(11): e0143488
- [10] Jue D, Sang X, Liu L, Shu B, Wang Y, Xie J, Liu C, Shi S. The ubiquitin-conjugating enzyme gene family in Longan (*Dimocarpus longan* Lour.): genome-wide identification and gene expression during flower induction and abiotic stress responses. Molecules, 2018, 23(3): E662
- [11] Ahn M Y, Oh T R, Seo D H, Kim J H, Cho N H, Kim W T. *Arabidopsis* group XIV ubiquitin-conjugating enzymes *AtUBC32*, *AtUBC33*, and *AtUBC34* play negative roles in drought stress response. Journal of Plant Physiology, 2018, 230: 73-79
- [12] Bahmani R, Kim D, Lee B D, Hwang S. Over-expression of tobacco *UBC1* encoding a ubiquitin-conjugating enzyme increases cadmium tolerance by activating the 20S/26S proteasome and by decreasing Cd accumulation and oxidative stress in tobacco (*Nicotiana tabacum*). Plant Molecular Biology, 2017, 94(4-5): 433-451
- [13] Priest H D, Filichkin S A, Mockler T C. *Cis*-regulatory elements in plant cell signaling. Current Opinion in Plant Biology, 2009, 12(5): 643-649
- [14] 成舒飞,端木慧子,陈超,刘艾林,肖佳雷,朱延明. 大豆 MYB 转录因子的全基因组鉴定及生物信息学分析. 大豆科学, 2016, 35(1): 52-57
Cheng S F, Duanmu H Z, Chen C, Liu A L, Xiao J L, Zhu Y M. Whole genome identification of soybean MYB transcription factors and bioinformatics analysis. Soybean Science, 2016, 35(1): 52-57
- [15] Zhao S P, Lu D, Yu T F, Ji Y J, Zheng W J, Zhang S X, Chai S C, Chen Z Y, Cui X Y. Genome-wide analysis of the YABBY family in soybean and functional identification of *GmYABBY10* involvement in high salt and drought stresses. Plant Physiology and Biochemistry, 2017, 119: 132-146
- [16] Zhang D, Wan Q, He X, Ning L, Huang Y, Xu Z, Liu J, Shao H. Genome-wide characterization of the ankyrin repeats gene family under salt stress in soybean. Science of the Total Environment, 2016, 568: 899-909
- [17] Liu H, Che Z, Zeng X, Zhou X, Siteo H M, Wang H, Yu D. Genome-wide analysis of calcium-dependent protein kinases and their expression patterns in response to herbivore and wounding stresses in soybean. Functional and Integrative Genomics, 2016, 16(5): 481-493
- [18] Kraft E, Stone S L, Ma L, Su N, Gao Y, Lau O S, Deng X W, Callis J. Genome analysis and functional characterization of the E2 and RING-type E3 ligase ubiquitination enzymes of *Arabidopsis*. Plant Physiology, 2005, 139(4): 1597-1611
- [19] Sharma B, Bhatt T K. Genome-wide identification and expression analysis of E2 ubiquitin-conjugating enzymes in tomato. Scientific Reports, 2017, 7(1): 8613
- [20] Umezawa T, Nakashima K, Miyakawa T, Kuromori T, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. Plant and Cell Physiology, 2010, 51(11): 1821-1839
- [21] Liu S, Lv Z, Liu Y, Li L, Zhang L. Network analysis of ABA-dependent and ABA-independent drought responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. Genetics and Molecular Biology, 2018, 41(3): 624-637
- [22] Cui F, Liu L J, Zhao Q, Zhang Z, Li Q, Lin B, Wu Y, Tang S, Xie Q. *Arabidopsis* ubiquitin conjugase UBC32 is an ERAD component that functions in brassinosteroid-mediated salt stress tolerance. Plant Cell, 2012, 24(1): 233-244
- [23] Zhou G A, Chang R Z, Qiu L J. Overexpression of soybean ubiquitin-conjugating enzyme gene *GmUBC2* confers enhanced drought and salt tolerance through modulating abiotic stress-responsive gene expression in *Arabidopsis*. Plant Molecular Biology, 2010, 72(4-5): 357-367