

大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 致敏蛋白 Gly m Bd 30K 检测方法及其低致敏优异种质鉴定

周明明¹, 张明俊¹, 王 俊¹, 邱丽娟²

(¹ 长江大学农学院, 湖北荆州 434025; ² 农作物基因资源与遗传改良国家重大科学工程 /
农业部北京大豆生物学重点实验室 / 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: Gly m Bd 30K 蛋白是大豆中主要的免疫显性过敏原之一, 会引起人和牲畜腹泻和肠道炎症等过敏反应。因此, 发掘低 Gly m Bd 30K 蛋白含量优异种质对于培育优质大豆品种具有重要意义。为了获得致敏蛋白 Gly m Bd 30K 低含量的优异种质, 根据 Gly m Bd 30K 蛋白的 190-379aa 多肽序列制备多克隆抗体; 对来源于山西省的 29 份种质, 利用 Western blot 技术对其 Gly m Bd 30K 蛋白含量进行检测; 并扩增和分析 *Gly m Bd 30K* 基因序列; 利用荧光定量 PCR 技术对筛选出的低 Gly m Bd 30K 含量种质进行表达分析。结果表明: 从参试种质中鉴定出 2 份 Gly m Bd 30K 蛋白含量低的种质, Gly m Bd 30K 蛋白低含量种质的鉴定效率为 6.9%, 分别是来自太原市的大豆种质 134 (ZDD02046) 和大青豆 (ZDD02174), 其 *Gly m Bd 30K* 基因序列与 Williams82 相比, 在启动子上都有 TA 重复序列变异, 134 (ZDD02046) 有 8 次 TA 重复, 大青豆 (ZDD02174) 有 42 次 TA 重复, 表达分析结果显示, 134 (ZDD02046) 的转录水平显著低于大青豆 (ZDD02174), 推测启动子上 TA 多态性可能影响了其转录水平。本研究建立 Gly m Bd 30K 蛋白含量测定的方法, 鉴定出 2 份低蛋白含量的优异种质, 为今后选育优质蛋白组合的大豆新品种提供了技术和材料支撑。

关键词: 大豆; 过敏原; Gly m Bd 30K; 种质筛选; Western blot

Detection Method of Allergen Gly m Bd 30K and Identification of Elite Accessions with Low Allergenicity in Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.)

ZHOU Ming-ming¹, ZHANG Ming-jun¹, WANG Jun¹, QIU Li-juan²

(¹ Yangtze University, College of Agriculture, Hubei Jingzhou 434025; ² National Key Facility for Crop Gene
Resources and Genetic Improvement / Key Laboratory of Soybean Biology in Beijing (MOA) / Institute of
Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: Gly m Bd 30K protein is recognized as a major immunodominant allergen in soybean, and this protein can lead to anaphylaxis such as diarrhea and intestinal inflammation in humans and livestock. The exploration of germplasm with lower Gly m Bd 30K content is important in breeding for elite functional soybean varieties. In this study, we generated the polyclonal antibody targeting to the 190-379aa peptides of the Gly m Bd 30K protein, followed by quantifying the Gly m Bd 30K protein using Western blot in 30 soybean accessions that were derived from Shanxi province. The genomic sequence of the *Gly m Bd 30K*

收稿日期: 2020-06-18 修回日期: 2020-08-13 网络出版日期: 2020-09-02

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20200618001>

第一作者研究方向为大豆基因挖掘, E-mail: zml589247458@163.com

通信作者: 邱丽娟, 研究方向为大豆基因资源挖掘与利用, E-mail: qiliujuan@caas.cn

王俊, 研究方向为大豆分子生物学与遗传育种, E-mail: wangjagri@yangtzeu.edu.cn

基金项目: 农作物种质资源保护与利用专项 (2019NWB036-05); 中国农科院科技创新工程项目

Foundation projects: Special Project for Protection and Utilization of Crop Germplasm Resources (2019NWB036-05), Science and Technology
Innovation Project of Chinese Academy of Agricultural Sciences

gene and its transcriptional level was further conducted. As a result, two germplasms (134, ZDD02046, Daqingdou, ZDD02174) with lower Gly m Bd 30K protein content have been identified, the identification efficiency is 6.9%. Both accessions displayed 8 and 42 TA repeats respectively in the promoter of the *Gly m Bd 30K* gene if compared with that of Willams82. The transcription level in 134 (ZDD02046) was found to be significantly lower than that of Daqingdou (ZDD02174). It is speculated that TA polymorphism in the promoter may associate with the *Gly m Bd 30K* expression. Collectively, this study established a strategy on the quantification of Gly m Bd 30K protein content and identified two accessions with lower Gly m Bd 30K protein, which will provide technical and material supports in breeding for new soybean varieties with high-quality proteins.

Key words: soybean; allergen; Gly m Bd 30K; germplasm screening; Western blot

大豆含有丰富的蛋白质和平衡氨基酸,能被加工成各种豆制品,如酱油、豆豉和豆浆等。此外它还可作为医药、保健品的原料和牲畜饲料,是人和牲畜重要的植物性蛋白来源。但是,自 1934 年 Duke^[1]首次发现大豆蛋白可能引起婴幼儿腹泻、虚脱和肠道炎症反应以来,越来越多的研究表明一些大豆蛋白会导致人和牲畜的过敏反应。大豆目前属于公认的八大类食物过敏原之一^[2],大豆过敏的患病率在一般人群中可高达 0.5%,在儿童中高达 13%^[3];美国、欧盟、加拿大、澳大利亚、新西兰等国家都强制性要求在食品标签中标识大豆、花生、奶、蛋等过敏原^[4]。但是,食品过敏原标识只能指导人们通过少吃大豆食品来避免大豆过敏原的接触,而筛选出低敏感大豆种质,并利用这些种质培育低敏感品系,对大豆易感人群的营养摄入及健康安全有重要意义。

截至 2018 年 5 月,致敏原数据库 (<http://www.allergenonline.org/>) 已收录 12 种大豆过敏原,包括 Gly m Bd 28K、Gly m Bd 30K、Gly m Bd 60K、大豆疏水蛋白 (Gly m 1)、胰蛋白酶抑制剂 (KTI) 等,且每种过敏原都有不同的类型,其中, Gly m Bd 30K 有 3 种类型过敏原,能被 65% 的大豆过敏患者的血清识别,认为是大豆中的主要致敏蛋白^[5]。Gly m Bd 30K 也被称为 P34,是一种半胱氨酸蛋白酶,属于木瓜蛋白酶超家族,普遍存在于大豆种子细胞液泡中^[6]。Gly m Bd 30K 也是一种糖蛋白,其 N 端 170 位氨基酸处是多糖链结合位点^[7],有研究表明蛋白质的糖基化在其致敏性方面发挥重要作用^[8]。另外, Ji 等^[9]研究发现 Gly m Bd 30K 能与丁香内脂 (syringolide) 结合,而丁香内脂是能引起携带抗性基因 *Rpg4* 大豆品种超敏反应的引发剂,推测 Gly m Bd 30K 可能是介导丁香内脂信号传导的受体; Okinaka 等^[10]利用酵母双杂实验发现 Gly m Bd 30K 能与大豆光呼吸酶 NADH 依赖的羟基

丙酮酸还原酶 (HPR) 相互作用,推测后者是 Gly m Bd 30K 的第二信使。深入研究 Gly m Bd 30K 的生物学功能,对筛选 Gly m Bd 30K 蛋白低含量或者缺失的大豆种质具有重要意义。

目前筛选低 Gly m Bd 30K 蛋白的常用方法有 Western blot 和酶联免疫技术,两者都是根据抗原抗体结合的原理来检测蛋白量,酶联免疫反应能定量地读出蛋白的浓度,但却不能排除非特异性条带的结合, Western blot 虽然只能定性地显示蛋白条带的差异,但能忽略非特异性条带的影响。由于大豆中过敏原较多,本实验制备的抗体为纯化的 Gly m Bd 30K 多克隆抗体,为了排除非特异性条带的误差,提高实验的准确性,选择利用 Western blot 技术检测大豆种质中的 Gly m Bd 30K 蛋白含量。

张跃强等^[11]在我国大豆核心种质部分样本中没有发现 Gly m Bd 30K 缺失种质, Joseph 等^[12]检测了 16266 份大豆种质,鉴定出 12 份 Gly m Bd 30K 低含量种质,其中 PI567476 (又名榆次黄) 来源于我国山西省榆次市。2016 年, Geng 等^[13]研究表明环境因素对过敏原水平的影响要大于遗传因素。因此,本研究随机选择来源于山西省的 29 份种质,利用 Western blot 技术检测其 Gly m Bd 30K 蛋白含量,在中国首次鉴定出 Gly m Bd 30K 低含量种质,本研究为大豆优异种质筛选提供了新思路,也为大豆低致敏品种培育提供了技术和材料支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所用的 31 份大豆种质来源于中国农业科学院种质库 (表 1),都是地方品种,属于北方春大豆。其中, Willams82 是 Gly m Bd 30K 正常含量种质,作为阴性对照,榆次黄是 Gly m Bd 30K 低含量种质,作为阳性对照。

表 1 31 份参试种质的名称、来源和类型

Table 1 Name, origin and ecological type of 31 participating germplasms

序号 Order	统一编号 Uniform code	种质名称 Germplasm name	产地来源 Origin
1	ZDD02036	黄豆	中国山西清徐
2	ZDD02342	霸王鞭	中国山西清徐
3	ZDD02040	天鹅蛋	中国山西寿阳
4	ZDD02041	大黄豆	中国山西寿阳
5	ZDD02078	大黄豆	中国山西太谷
6	ZDD02079	大豆	中国山西太谷
7	ZDD02369	大黑豆	中国山西太谷
8	ZDD02370	小黑豆	中国山西太谷
9	ZDD02389	大豆	中国山西太谷
10	ZDD02042	天鹅蛋	中国山西太原
11	ZDD02043	大黄豆	中国山西太原
12	ZDD02044	灰老鼠	中国山西太原
13	ZDD02045	白黑豆	中国山西太原
14	ZDD02046	134	中国山西太原
15	ZDD02047	洋歌豆	中国山西太原
16	ZDD02048	黑嘴豆	中国山西太原
17	ZDD02174	大青豆	中国山西太原
18	ZDD02333	金星豆	中国山西太原
19	ZDD02334	平顶山	中国山西太原
20	ZDD02556	蚕丝豆	中国山西太原
21	ZDD02051	天鹅蛋	中国山西榆次
22	ZDD02052	大黄豆	中国山西榆次
23	ZDD02053	小黄豆	中国山西榆次
24	ZDD02061	榆选 12	中国山西榆次
25	ZDD02343	大黑豆	中国山西榆次
26	ZDD02344	平顶山	中国山西榆次
27	ZDD02345	鸽次条	中国山西榆次
28	ZDD02062	大洋白豆	中国山西榆社
29	ZDD02353	秋黑豆	中国山西榆社
30	ZDD02058	榆次黄	中国山西榆次
31	WDD00587	Willamd82	美国

1.2 试验方法

1.2.1 Gly m Bd 30K 抗原表位分析及抗体的制备

利用 DNA Star 软件对 Gly m Bd 30K 蛋白进行功能分析, 分析 Gly m Bd 30K 蛋白的线性表位、亲水性、免疫原性、表面极性等性质 (图 1)。蛋白质二级结构中的 β 转角是凸出结构, 此序列通常位于蛋白质的表面, 容易与抗体结合; 蛋白质序列的亲水性、柔软性越好, 氨基酸残基越容易与抗体结合; 抗原指数大于 0、表面极性大于 1 的氨基酸残

基越容易成为抗原表位, 与抗体结合。综合以上数据, 选择了 190-379aa 的多肽序列作为抗原制备 Gly m Bd 30K 抗体。首先, 设计引物 30pAB-F: TGTGTGGAAGAAAGCGAAGGTTG, 30pAB-R: TCAAAGAGGAGAGTGATCAACTCTTCG 克隆 Gly m Bd 30K 基因的 190-379aa 序列, N 端连接 His 标签, 转入表达载体 pET-28a-SUMO 中, 然后转化表达菌株 *E.coli Rosetta*, 最后用表达的 190-379aa 融合蛋白免疫日本大耳白兔, 亲和纯化后获得 Gly m Bd 30K 多克隆抗体。

1.2.2 蛋白提取 用电钻磨取大豆种脐背部豆粉, 称量豆粉 5.0 mg 于 2.0 mL 离心管中, 在通风橱处加入对应的 500 μ L 蛋白提取液 (使用前加入 2% 的 β -巯基乙醇)。用振荡器充分振荡 10 min, 使底部豆粉完全溶解于提取液中。在 4 $^{\circ}$ C 条件下 12000 r/min 离心 10 min, 离心完毕后吸取 100 μ L 上清液转移到新的 2.0 mL 离心管中, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.2.3 SDS-PAGE 电泳和免疫印迹 SDS-PAGE 不连续垂直电泳仪电泳的制备详见试剂盒说明 (北京博迈斯生物科技有限公司)。上样 5.0 μ L 蛋白提取液, 浓缩胶阶段 100 V 恒压电泳, 分离胶阶段 120 V 恒压电泳, 待溴酚蓝条带移动到分离胶底部时 (约 2 h) 停止电泳。用考马斯亮蓝 R250 染 3 h (2.25 g 考马斯亮蓝 R250, 440 mL 乙醇, 60 mL 冰醋酸, 超纯水定容至 1 L), 然后用脱色液 (200 mL 甲醇, 50 mL 冰醋酸, 超纯水定容至 1 L) 脱色, 直至背景色透明。用浸泡过 5% 甘油的玻璃纸封胶, 自然条件下风干并扫描胶片。

Western blot 时, 将分离胶在转膜液中浸泡 5 min, PVDF 膜用甲醇浸泡 5 min, 然后按照滤纸、PVDF 膜、胶片、滤纸的顺序放置, PVDF 膜端连正极, 胶片端连负极, 50 V 电压转膜 1 h 即可; 转膜完成后, PVDF 膜用 5% 牛奶封闭膜上的非特异性结合位点, 室温摇床封闭 1 h; 更换封闭液, 在 5 mL 封闭液中加入 5 μ L 的 Gly m Bd 30K 抗体 (稀释 1000 倍), 室温孵育 1 h; 更换 PBST 溶液, 5 mL PBST 溶液中加入 1 μ L 的兔二抗 (稀释 5000 倍), 室温孵育 1 h; 用 PBST 溶液洗 3 次, 每次 5 min, 显色液显影, 然后用 ECL 系统检测条带, 利用 Quantity One 进行样品条带的灰度值分析。实验重复 3 次。本实验所用的参考蛋白为植物 Actin, 数据处理时, Gly m Bd 30K 与 Actin 灰度值的比值作为样品的相对含量。

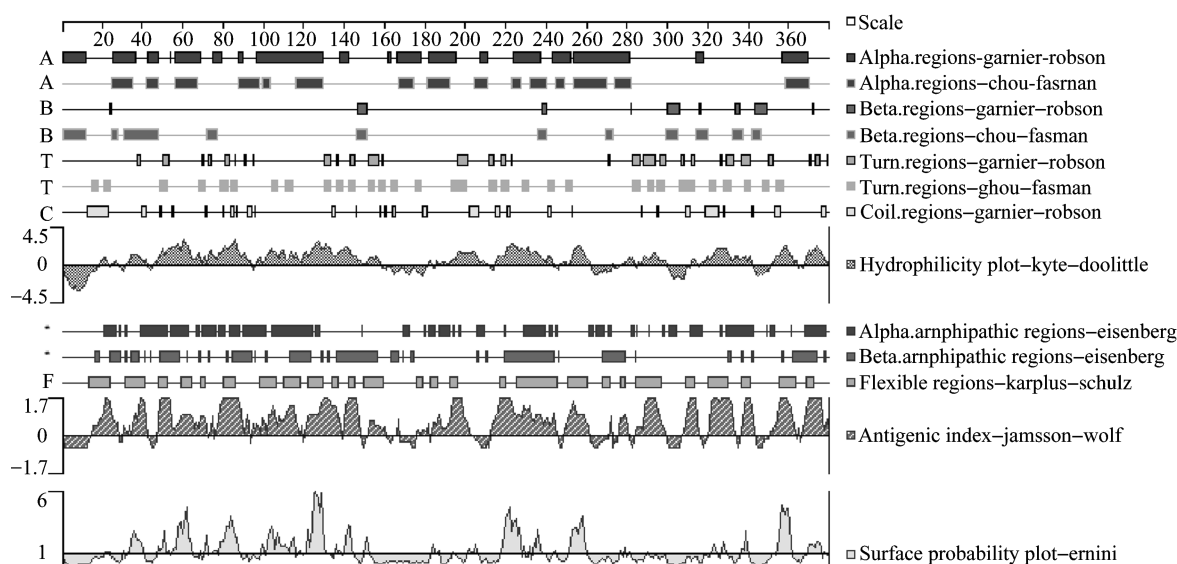


图1 DNA star 软件预测 Gly m Bd 30K 蛋白的二级结构、抗原指数、亲水性、蛋白表面可及性及柔韧性

Fig.1 The secondary structure, antigenic index, hydrophilicity plot, surface probability plot and flexibility regions of Gly m Bd 30K protein predicted by DNA star software

1.2.4 Gly m Bd 30K 基因及启动子区的扩增 利用 CTAB 法提取 Willms82、榆次黄、134 (ZDD02046) 和大青豆 (ZDD02174) 4 个种质的基因组 DNA, 根据 Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 收录的 Gly m Bd 30K 基因序列, 设计 1 段引物扩增起始密码子和终止密码子之间的 1816bp 序列, 30K-F: ATGGGTTTCCTTGTGTGCTT, 30K-R: TCAAAGAGGAGAGTGATCAACTCTTCG, 设计 3 段引物扩增基因上游启动子序列 2097bp, TY-1F: ACGACATGCTACAAGTGAAGTG, TY-1R: GGTAGACACGTCCATGCTCA, Pro-2F: GTGGATTCATACTTGGTCTATTG, Pro-2R: TGTCCATTGTTTAATCTGCG, Pro-3F: CGCAGATTAAACAATGGACA, Pro-3R: ATGGTCACTTCACTTGTAGC, 然后利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测, 扩增成功的序列在中国农业科学院公共实验室进行测序。

1.2.5 种子 RNA 的提取和反转录 使用种子总 RNA 提取试剂盒 (北京金百特生物技术有限公司) 提取 Willms82、榆次黄、134 (ZDD02046) 和大青豆 (ZDD02174) 成熟种子的总 RNA, 实验步骤见试剂说明书。利用微量分光光度计测定 RNA 浓度, 每种种质总 RNA 定量 1 μ g, 利用金百特公司的反转录试剂盒合成 cDNA, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱, 后续利用荧光定量 PCR 检测 Gly m Bd 30K 基因的表达水平。

1.2.6 荧光定量 PCR 检测 Gly m Bd 30K 基因的表达水平 分析 Gly m Bd 30K 的序列特征, 设计

荧光定量 PCR 的引物, 30QPCR-F: ATTTGGATCCAAAGAAACACGG, 30QPCR-R: GCACTCGTTGTATTGAACCTTT。将反转录的 cDNA 稀释 25 倍, 使用 TakaRa 的 TB Green Premix ExTaq 试剂盒进行荧光定量 PCR, 20 μ L 的反应体系: 上游和下游引物分别加入 0.4 μ L (10 μ mol/L), Rox 染料加入 0.4 μ L, TB Green Premix ExTaq 加入 10 μ L, cDNA 加入 2 μ L, 无菌水补足 20 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 31 s, 40 个循环; 使用大豆 Actin11 为内参基因, Actin11-F: CGGTGGTTCTATCTTGGCATC, Actin11-R: GTCTTTCGCTTCAATAACCCTA。每个样品设置 3 次独立重复, 反应结束后分析 4 个种质 Gly m Bd 30K 基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 Gly m Bd 30K 蛋白 Western blot 检测方法的建立

成熟 Gly m Bd 30K 蛋白是由 257 个氨基酸残基组成的糖蛋白, 分子量约为 34 kDa。我们对 Gly m Bd 30K 蛋白的抗原表位进行分析后, 选择 190-379aa 之间的多肽序列作为抗原制备 Gly m Bd 30K 抗体。结果表明, 利用 30pAB 引物成功扩增出 Gly m Bd 30K 基因的 190-379aa 序列, 扩增片段长度与目的片段 570bp 一致 (图 2A); 扩增成功的 190-379aa 序列与 His 标签构成融合基因, 转入表达载体 pET-28a-SUMO 中, 利用 0.8 mmol/L 的 IPTG 诱导融合基因在 *E.coli* Rosetta 菌株中表达蛋白, 结果表

明, Gly m Bd 30K 蛋白的 190-379aa 多肽与 His 标签构成的融合蛋白表达成功 (图 2B), 亲和纯化后可以免疫大白兔获得血清中的 Gly m Bd 30K 抗体。用制备的抗体检测榆次黄的 Gly m Bd 30K 蛋白, 结果显示, 榆次黄的 Gly m Bd 30K 蛋白含量极低, 而且没有非特异性结合条带 (图 3), 与 Joseph 等^[12]的研究结果一致, 进一步说明制备的抗体能有效检测大豆种质的 Gly m Bd 30K 蛋白含量差异。

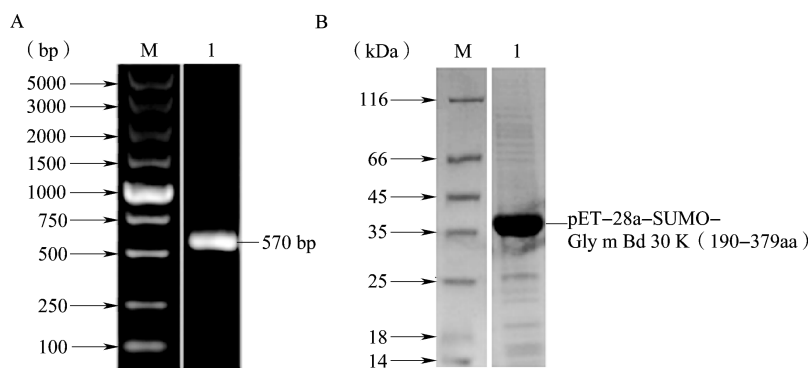
2.2 Gly m Bd 30K 蛋白低含量优异资源筛选

以 Willams82 为阴性对照, 榆次黄为阳性对照, 植物 Actin 为内参基因, 利用 Western blot 对来源于山西省的 29 份种质进行检测, 结果显示, 134 (ZDD02046) 和大青豆 (ZDD02174) 2 份种质与 Willams82 相比, Gly m Bd 30K 蛋白含量降低, 但高于

低致敏种质榆次黄的表达量; 利用 Quantity One 软件对蛋白条带进行分析, 结果显示, 134 (ZDD02046)、大青豆 (ZDD02174) 的 Gly m Bd 30K 蛋白含量分别比 Willams82 降低了 19% 和 31%, 榆次黄的 Gly m Bd 30K 蛋白含量比 Willams82 降低了 80% (图 4)。

2.3 低过敏优异种质的 Gly m Bd 30K 基因序列分析

对上述 4 个种质的 Gly m Bd 30k 基因组共 3912 bp 序列进行序列分析, 包括上游启动子序列 2096 bp 和整个编码区序列 1816 bp, 编码序列包含 4 个外显子和 3 个内含子 (图 5)。4 个种质在启动子区存在 TA 重复序列的差异, Willams82 有 35 次 TA 重复, 134 (ZDD02046) 的 TA 重复次数最少, 只有 8 次, 大青豆 (ZDD02174) 的 TA 重复次数最多, 有 42 次, 榆次黄有 19 次 TA 重复 (图 6)。除此之



A: 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 Gly m Bd 30K (190-379aa) PCR 产物; M: 5000 bp Marker; 1: Gly m Bd 30K (190-379aa) PCR 产物。

B: 在 *E. coli Rosetta* 中表达的融合蛋白 pET-28a-SUMO-Gly m Bd 30K (190-379aa) SDS-PAGE 电泳分析;

M: Protein Marker; 1: *E. coli Rosetta* 菌株表达的融合蛋白条带

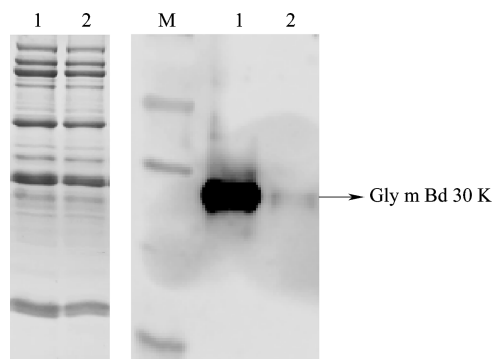
A: Detection of Gly m Bd 30K (190-379aa) PCR product by 1% agarose gel electrophoresis, M: 5000 bp Marker, 1: PCR product.

B: SDS-PAGE electrophoresis analysis of fusion protein pET-28a-SUMO-Gly m Bd 30K expressed in *E. coli Rosetta*,

M: Protein Marker, 1: Fusion protein band expressed by *E. coli Rosetta*

图 2 Gly m Bd 30K 抗体的制备

Fig.2 Preparation of Gly m Bd 30K antibody



M: Marker; 1: Willams82; 2: 榆次黄

M: Marker, 1: Willams82, 2: Yuchi Huang

图 3 榆次黄 (ZDD02058) Gly m Bd 30K 蛋白的 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 结果分析

Fig.3 Analysis of Gly m Bd 30K protein from Yuchi Huang (ZDD02058) by SDS-PAGE electrophoresis and Western blot

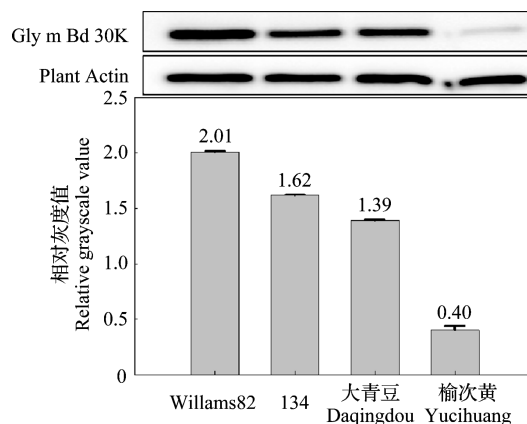


图 4 Western blot 分析 Willams82、134、大青豆和榆次黄的 Gly m Bd 30K 蛋白含量

Fig.4 Western blot analysis of Gly m Bd 30K protein content of Willams82, 134, Daqingdou and Yuchi Huang

外,与 Willams82 相比,榆次黄在起始密码子处有 1 个四碱基插入变异,与 Bilyeu 等^[14]的研究结果一致;134(ZDD02046)在 *Gly m Bd 30K* 基因上还有 8 处变异,其中内含子上有 3 处变异,第 2 个外显子和第 4 个外显子上分别有 1 处变异,都是同义突变,

没有引起氨基酸的变化;启动子上有 1 个变异发生在 -394 bp 处,位于 ATCT-motif 上,是参与光响应的 DNA 元件,变异导致 ATCT-motif 变成 TTCT 序列,而在 -981 (G-A) 和 -961 (GTGGA-AATAAT) 处的变异没有发生在 DNA 元件上(图 5)。

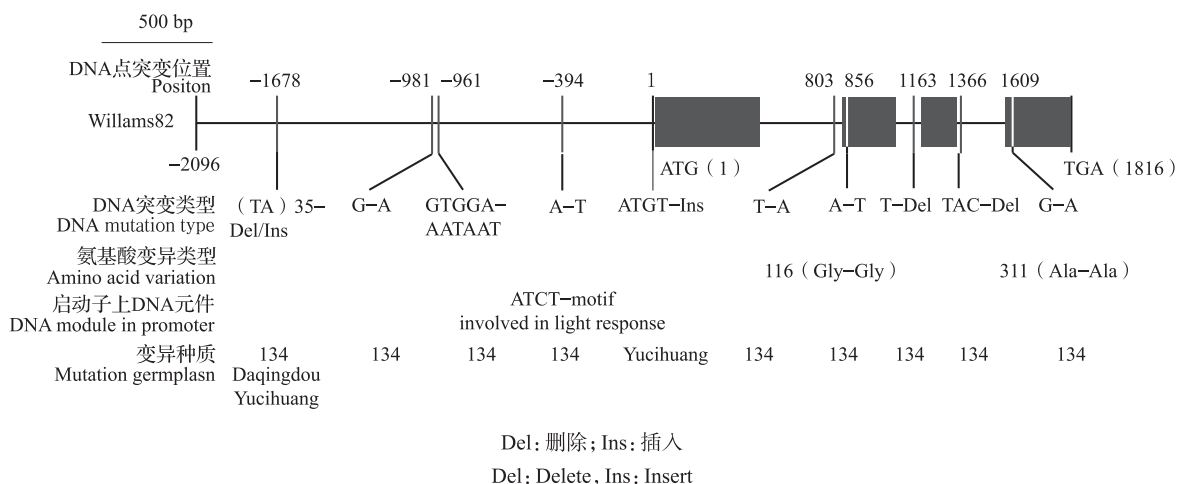


图 5 *Gly m Bd 30K* 序列变异位点
Fig.5 Mutation sites of *Gly m Bd 30K* sequences among the genotypes

2.4 低过敏优异种质的 *Gly m Bd 30K* 基因表达分析

利用荧光定量 PCR 技术对上述 4 个种质的 *Gly m Bd 30K* 基因转录水平进行分析(图 6)。结果表明: Willams82、134(ZDD02046)、大青豆(ZDD02174)和榆次黄之间的转录水平有差异,其中 134(ZDD02046)和榆次黄的转录水平显著低于 Willams82,与其蛋白表达水平一致,然而大青豆

(ZDD02174)的转录水平却显著高于 Willams82,与其蛋白表达水平不一致。另一方面, Willams82、134(ZDD02046)、大青豆(ZDD02174)的转录水平与其启动子区的 TA 重复次数有关系,134(ZDD02046)的 TA 重复次数最少,相应的转录水平最低,大青豆(ZDD02174)的 TA 重复次数最多,相应的转录水平最高。

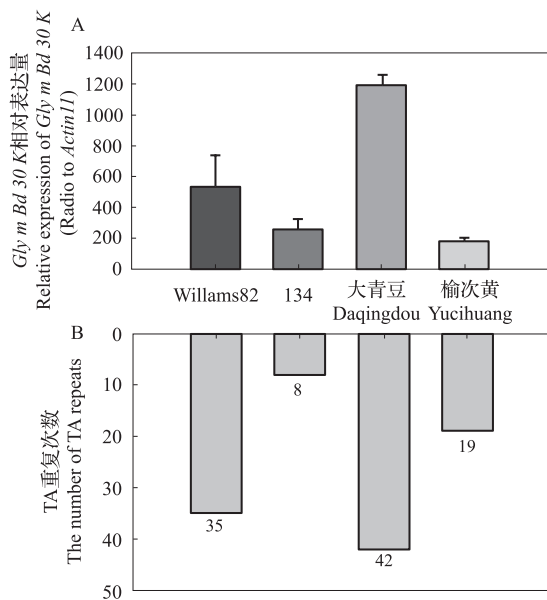


图 6 *Gly m Bd 30K* 基因启动子上不同 TA 重复次数 (B) 种质的 RNA 表达分析 (A)

Fig. 6 Analysis of RNA expression level of germplasms (A) with different TA repeats (B) in *Gly m Bd 30K* promoter

3 讨论

3.1 *Gly m Bd 30K* 蛋白抗原表位区的选择与抗体制备

单晓红等^[15]对 *Gly m Bd 30K* 的抗原决定簇研究发现, 80-85aa, 103-112aa, 217-220aa, 355-360aa 序列是可能的抗原表位。邬玉兰等^[16]构建 *Gly m Bd 30K* 全蛋白原核表达载体, 发现 *Gly m Bd 30K* 全蛋白难表达, 但林苏霞等^[17]利用 *Gly m Bd 30K* 的 144-264aa 序列作为抗原表位, 获得了高表达的重组蛋白。与这些研究结果相比, 本实验所用 *Gly m Bd 30K* 蛋白的 190-379aa 抗原表位区最长, 并成功制备纯化了 *Gly m Bd 30K* 抗体。利用该抗体构建了 Western blot 检测技术, 不仅成功验证了榆次黄的 *Gly m Bd 30K* 蛋白含量低, 同时已成功用于其他 *Gly m Bd 30K* 低含量种质的鉴定。

3.2 环境因素与大豆过敏原含量变化

Stevenson 等^[18]对非转基因大豆在 6 个不同地区的 8 种过敏原含量进行测定, 结果表明对于大多

数过敏原,环境的影响要大于品种之间的差异。宋黎等^[19]发现大豆中的 Gly m Bd 30K 过敏原会受水土中污染物质的影响而发生变异。研究发现由环境污染区域种植的大豆制成的食品,过敏原 Gly m Bd 30K 基因浓度严重超标^[20],推测此基因可能发生了变异。Mcclain 等^[21]对在 9 个位置生长的 3 个品种的 9 种过敏原含量进行定量,发现过敏原 Gly m Bd 30K 不仅受到遗传学的显著影响,也受环境因素的显著影响。王金陵^[22]指出,大豆特定品种类型的形成是与其生态环境紧密相关。根据低过敏种质榆次黄的地理来源为山西榆次市,本研究选择山西省榆次市及其附近市的 29 份种质进行研究(表 1),筛选出了 Gly m Bd 30K 低含量大豆种质 2 份,即 134 (ZDD02046) 和大青豆 (ZDD02174),鉴定效率高达 6.9%,远远高于 Joseph 等^[12]的筛选效率 0.07%,但这 2 个种质的 Gly m Bd 30K 蛋白含量都高于榆次黄(图 4)。

3.3 Gly m Bd 30K 基因启动子上的 TA 重复多态性与表达水平

Bilyeu 等^[14]和 Koo 等^[23]研究表明,榆次黄 Gly m Bd 30K 蛋白的低表达与起始密码子处四碱基插入有直接关系,而 134 (ZDD02046) 和大青豆 (ZDD02174) 在起始密码子处没有四碱基插入,但是其蛋白表达下降,推测这 2 个种质的 Gly m Bd 30K 基因组序列上可能有新的变异造成了其蛋白的低表达,且新的变异对蛋白表达的抑制程度较低。通过分析 134 (ZDD02046) 和大青豆 (ZDD02174) 的基因组序列,发现 134 (ZDD02046) 的变异较多,但基因上的 5 处变异都没有引起氨基酸的变化(图 5),而启动子上的变异 ProSNP-1 位于 ATCT-motif 上,是参与光响应的 DNA 元件(图 5),说明 Gly m Bd 30K 基因可能受光胁迫而影响表达^[24]。另外,2 个种质的启动子区域有不同的 TA 重复序列多态性(图 6B),134 (ZDD02046) 有 8 次 TA 重复,而大青豆 (ZDD02174) 有 42 次 TA 重复。Tremblay 等^[25]利用荧光素酶实验研究发现 36 个 TA 重复次数的 *Npr1* 启动子活性显著低于 10 个 TA 重复次数的 *Npr1* 启动子活性,说明较多的 TA 重复次数会抑制 *Npr1* 基因的转录活性;Koo 等^[23]研究发现 PI567476 (榆次黄) 和 Clark 的 Gly m Bd 30K 基因启动子区域的 TA 重复次数分别是 19 次和 36 次, Northern blot 结果表明前者的转录水平低于后者的转录水平。因此,推测本研究中 134 (ZDD02046) 的转录水平显著低于大青豆 (ZDD02174) 可能

就与两者启动子上不同的 TA 重复次数有关。而榆次黄 (19 次 TA 重复) 的转录水平低于 134 (ZDD02046) (8 次 TA 重复) 的转录水平,推测表达水平也与 134 (ZDD02046) Gly m Bd 30K 启动子上的其他变异有关,或是榆次黄起始密码子处的四碱基插入影响了它的转录水平。这些变异对 RNA 和蛋白水平的影响还有待进一步实验的验证。

另外, Wu 等^[26]研究发现 mRNA 的表达方式不能完全与过敏原积累模式相协调,表明蛋白质的积累还受到转录后调控。Tsai 等^[27]同样发现转基因大豆和常规大豆的 Gly m Bd 30K 蛋白含量没有显著差异,但是 Gly m Bd 30K 基因转录水平存在显著差异,进一步说明 Gly m Bd 30K 蛋白还受到转录后调控或翻译后修饰的影响。本研究中大青豆 (ZDD02174) 的转录水平显著高于 Willams82,而其蛋白水平却显著低于 Willams82,推测可能是 Gly m Bd 30K 蛋白受到翻译后糖基化修饰的影响,其 170 位氨基酸处的 N-糖基化是普遍存在的共翻译和翻译后修饰,在受体介导的防御信号传导方面发挥着重要功能^[28],可影响多种细胞过程,包括蛋白质折叠和蛋白质-受体相互作用等^[29-30]。

本研究在制备 Gly m Bd 30K 抗体的基础上,建立了 Western blot 检测技术;筛选出 Gly m Bd 30K 低含量优异种质 2 份;明确了这些种质 Gly m Bd 30K 基因序列变异,推测启动子上游差异较大的 TA 重复序列多态性可能与其 RNA 和蛋白表达水平相关。本研究建立的检测方法和筛选的优异种质为优质新品种选育、饲料加工等提供了技术和材料支撑。

参考文献

- [1] Duke W W. Soybean as a possible important source of allergy. *Journal of Allergy*, 1934, 5 (3): 300-302
- [2] Metcalfe D. The nature and mechanisms of food allergies and related diseases. *Food Technology*, 1992, 5 (5): 136-140
- [3] Saeed H, Gagnon C, Cober E, Gleddie S. Using patient serum to epitope map soybean glycinins reveals common epitopes shared with many legumes and tree nuts. *Molecular Immunology*, 2016, 70: 125-133
- [4] 周淑红. 国外关于食品过敏标签的现状及启示. *世界农业*, 2007 (6): 67-68
Zhou S H. The apocalypse and status on food allergy labels in abroad. *World Agriculture*, 2007 (6): 67-68
- [5] Ogawa T, Bando N, Tsuji H, Okajima H, Nishikawa K, Sasaoka K. Investigation of the IgE-binding proteins in soybeans by immunoblotting with the sera of the soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *Nutrition Science Vitaminology*, 1991, 37 (6): 555-565
- [6] Kalinski A, Weisemann J M, Matthews B F, Herman E

- M. Molecular cloning of a protein associated with soybean seed oil bodies that is similar to thiol proteases of the papain superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265 (23): 13843-13848
- [7] Bando N, Tsuji H, Yamanishi R, Nio N, Ogawa T. Identification of the glycosylation site of a major soybean allergen Gly m Bd 30K. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1996, 60 (2): 347-348
- [8] 布冠好, 张楠, 陈复生. 大豆蛋白-木糖复合物的抗原性、致敏性及结构特征性研究. *现代食品科技*, 2015, 31 (11): 33-38
Bu G H, Zhang N, Chen F S. Antigenicity, allergenicity, and structural properties of soy protein Isolate-xylose conjugates. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31 (11): 33-38
- [9] Ji C, Boyd C, Slaymaker D, Okinaka Y, Takeuchi Y, Midland S L, Sims J J, Herman E, Keen N. Characterization of a 34-kDa soybean binding protein for the syringolide elicitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95 (6): 3306-3311
- [10] Okinaka Y, Yang C H, Herman E, Kinney A, Keen N T. The P34 syringolide elicitor receptor interacts with a soybean photorespiration enzyme, NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2002, 15 (12): 1213-1218
- [11] 张跃强, 关荣霞, 刘章雄, 常汝镇, 姚源松, 邱丽娟. 利用大豆核心种质部分样本鉴定 28K 和 30K 过敏蛋白缺失材料. *作物学报*, 2006, 32 (3): 324-329
Zhang Y Q, Guan R X, Liu Z X, Chang R Z, Yao Y S, Qiu L J. Identification of Gly m Bd 28K and Gly m Bd 30K lacking soybean by using random sampling of core collection in soybean. *Acta Agronomica Sinica*, 2006, 32 (3): 324-329
- [12] Joseph L M, Hymowitz T, Schmidt M A, Herman E M. Evaluation of *Glycine* germplasm for nulls of the immunodominant allergen P34/Gly m Bd 30K. *Crop Science*, 2006, 46: 1755-1763
- [13] Geng T, Stojšin D, Liu K, Schaalje B, Postin C, Ward J, Wang Y, Liu Z L, Li B, Glenn K. Natural variability of allergen levels in conventional soybeans: assessing variation across North and South America from five production years. *Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65: 463-472
- [14] Bilyeu K, Ren C W, Nguyen H T, Herman E, Sleper D A. Association of a four-basepair insertion in the P34 gene with the low-allergen trait in soybean. *The Plant Genome*, 2009, 2 (2): 141-148
- [15] 单晓红, 孙秀兰, 管露, 张银志, 尤继明, 李红梅. 大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 抗原决定簇表征预测研究. *分析科学学报*, 2012, 28 (6): 771-774
Shan X H, Sun X L, Guan L, Zhang Y Z, You J M, Li H M. Prediction of antigenic epitopes of soybean major allergen Gly m Bd 30K. *Journal of Analytical Science*, 2012, 28 (6): 771-774
- [16] 邬玉兰, 刘志刚. 大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 基因的克隆及其原核表达载体的构建. *大豆科学*, 2009, 28 (1): 11-15
Wu Y L, Liu Z G. Cloning and prokaryotic expression vector construction of Gly m Bd 30K gene from soybean (*Glycine max*). *Soybean Science*, 2009, 28 (1): 11-15
- [17] 林苏霞, 王晓梅, 刘志刚, 曾梦雅, 吴研, 陈家杰. 大豆主要过敏原 Gly m Bd 30K 的抗原表位区基因的克隆表达、纯化及免疫原性鉴定. *大豆科学*, 2010, 29 (2): 186-190
- Lin S X, Wang X M, Liu Z G, Zeng M Y, Wu Y, Chen J J. Cloning and expression of the antigenic epitope of Gly m Bd 30K protein from soybean and purification and identification of expressed product. *Soybean Science*, 2010, 29 (2): 186-190
- [18] Stevenson S E, Woods C A, Hong B, Kong X, Thelen J J, Ladics G S. Environmental effects on allergen levels in commercially grown non-genetically modified soybeans: assessing variation across north america. *Frontiers in Plant Science*, 2012, 3: 196
- [19] 宋黎, 叶俊儒, 陆茂, 唐懿, 刘彦麟. 成都地区 859 例慢性荨麻疹患者过敏原检测结果分析. *重庆医学*, 2016, 45 (7): 918-920
Song L, Ye J R, Lu M, Tang Y, Liu Y L. Detection and analysis of allergens in 859 patients with chronic urticarial in Chengdu. *Chongqing Medicine*, 2016, 45 (7): 918-920
- [20] 谢文佳, 殷柯柯, 魏法山, 冯波. 大豆过敏原 P34 蛋白基因检测技术与环境污染的关系研究. *环境科学与管理*, 2018, 43 (2): 148-152
Xie W J, Yin K K, Wei F S, Feng B. Relationship between detection technology of soybean allergen P34 protein gene and environmental pollution. *Environmental Science and Management*, 2018, 43 (2): 148-152
- [21] McClain S, Stevenson S E, Brownie C, Herouet-guicheney C, Herman R A, Ladics G S, Privalle L, Ward J M, Doerr N, Thelen J J. Variation in seed allergen content from three varieties of soybean cultivated in nine different locations in Iowa, Illinois, and Indiana. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1025
- [22] 王金陵. 大豆生态类型. 北京: 农业出版社, 1991: 167-201
Wang J L. Ecological types of soybean. Beijing: Agricultural Publishing House, 1991: 167-201
- [23] Koo S C, Seo J S, Park M J, Cho H M, Park M S, Choi C W, Jung W H, Lee K H, Jin B J, Kim S H, Shim S I, Chung J S, Chung J I, Kim M C. Identification of molecular mechanism controlling P34 gene expression in soybean. *Plant Biotechnology Report*, 2013, 7: 331-338
- [24] Park S, Lee Y, Lee J H, Jin E. Expression of the high light inducible dunaliella LIP promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, 2013, 238 (6): 1147-1156
- [25] Tremblay J, Hum D H, Sanchez R, Dumas P, Pravenec M, Krenova D, Kren V, Kunes J, Pausova Z, Gossard F, Hamet P. TA repeat variation, *Npr1* expression, and blood pressure: impact of the *Ace* locus. *Hypertension*, 2003, 41: 16-24
- [26] Wu Y M, Guan R X, Liu Z X, Li R Z, Chang R Z, Qiu L J. Synthesis and degradation of the major allergens in developing and germinating soybean seed. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2012, 54 (1): 4-14
- [27] Tsai J J, Chang C Y, Liao E C. Comparison of allergenicity at Gly m 4 and Gly m Bd 30K of soybean after genetic modification. *Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65: 1255-1262
- [28] Stulemeijer I J, Joosten M H. Post-translational modification of host proteins in pathogen-triggered defence signalling in plants. *Plant Pathology*, 2008, 9 (4): 545-560
- [29] Strasser R. Biological significance of complex N-glycans in plants and their impact on plant physiology. *Front in Plant Science*, 2014, 5: 363
- [30] Nagashima Y, Von Schaewen A, Koiwa H. Function of N-glycosylation in plants. *Plant Science*, 2018, 274: 70-79