

玉米籽粒高蛋白氨基酸突变体 *Zmts1* 的鉴定与转录组分析

洪泽渊^{1,2}, 鲁鑫², 汤泽洋^{1,2}, 周志强², 郭长虹¹, 李新海^{1,2}

(¹哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 哈尔滨 150025; ²中国农业科学院作物科学研究所/作物基因资源与育种全国重点实验室, 北京 100081)

摘要: 蛋氨酸是畜禽类玉米-豆粕型日粮的第一限制性氨基酸, 氨基酸不平衡会导致机体蛋白质合成受到抑制从而影响肉和奶的品质。为解析玉米籽粒蛋氨酸积累的调控机制, 本研究利用同源克隆方法获得了影响蛋氨酸含量的候选基因 *ZmTS1* (*Threonine synthase 1*), 通过玉米突变体材料验证 *ZmTS1* 基因功能, 发现与野生型相比, *Zmts1* 突变体籽粒中蛋氨酸含量提高了 60%, SDS-PAGE 凝胶电泳结果表明 *Zmts1* 突变体成熟籽粒中富含蛋氨酸残基的 10 kDa δ 醇溶蛋白较野生型有了显著提高, 验证了该基因可显著提高玉米籽粒中蛋氨酸含量。生物学信息分析结果表明, 该蛋白含有一个苏氨酸合酶结构域, 属于亲水性蛋白。通过转录组分析挖掘与蛋氨酸代谢相关的差异表达基因, 共筛选到 1144 个差异表达基因, 其中 571 个基因表达上调, 573 个基因表达下调。GO 和 KEGG 富集通路分析表明, 差异表达基因主要参与氨基酸的生物合成和代谢途径。利用 qRT-PCR 进一步验证了 7 个可能参与蛋氨酸代谢途径的关键候选基因, RNA-Seq 与 qRT-PCR 的表达模式一致, 表明 7 个基因能间接调控蛋氨酸代谢途径。本研究为高蛋白氨基酸玉米育种提供了新的种质资源, 也为玉米蛋氨酸调控机制提供一定的理论依据。

关键词: 玉米; 蛋氨酸; *Zmts1* 突变体; 转录组分析

Identification and Transcriptome Analysis of the High Methionine Mutant *Zmts1* in Maize Kernels

HONG Zeyuan^{1,2}, LU Xin², TANG Zeyang^{1,2}, ZHOU Zhiqiang², GUO Changhong¹, LI Xinhai^{1,2}

(¹College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025; ²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/State Key Laboratory of Crop Gene Resources and Breeding, Beijing 100081)

Abstract: Methionine is the primary limiting amino acid in maize-soybean meal diets for livestock and poultry. An imbalance in amino acids can inhibit protein synthesis in animals, thus affecting the quality of meat and milk. To analyze the regulatory mechanism governing methionine accumulation in maize grains, this study used homologous cloning strategy to identify a candidate gene, *ZmTS1* (*Threonine Synthase 1*), which affects methionine content. Methionine content in *Zmts1* mutant seeds increased by 60%. SDS-PAGE analysis revealed that the methionine residue-rich 10 kDa- δ alcohol-soluble protein in mature *Zmts1* mutant kernel was significantly elevated compared to the wild type, confirming that this gene could significantly increase methionine content in maize kernels. Bioinformatics analysis indicated that the gene contained a threonine synthase structural domain and the encoded protein was hydrophilic. Transcriptome analysis revealed 1144 differentially expressed genes associated with methionine metabolism, of which 571 and 573 were up-regulated and down-regulated, respectively. GO and KEGG enrichment pathway analysis showed that the differentially expressed genes were mainly involved in the biosynthesis and metabolism of amino acids. qRT-PCR was used to further analyze seven key candidate genes that may be involved in methionine metabolism pathway. The

收稿日期: 2024-05-15 网络出版日期: 2024-07-24

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240515002>

第一作者研究方向为植物遗传学, E-mail: 59752006@qq.com

通信作者: 郭长虹, 研究方向为植物遗传学, E-mail: kaku3008@126.com

李新海, 研究方向为玉米遗传改良与种质创新, E-mail: linxinhai@caas.cn

基金项目: 国家自然科学基金(32001559); 作物基因资源与育种全国重点实验室

Foundation projects: National Nature Science Foundation of China (32001559); State Key Laboratory of Crop Gene Resources and Breeding

transcriptional patterns revealed by both in RNA-Seq and qRT-PCR implied indirect functions of these genes in the methionine metabolic pathway. This study provides new germplasm resources for breeding methionine-rich maize, and offers a theoretical basis for understanding methionine regulation mechanisms in maize.

Key words: maize; methionine; *Zmts1* mutant; transcriptome analysis

玉米(*Zea mays* L.)是我国第一大粮食作物,其中60%以上的玉米被用作饲料。富硫氨基酸(蛋氨酸、半胱氨酸和胱氨酸)特别是蛋氨酸是畜禽类玉米-豆粕型日粮的第一限制性氨基酸,对动物的生长发育起着至关重要的调控作用。蛋氨酸作为蛋白质合成的底物,直接参与动物机体蛋白质的从头合成^[1-2];蛋氨酸在蛋氨酸腺苷转移酶的作用下生成S-腺苷蛋氨酸(SAM, S-adenosylmethionine), SAM是动物重要的甲基供体,可供甲基参与蛋白质、DNA和RNA的甲基化^[3];蛋氨酸还能提供活性羟基基团,补充胆碱或维生素B₁₂的部分作用;在体内代谢生成聚胺,对动物生长具有非常重要的促进作用;同时它可由代谢中间产物同型半胱氨酸(Hcy, homocysteine)通过转硫化途径生成半胱氨酸,代谢生成抗氧化产物,提高机体抗氧化能力^[4]。因此,提高玉米籽粒蛋氨酸含量对畜禽产业发展具有重要意义。

高等植物中的蛋氨酸合成为3个连续的酶促反应,主要发生在叶绿体中。首先半胱氨酸和O-乙酰高丝氨酸(OPH, O-phosphohomoserine)作为共同底物,在胱硫醚- γ -合成酶(CGS, cystathionine- γ -synthase)的催化作用下,生成胱硫醚(Cystathionine)。然后以胱硫醚作为底物,在胱硫醚 β 裂解酶(CBL, cystathionine β -lyase)的催化作用下,生成高半胱氨酸。最后以高半胱氨酸作为底物,经蛋氨酸合成酶(MS, methionine synthase)催化作用将其转化生成蛋氨酸^[5]。

在模式生物拟南芥中,苏氨酸合成酶(TS, threonine synthetase)位于苏氨酸(Thr, threonine)和蛋氨酸生物合成的分支点,与CGS竞争共同底物O-磷酸高丝氨酸^[6],对OPH的利用效率仅取决于二者的含量^[7]。研究发现,蛋氨酸的直接代谢产物SAM对TS有正向调节作用,蛋氨酸反馈抑制CGS^[8]。可以通过改造CGS,减弱蛋氨酸的反馈抑制作用,或减少TS来合成更多的蛋氨酸。通过将*AtCGS*基因在拟南芥、烟草、马铃薯、苜蓿中过表达,植株中蛋氨酸含量能够显著增加,说明该基因对蛋氨酸合成起到正调控作用^[9-11]。在拟南芥*ts*突变体*mto2-1*(Leu-204 to Arg)中,蛋氨酸含量较野生型提高了近100倍,这为通过抑制TS基因表达来提

高蛋氨酸含量提供了可能^[12]。但目前除拟南芥外,在其他植物中通过抑制TS合成来提高蛋氨酸含量的研究还未见报道。

本研究以编码玉米苏氨酸合酶的基因*ZmTS1*为研究对象,利用生物信息学分析玉米*ZmTS1*蛋白特征,以及实时荧光定量分析玉米*ZmTS1*基因在授粉后不同时期各组织中的表达水平。分析玉米*Zmts1*突变体及野生型B73的籽粒氨基酸含量变化,并通过转录组测序分析*Zmts1*突变体和B73的差异表达基因,进而对*ZmTS1*基因功能进行初步验证,为优质蛋白玉米分子遗传改良提供基因资源和理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

玉米自交系B73和*Zmts1*突变体于2021年5月种植于北京昌平中国农业科学院试验基地,行长3 m,株距25 cm,每行均匀点播13粒,常规田间管理。玉米自交系B73由中国农业科学院作物科学研究所玉米优质抗逆育种课题组提供。*Zmts1*突变体购买于MEMD(www.elabcaas.cn/memd/),与野生型亲本B73回交两代后再自交构建BC₂F₂群体,得到*Zmts1*纯合突变体。

1.2 试验方法

1.2.1 *ZmTS1*基因的同源克隆

通过Gramene网站(<https://www.gramene.org/>)获得玉米自交系B73中*ZmTS1*基因的CDS序列。根据*ZmTS1*基因的CDS序列设计引物(表1),取3株玉米B73灌浆期的叶片,使用总RNA提取试剂盒RNA-easy Isolation Reagent(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)提取RNA, cDNA逆转录试剂盒FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix(北京天根生化科技有限公司)将RNA反转录成cDNA,使用南京诺唯赞生物科技股份有限公司2×Phanta Flash Master Mix(Dye Plus),以玉米B73叶片cDNA为模板,克隆*ZmTS1*基因编码区序列,*ZmTS1*扩增片段经胶回收后连接B-Zero载体*pEASY*®-T&B Zero Cloning Kit(北京全式金生物技术有限公司)。利用载体通用引物M13F和M13R测序,引物合成和测序工作在北京华大基因公司完成。

表 1 本研究引物信息

Table 1 Information of the primers in this study

引物名称 Primer name	正向引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')	功能 Function
CDS- <i>ZmTS1</i>	CTGCCCTCCCTAAACGAAA	GGAAAGGCTAGAGCAAACAAC	同源克隆
EMS- <i>Zmts1</i>	AGGGTTTCTCTGCGTGGTACG	TGCATAGATATCCCAAGATTGC	突变体鉴定
<i>ZmUbi</i>	TAAGCTGCCGATGTGCCTGCGTGC	CTGAAAGACAGAACATAATGAGCACAG	qRT-PCR引物
RT- <i>ZmTS1</i>	CGCCATCGTGTCTCTCG	GCTGTCTTCTGCCCTCAA	
<i>Zm00001d008883</i>	AACCTCGAAGCCTTCTTCTCTG	TGCTCTCCACTTAAACCACTACTGA	
<i>Zm00001d018386</i>	GTAGTCAAGAAGGCTGAAAATC	ATCCAGTGCCCGAGAGA	
<i>Zm00001d034460</i>	GAGAGGATAGGAATAAGAGAGG	TCCAGAACCAGAAGAGAGC	
<i>Zm00001d049823</i>	GCCAAAGGAGCAAGCA	GGGGACACATATCCAGAGA	
<i>Zm00001d050495</i>	TTCTGCTGTCCACGGCT	TGGTTGCACAAAGTTTCTCT	
<i>Zm00001d048060</i>	GCCTAAACCATCTCATTCTCA	TCCTCCAACACCCCAT	
<i>Zm00001d050133</i>	CGCCTGTCTTCTACCT	TCCAATACGACCTTCTAACT	

1.2.2 突变体株系基因型鉴定 取田间种植的 BC₂F₂ 植株散粉期新鲜叶片 20 株, CTAB 法提取 DNA, 在 MEMD 突变体库中查询 *Zmts1* 提前终止突变体的突变位点, 在突变位点前后 500 bp 设计测序引物 EMS-*Zmts1* (表 1), 以 BC₂F₂ 植株 DNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 体系包括 1 μg/μL 模板 DNA 0.8 μL, 引物各 0.8 μL (正向和反向), 8 μL Mix (2× Phanta Flash Master Mix (Dye Plus), 诺唯赞生物科技股份有限公司), 用水补足到 20 μL。PCR 反应程序为 98℃ 预变性 30 s; 98℃ 变性 10 s, 60℃ 复性 5 s, 72℃ 延伸 3 s, 30 个循环; 最终 72℃ 1 min。扩增 PCR 产物送至北京华大基因公司测序。

1.2.3 突变体株系氨基酸含量测定 以野生型 B73 序列为参考比对测序结果, 选取纯合突变株系分析籽粒蛋氨酸表型。参照国标 NY/T 56-1987《谷物籽粒氨基酸测定的前处理方法》的酸水解法进行^[13]前处理, 用自动氨基酸分析仪 (日立 L-8900, 日本) 测定富硫氨基酸 (蛋氨酸) 含量。选取 3 行、每行中间 3 株突变体和野生型自交果穗、同株的叶和茎收获后晾干, 从每一果穗的中间部位选生长正常、一致和饱满的种子混合, 继续用烘箱 60℃ 烘 48 h, 随后用磨样机将其磨碎成粉, 用于氨基酸的测定。氨基酸测定具体方法如下: 称取 50~70 mg 磨碎的玉米粉末放入标有 10 mL 刻度的试管中, 并加入 10 mL 6 mol/L 的 HCl 在 110℃ 烘箱中烘 22~24 h, 使样品充分水解。取出后冷却至室温, 过滤溶解好的溶液至 50 mL 容量瓶中, 用双蒸水定容至 50 mL, 充分混匀, 取 750 μL 利用旋转蒸发仪加热至 45~60℃ 旋转

蒸干, 再用 750 μL 0.02 mol/L HCl 溶解干燥的样品, 充分混匀, 然后取 20 μL 重悬液进行测定, 每个样品测定 2 个技术重复^[14]。本试验所有样品处理及检测均由河南农业科学院质量标准研究所完成。

1.2.4 籽粒醇溶蛋白提取 取授粉后成熟籽粒磨碎, 称取 0.1 g 籽粒粉末加 1 mL 提取液 (70% 无水乙醇、2%β-巯基乙醇), 37℃ 摇床充分震荡 2 h, 然后 12000 rpm/min 离心 10 min, 上清为醇溶蛋白。取 100 μL 上清液加 10 μL 10% 的 SDS, 烘干后加水溶解蛋白, 溶解后的蛋白加入 5×Loading Buffer 95℃ 煮沸 5 min, 使蛋白质完全变性, 最后吸取 3~6 μL 的上样液用 12.5% 的 SDS-PAGE 进行电泳分析, SDS-PAGE 凝胶制备电泳试剂盒购自北京博泰斯生物技术有限公司。

1.2.5 *ZmTS1* 基因的生物信息学分析 依据 *ZmTS1* 基因编码的氨基酸序列, 利用在线软件 ExPASy 对 *ZmTS1* 蛋白亲疏水性分析^[15]; 在线软件 TMHMM^[16]对 *ZmTS1* 蛋白跨膜结构分析; 在线软件 Net Phos 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 对 *ZmTS1* 蛋白磷酸化位点进行分析; 在线软件 SOPMA^[17]对 *ZmTS1* 蛋白二级结构等进行预测分析。采用在线工具 Ortho DB (<https://www.orthodb.org/>) 对 *ZmTS1* 蛋白进行同源性分析, 找出与其亲缘关系近的物种基因号, 利用 DNAMAN 9 软件和 MEGA 7 软件^[18]将序列导出和绘制进化树。

1.2.6 *ZmTS1* 基因的表达模式分析 在相同田间管理条件下, 以玉米自交系 B73 和 *Zmts1* 突变体为实时荧光定量实验材料, 取授粉后 10 d、15 d、20 d、

25 d、30 d的玉米籽粒和授粉后20 d的根、茎、叶、花丝等组织,用液氮冻存后放入 -80°C 冰箱保存,每个处理均有3次生物学重复。使用RNA-easy Isolation Reagent试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)提取RNA并进行RNA完整性和浓度检测,使用FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix试剂盒(北京天根生化科技有限公司)合成cDNA,以野生型B73和*Zmts1*突变体玉米的cDNA为模板,以*ZmTS1*基因为目标基因,*ZmUbi*为内参基因引物,RT-*ZmTS1*为基因引物(表3),使用SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)(北京天根生化科技有限公司)荧光定量试剂盒检测野生型玉米B73和*Zmts1*突变体玉米中*ZmTS1*基因的表达水平。

1.2.7 转录组测序 以玉米B73和*Zmts1*突变体授粉后20 d的籽粒胚乳为材料,设置3个生物学重复^[19-20]。转录组测序包括样品RNA提取、样品纯度和RNA长度检测、文库构建、文库质量检验、上机测序等环节,由北京奥维森基因科技有限公司完成。对测序原始数据进行过滤获得高质量的Clean reads,以玉米B73基因组为参考基因组,用STAR软件将Clean reads比对到参考基因组上,比对完成后将比对上的Reads进行组装和定量分析。

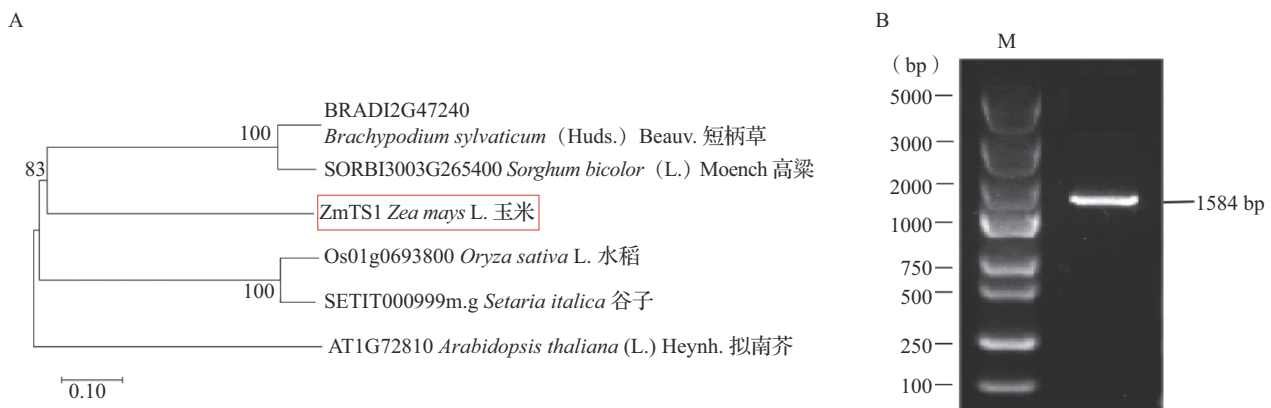
1.2.8 差异表达基因分析 利用HTSeq软件分析基因的表达水平,采用FPKM(Fragments per kilobase of exon model per million mapped reads)值为1作为判断基因是否表达的评价指标。绘制火山图分析差异基因的分布情况。将差异基因筛选的标准定义为: $|\log_2\text{FC}|\geq 1$ 且 $P\text{-value}<0.05$,确保试验误差在控制范围内。

1.2.9 qRT-PCR验证 选取7个蛋氨酸通路的差异表达基因,使用Primer 5软件设计定量引物(表1),引物序列由华大基因合成,以玉米中*ZmUbi*为内参基因,以野生型和BC₂F₂突变体株系授粉后20 d籽粒cDNA为模板进行qRT-PCR验证。qRT-PCR扩增体系为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 模板cDNA 0.8 μL ,1 mol/L正向和反向引物各0.8 μL ,8 μL Mix酶,无菌水将体系补足至20 μL 。PCR反应过程为98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s;98 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 复性5 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸2 s,30个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 1min。每个样品设置3个生物学重复和3次技术重复,重复之间的Ct值控制在 ± 0.5 ,利用公式 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 *ZmTS1*基因的同源克隆

在线工具Ortho DB分析显示,*ZmTS1*与高粱(SORBI3003G265400)、谷子(SETIT000999m.g)、水稻(Os01g0693800)、短柄草(BRADI2G47240)和拟南芥(AT1G72810)存在同源关系。使用MEGA7.0软件分析玉米*ZmTS1*蛋白和多种植物的同源蛋白,进行多重序列比对并进行系统进化树的构建,结果表明玉米*ZmTS1*与高粱(SORBI3003G265400)蛋白亲缘关系最近。拟南芥AT1G72810参与苏氨酸和蛋氨酸代谢^[6],因此推测*ZmTS1*基因具有相似的调控苏氨酸和蛋氨酸代谢功能(图1A)。对从玉米B73 cDNA中克隆获得的*ZmTS1*的基因编码区(CDS)片段进行凝胶电泳检测(图1B)并测序,结果证实其CDS片段长1584 bp,编码527个氨基酸。



A: *ZmTS1* 进化树分析; B: *ZmTS1* 基因克隆

A: Phylogenetic tree analysis of *ZmTS1*; B: *ZmTS1* gene cloning; M: DL 5000 Marker

图1 *ZmTS1* 进化树分析与 *ZmTS1* 基因同源克隆

Fig. 1 Evolutionary tree analysis of *ZmTS1* and homologous cloning of *ZmTS1* gene

2.2 *ZmTS1* 基因的功能验证

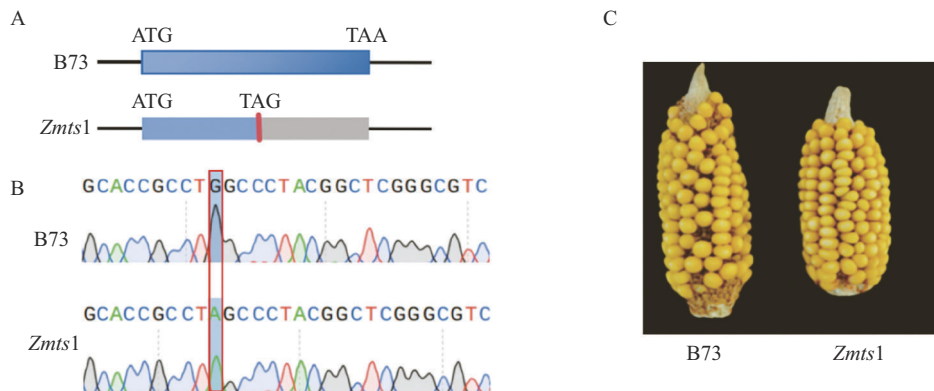
以突变体 *Zmts1* 和野生型 B73 为材料,对 *ZmTS1* 基因进行基因型鉴定。结果表明,该突变体外显子上 TGG/TAG 碱基变异,导致该基因提前终止转录(图2)。为了验证 *ZmTS1* 基因突变后对玉米不同组织中氨基酸含量是否产生影响,对突变体 *Zmts1* 和野生型 B73 的籽粒、叶以及茎进行氨基酸含量测定。与野生型 B73 相比,除茎组织外,总氨基酸含量在突变体 *Zmts1* 和野生型 B73 的籽粒与叶片间无显著性差异,而 *Zmts1* 突变体籽粒、叶、茎的蛋氨酸含量均极显著高于野生型(图3A、B)。

为了观察突变体 *Zmts1* 和野生型 B73 籽粒中与含硫氨基酸相关的醇溶蛋白亚基丰度,分别提取野生型与 *Zmts1* 授粉后成熟籽粒的胚乳醇溶蛋白(Zein),利用 SDS-PAGE 凝胶电泳分析不同醇溶蛋白亚基表达情况。结果表明,在授粉后成熟籽粒的胚乳中,醇溶蛋白各亚基在野生型与突变体中均无

明显差异;在全籽粒中,突变体富含蛋氨酸残基的 10 kDa δ -醇溶蛋白有了明显提高,富含半胱氨酸残基的 27 kDa γ -醇溶蛋白和 16 kDa γ -醇溶蛋白含量也相对提高,而富含蛋氨酸和半胱氨酸残基很低的醇溶蛋白亚基如 19 kDa α -醇溶蛋白和 22 kDa α -醇溶蛋白的含量在二者间无明显变化(图3C)。

2.3 *ZmTS1* 基因的表达模式分析

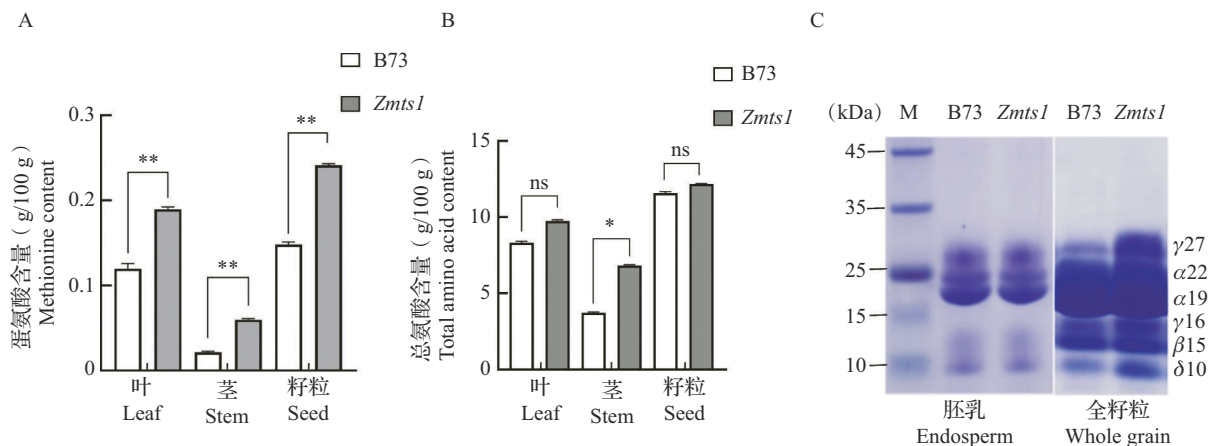
对突变体 *Zmts1* 和野生型 B73 进行同步取样,分析 *ZmTS1* 基因的时空表达模式。分析发现, *Zmts1* 突变体中 *ZmTS1* 基因的相对表达量较野生型极显著降低,在授粉后 10~30 d 的胚乳及 20 d 的叶、茎、籽粒、花丝和根中,差异均达到极显著水平(图4A)。在各个组织和不同时期胚乳中, B73 中 *ZmTS1* 在叶片的相对表达量最高,其次是授粉后 10 d 的胚乳(图4B),说明 *ZmTS1* 基因可能主要在叶片和籽粒胚乳中受到调控表达。



A: 突变体 *Zmts1* 和野生型 B73 基因结构; B: *Zmts1* 基因型检测, 表示变异位点; C: 突变体 *Zmts1* 和野生型 B73 的果穗表型
A: Wild-type B73 and *ZmTS1* gene structure; B: *Zmts1* genotype testing, indicates a variant site; C: Ears phenotype of Wild-type B73 and *Zmts1*

图2 *Zmts1* 基因型检测及果穗表型

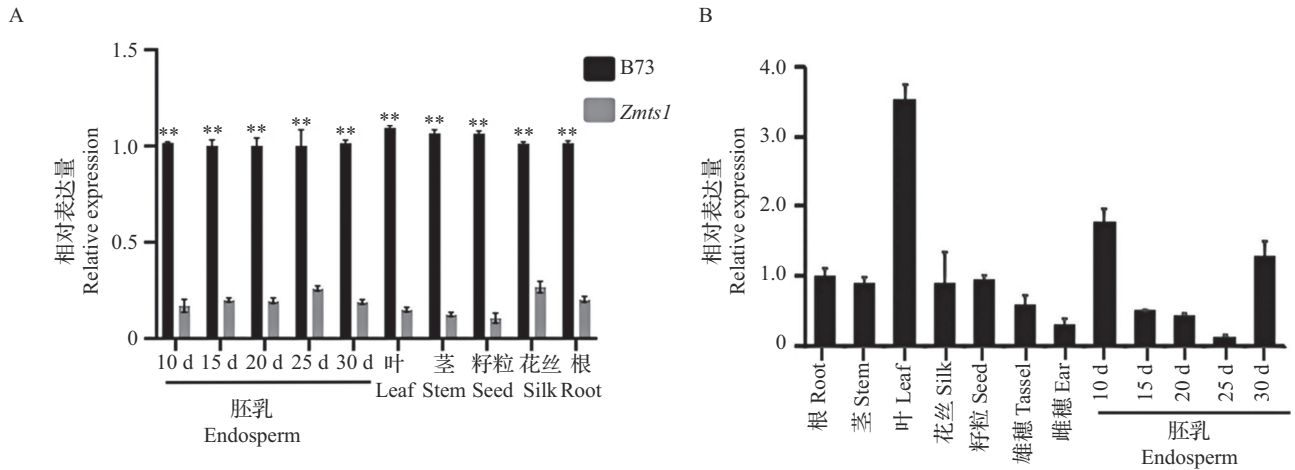
Fig. 2 The genotype and ears phenotype of *Zmts1*



M: Marker; **表示达到极显著水平 ($P < 0.01$); *表示达到显著水平 ($P < 0.05$); ns 表示无显著性差异; 下同
**denotes highly significant level ($P < 0.01$); * denotes significant level ($P < 0.05$); ns denotes no significant difference; The same as below

图3 B73 和 *Zmts1* 突变体的蛋氨酸含量测定及 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 Determination of methionine content and SDS-PAGE analysis of B73 and *Zmts1* mutants



A: B73 和 *Zmts1* 中 *ZmTS1* 基因的时空表达模式; B: B73 中 *ZmTS1* 基因的时空表达模式; d: 代表授粉后天数
 A: Spatiotemporal expression patterns of the *ZmTS1* gene in B73 and *Zmts1*; B: Spatiotemporal expression pattern of the *ZmTS1* gene in B73; d represents the number of days after pollination

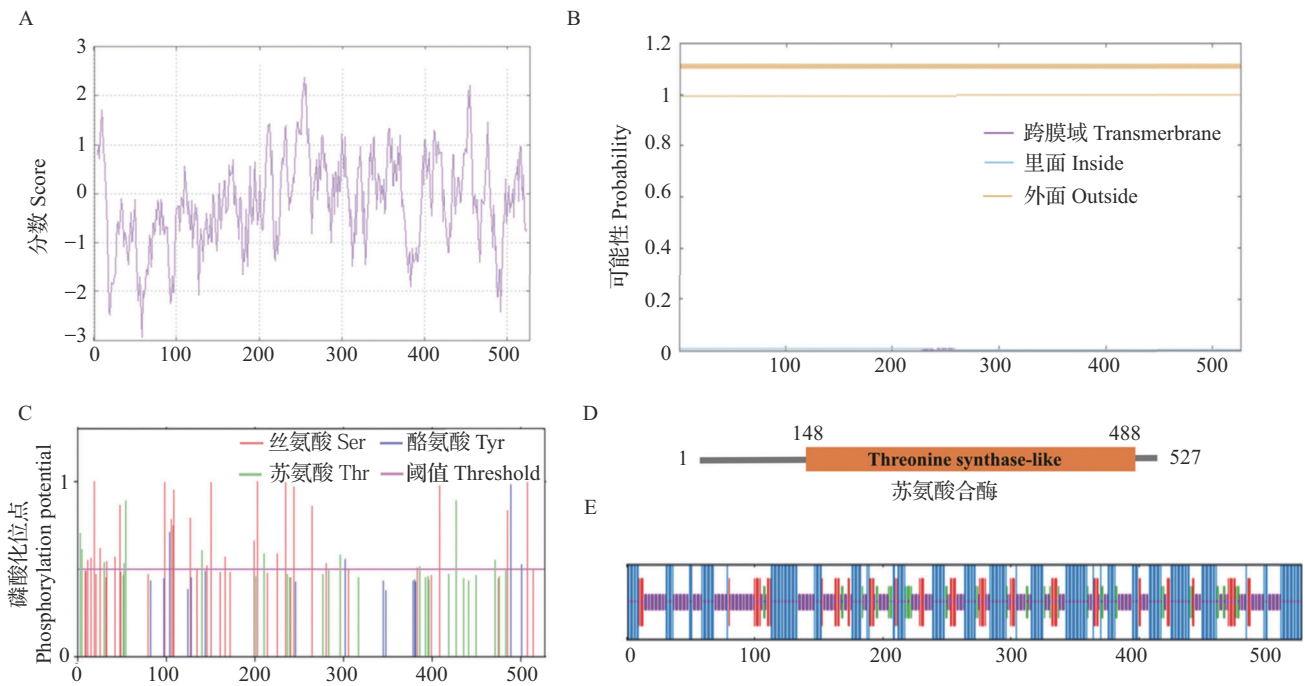
图4 B73 和 *Zmts1* 突变体不同组织 *ZmTS1* 基因的时空表达模式

Fig. 4 Spatio temporal expression patterns of the *ZmTS1* gene in different tissues of B73 and *Zmts1* mutant

2.4 *ZmTS1* 基因的生物信息学分析

Prot Param 在线分析 *ZmTS1* 基因编码 527 个氨基酸, 相对分子量 57.6 kDa, 等电点为 6.44, 消光系数 72350, 不稳定系数 34.91 (<40), 是一种稳定蛋白。亲水性为 -0.178 (>-0.5), 属于亲水性蛋白(图 5A)。

通过 TMHMM 预测蛋白序列跨膜结构, *ZmTS1* 属于非跨膜蛋白(图 5B)。Net Phos3.1 分析显示, *ZmTS1* 蛋白含有 26 个丝氨酸磷酸化位点、12 个苏氨酸磷酸化位点以及 4 个酪氨酸磷酸化位点(图 5C)。InterPro 分析结果表明, *ZmTS1* 含有 1 个苏氨酸合酶



A: 亲疏水性预测; B: 跨膜结构预测; C: 磷酸化结构预测; D: *ZmTS1* 结构域分析; E: *ZmTS1* 二级结构分析; α 螺旋用蓝色表示; β 转角用绿色表示; 延伸链用红色表示; 无规则卷曲用紫色表示; 横坐标处为氨基酸序列的序号

A: Hydrophilicity prediction; B: Prediction of transmembrane structure; C: Prediction of phosphorylation structure; D: *ZmTS1* structural domain analysis; E: Secondary structure analysis of *ZmTS1*; Alpha helices are shown in blue; Beta turns are shown in green; Extended strands are shown in red; Random coils are shown in purple; The horizontal coordinate indicates the position of the protein sequence

图5 *ZmTS1* 蛋白的生物信息学预测分析

Fig. 5 Bioinformatics prediction analysis of *ZmTS1* protein

结构域(图 5D)。SOPMA 在线分析表明, *ZmTS1* 的二级结构中含有 202 个 α 螺旋(38.33%), 39 个 β 转角(7.40%), 209 个延伸链(39.66%), 77 个无规则卷曲(14.61%)(图 5E)。

2.5 *Zmts1* 突变体的转录组分析

利用转录组测序技术分析突变体中 *ZmTS1* 基因突变是否影响其他基因的表达。对 B73 和 *Zmts1* 突变体授粉后 20 d 的籽粒胚乳提取 RNA 进行转录

组测序。通过对 6 个样品的转录组分析获得 43.74 Gb 的测序数据。6 个测序样品的 Q20 值均在 97.66% 以上, Q30 值均在 93.59% 以上。单个碱基位置的测序错误率为 0.02%~0.03%, Clean Reads 均高于 97% (表 2)。将皮尔逊系数(R^2)作为生物学重复相关性的评估指标, 结果表明, 生物学重复样品间的 $R^2 > 0.901$ (图 6)。结果显示测序数据质量和样品间的重复性良好, 可以进行下一步分析。

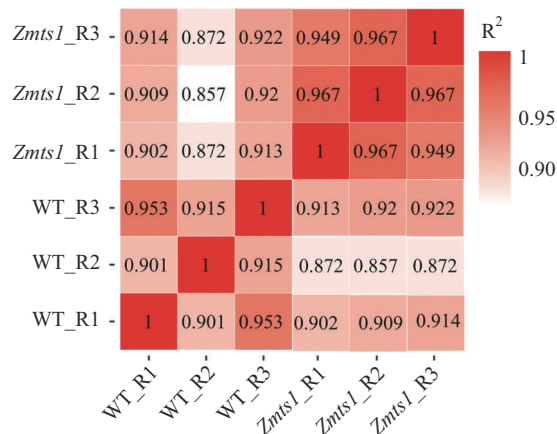
表 2 转录组测序数据结果统计

Table 2 Summary of datasets by Illumina sequencing

样品名称 Sample	测序 Reads 数量 Number of sequencing reads	过滤后 Reads Filtered reads	错误率 (%) Error rate	Q20 (%)	Q30 (%)	GC 含量 (%) GC content
WT_R1	43540100	42844478	0.02	98.03	94.39	53.12
WT_R2	48380496	47012800	0.03	97.66	93.59	54.42
WT_R3	53115608	51934714	0.02	98.02	94.40	52.83
<i>Zmts1</i> _R1	48947850	47961060	0.02	98.11	94.65	53.97
<i>Zmts1</i> _R2	49695698	48758594	0.02	98.00	94.34	53.82
<i>Zmts1</i> _R3	48102436	47182874	0.02	98.05	94.49	53.65

WT_R1~R3 代表野生型籽粒胚乳的 3 个生物学重复; *Zmts1*_R1~R3 代表突变体籽粒胚乳的 3 个生物学重复; Q20 和 Q30 分别计算 Phred 数值大于 20 和 30 的碱基占总体碱基的百分比 (Clean data)

WT_R1-R3 represents three biological replicates of wild-type grain endosperm; *Zmts1*_R1-R3 represents three biological repeats of the endosperm of mutant grains; Q20 and Q30 were calculated as the percentage of bases with Phred values greater than 20 and 30, respectively, out of the total number of bases (Clean data)



皮尔逊系数 R^2 为生物学重复相关性的评估指标

Pearson coefficient R^2 was used to evaluate the correlation of biological replicates

图 6 样本相关性矩阵图

Fig. 6 Correlation matrix among samples

将差异基因筛选的标准定义为: $|\log_2FC| \geq 1$ 且 $P\text{-value} < 0.05$, 绘制差异表达基因火山图, 结果显示, 在突变体和野生型玉米样品中, 共筛选到

1144 个差异表达基因, 其中表达量升高的基因有 571 个, 表达量下降的基因有 573 个(图 7)。

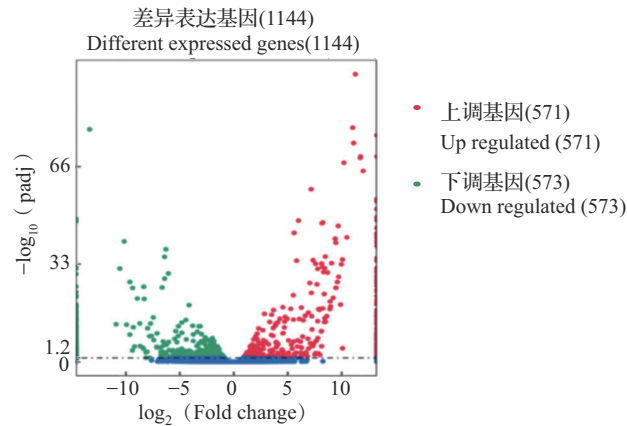


图7 差异表达基因火山图

Fig. 7 Volcano plot of differentially expressed gene

对 1144 个差异表达基因进行 KEGG 功能注释和 GO 功能富集分析。差异表达基因在 3 个 GO 条目中都超过了 20 个, 差异表达基因多参与 ncRNA 代谢 (ncRNA metabolic process)、碳水化合物生物合成 (Carbohydrate biosynthetic process) 及 tRNA 代谢 (tRNA metabolic process) 等生物过程及核酸结合 (Nucleic acid binding)、病毒组装 (Virion assembly)

和病毒基因组复制 (Viral genome replication) 等分子功能; 参与同源重组 (Homologous recombination)、核苷酸切除修复 (Nucleotide excision repair)、错配修复 (Mismatch repair) 等分子功能。KEGG 通路显著性富集分析显示, 差异表达基因多参与氨基酸的生物合成, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 半胱氨酸和蛋氨酸代谢等过程 (图 8)。

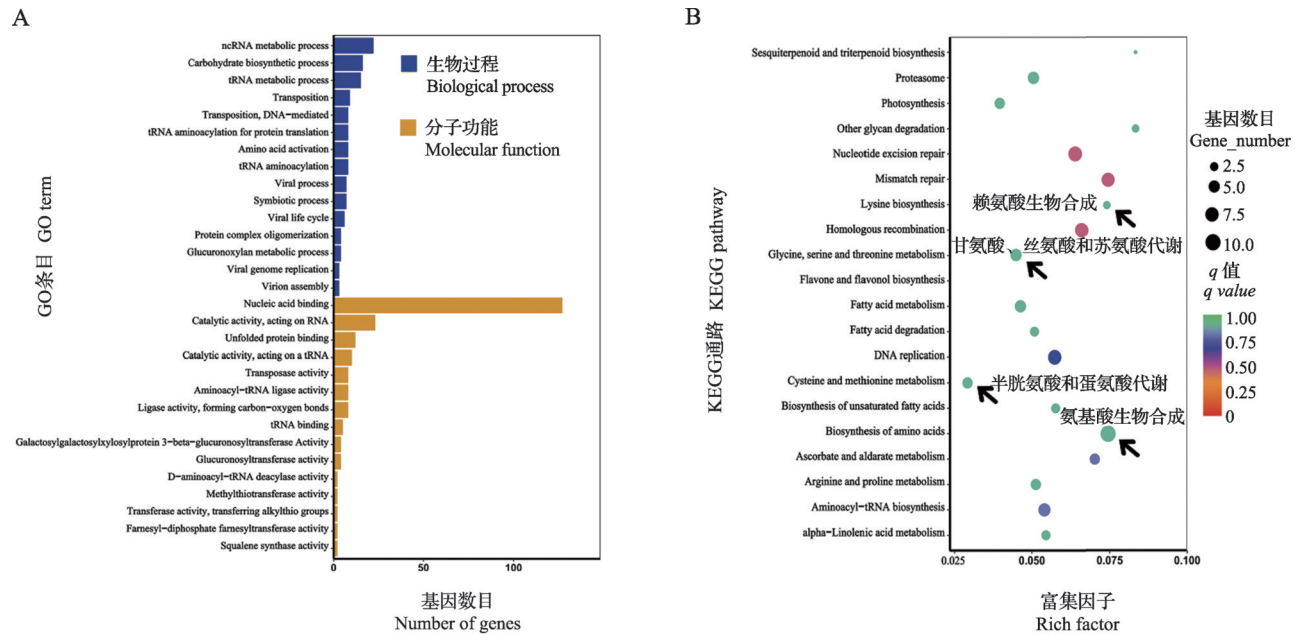


图8 差异表达基因的GO和KEGG分析

Fig. 8 GO and KEGG analysis of differentially expressed genes

2.6 qRT-PCR 验证

从富集分析结果中挑选出 7 个与蛋氨酸途径相关基因, 利用荧光定量 PCR 分析其在 B73 和 *Zmts1* 突变体籽粒胚乳中的表达情况, 7 个差异表达基因包括 5 个上调基因 (*Zm00001d050495*、*Zm00001d034460*、*Zm00001d008883*、*Zm00001d049823*、

Zm00001d018386) 和 2 个下调基因 (*Zm00001d048060*、*Zm00001d050133*) (图 9)。结果表明, 7 个差异表达基因在 RNA-Seq 和 qRT-PCR 中的表达模式基本是一致的, 推测这 7 个差异表达基因在一定程度上与蛋氨酸的合成存在着联系。

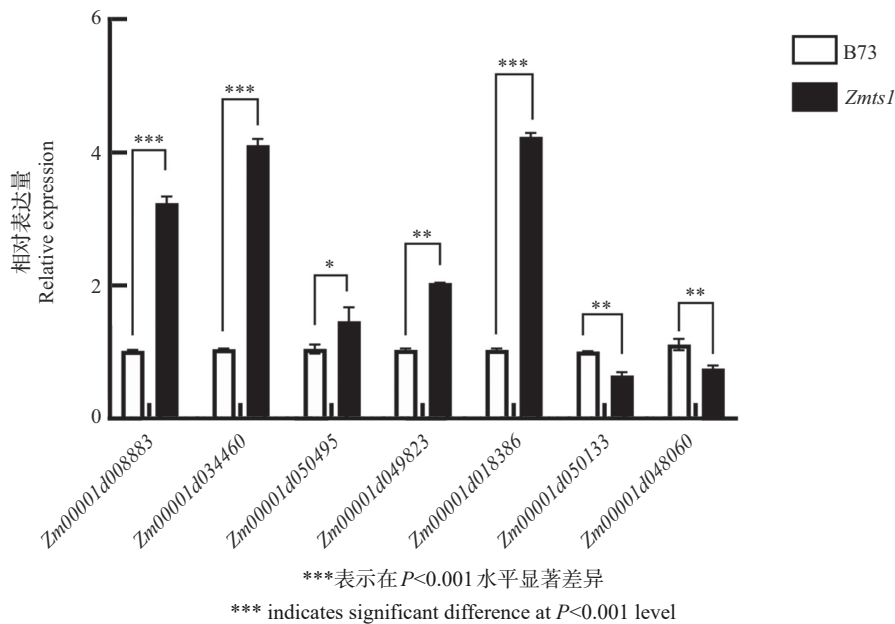


图9 实时荧光定量PCR结果

Fig. 9 Results of quantitative Real-time PCR

3 讨论

氨基酸是植物氮代谢过程中重要的代谢产物,以游离态、多肽和蛋白质形式存在^[21]。它是植物中最重要的氮源,对生长发育^[22]、抗逆^[23]及代谢都具有重要作用。植物氨基酸代谢路径中,蛋氨酸是富硫氨基酸代谢的关键位点之一,提高作物中蛋氨酸含量主要是通过过表达富含蛋氨酸的贮藏蛋白,减少缺乏蛋氨酸的贮藏蛋白,沉默蛋氨酸分解酶,或者上调参与蛋氨酸合成的关键酶等方法^[24-26]。如在大豆中引入富硫氨基酸的合成基因,大豆中蛋氨酸和半胱氨酸显著增加^[27]。在拟南芥中构建突变体降低了苏氨酸合成酶转录水平,蛋氨酸水平显著增多^[6]。过表达拟南芥胱硫醚- γ -合成酶的马铃薯块茎中蛋氨酸含量是野生型的2倍^[28]。在拟南芥 *ts* 突变体中,蛋氨酸含量较野生型提高了近100倍,这为通过抑制 *TS* 基因表达而提高蛋氨酸含量提供了可能。但目前除拟南芥外,在其他植物中通过抑制苏氨酸合成而提高蛋氨酸含量的研究还未见报道。本研究通过对 *ZmTS1* 的生物信息学和进化树分析,发现该基因含有一个外显子,共编码527个氨基酸。编码的氨基酸序列与高粱、谷子、水稻、短柄草和拟南芥存在同源关系。本研究通过同源克隆方法克隆 *ZmTS1* 基因,并通过提前终止突变体验证基因功能。

在 B73 和 *Zmts1* 突变体中,除茎外,玉米叶和籽粒中,氨基酸总量无显著差异。茎中蛋氨酸含量增

加2倍,叶中蛋氨酸含量增加58.33%,玉米籽粒中蛋氨酸含量提高60%。在玉米中叶和籽粒属于联系紧密的库源关系^[29],籽粒中蛋氨酸除了本身的蛋氨酸循环途径合成外,也有来自叶片中转运来的蛋氨酸。在 *Zmts1* 突变体中,在不影响籽粒氨基酸总量和其他氨基酸含量的情况下,蛋氨酸含量显著提高,推测可能是由于叶中所合成的蛋氨酸转运,直接提高了籽粒蛋氨酸含量;或者蛋氨酸合成的前体物质转运到籽粒中,间接促进蛋氨酸合成使其在籽粒中得到积累。大多数玉米醇溶蛋白中富含谷氨酰胺和脯氨酸,而蛋氨酸和半胱氨酸残基很少,由于编码10 kDa δ -zein 的基因存在亲本印迹,很难通过传统育种方式创制高蛋氨酸种质,本研究通过 SDS-PAGE 分析发现, *Zmts1* 突变体中的10 kDa 醇溶蛋白相较于野生型有了显著提高,为高蛋氨酸玉米育种提供了新的思路。

本研究对 B73 和 *Zmts1* 突变体授粉后20 d 籽粒胚乳进行转录组分析,通过比较差异表达基因对 *Zmts1* 突变体中可能影响蛋氨酸的基因进行分析以完善富硫氨基酸调控网络。共筛选到1144个差异表达基因。GO 富集和 KEGG 通路分析表明,差异表达基因主要参与氨基酸的生物合成、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢等过程。利用 qRT-PCR 进一步验证了7个可能参与蛋氨酸代谢途径关键候选基因, RNA-Seq 和 qRT-PCR 的表达模式一致,表明它们直接或间接参与调控蛋氨酸代谢。

参考文献

- [1] 董贤文. 提高蛋氨酸和支链氨基酸对奶牛乳腺上皮细胞酪蛋白合成调控通路的影响. 成都: 四川农业大学, 2020
Dong X W. Effects of increasing the supplementary of Met and branched amino acids on regulation of casein synthesis pathway in bovine mammary epithelial cells. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2020
- [2] 郭艳红, 唐静, 张博, 曹俊婷, 郭占宝, 谢明, 周正奎, 吴永保, 闻治国. 饲料中代谢能和蛋氨酸水平对育肥期北京鸭生长性能、屠宰性能和血浆生化指标的影响. 畜牧兽医学报, 2023, 54(10): 4278-4288
Guo Y H, Tang J, Zhang B, Cao J T, Guo Z B, Xie M, Zhou Z K, Wu Y B, Wen Z G. Effects of metabolisable energy and methionine levels in diets on growth performance, slaughter performance and plasma biochemical indices of Pekin ducks during fattening period. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2023, 54(10): 4278-4288
- [3] 吴永保, 唐静, 闻治国, 曹俊婷, 张博, 邢光楠, 谢明, 胡海峰, 崔德福, 侯水生. 蛋氨酸对HepG2细胞和鸭原代肝细胞生长和脂质代谢的影响. 动物营养学报, 2022, 34(8): 5364-5373
Wu Y B, Tang J, Wen Z G, Cao J T, Zhang B, Xing G N, Xie M, Hu H F, Cui D F, Hou S S. Effect of methionine on the growth and lipid metabolism of HepG2 cells and duck primary hepatocytes. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2022, 34(8): 5364-5373
- [4] 徐巧云, 胡良宇, 王梦芝. 蛋氨酸在动物体内代谢途径与周转机制. 动物营养学报, 2017, 29(11): 3877-3884
Xu Q Y, Hu L Y, Wang M Z. Metabolic pathways and turnover mechanisms of methionine in animals. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2017, 29(11): 3877-3884
- [5] 任莹, 连通, 张春义, 姜凌. 玉米甲硫氨酸合酶基因METS的克隆及表达特性. 生物技术通报, 2022, 38(4): 79-85
Ren Y, Lian T, Zhang C Y, Jiang L. Gene cloning and expression characteristics of methionine synthase METS in maize. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(4): 79-85
- [6] 汤洋洋, 鲁鑫, 吴金丽, 周志强, 郭长虹, 李新海. 玉米含硫氨基酸代谢机制研究进展. 植物遗传资源学报, 2024, 25(7): 1035-1045
Tang Z Y, Lu X, Wu J L, Zhou Z Q, Guo C H, Li X H. Research progress on sulfur-rich amino acid metabolism in maize. Journal of Plant Genetic Resources, 2024, 25(7): 1035-1045
- [7] Curien G, Ravel S, Dumas R. A kinetic model of the branch-point between the methionine and threonine biosynthesis pathways in *Arabidopsis thaliana*. European Journal of Biochemistry, 2003, 270: 4615-4627
- [8] Galili G, Amir R, Hoefgen R, Hesse H. Improving the levels of essential amino acids and sulfur metabolites in plants. Biological Chemistry, 2005, 386: 817-831
- [9] Avraham T, Badani H, Galili S, Amir R. Enhanced levels of methionine and cysteine in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants over-expressing the Arabidopsis cystathionine gamma-synthase gene. Plant Biotechnology Journal, 2005, 3(1): 71-79
- [10] Hacham Y, Matiyahu I, Schuster G, Amir R. Overexpression of mutated forms of aspartate kinase and cystathionine gamma-synthase in tobacco leaves resulted in the high accumulation of methionine and threonine. Plant Journal, 2008, 54(2): 260-271
- [11] Kim J, Lee M, Chalam R, Martin M N, Leustek T, Boerjan W. Constitutive overexpression of cystathionine gamma-synthase in Arabidopsis leads to accumulation of soluble methionine and S-methylmethionine. Plant Physiology, 2002, 128(1): 95-107
- [12] Bartlem D, Lambein I, Okamoto T, Itaya A, Uda Y, Kijima F, Tamaki Y, Nambara E, Naito S. Mutation in the threonine synthase gene results in an over-accumulation of soluble methionine in Arabidopsis. Plant Physiology, 2000, 123(1): 101-110
- [13] 顾金炎. NY/T 56-1987 谷物籽粒氨基酸测定的前处理方法. 北京: 农牧渔业部, 1987
Gu J Y. NY/T 56-1987 Pre-treatment method for the determination of amino acids in cereal grains. Beijing: Ministry of Agriculture, Animal Husbandry and Fisheries, 1987
- [14] 南芝润, 张杰, 侯磊, 田怀泽. 基于游离氨基酸含量的玉米自交系品质综合评价. 中国种业, 2022(11): 54-58
Nan Z R, Zhang J, Hou L, Tian H Z. Comprehensive quality evaluation of maize inbred lines based on free amino acid content. China Seed Industry, 2022(11): 54-58
- [15] Wilkins M R, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez J C, Williams K L, Appel R D, Hochstrasser D F. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. Methods in Molecular Biology, 1999, 112: 531-552
- [16] Chen Y, Yu P, Luo J, Jiang Y. Secreted protein prediction system combining CJ-SPHMM, TMHMM, and PSORT. Mamm Genome, 2003, 14(12): 859-865
- [17] Geourjon C, Deléage G. SOPMA: Significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. Computer Applications in the Biosciences, 1995, 11(6): 681-684
- [18] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874
- [19] Li Z G, Ye X Y. Transcriptome response of maize (*Zea mays* L.) seedlings to heat stress. Protoplasma, 2022, 59(2): 357-369
- [20] Cao H, Yang Z, Song S, Xue M, Liang G, Li N. Transcriptome analysis reveals genes potentially related to maize resistance to *Rhizoctonia solani*. Plant Physiology and Biochemistry, 2022, 193: 78-89
- [21] 高肖飞. 植物叶片中游离氨基酸的测定及其对大气氮沉降的响应. 南昌: 南昌大学, 2015
Gao X F. Determination of free amino acids in plant leaves and their response to atmospheric nitrogen deposition. Nanchang:

- Nanchang University, 2015
- [22] 孙源蔚, 荣艳菊, 冯军民, 郭聪聪, 王东晨. 氨基酸对燕山早丰板栗生长及结果的影响. 中国果树, 2022, 227(9): 38-41
Sun Y W, Rong Y J, Feng J M, Guo C G, Wang D C. Effects of amino acids on growth and fruiting of Yanshan early abundant chestnut. Chinese Fruit Tree, 2022, 227(9): 38-41
- [23] 徐宇, 肖化云, 郑能建, 张忠义, 瞿玲露. 植物组织中游离氨基酸在盐胁迫下响应的研究进展. 环境科学与技术, 2016, 39(7): 40-47
Xu Y, Xiao H Y, Zheng N J, Zhang Z Y, Qu L L. Progress of free amino acids in plant tissues in response to salt stress. Environmental Science and Technology, 2016, 39(7): 40-47
- [24] Amir R, Cohen H, Hacham Y. Revisiting the attempts to fortify methionine content in plant seeds. Journal of Experimental Botany, 2019, 70(16): 4105-4114
- [25] Marsolais F, Pajak A, Yin F, Taylor M, Gabriel M, Merino D M, Ma V, Kameka A, Vijayan P, Pham H, Huang S, Rivoal J, Bett K, Hernández-Sebastià C, Liu Q, Bertrand A, Chapman R. Proteomic analysis of common bean seed with storage protein deficiency reveals up-regulation of sulfur-rich proteins and starch and raffinose metabolic enzymes, and down-regulation of the secretory pathway. Journal of Proteomics, 2010, 73(8): 1587-600
- [26] Zhang Y, Scherthner J, Labbé N, Hefford M A, Zhao J, Simmonds D H. Improved protein quality in transgenic soybean expressing a de novo synthetic protein, MB-16. Transgenic Research, 2014, 23(3): 455-467
- [27] Kumar P, Jander G. Concurrent overexpression of *Arabidopsis thaliana* cystathionine γ -synthase and silencing of endogenous methionine γ -lyase enhance tuber methionine content in solanum tuberosum. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(13): 2737-2742
- [28] Chen W, Chen L, Zhang X, Yang N, Guo J, Wang M, Ji S, Zhao X, Yin P, Cai L, Xu J, Zhang L, Han Y, Xiao Y, Xu G, Wang Y, Wang S, Wu S, Yang F, Jackson D, Cheng J, Chen S, Sun C, Qin F, Tian F, Fernie A R, Li J, Yan J, Yang X. Convergent selection of a WD40 protein that enhances grain yield in maize and rice. Science, 2022, 375(6587): eabg7985
- [29] 陈国平, 郭景伦, 王忠孝, 陆卫平, 饶春富, 朱世明. 玉米库源关系的研究. 玉米科学, 1998(4): 37-39
Chen G P, Guo J L, Wang Z X, Lu W P, Rao C F, Zhu S M. Studies on the relationship between maize reservoir sources. Maize Science, 1998(4): 37-39