



植物遗传资源学报

Journal of Plant Genetic Resources

ISSN 1672-1810, CN 11-4996/S

《植物遗传资源学报》网络首发论文

题目：玉米籽粒高蛋白突变体 Zmts1 的鉴定与转录组分析
作者：洪泽渊，鲁鑫，汤泽洋，周志强，郭长虹，李新海
DOI：10.13430/j.cnki.jpgr.20240515002
收稿日期：2024-05-15
网络首发日期：2024-07-24
引用格式：洪泽渊，鲁鑫，汤泽洋，周志强，郭长虹，李新海. 玉米籽粒高蛋白突变体 Zmts1 的鉴定与转录组分析[J/OL]. 植物遗传资源学报.
<https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240515002>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

玉米籽粒高蛋氨酸突变体 *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到肉和奶的品质。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 Synthase1*), 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, 该基因含有一个苏氨酸合酶结构域, 编码的蛋白属于亲水性蛋白。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 个参与蛋氨酸代谢途径关键候选基因, 这 7 个基因能间接调控蛋氨酸代谢途径, RNA-Seq 与 qRT-PCR 的表达模式相一致。本研究为高蛋氨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 first limiting amino acid in maize-soybean meal diets for livestock and poultry. An imbalance in amino acids leads to inhibition of protein synthesis in the organism, thus affecting the quality of meat and milk. To analyse the regulatory mechanism of methionine accumulation in maize grains, this study used homologous cloning to obtain a candidate gene, *ZmTS1* (*Threonine Synthase 1*), which affects methionine content. Methionine content in *Zmts1* mutant seeds increased by 60%, SDS-PAGE results showed that the methionine residue-rich 10 KDa- δ alcohol-soluble protein in the mature *Zmts1* mutant kernel was significantly

收稿日期: 2024-05-15

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

通讯作者: 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)

Foundation project: National Nature Science Foundation of China (32001559)

increased compared to the wild type, confirming that the gene could significantly increase the methionine content in maize kernels. The gene contained a threonine synthase structural domain and the encoded protein was hydrophilic, according to biological information analysis. The gene contained a threonine synthase structural domain and the encoded protein was hydrophilic, according to biological information analysis. Transcriptome analysis revealed 1,144 differentially expressed genes related to methionine metabolism, of which 571 were up-regulated and 573 down-regulated. Analysis of GO and KEGG enriched pathways showed that the differentially expressed genes were mainly involved in amino acid biosynthesis and metabolism pathways. Seven key candidate genes involved in the methionine pathway were further validated by qRT-PCR, which could indirectly regulate the methionine pathway, and the expression patterns of RNA-Seq and qRT-PCR were consistent. This study provides new germplasm resources for breeding methionine-rich maize, and also provides some theoretical basis for the mechanism of methionine regulation 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。

蛋氨酸高等植物中的蛋氨酸合成为三个连续的酶促反应, 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。最后则是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^[12]。但目前除拟南芥外，在其他植物中通过抑制 TS 合成而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 (*ZmTS1*) 的基因为研究对象，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/)，与自交系 B73 杂交两代后再自交构建 BC₂F₂ 群体，进行遗传分析。

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 B73 中 *ZmTS1* 基因的 CDS 序列。根据 *ZmTS1* 基因的 CDS 序列设计引物(表 1)，使用南京诺唯赞生物科技股份有限公司 2×Phanta Flash Master Mix (Dye Plus) 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股份有限公司)。利用载体通用引物 M13F 和 M13R 测序，引物合成和测序工作在华大基因完成。

表 1 本研究引物信息

Table 1 Information of the primers in this study

引物名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')	功能
Primer name	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')	Function
CDS- <i>ZmTS1</i>	CTGCCCTCCCTAAACGAAA	GGAAAGGCTAGAGCAAACAAC	同源克隆
EMS- <i>Zmts1</i>	AGGGTTTCTCTGCGTGGTACG	TGCATAGATATTCCAAGATTGC	突变体鉴定
<i>ZmUbi</i>	TAAGCTGCCGATGTGCCTGCGTGC	CTGAAAGACAGAACATAATGAGCACAG	RT-qPCR 引物
RT- <i>ZmTS1</i>	CGCCATCGTGTTCTCTGC	GCTGTCTTCTGCCCCTCAA	
<i>Zm00001d008883</i>	AACCTCGAAGCCTTCTTCTCTG	TGCTCTCCACTTAAACCACTACTGA	
<i>Zm00001d018386</i>	GTAGTCAAGAAGGCTGAAAATC	ATCCAGTGCCCGAGAGA	
<i>Zm00001d034460</i>	GAGAGGATAGGAATAAGAGAGG	TCCAGAACCAGAAGAGAGC	

Zm00001d049823	GCCAAAGGAGCAAGCA	GGGGACACATATCCAGAGA
Zm00001d050495	TTCTGCTGTCCACGGCT	TGGTTGCACAAAGTTTCCT
Zm00001d048060	GCCTAAACCATCTCATTCTCA	TCCTCCAACACCCCAT
Zm00001d050133	CGCCTGTCTTCTACCT	TCCAATACGACCTTCTAACT

1.2.2 突变体株系基因型鉴定 *Zmts1* 突变体与自交系 B73 杂交两代后再自交构建 BC₂F₂ 群体，进行遗传分析及氨基酸含量测定。取田间种植的 BC₂F₂ 植株的叶片，CTAB 法提取 DNA，在突变位点前后 500 bp 设计测序引物 EMS-*Zmts1*（表 1），以 DNA 为模板进行 PCR 扩增，PCR 采用 1 μg/μL 模板 DNA，每个引物包含 0.8 μL（正向和反向），8 μLMix，用水补足到 20 μL。PCR 反应过程为 98°C 预变性 30 s；继续在 98°C 变性 10 s，60°C 复性 5 s，72°C 延伸 3 s，变性复性延伸共 30 个循环；最终 72°C 1 min。PCR 产物送至北京华大公司测序。

1.2.3 突变体株系氨基酸表型测定 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氨基酸表型。富硫氨基酸（蛋氨酸）含量方法参照国标“谷物籽粒氨基酸测定的前处理方法”（NY/T 56-1987）的酸水解法进行^[13]，用 L-8900 自动氨基酸分析仪进行测定。被测材料自交果穗收获后晾干，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后继续用烘箱 60°C 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 M 的 HCl 在 110°C 烘箱中烘 22~24 小时，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°C 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 个重复^[14]。本实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 醇溶蛋白提取 称取 0.1 g 籽粒粉末加 1 mL 提取液，37°C 摇床充分震荡 2 h，12,000 r/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°C 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/Net_Phos/）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，找出与它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* 突变体为荧光实时定量实验材料，取授粉后玉米籽粒 10 天、15 天、20 天、25 天、30 天和授粉后 20 天的根、茎、叶、花丝等组织用液氮冻存后放入-80℃冰箱保存，每个处理均有三次重复。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 并进行 RNA 完整性和浓度检测，使用 cDNA 逆转录试剂盒 FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix（北京天根生化科技有限公司）进行 cDNA 合成，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 天籽粒胚乳为材料，提取 RNA 进行转录组测序(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，比对完成后对对比上的 reads 进行组装和定量分析。

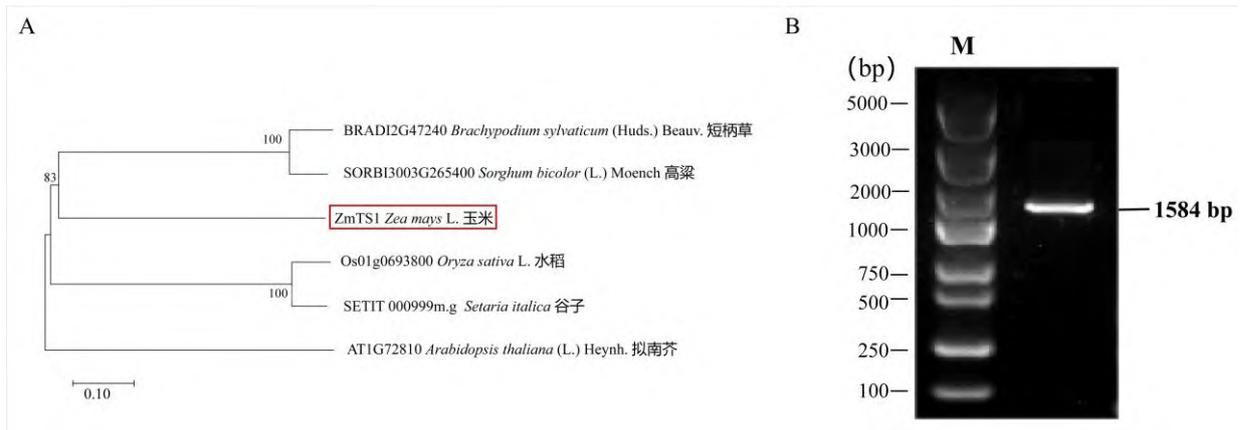
1.2.8 差异表达基因分析 利用 HTSeq 软件分析基因的表达水平，采用 FPKM（Fragments per kilobase of exon model per million mapped reads）值为 1 作为判断基因是否表达的评价指标。绘制火山图分析差异基因的分布情况。将差异基因筛选的标准定义为： $|\log_2FC| \geq 1$ 且 $P\text{-value} < 0.05$ ，确保实验误差在控制范围内。

1.2.9 qRT-PCR 验证 选取 7 个目标通路的差异表达基因进行 qRT-PCR 验证，以玉米中 *ZmUbi* 为内参基因，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。每个样品设置三个生物学重复和三次技术重复，重复之间的 Ct 值控制在 ± 0.5 ，利用 Excel 公式（ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ）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 SORBI_3003G265400、谷子 Si000999m.g、水稻 OS01G0693800、短柄草 BRADI2G47240 和拟南芥 AT1G72810 存在同源关系。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 SORBI_3003G265400 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，测序结果表明其 CDS 片段长 1584 bp，编码 527 个氨基酸（图 1B）。



A: *ZmTS1* 进化树分析; B: *ZmTS1* 基因克隆

A: Phylogenetic tree analysis of *ZmTS1*; B: *ZmTS1* gene cloning; M: DS5000 Marker

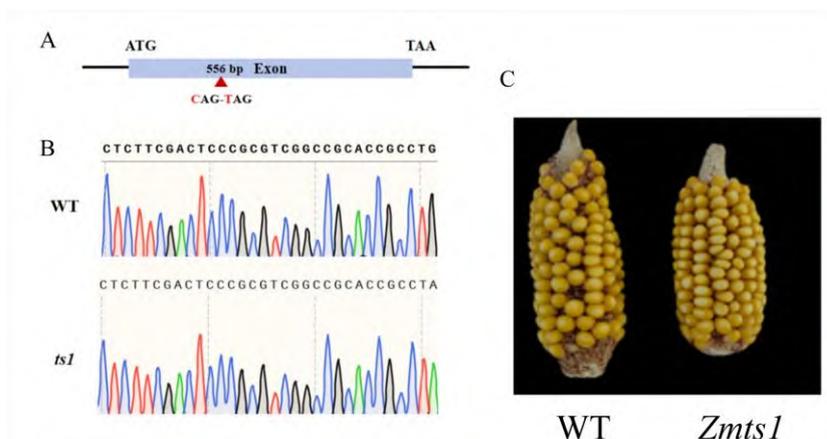
图 1 *ZmTS1* 基因的同源克隆

Fig.1 Homologous cloning of the *ZmTS1*

2.2 *ZmTS1* 基因的功能验证

以 *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 *ZmTS1* 突变体和野生型 B73 的籽粒、叶以及茎进行氨基酸含量测定。在本试验 3 个组织中, 与 B73 相比, 除茎组织外, 总氨基酸含量在突变体与 B73 的籽粒与叶片间无显著性差异 ($P>0.05$), 而籽粒中的蛋氨酸含量显著高于叶片和茎 (图 3A~B)。

为了观察野生型与 *ZmTS1* 突变体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 20 天与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 20 天胚乳中, 醇溶蛋白各亚基在野生型与突变体中均无明显差异; 在突变体成熟籽粒中, 富含蛋氨酸残基的 10 KDa- δ zein 蛋白有了显著提高, 富含半胱氨酸残基的 27 KDa- γ zein 和 16 KDa- γ zein 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 zein 和 22 KDa- α zein 的含量在二者间无明显变化 (图 3C)。

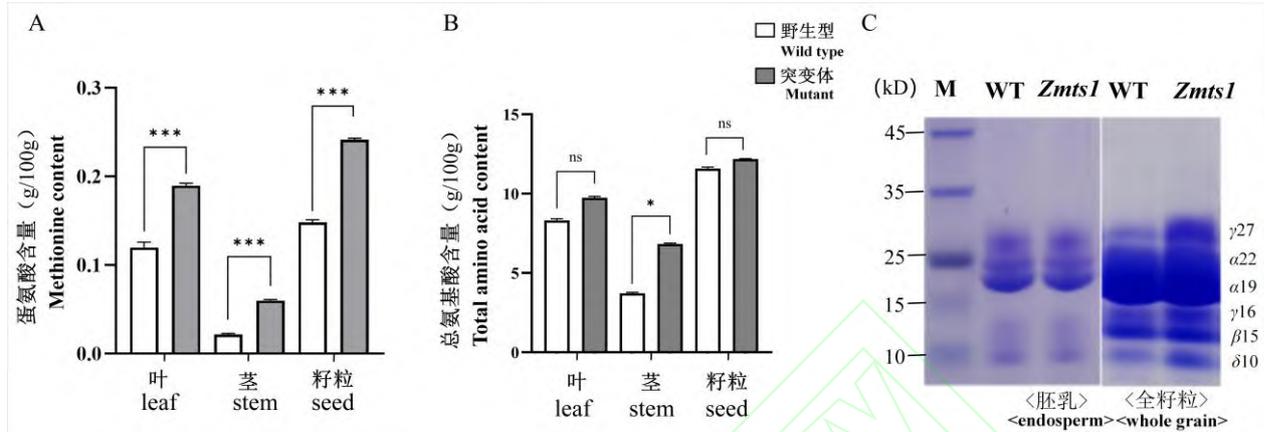


A: 野生型与 *ZmTS1* 基因结构图; B: *ZmTS1* 基因型检测; C: 野生型与 *ZmTS1* 与果穗比较

A: Wild-type and *ZmTS1* gene structure map; B: *ZmTS1* Genotype Testing; C: Wild-type and *ZmTS1* phenotypes of ears

图 2 *zmTS1* 基因型检测及果穗表型

Fig.2 The genotype verification of *ZmTS1* and the phenotypes of ears



***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

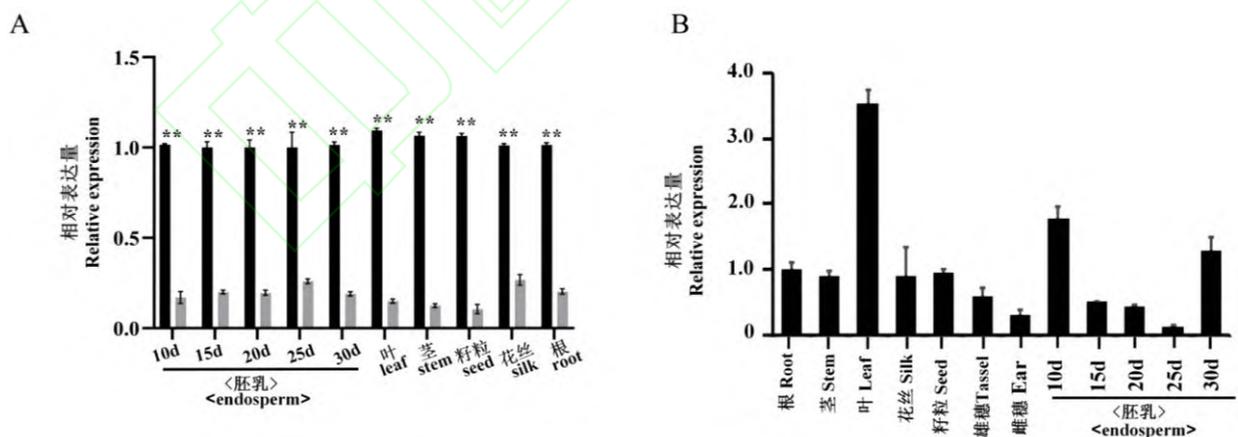
***denotes highly significant level ($P < 0.01$); ** denotes significant level ($P < 0.05$); ns denotes no significant level; The same as below

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 sulphur-rich amino acid content and SDS-PAGE analysis of B73 and *ZmTS1* mutants

2.3 *ZmTS1* 基因的表达模式分析

对 *ZmTS1* 突变体材料和野生型 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* 基因的表达丰度较野生型均显著降低, 在籽粒和授粉后不同时期的组织中, 差异达到极显著水平 ($P < 0.01$) (图 4A)。在各个组织和不同时期胚乳中, *ZmTS1* 在叶片中的表达丰度最高, 其次是授粉后 10 天的胚乳 (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: B73 和 *ZmTS1* 中 *ZmTS1* 基因的相对时空表达模式; B: B73 中 *ZmTS1* 基因的时空表达模式; d (DAP) 代表授粉后天数

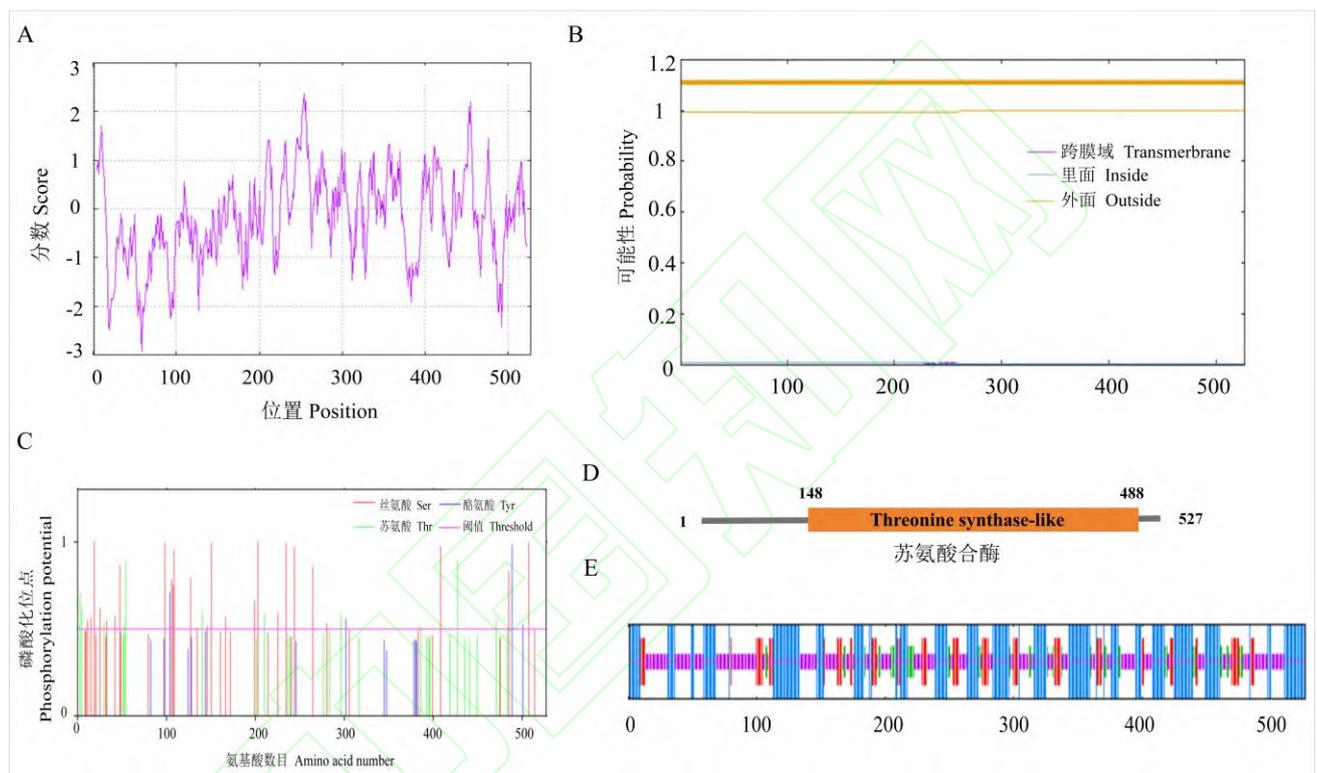
A: Relative spatiotemporal expression patterns of the *ZmTS1* gene in B73 and *ZmTS1*; B: Spatiotemporal expression pattern of the *ZmTS1* gene in B73; d (DAP) represents the number of days after pollination

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，亲水性系数大于-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* 基因含有 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）。结构域分析结果表明，*ZmTS1* 含有 1 个苏氨酸合酶结构域（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）。



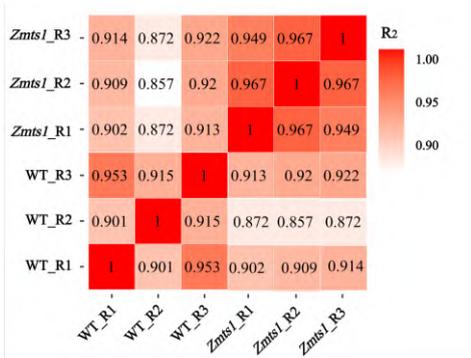
A: 亲疏水性预测; B 跨膜结构预测; C: 磷酸化结构预测; D: *ZmTS1* 结构域分析; E: *ZmTS1* 二级结构分析
A: Hydrophilicity prediction; B. Prediction of transmembrane structure; C: Prediction of phosphorylation structure; D: *ZmTS1* structural domain analysis; E: secondary structure analysis of *ZmTS1*

图 5 *ZmTS1* 蛋白的生物信息学分析

Fig.5 Bioinformatics analysis of *ZmTS1* protein

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 WT 和 *Zmts1* 突变体授粉后 20 天的籽粒胚乳提取 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 97.98% 以上，Q30 值均在 94.31% 以上。单个碱基位置的测序错误率为 0.02%-0.03%，Clean Reads 均高于 97.17%，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，两两样品间的 $R^2 > 0.8$ （图 6），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）。



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; 皮尔逊系数 R^2 为生物学重复相关性的评估指标

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

图 6 样本相关性图

Fig.6 Sample correlation charts

表 2 转录组测序结果概况

Table 2 Summary of Illumina transcriptome assembly

样品名称	测序 reads 数量	过滤后 reads	错误率	Q20	Q30	GC 含量
WT-R1	43,540,100	42,844,478	0.02%	98.03%	94.39%	53.12%
WT-R2	48,380,496	47,012,800	0.03%	97.66%	93.59%	54.42%
WT-R3	53,115,608	51,934,714	0.02%	98.02%	94.40%	52.83%
<i>Zmts1</i> -R1	48,947,850	47,961,060	0.02%	98.11%	94.65%	53.97%
<i>Zmts1</i> -R2	49,695,698	48,758,594	0.02%	98.00%	94.34%	53.82%
<i>Zmts1</i> -R3	48,102,436	47,182,874	0.02%	98.05%	94.49%	53.65%

Q20、Q30 分别计算 Phred 数值大于 20、30 的碱基占总体碱基的百分比 (clean data)

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)

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)。

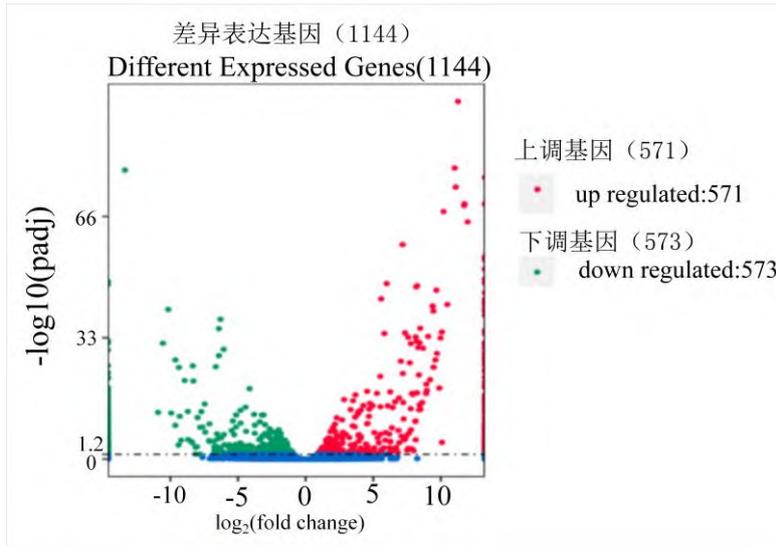
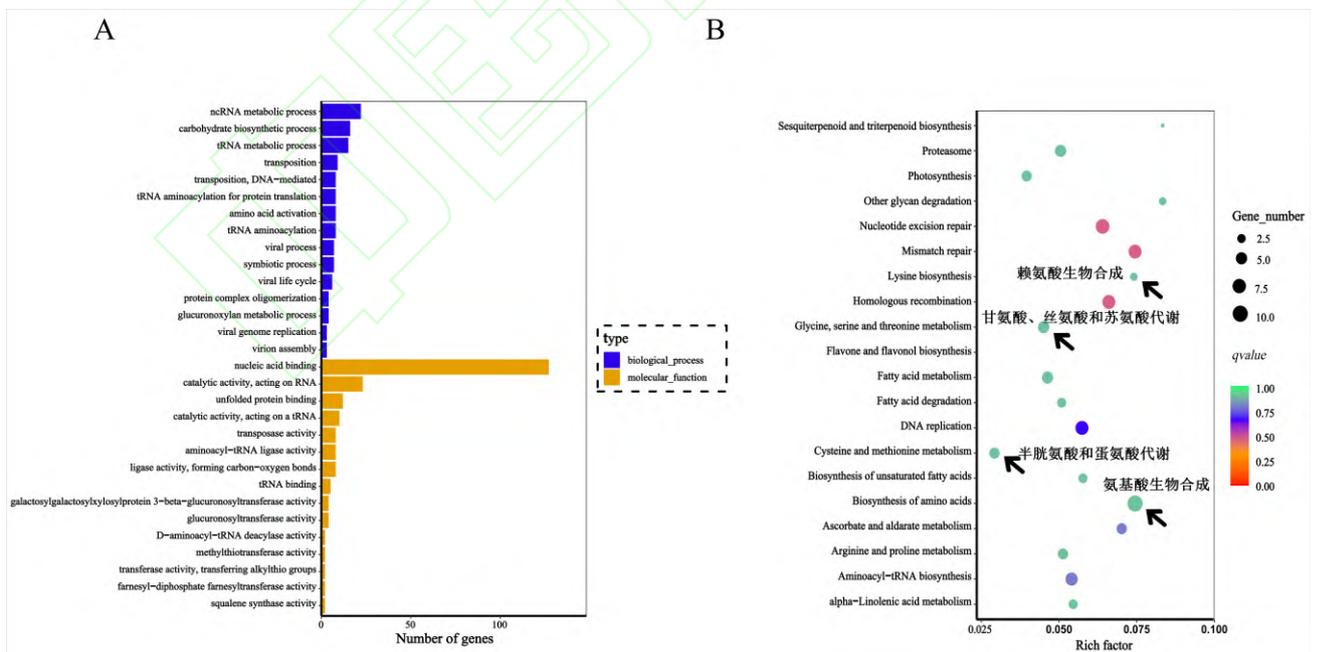


图 7 差异基因火山图

Fig.7 Volcano plot of differentially expressed gene distribution

对 1144 个差异表达基因进行了 KEGG 功能注释和 GO 功能富集分析。在生物过程部分中, 差异表达基因在 3 个 GO term 中都超过了 20 个基因, 分别是蛋白质折叠 (Protein Folding)、温度刺激反应 (Response to Temperature Stimulus)、tRNA 代谢过程 (tRNA Metabolic Process)。KEGG Pathway 显著性富集分析显示, 差异表达基因多参与 ncRNA 代谢、碳水化合物生物合成及 tRNA 代谢等生物学过程、氨基酸的生物合成如甘氨酸、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 (图 8A~B)。



A: 差异表达基因 GO 分类条形图 B: 差异表达基因 KEGG 分类富集路径

A: Differently expressed gene GO classification bar graph B: Differently expressed gene KEGG classification enrichment pathway

图 8 差异表达基因的 GO 和 KEGG 通路分析

Fig.8 GO and KEGG pathway 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 分析了其在 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*) 进行 qRT-PCR 验证 (图 9)，定量引物序列见表 1。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。

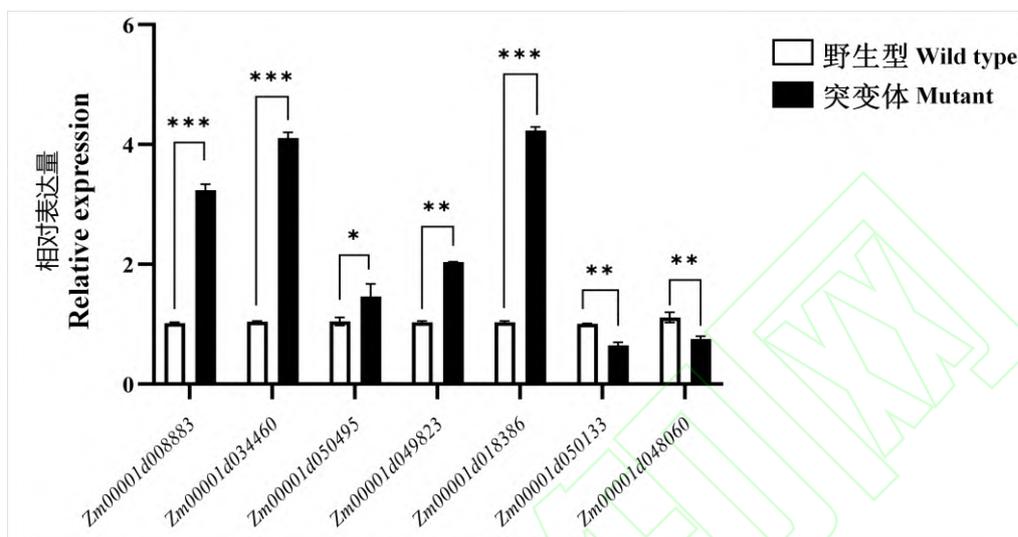


图 9 实时荧光定量 PCR 验证结果

Fig.9 Verification 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 *TS* 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 *SORBI_3003G265400*、谷子 *Si000999m.g*、水稻 *OS01G0693800*、短柄草 *BRADI2G47240* 和拟南芥 *AT1G72810* 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 *ts1* 突变体中, 除茎外, 玉米叶和籽粒中, 氨基酸总量无显著差异 ($P>0.05$)。茎中蛋氨酸增加 2 倍。叶中蛋氨酸增加 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 ($P<0.05$)。这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 Met 和 Cys 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 天籽粒胚乳进行转录组分析, 通过比较上下调差异表达基因对 *Zmts1* 突变体中可能影响蛋氨酸的基因进行分析以及完善富硫氨基酸调控网络。共筛选到 1,144 个基因差异表达。通过 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如甘氨酸、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 个参与蛋氨酸代谢途径关键候选基因, 它们直接或间接参与调控蛋氨酸代谢, RNA-Seq 和 qRT-PCR 的表达模式一致。

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. 四川: 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. Sichuan: 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] 汤泽洋, 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, Ravanel 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, Matityahu 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 MN, 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, Lambain 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, 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, 332(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, 332(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 C, 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 MA, Zhao J, Simmonds DH. 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 AR, 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

