

郑春花,孔祥远,隋炯明,等.花生金属蛋白酶家族基因 *FtsH* 的鉴定、分类和盐胁迫表达分析[J].江苏农业科学,2016,44(12):74-77.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.019

# 花生金属蛋白酶家族基因 *FtsH* 的鉴定、 分类和盐胁迫表达分析

郑春花,孔祥远,隋炯明,束晨,赵春梅

(青岛农业大学/山东省高校植物生物技术重点实验室,山东青岛 266109)

**摘要:** *FtsH* 是一种 ATP 和  $Zn^{2+}$  依赖型金属蛋白酶,在植物抗逆胁迫中发挥了重要作用。为分析花生中 *FtsH* 家族成员情况,构建花生叶片转录组数据库,筛选出 19 个 *FtsH* 家族基因,位于花生 A 组野生种的 8 条染色体上,与拟南芥、水稻的 *FtsH* 基因进行同源序列比对后发现,多数 *FtsH* 基因没有聚到已报道的亚类。利用花生耐盐突变体(S2)和对照(S4)构建盐胁迫处理前后各时间段的表达谱文库,进行 *FtsH* 基因盐胁迫表达分析,结果表明,9 个 *FtsH* 基因受盐胁迫诱导表达,绝大多数 *FtsH* 基因在耐盐突变体和对照中表现出不同的表达模式。该研究为花生金属蛋白酶基因的功能研究与耐盐分子育种提供了基础。

**关键词:** 花生; *FtsH* 基因; 基因表达谱; 耐盐突变体; 盐胁迫

**中图分类号:** S565.201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)12-0074-03

*FtsH* 属于 AAA 蛋白酶家族,是一种 ATP 和  $Zn^{2+}$  依赖型蛋白,在生物体内广泛分布<sup>[1]</sup>。*FtsH* 负责细菌原生质膜、线粒体膜、叶绿体膜上未装配蛋白的降解,通过降解非复合体形式的自由亚基,可以避免有害物质的大量积累<sup>[2-3]</sup>。在高等植物中,*FtsH* 蛋白参与 D1 蛋白光氧化损伤产物的降解,现已证实 *FtsH* 具有降解快速周转的蛋白的功能,*FtsH* 是植物抵抗光抑制过程中 PS II 复合物修复的关键成分之一<sup>[4]</sup>。*FtsH* 蛋白除了作为蛋白酶发挥功能外,还作为分子伴侣参与蛋白的装配和折叠<sup>[5-7]</sup>。

已有研究表明,拟南芥的 12 个 *FtsH* 基因和水稻的 *FtsH* 基因可以分为 8 个亚族,每个亚族的成员蛋白序列高度保守,种内同源物相似性大于 80%,且种间同源物的相似性也大于 70%<sup>[8]</sup>。*FtsH* 不仅参与生物体内正常的代谢调节过程,而且与多种逆境胁迫响应密切相关,有些成员在植物抵抗热激和高渗、盐害、冷胁迫和病原菌等胁迫中发挥着重要作用<sup>[9-11]</sup>。

笔者前期以花生胚小叶为外植体,通过平阳霉素离体诱变和羟脯氨酸定向筛选,获得了一批羟脯氨酸耐性苗及其后代<sup>[12]</sup>,其中 1 个突变体(S2)在 0.7% 盐溶液中发芽率超过 50%,且具有较高的超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性,而对照花育 20(S4)在相同浓度的盐溶液中发芽率只有 6.7%。为从整个转录组水平了解花生 *FtsH* 家族基因的情况,笔者用上述材料构建花生叶片转录组文库,利用生物信息学研究手段,鉴定花生 *FtsH* 家族基因,进行 *FtsH* 基因的

染色体定位和分类。然后构建耐盐突变体 S2 和对照 S4 在盐胁迫处理前后的表达谱,分析 *FtsH* 家族各成员在盐胁迫处理前后表达量的变化,为全面了解 *FtsH* 家族成员在花生中的功能以及耐盐分子育种奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究所用材料为平阳霉素离体诱变和羟脯氨酸定向筛选后稳定遗传的耐盐突变体(S2)和对照花育 20(S4)。

### 1.2 转录组数据库构建

用 250 mmol/L NaCl 处理耐盐突变体 S2 和对照 S4,在 0、6、12、24、48 h 取叶片,每个样品包含 2 个生物学重复。混合后构建转录组文库,送交北京诺和致源公司进行双向测序,组装处理后获得非冗余 Unigene 序列,在 NCBI 数据库注册(注册号 SRR3114511)。用 NR、NT、SwissProt、PFAM、KOG、GO、KEGG 数据库进行基因功能注释。

### 1.3 盐胁迫处理前后表达谱数据库构建

由北京诺和致源公司对盐胁迫处理前后 20 个样品进行数字化表达谱测序,构建花生叶片盐胁迫处理前后的表达谱数据库(NCBI 注册号 SRR3210665、SRR3210666)。

### 1.4 基因家族成员鉴定、基因结构分析和染色体定位

根据 NR、NT、SwissProt、PFAM、KOG、GO、KEGG 数据库的基因功能预测,搜索 *FtsH* 基因。利用生物信息学软件分析蛋白结构域、分子量、理论等电点和可能的亚细胞定位。从花生全基因组数据(<http://www.peanutbase.org>)下载 A 组野生种基因组序列,进行基因序列比对,取相似度最高的序列作为目标基因,并根据数据库的预测结果和比对结果进行基因结构分析。根据与数据库比对后的结果,标示基因在染色体上的位置,得到各个基因在染色体上的分布情况。

### 1.5 系统进化树的构建

通过 Clustal X 软件对拟南芥、水稻 *FtsH* 蛋白进行序列比

收稿日期:2016-08-30

基金项目:国家自然科学基金(编号:31571705、31301356、31471542);山东省科技发展计划(编号:2014GNC110002)。

作者简介:郑春花(1979—),女,山西忻州人,硕士,图书馆员,主要从事生物信息学分析。E-mail:zchsjm@163.com。

通信作者:赵春梅,博士,副教授,主要从事作物分子育种研究。E-mail:meiwei2002@163.com。

对分析,采用邻接法生成 *FtsH* 基因的系统进化树。

### 1.6 盐胁迫响应分析

将 S2 或 S4 样品中,某一基因在胁迫处理前后 0、6、12、24、48 h 的任何 2 个时间段内的表达量进行比较,如果调整后的  $P < 0.05$ ,则认为该基因对盐胁迫有响应。

## 2 结果与分析

### 2.1 花生 *FtsH* 家族基因的鉴定及它们在染色体上的分布

根据上述 7 大数据库的基因功能预测结果,笔者从花生叶片转录组数据库中筛选出 25 个候选 *FtsH* 基因。将其与公布的花生 A 组野生种基因组序列进行比对,其中 6 个基因(编号分别为 c40440\_g2、c35114\_g1、c38335\_g1、c44670\_g2、c41532\_g1 和 c19813\_g1)因与其他基因比对到同一位置被剔除,最终得到 19 个花生 *FtsH* 基因。根据与花生 A 组野生种基因组的比对结果,确定了 18 个 *FtsH* 基因在 A 染色体组的分布情况,这些基因分布在 8 条染色体上,其中第 2、8 号染色体上不含有 *FtsH* 基因,第 3、4、9、10 号染色体分布的成员数量最多,有 3~5 个,其他各染色体含有 1~2 个 *FTSH* 基因, c53069\_g1 在 A 染色体组没有比对到相应序列(表 1)。花生 *FtsH* 蛋白最长有 1 283 个氨基酸残基,最短的有 209 个氨基酸残基,其等电点范围为 4.91~10.09,除 c53069\_g1 无法进行亚细胞定位外,其余 18 个蛋白中 10 个定位于叶绿体,8 个定位于线粒体。基因结构分析显示,外显子数为 1~19 个(表 1)。

表 1 花生 *FtsH* 基因的基本信息

基因编号	所在染色体	亚细胞定位	氨基酸数(个)	分子量(ku)	等电点	外显子数目(个)
c43699_g1	1	线粒体	583	65.53	6.74	6
c5716_g1	1	线粒体	209	24.03	11.33	4
c44096_g1	3	叶绿体	877	99.92	9.97	11
c31995_g1	3	叶绿体	701	75.16	6.24	4
c1356_g1	3	线粒体	310	32.45	6.49	4
c43933_g1	3	线粒体	718	79.10	8.75	8
c36613_g1	3	叶绿体	603	67.54	9.08	9
c25618_g1	4	线粒体	500	56.49	8.15	3
c39505_g1	4	叶绿体	690	74.20	5.53	4
c40421_g1	5	线粒体	485	54.01	7.76	2
c40440_g1	6	叶绿体	683	73.15	5.86	6
c44339_g1	7	叶绿体	1 008	114.78	6.41	19
c39850_g1	7	叶绿体	809	87.69	9.00	14
c37927_g1	9	线粒体	546	60.71	9.83	5
c44670_g1	9	叶绿体	1 283	147.72	8.45	19
c39969_g1	10	叶绿体	644	71.79	10.17	4
c32457_g1	10	线粒体	649	72.61	4.99	14
c36931_g2	10	叶绿体	256	29.23	4.75	1
c53069_g1	—	—	—	—	—	—

### 2.2 花生 *FtsH* 基因的聚类分类

模式植物拟南芥、水稻分别有 12、9 个 *FtsH* 基因,可分为 8 个亚家族<sup>[8]</sup>。根据 *FtsH* 蛋白家族成员长度差异、含不同特征的结构域等特点,将花生 19 个 *FtsH* 蛋白与拟南芥和水稻基因组中全部 *FtsH* 蛋白进行多重序列比对和系统进化分析。聚类结果显示,4、5、7 亚家族只有拟南芥和水稻的 *FtsH* 基因,暂时没有找到花生的 *FtsH* 基因;1、2、3、6、8 亚家族分别包含 1、2、1、1、1 个 *FtsH* 基因,其他 13 个 *FtsH* 基因没有聚到

这 8 个亚家族,它们可能属于一些新的亚族(图 1)。

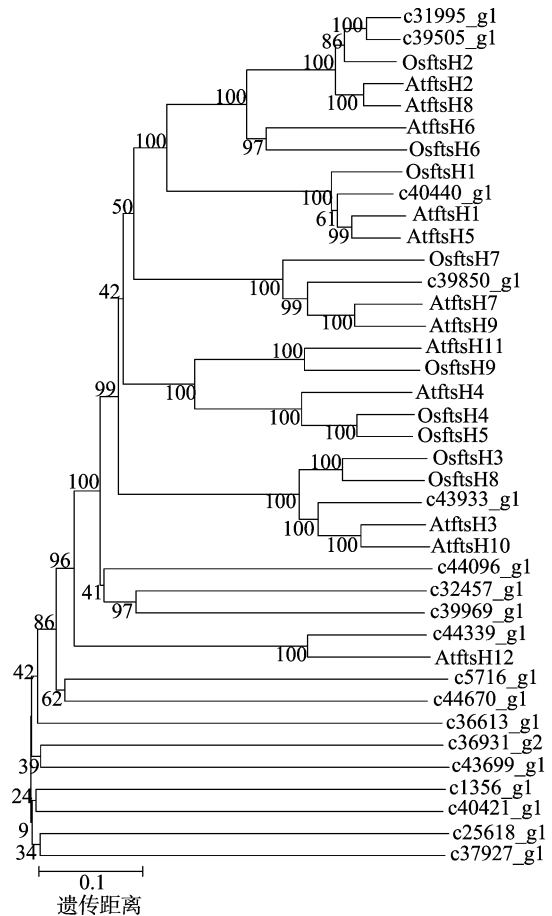


图 1 花生 *FtsH* 基因的进化树

### 2.3 花生 *FtsH* 家族基因的盐胁迫响应分析

笔者利用盐胁迫处理前后 S2、S4 的 20 个数字表达文库谱,在胁迫处理前后对 19 个 *FtsH* 基因的任意 2 个时间段的表达量进行比较,根据调整后的  $P$  值,确定其是否受盐胁迫诱导表达,结果见表 2 和图 2。可以看出,在 S2 中,与胁迫处理前相比,胁迫处理 6、12 h 后,差异表达的基因各有 3 个;胁迫处理 48 h 与 12 h 相比,也有 3 个差异表达的基因。而在 S4 中,胁迫处理 48 h 与 12 h 相比,差异表达的基因数最多,有 5 个上调,1 个下调。

进一步分析发现,5 个基因(c25618\_g1、c40440\_g1、c53069\_g1、c37927\_g1、c40421\_g1)在 S2 和 S4 中均受胁迫诱导表达;2 个基因(c32457\_g1、c36613\_g1)只在 S2 中受胁迫诱导表达;2 个基因(c44096\_g1、c31995\_g1)只在 S4 中受胁迫诱导表达(表 2、图 2)。S2 中,c53069\_g1 和 c44096\_g1 表达模式相同,均为上调一下调—上调—上调,c32457\_g1 和 c36613\_g1 表达模式相同,均为上调—上调一下调一下调;S4 中,c25618\_g1 和 c40440\_g1 表达模式相同,均为下调一下调—上调—上调,c44096\_g1 和 c40421\_g1 表达模式相同,均为上调一下调一下调一下调。只有 c53069\_g1 和 c37927\_g1 这 2 个基因在 S2 和 S4 中表达模式完全一致,其他基因表达模式都有差别,特别是 c25618\_g1、c32457\_g1、c44096\_g1 和 c36613\_g1 在 S2 和 S4 中表达模式差别非常大。

各基因百万外显子的碱基片段(FPKM)值差异很大,S2

中 FPKM 值的变化范围为 0.68 ~ 537.85,而 S4 中 FPKM 值的变化范围为 2.64 ~ 632.78。与胁迫处理前相比,胁迫处理后,c53069\_g1 在 S2 中的表达量明显上调,log<sub>2</sub>(变化表达量)最高达到 3.29,而在 S4 中的多个时间段的比值都超过 2.70,最高达到 4.99;胁迫处理后 c25618\_g1 在 S4 中的 log<sub>2</sub>(变化表达量)最高达到 4.15;而 c37927\_g1 在胁迫处理后的某些时间段出现了显著下调,在 S2、S4 中的 log<sub>2</sub>(变化表达量)最低分别为 -3.08、-2.03。由此可见,不同的 *FtsH* 基因在胁迫处理后的表达模式差异很大。

表 2 耐盐突变体(S2)和对照(S4)中受盐胁迫诱导表达的 *FtsH* 基因数目

时间 (h)	S2 表达的 <i>FtsH</i> 基因数(个)					S4 表达的 <i>FtsH</i> 基因数(个)				
	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h
0	0	2	2	0	1	0	1	1	1	1
6	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
12	1	0	0	0	2	0	1	0	2	5
24	0	0	1	0	0	0	3	1	0	0
48	0	0	1	0	0	0	2	1	0	0

注:红色数字表示上调基因数,蓝色数字表示下调基因数。

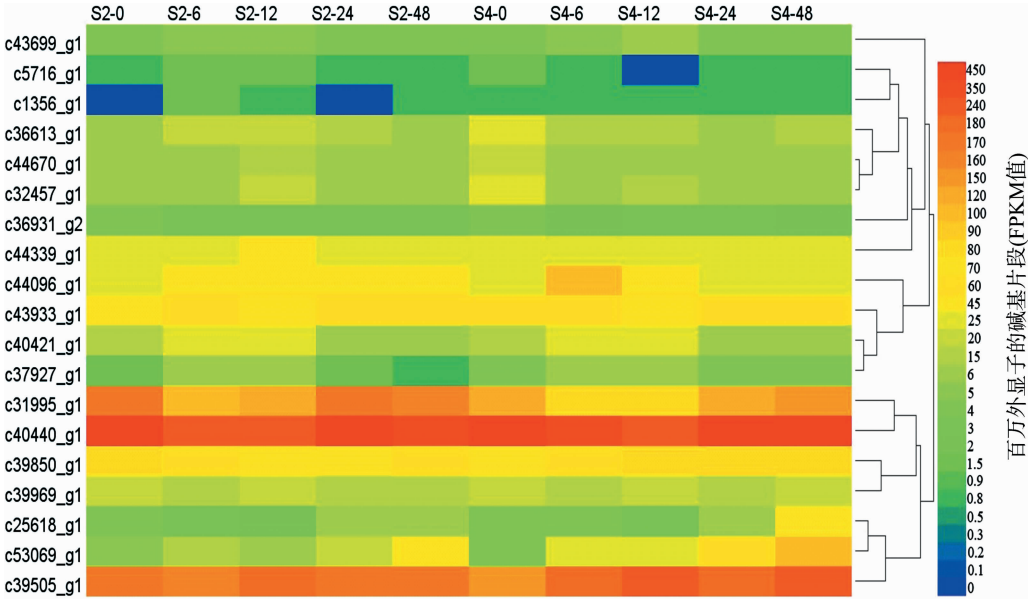


图2 盐胁迫处理前后 *FtsH* 基因在 S2、S4 中的表达情况

3 结论与讨论

生物体内的 FtsH 种类繁多,拟南芥中有 12 种 FtsH 蛋白酶,其中 AtFtsH3、AtFtsH4 和 AtFtsH10 定位于线粒体,其余 9 种定位于叶绿体<sup>[8]</sup>,本研究筛选到的 FtsH 蛋白酶均定位于叶绿体和线粒体。FtsH 参与多种调控途径,有些 *FtsH* 基因与某些生物和非生物胁迫响应密切相关。烟草叶绿体 FtsH 蛋白同系物 DS9 与植株抗病性有关,其表达量降低后叶片对病毒侵染产生超敏反应<sup>[13]</sup>。拟南芥 AtFtsH1 参与 D1 蛋白光氧化损伤产物的降解<sup>[4]</sup>,AtFtsH2 和 AtFtsH5 参与光保护和类囊体发育过程,2 个基因突变都会引起叶片花斑和对光抑制敏感性提高<sup>[14-15]</sup>。定位于叶绿体中的一个苜蓿 *FtsH* 基因只受低温和光照调控,而不受脱落酸、NaCl 或脱水胁迫诱导<sup>[9]</sup>。来源于番茄叶片组织的 *LeFtsH6* 基因也定位于叶绿体,该基因只受热胁迫诱导表达,而不受冷害、盐、干旱或光胁迫诱导,其启动子中的顺式调控元件热激响应元件(HSE)可以与热激因子互作<sup>[10]</sup>。在冰叶日中花中筛选到的 *FtsH* 基因可受盐胁迫表达<sup>[11]</sup>。由此可见,高等植物中 FtsH 家族成员功能发生了分化。

为了分析花生中 *FtsH* 基因的情况,笔者利用构建的花生叶片转录组数据库,通过生物信息学手段,鉴定出 19 个 *FtsH* 基因,位于花生 A 组野生种的 8 条染色体上。聚类分析表明,只有 1、2、3、6、8 这 5 个亚家族含有花生 *FtsH* 基因,花生

的绝大多数 *FtsH* 基因可能属于一些新的亚家族。拟南芥中多个 *FtsH* 基因成对存在,有些成对基因之间表达模式相似且功能可以互补,如 *AtFtsH3* 和 *AtFtsH10*,*AtFtsH2* 和 *AtFtsH8*,*AtFtsH1* 和 *AtFtsH5* 等<sup>[8]</sup>,而在笔者的试验中这种现象并不多见,可能是由于笔者获得的 *FtsH* 基因只是来源于叶片组织,而未包括花生全部的 *FtsH* 基因。利用花生耐盐突变体(S2)和对照(S4)构建盐胁迫处理前后各时间段的表达谱数据,进行基因盐胁迫表达分析,结果表明,共 9 个基因在 S2 和(或)S4 中受盐胁迫诱导表达,绝大多数 *FtsH* 基因在耐盐突变体和对照中的表达模式有较大差异,这些 *FtsH* 基因可能在花生抵御盐胁迫中发挥着重要作用。该结果为进一步研究其功能以及利用它们来改良花生的耐盐性提供了重要依据。

参考文献:

[1] Schumann W. FtsH - a single - chain chaperonin[J]. FEMS Microbiol Rev, 1999, 23(1): 1 - 11.

[2] Ostersetzter O, Adam Z. Light - stimulated degradation of an unassembled Rieske FeS protein by a thylakoid - bound protease: the possible role of the FtsH protease[J]. Plant Cell, 1997, 9(6): 957 - 965.

[3] Akiyama Y, Kihara A, Ito K. Subunit  $\alpha$  of proton ATPase F0 sector is a substrate of the FtsH protease in *Escherichia coli*[J]. FEBS Lett, 1996, 399: 26 - 28.

[4] Lindahl M, Spetea C, Hundal T, et al. The thylakoid FtsH protease plays a role in the light - induced turnover of the photosystem II D1

薛涛涛,边 金,伍 陆,等. 酿酒酵母组蛋白 H3K56A 突变菌株的构建及其对细胞生长的影响[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):77-81.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.020

# 酿酒酵母组蛋白 H3K56A 突变菌株的构建 及其对细胞生长的影响

薛涛涛,边 金,伍 陆,赵秀娟,崔向军,蔡 禄

(内蒙古科技大学数理与生物工程学院,内蒙古包头 014010)

**摘要:**组蛋白修饰,例如甲基化、乙酰化等修饰对基因表达和细胞生长至关重要。为揭示组蛋白 H3 第 56 位赖氨酸(K)修饰对酵母细胞生长的重要性,构建 H3K56 定点突变为丙氨酸(A)的组蛋白突变株 H3K56A,并对其在高温、高盐等条件下的生长状况进行初步检测。根据酵母同源重组的原理,采用两步替换法构建 H3K56A 突变菌株,用分光光度法测定突变菌株的生长曲线,并分别在高盐、高温条件下检测突变体的表型。结果表明,酿酒酵母组蛋白 H3K56A 突变菌株构建成功,其生长曲线与野生型无明显差异;H3K56A 突变株对高温、高盐条件均较敏感,且在高盐条件下,菌体生长缓慢、菌落偏小,表明组蛋白 H3K56 位点的修饰可能与酿酒酵母抗高盐、高温机制有关。

**关键词:**酿酒酵母;H3K56A 突变菌;组蛋白修饰;两步替换法;同源重组;高盐环境;高温环境;抗逆机制

**中图分类号:** S188 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)12-0077-05

核小体是真核生物细胞内染色质的基本组成单位,它由 147 bp 的 DNA 缠绕核心组蛋白八聚体形成<sup>[1]</sup>,组蛋白 H1 与 2 个核小体之间有 40~60 bp 的连接 DNA 以稳定核小体的结构<sup>[2]</sup>。组蛋白八聚体具有球状的三维结构,而蛋白质氨基端则游离在三维球形的表面,游离氨基端的氨基酸残基可以被共价修饰<sup>[3]</sup>。在酿酒酵母中,编码核心组蛋白 H2A、H2B、

H3、H4 的基因都有 2 个拷贝,主要的核心组蛋白基因组成 4 个基因座,每个基因座包含 2 个组蛋白基因,这 2 个基因共用 1 个中心启动子并以不同的方向进行转录。编码组蛋白 H3、H4 的 2 个基因分别为 *HHT1-HHF1*、*HHT2-HHF2*,分别位于 II 号、XIV 号染色体上<sup>[4]</sup>,在基因组中这 2 个拷贝只要有 1 个存在,便可维持细胞的正常生存<sup>[5]</sup>。组蛋白 H2A、H2B 的 2 个基因座分别为 *HTA1-HTBI*、*HTA2-HTB2*,它们编码几乎相同的组蛋白 H2A、H2B<sup>[6]</sup>。与组蛋白 H3/H4 不同的是基因座 *HTA1-HTBI* 对于细胞的生存是必需的,但 *HTA2-HTB2* 却不是。组蛋白上能发生共价修饰的氨基酸残基称为修饰位点,组蛋白修饰主要发生在组蛋白的 N-末端残基上<sup>[7]</sup>。常见的修饰种类包括组蛋白乙酰化、甲基化、泛素化、磷酸化,以及研究较少的小泛素相关修饰物 (small ubiquitin-related

收稿日期:2015-11-02

基金项目:国家自然科学基金(编号:61361014、31260274);内蒙古自然科学基金(编号:2015MS0334)。

作者简介:薛涛涛(1990—),女,山西临县人,硕士研究生,主要从事表观遗传学研究。E-mail: xuetaotao196485@163.com。

通信作者:赵秀娟,博士,教授,主要从事表观遗传学研究。E-mail: zhaoxiujuan@imust.cn。

protein[J]. Plant Cell,2000(12):419-431.

[5] Akiyama Y, Shirai Y, Ito K. Involvement of FtsH in protein assembly into and through the membrane. II. Dominant mutations affecting FtsH functions[J]. J Biol Chem, 1994, 269(7): 5225-5229.

[6] Jayasekera M M, Foltin S K, Olson E R, et al. *Escherichia coli* requires the protease activity of FtsH for growth[J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 380: 103-107.

[7] Makino S, Makino T, Abe K, et al. Second transmembrane segment of FtsH plays a role in its proteolytic activity and homo-oligomerization[J]. FEBS Letters, 1999, 460(3): 554-558.

[8] 张杰道,孙爱清. 拟南芥和水稻金属蛋白酶 FtsH 基因家族的基因组比较分析[J]. 生物工程学报, 2009, 25(9): 1402-1408.

[9] Ivashuta S, Imai R, Uchiyama K, et al. Changes in chloroplast FtsH-like gene during cold acclimation in alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. J Plant Physiol, 2002, 159: 85-90.

[10] Sun A Q, Yi S Y, Yang J Y, et al. Identification and characterization of a heat-inducible FtsH gene from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [J]. Plant Sci, 2006, 170: 551-562.

[11] Kore-eda S, Cushman M A, Akseelrod I, et al. Transcript profiling of salinity stress responses by large-scale expressed sequence tag analysis in *Mesembryanthemum crystallinum* [J]. Gene, 2004, 341: 83-92.

[12] Sui J M, Wang Y, Wang P, et al. Generation of peanut drought tolerant plants by pingyangmycin-mediated in vitro mutagenesis and hydroxyproline-resistance screening [J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0119240.

[13] Seo S, Okamoto M, Iwai T, et al. Reduced levels of chloroplast FtsH protein in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves accelerate the hypersensitive reaction [J]. Plant Cell, 2000, 12: 917-932.

[14] Chen M, Choi Y, Voytas D F, et al. Mutations in the *Arabidopsis* VAR2 locus cause leaf variegation due to the loss of a chloroplast FtsH protease [J]. Plant J, 2000, 22: 303-313.

[15] Sakamoto W, Tamura T, Hanba - Tomita Y, et al. The VAR1 locus of *Arabidopsis* encodes a chloroplastic FtsH and is responsible for leaf variegation in the mutant alleles [J]. Genes Cells, 2002(7): 769-780.