



红豆草*OvIF7GT*基因克隆与表达分析

李珍珍 张正芳 马晓兰 王文颖 邱庆辉 王小梅 周华坤 殷恒霞

Gene cloning and expression analysis of *OvIF7GT* in *Onobrychis viciifolia*

LI Zhenzhen, ZHANG Zhengfang, MA Xiaolan, WANG Wenying, QIU Qinghui, WANG Xiaomei, ZHOU Huakun, YIN Hengxia

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2023-0526>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

扁果枸杞转录因子基因*LbWIN1*的克隆及响应非生物胁迫的表达分析

Cloning and expression analysis of transcription factor gene *LbWIN1* in response to abiotic stress in *Lycium barbarum* ssp. *Bianguo*
草业科学. 2023, 40(6): 1449 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2022-0190>

基于实时荧光定量PCR筛选巨菌草内参基因

Screening of reference genes of *Pennisetum giganteum* based on real-time fluorescence quantitative PCR
草业科学. 2022, 39(5): 907 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0680>

柱花草*SgLPR1*基因克隆与表达分析

Cloning and expression analysis of *SgLPR1* in *Stylosanthes guianensis*
草业科学. 2023, 40(7): 1856 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2022-0641>

云南逸散紫花苜蓿*MsVDE*基因的克隆与表达分析

Cloning and expression analysis of *MsVDE* in escaped alfalfa in Yunnan, China
草业科学. 2022, 39(6): 1140 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0658>

芦竹*TCP*家族的基因鉴定与盐胁迫下的表达分析

Gene identification and expression analysis of the *TCP* gene family of *Arundo donax* under salt stress
草业科学. 2024, 41(10): 2316 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2024-0027>

藏绵羊*PRDX5*基因的克隆及其在睾丸中的表达

Cloning of Tibetan sheep (*Ovis aries*) *PRDX5* gene and its expression in testis
草业科学. 2022, 39(5): 1015 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0326>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

DOI: 10.11829/j.issn.1001-0629.2023-0526

李珍珍, 张正芳, 马晓兰, 王文颖, 邱庆辉, 王小梅, 周华坤, 殷恒霞. 红豆草 *OvIF7GT* 基因克隆与表达分析. 草业科学, 2024, 41(12): 2917-2927.

LI Z Z, ZHANG Z F, MA X L, WANG W Y, QIU Q H, WANG X M, ZHOU H K, YIN H X. Gene cloning and expression analysis of *OvIF7GT* in *Onobrychis viciifolia*. Pratacultural Science, 2024, 41(12): 2917-2927.



红豆草 *OvIF7GT* 基因克隆与表达分析

李珍珍^{1,2}, 张正芳^{1,2}, 马晓兰^{1,2}, 王文颖³, 邱庆辉²,
王小梅², 周华坤⁴, 殷恒霞¹

(1. 青海大学省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 青海 西宁 810016; 2. 青海大学生态环境工程学院, 青海 西宁 810016; 3. 青海师范大学生命科学院 / 青藏高原生物多样性形成机制与综合利用省级重点实验室, 青海 西宁 810008; 4. 中国科学院西北高原生物研究所 / 青海省寒区恢复生态学重点实验室, 青海 西宁 810008)

摘要: 异黄酮是豆科植物中一类典型的次级代谢产物, 其化学结构多样性对于植物生长发育及抵御环境胁迫具有重要功能。本研究以高寒地区豆科牧草红豆草 (*Onobrychis viciifolia*) 为研究材料, 根据转录组测序数据, 从红豆草叶片中克隆获得一个异黄酮 7-O-糖基转移酶 (Isoflavone 7-O-glucosyltransferase, *OvIF7GT*) 基因, 并对该基因进行生物信息学、亚细胞定位和干旱胁迫下表达水平的分析。结果显示: 1) 本研究克隆得到的 *OvIF7GT* 大小为 1 512 bp, 编码 503 个氨基酸, 蛋白质相对分子质量为 56 774.36 Da; 其编码蛋白是一种亲水性蛋白, 具有两个跨膜结构域, 62 个磷酸化结合位点, 理论等电点为 5.51。2) 保守结构域分析推测, *OvIF7GT* 蛋白属于异黄酮糖基转移酶家族, 主要由 α -螺旋 (41.75%) 和无规则卷曲 (35.79%) 构成; 系统发育进化关系分析表明该蛋白与蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 和鹰嘴豆 (*Cicer arietinum*) 中的 IF7GT 亲缘关系较近; 此外, 亚细胞定位分析显示 *OvIF7GT* 主要存在于细胞质中, 在细胞核中也有分布。3) 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 结果表明, 在干旱胁迫 72 h 后, 红豆草幼苗中 *OvIF7GT* 显著受到干旱胁迫的诱导表达, 且在叶中比根中的表达量更高。该研究结果表明, *OvIF7GT* 参与了红豆草干旱胁迫的响应, 可能在红豆草的抗旱中具有潜在功能。

关键词: 红豆草; 异黄酮 7-O-糖基转移酶; 基因克隆; 亚细胞定位; 实时荧光定量 PCR; 干旱胁迫; 表达分析

文献标识码: A 文章编号: 1001-0629(2024)12-2917-11

Gene cloning and expression analysis of *OvIF7GT* in *Onobrychis viciifolia*

LI Zhenzhen^{1,2}, ZHANG Zhengfang^{1,2}, MA Xiaolan^{1,2}, WANG Wenying³, QIU Qinghui²,
WANG Xiaomei², ZHOU Huakun⁴, YIN Hengxia¹

(1. State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China;

2. College of Eco-Environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China;

3. College of Life Sciences, Qinghai Normal University, Key Laboratory of Biodiversity Formation Mechanism and Comprehensive Utilization of Qinghai-Tibet Plateau, Xining 810008, Qinghai, China;

4. Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Key Laboratory of Restoring Ecology in Cold Region, Xining 810008, Qinghai, China)

Abstract: Isoflavones are a class of typical secondary metabolites in legumes. The diversity of their chemical structure aids plant growth and development and resistance to environmental stress. In the present study, a gene encoding isoflavone 7-O-glucosyltransferase (*OvIF7GT*) was cloned from the leaf of *Onobrychis viciifolia* with specific primers designed from the

收稿日期: 2023-09-25 接受日期: 2023-11-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32300269); 青海省科技厅应用基础研究项目 (2022-ZJ-731)

第一作者: 李珍珍 (1998-), 女, 青海西宁人, 在读硕士生, 主要从事植物抗逆的生理和分子机制研究。E-mail: lzz870504@163.com

通信作者: 殷恒霞 (1984-), 女, 青海海东人, 教授, 博士, 主要从事高寒植物极端环境适应性机制研究。Email: hengxiayin@qhu.edu.cn

transcriptome data, and the gene was subjected to bioinformatics analysis, subcellular localization, and relative expression analysis under drought stress. The results revealed that the gene *OvIF7GT* had the sequence size of 1 512 bp and encodes a protein with 503 amino acids and molecular weight of 56 774.36 Da. The protein was proposed to be hydrophilic and had two transmembrane domains, 62 phosphorylation binding sites, and a theoretical isoelectric point of 5.51. Its conserved domain analysis showed that the protein *OvIF7GT* contained α -helix (41.75%) and random coils (35.79%); hence, it is proposed to be belonged to the isoflavone glucosyltransferase family. Its phylogenetic analysis showed that the protein *OvIF7GT* has the closest relationship with the *Medicago truncatula* and *Cicer arietinum* homologues. Subcellular localization analysis showed that *OvIF7GT* was mainly present in the cytoplasm and also distributed in the nucleus. The real-time fluorescence quantification (qRT-PCR) result revealed that the relative expression level of *OvIF7GT* gene was significantly induced by drought stress, the highest level was at 72 h under drought stress, and the expression level in the leaves was higher than that in roots. Therefore, the gene *OvIF7GT* probably plays a role in drought stress response and resistance of *O. viciifolia*.

Keywords: *Onobrychis viciifolia*; Isoflavone 7-O-glucosyltransferase; gene cloning; subcellular localization; real-time fluorescence quantitative PCR; drought stress; expression analysis

Corresponding author: YIN Hengxia E-mail: hengxiayin@qhu.edu.cn

作为一类植物广泛产生的次级代谢产物,类黄酮不仅具有重要的药用价值,而且在植物生长发育及环境胁迫抗逆调控中具有重要作用^[1-3]。在非生物胁迫如干旱胁迫下,植物体内往往会产生过多的活性氧,而类黄酮物质中存在多酚羟基的结构,具有清除氧自由基的活性,可以帮助植物降低活性氧水平,以此减轻植物受到的氧化损伤^[4]。糖基化主要是在尿苷二磷酸糖基转移酶 (UDP-glycosyltransferase, UGT) 的催化作用下,将供体糖上的糖基转移到小分子化合物上,而糖基化位置、糖基数目、糖苷键性质的差异,导致类黄酮化学和功能更具多样性^[5]。最新研究也表明,类黄酮的糖基化过程参与了植物对环境胁迫的应答^[6],如以类黄酮为糖基化底物的糖基转移酶基因 *UGT2* 在玉米 (*Zea mays*) 中过表达,促进了类黄酮苷的积累,进而增强了玉米对干旱和盐环境的抗性^[7]。此外,豆科植物蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 糖基转移酶 *UGT71G1* 对异黄酮和黄酮醇槲皮素具有较高的糖基化效率,提高了蒺藜苜蓿对非生物胁迫的抗性^[8-9]。由此看出,类黄酮及参与其生物合成的基因如 *UGT* 在应答和抵御植物环境胁迫中发挥着潜在功能。

异黄酮是一种主要分布于豆科植物中的类黄酮,其糖基化主要是 C-7 位的 O-葡萄糖基化,并且主要由异黄酮 7-O-葡萄糖基转移酶 (*IF7GT*) 特异性催化形成^[10],不仅在豆科植物固氮根瘤形成中充当关键信号分子,而且还参与抵抗病原体感染的防御机

制^[11-12]。目前,仅在葛根 (*Pueraria lobata*)^[13]、甘草 (*Glycyrrhiza echinata*)^[14]、大豆 (*Glycine max*) 幼苗的根^[15] 和大豆种子^[16] 中分离获得,而从其他豆科植物中克隆的 *IF7GT* 还十分有限。

红豆草 (*Onobrychis viciifolia*), 系豆科驴豆属草本植物,已在甘肃、青海、西藏等高原地区引种栽培多年^[17]。前期试验对田间种植的红豆草转录组分析发现,类黄酮代谢通路在红豆草干旱环境适应中显著富集,进一步分析发现,参与类黄酮代谢的红豆草异黄酮 7-O-葡萄糖基转移酶基因 (*OvIF7GT*) 的表达显著上调,提示 *OvIF7GT* 基因在红豆草干旱胁迫耐受中可能具有重要作用。本研究以红豆草为试验材料,利用 RT-PCR 技术克隆红豆草 *OvIF7GT* 基因,并对该基因进行生物信息学及亚细胞定位分析;此外,利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术分析该基因在红豆草幼苗中对干旱胁迫的响应表达情况,以期为进一步深入探究 *OvIF7GT* 在红豆草抗旱中的功能提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

红豆草种子于 2022 年 8 月采自于青海省牧草良种繁殖场 (100°39' E, 35°09' N), 将颗粒饱满的种子去稃后分别用 75% 的无水乙醇和 1% 的次氯酸钠溶液进行表面消毒,然后置于铺有双层无菌滤纸

的玻璃培养皿中并加入 3 mL 灭菌水, 在植物光照培养箱中萌发, 培养条件为: 光照/黑暗 16 h/8 h, 温度 23 ℃, 湿度 40%, 每天更换新的无菌水。待种子萌发第 7 天, 选取长势一致的幼苗定植于 1/2 Hoagland 营养液中继续培养, 每 3 d 更换一次营养液。幼苗生长至第 28 天, 以 1/2 Hoagland 营养液配制的 15% PEG6000 溶液模拟干旱胁迫, 同时以不加 PEG6000 的营养液培养作为对照 (CK), 对照和胁迫组各设置 3 个重复; 分别取 0、6、12、24、48 和 72 h 干旱胁迫后的红豆草幼苗叶和根组织存放于-80 ℃ 冰箱, 用于后续 *OvIF7GT* 的克隆和表达分析。

1.2 试验试剂及主要仪器

植物 RNA 提取试剂盒 (TaKaRa, 大连, Cat#9769)、cDNA 反转录试剂盒 (Takara, 大连, Cat#6210A)、pMD19-T 载体 (Takara, 大连, Cat#3271)、实时荧光定量试剂盒 (Takara, 大连, Cat#RR820A)、DNA 片段凝胶回收试剂盒 (B518141-0100, 上海)、大肠杆菌 *E.coli* DH5 α (全式金生物技术有限公司, 北京)、高保真聚合酶 Prime STAR HS (Premix) (Takara, 大连, Cat#R040Q)、荧光定量 PCR 试剂盒 TB Green Premix Ex Taq II (Takara, 大连, Cat#RR820A)。

超微量核酸蛋白测定仪 (NanoPhotometer® NP80, IMPLEN)、凝胶成像仪 (Universal Hood II, BIO-RAD)、实时荧光定量 PCR 仪 (LightCycler®480II, Roche)、激光共聚焦显微镜 (NIKON A1R+, 日本尼康公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 RNA 提取及 cDNA 链的合成

利用植物总 RNA 提取试剂盒, 按照试剂盒说明

书提取 CK 和干旱胁迫处理后红豆草叶和根组织的总 RNA, 然后利用 Nanodrop 检测 RNA 浓度和纯度; 接着利用 1.0% 琼脂糖凝胶检测 RNA 完整性 (1 $\times$ TAE 缓冲液, 120 V, 25 min), 上样量 3 μ L (RNA 2 μ L + Loading buffer 1 μ L); 最后利用反转录试剂盒将 RNA 反转录合成 cDNA 链。将合成的 cDNA 放置于-20 ℃ 冰箱保存用于后续试验。

1.3.2 目的基因克隆

结合前期试验红豆草转录组数据 *OvIF7GT* 基因的序列信息, 通过在线工具 NCBI ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 找出其完整的开放阅读框, 利用 Primer Premier 5.0 设计目的基因特异性引物 (表 1); 以 72 h 干旱处理红豆草幼苗叶 RNA 反转录后的 cDNA 链为模板, 进行 PCR 扩增。扩增体系 (50 μ L) 为, cDNA 0.5 μ L, 上下游引物各 1 μ L, PrimeSTAR HS (Premix) 25 μ L, 灭菌 ddH₂O 22.5 μ L。反应程序为, 预变性: 94 ℃ 5 min; 变性: 94 ℃ 30 s, 退火: 50 ℃ 45 s, 延伸: 72 ℃ 90 s, 共 30 个循环; 延伸: 72 ℃ 10 min, 4 ℃ 保存。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 将目的基因片段切胶回收, 再连接至 pMD19-T 载体并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取单克隆送金唯智测序公司进行测序。

1.3.3 *OvIF7GT* 蛋白的生物信息学分析

利用在线生物信息分析软件 (表 2) 分析 *OvIF7GT* 蛋白的等电点、亲疏水性、跨膜区、蛋白序列信号肽、二级结构及三级结构等理化性质。此外, 在 NCBI 数据库中检索 *OvIF7GT* 的同源蛋白序列, 利用 DNAMAN 软件对同源蛋白的氨基酸序列进行多重比对, 然后以拟南芥作为外来群, 基于最大似然

表 1 红豆草 *OvIF7GT* 基因克隆及荧光定量 PCR 所用引物
Table 1 Primers used for cloning and quantitative PCR of *OvIF7GT* in *O. viciifolia*

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	用途 Application
<i>OvIF7GT</i> -F	GAAAGGATTAATGGTAGAGGCATTGTG	基因克隆 Gene cloning
<i>OvIF7GT</i> -R	CAAGACCGGCAACAGGATTCAATC	
<i>yOvIF7GT</i> -F	AACACGGGGGACTTTGCAACATGGCTTCTCCTCTTCTCGTTTCG	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>yOvIF7GT</i> -R	CCTGAAGCGGCCGCTGTACAAGGATAAATCTCAATAAGGGACAACAATCCTGTC	
<i>qOvIF7GT</i> -F	ATCATTACCACCTCCAACCTT	荧光定量PCR qRT-PCR
<i>qOvIF7GT</i> -R	GGATACCAGGCACAACAA	
<i>ACTINI</i> -F	TCCTATCTCACCTCTTATCCA	内参基因 Reference gene
<i>ACTINI</i> -R	CCATCCATTGTCCACGAA	

表 2 生物信息学分析网站
Table 2 Websites used for bioinformatics analysis

用途 Function	网址 Website
保守结构域分析 Conservative domain analysis	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi
蛋白质理化性质 Physicochemical properties of protein	https://web.expasy.org/protparam
蛋白质的磷酸化位点 Phosphorylation sites of proteins	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1
蛋白质亲/疏水性分析 Protein hydrophilicity analysis	https://web.expasy.org/protscale/
蛋白质信号肽分析 Analysis of protein signal peptide	www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1
蛋白质跨膜结构 Protein transmembrane structure	www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM
蛋白质二级结构预测 Protein secondary structure prediction	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa%20_sopma.html
蛋白质三级结构预测 Protein tertiary structure prediction	https://swissmodel.expasy.org

法 (maximum likelihood, ML), 使用 MEGA X7 软件构建不同物种 IF7GT 蛋白同源序列的系统发育进化树, Bootstrap 设置为 1 000。

1.3.4 OvIF7GT 亚细胞定位

本研究先利用在线工具 CELLO v.2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) 预测 OvIF7GT 蛋白的亚细胞定位情况; 其次通过瞬时表达试验验证该蛋白的表达定位, 具体方法如下: 用以含有目的基因的 pMD19-T 为模板, 用 *yOvIF7GT-F* 和 *yOvIF7GT-R* 引物进行扩增 (表 1), 扩增产物利用 Gibson assembly 同源重组的方法将 *OvIF7GT* 亚克隆至 pCAMBIA1300-GFP 载体并测序, 将测序正确的载体 pCAMBIA1300-IF7GT-GFP 转入农杆菌 GV3101, 挑取单克隆至 LB 液体培养基 (含 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素) 中培养, 菌液离心收集菌体后, 用 10 mmol·L⁻¹ MgCl₂ (含 120 mmol·L⁻¹ AS) 悬浮液重悬菌体并调节 OD₆₀₀ 至 0.6 左右, 然后将其注射烟草叶片下表皮, 室温弱光培养 48 h 后用激光共聚焦显微镜观察绿色荧光信号。

1.3.5 不同干旱胁迫时间下 *OvIF7GT* 在红豆草中的表达水平分析

根据 *OvIF7GT* 序列, 设计 *OvIF7GT* 的 qRT-PCR 特异性引物 (表 1), 以 CK 和干旱处理 6、12、24、48 和 72 h 后红豆草叶和根组织 cDNA 为模板, 进行 qRT-PCR 表达分析, 并以 *ACTINI*^[18] 作为内参基因, 各处理设置 3 个重复。反应体系 (20 μL) 为: cDNA 模板 2 μL, TB Green Premix Ex Taq II 10 μL, 正反向引物各 0.8 μL, ddH₂O 6.4 μL; 反应程序为 95 °C 30 s, 9 °C 5 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环。采用 2^{-ΔΔCT} 方法^[19] 计算 *OvIF7GT* 基因相对表达量, 利

用 Graphpad Prism 6 软件对结果统计分析与绘图。

2 结果与分析

2.1 *OvIF7GT* 基因的克隆

结合前期的红豆草干旱胁迫转录组数据, 获得一条注释为异黄酮-7-O-糖基转移酶基因 (*OvIF7GT*) 的转录本, 利用 ORF 特异性引物对 *OvIF7GT* 基因进行扩增, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物检测, 获得一条特异性强、序列大小 1 500 bp 左右的基因片段 (图 1)。测序结果显示, 该基因序列大小为 1 512 bp, 与预期目的基因片段大小相符, 表明本研究成功克隆得到目的基因 *OvIF7GT*

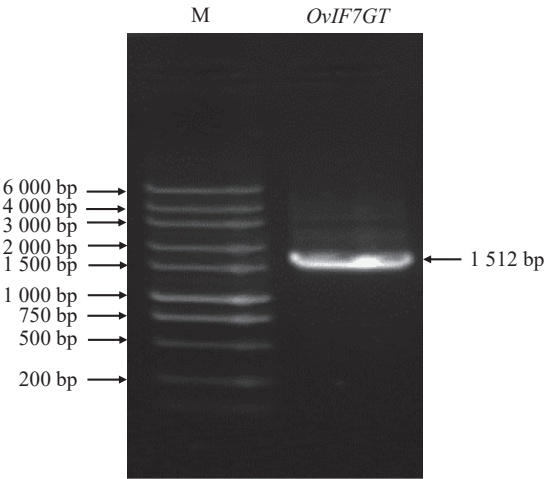


图 1 红豆草 *OvIF7GT* 基因的 PCR 扩增
Figure 1 PCR amplification of *OvIF7GT* gene in *Onobrychis viciaefolia*
M 代表 6 000 bp Marker, *OvIF7GT* 为目的基因。
M and *OvIF7GT* indicate the 6 000 bp Marker and interested gene, respectively.

(Genbank 收录号为 OQ914858)。

2.2 *OvIF7GT* 蛋白的生物信息学分析

基于 NCBI CD search 在线工具对 *OvIF7GT* 基因编码的蛋白质进行分析, 发现 *OvIF7GT* 蛋白由 GTB 型 UDP 糖基转移酶结构域、胸腺嘧啶二磷酸腺苷 (TDP) 结合位点、底物结合域和激活域组成 (图 2)。利用 ExPASy-ProtParam tool 工具对 *OvIF7GT* 理化性质进行分析, 结果显示: *OvIF7GT* 共编码 503 个氨基酸, 分子式为 C₂₅₂₇H₃₉₉₁N₆₇₅O₇₄₉S₃₀, 相对

分子质量为 56 774.36 Da, 理论等电点为 5.51, 不稳定系数为 51.59, 是一种酸性不稳定蛋白; 脂肪系数为 92.23, 蛋白所带正负电荷残基数目分别为 47 和 62, 半衰期为 30 h。

利用 NetPhos 在线软件预测了 *OvIF7GT* 基因编码蛋白质的磷酸化位点, 结果显示 *OvIF7GT* 含有丝氨酸 (Serine, Ser) 位点最多, 其次是苏氨酸 (Threonine, Thr) 位点和酪氨酸 (Tyrosine, Tyr) 位点 (图 3A), 表明该蛋白在发生磷酸化时主要以丝氨酸磷酸化为主。通过该蛋白质的亲/疏水性分析 (图 3B), 显示亲

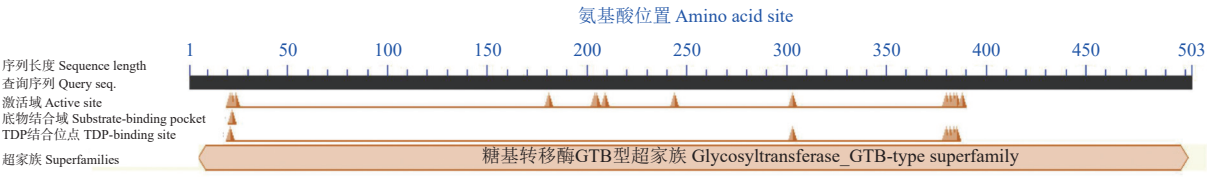


图 2 *OvIF7GT* 蛋白的保守结构域分析
Figure 2 Conservative domain analysis of protein *OvIF7GT*

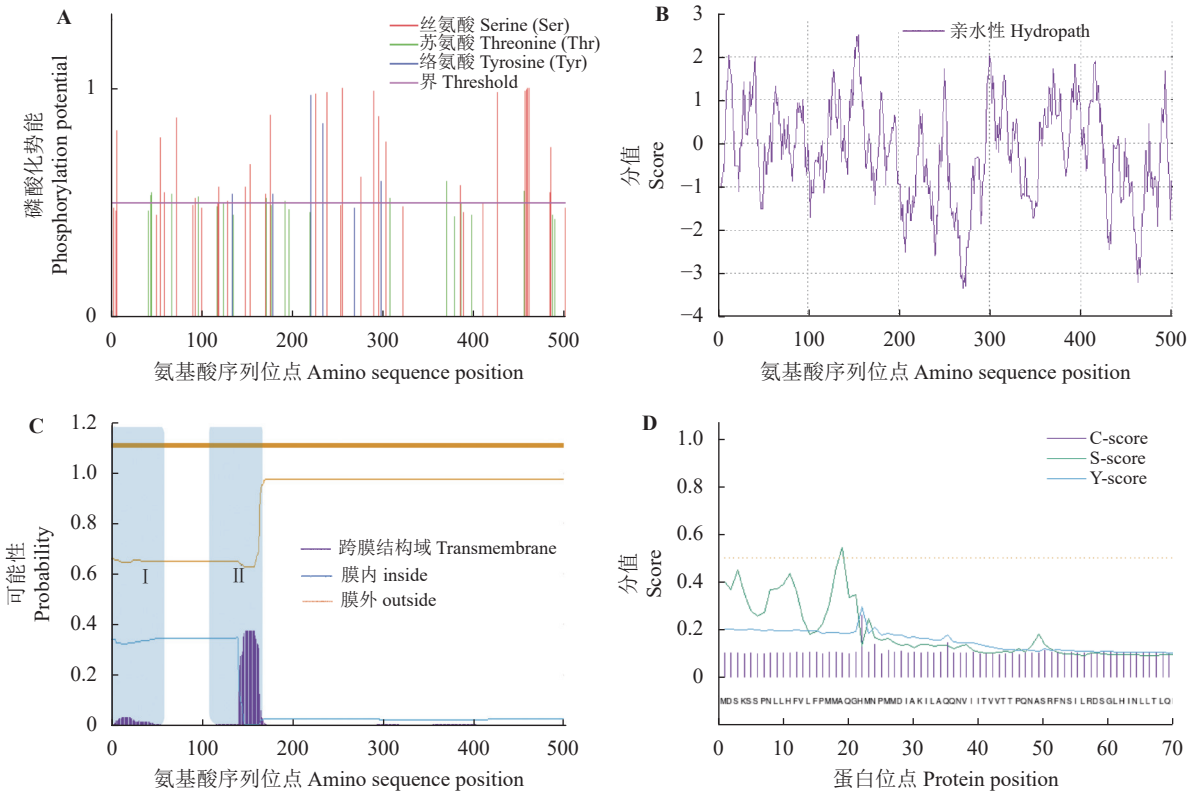


图 3 红豆草 *OvIF7GT* 磷酸化 (A)、亲/疏水性 (B)、跨膜结构域 (C) 及信号肽 (D) 分析
Figure 3 Phosphorylation analysis (Panel A), hydrophilicity analysis (Panel B), transmembrane structure (Panel C), and signal peptide analysis (Panel D) of protein *OvIF7GT*

C-score: 原始剪切位点分值; S-score: 多肽链氨基酸残基信号肽分值; Y-score: 最高综合剪切位点分值。图 D 的线条下字母表示氨基酸序列。
C-score: the score representing the likelihood of the original cleavage site. S-score: the signal peptide score based on the amino acid residues of the polypeptide chain. Y-score: the highest integrated score for the cleavage site, combining multiple predictive parameters. The letters under the lines represent amino acid sequences in Figure D.

水性最强的为 277 位,其最低分值-3.4;疏水性最强的为 150 位,其最高分值为 2.6,总平均亲水性 (GRA-VY) 为-0.215,推测该蛋白质其作为一种亲水性蛋白。蛋白质跨膜结构的预测结果表明 OvIF7GT 包含两个跨膜结构域 (图 3C)。Signal P 4.1 在线分析结果显示, OvIF7GT 多肽链中 19 号位丙氨酸残基信号肽分值 (S-score) 最高为 0.545,第 22 位组氨酸残基的原始剪切位点分值 (C-score) 最高为 0.259,并且其综合剪切位点分值 (Y-score) 也是最高,为 0.297 (图 3D)。

2.3 OvIF7GT 蛋白的结构预测

SOPMA 软件对 OvIF7GT 的二级结构预测结果显示,该蛋白质含有 41.75% α -螺旋、35.79% 无规则卷曲、15.51% 延伸链和 6.96% β -折叠,表明该蛋白二级结构以 α -螺旋和无规则卷曲为主 (图 4)。同时,利用 SWISS-MODEL 软件对 OvIF7GT 蛋白的三级结构进行预测,发现氨基酸序列相似性为 41.18%,覆盖度为 0.74;该蛋白主要由 α -螺旋和无规则卷曲为主,与二级结构预测结果一致 (图 4)。

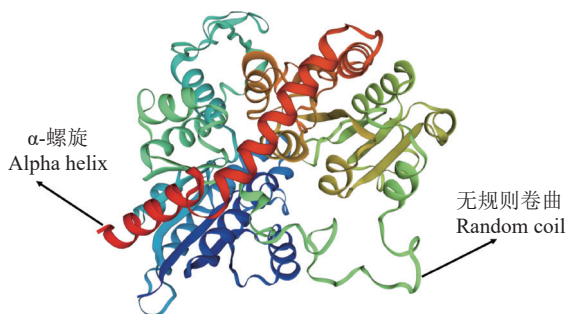


图 4 OvIF7GT 蛋白三级结构预测
Figure 4 Three-dimensional structure prediction of protein OvIF7GT

2.4 OvIF7GT 同源蛋白序列比对及系统发育进化关系分析

在 NCBI 数据库中对 OvIF7GT 蛋白的氨基酸序列进行同源搜索,然后利用 DNAMAN 软件对 OvIF7GT 蛋白序列同源性较高的蒺藜苜蓿、红车轴草 (*Trifolium pretense*)、鹰嘴豆 (*Cicer arietinum*)、相思子 (*Abrus precatorius*)、豌豆 (*Pisum sativum*) 和大豆等 12 个物种同源序列进行比对,发现 OvIF7GT 与蒺藜苜蓿 (XP_003625715.1)、鹰嘴豆 (XM_004494036.3) 和红车轴草 (XP_045798308.1) 中的同源蛋白氨基酸序列相似度最高,分别为

73.99%、72.20% 和 70.77%,推测它们可能具有类似的生物学功能 (图 5)。此外,蛋白同源序列比较发现,在序列 C 端含有一段约 40 个氨基酸残基的植物次级代谢产物糖基转移酶 (plant secondary product glycosyltransferase box, PSPG) 保守序列 (图 5)。系统发育进化关系分析结果显示, OvIF7GT 与蒺藜苜蓿和鹰嘴豆聚为一支系,表明它们具有更近的亲缘关系 (图 6)。

2.5 OvIF7GT 亚细胞定位分析

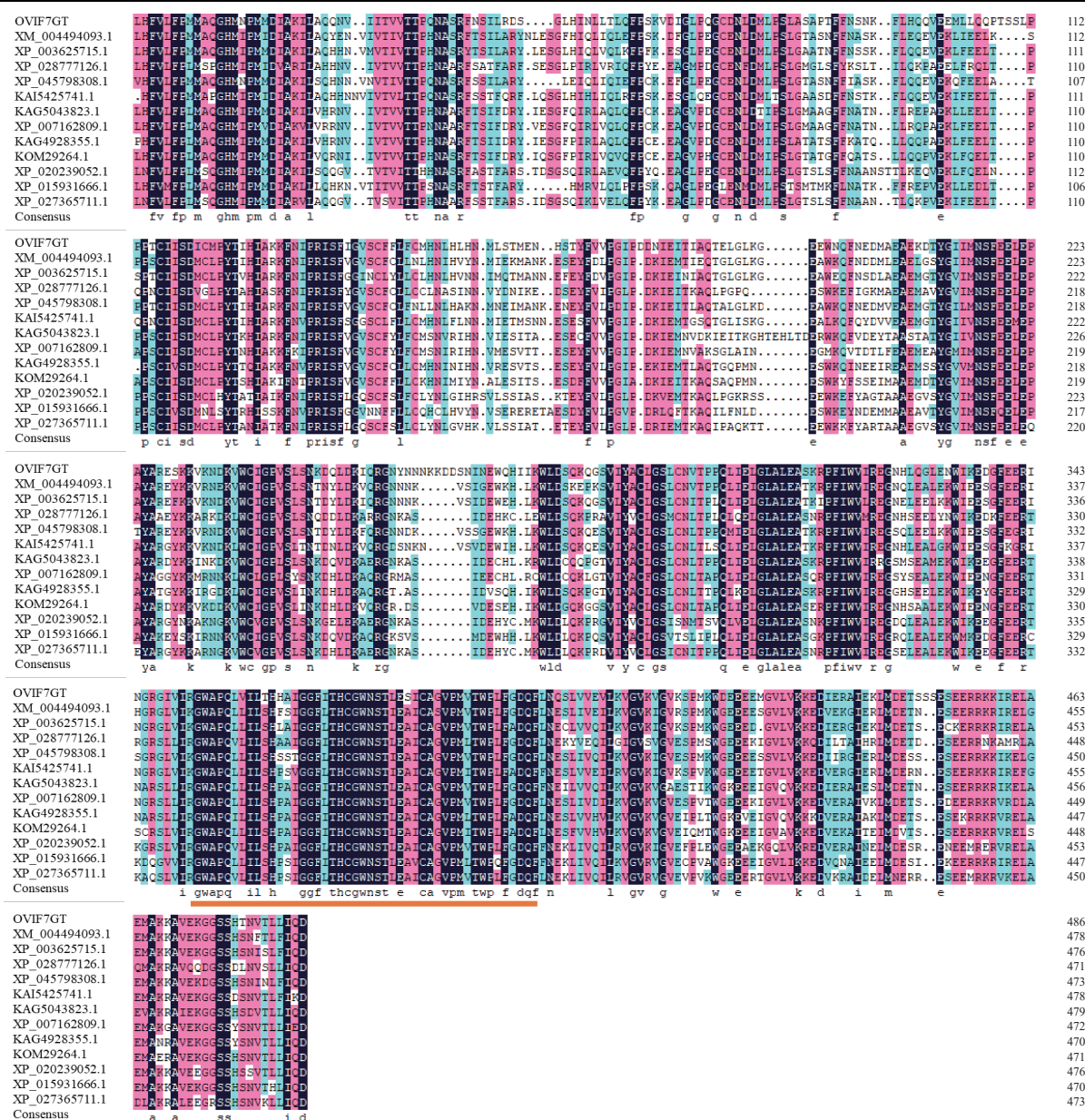
本研究首先利用在线工具 CELLO v.2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) 预测 OvIF7GT 蛋白亚细胞定位,结果表明该蛋白在细胞质中表达。为了进一步验证预测结果,本研究通过构建含有 GFP 荧光蛋白的融合表达载体 pCAMBIA1300-IF7GT-GFP,并侵染烟草 (*Nicotiana tabacum*) 叶片进行瞬时表达分析,从图 7 中可以看出,绿色荧光信号主要存在于细胞质中,但是也有少量存在于细胞核中,表明 OvIF7GT 蛋白主要在细胞质中发挥功能。

2.6 不同干旱胁迫时间下红豆草叶和根中 OvIF7GT 的表达分析

本研究通过 qRT-PCR 检测了 OvIF7GT 在红豆草幼苗不同时间干旱胁迫下的表达水平,结果显示 (图 8),随着干旱胁迫时间的增加,该基因在红豆草幼苗叶中的表达呈现升高、降低、再升高的趋势,并且相较于 CK,干旱胁迫 48 h 后该基因的相对表达量显著升高 ($P < 0.001$);而在根中,该基因的表达在干旱胁迫 48 h 内的相对表达量未发生明显变化,但是在干旱处理 72 h 后其相对表达量也显著提高 ($P < 0.001$)。此外,在干旱处理 72 h 后, OvIF7GT 在红豆草幼苗叶中的相对表达量 (2.48 倍) 也明显高于根组织 (1.54 倍)。结果表明,红豆草幼苗中 OvIF7GT 的表达受到干旱胁迫的诱导,并且参与红豆草对干旱胁迫的响应。

3 讨论

干旱是影响高寒地区牧草生长发育及其生产性能的主要环境胁迫因子之一^[20],通过发掘干旱胁迫响应基因选育优良高寒牧草品种,是高寒地区牧草产业及畜牧业可持续发展亟待解决的瓶颈问题。类黄酮作为植物中最大的次级代谢产物类型之一,其

图 5 *OvIF7GT* 同源蛋白序列比对Figure 5 Sequence alignments of *OvIF7GT* homologous proteins

OvIF7GT: 红豆草; XM_004494093.1: 鹰嘴豆; XP_003625715.1: 蒺藜苜蓿; XP_028777126.1: 牧豆树; XP_045798308.1: 红车轴草; KAI5425741.1: 豌豆; KAG5043823.1: 野大豆; XP_007162809.1: 芸豆; KAG4928355.1: 大豆; KOM29264.1: 赤豆; XP_020239052.1: 木豆; XP_015931666.1: 金花生; XP_027365711.1: 相思子。

OvIF7GT: *O. viciaefolia*; XM_004494093.1: *Cicer arietinum*; XP_003625715.1: *Medicago truncatula*; XP_028777126.1: *Prosopis alba*; XP_045798308.1: *Trifolium pratense*; KAI5425741.1: *Pisum sativum*; KAG5043823.1: *Glycine soja*; XP_007162809.1: *Phaseolus vulgaris*; KAG4928355.1: *Glycine max*; KOM29264.1: *Vigna angularis*; XP_020239052.1: *Cajanus cajan*; XP_015931666.1: *Arachis duranensis*; XP_027365711.1: *Abrus precatorius*.

生物合成和积累在植物环境胁迫耐受中具有重要作用, 而这一活性或功能往往依赖于其结构的糖基化修饰^[21]。前期研究揭示了类黄酮对于红豆草适应高海拔地区干旱环境的潜在作用, 并且发现了一个显著上调表达的异黄酮糖基化修饰酶编码基因

OvIF7GT, 本研究成功克隆了该基因, 生物信息分析表明该基因编码蛋白具有 GT-B 型糖基转移酶超家族的特性相似, 如葡萄 *GT1*、拟南芥 *UGT72B1* 和苜蓿

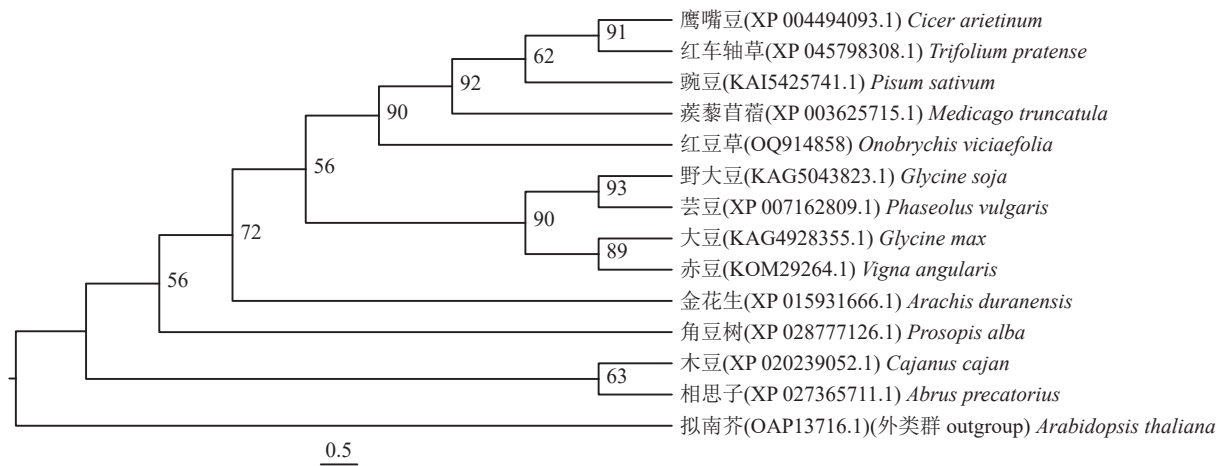


图 6 IF7GT 蛋白系统发育进化树

Figure 6 Phylogenetic tree of protein IF7GT

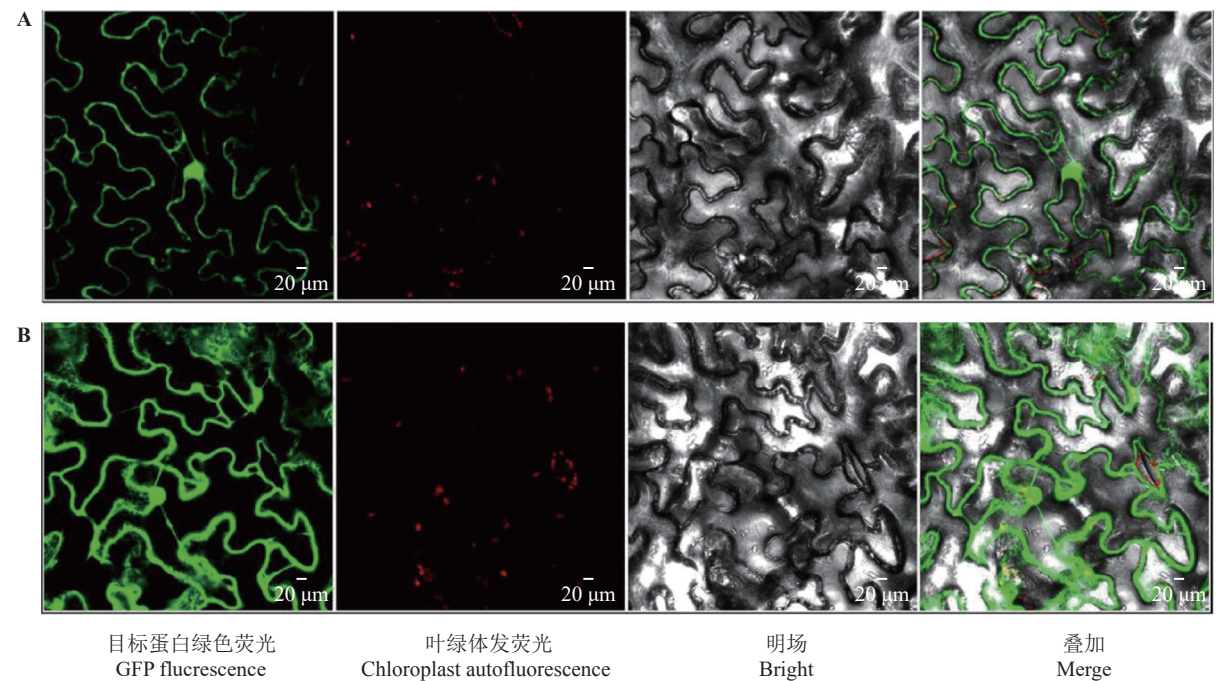


图 7 OvIF7GT 的亚细胞定位

Figure 7 Subcellular localization of OvIF7GT

A: 含有目的基因的载体 pCambia1300-IF7GT-GFP; B: 空载体 pCambia1300-GFP。
A: pCambia1300-IF7GT-GFP with the cloned gene; B: empty vector pCambia1300-GFP without the cloned gene.

UGT71G1、UGT78G1 等^[22]，并且 OvIF7GT 具有一个 PSPG box 保守结构域，而这个结构域是不同植物中糖基转移酶的保守序列^[23]，进一步说明了 OvIF7GT 具有催化糖基转移的功能，并且其 PSPG box 保守序列中最后一个氨基酸残基是谷氨酰胺，推测该酶利用的糖基供体是 UDP-葡萄糖^[24]。此外，通过系统发育关系分析，红豆草与蒺藜苜蓿和鹰嘴豆亲缘关系最近(图 6)，OvIF7GT 基因可能与这两个物种中的同源基因功能相似，但是在这两个物种中尚未分离

得到 IF7GT 基因，虽然从豆科植物中尤其是大豆中已克隆了多个 IF7GT 基因，并体外考察了其编码蛋白的催化特性^[25]，但是物种之间的差异，可能导致同源蛋白催化功能以及植物生理功能上存在差异。蛋白质在细胞中的表达分布与其在细胞内的分子功能具有紧密关系^[26]，本研究通过亚细胞定位预测和烟草中的瞬时表达验证，揭示 OvIF7GT 主要存在于细胞质中，但在细胞核中也有少量分布，这与黄牡丹中类黄酮糖基化酶的亚细胞定位相一致^[27]，

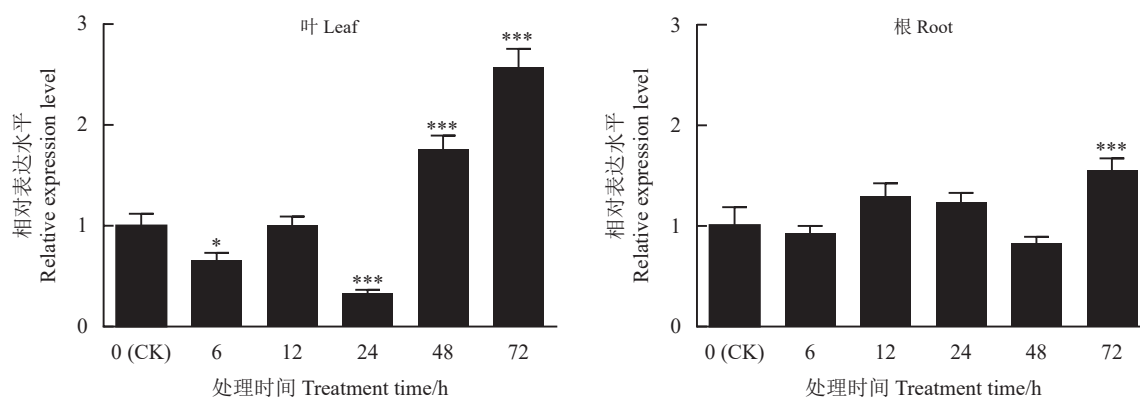


图 8 不同干旱胁迫时间下红豆草 *OvIF7GT* 在不同组织中的表达水平

Figure 8 Relative expression levels of *OvIF7GT* in different tissues of *O. viciifolia* under different drought stress time

*和***分别表示 CK 和干旱处理组之间的差异显著性水平为 $P < 0.05$ 和 $P < 0.001$ 。

*and *** indicate that the statistically significant differences between CK and drought stress treatment at 0.05 and 0.001 levels, respectively.

但是大多数的类黄酮糖基转移酶一般表达于蛋白质^[28], 如山葡萄 (*Vitis amurens*)^[29]、紫花苜蓿中的 UGT, 这可能与植物中糖基转移酶一般在细胞质中具有更高的生物活性有关, 而且类黄酮的生物合成和修饰也主要在细胞质中发生^[30]。

干旱胁迫往往引起包括糖基转移酶编码基因在内的类黄酮生物合成相关基因的上调表达^[31], 进而导致植物体内类黄酮的积累, 这一过程对于植物缓解干旱引起的氧化损伤具有重要作用, 并且通过体内过表达试验也得到证实, 如拟南芥 *UGT76E11* 基因过表达植株具有更强的环境胁迫抗氧化能力^[32]; 拟南芥中过表达 *AtUGT74E2* 或 *AtUGT75D1* 基因均可显著提高其对盐和干旱胁迫的耐受性^[33], 说明糖基转移酶基因参与植物逆境胁迫应答调控。对于 UGT 基因在植物非生物胁迫处理后的表达分析已有较多报道, 如宗宪春等^[34] 研究发现, 干旱胁迫处理下小麦 (*Triticum aestivum*) *TaGT157* 基因在 F_1 代中相对表达量比在父本和母本中的相对表达量高, 且 F_1 代小麦抗旱能力较父本有所提高在木豆中, *CcUGT* 基因在叶片中的表达量高于其他组织, 而在根中 *CcUGT69* 和 *CcUGT110* 基因分别受到盐和低温的诱导表达^[35], 这些研究表明, UGT 基因的表达不仅跟受到的环境胁迫类型相关, 而且具有明

显的组织特异性。在本研究中, *OvIF7GT* 在不同时间干旱胁迫的红豆草幼苗根和叶中的表达模式不同, 这与番茄 (*Solanum lycopersicum*) 中 *SlUGT75C1-like* 基因干旱胁迫下表达规律具有相似性^[36], 但随着干旱胁迫时间的延长, 尤其是干旱处理 72 h 后, 该基因在两个组织部位的相对表达量都显著提高, 说明 *OvIF7GT* 的表达不仅受到干旱胁迫诱导, 而且具有一定的时空特异性, 推测干旱可能引起糖基化类黄酮的积累以抵御干旱不利影响, 同时也提示该基因在红豆草抗旱中可能具有重要功能, 这一过程值得进一步深入研究。

4 结论

本研究从红豆草幼苗中成功克隆了一个干旱胁迫响应的异黄酮-7-O 葡萄糖基转移酶基因 *OvIF7GT*, 属于 GT-B 型糖基转移酶家族, 与蒺藜苜蓿和鹰嘴豆中的同源蛋白具有较近的亲缘关系。烟草瞬时表达分析表明, *OvIF7GT* 主要定位于细胞质中, 少量存在于细胞核中。此外, 红豆草幼苗中 *OvIF7GT* 基因的表达受到干旱胁迫诱导, 并表现出特异的时空特异性。该研究结果不仅为深入研究该基因的植物抗旱功能提供了依据, 而且为耐旱红豆草分子设计育种提供了新的靶点。

参考文献 References:

- [1] 张新业, 王雨欣, 孙艳香, 朱姝, 王聪艳, 李文静. 胡萝卜类黄酮含量的测定及 *DcCHS* 基因家族的鉴定分析. 西北农业学报, 2021, 30(4): 572-581.

- ZHANG X Y, WANG Y X, SUN Y Z, ZHU S, WANG C Y, LI W J. Determination of flavonoid content in *Daucus carota* and identification of *DcCHS* gene family. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2021, 30(4): 572-581.
- [2] 王秋媛, 姜兰, 范成林. 豆科植物中异黄酮类化合物生物合成的研究进展. *耕作与栽培*, 2016(5): 83-86.
- WANG Q Y, JIANG L, FAN C L. Research progress on biosynthesis of isoflavones in leguminous plants. *Tillage and Cultivation*, 2016(5): 83-86.
- [3] 张艺, 于存浩, 马晓红, 姚陆铭, 武天龙, 王彪. UV-B 处理对大豆异黄酮合成影响及 *GmUVR8* 基因克隆与表达分析. *大豆科学*, 2022, 41(1): 28-35.
- ZHANG Y, YU C H, MA X H, YAO L M, WU T L, WANG B. Effects of UV-B treatment on soybean isoflavone synthesis and cloning and expression analysis of *GmUVR8* gene. *Soybean Science*, 2022, 41(1): 28-35.
- [4] 李宗艳, 李名扬. 调控植物类黄酮生物合成的转录因子研究进展. *南京林业大学学报 (自然科学版)*, 2011, 35(5): 129-134.
- LI Z Y, LI M Y. Research progress on transcription factors regulating flavonoid biosynthesis in plants. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition)*, 2011, 35(5): 129-134.
- [5] TSAKEM B, TCHUENGUEM R T, SIWE-NOUNDOU X, KEMVOUFO B P, DZOYEM J P, TEPONNO R B, KRAUSE R W M, TAPONDJOU L A. New bioactive flavonoid glycosides with antioxidant activity from the stem bark of *Olax subscorpioidea* Oliv. *Natural Product Research*, 2023, 37(10): 1641-1650.
- [6] REHMAN H M, NAWAZ M A, SHAH Z H, LUDWIG-MULLER J, CHUNG G, AHMAD M Q, YANG S H, LEE S I. Comparative genomic and transcriptomic analyses of Family-1 UDP glycosyltransferase in three *Brassica* species and *Arabidopsis* indicates stress-responsive regulation. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 1875.
- [7] LI Y J, LI P, WANG T, ZHANG F J, HUANG X X, HOU B K. The maize secondary metabolism glycosyltransferase *UFGT2* modifies flavonols and contributes to plant acclimation to abiotic stresses. *Annals of Botany*, 2018, 122(7): 1203-1217.
- [8] 于安东, 刘琳, 龙瑞才, 康俊梅, 陈林, 杨青川, 李明娜. 植物 UDP-糖基转移酶 (UGT) 的功能及应用前景. *植物生理学报*, 2022, 58(4): 631-642.
- YU A D, LIU L, LONG R C, KANG J M, CHEN L, YANG Q C, LI M N. Function and application prospect of plant UDP-glycosyltransferase (UGT). *Acta Phytophysiology Sinica*, 2022, 58(4): 631-642.
- [9] ACHNINE L, HUHMANN D V, FARAG M A, SUMNER S W, BLOUNT J W, DIXONET R A. Genomics-based selection and functional characterization of triterpene glycosyltransferases from the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Journal*, 2005, 41(6): 875-887.
- [10] STEELE C L, GIJZEN M, QUTOB D, DIXON R A. Molecular characterization of the enzyme catalyzing the aryl migration reaction of isoflavonoid biosynthesis in soybean. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 367(1): 146-150.
- [11] SUBRAMANIAN S, STACEY G, YU O. Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends Plant Science*. 2007, 12(7): 282-285.
- [12] DAKORA F D, PHILLIPS D A. Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1996, 49(1): 1-20.
- [13] LI J, LI Z, LI C, GOU J B, ZHANG Y S. Molecular cloning and characterization of an isoflavone 7-O-glucosyltransferase from *Pueraria lobata*. *Plant Cell Reports*, 2014, 33(7): 1173-1185.
- [14] NAGASHIMA S, INAGAKI R, KUBO A, HIROTANI M, YOSHIKAWA T. cDNA cloning and expression of isoflavonoid-specific glucosyltransferase from *Glycyrrhiza echinata* cell-suspension cultures. *Planta*, 2004, 218(3): 456-459.
- [15] NOGUCHI A, SAITO A, HOMMA Y, NAKAO M, SASAKI N, NISHINO T, TAKAHASHI S, NAKAYAMA T. A UDP-glucose: isoflavone 7-O-glucosyltransferase from the roots of soybean (*Glycine max*) seedlings. Purification, gene cloning, phylogenetics, and an implication for an alternative strategy of enzyme catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(32): 23581-23590.
- [16] DHAUBHADEL S, FARHANGKHOEE M, CHAPMAN R. Identification and characterization of isoflavonoid specific glycosyltransferase and malonyltransferase from soybean seeds. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(4): 981-994.
- [17] 赖声渭, 杨文亮, 哈长杰. 红豆草特征特性及其在月亮山天然草场补播改良栽培技术. *现代农业科技*, 2010(17): 339-341.
- LAI S W, YANG W L, HA C J. Characteristics of *Onobrychis viciifolia* and its reseeding cultivation techniques in natural grassland of Moon Mountain. *Modern Agricultural Sciences and Technology*, 2010(17): 339-341.
- [18] 李莉萍, 李旭澍, 张晓捷, 谷丽丽, 张博. 紫花苜蓿 *atpA* 基因的克隆及表达模式分析. *草地学报*, 2022, 30(6): 1413-1421.
- LI L P, LI X L, ZHANG X J, GU L L, ZHANG B. Cloning and expression pattern analysis of *atpA* gene in *Medicago sativa*. *Acta Agrestia Sinica*, 2022, 30(6): 1413-1421.
- [19] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.

- [20] 韩福松, 余成群, 付刚, 彭依. 低温和干旱胁迫下牧草的抗逆性机制. 草地学报, 2022, 30(11): 2856-2864.
HAN F S, YU C Q, FU G, PENG Y. The stress resistance mechanism of forage grass under low temperature and drought stress. *Acta Agrestia Sinica*, 2022, 30(11): 2856-2864.
- [21] AKASHI T, AOKI T, AYABE S. Molecular and biochemical characterization of 2-hydroxyisoflavanone dehydratase. Involvement of carboxylesterase-like proteins in *leguminous* isoflavone biosynthesis. *Plant Physiology*, 2005, 137(3): 882-91.
- [22] 姬向楠, 何非, 段长青, 王军. 植物 UDP-糖基转移酶生化特性和功能研究进展. 食品科学, 2013, 34(9): 316-323.
JI X N, HE F, DUAN C Q, WANG J. Advances in biochemical characteristics and functions of plant UDP – glycosyltransferase. *Food Science*, 2013, 34(9): 316-323.
- [23] JADHAV S K, PATEL K A, DHOLAKIA B B, KHAN B M. Structural characterization of a flavonoid glycosyltransferase from *Withania somnifera*. *Bioinformation*, 2012, 8(19): 943-949.
- [24] KUBO A, ARAI Y, NAGASHIMAN S, YOSHIKAWA T. Alteration of sugar donor specificities of plant glycosyltransferases by a single point mutation. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 429(2): 198-203.
- [25] FUNAKI A, WAKI T, NOGUCHI A, KAWAI Y, YAMASHITA S, TAKAHASHI S, NAKAYAMA T. Identification of a highly specific Isoflavone 7-O-glucosyltransferase in the soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Plant and Cell Physiology*, 2015, 56(8): 1512-1520.
- [26] 邢浩然, 刘丽娟, 刘国振. 植物蛋白质的亚细胞定位研究进展. 华北农学报, 2006, 21(S2): 1-6.
XING H R, LIU L J, LIU G Z. Research progress on subcellular localization of plant proteins. *Acta Agriculturae Borealis-Sinica*, 2006, 21(S2): 1-6.
- [27] ZOU H, HAN L, YUAN M, ZHANG M, ZHOU L, WANG Y. Sequence analysis and functional verification of the effects of three key structural genes, *PdTHC2'GT*, *PdCHS* and *PdCHI*, on the isosalipurposide synthesis pathway in *Paeonia delavayi* var. *lutea*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(10): 5696.
- [28] 岑慧芳, 黄洁琼, 申王晖, 朱慧森, 夏方山, 许涛. 紫花苜蓿 *MsUGT87A1* 基因克隆及其对非生物胁迫的响应分析. 草地学报, 2023, 31(6): 1682-1692.
CEN H F, HUANG J Q, SHEN W H, ZHU H S, XIA F S, XU T. Cloning of *MsUGT87A1* gene in *Medicago sativa* and analysis of its expression in the response to abiotic stresses. *Acta Agrestia Sinica*, 2023, 31(6): 1682-1692.
- [29] HE F, CHEN W K, YU K J, JI X N, DUAN C Q, REEVES M, WANG J. Molecular and biochemical characterization of the UDP-glucose: Anthocyanin 5-O-glucosyltransferase from *Vitis amurens*. *Phytochemistry*, 2015, 117(9): 363-372.
- [30] GEZA HRAZDINA, GEORGE J, WAGNER HAROLD W. SIEGELMAN. Subcellular localization of enzymes of anthocyanin biosynthesis in protoplasts. *Phytochemistry*, 1978, 27(1): 53-56.
- [31] YIN H X, ZHOU H K, WANG W Y, TRAN L P, ZHANG B Y. Transcriptome analysis reveals potential roles of abscisic acid and polyphenols in adaptation of *Onobrychis viciifolia* to extreme environmental conditions in the Qinghai-Tibetan Plateau. *Biomolecules*, 2020, 10(6): 967.
- [32] LI Q, YU H M, MENG X F, LIN J S, LI Y J, HOU B K. Ectopic expression of glycosyltransferase *UGT76E11* increases flavonoid accumulation and enhances abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Biology (Stuttg)*, 2018, 20(1): 10-19.
- [33] ZHANG G Z, JIN S H, JIANG X Y, DONG R R, LI P, LI Y J, HOU B K. Ectopic expression of *UGT75D1*, a glycosyltransferase preferring indole-3-butyric acid, modulates cotyledon development and stress tolerance in seed germination of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 2016, 90(1-2): 77-93.
- [34] 宗宪春, 李啟萌, 公杰, 刘永杰, 李丹, 连娟, 赵昌平, 高世庆. 小麦糖基转移酶家族候选基因干旱胁迫表达模式分析. 分子植物育种, 2023, 21(6): 1753-1762.
ZONG X C, LI Q M, GONG J, LIU Y J, LI D, LIAN J, ZHAO C P, GAO S Q. Analysis of drought stress expression patterns of candidate genes of *Triticum aestivum* glycosyltransferase family. *Molecular Plant Breeding*, 2023, 21(6): 1753-1762.
- [35] SONG Z H, NIU L L, YANG Q, DONG B Y, WANG L T, DONG M Z, FAN X H, JIAN Y, MENG D, FU Y J. Genome-wide identification and characterization of *UGT* family in pigeonpea (*Cajanus cajan*) and expression analysis in abiotic stress. *Trees*, 2019, 33(4): 987-1002.
- [36] 李园园. 糖基转移酶 *SIUGT75C1-like* 和 *SIUGT76E1* 参与番茄盐、干旱、Cd 耐受性的研究. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学硕士学位论文, 2023.
LI Y Y. *SIUGT75C1-like* and *SIUGT76E1* are involved in salt, drought and Cd tolerance in *Solanum lycopersicum*. Master Thesis. Harbin: Harbin Normal University, 2023.

(责任编辑 张瑾)