第 38 卷 第 1 期　　华 中 农 业 大 学 学 报　　Vol.38 No.1
2019 年 1 月　　Journal of Huazhong Agricultural University　　Jan. 2019,16～21

百脉根半胱氨酸蛋白酶基因在根瘤衰老过程中的表达分析

许泽远　苟洪兰　段柳剑　张忠明

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室,武汉 430070

摘要　为明确半胱氨酸蛋白酶与定型根瘤衰老的相关性,通过与已鉴定的紫云英半胱氨酸蛋白酶 AsNODf32进行序列比对分析,从百脉根中鉴定出 2 个与根瘤衰老相关的蛋白酶基因 *LjCyp*1 和 *LjCyp*5。蛋白序列及结构分析表明,LjCyp1 和 LjCyp5 同源性高达 96.2%,均含有 2 个典型的半胱氨酸蛋白酶结构域和液泡定位信号肽,属于木瓜蛋白酶家族。体外酶活检测显示,2 个蛋白都具有半胱氨酸蛋白酶活性。通过 Real-time PCR 和组织化学定位分析表明,2 个蛋白酶基因主要在成熟和衰老的根瘤中表达。结果表明 *LjCyp*1 和 *LjCyp*5 可能在百脉根根瘤衰老过程中发挥重要作用。

关键词　百脉根;半胱氨酸蛋白酶;根瘤衰老;共生固氮

中图分类号　Q 939.9　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　1000-2421(2019)01-0016-06

在豆科植物与根瘤菌的共生固氮系统中,根瘤是重要的固氮器官,根瘤的发育、成熟及衰老对固氮效率都有着深远的影响,直接影响植物的生长、发育和产量。因此,延缓根瘤衰老、提高根瘤固氮效率在生产实践中具有重要意义。已有的研究表明,在根瘤衰老的过程中,包括半胱氨酸蛋白酶在内的一系列蛋白水解酶会被激活。在豌豆中,鉴定出一个与根瘤发育、种子萌发和胁迫相关的半胱氨酸蛋白酶基因 *PsCyp*15a,该基因在根瘤衰老过程中上调表达,将 *PsCyp*15a 在紫花苜蓿根瘤中过量表达时,能加速根瘤的衰老[1]。同时在苜蓿中抑制该蛋白的同源基因 *MsCyp*15a 的表达后,延迟了根瘤衰老进程[2]。Naito 等[3]在紫云英中也鉴定出一个与根瘤衰老相关的半胱氨酸蛋白酶基因 *AsNODf*32。Moreno 等[4]从模式植物蒺藜苜蓿中,鉴定出 6 个半胱氨酸蛋白酶基因,作为根瘤发育和衰老的标记基因。然而,目前所发现与根瘤衰老相关的半胱氨酸蛋白酶基因都来自于不定型根瘤。在百脉根、大豆等定型根瘤中虽然也有大量根瘤特异表达的半胱氨酸蛋白酶基因[5],但还没有明确有多少或有哪些半胱氨酸蛋白酶基因与根瘤衰老相关。本研究以百脉根为材料,通过同源比对分析鉴定出百脉根中可能与根瘤衰老相关的半胱氨酸蛋白酶 *LjCyp*1 和 *LjCyp*5,探索 *LjCyp*1 和 *LjCyp*5 在定型根瘤衰老过程中的生物学功能和作用机制,为在豆科植物生产过程中改良和提高共生固氮效率提供科学资料。

1　材料与方法

1.1　菌株与质粒

百脉根根瘤菌 *Mesorhizobium loti* NZP2037、大肠杆菌 DH10B、大肠杆菌 BL21-DE3、发根农杆菌 LBA1334 及质粒 pET-28a 由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室保存;质粒 pCAMBIA1391Z 由华中农业大学生命科学技术学院林拥军教授馈赠。

1.2　植物材料的栽培

百脉根(*Lotus japonicus*)MG20 亚种的种子为笔者所在研究室保存。将百脉根种子用浓硫酸处理 7～9 min 后用无菌水漂洗 5～6 遍;再用 2%次氯酸钠溶液处理 4～5 min 后用无菌水漂洗 6～7 遍,保留少量水于 4 ℃下放置 2 d;之后转移至 MS 培养基上避光培养 2 d 再光照培养 2 d,最后移栽到装有已灭菌的珍珠岩和蛭石的花盆中;接种根瘤菌 *M. loti* NZP2037 后分别收集不同时间段接种的植物

收稿日期:2018-04-23
基金项目:国家重点研发计划"七大农作物育种专项"(52016YFD0100702)
许泽远,硕士研究生. 研究方向:根瘤菌分子生物学. E-mail:462577443@qq.com
通信作者:张忠明,教授. 研究方向:共生固氮. E-mail:zmzhang@mail.hzau.edu.cn

组织[6]。

1.3　酶荧光法检测半胱氨酸蛋白酶酶活

Z-苯丙胺酰-精氨酸-7-氨基-4-甲基香豆素(*Z*-phe-arg-AMC)是一种拟肽类物质，是多种半胱氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶的底物，蛋白酶通过水解 *Z*-phe-arg-AMC 释放荧光物质 AMC 聚合体，使荧光值增加，通过紫外分光光度计测定荧光值，将蛋白酶单位时间内水解底物的能力作为蛋白酶活性测定的指标，具体操作步骤参照 Beyene 等[7]的方法。

1.4　Real-time PCR 分析

收取接种不同时间百脉根的根、茎、叶和根瘤，并用 Trizol(Invitrogen)方法提取总 RNA，将抽提得到的 RNA 反转录得到 cDNA。定量方法采用相对定量△△Ct 法，Real-time PCR 用的是 TaKaRa Real-time PCR 专用板和 ViiA™ 7 荧光定量 PCR 仪，并用 One-Step SYBR® Prime Script™RT-PCR Kit(perfect real time)试剂盒配置反应液，进行 3 次重复实验。选用 *Ubiquitin* (AW720576)作为内参基因；*LjCyp*1 的 Real-time PCR 上游引物：5′- AGAAGATTGGGGTGAAGAAGGATAC -3′，下游引物：5′-AATTGATGGGTACAATGGTGAATGG -3′；*LjCyp*5 的 Real-time PCR 上游引物：5′-TCACATTTCATTAACCAACTTGAAGTAG -3′，下游引物：5′-CCATCCATTGCTCATGCCTCTCCTG -3′。

1.5　组织化学定位分析

以百脉根基因组 DNA 为模板，设计特异性引物扩增出基因启动子片段。*LjCyp*1 启动子扩增上游引物：5′-AAAGTCGACAAGCTTACCAACCATCC -3′，扩增下游引物：5′-GGGGAATTCGGTAGCTAGTCAGCTAGTGTA -3′，*LjCyp*1 启动子序列含有 2 173 个碱基；*LjCyp*5 启动子扩增上游引物：5′-AAAGTCGACCCACGTGGCTGTCCTTA-3′，下游引物：5′-GGGGAATTCGGTAGCTAGTCAGCTAGTGTA -3′，*LjCyp*5 启动子序列含有 2 036 个碱基。将扩增得到的启动子片段连接到含有 *GUS* 报告基因的 pCAMBIA1391Z 载体上。然后利用农杆菌介导的毛根转化体系将重组质粒转到百脉根中获得转基因的植物组织，通过 GUS 活性检测法确定基因表达部位。

2　结果与分析

2.1　LjCyp1 和 LjCyp5 蛋白的序列及结构分析

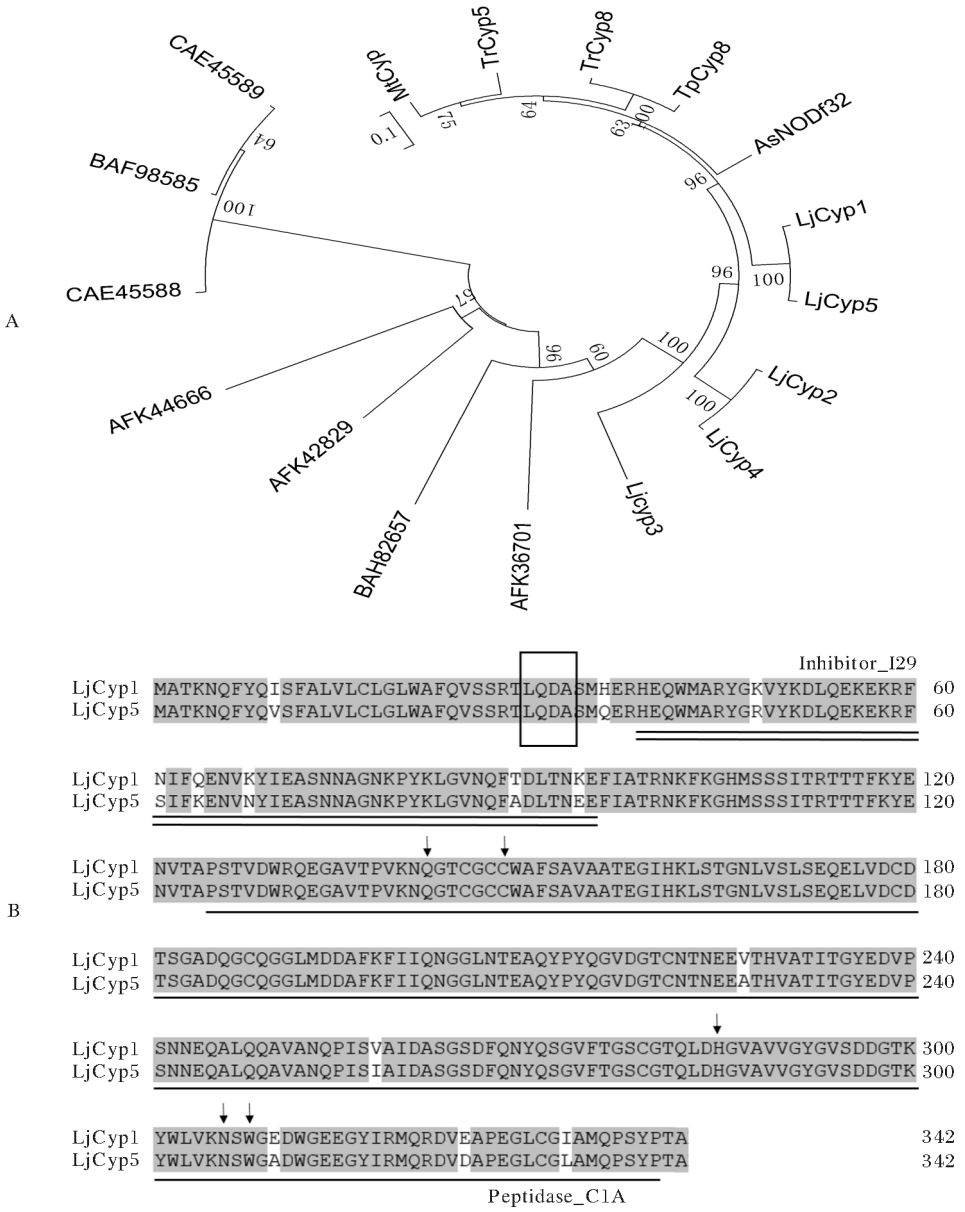
百脉根中有 4 个半胱氨酸蛋白酶基因 *LjCyp*1、*LjCyp*2、*LjCyp*3 和 *LjCyp*4，转录组分析结果表明在接种丛枝菌根真菌后这 4 个基因在根中的表达明显上调[8]。为了在百脉根中鉴定出根瘤特异性半胱氨酸蛋白酶，在百脉根网站(http://www.kazusa.or.jp/lotus/blast.html)中以紫云英根瘤特异性半胱氨酸蛋白酶 AsNODf32 蛋白序列为源序列进行比对，分析结果显示：在百脉根中同时位于 3 号染色体上的 LjCyp1(GenBank：AB300459)和 LjCyp5(GenBank：JQ757168)与 AsNODf32 同源性最高，其中 LjCyp1 和 LjCyp5 同源性高达 96.2%(图 1A)；LjCyp1 和 LjCyp5 cDNA 序列分别为 1 281个碱基和 1 266 个碱基，其蛋白都由 342 个氨基酸组成；LjCyp1 和 LjCyp5 均含有 AsNODf32 特定的液泡定位信号肽 LQDA 和半胱氨酸蛋白酶 2 个典型的结构域：抑制结构域 Inhibitor_I29 和酶活性结构域 Peptidase_C1A；*LjCyp*1 和 *LjCyp*5 均包含对形成半胱氨酸蛋白酶活性位点至关重要的 QCHNW 氨基酸残基(图 1B)[9]。推测 LjCyp1 和 LjCyp5 可能是百脉根根瘤特异性的半胱氨酸蛋白酶。

2.2　荧光法测定 LjCyp1 和 LjCyp5 蛋白酶活

设计特异性引物扩增出无抑制结构域的 *LjCyp*1 和 *LjCyp*5 部分基因片段，并分别命名为 *LjCyp*1B 和 *LjCyp*5B。将去抑制结构域片段连接到带有 His 标签的 pET-28a 载体上，将重组质粒转化到大肠杆菌 BL21-DE3 中表达并纯化得到目的蛋白 LjCyp1B 和 LjCyp5B。通过荧光法测定蛋白酶活性，并加入半胱氨酸蛋白酶抑制剂 E-64 观察对蛋白酶活性的影响[10]。结果显示：LjCyp1B 和 LjCyp5B 能分解底物 *Z*-phe-arg-AMC 并释放荧光物质 AMC 聚合体；当加入了抑制剂 E-64 后，LjCyp1B 和 LjCyp5B 的蛋白酶活性受到了抑制(表 1)。表明 LjCyp1B 和 LjCyp5B 具有半胱氨酸蛋白酶活性，LjCyp1 和 LjCyp5 是 2 个半胱氨酸蛋白酶。

2.3　*LjCyp*1 和 *LjCyp*5 的时空表达分析

通过 Real-time PCR 分析 *LjCyp*1 和 *LjCyp*5 在百脉根不同组织中的表达情况。结果显示：百脉根接种 30 d 时，*LjCyp*1 和 *LjCyp*5 在瘤中的表达量比在根、茎和叶中的表达量高；接种 50 d 时，*LjCyp*1 和 *LjCyp*5 在瘤中的表达量比在根、茎和叶中的表达量高出几万倍到几十万倍(图 2A)。在根瘤中的表达分析结果显示：百脉根接种 20 d 和 30 d 时，*LjCyp*1 和 *LjCyp*5 在根瘤中的表达量较低；在接种 40 d 和 50 d 的根瘤中，*LjCyp*1 和 *LjCyp*5 的



A.Cyps 蛋白的进化树分析；B. LjCyp1 和 LjCyp5 蛋白结构；双线标记的为抑制结构域，单线标记的为酶活性结构域。A. Phylogenetic analysis of Cyps protein; B. Protein structure of LjCyp1 and LjCyp5. The inhibitory domain was marked with double-stranded and the enzyme active domain was marked with a single line.

图 1 Cyps 蛋白的进化树分析及结构分析

Fig.1 Phylogenetic and structure analysis of Cyps protein

表 1 LjCyp1B 和 LjCyp5B 的半胱氨酸蛋白酶活分析

Table 1 Cysteine protease activity of LjCyp1B and LjCyp5B

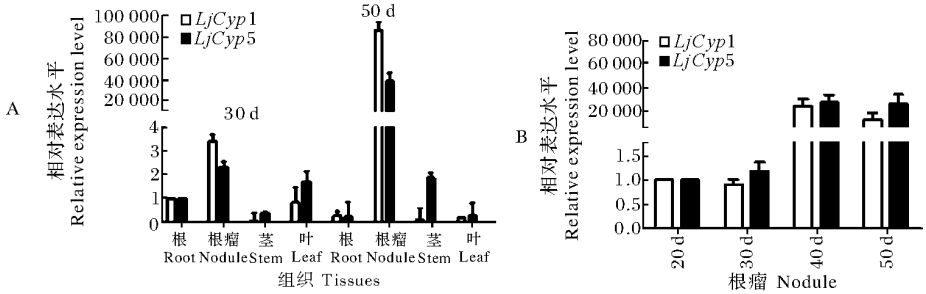
半胱氨酸蛋白酶 Cysteine protease	酶活/(μmol/(g·min)) Activity
LjCyp1B	4.25±0.15
LjCyp1B+E-64	0.57±0.08
LjCyp5B	5.46±0.07
LjCyp5B+E-64	0.66±0.06

注：本研究将每克蛋白酶单位时间内水解底物的能力作为蛋白酶活性测定的指标。Note: In this study, the ability to hydrolyze substrates per gram of proteinase in one minute was used as an indicator of protease activity determination.

表达量显著增加(图 2B)。表明 *LjCyp*1 和 *LjCyp*5 主要在后期的根瘤中发挥作用，可能与根瘤的衰老有关。

2.4 LjCyp1 和 LjCyp5 的组织化学定位

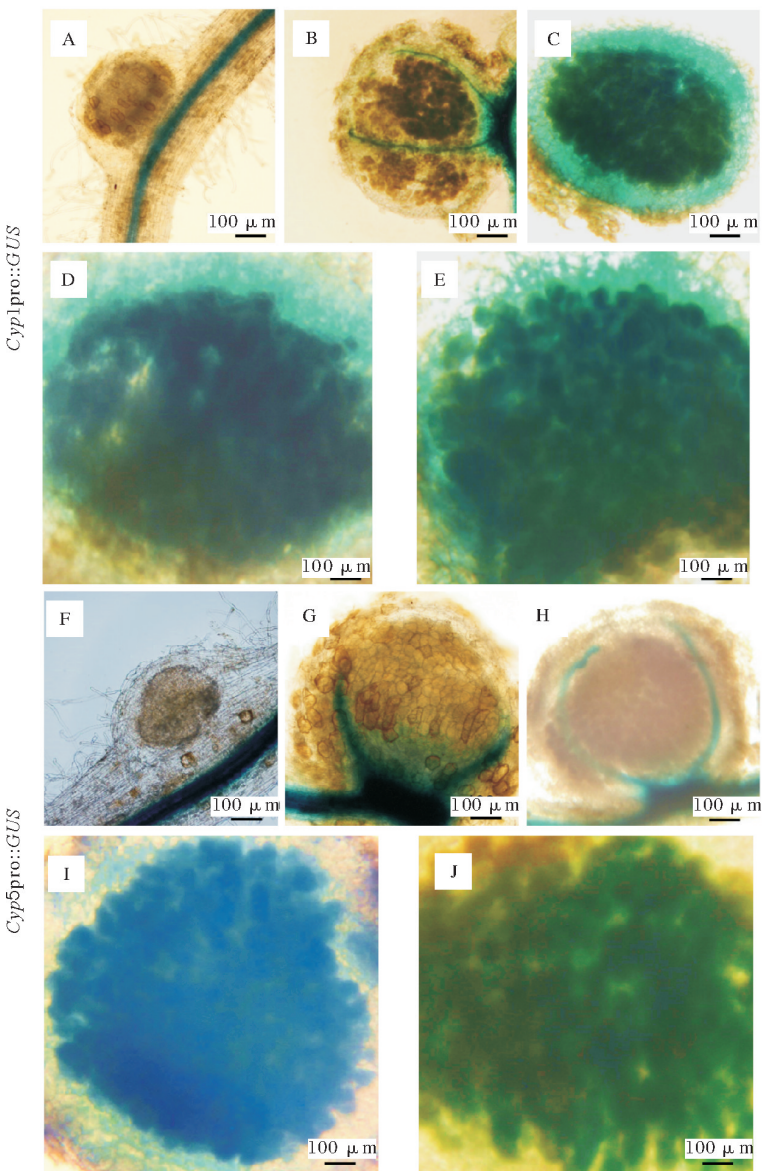
把 *Cyp*1pro 和 *Cyp*5pro 连接到含有报告基因 *GUS* 的 pCAMBIA1391Z 载体上，通过百脉根毛根转化的方法，获得转基因的根和根瘤并观察 *GUS* 基因的表达情况。结果显示：*Cyp*1pro 在接种 10 d 和 20 d 的根瘤原基中没有表达，接种 30、40 和 50 d



A.*LjCyp*1 和 *LjCyp*5 在百脉根的根、茎、叶和根瘤中的表达;B.*LjCyp*1 和 *LjCyp*5 在百脉根根瘤中的表达。A. Expression of *LjCyp*1 and *LjCyp*5 in root, nodule, stem and leaf of *Lotus japonicas*; B. Expression of *LjCyp*1 and *LjCyp*5 in nodules of *Lotus japonicas*.

图 2　*LjCyp*1 和 *LjCyp*5 在百脉根中的表达

Fig.2　Expression of *LjCyp*1 and *LjCyp*5 in *Lotus japonicas*



A、F.10 d 根瘤; B、G. 20 d 根瘤;C、H. 30 d 根瘤;D、I. 40 d 根瘤;E、J. 50 d 根瘤。A,F.10 d nodule; B,G. 20 d nodule; C,H.30 d nodule; D,I: 40 d nodule; E,J:50 d nodule.

图 3　*Cyp*1pro∶∶GUS 和 *Cyp*5pro∶∶GUS 组织化学定位分析

Fig.3　Analysis of expression of *Cyp*1pro∶∶GUS and *Cyp*5pro∶∶GUS in transgenic hairy roots of *Lotus japonicus*

后在根瘤的共生区有大量表达(图3A-E);*Cyp*5pro在接种10、20和30 d的根瘤共生区中均没有表达,接种40和50 d后在根瘤的共生区有大量表达(图3F,J)。结合时空表达结果分析进一步表明*Cyp*1pro和*Cyp*5pro主要在后期的根瘤共生体区表达,可能在根瘤的衰老过程中发挥作用。

3 讨 论

在植物组织中半胱氨酸蛋白酶是一类比较常见的主要存在于裂解液泡中的组织蛋白酶[11],并且通常分为9个亚科[12]。半胱氨酸蛋白酶在植物种子储藏蛋白的分解代谢[13]和氧化应激[15]等生理生化过程中都发挥着重要作用。半胱氨酸蛋白酶一般以蛋白酶前体的形式产生,同时含有一个自抑制结构域,只有去除抑制区域后才能释放有活性的成熟蛋白酶[16]。在豆科植物与根瘤菌的共生关系中,根瘤的固氮作用对豆科植物的生长有着重要意义,根瘤的过早衰老会对植物生长产生负面影响。与根瘤衰老相关的半胱氨酸蛋白酶多属于木瓜蛋白酶家族,目前的研究表明半胱氨酸蛋白酶在根瘤衰老过程中发挥了重要作用,这在紫云英、豌豆和苜蓿中已经得到证实。本研究通过与紫云英根瘤特异性半胱氨酸蛋白酶AsNODf32进行比对分析,在百脉根中鉴定出2个与AsNODf32有高度同源性的蛋白LjCyp1和LjCyp5。体外酶活检测结果显示LjCyp1和LjCyp5具有半胱氨酸蛋白酶活性,通过Real-time PCR以及组织化学定位分析结果均显示*LjCyp*1和*LjCyp*5主要在百脉根根瘤中表达,并且在早期根瘤中表达量不高,而在后期根瘤中有大量表达。表明LjCyp1和LjCyp5可能是与百脉根根瘤衰老有关的半胱氨酸蛋白酶,为进一步研究半胱氨酸蛋白酶基因在根瘤衰老过程中的作用机制提供了工作基础。但在根瘤衰老过程中*LjCyp*1和*LjCyp*5是正调控还是负调控,是否是决定根瘤衰老的关键基因而及由此通过调节基因的表达来控制根瘤的衰老过程是后续研究的内容。

参 考 文 献

[1] SHEOKAND S,DAHIYA P,VINCENT J L,et al. Modified expression of cysteine protease affects seed germination,vegetative growth and nodule development in transgenic lines of *Medicago truncatula*[J]. Plant science,2005,169(5):966-975.

[2] VINCENT J L,BREWIN N J. Immunolocalization of a cysteine protease in vacuoles,vesicles,and symbiosomes of pea nodule cells[J]. Plant physiology,2000,124(2):521-530.

[3] NAITO Y,FUJIE M,USAMI S,et al. The involvement of a cysteine proteinase in the nodule development in Chinese milk vetch infected with *Mesorhizobium huakuii* subsp. *rengei*[J]. Plant physiology,2000, 124(3):1087-1096.

[4] GUERRA J C P,COUSSENS G,KEYSER A D,et al. Comparison of developmental and stress-induced nodule senescence in *Medicago truncatula*[J]. Plant physiology, 2010, 152(3):1574-1584.

[5] GEORGE S,DU PLESSIS M,CULLIS C A,et al. Cysteine protease and cystatin expression and activity during soybean nodule development and senescence[J]. BMC Plant Biol,2014,14:294. http://www.docin.com/p-1356564294.html.

[6] 汪涛,冯勇,张忠明.百脉根LjSERKs基因家族在根瘤共生中的功能鉴定[J].华中农业大学学报,2018,37(2):9-15.

[7] BEYENE G,FOYER C H,KUNERT K J. Two new cysteine proteinases with specific expression patterns in mature and senescent tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves[J]. Journal of experimental botany,2006,57(6):1431-1443.

[8] DEGUCHI Y,BANBA M,SHIMODA Y,et al. Transcriptome profiling of *Lotus japonicus* roots during arbuscular mycorrhiza development and comparison with that of nodulation[J]. DNA research:an international journal for rapid publication of reports on genes & genomes,2007,14(3):117.

[9] LI A H,MOON S U,PARK Y K,et al. Identification and characterization of a cathepsin L-like cysteine protease from *Taenia solium* metacestode[J]. Vet Parasitol,2006,141(3/4):251-259.

[10] CARVALHO T B D,GUIMAR E S S. *In vitro* antigiardial activity of the cysteine protease inhibitore-64[J]. Revista do instituto de medicina tropical de sao paulo,2014,56(1):43-47.

[11] RUSTGI S,BOEX-FONTVIEILLE E,REINBOTHE C,et al. The complex world of plant protease inhibitors:insights into a Kunitz-type cysteine protease inhibitor of *Arabidopsis thaliana*[J]. Communicative & integrative biology, 2018, 1(1):e1368599.

[12] RICHAU K H,KASCHANI F,VERDOES M,et al. Subclassification and biochemical analysis of plant papain-like cysteine proteases displays subfamily-specific characteristics[J]. Plant physiology,2012,158(4):1583-1599.

[13] FISCHER J,BECKER C,HILLMER S,et al. The families of papain- and legumain-like cysteine proteinases from embryonic axes and cotyledons of *Vicia* seeds:developmental patterns,intracellular localization and functions in globulin proteolysis[J]. Plant molecular biology,2000,43(1):83-101.

[14] LOHMAN K N,GAN S,JOHN M C,et al. Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*[J].Physiolo-

gia plantarum,1994,92(2):322-328.

[15] SOLOMON M,BELENGHI B,DELLEDONNE M,et al. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants[J]. Plant cell,1999,11(3):431-434.

[16] MISASVILLAMIL J C,VAN DER HOORN R A L,DOEHLEMANN G.Papain-like cysteine proteases as hubs in plant immunity[J]. New phytologist,2016,212(4):902-907.

Analysis of cysteine protease expression during nodule senescence in *Lotus japonicus*

XU Zeyuan　GOU Honglan　DUAN Liujian　ZHANG Zhongming

State Key Laboratory Agricultural Microbiology/College of Life Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, *China*

Abstract　In order to explore the correlation between cysteine proteases and the senescence of determinate nodules, *LjCyp*1 and *LjCyp*5, associated with root nodule senescence were identified from *Lotus japonicus* by sequence alignment analysis with cysteine protease AsNODf32. The protein sequence and structure showed that the homology of LjCyp1 and LjCyp5 was as high as 96.2%, both of which contained two typical cysteine protease domains and vacuolar localization signal peptides, belonging to the papain family. *In vitro* enzyme activity assays showed that both proteins had cysteine protease activity. Real-time PCR and histochemical localization analysis showed that two protease genes were mainly expressed in mature and aged root nodules. The results indicated that *LjCyp*1 and *LjCyp*5 cysteine proteases may play an important role during nodule senescence in *Lotus japonicus*.

Keywords　*Lotus japonicus*; cysteine protease; nodule senescence; symbiotic nitrogen fixation

(责任编辑:张志钰)