

菜用大豆蔗糖转运蛋白基因家族的克隆及表达分析

张玉梅 胡润芳* 林国强*

(福建省农业科学院作物研究所, 福州 350013)

摘要 蔗糖是高等植物体内碳水化合物长距离运输的主要甚至唯一的形式, 蔗糖转运蛋白在蔗糖转运过程中起着极为重要的作用。该研究从菜用大豆闽豆6号中克隆到9个蔗糖转运蛋白基因, 分别命名为*GmSUT-1~GmSUT-9*, 并对其进行生物信息学、系统发育和组织表达分析。结果表明, *GmSUTs*属于MFS超家族, 根据SUT系统进化分析法将*GmSUTs*划分为SUT1、SUT2和SUT4三个亚族, 其中*GmSUT-1*、*GmSUT-2*、*GmSUT-4*、*GmSUT-5*、*GmSUT-6*、*GmSUT-7*和*GmSUT-8*属于SUT1亚族, *GmSUT-9*属于SUT2亚族, *GmSUT-3*属于SUT4亚族。SUTs各亚族成员氨基酸序列的差异性可能导致它们在蔗糖的跨膜转运中扮演不同的角色, 其表达模式和生理功能也不同。大豆SUT1亚族中7个基因总的表达趋势相似, 花中表达量相对来说最高, 而籽粒、叶片、茎和根等组织中表达量则相对较低; SUT2亚族中的*GmSUT-9*和SUT4亚族中的*GmSUT-3*在不同组织中的表达量相对来说都较低。该研究初步阐明了菜用大豆蔗糖转运蛋白家族基因的结构及组织表达特点, 为进一步开展蔗糖转运蛋白基因调控菜用大豆籽粒发育中蔗糖的积累和分配的研究奠定了基础。

关键词 菜用大豆; 蔗糖转运蛋白; 基因克隆; 表达分析

Gene Clone and Expression Analysis of Sucrose Transporter Gene Family from Vegetable Soybean

Zhang Yumei, Hu Runfang*, Lin Guoqiang*

(Crop Sciences Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China)

Abstract Sucrose is the main or even the only form of long distance transport of carbohydrates in higher plants, and sucrose transporter plays a very important role in the process of sucrose transport. In this study, 9 sucrose transporter genes were cloned from vegetable soybean Mindou 6, named *GmSUT-1~GmSUT-9*, and their bioinformatics, phylogeny and tissue expression were analyzed. The results showed that *GmSUTs* belonged to MFS superfamily. According to the SUT phylogenetic analysis, *GmSUTs* was divided into three subgroups of SUT1, SUT2 and SUT4, of which *GmSUT-1*, *GmSUT-2*, *GmSUT-4*, *GmSUT-5*, *GmSUT-6*, *GmSUT-7* and *GmSUT-8* belonged to subgroup SUT1, *GmSUT-9* belonged to subgroup SUT2 and *GmSUT-3* belonged to subgroup SUT4. The differences in amino acid sequences of members of SUTs subgroups might lead to different roles in transmembrane transport of sucrose, and their expression patterns and physiological functions were also different. The total expression of 7 genes in the SUT1 subfamily of soybean is similar, the highest expression is in the flower, while the expression of the seeds, leaves, stems and roots is relatively low, and the expression of *GmSUT-3* in

收稿日期: 2018-05-14 接受日期: 2018-09-04

国家重点研发计划(批准号: 2017YFD0101500)、福建省属公益类科研院所基本科研专项(批准号: 2016R1025-6、2018R1026-1)和福建省农科院科技创新团队(批准号: STIT2017-2-6)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13506993062, E-mail: 279071648@qq.com; Tel: 13960831749, E-mail: 542057656@qq.com

Received: May 14, 2018 Accepted: September 4, 2018

This work was supported by National Key R&D Program of China (Grant No.2017YFD0101500), Fujian Provincial Public Research Institute of Fundamental Research (Grant No.2016R1025-6, 2018R1026-1) and Science and Technology Innovative Team in Fujian Academy of Agricultural Sciences (Grant No.STIT2017-2-6)

*Corresponding authors. Tel: +86-13506993062, E-mail: 279071648@qq.com; Tel: +86-13960831749, E-mail: 542057656@qq.com

网络出版时间: 2018-10-26 17:38:29

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181026.1738.028.html>

SUT4 subgroup and *GmSUT-9* in SUT2 subgroup was relatively low. This study preliminarily clarified the structure and tissue expression characteristics of the sugar transporter family gene in vegetable soybean, which laid the foundation for the further development of sucrose transporter gene regulation in the accumulation and distribution of sucrose in the development of vegetable soybean seeds.

Keywords vegetable soybean; sucrose transporters; gene clone; expression analysis

蔗糖是高等植物体内碳水化合物长距离运输的主要甚至唯一的形式,在成熟叶片(源)中合成后,进一步转运到多种异养组织(库)中,满足植物生长发育的需要^[1]。高等植物体内蔗糖的跨膜运输及其在植物中的分配由细胞膜上的蔗糖转运蛋白(Sucrose/H⁺ cotransporters或sucrose transporters, SUCs或SUTs)基因家族负责完成,因此,蔗糖转运蛋白在蔗糖转运过程中起着极为重要的作用^[2-3]。蔗糖转运蛋白是一类典型的膜结合蛋白,广泛存在于高等植物的各种组织和器官中,负责蔗糖的跨膜运输,在蔗糖进出韧皮部、蔗糖的贮藏和库组织的蔗糖供给等环节中发挥重要作用。蔗糖转运蛋白基因是一个大的基因家族,属于MFS超家族(major facilitator super-family)的蔗糖转运子(sugar transporter)亚族,其氨基酸序列高度保守,含有12个结构保守的跨膜结构域,序列中部有一个定位于细胞质的大环,将整个蛋白分为各含6个跨膜域的2部分,N-端序列也定位于细胞质^[4]。自首次在酵母中获得蔗糖转运蛋白(SoSUT1)^[5]以来,在马铃薯、烟草、拟南芥、水稻、玉米和小麦等植物中也先后获得了蔗糖转运蛋白^[6-9]。

菜用大豆俗称毛豆,富含蛋白质、碳水化合物、膳食纤维、维生素、矿物质和植物雌激素^[10]。相对于普通大豆来说,菜用大豆具有香甜柔糯以及荚大粒大等诸多优点,因此商品价格较高、市场需求量也较大。研究表明,可溶性糖含量高的品种有较强的甜味,淀粉含量高的品种糯性较强,脂肪含量高的品种质地较软,蛋白质中游离氨基酸含量较高的品种有较强的鲜味^[11]。Li等^[12]的研究表明,菜用大豆鲜食期籽粒中可溶性糖含量最高的蔗糖,可占可溶性总糖的70%左右。但大豆蔗糖转运蛋白的克隆及如何调控菜用大豆籽粒蔗糖源库关系还未见报道。本实验以菜用大豆品种“闽豆6号”为材料,采用同源克隆技术克隆蔗糖转运蛋白基因,利用RT-qPCR技术测定*GmSUTs*基因在不同组织中的表达量,分析这些基因在菜用大豆不同组织中的表达情况,为菜用

大豆籽粒发育中蔗糖转运的生理及分子机理研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

菜用大豆品种闽豆6号由福建省农业科学院作物研究所提供。将材料种植于福清国家级农作物品种区域试验站,常规大田管理,大豆的根、茎、叶、花和荚同时取样,并于液氮速冻后-80℃保存备用。

1.2 大豆SUT同源序列的搜索及引物设计

以拟南芥蔗糖转运蛋白(Q39232)在大豆基因组数据库(<http://www.phytozome.net/soybean>)进行同源比对,排除与SUT没有很高同源性的序列以及没有完整开放阅读框(ORF)的序列,获得9条序列并对其全长序列进行引物设计(表1)。

1.3 大豆SUT基因的克隆与测序

根据同源比对在大豆基因组数据库(<http://www.phytozome.net/soybean>)获得SUT序列。利用Primer Premier 5软件对预测的序列进行引物设计(表1),引物由上海英骏生物技术有限公司合成。根据设计的引物,PCR扩增大豆花的cDNA。PCR反应程序为:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,根据每个引物的退火温度退火30 s,72℃延伸1 min,35个循环;72℃延伸10 min。用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,目的片段经回收(美国Omega公司)、连接(pEASY®-T1 Simple Cloning Vector,北京全式金生物技术有限公司)、转化(大肠杆菌DH5α,北京全式金生物技术有限公司)、蓝白斑筛选(北京全式金生物技术有限公司)、PCR鉴定、测序[生工生物工程(上海)股份有限公司],最后获得SUT保守片段。

1.4 大豆SUT基因的序列分析

应用DNAMAN6.0用于多序列比对;使用ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam>)和ProtScale(<http://web.expasy.org/protscale/0>)在线软件分析蛋白一级结构;保守结构域运用SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)软件分析;应用bioxm预

表1 *GmSUTs*基因克隆引物及cDNA片段长度Table 1 Primers used to isolate the *GmSUTs* genes and the cDNA length of *GmSUTs* genes

基因 Genes	基因ID Locus ID	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')	扩增长度(bp) Amplification length (bp)
<i>GmSUT-1</i>	Glyma02g08250	F: CCA ACT CTC TCC CAC ACT CCT R: CCG GCA AGA TGA CTG TTC ATA CAC G	1 531
<i>GmSUT-2</i>	Glyma02g08260	F: AGT CCC TCC TTG GTT CTA CA R: AGC AGG GGA CAA AAC TGA AAC	1 691
<i>GmSUT-3</i>	Glyma02g38300	F: TTT TTG CGT TAT ACC TCT R: CAT TTT CAC CAT CCT TCT	1 663
<i>GmSUT-4</i>	Glyma10g36200	F: ACT CAA CAC AAA CAC TCA CAC R: AAC ACG GTC AAC TCT GAT TAG	1 634
<i>GmSUT-5</i>	Glyma16g27320	F: TTC TCA CAC TCT GCT TCC R: ATG GAA ACT CCC AGC AGT	1 613
<i>GmSUT-6</i>	Glyma16g27330	F: TCT CAC AAC AAT GGA GGA GC R: GCG AAG CAT GTA AAG CCC TAT	1 526
<i>GmSUT-7</i>	Glyma16g27340	F: GCC TCT CTC ACA ACA ATG GA R: TAT ACA CAT GCA CAC ACC CAC	1 602
<i>GmSUT-8</i>	Glyma16g27350	F: TCT CTT GTT CCT TCT CCT R: CTA TTA AAG CAG GGG ACA	1 710
<i>GmSUT-9</i>	Glyma18g15950	F: ATG ACG ACG GGG AAG TCT GAT TT R: CTA GCC AAT ATG AAA TCC TGT TGA CTG G	1 848

测分子量、蛋白质的等电点;应用SOMPA(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)在线软件分析蛋白质二级结构;采用SMARTT(<http://smart.embl-heidelberg.de/>) ClustalX1.81软件和MEGA4.0软件构建进化树。

1.5 实时荧光定量PCR分析

依据大豆蔗糖转运蛋白基因全长序列,应用Primer Express 3.0软件根据定量PCR引物设计原则各设计一对荧光定量特异引物,以大豆*GmACTIN2/7*(Gene ID:Glyma04g39380.1)为内参设计内参引物(表2)。应用Power SYBR Green PCR Master Mix(美国ABI公司)试剂盒进行实时定量PCR扩增(ABI7500)。25 μ L反应体系: 12.5 μ L Power SYBR Green PCR Master Mix, 1 μ L cDNA, 上、下引物各0.5 μ L(10 μ mol/L), 用双蒸水补充至25 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C预变性30 s; 95 $^{\circ}$ C变性5 s, 60 $^{\circ}$ C退火34 s, 40个循环。每个反应设3次重复。在Excel软件中采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析处理数据并得出基因表达情况。

2 结果

2.1 大豆*SUT*基因序列分析

利用拟南芥蔗糖转运蛋白(Q39232)基因对大豆

全基因组进行搜索,在排除没有较高同源性和完整ORF的序列后,9个预测的*SUT*基因序列被保留。对这9个序列进行序列特异性引物的设计(表1)并进行基因的克隆,最终获得了9个完整的*SUT*基因序列(图1)。

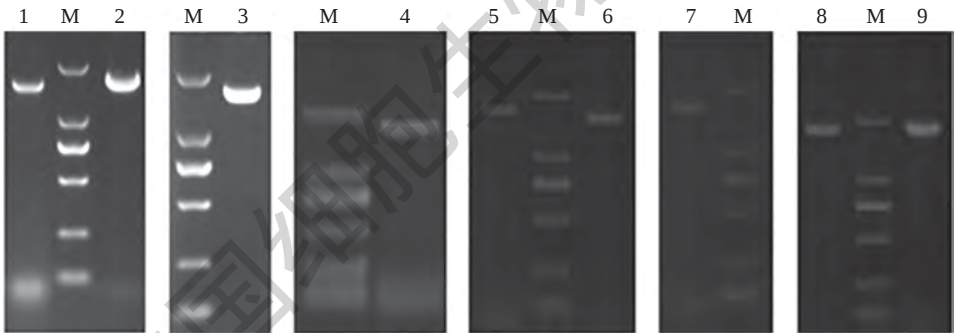
对这9个*SUT*基因进行序列分析发现,它们分布于不同的大豆染色体上,ORF框大小为1 443~1 794 bp,分子量为51.20~64.30 kDa(表3)。通过氨基酸序列相似性比较发现,这9个*GmSUTs*可以明显地分为3组,每组之间的相似性极高但是不同组之间的相似性却相对较低(表4)。*GmSUT-1*、*GmSUT-2*、*GmSUT-4*、*GmSUT-5*、*GmSUT-6*、*GmSUT-7*和*GmSUT-8*之间具有极高的相似性但是与其他序列(*GmSUT-3*和*GmSUT-9*)的相似性却较低。同样,*GmSUT-2*和*GmSUT-8*之间具有95.69%的相似性,这两个序列与*GmSUT-1*、*GmSUT-4*、*GmSUT-5*、*GmSUT-6*和*GmSUT-7*的相似性为67.49%~75.51%,但与*GmSUT-3*的相似性为48.75%,与*GmSUT-9*的相似性仅为39.24%和39.41%。*GmSUT-3*和*GmSUT-9*与其他序列的相似性都较低,但*GmSUT-3*与其他序列的相似性略高于*GmSUT-9*与其他序列的相似性。

2.2 大豆*SUT*家族蛋白的鉴定及系统发育分析

9个*SUT*蛋白多重序列比对分析如图2所示,从

表2 用于实时荧光定量PCR的引物
Table 2 Primers used for quantitative Real-time PCR

基因 Genes	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')
<i>GmSUT-1</i>	F: CTG CTG CAT TGA CTT TCT TCT C R: CTC CTG AAG TGG TGG AGT ATA TG
<i>GmSUT-2</i>	F: CAG GAG CAG GAC AAG GTT TAT R: GGA ATC CCA AGG ACC ACT TAA T
<i>GmSUT-3</i>	F: GCA ATA GTG GTC CCA CAG ATA A R: GTC CAC TGA TAA GGG CTG AAA
<i>GmSUT-4</i>	F: GGA CCA TGG GAT GCT CTA TTT R: GGA GAT GGC AGC AGG ATT AT
<i>GmSUT-5</i>	F: GCT ATA AGT GGA CAG TGG GAT AAG R: AGC AGA ACA ACC GCT AAC A
<i>GmSUT-6</i>	F: CGC TTG GGC CTC ATT TAT TTG R: CAA AGA CCC GGC TAG GAT AAA G
<i>GmSUT-7</i>	F: GTG GAA ACT TGC CTG CAT TC R: CCT GAC CTC ATC AGC TTT CTT
<i>GmSUT-8</i>	F: GTC CTA CAA AGG TCT CCA CAA G R: AGC AGC AAG AGG ATT GAG AAA
<i>GmSUT-9</i>	F: TTC TTC AGG TGC TAG GGA AAG R: ACA GCA AGC TCT AGT GTC AAG
<i>GmACTIN2/7</i>	F: TTT GCT GGT GAT GAT GCT C R: ACC TCT TTT TGA CTG GGC T



1~9: 大豆蔗糖转运蛋白基因1~9的扩增产物; M: DNA标准分子量DL2000。
1-9: product of *GmSUT-1-GmSUT-9*; M: DNA marker DL2000.

图1 大豆SUT基因的克隆
Fig.1 Cloning of *GmSUTs* genes in *Glycine max*

表3 9个大豆SUT的蛋白信息
Table 3 Protein information of 9 *GmSUTs*

基因ID Locus ID	命名 Gene nomenclature	ORF大小(bp) ORF size (bp)	氨基酸大小(aa) Size (aa)	等电点 pI	分子量(kDa) MW (kDa)
Glyma02g08250	<i>GmSUT-1</i>	1 443	480	8.87	51.20
Glyma02g08260	<i>GmSUT-2</i>	1 536	511	8.69	54.00
Glyma02g38300	<i>GmSUT-3</i>	1 518	505	9.04	54.15
Glyma10g36200	<i>GmSUT-4</i>	1 566	521	9.33	55.20
Glyma16g27320	<i>GmSUT-5</i>	1 515	505	8.96	53.90
Glyma16g27330	<i>GmSUT-6</i>	1 485	494	8.27	52.76
Glyma16g27340	<i>GmSUT-7</i>	1 485	494	8.27	52.87
Glyma16g27350	<i>GmSUT-8</i>	1 536	511	8.92	54.09
Glyma18g15950	<i>GmSUT-9</i>	1 794	598	5.81	64.30

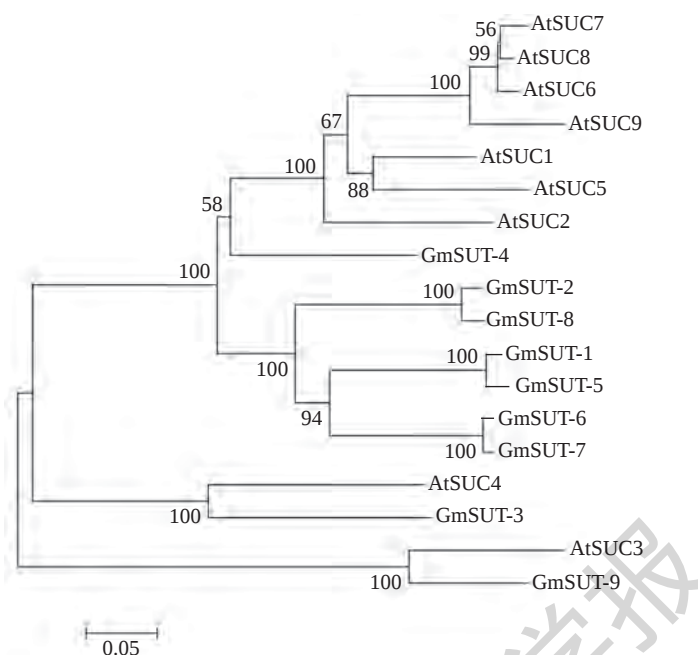


图3 大豆GmSUTs和拟南芥AtSUCs的系统发育分析

Fig.3 Phylogenetic relationships among *Glycine max* (GmSUTs) and *Arabidopsis thaliana* (AtSUCs)

SUT4亚族。SUTs各亚族成员氨基酸序列的差异性可能与它们在蔗糖的跨膜转运中扮演不同的角色有关。

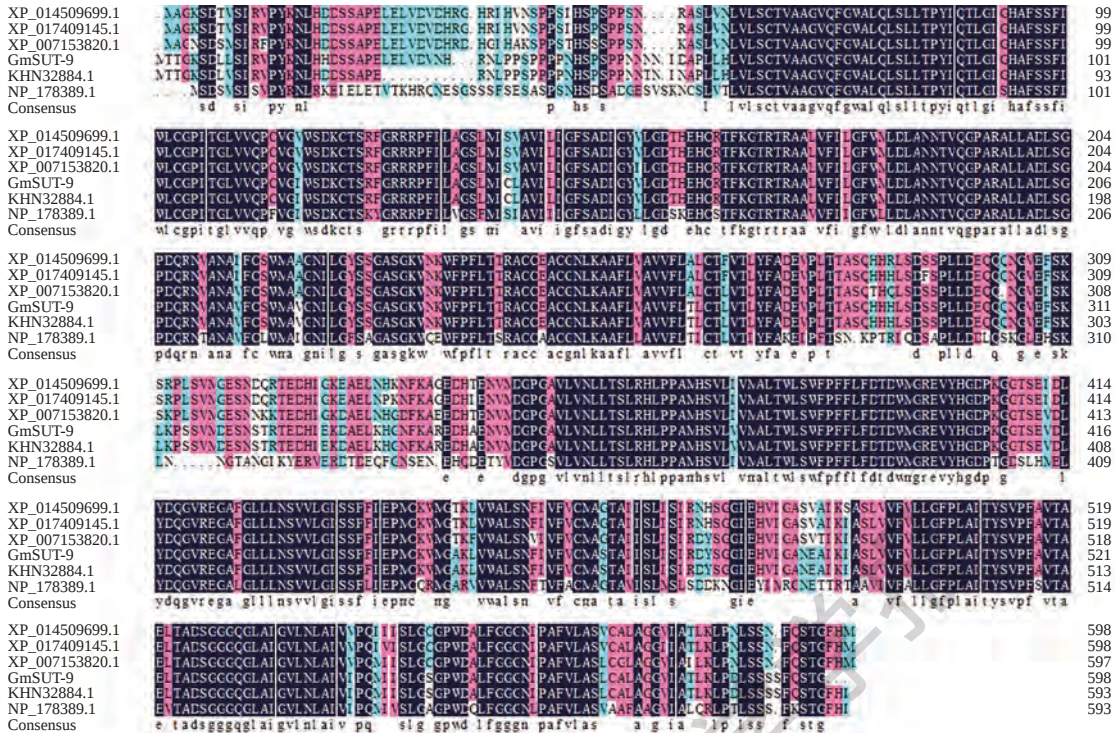
从系统发育树中可以看出,聚合成SUT1亚族的蛋白具有两个明显的分支,将GmSUT-4与GmSUT-1、GmSUT-2、GmSUT-5、GmSUT-6、GmSUT-7和GmSUT-8等6个SUT1亚族的SUT区分开(图3),推测它们可能具有区别于其他GmSUT-4的功能。而GmSUT-1与GmSUT-5、GmSUT-2与GmSUT-8以及GmSUT-6与GmSUT-7具有极高的相似性,推测它们可能具有类似的功能。从系统发育树可以发现, SUT1和SUT4亚族间的亲缘关系要近于SUT2亚族。

由图2和表4可以看出, GmSUT-9与其他8个GmSUTs的同源性不高,而GmSUT-9和AtSUC3同属于SUT2亚族。为了进一步分析SUT2亚族中其他物种的同源性,将GmSUT-9的氨基酸序列登录到NCBI网站上,用BLAST程序进行序列的同源性检索,如图4所示。结果表明,大豆(GmSUT-9)与野生大豆(KHN32884.1)的亲缘关系最近,达97.34%;其次是绿豆(XP_014509699.1)、小豆(XP_017409145.1)、菜豆(XP_007153820.1),同源性分别为89.24%、88.91%、88.74%,与拟南芥AtSUC3(NP_178389.1)的同源性为68.98%;拟南芥AtSUC3(NP_178389.1)

与绿豆(XP_014509699.1)、小豆(XP_017409145.1)、菜豆(XP_007153820.1)、大豆(GmSUT-9)、野生大豆(KHN32884.1)的同源性分别为68.54%、67.88%、69.37%、68.98%和69.97%。

2.3 大豆SUT基因在大豆不同组织中的表达特性分析

为了分析大豆SUT基因在大豆不同组织中的表达特性,本研究利用实时荧光定量PCR对9个基因进行鉴定(图5),结果表明,大豆SUT基因在大豆的根、茎、叶、花和荚中都有表达,但是表达水平各异。总的来说,在花中表达量相对较高,其次是荚,在叶片、茎和根中表达量相对较低。在系统发育分析中,来源于同一分支的SUT的表达形式具有很高的相似性,表明它们可能具有类似的功能。SUT1亚族中7个基因(GmSUT-1、GmSUT-2、GmSUT-4、GmSUT-5、GmSUT-6、GmSUT-7和GmSUT-8)总的表达趋势相似,花中表达量相对来说最高,而籽粒、叶片、茎和根中表达量则相对较低。在这7个基因中,相似性较高的GmSUT-2和GmSUT-8表达趋势更相似, GmSUT-1和GmSUT-5表达趋势更相似, GmSUT-6和GmSUT-7表达趋势更相似; SUT2亚族中的GmSUT-9在不同组织中的表达量相对来说都较低,在花和根中表达量稍微高点,而在茎、叶和籽粒中的表达量较低。SUT4亚族中的GmSUT-3在不



XP_014509699.1: 绿豆; XP_017409145.1: 小豆; XP_007153820.1: 菜豆; GmSUT-9: 大豆; KHN32884.1: 野生大豆; NP_178389.1: 拟南芥。

XP_014509699.1: *Vignaradiata* var. *radiata*; XP_017409145.1: *Vignaangularis*; XP_007153820.1: *Phaseolus vulgaris*; GmSUT-9: *Glycine max*; KHN32884.1: *Glycine sojae*; NP_178389.1: *Arabidopsis thaliana*.

图4 大豆GmSUT-9氨基酸同源性分析

Fig.4 Homology analysis of GmSUT-9 in *Glycine max*

同组织中的表达量相对来说都较低, 其表达趋势与SUT2亚族中的GmSUT-9相似。部分同源的GmSUT在不同组织中具有类似的表达模式, 但是表达丰度却具有很大的差异, 例如GmSUT-1和GmSUT-2, 推测可能这些同源基因在大豆生长过程中扮演不同的角色。由于不同基因在大豆组织中都有表达, 但表达模式不同, 如GmSUT-5在花中表达丰度最高, 而GmSUT-3和GmSUT-9基因在根中表达丰度最高, 推测这9个基因在大豆生长发育过程中可能具有不同的作用。

3 讨论

蔗糖转运蛋白普遍存在于植物、动物、微生物中, 植物中SUT是具有蔗糖转运活性的蔗糖载体, 在植物生长代谢中调控蔗糖的运输和分配, 并通过蔗糖信号影响其他代谢途径^[14]。蔗糖转运蛋白基因属于多家族基因, 如拟南芥中有9种^[15], 水稻中有5种^[16], 橡胶树中有6种^[17], 胡萝卜中则有3种^[18]。本研究从菜用大豆闽豆6号中克隆9个GmSUT基因, 分别命名为GmSUT-1~GmSUT-9。这9个GmSUT分布

于大豆不同的染色体上, ORF框大小为1 443~1 794 bp, 其对应的蛋白分子量为51.20~64.30 kDa。系统发育分析结果显示, 大豆GmSUT-2和GmSUT-8、GmSUT-1和GmSUT-5以及GmSUT-6和GmSUT-7蛋白序列具有极高的相似性, 说明它们可能具有类似的功能。

蔗糖转运蛋白基因是一类典型的膜结合蛋白, 属于多家族基因, 负责蔗糖的跨膜运输, 在蔗糖进出韧皮部、蔗糖的贮藏和库组织的蔗糖供给等方面发挥重要的作用。不同基因执行功能不同, 其表达部位不同, 这在不同植物中也有差异。张清等^[19]通过对更多有代表性物种的基因家族成员聚类分析表明, SUT基因家族可分为SUT1、SUT2、SUT3、SUT4和SUT5共5个亚族, 其中SUT2和SUT4为单、双子叶所共有, SUT1为双子叶特异, 而SUT3和SUT5为单子叶特异。根据SUT家族的不同, SUT成员的表达模式和生理功能也不同^[20]。SUT1类蛋白主要在源和库组织中表达, 参与蔗糖在韧皮部的运输^[21]。SUT2类蛋白不具有蔗糖转运活性, 也不能定位到质膜^[22]。SUT4的表达影响一些生物钟调

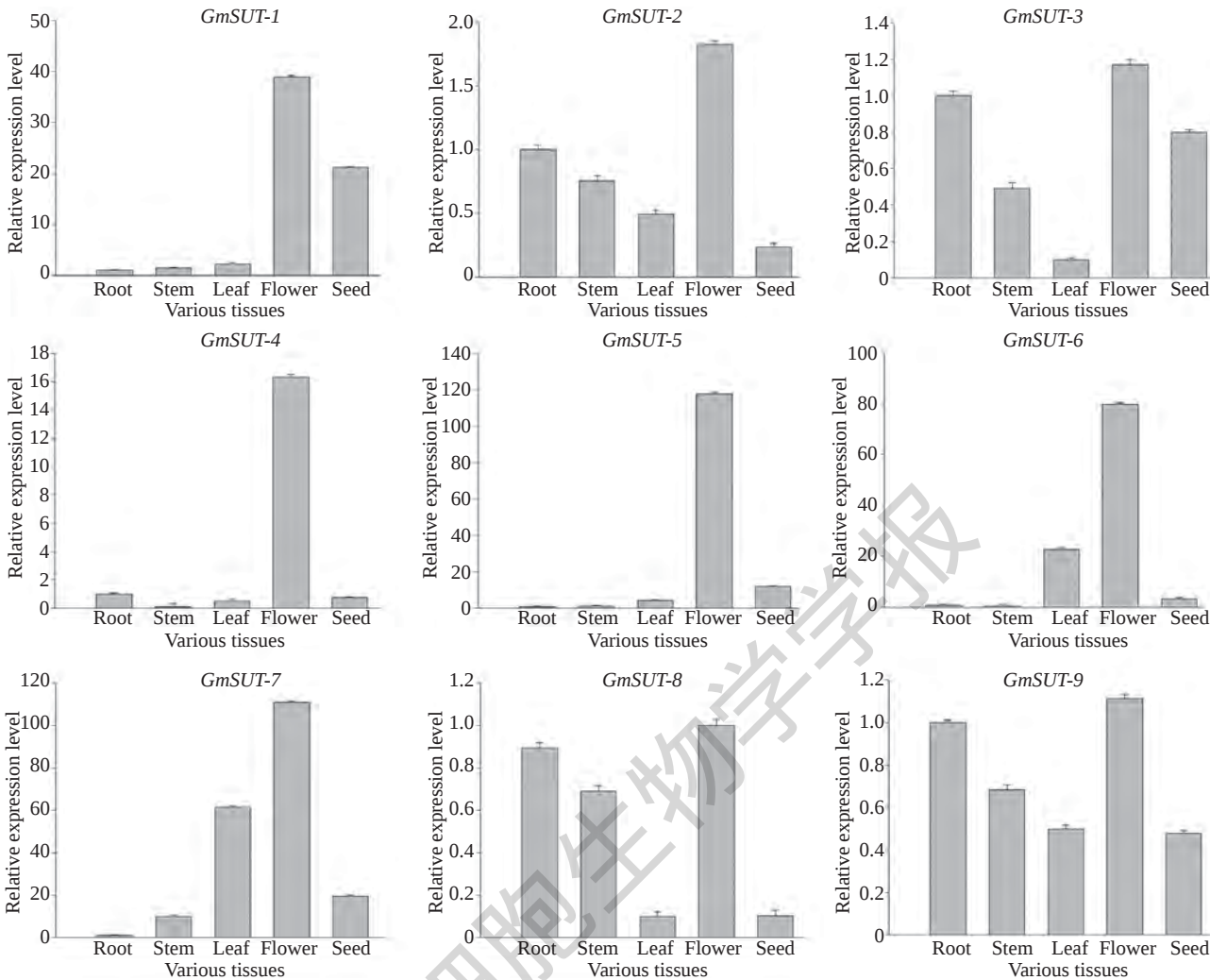


图5 大豆GmSUTs基因的组织表达分析

Fig.5 Expression of GmSUTs genes in various soybean tissues

控相关基因(如*StFT*、*StSOC1*、*StCO*)的表达, 这些生物钟相关基因参与调控光周期依赖的块茎组织器官发育^[23]。拟南芥中9个蔗糖转运蛋白家族成员分为SUT1、SUT2和SUT4 3个亚族, 其中*AtSUC1*、*AtSUC2*、*AtSUC5*、*AtSUC6*、*AtSUC7*、*AtSUC8*和*AtSUC9*属于SUT1亚族, *AtSUC3*属于SUT2亚族, *AtSUC4*属于SUT4亚族^[13]。对大豆*GmSUTs*和拟南芥*AtSUCs*进行系统发育分析发现, 所有蛋白可以明显分成3簇(图3), 大豆*GmSUTs*也划分为3个亚族, 其中*GmSUT-1*、*GmSUT-2*、*GmSUT-4*、*GmSUT-5*、*GmSUT-6*、*GmSUT-7*和*GmSUT-8*属于SUT1亚族, *GmSUT-9*属于SUT2亚族, *GmSUT-3*属于SUT4亚族。早在2003年, Aldape等^[24]在对已克隆的*SUT*基因同源性比对的基础上, 设计简并引物, 利用RT-qPCR获得*SUT*基因的保守片段, 进一步通过RACE方法获

得全长cDNA, 并将其命名为*GmSUT1*。根据Aldape等^[24]提供的上下游引物进行同源性比对, 获得同源性最高的序列是Glyma.10G217900.1(Glyma10g36200), 也就是本文中的*GmSUT-4*。将本文中*GmSUT-4*测序序列与大豆参考基因组Williams 82(<http://www.phytozome.net/soybean>)中的序列进行比对发现, 两条序列相似性达到99.98%, 仅第975位碱基由G变成A, 即Williams 82中第975位碱基是鸟嘌呤(G), 而闽豆6号中第975位碱基是腺嘌呤(A); 相应的氨基酸序列也由第326个氨基酸丙氨酸(A)变成苏氨酸(T)。根据系统发育分析发现, *GmSUT1*归于SUT1亚族, 这与本文的研究结果一致。戚继艳等^[25]的研究表明, 根据植物*SUT*基因的结构及其氨基酸编码序列的特点, 可将其分为2类, 一类的编码序列一般小于530个氨基酸, 另一类的编码序列较长, 一般大于590个氨基

酸,如拟南芥的*AtSUC3*、葡萄的*VvSUC12*、番茄的*LeSUT2*等都属于此类基因。不同物种来源SUT的序列比较保守反映植物SUT基因在进化上的保守性,同一物种SUT家族不同成员间的氨基酸序列的同源性较低也反映该基因起源与进化的多样性。这或许也是*GmSUT-9*与大豆其他8个基因同源性都不高的原因。

草莓果实发育过程中蔗糖含量的高低与蔗糖转运蛋白表达水平高低有关,并且蔗糖转运蛋白的表达影响果实的成熟进度^[26]。东方山羊豆*GoSUT*在茎中表达量高,根部和叶片中表达量较低^[27]。拟南芥中,*AtSUT5*在花、荚果中表达量最高,并在胚乳中特异性表达,表明其在种子早期发育过程中起重要作用^[28]。*AtSUC1*仅在拟南芥花中表达,研究表明,其可能参与花粉囊开裂和花粉管伸长所需渗透压力的形成^[29]。将T-DNA插入*AtSUC2*基因导致突变体植株形态矮小,且营养组织内有大量蔗糖和淀粉沉积。将*AtSUC2*基因重新导入突变体植株可使植株形态,营养组织内蔗糖与淀粉的转运均恢复正常^[30]。可见,蔗糖转运蛋白与蔗糖的运输和碳分配密切相关,其活力不仅影响植物的生长发育,甚至影响农作物的产量。本研究对大豆9个*GmSUT*在大豆不同组织中的表达模式进行了分析。研究结果表明,大豆*GmSUTs*在大豆的根、茎、叶、花和籽粒中都有一定的表达丰度,说明大豆*GmSUTs*基因在大豆生长和发育进程中扮演着重要的角色,尤其是在调控菜用大豆由营养生长进入生殖生长过程中起着重要的作用。研究表明,菜用大豆鲜食期蔗糖对菜用大豆甜味的贡献率达71%^[31]。菜用大豆籽粒发育过程中,蔗糖结合蛋白2前体的上调表达可能有助于提高采摘期菜用大豆籽粒的营养品质和食味品质^[32]。蔗糖结合蛋白属于贮藏蛋白家族,实验证明,蔗糖结合蛋白与植物蔗糖转运有关^[33]。抑制烟草细胞中*GmSBP*的表达,植物体表现出与蔗糖转运受损相同的表型^[34]。将*GmSBP*在SBP转化酶缺失的酵母突变体内进行异源表达,发现酵母细胞可在以蔗糖为唯一碳源的培养基上生长^[35]。Hu等^[36]的研究表明,氨基酸、有机酸以及糖类代谢物对菜用大豆品质有着重要影响,推测蔗糖转运蛋白在调控菜用大豆籽粒发育中对蔗糖的积累和分配起着重要的作用。本研究为进一步研究蔗糖转运蛋白表达分析及功能验证提供了理论参考。

参考文献 (References)

- 1 Kühn C, Grof CPL, Sonnewald U, Frommer WB. Sucrose transporters of higher plants. *Curr Opin Plant Biol* 2010; 13(3): 288-98.
- 2 Williams LE, Lemoine R, Sauer N. Sugar transporters in higher plants-a diversity of roles and complex regulation. *Trends Plant Sci* 2000; 5(7): 283-90.
- 3 Barker L, Kühn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, et al. SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell* 2000; 12(7): 1153-64.
- 4 张雷, 刁丰秋, 杨志攀, 黄美娟, 吴乃虎. 一种胡萝卜蔗糖转运蛋白基因家族新成员的分离及功能鉴定. *科学通报*(Zhang Lei, Diao Fengqiu, Yang Zhipan, Huang Meijuan, Wu Naihu. Isolation and functional identification of a new member of carrot sucrose transporter gene family. *Chinese Science Bulletin*) 2001; 46(14): 1190-5.
- 5 Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J* 1992; 11(13): 4705-13.
- 6 Sauer N, Stolz J. SUC1 and SUC2: Two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant J* 1994; 6(1): 67-77.
- 7 Kühn C, Quick WP, Schulz A, Riesmeier JW, Sonnewald U, Frommer WB. Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transporter SUT1. *Plant Cell Environ* 1996; 19(10): 1115-23.
- 8 Gahrz M, Stolz J, Sauer NA. Phloem-specific sucrose-H⁺ symporter from *Plantago major* L. supports the model of apoplastic phloem loading. *Plant J* 1994; 6(5): 697-706.
- 9 Hirose T, Imaizumi N, Scofield GN, Furbank RT, Ohsugi R. cDNA cloning and tissue specific expression of a gene for sucrose transporter from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol* 1997; 38(12): 1389-96.
- 10 Kim SY, Kim BM, Kim JB, Shanmugavelan P, Kim HW, Kim SN, et al. Effect of steaming, blanching, and high temperature/high pressure processing on the amino acid contents of commonly consumed Korean vegetables and pulses. *Prev Nutr Food Sci* 2014; 19(3): 220-6.
- 11 张玉梅, 赵晋铭, 王明军, 邢邯, 盖钧镒. 南方菜用大豆资源营养品质性状的遗传变异. *大豆科学*(Zhang Yumei, Zhao Jinming, Wang Mingjun, Xing Han, Gai Junyi. Genetic variance of nutritional quality of vegetable soybean germplasm of *Glycine max* Merr. in southern China. *Soybean Science*) 2006; 25(3): 239-43.
- 12 Li YS, Ming D, Zhang QY, Wang GH, Hashemi M, Liu XB. Greater differences exist in seedprotein, oil, total soluble sugar and sucrose content of vegetable soybean genotypes [*Glycine max* (L.) Merrill] in Northeast China. *Aust J Crop Sci* 2012; 6(12): 1681-6.
- 13 Sauer N, Ludwig A, Knoblauch A, Rothe P, Gahrz M, Klebl F. *AtSUC8* and *AtSUC9* encode functional sucrose transporters but the closely related *AtSUC6* and *AtSUC7* genes encode aberrant proteins in different *Arabidopsis* ecotypes. *Plant J* 2004; 40(1): 120-30.
- 14 吴转娣, 咎逢刚, 张树珍. 蔗糖转运蛋白的调节. *生物技术通报* (Wu Zhuandi, Zan Fenggang, Zhang Shuzhen. The regulation of

- sucrose transporters. *Biotechnology Bulletin*) 2009; 7: 12-6.
- 15 高蕾, 肖文芳, 李文燕, 彭昌操. 拟南芥蔗糖转运蛋白(SUTs)的功能研究进展. *分子植物育种*(Gao Lei, Xiao Wenfang, Li Wenyan, Peng Changcao. Progress on functions of sucrose transporters (SUTs) in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Breeding*) 2011; 9(2): 251-5.
- 16 Aoki N, Hirose T, Scofield GN, Whitfield PR, Furbank RT. The sucrose transporter gene family in rice. *Plant Cell Physiol* 2003; 44(3): 223-32.
- 17 阳江华, 黄德宝, 刘术金, 唐朝荣. 巴西橡胶树6个蔗糖转运蛋白基因的克隆与序列分析. *热带作物学报*[Yang Jianghua, Huang Debao, Liu Shujin, Tang Chaorong. Molecular cloning and sequence analysis of six sucrose transporter genes from *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Chinese Journal of Tropical Crops*] 2007; 28(4): 32-8.
- 18 Shakya R, Sturm A. Characterization of source and sink specific sucrose/H⁺ symporters from carrot. *Plant Physiol* 1998; 118(4): 1473-80.
- 19 张清, 胡伟长, 张积森. 植物蔗糖转运蛋白研究进展. *热带作物学报*(Zhang Qing, Hu Weichang, Zhang Jisen. Sucrose transporters in plants. *Chinese Journal of Tropical Crops*) 2016; 37(1): 193-202.
- 20 Kühn C. A comparison of the sucrose transporter systems of different plant species. *Plant Biol* 2003; 5(3): 215-32.
- 21 Geiger D. Plant sucrose transporters from a biophysical point of view. *Mol Plant* 2011; 4(3): 395-406.
- 22 Krügel U, Kühn C. Post-translational regulation of sucrose transporters by direct protein-protein interactions. *Front Plant Sci* 2013; 4(2): e237.
- 23 Chincinska I, Gier K, Krügel U, Liesche J, He HX, Grimm B, *et al.* Photoperiodic regulation of the sucrose transporter *StSUT4* affects the expression of circadian-regulated genes and ethylene production. *Front Plant Sci* 2013; 4(2): 26.
- 24 Aldape M, Elmer AM, Chao WS, Grimesa HD. Identification and characterization of a sucrose transporter isolated from the developing cotyledons of soybean. *Arch Biochem Biophys* 2003; 409(2): 243-50.
- 25 戚继艳, 阳江华, 唐朝荣. 植物蔗糖转运蛋白的基因与功能. *植物学通报*(Qi Jiyan, Yang Jianghua, Tang Chaorong. Sucrose transporter genes and their functions in plants. *Chinese Bulletin of Botany*) 2007; 24(4): 532-43.
- 26 柴叶茂, 贾海峰, 李春丽, 秦岭, 沈元月. 草莓果实发育过程中糖代谢相关基因的表达分析. *园艺学报*(Chai Yemao, Jia Haifeng, Li Chunli, Qin Ling, Shen Yuanyue. Transcriptional analysis of sugar metabolism-related genes during strawberry fruit development. *Acta Horticulturae Sinica*) 2011; 38(4): 637-43.
- 27 李俊, 王学敏, 董洁, 王赞, 高洪文, Dzyubenko Nikolay, 等. 东方山羊豆蔗糖转运蛋白基因克隆及表达载体构建. *中国草地学报*(Li Jun, Wang Xuemin, Dong Jie, Wang Zan, Gao Hongwen, Dzyubenko Nikolay, *et al.* Isolation and construction expression vector of GoSUT in *Galega orientalis*. *Chinese Journal of Grassland*) 2011; 33(3): 39-46.
- 28 Baud S, Wuillème S, Lemoine R, Kronenberger J, Caboche M, Lepiniec L, *et al.* The AtSUC5 sucrose transporter specifically expressed in the endosperm is involved in early seed development in *Arabidopsis*. *Plant J* 2005; 43(6): 824-36.
- 29 Stadler R, Truernit E, Gahrtz M. The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force for anther dehiscence and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Plant J* 1999; 19(3): 269-78.
- 30 Srivastava AC, Ganesan S, Ismail IO, Ayre BG. Functional characterization of the *Arabidopsis AtSUC2* sucrose/H⁺ symporter by tissue specific complementation reveals an essential role in phloem loading but not in long distance transport. *Plant Physiol* 2008; 148(1): 200-11.
- 31 张秋英, 李彦生, 刘长锴, 田博文, 涂冰洁, 毛健伟. 菜用大豆食用品质关键组分及其积累动态研究. *作物学报*(Zhang Qiying, Li Yansheng, Liu Changkai, Tian Bowen, Tu Bingjie, Mao Jianwei. Key components of eating quality and their dynamic accumulation in vegetable soybean varieties [*Glycine max* (L.) Merr.] *Acta Agronomica Sinica*) 2015; 41(11): 1692-700.
- 32 Zhang YM, Hu RF, Li HW, Zhu HS, Zhao JM, Guo N, *et al.* Proteomics changes in filling seeds of vegetable soybean. *HortScience* 2016; 51(11): 1397-401.
- 33 Ripp KG, Viitanen PV, Hitz WD, Franceschi VR. Identification of membrane protein associated with sucrose transport into cells of developing soybean cotyledons. *Plant Physiol* 1988; 88(4): 1435-45.
- 34 Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB. Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *EMBO J* 1994; 13(1): 1-7.
- 35 Grimes HD, Overvoorde PJ. Functional characterization of sucrose binding protein mediated sucrose uptake in yeast. *J Experi Bot* 1996; 47(30): 1217-22.
- 36 Hu RF, Zhang YM, Chen YH, Lin GQ. Dynamic metabolic profiling in vegetable soybean seed development. *Emir J Food Agr* 2018; 30(2): 90-8.