

大豆异黄酮生物合成途径中 *IFS1* 基因表达分析

练云,李海朝,王树峰,武永康,李金英,雷晨芳,卢为国

(河南省农业科学院 经济作物研究所,国家大豆改良中心郑州分中心,农业部黄淮海油料作物重点实验室,河南 郑州 450002)

摘要:在异黄酮合成途径中,异黄酮合酶(Isoflavone synthase, *IFS*) 基因起着重要作用,为此,分析了 *IFS1* 基因(*IFS* 基因的同源基因之一)在大豆中的表达特点。组织表达分析表明, *IFS1* 基因在根、茎、叶、花、籽粒、豆荚和胚中均有表达,其中在较嫩的组织(萌发 7 d 的豆苗根、茎、叶)中表达量较高,在较老的组织(生长 70 d 的豆苗根、茎、叶)中表达量较低,在开花后 25、45 d 的籽粒和豆荚及花中表达量也较低,而在成熟胚中 *IFS1* 基因表达量较高,推测该基因在胚形成早期就已经完成了大豆异黄酮的积聚过程。不同非生物胁迫的诱导表达分析表明, *IFS1* 基因不同程度地受 IAA、ABA、PEG、NaCl、低温和创伤胁迫诱导表达,表明该基因参与了大豆的逆境应答。

关键词:大豆;异黄酮;异黄酮合酶;基因表达

中图分类号:S565.1;Q786 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2013)03-0025-05

Expression Analysis of *IFS1* Gene in Isoflavonoids Pathway in Soybean

LIAN Yun, LI Hai-chao, WANG Shu-feng, WU Yong-kang, LI Jin-ying, LEI Chen-fang, LU Wei-guo

(Zhengzhou Subcenter of National Soybean Improvement Center, Key Laboratory of Oil Crops in Huanghuaihai Plains of Ministry of Agriculture, Institute of Industrial Crops, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Previous studies have shown that isoflavone synthase (*IFS*) encode key enzymes in the isoflavonoids pathway in Soybean. There are two *IFS* homologues *IFS1* and *IFS2* in Soybean. The expression level of *IFS1* gene in different tissues will be quantified by fluorescence quantitative PCR. The results revealed that the transcripts were widely distributed in all the tested tissues. *IFS1* gene showed the higher expression level in the tender organs: root, stem, leaf germinating 7 days than that in the older organs: roots, stems, leaves growing 70 days. Expression level in seeds at 25 days and 45 days post anthesis were also lower, while with higher content in the mature embryo, suggesting that *IFS1* gene has finished the Soybean isoflavone accumulation process in the early embryo formation. Further, the analysis of expression induced by abiotic treatments indicated that the genes were differentially regulated under IAA, ABA, PEG, NaCl, cold and wounding treatments. It will provide more knowledges on isoflavone biosynthesis and resistance to abiotic stress in Soybean.

Key words: Soybean; Isoflavones; Isoflavone synthase; Gene expression

大豆异黄酮是一类具有多种生理活性的酚类次级代谢物,主要存在于豆科植物中,它不仅参与调节植物的生长活动,而且对人体能够发挥有益的生理调节作用。由于它与雌激素有相似结构,因此,大豆异黄酮又称植物雌激素,这些化合物在人类预防或治疗激素相关的疾病方面具有重要作用,是天然的癌症化学预防剂^[1-4]。大豆异黄酮已成为当前国内外食品开发研究中的一个热点,是衡量大豆品质的

重要指标之一。除此之外,大豆异黄酮在防止植物受紫外线伤害、作为植物-微生物间的信号物质、植物防御反应等方面还扮演着天然角色^[5-8]。因此,在豆科和非豆科作物中进行异黄酮遗传改良不仅可以改善食品品质、增加食品营养价值,还可以增强植物的抗逆性,因而具有重要的营养学和农艺学意义^[9]。

异黄酮的合成源自类黄酮生物合成途径中的中间代谢物黄烷酮,而异黄酮合酶(*IFS*)是催化黄烷

收稿日期:2013-04-17

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08004-003);国家“863”项目(2012AA101106)

作者简介:练云(1978-),女,河南永城人,助理研究员,博士,主要从事大豆转基因育种研究。

通讯作者:卢为国(1971-),男,河南伊川人,研究员,博士,硕士生导师,主要从事大豆遗传育种研究。

酮进入异黄酮合成途径的第一步反应酶,因此, *IFS* 是异黄酮生物合成途径中的关键酶之一^[10-11]。鉴定和分离在大豆异黄酮形成途径中具有关键作用的基因,是利用基因工程手段培育高异黄酮含量大豆品种急需解决的关键问题^[12]。本研究分析了 *IFS1* 基因的组织特异性表达及在非生物胁迫诱导下表达的特点,以期为明确大豆异黄酮合成途径中 *IFS* 基因分子调控机制提供理论依据,同时为高异黄酮生物合成及大豆品质改良提供分子依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

所用大豆品种为 Williams 82(*Glycine max* cv. Williams 82)。

1.2 方法

1.2.1 材料培养 把适量的水和蛭石搅拌均匀,分装到小花盆中,每个小花盆中放 4~6 粒种子,再盖上一层蛭石。将小花盆放在托盘中,26~28℃光照培养,适时浇水。对发育 7~10 d 的幼苗进行处理。

1.2.2 材料处理 一部分幼苗移栽至温室,培养至结荚。另一部分幼苗进行胁迫处理,于处理后 2 h, 12 h 取材,每 4 株为一个样本。低温处理:将生长在小花盆中的幼苗直接放在 4℃冰箱中培养;创伤处理:在叶片处用剪刀制造数个 1 cm 左右的伤口后,继续培养;ABA 处理:把发芽盒四周用黑塑料袋封好,在盒子上方盖上一个事先打好孔的泡沫板,装入

1 L 配好的 ABA 溶液(100 μmol/L)。把生长 7 d 的幼苗从蛭石中取出,在流水下轻轻洗掉根上的蛭石,用海绵包住苗子的茎部塞到孔中,在溶液中通入氧气;PEG/NaCl/IAA 处理:方法同 ABA 处理,溶液的浓度分别是 20% PEG、250 mmol/L NaCl、10 μmol/L IAA。

1.2.3 取材标准 将 7 d 的幼苗根上的蛭石用流水轻轻洗掉,分别取根、茎、叶,液氮速冻后, -70℃保存;在温室中生长 70 d 的大豆植株,分别取根、茎、叶,液氮速冻后, -70℃保存;取刚刚露白的花朵 150~200 朵,液氮速冻后, -70℃保存;对刚刚露白的花进行标记,于标记后 25 d 和 45 d,分别取籽粒和豆荚,液氮速冻后, -70℃保存;取刚收获大豆种子的胚 30~50 个,液氮速冻后, -70℃保存;将胁迫处理的幼苗根部冲洗净,吸水纸沾干根部的水,锡箔纸包裹之后,液氮速冻, -70℃保存。

1.2.4 引物设计 根据 GenBank 提供的 *IFS1* 基因序列(AF195818),利用 Primer 5.0 软件设计引物,用于扩增 *IFS1* 基因全长序列; *IFS1* 和 *IFS2* 有较高的同源性,用 DNAMAN 软件将 2 个基因的核苷酸序列进行比对,根据实时荧光定量 PCR 引物设计的原则,设计 *IFS1* 基因特异引物(图 1);选择大豆凝集素(α -lectin)基因作为内标基因,用于在数据分析时对不同样品 cDNA 模板的上样量进行均一化。以上引物均由上海生工生物工程公司合成,序列见表 1。

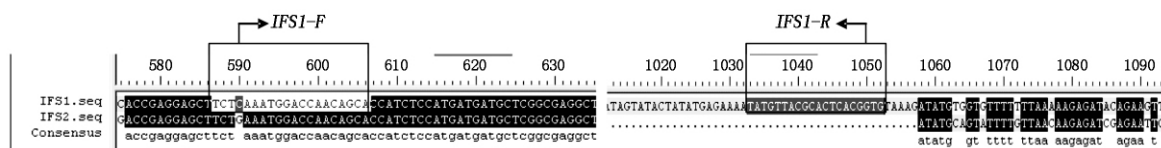


图 1 *IFS1* 基因特异引物的设计位点

Fig. 1 Designing site of *IFS1* specific primers

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因序列 Gene sequence	引物名称 Primer	引物序列 Primer sequences
<i>IFS1</i> 全长序列	IFS1-BgF	5'-AGAAGATCTTCACGATGTTGCTGGA-3'
<i>IFS1</i> full length sequence	IFS1-BaR	5'-CTGGTAACCTATATGATGATTATC-3'
<i>IFS1</i> 特异序列	IFS1-F	5'-TCTCAAATGGACCAACAGCA-3'
<i>IFS1</i> specific sequence	IFS1-R	5'-CACCGTGAGTGCCTAACATA-3'
α -lectin	Lectin-F	5'-CCTCCTCGGGAAGTTACAA-3'
	Lectin-R	5'-GGGCATAGAAGGTGAAGTT-3'

1.2.5 RNA 分离和 cDNA 合成 用 Invitrogen 公司提供的 TRIzol 试剂盒从大豆组织中提取总 RNA,参照 Promega 公司 M-MLV 逆转录酶使用说明,采用 Oligo(dT) 引物将 RNA 反转录成 cDNA,用于 PCR 扩增。

1.2.6 Real-time PCR 扩增体系(20 μL)的组成: Premix Ex TaqTM(Takara) 10 μL, 20 μmol/L 引物各 0.4 μL, 1:10 稀释的 cDNA 模板 5 μL, ddH₂O 4.2 μL。将每个 PCR 反应所需的组分(每个反应重复 3 次)混合后分装于 Real-time 专用 96 孔板中,盖好专

用盖子(高透光率)在 Mastercycler ep realplex PCR 仪(Eppendorf)上进行扩增。扩增程序: 95 °C 2 min; 95 °C 5 s 55 °C 15 s 72 °C 30 s 40 个循环, 之后生成融解曲线。

1.2.7 数据分析 对目的基因相对表达量的计算, 是以看家基因 α -lectin 的表达量作为校正基因, 用 $2^{-\Delta CT}$ 方法分析 *IFS1* 基因在不同组织中的相对表达量; 对目的基因诱导表达量的计算, 是以未进行胁迫处理的样品(7 d 的幼苗)作为校正样品, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分析 *IFS1* 基因在不同胁迫下的表达情况, 差异显著性分析用 SAS 软件进行。

具体计算公式^[13]如下:

目的基因相对表达量 = $2^{-\Delta CT}$, 其中 $\Delta CT = C_{t_{目的基因}} - C_{t_{lectin}}$

目的基因的诱导表达量 = $2^{-\Delta\Delta CT}$, 其中 $\Delta\Delta CT = (C_{t_{目的基因}} - C_{t_{lectin}})_{试验组} - (C_{t_{目的基因}} - C_{t_{lectin}})_{对照}$

1.2.8 *IFS1* 基因的进化分析 依据 GenBank 提供的 *IFS1* 基因序列(AF195818), 用其蛋白序列在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 及 plantgdb(<http://www.plantgdb.org>) 中进行 tBlastN 分析, 最终在其他豆类作物中得到了 21 条 *IFS1* 全长基因序列, 用 DNAMAN 软件对翻译后的蛋白序列进行多序列比对, 并构建进化树。

2 结果与分析

2.1 *IFS1* 基因的进化分析

利用 *IFS1* 基因全长引物, 从大豆 cDNA 中扩增得到了 1.6 kb 片段, 与预期扩增片段大小相符。克隆产物经正反双向测序后, 拼接结果表明, *IFS1* 基因全长 1 612 个碱基, 经 BLAST 分析, 其与已报道的大豆异黄酮合酶基因(AF195818)的核苷酸同源性为 100%。

目前, 在很多作物中已经克隆到了 *IFS1* 基因, 这些基因都含有保守的结构域。根据已知的栽培种大豆(*Glycine max*)、野生种大豆(*Glycine soja*)、豌豆(*Pisum sativum*)、苜蓿(*Medicago sativa*)、扁豆(*Lens culinaris*)、白三叶草(*Trifolium repens*)、毛野豌豆(*Vicia villosa*)、绿豆(*Vigna radiata*)、白羽扇豆(*Lupinus albus*)、黄羽扇豆(*Lupinus luteus*)、甜菜(*Beta vulgaris*)、豇豆(*Vigna unguiculata*)、树锦鸡儿(*Caragana arborescens*)、黄芪(*Astragalus mongholicus*)、甘草(*Glycyrrhiza uralensis*) 等作物的 *IFS1* 基因序列, 将其蛋白序列进行多序列比对, 并构建了一个有根的进化树, 如图 2 所示, 栽培大豆中的 *IFS1* 基因(AF195818)与野生大豆 *IFS1* 基因(FJ483836)的蛋

白序列有较高的同源性, 达 100%。

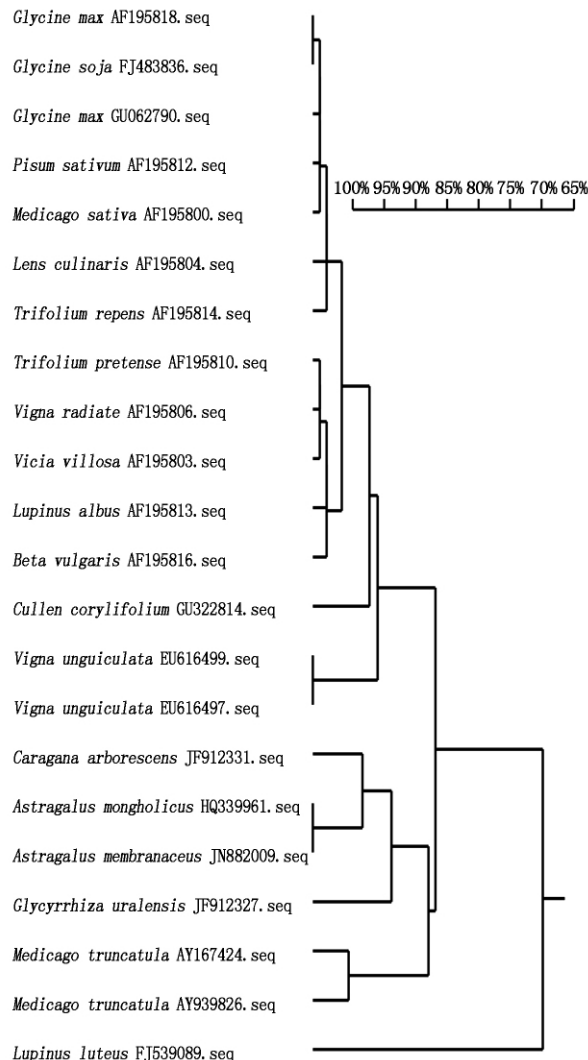
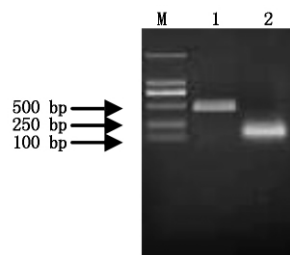


图 2 植物中 *IFS1* 基因家族进化树

Fig.2 Tree-based alignment of the *IFS1* gene families in plants

2.2 Real-time PCR 特异引物的检测

利用 *IFS1* 特异引物 *IFS1*-F/R 对 *IFS1* 基因进行扩增, 得到的基因片段大小为 466 bp; 利用引物 Lectin-F/R 对内参基因进行扩增, 片段大小为 180 bp, 这 2 对引物扩增出的片段大小均与目的条带一致, 且条带单一, 无二聚体(图 3), 因此, 可以利用这 2 对引物进行 Real-time PCR 分析。



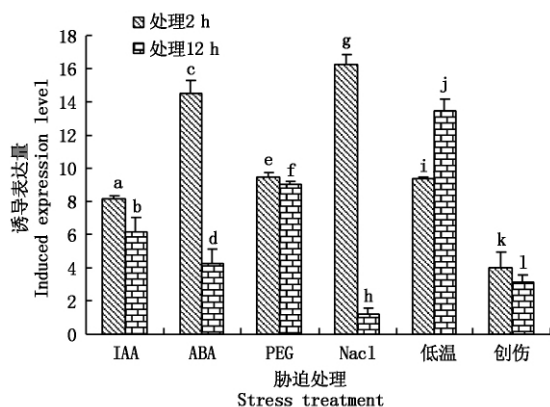
M. DL2000; 1. *IFS1*; 2. lectin.

图 3 *IFS1* 基因和内参基因扩增产物电泳图谱

Fig.3 Electrophoresis of *IFS1* gene and lectin gene amplification product

2.3 *IFS1* 基因非生物胁迫诱导表达分析

为了检测大豆异黄酮合成途径中 *IFS1* 基因与非生物胁迫的相关性,对 7 d 大小的大豆幼苗进行了非生物胁迫处理,通过 Real-time PCR 分析了大豆中 *IFS1* 基因在逆境下的表达情况(图 4)。结果表明,在 IAA、ABA、PEG、NaCl、低温和创伤环境下处理 2 h 时, *IFS1* 基因均上调表达;胁迫继续处理到 12 h 时,除低温处理的材料中 *IFS1* 基因上调表达之外,其他处理中该基因均下调表达,表明 *IFS1* 基因参与了大豆的逆境应答,差异显著性分析表明, *IFS1* 基因的表达量在本试验中所用到的不同处理之间的差异均达到显著水平($P < 0.05$)。



bar. 代表标准差; 不同字母代表差异显著($P < 0.05$)。图 5 同。
Bar means + SD; Different letters mean significant difference ($P < 0.05$). The same as Fig. 5.

图 4 实时荧光定量 PCR 分析 *IFS1* 基因在非生物胁迫处理下的诱导表达量

Fig. 4 Analysis of the expression pattern of *IFS1* gene under various stresses monitored by fluorescence quantitative PCR

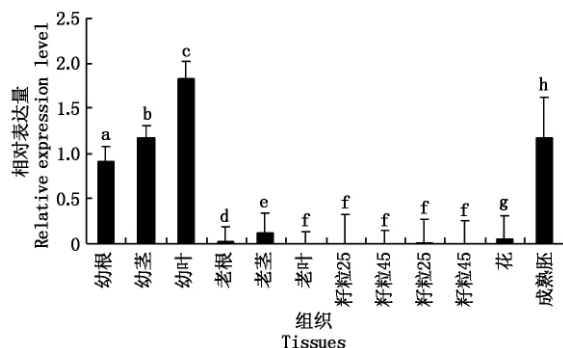


图 5 实时荧光定量 PCR 分析 *IFS1* 基因在大豆不同组织中的相对表达量

Fig. 5 Analysis of the expression pattern of *IFS1* gene in different tissues by fluorescence quantitative PCR

2.4 *IFS1* 基因的组织表达分析

通过荧光定量 PCR 的方法分析了 *IFS1* 基因在大豆不同组织中的表达情况,如图 5 所示。在正常生长条件下, *IFS1* 基因在根、茎、叶、花、籽粒、豆荚和成熟胚中均有表达,其中在萌发 7 d 幼苗的根、

茎、叶中表达量较高,在生长 70 d 植株的根、茎、叶中表达量较低,在开花后 25、45 d 的籽粒和豆荚及花中表达量也较低,在胚中表达量较高,差异显著性分析表明, *IFS1* 基因表达量在发育 7、70 d 的根、茎、叶与花、成熟胚间的差异均达到显著水平($P < 0.05$),而在发育 25、45 d 的籽粒、豆荚与老叶之间的差异不显著。

3 结论与讨论

IFS 基因有 2 个同源基因: *IFS1* 和 *IFS2*,其核苷酸序列有 93% 的同源性,本研究根据序列比对结果,设计了 *IFS1* 基因的特异引物,提取大豆不同发育时期不同组织及不同胁迫处理幼苗中的 RNA,利用实时荧光定量 PCR 的方法对该基因的表达模式进行研究,结果表明,随着大豆的发育, *IFS1* 基因的表达从根、茎、叶向着种子转移,并推测该基因在胚形成早期就已经完成了大豆异黄酮的积聚过程; *IFS1* 基因响应环境刺激,并且对不同的胁迫处理表现出不同的响应。因此, *IFS1* 基因在大豆组织中有复杂的调节表达模式,并参与了大豆的逆境应答。

有生理研究表明,种子是异黄酮的储藏器官^[14],异黄酮积聚主要在种子发育后期^[15-16],在种子萌发过程中,种子释放异黄酮物质,子叶为幼苗提供异黄酮来源^[17]。本研究在大豆幼嫩的组织(发育 7 d 的幼苗根、茎、叶)中检测到了 *IFS1* 基因的大量表达,而在较老的组织(发育 70 d 的豆苗根、茎、叶)中 *IFS1* 基因表达量较低,从而推测大豆异黄酮的积聚在向种子转运,在开花后 25、45 d 的大豆籽粒和豆荚中, *IFS1* 基因表达量均较低,而在成熟胚中, *IFS1* 基因表达量较高,推测异黄酮的积聚在胚形成早期就已完成。因为在开花 25、45 d 时,将胚进行分离检测比较困难,本研究对整个籽粒进行了检测,由于籽粒中胚的体积所占比例尚小,所以表现为 *IFS1* 基因表达量低。因此,在提高异黄酮的大豆改良中,应该注重创造在苗期有利于异黄酮积聚的条件。

有研究表明,提高异黄酮的含量与提高作物抗病能力有直接关联^[18-19],在 *IFS1* 基因中有一些单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphisms, SNPs) 与大豆花叶病毒 SC-3 号株系的抗性位点紧密连锁,推测 *IFS1* 基因在抗病机制中起到作用^[20],本研究在大豆较幼嫩的组织(根、茎、叶)中检测到 *IFS1* 基因的大量表达,这一现象或许与该基因在苗期用于抗性表达有关。从胁迫处理结果看, *IFS1* 基因响应 IAA、ABA、PEG 和创伤处理的应答模式是相似的,处理 2 h 时,大量诱导表达,继续处理到 12 h,

诱导表达量略有降低,在这个时间段中,*IFS1* 基因可能参与并已完成了对这些胁迫的应答过程;在 NaCl 胁迫中处理 2 h 时,*IFS1* 基因表达量上调,继续处理到 12 h 时,几乎不被诱导,推测该基因不参与 NaCl 应答过程,处理 2 h 的大量表达是对外界环境改变做出的正常应激反应;在冷胁迫中处理 2 h 时,*IFS1* 基因大量诱导表达,继续处理到 12 h,诱导表达量进一步增多,说明该基因参与并且还未完成对冷胁迫的应答过程。

总之,提高 *IFS1* 和 *IFS2* 基因表达都有助于种子中异黄酮的积累^[21],开展大豆异黄酮合成途径中 *IFS* 基因分子调控机制研究具有重要意义。

参考文献:

- [1] Watanabe S, Uesugi S, Kikuchi Y. Isoflavones for prevention of cancer, cardiovascular diseases, gynecological problems and possible immune potentiation [J]. *Biomed Pharmacother* 2002, 56(6): 302–312.
- [2] Rochford S, Panozzo J. Phytochemicals for health, the role of pulses [J]. *J Agric Food Chem* 2007, 55(20): 7981–7994.
- [3] Wang Y, Chen S, Yu O. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms [J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011, 91: 949–956.
- [4] 赵 珺, 黄玉珍, 刘冰许. 大豆功能因子对小鼠生理性能的影响 [J]. *河南农业科学* 2010(3): 103–105.
- [5] Kossalak R M, Bohloul B B. Suppression of nodule development of one side of a split-root system of soybeans caused by prior inoculation of the other side [J]. *Plant Physiol* 1984, 75(1): 125–130.
- [6] Zhang J, Subramanian S, Stacey G *et al.* Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti* [J]. *The Plant Journal* 2009, 57(1): 171–183.
- [7] Reid D E, Ferguson B J, Hayashi S, *et al.* Molecular mechanisms controlling legume autoregulation of nodulation [J]. *Ann Bot* 2011, 108(5): 789–795.
- [8] Mortier V, Fenta B A, Martens C *et al.* Search for nodulation-related *CLE* genes in the genome of *Glycine max* [J]. *J Exp Bot* 2011, 62(8): 2571–2583.
- [9] 韩粉霞, 丁安林, 孙君明. 高异黄酮含量大豆新品种中豆 27 的选育及配套栽培技术 [J]. *华北农学报* 2002, 17(增刊): 111–114.
- [10] Jung W, Yu O, Lau S M *et al.* Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes [J]. *Nat Biotechnol*, 2000(18): 208–212.
- [11] Pregelj L, McLanders J R, Gresshoff P M, *et al.* Transcription profiling of the isoflavone phenylpropanoid pathway in soybean in response to *Bradyrhizobium japonicum* inoculation [J]. *Functional Plant Biology*, 2010, 38(1): 13–24.
- [12] 张 卓, 王丕武, 付永平, 等. 大豆查尔酮异构酶基因的克隆及粟酒裂殖酵母表达载体的构建 [J]. *河南农业科学* 2010(11): 23–26.
- [13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-delta delta C(T))} method [J]. *Methods* 2001, 25: 402–408.
- [14] Berger M, Rasolohery C A, Cazalis R, *et al.* Isoflavone accumulation kinetics in soybean seed cotyledons and hypocotyls: Distinct pathways and genetic controls [J]. *Crop Science* 2008, 48(2): 700–708.
- [15] Kim J A, Chung I M. Change in isoflavone concentration of soybean (*Glycine max* L.) seeds at different growth stages [J]. *J Sci Food Agric* 2007, 87(3): 496–503.
- [16] Dhaubhadel S, Gijzen M, Moy P *et al.* Transcriptome analysis reveals a critical role of *CHS7* and *CHS8* genes for isoflavonoid synthesis in soybean seeds [J]. *Plant Physiol* 2007, 143(1): 326–338.
- [17] Graham T L. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates [J]. *Plant Physiol* 1991, 95(2): 594–603.
- [18] Dixon R A. Natural products and plant disease resistance [J]. *Nature* 2001, 411: 843–847.
- [19] Dixon R A, Paiva N L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism [J]. *Plant Cell* 1995, 7: 1085–1097.
- [20] Cheng H, Yang H, Zhang D *et al.* Polymorphisms of soybean isoflavone synthase and flavanone 3-hydroxylase genes are associated with soybean mosaic virus resistance [J]. *Mol Breeding* 2010, 25(1): 13–24.
- [21] Cheng H, Yu O, Yu D Y. Polymorphisms of *IFS1* and *IFS2* gene are associated with isoflavone concentrations in soybean seeds [J]. *Plant Science* 2008, 175: 505–512.