

蒺藜苜蓿膜联蛋白家族基因在非生物胁迫下的表达分析

程婕¹, 徐柳根¹, 邱涛涛¹, 毛涵屹¹, 叶绮文¹, 余萍¹, 周松松¹, 王义华², 宋剑波^{1*}

(1. 江西农业大学生物科学与工程学院, 江西南昌 330045; 2. 江西农业大学理学院, 江西南昌 330045)

摘要 膜联蛋白(Annexin)是一种磷脂结合蛋白,目前有关蒺藜苜蓿膜联蛋白家族的研究较少。对蒺藜苜蓿膜联蛋白家族基因进行了生物信息学分析,确定了膜联蛋白家族基因的数量、结构域和进化关系。对蒺藜苜蓿的幼苗分别进行干旱、盐和冷处理,并利用高通量测序对20个蒺藜苜蓿膜联蛋白基因进行表达分析,结果表明:在干旱胁迫下,3个基因表达下调;在盐胁迫下,5个基因表达下调,4个基因表达上调;在冷胁迫下,3个基因表达下调。其中, *MtANX3* 在各胁迫下均发生了下调。综上所述,非生物胁迫影响了蒺藜苜蓿膜联蛋白家族基因的表达。

关键词 蒺藜苜蓿;膜联蛋白;非生物胁迫;基因表达

中图分类号 S188 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)21-0115-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.21.030



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Expression Analysis of Annexin Family Genes in *Medicago truncatula* under Abiotic Stress

CHENG Jie, XU Liu-gen, QIU Tao-tao et al (College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045)

Abstract Annexin is a phospholipid binding protein. There are few studies on the *Medicago truncatula* annexin family. In this paper, bioinformatics analysis of *M. truncatula* annexin family genes was carried out, and the number, domain and evolutionary relationship of annexin family genes were determined. The *M. truncatula* seedlings were treated with drought, salt and cold stress, and the expression of 20 *M. truncatula* annexin genes was analyzed by high-throughput sequencing. The results showed that under drought stress, 3 genes were down-regulated. Under salt stress, 5 genes were down-regulated and 4 genes were up-regulated. Under cold stress, 3 genes were down-regulated. Among them, *MtANX3* were all down-regulated under various stresses. In summary, abiotic stress affects the expression of *M. truncatula* annexin family genes.

Key words *Medicago truncatula*; Annexin; Abiotic stress; Gene expression

膜联蛋白是在1978年发现的一种Ca²⁺和磷脂结合型蛋白^[1],后续发现其能明显促进依赖Ca²⁺的胞吐作用^[2-3]。膜联蛋白是一种多功能性蛋白,在生物体内分布很广,它可以分布在除酵母菌外的所有真核生物中。而根据生物种类的不同,膜联蛋白可以分为A、B、C、D、E五类。脊椎动物蛋白是A类,无脊椎动物蛋白属于B类,真菌和一些单核细胞生物被归属于C类,D类包含植物膜蛋白,原核生物属于E类^[4]。不同膜联蛋白基因的表达模式以及蛋白质的亚细胞定位具有特异性^[5-7]。

膜联蛋白在生物体内具有许多重要作用,但目前的研究主要集中在动物和植物上。在动物体内,已有研究证明,膜联蛋白具有参与细胞分泌^[8]、生物膜的形成和调节离子通道的作用,还与细胞凋亡等生命活动有关^[9]。目前,有多个研究膜联蛋白在癌症方面作用的内容,如发现在动物体内,膜联蛋白通过纤溶酶原产生纤溶酶,可以促进细胞外基质降解,促进细胞的迁移和肿瘤的侵袭^[10-11]。在植物方面,膜联蛋白基因在植物体生长发育的各个阶段均有表达^[12],也发挥了各种作用:参与细胞分泌、胞吐作用,与Ca²⁺形成离子通道,有一些还具有酶的作用^[13-14]。植物膜联蛋白还参与调控植物代谢和生长发育并可以协同调节抗旱、耐盐等多种抗逆反应^[15-17],在干旱、冷害和高盐等非生物胁迫下,参与调控植

物生命活动,且膜联蛋白的表达调控会因物种的不同而出现差异^[18]。还有研究表明植物膜联蛋白与根毛和花粉的生长发育以及信号转导有关系^[19-20]。

笔者鉴定了蒺藜苜蓿中膜联蛋白家族成员,并对其结构域和进化关系进行分析。最后,通过高通量测序分析了该家族基因在高盐、干旱和冷害胁迫下的表达情况。这一研究初步阐明了蒺藜苜蓿膜联蛋白家族的胁迫表达情况,将有助于在豆科植物中解析膜联蛋白在非生物胁迫下发挥的潜在调节作用,为该家族的基因功能鉴定奠定基础。

1 材料与方法

1.1 苜蓿培养与样品处理 用Hoagland营养液水培苜蓿4周。培养条件:光周期14/10h(日/夜),温度22~24℃,光合有效辐射200 μmol/(m²·s)。分别进行干旱处理(将小苗置于滤纸),盐处理(300 mmol/L NaCl溶液)和冷处理(4℃)0、2、6、12 h。TRIzol法提取样品总RNA,送公司进行高通量测序。

1.2 苜蓿膜联蛋白家族基因鉴定 在PFAM数据库(<http://pfam.xfam.org>)获得蒺藜苜蓿膜联蛋白基因家族的结构域模型(PF00191),利用Hmmer 3.0程序(<http://hmmer.janelia.org/>)进行比对、筛选。将筛选得到的候选基因到PFAM数据库中进行比对,确认最终的膜联蛋白。

1.3 苜蓿膜联蛋白基本信息和结构域分析 在蛋白质的数据库Swiss-Prot(<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=reviewed%3Ayes>)中获得膜联蛋白家族基因的基本信息,包括等电点、氨基酸数、相对分子质量等。从PFAM数据库中获得这20个基因的结构域图谱。

基金项目 江西省教育厅科技计划项目(GJJ170276)。

作者简介 程婕(1994—),女,江西赣州人,硕士研究生,研究方向:生物化学与分子生物学。*通信作者,教授,从事植物分子生物学研究。

收稿日期 2019-11-28;修回日期 2019-12-18

1.4 构建进化树和基因芯片图谱 首先,用 ClustalW 程序对膜联蛋白氨基酸序列进行比对,然后通过 MEGA7 程序,用邻接法(Neighbor-Joining)构建进化树,步长设为 1 000。从苜蓿芯片网站(<https://mtgea.noble.org/v2/index.php>)获得已知芯片信息,用 MeV4.0 做成热图。

2 结果与分析

2.1 蒺藜苜蓿膜联蛋白的基本信息 通过 HMMER 软件在

苜蓿蛋白数据库中比对搜索,然后通过 PFAM 网站确定,共发现了 20 个膜联蛋白。蛋白的氨基酸数分布在 96~320,其中, MtANX14 氨基酸数最少,只有 96 个; MtANX10 最多有 320 个。蛋白的分子量分布在 10.86~36.83 kD,而等电点分布在 4.67~9.43,大部分等电点偏中性,等电点最大的是 MtANX20,最小的是 MtANX1(表 1)。通过 PFAM 搜索发现,这 20 个蛋白质都含有 ANX 结构域,而不含其他结构域。

表 1 蒺藜苜蓿中膜联蛋白基因的基本信息

Table 1 Basic information of annexin gene in *Medicago truncatula*

序号 No.	基因编号 Gene number	登录号 Accession ID	其他结构域 Other domain	预测蛋白 Predicted Protein//aa	分子量 Molecular weight//kD	等电点 pI	染色体 Chromosome
1	MtANX1	Medtr0276s0050.1	Unknown	315	35.74	5.43	
2	MtANX2	Medtr1g033560.1	Unknown	315	35.60	9.43	1
3	MtANX3	Medtr1g112520.1	Unknown	315	35.47	8.95	1
4	MtANX4	Medtr2g031980.1	Unknown	313	35.61	5.74	2
5	MtANX5	Medtr3g018780.1	Unknown	314	36.19	7.83	3
6	MtANX6	Medtr3g018790.1	Unknown	314	35.86	6.47	3
7	MtANX7	Medtr3g018920.1	Unknown	180	20.85	6.76	3
8	MtANX8	Medtr3g018925.1	Unknown	109	12.59	8.59	3
9	MtANX9	Medtr5g063670.1	Unknown	316	36.17	7.14	5
10	MtANX10	Medtr6g028030.1	Unknown	320	36.83	7.61	6
11	MtANX11	Medtr6g071595.1	Unknown	315	35.58	8.94	6
12	MtANX12	Medtr6g071605.1	Unknown	315	35.52	8.76	6
13	MtANX13	Medtr6g071615.1	Unknown	315	35.40	9.05	6
14	MtANX14	Medtr8g038090.1	Unknown	96	10.86	4.67	8
15	MtANX15	Medtr8g038150.1	Unknown	321	36.39	5.66	8
16	MtANX16	Medtr8g038170.1	Unknown	314	36.08	8.64	8
17	MtANX17	Medtr8g038180.1	Unknown	314	36.08	8.80	8
18	MtANX18	Medtr8g038210.1	Unknown	313	35.61	7.84	8
19	MtANX19	Medtr8g038220.1	Unknown	313	35.90	8.80	8
20	MtANX20	Medtr8g107640.1	Unknown	315	35.65	9.25	8

2.2 膜联蛋白的进化树分析 对蒺藜苜蓿膜联蛋白的 20 个基因进行系统分析。用 ClustalW 程序校对得到膜联蛋白的氨基酸序列,使用 MEGA7.0 用 Neighbor-Joining 格式构建进化树(图 1)。从图中可以看出, MtANX5 和 MtANX17, MtANX18 和 MtANX19, MtANX1 和 MtANX9, MtANX3 和 MtANX11, MtANX12 和 MtANX13, 这 5 对蛋白质之间的亲缘关系很近。

2.3 膜联蛋白家族基因在非生物胁迫下的差异性表达 为了探明膜联蛋白基因在非生物胁迫下的表达,分别对幼苗进行干旱处理,盐处理和冷处理 0、2、6、12 h,提取总 RNA,进行高通量测序。将胁迫处理与非处理的样品进行比较,如果不同胁迫处理时间点的表达变化一致,并且至少有一个满足条件 $|\log_2 N| > 1$,就把它定义为差异表达基因。结果显示: MtANX4、MtANX9、MtANX15 和 MtANX16 在盐胁迫中上调(表 3); MtANX3、MtANX5 和 MtANX10 在干旱胁迫中下调(表 2); MtANX1、MtANX3、MtANX5、MtANX13 和 MtANX18 在盐胁迫中下调(表 3); MtANX3、MtANX7 和 MtANX19 在低温胁迫中下调(表 4)。

2.4 膜联蛋白基因组织表达分析 为了分析苜蓿中膜联蛋白基因组织表达,从已知芯片数据库中下载数据,利用

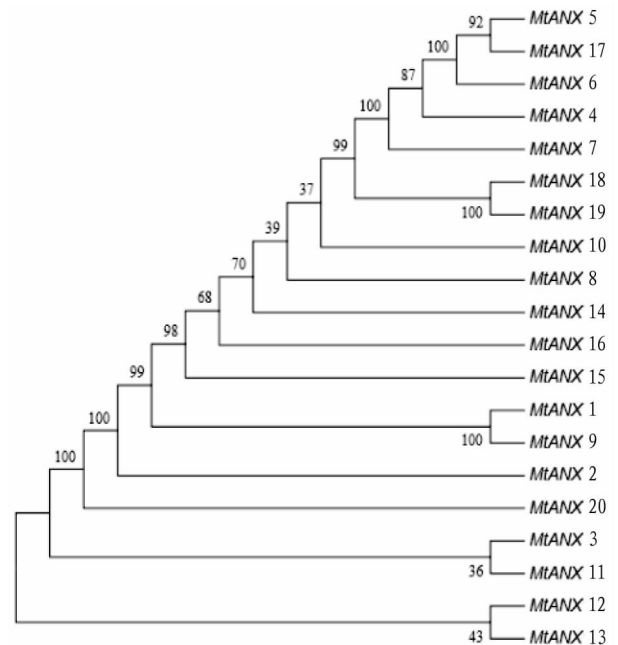


图 1 蒺藜苜蓿中膜联蛋白基因进化树分析

Fig. 1 Phylogenetic tree analysis of annexin gene in *Medicago truncatula*

Mev4.0 构建热图。结果显示:*MtANX14* 和 *MtANX17* 在植物体各部分的表达都较低,*MtANX5*、*MtANX18*、*MtANX19* 和 *MtANX20* 在植物的根和种子中表达较高,*MtANX9* 在各组织

中表达都较高。*MtANX6*、*MtANX7*、*MtANX18*、*MtANX19* 和 *MtANX20* 在根瘤中表达较高,而 *MtANX14* 和 *MtANX17* 在根瘤中表达很低(图 2)。

表 2 蒺藜苜蓿膜联蛋白基因在干旱胁迫下差异性基因表达

Table 2 Differential gene expression of annexin gene of *Medicago truncatula* under drought stress

基因编号 Gene number	干旱-0 Drought-0	干旱-2 Drought-2	干旱-6 Drought-6	干旱-12 Drought-12	$\log_2(\text{Drought-2/}$ $\text{Drought-0})$	$\log_2(\text{Drought-6/}$ $\text{Drought-0})$	$\log_2(\text{Drought-12/}$ $\text{Drought-0})$
<i>MtANX1</i>	2 721	2 526	1 884	1 464	-0.27	-0.32	-0.27
<i>MtANX3</i>	9	5	2	0	-0.86	-1.58	-3.25
<i>MtANX4</i>	1	0	2	2	-0.96	0.71	1.01
<i>MtANX5</i>	170	104	65	78	-0.86	-1.16	-0.50
<i>MtANX6</i>	86	90	46	77	-0.09	-0.68	0.46
<i>MtANX9</i>	2 772	2 793	1 065	1 061	-0.15	2.15	2.56
<i>MtANX10</i>	90	88	60	27	-0.19	-0.37	-1.09
<i>MtANX11</i>	1 047	1 154	869	664	-0.02	-0.06	-0.03
<i>MtANX13</i>	137	162	47	63	0.08	-1.32	-0.49
<i>MtANX15</i>	69	100	65	63	0.37	0.12	0.49
<i>MtANX16</i>	125	215	134	65	0.62	0.31	-0.32
<i>MtANX18</i>	369	638	208	601	0.63	-0.61	1.32
<i>MtANX19</i>	147	85	86	69	-0.94	-0.56	-0.46
<i>MtANX20</i>	604	896	1 250	473	-0.04	0.90	1.79

表 3 蒺藜苜蓿膜联蛋白基因在盐胁迫下差异性基因表达

Table 3 Differential gene expression of annexin gene of *Medicago truncatula* under salt stress

基因编号 Gene number	盐-0 Salt-0	盐-2 Salt-2	盐-6 Salt-6	盐-12 Salt-12	$\log_2(\text{Salt-}$ $2/\text{Salt-0})$	$\log_2(\text{Salt-}$ $6/\text{Salt-0})$	$\log_2(\text{Salt-}$ $12/\text{Salt-0})$
<i>MtANX1</i>	2 257	2 890	2 433	939	-0.17	-0.41	-1.01
<i>MtANX3</i>	7	6	4	1	-0.64	-1.10	-1.91
<i>MtANX4</i>	0	4	6	5	2.03	2.50	2.94
<i>MtANX5</i>	132	133	89	35	-0.51	-1.08	-1.64
<i>MtANX6</i>	77	76	97	51	-0.54	-0.18	-0.33
<i>MtANX9</i>	2 540	6 351	12 989	7 596	0.79	1.84	1.84
<i>MtANX10</i>	97	127	200	189	-0.14	0.52	1.21
<i>MtANX11</i>	822	1 246	1 055	487	0.07	-0.16	-0.50
<i>MtANX13</i>	124	118	61	47	-0.60	-1.52	-1.13
<i>MtANX15</i>	42	201	91	52	1.71	0.59	0.55
<i>MtANX16</i>	83	273	139	78	1.18	0.22	0.17
<i>MtANX18</i>	279	192	254	204	-1.06	-0.65	-0.19
<i>MtANX19</i>	94	130	122	86	-0.06	-0.14	0.13
<i>MtANX20</i>	473	673	1 088	732	-0.02	0.68	0.89

表 4 蒺藜苜蓿膜联蛋白基因在冷害胁迫下差异性基因表达

Table 4 Differential gene expression of annexin gene of *Medicago truncatula* under cold stress

基因编号 Gene number	冷-0 Cold-0	冷-2 Cold-2	冷-6 Cold-6	冷-12 Cold-12	$\log_2(\text{Cold-}$ $2/\text{Cold-0})$	$\log_2(\text{Cold-}$ $6/\text{Cold-0})$	$\log_2(\text{Cold-}$ $12/\text{Cold-0})$
<i>MtANX1</i>	2 520	2 640	2 917	1 216	-0.35	-0.41	-0.61
<i>MtANX3</i>	11	5	10	4	-1.34	-0.68	-0.91
<i>MtANX4</i>	1	2	0	1	0.33	-1.02	0.24
<i>MtANX5</i>	149	152	157	81	-0.39	-0.55	-0.44
<i>MtANX6</i>	89	112	128	52	-0.04	-0.05	-0.28
<i>MtANX7</i>	1	0	0	0	-1.02	-1.02	-1.02
<i>MtANX9</i>	2 618	3 056	4 244	2 111	-0.19	0.07	0.13
<i>MtANX10</i>	102	132	173	185	-0.05	0.14	1.29
<i>MtANX11</i>	936	1 177	1 722	809	-0.09	0.25	0.23
<i>MtANX13</i>	144	154	151	79	-0.32	-0.55	-0.42
<i>MtANX15</i>	64	110	105	18	0.36	0.09	-1.36
<i>MtANX16</i>	89	124	100	51	0.06	-0.45	-0.36
<i>MtANX18</i>	339	368	344	306	-0.30	-0.60	0.29
<i>MtANX19</i>	108	124	132	38	-0.22	-0.33	-1.05
<i>MtANX20</i>	495	623	574	319	-0.09	-0.41	-0.19

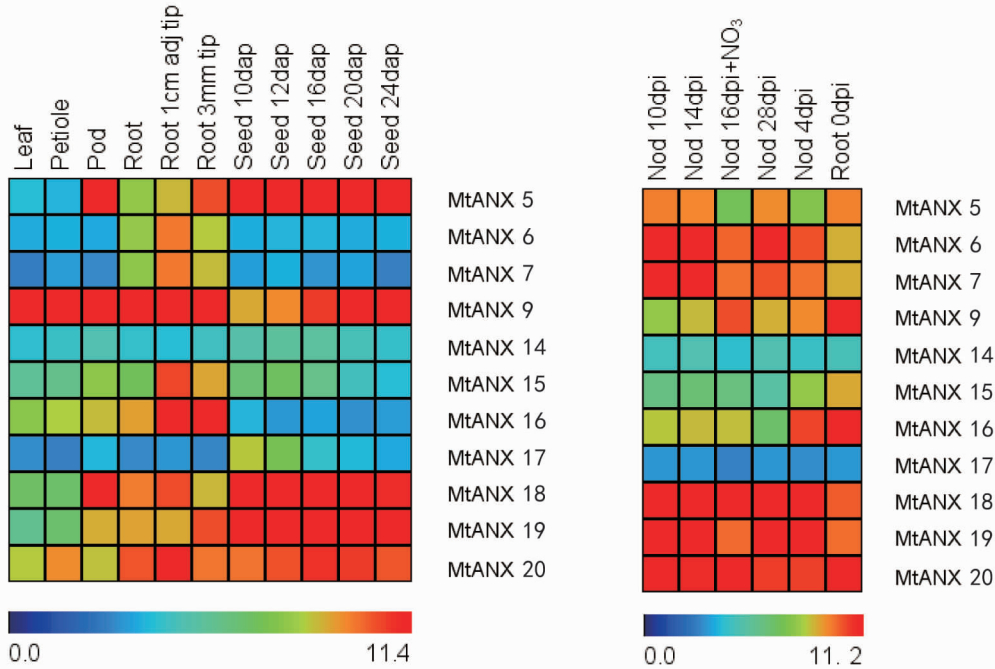


图2 蒺藜苜蓿膜联蛋白的组织表达

Fig. 2 Tissue expression of annexin from *Medicago truncatula*

3 讨论与展望

通过生物信息分析,首次鉴定了20个蒺藜苜蓿膜联蛋白。这20个蛋白的基本信息显示大部分蛋白的氨基酸数为300多个,并且等电点偏中性。这些特征可能与膜联蛋白发挥的细胞分泌、胞吐作用、与 Ca^{2+} 形成离子通道等功能相关。通过结构域分析,发现这个家族蛋白的结构域非常单一,只有ANX结构域。这一结果说明该家族蛋白可能在功能上比较保守。通过进化树分析,发现这20个膜联蛋白有5组亲缘关系非常相近,这说明可能膜联蛋白存在着功能的冗余。

进一步通过高通量测序发现这些蛋白基因中有很多受到非生物胁迫的调控。在干旱胁迫下,3个基因表达下调;在盐胁迫下,5个基因表达下调,4个基因表达上调;在冷胁迫下,3个基因表达下调。其中,*MtANX3*在各胁迫下均发生了下调。说明非生物胁迫对膜联蛋白家族基因的表达有影响。

首次在豆科模式植物苜蓿膜中鉴定了膜联蛋白家族基因。这一研究将有助于进一步在豆科植物中阐明膜联蛋白在非生物胁迫下发挥的潜在的调节功能。

参考文献

- [1] 王立科,张边江,唐宁,等. 植物膜联蛋白基因研究进展[J]. 分子植物育种,2016,14(8):2060-2065.
- [2] CARROLL A D, MOYEN C, VAN KESTEREN P, et al. Ca^{2+} , annexins, and GTP modulate exocytosis from maize root cap protoplasts[J]. The plant cell, 1998, 10(8): 1267-1276.
- [3] 张娜,尚忠林. 植物细胞中的膜联蛋白(annexin)[J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(3): 277-283.
- [4] 钱学磊,韩志颖,刘瑞齐,等. 膜联蛋白:植物生长过程中的多功能复合体[J]. 广西植物, 2013, 33(5): 703-709.
- [5] 褚翠萍,任秋萍,孔兰静,等. 拟南芥膜联蛋白2的亚细胞定位研究[J]. 中国细胞生物学学报, 2017, 39(7): 873-880.
- [6] HUH S M, NOH E K, KIM H G, et al. Arabidopsis annexins AnnAt1 and

- AnnAt4 interact with each other and regulate drought and salt stress responses[J]. Plant and cell physiology, 2010, 51(9): 1499-1514.
- [7] CARLETTI P, MASI A, SPOLAORE B, et al. Protein expression changes in maize roots in response to humic substances[J]. Journal of chemical ecology, 2008, 34(6): 804-818.
- [8] SRIVASTAVA M, ZHANG-KECK Z Y, CAO HUY H, et al. Novel isoforms of synexin in *Xenopus laevis*: Multiple tandem PGQM repeats distinguish mRNAs in specific adult tissues and embryonic stages[J]. Biochemical journal, 1996, 316(3): 729-735.
- [9] 黄逸群,左开井. 膜联蛋白的功能与调控研究进展[J]. 生物技术进展, 2012, 2(3): 157-164.
- [10] TAKAHASHI H, KATSUTA E, YAN L, et al. High expression of Annexin A2 is associated with DNA repair, metabolic alteration, and worse survival in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Surgery, 2019, 166(2): 150-156.
- [11] YU S Y, BIAN H L, GAO X, et al. Annexin A9 promotes invasion and metastasis of colorectal cancer and predicts poor prognosis[J]. International journal of molecular medicine, 2018, 41: 2185-2192.
- [12] 王慧敏,李新国,万书波,等. 花生膜联蛋白基因家族成员的结构和表达分析[J]. 作物学报, 2019, 45(3): 390-400.
- [13] KONOPKA-POSTUPOWSKA D, CLARK G, HOFMANN A. Structure, function and membrane interactions of plant annexins: An update[J]. Plant science, 2011, 181(3): 230-241.
- [14] 李瑞梅,王雨晴,张帆,等. 植物膜联蛋白(Annexin)的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(5): 2128-2136.
- [15] 何美敬,穆国俊,侯名语,等. 植物膜联蛋白的结构及功能研究进展[J]. 西北植物学报, 2013, 33(12): 2567-2574.
- [16] 却志群,於紫蕾,沈春修. 水稻膜联蛋白基因 OsAnn8 干旱和低温条件下表达模式以及 CRISPR/Cas9 定点编辑[J]. 华北农学报, 2019, 34(1): 54-60.
- [17] 丁红,戴良香,秦斐斐,等. 花生膜联蛋白基因 *AhAnn1* 的克隆与表达分析[J]. 华北农学报, 2017, 32(3): 21-26.
- [18] 王希,李勇,朱延明,等. 野生大豆胁迫应答膜联蛋白基因的克隆及胁迫耐性分析[J]. 作物学报, 2010, 36(10): 1666-1673.
- [19] 巩子英,宋雪,陈功友,等. 苜蓿膜联蛋白 *MtAnn3* 基因的鉴定及其在根毛发育中的功能[J]. 科学通报, 2012, 57(6): 431-437.
- [20] ZHU J E, YUAN S J, WEI G, et al. Annexin5 is essential for pollen development in *Arabidopsis*[J]. Molecular plant, 2014, 7(4): 751-754.