

• 农业生物技术 •

# 野生大豆肌醇磷酸水解酶 Gs5PTase8 的原核表达纯化及活性鉴定

陈媛<sup>1</sup>, 范寒雨<sup>1</sup>, 刘雨杭<sup>1</sup>, 梁康迳<sup>1</sup>, 林文雄<sup>2</sup>, 贾琪<sup>1\*</sup>

1 福建农林大学 农学院 作物遗传育种与综合利用教育部重点实验室, 福建 福州 350002

2 福建农林大学 作物生态与分子生理学福建省高校重点实验室, 福建 福州 350002

陈媛, 范寒雨, 刘雨杭, 梁康迳, 林文雄, 贾琪. 野生大豆肌醇磷酸水解酶 Gs5PTase8 的原核表达纯化及活性鉴定[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3588-3602.

CHEN Yuan, FAN Hanyu, LIU Yuhang, LIANG Kangjing, LIN Wenxiong, JIA Qi. Prokaryotic expression, purification, and activity of the inositol polyphosphate 5-phosphatase Gs5PTase8 from wild soybean[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3588-3602.

**摘要:** 多磷酸肌醇-5-磷酸酶(inositol polyphosphate 5-phosphatase, 5PTase)是肌醇信号传导途径中的关键酶, 能水解肌醇磷酸(inositol phosphate, IP)或磷脂酰肌醇磷酸(phosphatidylinositol phosphates, PIP)的肌醇环 5-磷酸。然而, 大豆中该类基因研究较少。本研究从野生大豆(*Glycine soja* S. & Z.)中克隆出耐盐基因 *Gs5PTase8* 并对其底物进行探究。*Gs5PTase8* 编码 493 个氨基酸。经序列比对与系统进化树分析, 发现其在植物中具有保守性。利用实时荧光定量 PCR 对不同大豆组织分析该基因的表达, 发现 *Gs5PTase8* 主要在大豆根中表达。为了探究其水解底物, 分别构建了大肠杆菌表达载体 pET28a-*Gs5PTase8* 和 pGEX4T1-*Gs5PTase8*, 但只成功诱导表达了 GST-*Gs5PTase8* 重组蛋白。使用不同浓度异丙基 β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG), 分别在 16、30、37 °C 条件下进行诱导表达条件优化, 发现重组蛋白在 16 °C、0.2 mmol/L IPTG 过夜诱导时表达量最高。SDS-PAGE 检测重组蛋白的相对分子量约为 75 kDa, 经纯化后条带单一, 纯度达 95%以上, 二辛可酸法(bicinchoninic acid assay, BCA)检测出重组蛋白的得率为 4.9 mg/L。体外底物酶活检测表明, *Gs5PTase8* 蛋白可以水解 IP<sub>3</sub> [inositol(1,4,5)trisphosphate]、IP<sub>4</sub> [inositol(1,3,4,5)tetrakisphosphate]、PI(4,5)P<sub>2</sub> [phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate]和 PI(3,4,5)P<sub>3</sub> [phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphate], 本研究为进一步探索 *Gs5PTase8* 参与耐盐的分子作用机制提供了科学依据。

**关键词:** 大豆; *Gs5PTase8*; 原核表达; 蛋白纯化

资助项目: 国家自然科学基金面上项目(32372061); 福建农林大学创新基金(CXZX2019029G)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32372061) and the Science Grant for Innovation of Fujian Agriculture and Forestry University (FAFU) (CXZX2019029G).

\*Corresponding author. E-mail: jiaqi@fafu.edu.cn

Received: 2024-01-30; Accepted: 2024-05-10; Published online: 2024-05-14

# Prokaryotic expression, purification, and activity of the inositol polyphosphate 5-phosphatase Gs5PTase8 from wild soybean

CHEN Yuan<sup>1</sup>, FAN Hanyu<sup>1</sup>, LIU Yuhang<sup>1</sup>, LIANG Kangjing<sup>1</sup>, LIN Wenxiong<sup>2</sup>, JIA Qi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Ministry of Education for Genetics, Breeding and Multiple Utilization of Crops, College of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Crop Ecology and Molecular Physiology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

**Abstract:** Inositol polyphosphate-5-phosphatase (5PTase) is a key enzyme in the inositol signaling pathway. It hydrolyzes the 5-phosphate on the inositol ring of inositol phosphate (IP) or phosphatidylinositol phosphate (PIP). However, there is limited reports on the homologous genes in soybean. This study cloned the salt tolerant gene *Gs5PTase8* from wild soybean (*Glycine soja* S. & Z.) and explored its substrate. *Gs5PTase8* encodes 493 amino acid residues. The sequence alignment and phylogenetic tree showed that this gene was conserved in plants. RT-qPCR was employed to determine the expression of *Gs5PTase8* in different tissues of soybean and the results showed that *Gs5PTase8* was mainly expressed in soybean roots. To investigate the hydrolytic substrates, we constructed pET28a-*Gs5PTase8* and pGEX4T1-*Gs5PTase8* for the *Escherichia coli* expression system and only obtained the recombinant protein GST-Gs5PTase8. The induction conditions for the protein expression including the isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) concentration and temperature (16 °C, 30 °C, and 37 °C) were optimized. The expression level was highest when the expression was induced overnight with 0.2 mmol/L IPTG at 16 °C. The SDS-PAGE results showed that the recombinant protein had a relative molecular weight of 75 kDa and presented a single band after purification, with the purity reaching over 95%. The yield of the recombinant protein determined by the BCA method was 4.9 mg/L LB. The hydrolytic substrates of this enzyme *in vitro* included IP<sub>3</sub> [inositol(1,4,5)trisphosphate], IP<sub>4</sub> [inositol(1,3,4,5)tetrakisphosphate], PI(4,5)P<sub>2</sub> [phosphatidylinositol(4,5) biphosphate] and PI(3,4,5)P<sub>3</sub> [phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphate]. This study provides a scientific basis for further research on the molecular mechanism of Gs5PTase8 involved in salt tolerance.

**Keywords:** soybean; Gs5PTase8; prokaryotic expression; protein purification

栽培大豆(*Glycine max* L.)是重要的粮油作物,为全世界提供植物源的食用油和蛋白质,大豆产量受到干旱、盐胁迫等多种非生物胁迫的威胁,其中盐胁迫是造成大豆产量和品质下降的主要胁迫之一<sup>[1]</sup>。发掘新大豆耐盐基因,探

究其功能及作用机制对提高大豆耐盐育种有重要意义。野生大豆(*Glycine soja* S. & Z.)是栽培大豆的近源祖先种,对环境适应性强,具有较好的抗逆性且可与栽培大豆种间杂交,可为栽培大豆的遗传改良提供丰富的基因库<sup>[2-4]</sup>。对位

于大豆 3 号染色体上主要的耐盐数量性状座位 (quantitative trait locus, QTL) 位点展开研究<sup>[5-7]</sup>, 通过对大豆耐盐转录组数据的分析<sup>[8]</sup>, 并经基因表达验证, 在该耐盐位点中, 发掘出一个受盐胁迫高诱导的多磷酸肌醇-5-磷酸酶 (inositol polyphosphate 5-phosphatase, 5PTase) 基因, 命名为 *Gs5PTase8*, 功能鉴定表明其为大豆耐盐正调节基因<sup>[9]</sup>。

5PTase 是植物中肌醇磷酸水解酶家族中最大的一类, 为肌醇信号传导途径中的关键酶, 含有多磷酸肌醇磷酸水解酶催化保守区 (inositol polyphosphate phosphatase catalytic, IPPc), 能水解肌醇磷酸 (inositol phosphate, IP) 和磷脂酰肌醇磷酸 (phosphatidylinositol phosphates, PIP) 底物的 5-磷酸<sup>[10]</sup>。根据其水解底物的不同可以分成 4 类: I 类只水解水溶性的肌醇多磷酸, 如 IP<sub>3</sub> [inositol(1,4,5)trisphosphate, Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>] 和 IP<sub>4</sub> [inositol(1,3,4,5)tetrakisphosphate, Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>]; II 类能水解水溶性的肌醇多磷酸和脂溶性的膜结合磷脂酰肌醇磷酸, 如 PI(4,5)P<sub>2</sub> [phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>] 和 PI(3,4,5)P<sub>3</sub> [phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphate, PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>]; III 类水解含 3-磷酸的 IP<sub>4</sub> 和 PI(3,4,5)P<sub>3</sub>; IV 类只水解脂溶性的磷脂酰肌醇磷酸<sup>[11]</sup>。

多磷酸肌醇类物质在真核生物体中广泛存在, 参与众多细胞生物学进程, 如磷脂酰肌醇信号传导、IP<sub>3</sub> 信号通路、囊泡运输、肌动蛋白组装等, 在植物中还可参与调节生长发育和抗逆反应等<sup>[12-16]</sup>。调控多磷酸肌醇磷酸水平的水解酶如 5PTase, 常在这些生命进程调节中起到重要作用<sup>[17-18]</sup>。植物 5PTase 的研究主要集中在拟南芥中。*At5PTase1* 和 *At5PTase2* 是 II 类 5PTase 酶, 可以水解 IP<sub>3</sub>、IP<sub>4</sub> 和 PI(4,5)P<sub>2</sub> 的 5'-磷酸, 参与苗期发育、气孔开闭、脱落酸 (abscisic acid, ABA)

和光信号传导的调节<sup>[19-21]</sup>。*At5PTase14* 和 *At5PTase15* 也同属于 II 类 5PTase 酶, *At5PTase15* 参与了细胞壁合成和肌动蛋白组装<sup>[22]</sup>。*At5PTase6/CVP2* (cotyledon vascular pattern 2) 和 *At5PTase7/CVP1* 为 IV 类 5PTase 酶, 只水解膜结合的磷脂酰肌醇的 5'-磷酸, 参与叶脉形成和根的分枝<sup>[23-24]</sup>。同属于 IV 类 5PTase 酶的 *At5PTase9* 和 *At5PTase7* 介导活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 信号参与耐盐调控<sup>[25-26]</sup>。*At5PTase11* 亦为 IV 类 *At5PTase* 酶, 参与调节苗期发育<sup>[27]</sup>。*At5PTase12* 和 *At5PTase13* 为 I 类 5PTase 酶, *At5PTase12* 参与花粉休眠和发芽调节, *At5PTase13* 参与调节子叶叶脉发育、根向地性、囊泡运输及生长素和 ABA 激素信号转导等<sup>[28-29]</sup>。然而, 仍有 33.3% 的拟南芥 5PTase 酶的功能及作用机制尚不清楚。其他植物如大豆等的 5PTase 酶则所知甚少。

明确肌醇磷酸水解酶的作用底物有助于解析该类酶的分子作用机制。为了从生物化学层面解析多磷酸肌醇-5-磷酸酶 5PTases 的水解底物特性, 需在体外融合表达纯化该活性蛋白。在以往报道中, 对动植物 5PTases 大多采用真核表达系统, 即昆虫表达系统果蝇 (*Drosophila*) S2 细胞和酵母表达系统, 添加 His-tag、FLAG-tag 或 GST-tag 等来进行表达纯化调控<sup>[10,22-23,25,30]</sup>。对植物 5PTases 进行大肠杆菌融合表达系统进行纯化的尝试并不多, Sanchez 等<sup>[21]</sup>利用 pET-28a 系统, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 诱导表达带 His-tag 标签的融合蛋白, 通过镍亲和柱层析成功纯化得到了 *AtIP5PII* (即 *At5PTase2*)。而林文慧<sup>[31]</sup>在大肠杆菌中采用 pET32a 系统, 进行 *At5PTase13* 蛋白与 His-tag 融合表达, 可能由于 *At5PTase13* 蛋白太大不稳定, 只能获得其催化域的融合蛋白。相较于真核表达系统, 原核表达系统较为简单易行。为了进一步探究本课题组发掘出的大豆耐盐基因 *Gs5PTase8* 的作用机制, 本

研究分别利用大肠杆菌原核诱导表达系统, 采用 His-tag 和 GST-tag 标签融合表达 Gs5PTase8 蛋白, 优化其诱导表达条件, 并初步检测其作用底物, 明确酶的分类, 为后续研究 Gs5PTase8 参与大豆耐盐反应提供生化理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

栽培大豆 C08 ‘Union’、野生大豆 W05 ‘Mengjin1’为香港中文大学林汉明教授课题组惠赠, 栽培大豆 Williams82 为中国农业科学院作物科学研究所傅永福研究员课题组惠赠; 大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、中间载体 pBluescript KS (+/-) Phagemids、原核表达载体 pET-28a(+) (卡那霉素抗性)及 pGEX-4T-1 (氨苄霉素抗性)均为本实验室保存; 限制性核酸内切酶 FastDigest *Xba* I、*Bam*H I、*Xho* I 和 Phusion<sup>®</sup>热启动 II 高保真 DNA 聚合酶购自赛默飞世尔科技公司; 卡那霉素(kanamycin, Kan)和氨苄青霉素(ampicillin, Amp)购自北京索莱宝科技有限公司; 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside, IPTG)、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、质粒提取和胶回收试剂盒等购自生工生物工程(上海)股份有限公司; RNAiso Plus (Total RNA 提取试剂)、PrimeScript<sup>™</sup> RT Reagent with gDNA Eraser (Perfect Real Time)逆转录试剂盒、SYBR<sup>®</sup> Premix *Ex Taq*<sup>™</sup> II (Tli RNaseH Plus)实时荧光定量 RT-qPCR 试剂盒和 DNA Ligation Kit ver.2.1 连接试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司; 高亲和力 GST 纯化介质 GST 融合蛋白纯化试剂盒购自金斯瑞生物科技股份有限公司; 预染蛋白质分子量标准物(10–180 kDa)购自北京百奥莱博科技有限公司; 5 $\times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒和

BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)购自上海翊圣生物科技有限公司; 蛋白酶抑制剂苯甲磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; IP<sub>3</sub>、IP<sub>4</sub>、PI(4,5)P<sub>2</sub> diC<sub>8</sub> 和 PI(3,4,5)P<sub>3</sub> diC<sub>8</sub> 购自 Echelon Biosciences Incorporated。

### 1.2 基因克隆、序列比对及组织表达分析

从 Phytozome 13 在线数据库网站 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)提供的大豆注释基因组 *G. max* Williams82.a2.v1 中提取大豆 5PTase8 基因序列信息, 根据其转录序列, 借助 NCBI 网站的在线工具 Primer-BLAST ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=Blast\\_Home](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=Blast_Home)), 设计引物 InoF 和 InoR, 引物序列信息见表 1。

液氮研磨盐胁迫后的栽培大豆(Williams82 和 C08)和野生大豆(W05)的根, 根据试剂盒操作指南, 采用 RNAiso Plus (Total RNA 提取试剂)分别提取总 RNA, 逆转录成 cDNA, 5 倍稀释后当作模板, 由 Phusion<sup>®</sup>热启动 II 高保真 DNA 聚合酶 PCR 扩增 5PTase8 基因片段, 为了连入载体, 引物的末端添加了对应的 *Xba* I 和 *Xho* I 限制内切酶位点。PCR 扩增反应程序为: 98 °C 预变性 30 s; 98 °C 变性 10 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 8 min。1%琼脂糖凝胶检测产物条带大小, 割胶回收获得扩增 5PTase8 基因目标片段的 PCR 产物。将 PCR 产物和中间载体 pBluescript KS (+/-) Phagemids 分别经 *Xba* I 和 *Xho* I 双酶切后, 将 5PTase8 目标片段连入 pBluescript KS (+/-) Phagemids, 热激法转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 37 °C Amp 抗性 LB 板涂布过夜培养, 筛选阳性单克隆, 并经菌落 PCR 验证后, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 通过 BLASTP 在线工具进行序列比对。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Name	Sequences (5'→3')	Usage
InoF	CCTCTAGACAATGCCGTTGACTCACGTT	<i>5PTase8</i> (Cloning, with <i>Xba</i> I)
InoR	GGCTCGAGCCGCGAGCTACGGTTACTT	<i>5PTase8</i> (Cloning, with <i>Xho</i> I)
QJ109F	CCTCTAGAATGAGAACAGAATCAAAGAAG	<i>5PTase8</i> (Cloning, with <i>Xba</i> I)
QJ110R	GGCTCGAGAAACCTAGGTATGGTGTCTATG	<i>5PTase8</i> (Cloning, with <i>Xho</i> I, no stop codon)
QJ204F	CTGGATCCATGAGAACAGAATCAAAGAAG	<i>5PTase8</i> (Cloning, with <i>Bam</i> H I)
QJ205R	GGCTCGAGTCAAACCTAGGTATGGTGT	<i>5PTase8</i> (Cloning, with <i>Xho</i> I)
QJ101F	CCACTATGTTGCCCAATCCT	<i>5PTase8</i> (qRT-PCR)
QJ102R	ACATCTGATTCAGGCCTTCC	
ELF1bF	CCACTGCTGAAGAAGATGATGATG	<i>ELF1b</i> (qRT-PCR)
ELF1bR	AAGGACAGAAGACTTGCCACTC	

F: Forward primer; R: Reverse primer. The underlined sequences are the recognized sites for the responding restriction enzymes.

将获得的大豆 *5PTase8* 序列在 Phytozome 13 在线数据库网站(<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)并利用 BLAST 在线工具(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行同源性蛋白序列搜索,对双子叶植物同源蛋白的% identity 阈值为 50%,对单子叶植物同源蛋白的% identity 阈值为 43%,每种植物选取最相近的同源序列,*E-value* 均小于 0.05。再以选中的蛋白为查询序列 BLAST 出大豆中的同源蛋白,验证结论的可靠性。将同源蛋白用 CLUSTAL 软件进行序列比对,用 MEGA 11 软件邻接法(neighbor-joining method)将自展值(bootstrap value)设为 1 000 构建分子系统发育树<sup>[32-33]</sup>。

采用上述方法,分别提取大豆根、茎、叶、花、果荚的总 RNA,逆转录成 cDNA。以大豆 *ELF1b* 基因为内参基因<sup>[34]</sup>,按试剂盒说明书,使用 Bio-Rad 荧光定量 PCR 仪 CFX96 Touch™ Real-Time Detection System (Bio-Rad Laboratories)进行实时荧光定量 PCR 检测及半定量 RT-PCR 检测。每个样品包含 3 次生物学重复,每个生物学重复含 3 个技术重复,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算相对表达量<sup>[35]</sup>。

### 1.3 原核表达载体的构建及转化

为了构建 *Gs5PTase8* 基因的原核表达载

体,在引物的末端添加了相应的限制内切酶位点。本研究尝试了 2 种原核表达系统 pET-28a(+)(Kan 抗性)和 pGEX-4T-1 (Amp 抗性)。采用 QJ109F/QJ110R 或 QJ204F/QJ205R 引物对,以进行上述的 PCR 程序扩增 *Gs5PTase8* 基因片段,使其末端分别带上可酶切接入 pET-28a(+)*Xba* I 和 *Xho* I 酶切位点或连入 pGEX-4T-1 的 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点。分别将 PCR 扩增的 *Gs5PTase8* 基因目标片段和空载体用相应的酶切后,经 1%琼脂糖凝胶检测,切胶回收,利用 DNA Ligation Kit Ver.2.1 连接试剂盒,将目标片段与对应原核表达空载体连接,分别转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,经过抗性板筛选(50 mg/L Kan 或 100 mg/L Amp)阳性单克隆,经菌落 PCR 验证后,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,通过 BLASTP 在线工具进行序列比对,获得重组质粒 pET28a-*Gs5PTase8* 和 pGEX4T1-*Gs5PTase8*。

将测序验证正确的含融合质粒的 DH5 $\alpha$  菌,在添加对应抗生素的 LB 培养液中转接培养,小提质粒。采用热激法将原核表达空载体和融合质粒分别转进大肠杆菌 BL21(DE3),在含有相应抗性的 LB 板 37 °C 过夜培养,菌落 PCR 验证为阳性的单克隆,留存为后续诱导表达菌种。

#### 1.4 重组蛋白的原核诱导表达及最适表达条件探索

将含空载及含重组质粒的 BL21(DE3)过夜培养,按 1:100 的比例,接种到 3 mL 含有相应抗生素的 LB 液体培养基中,培养至  $OD_{600}=0.6-0.8$ ,加入 1 mmol/L IPTG, 16 °C、180 r/min 过夜培养,4 °C 离心收集菌体,1×磷酸盐缓冲液(PBS)重悬菌体,加入超声裂解液(终浓度为 300 μg/mL 溶菌酶,1% Triton X-100,1% PMSF),置于冰上,使用超声破碎仪破碎细胞(超声 9 s,间歇 6 s,总工作时间为 30 min),15 000 r/min、4 °C 离心,分离出上清和沉淀,沉淀使用 1×PBS 进行重悬。上清和重悬后的沉淀分别加入 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,98 °C 煮样 5 min,10% SDS-PAGE 检测融合蛋白诱导表达情况。

为了摸索最佳诱导表达条件,分别探索了诱导剂 IPTG 不同浓度(0.1、0.2、0.5 和 1.0 mmol/L)和不同培养温度(16 °C 过夜诱导,30 °C 和 37 °C 均诱导 4 h)下的诱导表达效果。经 10% SDS-PAGE 胶检测确定最适的诱导表达条件。

#### 1.5 大量诱导 GST-Gs5PTase8 重组蛋白表达和纯化

采用最佳诱导方案将含 pGEX4T1-Gs5PTase8 大肠杆菌 BL21(DE3)接种到含 100 mg/L Amp 的 10 mL LB 液体培养基 37 °C 过夜培养活化,转接到含 Amp 抗性的 1 L LB 液体培养基,37 °C 扩大培养至  $OD_{600}=0.6-0.8$ ,加入 0.2 mmol/L IPTG 诱导表达,16 °C 过夜培养,收集菌体。加入超声裂解液在冰上进行超声,分离上清和沉淀,上清用 0.45 μm 滤菌膜过滤去除杂质,准备过 GST 融合蛋白纯化层析柱。用约 10 倍柱体积的已预冷的 1×PBS 清洗平衡层析柱,加入除杂质的细菌裂解液,层析柱加盖密封,4 °C 过夜孵育。用约 20 倍柱体积含 1% Triton X-100、1% Tween-20 和 5 mmol/L DTT 的 1×PBS 清洗层析柱,

配制约 15 倍柱体积 15 mmol/L 谷胱甘肽洗脱液(0.231 g 还原性谷胱甘肽溶于 50 mL 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)洗脱融合蛋白。10% SDS-PAGE 检测纯度,BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定纯化蛋白浓度和得率。

#### 1.6 重组蛋白的酶活测定

将 10 ng Gs5PTase8 重组蛋白分别和其可能的底物[IP<sub>3</sub>、IP<sub>4</sub>、PI(4,5)P<sub>2</sub> 和 PI(3,4,5)P<sub>3</sub>]混合于 100 μL 反应缓冲液(25 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 37 °C 孵育 30 min,按已报道的分光光度法<sup>[36]</sup>,使用酶标仪测定底物水解游离磷酸在 650 nm 波长的吸光值,IP<sub>3</sub> 底物浓度为 0.2 mmol/L,其余底物浓度均为 0.5 mmol/L。

## 2 结果与分析

### 2.1 Gs5PTase8 基因的克隆、序列分析及组织表达

从 Phytozome 网站(<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)提供的大豆注释基因组 *Glycine max* Wm82.a2.v1 中提取大豆 5PTase8 基因(*Glyma.03G173000*)序列信息,基因序列长度为 6 644 bp,转录序列长度为 2 157 bp,编码序列(coding sequence, CDS)全长 1 482 bp,编码 493 个氨基酸(amino acid, aa)。设计克隆 5PTase8 的引物时,当以其编码区序列(coding domain sequence, CDS)的起始密码子 ATG 开始的正向引物和终止密码子 TGA 互补序列开始的负向引物进行 PCR 扩增时,无法获得该基因,可能存在其他同源基因的干扰。将 PCR 扩增的区域扩大,正向引物和负向引物分别向 5PTase8 上游和下游平移,设计引物 InoF 和 InoR,以盐胁迫下的栽培大豆(Williams82 和 C08)和野生大豆(W05)的根 cDNA 为模板,成功 PCR 扩增出栽培大豆的 *Gm5PTase8* 和野生大豆 *Gs5PTase8* 的基因片段,经 *Xba* I 和 *Xho* I 双酶切后,连入

中间载体 pBluescript KS (+/-) Phagemids, 分别获得重组质粒 pKS-*Gm5PTase8* 和 pKS-*Gs5PTase8*, 质粒测序结果与 Wildsoydb DataHub 网络公开数据库(<https://datahub.wildsoydb.org/>)上提供的序列一致。来自栽培大豆 Williams82 (Wm82) 和 C08 的 *5PTase8* 基因 CDS 序列基本一致, 命名为 *Gm5PTase8* (*Glyma.03G173000*), 只存在一个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP), 引起了 311 位氨基酸的变异(D311G), 野生大豆 W05 的 *5PTase8* 基因记作 *Gs5PTase8* (*Glysoja.03G007441*), 与 *Gm5PTase8* 存在 8 个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)差异, 有 8 个氨基酸的差异, 分别是 K10T、I38T、P195R、L198S、A442V、L448M、I487L、I490V。将大豆 *5PTase8* 与在 Phytozome、Wildsoydb DataHub 和 Soybase (<https://www.soybase.org/>)网站上公开的几种其他大豆基因组中的同源蛋白进行比对(国家微生物科学数据中心, 登录号: NMDCX0000287), 其中包含栽培大豆 Williams82 ISU01 (Wm82 ISU01)、中黄 13 (Zhonghuang13, ZH13)、Lee、'Fiskeby III' PI 438471 和野生大豆 PI483463, 发现 6 种栽培大豆的相似度高, Wm82 ISU01 与 Wm82 序列一致, ZH13、Lee 和 Fiskeby III 均与 Wm82 存在 2 个相同的 SNP, 即 I38T、I490V。而两种野生大豆的序列一致。大豆 *5PTase8* 的磷酸酶家族特征区域(PF03372)在氨基酸 92-423 区段, 含 2 个保守区 domain I 和 domain II, 分别位于氨基酸 311-325 和 390-406 区段, 证明氨基酸替换的位点均不在酶活的保守区。

将 *Gm5PTase8* 蛋白序列作为查询序列, 搜索其他已测序的主要模式植物或作物基因组, 获得其同源蛋白, 进行序列比对和系统发育树分析。挑选大豆、豆科模式植物百脉根和蒺藜苜蓿、模式植物拟南芥、水稻和葡萄的序列进

行比对(图 1), 各植物 *5PTase8* 特征区域序列较为相似, 尤其是 2 个保守区段。用 MEGA 11 构建邻接进化树(图 2), 其结果基本体现了物种间的亲缘关系。睡莲是被子植物中较早分化出来的类群, 亦有一个 *5PTase8* 的同源蛋白, 双子叶植物与单子叶植物的 *5PTase8* 同源蛋白分别聚类于两个分支, 豆科植物的 *5PTase8* 同源蛋白聚类于一个小分支, 相较于其他植物, 大豆 *5PTase8* 的同源基因数更多, 共有 4 个, 也验证了大豆基因组比其他豆科多一轮的全基因组复制事件。

之前的研究发现 *Gs5PTase8* 受盐胁迫诱导表达<sup>[9]</sup>, 本研究用半定量 RT-PCR 和 qRT-PCR 检测了 *Gs5PTase8* 在大豆各组织的表达情况(图 3), 发现 *Gs5PTase8* 在大豆根、叶、茎、荚果和花里都有表达, 在根中的表达丰度最高。

## 2.2 *Gs5PTase8* 原核表达载体的构建及诱导表达

*Gs5PTase8* 为多磷酸肌醇-5-磷酸酶, 研究其酶活性质对阐明其生物功能十分关键。为得到体外表达纯化 *Gs5PTase8* 蛋白, 以重组质粒 pKS-*Gs5PTase8* 为模板, 其 CDS 序列的起始密码子 ATG 开始的正向引物和终止密码子 TGA 或仅缺失 TGA 互补序列开始的负向引物进行 PCR 扩增, 得到该基因片段。本研究先尝试了 pET-28a(+) 的 His-tag 镍亲和纯化系统。pET-28a(+) 载体经 *Xba* I 和 *Xho* I 酶切, His-tag 位于融合蛋白的 C 端, 反向扩增引物需去除终止密码子 TGA。将 pET-28a(+) 空载体和 *Gs5PTase8* 基因的 PCR 扩增片段经 *Xba* I 和 *Xho* I 双酶切后连接, 得到在含 Kan 的 LB 板上的抗性单克隆, 经菌落 PCR 验证得到阳性克隆, 测序正确后获得原核表达重组载体 pET28a-*Gs5PTase8*。然而, 当转入大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3), 并经 1 mmol/L IPTG 诱导表达时, 并未获得融合蛋白(图 4), 结合以

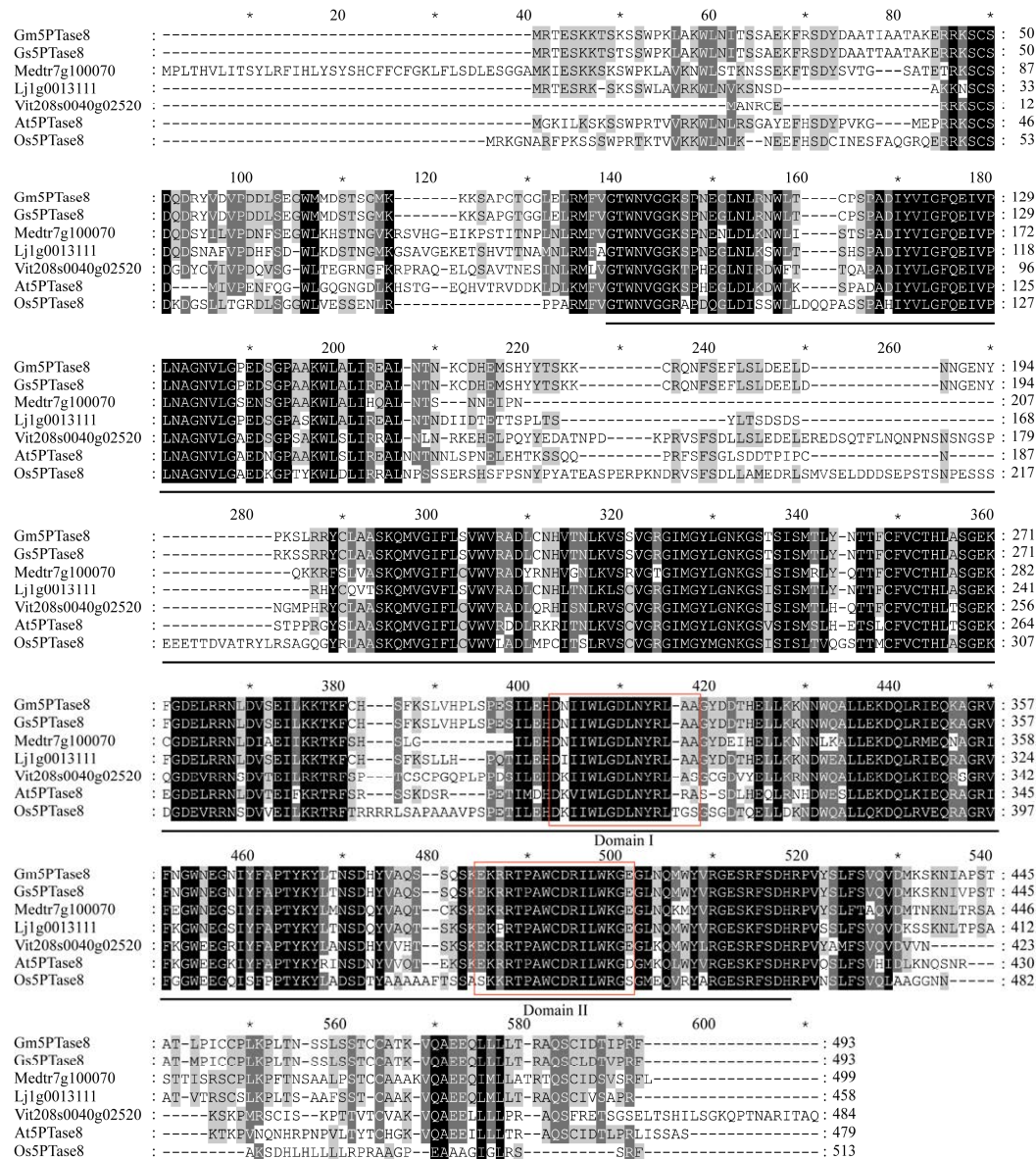


图1 大豆 5PTase8 蛋白序列比对 选取来自栽培大豆 *Glycine max* (Gm5PTase8)、野生大豆 *Glycine soja* (Gs5PTase8)、蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* G. (Medtr7g100070)、百脉根(*Lotus japonicus* L.) (Lj1g0013111)、葡萄(*Vitis vinifera* L.) (Vit208s0040g02520)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.) (At5PTase8)、水稻(*Oryza sativa* L.) (Os5PTase8)的同源序列进行比对,划线区域为 5PTase8 的磷酸酶家族特征区域 PF03372 区段,方框区域为其含 2 个保守区 domain I 和 domain II

Figure 1 The alignment of soybean 5PTase8 protein. The plant 5PTase8 homologous proteins were used for alignment, including Gm5PTase8 from *Glycine max*, Gs5PTase8 from *Glycine soja*, Medtr7g100070 from *Medicago truncatula* G., Lj1g0013111 from *Lotus japonicus* L., Vit208s0040g02520 from *Vitis vinifera* L., At5PTase8 from *Arabidopsis thaliana* L. and Os5PTase8 from *Oryza sativa* L.. Underlined domain is the characteristic region of the phosphatase family PF03372. Two boxed domains are the conserved domains, that is domain I and domain II. The gene locus of Gm5PTase8: Glyma.03G173000; Gs5PTase8: Glysoja.03G007441; At5PTase8: At2G37440; Os5PTase8: LOC\_Os05g02350.



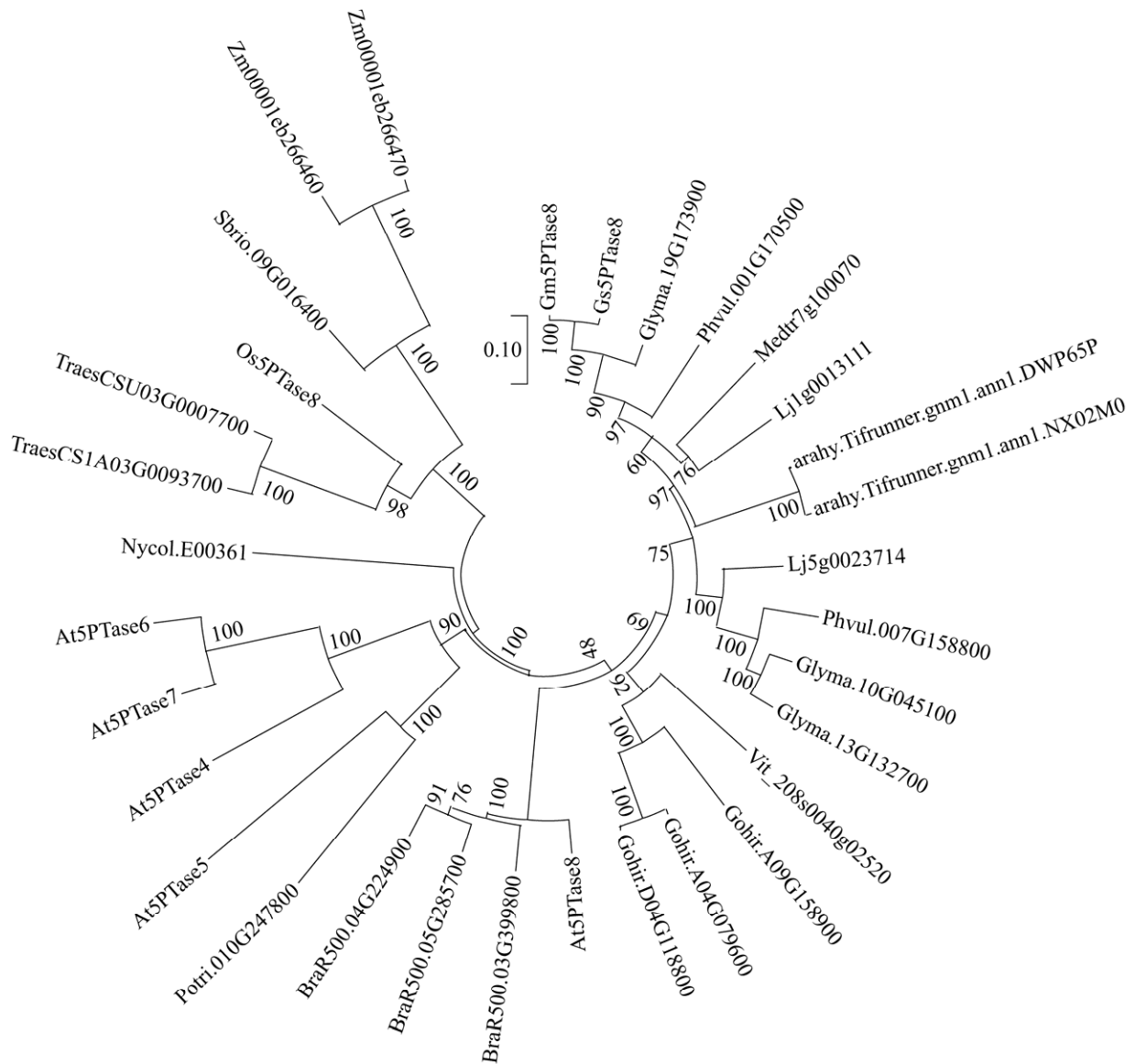
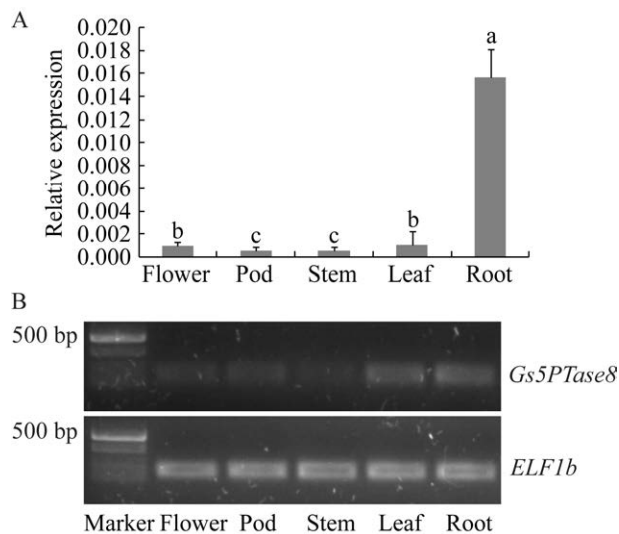


图2 植物5PTase8的系统发育树 将来自各植物的5PTase8同源蛋白,包括栽培大豆、野生大豆、拟南芥、葡萄、蓝星睡莲、百脉根、蒺藜苜蓿、水稻、菜豆、花生、芸苔、棉花、玉米、高粱、小麦和杨树,进行序列比对,构建邻接树.标尺代表每个位点有0.1个氨基酸替代的长度

Figure 2 Phylogenetic tree of the 5PTase8 proteins in plants. The neighbor-joining tree was constructed based on the alignment of the homologous 5PTase8 proteins in plants, including *Glycine max*, *Glycine soja*, *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera*, *Nymphaea colorata* P., *L. japonicus*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa*, *Phaseolus vulgaris* L., *Arachis hypogaea* L., *Brassica rapa* L., *Gossypium hirsutum* L., *Zea mays* L., *Sorghum bicolor* L., *Triticum aestivum* L. and *Populus trichocarpa* T. & G. The scale bar represents 0.1 amino acid substitutions per site. The gene locus of Gm5PTase8: Glyma.03G173000; Gs5PTase8: Glysoja.03G007441; At5PTase4: At3G63240; At5PTase5: At5G65090; At5PTase6: At1G05470; At5PTase7: At2G32010; At5PTase8: At2G37440; Os5PTase8: LOC\_Os05g02350.

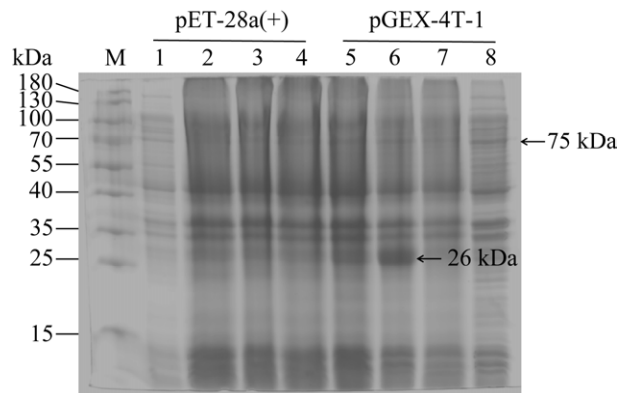


**图 3** 大豆 *Gs5PTase8* 的组织表达特性 A: 大豆 *Gs5PTase8* 各组织表达相对量的 qRT-PCR 结果. 不同小写字母表示显著差异 ( $P < 0.05$ ), 误差线代表标准差. B: 大豆 *Gs5PTase8* 各组织表达的半定量 RT-PCR 结果

Figure 3 Expression levels of *Gs5PTase8* in different tissues. A: Relative expression of *Gs5PTase8* in different tissues by qRT-PCR. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ), and error bars represent standard deviations. B: Agarose gel electrophoresis on expression of *Gs5PTase8* in different tissues by RT-PCR.

往 5PTase 蛋白表达纯化研究<sup>[30]</sup>, 推测其可能形成了包涵体, 或者 His-tag 影响了其表达。

为了提高 *Gs5PTase8* 重组蛋白的可溶性, 改用谷胱甘肽 S-转移酶(glutathion S-transferase, GST)融合蛋白纯化系统。GST 标签在目标蛋白的 N 端, 保留了 *Gs5PTase8* 基因原始的终止子。将空载体 pGEX-4T-1 和 *Gs5PTase8* 基因的 PCR 扩增片段经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后连接, 得到在含 Amp 的 LB 板上的抗性单克隆, 菌落 PCR 验证选取测序正确的阳性克隆抽提质粒, 得到构建的融合质粒 pGEX4T1-*Gs5PTase8*。转入 BL21(DE3), 添加 1 mmol/L IPTG 诱导, 10% SDS-PAGE 检测表达(图 4)。未诱导的载体不能



**图 4** *Gs5PTase8* 重组蛋白的原核诱导表达 M: 蛋白 marker; 1、5 为空载体诱导前; 2、6 为空载体 16 °C 1 mmol/L IPTG 过夜诱导后; 3、7 分别为重组载体 pET28a-*Gs5PTase8* 和 pGEX4T1-*Gs5PTase8* 诱导前; 4、8 分别为重组载体 16 °C 1 mmol/L IPTG 过夜诱导后

Figure 4 Prokaryotic inducible expression of the recombinant *Gs5PTase8* protein. M: Protein marker; 1, 5 for empty vector before IPTG induction; 2, 6 for empty vector induced by 1 mmol/L IPTG at 16 °C overnight; 3, 7 for the recombinant vector pET28a-*Gs5PTase8* and pGEX4T1-*Gs5PTase8* before IPTG induction, respectively; 4, 8 for the recombinant vector induced by 1 mmol/L IPTG at 16 °C overnight.

表达目的蛋白, IPTG 诱导后, 融合载体可以表达出目的蛋白。pGEX-4T-1 空载体的 GST 标签蛋白大小约为 26 kDa, *Gs5PTase8* 蛋白预测分子量约为 49 kDa, GST-*Gs5PTase8* 融合蛋白分子量约为 75 kDa, 这与 SDS-PAGE 检测结果一致, 说明该系统可以成功进行大豆蛋白 *Gs5PTase8* 的原核表达。

### 2.3 GST-*Gs5PTase8* 重组蛋白表达条件优化

为了优化大量表达纯化的条件, 探索了不同诱导条件进行蛋白诱导表达, 分别设置了诱导剂 IPTG 的浓度为 0.1、0.2、0.5、1.0 mmol/L, 温度为 16、30、37 °C, 其中 16 °C 为过夜诱导表达, 30 °C 和 37 °C 为 4 h 诱导表达。各诱导条

件下, 重组载体表达产物的 10% SDS-PAGE 胶检测结果如图 5 所示。在没有诱导剂 IPTG 存在时, 不同温度条件下重组质粒均不能表达目标蛋白。当 IPTG 浓度较低时, 提高 IPTG 浓度可提高目标蛋白的诱导表达, 而当 IPTG 浓度达到 0.2 mmol/L 时, 目标蛋白的诱导表达量随 IPTG 浓度增加不再明显。3 个温度的诱导结果对比结果表明, 16 °C 过夜诱导时, 目标蛋白的表达最高, 且杂质最少; 37 °C 诱导 4 h 时, 目标蛋白表达量也较多, 但杂质较多; 30 °C 诱导 4 h 时, 目标蛋白表达量很少, 可能需要延长培养时间来增加目标蛋白表达量, 但该条件下杂质也较多。因此选择 16 °C 添加 0.2 mmol/L IPTG 过夜诱导为融合蛋白 GST-Gs5PTase8 表达的最适条件。

#### 2.4 重组蛋白的纯化

采用上述验证的最适诱导表达条件, 即 16 °C 添加 0.2 mmol/L IPTG 过夜诱导, 对 GST-Gs5PTase8 重组蛋白进行大量表达。用 GST 亲和柱纯化, 对纯化蛋白进行 SDS-PAGE

检测(图 6), 在蛋白相对分子量约为 75 kDa 的位置处出现一条特异性蛋白条带, 大小与预期相符合, 纯化后的蛋白条带单一, 无杂带, 纯度达 95% 以上。这表明重组蛋白 GST-Gs5PTase8 纯化成功。使用 BCA 检测法进行测定, 纯化蛋白得率约为 4.9 mg/L。

#### 2.5 重组蛋白的酶活检测

为了研究 Gs5PTase8 的功能, 寻找其水解底物十分必要。根据 5PTase 家族同源基因的报道<sup>[17]</sup>, 其可能的作用底物分别为 IP<sub>3</sub>、IP<sub>4</sub>、PI(4,5)P<sub>2</sub> 和 PI(3,4,5)P<sub>3</sub>。将 Gs5PTase8 重组蛋白和含各底物的反应液在 37 °C 下孵育 30 min, 检测样品水解后游离磷的吸光值来判断酶活性, 其中底物 IP<sub>3</sub> 的初始浓度为 0.2 mmol/L, 其余底物浓度均为 0.5 mmol/L。结果如图 7 所示, 在 650 nm 波长下, 含有底物的混合物的吸光值均上升, 说明 Gs5PTase8 融合蛋白在体外均能水解 IP<sub>3</sub>、IP<sub>4</sub>、PI(4,5)P<sub>2</sub> 和 PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, 其底物类型即包含水溶性的肌醇磷酸和脂溶性的磷脂酰肌醇, 属于 II 类多磷酸肌醇-5-磷酸酶。

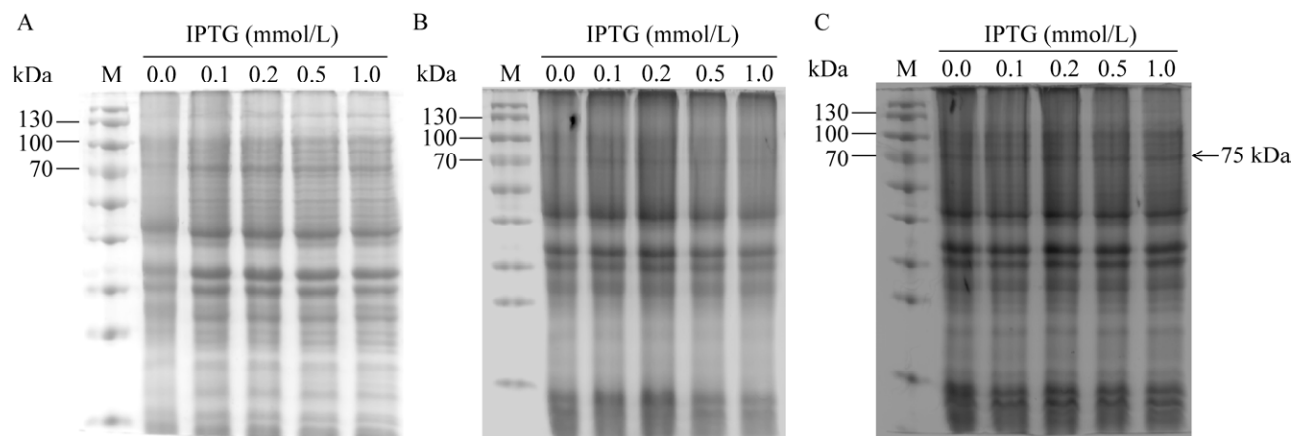


图 5 GST-Gs5PTase8 重组蛋白诱导表达条件的优化 A: 16 °C 条件下不同浓度 IPTG 诱导过夜表达。B: 30 °C 条件下不同浓度 IPTG 诱导 4 h 表达。C: 37 °C 条件下不同浓度 IPTG 诱导 4 h 表达。M: 蛋白 marker  
Figure 5 Optimization of prokaryotic inducible expression conditions for the recombinant GST-Gs5PTase8 protein. A: Inducible expression by IPTG with different concentrations overnight at 16 °C. B: Inducible expression by IPTG with different concentrations for 4 h at 30 °C. C: Inducible expression by IPTG with different concentrations for 4 h at 37 °C. M: Protein marker.

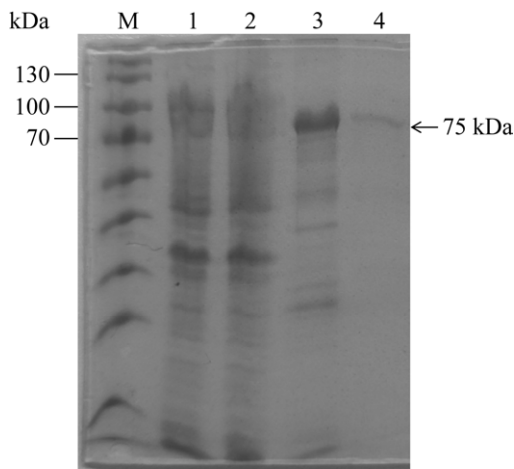


图6 GST-Gs5PTase8 重组蛋白的纯化 M: 蛋白 marker; 1: 空载体(pGEX-4T-1)诱导前; 2: 重组质粒(pGEX4T1-Gs5PTase8)诱导前; 3: 16 °C, 重组质粒(pGEX4T1-Gs5PTase8) 0.2 mmol/L IPTG 过夜诱导; 4: GST-Gs5PTase8 纯化蛋白

Figure 6 Purification of the recombinant GST-Gs5PTase8 protein. M: Protein marker; 1: Empty vector (pGEX-4T-1) before induction; 2: Recombinant plasmid (pGEX4T1-Gs5PTase8) before induction; 3: Recombinant plasmid (pGEX4T1-Gs5PTase8) was induced overnight by 0.2 mmol/L IPTG at 16 °C; 4: Purified GST-Gs5PTase8.

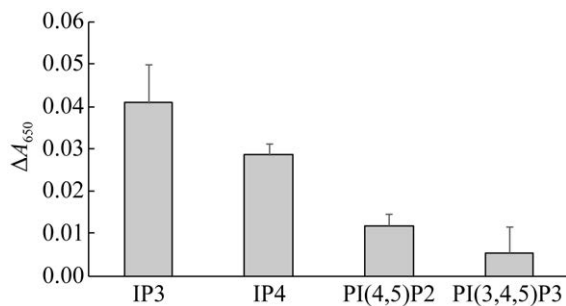


图7 Gs5PTase8 蛋白底物特异性检测  
Figure 7 Substrate specificity of Gs5PTase8.

### 3 讨论与结论

多磷酸肌醇-5-磷酸酶(inositol polyphosphate 5-phosphatases, 5PTases)广泛存在于真核生物中, 已发现的成员能水解磷脂酰肌醇或游离肌

醇 5'位上的磷酸, 主要介导磷脂酰肌醇信号传导和 IP<sub>3</sub> 信号通路等, 调节多种生命反应进程<sup>[17-18]</sup>。植物 5PTases 水解底物的特异性反映了其分子作用机制的差异。At5PTase7 和 At5PTase9 特异性水解脂溶性的膜结合磷脂酰肌醇磷酸, 而作用于盐胁迫下的囊泡转运过程, 影响细胞内吞作用<sup>[25-26]</sup>。At5PTase12 和 At5PTase13 特异性水解水溶性 IP<sub>3</sub>, 从而影响了胞内的 IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup>水平<sup>[28]</sup>。可水解脂溶性磷脂酰肌醇磷酸和水溶性肌醇多磷酸底物的 5PTases 则可能直接作用于膜磷脂酰肌醇途径和胞内游离的磷酸肌醇途径<sup>[17]</sup>。因此, 解析新 5PTase 家族成员功能, 探明其作用底物十分关键。

大豆 5PTases 研究较少, 本课题组发现的野生大豆耐盐新基因 *Gs5PTase8*, 其编码蛋白与拟南芥 At5PTase8 同源。Gs5PTase8 有 493 个氨基酸, 含 2 个酶活保守区, 栽培大豆与野生大豆 5PTase8 基因存在 8 个 SNP, 6 个已测序的栽培大豆品种之间该基因相似度高。同源基因序列比对及系统发育树分析发现该基因在植物中是保守的, 与各物种进化关系基本一致, 除了本课题组发现的参与野生大豆耐盐的 *Gs5PTase8*<sup>[9]</sup>, 其他同源基因(包括拟南芥 At5PTase8)的功能均尚未见报道。

为获得 *Gs5PTase8* 蛋白以便于后续研究其作用机制, 本研究利用大肠杆菌原核表达系统, 分别融合 His-tag 和 GST-tag 表达纯化 *Gs5PTase8*, 结果表明, His-Gs5PTase8 的融合诱导表达并未成功, 只有 GST-Gs5PTase8 融合诱导表达成功。前人对 5PTases 蛋白的诱导表达与纯化, 也有不少用 His-tag 的成功案例, 但大多是在真核表达系统、酵母或昆虫果蝇(*Drosophila*) S2 细胞表达系统中<sup>[10,22,25]</sup>, 可能原核表达系统与真核生物的转录翻译及后加工系统不同, 导致蛋白不稳定或可溶性低, 不能成功纯化, 而 GST-tag

可能有助于提高蛋白的可溶性和稳定性,因此本研究成功表达纯化出了 GST-Gs5PTase8。经条件摸索, 0.2 mmol/L IPTG 诱导 16 °C 过夜培养为最适条件, GST 亲和柱层析纯化后, 能得到纯度大于 95% 的融合蛋白, 得率为 4.9 mg/L。

多磷酸肌醇-5-磷酸酶 5PTases 家族成员可水解的底物主要有两大类, 一类是水溶性的肌醇磷酸(IP), 包括重要信号传递小分子 IP<sub>3</sub>; 另一类是脂溶型的磷脂酰肌醇磷酸(PIP), 其中有膜代谢的重要信号分子 PI(4,5)P<sub>2</sub><sup>[10]</sup>。这些分子与植物耐盐等耐逆反应有重要关联。IP<sub>3</sub> 能与 Ca<sup>2+</sup>流信号、ABA 通路相互作用, 影响耐盐的 SOS 通路等<sup>[17,37-39]</sup>。研究表明, 质膜上磷脂酰肌醇(PI)抑制质膜 H<sup>+</sup>-ATPase 活性, 而在盐胁迫下, PI 磷酸化为磷脂酰肌醇-4 磷酸(PI4P), 从而解除了 PI 对质膜 H<sup>+</sup>-ATPase 活性的抑制, 同时, PI4P 激活钠氢反向离子通道 SOS1 活性, 外排 Na<sup>+</sup>, 促进植物耐盐, 这说明 PIP 类物质在植物耐盐中亦起重要作用<sup>[40]</sup>, 而不同的 5PTase 蛋白能水解的底物会有区别, 这也从生化本质上限定了它们功能的分子作用机制。本研究证明大豆耐盐基因 *Gs5PTase8* 的底物既包含水溶性的肌醇磷酸(IP), 也包含脂溶型的磷脂酰肌醇磷酸(PIP), 为 II 类多磷酸肌醇-5-磷酸酶。结合前期研究中发现的 *Gs5PTase8* 亚细胞定位于质外体(apoplast)、细胞膜、细胞壁和细胞核<sup>[9]</sup>, 说明 *Gs5PTase8* 在膜及胞外部分的功能可能与水解 PIP 类底物相关, 而在胞内的功能则更可能与水解 IP 类底物相关。

总之, 本研究首次在大肠杆菌中诱导表达并纯化了大豆 *Gs5PTase8* 重组蛋白, 同时进行了序列分析并检测其组织表达情况, 发现该蛋白在植物中保守, 其在大豆根中特异表达。经体外底物特异性检测发现, *Gs5PTase8* 重组蛋白可以水解底物 IP<sub>3</sub>、IP<sub>4</sub>、PI(4,5)P<sub>2</sub> 和 PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, 本

研究的结果为今后进一步研究 *Gs5PTase8* 参与大豆耐盐反应机制奠定了理论基础。

## 致谢

感谢香港中文大学林汉明教授组提供的大豆栽培种质 C08 和野生大豆种质 W05。感谢中国农业科学院作物科学研究所傅永福研究员课题组惠赠栽培大豆 Williams82。

## REFERENCES

- [1] 方义生, 曹东, 杨红丽, 刘小荣, 张恒斌, 陈李森, 周新安. 大豆耐盐相关基因研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2020, 42(4): 512-526.  
FANG YS, CAO D, YANG HL, LIU XR, ZHANG HB, CHEN LM, ZHOU XA. Research progress of salt-tolerance genes in soybean[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2020, 42(4): 512-526 (in Chinese).
- [2] XIE M, CHUNG CYL, LI MW, WONG FL, WANG X, LIU AL, WANG ZL, LEUNG AKY, WONG TH, TONG SW, XIAO ZX, FAN KJ, NG MS, QI XP, YANG LF, DENG TQ, HE LJ, CHEN L, FU AS, DING Q, et al. A reference-grade wild soybean genome[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 1216.
- [3] CAI XX, JIA BW, SUN MZ, SUN XL. Insights into the regulation of wild soybean tolerance to salt-alkaline stress[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 1002302.
- [4] LIU YC, DU HL, LI PC, SHEN YT, PENG H, LIU SL, ZHOU GA, ZHANG HK, LIU Z, SHI M, HUANG XH, LI Y, ZHANG M, WANG Z, ZHU BG, HAN B, LIANG CZ, TIAN ZX. Pan-genome of wild and cultivated soybeans[J]. Cell, 2020, 182(1): 162-176.e13.
- [5] QI XP, LI MW, XIE M, LIU X, NI M, SHAO GH, SONG C, YIM AKY, TAO Y, WONG FL, ISOBE S, WONG CF, WONG KS, XU CY, LI CQ, WANG Y, GUAN R, SUN FM, FAN GY, XIAO ZX, et al. Identification of a novel salt tolerance gene in wild soybean by whole-genome sequencing[J]. Nature Communications, 2014, 5: 4340.
- [6] GUAN RX, QU Y, GUO Y, YU LL, LIU Y, JIANG JH, CHEN JG, REN YL, LIU GY, TIAN L, JIN LG, LIU ZX, HONG HL, CHANG RZ, GILLIHAM M, QIU LJ.

- Salinity tolerance in soybean is modulated by natural variation in GmSALT3[J]. *The Plant Journal*, 2014, 80(6): 937-950.
- [7] DO TD, CHEN HT, HIEN VTT, HAMWIEH A, YAMADA T, SATO T, YAN YL, CONG H, SHONO M, SUENAGA K, XU DH. Ncl synchronously regulates  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  in soybean and greatly increases the grain yield in saline field conditions[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 19147.
- [8] LIU AL, XIAO ZX, LI MW, WONG FL, YUNG WS, KU YS, WANG QW, WANG X, XIE M, YIM AKY, CHAN TF, LAM HM. Transcriptomic reprogramming in soybean seedlings under salt stress[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2019, 42(1): 98-114.
- [9] JIA Q, SUN S, KONG DF, SONG JL, WU LM, YAN Z, ZUO L, YANG YJ, LIANG KJ, LIN WX, HUANG JW. Ectopic expression of *Gs5PTase8*, a soybean inositol polyphosphate 5-phosphatase, enhances salt tolerance in plants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(3): 1023.
- [10] ERCETIN ME, GILLASPY GE. Molecular characterization of an *Arabidopsis* gene encoding a phospholipid-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase[J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(2): 938-946.
- [11] MAJERUS PW, KISSELEVA MV, NORRIS FA. The role of phosphatases in inositol signaling reactions[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(16): 10669-10672.
- [12] PIRRUCCELLO M, de CAMILLI P. Inositol 5-phosphatases: insights from the Lowe syndrome protein OCRL[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2012, 37(4): 134-143.
- [13] STEVENSON JM, PERERA IY, HEILMANN I, PERSSON S, BOSS WF. Inositol signaling and plant growth[J]. *Trends in Plant Science*, 2000, 5(6): 252-258.
- [14] XUE HW, CHEN X, LI G. Involvement of phospholipid signaling in plant growth and hormone effects[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10(5): 483-489.
- [15] XUE HW, CHEN X, MEI Y. Function and regulation of phospholipid signalling in plants[J]. *Biochemical Journal*, 2009, 421(2): 145-156.
- [16] HEILMANN I. Phosphoinositide signaling in plant development[J]. *Development*, 2016, 143(12): 2044-2055.
- [17] JIA Q, KONG DF, LI QH, SUN S, SONG JL, ZHU YB, LIANG KJ, KE QM, LIN WX, HUANG JW. The function of inositol phosphatases in plant tolerance to abiotic stress[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(16): 3999.
- [18] ZHANG ZB, LI YT, LUO ZY, KONG SW, ZHAO YL, ZHANG C, ZHANG W, YUAN HY, CHENG L. Expansion and functional divergence of inositol polyphosphate 5-phosphatases in angiosperms[J]. *Genes*, 2019, 10(5): 393.
- [19] BERDY SE, KUDLA J, GRUISSEM W, GILLASPY GE. Molecular characterization of At5PTase1, an inositol phosphatase capable of terminating inositol trisphosphate signaling[J]. *Plant Physiology*, 2001, 126(2): 801-810.
- [20] GUNESEKERA B, TORABINEJAD J, ROBINSON J, GILLASPY GE. Inositol polyphosphate 5-phosphatases 1 and 2 are required for regulating seedling growth[J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(3): 1408-1417.
- [21] SANCHEZ JP, CHUA NH. *Arabidopsis* PLC1 is required for secondary responses to abscisic acid signals[J]. *The Plant Cell*, 2001, 13(5): 1143-1154.
- [22] ZHONG RQ, BURK DH, MORRISON WH 3rd, YE ZH. FRAGILE FIBER3, an *Arabidopsis* gene encoding a type II inositol polyphosphate 5-phosphatase, is required for secondary wall synthesis and actin organization in fiber cells[J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(12): 3242-3259.
- [23] CARLAND F, NELSON T. CVP2- and CVL1-mediated phosphoinositide signaling as a regulator of the ARF GAP SFC/VAN3 in establishment of foliar vein patterns[J]. *The Plant Journal*, 2009, 59(6): 895-907.
- [24] RODRIGUEZ-VILLALON A, GUJAS B, van WIJK R, MUNNIK T, HARDTKE CS. Primary root protophloem differentiation requires balanced phosphatidylinositol-4,5-biphosphate levels and systemically affects root branching[J]. *Development*, 2015, 142(8): 1437-1446.
- [25] KAYE Y, GOLANI Y, SINGER Y, LESHEM Y, COHEN G, ERCETIN M, GILLASPY G, LEVINE A. Inositol polyphosphate 5-phosphatase7 regulates the production of reactive oxygen species and salt tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(1): 229-241.
- [26] GOLANI Y, KAYE Y, GILHAR O, ERCETIN M, GILLASPY G, LEVINE A. Inositol polyphosphate phosphatidylinositol 5-phosphatase9 (At5ptase9)

- controls plant salt tolerance by regulating endocytosis[J]. *Molecular Plant*, 2013, 6(6): 1781-1794.
- [27] ERCETIN ME, ANANIEVA EA, SAFAEE NM, TORABINEJAD J, ROBINSON JY, GILLASPY GE. A phosphatidylinositol phosphate-specific myo-inositol polyphosphate 5-phosphatase required for seedling growth[J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 67(4): 375-388.
- [28] WANG Y, CHU YJ, XUE HW. Inositol polyphosphate 5-phosphatase-controlled  $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3/\text{Ca}^{2+}$  is crucial for maintaining pollen dormancy and regulating early germination of pollen[J]. *Development*, 2012, 139(12): 2221-2233.
- [29] WANG Y, LIN WH, CHEN X, XUE HW. The role of *Arabidopsis* 5PTase13 in root gravitropism through modulation of vesicle trafficking[J]. *Cell Research*, 2009, 19(10): 1191-1204.
- [30] IJUN T, MOCHIZUKI Y, FUKAMI K, FUNAKI M, ASANO T, TAKENAWA T. Identification and characterization of a novel inositol polyphosphate 5-phosphatase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(15): 10870-10875.
- [31] 林文慧. 拟南芥磷脂酰肌醇信号传导途径相关基因的表达谱分析及多磷酸肌醇-5-磷酸酶的生理功能研究[D]. 上海: 中国科学院研究生院(上海生命科学研究院)博士学位论文, 2005.  
LIN WH. Expression profile analysis of *Arabidopsis* phosphatidylinositol signaling pathway relevant genes and function characterization of *Arabidopsis* inositol polyphosphate 5-phosphatase[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of Shanghai Institutes for Biological Sciences, 2005 (in Chinese).
- [32] LARKIN MA, BLACKSHIELDS G, BROWN NP, CHENNA R, McGETTIGAN PA, McWILLIAM H, VALENTIN F, WALLACE IM, WILM A, LOPEZ R, THOMPSON JD, GIBSON TJ, HIGGINS DG. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [33] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, KUMAR S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [34] YIM AKY, WONG JWH, KU YS, QIN H, CHAN TF, LAM HM. Using RNA-seq data to evaluate reference genes suitable for gene expression studies in soybean[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0136343.
- [35] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [36] KU YS, KOO NSC, LI FWY, LI MW, WANG HM, TSAI SN, SUN F, LIM BL, KO WH, LAM HM. GmSAL1 hydrolyzes inositol-1,4,5-trisphosphate and regulates stomatal closure in detached leaves and ion compartmentalization in plant cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e78181.
- [37] DeWALD DB, TORABINEJAD J, JONES CA, SHOPE JC, CANGELOSI AR, THOMPSON JE, PRESTWICH GD, HAMA H. Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2001, 126(2): 759-769.
- [38] DROBAK BK, WATKINS PA. Inositol(1,4,5)trisphosphate production in plant cells: an early response to salinity and hyperosmotic stress[J]. *FEBS Letters*, 2000, 481(3): 240-244.
- [39] TAKAHASHI S, KATAGIRI T, HIRAYAMA T, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. Hyperosmotic stress induces a rapid and transient increase in inositol 1,4,5-trisphosphate independent of abscisic acid in *Arabidopsis* cell culture[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2001, 42(2): 214-222.
- [40] YANG YQ, HAN XL, MA L, WU YJ, LIU X, FU HQ, LIU GY, LEI XG, GUO Y. Dynamic changes of phosphatidylinositol and phosphatidylinositol 4-phosphate levels modulate  $\text{H}^+$ -ATPase and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter activities to maintain ion homeostasis in *Arabidopsis* under salt stress[J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(12): 2000-2014.

(本文责编 郝丽芳)