

陈 杰, 杨天宇, 黄新元. 水稻丝氨酸羟甲基转移酶基因 *OsSHMT5* 克隆与功能分析[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(2): 209-220.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.02.001

水稻丝氨酸羟甲基转移酶基因 *OsSHMT5* 克隆与功能分析

陈 杰^{1,2}, 杨天宇², 黄新元²

(1.江苏省农业科学院蔬菜研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏 南京 210014; 2.南京农业大学资源与环境科学学院/作物遗传与创制创新利用全国重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 水稻中已克隆到 *OsSHMT4* (*OsCADT1*), 该基因编码丝氨酸羟甲基转移酶(*SHMT*), 可调控硫酸盐/硒酸盐吸收和同化, 其高度同源基因 *OsSHMT5* 的功能尚不清楚。本研究基于反向遗传学研究方法, 对水稻 *OsSHMT5* 基因进行分子克隆, 发现 *OsSHMT5* 与 *OsSHMT4* (*OsCADT1*) 的同源性高达 84%。亚细胞定位结果表明, *OsSHMT5* 蛋白定位于细胞核。利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *OsSHMT5* 基因敲除突变体, 发现 *OsSHMT5* 基因敲除突变体的地上部或地下部中总硫/总硒及各形态硒含量与野生型相比无显著差异。基于转录组水平分析发现, *OsSHMT5* 对水稻硫酸盐/硒酸盐吸收和同化相关基因的表达无显著调控作用。在水稻地下部, *OsSHMT5* 可能具有四吡咯结合、血红素结合、氧化还原酶活性、电子转移活性和铁离子结合等分子功能; 在地上部, *OsSHMT5* 可能具有转录调节因子活性、分子功能调节因子、内肽酶调节活性、肽酶抑制剂活性、铜离子结合等分子功能。本研究结果为水稻中 *OsSHMT* 家族功能的研究奠定了基础。

关键词: 水稻; 丝氨酸羟甲基转移酶; *OsSHMT5* 基因; 硫元素; 硒元素

中图分类号: S511 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025) 02-0209-12

Cloning and functional analysis of serine hydroxymethyltransferase gene *OsSHMT5* in rice

CHEN Jie^{1,2}, YANG Tianyu², HUANG Xinyuan²

(1. Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/ Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing 210014, China; 2. State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement & Utilization/ College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In rice, *OsSHMT4* (*OsCADT1*) has been cloned. This gene encodes serine hydroxymethyltransferase (*SHMT*), which can regulate the absorption and assimilation of sulfate/ selenate. However, the function of its highly homologous gene, *OsSHMT5*, remains unclear. Based on the reverse genetics research method, the *OsSHMT5* gene was cloned in this study. It was found that the homology between *OsSHMT5* and *OsSHMT4* (*OsCADT1*) was as high as 84%. The results of sub-

cellular localization indicated that *OsSHMT5* was localized in the nucleus. The *OsSHMT5* gene knockout mutants were constructed using the CRISPR/Cas9 technology. It was found that there were no significant differences in the total sulfur/ total selenium and various forms of selenium content in the root or shoot of the *OsSHMT5* gene knockout mutants compared with the wild-type. Based on transcriptome-level analysis, it was found that *OsSHMT5* had no significant

收稿日期: 2024-09-09

基金项目: 江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20210389); 国家自然科学基金青年基金项目(32202592)

作者简介: 陈 杰(1992-), 男, 江苏丹阳人, 博士, 助理研究员, 主要从事植物矿质元素吸收与积累机制研究。(E-mail) jiechen@jaas.ac.cn

通讯作者: 黄新元, (E-mail) xinyuan.huang@njau.edu.cn

regulatory effect on the expression of genes related to sulfate/selenate absorption and assimilation in rice. In the root, *OsSHMT5* may have molecular functions such as tetrapyrrole binding, heme binding, oxidoreductase activity, electron transfer activity, and iron ion binding. In the shoot, *OsSHMT5* may have molecular functions such as transcription regulator activity, molecular function regulator, endopeptidase regulatory activity, peptidase inhibitor activity, and copper ion binding. The results of this study lay a foundation for the research on the functions of the *OsSHMT* family in rice.

Key words: rice; serine hydroxymethyltransferase; *OsSHMT5* gene; sulphur; selenium

丝氨酸羟甲基转移酶(*SHMT*)催化丝氨酸与四氢叶酸的反应,生成甘氨酸和 5,10-亚甲基四氢叶酸,为生物体内的甲基合成、核苷酸合成和氨基酸代谢等提供一碳单位^[1-4]。在拟南芥中,定位于线粒体的 *AtSHMT1* 和 *AtSHMT2* 均参与光呼吸过程^[5],但 *AtSHMT1* 和 *AtSHMT2* 的功能可能存在冗余^[6]。定位于质体的 *AtSHMT3* 也具有酶活性^[6]。在水稻中,定位于线粒体的 *OsSHMT1* 参与光呼吸过程,其功能缺陷导致幼苗新叶失绿变黄且苗期致死^[7-8]。水稻中,泛素化修饰的 *OsSHMT1* 可以激活植物免疫信号,增强水稻对多种病害(水稻条纹叶枯病、稻瘟病及水稻白叶枯病^[9])的抗性。水稻 *OsSHMT3* 定位于叶绿体^[10],在大肠杆菌或拟南芥中异源表达 *OsSHMT3* 可提高其盐耐性^[11]。在拟南芥中,定位于细胞核的拟南芥 *AtSHMT7*(*MSA1*)虽然未被鉴定出 *SHMT* 酶活性,但其突变可在表观遗传层面调控体内硫素稳态,增加叶片中总硫(S)和总硒(Se)的积累量^[12]。在水稻中,*OsSHMT4*(*OsCADT1*)也定位于细胞核,作为负调控因子影响硫酸盐/硒酸盐吸收和同化途径^[13]。虽然 *OsSHMT4*(*OsCADT1*)突变影响籽粒中富含半胱氨酸的贮藏蛋白的合成、影响胚乳发育和垩白度^[14-15],但可显著提高水稻对镉的耐性,同时促进籽粒硒的生物富集^[13]。

硒是一种类金属元素,在自然界中主要以无机硒和有机硒的形式存在^[16-17]。硒为人体必需而植物非必需的微量元素之一,对保障人体健康具有重要作用,人体主要通过植源性食物摄入硒^[18-19]。根据联合国粮食及农业组织报道,成年人每日硒摄入量为 26~34 μg ,每日硒摄入最高安全剂量为 400 μg ^[20]。全球范围内约有 15% 的人硒摄入不足^[21],而中国是世界上缺硒最严重的国家之一,72% 的国土面积中为缺硒区域,并且超 1.05×10^8 人处于硒摄入不足状态^[22]。稻米作为中国 60% 以上人的主食,是硒膳食摄入的主要来源,其硒含量与人体健康密

切相关^[23]。然而,相比于美国和印度等国家,中国市售普通大米的硒含量普遍较低(0.01~0.10 mg/kg),难以满足日常硒摄入需求,因此亟需通过农艺措施或生物强化技术提高水稻籽粒中的硒含量^[23-25]。

拟南芥 *AtSHMT7*(*MSA1*)和水稻 *OsSHMT4*(*OsCADT1*)同属于丝氨酸羟甲基转移酶中定位于细胞核的家族亚类,其功能缺陷均可提高植物地上部硫元素和硒元素的积累量^[12-13],*OsSHMT5* 为 *OsSHMT4*(*OsCADT1*)的同源基因。本研究拟利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *osshmt5* 纯合突变体,对比 *OsSHMT5* 敲除突变体和野生型中各种营养元素含量的差异,再结合转录组学分析 *OsSHMT5* 的调控机制,为水稻中 *OsSHMT* 家族功能的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

粳稻品种中花 11(ZH11)。

1.2 系统进化树的构建

在 NCBI 网站(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)检索 *OsSHMT4*(*OsCADT1*)氨基酸序列。利用 Mega11 软件对 *OsSHMT1*(Os03g0738400)、*OsSHMT2*(Os11g0455800)、*OsSHMT3*(Os12g0409000)、*OsSHMT4*(*OsCADT1*, Os01g0874900)、*OsSHMT5*(Os05g0429000)、*AtSHMT1*(At4g37930)、*AtSHMT2*(At5g26780)、*AtSHMT3*(At4g32520)、*AtSHMT4*(At4g13930)、*AtSHMT5*(At4g13890)、*AtSHMT6*(At1g22020)和 *AtSHMT7*(*MSA1*, At1g36370)的氨基酸序列进行比对,并构建系统进化树。

1.3 亚细胞定位

以中花 11 的 cDNA 为模板,正向引物 F:5'-TCG-AGCTCAAGCTTCGAATTCATGCTCGATCGCGCGAC-G-3',反向引物 R:5'-GGATCCCGGGCCCGCGGTAC-CTACATCAAATCCCGGCATGG-3',扩增出 *OsSHMT5* 基因的编码区片段,通过同源重组将该片段插入至

载体 pSAT6A-eGFP-N1 的 *Eco* R I 和 *Kpn* I 酶切位点之间。利用 *PI-Psp* I 内切酶酶切得到 2xCaMV 35S::*OsSHMT5:eGFP* 片段,再将该片段利用 T4 连接酶连接至线性化载体 pRCS2-ocs-npt II 的 *PI-Psp* I 酶切位点处。通过农杆菌介导的烟草叶片瞬时表达技术,在叶片中表达增强型绿色荧光蛋白(eGFP)与 *OsSHMT5* 的融合蛋白^[26],荧光信号由激光共聚焦显微镜检测(型号 TCS-SP8,Leica 公司产品)。

1.4 突变体的构建

针对 *OsSHMT5* 的编码区设计 2 个敲除靶点(U6A:5'-CTCCTCCTGCCTCTCGCCCG-3'和 U6B:5'-GTCCGCTGGGGCGTCAACG-3')。首先构建靶标 sgRNA 表达盒,再利用 *Bsa* I 酶切和 T4 连接酶将其组装至 pYLCRISPR/Cas9 载体中^[27]。构建好的载体送至伯远生物科技有限公司进行遗传转化和阳性苗筛选。以 T0 代单株的 DNA 为模板,使用引物 F:5'-ATGCTCGATCGCGCGACG-3'和引物 R:5'-ATGTACCCGGTGTGCGGGTT-3'扩增目的片段,并通过 Sanger 测序鉴定 *OsSHMT5* 基因突变类型。最终得到 *OsSHMT5* 基因敲除突变体 *osshmt5-1*、*osshmt5-2* 和 *osshmt5-3*。

1.5 营养元素含量的测定

木村 B 营养液(Kimura B)的浓度稀释到标准浓度的一半,将水稻野生型(ZH11)和 *OsSHMT5* 敲除突变体(*osshmt5-1*、*osshmt5-2* 和 *osshmt5-3*) 在 1/2 Kimura B 营养液中水培 21 d,然后外源添加终浓度 2 $\mu\text{mol/L}$ 硒酸钠,处理 2 d。处理结束后,分别采集地下部和地上部,清洗干净后 65 $^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重,采用 HNO_3 法在石墨炉(型号 ED45,Lab Tech 公司产品)对水稻样品进行消解^[28],并使用电感耦合等离子体质谱仪(型号 NexION 300X,PerkinElmer 公司产品)测定水稻样品中 S、Se 及其他营养元素的含量。

1.6 各形态硒含量测定

分别取水稻地上部和地上部,保存于 -80°C 。液氮研磨后,取约 0.1 g 样品加 1 mL 超纯水(电阻率 $>18 \text{ M}\Omega$) 混匀。室温下以 40 Hz 超声振荡 30 min,随后 15 000 g 离心 20 min,取上清液过 0.45 μm 尼龙滤膜。采用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用仪(型号 NexION 300X,PerkinElmer 公司产品)测定各形态硒含量,其中阴离子交换柱为 Hamilton PRP 100、流动相为 4.5 mmol/L 柠檬酸(pH 值 4.5)。

1.7 转录组测序与数据分析

将水稻野生型(ZH11)、*osshmt5-1* 突变体和 *osshmt5-3* 突变体水培 21 d 后,分别采集地下部和地上部,水稻总 RNA 提取、文库构建和基于 Illumina NovaSeq 6000 平台的高通量测序分析由上海凌恩生物科技有限公司完成。差异表达基因的筛选标准为 $| \text{差异倍数}(FC) | \geq 2$ 且错误发现率(FDR) ≤ 0.05 。差异表达基因 GO 富集分析筛选标准为 P 值 ≤ 0.05 。

1.8 数据处理与分析

采用 SPSS Statistics v.25.0 软件进行单因素方差分析,比较差异显著性。

2 结果与分析

2.1 SHMT 家族进化树分析

基于氨基酸序列比对发现,水稻中有 5 个 *OsSHMT*,拟南芥中有 7 个 *AtSHMT*。利用 MEGA10 软件构建系统发育树,如图 1 所示,其可分成 3 个亚家族,水稻中 *OsSHMT4*(*OsCADT1*) 与 *OsSHMT5* 的同源性最高,约 84%,拟南芥中 *AtSHMT7*(*MSA1*) 与 *AtSHMT6* 的同源性最高,约 78%,这 4 个酶属于同一 SHMT 亚家族分支,表明他们在功能和定位上存在一定的相似性。水稻 *OsSHMT1* 与拟南芥 *AtSHMT1-3* 属于同一 SHMT 亚家族,且这些酶均定位于质体^[5-7]。水稻 *OsSHMT2-3* 和拟南芥 *AtSHMT4-5* 属于同一 SHMT 亚家族,但其生物学功能尚不明确。

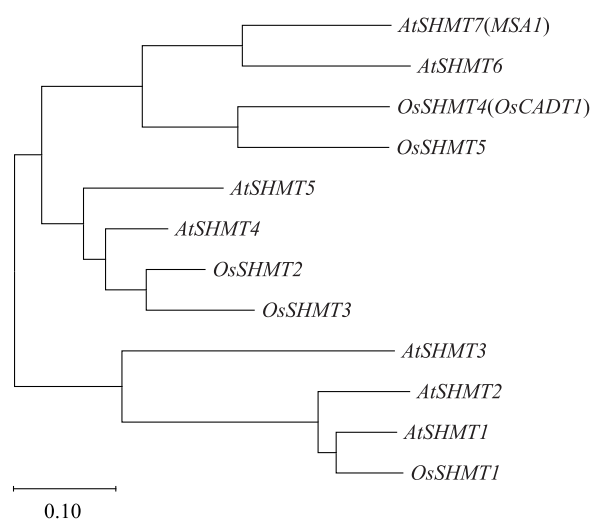


图1 水稻和拟南芥中丝氨酸羟甲基转移酶家族进化树

Fig.1 The phylogenetic tree of the serine hydroxymethyltransferase family in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*

2.2 OsSHMT5 蛋白亚细胞定位

为进一步探究 *OsSHMT4* (*OsCADT1*) 与 *OsSHMT5* 的同源性,需要明确 *OsSHMT5* 蛋白的亚细胞定位。通过 35S 强启动子驱动 C 端融合增强型绿色荧光蛋白基因(*eGFP*)的 *OsSHMT5* 在烟草叶片中瞬时表达,如图 2 所示,叶肉细胞的细胞核中呈现明显绿色荧光信号;空载对照 35S::eGFP 在烟草叶片中瞬时表达,绿色荧光信号分散于整个细胞中。结果表明,水稻 *OsSHMT5* 蛋白定位于细胞核中。

2.3 敲除 *OsSHMT5* 基因对水稻硫元素和硒元素积累的影响

利用 CRISPR/Cas9 技术靶向敲除 *OsSHMT5* 基因第 1 个外显子区域,通过测序鉴定到 3 个 *OsSHMT5* 缺失纯合突变体(*osshmt5-1*、*osshmt5-2* 和 *osshmt5-3*)。如图 3 所示,*osshmt5-1* 突变体 *OsSHMT5* 基因第 1 个外显子被插入 2 个单碱基 A,*osshmt5-2* 突变体 *OsSHMT5* 基因第 1 个外显子被插入碱基 A 和

T,均导致移码突变。突变体 *osshmt5-3* *OsSHMT5* 基因编码区上游缺失 39 个碱基,下游缺失 2 个碱基。

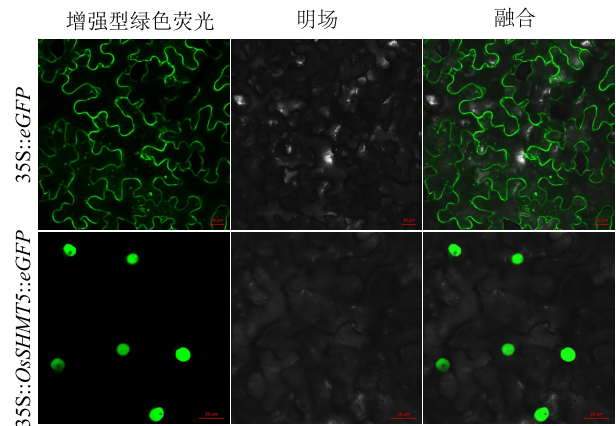


图 2 *OsSHMT5* 蛋白在烟草叶片中的亚细胞定位

Fig.2 Subcellular localization of *OsSHMT5* in tobacco leaves

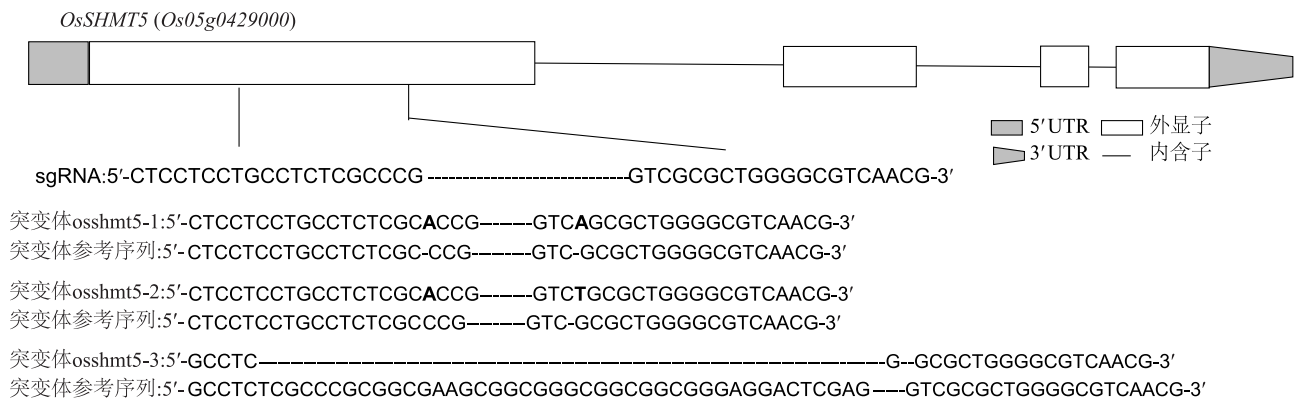


图 3 突变体 *osshmt5-1*、*osshmt5-2* 和 *osshmt5-3* 的突变类型

Fig.3 Mutation types of *osshmt5-1*, *osshmt5-2* and *osshmt5-3*

如图 4 所示,水培条件下 21 d 苗龄的水稻野生型 (ZH11) 和突变体 *osshmt5-1*、*osshmt5-2*、*osshmt5-3* 的表型没有明显差异。野生型、突变体 *osshmt5-1*、*osshmt5-2* 和 *osshmt5-3* 的地上部和地下部硫含量以及硒含量均无显著差异 ($P < 0.05$)。该试验结果表明,*OsSHMT5* 突变对水稻硫含量和硒含量无显著影响。如表 1 所示,野生型、突变体 *osshmt5-1*、*osshmt5-2* 和 *osshmt5-3* 的地上部和地下部锰、锌、镁、磷、钾、钙、铁、铜和钴含量均无显著差异 ($P < 0.05$)。

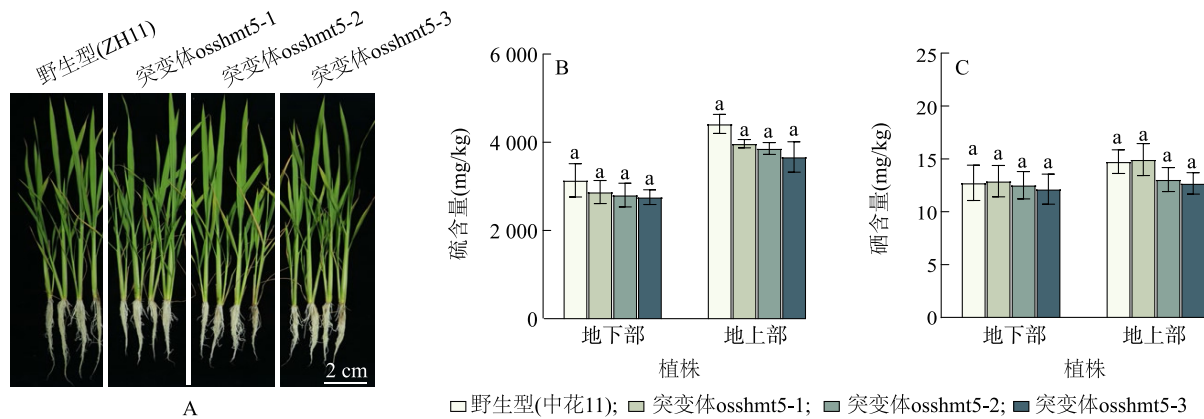
2.4 敲除 *OsSHMT5* 基因对水稻中各形态硒含量的影响

硒酸盐为植物中无机硒的主要存在形态,亚硒

酸盐为硒酸盐被还原的产物,硒代胱氨酸 (SeCys2) 和硒代甲硫氨酸 (SeMet) 是植物中有机硒的主要形态。如图 5 所示,野生型、*osshmt5-1*、*osshmt5-2* 和 *osshmt5-3* 的地下部和地上部的硒酸盐、亚硒酸盐、硒代胱氨酸、硒代甲硫氨酸含量均无显著差异 ($P > 0.05$),表明 *OsSHMT5* 基因突变对水稻中不同形态硒的含量均无影响。

2.5 敲除 *OsSHMT5* 基因对水稻硫酸盐/硒酸盐吸收与同化途径的影响

为探究敲除 *OsSHMT5* 基因突变在转录水平对水稻硫酸盐/硒酸盐吸收和同化的影响,利用 RNA-Seq 技术分析差异基因及其富集通路。选取突变类



A:水稻野生型(中花 11)与 3 种不同敲除类型的 *osshmt5* 突变体水培 21 d 的表型。B 和 C 分别为水培实验中野生型和突变体 *osshmt5* 硫和硒含量(以干物质计)。同一部位图柱上不同小写字母表示不同基因型间的差异达显著水平($P<0.05$),以干物质计。

图 4 水稻野生型和 *osshmt5* 突变体表型及硫、硒含量

Fig.4 Phenotypes and the contents of sulfur and selenium of the wild type and *osshmt5* mutants of rice

表 1 水稻野生型和 *osshmt5* 突变体地下部和地上部的元素含量

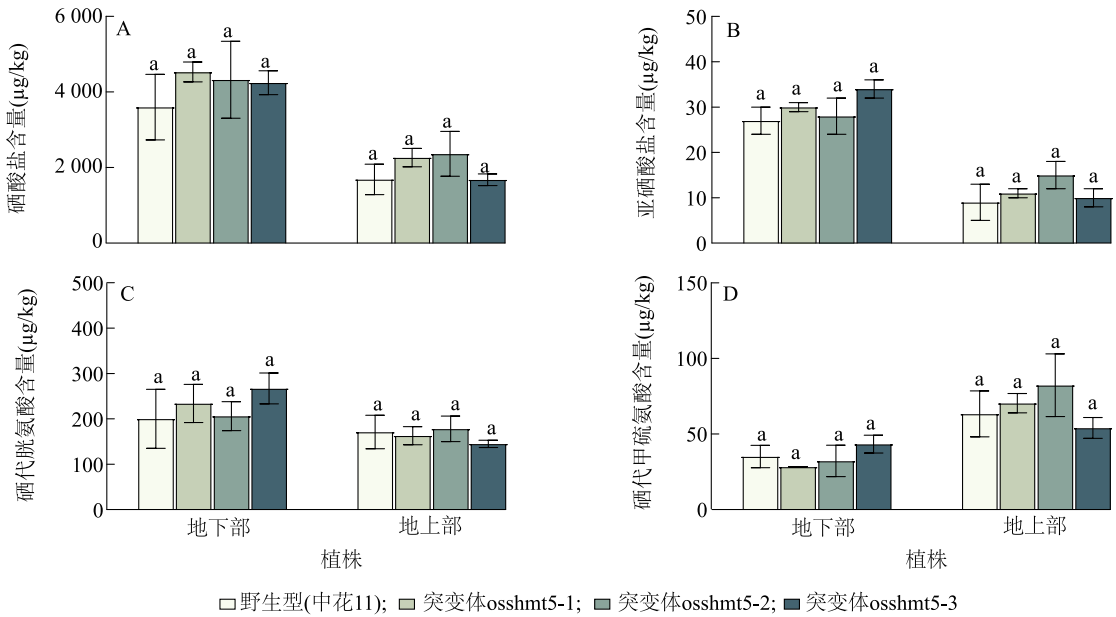
Table 1 The contents of nutrient elements in the shoot and root of the wild type and *osshmt5* mutants of rice

矿质元素	部位	野生型(中花 11)	突变体 <i>osshmt5</i> -1	突变体 <i>osshmt5</i> -2	突变体 <i>osshmt5</i> -3
镁含量 (mg/kg)	地下部	3 031.0±157.0a	2 791.0±157.0a	2 550.0±191.0a	2 688.0±199.0a
	地上部	4 112.0±284.0a	3 837.0±289.0a	4 061.0±289.0a	3 401.0±228.0a
磷含量 (mg/kg)	地下部	3 994.0±362.0a	4 023.0±111.0a	3 710.0±158.0a	3 564.0±320.0a
	地上部	8 139.0±238.0a	7 649.0±97.0a	7 748.0±291.0a	7 472.0±328.0a
钾含量 (mg/kg)	地下部	5 687.0±507.0a	6 055.0±724.0a	5 977.0±199.0a	5 441.0±1 039.0a
	地上部	23 949.0±1 784.0a	20 672.0±618.0a	19 243.0±1 968.0a	19 034.0±1 508.0a
钙含量 (mg/kg)	地下部	703.0±52.0a	675.0±18.0a	536.0±9.0a	534.0±126.0a
	地上部	2 076.0±268.0a	1 947.0±282.0a	2 072.0±225.0a	1 603.0±200.0a
锰含量 (mg/kg)	地下部	8.6±0.4a	6.9±0.1a	6.5±0.2a	7.3±0.8a
	地上部	64.4±5.5a	61.9±6.0a	56.2±4.1a	53.0±3.1a
铁含量 (mg/kg)	地下部	335.0±57.0a	315.0±23.0a	291.0±11.0a	328.0±40.0a
	地上部	86.0±1.0a	86.0±10.0a	88.0±9.0a	82.0±23.0a
钴含量 (mg/kg)	地下部	78.0±18.0a	75.0±2.0a	58.0±2.0a	73.0±4.0a
	地上部	8.6±2.3a	10.6±0.6a	10.6±3.5a	6.5±2.7a
铜含量 (mg/kg)	地下部	69.0±14.0a	57.0±4.0a	48.0±3.0a	55.0±3.0a
	地上部	14.6±0.8a	13.1±0.6a	12.9±0.6a	11.0±0.5a
锌含量 (mg/kg)	地下部	33.0±3.0a	27.0±1.0a	27.0±2.0a	25.0±3.0a
	地上部	50.0±5.0a	56.0±5.0a	45.0±15.0a	51.0±7.0a

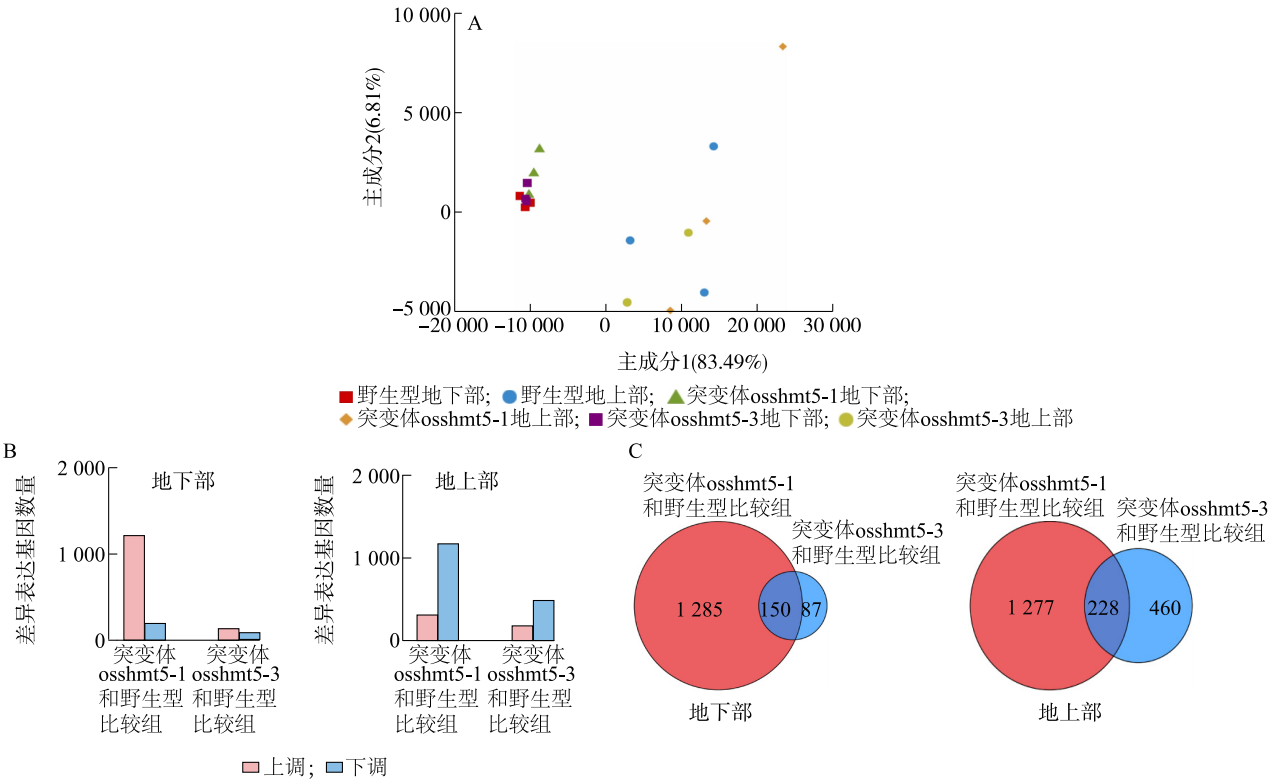
同一行数据后相同小写字母表示差异不显著($P>0.05$)。以干物质计。

型差异大的突变体 *osshmt5*-1 和 *osshmt5*-3 作为研究对象。如图 6 所示,与水稻野生型相比,突变体 *osshmt5*-1 地下部有 1 227 个基因相对表达量上升,有 208 个基因相对表达量下降,其地上部有 322 个基因相对表达量上升,有 1 183 个基因相对表达量下降;突变体 *osshmt5*-3 地下部有 147 个基因相对

表达量上升,有 90 个基因相对表达量下降,其地上部有 190 个基因相对表达量上升,有 498 个基因相对表达量下降。对于地下部,2 个突变体和野生型比较组中共同存在 150 个差异表达基因;对于地上部,2 个突变体和野生型比较组中共同存在 228 个差异表达基因。



同一部位相同小写字母表示不同基因型间差异无显著 ($P > 0.05$), 以鲜重计。
图 5 突变体 *osshmt5* 和野生型地下部和地上部各形态硒的含量
Fig.5 Contents of various forms of selenium in the root and shoot of *osshmt5* mutants and the wild type

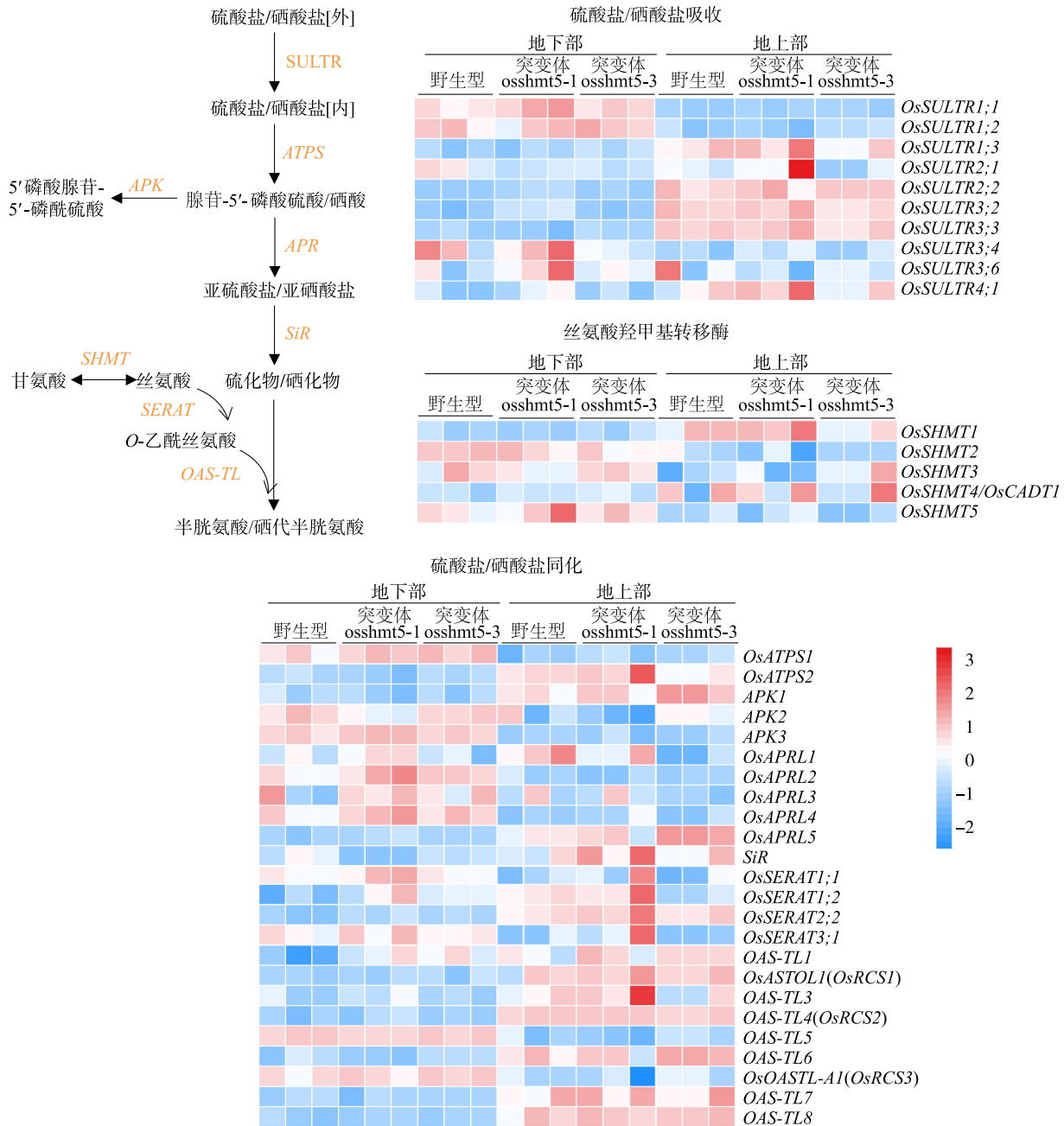


A: 主成分分析。B: 突变体与野生型比较组差异表达基因数。C: 差异表达基因的 Venn 分析。
图 6 突变体 *osshmt5* 和野生型差异表达基因数量
Fig.6 The number of differentially expressed genes between the *osshmt5* mutant and the wild type

如图 7 所示, 水稻突变体 *osshmt5* 的地下部和 地上部硫酸盐转运蛋白 *OsSULTR1*、*OsSULTR2*、*Os-*

SULTR3 和 *OsSULTR4* 亚家族基因的相对表达量和野生型相比均无显著差异,参与硫酸盐/硒酸盐同化的 *OsATP*、*APK*、*OsAPRL*、*SiR*、*OsSERAT* 和 *OAS-TL* 基因相对表达量和野生型相比也无显著差异。基于 RNA-Seq 数据发现, *OsSHMT5* 主要在水稻地下部表

达,而其同源基因 *OsSHMT4* (*OsCADT1*) 主要在地上部表达, *OsSHMT1* 主要在地上部表达, *OsSHMT2* 和 *OsSHMT3* 主要在地下部表达。但是,水稻突变体 *osshmt5* 的地下部和地上部 5 个 *OsSHMT* 基因的相对表达量与野生型相比均无显著差异。



SULTR:硫酸盐转运蛋白;ATPS:三磷酸腺苷硫酸化酶;APK:腺苷 5'-磷酸硫酸激酶;APR:5'磷酸硫酸还原酶;SiR:亚硫酸还原酶;SERAT:丝氨酸乙酰转移酶;OAS-TL:O-乙酰丝氨酸(巯基)裂合酶;SHMT:丝氨酸羟甲基转移酶。

图 7 突变体 *osshmt5* 地下部和地上部与丝氨酸羟甲基转移酶以及硫酸盐/硒酸盐吸收和同化相关基因的表达模式

Fig.7 Expression patterns of genes related to serine hydroxymethyltransferase and sulfate/selenate absorption and assimilation in the root and shoot of *osshmt5* mutants

2.6 *OsSHMT5* 基因敲除突变体和野生型差异表达基因 KEGG/GO 富集分析

分别对水稻野生型与突变体 *osshmt5-1*、*osshmt5-3* 地上部和地下部的差异表达基因进行 KEGG 富集分析。结果如图 8 所示,对于地上部,突变体 *osshmt5-1* 和野生型比较组中,差异表达基因显著富集于谷胱甘肽代谢途径、甘油磷脂代谢途径和植物激素信号转导途径;对于地下部,突变体 *osshmt5-1*

和野生型比较组中,差异表达基因显著富集于光合生物中的碳固定途径、乙醛酸和二羧酸代谢途径、碳代谢途径和不同环境中的微生物代谢途径。对于地上部,突变体 *osshmt5-3* 和野生型比较组中不存在差异表达基因显著富集的途径;对于地下部,突变体 *osshmt5-3* 和野生型比较组中,差异表达基因显著富集于脂肪酸延长途径、二萜类生物合成途径、角质、木栓质和蜡生物合成途径、

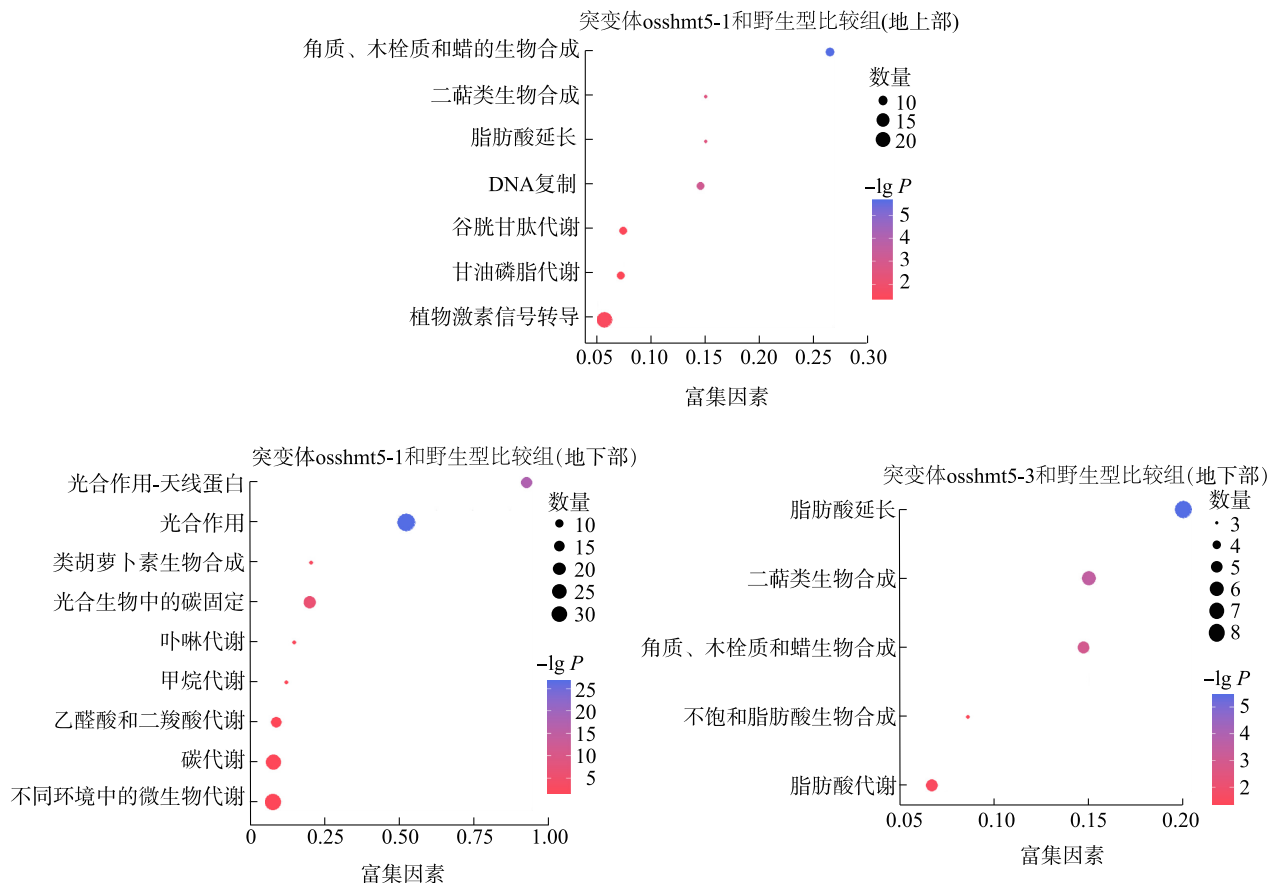


图 8 突变体 *osshmt5* 和野生型差异表达基因 KEGG 富集分析

Fig.8 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes between *osshmt5* mutants and the wild type

如图 9、表 2 所示,在 GO 富集分析和功能注释中,对于地下部,突变体 *osshmt5-1* 和野生型比较组、突变体 *osshmt5-3* 和野生型比较组,差异表达基因主要具有四吡咯结合 (GO:0046906)、血红素结合 (GO:0020037)、氧化还原酶活性 (GO:0016705 和 GO:0016491)、电子转移活性 (GO:0009055) 和铁离子结合 (GO:0005506) 等分子功能;对于地上部,突变体 *osshmt5-1* 和野生型比较组、突变体 *osshmt5-3* 和野生型比较组,差异表达基因主要具有转录调节因子活性 (GO:0140110)、分子功能

调节因子 (GO:0098772)、内肽酶调节活性 (GO:0061135)、肽酶调节活性 (GO:0061134)、序列特异性 DNA 结合 (GO:0043565)、肽酶抑制剂活性 (GO:0030414)、水解酶活性 (GO:0016798)、转移酶活性 (GO:0016747)、脂质结合 (GO:0008289)、铜离子结合 (GO:0005507)、丝氨酸型内肽酶抑制剂活性 (GO:0004867)、内肽酶抑制剂活性 (GO:0004866)、酶抑制剂活性 (GO:0004857)、水解酶活性 (GO:0004553) 和 DNA 结合转录因子活性 (GO:0003700) 等分子功能。

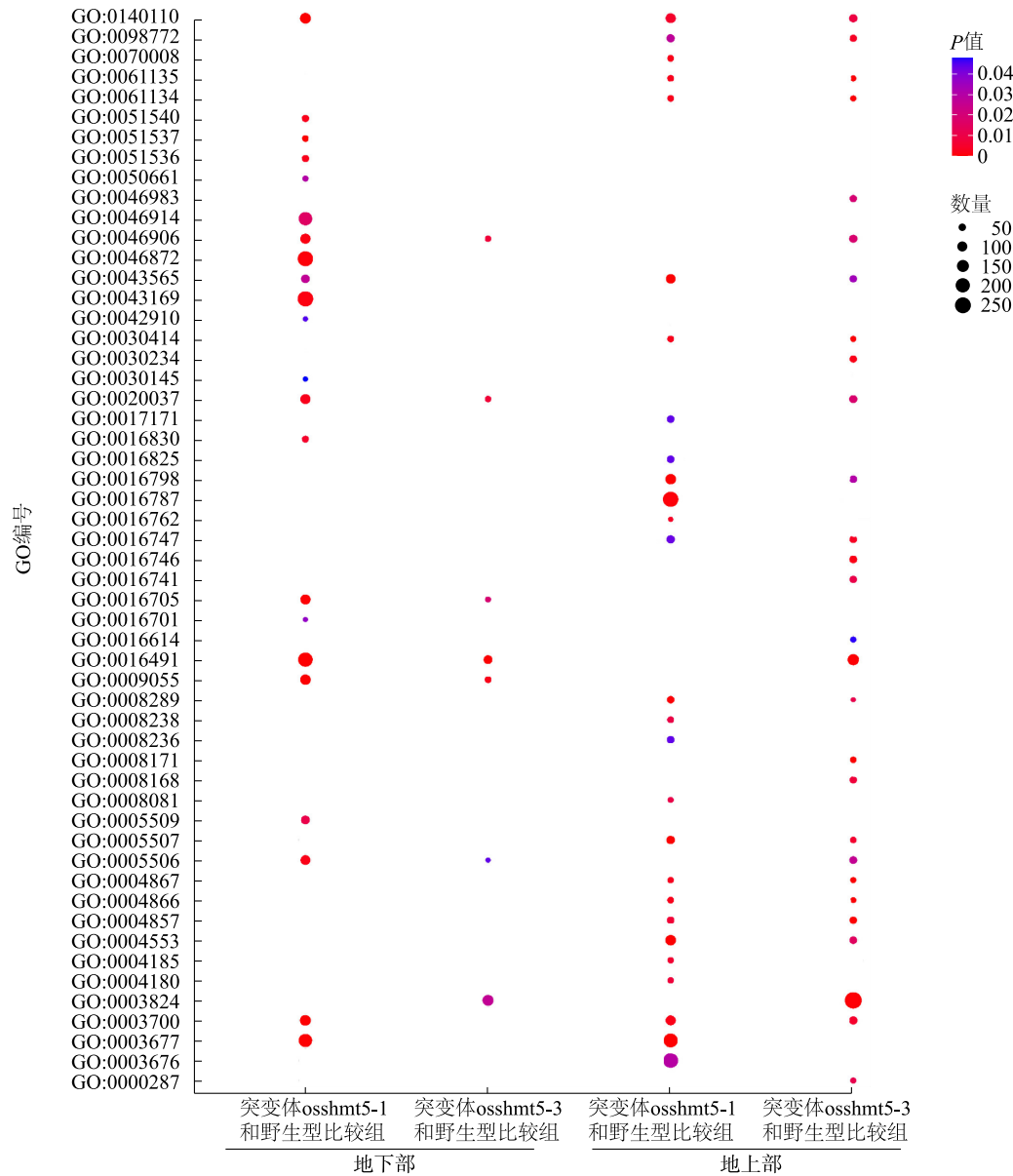


图 9 突变体 *osshmt5* 和野生型差异表达基因 GO 富集分析
Fig.9 GO enrichment analysis of differentially expressed genes between *osshmt5* mutants and the wild type

表 2 GO 功能注释

Table 2 Go function annotations

GO 编号	功能	GO 编号	功能
GO:0140110	转录调节因子活性	GO:0016746	转移酶活性(转移酰基)
GO:0098772	分子功能调节因子	GO:0016741	转移酶活性(转移一碳基团)
GO:0070008	丝氨酸型外肽酶活性	GO:0016705	氧化还原酶活性(作用于成对供体,伴随分子氧的掺入或还原)
GO:0061135	内肽酶调节活性	GO:0016701	氧化还原酶活性(作用于单个供体并掺入分子氧)
GO:0061134	肽酶调节活性	GO:0016614	氧化还原酶活性(作用于供体的 CH-OH 基团)
GO:0051540	金属簇结合	GO:0016491	氧化还原酶活性
GO:0051537	二铁二硫簇结合	GO:0009055	电子转移活性

续表2 Continued2

GO 编号	功能	GO 编号	功能
GO:0051536	铁-硫簇结合	GO:0008289	脂质结合
GO:0050661	NADP 结合	GO:0008238	外肽酶活性
GO:0046983	蛋白质二聚化活性	GO:0008236	丝氨酸型肽酶活性
GO:0046914	过渡金属离子结合	GO:0008171	O-甲基转移酶活性
GO:0046906	四吡咯结合	GO:0008168	甲基转移酶活性
GO:0046872	金属离子结合	GO:0008081	磷酸二酯水解酶活性
GO:0043565	序列特异性 DNA 结合	GO:0005509	钙离子结合
GO:0043169	阳离子结合	GO:0005507	铜离子结合
GO:0042910	异生物质跨膜转运蛋白活性	GO:0005506	铁离子结合
GO:0030414	肽酶抑制剂活性	GO:0004867	丝氨酸型内肽酶抑制剂活性
GO:0030234	酶调节活性	GO:0004866	内肽酶抑制剂活性
GO:0030145	锰离子结合	GO:0004857	酶抑制剂活性
GO:0020037	血红素结合	GO:0004553	水解酶活性(水解 O-糖基化合物)
GO:0017171	丝氨酸水解酶活性	GO:0004185	丝氨酸型羧肽酶活性
GO:0016830	碳-碳裂解酶活性	GO:0004180	羧肽酶活性
GO:0016825	水解酶活性(作用于酸性磷-氮键)	GO:0003824	催化活性
GO:0016798	水解酶活性(作用于糖基键)	GO:0003700	DNA 结合转录因子活性
GO:0016787	水解酶活性	GO:0003677	DNA 结合
GO:0016762	木葡聚糖:木葡糖基转移酶活性	GO:0003676	核酸结合
GO:0016747	转移酶活性(转移非氨酰基的酰基)	GO:0000287	镁离子结合

3 讨论

丝氨酸羟甲基转移酶可参与植物体内丝氨酸和甘氨酸的互相转化,为甲基合成、核苷酸合成和氨基酸代谢等提供一碳单位^[6]。在本研究中,基于氨基酸序列比对挖掘到已报道的 *OsSHMT4* (*OsCADT1*) 的高度同源蛋白酶 *OsSHMT5*。亚细胞定位结果表明,*OsSHMT5* 蛋白定位于细胞核,该结果与其亚家族中水稻 *OsSHMT4* (*OsCADT1*) 和拟南芥 *AtSHMT7* (*MSA1*) 的定位结果一致^[12-13]。水稻 *OsSHMT1* 以及拟南芥 *AtSHMT1* 和 *AtSHMT2* 定位于线粒体,其基因体外表达产物已被验证具有丝氨酸羟甲基转移酶 (*SHMT*) 催化活性^[5-6,29]。将水稻的 *OsSHMT4* (*OsCADT1*)、*OsSHMT5* 和拟南芥的 *AtSHMT7* (*MSA1*) 基因在酵母甘氨酸缺陷型菌株中进行异源表达,无法使这些酵母菌株恢复正常的生长表型^[13]。水稻 *OsSHMT2* 和 *OsSHMT3* 分别定位于细胞质和叶绿体^[10]。在体外表达试验中,未检测到 *OsSHMT3*、*Os-*

SHMT4 (*OsCADT1*) 和 *OsSHMT5* 具有 *SHMT* 活性,但酵母双杂交试验结果表明,*OsSHMT4* (*OsCADT1*) 可与 *OsSHMT3* 或 *OsSHMT5* 互作^[14]。水稻中的 5 个 *OsSHMT* 都可形成同源二聚体,且 *OsSHMT3* 也可与 *OsSHMT2*、*OsSHMT4* 和 *OsSHMT5* 结合成异源二聚体^[10]。*OsSHMT3* 敲除突变体中, *SHMT* 活性下降 35%,而 *OsSHMT4* (*OsCADT1*) 敲除突变体 flo20-1 中, *SHMT* 活性下降 64%,这表明 *OsSHMT4* (*OsCADT1*) 在调控 *SHMT* 活性方面可能比 *OsSHMT3* 发挥更重要的作用^[14]。

基于前期研究发现 *OsSHMT4* (*OsCADT1*) 突变可增强水稻籽粒中硫和硒的含量,本研究将 *OsSHMT4* (*OsCADT1*) 的同源基因 *OsSHMT5* 作为目的基因,利用 CRISPR/Cas9 技术敲除中花 11 的 *OsSHMT5* 基因,得到 3 种不同突变类型的纯合突变体 *os-shmt5-1*、*osshmt5-2*、*osshmt5-3*。水培条件下,这 3 种突变体与野生型的生长表型无显著差异。外源添加低浓度硒酸钠,突变体 *osshmt5* 地下部和地上部中

硫含量和硒含量与野生型相比无显著差异 ($P < 0.05$), 且硒酸盐、亚硒酸盐、硒代胱氨酸和硒代甲硫氨酸与野生型相比也无显著差异 ($P < 0.05$)。在转录水平, 突变体 *osshmt5* 水稻硫酸盐/硒酸盐的吸收和同化相关基因的相对表达量和野生型相比无显著差异。试验结果说明, 同源基因 *OsSHMT5* 与 *OsSHMT4* (*OsCADT1*) 在调控水稻硫和硒积累方面存在差异, 这可能是由于 *OsSHMT5* 不参与调控水稻硫和硒的积累, 或者是由于 *OsSHMT4* (*OsCADT1*) 功能远强于 *OsSHMT5*, 导致在 *OsSHMT4* (*OsCADT1*) 功能正常的情况下, *OsSHMT5* 突变不影响水稻硫和硒的积累。本研究还尝试分别在水稻突变体 *cad1* (中嘉早 17 背景) 中单敲除 *OsSHMT5* 基因及中花 11 背景下同时敲除 *OsSHMT4* (*OsCADT1*) 和 *OsSHMT5* 基因, 但均未能获得纯合双基因突变植株, 表明这两个基因在植物生长发育中起到重要作用。已有研究结果表明, *OsSHMT4* (*OsCADT1*) 或 *AtSHMT7* (*MAS1*) 的功能缺陷会影响 *S*-腺苷甲硫氨酸含量, *S*-腺苷甲硫氨酸是甲基化反应的关键供体, 其通过影响 DNA 或/和组蛋白的甲基化过程, 从表观遗传学角度调控相关基因的表达^[12-14]。 *OsSHMT4* (*OsCADT1*) 功能缺陷会导致水稻 *OsSULTR1;1* 的表达量上升; *AtSHMT7* (*MAS1*) 功能缺陷会导致拟南芥 *AtSULTR1;2* 的表达量上升, 从而促进根部对硫酸盐/硒酸盐的吸收。此外, *OsSHMT4* (*OsCADT1*) 还可以与 *S*-腺苷甲硫氨酸合成酶 (*OsSAMS2*) 互作, 进一步调控 *S*-腺苷甲硫氨酸的合成和代谢^[14]。

转录组数据分析结果显示, *OsSHMT2*、*OsSHMT3* 和 *OsSHMT5* 基因主要在地下部表达, *OsSHMT1* 基因主要在地上部表达, 而 *OsSHMT4* 基因在地下部和地上部的相对表达量相近。转录因子 B3、BBR-BPC、MYB、MYB-related 和 TCP 可能与 *OsSHMT5* 启动子区域互作, 从而调控 *OsSHMT5* 基因的表达。同时细胞分裂素抑制 *OsSHMT5* 的表达, 而生长素和茉莉酸促进 *OsSHMT5* 的表达, 表明 *OsSHMT5* 可能参与水稻生长发育的调控^[10]。对于地下部, 突变体和野生型比较组中的差异表达基因主要具有氧化还原酶活性、电子转移活性、铁离子结合和四吡咯结合等分子功能, 对于地上部, 突变体和野生型比较组中的差异表达基因主要具有转录调节因子活性、分子功能调节因子、内肽酶调节活性、肽酶抑制剂活性、铜离子结合等分子功能。

4 结 论

本研究对水稻丝氨酸羟甲基转移酶基因 *OsSHMT5* 进行了分子克隆和功能解析, 结果表明, (1) *OsSHMT5* 与 *OsSHMT4* (*OsCADT1*) 同源性较高, 且它们分别编辑的 2 种蛋白质均定位于细胞核中, 但 *OsSHMT5* 突变对水稻硫酸盐/硒酸盐吸收和同化途径无显著调控作用, 其功能突变不影响水稻中硫和硒的积累。(2) 基于转录水平分析发现, 在水稻地下部, *OsSHMT5* 可能具有四吡咯结合、血红素结合、氧化还原酶活性、电子转移活性和铁离子结合等分子功能; 在地上部, *OsSHMT5* 可能具有转录调节因子活性、分子功能调节因子、内肽酶调节活性、肽酶抑制剂活性、铜离子结合等分子功能。

参考文献:

- [1] MCNEIL J B, BOGNAR A L, PEARLMAN R E. *In vivo* analysis of folate coenzymes and their compartmentation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Genetics*, 1996, 142(2): 371-381.
- [2] LI R, MOORE M, KING J. Investigating the regulation of one-carbon metabolism in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2003, 44(3): 233-241.
- [3] 赵玉琪, 周志林, 唐 君, 等. 甘薯、番茄和拟南芥中丝氨酸羟甲基转移酶基因家族功能研究[J]. 合肥工业大学学报(自然科学版), 2022, 45(12): 1705-1714.
- [4] 马 莉, 陈丽梅. 植物丝氨酸羟甲基转移酶基因研究进展[J]. 生物技术通报, 2008(2): 15-19.
- [5] VOLL L M, JAMAI A, RENNÉ P, et al. The photorespiratory *Arabidopsis shm1* mutant is deficient in *SHM1*[J]. *Plant Physiology*, 2006, 140(1): 59-66.
- [6] ZHANG Y, SUN K H, SANDOVAL F J, et al. One-carbon metabolism in plants: characterization of a plastid serine hydroxymethyltransferase[J]. *The Biochemical Journal*, 2010, 430(1): 97-105.
- [7] WANG D K, LIU H Q, LI S J, et al. Characterization and molecular cloning of a serine hydroxymethyltransferase 1 (*OsSHM1*) in rice[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2015, 57(9): 745-756.
- [8] WU J X, ZHANG Z G, ZHANG Q, et al. The molecular cloning and clarification of a photorespiratory mutant, *oscdm1*, using enhancer trapping[J]. *Frontiers in Genetics*, 2015, 6: 226.
- [9] FU S, WANG K, MA T T, et al. An evolutionarily conserved C4HC3-type E3 ligase regulates plant broad-spectrum resistance against pathogens[J]. *Plant Cell*, 2022, 34(5): 1822-1843.
- [10] PAN T, JIN H M, ZHOU C H, et al. Rice serine hydroxymethyltransferases: evolution, subcellular localization, function and perspectives[J]. *Plants*, 2024, 13(8): 1116.
- [11] MISHRA P, JAIN A, TAKABE T, et al. Heterologous expression

- of serine hydroxymethyltransferase-3 from rice confers tolerance to salinity stress in *E. coli* and *Arabidopsis* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 217.
- [12] HUANG X Y, CHAO D Y, KOPRIVOVA A, et al. Nuclear localised more sulphur accumulation 1 epigenetically regulates sulphur homeostasis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *PLoS Genetics*, 2016, 12 (9): e1006298.
- [13] CHEN J, HUANG X Y, SALT D E, et al. Mutation in *OsCADT1* enhances cadmium tolerance and enriches selenium in rice grain [J]. *New Phytologist*, 2020, 226(3): 838-850.
- [14] YAN M, PAN T, ZHU Y, et al. Flourey endosperm20 encoding SHMT4 is required for rice endosperm development [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(8): 1438-1440.
- [15] MATSUSAKA H, FUKUDA M, ELAKHDAR A, et al. Serine hydroxymethyltransferase participates in the synthesis of cysteine-rich storage proteins in rice seed [J]. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 2021, 312: 111049.
- [16] ELLIS D R, SALT D E. Plants, selenium and human health [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, 6(3): 273-279.
- [17] BOYD R. Selenium stories [J]. *Nature Chemistry*, 2011, 3(7): 570.
- [18] HARTHILL M. Review: micronutrient selenium deficiency influences evolution of some viral infectious diseases [J]. *Biological Trace Element Research*, 2011, 143(3): 1325-1336.
- [19] RAYMAN M P. Selenium intake, status, and health: a complex relationship [J]. *Hormones (Athens, Greece)*, 2020, 19(1): 9-14.
- [20] Food and Agriculture Organization of the United Nations. Human vitamin and mineral requirements: report of a joint FAO/WHO expert consultation [R]. Bangkok: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2002.
- [21] TAN L C, NANCHARAI Y V, VAN HULLEBUSCH E D, et al. Selenium: environmental significance, pollution, and biological treatment technologies [J]. *Biotechnology Advances*, 2016, 34(5): 886-907.
- [22] SCHIAVON M, NARDI S, DALLA VECCHIA F, et al. Selenium biofortification in the 21 century: status and challenges for healthy human nutrition [J]. *Plant and Soil*, 2020, 453(1/2): 245-270.
- [23] SUN G X, LIU X, WILLIAMS P N, et al. Distribution and translocation of selenium from soil to grain and its speciation in paddy rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(17): 6706-6711.
- [24] WILLIAMS P N, LOMBI E, SUN G X, et al. Selenium characterization in the global rice supply chain [J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(15): 6024-6030.
- [25] ZHAO F J, MCGRATH S P. Biofortification and phytoremediation [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2009, 12(3): 373-380.
- [26] SPARKES I A, RUNIONS J, KEARNS A, et al. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants [J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(4): 2019-2025.
- [27] MA X L, ZHANG Q Y, ZHU Q L, et al. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants [J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(8): 1274-1284.
- [28] 陈杰. 水稻和拟南芥镉耐性相关基因 *OsSHM4* 和 *PP2A-4C* 的克隆和功能解析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2019.
- [29] ENGEL N, EWALD R, GUPTA K J, et al. The presequence of *Arabidopsis* serine hydroxymethyltransferase SHM2 selectively prevents import into mesophyll mitochondria [J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(4): 1711-1720.

(责任编辑: 成纾寒)