

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.00445

蛋白和核酸合成抑制剂对氮素诱导甜菜谷氨酰胺合成酶基因表达的影响

陈胜勇 侯静** 李彩凤* 马凤鸣 尹春佳 黄兆峰

东北农业大学农学院, 黑龙江哈尔滨 150030

摘要: 谷氨酰胺合成酶(GS)家族是甜菜等高等植物体内氨态氮同化酶,也是氮利用与循环的核心构件。为揭示在氮素诱导下放线菌素 D(AMD)和放线菌酮(CHM)对甜菜 GS 基因调控表达的影响,采用半定量 RT-PCR 技术,对甜菜的胞液型谷氨酰胺合成酶基因(GS1)和质体型谷氨酰胺合成酶基因(GS2)进行 mRNA 的表达检测,同时进行 GS 活性的测定。结果表明,甜菜幼苗经过低浓度 AMD 处理 2~6 h,GS 活性略有增加,9 h 后,高和低浓度 AMD 处理下的 GS 活性都下降,且随着浓度的增加下降幅度加大,同时 GS1mRNA 和 GS2mRNA 的相对量随浓度的增加而下降。CHM 处理甜菜幼苗 9 h 后,随着浓度的增加和处理时间的延长,GS 活性下降幅度增加,但 GS1mRNA 和 GS2mRNA 的相对量在不同 CHM 浓度处理间变化不显著。

关键词: 甜菜; 谷氨酰胺合成酶; 氮素; 放线菌素 D; 放线菌酮

Influence of Inhibitors of Nucleic Acid Synthesis and Protein Synthesis on Glutamine Synthetase Gene Expression Induced by Nitrogen in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.)

CHEN Sheng-Yong, HOU Jing**, LI Cai-Feng*, MA Feng-Ming, YIN Chun-Jia, and HUANG Zhao-Feng

College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: Glutamine synthetase (GS, EC6.3.1.2) families are the key enzymes involving in nitrogen assimilation in the higher plants as well as a core elements for nitrogen use efficiency and nitrogen recycle. The objective of this study was to reveal the effect of actinomycin D (AMD) and cycloheximide (CHM) on GS gene expression and its activities induced by nitrogen in sugar beet. GS activity in sugar beet was determined under the treatment of AMD and CHM. Gene transcripts of cytosolic glutamine synthetase (GS1) and plastidic glutamine synthetase (GS2) were detected by semi-quantitative PCR. Efficiency of GS mRNA synthesis from each sample was estimated by quantitative PCR of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The results showed that the GS activities increased slightly under the low concentration treatment of AMD for 2-6 hours, but decreased with treatment of all concentrations. The transcript level of GS1mRNA and GS2mRNA decreased with the increase of AMD concentration treated for more than 9 hours. GS activities decreased fast with the increase of CHM concentrations treated for more than 9 hours. There was no significant difference between GS1mRNA and GS2mRNA expressions in the treatments with all CHM concentrations for more than 9 hours.

Keywords: Sugar beet (*Beta vulgaris* L.); Glutamine synthetase; Nitrogen; Actinomycin D; Cycloheximide

糖用甜菜是世界主要糖料作物之一。在甜菜的生长发育过程中,氮素同化是一个十分重要的生理过程。无机氮只有转化成有机氮的形式才可以被植物体利用^[1],而谷氨酰胺合成酶(GS, EC 6.3.1.2)是这一生理过程的关键酶。GS 存在多种同工酶,根据其在亚细胞的定位,可以分为胞液型 GS1 和质体型

GS2。GS1 的功能是直接同化从土壤中吸收的、种子萌发过程中贮藏蛋白质降解产生的、衰老叶片中氮的转移再利用的和固氮形成的各种 NH_4^{+} ^[2]。GS2 的主要生理功能不但是 NO_3^- 还原生成 NH_4^+ ,更重要的是光呼吸和氨基酸代谢中调控 NH_4^+ 的再同化^[3]。有关 GS 的生物化学特性已有比较深入的研究,氮

本研究由国家自然科学基金项目(30471017 和 30771276),黑龙江省博士后科研启动基金项目(BSH-Q06103)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 李彩凤, E-mail: licaifeng1965@yahoo.com.cn; Tel: 0451-55190854

第一作者联系方式: E-mail: greenbeanyong@yahoo.com.cn(陈胜勇); E-mail: houjing84@yahoo.cn(侯静) ** 共同第一作者

Received(收稿日期): 2008-06-01; Accepted(接受日期): 2008-10-21.

素对甜菜 GS 诱导的研究主要集中在 GS 活性方面^[4-5], 而有关核酸合成和蛋白合成抑制剂对 GS 基因经氮素诱导表达的调控研究较少, 且主要涉及逆境的影响^[6-7]。王学奎等^[8]研究表明, 光诱导 GS 的重新合成, 短期调节主要是在翻译水平上起作用, 受放线菌酮的抑制, 长期调节则是在转录水平上发挥作用, 受放线菌素 D 的影响。研究证明, 光照、外源氮素、水分、NaCl、抑制剂等外界因子都能影响 GS 基因的表达^[9-19]。氮素对甜菜 GS 的作用机理尚未明确, 研究氮素诱导下甜菜 GS 基因在抑制剂处理条件下的表达变化, 能在分子水平上明确谷氨酰胺合成酶基因表达的调控机理, 对进一步进行基因操作以提高氮素利用效率具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 植物材料

二倍体纯系品种甜研 7 号, 由黑龙江大学甜菜研究所提供。

1.2 试验设计

在东北农业大学农业部寒地作物生理生态重点实验室人工气候培养室, 2006 年 7 月 19 日催芽, 7 月 21 日播种于直径 15 cm 加营养液的营养钵中, 每钵 5 粒, 基质为江沙, 改良的 Hoagland 营养液含 4.02 mmol L⁻¹ Ca(NO₃)₂·4H₂O, 1.99 mmol L⁻¹ Mg₂SO₄·7H₂O, 6.03 mmol L⁻¹ KNO₃, 1.75 mmol L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 1.03 mmol L⁻¹ KH₂PO₄, 0.15 mmol L⁻¹ EDTA-Fe, 1.0×10⁻³ mmol L⁻¹ H₃BO₃, 1.0×10⁻³ mmol L⁻¹ MnCl₂·4H₂O, 1.0×10⁻³ mmol L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O, 1.0×10⁻⁴ mmol L⁻¹ CuSO₄·5H₂O, 5.0×10⁻⁶ mmol L⁻¹ (NH₄)₆MoO₇O₂₄·4H₂O。为了维持营养液中浓度及离子平衡, 用 4% 的硝酸-磷酸混合液(1:20)调节 pH 值至 7.0 左右, 再加入 NO₃⁻-N 与 NH₄⁺-N 比例约为 4:1 的氮素以诱导甜菜幼苗, NO₃⁻以 Ca(NO₃)₂ 和 KNO₃ 为氮源, NH₄⁺以 (NH₄)₂SO₄ 为氮源, 总氮量均为 7 mmol L⁻¹。分别设放线菌素 D 和放线菌酮的浓度为 0 对照浓度, 0.5、2、5 和 10 μmol L⁻¹ 5 个梯度。待甜菜幼苗经氮素诱导 7 d 长到 3 对真叶时将预先制备好的含不同浓度的放线菌素-D 或者放线菌酮药液加入营养液, 然后分别取处理后 2、6、9、12、24 h 的幼叶立即置液氮速冻, 并于 -80℃ 冰箱保存用于总 RNA 提取和酶活测定。培养和取样均在条件一致的光照培养箱(光强约 36 μmol m⁻² s⁻¹, 温度 25℃)中进行。

1.3 GS 活力的测定

参照 Miflin 等^[20]方法, 略有改动。将 1 g 左右

的甜菜叶样放于预冷的研钵中, 每一样品共用 5 mL 咪唑-盐酸缓冲液(pH 7.2, 内含 0.05 mol L⁻¹ 咪唑、0.5 mmol L⁻¹ EDTA、0.5 mmol L⁻¹ β-巯基乙醇)研磨均匀, 在 4℃、12 000×g 离心 10 min, 上清液即为 GS 粗酶液。依次取 0.25 mol L⁻¹ 咪唑-HCl 缓冲液 1 mL, 0.5 mol L⁻¹ MgCl₂·6H₂O、50 mmol L⁻¹ EDTA-Na₂、1 mmol L⁻¹ Glu-Na₂、0.5 mol L⁻¹ 盐酸羟胺、180 mmol L⁻¹ ATP-Na₂ 各 0.2 mL 放入试管中, 再迅速加入 1 mL 粗酶液混匀, 于 35℃ 水浴反应 15 min 后立即取出, 迅速加入 1 mL 终止显色液(内含 0.37 mol L⁻¹ FeCl₃、0.67 mol L⁻¹ 三氯乙酸、0.2 mol L⁻¹ HCl)终止反应, 在 5 000×g 下离心 10 min。之后用 Carry 50 紫外-可见分光光度计(Varian)在 540 nm 下测定吸光值。酶活性用 μmol γ-谷氨酰异羟肟酸 mg⁻¹ Pr min⁻¹ (μmol GHA mg⁻¹ Pr min⁻¹) 表示。

采用考马斯亮蓝 G-250 快速测定法, 于 Carry 50 型紫外可见分光光度计在 595 nm 下测定蛋白质含量。

1.4 总 RNA 提取和鉴定

按 Trizol Reagent (Invitrogen) 公司提供的 TRIZOL (Invitrogen, Rockville MD) 试剂盒说明书提取总 RNA, 并消除总 RNA 中的 DNA。采用紫外分光光度计(Beckman, DU640)测定样品在波长 260 nm 和 280 nm 下的紫外吸收值。模板 RNA 用量按以下公式计算, 总 RNA(μg) = OD₂₆₀ × 40 (μg mL⁻¹) × 1 000(稀释倍数) × 总 RNA 溶液体积(μL)/1 000, 根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值判定 RNA 样品的纯度(比值在 1.8~2.1 为宜), 用 1.5% 琼脂糖电泳检测 RNA 质量。

1.5 反转录合成 cDNA

取各样本 RNA 2 μg 按 SuperScript III Reverse Transcriptase 试剂盒(Invitrogen)操作方法, 在一个 DEPC 处理过的 Eppendorf 离心管中加入总 RNA 2 μg, 0.5 μg μL⁻¹ Oligo(Dt)₁₈ 1 μL, 加 DEPC 处理的灭菌水补至 12 μL, 稍离心混合后 70℃ 反应 5 min, 取出后立即放于冰上, 然后加入 5×buffer 4 μL, Ribonuclease inhibitor 1 μL, 10 mmol L⁻¹ dNTP mix 2 μL, 混匀后 37℃ 反应 5 min, 再加 200 U μL⁻¹ SuperScript III Reverse Transcriptase 1 μL, 42℃ 反应 1 h, 取出放于 70℃ 加热 10 min 终止反应。获得 cDNA 模板, 保存于 -20℃, 用于 PCR 扩增。

1.6 半定量 PCR 反应

根据 GenBank 提供的甜菜 GS1 基因 *gln1* (accession No.: AF343667)、GS2 基因 *gln2* (accession No.:

AY026353)和甜菜看家基因三磷酸甘油醛脱氢酶 *GAPDH* (accession No.: EF408234)的 cDNA 序列设计特异引物。引物由 primer premier 5 软件设计, 然后在 NCBI 网站上进行 Blast 以保证引物的专一性。*GS1* 上游引物 *GS1-F* 为 5'-AAGCAAAGCAAGGAC ATTAACAGGG-3', 下游引物 *GS1-R* 为 5'-GGCTTT CCGAGGATAGTTGTTTCAG-3'; *GS2* 上游引物 *GS2-F* 为 5'-ATGGCTCAAATACTTGCACCTAACA-3', 下游引物 *GS2-R* 为 5'-TTACACATTGAGAGAG AGTCTTTGA-3'; *GAPDH* 上游引物 *GAPDH-F* 为 5'-CACATTTCTCATTCTTCACCAT-3', 下游引物 *GAPDH-R* 为 5'-TCGAAACTGCAGCTATGTAT TA-3', 均由上海生工生物工程公司合成。每样品 PCR 重复 2 次, 同时用 ddH₂O 和总 RNA 样品代替 cDNA 模板作阴性对照, 以检验是否有外源 DNA 和基因组 DNA 污染。

半定量 PCR 体系 50 μL , 于一 PCR 管中加入反转录产物 cDNA 模板 1~2 μL (cDNA 模板的加入量依据使用的不同样品看家基因 *GAPDH* mRNA 的量来确定), 10 \times buffer 5 μL , 25 mmol L⁻¹ MgCl₂ 3 μL , 10 mmol L⁻¹ dNTP mix 1 μL , *GS1-F* 和 *GS1-R* (或 *GS2-F* 和 *GS2-R* 或 *GAPDH-F* 和 *GAPDH-R*) 各 1 μL , Bio-Ready *LA-Taq* 酶 (BioFlux) 0.5 μL , 再加 RNase Free ddH₂O 补足 50 μL 。将 PCR 管在 PTC100 PCR 仪 (MJ Research) 上 94 $^{\circ}\text{C}$ 先保温 3 min, 按 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 为一个循环, 循环 30 次, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

取 PCR 产物 2 μL , DNA marker 2 μL , 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检查, 用 EB 染色, 在影像分析系统 SYNGENE (Gene Company, USA) 上摄像, 用系统自

带的 SYNGENE TOOL 软件对电泳条带进行平均光密度分析, 取 *GS* 的 PCR 产物与相应的 *GAPDH* 的 PCR 产物的光密度比值, 半定量表示 *GS* mRNA 相对表达量。

2 结果与分析

2.1 放线菌素 D 对甜菜叶片 *GS* 活性的影响

在放线菌素 D 不同处理时间和处理浓度下的 *GS* 活性均有显著或极显著差异 (图 1), 当 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 放线菌素 D 处理 2 h 时, *GS* 活性比对照高 15%, 其他浓度时 *GS* 活性均低于对照, 其中以 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 处理时 *GS* 活性显著低于其他处理浓度; 以 0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 处理 6 h, *GS* 活性稍微高于对照 (6.7%), 其他处理均低于对照, 而且随着处理浓度的增大, *GS* 活性逐渐降低 (2~10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 显著低于对照); 处理 9~24 h, 所有处理的 *GS* 活性都显著低于对照, 且浓度越大处理时间越长 *GS* 活性越低。这说明提高放线菌素 D 浓度可以在短时间内有效抑制 *GS* 活性。2~5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 放线菌素 D 处理 9~12 h, 就能有效抑制甜菜 *GS* 活性。

2.2 放线菌酮对甜菜叶片 *GS* 活性的影响

图 2 表明, 在放线菌酮不同的处理时间和处理浓度下的 *GS* 活性均有显著或极显著差异。0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 和 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 放线菌酮处理 2 h, 使 *GS* 活性分别比对照提高 20.7% 和 17.5%, 达到显著差异, 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 和 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 的 *GS* 活性分别比对照低 22.5% 和 54.4% (达显著差异)。以 0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 处理 6 h, *GS* 活性依然稍微高于对照 (6.9%), 其他处理都低于对照, 且显著差异。以放线菌酮各浓度处理 9~24 h, *GS* 活性都显著低于对照, 而且浓度越大, *GS* 活性越低,

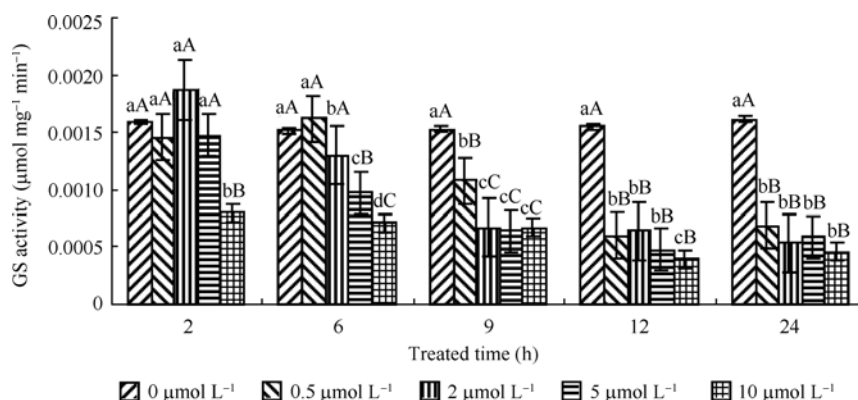


图 1 放线菌素 D 处理甜菜叶片 *GS* 活性的变化

Fig. 1 GS activities sugar beet leaves treated by actinomycin D with different concentrations for different hours

不同大小写字母表示在 0.01 和 0.05 水平差异显著。

Bars with different capitals or lowercases are significantly different at the 0.01 and 0.05 probability levels, respectively.

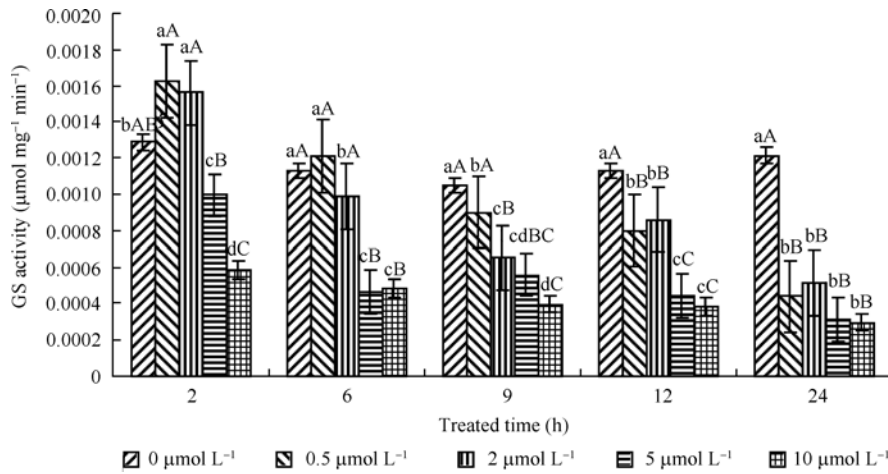


图 2 放线菌酮处理甜菜叶片 GS 活性的变化
 Fig. 2 GS activities of sugar beet leaves treated by cycloheximide with different concentrations for different hours
 不同大小写字母表示在 0.01 和 0.05 水平差异显著。
 Bars with different capitals or lowercases are significantly different at the 0.01 and 0.05 probability levels, respectively.

这说明提高放线菌酮浓度和延长处理时间可以有效抑制 GS 活性, 随着处理时间的延长, GS 活性呈下降趋势。以 5~10 µmol L⁻¹ 处理 12~24 h, 就能有效抑制甜菜 GS 活性。

2.3 放线菌素 D 对甜菜叶片 GS1mRNA 的影响

放线菌素 D 处理 9 h 后, GS 活性显著低于对照, 因此只选取处理 9 h 的甜菜幼苗代表其他时间段处理对 GS 基因进行反转录和半定量 PCR。从图 3 的电泳图和图 4 的柱状图可以看出, 在 9 h 处理时间下, 随处理浓度的提高, GS1mRNA 的量变少, 并均低于对照, 且差异显著或极显著。其中 0.5 µmol L⁻¹ 处理的 GS1mRNA 比对照少 12.3%, 2 µmol L⁻¹ 处理减少 15.3%。当处理浓度为 5 µmol L⁻¹ 和 10 µmol L⁻¹ 时, 放线菌素 D 能够明显地抑制 GS1 基因的表达(分别为减少了 51.2%和 73.3%), 差异极显著。说明氮素诱导的 GS1mRNA 的量受放线菌素 D 的调控。

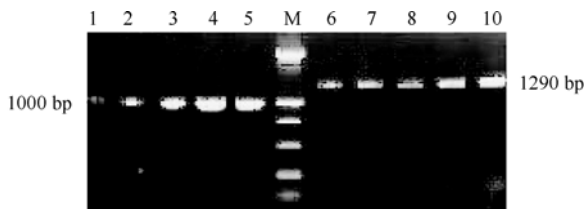


图 3 不同浓度放线菌素 D 处理 9 h 对 GS1mRNA 的影响
 Fig. 3 The electrophoresis result of GS1mRNA in treatments with different actinomycin D concentrations for 9 h
 M: DL2000 marker with 2 000, 1 000, 750, 500, 250, and 100 bp; 1-5: GS1cDNA with 10, 5, 2, 0.5, and 0 µmol L⁻¹, respectively; 6-10: GAPDHcDNA with 10, 5, 2, 0.5, and 0 µmol L⁻¹, respectively.

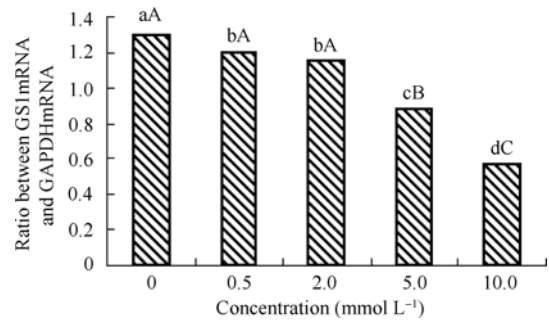


图 4 不同浓度放线菌素 D 处理 9 h 对 GS1mRNA 的影响
 Fig. 4 Transcript accumulation of GS1mRNA in treatments with different actinomycin D concentrations for 9 h
 Different capitals or lowercases are significantly different at the 0.01 and 0.05 probability levels, respectively.

2.4 放线菌素 D 对甜菜叶片 GS2mRNA 的影响

从图 5 的电泳图和图 6 的柱状图可以看出, 9 h 不同放线菌素 D 浓度处理对 GS2 基因表达的影响不同。与对照相比, 0.5~10.0 µmol L⁻¹ 放线菌素 D 处理的 GS2mRNA 相对量均低, 差异显著或极显著, 并随着处理浓度的增加, GS2mRNA 的量呈下降趋势。不过, 2~10 µmol L⁻¹ 放线菌素 D 能够明显地抑制 GS2

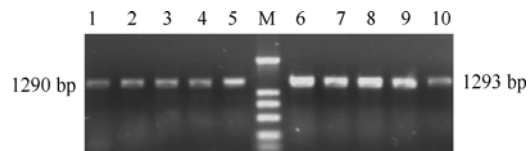


图 5 不同浓度放线菌素 D 处理 9 h 对 GS2mRNA 的影响
 Fig. 5 The electrophoresis result of GS2mRNA in the treatments with different actinomycin D concentrations for 9 h
 M: DL2000 marker with 2 000, 1 000, 750, 500, 250, and 100 bp; 1-5: GAPDHcDNA with 10, 5, 2, 0.5, and 0 µmol L⁻¹, respectively; 6-10: GS2cDNA with 0, 0.5, 2, 5, and 10 µmol L⁻¹, respectively.

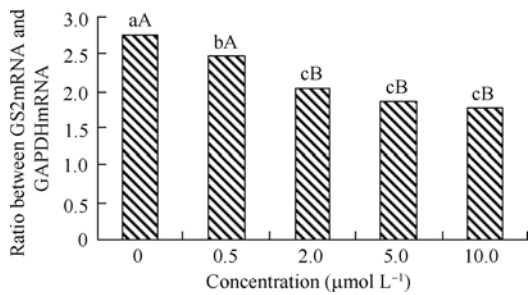


图 6 不同浓度放线菌素 D 处理 9 h 对 GS2mDNA 的影响
Fig. 6 Transcript accumulation of GS2mRNA in treatments with different actinomycin D concentrations for 9 h
 Different capitals or lowercases are significantly different at the 0.01 and 0.05 probability levels, respectively

基因的表达(差异极显著)。说明氮素诱导的 GS2 基因表达也受放线菌素 D 的调控。

2.5 放线菌酮对甜菜叶片 GS1mRNA 的影响

同理, 在 2.2 中, 以放线菌酮处理 9 h 后, GS 活性显著低于对照, 因此在此实验中只选取处理 9 h 的甜菜幼苗, 对 GS 基因进行反转录和半定量 PCR。从图 7 的电泳图和图 8 的柱状图可以看出, 随着放线菌酮浓度的增加, 甜菜 GS1mRNA 的相对量没有规律性变化, 处理间均没有显著差异。

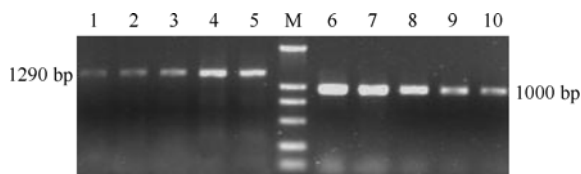


图 7 不同浓度放线菌酮处理 9 h 对 GS1mRNA 的影响
Fig. 7 The electrophoresis result of GS1mRNA in the treatments with different cycloheximide concentrations for 9 h
 M: DL2000 marker with 2 000, 1 000, 750, 500, 250, and 100 bp; 1-5: GAPDHcDNA with 0, 0.5, 2, 5, and 10 μmol L⁻¹ respectively; 6-10: GS1cDNA with 10, 5, 2, 0.5, and 0 μmol L⁻¹, respectively.

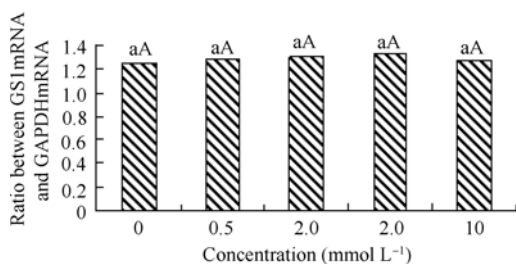


图 8 不同浓度放线菌酮处理 9 h 对 GS1mRNA 的影响
Fig. 8 Transcript accumulation of GS1mRNA in treatments with different cycloheximide concentrations for 9 h
 Different capitals or lowercases are significantly different at the 0.01 and 0.05 probability levels, respectively.

2.6 放线菌酮对甜菜叶片 GS2mRNA 的影响

从图 9 的电泳图和图 10 的柱状图可以看出, 不同浓度放线菌酮处理 9 h 的 GS2mRNA 的相对量均

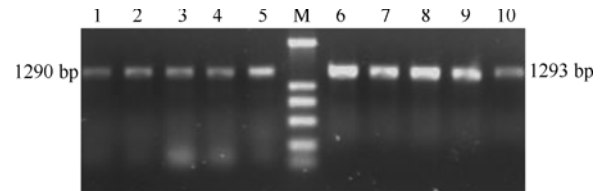


图 9 不同浓度放线菌酮处理 9 h 对 GS2mRNA 的影响
Fig. 9 The electrophoresis result of GS2mRNA in treatments with different cycloheximide concentrations for 9 h
 M: DL2000 marker with 2 000, 1 000, 750, 500, 250, and 100 bp; 1-5: GAPDHcDNA with 0, 0.5, 2, 5, and 10 μmol L⁻¹, respectively; 6-10: GS2cDNA with 10, 5, 2, 0.5, and 0 μmol L⁻¹, respectively.

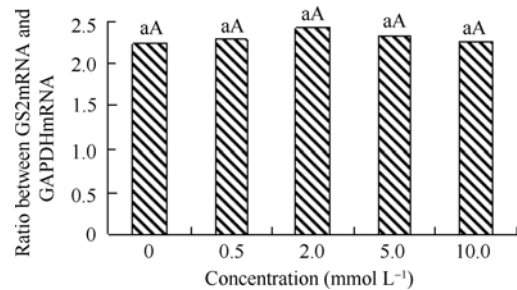


图 10 不同浓度放线菌酮处理 9 h 对 GS2mRNA 的影响
Fig. 10 Transcript accumulation of GS2mRNA in the treatments with different cycloheximide concentrations for 9 h
 Different capitals or lowercases are significantly different at the 0.01 and 0.05 probability levels, respectively.

没有显著差异。

3 讨论

谷氨酰胺合成酶(GS)、谷氨酸合酶(GOGAT)和谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)是高等植物氮同化涉及的主要酶, 其中 GS/GOGAT 循环又是同化吸收氮素的主要途径^[17]。高等植物中, 对氮素同化酶表达的影响因植物种类、组织器官、环境的差异以及氮源的不同而有别^[21]。陈胜勇等^[22]研究发现, NO₃⁻-N 和 NH₄⁺-N 的比约为 4 : 1 的氮素配比对甜菜 GS 诱导较好。

本试验显示, 适当处理时间和处理浓度的放线菌素 D 和放线菌酮都明显抑制氮素对 GS 活性的诱导作用, 而放线菌素 D 和放线菌酮分别是核酸转录水平抑制剂和蛋白质翻译水平抑制剂, 表明氮素对甜菜幼苗叶片 GS 活性的诱导在转录和翻译水平均受到调节。此结果与王学奎等^[8]、印莉萍等^[9]、Zhang 等^[16]的研究结果相似, 在放线菌素 D 和放线菌酮处理下, GS 基因表达降低, 说明 RNA 的重新合成和细胞质中蛋白质的合成对甜菜幼苗 GS 基因表达是必需的。

但是 GS 受放线菌素 D 和放线菌酮的调节并不是与处理时间和处理浓度呈直线关系, 如 0.5~2.0 μmol L⁻¹ 放线菌酮处理 2 h, GS 活性明显高于对照,

可能是由于 GS 本身既有同化氮素作用又有抗逆性的特点, 受到抑制剂胁迫的时候, 暂时表现出了抗性^[23-27]。并且 GS mRNA 的量和酶活性并不是呈现完全相同的变化规律, 而从基因转录开始到表现出酶活性, 其间有很多过程, 如蛋白质的修饰以及酶活性的表现等, 这些因素都有可能造成 GS mRNA 的量和酶活性不完全一致。

RT-PCR 半定量法是目前探讨基因转录水平的有效手段, 比传统的 Northern blot 法灵敏、简捷、特异性高, 虽然没有新技术实时荧光定量 PCR (real time fluorescent quantitative PCR) 定量准确可靠、灵敏度高、重复性好^[28], 但是实时荧光定量 PCR 成本高, 而本实验不需要太准确的定量, PCR 半定量已经满足对基因表达的定量要求。

由于靶基因 GS 基因的模板量大大低于看家基因 GAPDH 基因, 若按常规方法同时加入两种基因的引物进行 PCR 扩增, 当两者均处于指数扩增期时, 在溴化乙锭染色的琼脂糖凝胶上较难同时检测出两者的理想扩增产物。故本实验将 GAPDH 基因和 GS 基因引物分管进行 PCR 扩增, 克服了常规方法中由于内参与靶基因模板量的巨大差异而造成内参的优势扩增。所以本实验所采用的 PCR 半定量与酶活性测定相结合方法可以有效地用于甜菜中基因表达的定量分析。

在半定量 PCR 分析时两种处理采用的时间是一致的, 均选择 9 h 作为代表, 并不能排除在其他时间段 GS 基因可能出现不同的变化规律, 因为可能 GS 基因表达和酶活性受光照、碳水化合物供应等因素的影响, 或者核酸合成和蛋白合成抑制剂对 GS 的调控机制是不同的。在分析放线菌酮对 GS 表达的影响时, 其实应该分析放线菌酮处理下 GS 酶蛋白的实际表达量, 仅分析 mRNA 的相对量只是间接证据, 这些都需要我们进行下一步研究加以验证。

4 结论

在氮素诱导后, 甜菜幼苗 GS 活性为放线菌素 D 和放线菌酮所抑制, 在 9 h 处理中, GS1 mRNA 和 GS2 mRNA 的相对量受到放线菌素 D 的调控, 但不受放线菌酮调节。说明氮素促进甜菜 GS 基因的表达主要发生在转录水平, 是否发生在翻译水平上有待进一步研究。

References

[1] Migge A, Carayol E, Hirel B, Becher T W. Leaf-specific overex-

pression of plastidic glutamine synthetase stimulates the growth of transgenic tobacco seedlings. *Planta*, 2000, 210: 252-260

- [2] Tobin A K, Yamaya T. Cellular compartmentation of ammonium assimilation in rice and barley. *J Exp Bot*, 2001, 52: 591-604
- [3] Weber A, Flugge U I. Interaction of cytosolic and plastidic nitrogen metabolism in plants. *J Exp Bot*, 2002, 53: 865-874
- [4] Li C-F (李彩凤), Ma F-M (马凤鸣), Zhao Y (赵越). Effects of nitrogen forms on key enzyme activities and related products in sugar and nitrogen metabolism of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Acta Agron Sin* (作物学报), 2003, 29(1): 128-132 (in Chinese with English abstract)
- [5] Zhao Y (赵越), Ma F-M (马凤鸣), Zhang D-Y (张多英). Study on the absorption kinetics of different nitrogen in sugar beet. *J Northeast Agric Univ* (东北农业大学学报), 2006, 37(3): 294-298 (in Chinese with English abstract)
- [6] Wu X-P (吴小平), Wang P-H (汪沛洪), Zhang H (张惠). Effects of osmotic stress on protease activities of two winter wheat cultivars with different drought resistance. *Acta Agric Boreali-Occident Sin* (西北农业学报), 1994, 3(1): 49-53 (in Chinese with English abstract)
- [7] Xue Y-C (薛永常), Chen Y-J (陈永军), Cao M (曹敏). Effect of actinomycin D and cycloheximide on ABA accumulation induced by water stress in winter wheat seedling. *J Hebei Norm Univ* (Nat Sci) (河北师范大学学报·自然科学版), 1997, 21(3): 317-319 (in Chinese with English abstract)
- [8] Wang X-K (王学奎), Li H-S (李合生), Liu W-D (刘武定). Preliminary study on mechanism of light regulated glutamine synthetase in wheat leaves. *J Huazhong Agric Univ* (华中农业大学学报), 2000, 19(2): 102-105 (in Chinese with English abstract)
- [9] Yin L-P (印莉萍), Chai X-Q (柴晓清), Liu X-L (刘祥林). Influence of chloroplast development and light on the gene expression of glutamine synthetase in wheat leaves. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1994, 36(8): 597-602 (in Chinese with English abstract)
- [10] Schumid S, Mober H. Regulation of the appearance of glutamine synthetase in mustard (*Sinap isalba* L.) cotyledons by light, nitrate and ammonium. *Planta*, 1989, 177: 526-534
- [11] Hirel B, Cadal P. Glutamine synthetase in rice: A comparative study of the enzymes from roots and leaves. *Plant Physiol*, 1980, 66: 619-623
- [12] Peterman T K, Goodman H M. The glutamine synthetase gene family of *Arabidopsis thaliana*: Light-regulation and differential expression in leaves, root and seeds. *Mol Gen Genet*, 1991, 230: 145-154
- [13] Chen Y (陈煜), Zhu B-G (朱保葛), Zhang J (张敬). Effects of different nitrogens on activities of nitrate reductase, glutamine synthetase and seed protein contents in soybean cultivars. *Soybean Sci* (大豆科学), 2004, 23(2): 143-146 (in Chinese with English abstract)
- [14] Dai T-B (戴廷波), Cao W-X (曹卫星), Sun C-F (孙传范). Effect of enhanced ammonium nutrition on photosynthesis and nitrate reductase and glutamine synthetase activities of winter wheat. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 2003, 14(9): 1529-1532 (in Chinese with English abstract)

- [15] Mack G. Organ-specific changes in the activity and subunit composition of glutamine synthetase isoforms of barley (*Hordeum vulgare* L.) after growth on different levels of NH_4^+ . *Planta*, 1995, 196: 231–238
- [16] Zhang C F, Peng S B, Peng X X. Response of glutamine synthetase isoforms to nitrogen sources in rice (*Oryza sativa* L.) roots. *Plant Sci*, 1997, 125: 163–170
- [17] Lam H M, Coschigano K T, Oliveira I C. The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47: 569–593
- [18] Li C-J(李常健), Lin Q-H(林清华), Zhang C-F(张楚富). Effect of NaCl stress on activity and isozymes of glutamine synthetase in rice plants. *J Wuhan Univ (Nat Sci Edn)* (武汉大学学报·自然科学版), 1999, 45(4): 497–500(in Chinese with English abstract)
- [19] Hoshi H, Tanaka Y, Hibino T. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpress chloroplast glutamine synthetase. *Plant Mol Biol*, 2000, 43: 103–111
- [20] Mifflin B J, Lea P J. Ammonia Assimilation in the Biochemistry of Plants: Amino Acids Their Derivatives. New York: Academic Press, 1980. pp 169–202
- [21] Oliveira L C, Coruzzi G M. Carbon and Amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 1999, 121: 301–309
- [22] Chen S-Y(陈胜勇), Li C-F(李彩凤), Ma F-M(马凤鸣), Yang D-G(杨德光), Hou J(侯静), Sun S-C(孙世臣), Yin C-J(尹春佳), Huang Z-F(黄兆峰), Zhao L-Y(赵丽影), Chen Y-T(陈业婷), Yue P(越鹏). Expression analysis of glutamine synthetase gene under different nitrogen conditions in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Crops (作物杂志)*, 2008, (4): 64–67(in Chinese with English abstract)
- [23] Kang S M, Titus J S. Activity profiles of enzymes involved in glutamine and glutamate metabolism in the apple during autumnal senescence. *Physiol Plant*, 1980, 50: 291–297
- [24] Kang S M, Titus J S. Increased proteolysis of senescing rice leaves in the presence of NaCl and KCl. *Plant Physiol*, 1989, 91: 1232–1237
- [25] Kar M, Feierabend J. Changes in the activities of enzymes involved in amino acid metabolism during the senescence of detached wheat leaves. *Physiol Plant*, 1984, 62: 39–44
- [26] Yuang H, Hou C A. comparative study of two forms of glutamine synthetase from rice leaves. *Bot Bull Acad Sin*, 1987, 28: 91–108
- [27] Han N(韩娜), Ge R-C(葛荣朝), Zhao B-C(赵宝存). Research development of the glutamine synthetase in plants. *J Hebei Norm Univ (Nat Sci Edn)* (河北师范大学学报·自然科学版), 2004, 28(4): 407–410 (in Chinese with English abstract)
- [28] Becker K, Pan D, Whitley C B. Real-time quantitative polymerase chain reaction to assess gene transfer. *Human Gene Therapy*, 1999, 10: 2559–2566