

不同基因型大豆 *Fd-GOGAT* 基因 cDNA 序列的克隆与分析

陈丽华¹, 刘丽君², 刘页丽², 祖伟²

(1. 国家农业标准化监测与研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150036; 2. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:克隆了6个不同基因型大豆的 *Fd-GOGAT* 基因, 序列比对分析结果表明: 不同基因型大豆的 *Fd-GOGAT* 基因序列相似性很高, 可设计出通用 Real-time PCR 引物, 检测 *Fd-GOGAT* 基因的表达规律。在东农 42 *Fd-GOGAT* 基因序列的编码区内出现了1个8核苷酸的缺失, 产生了移码突变, 导致其 C 端缺失了79个氨基酸的保守序列, 造成谷氨酸合成酶大亚基 C 端保守结构域(gltB_C)不完整。*Fd-GOGAT* 基因分子进化树和蛋白质序列分子进化树都显示东农 42、半野生大豆、东农 46 *Fd-GOGAT* 基因序列进化距离较近。

关键词:大豆; *Fd-GOGAT* 基因; 克隆

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841(2011)03-0374-05

Cloning and Analysis of *Fd-GOGAT* Genes from Different Soybean Varieties

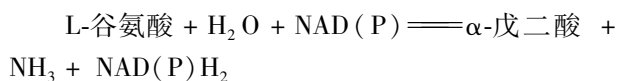
CHEN Li-hua¹, LIU Li-jun², LIU Ye-li², ZU Wei²

(1. National Agriculture Standardize Supervise and Research Center, Harbin 150036; 2. Agronomy College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: *Fd-GOGAT* genes from six different soybean varieties were cloned. The comparative analysis showed the sequences of *GOGAT* genes in different soybean varieties were very identical, so we can design general real-time PCR primer to detect express regulation of *Fd-GOGAT* genes. The coding sequence of *Fd-GOGAT* gene in Dongnong42 appeared an absence of 8 nucleotides, which brought frameshift mutation, led to its C-terminal lack of 79 amino acids conserved sequence and the GS₁ big subunit C-terminal conserved domain(gltB_C) were not in their integrity. Molecular and protein evolution tree analysis showed Dongnong 42, Dongnong 46 and *G. gracilis* had similar evolution distance for *Fd-GOGAT* gene.

Key words: Soybean; *Fd-GOGAT* genes; Enrichment separation; Clone

对植物的生长和发育而言, 氮素的同化是个十分重要的生理过程。其中, 无机氮必须同化为谷氨酰胺和谷氨酸等有机氮才能被植物体所吸收和利用。植物体内的 NH_4^+ 有多种来源, 一部分来自根通过细胞质膜上的专一性转运子吸收的 NH_4^+ 与 NO^- [3-13], 其中 NO_3^- 由体内细胞质硝酸还原酶(NR)还原为 NO_2^- , 再由质体中的亚硝酸还原酶(NiR)将 NO_2^- 还原为 NH_4^+ ; 另一部分来自光呼吸、根瘤菌固 N 作用、氨基酸代谢、类苯基丙烷代谢、衰老组织氮化合物转移再利用等多种途径 [3-4]。过去认为谷氨酸脱氢酶(GDH)是同化 NH_4^+ 的主要酶, 因为该酶在植物体内广泛分布, 可催化下列反应:



后来研究表明, GDH 对 NH_3 的亲合力低 ($K_m = 5 \sim 70 \text{ mmol}$) [4], 只有当体内 NH_3 浓度较高时, 如 C_3

植物在强光下进行光呼吸时线粒体产生大量 NH_3 , 环境胁迫(包括 NH_4^+ 胁迫)以及防御反应产生较多 NH_3 时, 该酶才起作用。但通常情况下细胞中 NH_3 浓度较低, 因此, 该酶对植物体内 NH_3 同化的重要作用受到怀疑, 目前一般认为 GDH 主要起解除氨毒作用 [5]。1974 年, 一条新的 NH_4^+ 同化途径被发现, NH_4^+ 进入该途径首先由 GS 催化合成谷氨酰胺, 然后由 GOGAT 将谷氨酰胺和 α 戊二酸转变为 2 个分子谷氨酸, 其中一个分子谷氨酸可作为 GS 的底物, 另一分子谷氨酸可用于合成蛋白质、核酸等含氮化合物。在同化 NH_4^+ 时, GS 和 GOGAT 是同时起作用的, 因而该途径被称为 GS/GOGAT 循环, 植物体内 95% 以上的 NH_4^+ 通过该途径同化 [6-7]。GDH 对 GS/GOGAT 循环起辅助作用 [8-9]。

GOGAT 在植物无机氮的同化中通过“谷氨酸合成酶循环”起重要作用。固氮生物还原 N_2 生成

收稿日期: 2010-12-13

基金项目: 国家“十一五”科技攻关资助项目(2006BAD21B01)。

第一作者简介: 陈丽华(1973-), 女, 高级工程师, 博士, 研究方向为食品安全与农业标准化。E-mail: chenlihua1973@126.com。

通讯作者: 祖伟(1958-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事大豆栽培生理研究。E-mail: zuwei@neau.edu.cn。

的氮也是通过“谷氨酸合成酶循环”同化的。在种子成熟时,它得到的氮素主要是运输系统运来的酰胺、脲和精氨酸等化合物,它们大都要先将氮释放出来,再由 GS/GOGAT 同化,转变成其它的合成贮藏蛋白所需的氨基酸。

GS/GOGAT 在植物叶片、根瘤以及根中均有分布,但在不同器官中 GS/GOGAT 循环的作用不尽相同。谷氨酸合酶有 3 种形式,分别以铁氧还蛋白、NADH 和 NADPH 为电子供体。植物几乎所有组织中都有较高的 GOGAT 活力。NAD(P)H-GOGAT 在微生物和植物中广泛存在。在种子、根、叶片等组织中都是以 Fd-GOGAT 和 NAD(P)H-GOGAT 共存。高等植物叶片 GOGAT 主要存在于质体中,其中 Fd-GOGAT 占总 GOGAT 活性的 96%。

因此 Fd-GOGAT 是氮代谢中为关键的酶。在此前 N 代谢规律的研究中大多将 GOGAT 酶活性作为主要的测定指标^[10-11],而缺乏不同基因型大豆在 GOGAT 基因结构和转录水平的研究。该试验通过对不同基因型大豆 *Fd-GOGAT* 基因进行克隆和分析,以期对相关基因的功能分析和转录水平的定量分析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

高油大豆:垦丰 9 号(KF9)、东农 46(DN46);高蛋白大豆:东农 42(DN42)、黑农 35(HN35);半野生大豆(MSD);野生大豆(WS)。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取 取不同基因型大豆幼苗幼嫩叶片,采用上海生工 UNIQ 柱式 Trizol 总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。

1.2.2 DNA 提取 取不同基因型大豆幼苗幼嫩叶片,采用 CTAB 法提取 DNA^[12]。

1.2.3 反转录 采用上海生工 AMV 第 1 链 cDNA 合成试剂盒。

1.2.4 目的基因的 PCR 扩增 根据 Genbank 上的大豆 *Fd-GOGAT* 基因序列,应用 Primer Premier 5.0 软件设计基因特异引物。以基因组 DNA 或反转录产物为模板,使用 LA Taq 酶扩增 *Fd-GOGAT* 基因序列。

Sense: 5'GGCCGACTGACTTGTTC 3'

Antisense: 5'CTCCATAGCCTGGCGTAAT 3'

1.2.5 PCR 产物的电泳回收 参照上海华舜生物工程有限公司回收试剂盒说明。

1.2.6 PCR 产物的克隆 参照 pMD18-T vector 试剂盒说明进行连接。大肠杆菌感受态的制备、大肠

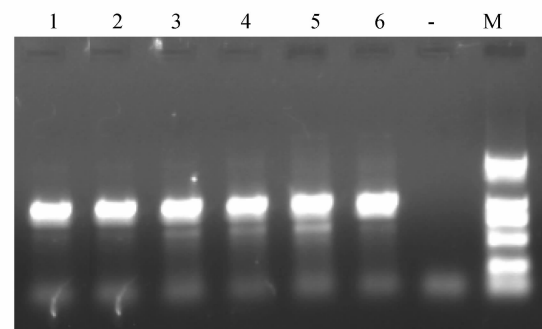
杆菌的转化、质粒 DNA 提取均采用常规方法^[13]。

1.2.7 序列分析 应用 Clustal W 软件对所获得的基因序列进行比较分析,分析不同基因型大豆 *Fd-GOGAT* 基因的差异,提取共有序列,并构建分子进化树。应用 DANMAN 软件的 Translation 功能将基因序列转变成蛋白质序列。应用 NetGene2 软件预测基因外显子和内含子。应用 NCBI 在线 spidey 软件和 DANMAN 软件分析基因外显子和内含子。

2 结果与分析

2.1 不同基因型大豆 *Fd-GOGAT* 基因 cDNA 序列的 PCR 扩增克隆

通过 RT-PCR 扩增,在不同基因型大豆中均可扩增出约 1 000 bp 的 *Fd-GOGAT* 基因片段(图 1)。



1.DN42 2.HN35 3.MSD 4.KF9 5.WS 6.DN46 —H₂O M.DL2000

1. DN42 2. HN35 3. MSD 4. KF9
5. WS 6. DN46 —. H₂O M. DL2000

图 1 *Fd-GOGAT* 基因的扩增

Fig. 1 Amplification of *Fd-GOGA* genes

2.2 不同基因型大豆 *Fd-GOGAT* 基因序列分析

经测序获得了 6 个不同基因型大豆的 *Fd-GOGA* 基因序列,应用 Clustal W 对比程序对这 6 个基因序列进行比较分析。从图 2 可以看出,不同基因型大豆的 *Fd-GOGA* 基因序列相似性很高,因此能够从中提取共有序列,并据此设计 real-time PCR 引物,检测不同基因型大豆 *Fd-GOGA* 基因的表达规律。序列间的差异主要表现为点突变,唯一的例外是在东农 42 *Fd-GOGA* 基因序列的编码区内出现了 1 个 8 核苷酸的缺失,这一突变位点对 Fd-GOGAT 蛋白质结构和酶活性的影响程度还有待于深入研究。

根据不同基因型大豆 *Fd-GOGAT* 基因序列,应用 clustal W 软件构建了 *Fd-GOGA* 基因分子进化树(图 3)。从分子进化树中可以看出,东农 42、半野生大豆、东农 46 *Fd-GOGA* 基因序列进化距离较近。

```

HN35 GOGAT  GGCCGGACTGACTTGTTC AACCACGAGACATATCTCTAGCAAAAAGCTCAGCATCTAGAT
WS GOGAT     GGCCGGACTGACTTGTTC AACCACGAGACATATCTCTAGCAAAAAGCTCAGCATCTAGAT
KF9 GOGAT    GGCCGGACTGACTTGTTC AACCACGAGACATATCTCTAGCAAAAAGCTCAGCATCTAGAT
DN42 GOGAT   GGCCGGACTGACTTGTTC AACCACGAGACATATCTCTAGCAAAAAGCTCAGCATCTAGAT
DN46 GOGAT   GGCCGGACTGACTTGTTC AACCACGAGACATATCTCTAGCAAAAAGCTCAGCATCTAGAT
MSD GOGAT    GGCCGGACTGACTTGTTC AACCACGAGACATATCTCTAGCAAAAAGCTCAGCATCTAGAT
                * * * * *
(此处省略 660 bp 序列比对结果)
HN35 GOGAT  TTCATACCCAAGGTAAACAGAGAAATTGTA AAAATCCAACGGGTGTCAGCCCTGTTGGA
WS GOGAT    TTCATACCCAAGGTAAACAGAGAAATTGTA AAAATCCAACGGGTGTCAGCCCTGTTGGA
KF9 GOGAT   TTCATACCCAAGGTAAACAGAGAAATTGTA AAAATCCAACGGGTGTCAGCCCTGTTGGA
DN42 GOGAT  TTCATACCCAAG - - - - AGAAATTGTA AAAATCCAACGGGTGTCAGCCCTGTTGGA
DN46 GOGAT  TTCATACCCAAGGTAAACAGAGAAATTGTA AAAATCCAACGGGTGTCAGCCCTGTTGGA
MSD GOGAT   TTCATACCCAAGGTAAATGGAGAAATTGTA AAAATCCAACGGGTGTCAGCCCTGTTGGG
                * * * * *
HN35 GOGAT  CAGATGCAACTGAAGAGCCTGATTGAAGCTCACGTTGAAAAAACCGGTAGTACCAAAGGT
WS GOGAT    CAGATGCAACTGAAGAGCCTGATTGAAGCTCACGTTGAAAAAACCGGTAGTACCAAAGGT
KF9 GOGAT   CAGATGCAACTGAAGAGCCTGATTGAAGCTCACGTTGAAAAAACCGGTAGTACCAAAGGT
DN42 GOGAT  CAGATGCAACTGAAGAGCCTGATTGAAGCTCACGTTGAAAAAACCTGTAGTACCAAAGGT
DN46 GOGAT  CAGATGCAACTGAAGAGCCTGATTGAAGCTCACGTTGAAAAAACCTGTAGTACCAAAGGT
MSD GOGAT   CAGATGCAACTGAAGAGCCTGATTGAAGCTCATGTTGAAAAAACCGGTAGTACCAAAGGT
                * * * * *
HN35 GOGAT  GCGGCTATTCTAAGGACTGGGATAAGTATTTATCACTATTTTGGCAGCTGTTCCACCT
WS GOGAT    GCGGCTATTCTAAGGACTGGGATAAGTATTTATCACTATTTTGGCAGCTGTTCCACCT
KF9 GOGAT   GCGGCTATTCTAAGGACTGGGATAAGTATTTATCACTATTTTGGCAGCTGTTCCACCT
DN42 GOGAT  GCGGCTATTCTAAGGACTGGGATAAGTATTTATCACTATTTTGGCAGCTGTTCCACCT
DN46 GOGAT  GCGGCTATTCTAAGGACTGGGATAAGTATTTATCACTATTTTGGCAGCTGTTCCACCT
MSD GOGAT   GCGGCTATTCTAAGGATTGGGAGAAGTATTTATCACTATTTTGGCAGCTGTTCCACCT
                * * * * *
HN35 GOGAT  AGTGAAGAAGATACCCCCGAGGCAAATGCCAAATATGACACA ACTACGGCAGATCAGGTC
WS GOGAT    AGTGAAGAAGATACCCCCGAGGCAAATGCCAAATATGACACA ACTACGGCAGATCAGGTC
KF9 GOGAT   AGTGAAGAAGATACCCCCGAGGCAAATGCCAAATATGACACA ACTACGGCAGATCAGGTC
DN42 GOGAT  AGTGAAGAAGATACCCCCGAGGCAAATGCCAAATATGACACA ACTACGGCAGATCAGGTC
DN46 GOGAT  AGTGAAGAAGATACCCCCGAGGCAAATGCCAAATATGACACA ACTACGGCAGATCAGGTC
MSD GOGAT   AGTGAAGAGGATACCCCTGAGGCAAATGCCAAGTACGACACA ACTACGGCAGATCAGGTC
                * * * * *
HN35 GOGAT  ACTTATCAGTCTGCTTAGGTAACAATCTAAGGTTACATTACATTGATTACGCCAGGCTA
WS GOGAT    ACTTATCAGTCTGCTTAGGTAACAATCTAAGGTTACATTACATTGATTACGCCAGGCTA
KF9 GOGAT   ACTTATCAGTCTGCTTAGGTAACAATCTAAGGTTACATTACATTGATTACGCCAGGCTA
DN42 GOGAT  ACTTATCAGTCTGCTTAGGTAACAATCTAAGGTTACATTACATTGATTACGCCAGGCTA
DN46 GOGAT  ACTTATCAGTCTGCTTAGGTAACAATCTAAGGTTACATTACATTGATTACGCCAGGCTA
MSD GOGAT   ACTTATCAGTCTGCTTAGGTTGACGATGCAAGGTTACATTACATTGATTACGCCAGGCTA
                * * * * *
HN35 GOGAT  TGGAG
WS GOGAT    TGGAG
KF9 GOGAT   TGGAG
DN42 GOGAT  TGGAG
DN46 GOGAT  TGGAG
MSD GOGAT   TGGAG
                * * * * *

```

图 2 不同基因型大豆 *Fd-GOGA* 基因序列比对结果

Fig. 2 Alignment of *Fd-GOGA* gene sequences in different genotype soybeans

