

研究报告 Original Papers

大豆 *GmcpSecA* 基因的克隆及表达特异性

党利洁, 李鹏丽, 刘栋, 诸锡莉, 龚清秋, 王宁宁*

南开大学生命科学学院, 天津 300071

摘要: Sec途径是将核编码的叶绿体蛋白输入到类囊体腔的蛋白分选途径之一, 对叶绿体正确行使其功能有重要作用。前期研究获得了拟南芥 *AtcpSecA* 功能缺失的突变体 *agy1*, 其叶片呈黄白色, 叶绿体发育缺陷, 内部缺少类囊体片层结构。我们从大豆中克隆了拟南芥 *AtcpSecA* 的同源基因 *GmcpSecA* 基因的全长 cDNA 序列和 5' 端 ATG 上游 1.5 kb 的启动子序列, 通过 RT-PCR 的方法对 *GmcpSecA* 基因表达的器官特异性进行了初步分析; 并构建了 *GmcpSecA::GUS* 和 *35S::GmcpSecA* 融合基因, 以农杆菌介导的转化方法获得转基因拟南芥。GUS 组织化学染色结果表明: 在转基因拟南芥的子叶、叶片、花萼等绿色组织中都有较强的 GUS 表达, 而在非绿色组织中没有 GUS 表达。通过将过表达载体 *p35S::GmcpSecA* 转化 *agy1*, 结果表明 *GmcpSecA* 能够部分回补拟南芥 *agy1* 突变体的表型。推测 *GmcpSecA* 基因具有与 *AtcpSecA* 基因相似的功能, 在叶绿体发育过程中发挥重要作用。

关键词: 大豆; *GmcpSecA* 基因; 表达特异性; 回补

Cloning and Expressional Characterization of Soybean *GmcpSecA* Gene

DANG Li-Jie, LI Peng-Li, LIU Dong, ZHU Xi-Li, GONG Qing-Qiu, WANG Ning-Ning*

College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: The Sec-dependent protein sorting pathway is essential for protein import into the thylakoid lumen and is important for the proper function of the chloroplast. We have previously reported the characterization of a loss-of-function mutant of cpSecA, the ATPase subunit of the Sec protein complex. The homozygous mutant is albino and seedling lethal, and lacks the thylakoid structure. We cloned the full-length cDNA of *GmcpSecA* and its 1.5 kb promoter sequence upstream of the coding region from soybean, and examined the expression patterns of *GmcpSecA* by RT-PCR in soybean. In this study, we constructed *GmcpSecA::GUS* and *35S::GmcpSecA* fusion genes and introduced into *Arabidopsis* by *Agrobacterium*-mediated floral dipping. Histochemical staining of GUS revealed that *GmcpSecA* is strongly expressed in all green tissues including cotyledons, rosette leaves, and sepals whereas no expression could be detected in non-green tissues such as roots, inflorescences, and siliques. Then we transformed the *agy1* mutant with *p35S::GmcpSecA*, and the results showed that *GmcpSecA* can partially restore the phenotype of *agy1*. Our data indicates that the *GmcpSecA* gene has a function similar to *AtcpSecA*, and that *GmcpSecA* plays an important role in chloroplast biogenesis.

Key words: soybean; *GmcpSecA* gene; expression pattern; complementation

叶绿体是绿色植物进行光合作用的重要的细胞器, 叶绿体内有 2 000~2 500 种蛋白, 只有不足 100 种蛋白是由叶绿体的基因组编码的, 其余大部分都是由核基因组编码 (Chi 等 2008)。核基因编码的叶绿体蛋白首先在胞质中合成前体, 然后通过不同的途径, 最终到达类囊体膜或类囊体腔。目前所了解的类囊体蛋白转运机制有 Tat 途径、Sec 途径、SRP 途径和自发途径。SecA (cpSecA) 是叶绿体蛋白转运 Sec 途径中一个重要组分 (Di Cola 等 2005), 它的功能是作为重要的蛋白转位因子将核编码的叶绿体蛋白转运到类囊体腔 (Hawwrd 等 1997)。它参与转运的类囊体腔蛋白是光系统 I 和光系统 II

的重要组分 (Keegstra 和 Cline 1999), 对光合作用以及叶的发育有重要的作用。我们在前期研究中获得了叶片呈黄白色表型的拟南芥突变体 *agy1*, 并证明这是由于 T-DNA 插入造成 *AtcpSecA* 基因 (At4g01800) 被破坏导致的 (Liu 等 2010), 此突变体叶片呈黄白色, 叶绿体发育缺陷, 内部缺少类囊体

收稿 2010-08-02 修定 2010-08-18

资助 国家高技术研究发展计划 (“863” 计划) (2007AA10Z1 05)、国家自然科学基金 (30670193) 和天津市自然科学基金 (08JCYBJC03800)。

* 通讯作者 (E-mail: wangnn@nankai.edu.cn; Tel: 022-23504096)。

片层结构,不能进行正常的生长发育、开花、结实。

大豆是全球重要的经济作物,深入了解大豆叶绿体发育的特点,对于提高大豆叶片的光合效率并最终提高大豆产量,具有重要的理论和实践意义。根据同源序列比对我们从大豆中找到了拟南芥 *AtcpSecA* 的同源基因 *GmcpSecA*,并克隆了其全长 cDNA 序列及其 5' 端 ATG 上游 1.5 kb 的启动子序列。通过对 *GmcpSecA* 全长 cDNA 序列分析表明,该基因与豌豆、菠菜和拟南芥的 *SecA* 基因具有很高的同源性;分别利用 RT-PCR 和启动子 -*GUS* 报告基因系统检测该基因的表达特点,发现该基因特异于绿色组织中表达。*SecA* 功能回补实验表明 *GmcpSecA* 基因能够部分地回补拟南芥 *agy1* 突变体由于 T-DNA 插入造成的 *SecA* 功能缺陷。这些研究结果,暗示着 *GmcpSecA* 基因在大豆叶绿体的蛋白转运和功能建成中发挥重要作用。

材料与amp;方法

实验所用的植物材料为模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.) Colombia-0 型,生长条件:光/暗时间为 16 h/8 h;光照强度为 75 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$;温度为 (22±1) °C。拟南芥 *agy1* 突变体为 T-DNA 插入突变体,将在 4 °C 黑暗下春化 3 d 的 *AGY1/agy1* 杂合突变体种子均匀铺在含有 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素的 1/2MS (0.7% 琼脂、1% 蔗糖) 培养基上,生长条件同上,待幼苗长到 2 周大时,将幼苗移到土里,在相同的条件下继续生长。

实验所用大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] 品种为 ‘中黄 13’,生长条件:光/暗时间为 16 h/8 h;光照强度为 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$;温度为 25 °C。

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 菌株用于感受态细胞的制备;根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 菌株用于拟南芥的遗传转化;pMD-18T Vector 用于基因克隆,携带 *GUS* 基因的植物表达载体 *pCambia1301* 用于载体构建,以上菌株和载体均为本实验室保存。

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、用于 PCR 的 DNA 聚合酶、高保真聚合酶 Pfu、质粒提取试剂盒及 DNA 回收试剂盒均购自宝生物 (TaKaRa) 公司;用于 RT-PCR 的 DNA 酶和反转录酶等购自

Promega 公司。上海生物工程公司代为合成引物。潮霉素 (hygromycin) 购自 Roche 公司;其他生化试剂均为国产分析纯。

分别选取 V2 时期的大豆子叶、V5 时期大豆的根、茎和叶材料;R2 时期大豆花(包括萼片)材料;R3 时期大豆的种荚材料[大豆发育时期的界定参考 Fehr 等(1971)方法]。每个样品随机取样 3 次,液氮速冻后, -70 °C 冰箱保存备用。大豆材料总 RNA 的提取用异硫脲胍 - 酚法,药品的使用、配制以及具体操作步骤参考《分子克隆实验指南》(第三版) (Sambrook 和 Russell 2002)。提取总 RNA 后用一定量的 DNase (RNase free) 消化,然后用基因特异引物以总 RNA 为模板进行 PCR 反应,经电泳检测后没有发现任何扩增带,说明 RNA 样品中的基因组 DNA 已经去除干净。样品经过严格定量后,取 2 μg 利用 Promega ImProm-IITM 反转录酶进行反转录,得到 cDNA。操作方法参照说明书。将 cDNA 稀释 10 倍作为 PCR 反应的模板。以大豆核糖体 18S rRNA 基因为 RT-PCR 反应的内标,内标引物为 SRNA-1 (5'-CCTTGCTTGTGCTTTACT-AAATAG-3') 和 SRNA-2 (5'-ATGCACCTTTTC-GTTTGTTCGGAG-3'),扩增 209 bp 的内标基因;*GmcpSecA* 基因的特异引物为 GmcpSecA-1 (5'-GATTGAAGTTGGCCTCATTTCAGCAGA-3') 和 GmcpSecA-2 (5'-CTGCATGACTCGACCAGTA-AACTCATC-3'),扩增目的片段长度 527 bp。半定量 RT-PCR 反应程序为:94 °C 变性 30 s, 55 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 25 个循环;72 °C 延伸 10 min。本研究中所有 RT-PCR 结果均经过 3 次自 RNA 提取开始独立的重复实验,结果一致。

提取大豆 ‘中黄 13’ 的基因组,以此基因组为模板,用引物 GmSecA_F1 (5'-CCTCCGCAATTCT-TAATTCATTTCGAACC-3') 和 GmSecA_F2 (5'-CTCCAGATACATATTAGTCTTGAGTGCT-3') 扩增 *GmcpSecA* 基因。PCR 程序为:94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 3 min, 31 个循环;72 °C 10 min;用引物 GmcpSecA_Pro1 (5'-GGTACCGGA-AACGGTGGGGTTTCGGGAAG-3', 斜体部分为引入的 *KpnI* 酶切位点) 和 GmcpSecA_Pro2 (5'-CCATGGTTCGAATGAATTAAGAATTGCGGA-3', 斜体部分为引入的 *NcoI* 酶切位点) 扩增 *GmcpSecA* 启

动子。PCR 程序为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 31 个循环; 72 °C 10 min。将 PCR 反应后的产物进行琼脂糖凝胶电泳, 回收目的 DNA 片段, 然后分别连入 TA 克隆载体 pMD-18T Vector, 16 °C, 连接过夜, 然后转化大肠杆菌 DH5 α 。选取阳性克隆摇菌提质粒。将测序正确的 *GmcpSecA* 基因的 TA 克隆质粒用 *NcoI* 和 *BstEII* 双酶切, 回收 3 kb 的目的基因片段; 将测序正确的 *GmcpSecA* 基因启动子的 TA 克隆质粒用 *KpnI* 和 *NcoI* 双酶切, 回收 1.5 kb 启动子片段。分别用相同的酶对双元表达载体 *pCAMBIA1301* 质粒进行双酶切, 回收载体大片段, 连接回收的目的基因片段和载体大片段, 连接回收的启动子片段和载体大片段, 转化大肠杆菌 DH5 α , 在含有 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素的 LB 培养基上筛选转化子。提取阳性转化子的质粒进行酶切鉴定, 并测序, 构建成 35S 启动子驱动的 *GmcpSecA* 基因和 *GmcpSecA* 启动子驱动的 *GUS* 报告基因的双元表达载体, 分别命名为 *p35S::GmcpSecA* 和 *pGmcpSecA::GUS*。

将鉴定正确的 *p35S::GmcpSecA* 和 *pGmcpSecA::GUS* 转化子分别转入农杆菌 GV3101 中, 经卡那霉素、硫酸庆大霉素和利福平筛选阳性转化子, 再经过菌裂解 PCR 及质粒 DNA 酶切进行鉴定。利用农杆菌介导的花苞浸泡法将 *pGmcpSecA::GUS* 转化子转化野生型拟南芥, 收获的种子在含有 30 mg·L⁻¹ 潮霉素的 1/2MS 培养基上进行抗性筛选; 利用农杆菌介导的花苞浸泡法将 *p35S::GmcpSecA* 转化子转化 *AGY1/agy1* 杂合突变体, 收获的种子在含有 30 mg·L⁻¹ 潮霉素和 40 mg·L⁻¹ 卡那霉素的 1/2MS 培养基上进行抗性筛选。抗性植株转土培养后进行分子检测和鉴定。

大肠杆菌 DH5 α 和农杆菌 GV3101 感受态细胞的制备与转化采用氯化钙法, 转化分别采用热激法和冻融法, 药品的配置及具体操作步骤参考《分子克隆实验指南》(第三版) (Sambrook 和 Russell 2002)。

提取上述抗性拟南芥的基因组 DNA, 基因组 DNA 的提取参考《分子克隆实验指南》(第三版) (Sambrook 和 Russell 2002) 方法进行。用 *GmcpSecA* 启动子的特异性引物检测野生型拟南芥中外源片段的插入情况; 用 *GmcpSecA* 目的基因的特异性引物检测 *agy1* 突变体拟南芥中外源片段的插入情况, 用

T-DNA 边界引物和 *AtcpSecA* 基因的特异性引物检测 *agy1* 突变体的纯合情况。

分别取一周苗、成熟莲座叶和成熟苗的花序和种荚进行 GUS 组织化学染色, GUS 组织化学染色方法参照 Blume 和 Griensson (1997) 的方法进行, 染色时间为 6 h, 将植物的染色结果用 EPSON PERFECTION 1260 型扫描仪扫描成照片保存。

分别选取一个月苗龄的野生型拟南芥、*AGY1/agy1* 杂合体拟南芥和 *agy1* 纯合突变体背景下转 *35S::GmcpSecA* 的拟南芥的叶片, *agy1* 纯合突变体拟南芥, 按照上述方法提取总 RNA, 定量, 进行反转录。以拟南芥 *Tip41-like* 基因为 RT-PCR 反应的内标, 内标引物为 *Tip41-like-F* (5'-GAAATTCAGGAGCAAGCCGTCTCAG-3') 和 *Tip41-like-R* (5'-ATCAACTCTCAGCCAAAATCGCAAG-3'), 扩增目的片段长度 331 bp; *GmcpSecA* 基因的特异引物为 *GmcpSecA-3* (5'-TGATGCCAAGAGTTGTTAAACCATCTG-3') 和 *GmcpSecA-4* (5'-TAGGTCTTCAACTCTGAACGCTTGC-3'), 扩增目的片段长度 524 bp; *AtcpSecA-1* (5'-CGCATCCATCGTCGCATCCGT-3') 和 *AtcpSecA-2* (5'-CGAGCTCCTCAACTCTCGTGGC-3') 扩增目的片段长度 700 bp。半定量 RT-PCR 反应程序为: 94 °C 变性 30 s, 56 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。本研究中所有 RT-PCR 结果均经过 3 次自 RNA 提取开始独立的重复实验, 结果一致。

实验结果

1 *GmcpSecA* 基因 cDNA 序列克隆与分析

以拟南芥 *cpSecA* 基因的 CDS 为探针, 对大豆 EST 序列数据库进行筛选, 根据 EST 拼接获得的基因序列信息设计双引物, 利用 RT-PCR 方法, 克隆得到特异扩增产物并进行序列测定, 序列测定结果与 EST 拼接结果完全一致。

序列分析表明, 所克隆的 cDNA 序列包含完整的 CDS 序列以及部分 5'- 和 3'-UTR, 其 3 045 bp 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 编码一个 1 014 个氨基酸的蛋白。它与其他高等植物如豌豆 (*PsSecA*)、拟南芥 (*AtSecA*)、菠菜 (*SoSecA*) 的同源性分别达到 90%、80%、78%, 与原核生物大肠杆菌 (*EcSecA*) 的同源性达到了 39%, 与藻类的

SecA 也具有很高的同源性。在这些同源序列的起始区域有很高的保守性,所有序列的ATP高亲和和结构域和 ATP 低亲和结构域也相当保守(Mitchell 和 Oliver 1993)。高等植物 SecA 的 N- 端有一段转运肽序列,负责引导前体蛋白通过不同的途径进入类

囊体腔,完成转运后被类囊体腔中的加工肽酶所剪切(Nohara 等 1995)。SignalP3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP>)预测 GmcpSecA 的前 62 个氨基酸是它的转运肽序列(图1),这与拟南芥和豌豆中的情况类似,拟南芥和豌豆的转运肽剪切位点在

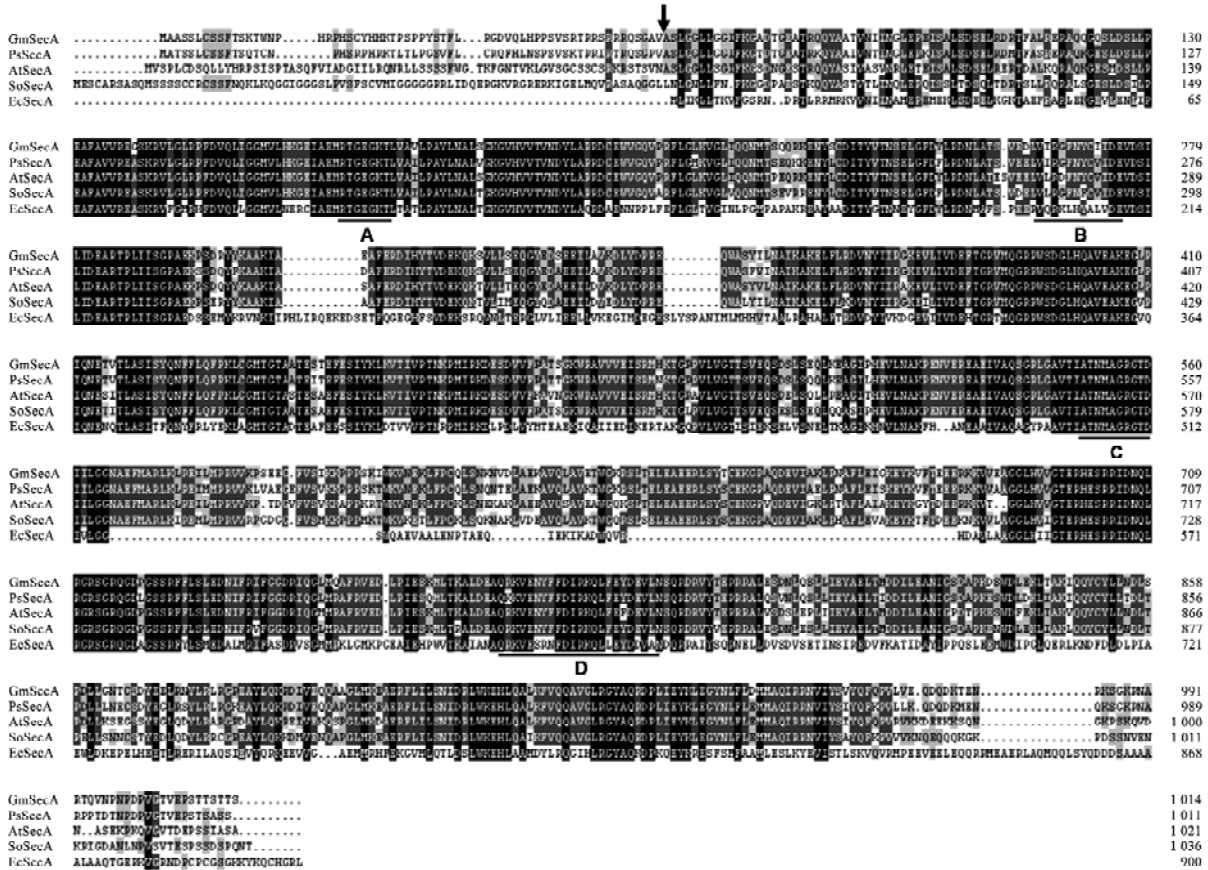


图1 GmcpSecA 以及同源基因的多重序列比对

Fig.1 Multiple sequence alignment and structural analysis of GmcpSecA and its homologues

A 和 B 代表 ATP 高亲和和结构域; C 和 D 代表 ATP 低亲和和结构域; 向下的箭头代表推测的 GmcpSecA 基因转运肽的剪切位点。

第 61 和第 62 个氨基酸之间。

2 大豆中 GmcpSecA 基因的器官表达特点

利用半定量 RT-PCR 的方法来研究 GmcpSecA 基因在大豆不同器官中的表达,结果如图 2 所示。GmcpSecA 基因在子叶、叶片中有较强的表达,在花和幼嫩种荚中有较弱的表达,而在根和茎中几乎没有表达。

3 GmcpSecA 基因和启动子序列克隆及融合基因表达载体的构建

我们根据获得的大豆 GmcpSecA 基因启动子的

序列信息,设计克隆引物。提取大豆的基因组 DNA,用启动子特异性引物进行 PCR 扩增,得到大豆 GmcpSecA 基因启动子的克隆。以大豆 cDNA 为模板,用 GmcpSecA 基因特异性引物进行 PCR,得到大豆 GmcpSecA 基因的克隆。将所克隆的 1.5 kb 的 GmcpSecA 基因启动子替换植物双元表达载体 pCAMBIA1301 上的 35S 启动子,构建 GmcpSecA::GUS 融合基因。GmcpSecA::GUS 融合基因序列经序列测定结果正确。该载体带有潮霉素筛选标记,用于转化过程中转基因植株的筛选。将此表达载

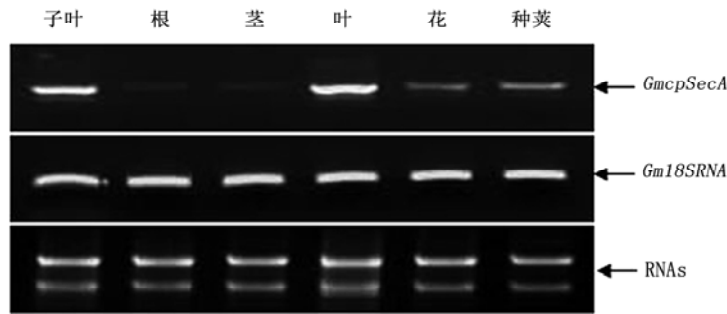


图2 *GmcpSecA* 基因在大豆不同器官中的表达

Fig.2 Expression levels of *GmcpSecA* in different soybean organs

子叶取自 V2 时期的大豆; 根、茎和叶取自 V5 时期的大豆; 花(包括萼片)取自 R2 时期的大豆; 种荚取自 R3 时期的大豆。*Gm18SRNA* 作为内标。

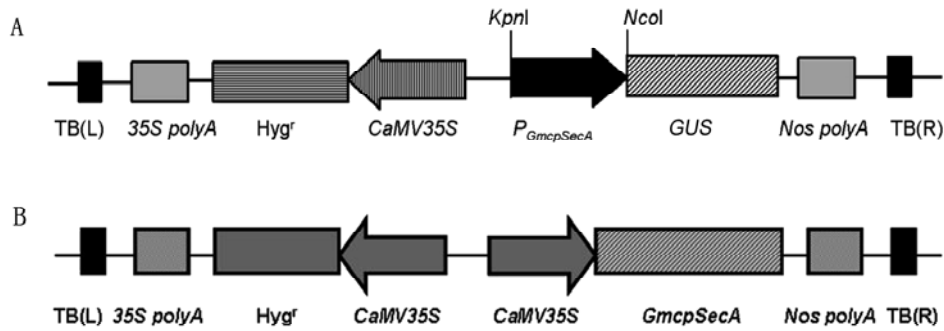


图3 植物表达载体基本结构示意图

Fig.3 Schematic structure of the plant expression vector *pGmcpSecA::GUS*

A: *pGmcpSecA::GUS* 结构示意图; B: *p35S::GmcpSecA* 结构示意图。TB (L)和 TB (R) 分别表示 T-DNA 的左、右边界。

体命名为 *pGmcpSecA::GUS* (图 3-A)。以同样的方法将克隆到的 3 kb 的 *GmcpSecA* 基因替换植物二元表达载体 *pCambia1301* 上的 *GUS* 基因序列, 构建 *35S::GmcpSecA* 融合基因, 并将此表达载体命名为 *p35S::GmcpSecA* (图 3-B)。

4 转基因植株的获得

采用农杆菌介导的花苞浸泡法(Clough 和 Bent 1998), 以 *pGmcpSecA::GUS* 转化野生型拟南芥, 收获的种子经过 $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 潮霉素抗性筛选; 利用农杆菌介导的花苞浸泡法以 *p35S::GmcpSecA* 转化 *AGY1/agy1* 杂合体拟南芥, 收获的种子在含有 $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 潮霉素和 $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 1/2MS 培养基上进行抗性筛选。抗性植株转土培养。提取这些抗性植株的基因组 DNA, 分别用 *GmcpSecA* 的启动子和基因特异性引物进行 PCR 检测, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析(图 4-A、B), 证明外源基因已经整合到

拟南芥基因组中, 所获得的抗性植株为转化株。

5 *GmcpSecA::GUS* 在转基因拟南芥中的表达特性

为了研究 *GmcpSecA* 在转基因拟南芥中的表达模式, 利用 GUS 组织化学染色方法, 对 *GmcpSecA::GUS* 转基因拟南芥中 GUS 报告基因的表达进行了分析。分别选取一周苗、成熟莲座叶、花序和种荚进行 GUS 染色。染色结果(图 5)表明: *GmcpSecA::GUS* 转基因拟南芥在 16 h 光照/8 h 黑暗的培养条件下, 在子叶、叶片、下胚轴、莲座叶以及茎生叶等绿色组织中都有很强的 GUS 活性, 而在根、花瓣和种荚等非绿色组织中没有 GUS 活性。经基因组检测共获得 12 株转基因拟南芥, 其中经 GUS 组织化学染色, 有 7 株 GUS 染色明显。

6 *SecA* 的功能回补

为进一步研究 *GmcpSecA* 基因在拟南芥中的作用, 利用农杆菌介导的遗传转化方法将 *35S::*

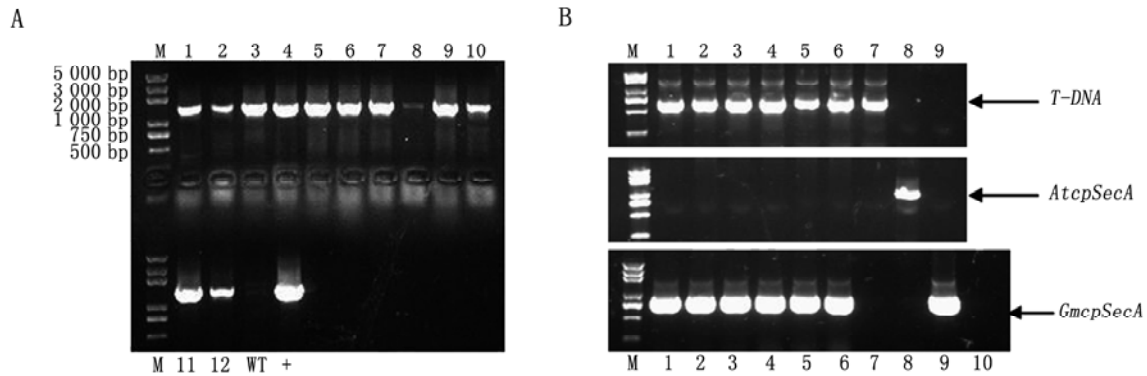


图4 转基因拟南芥基因组 PCR 检测

Fig.4 Identification of the transgenic plants

A: *GmcpSecA::GUS* 转基因拟南芥基因组 PCR 检测。泳道 M: 2K plus Marker; 泳道 1~12: *GmcpSecA::GUS* 转基因拟南芥基因组 DNA 为模板的 PCR 产物; WT: 用野生型拟南芥的基因组 DNA 为模板的负对照; +: *GmcpSecA::GUS* 质粒为模板的 PCR 的正对照。B: *35S::GmcpSecA* 转基因拟南芥基因组 PCR 检测。泳道 M: 2K plus Marker; 泳道 1~6: *35S::GmcpSecA* 转基因拟南芥基因组 DNA 为模板的 PCR 产物; 7: 拟南芥 *agy1* 突变体基因组 DNA 为模板的 PCR 产物; 8: 用野生型拟南芥的基因组 DNA 为模板的负对照; 9 (上、中): H_2O 为模板的 PCR 的负对照; 9 (下): *35S::GmcpSecA* 质粒为模板的 PCR 的正对照; 10: H_2O 为模板的 PCR 的负对照。

*GmcpSecA*融合基因转化AGY1/*agy1*杂合体拟南芥, 收获的种子经 $30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 潮霉素和 $40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素的抗性筛选, 发现在含有 $30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 潮霉素和 $40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素的1/2MS培养基上生长的抗性苗全部都是绿色或者黄绿色, 而没有白化的幼苗, 将抗性苗移土, 这些抗性苗都能在土里生长。虽然与野生型相比抗性苗表现出明显的生长迟滞, 叶片呈黄绿色(图 6-C), 但是能够正常开花结实。通过半定量 RT-PCR 进一步验证, 这些抗性苗确实是在 *agy1* 纯合背景下表达了 *GmcpSecA* 基因(图 6-D)。

讨 论

核编码的叶绿体蛋白输入类囊体膜和类囊体腔主要有 4 种途径, 其中类囊体腔蛋白的转运通过 Sec 和 Tat 两途径实现。SecA 是类囊体腔蛋白转运途径的 Sec 途径中的重要组分(Di Cola 等 2005)。叶绿体 cpSecA 参与前体蛋白到类囊体腔的转运。SecA 参与转运的囊腔蛋白是光系统 I 和 II 的重要组分(Keegstra 和 Cline 1999), 这些类囊体腔蛋白包括质体蓝素(plastocyanin)、光系统 II 的放氧复合物(oxygen-evolving complex of photosystem II)的 33 kDa 多肽 OEC33、光系统 I 复合物 F 亚基 PSI-F (F subunit of photosystem I)和细胞色素 f (cytochrome f)等。大豆是重要的经济作物, 是人类主要植物性

蛋白质来源之一, 又是重要的家畜饲料和许多工业的原料, 在医学上也有很大价值。深入了解大豆叶绿体发育的特点, 能够通过调控叶片的光合效率和光合功能以期为提高大豆产量提供理论基础。

前人的研究表明 Sec 系统是一个进化上十分保守的叶绿体蛋白转运机制, 从细菌到藻类到高等植物都具有很高的保守性(Liu 等 2010)。cpSecA 的序列比对表明 SecA 序列在高等植物中具有高度的保守性, 推测 SecA 在不同植物中的功能具有很高的保守性, 那么 *GmcpSecA* 也许具有与 *AtcpSecA* 类似的功能和表达特点。半定量 RT-PCR 检测大豆 *GmcpSecA* 器官表达模式的结果是 *GmcpSecA* 在子叶、花和种荚这些绿色组织中有表达(图 1), 转基因拟南芥的 GUS 染色结果证明了我们克隆到的 *GmcpSecA* 基因启动子片段具有启动转录的活性, 驱动 *GmcpSecA* 基因在拟南芥的绿色组织中特异表达(图 5), 前期的研究中发现 *AtcpSecA* 的表达也具有绿色组织特异性(李金萍等 2009)。这些结果初步验证了 SecA 在大豆和拟南芥中功能的保守性, 同时也说明了 *GmcpSecA* 在大豆的叶绿体和叶片的正常发育过程中可能起到了重要的作用。

我们前期的研究证明拟南芥突变体 *agy1* 由于 T-DNA 插入 *AtcpSecA* 基因造成叶绿体发育受阻、

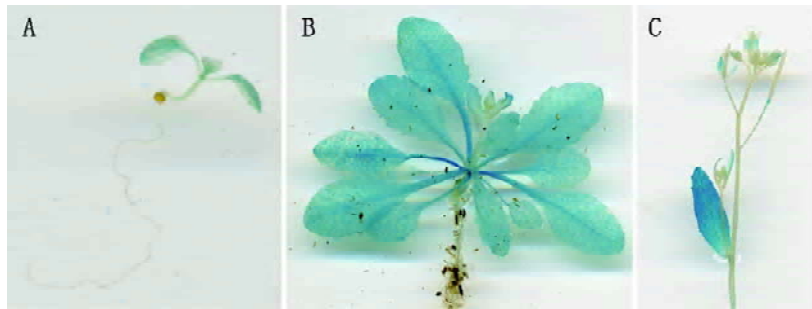


图5 不同苗龄中 *GmcpSecA::GUS* 转基因拟南芥的 GUS 染色
Fig.5 *GUS* expression of *GmcpSecA::GUS* recombinant transgene in the developing plants
A: 一周苗; B: 成熟莲座叶; C: 花序和种荚。

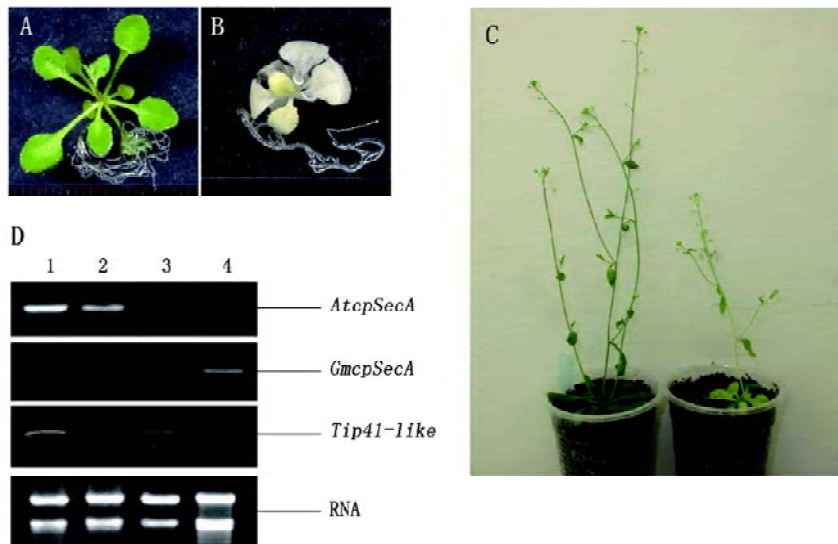


图6 *SecA* 功能回补

Fig.6 Complementation of *agy1* with *GmcpSecA*

A: 25 d 苗龄的野生型拟南芥; B: 25 d 苗龄的 *agy1*; C: 30 d 苗龄的野生型拟南芥和被回补的 *agy1* (左为野生型拟南芥; 右为回补的 *agy1*); D: 半定量 RT-PCR 分别检测野生型拟南芥、*agy1* 纯合体、*AGY1/agy1* 杂合体和被回补的 *agy1* 拟南芥中 *AtcpSecA* 和 *GmcpSecA* 的表达。泳道 1: 野生型拟南芥 cDNA 为模板的 PCR 产物; 泳道 2: *AGY1/agy1* 杂合体拟南芥 cDNA 为模板的 PCR 产物; 泳道 3: *agy1* 纯合体拟南芥 cDNA 为模板的 PCR 产物; 泳道 4: 被回补的 *agy1* cDNA 为模板的 PCR 产物。

叶片呈黄白色(马媛媛 2006), 通过将构建 *35S::GmcpSecA* 转化 *AGY1/agy1* 杂合体拟南芥, 转基因幼苗的叶片呈黄绿色(图6-C), 能部分地进行光合自养并正常开花结实, 能够完成其生活史, 表明 *GmcpSecA* 基因部分地回补了 *agy1* 的生长缺陷。半定量 RT-PCR 也表明回补了的 *agy1* 体内确实表达了 *GmcpSecA*, 而没有 *AtcpSecA* 的表达(图6-D)。这些结果充分说明了 *GmcpSecA* 基因在拟南芥 *agy1* 中能够部分代替 *AtcpSecA* 基因发挥作用, 参与叶绿体功能的正常发挥, 回补拟南芥 *agy1* 由于 *AtcpSecA*

被破坏造成的生长缺陷。但不管从回补幼苗的表型还是 RT-PCR 的结果都可以看出, 转基因幼苗并没有被回补到野生型的程度, 这可能是由于转基因幼苗里 *GmcpSecA* 的表达水平低于野生型中 *AtcpSecA* 的表达水平。这些结果说明了拟南芥和大豆中 *SecA* 的功能虽然相似, 但同时又有细微的差异。那么 *GmcpSecA* 是否能够完全回补 *agy1* 由于 *cpSecA* 被破坏造成的生长缺陷? *GmcpSecA* 基因在大豆叶绿体发育过程中发挥功能的详细分子机制是怎样的? 这些问题有待进一步的实验来探索。

参考文献

- 李金萍, 李鹏丽, 于蕴卿, 王宁宁(2009). 拟南芥 *AtcpSecA* 基因表达的特异性. 植物生理学通讯, 45: 244~248
- 马媛媛(2006). 大豆 *GmSARK* 基因的结构与功能分析及拟南芥两个衰老相关突变体的初步鉴定[博士学位论文]. 天津: 南开大学
- Sambrook J, Russell DW. 黄培堂等译(2002). 分子克隆实验指南(第三版). 北京: 科学出版社
- Blume B, Grierson D (1997). Expression of ACC oxidase promoter-GUS fusions in tomato and *Nicotiana plumbaginifolia* regulated by developmental and environmental stimuli. *Plant J*, 12 (4): 731~746
- Chi W, Ma JF, Zhang D, Guo J, Chen F, Lu C, Zhang L (2008). The pentatricopeptide repeat protein DELAYED GREENING1 is involved in the regulation of early chloroplast development and chloroplast gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 147 (2): 573~584
- Clough SJ, Bent AF (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16 (6): 735~743
- Di Cola A, Klostermann E, Robinson C (2005). The complexity of pathways for protein import into thylakoids: it's not easy being green. *Biochem Soc Trans*, 33: 1024~1027
- Fehr WR, Caviness CE, Burmood DT, Pennington JS (1971). Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Sci*, 11: 929~931
- Hawrd SR, Napier JA, Gray JC (1997). Chloroplast SecA functions as a membrane-associated component of the Sec-like protein translocase of pea chloroplasts. *Eur J Biochem*, 248 (3): 724~730
- Keegstra K, Cline K (1999). Protein import and routing systems of chloroplasts. *Plant Cell*, 11 (4): 557~570
- Liu D, Gong Q, Ma Y, Li P, Li J, Yang S, Yuan L, Yu Y, Pan D, Xu F, Wang NN (2010). cpSecA, a thylakoid protein translocase subunit, is essential for photosynthetic development in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 61 (6): 1655~1669
- Mitchell C, Oliver D (1993). Two distinct ATP-binding domains are needed to promote protein export by *Escherichia coli* SecA ATPase. *Mol Microbial*, 10 (3): 483~497
- Nohara T, Nakai M, Goto A, Endo T (1995). Isolation and characterization of the cDNA for pea chloroplast SecA evolutionary conservation of the bacterial-type SecA-dependent protein transport within chloroplasts. *FEBS Lett*, 364 (3): 305~308