

甜菜胞质型谷氨酰胺合成酶基因组 DNA 的克隆

康传红¹, 王淑春¹, 陈胜勇², 李彩凤^{2,*}

¹黑龙江大学生命科学学院, 哈尔滨 150080; ²东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030

摘要: 以甜菜叶片为材料, 用CTAB法提取基因组DNA。以分段PCR法扩增得到了完整的甜菜胞质型谷氨酰胺合成酶(GS1)基因组DNA。采用RT-PCR法扩增此GS1基因(*GS1*)的cDNA序列应用于对照。获得了长度为9 606 bp的完整的*GS1* DNA序列和长度为1 068 bp的*GS1* cDNA序列。分析*GS1*基因组DNA序列表明, 它包含13个外显子, 被12个内含子分隔开。其外显子区与已公布的*GS1* mRNA序列的相似性达99.5%。RT-PCR法获得的cDNA序列与已知的*GS1* mRNA序列相似性达99.6%。而2次实验中*GS1*基因组DNA外显子区与*GS1* cDNA序列的相似性达99.9%。GenBank登录号为EU370974。
关键词: 甜菜; 谷氨酰胺合成酶; 基因克隆

Genomic DNA Cloning of Cytosolic Glutamine Synthetase from Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.)

KANG Chuan-Hong¹, WANG Shu-Chun¹, CHEN Sheng-Yong², LI Cai-Feng^{2,*}

¹College of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin 150080, China; ²College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: Genomic DNA was extracted from sugar beet leaves by CTAB method in this paper. Cytosolic glutamine synthetase (GS1) genomic DNA was cloned by subsection PCR method, and the full-length *GS1* gene sequence was successfully obtained. The partial *GS1* cDNA sequence was obtained by RT-PCR method and compared to *GS1* gene. The full length of *GS1* genomic DNA was 9 606 bp, including 13 exons which were separated by 12 introns. The sequence similarity between exon parts of *GS1* genomic DNA and the known *GS1* mRNA was 99.5%. *GS1* cDNA sequence was 1 068 bp, and the sequence similarity between this *GS1* cDNA and the known *GS1* mRNA was 99.6%. Meanwhile, the sequence similarity between exon parts of *GS1* genomic DNA and *GS1* cDNA cloned in the experiment was 99.9%. The gene accession number in GenBank was EU370974.

Key words: sugar beet (*Beta vulgaris*); glutamine synthetase; gene cloning

在植物生长发育过程中, 氮素同化之重要已不言而喻。其中, 无机氮必须同化为谷氨酰胺和谷氨酸等有机氮化合物才能为植物体利用。谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, EC6.3.1.2, GS)是参与这一氨同化过程的关键酶之一(Gebhardt等1986; 李常健等2000, 2001; 韩娜等2004), 在ATP供能的情况下, 它催化 NH_4^+ 同化成谷氨酰胺。后者又在谷氨酸合酶(GOGAT)的催化下, 将其酰胺转移到 α -酮戊二酸上, 生成2个分子的谷氨酸。生物化学和遗传学研究表明, GS和GOGAT构成的循环反应是正常条件下高等植物氮同化的主要途径。

在甜菜中存在2种类型的GS, 即胞质型的GS1和叶绿体型的GS2。前者主要同化内源性蛋白质降解和氨基酸分解代谢产生的氨, 并可能在氮素的转运中起作用(Lam等1996; 袁永泽等2002)。后者则同化 NO_3^- 经硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶

催化产生的氨以及光呼吸作用产生的氨的再同化(Wallsgrove等1987)。甜菜GS基因的表达既有组织器官专一性, 又受环境和发育因子的影响, 因此弄清楚甜菜这一特定作物中GS基因的编码区, 就可以为进一步分离此基因的调控区建立基础。本文用分段PCR法研究了甜菜*GS1*的DNA序列, 以期能为此基因的表达和调控以及为实现甜菜高同化氮基因操作提供分子生物学的解释和参考。

材料与方法

植物材料为甜菜(*Beta vulgaris* L.)中标准偏高

收稿 2008-04-30 修定 2008-05-28

资助 国家自然科学基金(30471017, 30771276)和黑龙江省博士后科研启动基金(BSH-Q06103)。

* 通讯作者(E-mail: licai Feng1965@yahoo.com.cn; Tel: 0451-55190854)。

糖型二倍体的品种‘甜研7号’。大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自北京天根公司, pMD19-T 载体为 TaKaRa 公司产品。酶和试剂盒以及 TaKaRa Ex Taq、PrimeSTARTM HS DNA 聚合酶、TaKaRa 琼脂凝胶 DNA Purification Kit Ver. 2.0、TaKaRa DNA

A-Tailing Kit、TaKaRa RNA LA PCRTM Kit (AMV) Ver. 1.1 均购自 TaKaRa 公司。

根据 GenBank 上已知的甜菜 *GS1* mRNA 序列 (登录号: AF343667), 用 Primer Premier 5.0 引物设计软件设计引物, 引物设计如图 1。



图 1 引物设计示意图

Fig.1 Primer design

横线代表甜菜 *GS1* mRNA 全长序列, 引物的编号是引物 5' 端在 *GS1* mRNA 序列中的位置, 箭头表示扩增方向。

引物由上海生工公司合成, 如下。

(1) *GS1* DNA 分段克隆引物为 PF1: 5' ATG GCT CTT CTT AAC GAT CT 3' 20 bp; PR239: 5' TCC TTG AAA ATA GCC TGA 3' 18 bp; PF3254: 5' CAA CAG CCC TCA GGC TAT 3' 18 bp; PR3496: 5' TAA TGC CAA GTG CCA ACG 3' 18 bp; PF334: 5' AAA ATC TTC AGC CAC CCA 3' 18 bp; PR855: 5' CCC GTA GGC AGC AAT GTG 3' 18 bp; PF818: 5' TGA GTC TCC GTC ACA AGG 3' 18 bp; PR1071: 5' TCA AGG CTT TCC GAG GAT 3' 18 bp; PF88: 5' GGG TTG GAT ATG AGA AGC 3' 18 bp; PR1062: 5' TCC GAG GAT AGT TGT TTC AG 3' 20 bp。

(2) *GS1* mRNA 的 RT-PCR 引物为 PF1: 5' ATG GCT CTT CTT AAC GAT CT 3' 20 bp; PR1068: 5' AGG CTT TCC GAG GAT AGT TGT TTC A 3' 25 bp。

用 CTAB 法从甜菜叶片中提取基因组 DNA (康传红等 2002)。

目的片段 1 用 TaKaRa Ex Taq 酶进行 PCR 扩增, 实验过程中对 PCR 反应体系的 4 个组分 (Mg^{2+} 、dNTPs、引物浓度和酶的用量) 进行四因素三水平的正交优化, 最终确定的反应体系见表 1。反应条件为: 预变性 94 $^{\circ}C$ 5 min; 变性 94 $^{\circ}C$ 30 s, 退火 57 $^{\circ}C$ 1 min, 延伸 72 $^{\circ}C$ 5 min, 循环数为 30 个, 72 $^{\circ}C$ 10 min。

表 1 PCR 反应体系

Table 1 PCR reaction system

PCR 组分	体积 / μ L
10 \times Ex Taq 缓冲液	5
Mg^{2+} (25 mmol \cdot L $^{-1}$)	5
dNTP 混合液 (各 2.5 mmol \cdot L $^{-1}$)	6
模板 DNA (123.9 ng \cdot μ L $^{-1}$)	0.7
PF334 (20 μ mol \cdot L $^{-1}$)	0.5
PR855 (20 μ mol \cdot L $^{-1}$)	0.5
TaKaRa Ex Taq (5 U \cdot μ L $^{-1}$)	0.4
双蒸水	31.9
总体积	50

目的片段 2、3 和 4 的 PCR 扩增用高保真酶 PrimeSTARTM HS DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, 反应体系按酶的说明书进行, 各对引物的反应条件为: 引物对为 PF1 和 PR239 时, 变性 98 $^{\circ}C$ 10 s, 退火 56 $^{\circ}C$ 15 s, 延伸 72 $^{\circ}C$ 3 min, 循环数 30 个, 72 $^{\circ}C$ 10 min; 引物对为 PF818 和 PR1071 时, 变性 98 $^{\circ}C$ 10 s, 退火 56 $^{\circ}C$ 15 s, 延伸 72 $^{\circ}C$ 1 min, 循环数 30 个, 72 $^{\circ}C$ 10 min; 引物对为 PF3254 和 PR3496 时, 变性 98 $^{\circ}C$ 10 s, 退火 55 $^{\circ}C$ 15 s, 延伸 72 $^{\circ}C$ 3 min, 循环数 30 个, 72 $^{\circ}C$ 10 min。

目的片段的胶回收按 TaKaRa 胶回收试剂盒进行。

平末端 DNA 片段的加 A 反应由于 PCR 过程中

使用了高保真酶PrimeSTAR™ HS DNA聚合酶, 以致目的片段2、3、4几乎都为平滑末端, 在将这些目的片段克隆到T载体之前, 要对其进行3'末端加A反应。具体操作按TaKaRa DNA A-Tailing Kit说明书进行。

A末端DNA片段的连接和转化时, 将目的片段1及A末端的目的片段2、3、4与pMD19-T载体连接, 转化大肠杆菌感受态细胞DH5 α , 通过蓝白筛选选择阳性菌落。具体操作按说明书进行。

阳性克隆子的PCR验证时, 在蓝白平板上随机选择几个白斑, 转接到1 mL LB+Amp液体培养基中, 37 180 r·min⁻¹过夜摇菌, 进行菌液PCR。反应体系按PrimeSTAR™ HS DNA聚合酶说明书进行, 使用了载体上的通用引物, 退火温度为68 $^{\circ}$ 。选择阳性克隆子去测序。

甜菜总RNA的提取采用Trizol试剂, 操作按说明书进行。

RT-PCR反应按TaKaRa RNA LA PCR™ Kit说明书进行。引物对为PF1和PR1068, 退火温度为51 $^{\circ}$ 。按照上述方法将目的片段进行克隆和验证。

结果与讨论

1 *GSI* DNA基因的PCR扩增

根据GenBank上已知的甜菜*GSI* mRNA序列(登录号: AF343667)设计引物, 经引物对PF334和PR855 PCR扩增得到大于5 kb的DNA片段(图2),

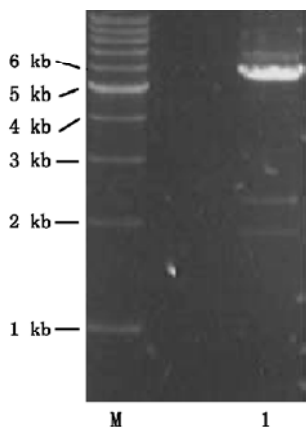


图2 引物对PF334和PR855的PCR扩增

Fig.2 PCR of PF334 and PR855

M: 1.5 kb DNA分子量; 1: PCR扩增产物。

测序结果显示此目的片段长度为5 201 bp。经引物对PF1和PR239 PCR扩增得到大于3 kb的DNA片段(图3), 测序结果显示此目的片段长度为3 280 bp。经引物对PF818和PR1071 PCR扩增得到大于800 bp的DNA片段(图4), 测序结果显示此目的片段长度为817 bp。经引物对PF3254和PR3496 PCR扩增得到大于500 bp的DNA片段(图5), 测序结果显示此目的片段长度为589 bp。

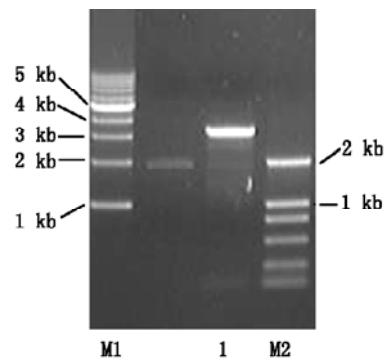


图3 引物对PF1和PR239的PCR扩增

Fig.3 PCR of PF1 and PR239

M1: 1.5 kb DNA分子量; M2: DL2000分子量; 1: PCR扩增产物。

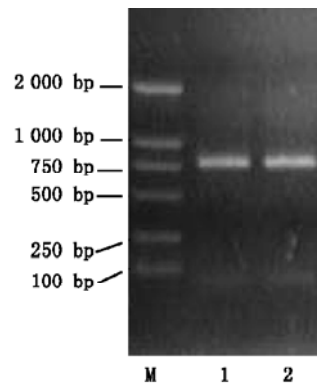


图4 引物对PF818和PR1071的PCR扩增

Fig.4 PCR of PF818 and PR1071

M: DL2000分子量; 1、2: PCR扩增产物。

2 *GSI* DNA扩增片段的阳性克隆子的PCR验证

经引物对PF334和PR855、PF1和PR239、PF818和PR1071、PF3254和PR3496的PCR法验证阳性克隆子的结果分别如图6~9所示。

3 *GSI* DNA的序列拼接

采用分段克隆的方法获得的4段DNA序列均为目的片段(序列拼接资料未列出)。经过拼接得

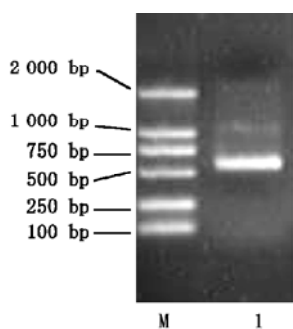


图5 引物对PF3254和PR3496的PCR扩增
Fig.5 PCR of PF3254 and PR3496
M: DL2000分子量; 1: PCR扩增产物。

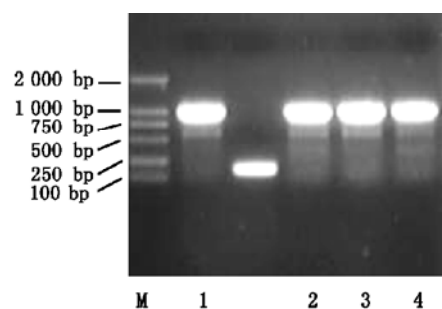


图8 PF818和PR1071的转化
Fig.8 Transformation of PF818 and PR1071
M: DL2000分子量; 1~4: 目的PCR扩增产物。

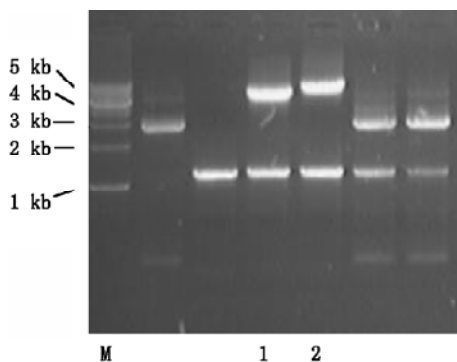


图6 PF334和PR855的转化
Fig.6 Transformation of PF334 and PR855
M: 1.5 kb DNA分子量; 1, 2: 目的PCR扩增产物。

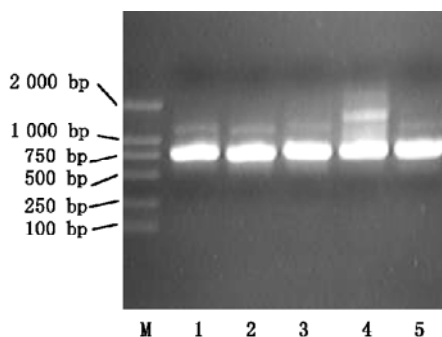


图9 PF3254和PR3496的转化
Fig.9 Transformation of PF3254 and PR3496
M: DL2000分子量; 1~5: 目的PCR扩增产物。

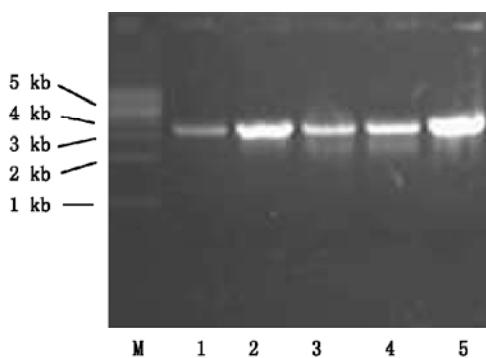


图7 PF1和PR239的转化
Fig.7 Transformation of PF1 and PR239
M: 1.5 kb DNA分子量; 1~5: 目的PCR扩增产物。

2 739 bp; 最小的内含子为第11个内含子, 长度为83 bp; 其余的内含子长度在103~482 bp之间。外显子区与已公布的*GSI* mRNA序列相似性达99.5%, 2个序列只有5个碱基差异。

4 *GSI* cDNA的RT-PCR和PCR验证

经引物对PF1和PR1068反转录PCR扩增得到大于1 000 bp的DNA片段(图10), 测序结果显示

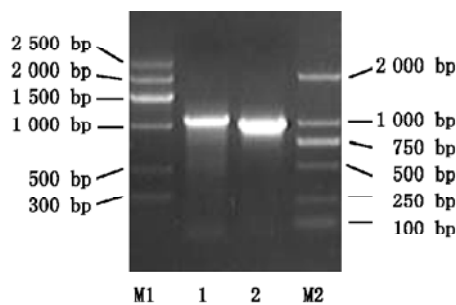


图10 RT-PCR的电泳图谱
Fig.10 Electrophoretogram of RT-PCR
M1: 1.5 kb DNA分子量; M2: DL2000分子量; 1, 2: PCR扩增产物。

到全长*GSI*基因组DNA, 长度为9 606 bp, 与已知*GSI* mRNA序列比对分析的结果表明, 其包含13个外显子和12个内含子, 外显子与内含子的边界为GT和AG。最大的内含子为第5个内含子, 长度为3 760 bp; 次大的内含子是第3个内含子, 长度为

此目的片段长度为1 068 bp。阳性克隆子的PCR验证结果如图11(测序资料未列出)。GS1 cDNA片段与已公布的GS1 mRNA序列相似性达99.6%,两者只有4个碱基的差异。

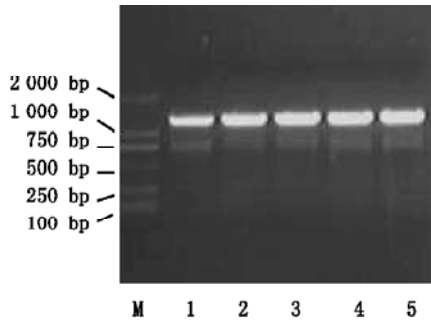


图11 PF1和PR1068的转化

Fig.11 Transformation of PF1 and PR1068
M: DL2000分子量; 1~5: 目的PCR扩增产物。

RT-PCR法得到的GS1 cDNA序列测序结果与已克隆到的GS1 DNA序列的外显子区的相似性为99.9%,二者只有1个碱基的差异。

综上所述,可以得到以下几点认识。

(1)本文以甜菜为试材,从叶片中提取基因组DNA,并以此为模板,根据GenBank上的已登录的甜菜GS1 mRNA序列设计引物,进行PCR扩增。由于GS基因DNA序列未知,无法估计它的限制性内切酶位点,故将PCR产物克隆到T载体中。为了使获得的基因序列更具可信度,在PCR时,采用了高保真酶(TaKaRa Ex Taq),这是一种热启动酶,PCR的结果更可靠。

(2)在预备试验时,我们感到PF88和PR1062引物对偶尔能扩增出大于9 kb的条带。因此设想欲克隆的GS1 DNA片段可能很大,很难一步扩增出全长,于是采取了分段克隆的方法。经过多次的PCR反应体系的摸索,结果克隆到了约5 kb的片段,然后在此基础上设计引物,克隆基因的其它部分。最后将所得的4个片段拼接成全长基因序列,最终获得长度为9 606 bp的完整GS1 DNA序列。

(3)迄今,许多植物的GS1基因已得到克隆,序列信息在GenBank数据库中可以查到,但大多数序列信息都是cDNA,基因组序列的信息很少。经过

拼接得到的全长GS1基因组DNA与已知GS1 mRNA的序列比对分析得知,它包含13个外显子和12个内含子。这与Thykjaer等(1997)认为的植物GS基因的保守模式是12个外显子被11个内含子分开有差异,可见甜菜有自身的GS基因保守模式。GS1基因组DNA外显子和内含子的边界为GT和AG,这与通常认为的植物基因中内含子的边界(韩娜等2004)一致。

(4)本文中采用RT-PCR方法获得长度为1 068 bp的GS1 cDNA片段,与已公布的GS1 mRNA序列虽然有4个碱基的差异(两者相似性达99.6%),但由此GS1 cDNA推导出的氨基酸序列与已知GS1 mRNA翻译得到的氨基酸序列完全一致,可见GS1的氨基酸序列是非常保守和稳定的。用RT-PCR法得到的GS1 cDNA序列测序结果与已克隆的GS1 DNA序列外显子区的相似性为99.9%,二者只有1个碱基的差异,说明2次实验的结果一致而可靠。

参考文献

- 韩娜,葛荣朝,赵宝存,沈银柱,黄占景(2004). 植物谷氨酰胺合成酶研究进展. 河北师范大学学报(自然科学版), 28 (4): 407~410
- 康传红,韩晓云,关卫夫,郭德栋,王桂芝(2002). 甜菜基因组DNA三种提取方法的对比研究. 中国糖料, (2): 1~4
- 李常健,林清华,张楚富(2000). 高等植物中氨同化酶及其同工酶研究. 零陵师范高等专科学校学报, 21 (3): 20~22
- 李常健,林清华,张楚富(2001). 高等植物谷氨酰胺合成酶研究的进展. 生物学杂志, 18 (4): 1~3
- 袁永泽,林清华,张楚富,王其海,魏国威(2002). 蔗糖对水稻幼苗叶片谷氨酰胺合成酶和1,5-二磷酸核酮糖羧化酶加氧酶的影响. 武汉植物学研究, 20 (3): 219~222
- Gebhardt C, Oliver JE, Forde BG, Mifflin BJ (1986). Primary structure and differential expression of glutamine synthetase genes in nodules, roots, and leaves of *Phaseolus vulgaris*. EMBO J, 5 (7): 1429~1435
- Lam HM, Coschigano KT, Oliveiza IC (1996). The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 47: 569~593
- Thykjaer T, Danielsen D, She Q (1997). Organization and expression of genes in the genomic region surrounding the glutamine synthetase gene Gln1 from *Lotus japonicus*. Mol Gen Genet, 255: 628~636
- Wallsgrave RM, Turner JC, Hall NP (1987). Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase biochemical and genetic analysis. Plant Physiol, 83: 155~158