

## 生物信息学在植物谷氨酰胺合成酶同工酶基因研究中的应用

叶雄 张楚富\*

武汉大学生命科学院植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072

### Applications of Bioinformatics in the Study of Glutamine Synthetase Isozyme Genes of Plants

YE Xiong, ZHANG Chu-Fu\*

Key Laboratory of Ministry of Education for Plant Developmental Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China

**提要** 介绍了生物信息学在植物谷氨酰胺合成酶同工酶基因研究中的应用进展。

**关键词** 谷氨酰胺合成酶; 生物信息学; 序列比对; 分子进化树

谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS EC 6.3.1.2)是高等植物中氨同化的关键酶(Mifflin和Lea 1980), 在有ATP的情况下, 它催化 $\text{NH}_4^+$ 同化成谷氨酰胺(Tate等1972)。谷氨酰胺在谷氨酸合酶(glutamate synthase, GOGAT)的催化下, 将酰胺转移给 $\alpha$ -酮戊二酸, 生成2个分子的谷氨酸。这两种反应是正常条件下高等植物同化氨的主要途径。

GS广泛分布在植物的不同组织和器官中, 细胞内有2种不同同工酶: 叶绿体型(GS2)和胞液型(GS1)(McNally和Hirel 1983; Hirel等1984)。Edwards等(1990)分析豌豆GS3A基因启动子的结果证明, 叶肉维管组织细胞液中GS优先表达。他们进一步的研究证实, GS1定位在植物韧皮部和相关维管组织中。GS1在叶中其它部位的表达随着发育阶段和物种的不同而变化。Brugière等(2000)证明, 烟草叶的成熟阶段的叶肉细胞胞液中GS大量地表达。后来发现GS1也存在大麦叶肉中(Tobin和Yamaya 2001), 并也从豌豆叶肉原生质体得到了分离(Wallsgrove等1979)。在大多数植物的根中, 也存在胞液型GS, 但在少数植物根中曾观察到质体型GS活性。Zhang等(1997)在水稻根部检测到2种GS同工酶: GSra和GSrb。除了存在于根和叶以外, 有一些特殊的组织和器官中也存在。例如, 在菜豆与根瘤菌共生的固氮开始阶段, GS同工酶在根瘤中特异地形成(Lara等1983)。玉米的一个GS1基因可在玉米的花梗中

优先高度地表达(Rastogi等1998)。

一般认为, 植物叶绿体中主要分布的是GS2(Avila等2001)。但最近的研究表明, 松树叶绿体中并无GS2分布, 松树中的GS主要是胞液型的, 包括GS1a和GS1b两种同工酶。GS2还存在于根部的质体和其它的非光合组织中, 其分布随物种和质体类型的不同而异同(Concepción等2000)。

GS1功能主要是参与种子萌发时的储存氮源转运, 叶片衰老时氮的转移再利用; GS2的功能主要是光呼吸过程中参与氨的再同化。

GS的分子生物学研究始于1983年。此后, 人们采用各种生物化学和分子生物学方法对GS同工酶基因进行了研究, 并对其有了比较全面的认识。不同GS基因编码不同亚基多肽, 再组成不同GS同工酶。一般而言, 组成叶绿体型GS亚基的分子量为45 kDa左右, 而组成胞液型GS亚基的分子量小于40 kDa。在大多数植物中, GS同工酶至少由4个功能基因组成的多基因家族所编码, 这些基因至少编码1种质体型和3种胞液型GS多肽。不同亚基多肽组成多种类型的GS同工酶。研究表明, 在菜豆中, 编码GS同工酶的基因有4个, 分别编码4种不同GS多肽。一个基因编码叶绿体GS特有的 $\delta$ 亚基多肽; 另一个编

收稿 2005-06-03 修定 2005-12-03

资助 国家自然科学基金(30270130)。

\*通讯作者(E-mail: cfzhang@whu.edu.cn, Tel: 027-87867314)。

码根、叶和根瘤中GS的一个亚基多肽,称为 $\beta$ 亚基;第3个基因编码的 $\gamma$ 亚基是根瘤GS所特有;第4个基因编码的 $\alpha$ 亚基存在于根和叶GS中(Peterman和Goodman 1991;印莉萍等1995)。

最近10年来,计算机和网络技术得到飞速发展,生物大分子序列和结构测定技术也不断有新的突破,因而不同物种不同分子的序列、结构和功能信息每天都以惊人的速度增长,网络上大量数据库应运而生。结合生物学实验方法,并采用这些生物信息学资源研究GS及其基因已成为新的热点。

### 1 Internet网上可用于GS和基因研究的资源

在Internet网上,有许多可用于GS及基因研究的资源。对每一位从事GS研究的人员来说,大量阅读相关文献以了解GS研究进展是非常重要的。网络检索文献的途径有很多,可通过网络直接进入一些文献数据库进行检索。对没有这些文献数据库链接的网络,可进入PubMed Central (PMC, <http://www.pubmedcentral.nih.gov/>)数据库进行检索。PubMed用户用PMC检索文献的同时也可通过NCBI网站链接到期刊网站免费检索,阅读文献全文。用google搜索引擎也能准确而且更快捷地检索所要查阅的文献。方法就是用inurl语法进行搜索,如输入inurl:pdf "glutamine synthetase",可以搜索到上万篇有关GS的pdf格式的文献。如果要搜索某篇题目的文献,可在引号内输入文献题目,有时还可精确找到此篇文章,搜索中文文献可不用引号。此外,现在已开发出专门进行文献检索的软件,如Reference Manager 9.0,也能很方便、快捷地检索文献。

目前,网络上已建立了许多可为GS研究提供信息的数据库。著名的三大综合数据库NCBI (National Center for Biotechnology Information)、EMBL (European Molecular Biology Laboratory)、DDBJ (DNA Data Bank of Japan)中包含了大量不同物种、不同GS同工酶蛋白和核酸序列的基本信息,这些信息为GS及其基因的实验研究提供了很大的帮助,现在越来越多从事GS分子研究的人员都会用到这些数据库进行搜索。每一个GS基因在

这三大数据库中有一个收录号(ACCESSION),该号码可直接搜索到该基因的各种信息。表1是一些植物GS基因的收录号及其表达定位(Jacek和Andrzej 1997)。

此外,网络上还有许多可用于研究GS的特殊数据库。如真核生物启动子数据库(EPD, <http://www.epd.isb-sib.ch/>)可收集所有转录起始点,即已经由实验确定的第II类DNA聚合酶启动子序列(Perier等2000);TRANSFAC数据库(<http://transfac.gbf.de/TRANSFAC/>)是收集真核生物基因表达调控因子的数据库(Wingender等2000);植物顺式作用调控因子数据库PlantCARE (<http://sphinx.rug.ac.be.8080/plantcare/>) (Rombauts等1999);PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>)是从文献中搜集的维管植物顺式作用调控元件DNA模体的数据库(Higo等1999);Mendel数据库(<http://jiiio6.jic.bbsrc.ac.uk/>)可搜集植物STS (sequence tag site, 序列标签位点)和EST (expressed sequence tag, 表达序列标签)序列,并加有基因家族的信息(郝柏林和张淑誉2000)。此外,还有一些数据库将在下文中陆续加以介绍。

### 2 GS及其基因的序列比对

在GS及其基因的研究中,可以通过比较分析的方法获取有用的信息,对不同的GS进行相互比较以寻找某一GS可能具备的特征。在蛋白质和核酸序列的两两比较中,BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast>)和FASTA是现在应用最广泛的序列相似性搜索工具。

Concepción等(2000)的研究发现,松树的2个编码不同胞质GS的基因(*GS1a*和*GS1b*)在基因组中是紧密地连锁在一起的。他们从cDNA文库中已筛选出这2个基因,并用双脱氧链终止法检测了它们的核酸序列。以FASTA程序比对这两基因编码序列的结果表明,这2个序列高度地保守,有73.4%同源,只是用不同密码子编码相同氨基酸的频率较高。而它们的5'和3'非编码区同源性较差,这说明这2个cDNA序列代表不同的GS基因。Northern blotting分析表明,*GS1a*基因得到大量转录,而*GS1b*基因很少转录。为了证明GS1b也是胞质型GS,他们将GS1b氨基酸序列

表1 一些植物GS基因的收录号及表达定位(Jacek和Andrej 1997)

物种	收录号	表达部位	参考文献
水稻 <i>Oryza sativa</i>	X14245	芽	Sakamoto 等 1989
<i>Oryza sativa-rt</i>	X14244	根	Sakamoto 等 1989
<i>Oryza sativa-cl</i>	X14246	叶绿体	Sakamoto 等 1989
大麦 <i>Hordeum vulgare</i>	X69087	芽	Stroman 等 1990
<i>Hordeum vulgare-clr</i>	X53580	叶绿体	Stroman 等 1990
<i>Hordeum vulgare-cl</i>	X16000	叶绿体	Freeman 等 1990
玉米 <i>Zea mays-1</i>	D14576	根、芽	Sakakibara 等 1992
<i>Zea mays-2</i>	D14577	根、芽	Sakakibara 等 1992
<i>Zea mays-3</i>	D14578	根、芽	Sakakibara 等 1992
<i>Zea mays-1-1</i>	X65926	根、芽	Li 等 1993
<i>Zea mays-1-2</i>	X65927	根	Li 等 1993
<i>Zea mays-1-3</i>	X65928	根、芽	Li 等 1993
<i>Zea mays-1-4</i>	X65929	根、芽	Li 等 1993
芸苔 <i>Brassica napus-rl</i>	X76736	根	Schock 等 1994
<i>Brassica napus-cl-1</i>	X72751	叶绿体	Ochs 等 1993
莴苣 <i>Lactuca sativa</i>	X60092	芽	Sakamoto 等 1990
萝卜 <i>Raphanus sativus-A</i>	D25324	根、芽	Watanabe 等 1994
<i>Raphanus sativus-B</i>	D25325	根、芽	Watanabe 等 1994
<i>Raphanus sativus-C</i>	D25326	根、芽	Watanabe 等 1994
烟草 <i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	M19055	芽	Tingey 和 Coruzzi 1987
<i>Nicotiana tabacum-cl</i>	S39536	叶绿体	Becker 等 1992
<i>Nicotiana sylvestris-cl</i>	X66940	叶绿体	Becker 等 1992
菜豆 <i>Phaseolus vulgaris-ND</i>	X14605	仅在根瘤	Gebhardt 等 1986
<i>Phaseolus vulgaris-R1</i>	X04001	根、芽、根瘤	Gebhardt 等 1986
<i>Phaseolus vulgaris-R2</i>	X04002	根、芽	Gebhardt 等 1986
<i>Phaseolus vulgaris-cl</i>	X12738	叶绿体	Lightfoot 等 1988
豌豆 <i>Pisum sativum-rt</i>	X04763	根、根瘤	Tingey 等 1987
<i>Pisum sativum</i>	M20663	根、根瘤	Tingey 等 1988
<i>Pisum sativum-cl</i>	M20664	叶绿体	Tingey 等 1988
<i>Pisum sativum-lf</i>	X05514	叶绿体	Tingey 等 1987
黄羽扇豆 <i>Lupinus luteus-nd</i>	X71399	根瘤	Boron 和 Legocki 1994
大豆 <i>Glycine max-nd1</i>	X81700	根瘤	Marsolier 等 1995
<i>Glycine max-nd2</i>	X81460	根瘤	Marsolier 等 1995
<i>Glycine max</i>	S46513	芽	Miao 等 1991
苜蓿 <i>Medicago sativa-nd</i>	U15591	根瘤	Dunn 1988
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	S69727	叶绿体	Peterman 和 Goodman 1991
羽扇豆 <i>Lupinus angustifolius-nd</i>	X15578	根瘤	Grant 等 1989

分别与胞质型 GS 和质体型 GS 进行比对。结果显示, GS1b 有 83%~86% 序列与胞质型 GS 相同, 而只有 76% 与质粒型 GS 相同, 从而暗示 GS1b 为胞质型 GS。他们通过实验证明了这一结论。

如果需要对多个 GS 序列进行比对, 就要用 CLUSTAL W 程序。用该程序研究 GS 多序列中的

高度保守区域, 可以预测这些 GS 保守区域对维持三维结构的重要性。David 等(2000)将 5 个不同物种的 GS 氨基酸序列进行多序列比对时发现, 这 5 种 GS 的保守位点也即是活性位点。比对结果暗示不同的物种的 GS 具相同的催化机制, 亦可预测这些 GS 三级结构的某些特征。

以前的研究发现, I型GS (GSI)基因主要在原核生物中表达, 而真核生物通常还包含II型GS (GSII)基因, GSII也可在某些原核生物中表达。René等(2000)采用蛋白质的多序列比对法发现GSI样基因广泛地存在于高等植物中。他们运用CLUSTAL W程序, 以苜蓿(*Medicago truncatula*)中的MEDTR-Ia蛋白(AJ23821)与GSI和GSII蛋白进行比对的结果表明, 该类蛋白有36%~46%氨基酸序列与原核生物GS同源, 而只有少于25%的氨基酸与GSII同源。他们继续以MEDTR-Ia cDNA的3'非转录区作为探针进行Northern blotting分析, 可以观察到这个基因在该植物大多数器官中可得到表达。

### 3 GS及其基因分子进化树的构建

GS是植物氮同化的关键酶, 此酶在进化中是相当保守的, 因此可以将GS基因看作是一种生物钟, 以之衡量植物之间的进化关系。如果知道各种植物GS基因编码序列后, 就可以通过构建分子进化树来显示植物的进化关系。这涉及一系列系统树的构建方法, 主要有最大简约法(maximum parsimony method)、使用算术平均的不加权对群法(unweighted pair-group method using arithmetic average method, UPGMA)、邻接法(neighbor-joining method)、最大似然法(maximum likelihood method)和Fitch-mergolish法等。

Jacek和Andrej (1997)用这些方法构建分子进化树研究了植物GS基因进化。他们用如表1中的各GS基因收录号, 从GenBank核酸数据库中检索出各GS基因核酸序列, 分别用CLUSTAL W程序对这些基因进行比对; 用DNADIST程序分别计算第1、2、1+2、1+3、1+2+3密码子位点的距离矩阵, 该程序运用的是最大似然法; 这些距离矩阵再用邻接法和UPGMA法重构进化树。用PROTPARS、DNAPARS、DNADIST、NEIGHBOR、SEQBOOT、CONSENSE等程序进行以上运算后, 再用Treeview程序即可显示出来, 然后用KITSCH程序(主要应用Fitch-mergolish法)重新计算进化树分支的长度, 估算出分子钟进化时间。

运用这些生物信息学方法构建GS基因分子进

化树, 在许多的GS研究中得到了应用。René等(2000)也应用了构建GS基因分子进化树的方法, 进一步说明MEDTR-Ia基因与GSI型基因的进化关系比GSII型基因更加近, 从而证明GSI样基因在高等植物中广泛存在。Concepción等(2000)研究松树2个GS基因(*GS1a*和*GS1b*)在基因组中的定位时, 为了说明GS1a与GS1b之间关系, 他们构建GS1a、GS1b与被子植物GS1和GS2、真菌GS、原核生物GS这些酶的分子进化树, 结果表明这2个酶与被子植物GS1亲缘关系更近, 而且也能看到从GS1a、GS1b直到被子植物GS1之间的进化关系(图1)。

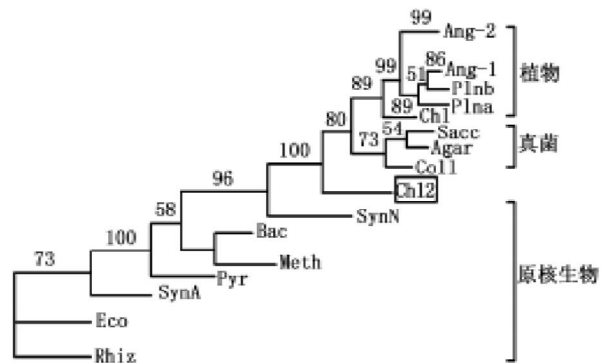


图1 GS分子进化树(Concepción等 2000)

图中可以看出一些植物、真菌类和原核生物之间的进化关系。Ang-1和Ang-2分别为被子植物GS1和GS2; Plna和Plnb分别为松树GS1a和GS1b; Chl、Sacc、Agar、Coll分别表示衣藻、啤酒酵母、双孢蘑菇、毛盘孢; Syn、Bac、Meth、Eco、Rhiz分别表示集胞藻、枯草芽孢杆菌、甲烷球菌、大肠杆菌、豌豆根瘤菌。

GS分子进化研究有助于进一步阐明植物进化的分子基础, 探索GS基因起源机制, 从进化的角度研究GS及其基因序列与功能关系。这一方法在今后GS的研究中将会得到更多的应用。

### 4 GS及其基因序列分析

在GS的研究早期, 主要用一些传统的分子生物学方法, 如PAGE、引物延伸法、凝胶阻滞实验、DNase I足迹实验等进行GS基因调控区域和编码区域的研究。最近10年, 生物信息学发展起来以后, 人们又用一些电脑程序对这些区域进行分析和预测。目前, 已经开发出了许多综合商业软件, 如Wisconsin package。商业软件虽然

较精确, 但比较昂贵。因此, 人们还可以用网络上的一些免费软件进行分析与预测, 然后根据这些信息进行实验设计。由于这些软件准确性不高, 有必要将GS序列提呈给多个不同程序加以分析, 以求得较满意结果。如可用Genebuilder程序进行TATA box、poly A位点、转录因子预测。

Josefa等(2004)研究松树*GS1b*基因5'上游区时, 发现了一个赤霉素(GA)应答元件的存在。为了分析和预测*GS1b*基因5'上游元件, 他们在前面介绍的3个数据库——PLACE、PlantCARE和TRANSFAC中搜索顺式调节序列, 并结合预测程序分析, 发现*GS1b*基因启动子上游存在1个AT盒、1个AC基序和1个赤霉素应答元件, 然后他们用凝胶阻滞实验证实了位于转录起始位点-786~-748 bp应答元件的存在。Michael等(2002)设计研究玉米*GS<sub>1-2</sub>*基因(AF359511)的实验前, 对其进行分析与预测的结果表明, -39~-34 bp存在一个TATA盒; 其-165~-162 bp处为CAAT盒。此外, P site、c-myc和Nit 2和3个外显子序列也都可以分析出来。Arnaud等(2005)在研究中对Cg GS基因5'和3'非编码区用计算机进行分析时, 也得出了较准确的信息。

Thykjaer等(1997)用类似的方法研究百脉根(*Lotus japonicus*) GS基因*Gln1*在23 326 bp基因组区域的定位时, 分析LJ *Gln1*基因5'上游区的结果表明: 除了+1起始位点外, -163处还有一弱起始位点; TATA盒位于-33和-168 bp处; 重复序列分别位于-715、-685、-419、-318 bp处。他们用*Gln1*基因下游序列进行数据库搜索时, 发现这一序列中含有2个短的开阅读框, 并且这2个ORF表达产物与驱动蛋白轻链(kinesin light chain)的某些部位有一定的相似性, 用BLAST程序进行序列比对也证明了这种相似性, 认为它们是同一基因*Krm* (kinesin repeat motif)基因的2个外显子。为了发现其它基因是否存在, 他们用Grail 1.3外显子识别程序对整个23 326 bp基因组区域进行预测, 这可点击进入<http://avalon.emp.ornl.gov/Grail-1.3/>网页进行免费在线分析得到。该程序可高度精确地预测到*Gln1*和*Krm*基因外显子-内含子结构。同时还发现在*Gln1*和*Krm*基因之间存在

3个外显子, 预测的ORF有210个氨基酸, 而且作数据库搜索时没有发现任何基因或蛋白是与其相似的。不同组织的Northern blotting分析中也没有观察到该基因转录, 此基因被命名为*Pge1*基因(predicted gene)。分析*Gln1*基因上游区发现存在*dRtp1*、*dRtp2*基因和一些重复序列。这些预测结果用分子生物学实验在一定程度上得到了证明。

生物信息学方法和工具还可以用来研究GS蛋白的生化性质。网络上应用得最广泛的免费蛋白质计算工具是ExPASy。它包括蛋白数据库(SWISS-PROT)、蛋白分析工具(<http://cn.expasy.org/tools/>)等, 这些主要用来分析蛋白序列和结构。Concepción等(2000)就用到这些工具分析了GS的生化性质。他们先用*GS1a*和*GS1b*核酸序列预测其蛋白质产物, 再用氨基酸序列预测出诸如分子量、等电点以及在pH 7.0时的净电荷等生化性质, 并对这些性质进行了比较(表2)。从这些性质中可以看出, *GS1a*与*GS1b*分子量大体相同, 所以用SDS-PAGE不能将其分离开来。而它们的等电点分别为6.6、6.0, 则可以用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(2D PAGE)将其分开。以后用2D PAGE确证在2号染色体上*GS1a*、*GS1b*是连锁在一起的。现在网络上已建立了许多2D PAGE蛋白质组数据库, 可以用来搜索某些物种特定组织特定发育阶段的2D PAGE蛋白质组图。上述研究进入<http://www.pierroton.inra.fr/genetics/2D/>数据库可以搜索到2D PAGE图, 用*GS1a*、*GS1b*分子量和等电点数据可找到这2种GS斑点所在位置, 然后再以一系列实验证明在基因组中*GS1a*、*GS1b*基因是连锁的。

表2 用蛋白质分析工具预测出的GS生化性质  
(Concepción等 2000)

	氨基酸序列同一性	残基数	分子量/ kDa	等电点	净电荷 (pH 7.0)	1 A <sub>280nm</sub> / mg·mL <sup>-1</sup>
<i>GS1b</i>	100.0	355	39.2	6.0	-4.0	0.6
<i>GS1a</i>	81.5	357	39.5	6.6	-2.0	0.6

总之, 从以上的GS研究可以看出, 生物信息学方法是一个新兴而十分有效的方法。它在GS

研究中得到了越来越广泛的应用。但这一技术发展还不够成熟, 尚未达到部分取代实验技术的程度, 研究中只能作为辅助技术。GS 功能是由其三级结构决定的, 而三级结构又是由核酸序列决定的, 因此在今后的 GS 研究中, 应根据生物技术和信息技术的不断提高, 可直接从 GS 基因的核酸序列中精确地预测它的表达调控机制和三级结构, 这对 GS 及其基因研究来说, 很有意义。

### 参考文献

- 郝柏林, 张淑誉 (2000). 生物信息学手册. 上海: 上海科学技术出版社, 91~92
- 印莉萍, 刘祥林, 林忠平 (1995). 植物谷氨酰胺合成酶基因以及基因表达. 生物工程进展, 15: 36~41
- Arnaud T, Isabelle B, Dario M (2005). Molecular characterization of the glutamine synthetase gene in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* expression study in response to xenobiotic exposure and developmental stage. *Biochim Biophys Acta*, 1681: 116~125
- Avila C, Suarez MF, Gomez-Maldonado J, Canovas FM (2001). Spatial and temporal expression of two cytosolic glutamine synthetase genes in Scots pine: functional implications on nitrogen metabolism during early stages of conifer development. *Plant J*, 25: 93~102
- Becker TW, Caboche M, Carrayol E (1992). Nucleotide sequence of tobacco cDNA encoding plastidic glutamine synthetase and light inducibility, organ specificity and diurnal rhythmicity in the expression of the corresponding genes of tobacco and tomato. *Plant Mol Biol*, 19: 367~379
- Boron L, Legocki AB (1994). Glutamine synthetase in *Lupinus luteus*. Identification and preliminary characterization of nodule-specific cDNA clone. *Gene*, 136: 95~102
- Brugière N, Dubois F, Masclaux C, Sangwan RS, Hirel B (2000). Immunolocalization of glutamine synthetase in senescing tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves suggests that ammonia assimilation is progressively shifted to the mesophyll cytosol. *Planta*, 211: 519~527
- Concepción AS, Ramón MC, Christophe P, Frigerio JM, Francisco M (2000). Two genes encoding distinct cytosolic glutamine synthetases are closely linked in the pine genome. *FEBS Lett*, 477: 237~243
- David E, Harindarpal SG, Gaston MUP, Rotstein SH (2000). Structure-function relationships of glutamine synthetases. *Biochim Biophys Acta*, 1477: 122~145
- Dunn K (1988). Developmental regulation of nodule-specific genes in alfalfa root nodules. *Mol Plant Microbe Interact*, 1: 66~74
- Edwards JW, Walker EL, Coruzzi GM (1990). Cell-specific expression in transgenic plants reveals non-overlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. *Proc Nat Acad Sci USA*, 87: 3459~3463
- Freeman J, Marquez AJ, Wallsgrove R (1990). Molecular analysis of barley mutants deficient in chloroplast glutamine synthetase. *Plant Mol Biol*, 14: 297~311
- Gebhardt C, Oliver JE, Forde G, Saarelainen R, Mifflin B (1986). Primary structure and differential expression of glutamine synthetase in nodules, roots and leaves of *Phaseolus vulgaris*. *EMBO J*, 5: 1429~1435
- Grant MR, Carne A, Hill DF (1989). The isolation and characterization of a cDNA clone encoding *Lupinus angustifolius* root nodule glutamine synthetase. *Plant Mol Biol*, 13: 481~490
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucl Acids Res*, 27: 297~300
- Hirel B, McNally SF, Gadal P (1984). Cytosolic glutamine synthetase in higher plants. *Eur J Biochem*, 138: 63~66
- Jacek B, Andrzej BL (1997). Evolution of the glutamine synthetase gene in plants. *Plant Sci*, 28: 51~58
- Josefa GM, Francisco MC, Concepción A (2004). Molecular analysis of the 5' upstream region of a gibberellin-inducible cytosolic glutamine synthetase gene (GS1b) expressed in pine vascular tissue. *Planta*, 218: 1036~1045
- Lara M, Cullimore JV, Lea PJ, Mifflin BJ, Johnstone AMB, Lamb JW (1983). Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase during nodule development in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*, 157: 254~258
- Li MG, Villemur R, Hussey PJ, Silflow CD, Gantt JS, Snustad DP (1993). Differential expression of six glutamine synthetase genes in *Zea mays*. *Plant Mol Biol*, 23: 401~407
- Lightfoot DA, Green NK, Cullimore JV (1988). The chloroplast-located glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L: nucleotide sequence expression in different organ and uptake into isolated chloroplasts. *Plant Mol Biol*, 11: 191~202
- Marsolier MC, Debrosses G, Hirel B (1995). Identification of several soybean cytosolic glutamine synthetase transcripts highly of specifically expressed in nodules. Expression studies using one of the corresponding genes in *Lotus corniculatus*. *Plant Mol Biol*, 27: 1~15
- McNally SF, Hirel B (1983). Glutamine synthetase isoforms in plants. *Physiology*, 21 (4): 761~774
- Miao GH, Hirl B, Marsolier MC, Ridge RW, Verma DP (1991). Ammonia-regulated expression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in transgenic *Lotus corniculatus*. *Plant Cell*, 3: 11~22
- Michael JM, Liang H, Rajeev R (2002). Isolation of a promoter sequence from the glutamine synthetase gene capable of

- conferring tissue-specific gene expression in transgenic maize. *Plant Sci*, 163: 865~872
- Mifflin BJ, Lea PJ (1980). Ammonia assimilation. In: Mifflin BJ (ed). *The Biochemistry of Plants (Vol 5). Amino Acids and Their Derivatives*. New York: Academic Press, 169~202
- Ochs G, Shock G, Wild A (1993). Chloroplastic glutamine synthetase from *Brassica napus*. *Plant Physiol*, 103: 303~304
- Perier RC, Praz V, Junier T, Bonnard C, Bucher P (2000). The eukaryotic promoter database (EPD). *Nucl Acids Res*, 28: 302~303
- Peterman TK, Goodman HM (1991). The glutamine synthetase gene family of *Arabidopsis thaliana*: light-regulation and differential expression in leaves, roots and seeds. *Mol Gen Genet*, 230: 145~154
- Rastogi RA, Chourey PS, Muhitch MJ (1998). The maize glutamine synthetase GSI-2 gene is preferentially expressed in kernel pedicels and is developmentally regulated. *Plant Cell Physiol*, 39: 443~446
- René M, Pascal G, Yves M, Cullimore JV (2000). The presence of GSI-like genes in higher plants support for the paralogous evolution of GSI and GSII genes. *J Mol Evol*, 50: 116~122
- Rombauts S, Dehais P, Van Montagu M, Rouze P (1999). PlantCARE, a plant *cis*-acting regulatory element database. *Nucl Acids Res*, 27: 295~296
- Sakakibara H, Kawabata S, Takahashi H, Hase T, Sugiyama T (1992). Molecular cloning of the family of glutamine synthetase genes from maize: expression of genes for glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Plant Cell Physiol*, 33: 49~58
- Sakamoto A, Ogawa M, Masumura T, Shibata D, Takeba G, Tanaka K, Fujii S (1989). Three cDNA sequences coding for glutamine synthetase polypeptides in *Oryza sativa* L. *Plant Mol Biol*, 13: 611~614
- Sakamoto A, Takeda G, Shibata D (1990). Phytochrome-mediated activation of the gene for cytosolic glutamine synthetase (GSI) during imbibition of photosensitive lettuce seeds. *Plant Mol Biol*, 15: 317~323
- Schock G, Ochs G, Wild A (1994). Glutamine synthetase from roots of *Brassica napus*. Nucleotide sequence of a cytosolic isoform. *Plant Physiol*, 105: 757~758
- Stroman P, Baima S, Casadoro G (1990). A cDNA sequence coding for glutamine synthetase in *Hordeum vulgare* L. *Plant Mol Biol*, 15: 161~163
- Tate SS, Leu FY, Meister A (1972). Rat liver glutamine synthetase. Preparation, properties, and mechanism of inhibition by carbamyl phosphate. *J Biol Chem*, 247 (17): 5312~5321
- Thykjaer T, Danielsen D, She Q, Stougaard J (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
- Tingey SV, Tsai FY, Edwards JW, Walker EL, Coruzzi GM (1988). Chloroplast and cytosolic glutamine are encoded by homologous nuclear genes, which are differentially expressed *in vivo*. *J Biol Chem*, 263: 9651~9657
- Tingey SV, Coruzzi GM (1987). Glutamine synthetase of *Nicotiana glauca*: cloning and *in vivo* expression. *Plant Physiol*, 84: 366~373
- Tingey SV, Walker EL, Coruzzi GM (1987). Glutamine synthetase genes of pea encode distinct polypeptides which are differentially expressed in leaves roots and nodules. *EMBO J*, 6: 1~9
- Tobin AK, Yamaya T (2001). Cellular compartmentation of ammonium assimilation in rice and barley. *J Exp Bot*, 53: 591~604
- Wallsgrave RM, Lea PJ, Mifflin BJ (1979). The distribution of the enzymes of nitrogen assimilation within the pea cell leaf. *Plant Physiol*, 63: 232~236
- Watanabe A, Hamada K, Yokoi H (1994). Biphasic and differential expression of cytosolic glutamine genes of radish during seed germination and senescence of cotyledons. *Plant Mol Biol*, 26: 1807~1817
- Wingender E, Chen X, Hehl R (2000). TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucl Acids Res*, 28: 316~319
- Zhang CF, Peng SB, Peng XX (1997). Response of glutamine synthetase isoforms to nitrogen sources in rice (*Oryza sativa* L.) roots. *Plant Sci*, 125: 163~170