

# 大豆氨基酸透性酶基因 *GmAAP2-like 1* 的克隆及功能初探

李美美, 夏铜梅, 王丹, 梅圆圆, 王宁宁\*

南开大学生命科学学院, 天津300071

**摘要:** 氨基酸透性酶(amino acid permeases)在植物不同器官的氨基酸转运过程中发挥着重要作用, 但迄今为止, 大豆中氨基酸透性酶相关的研究甚少。本文利用大豆初生叶水培系统对大豆(*Glycine max*)品种‘Williams 82’进行缺氮处理后, 发现与足氮对照相比, 大豆初生叶中 *GmAAP2-like 1* 基因的表达明显上调。对大豆不同器官中 *GmAAP2-like 1* 的转录水平进行RT-PCR检测, 结果显示该基因在花、叶和茎中的表达量较高而在根和种子中表达量很低。构建 *GmAAP2-like 1* (无内含子)过表达植物表达载体, 在转化农杆菌时发现, 该载体转化农杆菌GV3101致死; 改进载体构建策略, 采用融合PCR方法, 在 *GmAAP2-like 1* 的第一个外显子后插入一段内含子序列, 改进的载体可以成功转化农杆菌。应用农杆菌介导的花萼浸泡法转化拟南芥, 对所获得的转基因拟南芥抗性苗进行基因组PCR和RT-PCR鉴定, 共检测到8个 *GmAAP2-like 1* 不同程度表达的转基因拟南芥株系, 且其中的内含子都得到了正确的剪切。氨基酸有毒类似物(MSX)处理实验表明: 转基因拟南芥对MSX处理比野生型更为敏感, 暗示 *GmAAP2-like 1* 具有运输谷氨酸等酸性氨基酸的功能。

**关键词:** 大豆; 氨基酸透性酶; 缺氮; 融合PCR; 氨基酸运输

大豆是一种在世界各地广泛种植的经济作物, 由于种子中含有丰富的蛋白质和植物油, 因此成为人类食物、动物饲料以及工业副产品的重要来源之一(Gresshoff 2013)。

氮素在植物中占有重要的地位, 它是氨基酸、酰胺、蛋白质、核酸、辅酶、叶绿素和某些植物激素等的组成元素(潘瑞焱2008), 在植物光合作用和种子成熟等过程中发挥着重要作用。在大豆中氮素影响着其生长发育过程、根瘤固氮等代谢过程以及品质、产量的形成等多个过程(夏玄2014)。同时, 在绝大多数植物中, 氨基酸是氮素同化物长距离运输的主要形式(Zhang等2015)。

无论是植物根部直接从土壤中吸收氨基酸、根部吸收和合成的氨基酸向“库”器官的长距离运输、氮素再动员过程中“源”器官中氨基酸的韧皮部装载还是叶肉细胞和种子中氨基酸的输入等过程, 都离不开氨基酸转运蛋白(Tegeder 2012)。氨基酸透性酶(amino acid permeases, AAPs)是研究的相对比较清楚的一类氨基酸转运蛋白。在模式植物拟南芥中的研究表明, 氨基酸透性酶在氨基酸由“源”向“库”的转运和种子的发育过程中发挥着重要的作用。例如, AtAAP1定位于根表皮、根毛以及整个植物根尖和胚, 能够将氨基酸运输到根和发育中的胚(Lee等2007; Sanders等2009); AtAAP2定位于植物整个韧皮部中, 在将木质部中的氨基酸运输到韧皮部过程中发挥作用, 同时可以将“源”叶中的氨基酸装载到韧皮部中并且将氨基酸

分配到种子“库”中(Zhang等2010); AtAAP3主要在根部表达, 定位在根韧皮部的质膜和核膜, 可能负责根部氨基酸的吸收和分配(Fisher等1995; Okumoto等2004); AtAAP5主要在根皮层中表达, 参与碱性氨基酸L-Arg和L-Lys等的吸收(Hirner等2006; Svennerstam等2008); AtAAP6主要在“库”器官中表达, 比如根、“库”叶, 主要作用是将氨基酸从木质部转运到韧皮部(Okumoto等2002; Hunt等2010); AtAAP8主要在发育中的种子和成熟种荚中表达(Okumoto等2002), 在种子早期胚胎发育中可以将氨基酸运输到胚乳中供给发育中的胚(Schmidt等2007)。

然而, 到目前为止, 国内外对大豆中氨基酸透性酶的研究非常少见。本文完成了大豆氨基酸透性酶基因 *GmAAP2-like 1* 的克隆并获得了转基因拟南芥, 通过对转基因植物进行有毒氨基酸类似物处理实验推测 *GmAAP2-like 1* 具有谷氨酸等酸性氨基酸运输的功能。

## 材料与方法

### 1 实验材料与处理

#### 1.1 实验材料与培养条件

实验用大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] 品种为

收稿 2015-12-03 修定 2015-12-21

资助 教育部科学技术研究重大项目(313032)、国家自然科学基金(31370285)和国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2014ZX08009-030B-002)。

\* 通讯作者(E-mail: wangnn@nankai.edu.cn)。

‘Williams 82’, 水培时用1/2Hoagland营养液进行培养。

实验用拟南芥为哥伦比亚生态型(*Arabidopsis thaliana* L., Col-0)。进行分子鉴定所用植物材料在培养初期(萌发后7~9 d)于固体1/2MS (蔗糖含量为1%)上培养; 有毒氨基酸类似物处理时用液体1/2MS进行培养。

### 1.2 大豆缺氮处理方法

在正常水培条件下, 将野生型大豆培养至初生叶刚刚展开, 将实验组转移到缺氮营养液(除去1/2Hoagland营养液中的氮素)培养1~2 d, 对照组继续在1/2Hoagland营养液(足氮营养液)中培养。

### 1.3 有毒氨基酸类似物处理方法

有毒氨基酸类似物处理实验参照Perchlik等(2013)进行。首先将颗粒饱满, 大小一致的WT和转基因拟南芥种子在4°C黑暗条件下春化48 h; 对照组采用1/2MS液体培养基, 实验组于1/2MS液体培养基中添加10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酸有毒类似物L-Met sulfoximine (MSX, 购自上海维源化学科技有限公司), 对照组和每个实验组分别取20粒拟南芥种子进行实验; 将拟南芥种子分别于上述培养基中振荡培养, 转速为80  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 处理8 d。

## 2 总RNA的提取和cDNA合成

取大豆不同器官或拟南芥9 d幼苗的全苗约100 mg, 用TRIzol法提取总RNA, 并用1  $\mu\text{g}$  RNA反转录合成cDNA第一链, 具体步骤参照Liu等(2010)文献。

## 3 *GmAAP2-like 1*基因Real-time PCR和半定量RT-PCR

采用Real-time PCR对缺氮处理后大豆中*GmAAP2-like 1*的表达量进行测定, 以大豆cDNA为模板, 引物为RT-F: 5'-AGGACCCCAAGGTG-GAGTGGT-3', RT-R: 5'-TGAGCCA-ACAGCAGC-CGCAA-3'; 以大豆*ELF*为内标, 引物为ELF-F: 5'-GTTGAAAAGCCAGGGG-ACA-3', ELF-R: 5'-TCTTACCCCTTGAGCGTGG-3'。用半定量RT-PCR检测*GmAAP2-like 1*在大豆各个器官的表达特异性时, 引物为sRT-F: 5'-GGCATTGCCAAAGTT-GCAGA-3', sRT-R: 5'-CAAAGAGGGGCTGGG-CATAA-3'; 以大豆*18S rRNA*为内标, 引物为rRNA-F: 5'-CCTTGCTTGTTGCTTTACTAAATAG-3', rRNA-R: 5'-ATGCACCTTTTCGTTTGTTCG-

GAG-3', PCR反应程序为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 45 s, 28个循环; 72°C 10 min。

## 4 *GmAAP2-like 1*基因的克隆、转基因拟南芥的获得和分子鉴定

### 4.1 *GmAAP2-like 1*基因的克隆

*GmAAP2-like 1* (无内含子)基因的扩增: 以野生型大豆的cDNA为模板, 正向引物为F1: 5'-GG-GCCCAGAATTCATGGAGCCTTACTCCATTGAT-GGTG-3', 反向引物为R2: 5'-ACTAGTACCTC-GAGATAGTCTACATGAAACGGTTTG-TATTTCTG-3'。PCR反应程序为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 2 min, 26个循环; 72°C 10 min。

*GmAAP2-like 1* (含内含子)基因的扩增: 分别克隆上下游片段再融合而成。上游片段以野生型大豆基因组为模板, 正向引物为F1 (与前文F1序列相同), 反向引物为R1: 5'-CTCTTCCCGGTAA-CAGGGTCACC-3'; 下游片段以野生型大豆cDNA为模板, 正向引物为F2: 5'-GGTGACCCTGTAC-CGGGAAGAG-3', 反向引物为R2 (与前文R2序列相同), 上下游片段扩增的PCR反应程序均为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 1 min, 12个循环; 72°C 10 min。将上下游片段的PCR产物回收后, 进行融合PCR, 该PCR体系中上下游片段产物摩尔数比为1:1, PCR反应程序为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 2 min, 12个循环; 72°C 10 min。

将扩增产物经PCR纯化试剂盒纯化后通过TA克隆连接到T载体上, 阳性克隆由华大基因公司测序。将测序正确的含有目的片段的质粒和pCAMBIA 1301空载体同时用*KpnI*和*ApaI*双酶切, 之后用胶回收试剂盒回收目的片段, 再用连接酶将目的片段连接到经相同酶切后的pCAMBIA 1301载体上, 获得的35S:*GmAAP2-like 1*阳性克隆由华大基因公司测序。测序结果正确后转化农杆菌GV3101。

### 4.2 35S:*GmAAP2-like 1*转基因拟南芥的获得和分子鉴定

用农杆菌介导的花苞浸泡法(Clough和Bent 1998)来转化拟南芥。将获得种子在含有30  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 潮霉素的1/2MS培养基上筛选, 将抗性苗移到土中培养并进行分子鉴定。取3周大时拟南芥第3或第

4片叶子,参考《分子克隆实验指南》(萨姆布鲁克和拉塞尔2002)提取基因组DNA,进行PCR鉴定。PCR体系中,引物为F1和R2(F1、R2序列均与前文相同),取1  $\mu$ L基因组DNA为模板,PCR反应程序为:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,32个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。获得纯合子后,用9 d大的幼苗全苗提取RNA进行半定量RT-PCR检测,引物为sRT-F和sRT-R(二者序列均与前文序列相同);内标引物为Tip41-F:5'-GAATTCAGGAGCA-AGC-CGTCTCAG-3',Tip41-R:5'-ATCAACTCTCAGC-CAAAATCGCAAG-3'。PCR反应程序为:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,30个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。

## 实验结果

### 1 缺氮处理后初生叶中*GmAAP2-like 1*表达上调

分别取缺氮处理1和2 d的大豆初生叶,提取总RNA,通过Real-time PCR检测*GmAAP2-like 1*基因

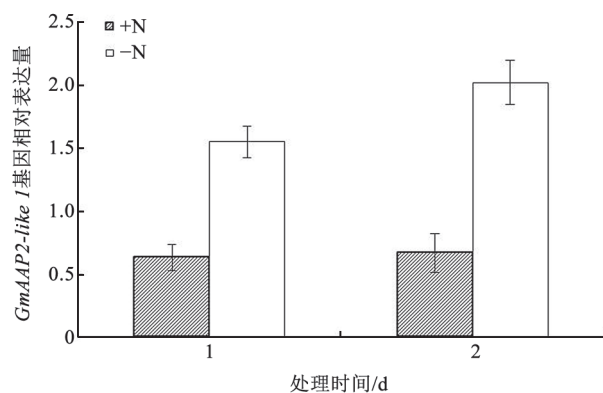


图1 *GmAAP2-like 1*对缺氮的响应

Fig.1 *GmAAP2-like 1* transcription in response to nitrogen-deficiency

的表达。结果如图1所示,缺氮处理后*GmAAP2-like 1*的表达明显上调;随着缺氮处理时间由1 d延长到2 d,其表达水平上升;而足氮对照中该基因的表达水平较低,且不受时间延长的影响。

### 2 *GmAAP2-like 1*在大豆各器官中的表达特异性分析

为了研究*GmAAP2-like 1*在大豆各个器官的表达特异性,分别取正常培养大豆R2期的根、茎、叶,盛花期的花,鼓粒期的种荚和种子作为材料,进行半定量RT-PCR检测。结果如图2所示,*GmAAP2-like 1*在大豆的各个器官中均有表达,其中在花、叶和茎中表达水平较高,而在根和种子中表达水平很低。

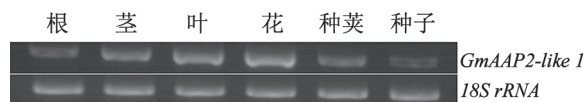


图2 *GmAAP2-like 1*在大豆各器官的特异性表达

Fig.2 Tissue specific expression of *GmAAP2-like 1* in soybean

### 3 含35S:*GmAAP2-like 1* (无内含子)融合基因的载体转化农杆菌致死

将携带35S:*GmAAP2-like 1* (无内含子)的表达载体与空载体对照分别转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,二者均在含有卡那霉素的LB培养基上得到许多菌落,并鉴定出成功转入35S:*GmAAP2-like 1* (无内含子)构建的阳性克隆(图3-A)。将构建好的35S:*GmAAP2-like 1* (无内含子)质粒与空载体分别转化农杆菌菌株GV3101,空载体转化成功,35S:*GmAAP2-like 1* (无内含子)质粒转化农杆菌后无菌斑长出(图3-B)。我们推测35S:*GmAAP2-like 1* (无内含子)质粒转化GV3101致死。

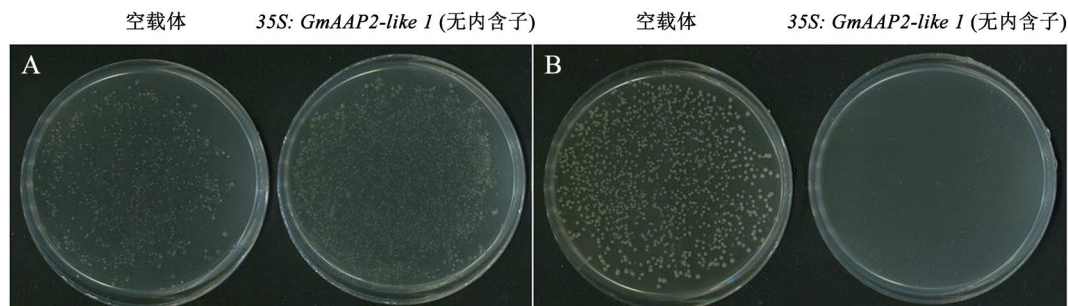


图3 含35S:*GmAAP2-like 1* (无内含子)融合基因的载体转化DH5 $\alpha$  (A)和GV3101 (B)

Fig.3 DH5 $\alpha$  (A) and GV3101 (B) were transformed with vector harboring 35S:*GmAAP2-like 1* fusion gene

#### 4 融合基因的获得及农杆菌转化

重新调整构建策略, 在*GmAAP2-like 1*的第一、二个外显子中间插入一段内含子序列, 即分别克隆该基因的上下游片段再进行融合。上游片段以大豆基因组为模板, F1、R1为引物, 下游片段以大豆cDNA为模板, F2、R2为引物, 如图4-A所示。图4-B为融合基因PCR扩增的电泳图, 其中泳

道1为上游片段, 大小为292 bp, 泳道2为下游片段, 大小为1 424 bp, 泳道3为融合后的片段, 大小为1 716 bp。将构建好的新的35S:*GmAAP2-like 1* (含内含子)质粒与空载体对照分别转化农杆菌GV3101, 如图4-C, 在含有卡那霉素、庆大霉素、利福平的YEP培养基上均长出大量菌斑, 并且可以获得成功转入上述质粒的转化子。

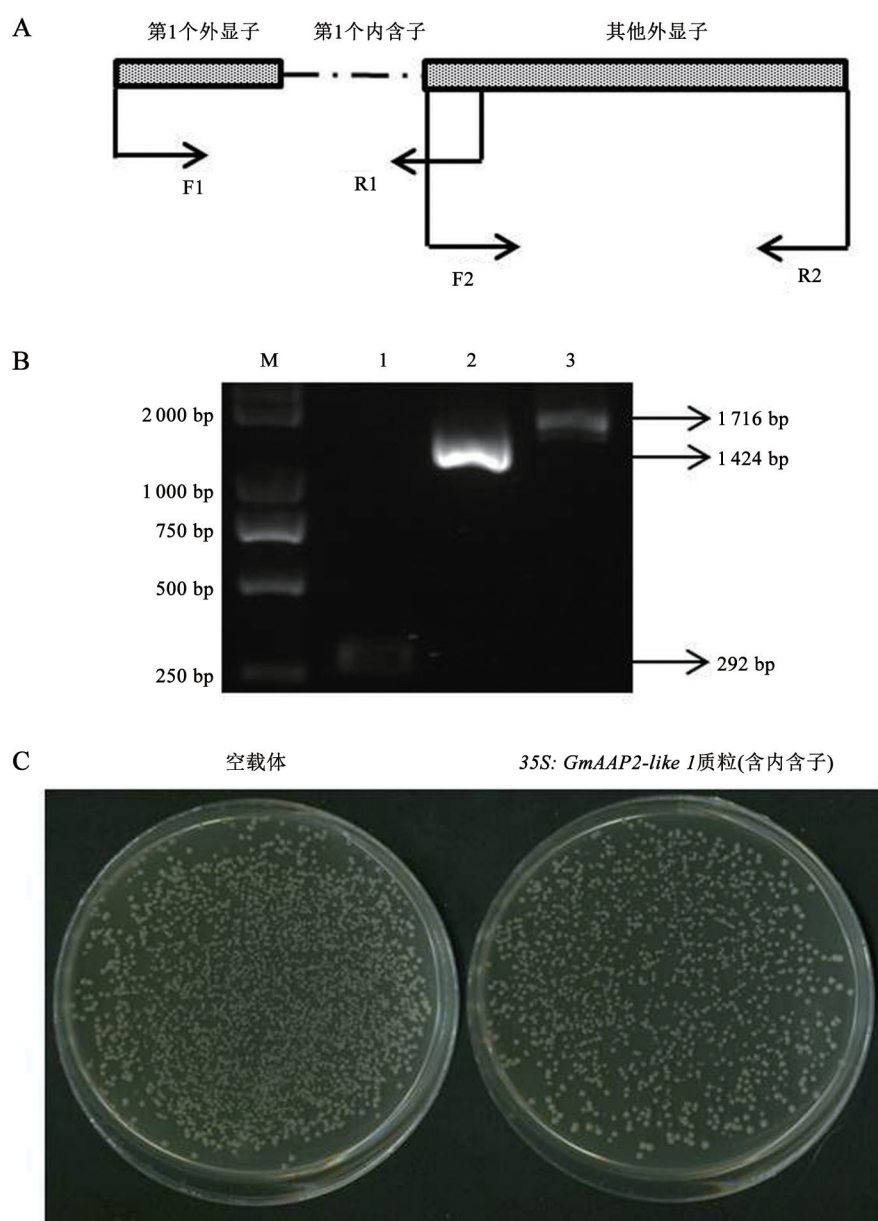


图4 融合PCR及农杆菌转化结果

Fig.4 Fusion PCR and *Agrobacterium* transformation results

A: 融合PCR示意图; B: 融合基因PCR产物电泳结果, 其中M为DNA分子量标准, 泳道1为上游片段, 泳道2为下游片段, 泳道3为融合后片段; C: 转化GV3101结果。

## 5 转基因拟南芥的分子鉴定

对获得的35S:*GmAAP2-like 1* (含内含子)拟南芥抗性苗进行基因组水平和转录水平的检测, 结果显示11株抗性苗基因组中均插入了35S:*GmAAP2-like 1* (含内含子)片段, 为阳性苗(图5-A)。图5-B为转录水平的检测结果, 由于在构建中插入了一个内含子, 为了检测转基因植物中的内含子序列是否在转录后加工过程中被正确剪切, 同时设置了分别以35S:*GmAAP2-like 1* (无内含子)和35S:*GmAAP2-like 1* (含内含子)质粒为模板的PCR作为对照, 结果如图5-B所示, 9个被检测株系中有8个株系可以明显检测到*GmAAP2-like 1*基因的表达, 且

35S:*GmAAP2-like 1* (含内含子)构建中的内含子序列都得到了正确的剪切。

## 6 *GmAAP2-like 1*具有酸性氨基酸运输功能

谷氨酸属于酸性氨基酸, 经谷氨酸的有毒类似物MSX处理8 d后, CK组的WT与35S:*GmAAP2-like 1* (含内含子)转基因拟南芥长势良好且一致。MSX处理组的WT与35S:*GmAAP2-like 1* (含内含子)转基因拟南芥生长均受到明显抑制, 转基因拟南芥的长势较WT更弱, 完整的叶片数也明显少于WT, 叶片坏死现象较WT更为严重(图6), 表明*GmAAP2-like 1*可能具有运输谷氨酸等酸性氨基酸的功能。

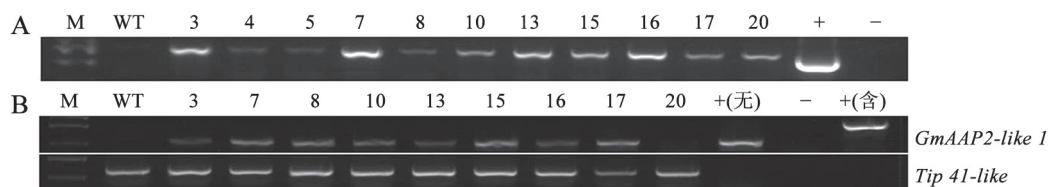


图5 转基因拟南芥的分子鉴定

Fig.5 Molecular identification of transgenic *Arabidopsis*

A: 基因组PCR结果; B: 转基因株系的RT-PCR鉴定。M为DNA分子量标准, 数字代表35S:*GmAAP2-like 1* (含内含子)转基因植物的不同株系; +为正对照, 35S:*GmAAP2-like 1* (含内含子)质粒作为模板; +(含)为含内含子的正对照, 35S:*GmAAP2-like 1* (含内含子)质粒作为模板; +(无)为无内含子的正对照, 35S:*GmAAP2-like 1* (无内含子)质粒为模板; -为负对照, ddH<sub>2</sub>O作为模板。

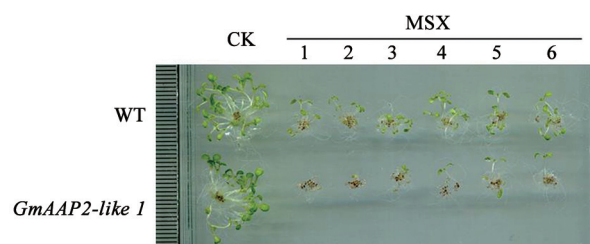


图6 MSX处理导致35S:*GmAAP2-like 1*转基因拟南芥受到更为严重的生长抑制

Fig.6 MSX treatment resulted in more severe growth inhibition in transgenic *Arabidopsis*  
1~6为6个MSX处理组。

## 讨 论

根据序列同源性分析, 我们在大豆中发现了一个与拟南芥中氨基酸透性酶基因*AtAAP2*同源性很高的基因*GmAAP2-like 1*。*GmAAP2-like 1*在大豆缺氮处理后表达明显上调, 我们推测该基因可能在大豆缺氮或低氮条件下的氨基酸运输过程中

发挥作用。我们在实验中发现, *GmAAP2-like 1*在大豆各个器官中都有表达, 但其表达丰度具有器官特异性, 即在花、叶和茎中表达较高而在根和种子中表达很低, 说明其可能主要在花、叶和茎等器官的氨基酸转运中发挥作用。对*AtAAP2*的研究发现, 该基因在拟南芥各个器官的维管组织中均有表达(Zhang等2010), 而*GmAAP2-like 1*在植物各器官中的具体表达部位还有待进一步研究。另外, 本实验中*GmAAP2-like 1*的氨基酸吸收功能是通过有毒氨基酸类似物的处理实验来验证的。经谷氨酸毒性类似物MSX处理8 d后35S:*GmAAP2-like 1*转基因拟南芥比WT受到更为严重的生长抑制, 表明35S:*GmAAP2-like 1*转基因植物对MSX更为敏感, 推测*GmAAP2-like 1*具有运输谷氨酸的功能。Fisher等(2002)通过爪蟾卵母细胞的电生理学运输实验证明, *AtAAP2*主要运输谷氨酸和中性氨基酸, 而*GmAAP2-like 1*是否也可以运输中性氨基酸还有待进一步研究。

我们在实验过程中发现,携带35S:*GmAAP2-like 1* (无内含子)构建的质粒转化农杆菌GV3101不能获得转化子。有报道指出,35S启动子可以驱动*GUS*基因在农杆菌中进行表达(刘斌2003)。我们推测35S:*GmAAP2-like 1*转化农杆菌致死可能是由于可以使*GmAAP2-like 1*蛋白在农杆菌中表达,从而对农杆菌产生毒性造成的。关于致死原因我们做出以下3种推测:第一,可能是由于*GmAAP2-like 1*蛋白从培养基中转运了较多的氨基酸到农杆菌体内,而高浓度的氨基酸对细胞有毒害作用(Ji等2015),进而导致农杆菌死亡;第二,由于绝大多数氨基酸运输蛋白转运氨基酸的过程都是质子与氨基酸共转运的(Ortiz-Lopez等2000),可能*GmAAP2-like 1*运输氨基酸的同时伴随着H<sup>+</sup>的跨膜转运,从而使农杆菌细胞内的pH值发生改变,改变了细菌生长所需的酶的活性,导致农杆菌死亡;第三,绝大部分氨基酸透性酶主要定位在质膜上(Tegeder和Rentsch 2010),*GmAAP2-like 1*可能对农杆菌细胞膜结构产生了影响,导致细菌细胞膜穿孔(黄琴等2007),从而引起农杆菌渗漏死亡。为了解决这个问题,本研究中采用融合PCR方法,在*GmAAP2-like 1*基因中插入一段内含子序列后可以成功将构建转化农杆菌。由于在农杆菌中不存在转录后加工过程,无法剪切内含子,因此不会表达*GmAAP2-like 1*蛋白,不会出现上述3种情况,因此不会对农杆菌产生毒害作用,所以35S:*GmAAP2-like 1* (内含子)可以成功转化农杆菌。该构建策略为我们在相关实验中解决类似的问题提供了一个新的思路。

本文首次从大豆中克隆了氨基酸透性酶基因*GmAAP2-like 1*,并通过对转基因拟南芥进行初步的氨基酸吸收功能验证推测*GmAAP2-like 1*具有酸性氨基酸运输功能,为深入解析大豆氮素“源”-“库”输送机制奠定了基础。

### 参考文献

- Clough SJ, Bent AF (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16 (6): 735–743
- Fischer WN, Loo DD, Koch W, Ludewig U, Boorer KJ, Tegeder M, Rentsch D, Wright EM, Frommer WB (2002). Low and high affinity amino acid H<sup>+</sup>-cotransporters for cellular import of neutral and charged amino acids. *Plant J*, 29 (6): 717–731
- Fischer WN, Kwart M, Hummel S, Frommer WB (1995). Substrate specificity and expression profile of amino acid transporters (AAPs) in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 270 (27): 16315–16320
- Gresshoff PM (2013). Soybean (*Glycine max* L.). In: Brenner S, Miller JH (eds). *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (Second Edition). Pittsburgh: Academic Press, 36 (6): 494–497
- Hirner A, Ladwig F, Stransky H, Okumoto S, Keinath M, Harms A, Frommer WB, Koch W (2006). *Arabidopsis* LHT1 is a high-affinity transporter for cellular amino acid uptake in both root epidermis and leaf mesophyll. *Plant Cell*, 8 (8): 1931–1946
- Huang Q, Ma GX, Zhou XX, Li WF (2007). Antibacterial mechanism of nisin. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 7 (2): 128–133 (in Chinese with English abstract) [黄琴, 马国霞, 周绪霞, 李卫芬 (2007). 乳链菌肽的抑菌机制. *中国食品学报*, 7 (2): 128–133]
- Hunt E, Gattolin S, Newbury HJ, Bale JS, Tseng HM, Barrett DA, Pritchard J (2010). A mutation in amino acid permease *AAP6* reduces the amino acid content of the *Arabidopsis* sieve elements but leaves aphid herbivores unaffected. *J Exp Bot*, 61 (1): 55–64
- Ji Y, Wu Z, Dai Z, Zhang Q, Wu G (2015). Excessive L-cysteine induces vacuole-like cell death by activating endoplasmic reticulum stress and mitogen-activated protein kinase signaling in intestinal porcine epithelial cells. *Amino Acids*, 2015: 1–8
- Sambrook J, Russell DW (2002). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (3rd edition). Beijing: Science Press, 463–470 (in Chinese) [J.萨姆布鲁克, D.W.拉塞尔(2002). *分子克隆实验指南* (第3版). 北京: 科学出版社, 463–470]
- Lee YH, Foster J, Chen J, Voll LM, Weber AP, Tegeder M (2007). AAP1 transports uncharged amino acid into roots of *Arabidopsis*. *Plant J*, 50 (2): 305–319
- Liu B (2003). Effect of SP promoter and intron on the expression of foreign gene in the transgenic Poplar (Master's thesis). Tai'an, Shandong: Shandong Agricultural University, 41–42 (in Chinese with English abstract) [刘斌(2003). SP启动子与内含子对转基因杨树中外源基因表达的影响(硕士论文). 山东泰安: 山东农业大学, 41–42]
- 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
- Okumoto S, Koch W, Tegeder M, Fischer WN, Biehl A, Leister D, Stierhof YD, Frommer WB (2004). Root phloem-specific expression of the plasma membrane amino acid proton co-transporter AAP3. *J Exp Bot*, 55 (406): 2155–2168
- Okumoto S, Schmidt R, Tegeder M, Fischer WN, Rentsch D, Frommer WB, Koch W (2002). High affinity amino acid transporters specifically expressed in xylem parenchyma and developing seeds of *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 277 (47): 45338–45346
- Ortiz-Lopez A, Chang H, Bush DR (2000). Amino acid transporters in plants. *Biochim Biophys Acta*, 1465 (1-2): 275–280
- Pan RZ (2003). *Plant Physiology* (6th edition). Beijing: Higher Education Press, 29–30 (in Chinese) [潘瑞焱(2008). *植物生理学* (第6版). 北京: 高等教育出版社, 29–30]
- Perchlik M, Foster J, Tegeder M (2013). Different and overlapping functions of *Arabidopsis* LHT6 and AAP1 transporters in root amino acid uptake. *J Exp Bot*, 65 (18): 5193–5204

- Sanders A, Collier R, Trethewy A, Gould G, Sieker R, Tegeder M (2009). AAP1 regulates import of amino acid into developing *Arabidopsis* embryos. *Plant J*, 59 (4): 540–552
- Schmidt R, Stransky H, Koch W (2007). The amino acid permease AAP8 is important for early seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 226 (4): 805–813
- Svennerstam H, Ganeteg U, Näsholm T (2008). Root uptake of cationic amino acids by *Arabidopsis* depends on functional expression of amino acid permease 5. *New Phytol*, 180 (3): 620–630
- Tegeder M (2012). Transporters for amino acids in plant cells: some functions and many unknowns. *Curr Opin Biotechnol*, 15 (3): 315–321
- Tegeder M, Rentsch D (2010). Uptake and partitioning of amino acids and peptides. *Mol Plant*, 3 (6): 997–1011
- Xia X (2014). Effect of nitrogen levels on soybean nodulation, nitrogen accumulation and yield (Master's thesis). Harbin: Northeast Agricultural University, 1–2 (in Chinese with English abstract) [夏玄(2014). 氮素水平对大豆结瘤、氮素积累及产量的影响(硕士学位论文). 哈尔滨: 东北农业大学, 1–2]
- Zhang L, Tan Q, Lee R, Trethewy A, Lee YH, Tegeder M (2010). Altered xylem-phloem transfer of amino acids affects metabolism and leads to increased seed yield and oil content in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 22 (11): 3603–3620
- Zhang LZ, Garneau MG, Majumdar R, Grant J, Tegeder M (2015). Improvement of pea biomass and seed productivity by simultaneous increase of phloem and embryo loading with amino acids. *Plant J*, 81: 134–146

## Cloning and preliminary functional analysis of an amino acid permease gene *GmAAP2-like 1* in soybean

LI Mei-Mei, XIA Tong-Mei, WANG Dan, MEI Yuan-Yuan, WANG Ning-Ning\*

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

**Abstract:** Amino acid permeases play important roles in transferring amino acids between different parts of the plants; however, so far their functions have rarely been studied in soybean. In this research, an amino acid permease gene, *GmAAP2-like 1*, was seen to be up-regulated in primary leaves of hydroponically grown soybean (*Glycine max*) cultivar ‘Williams 82’ under nitrogen-deficiency treatment compared with nitrogen-sufficient control. The RT-PCR analysis further showed that *GmAAP2-like 1* was much more abundantly in flowers, leaves and stems of soybean while it showed very low expression in roots and seeds. During the cloning process, it was found that the vector carrying *35S::GmAAP2-like 1* could be transformed into *Escherichia coli* strain DH5 $\alpha$  successfully but was lethal to *Agrobacterium tumerfaciens* strain GV3101. As an alternative strategy, this gene was then cloned by fusion PCR with an intron inserted after the first exon and the following transformations turned out to be successful in both *E. coli* and *Agrobacterium* strains mentioned above. Subsequently, the obtained *Arabidopsis thaliana* transgenic lines of *35S::GmAAP2-like 1* with intron were verified by genomic PCR and semi-quantitative RT-PCR analysis, and the results showed that the intron was cut off correctly and the gene of interest was overexpressed in almost all the lines examined. Furthermore, it was shown that even though the growth of wild-type and transgenic seedlings were both inhibited after toxic glutamate analogues treatment in comparison to that of the mock control, the growth inhibition of transgenic lines was much more significant, implying that *GmAAP2-like 1* could possibly transport such acidic amino acid.

**Key words:** soybean; amino acid permease; nitrogen-deficiency; fusion PCR; amino acid transport

Received 2015-12-03 Accepted 2015-12-21

This work was supported by the Key Grant Project of the Chinese Ministry of Education (Grant No. 313032), the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31370285), and the Major Technological Program on Cultivation of New Varieties of Genetically Modified Organisms (Grant No. 2014ZX08009-030B-002).

\*Corresponding author (E-mail: wangnn@nankai.edu.cn).