

谷子天冬氨酸转氨酶基因部分片段的克隆

贾小平¹,董志平²,董普辉¹,郁飞燕¹

(1. 河南科技大学 农学院,河南 洛阳 471003;2. 河北省农林科学院 谷子研究所,河北 石家庄 050031)

摘要:为了利用基因工程手段改变谷子中氨基酸组成和含量,进而改善谷子营养品质,以谷子栽培品种豫谷1号幼嫩、无病斑的叶片基因组DNA为模板,根据已报道的玉米天冬氨酸转氨酶基因序列,设计1对特异性引物扩增克隆谷子天冬氨酸转氨酶基因部分序列。结果表明,PCR扩增获得约750 bp的目标片段,对该片段进行克隆测序得到一条742 bp的片段,经公共数据库同源搜索发现该序列含有天冬氨酸转氨酶超基因家族特有的保守域,证明所克隆片段为天冬氨酸转氨酶基因。对该基因进行系统进化树分析发现,部分单子叶植物和双子叶植物分别聚类,但是谷子与玉米、甘蔗3个C4作物并没有聚为一类。为进一步揭示谷子天冬氨酸转氨酶的功能奠定了基础。

关键词:谷子;天冬氨酸转氨酶;克隆

中图分类号:S515;Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2015)04-0021-04

doi:10.7668/hbxb.2015.04.004

Cloning of Partial Fragment of Aspartate Aminotransferase Gene in Foxtail Millet

JIA Xiao-ping¹, DONG Zhi-ping², DONG Pu-hui¹, YU Fei-yan¹

(1. College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China; 2. Institute of Millet Crops, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050031, China)

Abstract: The genomic DNA extracted from young, no-lesion leaves of foxtail millet cultivar Yugu 1 was as template, and a pair of specific primers was designed according to the reported corn aspartate aminotransferase gene sequence to clone aspartate transaminase partial gene sequence of foxtail millet, so as to provide foundation for altering composition and content of amino acids by genetic engineering, further altering nutritional quality of foxtail millet. The results showed that: PCR amplification obtained a 750 bp target fragment. After cloning and sequencing, a 742 bp fragment was obtained. After Blast search through public database, a specific conserved domain belonging to aspartate aminotransferase supergene family was found in cloned sequence, which proved that the cloned fragment was aspartate aminotransferase gene. Then a phylogenetic tree based on the gene sequences was constructed, which indicated that part of monocots and dicots could cluster respectively, but foxtail millet, maize and sugar cane, three C4 plants, could not cluster together. This study provided foundation for further revealing the function of aspartate aminotransferase gene of foxtail millet.

Key words: Foxtail millet; Aspartate aminotransferase; Cloning

天冬氨酸转氨酶(Aspartate aminotransferase, AAT)又名谷草转氨酶,是一种具有磷酸吡哆醛依赖性、由细胞核基因编码的线粒体酶,催化天冬氨酸的氨基转移到 α -酮戊二酸形成草酰乙酸和谷氨酸及其逆反应地进行^[1]。研究表明,天冬氨酸转氨酶在调控氮代谢中意义重大,对植物的品质和产量有重大的影响^[2]。在拟南芥中的研究表明,天冬氨酸转氨酶位于线粒体、叶绿体、核糖体、过氧化体、细胞质

中^[3]。在作物中该基因的表达与籽粒中蛋白质、氨基酸含量密切相关,超表达该基因可显著提高米粉中蛋白质含量和氨基酸水平^[4-5]。此外,在玉米、发豆、番茄、羽扇豆等植物中对天冬氨酸转氨酶也有一定研究^[6]。谷子起源于我国,其营养价值主要体现在以天冬氨酸为前体的必需氨基酸的含量上,天冬氨酸转氨酶活性对蛋白质氨基酸的组成和含量有重要影响。但迄今未见谷子中关于天冬氨酸转氨酶基

收稿日期:2015-04-19

基金项目:“十二五”农村领域国家科技计划课题(2011BAD06B01-1)

作者简介:贾小平(1973-),男,内蒙古包头人,副教授,博士,主要从事谷子资源评价与分子育种研究。

因的任何报道。为此,以豫谷 1 号谷子基因组 DNA 为模板,分离克隆谷子天冬氨酸转氨酶基因片段,并进行序列测定及分析,为进一步研究谷子天冬氨酸转氨酶基因的功能,进而利用基因工程手段提高谷子中蛋白质和氨基酸的含量,改善小米营养价值奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验所用谷子品种为豫谷 1 号;大肠杆菌(*E. coli*)DH5 α 菌株感受态细胞、pMD18-T 载体均购自大连宝生物有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 植物基因组 DNA 提取 采用 CTAB 法提取植物基因组 DNA。

1.2.2 天冬氨酸转氨酶基因部分片段的扩增 用 DNAMAN 5.0 设计谷子天冬氨酸转氨酶基因特异引物,正向引物序列为:5'-CTTCCTCGCGCTCGC CTC-3',反向引物序列为:5'-CCCCATACCTTGGN(N 为 A 或 T)ACCACAACC-3'。25 μ L 扩增体系含基因组 DNA 2.0 μ L(50 ng/ μ L)、正向引物 1.25 μ L(0.6 μ mol/L)、反向引物 1.25 μ L(0.6 μ mol/L)、dNTP (200 μ mol/L) 0.5 μ L、10 \times PCR Buffer 2.5 μ L、*Taq* 酶(1 U)0.5 μ L、ddH₂O(灭菌)8 μ L。PCR 扩增程序为降落程序:预变性 95 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 45 s,69 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1.5 min 5 个循环;然后 94 $^{\circ}$ C 45 s,68 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1.5 min 5 个循环;最后 94 $^{\circ}$ C 45 s,67 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1.5 min 20 个循环;共 30 个循环,循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

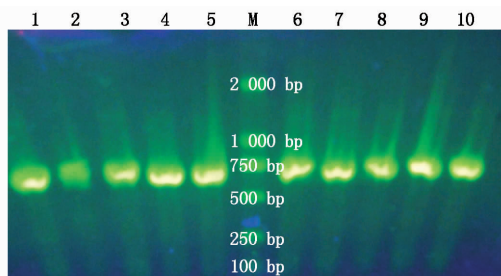
1.2.3 产物回收纯化、克隆、转化与测序 PCR 产物(50 μ L)用 1% 的琼脂糖凝胶检测,切下目的条带,用 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化目的片段,将回收产物连接到 pMD18-T 载体上,转化大肠杆菌(*E. coli*)DH5 α 菌株感受态细胞,蓝白斑筛选,对阳性重组子进行菌液 PCR 验证,经菌液 PCR 检测为阳性的克隆送北京三博志远测序部进行测序。

1.2.4 序列分析及其聚类分析 利用 NCBI 网站的 BlastN 和 BlastX 获得与所克隆基因高度同源的已知基因序列,然后利用 MEGA 4.0 软件进行遗传聚类分析。

2 结果与分析

2.1 谷子天冬氨酸转氨酶基因部分片段的 PCR 扩增

将扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测发现,在接近 750 bp 处出现目标条带(图 1)。

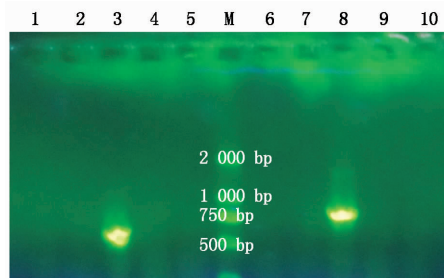


M. DNA Marker DL2000;1~10. PCR 扩增产物。
M. DNA Marker DL2000;1~10. PCR production.

图 1 谷子天冬氨酸转氨酶基因部分片段的 PCR 扩增结果
Fig.1 PCR amplification production of partial aspartate transaminase gene fragment

2.2 阳性克隆菌液的 PCR 检测

将 PCR 扩增产物连接到 pMD18-T 载体上,转化大肠杆菌 DH5 α 菌株感受态细胞,获得重组子。随机挑选 10 个白色阳性克隆进行菌液 PCR 检测,电泳检测后发现 1 个克隆含有目标片段(图 2,8 号),3 号片段偏小,为非特异性扩增片段。



M. DNA Marker DL2000;1~10;阳性克隆。
M. DNA Marker DL2000;1~10. Positive clones.

图 2 阳性克隆菌液 PCR 扩增结果

Fig.2 Broth-PCR production of positive clones

2.3 阳性克隆的测序及序列分析

挑选菌液 PCR 检测后符合预期大小的阳性克隆测序获得 742 bp 的目的序列(图 3),用 BlastN 程序在公共数据库进行同源搜索,发现该序列与高粱、玉米推定的 mRNA 序列高度同源,但具体基因并未确定。因此,用 BlastX 程序继续进行同源搜索,因为该程序是将核酸序列翻译成蛋白质,和蛋白质数据库进行比对,获得的基因信息更准确。BlastX 同源搜索结果表明,所克隆的基因具有天冬氨酸转氨酶超基因家族特有的保守结构域,因此推测其应为天冬氨酸转氨酶家族成员(图 4)。

2.4 基于天冬氨酸转氨酶基因部分序列的遗传聚类分析

从 NCBI 数据库下载了 9 个植物的 AAT 基因序列,加上本研究获得的谷子天冬氨酸转氨酶基因序列,共计 10 个植物种,构建了这 10 个植物的进化树。从图 5 可以看出,双子叶植物西红柿(XM004244895.1)、大豆(L09702.1)、棉花(JN555756.1)

聚为一组,亲缘关系较近;而单子叶植物水稻 (D14673.1)、玉米 (NM 001148497.1)、小麦 (EU346759.1) 聚为一组,表现较近的亲缘关系,但是谷子作为禾本科 C4 作物,却没有和玉米、甘蔗 (JQ292842.1) 这 2 个 C4 作物聚为一组 (甘蔗和葡

萄 (XM 002284919.1) 聚在一起),也没有和禾本科的小麦、水稻、玉米等聚为一组,而是和拟南芥 (U15026.1) 聚为一组,造成这种结果的原因可能是本研究所测谷子天冬氨酸转氨酶基因片段为部分片段,信息量有限所致。

CTTCTCGCGCTCGCCTCATAGTTAGGATATCCCGGTCTTGGAAGCAATATGTTGGTGCCCGGCTGGG
CCAGGACTGAGATCACAACTCGATGGCCTGAGTGCCTCTGCCGTGAGAAAGATGTCGTCGGATGAT
AGCTCGTATGGAAGATCACTCGACAGGTGCTTCGCCAAAGCGCTATTTCCAAAAGCAACAAATTAAGT
AGAAATACAATTAGGAGAGACTTAAATATAATAAATTGTCATTATTATACATAGGCATGCAAAAGAAT
AACAAAATCAAAACATATCAAAGGAAATAACAATTAATAACGAGAGAAACGTGCCAATTTGCCCTGA
GCAACCACCAGGGCGTTTGCCAACGTGGCAACGTATATTATACTAAGCACTGATGAATCCCTAATGA
TTTTGGTAAAAATCATTAAGTTAAGGTGGATACACATCTTGT CATATGATCAAATGGTTTCGCGAAAAAT
CAATAATCAGACAACAAGATGTGCGAACTCGATATTTACACGACTCTCTTTACCAATTCTGCCCCGAA
TTACACTTAAAACGACTCAACAGCTTAACGTTGGCTTGCCACGCATTACTTGACTGTAAAACCTCTCACT
CTTACGCCGTAACCTGCCAACCAAAGCGAGAACAACATAACATCAAACGAATCGACCGATTGTTAG
GTAATCGTCACCTCCACAAAGAGCGACTCGCTGGTTGTGGTTCCAAGGTATGGGG

图 3 谷子天冬氨酸转氨酶部分基因片段序列 (划线部分为引物序列)

Fig. 3 Sequence of partial aspartate transaminase gene fragment (underlined parts were primer sequences)

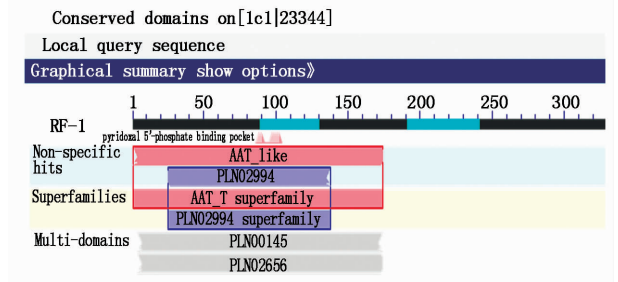


图 4 BlastX 同源搜索结果

Fig. 4 Result of BlastX homology search

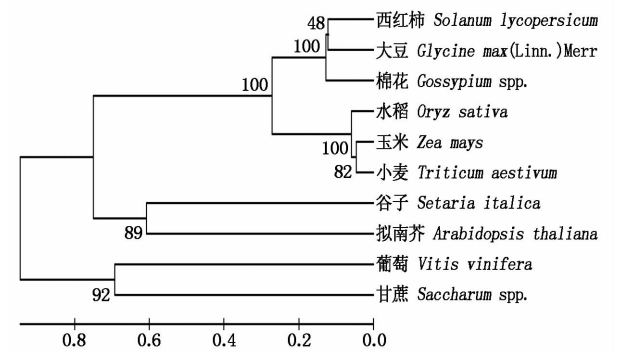


图 5 基于天冬氨酸转氨酶基因序列

10 种植物的遗传聚类分析

Fig. 5 Genetic clustering analysis of 10 plants species based on aspartate transaminase gene sequences

3 结论与讨论

谷物种子是重要的植物蛋白质来源,而一些组成蛋白质的重要氨基酸如赖氨酸、苏氨酸、蛋氨酸等必需氨基酸的合成具有共同的前体分子天冬氨酸,因此,研究天冬氨酸代谢途径关键酶基因对改良谷物种子的营养价值有重要意义。有关天冬氨酸转氨酶基因的研究在大豆中开展较早,大豆中共有 5 种

天冬氨酸转氨酶同工酶,它们表达需要的光照条件及表达部位有所不同,其中 AAT1 在黑暗条件下生长的种子中表达,而 AAT3 和 AAT4 在光照培养条件下的叶和种子中表达,AAT2 和 AAT5 为组成型表达^[7]。在拟南芥中也存在 5 种天冬氨酸转氨酶同工酶,由 5 个不同的基因编码,而在水稻中只发现 3 种同工酶,这些同工酶定位于不同的亚细胞结构中^[8-9]。转基因研究表明转化外源或者自身天冬氨酸转氨酶基因可以使拟南芥、水稻种子中氨基酸和蛋白质含量都显著增加^[10-11]。在玉米的研究中发现天冬氨酸转氨酶基因是与氮素利用效率相关的重要候选基因,在低氮胁迫条件下该基因表达量的高低与玉米氮素利用效率和产量有密切关系^[12]。除氮胁迫,高温对植物天冬氨酸转氨酶基因的表达也有一定影响。在水稻灌浆期,高温条件下水稻籽粒中天冬氨酸转氨酶基因活性和天冬氨酸、赖氨酸、苏氨酸等氨基酸的相对含量均显著提高^[4]。

谷子中目前还未见有关天冬氨酸转氨酶基因的报道,本研究首次克隆了谷子天冬氨酸转氨酶部分基因片段,经 BlastN、BlastX 同源搜索分析,确定其具有天冬氨酸转氨酶超基因家族成员特有的保守域,证明所克隆片段的准确性。但是基于基因序列的系统进化分析尽管分别将部分双子叶植物和单子叶植物聚为对应类群,却没有把同为 C4 作物的谷子、玉米、甘蔗聚为一类,谷子和亲缘关系较远的拟南芥聚在一起,说明用基因序列进行遗传聚类分析时首先应确保基因序列的完整性,对于超基因家族,成员较多,更应该选择功能上接近的基因,才能获得较为准确的遗传聚类结果,使分子系统进化分析在生物进化研究中发挥更先进的作用。在本研究的基

础上,今后的工作是克隆获得谷子全长天冬氨酸转氨酶基因序列,并且弄清基因拷贝数、表达特性,分析其表达活性与小米中各种氨基酸、蛋白质的含量存在的关系,为利用转基因技术或者标记辅助选择技术选育高营养品质谷子材料提供依据。

本研究克隆了谷子天冬氨酸转氨酶基因 742 bp 的片段,该片段包含 AAT 超基因家族特有的保守域,基于天冬氨酸转氨酶基因序列构建了 10 种植物系统进化树,该进化树能部分地将单子叶植物和双子叶植物分开,但同属 C4 作物的谷子、玉米、甘蔗却没有聚在一起。通过分析谷子中天冬氨酸转氨酶基因的分子特性和特点,对于后续研究天冬氨酸转氨酶与蛋白质合成的关系、改进谷子的蛋白质品质和口感、提高其中必需氨基酸的含量有重要意义。

参考文献:

- [1] 李常健,林清华,张楚富. 高等植物中氨同化酶及其同工酶研究 [J]. 零陵师范高等专科学校学报,2000,21(3):20-24.
- [2] 石 岗. 生物活性肽研究进展 [J]. 北京农业科学,2002(20):6-9.
- [3] Crawley M J, Brown S L, Halis R S, *et al.* Transgenic crops in natural habitats [J]. Nature,2001,409:682-683.
- [4] 周 莹. 水稻中天冬氨酸转氨酶的分子生物学研究和转基因应用 [D]. 武汉:华中农业大学,2009:1-3.
- [5] 梁成刚,张 青,李 敬,等. 水稻灌浆期高温对天冬氨酸代谢酶活性及其家族氨基酸含量的影响 [J]. 中国水稻科学,2013,27(1):71-76.
- [6] Marino A C, Nelson J C. Molecular genetic maps of the group 6 chromosomes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.) [J]. Genome,1996,39:359-366.
- [7] Gebhardt J S, Wadsworth G J, Matthews B F. Characterization of a single soybean cDNA encoding cytosolic and glyoxysomal isozymes of aspartate aminotransferase [J]. Plant Molecular Biology,1998,37(1):99-108.
- [8] Liepman A H, Olsen L J. Genomic analysis of aminotransferases in *Arabidopsis thaliana* [J]. Critical Reviews in Plant Sciences,2004,23:73-89.
- [9] Song J, Yamamoto K, Shomura A, *et al.* Characterization and mapping of cDNA encoding aspartate aminotransferase in rice, *Oryza sativa* L [J]. DNA Research: an International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes,1996,3(5):303-310.
- [10] Murooka Y, Mori Y, Hayashi M. Variation of the amino acid content of *Arabidopsis* seeds by expressing soybean aspartate aminotransferase gene [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering,2002,94(3):225-230.
- [11] Zhou Y, Cai H, Xiao J, *et al.* Over-expression of aspartate aminotransferase genes in rice resulted in altered Nitrogen metabolism and increased amino acid content in seeds [J]. Theoretical and Applied Genetics,2009,118(7):1381-1390.
- [12] 刘瑞响,曹晓良,陶勇生,等. 不同氮素水平下玉米产量与 *zmAspAT* 基因表达分析 [J]. 中国农学通报,2012,28(24):22-26.