

张国壁,马 静,左 壮,等. 转 *PnAlaAT3* 基因可提高低氮条件下杨树上位叶谷氨酰胺合成酶活力[J]. 江苏农业科学,2020,48(3):86-90.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.03.014

# 转 *PnAlaAT3* 基因可提高低氮条件下 杨树上位叶谷氨酰胺合成酶活力

张国壁,马 静,左 壮,许志茹,杨成君,刘关君,曲春浦

(东北林业大学,黑龙江哈尔滨 150040)

**摘要:**谷氨酸氨基转移酶又称谷丙转氨酶,在植物氮同化中起到关键作用。本试验以小黑杨为试材构建 *pROK II - PnAlaAT3* 植物表达载体,通过农杆菌介导法转化小黑杨,获得转基因植株,发现 5 号转基因株系叶片中 *PnAlaAT3* 基因表达量升高,但根中表达量却显著降低。对野生型和 *PnAlaAT3* 5 号转基因株系的谷氨酰胺合成酶(GS)和谷氨酰胺- $\alpha$ -酮戊二酸氨基转移酶(GOGAT)活性检测结果发现,在低氮条件下,*PnAlaAT3* 转基因株系上位叶 GS 活 LT 较野生型植株有显著增加。结果表明,*PnAlaAT3* 基因可以提高小黑杨上位叶中 GS 活力。

**关键词:**谷丙转氨酶基因;杨树;转基因;氮素同化;谷氨酰胺合成酶活性

**中图分类号:** Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)03-0086-04

丙氨酸氨基转移酶又称谷丙转氨酶(Alanine aminotransferase, AlaAT),在磷酸吡哆醛的存在下,该酶可催化丙氨酸和  $\alpha$ -酮戊二酸反应,生成丙酮酸和谷氨酸<sup>[1-2]</sup>。在植物中,该酶位于细胞质中,是氮素同化的关键酶<sup>[3]</sup>。第一个植物 *AlaAT* 基因是 Muench 等从玉米(*Zea mays*)中分离得到的<sup>[4]</sup>,之后相继从拟南芥、大豆、小麦和苜蓿中获得了多个编码 *AlaAT* 的基因。以拟南芥为例,Igarashi 等共鉴定了 4 个 *AlaAT* 基因,分别命名为 *AOAT1 ~ AOAT4*<sup>[5]</sup>,而大豆<sup>[6]</sup>和苜蓿<sup>[7]</sup>也有同样的家族成员数量。从功能上来看,在拟南芥中过表达外源物种的 *AlaAT* 基因可以提高拟南芥的氮素利用效率,而过表达大麦 *AlaAT* 基因的水稻(*Oryza sativa*)和油菜(*Brassica nupas*)的产量和生物量都发生了显著的提高<sup>[8-9]</sup>。过表达大麦 *AlaAT* 基因的甘蔗也在低氮条件下表现出了提高氮素利用率的现象<sup>[10-11]</sup>。

林木 *AlaAT* 基因研究相对较晚,2017 年,Xu 等从杨树中共克隆得到 4 个成员,分别命名为

*PnAlaAT1*、*PnAlaAT2*、*PnAlaAT3*、*PnAlaAT4*,其中 *PnAlaAT1* 和 *PnAlaAT2* 主要表达在叶中,并受日节律的影响,而 *PnAlaAT3* 和 *PnAlaAT4* 表达量在根中相对较多,其中 *PnAlaAT3* 在根中表达量最高,并受外源氮素的调节而显著上调<sup>[12]</sup>。但该基因在氮素同化中是否起到关键作用尚不清楚。本研究将 *PnAlaAT3* 在杨树体内进行过表达的遗传转化,并对转化株系在不同浓度氮素下的植株生长状况进行研究,从而推断该基因在杨树氮素同化中所起的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

采用小黑杨作为试验材料,取材于东北林业大学试验林场。pGEM-T Easy 载体和大肠杆菌(*Escherichia coli*) Trans1-T1 感受态细胞,购自北京全式金生物技术有限公司;二元表达载体 pROK II 和根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 EHA105,由笔者实验室保存;各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、反转录试剂盒,均购自 TAKARA 公司;引物合成委托哈尔滨博士生物科技有限公司完成。其他所需试剂均为国产分析纯。

### 1.2 试验方法

1.2.1 载体构建 根据杨树来源的 *PnAlaAT3* (GenBank 登录号:KT768062)设计引物 *PnAlaAT3* - F/R;5'-GCTCTAGACCATGGCTCGTGTCTCTTG-3',5'-TCCCCCGGGTCACTCGCGAAACTCCTC

收稿日期:2019-01-06

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(编号:31600534);国家自然科学基金面上项目(编号:31570648);中央高校基础科研业务费(编号:DL13EA03-01)。

作者简介:张国壁(1994—),男,山东聊城人,硕士,主要从事氮素营养与林木生长发育。E-mail:2456526675@qq.com。

通信作者:曲春浦,博士,工程师,主要从事氮素营养与林木生长发育。E-mail:qcp\_0451@163.com。

C-3′。下划线分别为 *Xba* I 和 *Sma* I 的酶切位点。以重组质粒 pGEM - T Easy - *AlaAT3* 为模板,用 KOD plus 高保真酶扩增目的片段,扩增产生的目的基因条带为 1 446 bp。采用 *Xba* I 和 *Sma* I 双酶切将目的片段连接到双元表达载体 *pROK* II 中,构建

植物表达载体 *pROK* II - *AlaAT3*(图 1 - A)。在构建的表达载体中,*AlaAT3* 上游启动子为组成型强启动子 CaMV 35S,终止子为 NOS,卡那霉素抗性基因。采用电击法将重组表达载体 *pROK* II - *PnAlaAT3* 转入农杆菌 EHA105 中。

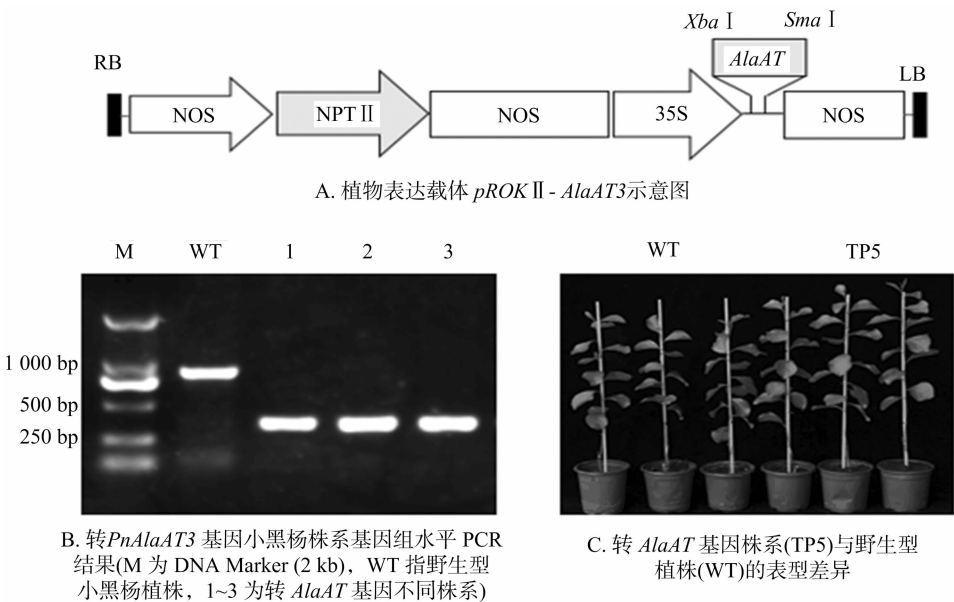


图1 植物表达载体示意图及转基因小黑杨植株检测结果

1.2.2 遗传转化 以小黑杨为受体物种,采用农杆菌介导法对其进行遗传转化。选取长势好的小黑杨无菌苗的叶片切成边长为 1 cm 的正方形小块,在农杆菌中侵染 20 min 后取出叶片,接种在不含抗生素的 MS<sup>[13]</sup> (Murashige & Skoog)分化培养基上,于 25 ℃ 条件下黑暗培养 2 d。之后将叶片接种到含有 50 mg/L 卡那霉素 (Kan) 和 300 mg/L 头孢霉素

(Cef)的筛选培养基中,在 25 ℃、16 h 光照/8 h 黑暗的条件下培养。待分化的不定芽长到 1 cm 左右时将其切下,转移到含有 50 mg/L 卡那霉素和 300 mg/L 头孢霉素的抽茎培养基中,待抗性芽长到 2 cm 时,将其切下并放入含有 25 mg/L 卡那霉素和 300 mg/L 头孢霉素的生根培养基中,继续培养抗性植株并生根。详细培养基配方见表 1。

表 1 培养基配方

| 培养基名称 | 培养基配方   |
|-------|---|
| 分化培养基 | MS + 萘乙酸(NAA) (0.05 mg/L) + 6 - 苄氨基嘌呤(6 - BA) (0.5 mg/L)              |
| 筛选培养基 | MS + NAA(0.05 mg/L) + 6 - BA(0.5 mg/L) + Kan(50 mg/L) + Cef(300 mg/L) |
| 抽茎培养基 | MS + NAA(0.05 mg/L) + 6 - BA(0.1 mg/L) + Kan(50 mg/L) + Cef(300 mg/L) |
| 生根培养基 | MS + 吲哚乙酸(IBA) (0.2 mg/L) + Kan(25 mg/L) + Cef(300 mg/L)              |

1.2.3 转基因植株的分子检测 以转基因小黑杨 DNA 为模板,用 *PnAlaAT3* 基因的特异性引物序列(*PnAlaAT3* - F,5′ - ATGGAAGTCACTGGGTTTGG - 3′;*PnAlaAT3* - R,5′ - GAGTAGGCTGCGACAGTAAA AG - 3′)进行 PCR 检测,目的条带送样测序。利用实时荧光定量 PCR 方法检测 *PnAlaAT3* 基因在转基因小黑杨中的表达情况,以 *PtActin* 基因为内参基因。*PnAlaAT3* 定量引物序列:F:5′ - GTTCCTGGCTC

TGGCTTTGGG - 3′;R:5′ - ACTCCGTGAGACGGGA GACAACA - 3′。

1.2.4 不同氮素处理及指标检测 选取健壮的转化植株和野生型无菌苗,移到灭菌的水培培养液(无蔗糖及琼脂的 MS 培养液)中,温室培养一段时间后,将所有试验苗分为 4 组,分别为野生型正常氮组(2 mmol/L NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>)、转基因正常氮组(2 mmol/L NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>)、野生型低氮组(1 mmol/L NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>)和转

基因低氮组(1 mmol/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )。用上述配置好的营养液装入水培装置,把小黑杨材料转入水培装置,处理 2 d,处理 2 d 后用吸水纸吸干根部残留的营养液,收样,放入  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  保存。其中叶片收样分为 2 个部分:第一部分是从小黑杨第 1 张完全展开的叶片开始依次向下取 3 张叶片的混样;第二部分是最下方 3 张叶片,分别代表小黑杨的新叶(上位叶)及老叶(下位叶)部分。转氨酶、谷氨酰胺合成酶、谷氨酸合酶等的活性用苏州科铭生物技术有限公司的试剂盒进行检测。

1.2.5 数据分析 采用 SPSS 20.0 软件对转基因株系与对照在表达水平及表型性状的差异显著性进行  $t$  检验( $P=0.05$ )。所有样品为 5 棵苗的混合样本,生物学重复 3 次。

## 2 结果与分析

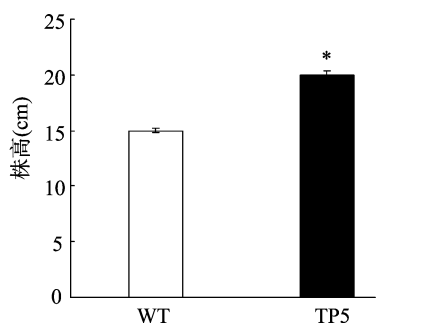
### 2.1 转 *PnAlaAT3* 基因的获得及分子检测

采用农杆菌介导法,将 *PnAlaAT3* 基因转入小黑杨中,共获得 17 棵转化株系,挑选 5、6、7 号转化株系(图 1-B 中 1~3)进行 DNA 及 RNA 等后续检测,以 DNA 为模板的 PCR 检测结果表明这些条带

的大小约为 400 bp(图 1-B),经测序确定为 354 bp,扩增结果与预期相符。这些结果初步证明 *PnAlaAT3* 基因已经成功整合到野生型小黑杨的基因组中。将 5 号转化株系进行无性扩繁后检测株高,结果如图 1-C 和图 2 所示,野生型平均株高为 15 cm,转化株系平均株高为 20 cm,两者株高差异显著( $P<0.05$ )。通过荧光定量 PCR 方法检测 *PnAlaAT3* 基因在该转化株系根和叶中的表达量,结果如图 3 所示,在叶片中,转基因小黑杨叶片中的基因表达量高于非转基因的植株;而在根中,转基因小黑杨中 *PnAlaAT3* 基因的表达量显著低于野生型植株。由此表明,*PnAlaAT3* 基因不仅成功整合到野生型小黑杨的基因组中,并且在小黑杨不同组织中成功表达。

### 2.2 转 *PnAlaAT3* 基因植株 AlaAT 酶活变化

为了确定转 *PnAlaAT3* 基因的转化株系在酶活水平的变化情况,对野生型及转化株系地上和地下部分酶活进行检测,结果如图 4 所示,在根中,转基因植株的 AlaAT 酶活与野生型植株基本一致,但在叶片中转基因植株的 AlaAT 酶活相对于野生型植株有显著的提高。



\*表示差异达显著水平( $P<0.05$ )。下同  
图2 野生型植株(WT)和转基因植株(TP5)株高

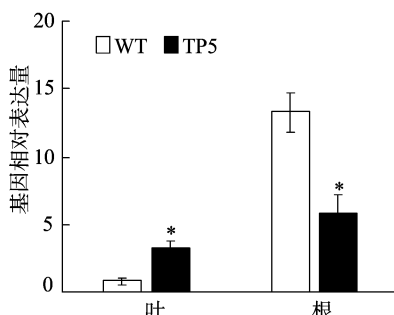


图3 荧光定量 PCR 检测野生型植株(WT)和转基因植株 *PnAlaAT3* 基因表达量差异

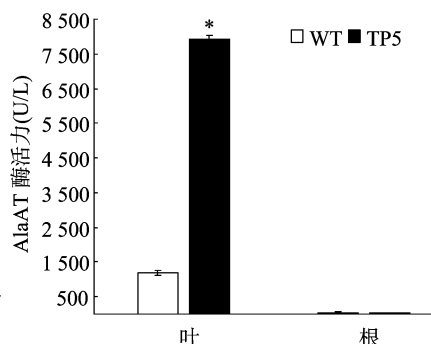


图4 野生型小黑杨与转 *PnAlaAT3* 基因植株 AlaAT 酶活差异分析

### 2.3 转 *PnAlaAT3* 基因小黑杨对氮同化相关基因酶活的影响

GS 和 GOGAT 是氮素同化过程中关键的基因,本试验对不同氮素下转 *PnAlaAT3* 基因株系的谷氨酰胺合成酶(GS)以及谷氨酰受- $\alpha$ -酮戊二酸氨基转移酶(GOGAT)活力进行检测,结果如图 5 所示,在根中以及下位叶中,GS 以及 GOGAT 活力没有显著差异,即使在不同氮素处理的条件下也是如此;在上位叶中,转 *PnAlaAT3* 基因的转化株系 GOGAT 活力没有显著区别,但 GS 活力在低氮条件下相对于野生型植株有明显的提高,且差异达到显著水平。

## 3 结论与讨论

在植物中,谷丙转氨酶不仅在逆境条件下发挥一定的作用,在外界氮素发生变化时,该酶也同时起到提高氮素利用的功能<sup>[13]</sup>。有研究表明,在小麦中氮素利用率的高低与谷丙转氨酶表达量成正相关<sup>[14-15]</sup>。在油菜中组成型表达大麦的谷丙转氨酶基因,结果导致在低氮条件下油菜的氮素利用率提高<sup>[9,16]</sup>。将大麦 *AlaAT* 基因转入水稻,并加以水稻的根部特异性启动子,结果导致转基因水稻分蘖数明显增加,根更加稠密<sup>[8]</sup>。同时,转基因水稻地上

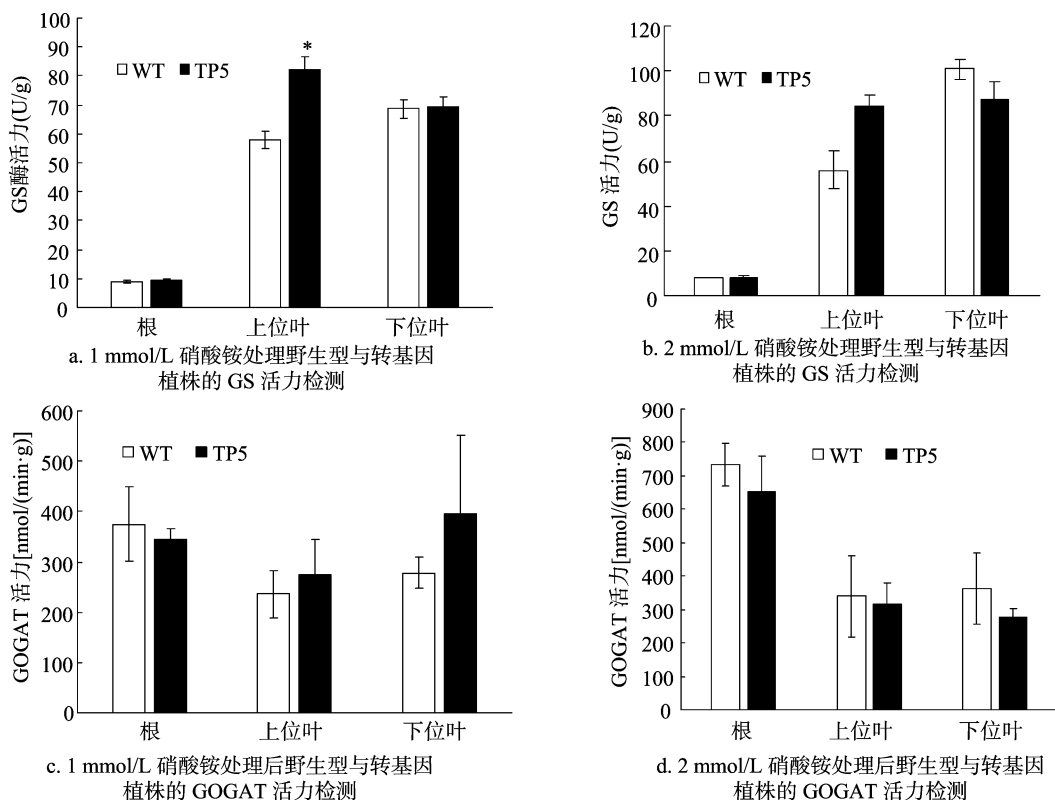


图5 野生型与转 *PnAlaAT3* 基因小黑杨在 GS 及 GOGAT 活力水平的差异分析

部分的生物量和含氮总量也显著增加,籽粒产量显著高于野生型水稻<sup>[8]</sup>。同时,谷氨酸、谷氨酰胺和天冬氨酸等的含量也发生相应变化<sup>[17]</sup>。

本研究中将 *PnAlaAT3* 基因转入野生型小黑杨,获得了过表达株系,在相同生长条件下发现转基因植株长势优于野生型植株,株高有显著增加。且转基因植株叶片中的 AlaAT 酶活高于野生型植株叶片中的 AlaAT 酶活。在低氮处理下,转化株系的上位叶片中 GS 活力显著高于野生型植株,株高也优于野生型植株。GS 活力升高会积累更多的谷氨酰胺,以提供给上位叶更多的原材料,从而使转基因植株长势更好。

#### 参考文献:

- [1] Miyashita Y, Dolferus R, Ismond K P, et al. Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Journal, 2007, 49 (6): 1108 – 1121.
- [2] Yonaha K, Suzuki K, Toyama S. Streptomyces beta – alanine: alpha – ketoglutarate aminotransferase, a novel omega – amino acid transaminase. Purification, crystallization, and enzymologic properties [J]. Journal of Biological Chemistry, 1985, 260: 3265 – 3268.
- [3] 黄冰艳, 高伟, 苗利娟, 等. 谷氨酰胺合成酶基因研究进展及其在植物氮代谢调控中的应用 [J]. 中国农学通报, 2010, 26 (23): 53 – 57.

- [4] Muench D G, Christopher M E, Good A G. Cloning and expression of a hypoxic and nitrogen inducible maize alanine aminotransferase gene [J]. Physiologia Plantarum, 1998, 103 (4): 503 – 512.
- [5] Igarashi D, Miwa T, Seki M, et al. Identification of photorespiratory glutamate: glyoxylate aminotransferase (GGAT) gene in *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal, 2003, 33 (6): 975 – 987.
- [6] Rocha M, Sodek L, Licausi F, et al. Analysis of alanine aminotransferase in various organs of soybean (*Glycine max*) and in dependence of different nitrogen fertilisers during hypoxic stress [J]. Amino Acids, 2010, 39 (4): 1043 – 1053.
- [7] Ricoult C, Echeverria L O, Cliquet J B, et al. Characterization of alanine aminotransferase (AlaAT) multigene family and hypoxic response in young seedlings of the model legume *Medicago truncatula* [J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57 (12): 3079 – 3089.
- [8] Shrawat A K, Carroll R T, DePauw M, et al. Genetic engineering of improved nitrogen use efficiency in rice by the tissue – specific expression of alanine aminotransferase [J]. Plant Biotechnology Journal, 2008, 6 (7): 722 – 732.
- [9] Good A G, Johnson S J, De Pauw M, et al. Engineering nitrogen use efficiency with alanine aminotransferase [J]. Revue Canadienne De Botanique, 2007, 85: 252 – 262.
- [10] Snyman S J, Hajari E, Watt M P, et al. Improved nitrogen use efficiency in transgenic sugarcane: phenotypic assessment in a pot trial under low nitrogen conditions [J]. Plant Cell Reports, 2015, 34 (5): 667 – 669.
- [11] 徐红卫, 郭桂梅, 黄赛华, 等. 两份大麦纯合突变体氮代谢相关

秦姣姣, 杨玉琦, 胡晓艳, 等. 银杏转录组数据中 EST-SSR 位点的生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(3): 90-94.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.03.015

# 银杏转录组数据中 EST-SSR 位点的生物信息学分析

秦姣姣, 杨玉琦, 胡晓艳, 杜淑辉

(山西农业大学林学院, 山西太谷 030800)

**摘要:** 银杏(*Ginkgo biloba* L.) 是雌雄异株植物, 其植株价值因性别不同而异。银杏转录组数据中 EST-SSR 位点的生物信息学分析将为银杏遗传学研究开展提供重要的理论与方法支持。首先通过高通量测序技术获得银杏大、小孢子叶球转录组数据, 然后开展数据拼接组装与 EST-SSR 位点挖掘及相应的生物信息学分析。转录组数据处理及拼接组装后共获得 108 307 条 unigenes, 然后利用 MISA 软件发掘银杏转录组数据中的 SSR 位点, 最终从 8 178 条 unigenes 中检索出 9 668 个 SSR 位点。其中, 单核苷酸重复的数量最多, 有 5 663 个; 其次是二核苷酸和三核苷酸, 重复数量分别为 2 471、1 438 个; 四核苷酸至六核苷酸重复的数量相对较少, 共有 96 个。银杏转录组 EST-SSR 位点共包含 147 种重复基元。在单核苷酸重复中, A 和 T 是优势重复基元类型, 分别有 2 808、2 685 个; 在二核苷酸重复基元中, AT 与 TA 数量较多, 分别为 469、383 个, 所占比例为 34.48%。此外, 设计得到 6 809 对银杏 EST-SSR 位点特异引物。银杏转录组 EST-SSR 位点的发掘将为银杏遗传图谱构建、遗传性状分析、幼年期性别鉴定方法的建立等提供有力的理论与方法支持。

**关键词:** 银杏; 转录组; SSR 位点; 重复基元

**中图分类号:** S664.301 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)03-0090-05

微卫星序列(simple sequence repeat, SSR)是指由 1~6 个核苷酸为重复单位组成的串联重复序列, 如  $T_n$ 、 $(AG)_n$ 、 $(ATG)_n$ 、 $(ATGC)_n$  等, 在真核生物基

因组中随机分布。不同物种间 SSR 位点的分布差异较大, 主要表现在基序类型、重复长度以及在染色体上的分布情况等, 从而反映出物种间高水平的等位基因多样性。虽然不同物种间 SSR 位点的差异性较大, 但是 SSR 位点两端的序列比较保守, 因此可以根据 SSR 位点两端的保守序列设计特异性引物以获得其长度多态性, 即 SSR 分子标记。SSR 分子标记技术除了具有操作简单、易检测、共显性、稳定性好等优点外, 还具有特异性强、等位基因变异多、受选择压力小等特点<sup>[1]</sup>。开发 SSR 分子标记的传统方法所需费用高、工作量大, 并且成功获得阳性克隆和多态性引物的概率偏低<sup>[2]</sup>。当前, 高通

收稿日期: 2019-11-23

基金项目: 山西省高等学校大学生创新创业训练计划(编号: 2019109); 山西省高等学校科技创新项目(编号: 2019L0369); 山西农业大学博士科研启动项目(编号: 2017YJ22); 山西省优秀博士来晋工作奖励项目(编号: SXYBKY201742)。

作者简介: 秦姣姣(1998—), 女, 重庆人, 主要从事园林植物种质资源评价与保存研究。E-mail: qinjj@163.com。

通信作者: 杜淑辉, 博士, 副教授, 主要从事园林植物种质资源研究。E-mail: dshxy@163.com。

基因于不同生长发育时期的表达[J]. 植物生理学报, 2017, 53(11): 2031-2036.

[12] Xu Z, Jing M, Qu C, et al. Identification and expression analyses of the alanine aminotransferase(*AlaAT*) gene family in poplar seedlings[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 45933.

[13] Enosawa S, Dozen M, Tada Y, et al. Electron therapy attenuated elevated alanine aminotransferase and oxidative stress values in type 2 diabetes-induced nonalcoholic steatohepatitis of rats[J]. Cell Medicine, 2013, 6(1/2): 63-73.

[14] Tian H, Fu J, Drijber RA, et al. Expression patterns of five genes involved in nitrogen metabolism in two winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes with high and low nitrogen utilization

efficiencies[J]. Journal of Cereal Science, 2015, 61: 48-54.

[15] 董召娣, 易媛, 张明伟, 等. 春性和半冬性小麦花后旗叶和籽粒氮代谢关键酶活性的差异[J]. 麦类作物学报, 2015, 35(8): 1098-1106.

[16] Mauchline T H, Fowler J E, East A K, et al. Mapping the *Sinorhizobium meliloti* 1021 solute-binding protein-dependent transportome[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(47): 17933-17938.

[17] Kan C C, Chung T Y, Juo Y A, et al. Glutamine rapidly induces the expression of key transcription factor genes involved in nitrogen and stress responses in rice roots[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 731.