

大豆 γ -生育酚甲基转移酶基因的克隆与表达分析

胡英考, 孟宪萍, 李雅轩, 蔡民华

(首都师范大学 生命科学院, 北京 100048)

摘要: 采用电子克隆与实验克隆相结合的方法获得了大豆 γ -生育酚甲基转移酶基因的 cDNA 序列, GenBank 登录号为 AY960126。序列分析结果表明, 该 cDNA 序列含有 1 个编码 350 个氨基酸的完整的开放读码框, 5' 非翻译区具有 2 个同框终止密码子, 3' 端具有 2 个加尾信号和 polyA 尾巴。启动子区除含有通用核心元件外, 还含有许多与光反应有关的作用元件。编码的蛋白质序列含有 1 个信号肽和 γ -生育酚甲基转移酶的特征基序, 该蛋白定位于叶绿体中。氨基酸序列比对和系统发育分析结果显示, 不同物种之间 γ -生育酚甲基转移酶氨基酸序列同源性较高。电子表达分析和 RT-PCR 组织表达分析结果表明, 该基因的表达量与组织中叶绿体含量具有很高的关联, 但强光逆境对该基因的表达无影响。

关键词: 大豆; γ -生育酚甲基转移酶; 基因克隆; 电子表达分析

中图分类号: S 565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2011)02-0198-07

Cloning and Expression Analysis of *Glycine max* γ -tocopherol Methyltransferase Gene

HU Ying-kao, MENG Xian-ping, LI Ya-xuan, CAI Min-hua

(College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

Abstract: cDNA sequence of γ -tocopherol methyltransferase gene was cloned by using *in silico* cloning combined with experimental RT-PCR from *Glycine max* with a GenBank accession number AY960126. Nucleotide sequence analysis showed that the cDNA has an intact open reading frame (ORF) encoding 350 amino acids. Two same frame stop codons were found in 5' untranslated region and two tailing signals and a polyA tail were found in 3' region. Many light responsive elements were found in its promoter region including many common core promoter elements. The deduced protein contained a signal peptide located in chloroplast and two γ -tocopherol methyltransferase motifs. Protein multiple-alignment and phylogenetic analysis suggested that GmTMT was strong similarity in different plant species. Expression analysis with *in silico* and RT-PCR results showed that its expression was closely correlated with chloroplast content. However, high light stress has no effect on its expression.

Key words: *Glycine max*; γ -tocopherol methyltransferase; Gene cloning; *in silico* expression analysis

维生素 E 是由光合生物生产的 α 、 β 、 γ 和 δ -生育酚的总称, 它们的区别在于芳香环上甲基的位置和数目, 但都具有相同的抗氧化特性^[1]。除了作为抗氧化剂之外, 生育酚在植物体内的信号转导以及碳水化合物代谢等方面也发挥着重要的作用^[2-3]。不仅如此, 维生素 E 还是医学临床、食品工业、饲料工业和化妆品工业的重要原料, 是人和动物必须从食物中摄取的一种微量营养素^[4-7], 是作物微量营养品质改良的重要育种目标。

植物生育酚的生物合成途径已经研究清楚, 控制它们的基因也已经克隆^[8-9], 生育酚生物合成的第一步、也是头部合成的关键步骤是由对羟苯丙酮

酸双加氧酶 (HPPD) 催化对羟苯丙酮酸 (HPP) 生成尿黑酸 (HGA, 或称 2,5-二羟苯乙酸)^[10-12]; 而后, 在尿黑酸叶绿基转移酶 (HPT) 的催化下, 尿黑酸与叶绿基二磷酸 (PDP) 发生缩合反应, 生成 2-甲基-6-叶绿基-1,4-氢醌^[13-16]; 然后由生育酚环化酶合成 δ 和 γ 生育酚^[17-19]; 最后, δ 和 γ 生育酚由 γ -生育酚甲基转移酶 (γ -TMT) 分别转化为 β 和 α 生育酚^[20]。虽然 4 种生育酚都能够被人体吸收且具有相同的抗氧化活性, 但由于人类肝脏中有 α -生育酚转移蛋白^[21], 所以 α -生育酚具有最高的相对维生素 E 活性 (100%), 而 β 、 γ 和 δ -生育酚的维生素 E 活性分别为 50%, 10% 和 3%。遗憾的是, 植物油脂

收稿日期: 2010-08-13

基金项目: 留学回国人员择优资助项目。

第一作者简介: 胡英考 (1966-), 男, 副教授, 博士, 主要从事植物种子发育与营养品质的分子遗传学研究。E-mail: yingkaohu@yahoo.com。

中 α -生育酚与 γ -生育酚的比率很低,如在大豆中该比率只有大约 0.1,而植物油脂则是人类维生素 E 的最主要来源^[22],因此,油料作物中 γ -生育酚甲基转移酶的活性是维生素 E 营养价值的限制因素^[20]。

大豆是重要的粮油、饲料和经济作物,也是生物柴油的潜在来源,大豆油脂占世界食用油市场的 25%,克隆和分离大豆 γ -生育酚甲基转移酶基因并研究其表达特性,对于大豆维生素 E 品质性状的改良具有十分重要的意义。该研究采用电子克隆与实验克隆相结合的方法分离了大豆 γ -生育酚甲基转移酶基因的 cDNA 序列,分析了该基因及其启动子的序列特征、组织与逆境表达情况,为进一步利用该基因改良大豆的营养品质打下了坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 电子克隆

以拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 γ -生育酚甲基转移酶基因 (GenBank 登录号:AY090280) 的蛋白质序列为探针,运行 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的 tBLASTn 检索大豆 EST 数据库,获得大豆的 EST 序列群,用 BioEdit 软件拼接组装为重叠群 (contig),获得组装全长 cDNA 序列的 EST 候选清单。最后利用 NCBI 的 ORF finder 程序,对最终所获得的 cDNA 序列进行开放读码框分析。

1.2 引物

以上述电子克隆所获得的 cDNA 序列为基础,采用 Primer Premier 5.0 软件设计 RT-PCR 引物:上游引物 5'-TATTGAAGGTTGGGCACCCGTGA-3';下游引物 5'-ATCCTGGGTCTCCATTTATTCAG-3'。

半定量所用的 18S rRNA 引物序列如下:

上游引物 5'-CCTTGCTTGTTGCTTTACTAAAT-3';
下游引物 5'-ATGCACCTTTTCGTTTGTTCGGAG-3'。
引物由上海生工生物工程公司合成。

1.3 植物材料

大豆种子水浸泡吸胀之后种在花盆中,在光照强度 $75 \sim 100 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的光照培养室中培养,25/22℃ 的昼夜循环温度,用 Hoagland 溶液每周浇灌 2~3 次,待大豆出现真叶后,用光强为 $0.8 \sim 1.0 \text{ mmol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的强光照照射幼苗 (光量子大约为 12 300 Lux),每天持续照射 10 h,同时将 Hoagland 溶液换成蒸馏水浇灌幼苗使其营养缺乏^[23],取新鲜幼嫩的大豆叶片用于基因克隆,取对照,光照和营养缺陷处理分别为 1、3、6 d 的大豆叶片、根和茎于 -70℃ 保存,用于半定量及组织表达谱分析。

1.4 RT-PCR

大豆叶片总 RNA 的提取采用 Trizol 法 (Invitrogen),按说明书进行。将 5 μg 总 RNA 按公司反转录试剂盒 (Promega, 美国) 说明书合成 cDNA,作为 PCR 的模板。PCR 反应体系 25 μL , 10 \times GC Buffer I 2.5 μL , 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP 2 μL , 5' Primer (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 μL , 3' Primer (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 μL , LA Taq 酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.25 μL , cDNA 模板 2 μL , ddH₂O 16.25 μL 。PCR 程序为:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 60℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 2 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物回收后与 pGEM-T Easy (TIANGEN) 载体连接,转化大肠杆菌 TOP10 (TRANSGEN) 菌株,在抗性 Amp^r 的 LB 平板上筛选阳性克隆。挑取单菌落进行菌落 PCR 鉴定,将 3 个独立的阳性菌落送上海生工采用 T7 和 SP6 引物双向测序。

1.5 生物信息学分析工具与方法

GmTMT 编码蛋白质的氨基酸基本性质分析采用 ExPASy 数据库中的 ProParam 在线工具 (physicochemical parameters of a protein sequence, <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 进行。SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 程序用于预测信号肽序列,TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 程序用于进行蛋白质的亚细胞定位,利用 ClustalX 1.83 和 DNAMAN 5.0 进行不同物种间同源基因的蛋白序列比对,并结合 MEGA 4.0 软件构建系统进化树。采用 Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 23.0 版本对 GmTMT 蛋白序列的特征基序进行搜索分析。

根据克隆到的 GmTMT 基因的 cDNA 序列,从 <http://www.plantgdb.org/> 网站下载 GmTMT 基因起始密码子上游 1 500 bp 的启动子区,在 plantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/>) 网站进行启动子作用元件在线分析。电子表达谱分析采用 NCBI 网站的 UniGene 数据库进行。

1.6 半定量 RT-PCR 与组织表达分析

半定量 RT-PCR 和组织表达分析方法参照李雅轩等^[24]的方法进行。

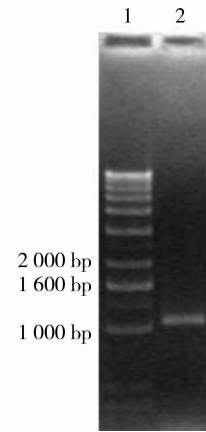
2 结果与分析

2.1 大豆 γ -TMT 基因的克隆

以拟南芥的 γ -生育酚甲基转移酶基因 (GenBank 登录号:AY090280) 的蛋白序列为信息探针, tBLASTn 检索 NCBI 中的大豆 EST 数据库,获得大豆的同源 EST 片段,然后用 BioEdit 软件将 EST 进行拼接组装成重叠群。再以重叠群为探针运行

BLASTn 程序重复上述过程,直至重叠群不能延长为止,获得了 1 条长为 1 292 bp 的电子 cDNA 序列。

根据上述电子克隆获得的 cDNA 序列,设计 1 对特异性的引物进行 RT-PCR 扩增,获得了 1 条约 1 100 bp 的单一一条带(图 1),经克隆与测序,证实其序列与电子克隆的序列完全一致,该序列的完整开放读码框(ORF, 49~1 101 bp)编码 350 个氨基酸(图 2),其 5'端非翻译区中有连续的同框终止密码子,起始密码子 AUG 处符合“A/GNNAUG”的 Kozak 规则^[25],在 3'非翻译区有 2 个加尾信号序列和 1 个 polyA 尾巴,表明所克隆的是 1 条真实存在的完整的基因序列,命名为 GmTMT,该基因序列已在 Gen-Bank 中注册,注册号为:AY960126。



1 DNA 标准分子量; 2 RT-PCR 产物

1 DNA molecular marker; 2 RT-PCR product

图 1 GmTMT cDNA 的 RT-PCR 产物

Fig. 1 RT-PCR product of GmTMT

```

1  AGCCTTTATTAGTAATTGACTATTGAAGGTTGGGCACCCGTGAGTGACATGGCCACCGTGGTGAGGATCCCAACAATCTCATGCATCCAC
   * *                               M A T V V R I P T I S C I H
91  ATCCACACGTTCCGTTCCCAATCCCTCGCACTTTTCGCCAGAATCCGGGTCGGACCCAGGTCGTGGGCTCCTATTCCGGCATCGGCAGCG
   I H T F R S Q S P R T F A R I R V G P R S W A P I R A S A A
181 AGCTCGGAGAGAGGGGAGATAGTATTGGAGCAGAAGCCGAAGAAGGATGACAAGAAGAAGCTGCAGAAGGGAATCGCAGAGTTTACGAC
   S S E R G E I V L E Q K P K K D D K K K L Q K G I A E F Y D
271 GAGTCTTCTGGCTTAGTGGGAGAACATTGGGGGACCATGACCATGGCTTTTATGACTCGGATTCCACTGTTTCGCTTTTCGGATCAT
   E S S G L W E N I W G D H M H H G F Y D S D S T V S L S D H
361 CGTGTCTGCTCAGATCCGAATGATCAAGAGTCTCTTCGCTTTGCTTCTGTTCTGAGGAGCGTAGTAAATGGCCCAAGAGTATAGTTGAT
   R A A Q I R M I Q E S L R F A S V S E E R S K W P K S I V D
451 GTTGGGTGTGGCATAGTGGCAGCTCTAGATACCTGGCCAAAGAAATTTGGAGCAACCAAGTGTAGGCATCACTCTGAGTCTCTTCAAGCT
   V G C G I G G S S R Y L A K K F G A T S V G I T L S P V Q A
541 CAAAGAGCAAAATGCTCTTGTGCTGCTCAAGGATTGGCTGATAAGGTTTCCTTTTCAGGTTGCTGACGCTCTACAGCAACCACTTCTCTGAC
   Q R A N A L A A A Q G L A D K V S F Q V A D A L Q Q P F S D
631 GGCCAGTTTGTATCTGTGTGTCCATGGAGAGTGGAGAGCATATGCCTGACAAAGCTAAGTTTGTGGAGAGTTAGCTCGGGTAGCAGCA
   G Q F D L V W S M E S G E H M P D K A K F V G E L A R V A A
721 CCAGGTGCCACTATAATAAGTAACATGGTGCCACAGGGATCTTGGCCCTGACGAACAATCCTTACATCCATGGGAGCAAGATCTCTTA
   P G A T T I I I V T W C H R D L G P D E Q S L H P W E Q D L L
811 AAGCAAGATTGGCATATTAACCTCCCTGCTGCTCAACTCTGATTATGTTAAGTTGCTCCAAATCCCTGTCACCTTCAGGACATC
   K K I C D A Y Y L P A W C S T S D Y V K L L Q S L S L Q D I
901 AAGTCAGAAAGATTGGTCTCGCTTTGTTGCTCCATTTTGGCCAGCAGTGATACGCTCAGCCTTCACATGGAAGGGTCAACTTCACCTCTTG
   K S E D W S R F V A P V I R S A F T W K G L T S L L
991 AGCAGTGGACAAAAACGATAAAAGGAGCTTTGGCTATGCCATTGATGATAGAGGGATACAAGAAAGATCTAATTAAGTTTGGCATCATT
   S S G Q K T I K G A L A M P L M I E G Y K K D L I K F A I I
1081 ACATGTCGAAAACCTGAATAAATGGAGAGGAGGATTACTTTTATAGAATGAACCAAGTTTCCAACAGGTCGTTTATTTCGATAGTTGAG
   T C R K P E *
1171 AAACAAGAGAAAAAATATAATGAAAGGGGTTGTTGCGATTTTATTTTATGTTTCTACATATGCAATATCTCCTATGATTGGCGAAATATATA
1261 TTATCTACTTAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
  
```

核酸序列中终止密码子用 * 表示;方框内为加尾信号;下划线部分为 polyA

Asterisks (*) indicate stop codons; rectangle frames represent the tailing signals; the polyA tail is underlined

图 2 GmTMT 的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 cDNA sequence of GmTMT and deduced amino acid sequence

2.2 GmTMT 蛋白序列特征及系统发育分析

利用在线工具对上述推导的蛋白质序列进行了分析,结果显示该基因的等电点(PI)为 8.9,分子量(MW)为 38 958.66 Da,在氨基端有 28 个氨基酸的信号肽序列。在线亚细胞定位分析表明,该蛋白定位于叶绿体,具有 2 个 S-腺苷甲硫氨酸结合结构域(SAM domain),这些特征均与拟南芥以及其它物种的 γ -生育酚甲基转移酶相似,表明该基因确实是大豆的 γ -生育酚甲基转移酶基因。

从 NCBI 的蛋白质数据库中下载小麦 (*Triticum aestivum*, AAZ67143), 苜蓿 (*Medicago sativa*, AAX63740), 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, NP849984), 水稻 (*Oryza sativa*, XP-467331), 衣藻 (*Chlamydomonas Reinhardtii*, CAI59122), 油菜 (*Brassica oleracea*, AAO13806) 的 γ -生育酚甲基转移酶的蛋白序列,并与大豆 GmTMT 序列进行比较,其蛋白序列的一致性分别为 56.46%、52.12%、56.20%、56.71%、45.57% 和 56.71% (图 3)。

<i>Glycine max</i>MATVRIPTISCIHIHIFRSQSPRTFARIR/GRSWAPTRASAASS.....ERGETVLEQKPKKDK	62
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>MPSIALQGHILPSSSACLGRATIRVCRVSTIRSRVIVR.....AGPLEITMKEITLIGV	56
<i>Brassica oleracea</i>	BRASSICALERACEFAMKAILAPPSSILSLRHKVSSIRSESLILQSQRESSALMITT.....ATRGSAV/TAATISSA	73
<i>Oryza sativa</i>MHAAATGALAPLHPLIRCTSRHLCAASERAGLCIHHRRRRSSRRIKLAVRAMAPITLSSSTAAAP	71
<i>Arabidopsis thaliana</i>MKAILAAPSSILSLPYRINSSFGSKSLLFRSESSSSVMT.....TTRGNVA/AAATIS.T	57
<i>Medicago truncatula</i>MKITTHHITMCSKNRPILVWVSCVKIRNSNSKNCAL.....FFCCIARCTVASNTQ	58
<i>Triticum aestivum</i>MANGAAILHSLISTGWIRRLIRASATRLAPSPGLSCRSRPTR.....S/RMASSTT.AARADAP	63
Censusus	l p r r sr a	
<i>Glycine max</i>	KKIQGIAEFYDESSGLWENIWD MHGFYDSDIVSLSD, .HRAQIRMIQESLRFAS SEE.....RSKWP	129
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	SDIKVGIAFYDESSGLWENIWD MHGFYKGPVKSNQ, ...QAQIMIEEILK/VAG TQA.....	116
<i>Brassica oleracea</i>	EALREGIAEFYNETSGLWEEIWD MHGFYDSDVQLSDSGHRAQIRMIQESLRFAG TEEF.....KKI	141
<i>Oryza sativa</i>	PGLKEGIAEFYDESSGLWEEIWD MHGFYDAGTAASMD, .HRAQIRMIQESLAFAA HDA.....EKKP	138
<i>Arabidopsis thaliana</i>	EALRKGIAEFYNETSGLWEEIWD MHGFYDSDVQLSDSGHRAQIRMIQESLRFAG TEEF.....EKKI	127
<i>Medicago truncatula</i>	HNEIMVITTRISLILHCHITFPQ HDTITTTTTITINER, .RRKGLRVSMAA/KEVM VMEEEKKIQLDQSKWP	136
<i>Triticum aestivum</i>	PGLKEGIAEFYDESSGLWEEIWD MHGFYDAGTAASMD, .HRAQIRMIQESLAFAA HDP.....TNKP	130
Censusus	l gia fydessglwe iwg hrthgfyd v sd hr aqirmieesl fa v e klp	
<i>Glycine max</i>	SI C LAK F AISV V Q A A AAP GLAD VS A Q SD Q	209
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	RM C ISR F CISN K A A A SKE GFCD IQ G A EA A	196
<i>Brassica oleracea</i>	RV C IAS F AECI V K A D AAP SLSH VS A D ED I	221
<i>Oryza sativa</i>	SV C LAN Y AQCY V E G A AAE GLSD VS G E PD Q	218
<i>Arabidopsis thaliana</i>	KV C LAS F AECI V K A D AAP SLAH AS A D ED K	207
<i>Medicago truncatula</i>	SV C LAK F ANCV V E A A AAP GLAD VS A Q PD Q	216
<i>Triticum aestivum</i>	TI Y LAN Y AQCS V E G A AAV GLSD AS A E PD Q	210
Censusus	k vcdvggiggssryla kfga c gitlspvqa ranalaaagil dkvsfqadad qof dggfollwsresgelm	
<i>Glycine max</i>	D AK G A A AIT I D GED QS HEW QDL KK CDAY A TS VKLIQSLS Q KSE	289
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	D KK S A C GIV V V GEG AG RED KAL DR NEAY D VA QKLEFAQS T QIR	276
<i>Brassica oleracea</i>	D AK K V T GRI I N SQE ES QPW QNL DR CKTF A TS VELIQSLS Q KCA	301
<i>Oryza sativa</i>	D RQ S A A ARI I N EES ES KPD INL RR CDAY D ES VKIAESLS E RIA	298
<i>Arabidopsis thaliana</i>	D AK K V A GRI I N SAG EA QPW QNL DK CKTF A TD VNLIQSLS Q KCA	287
<i>Medicago truncatula</i>	N EK G A A GIT I D RED ES QOW KIL KK CDSE E TA VKLEIIMS Q KSA	296
<i>Triticum aestivum</i>	N QK S A A AIT I N AES DS KPD INL KK CDAY D ES VKIAESLS E KTA	290
Censusus	pok kfv elarvaapgggtiivtwchml p eesl pwe nilkkicdaylp wostsdqvkllselslqik adw	
<i>Glycine max</i>	RE A P RS F WK LISLRS QKT K LA IE YKGL AI TOR BE.....	350
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	QE S G AT L SE IAGLAKA WIT K LV AE FRRL NL SGR IQQ.....	338
<i>Brassica oleracea</i>	EN A P RT L WK LISLRS MS K LT IE YKGL GI ACQ EL.....	362
<i>Oryza sativa</i>	EN A P KS L WK LISLRS WKT R MV IE YKGL TI TOR EETIQ.....	362
<i>Arabidopsis thaliana</i>	EN A P RT L WK LISLRS MS K LT IE YKGL GI TQ EL.....	348
<i>Medicago truncatula</i>	RE A P RS L WK FTSILRS IKT K LA IE FRKL AI TOR EENVDQ.....	362
<i>Triticum aestivum</i>	EN A P QS L WK LISLRS WKT K LV IQ YKGL SI TCH EQAIEGEFEASER	364
Censusus	senvapfvpavirsaltwgltsllrsy ktikal mpmiegykkglikf iitcrkp	

小麦 (*Triticum aestivum*, AAZ67143), 油菜 (*Brassica oleracea*, AA013806), 截形苜蓿 (*Medicago truncatula*, AAX63740), 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, NP849984), 水稻 (*Oryza sativa*, XP467331), 衣藻 (*Chlamydomonas Reinhardtii*, CAI59122)

图3 *GmTMT* 蛋白序列与其它植物同源蛋白序列的比对

Fig. 3 Comparison of *GmTMT* protein sequences with other plants homologous protein sequences

从构建的几种植物 γ -TMT 系统发育树可以看出(图4),同为豆科植物的大豆和截形苜蓿的亲缘关系最近,形成共同分支,演化较晚;禾本科的水稻和小麦同属一个分支,亲缘关系较近;十字花科的油菜和拟南芥属同一分支,它们都与低等植物衣藻的亲缘关系远,系统发育分析的结果与各物种在经典分类学上的位置一致。

2.3 *GmTMT* 基因启动子区作用元件分析

从 plantGDB 网站下载 *GmTMT* 基因上游 1 500 bp 的启动子序列,在 plantCARE 网站进行顺式作用元件分析,结果表明(表1),该启动子区含有大量的核心启动子元件 TATA 和 CAAT,除此之外,还有大量的与光反应有关的作用元件,显示出该基因的表达与光照的关系十分密切。此外,该启动子区还有

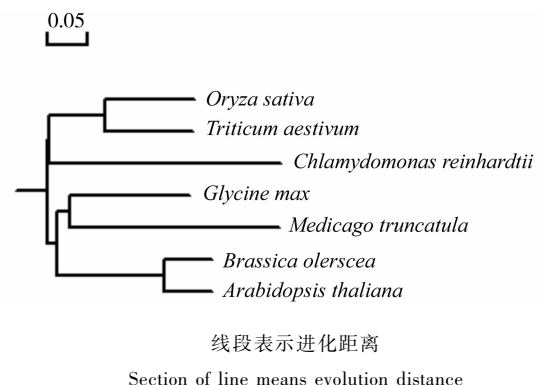


图4 植物 γ -TMT 的系统发育树
Fig. 4 Phylogenetic tree of plant γ -TMT

许多与逆境以及植物激素相关的作用元件,显示出该基因的表达也受逆境和植物激素的调节。

表 1 大豆 *GmTMT* 基因启动子区元件分析
Table 1 Cis-acting elements analysis of soybean *GmTMT* gene promoter region

元件功能分类 Category of element function	元件名称与数目 Element name and number
核心启动子 Core promoter region	CAAT-box(26), TATA-box(64)
光反应相关元件 Light responsive element and related	BoxI(1), 3-AF1 binding site(1), GT1-motif(3), MNF1(2), Sp1(1), G-Box(4), ACE(1), Box4(1), CATT-motif(1), GA-motif(1), GATA-motif(2), I-box(1), TCT-motif(1), chs-CMA1a(1)
逆境相关元件 Element involved in stress related	TC-rich repeats(2), LTR(1), MBS(1), ABRE(1), CGTCA-motif(1), ERE(1), TGA-element(1), TGACG-motif(1)
激素反应相关元件 Element involved in hormone response	ABRE(1), CGTCA-motif(1), ERE(1), TGA-element(1), TGACG-motif(1)
胚乳表达元件 Element required for endosperm expression	Skn ⁻¹ -motif(4)
异黄酮生物合成元件 Flavonoid biosynthetic genes regulation	MBSH(1)
细胞周期调节元件 Element involved in cell cycle regulation	MSA-like(1)

2.4 *GmTMT* 基因的电子表达谱分析

利用 NCBI 网站的 UniGene 数据库,分析了大豆 *GmTMT* 基因在不同组织的电子表达,结果表明(表 2),*GmTMT* 基因在上胚轴中表达量最高,TPM 值达 742,在营养芽、叶片和子叶中有相似的表达量,TPM 值分别为 378、288 和 232,在花、茎和根中表达量较少,而在分生组织、荚、种皮和体细胞胚中没有检测到表达。联系上述启动子元件分析和蛋白质的叶绿体定位结果,证实了该基因的表达与光照和细胞中叶绿体的含量有直接关系。

2.5 *GmTMT* 基因半定量 RT-PCR 及组织表达谱

对该基因在根、茎、叶 3 种不同组织中的表达水平进行了分析,结果表明(图 5),在正常的生长条件下,该基因在叶片中的表达量最高,茎的表达量略低,而在根中却几乎不表达,由此看出该基因的表达与器官的光合作用之间存在明显的关联。由于生育酚的合成是在光合作用的叶绿体中完成的,含叶绿体较多的细胞该基因的表达量高一些也是正常的。这一结果与上述电子表达谱的结果也基本一致,说明该基因的电子表达谱结果是可靠的。

表 2 大豆 *GmTMT* 基因电子表达谱
Table 2 Expression profile of soybean *GmTMT* gene in different tissues by *in silico* analysis

名称 Pool name	每百万转录 本中的数目 Transcripts per million (TPM)	基因的 EST /总 EST 库 Gene EST / Total EST in pool
子叶 Cotyledon	232	7/30082
上胚轴 Epicotyl	742	2/2692
花 Flower	60	1/16569
叶片 Leaf	288	13/45127
分生组织 Meristem	0	0/5891
荚 Pod	0	0/8637
根 Root	22	1/45166
种皮 Seed coat	0	0/10690
体细胞胚 Somatic embryo	0	0/13053
茎 Stem	48	1/20640
营养芽 Vegetative bud	378	1/2645

分别提取在强光和营养缺乏逆境条件下不同时间段大豆叶片的总 RNA,以持家基因 18S rRNA 为内参,进行 *GmTMT* 基因逆境条件下的半定量 RT-PCR 表达分析。结果表明,在强光和营养缺乏条件下 *GmTMT* 基因表达量几乎没有变化(结果未显示),说明该基因对强光逆境反应不敏感。由于 4 种生育酚具有相同的抗氧化能力,而 *GmTMT* 基因的功能是催化 δ 和 γ 生育酚转化为 β 和 α 生育酚,改变的只是不同种类生育酚的构成,并不改变生育酚总量。所以,强光逆境并不能上调其表达量。

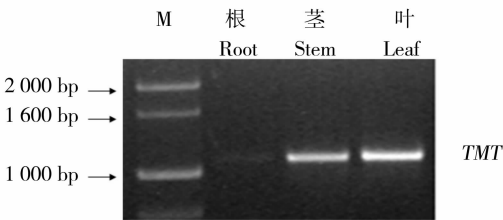


图 5 *GmTMT* 在不同大豆组织中的表达分析
Fig. 5 Expression analysis of *GmTMT* in different tissues (roots, stems and leaves)

3 讨论

采用电子克隆与实验克隆相结合的方法,成功地克隆了大豆 *GmTMT* 基因,并对该基因及其蛋白质序列、启动子区和电子表达谱与组织和逆境表达情况进行了分析,结果为进一步利用该基因改良大豆这一重要油料作物的品质打下了坚实的基础。

电子克隆(*in silico* cloning)的技术核心是电子组装延伸 EST 序列或者预测已知的基因组序列,再利用 RT-PCR 的方法进行克隆分析、验证^[26-27],具有

快速、经济、简便的特点,是伴随着大规模基因组和 EST 测序而产生和兴起的一种新的基因克隆方法。通过这种电子克隆与实验克隆相结合的方法,已成功地克隆了多个植物基因^[24,28-29]。该研究采用电子克隆与实验克隆相结合的方法,成功地克隆了大豆 γ -生育酚甲基转移酶基因,并采用多种生物信息学手段分析了该基因及其启动子区的特征特性,研究结果进一步证明了电子克隆与实验克隆相结合是克隆新基因的有效途径。但是该方法成功的关键是要有大量的 EST 序列或者基因组序列作后盾,只有那些序列资料很丰富的物种才适用该方法。

随着大规模的 EST 测序,NCBI 数据库中积累了大量的 EST 序列信息,这些 EST 序列由于来源于不同的实验室、不同的研究者、不同或相同的材料,因此,同一个基因在不同组织中 EST 序列的多少就反映了该基因的表达丰富程度,又由于每种组织中 EST 总量不同,为便于比较,采用数据库中每百万个 EST 序列中有多少条该基因的 EST 序列来表示基因表达的丰富程度^[30]。基于上述方法进行的电子表达谱分析,能够反映基因在不同发育阶段、不同组织中的差异表达情况,为基因功能的研究提供重要的参考信息。但该方法受制于数据库中序列的丰富程度,EST 序列资料越丰富,越能反映出基因表达的真实水平,提供的信息越有实际使用意义。该研究用 Unigene 数据库分析了 *GmTMT* 基因的电子表达谱,显示出该基因的表达与光合作用有很强的关联,而且 RT-PCR 的结果与电子表达谱的结果一致,说明电子表达分析可以用于该目的基因的分析,也从一个侧面说明数据库中大豆的 EST 序列资料比较充分。

生育酚的合成是在高等植物光合组织的叶绿体中进行的^[2],该研究结果表明,*GmTMT* 基因在茎和叶中都有表达,且在叶片中的表达量略高于茎段,而在根中几乎没有表达。该基因在叶片中的表达量之所以高于茎段,可能是叶细胞中含有叶绿体较茎细胞中多所致,而根组织细胞中可能是因为没有叶绿体而没有检测到 *GmTMT* 的表达。用半定量 RT-PCR 分析 *GmTMT* 基因在逆境情况下的表达量时,发现其表达并不受强光的调节,这与前人的研究结果相吻合^[23],即在逆境状态下,不是生育酚的种类而是生育酚的总量对逆境有所反应,而 *GmTMT* 是用来转化生育酚种类的,所以对强光逆境反应不敏感。

参考文献

[1] Fryer M V. The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α -to-

- copherol)[J]. *Plant Cell and Environment*, 1992, 15: 381-392.
- [2] Munne-Bosch S, Alegre L. The function of tocopherols and tocotrienols in plant[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2002, 21:31-57.
- [3] 潘卫东,李晓峰,陈双燕,等. 植物维生素 E 合成相关酶基因的克隆及其在体内功能研究进展[J]. *植物学通报*,2006,23(1):68-77. (Pan W D,Li X F,Chen S Y,et al. Progress in vitamin E synthesis-related enzyme genes and in vivo functions in plants[J]. *Chinese Bulletin of Botany*,2006,23(1):68-77.)
- [4] Ajjawi I, Shintani D. Engineered plants with elevated vitamin E: a nut racecutical success story [J]. *Trends in Biotechnology*, 2004, 22(3): 104-107.
- [5] 雷炳福. 我国天然维生素 E 产业化前景初探[J]. *中国油脂*, 2003,28(4):49-51. (Lei B F. Industrialization prospect of natural vitamin E of China[J]. *China Oils and Fats*,2003,28(4):49-51.)
- [6] 宋晓燕,杨天奎. 天然维生素 E 的功能及应用[J]. *中国油脂*, 2000,25(6):45-48. (Song X Y,Yang T K. Functional and application of natural vitamin E [J]. *China Oils and Fats*,2000,25(6):45-48.)
- [7] 尤新. 天然维生素 E 的功能和开发前景[J]. *食品工业科技*, 2000,21(4):5-61. (You X. Functional and industrialization prospect of natural vitamin E[J]. *Science and Technology of Food Industry*,2000,21(4):5-61.)
- [8] Della Penna D. Progress in the dissection and manipulation of vitamin E synthesis[J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(12): 574-579.
- [9] Della Penna D, Pogson B J. Vitamin synthesis in plants: Tocopherols and carotenoids[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57:711-38.
- [10] Norris S R, Barrette T R, Della Penna D. Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation[J]. *Plant Cell*, 1995, 7:2139-2149.
- [11] Norris S R, Shen X, Della Penna D. Complementation of the *Arabidopsis* *pds1* mutation with the gene encoding p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase[J]. *Plant Physiology*, 1998, 117: 1317-1323.
- [12] Schulz A, Ort O, Bayer P, et al. Sc-0051, a 2-benzoyl-cyclohexane-1,3-dione bleaching herbicide, is a potent inhibitor of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase [J]. *FEBS Letters*, 1993, 318: 162-166.
- [13] Cahoon E B, Hall S E, Ripp K G, et al. Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21: 1082-1087.
- [14] Collakova E, Della Penna D. Isolation and functional analysis of homogentisate phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2001, 127: 1113-1124.
- [15] Savidge B, Weiss J D, Wong Y H H, et al. Isolation and characterization of homogentisate phytyltransferase genes from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2002, 129: 321-332.
- [16] Schledz M, Seidler A, Beyer P, et al. A novel phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 involved in tocopherol biosyn-

- thesis[J]. FEBS Letters, 2001, 499: 15-20.
- [17] Sattler S E, Cahoon E B, Coughlan S J, et al. Characterization of tocopherol cyclases from higher plants and cyanobacteria. Evolutionary implications for tocopherol synthesis and function[J]. Plant Physiology, 2003, 132: 2184-2195.
- [18] Porfirova S, Bergmuller E, Tropf S, et al. Isolation of an Arabidopsis mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis[J]. Proceedings of National Academy of Sciences USA, 2002, 99: 12495-12500.
- [19] Provencher L M, Miao L, Sinha N, et al. Sucrose export defective1 encodes a novel protein implicated in chloroplast-to-nucleus signaling[J]. Plant Cell, 2001, 13: 1127-1141.
- [20] Shintani D, DellaPenna D. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering[J]. Science, 1998, 282: 2098-2100.
- [21] Traber M G, Arai H. Molecular mechanisms of vitamin E transport[J]. Annual Review of Nutrition, 1999, 19: 343-355.
- [22] Grusak A A. Genome-assisted plant improvement to benefit human nutrition and health[J]. Trends in Plant Science, 1999, 4: 164-166.
- [23] Collakova E, Della Penna D. The role of homogentisate phytyltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during abiotic stress[J]. Plant Physiology, 2003, 133: 930-940.
- [24] 李雅轩, 李蕊, 孟凡臣, 等. 大豆吡哆醛激酶基因的克隆与表达分析[J]. 华北农学报, 2009, 24(3): 23-27. (Li Y X, Li R, Meng F C, et al. In silico cloning and expression analysis of *Glycine max* pyridoxal kinase gene[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2009, 24(3): 23-27.)
- [25] Kozak M. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs[J]. Nucleic Acids Research, 1984, 12(2): 857-872.
- [26] O'Brien K P, Tapia-Paez I, Stahle-Backdahl M, et al. Characterization of five novel human genes in the 11q13-q22 region[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 273(1): 90-94.
- [27] 张德礼, 丁培国, 凌伦奖, 等. 人类新基因 C17orf32 的电子克隆和编码区序列 RT-PCR 验证[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(4): 543-549. (Zhang D L, Ding P G, Ling L J, et al. In silico cloning of C17orf32, a novel human gene and verification of its coding region by RT-PCR[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2002, 29(4): 543-549.)
- [28] 李晓晓, 李蕊, 李雅轩, 等. 大豆脱氢抗坏血酸还原酶基因的电子克隆[J]. 大豆科学, 2007, 26(1): 45-50. (Li X X, Li R, Li Y X, et al. In silico cloning and evolution analysis of dehydroascorbate reductase cDNA from *Glycine max* [J]. Soybean Science, 2007, 26(1): 45-50.)
- [29] 孟宪萍, 李晓晓, 李雅轩, 等. 大豆尿黑酸叶绿基转移酶基因的克隆与进化分析[J]. 华北农学报, 2007, 22(4): 14-18. (Meng X P, Li X X, Li Y X, et al. In silico cloning of homogentisate phytyltransferase gene from soybean[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2007, 22(4): 14-18.)
- [30] Sayers E W, Barrett T, Benson D A, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(Database issue): D5-15.
- ~~~~~
- (上接第 197 页)
- [9] Xue R G, Xie H F, Zhang B. A multi-needle-assisted transformation of soybean cotyledonary node cells[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28: 1551-1557.
- [10] Margie M P, Juan C M, Andrea B K, et al. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient Agrobacterium-mediated soybean transformation[J]. Plant Cell Reports, 2006, 25: 206-213.
- [11] Margie M P, Shou H X, Guo Z B, et al. Assessment of conditions affecting agrobacterium-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant[J]. Euphytica, 2004, 136: 167-179.
- [12] 吴静, 李春俭, 江荣凤, 等. 缺硼对大豆幼苗形成和根瘤固氮活性的影响[J]. 华北农学报, 1999, 14(2): 96-101. (Wu J, Li C J, Jiang R F, et al. Effects of boron-deficiency on soybean growth and nitrogenase activity[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 1999, 14(2): 96-101.)
- [13] 屈红征, 王丽萍, 吴国良. 植物硼素营养研究进展[J]. 山西农业大学学报, 2001, 21(2): 173-176. (Qu H Z, Wang L P, Wu G L. Progress of the study on boron nutrition of plant[J]. Journal of Shangxi Agricultural University, 2001, 21(2): 173-176.)
- [14] 刘鹏, 杨玉爱. 钼、硼浸种对大豆幼苗生理特性的影响[J]. 浙江大学学报, 2003, 30(1): 83-88. (Liu P, Yang Y A. Effect of soaking of molybdenum and boron on physiological characteristics of soybean seedling[J]. Journal of Zhejiang University, 2003, 30(1): 83-88.)
- [15] 黄益宗. 植物对硼素不足的反应及其成因探讨[J]. 土壤与环境, 2002, 11(4): 434-438. (Huang Y Z. Plant response to boron deficiency and origin of formation[J]. Soil and Environmental Sciences, 2002, 11(4): 434-438.)
- [16] 石磊, 徐芳森. 植物硼营养研究的重要进展与展望[J]. 植物学通报, 2007, 24(6): 789-798. (Shi L, Xu F S. Main progresses in boron nutrition research in plants and its prospects[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2007, 24(6): 789-798.)
- [17] Takano J P, Kyoko M W, Toru F W. Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters[J]. Trends in Plant Science, 2008, 13(8): 451-457.
- [18] 邓向阳, 卫志明. 大豆转化技术[J]. 植物生理学通讯, 1998, 34(5): 381-387. (Deng X Y, Wei Z M. Technique of transformation of soybean[J]. Plant Physiology Communications, 1998, 34(5): 381-387.)
- [19] Meurer C A, Dinkins R D, Collins G B. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation[J]. Plant Cell Reports, 1998, 18: 180-186.