

张志灯, 罗土炎, 饶秋华, 等. 3'RACE 法扩增谷氨酰胺合成酶基因及其生物信息学分析 [J]. 福建农业学报, 2012, 27 (9): 919-923.
ZHANG Z-D, LUO Tu-Y, RAO Q-H, et al. Glutamine Synthetase Gene Amplification by 3'RACE and Bioinformatics Analysis [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 27 (9): 919-923.

3'RACE 法扩增谷氨酰胺合成酶基因及其生物信息学分析

张志灯^{1,2}, 罗土炎^{2,3}, 饶秋华³, 曹治云⁴, 郑 腾¹

(1. 福建出入境检验检疫局技术中心, 福建 福州 350001; 2. 福建农林大学动物科学学院, 福建 福州 350002;
3. 福建省农业科学院中心实验室, 福建 福州 350003; 4. 福建中医药大学中西医结合研究院, 福建 福州 350108)

摘 要: 以抽提得到的黑曲霉 mRNA 为模板, 根据 GenBank 上检索的谷氨酰胺合成酶基因 mRNA 序列, 设计特异性引物, 进行 3'RACE PCR 扩增, 并在 NCBI 网站进行生物信息学分析。结果扩增得到长约 1 kb 的 DNA 片段, 测序结果表明, 所获得的 DNA 序列与 gene bank 上检索到黑曲霉产谷氨酰胺合成酶基因的同源性大于 97%, 与其他曲霉产谷氨酰胺合成酶的基因同源性大于 50%。经开放阅读框软件分析发现其具有 2 个外显子, 其中 1 个外显子的氨基酸序列与黑曲霉产 GS 同源性为 100%。

关键词: 谷氨酰胺合成酶基因; 3'RACE; 生物信息学

中图分类号: Q 786

文献标识码: A

Glutamine Synthetase Gene Amplification by 3'RACE and Bioinformatics Analysis

ZHANG Zhi-deng^{1,2}, LUO Tu-yan^{2,3}, RAO Qiu-hua³, CAO Zhi-yun⁴, ZHENG Teng¹

(1. *Technology Center, Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou, Fujian 350001, China*;
2. *Animal Seicece Academy, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China*;
3. *Central Lab, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China*;
4. *Fujian Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350108, China*)

Abstract: On the basis of GS mRNA and specific primer, Using 3'RACE PCR amplified the gene sequence and analyzed some bioinformatics information of the sequence in NCBI web. GS DNA fragment was about 1.0 kb. The sequence blast showed that the homology of fragment with GS gene of *Asp. niger* in GenbBank was more than 97% and with other *Asp* were more than 50%. Open reading frame analyzed that it included 2 exon, one of which had 100% homology with GS of *Asp. niger*.

Key words: glutamine synthetase gene; 3'RACE; bioinformatics

谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase, EC 6.3.1.2, GS) 存在于各种高等动物、高等植物、真菌及细菌中, 是生物体中最古老也是最广泛存在的酶类, 它在生物中参与催化 L-谷氨酸 (L-Glu) 与氨生成 L-Gln 生物体碳和氮的代谢, 作为氨基酸合成时氮源的供体, 是生物体必不可少的重要酶类。在工业生产和科学研究中 GS 都发挥着重要作用, GS 作为药品和生化试剂生产中极其重要的谷氨酰胺的工业性催化剂, 是极有价值的物质, 利用 GS 作为植物固氮过程中的关键酶, 把其作为靶酶研制开发新型除草剂已取得了较大成效, 同时 GS

也是分子生物学中研究基因专一性表达和时空表达及基因表达调控的良好模式, 因此该酶及其基因已被广泛研究^[1-2]。

GS 的分子生物学研究始于 1983 年, 从蓝细菌 *Anabaena* (glnA) 克隆并完全测序分析了细菌 GS 的结构基因以来, 进行了多种来源 GS 的 cDNA 和基因组 DNA 的克隆, 从它们的核苷酸顺序推算出 GS 亚基的一级结构, 并用于研究组织、结构、演化和 GS 基因的表达。随着分子生物学技术的发展, 基因克隆技术逐渐成熟, 已有关于克隆构巢曲霉产 GS 基因全长及相关外显子报道, 其编码基因

收稿日期: 2012-06-29 初稿; 2012-07-10 修改稿

作者简介: 张志灯 (1978-), 男, 硕士, 中级兽医师, 主要从事动物疾病研究 (E-mail: zhidengzhang@163.com)

基金项目: 福建省科技计划项目 (2000Z030)

的全长约为 5.7 kb, 中间由 2 个 56 bp 的内含子插入阅读框, 翻译成由 1 905 个氨基酸组成的分子量大约为 229 kD 的肽链。

黑曲霉具有出色的蛋白质分泌能力, 是重要的工业发酵微生物, 在工业酶制剂、有机酸发酵方面应用广泛。可用于生产淀粉酶、酸性蛋白酶、纤维素酶、果胶酶、葡萄糖氧化酶等超过 30 种酶制剂的菌株。黑曲霉具有强大的聚合物降解酶系, 赋予其在各种廉价的培养基上快速生长和发酵的能力, 能够在极低的 pH 下保持旺盛的代谢活性因而不易染菌, 能够适应工业发酵中粗放的物料和理化环境, 这些品质使黑曲霉成为一种不可多得的工业生产宿主菌。目前有见关于选育黑曲霉高产谷氨酰胺合成酶菌株的报道, 而针对黑曲霉产 GS 基因的相关研究报道甚少^[3-5]。本文利用快速 cDNA 末端扩增法 (Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE), 克隆了黑曲霉产 GS 的部分基因, 为该酶基因全序列的测定奠定了基础, 对阐明该酶的分子生物学作用机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 菌株

黑曲霉 (*Asp. niger* SL2-111) 由福建师范大学微生物工程研究所保存。

1.2 主要试剂

PolyAtract system 1 000 mRNA 抽提试剂盒, taq DNA 聚合酶购自 promega 公司, SuperScript II RNase H Reverse Transcriptase 反转录酶购自 Invitrogen 公司, Bio 101 system gene clean II kit DNA 纯化试剂盒购自 Q-BIO gene, 其他试剂均购自上海生物工程公司, 大肠杆菌 DH-5 α 为福建省出入境检验检疫局技术中心保存。

1.3 引物设计

根据谷氨酰胺合成酶 gene bank 中已发表的基因序列和 Clontech 公司的 SMART RACE cDNA Amplification Kit 中的 5'端 RACE 的克隆方法设计了如下一套引物进行 RACE PCR, 所有引物均由上海博亚公司合成。

1.4 黑曲霉 (*Asp. niger* SL2-111) 的培养

将黑曲霉接种在改良马丁氏琼脂培养基上, 于 28℃ 培养 3 d。

1.5 黑曲霉 mRNA 的制备

根据 PolyAtract system 1 000 mRNA 抽提试剂盒的说明进行操作。

1.6 反转录和 RACE PCR 扩增

1.6.1 反转录 以抽提得到的 mRNA 为模板, 以 3'-RACE CDS 为引物进行反转录制备 3'端 RACE 的模板, 反转录为 20 μ L 的反应体系: 10 μ L RNA sample (1~500 ng), 1 μ L 3'-CDS primer, 1 μ L dNTP Mix (10 mmol \cdot L⁻¹), 4 μ L 5X First-Strand buffer, 2 μ L DTT (100 mmol \cdot L⁻¹), 1 μ L RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor (40 U \cdot μ L⁻¹), 1 μ L SuperScript II RNase H Reverse Transcriptase。

表 1 RACE 法扩增谷氨酰胺合成酶引物

Table 1 The primer of RACE PCR

项目	引物
SP	5'-AGC AAG GGT AGT GCC GTG AC-3'
SMART II	5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG-3'
3'-RACE CDS	5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTAC(T) ₃₀ N-1N-3'
5'-RACE CDS	5'-(T) ₂₅ N-1N-3'
UPM- Long	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT-3'
UPM- Short	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
NUP	5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT-3'

1.6.2 3'端 RACE PCR 扩增 以反转录获得的 cDNA 第一链为模板, 以特异性引物 SP 为上游引物, 以 UPM (UPM- Long, UPM- Short, NUP) 的混合物为下游引物进行 3'-RACE PCR 扩增。50 μ L 的 PCR 反应体系包括: 5 μ L 10 \times Advantage 2 PCR Buffer, 1 μ L dNTP Mix (10 mmol \cdot L⁻¹), 0.25 μ L 50 \times Advantage 2 Polymerase Mix, 1.5 μ L MgCl₂ (50 mmol \cdot L⁻¹), 33.5 μ L PCR-Grade Water, 2.5 μ L 5'-RACE-Ready cDNA, 5 μ L UPM (10 \times), 1.25 μ L SP (20 mol \cdot L⁻¹)。PCR 扩增条件参照 SMART RACE cDNA Amplification Kit 的说明进行: 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 3 min, 35 个循环。

1.7 序列测定

扩增所得到的单一条带, 经 DNA 纯化试剂盒纯化回收后, 送上海博亚公司测序部进行序列测定。

1.8 基因序列的生物信息学分析

在 NCBI 网站上, 进行基因序列的同源性比较 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)、开放阅读框分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 及氨基酸序列的同源性比较 (获得氨基酸序列后, 直接点击 blastp, 进行匹配度比较)。

2 结果与分析

2.1 RACE-PCR 扩增

以黑曲霉 cDNA 为模板，以特异性引物 SP 为上游引物，以 UPM（UPM- Long，UPM- Short，NUP）的混合物为下游引物进行 3'-RACE PCR 扩增，经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测得到 1 条大小约 1 000 bp 的单一一条带（图 1）。

2.2 序列测定结果

所得序列经全自动测序仪测序，结果见图 2。

2.3 序列同源性比较

利用生物信息学技术，在 NCBI 的基因数据库中进行同源性分析，本研究扩增的 GS 基因片段与

同属真菌产 GS 具有高度同源性，例如与黑曲霉产 GS 的同源性为 97%~98%，与土曲霉、烟曲霉、棒曲霉、米曲霉产 GS 同源性为 56%~76%。

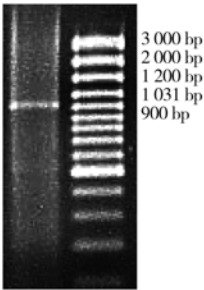


图 1 3'-RACE PCR 扩增单一一条带
Fig. 1 The single band of GS with 3'-RACE PCR

AGCAAGGGTAGTGCCGTGACATCGTCGAGGCTCACTACCGTGCCTGCTTGTACGCCGG
TATCAAGATCTCCGGTATCAACGCTGAGGTCATGCCTTCCCAGTGGGAGTACCAGGTCTG
GCCCTTGCGACGGCATTGAGATGGGTGACCACCTTTGGATGTCCCGTTTCCTCCTCCAC
CGTGTGCTGAAGAGTTCGGTGTCAAGATCTCTTCGACCCCAAGCCCATCAAGGGTG
ACTGGAACGGTGCCGGTCTCCACACCAACGTCTCCTCCGCTTCGATGCGTGCTGAGGG
CGGTATGAAGGTCATTGAGGCCGCCATGAAGAAGCTTGAGGCCGCCATGTTGAGCAC
ATTGCTGTCTATGGTGAGGGTAACGAGGAGCGTCTCACTGGCCGTCACGAGACCGGCA
ACATCGACAAGTTCAGCTATGGTGTTGCCGACCGTGGTGCTCCATCCGTATTCCCCGC
CAGGTCGCCAAGGACGGCAAGGGTTACTTCGAGGACCGTCGTCCCGCTAGTAACGCCT
GCCCCCTACCAGATACCCGTATTATTGTTGAGACTCTCATGGGTGGCAACTAAATGCGT
TACATACCGTTTGAAAATGTGAATACACTTCATATTAGCGCTCGTATACCCTCCGGCGTC
GACAGGGAGGTGGACAATAGCGCAGCCTGGCACTCTCGGGAGCAAACATAGAATTTC
TTTTTCATTCTTCAGCTGGTAGTTCGGGACTCTTCATTTACTCTCCGCCAGAGCTCGCCT
TGCGTTCCTTACCCTCTGCTGTTTTGCAITTCGTTTTCTTTCATTACTTGGGTTATGTGT
TACGTTAAGCATAGAGGACTTCGGAGGAACCGACAGTCACCTGAAAATAAACTGGTGG
AATGTGCCTAAGGCATACACCGGAAGGATCAGAGAATAGATTAATGGCCGACTTATCAC
AGTAACATAGTGTGTCAATACAATCATTGCCCAACGGGCTGGACATGAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

图 2 GS 的 PCR 片段测序结果
Fig. 2 The gene sequence of GS

表 2 Gene Bank 中 GS 登录基因的同源性比较
Table 2 Homology comparison of GS gene in Gene Bank

登录号	内容	最高分	总分	查询覆盖率 /%	E 值	最大相似度 /%
AY819644.1	Aspergillus niger glutamine synthetase (glnA) mRNA, partial cds	1855	1855	98	0.0	100
XM_001389265.2	Aspergillus niger CBS 513.88 glutamine synthetase, mRNA	1810	1810	97	0.0	99
XM_001389267.2	Aspergillus niger CBS 513.88 glutamine synthetase, mRNA	1810	1810	97	0.0	99
AM269977.1	Aspergillus niger 795 contig An01c0300, genomic contig	1813	1813	97	0.0	100
XM_001212373.1	Aspergillus terreus NIH2624 glutamine synthetase (ATEG_03195) partial mRNA	723	723	56	0.0	89
XM_746426.2	Aspergillus fumigatus Af293 glutamine synthetase (AFUA_4G13120), partial mRNA	710	710	56	0.0	89
XM_001272163.1	Aspergillus clavatus NRRL 1 glutamine synthetase (ACLA_052100), partial mRNA	695	695	56	0.0	88
XM_001816701.2	Aspergillus oryzae RIB40 glutamine synthetase, mRNA	689	689	76	0.0	83

表 3 GS 氨基酸序列的同源性比较
Table 3 Homology comparison of GS amino acid sequence

登录号	内 容	最高分	总分	查询覆盖率 /%
XP_001389304.2	glutamine synthetase [<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88]	342	342	100
AAV65596.1	glutamine synthetase [<i>Aspergillus niger</i>]	388	338	100
CAK37125.1	unnamed protein product [<i>Aspergillus niger</i>]	337	337	100
XP_001389302.2	glutamine synthetase [<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88]	337	337	100
XP_001212373.1	glutamine synthetase [<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624]	323	323	99
XP_001266733.1	glutamine synthetase [<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181]	313	313	100
XP_001816752.2	glutamine synthetase [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	313	313	100
CBF74586.1	TPA: glutamine synthetase (GS) (EC 6.3.1.2) (Glutamate-ammonia ligase)	311	311	99
XP_751519.2	glutamine synthetase [<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293]	310	310	100
XP_001816753.2	glutamine synthetase [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	310	310	100
EDP50664.1	glutamine synthetase [<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163]	309	309	100
BAE54751.1	unnamed protein product [<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	307	307	97
XP_002383319.1	glutamine synthetase [<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357]	306	306	97
XP_661763.1	hypothetical protein AN4159.2 [<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4]	306	306	100

90 atgccttcccagtgaggagtgaccaggtcgcccttgcgacggcatt
M P S Q W E Y Q V G P C D G I
135 gagatgggtgaccaccttggatgtcccggttctctctccacggt
E M G D H L W M S R F L L H R
180 gtcgctgaagagttcgggtgtcaagatctctttcgacccaagccc
V A E E F G V K I S F D P K P
225 atcaagggtgactggaacggtgccggtctccacaccaacgtctcc
I K G D W N G A G L H T N V S
270 tccgcttcgatgcgtgctgagggcggtatgaaggtcattgaggcc
S A S M R A E G G M K V I E A
315 gccatgaagaagcttgaggcccgccatgttgagcacattgctgtc
A M K K L E A R H V E H I A V
360 tatggtgagggttaacgaggagcgtctcactggccgtcacgagacc
Y G E G N E E R L T G R H E T
405 ggcaacatcgacaagttcagctatggtgttgccgaccgtggtggc
G N I D K F S Y G V A D R G G
450 tccatccgtattccccgccaggtcgccaaggacggcaagggttac
S I R I P R Q V A K D G K G Y
495 ttcgaggaccgctcgcccgctagtaacgcctgccccctaccagatc
F E D R R P A S N A C P Y Q I
540 accggtattattgttgagactctcatgggtggcaactaa 578
T G I I V E T L M G G N *
579 atgcgttacataccgctttgaaatgtgaatacacttcattatagc
M R Y I P F F E N V N T L H I S
624 gctcgatatccctccggtcgacaggaggtggacaatagcgca
A R I P S G V D R E V D N S A
669 gcctggcactctcgggagcaaacatag 695
A W H S R E Q T *

图 3 GS 开放阅读框分析结果
Fig. 3 The ORF analysis results of GS

2.4 开放阅读框分析基因序列对应的外显子

利用 NCBI 网站的开放阅读框分析软件，分析该段基因可能翻译的氨基酸序列。结果表明该段基因包括 2 段的外显子序列，分别对应的核苷酸为 315~577，579~695，其他均为内含子序列。

2.5 氨基酸序列同源性比较

翻译后的氨基酸序列利用生物信息学技术进行

同源性比对发现其与黑曲霉、费希新萨托菌、土曲霉、米曲霉、构巢曲霉等的 GS 氨基酸序列同源性高于 97%，具有极高同源性。

3 讨论与结论

微生物合成 L-谷氨酰胺 (L-Gln) 的途径是从葡萄糖开始，经糖酵解途径进入三羧酸循环，由该循环中间 α 酮戊二酸生成谷氨酸，最后转变为 L-谷氨酰胺。L-Gln 可维持机体免疫功能，调节蛋白质的合成和分解，是机体内氮和碳的重要运载工具，维持体内酸碱平衡，调节糖代谢，为快速生长和分化的细胞（如血管内皮细胞、淋巴细胞、肠黏膜上皮细胞等）提供能量来源。同时，L-Gln 在血液中有暂时解除氨毒的作用等。另外，还具有增进神经机能，改善脑出血后的记忆障碍，促进智力不佳儿童的智力发展，防止癫痫发作，增强肾排氮作用和延长淋巴细胞的寿命，促进细胞的生长等重要作用^[6-8]。

谷氨酰胺在工业上具有极其广泛的用途及经济价值，而 GS 是谷氨酰胺工业化生产中极其重要的催化剂，参与许多生物体的氮和碳代谢，是生物体内最为关键的酶类之一。此外，它也是体外微生物酶促转化合成茶氨酸的重要酶类之一，是非常有价值的物质。利用微生物发酵生产谷氨酰胺合成酶是条经济而又高效的途径，目前谷氨酰胺合成酶的产酶菌株主要是节杆菌属的一些细菌，而利用霉菌发酵生产谷氨酰胺合成酶的研究报道不多，针对霉菌

产谷氨酰胺合成酶基因的分子生物学分析研究报道很少。GS是催化谷氨酸生成L-谷氨酰胺的反应的关键酶,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,因此研究GS的基因序列从而进一步阐明其蛋白质的高级结构对探讨GS的结构及功能的关系意义重大,是进一步进行基因工程菌改造进而为获得稳定而低廉的GS生产奠定基础。

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、DNaseI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,随着生物信息学的发展,在已知数据的基础上利用数据库对这些区域进行分析和预测促进了GS研究的发展^[9-10]。本研究经过3'RACE方法获得长度大约为1 kb的基因片段,并测得基因序列。经基因的序列比对发现其与土曲霉、烟曲霉、棒曲霉、米曲霉产GS同源性的56%~76%。后经开放阅读框软件寻找此段基因序列中的外显子发现该序列包括2段外显子,对应的核苷酸分别为315~577,579~695,其余均为内含子序列。翻译后的氨基酸序列进行同源性比对发现其与黑曲霉、费希新萨托菌、土曲霉、米曲霉、构巢曲霉等的GS氨基酸序列同源性高于97%。通过生物信息学的比对,为进一步确定GS分子的一级核酸序列奠定了基础,并为阐明蛋白质的高级结构提供了线索。

在GS及其基因的研究中,生物信息学技术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。本研究结果表明黑曲霉(*Asp. niger* SL2-111)所

产GS与同种属产GS具有极高同源性,为进一步的构建GS的cDNA文库及进行酶学特性研究提供了可行性的基础。

参考文献:

- [1] 印莉萍,刘样林,林忠平. 植物谷氨酰胺合成酶基因以及基因表达[J]. 生物工程进展, 1995, 15(2): 36-41.
- [2] 王建国,赵卫光,范志金,等. 几种除草剂靶酶及其抑制剂的研究进展[J]. 植物保护学报, 2002, 29(3): 279-284.
- [3] 殷志敏,闫淑珍,戴谷,等. 耐热嗜酸古细菌谷氨酰胺合成酶基因克隆、诱导表达和活性测定[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(5): 745-749.
- [4] MARGELIS S, D'SOUZA C, SMALL A J, et al. Role of glutamine synthetase in nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans* [J]. J Bacterio, 2001, 183(20): 5826-5833.
- [5] KELLY R, REGISTER E, HSU M J, et al. Isolation of a gene involved in 1, 3-beta-glucan synthesis in *Aspergillus nidulans* and purification of the corresponding protein [J]. J Bacteriol, 1996, 178(15): 4381-4391.
- [6] 牟彬,周小秋,林燕. 谷氨酰胺对免疫细胞的影响研究进展[J]. 动物营养学报, 2007, 19: 487-491.
- [7] EAGLE H. Nutrition needs of mamma lian cells in tissue cultures [J]. Science, 1955, (122): 501-504.
- [8] VAN HR, KREEL B, MEYENFELDT M. Glutamine and the preservation of gut integrity [J]. Lancet, 1993, (341): 1363-1365.
- [9] HARTMANN F, PLAUTH L. Intestinal glutamine metabolism [J]. Metabolism, 1989, (515): 18-24.
- [10] RENNIE MJ, AHMED A, KHOGALI SE, et al. Glutamine metabolism and transport in skeletal muscle and heart and their clinical relevance [J]. J Nutr, 1996, (126): 1142-1149.

(责任编辑:林海清)