

文章编号:1001-1498(2016)04-0487-07

杨树 ASE 蛋白的生化功能研究

钱婷婷^{1,2}, 杨志灵³, 曾庆银^{1,2*}

(1. 中国科学院植物研究所,北京 100093; 2. 中国科学院大学,北京 100049; 3. 北京林业大学生物科学与技术学院,北京 100083)

摘要: [目的] 谷氨酰胺磷酸核糖焦磷酸转酰胺酶(ASE)在植物嘌呤合成中发挥着关键作用,本研究的目的是详细揭示杨树 ASE 蛋白的生化功能特性。[方法] 通过半定量 RT-PCR、蛋白质亚细胞定位以及测定纯化蛋白的催化活性等方法来研究其在体外的生化功能,进一步通过互补拟南芥缺失突变体(*atase2*)来研究杨树 ASE 基因的体内生物学功能。[结果] 从杨树基因组中鉴别出 2 个 ASE 基因,序列分析发现它们之间有很高的蛋白质序列相似性。半定量 RT-PCR 分析发现两个杨树 ASE 基因在根、茎、叶和芽中均表达。蛋白质亚细胞定位分析发现杨树 ASE 蛋白均定位在叶绿体中,而且两个杨树 ASE 蛋白均能完全互补拟南芥 *atase2* 突变体的表型。酶学性质分析表明,杨树两个 ASE 蛋白均能催化 5-磷酸核糖- α -焦磷酸生成 5-磷酸核糖- β -胺。[结论] 本研究预示着两个杨树 ASE 蛋白在嘌呤合成中均发挥着重要作用。

关键词: ASE 基因,基因表达,酶学功能,突变体

中图分类号:S792.11

文献标识码:A

Biochemical Characterization of *Populus* ASE Proteins

QIAN Ting-ting^{1,2}, YANG Zhi-ling³, ZENG Qing-yin^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. College of Biological Sciences and

Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: [Objective] The purpose of this study is to understand the biochemical functions of glutamine phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase (ASE). [Method] By sq-PCR, protein subcellular location and catalytic activity determination of purified protein, the *in vitro* biochemical functions of ASE proteins were studied, and furthermore, the deletion mutant of Arabidopsis by complementation (*atase2*) were used to study the *in vivo* biological functions of poplar ASE genes. [Result] Two ASE genes were identified from *Populus trichocarpa*. The protein sequence analysis revealed a high sequence similarity between the two ASEs. These ASE genes were expressed in root, stem, leaf and bud tissues. The results of protein subcellular localization analysis showed that *Populus* ASE proteins were localized in chloroplasts. The *Populus* ASE genes could completely complement the function of *Arabidopsis atase2* mutant. The recombinant *Populus* ASE proteins were expressed in *E. coli* and purified by Ni-affinity chromatography. *Populus* ASE proteins showed enzymatic activities to 5-phosphoribosyl- α -pyrophosphate. [Conclusion] It is suggested that the two *Populus* ASE proteins might play important roles in de novo biosynthesis of purine.

Keywords: ASE gene, gene expression, enzymatic function, mutant

收稿日期:2015-08-04

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 31425006)

作者简介:钱婷婷,硕士,主要研究方向:林木遗传学, E-mail: 15652826671@163.com

* 责任作者:曾庆银,博士,研究员, E-mail: qingyin@ibcas.ac.cn

生物体内核苷酸的合成有两条途径:即从头合成途径(*de novo synthesis pathway*)和补救合成途径(*salvage pathway*)。从头合成途径是利用磷酸核糖、氨基酸等简单物质为原料从头合成核苷酸,补救合成途径是利用体内游离碱基或核苷,经简单反应过程生成核苷酸的过程^[1]。从头合成是植物体内合成嘌呤核苷酸的主要途径,在植物的生长、发育和代谢中发挥重要作用^[2-3]。在嘌呤从头合成途径中,谷氨酰胺磷酸核糖焦磷酸转酰胺酶(*glutamine phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase*, ASE; EC 2.4.2.14)发挥着关键作用。ASE 负责催化嘌呤从头合成途径的第一步反应,将 5-磷酸核糖- α -焦磷酸(5-phosphoribosyl- α -pyrophosphate, PRPP) 转化为 5-磷酸核糖- β -胺(5-phosphoribosyl-(β) 1-amine, PRA)^[4]。在植物基因组中,ASE 基因是以小基因家族的形式存在,比如在拟南芥基因组中包含有 3 个 ASE 基因(*AtASE1*, *AtASE2* 和 *AtASE3*)。 *AtASE2* 基因主要在拟南芥根、叶和花中表达, *AtASE2* 基因在子叶和真叶中的表达量显著高于 *AtASE1* 和 *AtASE3*^[5-6]。利用 *T-DNA* 插入敲除 *AtASE2* 基因后,突变体植株表现出生长缓慢、植株矮小、子叶正常而真叶白化等表型,这说明 *AtASE2* 基因的缺失影响到植物的正常生长发育,特别是叶绿体的发育^[6]。然而当利用 *T-DNA* 插入敲除 *AtASE1* 基因后,其突变体和野生型植株在表型上没有明显差异^[6]。目前的研究结果说明了 ASE 基因家族内的成员间有显著的功能分化。在本研究中,我们以杨树为研究对象。杨树是我国重要的造林树种,也是林木研究的模式树种,我们从杨树中鉴定了两个 ASE 基因,并对其表达模式、蛋白质功能进行了详细研究,发现两个杨树 ASE 蛋白可能在嘌呤合成中均发挥着重要作用。

1 材料与方法

1.1 ASE 基因的序列搜索与鉴定

以拟南芥 *AtASE2* 蛋白序列为模板,在 Phytozome v9.1 (<http://www.phytozome.net>) 上利用 TBLASTN 搜索毛果杨 (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray) 基因组数据库,将获得序列在 National Center for Biotechnology Information database (NCBI) 上进行保守结构域分析。

1.2 系统发生关系分析

将杨树和其他植物 ASE 序列通过 Clustal X 1.83 进行氨基酸序列比对,然后经 BioEdit 手动校对。

利用 PHYML 的 JTT 模型构建进化树,Bootstrap 值为 100。

1.3 杨树 ASE 基因克隆

本研究所用毛果杨 (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray) 采自瑞典 Umea 大学校园。将采集得到的枝条带回国内在营养土中进行扦插培养三个月。用天根 DP441 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取毛果杨根、茎、叶和芽的总 RNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的总 RNA 质量,用 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 反转录试剂盒,将上述总 RNA 反转录为 cDNA。

根据从杨树基因组鉴定的 ASE 基因序列,用 primer 5.0 设计克隆引物(表 1)。用 TaKaRa 公司的 ExTaq 聚合酶扩增杨树 ASE 基因。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,在紫外灯下切割目的条带,使用鼎国 DNA 快速回收纯化试剂盒回收目的条带。将纯化后的 DNA 片段分别连接至克隆载体 *pEASY-T3* 上并转化大肠杆菌感受态细胞 Trans1-T1,并在含有 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氨苄霉素的固体 LB 培养基上培养。每个基因挑取 8 个白色菌斑,分别用博迈德公司的 $2 \times \text{Taq PCR MasterMix}$ 进行菌落 PCR 检测,将检测阳性的克隆进行双向测序。

1.4 杨树 ASE 基因的表达模式分析

为检测杨树 ASE 基因的表达模式,本研究用半定量 RT-PCR 的方法对正常生长条件下的杨树的根、茎、叶、芽等组织进行分析,PCR 反应分别设置 24、26、28 和 30 四个循环数对目的基因表达情况进行检测,用杨树 *Actin* 基因作为内参。检测基因表达模式引物见表 1。

1.5 杨树 ASE 蛋白的亚细胞定位分析

将杨树 ASE 基因连接到改造载体 pCAMBIA1302 中,使 ASE 蛋白的 C-末端加上 eGFP 标签,用于检测其亚细胞定位情况。构建 ASE 蛋白亚细胞定位的引物见表 1。将构建的重组质粒转化到 Trans1-T1 感受态中,测序正确后提取质粒,参照 Yoo 等人拟南芥原生质体转化的方法^[7]转化拟南芥原生质体,用激光共聚焦显微镜(Olympus FV1000MPE)观察亚细胞定位情况。

1.6 杨树 ASE 蛋白质的表达、纯化和生化功能分析

将杨树 ASE 基因克隆到 pET-30a 表达载体中,构建表达载体的引物见表 1。将测序正确的表达菌分别在 100 mL 含 $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 卡那霉素的 LB 培养

表1 本研究所用的引物序列

基因名称	引物名称	引物序列 (5' - 3')	用途
PtASE1	PtASE1-CL1	CGCACGCACCATTCTTTTT	克隆 ASE 基因
	PtASE1-CL2	TACCACCTGACCACATCACATAAT	
PtASE2	PtASE2-CL1	CACCCACCATTCTTTTTCTCC	
	PtASE2-CL2	TGAGCCAAAATCCATCAGTTC	
PtASE1	PtASE1-EP1	TATGCCCGCAAAGCTGGT	检测 ASE 基因的表达
	PtASE1-EP2	GCTCGGAGACTCATCACCTAAC	
PtASE2	PtASE2-EP1	TTGCGATGTAGTGATTGCGG	
	PtASE2-EP2	TGGGAGACTCCTCAGCCAAC	
PtActin	PtActin-1	GTGAGCAAAGCTGGATGACATG	
	PtActin-2	TCATGATGGAGTTGTATGTGGTCT	
PtASE1	PtASE1-SCL1	GTCGACATGGCAGACACCACTAGTTTCTC	构建 ASE 蛋白的亚细胞定位载体
	PtASE1-SCL2	CTGCAGATTCTGCAAAGAAGACAACCTCC	
PtASE2	PtASE2-SCL1	GTCGACATGGCAGCCACCGCCG	
	PtASE2-SCL2	CTGCAGTGTCAAAGAAGACAACCTCCCGG	
PtASE1	PtASE1-Ex1	GGAATTCGACGATGATGACGATAAGCCTC	构建 ASE 蛋白的原核表达载体
	PtASE1-Ex2	GGCGGCCGCATTTCTGCAAAGAAGACAACCTFCCC	
PtASE2	PtASE2-Ex1	GGAATTCGACGACGACGACGATAAGCCT	
	PtASE2-Ex2	GGCGGCCGCTGTCAAAGAAGACAACCTCCCGG	
PtASE1	PtASE1-OE1	GTCGACATGGCAGACACCACTAGTTTCTC	构建互补 atase2 突变体的载体
	PtASE1-OE2	CTGCAGTCAATTCTGCAAAGAAGACAACCT	
PtASE2	PtASE2-OE1	GTCGACATGGCAGCCACCGCCG	
	PtASE2-OE2	CTGCAGTCATGTCAAAGAAGACAACCTCCCGG	

基培养至 OD_{600} 值为 0.5 左右,加入 IPTG 至终浓度 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 诱导 ASE 蛋白表达。在 20°C 、200 rpm 的条件下培养 36 h,取 1 mL 留样检测,收集菌体 (10 000 rpm, 3 min, 4°C),用 binding buffer ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_3\text{PO}_4$ 、 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$ 和 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑, pH 7.4) 重悬菌体,并在冰上用超声波细胞破碎仪破碎菌体,离心 ($10\,000 \text{ rpm}$, 10 min , 4°C),取 $50 \mu\text{L}$ 上清样品,用 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的尿素溶解沉淀取样 $50 \mu\text{L}$,用 SDS-PAGE 凝胶电泳检测其表达情况。将剩余的上清用 binding buffer 预平衡的镍离子亲和层析柱 (GE Healthcare Bio-Sciences) 进行纯化。用 Elution buffer ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_3\text{PO}_4$ 、 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$ 和 $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑, pH 7.4) 洗脱目的蛋白。

1.7 杨树 ASE 蛋白质的酶活性测定

参考 Walsh 等人的 ASE 蛋白的酶活性测定方法^[8],取 5 个灭过菌的 1.5 mL 的 EP 管,其中两个为对照,剩余的三个为重复反应。向所有 EP 管中分别加入 $150 \mu\text{L}$ 蛋白质,反应组加入 $150 \mu\text{L}$ 底物 A ($40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Gln}$, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{PRPP}$),对照组加入 $150 \mu\text{L}$ 底物 B ($40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Gln}$),之后向反应组和对照组均加入底物 C ($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgCl}_2$, 10

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{DTT}$),室温反应 30 min,在 100°C 条件下 2.5 min 终止反应, $12\,000 \text{ rpm}$ 离心 1 min,分别取上清 $200 \mu\text{L}$ 到新的 EP 管中,向其中加入 $600 \mu\text{L}$ 反应液 A ($125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_3\text{PO}_4$, pH 8.0,其中 Na_3PO_4 用 $1.36 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 3-adenylpyridine dinucleotide 和 $33 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Glu dehydrogenase 溶解)。加入反应液 A 后用紫外分光光度计在 A_{363} 波长下读取 10 ~ 90 min 的读数,时间间隔为 10 min。

1.8 杨树 ASE 蛋白互补拟南芥 atase2 突变体研究

在 TAIR 网站上购买 atase2 突变体种子 (种子号: SALK_028034),在正常生长条件下种植,培养一个月左右后提取植株总 DNA 进行插入缺失的鉴定。将杨树 ASE 基因连接到 pCAMBIA1302 表达载体,并转化 Trans1-T1 感受态,检测得到阳性克隆并测序。用电转化的方法将含有目的基因的质粒转化到农杆菌 EHA105 感受态中,菌落 PCR 检测并测序,用测序正确的农杆菌用蘸花法^[9]转化拟南芥 atase2 杂合突变体,正常条件下培养。

将收获的转基因拟南芥种子消毒后种到终浓度为 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的潮霉素和 $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的头孢霉素的 1/2 MS 培养基上, 4°C 春化处理四天,然后在 25°C 的条件下避光生长三天,看到有明显茎增长的

植株后转至正常长日照(16 h 白昼/8 h 黑夜)条件下培养两天,子叶变绿后移苗至营养土中正常生长。两周后提取植株 DNA,用 *atase2* 突变体鉴定引物检测转基因植株的杂合性,用转基因检测引物检测转基因情况。移苗后 1 周及 2 周分别照相记录生长情况。

2 结果与分析

2.1 杨树 ASE 基因的克隆、序列特性及系统发育分析

在杨树基因组中鉴定出 2 个 ASE 基因,分别命名为 *PtASE1* 和 *PtASE2*。保守结构域分析发现这两个基因所编码的蛋白均具有完整的谷氨酰胺转酰胺酶结构域和磷酸核糖转移酶结构域,确定该序列编码的蛋白具有 ASE 结构域特征。然后我们从杨树中克隆获得 2 个 ASE 基因(*PtASE1* 和 *PtASE2*)。杨树的两个基因 *PtASE1* 和 *PtASE2* 长度分别为

1 761 bp 和 1 758 bp,分别编码 586 和 585 个氨基酸,预测分子量分别为 63.98 kDa 和 63.80 kDa。*PtASE1* 和 *PtASE2* 蛋白序列的相似性很高(图 1),达到了 90.6%。

我们从代表不同进化历史的苔藓植物小立碗藓(*Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp),江南卷柏(*Selaginella moellendorffii* Hieron.)和单子叶植物水稻(*Oryza sativa* L. ssp. japonica)中鉴定出 ASE 基因,然后与杨树进行序列分析,发现植物 ASE 蛋白序列的相似性在 47.0% 和 90.6% 之间(表 2)。系统进化分析发现两个杨树 ASE 基因聚成一支(图 2, A1),两个拟南芥 ASE 基因(*AtASE1* 和 *AtASE2*)聚成另一支(图 2, A2)。这说明杨树和拟南芥分化后,各自产生了一次基因重复事件,导致杨树和拟南芥都增加了一个基因。但根据进化树,有可能在杨树中丢失了一个 *AtASE3* 的直系同源基因。



图 1 杨树 ASE 蛋白的氨基酸序列比对

2.2 杨树 ASE 基因表达模式分析

为了检测杨树 ASE 基因的表达模式,本研究用半定量 PCR 的方法研究了杨树根、茎、叶和芽等组

织部位的表达情况(图 3)。杨树中 *PtASE1* 和 *PtASE2* 基因在根、茎、叶和芽等部位均表达,但是 *PtASE1* 在根、茎和芽部位的表达量高于 *PtASE2*。

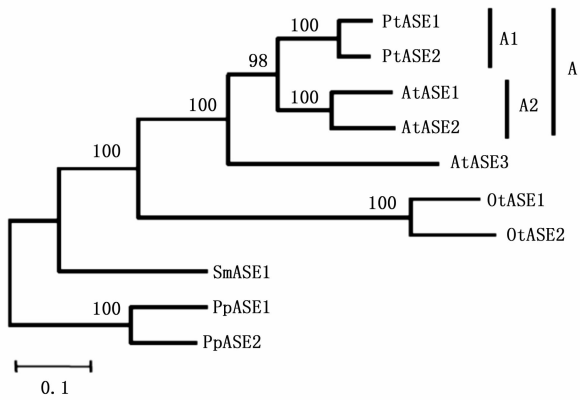


图2 植物 ASE 家族的系统进化树

2.3 杨树 ASE 蛋白的亚细胞定位分析

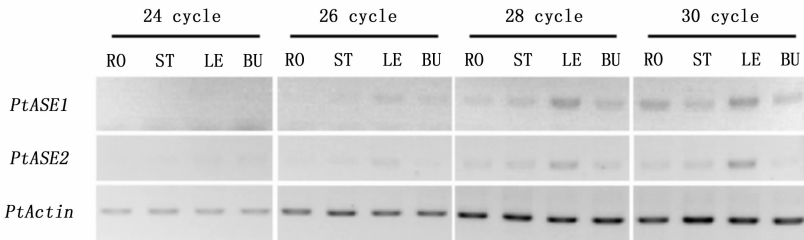
为研究杨树 ASE 蛋白的亚细胞定位情况,本研究在 ASE 蛋白的 C 末端加上 eGFP 标签,利用共聚焦显微镜观察融合蛋白在拟南芥原生质体中的表达情况。杨树的 ASE-eGFPs 融合蛋白在 488 nm 激发光下的绿色荧光与叶绿体在 543 nm 下的红色自发荧光重合呈黄色(图 4),说明杨树 ASE 蛋白都定位于叶绿体。

2.4 杨树 ASE 蛋白质生化功能分析

ASE 蛋白具有催化 PRPP 转化为 PRA 的活性。为研究杨树 ASE 基因所编码的蛋白是否有催化 PRPP 的功能,本研究将去除信号肽的杨树 ASE 基

表2 植物 ASE 家族蛋白质序列相似性比量

	PtASE1	PtASE2	AtASE1	AtASE2	AtASE3	OsASE1	OsASE2	SmASE1	PpASE1	PpASE2
PtASE1	1.000									
PtASE2	0.906	1.000								
AtASE1	0.759	0.764	1.000							
AtASE2	0.754	0.758	0.849	1.000						
AtASE3	0.611	0.623	0.628	0.628	1.000					
OsASE1	0.532	0.525	0.539	0.533	0.517	1.000				
OsASE2	0.539	0.531	0.548	0.540	0.513	0.805	1.000			
SmASE1	0.620	0.621	0.621	0.628	0.551	0.536	0.539	1.000		
PpASE1	0.554	0.558	0.567	0.562	0.527	0.490	0.490	0.604	1.000	
PpASE2	0.574	0.580	0.568	0.562	0.500	0.470	0.472	0.584	0.778	1.000



注:图中 RO、ST、LE、BU 分别代表根、茎、叶和芽组织

图3 杨树 ASE 基因的表达模式

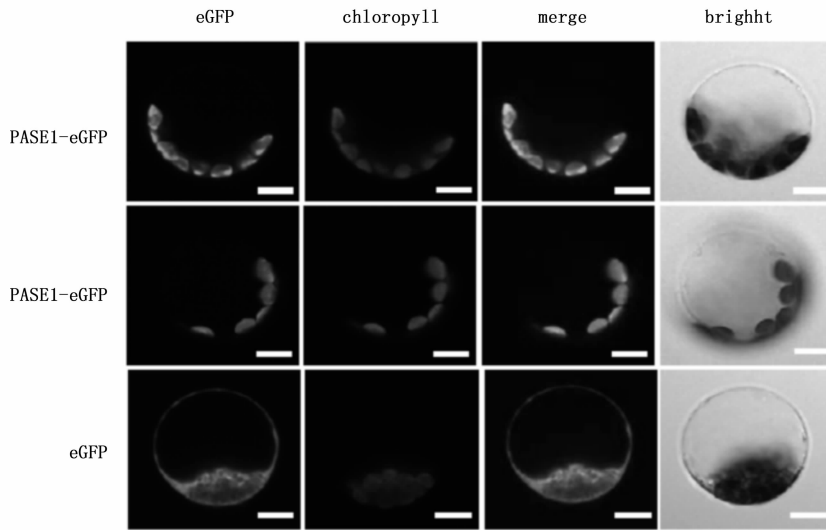
因连接到蛋白表达载体 pET30a 上,将构建好的重组质粒转化至蛋白表达菌株 BL21 (DE3) 中,用 IPTG 诱导蛋白表达。发现两个基因都能在大肠杆菌中可溶性表达。

用 Ni 离子亲和层析纯化获得纯化的目的蛋白,并通过 PD10 柱脱盐,用紫外分光光度计在 363 nm 的波长下检测 ASE 催化 PRPP 产生谷氨酰胺的生成量。杨树两个 ASE 蛋白都具有酶学活性(图 5)。在 90 分钟终止反应时, PtASE1 蛋白的催化活性是 PtASE2 的 66.17%。

2.5 杨树 ASE 蛋白互补拟南芥 *atase2* 突变体分析

先前的研究发现拟南芥 *AtASE2* 基因被敲除后,

突变体植株表现出生长缓慢、植株矮小、子叶正常而真叶白化等表型^[6]。在本研究中,我们首先筛选得到 *atase2* 突变体植株的纯合体,野生型(WT)表现为正常生长的状态, *atase2* 突变体表现为子叶正常而真叶白化的表型(图 6),而且纯合突变体植株比野生型植株生长速度慢。此结果与 2004 年 Hung 等人报道的 *atase2* 突变体表型一致^[6]。因 *atase2* 纯合突变体生长很弱,难以进行转基因,因此我们用农杆菌蘸花法将 *PtASE1* 和 *PtASE2* 转入 *atase2* 杂合突变体植株中。然后筛选纯合背景且转基因成功的 *atase2* 突变体植株,观察其表型。我们分别获得了 10 和 3 株 *PtASE1* 和 *PtASE2* 基因的转基因阳性植株。在 10



白色标尺长度为 10 μm

图4 杨树 ASE 蛋白的亚细胞定位

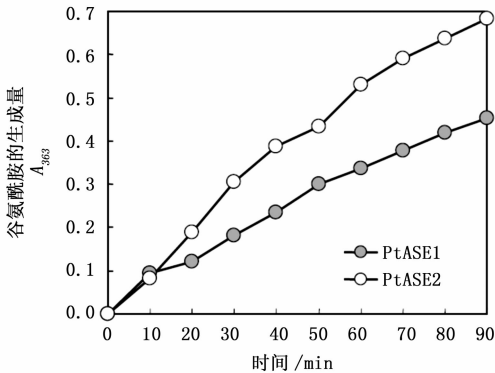
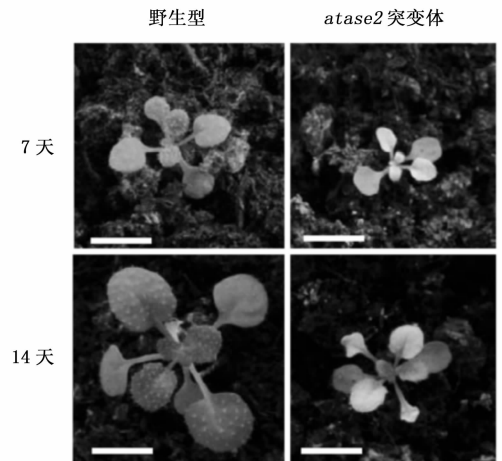


图5 杨树 ASE 蛋白的酶学活性

株 *PtASE1* 的转基因植株中,有七株表现为子叶生长正常且真叶也生长正常,3 株 *PtASE2* 的转基因植株均表现为子叶生长正常且真叶也生长正常,说明 *PtASE1* 和 *PtASE2* 蛋白都能互补 *atase2* 突变体(图7)。

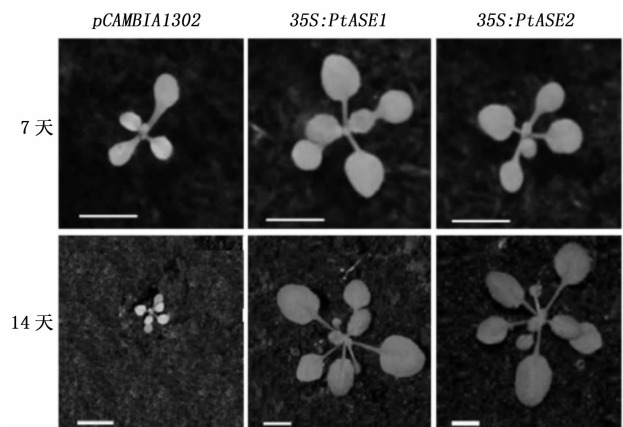
3 讨论

基因家族成员间经常存在功能分化,功能分化的原因可能来自于调控区,也有可能来自于蛋白编码区。对具体的基因家族,则需要通过对基因表达模式和蛋白功能的分析研究其基因家族成员间功能分化的原因。拟南芥 ASE 家族有 3 个成员,以前的研究发现拟南芥 3 个 ASE 基因的表达模式有显著分化,*AtASE2* 基因主要在拟南芥根、叶和花中表达,*AtASE2* 基因在子叶和真叶中的表达量显著高于 *AtASE1* 和 *AtASE3*^[5-6]。而且分别敲除拟南芥



白色标尺长度为 50 mm。

图6 拟南芥 *atase2* 纯合突变体的表型



白色标尺长度为 50 mm。

图7 杨树 ASE 蛋白能够回补拟南芥 *atase2* 突变体的表型

AtASE1 和 *AtASE2* 基因后,仅敲除 *AtASE2* 基因的突变体植株表现出生长缓慢、植株矮小、子叶正常而真叶白化等表型,这说明 *AtASE2* 基因对在嘌呤合成中起主要作用,而 *AtASE1* 基因并不起主要作用,这种功能的分化主要是由基因表达的差异引起的。对杨树 DOF 基因、LEA 和 GST 基因的研究也显示表达模式的分化对重复基因的功能分化有重要的作用^[10-12]。

在本研究中,我们发现 2 个杨树 ASE 基因 (*PtASE1* 和 *PtASE2*) 所编码的蛋白都定位到叶绿体,且都具有催化 5-磷酸核糖- α -焦磷酸转化为 5-磷酸核糖- β -胺的催化活性,同时 *PtASE1* 和 *PtASE2* 两个蛋白都能互补拟南芥 *atase2* 突变体的表型,这说明 *PtASE1* 和 *PtASE2* 的编码区是有功能的。表达模式分析发现 *PtASE1* 和 *PtASE2* 基因在相同的组织部位表达,*PtASE1* 在根、茎和芽部位的表达量高于 *PtASE2*,由于 *PtASE1* 和 *PtASE2* 两个基因的表达模式分化较小,可能目前这两个基因存在功能的部分冗余。

4 结论

本研究详细地揭示了杨树 ASE 蛋白的生化功能特性,研究结果预示着两个杨树 ASE 蛋白在嘌呤合成中均发挥着重要作用,研究结果也表明对于同一个基因家族,在不同物种中基因功能的分化模式可能存在差异。

参考文献:

- [1] Zrenner R, Stitt M, Sonnewald U, *et al.* Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57:805-836.
- [2] Senecoff J F, McKinney E C, Meagher R B. De novo purine synthe-

sis in *Arabidopsis thaliana*. II. The PUR7 gene encoding 50-phosphoribosyl-4-(N-succinocarboxamide)-5-aminoimidazole synthetase is expressed in rapidly dividing tissues [J]. *Plant Physiol*, 1996, 112:905-917.

- [3] Boldt R, Zrenner R. Purine and pyrimidine biosynthesis in higher plants [J]. *Physiol Plant*, 2003, 117:297-304.
- [4] Smith P M, Atkins C A. Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation [J]. *Plant Physiol*, 2002, 128:793-802.
- [5] Ito T, Shiraiishi H, Okada K, *et al.* Two amidophosphoribosyltransferase genes of *Arabidopsis thaliana* expressed in different organs, *Plant Mol Biol*, 1994, 26:529-533.
- [6] Hung W F, Chen L J, Boldt R, *et al.* Characterization of *Arabidopsis* glutamine phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase-deficient mutants [J]. *Plant Physiol*, 2004, 135:1314-1323.
- [7] Yoo S D, Cho Y H, Sheen J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts; a versatile cell system for transient gene expression analysis [J]. 2007, *Nat Protoc*, 2:1565-1572.
- [8] Walsh T A, Bauer T, Neal R, *et al.* Chemical genetic identification of glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase as the target for a novel bleaching herbicide in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2007, 144:1292-1304.
- [9] Clough S J, Bent A F. Floral dip; a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant J*, 1998, 16:735-743.
- [10] Yang X, Tuskan G A, Cheng M Z. Divergence of the Dof gene families in poplar, *Arabidopsis*, and rice suggests multiple modes of gene evolution after duplication [J]. *Plant Physiol*, 2006, 142:820-830.
- [11] Lan T, Yang Z L, Yang X, *et al.* Extensive functional diversification of the *Populus* glutathione S-transferase supergene family [J]. 2009, *Plant Cell*, 21:3749-3766.
- [12] Lan T, Gao J, Zeng Q Y. Genome-wide analysis of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family *Populus trichocarpa* [J]. *Tree Genet Genomes*, 2013. 9:253-264.

(责任编辑:张 研)