

盐胁迫下朝鲜碱茅的甜菜碱醛脱氢酶活性变化及其基因保守区的克隆

杨铮¹, 钟鸣^{1,*}, 郭志富¹, 李丽¹, 陈罡²

¹沈阳农业大学, 辽宁省农业生物技术重点实验室, 沈阳 110161; ²辽宁省林业科学研究院生物中心, 沈阳 110032

摘要: 文章探讨了朝鲜碱茅甜菜碱醛脱氢酶活性在盐胁迫下的变化, 用简并引物扩增了甜菜碱醛脱氢酶基因保守区序列的结果表明, 该保守区段长 438 bp, 推测编码 145 个氨基酸, 包括醛脱氢酶高度保守序列 V[T/S]LELGGKSP 和其后 29 位与酶功能有关的 Cys。此序列 Genbank 登录号为 EF095710。

关键词: 朝鲜碱茅; 盐胁迫; 甜菜碱醛脱氢酶(BADH); 简并引物; 保守区; 同源性

Change in Betaine Aldehyde Dehydrogenase Activity of *Puccinellia chinampoensis* Ohwi and Cloning of Its Conserved cDNA Region under Salt Stress

YANG Zheng¹, ZHONG Ming^{1,*}, GUO Zhi-Fu¹, LI Li¹, CHEN Gang²

¹Key Laboratory of Agriculture Biotechnology of Liaoning Province, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China;

²Forest Biotechnology Center, Liaoning Academy of Forestry Sciences, Shenyang 110032, China

Abstract: Change in betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) activity of *Puccinellia chinampoensis* under salt stress was explored and the conserved sequence of *BADH* was amplified using degenerate primers. The results demonstrated that the conserved sequence was 438 bp in length, which was deduced coding 145 amino acids. The deduced products contained the conserved motif of aldehyde dehydrogenase which was V[T/S]LELGGKSP and the Cys associated with aldehyde dehydrogenase function. The gene accession nucleotide sequence number in GenBank was EF095710.

Key words: *Puccinellia chinampoensis*; salt stress; betaine aldehyde dehydrogenase; degenerate primers; conserved cDNA region; homology

朝鲜碱茅为禾本科牧草, 广泛分布于我国东北、华北和西北地区的草原、辽河平原及碱湖周围, 具有较强的耐盐碱、耐旱和耐寒性, 是我国三北地区改良盐渍土地的优良先锋植物(徐恒刚 2003)。与其它盐生植物一样, 朝鲜碱茅在体内大量积累甜菜碱进行渗透调节是其适应不良环境的一个有效机制(梁峥等 1991)。甜菜碱醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase, BADH)是高等植物体内合成甜菜碱的关键酶(Sakamoto 和 Murata 2000), 大多数耐盐植物体内的 BADH 活性均随着盐浓度的升高而增加(McCue 和 Hanson 1992; 陈鹏和潘晓玲 2001; Arakawa 等 1990)。自 Weretilnyk 和 Hanson (1990)克隆菠菜全长 *BADH* 基因至今, 人们已相继在甜菜、辽宁碱蓬、大麦、玉米等多种藜科和禾本科植物中分离鉴定了这一基因(McCue 和 Hanson 1992; 白杰英等 2003; Yu 等 2004; 何晓兰等 2004; Nakamura 等 2001; 李秋莉等 2006; Li 等 2003; Li 和 Zou 2002; Oishi

和 Ebina 2005)。本文在研究朝鲜碱茅 BADH 活性与盐浓度相关趋势的基础上克隆 *BADH* 基因保守区 cDNA, 并对其作了分析。

材料与方法

朝鲜碱茅(*Puccinellia chinampoensis* Ohwi)草种由内蒙古民族大学农学院提供, 种子消毒后播于已灭菌的沙床中, 以 1/2 Hoagland 营养液浇灌培养。幼苗长至五叶一心时, 改用 1/2 Hoagland 营养液水培, 缓苗 1 周后进行 NaCl 胁迫处理。以无 NaCl 胁迫的样品为对照, 共 9 个处理, NaCl 胁迫浓度分别为 50、100、150、200、250、300、350、400 mmol·L⁻¹。为了避免刺激, NaCl

收稿 2006-12-29 修定 2007-05-08

资助 辽宁省重点实验室专项资金和辽宁省博士启动基金(辽宁省科委 2001102061)。

* 通讯作者(E-mail: zhming@syau.edu.cn; Tel: 024-88487164)。

浓度每隔 3 d 递增 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 直至终浓度。终浓度处理 3 d 后分别取样置于超低温冰箱中保存待测。

BADH的提取与活性测定参考刘凤华等(1997)文中和《现代植物生理学实验指南》(中国科学院上海植物生理研究所和上海市植物生理学会编 1999)的方法, 略有改动。于 28 °C 条件下用日立 U-3010 型分光光度计测定 340 nm 处 30 min 内吸光值变化。按公式酶比活性 $[\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}(\text{蛋白})\cdot\text{min}^{-1}] = \Delta\text{OD} \times 10^{-3} / (e_{\text{max}} \times C) \times 109$ 计算酶活性。式中, ΔOD 为每分钟增加的平均吸光值; e 为 NADH 摩尔消光系数(6200); C 为加入酶量。

根据 BADH 活性测定的结果, 确定酶活性最高时的对应 NaCl 浓度, 提取此种胁迫浓度下的样品总 RNA。采用 TIANGEN 生物工程公司生产的 RNAlant 试剂提取总 RNA, 以 1.2% 琼脂糖电泳检测总 RNA 的完整性, 紫外分光光度计法确定 RNA 的纯度。cDNA 第一链的合成采用赛百盛生物工程公司的 RT-easy go 试剂盒。引物设计参照才华等(2006)文中的方法, 利用 DNAMAN 生物软件对已报道的 BADH 氨基酸序列进行比较分析, 参照禾本科植物中(白杰英等 2003; Yu 等 2004; Nakamura 等 2001; Oishi 和 Ebina 2005; 其他信息来自 GenBank 数据库)该酶靠近 3' 端两段同源性高的区域(VKPVLSLE、EEVFGPV)及对应的核苷酸序列, 用引物设计软件 Primer 5.0 设计上、下游简并引物, BF: 5' GGTAAAGCCTGTTTCATTAGAGC 3'; BR: 5' ACTGG(T/A/C)CCAAAGACTTCCTC 3'。引物由赛百盛生物工程公司合成。

以反转录得到的第一链 cDNA 为模板, BF、BR 为上下游引物进行 PCR 扩增。扩增条件: 先 94 °C 预变性 5 min; 然后进入循环反应即 94 °C 50 s, 60 °C 1 min, 72 °C 2 min, 循环 38 次; 最后 72 °C

延伸 8 min。产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver 2.0 回收纯化目的片段。回收产物与大连宝生物生物工程公司 pMD18-T 载体连接成重组子, 转化 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞, 通过 PCR 和酶切鉴定阳性克隆, 测序由上海生工生物工程公司完成。

利用 DNAMAN 软件对测序结果进行氨基酸序

列翻译, 并将测序结果与预测的蛋白序列分别通过 NCBI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 程序和 DNAMAN 软件进行同源性比对分析, 确定克隆的序列为 BADH 基因的保守区序列。将得到的朝鲜碱茅 BADH 保守区 cDNA 序列递交 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

采用半定量 RT-PCR 对不同 NaCl 浓度下朝鲜碱茅 BADH 基因的表达进行分析。在 0~400 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 浓度处理 3 d 后取样提取总 RNA, 反转录成 cDNA 作为模板保存待测。根据获得的 BADH 基因保守区设计特异引物, P1: 5' GGTAAAGCC-TGTTTCATTAGAGC 3'; P2: 5' ACTGGACC-AAAGACTTCCTC 3'。反应体系及程序同前, 扩增循环次数减至 30 次。根据 18S rRNA 设计引物作为内参, 片段为 220 bp。P3: 5' GAA-GTTTGAGGCAATAACAGGT 3'; P4: 5' AAA-GGGCAGGGACGTAGTC 3'。反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 50 s, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 循环 30 次; 72 °C 延伸 8 min。

实验结果

1 朝鲜碱茅 BADH 活性的变化

如图 1 所示, 朝鲜碱茅 BADH 活性在无 NaCl 处理中为 $0.24 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}(\text{蛋白})\cdot\text{min}^{-1}$, 以后随着 NaCl 浓度的增大逐渐上升; 当 NaCl 浓度达到 300 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 酶活性达到最大值, 是无 NaCl 处理酶活性的 3 倍; 当 NaCl 浓度超过 300 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 酶活性开始下降。

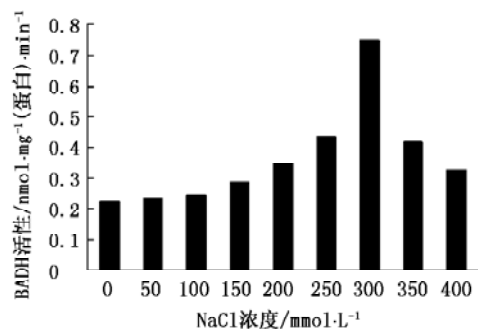


图 1 NaCl 胁迫下朝鲜碱茅 BADH 活性的变化
Fig.1 Change in BADH activity of *P. chinampoensis* under NaCl stress

2 朝鲜碱茅总RNA的质量检测

以1.2% 琼脂糖检测RNA的完整性, RNA基本未降解, 比较完整。用日立U-3010型分光光度计检测RNA的吸光值, $A_{260}/A_{280}=1.89$, 符合纯RNA溶液 A_{260}/A_{280} 介于1.7~2.0之间的要求, 表明采用此法得到的总RNA纯度较高。从纯度和完整性两方面分析, 此RNA符合试验要求。

3 朝鲜碱茅BADH基因保守区的克隆与序列分析

以cDNA为模板, BP1、BP2为引物进行PCR扩增, 获得1条大于400 bp的特异条带, 在1200和800 bp处分别有2条不明显的非特异条带(图2)可能是由于简并引物的非特异性造成。克隆PCR产物并对克隆后的片段测序的结果表明, 此片段长438 bp, 编码145个氨基酸(图3)。推测的蛋白序列包含有十肽醛脱氢酶高度保守序列V[S/T]LELGKSP和其后29位与酶功能有关的Cys, 前人的研究认为, 这些保守区包含酶的催化位点和NAD⁺结合位点(Weretilnyk和Hanson 1990; McCue和Hanson 1992; Ishitani等1995; González-Segura等2002, 2005)。

4 朝鲜碱茅BADH氨基酸序列的同源性分析

搜索GenBank数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 用DNAMAN生物软件将朝鲜碱茅BADH推演的氨基酸保守区序列与其它物种的BADH氨基酸序列进行同源性比对的结果表明, 该序列与短芒大麦(*Hordeum brevisubulatum*)、羊草(*Leymus*

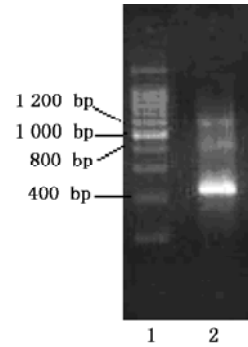


图2 朝鲜碱茅的BADH基因保守序列电泳

Fig.2 Agarose electrophoresis of amplification of the BADH conserved sequence from *P. chinampoensis*

1: 200 bp DNA标准分子量; 2: 朝鲜碱茅BADH基因保守序列扩增产物。

chinensis)、细叶结缕草(*Zoysia tenuifolia*)、菠菜(*Spinacia oleracea*)、甜菜(*Beta vulgaris*)的同源性分别为90.34%、89.66%、83.45%、75%和73.61%。结合序列分析和同源性比较结果可以初步认定该序列为朝鲜碱茅BADH cDNA的保守区序列。该保守区核苷酸序列已在NCBI登录, 登录号为EF095710。在同源性比较中(图4), 发现朝鲜碱茅BADH氨基酸序列中醛脱氢酶高度保守序列V[S/T]LELGKSP第2位是S与大多数禾本科植物一致, 而在藜科和苋科中我们发现, 该位点以T的形式存在居多(Li和Zou 2002; 白杰英等2003; Nakamura等2001; Oishi和Ebina 2005; Ye等

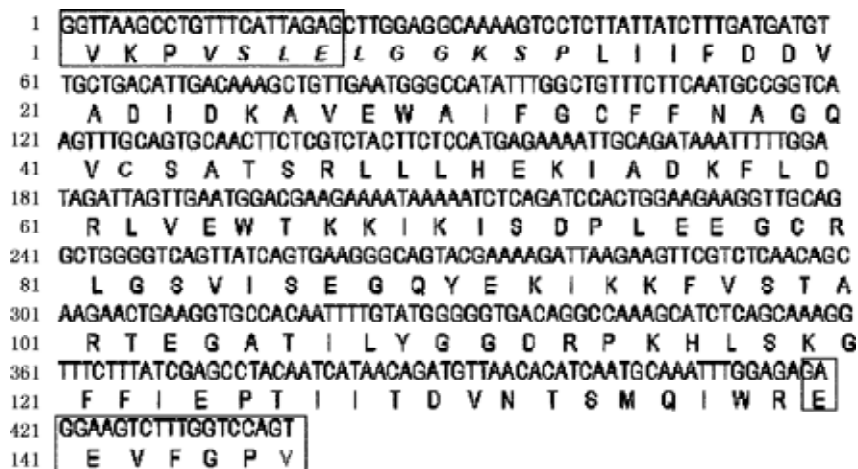


图3 朝鲜碱茅BADH基因保守区的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig.3 Conserved nucleotides and deduced amino acid sequences of BADH from *P. chinampoensis*
 第一行斜体部分表示醛脱氢酶高度保守序列及与酶功能有关的cys位点; 方框部分表示引物设计位点。

| 登录号 | 物种名 | 氨基酸序列 |
|----------|-------|--|
| | 朝鲜碱茅 | VKPV[S]LELGGKSPLIIFDDVADIDKAVEWAIFGCFFNAGQVCSATSRLLL |
| AA66641 | 短芒在麦 | -----v-----m-----g-r----- |
| DAD86757 | 羊草 | -----v-----m-----g----- |
| DAD34957 | 细叶结缕草 | -----v---idn--n-----m--i-a-g-----i-v |
| AAL05264 | 小麦 | ---t-----ivv---v-----tl---wtm--i-----i |
| AAV67891 | 高山离子芥 | ---m-----v---v-l---a---l---wtm--i-----v |
| AAV33872 | 甘菊 | ---t-----ivv---v-----tl---wtm--i-----i |
| AAB41696 | 菠菜 | ---t-----ivv-e-v---v---t---wtm--i-----v |
| BAB07176 | 甜菜 | ---t-----i-v-e-v-v-qv---tm---wtm--i-----v |
| AAL33906 | 辽宁碱蓬 | ---t-----i-v-e-v-l-v-a-t---v-wtm--i-----v |

图4 朝鲜碱茅 *BADH* 保守区氨基酸序列与其它物种该基因氨基酸同源性的比较

Fig.4 Comparison of partical amino acids between *P. chinampoensis* and other species

第1条序列为实验获得的朝鲜碱茅 *BADH* 部分氨基酸序列；方框为高保守区内的差异位点。

2005；Yu 等 2004)。

5 朝鲜碱茅 *BADH* 基因的表达分析

半定量 RT-PCR 结果显示：在 0~400 mmol·L⁻¹ NaCl 胁迫下，朝鲜碱茅体内 *BADH* 基因均有表达。当 NaCl 浓度达到 250~350 mmol·L⁻¹ 时，基因受 NaCl 胁迫的诱导最明显(图 5)，与酶活性测定结果一致。

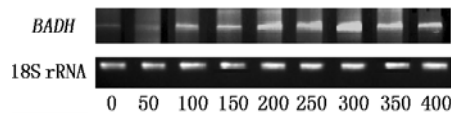


图5 朝鲜碱茅 *BADH* 基因的表达分析

Fig.5 Analysis of *BADH* expression from *P. chinampoensis*

讨 论

甜菜碱是植物体内的渗透调节物质之一，也是检测植物抗盐能力的指标之一，有人认为盐胁迫下甜菜碱在植物体内大量积累并行使渗透调节及分子伴侣的功能(Nomura 等 1998；杨铮等 2006)。BADH 是甜菜碱合成途径的关键酶，Arakawa 等(1990)提出大麦BADH酶活性伴随着盐胁迫浓度的增加而增大，当 NaCl 浓度达到 200 mmol·L⁻¹ 时，酶活性是未加 NaCl 的 3 倍。其后有人分别在甜菜和梭梭的研究中验证了BADH活性与盐浓度成正相关(McCue 和 Hanson 1992；陈鹏和潘晓玲 2001)。本文结果与此一致。

本文上游引物跨越醛脱氢酶保守十肽区 V [S/T]LELGGKSP，在设计引物时通过对前人研究结果以及 GenBank 的相关信息进行分析比对，我

们选择了禾本科植物中醛脱氢酶常见的S取得了理想的结果，扩增了朝鲜碱茅 *BADH* 基因的保守区序列，并且最保守的醛脱氢酶十肽序列中的第 2 位氨基酸为 S。在氨基酸的分类中，T 与 S 同属于脂肪族和不带电荷的极性氨基酸，他们的结构和化学性质相近，在酶的功能中二者的差异应该不会造成影响，但可能会造成物种间酶活性的差异，这一点需进一步验证。T 和 S 出现在不同植物中的醛脱氢酶保守十肽序列中可能是进化过程中不同种属之间进化途径不同。

参考文献

白杰英, 陆一鸣, 庞晓斌, 李彦航(2003). 盐胁迫短芒大麦甜菜碱醛脱氢酶基因片段的克隆与序列分析. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 18 (1): 38-41

才华, 朱延明, 李杰, 柏锡, 李勇(2006). 野生大豆 *CDPK* 基因保守区的克隆及序列分析. 东北农业大学学报, 37 (2): 159~164

陈鹏, 潘晓玲(2001). 干旱和 NaCl 胁迫下梭梭幼苗中甜菜碱含量和甜菜碱醛脱氢酶活性的变化. 植物生理学通讯, 37 (6): 520~522

何晓兰, 侯喜林, 吴纪中, 刘桂华, 软佩, 朱卫民(2004). 三角叶滨藜甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因的克隆及序列分析. 南京农业大学学报, 27 (1): 15~19

李秋莉, 张毅, 尹辉, 李丹(2006). 辽宁碱蓬甜菜碱醛脱氢酶基因(*BADH*)启动子分离及序列分析. 生物工程学报, 22 (1): 77~81

梁峥, 赵原, 李浴春, 邹喻苹, 骆爱玲, 黄巨富(1991). 菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因对甜菜碱的氧化. 植物学报, 33 (9): 680~686

刘凤华, 郭岩, 谷冬梅, 肖岗, 陈正华, 陈受宜(1997). 转甜菜碱醛脱氢酶基因植物的耐盐性研究. 遗传学报, 24 (1): 54~58

徐恒刚主编(2003). 中国盐生植被及盐渍化生态治理. 北京: 中国农业科学技术出版社, 244~245

杨铮, 钟鸣, 张丽(2006). 甜菜碱合成途径及其在基因工程育种中的应用. 分子植物育种, 4 (3S): 67~72

中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会编(1999).

- 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 127~128
- Arakawa K, Katayama M, Takabe T (1990). Levels of betaine and betaine aldehyde dehydrogenase activity in the green leaves, and etiolated leaves and roots of barley. *Plant Cell Physiol*, 31: 797~803
- González-Segura L, Velasco-García R, Muñoz-Clares RA (2002). Modulation of the reactivity of the essential cysteine residue of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J*, 361: 577~585
- González-Segura L, Velasco-García R, Rudiño-piñera E, Mújica-Jiménez C, Muñoz-Clares RA (2005). Site-directed mutagenesis and homology modeling indicate an important role of cysteine 439 in the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*, 87 (12): 1056~1064
- Ishitani M, Nakamura T, Han SY, Takabe T (1995). Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol*, 27 (2): 307~315
- Li QL, Gao XR, Yu XH, Wang XZ, An LJ (2003). Molecular cloning and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Suaeda liaotungensis* and its use in improved tolerance to salinity in transgenic tobacco. *Biotechnol Lett*, 25 (17): 1431~1436
- Li YH, Zou Q (2002). The sequence of *Triticum aestivum* betaine aldehyde dehydrogenase gene *WBADH*. *J Plant Physiol Mol Biol*, 28 (6): 495~496
- McCue KF, Hanson AD (1992). Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. *Plant Mol Biol*, 18 (1): 1~11
- Nakamura T, Nomura M, Mori H, Jagedorf AT, Ueda A, Takabe T (2001). An isozyme of betaine aldehyde dehydrogenase in barley. *Plant Cell Physiol*, 42: 1088~1092
- Nomura M, Hibino T, Takabe T, Sugiyama T, Yokota A, Miyake H, Takabe T (1998). Transgenically produced glycinebetaine protects ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from inactivation in *Synechococcus* sp. PCC7942 under salt stress. *Plant Cell Physiol*, 39: 425~432
- Oishi H, Ebina M (2005). Isolation of cDNA and enzymatic properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Zoysia tenuifolia*. *J Plant Physiol*, 162: 1077~1086
- Sakamoto A, Murata N (2000). Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *J Exp Bot*, 51 (342): 81~88
- Weretilnyk EA, Hanson AD (1990). Molecular cloning of a plant betaine aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87 (7): 2745~2749
- Ye CJ, Wu SW, Yang QK, Ma CZ, Yang GS, Wang B (2005). Cloning, sequencing and salt induced expression of PEAMT and BADH in oilseed rape (*Brassica naps*). *DNA Seq*, 16: 364~371
- Yu AL, Xu JSH, Zhou H, Zhang MQ, Chen RK (2004). Cloning and sequencing of *BADH* gene from maize (*Zea mays*). *Mole Plant Breed*, 2 (3): 365~368