

# 朝鲜碱茅 BADH 基因 3 端及 5 端部分序列的扩增

钟 鸣, 张 佳, 郭志富, 张 丽, 王 磊

(沈阳农业大学, 辽宁省农业生物技术重点实验室, 辽宁 沈阳 110161)

**摘要:**为探索朝鲜碱茅的耐盐、耐寒和耐旱的抗性机理, 从已知禾本科植物朝鲜碱茅甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因的一段保守区序列, 以此序列为研究基础, 结合其他禾本科植物的 BADH 基因保守区序列设计引物, 扩增出朝鲜碱茅 BADH 基因 3 端序列及 5 端部分序列共 1 502 bp。经 BLAST 比对, 结果表明, 获得到的朝鲜碱茅 BADH 基因序列与羊草和大麦的 BADH 基因的同源性达到 89%, 含有保守的十肽序列和其后 29 位与酶功能有关的 Cys。

**关键词:**朝鲜碱茅; 甜菜碱醛脱氢酶; 聚合酶链式反应; RACE

**中图分类号:** Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 - 7091(2009)03 - 0046 - 05

## The Amplification of BADH Gene 3 and 5 End from *Puccinellia chinampoensis*

ZHONG Ming, ZHANG Jia, GUO Zhi-fu, ZHANG Li, WANG Lei

(Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

**Abstract:** Part of conservative sequence of BADH from *Puccinellia chinampoensis* has been already known and was used as the basis of the research when specific primer was designed. The BADH gene of *Puccinellia chinampoensis* was cloned by SMART RACE. These two fragments were assembled and the result showed that we obtained the 3 end and part of 5 end. The sequence was 1 502 bp in length, its nucleotide sequence share 89% with the cDNA of BADH from *Leymus chinensis* and *Hordeum brevisubulatum*. Its deduced amino acid sequence contains the conserved domain sequence VTLELGGKSP of BADH and the Cys associated with aldehyde dehydrogenase function.

**Key words:** *Puccinellia chinampoensis*; BADH; PCR; RACE

朝鲜碱茅为禾本科碱茅属牧草, 是我国东北、华北和西北地区改良盐渍土地的优良先锋植物<sup>[1]</sup>。与其他盐生植物一样, 朝鲜碱茅在体内可大量积累甜菜碱进行渗透调节以适应不良环境, 具有较强的耐盐、耐旱和耐寒性。在植物中, 甜菜碱的合成经 2 步催化而成, 其第二步是由甜菜碱醛脱氢酶(Betaine aldehyde dehydrogenase, BADH)催化。目前, 人们已先后从禾本科植物大麦(*Hordeum vulgare*)、高粱(*Sorghum bicolor*)、水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)中分离得到 BADH 基因<sup>[2-11]</sup>, 并成功地获得了表达 BADH 基因活性的转基因植株<sup>[12-14]</sup>。本试验从朝鲜碱茅中分离了 BADH 基因 3 序列和 5 的部分序列, 并对其进行了序列分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

本试验所用的朝鲜碱茅种子为吉林省农科院草

地所提供。朝鲜碱茅播种于沙土中, 在五叶一心时, 用 1/2 Hoagland 营养液培养, 缓苗 7 d 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。为了避免盐激, 浓度每隔 3 d 递增 50 mmol/L 直至终浓度, 每个浓度处理 3 d 后分别取样置于超低温冰箱保存待测。

### 1.2 方法

1.2.1 甜菜碱醛脱氢酶提取与活性测定 甜菜碱醛脱氢酶提取与活性测定参考刘凤华等和《现代植物生理学试验指南》的方法, 略有改动。在 28 条件下用日立 U-3010 型紫外分光光度计测定 340 nm 处 30 min 内吸光值的变化。酶活性按每分钟转化生成 1 nmol NADH 所需的酶量为 1 个活性单位计算。依据 NADH 的摩尔消光系数计算酶的比活力。

酶的比活力 (nmol/(min·mg)) =  $OD \times 10^{-3} / (\max \times C) \times 10^9$ 。

收稿日期: 2009 - 02 - 18

基金项目: 辽宁省农业生物技术重点实验室专项基金, 沈阳市农业生物技术实验室专项基金(1041003 - 1 - 03)

作者简介: 钟 鸣(1971 - ), 女, 辽宁大连人, 副教授, 博士, 主要从事植物生物技术研究。

式中, OD 为每分钟增加的平均吸光值; max 为 NADH 摩尔消光系数, 等于  $6.22 \times 10^3$ ; C 为测定所加入酶蛋白的量, 单位为 mg。

### 1.2.2 朝鲜碱茅总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取 300 mmol/L 盐浓度处理的朝鲜碱茅<sup>[1]</sup>, 用 TrizolA + 试剂提取朝鲜碱茅叶片总 RNA, RT-PCR 合成第一链 cDNA。

### 1.2.3 *BADH* 基因 5 端部分序列的扩增和 *BADH* 基因 3 全序列的扩增

设计一对基因特异引物 P1、P2, PCR 扩增 *BADH* 基因 5 端序列。在 15  $\mu$ L 体系中分别加入下列成分: cDNA 模板 2  $\mu$ L, 缓冲液 (10  $\times$ ) 1.5  $\mu$ L, dNTP (2.5 mmol/L) 1.2  $\mu$ L,  $Mg^{2+}$  0.9  $\mu$ L, 引物 P1、P2 (10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, *Taq* DNA 聚合酶 (2.5 U/ $\mu$ L) 0.4  $\mu$ L,  $H_2O$  7  $\mu$ L; 扩增条件为: 94 30 s, 55 30 s, 72 1.5 min, 35 个循环, 72 延伸 10 min。设计 P3 和 P4 引物用 SMART RACE 方法扩增 *BADH* 基因 3 端片段。15  $\mu$ L 体系同上, 扩增条件为: 94 30 s, 57 30 s, 72 1.5 min, 32 个循环, 72 延伸 10 min。

引物 P1 为: 5'-CGATCGCCGC (T/C) AAGATTAAAG3'; 引物 P2 为: 5'-CTTCCTCTCTCC AAATTTGCATF3'; 引物 P3 为 5'-GGTAAAG CCTGTTTCATTAGAGCT3'; 引物 P4 为: 5'-A AGCAGTGGTAA-CAACGCAGAGT3'。

1.2.4 *BADH* 基因的回收及测序 将上述 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收纯化目的片段, 测序 (天根生物公司)。

1.2.5 序列分析 采用 DNAMAN 软件拼接获得的 *BADH* 基因片段, 并与 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 中的数据进行同源性比较。

1.2.6 甜菜碱的提取与含量测定 甜菜碱的提取与含量测定参照《现代植物生理学试验指南》的方法, 略有改动。按标准曲线方法分别测出四价铵化合物与胆碱的量, 求出甜菜碱的含量。

甜菜碱含量 = 四价铵化合物的量 - 胆碱的量。

## 2 结果与分析

### 2.1 甜菜碱醛脱氢酶活性测定

*BADH* 是植物体内合成甜菜碱的关键酶, 它可以将由胆碱单加氧酶氧化而生成的产物甜菜碱醛转化成甜菜碱。随着盐浓度的增加朝鲜碱茅体内 *BADH* 活性表现如图 1 所示, 未加 NaCl 胁迫处理中为每毫克蛋白中有 0.24 nmol/(min·mg); 盐浓度 0~250 mmol/L 之间 *BADH* 活性表现为平稳的上升; 当 NaCl 浓度达到 300 mmol/L 时, 酶活性达到最大值,

是未加 NaCl 处理酶活性的 3 倍, 当盐浓度超过 300 mmol/L 时酶活性开始下降, 但直至 400 mmol/L *BADH* 酶活性仍高于对照处理。

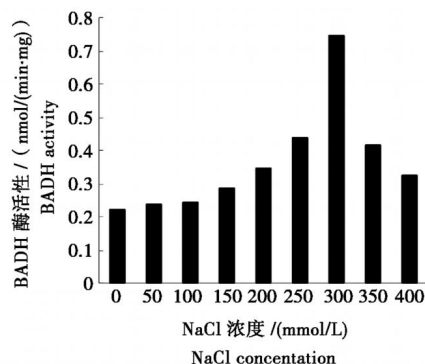


图 1 NaCl 胁迫下甜菜碱醛脱氢酶的变化

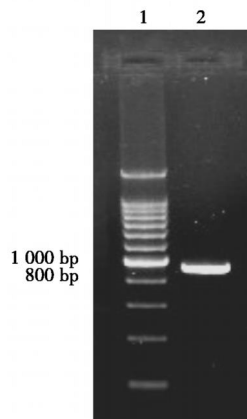
Fig. 1 Change in activity of *BADH* under salt stress

### 2.2 朝鲜碱茅总 RNA 的提取

以 300 mmol/L NaCl 诱导的朝鲜碱茅叶片为材料, TrizolA + 试剂提取总 RNA, 1% 的琼脂糖检测, 结果显示 28, 18, 5 S 条带清晰, 明亮, 且 28 S 约为 18 S 亮度的 2 倍, 紫外分光光度计测定  $A_{260}/A_{280}$  1.8, 可用于反转录 cDNA。

### 2.3 *BADH* 基因保守区 5 端及 3 端基因片段的扩增

以 cDNA 为模板, 用引物 p1/p2, p3/p4 分别扩增 *BADH* 基因 5 及 3 末端, 琼脂糖检测结果显示, 5 端扩增出 940 bp (图 2) 的片段, 3 端扩增出 1 100 bp (图 3) 的片段。



1. Marker: 200 bp DNA ladder;

2. *BADH* 基因 5 末端 PCR 产物。

1. Marker: 200 bp DNA ladder; 2. PCR amplification of *BADH* 5.

图 2 *BADH* 基因 5 端扩增

Fig. 2 PCR amplification of *BADH* 5 sequence from *P. chinampoensis*

### 2.4 *BADH* 核苷酸和氨基酸序列分析

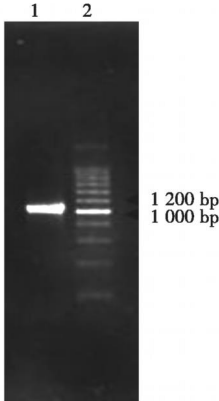
将得到的 5, 3 两个片段用 DNAMAN 软件进行拼接, 结果表明, 获得片段长为 1 502 bp, 3' 末端具有 AATAAA 加尾信号和多聚腺苷酸尾巴 Poly(A)。其中编码区 1 248 bp, 共编码 416 个氨基酸, 含有醛脱

氢酶特有的十肽保守序列(VSLHLGGKSP),以及其后 29 位点上与酶功能有关的半胱氨酸残基,C-端具有 SKL 信号肽序列(图 4)。在 GenBank 中与大麦(*Hordeum brevisubulatum*、*Hordeum vulgare* subs. *vulgare*、*Hordeum vulgare*)、羊草(*Leymus chinensis*)、细叶结缕草(*Zoysia tenuifolia*)、高粱(*Sorghum bicolor*)的 *BADH* 基因推测的氨基酸比对,发现与其他禾本科植物的 *BADH* 基因都具有很高的同源性,其中与大麦(*H. brevisubulatum*)和羊草(*L. chinensis*)的同源性高达 89 %。

2.5 *BADH*同源系统树分析

利用 DNAMAN 序列分析软件对羊草(*L. chinensis*, GenBank ACCESSION: AB183715)、大麦的基因家族成员(*H. brevisubulatum*, AY188952、*H. vulgare* subs. *vulgare* AB063179、*H. vulgare* D26448)、高粱(*S. bicolor* U12196)和细叶结缕草(*Z. tenuifolia* AB161712)等 6 种 *BADH* 氨基酸序列进行比对并构

建系统发育树状图(图 5)。结果表明,朝鲜碱茅与细叶结缕草和高粱的同源关系较近。



1. *BADH* 基因 3 末端 PCR 产物;  
2. 200 bp DNA Ladder。  
1. PCR amplification of *BADH* 3'; 2. 200 bp DNA ladder.

图 3 *BADH* 基因 3 端扩增

Fig. 3 PCR amplification of *BADH* 3 sequence from *P. chinampoensis*

<i>Hordeum brevisubulatum</i>	TGSTATGKMIMTAAQMUKFUSLELGGKSP	LUIFDDUADI	277
<i>Leymus chinensis</i>	TGSTATSKTINTAAQMUKFUSLELGGKSP	LUIFDDUADI	274
<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	TGSTATGKTINTAAQMUKFUSLELGGKSP	LUIFDDUADI	278
<i>Hordeum vulgare</i>	TGSTATGKTINTAAQMUKFUSLELGGKSP	LUIFDDUADI	277
<i>Zoysia tenuifolia</i>	TGSTeTGKrvMTAAQMUKFUSLELGGKSP	LUIFDDIdnI	279
<i>Sorghum bicolor</i>	TGSTeTGKriMTsAAQMUKFUSLELGGKSP	LUIFDDirDI	269
<i>Puccinellia chinampoensis</i>	TGSTeTGKriMTAAQMUKFUSLELGGKSP	LUIFDDUADI	188
Consensus	gst t k mt aaqmukpuslelggksp l fdd i		

<i>Hordeum brevisubulatum</i>	LENVLSUKQUTRYCKDELYGWYQRP	SKL	505
<i>Leymus chinensis</i>	LENVLSUKQUTRYCKDELYGWYQRP	SKL	502
<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	LENVLSUKQUTRYCKDELYGWYQRP	SKL	506
<i>Hordeum vulgare</i>	LENVLSUKQUTRYCKDELYGWYQRP	SKL	505
<i>Zoysia tenuifolia</i>	LdNYmtUKQUTkVCsDEpwGWYQp	PSKL	507
<i>Sorghum bicolor</i>	LdNYmtUKQUTkVCsDEpwGWYQp	PSKL	494
<i>Puccinellia chinampoensis</i>	LENVLSUKQUTRYCKDELYGWYQRP	SKL	416
Consensus	l ny vkqut yc de gwyq pskl		

图 4 氨基酸序列等对

Fig. 4 Amino and sequence alignment

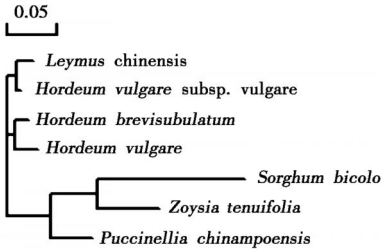


图 5 系统发育树状图  
Fig. 5 Phylogenetic tree

2.6 盐梯度胁迫下甜菜碱含量的变化

如图 6 所示,NaCl 胁迫下朝鲜碱茅体内甜菜碱含量的变化趋势,出现了双峰曲线。在 0 ~ 200 mmol/L 盐浓度之间,甜菜碱含量呈直线上升,当浓度处于 250 ~ 400 mmol/L 时其含量表现为先下降后上升。NaCl 浓度为 200 mmol/L 时甜菜碱含量最高,为对照的 2.5 倍。

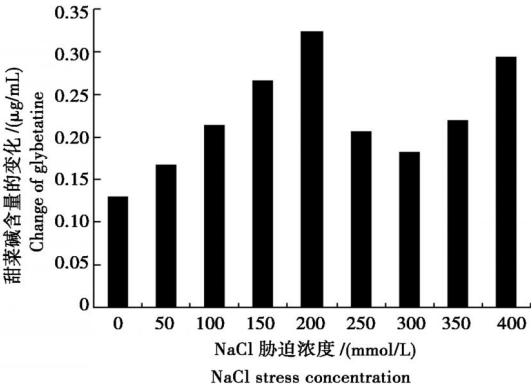


图 6 NaCl 胁迫下甜菜碱含量的变化  
Fig. 6 Change in activity of glycetaine under salt stress

3 讨论

本研究从朝鲜碱茅叶片中获得的 *BADH* 基因部分序列,在推测的 169 ~ 179 氨基酸序列中含有醛脱氢酶高度保守的十肽序列 VSLHLGGKSP,与多数植

物中 *BADH* 的十肽保守序列 VTLELGKSP 存在细微的差别,如在本试验材料和水稻中,第二位的 T 被 S 取代;在播娘蒿植物中,不但第二位的 T 被 S 取代,连第三位的 L 也被 M 取代<sup>[15]</sup>,但是 *BADH* 基因在进化中还是相当保守的,不同物种的 *BADH* 基因在进化过程中受到很强的选择压力,其编码区结构相对保守,这说明,该序列在植物对环境干旱、盐碱等逆境胁迫的适应性方面可能承担了很重要的作用<sup>[16]</sup>。另外,其后 29 位点上含有与酶功能有关的半胱氨酸残基,可能包含  $\text{NAD}^+$  结合位点及酶催化位点<sup>[2,3,17]</sup>。

在多数情况下,一个新基因的全长 cDNA 序列的获得一般通过筛选 cDNA 文库或 RACE 法。本研究利用 SMARTTRACE 方法克隆出 *BADH* 基因 cDNA 3 末端序列。但是,由于 *BADH* 基因 5 端保守性差且 GC 含量较高,常规 PCR 方法无法得到 *BADH* 基因保守区 5 端全序列,希望后续试验可以通过反向嵌套 PCR 获得 5 端全序列。

在典型的不积累甜菜碱的植物-水稻中,发现了 *BADH* 基因的低水平表达之后,引起了人们研究该酶在植物系统进化中所扮演角色的兴趣。目前的研究表明:植物中 *BADH* 基因可能是以小的多基因家族的形式存在,不同类型的 *BADH* 在细胞中的定位具有多样性,可能分别位于叶绿体、过氧化物酶体或细胞质等部位。在已报道的 *BADH* 氨基酸序列中,存在两种有关该酶蛋白定位的信号肽。一种是 N-端信号肽,其氨基酸序列为 QLFIDGE,它被认为是定位于叶绿体的信号,但该信号肽缺乏典型性。另一种是 C-端信号肽,氨基酸序列为 SKL,是定位于过氧化物酶体中的信号<sup>[18]</sup>。从目前的研究结果看,对具有不典型 N-端信号肽的 *BADH* 定位问题尚有争论,但具有 C-端信号肽 SKL 的 *BADH* 定位于过氧化物酶体已达成共识。不同类型的 *BADH* 在细胞中的不同定位,可能以有利于其酶活性的发挥为依据。在单子叶植物中,*BADH* 蛋白(具有 C 末端信号肽的类型)在过氧化物酶体中比在叶绿体中可能具有更高的活性。因此 Nakamura 等认为,在进化过程中,单子叶植物 *BADH* 蛋白(具有 C 末端信号肽的类型)的定位发生了由叶绿体到过氧化物酶体的变化,以便更有效地发挥其催化活性。本试验获得的朝鲜碱茅 *BADH* 的氨基酸序列 C-端含有 SKL 信号肽序列,且为禾本科植物<sup>[19]</sup>,故初步将其定位于过氧化物酶体中,但有待于进一步研究。

甜菜碱是大多数藜科、苋科、禾本科植物体内重要的渗透调节物质,甜菜碱在体内积累,可以稳定细

胞膜结构、调节渗透平衡、保护大分子蛋白的稳定性,甚至可以降低盐胁迫条件下 DNA 的解链温度。它的积累与盐胁迫浓度有关。植物体内甜菜碱的合成由胆碱单加氧酶和甜菜碱醛脱氢酶经两步氧化生成,反应底物为胆碱。甜菜碱的合成在叶绿体中完成,而大多数禾本科植物体内甜菜碱醛脱氢酶定位于过氧化物酶体中<sup>[19]</sup>。本试验中甜菜碱合成总体水平上升,但也表现出了复杂性,在 0 ~ 200 mmol/L 范围内,*BADH* 活性变化不显著,但活性可以达到一定水平,有可能是 CMO 的活性不断升高使得甜菜碱的含量直线上升。在 200 mmol/L 到 300 mmol/L 之间,中度盐胁迫可能抑制了 CMO 的活性或底物胆碱的供应受到了阻碍,使得甜菜碱醛不再增加。另外甜菜碱的合成在叶绿体中完成,而 *BADH* 存在于过氧化物酶体中,*BADH* 的运输需要一个过程,所以此时虽然 *BADH* 的活性有了大幅度的上升,却不能提高甜菜碱的合成量,当 NaCl 浓度大于 300 mmol/L 时,*BADH* 酶活性达到最大值,植物体内的 *BADH* 积累到一定程度可以将叶绿体内剩余的底物氧化,因此甜菜碱又一次出现直线上升趋势。在朝鲜碱茅甜菜碱的合成途径中,*BADH* 的转运机制及 CMO 的耐盐生理特性还有待于继续深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 杨 铮,钟 鸣,郭志富,等. 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[J]. 植物生理学通讯,2007,43(3):430-434.
- [2] McCue K F, Hanson A D. Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression[J]. Plant Mol Biol, 1992, 18: 1-11.
- [3] Li Q L, Gao X R, Yu X H, et al. Molecular cloning and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase gene from Suaeda liaotungensis and its use in improved tolerance to salinity in transgenic tobacco[J]. Biotechnol Lett, 2003, 25(17): 1431-1436.
- [4] Yin X J, Zhao Y X, Luo D, et al. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase (AcBADH) gene and isolation of its promoter from the halophyte *Ataplex centralasiatica*[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2002, 28(6): 479-484.
- [5] Legaria J, Rajsbaum R, Mufioz-Clares R A, et al. Molecular characterization of two genes encoding betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth expression in leaves under short-term exposure to osmotic stress or abscisic acid[J]. Gene, 1998, 218: 69-76.
- [6] Hibino T, Meng Y L, Kawamitsu Y, et al. Molecular cloning and function characterization of two kinds of betaine aldehyde

- dehydrogenase in betaine-accumulating man grove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh [J]. *Plant Mol Biol*, 2001, 45: 353 - 363.
- [7] Ishitani M, Nakamura T, Han S Y, *et al.* Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 27: 307 - 315.
- [8] Nakamura T, Nomura M, Mori H, *et al.* An isozyme of betaine aldehyde dehydrogenase in barley [J]. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42(10): 1088 - 1092.
- [9] Wood A J, Sanjoka H, Rhodes D. *et al.* Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum molecular cloning and expression of two related genes [J]. *Plant Physiol*, 1996, 110: 1301 - 1308.
- [10] Nakamura T, Yokota S, Muramoto Y, *et al.* Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycine betaine Nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes [J]. *Plant J*, 1997, 11(5): 1115 - 1120.
- [11] Li Y H, Zou Q. The sequence of *Triticum aestivum* betaine aldehyde dehydrogenase gene WBADH [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2002, 28(6): 495 - 496.
- [12] Rathinasabathi B, McCue K F, Gago D A, *et al.* Metabolic engineering of glycine betaine synthesis: plant betaine aldehyde dehydrogenase lacking typical transit peptides are targeted to tobacco chloroplasts where they confer betaine aldehyde resistance [J]. *Planta*, 1994, 193: 155 - 162.
- [13] 梁 峥, 马德钦, 汤 岚, 等. 菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因在烟草中的表达 [J]. *生物工程学报*, 1997, 3(3): 236 - 240.
- [14] 刘凤华, 郭 岩, 谷冬梅, 等. 转甜菜碱醛脱氢酶基因植物的耐盐性研究 [J]. *遗传学报*, 1997, 24(1): 54 - 58.
- [17] 肖 岗, 张耕耘, 刘风华, 等. 山菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因研究 [J]. *科学通报*, 1995, 40(8): 741 - 745.
- [16] 董海滨, 管荣展, 张红生, 等. 播娘蒿甜菜碱醛脱氢酶基因的克隆和表达分析 [J]. *分子植物育种*, 2006, 4(2): 209 - 215.
- [17] 曾幼玲, 幸 婷, 蔡忠贞, 等. 盐生植物盐爪爪甜菜碱醛脱氢酶基因的克隆及在盐胁迫下的 *BADH* 基因的表达 [J]. *云南植物研究*, 2007, 29(1): 79 - 84.
- [18] 刘振林, 戴思兰. 植物甜菜碱醛脱氢酶基因研究进展 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2004, 32(3): 104 - 112.
- [19] 崔 杰, 李滨胜, 史淑芝, 等. 植物甜菜碱醛脱氢酶基因工程研究进展 [J]. *中国甜菜糖业*, 2006(1): 40 - 44.