

北美海蓬子甜菜碱醛脱氢酶基因的克隆及表达载体构建

刘增美, 朱天艺, 龚一富*, 王何瑜, 章 丽

(宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 以北美海蓬子种子为材料, 采用 RACE 技术获得北美海蓬子 *BADH* 基因的 cDNA 全长序列。结果表明: *BADH* 基因 cDNA 全长为 1 836 bp, 其中开放阅读框(ORF)为 1 503 bp, 编码 500 个氨基酸, 预测蛋白的分子量为 54.5 kDa, 理论等电点为 5.31。推测出 *BADH* 氨基酸中含有甜菜碱醛脱氢酶家族高度保守的十肽序列(VTLELGKSP)及与酶功能相关的半胱氨酸残基(Cys)。序列比对和系统进化树显示, 北美海蓬子与盐节木和盐穗木的亲缘关系最近, 同源性达 94%。并构建了植物表达载体 pCambia3301-*BADH*, 将其成功导入到农杆菌 EHA105 中, 为进一步研究该基因的功能奠定了基础。

关键词: 北美海蓬子; 甜菜碱醛脱氢酶; 基因克隆; 载体构建

中图分类号: Q781

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2015) 04-0016-04

我国经济较发达的各大河流三角洲及沿海地区盐碱耕地约有 $6.6 \times 10^6 \text{ hm}^2$ [1]。因此从高耐盐植物中克隆耐盐基因, 对非耐盐植物进行作物改良后种植于盐碱地, 可有效利用盐碱地。北美海蓬子 (*Salicornia bigelovii* Torr.) 属藜科, 海蓬子属, 是耐盐性极强的盐生植物, 其耐盐极限为 5% NaCl 质量浓度, 超过海水 NaCl 质量浓度的 20%~30%, 也是美国的亚历山大环境研究实验室从 1 000 多种盐生植物中选育出来的最优品种 [2]。

植物在盐胁迫下, 可积累大量甜菜碱作为渗透调节剂维持液泡渗透压, 甜菜碱作为分子伴侣, 能稳定细胞内酶和蛋白质的构象 [3]。植物体内的甜菜碱以胆碱为原料, 经胆碱氧化酶(CMO)催化合成甜菜碱醛, 甜菜碱醛在甜菜碱醛脱氢酶(*BADH*)催化下合成甜菜碱。甜菜碱是植物体内一种重要的渗透调节剂, 甜菜碱醛脱氢酶(*BADH*)是甜菜碱合成途径中的关键酶之一。在正常情况下, 植物细胞 *BADH* 基因表达量很低, 但在盐胁迫下, 该基因活性显著增强。目前, *BADH* 基因在提高植物耐盐性的基因工程中大量应用。有报道将山菠菜 *BADH* 基

因转入甘薯, 可提高转基因甘薯细胞中的甜菜碱含量, 从而大大提高甘薯对水盐胁迫的耐受性 [4]。

目前, *BADH* 基因已经从盐节木 [5]、川芎 [6]、大麦 [7]、刺五加 [8] 等植物中克隆, 但有关北美海蓬子 *BADH* 基因克隆的研究还未见报道。因此, 本研究从北美海蓬子中克隆 *BADH* 基因, 并对其进行相关的生物信息学分析及构建到植物表达载体, 为耐盐植物遗传改良提供优良的基因资源。

1 材料和方法

1.1 试验材料

北美海蓬子种子购于江苏省盐城市绿苑海蓬子开发有限公司。种子用海水浸泡后置于光照培养箱中萌发, 温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光照时间为 $10 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$, 培养 1 周发芽后用于后续实验。

1.2 北美海蓬子 *BADH* 基因克隆

取萌发种子, 提取总 RNA 并反转录成 cDNA。根据已报道的多种耐盐植物 *BADH* 基因 cDNA 的保守区设计兼并引物 F 和 R (表 1), 以 cDNA 为模板, 扩增其核心片段; 5'RACE 中上游引物采用

收稿日期: 2014-11-18.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省自然科学基金 (LY13C020004); 浙江省科技创新团队项目 (2012R10029-07); 宁波市科技攻关项目 (2013C10018)。

第一作者: 刘增美 (1987-), 女, 浙江丽水人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 植物分子生物学。E-mail: zengmeiliu@sina.com

*通信作者: 龚一富 (1973-), 男, 重庆开县人, 博士/副教授, 主要研究方向: 植物分子生物学。E-mail: gongyifu@163.com

SMART RACE 试剂盒(美国 Clontech 公司)中自带引物 NUP, 设计特异性下游引物 R5-1、R5-2, 经 2 轮巢式 PCR 获得 5'端序列。3'RACE 中设计特异性上游引物 F3-1、F3-2, 下游引物为 AD-AT, 经 2 轮巢式 PCR 获得 3'端序列。核心片段、5'端和 3'端 PCR 产物分别回收连接转化后测序, 测序后用 Vector NTI 7.0 软件拼接该 3 段序列, 得到北美海蓬子 *BADH* 基因的全长 cDNA 序列。

表 1 文中所用 PCR 引物

编号	引物序列
F	5'-TAYYTVCGYGCTATTGCWGTAAAG-3'
R	5'-ACAGGRCCAAGCCKRCABCCTTC-3'
NUP	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAG TACGCGGG-3'
R5-1	5'-CAACCAAAGATAGCCCATTCAGC-3'
R5-2	5'-GGGCAGCAGAACCCATAACCT-3'
F3-1	5'-TGGGACTTCCTCCTGGTGTG-3'
F3-2	5'-TGCTGAATGGGCTATCTTTGG-3'
AD-AT	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3'
BADH-F	5'-GAAGATCTATGTCGATCCCTATA CCTTCTCGT-3'
BADH-R	5'-GGGTNACCTTAAGGAGACTTGTA CCACCCCC-3'

1.3 北美海蓬子 *BADH* 基因的生物信息学分析

采用 BLAST 对北美海蓬子 *BADH* 基因进行同源性比对, 用 NCBI-ORF finder 查找该基因的 ORF 区, 用 ProtParam 预测 *BADH* 蛋白的相对分子质量、等电点和亲疏水性, 用 MOTIF SCAN 分析该蛋白糖基化及磷酸化位点, 用 SOPMA 分析 *BADH* 蛋白的二级结构; 用 Swiss-Model 预测该蛋白的三级结构, 用 MEGA 3.0 构建系统进化树。

1.4 表达载体 pCAMBIA3301-*BADH* 的构建及转化农杆菌

设计含 Bgl II 和 BstE II 酶切位点引物 BADH-F 和 BADH-R, 扩增 *BADH* 基因 ORF, 回收后将其 pMD19T 连接, 转化摇菌抽提 pMD19T-*BADH* 质粒。用 Bgl II、BstE II 酶双酶切 pMD19T-*BADH* 质粒及 pCAMBIA3301 空质粒, 分别回收大小片段。大小片段连接产物为 pCAMBIA3301-*BADH*, 转化涂板后挑取阳性菌落, 用引物 BADH-F 和 BADH-R 检测该基因并测序。抽提阳性菌中的重组质粒, 用

Bgl II 和 BstE II 酶再次双酶切验证。

用液氮冻融法将 pCAMBIA3301-*BADH* 质粒转化到农杆菌 EHA105 感受态中。涂板后挑取筛选培养基上的阳性农杆菌, 用引物 BADH-F 和 BADH-R 进行 PCR 鉴定。阳性农杆菌扩大培养, -80℃保存于含 40% 的甘油中。

2 结果与分析

2.1 北美海蓬子 *BADH* 基因克隆

通过 RACE 技术克隆得到的 *BADH* 基因核心片段、5'端及 3'端序列分别为 374 bp、834 bp 和 926bp。拼接后得到该基因 cDNA 全长为 1 836 bp, GenBank 登录号 KM875506。

2.2 北美海蓬子 *BADH* 基因的生物信息学分析

北美海蓬子 *BADH* 基因的 ORF 为 1 503 bp, 非编码区 5'UTR 为 97 bp, 3'UTR 为 236 bp, 编码 500 个氨基酸, 分子式为 $C_{2447}H_{3851}N_{645}O_{727}S_{18}$ 。BADH 蛋白理论相对分子质量为 54.5 kDa, 等电点为 5.31。该蛋白含 20 种氨基酸, 丙氨酸(Ala)含量最丰富, 甲硫氨酸(Met)含量最低。BADH 蛋白拥有甜菜碱醛脱氢酶家族高度保守的十肽序列——VTLELGG KSP。根据 MOTIF SCAN 分析, 该蛋白可能含有 2 个 N 端糖基化位点、7 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、6 个蛋白激酶 C 磷酸化位点, 在 294 位点含有 1 个醛脱氢酶半胱氨酸活性位点, 在 285 位点含有 1 个醛脱氢酶谷氨酸活性位点; 采用 ProtParam 分析表明: 该蛋白不稳定系数为 33.12, 是较稳定的蛋白; 总平均亲水性(GRAVY)分值为 -0.087, 是亲水蛋

图 1 北美海蓬子 *BADH* 蛋白的三维结构预测

白. *BADH* 蛋白二级结构预测结果显示, α -螺旋占 38.4%, β -折叠占 17%, β -转角占 10%, 无规则卷曲占 34.6%. 三维空间结构预测发现该蛋白具有甜菜碱醛脱氢酶蛋白的经典结构, 构象中以 α -螺旋和无规则卷曲为主(图 1).

北美海蓬子 *BADH* 基因 ORF 核苷酸比对结果表明: 该基因编码区与盐穗木及盐节木有最大相似性, 均为 94%, 与辽宁碱蓬、海滨碱蓬、盐地碱蓬的相似性均为 90%. *BADH* 氨基酸比对结果表明: 不同物种的 *BADH* 氨基酸有一定相似性, 与盐节木有最大相似性, 为 95%; 其次是盐穗木, 为 94%; 与蓖麻、毛果杨的相似性较低, 为 77%. 从系统进化树可以看出北美海蓬子与盐节木和盐穗木的分支最近, 和胡杨、盐爪爪、菠菜分支较远, 与以上比对结果一致(图 2).

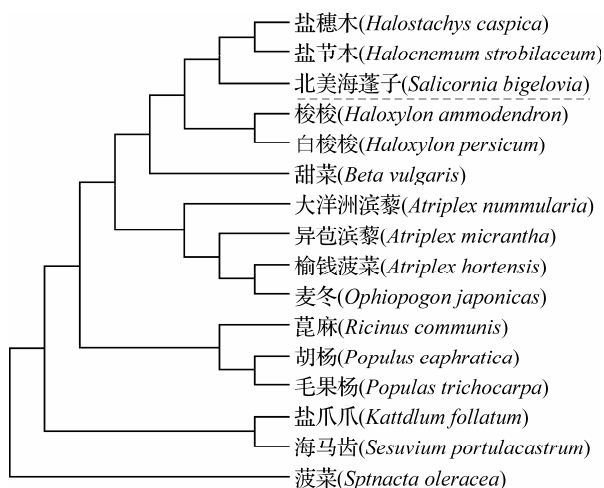
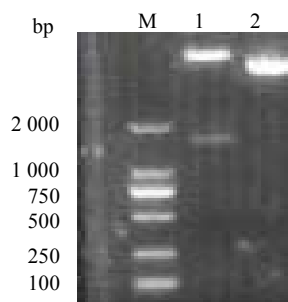


图2 北美海蓬子与其他植物 *BADH* 蛋白质系统进化树

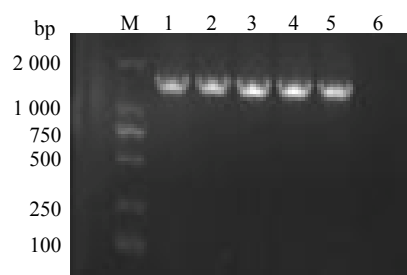
2.3 表达载体 pCambia3301-*BADH* 构建与鉴定

双酶切 pMD19T-*BADH* 质粒能得到 1 500 bp 的 *BADH* 基因小片段, 双酶切 pCambia3301 空质粒能得到约 9 000 bp 的载体大片段. 对转 pCambia3301-*BADH* 的大肠杆菌用引物 *BADH*-F、*BADH*-R 进行 PCR 鉴定, 能得到 1 500 bp 的 *BADH* 基因条带, 说明重组质粒构建成功, 并获得了转 pCambia3301-*BADH* 的工程菌, 且测序结果正确. 对该重组质粒再次双酶切, 结果显示大小片段与回收的条带大小一致(图 3). 用引物 *BADH*-F 和 *BADH*-R 对转基因阳性农杆菌 PCR 鉴定, 电泳后能得到 1 500 bp 的 *BADH* 基因条带(图 4), 说明获得了转 *BADH* 基因的工程农杆菌.



M: 2 kb DNA Ladder; 1: *Bgl* II / *Bst* E II 双酶切 pMD19T-*BADH*; 2: 未酶切的 pCambia3301-*BADH* 重组质粒.

图3 pCambia3301-*BADH* 质粒双酶切验证



M: 2 kb DNA Ladder; 1~5: 转 *BADH* 基因农杆菌; 6: 空白非转基因农杆菌对照.

图4 转 *BADH* 基因农杆菌目的基因检测

3 讨论

本研究采用 RACE 技术成功克隆了北美海蓬子 *BADH* 基因的 cDNA 全长序列, 为 1 836 bp, 其中 ORF 为 1 503 bp, 编码 500 个氨基酸. 该蛋白在 257~266 位点处含有甜菜碱醛脱氢酶的保守十肽序列——VTLELGKSP, 此序列被认为是该酶的活性位点. 在 294 位点含有与该酶功能相关的半胱氨酸残基. 从已报道的 *BADH* 基因可以发现, 多种植物如盐节木、碱蓬、异苞滨藜、麦冬等编码区都是 1 503 bp, 编码 500 个氨基酸, 说明不同物种的该基因编码区是比较保守的. 氨基酸比对显示: 北美海蓬子氨基酸序列与盐穗木、盐节木同源性很高, 与蓖麻、毛果杨的同源性较低, 且氨基酸比对与核苷酸比对结果一致. 进化树显示北美海蓬子与盐节木、梭梭的分支较近, 原因可能是它们同属藜科植物, 亲缘关系较近. 总体可以看出 *BADH* 蛋白在高等植物中有一定保守性, 尤其是藜科植物中保守性最高, 与物种间亲缘关系的远近保持一致.

目前研究表明, 一些植物中 *BADH* 基因以基因家族存在, 可定位于细胞质、叶绿体及过氧化物酶体中. 已报道 *BADH* 蛋白有 2 种信号肽——N 端

信号肽和C端信号肽。有些物种的C端具有SKL的三肽结构,认为是定位于过氧化物酶体的信号肽^[9]。而北美海蓬子BADH蛋白的C端无此三肽结构,因而不定位在过氧化物酶体。该蛋白N端有氨基酸序列为PLFIDGE七肽结构,与定位于叶绿体信号肽序列极为相似,推测北美海蓬子BADH蛋白定位于叶绿体中。但N端信号肽序列目前被认为是一种非典型的信号肽,并不能完全证实拥有该信号肽的蛋白一定定位于叶绿体中。

本研究用BglII、BstEII酶对pMD19T-BADH质粒及pCAMBIA3301双酶切,构建了植物表达载体pCAMBIA3301-BADH,为后期将BADH基因转化到烟草以提高其耐盐性奠定基础。盐胁迫下,转基因的耐盐植株比不耐盐非转基因植株的SOD及POD酶活性更高,从而削弱膜脂过氧化作用,更好地保护质膜^[10],为进一步利用BADH基因进行遗传工程创造抗逆境物种奠定基础。

参考文献:

- [1] 洪平,徐凯,刘亚欣,等.抗旱耐盐基因与作物的改良及其在荒漠化治理中的前景[J].中国农学通报,2008,24(4):398-402.
- [2] 吕忠进,Glenn E P, Hodges R M,等.全海水灌溉的作物——北美海蓬子(上)[J].世界农业,2001(2):14-16.
- [3] 李玉静,宋宪亮,杨兴洪,等.甜菜碱浸种对棉苗耐盐性的影响[J].作物学报,2008(2):305-310.
- [4] Fan W J, Zhang M, Zhang H X, et al. Improved tolerance to various abiotic stresses in transgenic sweet potato (*Ipomoea batatas*) expressing spinach betaine aldehyde dehydrogenase[J]. PLoS One, 2012, 7(5):37-44.
- [5] 高天鹏,王春燕,徐红伟,等.盐生植物盐节木甜菜碱醛脱氢酶基因的克隆及表达[J].植物研究,2013,33(3):317-338.
- [6] 周嘉裕,廖海.川芎甜菜碱醛脱氢酶基因的克隆及序列分析[J].西北农业学报,2011,20(3):45-51.
- [7] Zhao Y W, Hao J G, Bu H Y, et al. Cloning of HvBADH gene from *bulless barley*. and its transformation to tobacco[J]. Acta Agronomica Sinica, 2008, 34(7):1153-1159.
- [8] 邢朝斌,吴鹏,陈龙,等.刺五加GAPDH基因的克隆及序列分析[J].中草药,2012,43(1):155-158.
- [9] 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):105-112.
- [10] 李东魁,王蒂,张俊莲,等.转BADH基因马铃薯无性繁殖二代耐盐性检测[J].植物生理学通讯,2007,43(5):873-875.

Cloning of Gene from *Salicornia bigelovii* and its Expression Vectors Construction

LIU Zeng-mei, ZHU Tian-yi, GONG Yi-fu*, WANG He-yu, ZHANG Li

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: A full length cDNA sequence of BADH gene was cloned by RACE from *Salicornia bigelovii* seeds. The results show that the full length cDNA of BADH gene is 1 836 bp, which contains 1 503 bp ORF and encoded 500 amino acid with a putative molecular mass of 54.5 kDa and an isoionic point of 5.31. The deduced amino acid sequence contains the conserved decapeptide sequence (VTLELGKSP) and cysteine residue in betaine aldehyde dehydrogenase. Sequence comparison and phylogenetic tree analysis reveal that *Salicornia bigelovii* was close to *Halocnemum strobilaceum* and *Halostachys caspica* with 94% amino acids similarity. The plant expression vector pCAMBIA3301-BADH is successfully constructed, and the constructed vector is then transformed into *Agrobacterium* EHA105. The research is expected to lay a foundation for the further study on function of BADH gene.

Key words: *Salicornia bigelovii*; betaine aldehyde dehydrogenase; gene cloning; vector construction

(责任编辑 章踐立)