

北美海蓬子胆碱单加氧酶基因 *CMO* 的克隆及表达研究

朱天艺, 龚一富*, 刘增美, 王何瑜

(宁波大学 教育部应用海洋生物技术重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 胆碱单加氧酶(CMO)是合成植物小分子非毒性有机渗透调节物质甜菜碱过程中重要的限速酶。文中采用 RACE 技术以北美海蓬子为实验材料克隆 *CMO* 基因的全长 cDNA 序列(Genbank 登录号: KM884944), 并做相关的生物信息学分析。研究结果表明, 该基因 cDNA 全长 1 834 bp, 其中开放阅读框(ORF)有 1 317 bp, 编码 439 个氨基酸, 预测其蛋白分子量为 49.537 kDa, 理论等电点(pI)为 6.15; 序列分析显示北美海蓬子 CMO 蛋白中含有 2 个重要的保守域和功能域, 不存在跨膜区域; 除了与蒺藜苜蓿及水稻的同源性分别为 46%和 49%外, 与其他植物 CMO 蛋白序列相似性均达到 55%以上; 系统进化树分析显示, 它与欧洲海蓬子的亲缘关系最近; 实时荧光定量 PCR 结果显示, 随着 NaCl 浓度的升高, 北美海蓬子 *CMO* 基因的表达量增加, 说明该基因可通过盐胁迫诱导表达。

关键词: 北美海蓬子; 甜菜碱; 胆碱单加氧酶; 生物信息学; 表达分析

中图分类号: Q812

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2016) 04-0007-06

盐碱土可简单分为盐土和碱土。因盐碱土中含有大量盐分, 而限制了大部分植物的生长, 据不完全统计, 全世界盐碱地面积约占世界陆地总面积的 6%, 其中我国有 $2.7 \times 10^7 \text{ hm}^2$ ^[1]。因此, 从耐盐植物中克隆耐盐基因来提高植物尤其是作物的耐盐性, 进而改良和利用盐碱土具有重要的意义。藜科(Chenopodiaceae)、海蓬子属(Salicornia)植物——北美海蓬子(*Salicornia Bigelovii* Torr.)作为一种具有强耐盐性的盐生植物, 极限耐盐度能达到 5% NaCl 浓度, 在盐碱、干旱、低温等逆境胁迫下可通过合成一定量的甜菜碱(Glycine betaine, GB)来提高抗逆性^[2]。

植物在受到盐胁迫下, 能诱导表达 GB 合成基因, 积累大量 GB 来维持液泡渗透压, 稳定细胞内酶和蛋白质的构象^[3]。另外, GB 的生物合成途径是利用胆碱作为原料, 经胆碱单加氧酶 CMO(Choline Monooxygenase)催化生成中间产物, 再在甜菜碱醛脱氢酶 BADH(Betaine Aldehyde Dehydrogenase)催化下生成^[4]。CMO 是定位于叶绿体基质内的铁

氧还蛋白依赖型限速酶, 起关键作用的结构主要是单核非血红素 Fe 结合域和单核 Rieske 型 2Fe-2S 结构域这 2 个保守域^[5]。目前, *CMO* 基因已从菠菜(*Spinacia oleracea* L.)^[4]、甜菜(*Beta vulgaris*)^[6]、山菠菜(*Atriplex hortensis*)^[7-8]、梭梭(*Haloxylon ammodendron*)^[9]、杜梨(*Pyrus betulifolia*)^[10]和茶树(*Came-llia sinensis*)^[11]等植物中克隆, 而且还通过遗传转化该基因使转 *CMO* 基因植株在低温、干旱、高盐等胁迫下诱导 GB 积累, 从而提高植物抗逆性, 而有关北美海蓬子 *CMO* 基因的克隆及功能研究还没有相关报道。笔者采用 RACE 技术, 从北美海蓬子中克隆 *CMO* 基因全长 cDNA 序列, 对其相关的生物信息学进行分析, 同时用不同 NaCl 浓度胁迫北美海蓬子, 研究北美海蓬子 *CMO* 基因的转录差异。

1 材料与方法

1.1 试验材料

北美海蓬子种子用沙:泥(7:3)的沙质土萌发, 等幼苗出土后, 将温度维持在 25℃, 光照强度为

收稿日期: 2015-04-16.

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

基金项目: 国家科技部星火计划 (2014GA701020); 宁波市农村创新创业项目 (2014C91023)。

第一作者: 朱天艺 (1989—), 女, 浙江金华人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 植物分子生物学。E-mail: zhutianyi98926@163.com

*通信作者: 龚一富 (1973—), 男, 重庆人, 副教授, 主要研究方向: 藻类分子生物学。E-mail: gongyifu@163.com

6 000 lx, 相对湿度维持在 60%~80%之间, 光周期为 12 h:12 h 的光照培养箱中培养, 同时用 10%MS 营养液浇灌。

1.2 北美海蓬子 CMO 基因克隆

北美海蓬子总 RNA 提取采用 CTAB-LiCl 法, cDNA 第一链的合成参照 M-MLV RTase cDNA 合成试剂盒(TaKaRa, 大连)操作步骤逆转录合成, 用于 RACE 扩增。

根据已报道物种 CMO 基因 cDNA 的同源序列来设计兼并引物 CMO-F 和 CMO-R(表 1), 用以扩增北美海蓬子 CMO 基因核心片段。根据北美海蓬子 CMO 基因核心序列, 设计 5'RACE 和 3'RACE 特异引物(表 1), 参照 SMARTTM RACE Amplification Kit(Clontech, 美国)的操作步骤分别对 5'和 3'进行巢式 PCR 扩增。3'RACE: 第 1 轮反应引物是 CMO 3-1 和 3'RACE primer, 以北美海蓬子逆转录后 cDNA 为模板进行 PCR 扩增; 第 2 轮反应引物用 CMO 3-2 和 3'RACE primer, 以第一轮中获得的产物稀释 10 倍作为模板进行 PCR 扩增。5'RACE: 第 1 轮 PCR 反应以 CMO 5-1 和 NUP 为引物, 模板是以构建好的 5'RACE cDNA 文库进行扩增反应; 第 2 轮 PCR 反应引物用 CMO 5-2 和 NUP, 以第 1 轮中获得的产物稀释 10 倍作为模板进行 PCR 扩增。PCR 扩增测序后将得到的 5'RACE 末端序列、3'RACE 末端序列和核心片段序列用 Vector NTI Suite 7.0 软件比对接, 初步得到 CMO 基因的 cDNA 全长序列。

表 1 本研究所用引物列表

引物名称	引物序列(5'-3')
CMO-F	TGCCC/TTTAC/TCATGGATGGG/AT/C
CMO-R	GTT/A/GG/TT/CCATCCAAGG/TG/TCCATACC
CMO 3-1	ATGGATGGGTGTTTGGCTTAG
CMO 3-2	TGGAAGTGAAGTGGCTTGCTAG
3'RACE	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T) ₃₀ VN
CMO 5-1	CATAGTATTTGTGGGCATAAGGAAC
CMO 5-2	GCATCAGTTGTTTGGGTGGCTT
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG
C-qF	GGAAGTGAAGTGGCTTGCTAG
C-qR	GTTGCATAGTATTTGTGGGC
Actin-qF	ATCCCAAGGCTAATCGTGAAAA
Actin-qR	CAC CATCACCA GAGTCCAACA

1.3 北美海蓬子 CMO 蛋白的生物信息学分析

利用 Vector NTI Suite 7.0 软件和 BLAST 工具进行序列比对分析; 蛋白质的亲水/疏水性、跨膜结构域、转运肽和功能结构域分析分别由 ProtScale、TMHMM 2.0 Server、Psort 和 CDD 在线工具进行分析; 运用 Expasy ProtParam、PSIPRED 软件分析蛋白质的一级、二级结构; 系统进化树使用 MEGA 5.0 软件中的邻接法(Neighbor joining)构建。

1.4 NaCl 处理北美海蓬子 CMO 基因的表达特性

将幼苗分别用含 0, 100, 200 mmol·L⁻¹ NaCl 的 10% MS 营养液浇灌, 每个 NaCl 浓度设 3 个重复, 胁迫处理 1 周。提取不同处理组北美海蓬子的总 RNA, 用超微量核酸定量仪检测 RNA 纯度和浓度。以反转录得到的北美海蓬子 cDNA 稀释 10 倍作为模板, C-qF/C-qR 和 Actin-qF/Actin-qR 为引物(表 1), 进行实时荧光定量 PCR 反应。反应用 SYBR Premix Ex TaqTM (Perfect Real Time)试剂盒, 在 Realplex4 型定量 PCR 仪上进行, 北美海蓬子 CMO 基因引物反应体系为: 10 μL 2×SYBR[®] Premix Ex TaqTM, C-qF/C-qR 各 0.8 μL, 2 μL cDNA 模板, 6.4 μL ddH₂O; 反应程序为: 95 °C 2 min(1 个循环); 95 °C 15 s, 52 °C 15 s, 68 °C 20 s (40 个循环); 60 °C 15 s(1 个循环); 95 °C 15 s(1 个循环)。Actin 内参基因引物反应体系: 10 μL 2×SYBR Premix Ex TaqTM, Actin-qF/Actin-qR 各 0.8 μL, 2 μL cDNA 模板, 6.4 μL ddH₂O, 反应程序同上。反应结束后分别对扩增曲线和融解曲线进行分析确认。利用 $F = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算北美海蓬子 CMO 基因相对表达量^[12], 每个样品重复 3 次, 数据的统计分析使用 SPSS 软件。

2 结果与分析

2.1 北美海蓬子 CMO 基因 cDNA 全长序列

利用 RACE 技术扩增得到北美海蓬子 CMO 基因核心片段、3'端序列和 5'端序列, 测序结果显示片段长度分别为 518 bp、977 bp 和 763 bp(图 1), 将 3 段序列拼接得到北美海蓬子 CMO 基因的 cDNA 全长为 1 834 bp(图 2)。

2.2 北美海蓬子 CMO 蛋白的生物信息学分析

2.2.1 北美海蓬子 CMO 蛋白的氨基酸序列组成成分及理化性质分析

北美海蓬子 CMO 基因 cDNA 序列全长 1 834 bp,

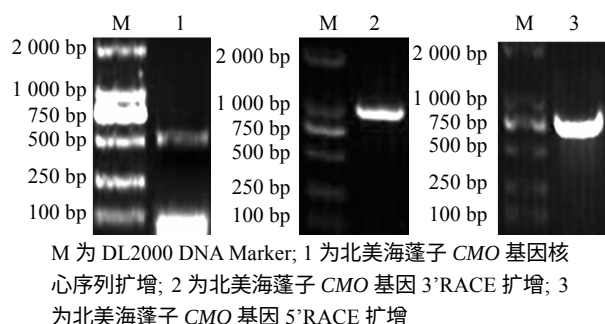


图 1 北美海蓬子 CMO 基因 PCR 扩增结果

ORF 为 1317 bp, 编码 439 个氨基酸, 蛋白质分子量预测有 49.537 kDa, 理论等电点 6.15. 该蛋白含有

20 种氨基酸, 含量最多的是缬氨酸(Val), 含量最低的是甲硫氨酸(Met). 北美海蓬子 CMO 蛋白和 GenBank 上已发表的相关物种 CMO 蛋白氨基酸序列同源比对显示, 它与欧洲海蓬子(*Salicornia europaea*)的相似性最高, 达 97%, 与辽宁碱蓬(*Suaeda liaotungensis*)、梭梭、甜菜、山菠菜等的相似性分别为 83%、79%、77%、74%, 说明笔者所获得的基因属于 CMO 基因. 北美海蓬子 CMO 蛋白序列中含有 CMO 蛋白中所特有的 2 个高度保守域, 一个是位于 163-185 位氨基酸的单核 Rieske 型 2Fe-2S 结构域, 表示为 CXHX₁₅₋₁₇CX₂H; 另一个是位于第

```

1      GGCACATACTCAAACAATACTAAGGAAGGCTCATTATAAAATACTGAAAAACAATCAATT
61     AAAGGAGTTATTAAATTAACCTCATAATAATAACAATAATCATCTAAAAAACTTTGTT
121    TGATTTTTTATTTTTTTTCAATTATTTTAAGATGGCAGCAGCCGCAAGTGCTACAACA
1      1
181    TGTTGCTAAAAATACCCATCACTCTGTTCACTTCCCAATTCATCATCATCACCATCAAACA
10     M L L K Y P S L C S L P N S S S S S P S N
241    ATAACAATGAATGTTCAAGAGATCTGAACATTCCACAAACAACACTCCGTTACTGAAAT
30     N N N E C S R D L N I P Q T N T P L L K
301    TCCGAGCACAACTAATAAACTGGTGGCGAAGCGGTGGCGTCGCCGGTGTTCCTGTTT
50     F R A Q P N K L V A N A V A S P V F P C
361    TAACAACCAACAACACCGTCATCTGTTAAACAACCTGTTTCATGAATTTGACCCATAAAA
70     L T T T T T P S S V K Q L V H E F D P K
421    TACCTGCTGAAGATGCTCTTACTCCTCCTAGTTCTTGGTACACTGAACCTGCTTTTTATT
90     I P A E D A L T P P S S W Y T E P A F Y
481    CTCATGAACCTTGACCGTATTTTCTACAAAGGCTGGCAAGTTGCAGGAATTAGTACCAAA
110    S H E L D R I F Y K G W Q V A G I S D Q
541    TTAAGGAGAAAAACCAATACTTCACTGGCAGGTTAGGAAATGTTGAATATGTGTGTGTC
130    I K E K N Q Y F T G R L G N V E Y V V C
601    GAGATGGTGAAGGAAAAGTTCATGCATTTTACAATGTTTGCCTCACCCTGCTTCTATTC
150    R D G E G K V H A F H N V C T H R A S I
661    TTGCTTGTGGAAGCGGCAAAAGATCCTGTTTGTGTGTCCTTACCATTGGATGGGTGTTG
170    L A C G S G K K S C F V C P Y H G W V F
721    GCTTAGATGGAGACCTCACAAAAGCCACCCAAACAACCTGATGCTCAAACATTTGATCCTA
190    G L D G D L T K A T Q T T D A Q T F D P
781    AAGAATATGGACTAGTACCACTAAAGGTAGCAGAGTGGGGACCATTGTTTTGATTAGTG
210    K E Y G L V P L K V A E W G P F V L I S
841    TGGACAAAAATCTTCTGAGACTGATCCTGGAAGTGGCTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
230    V D K N L P E T D P G T E W L G S S A E
901    ATGTTAAGGCCCATGCTTTTATGATCCCAACCTCCAATTCATCCATAGAAGTGAATTTCCCA
250    D V K A H A F D P N L Q F I H R S E F P
961    TGGAATGCAACTGGAAGGTTTTCTGTGACAACCTATGTGGACAGCTCTTATCATGTTCTCT
270    M E C N W K V F C D N Y V D S S Y H V P
1021   ATGCCCAACAATACTATGCAACTGAACTTGACTTTGACACTTATGACACTCAAACGATCG
290   Y A H K Y Y A T E L D F D T Y D T Q T I
1081   GCAAGTGGTGTATCCAAAGAGTTGCAGGCAATTCAAACAAGCCTGATGGTGTGATAGAC
310   G K V V I Q R V A G N S N K P D G F D R
1141   TTGGAACCAAGCATTCTATGCTTTTCTTATCCTAACGTTGCTGTTGAAAGGTATGGCC
330   L G N Q A F Y A F A Y P N V A V E R Y G
1201   CTTGGATGACAACAATGCATGTCCACCAATAGCTCAAAGGAAATGCAAATTAGTGGTGG
350   P W M T T M H V H P I A Q R K C K L V V
1261   ACTATTACATTGAAAAATCTATGCTGGATGACAAGGAATACATAGACAGAGGCATAGCAA
370   D Y Y I E K S M L D D K E Y I D R V C I A
1321   TCAACGATAACGTACAGAGGGAAGATAAGGTGTTGTGTGAAAGAGTCCAAAATGGTCTGG
390   I N D N V Q R E D K V L C E R V Q N G L
1381   AAACACCAGCCTATCGCAGTGGCAGATATGTGATGCCAATTGAGAAAGGAATCCACCAATT
410   E T P A Y R S G R Y V M P I E K G I H H
1441   TCCACTGCTGTTGACCAAAATTTGAAGTGAATTAATTTTGTGAGGTTTCTGCGAGCGC
430   F H C W L H Q I L K *
1501   GCAGGCATGCCCGCCCCTATATGTCCTTTTTCATTCTTTTACTCCTTAAAAATAATGGTTC
1561   TGTTTTTTTATAGATCTGGATTTTAAGGTTTCAGGAGCAACATTTTTTATTGCGCGGGTACTG
1621   GGATTTTGGTGTCTACTGTCCAATACTTTTCTACATAAATAAAGCATAGACACCCCTTT
1681   TTCCCTAAAAGAAGAAGCTTAGTTATTTTCTTAAAGAGGATGGGAATTTGAGCTTGTGTTA
1741   TGAACCTTATTTATTTATGTAGGTGTGTTGATTTTTATTTTAAAGAAGACTCCTTTTTATTAT
180    CGCGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

下划线部分为单核 Rieske 型 2Fe-2S 结构域 CXHX₁₅₋₁₇CX₂H, 方框部分为单核 Fe 结合域 G/DX₃₋₄DX₂HX₄₋₅H, 加粗核苷酸分别为起始密码子和终止密码子(*) (X 均代表任意氨基酸残基)

图 2 北美海蓬子 CMO 基因 cDNA 核苷酸序列和预测的氨基酸序列

279-292 位氨基酸的单核非血红素 Fe 结合域, 表示为 G/DX₃₋₄DX₂HX₄₋₅H(其中 X 均代表任意氨基酸残基)(图 2).

2.2.2 北美海蓬子 CMO 蛋白结构和同源特征

利用 ProtScale 在线分析北美海蓬子 CMO 蛋白疏水性/亲水性, 结果显示, 北美海蓬子 CMO 蛋白疏水性最大值为 1.756, 位于第 226 个氨基酸处; 亲水峰最大值为 -2.8, 位于第 395 个氨基酸处, 且数量多于疏水峰, 由此推测北美海蓬子 CMO 蛋白属亲水性蛋白(图 3).

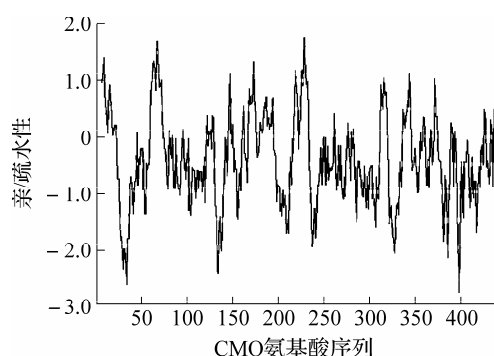


图 3 北美海蓬子 CMO 蛋白的亲/疏水性预测

北美海蓬子 CMO 蛋白转运肽预测结果显示, 该蛋白预测定位在叶绿体基质中的概率是 0.950. Psort 分析显示北美海蓬子 CMO 蛋白在位于 57~70 位氨基酸残基间存在亚细胞定位的单极性信号片段, 在 1~56 位氨基酸残基间为转运肽残基片段, 参与 CMO 蛋白在叶绿体内的定向转运功能.

对北美海蓬子 CMO 蛋白进行跨膜结构域预测显示, 该蛋白整条肽链跨膜螺旋中氨基酸残基数为 0.168 85, 并且前 60 个氨基酸中跨膜螺旋中的残基数为 0.029 78, 存在跨膜结构域的可能性小于 1, 蛋白全部位于膜外, 说明其不具跨膜区域. 同时分析欧洲海蓬子、辽宁碱蓬、梭梭、甜菜等植物的 CMO 跨膜结构域, 其预测结果与北美海蓬子相似.

根据 CDD 在线分析显示, 北美海蓬子 CMO 蛋白具有 2 个功能域: 一个是与 Rieske 家族有较高同源性的位于 120~237 肽段的 N 端, 是单核 Rieske 类型的 2Fe-2S 中心形成区域; 一个是与 SRPBCC 家族有较高同源性的位于 263-439 肽段的 C 端, 其含有 3 个主要位点, 分别为单分子非血红素 Fe 离子结合位点、亚基作用位点以及底物结合位点, 可将 α -羟基氧化催化成为醛基^[13].

北美海蓬子 CMO 蛋白二级结构预测结果显示, α -螺旋占 21.41%, β -折叠占 23.46%, 无规则卷曲占 45.10%, 显然北美海蓬子 CMO 蛋白中以无规卷曲为主要构件, 并且在整个肽链中分散分布(图 4).

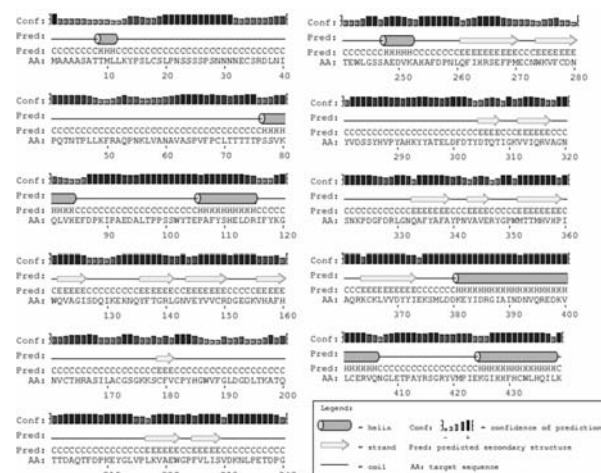


图 4 北美海蓬子 CMO 氨基酸序列二级结构预测

利用 MEGA 5.0 软件的邻近相连法对不同植物完整的 CMO 氨基酸序列构建系统进化树(图 5), 结果显示, 北美海蓬子 CMO 蛋白与欧洲海蓬子、辽宁碱蓬、梭梭等双子叶植物聚为一大类, 其中北美海蓬子与欧洲海蓬子的亲缘关系最近, 而与蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*)、水稻 (*Oryza sativa Japonica*)、玉米 (*Zea mays*) 等豆科和禾本科单子叶植物组成的另一进化分支则亲缘关系较远, 符合理论上的进化关系.

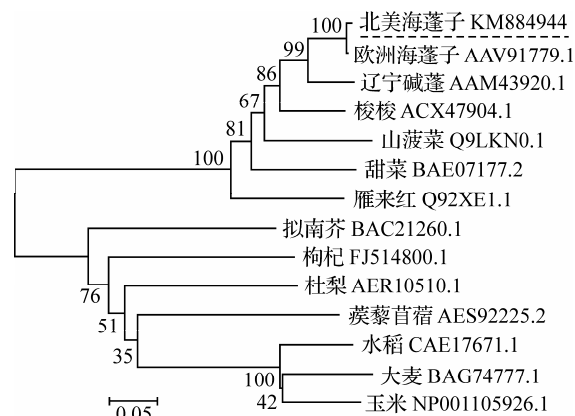


图 5 北美海蓬子 CMO 蛋白与其他植物 CMO 氨基酸序列的系统发育树

2.2.3 NaCl 处理北美海蓬子 CMO 基因表达特性分析
用实时荧光定量 PCR 检测北美海蓬子 CMO 基因在 NaCl 胁迫下的表达特性, 结果如图 6 所示, 随

着 NaCl 浓度升高, 其表达量升高, 在 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫下, 北美海蓬子 *CMO* 的表达量达到最大, 是对照组无 NaCl 胁迫的 2.3 倍多, 两者相比具有极显著差异 ($P < 0.01$), 说明一定浓度的 NaCl 胁迫可以诱导北美海蓬子 *CMO* 基因的表达量增加, 可初步推断其参与了北美海蓬子对盐胁迫的抗逆反应。

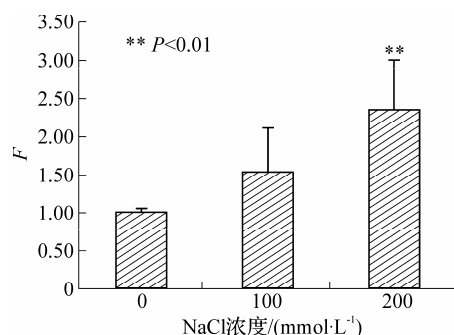


图6 不同浓度 NaCl 胁迫下北美海蓬子 *CMO* 基因的表达

3 讨论

植物在高盐、低温、干旱等逆境胁迫下, 作为细胞中一种重要有机渗透调节物质的 GB, 对蛋白质、代谢酶类和生物膜的结构和功能有保护作用, 可以提高它们对逆境的抵抗能力。因此, *CMO* 作为 GB 合成途径中的关键限速酶之一, 对其生物信息学和表达模式进行相关分析, 为进一步开展 *CMO* 基因在植物体内的合成代谢途径及抗逆调控机制方面的研究奠定理论基础。

文中选择世界上最具耐盐性植物之一的北美海蓬子, 运用 RACE 技术成功克隆了 GB 生物合成途径中的 1 个关键酶基因 *CMO*。北美海蓬子 *CMO* 蛋白为核基因编码蛋白, 预测其主要是定位于叶绿体中, 这与其他植物中报道的一致; 而且, 与其他植物的 *CMO* 相比, 其序列的 ORF 长度、蛋白质分子量、编码氨基酸个数以及理论等电点等均相近。氨基酸序列与其他物种也具有较高的相似性, 与梭梭、甜菜、山菠菜等的相似性都在 74% 以上; 位于第 163~185 位氨基酸的单核 Rieske 型 2Fe-2S 结构域和位于第 279~292 位氨基酸的单核非血红素 Fe 结合域是 *CMO* 蛋白中 2 个高度保守的功能域, 研究表明这 2 个保守的功能域是形成 *CMO* 活性中心, 对 *CMO* 酶活性有重要作用^[14-15], 该区域能通过铁氧还原蛋白利用胆碱脱下的氢原子, 将其传递给氧原子, 从而合成甜菜碱醛, 该特征与单氧化

酶相符合。另外, 预测北美海蓬子 *CMO* 蛋白不存在跨膜区域, 属于基质蛋白^[16], 这与该整个多肽链表现为亲水性相吻合。在二级结构分析预测中, 显示无规则卷曲是北美海蓬子 *CMO* 蛋白中的主要元件, 这与菠菜、山菠菜、雁来红 (*Amaranthus tricolor*) 的 *CMO* 二级结构中的情况相似。进化树显示, 属于双子叶植物的藜科和苋科的 *CMO* 基因在一个主分支上, 与北美海蓬子 *CMO* 基因亲缘关系较近, 而属于单子叶植物的豆科和禾本科的 *CMO* 基因在另一个分支上, 与其亲缘关系较远, 该结果与物种间亲缘关系的远近具有一致性。说明北美海蓬子 *CMO* 基因在植物遗传进化研究方面可作为重要的理论参考依据。

北美海蓬子 *CMO* 基因在盐胁迫下可诱导表达, 其在北美海蓬子中的表达量随着 NaCl 浓度的升高而增加, 在 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫下, 北美海蓬子 *CMO* 的表达量达到最大, 与对照组无 NaCl 胁迫相比有极显著差异 ($P < 0.01$)。潘丽娟等^[17]对水稻进行低温、高盐和干旱等胁迫, 发现水稻 *OsCMO* 基因在胁迫过程中表达量升高, 从而发挥其重要功能; 李慧等^[10]在研究高盐和干旱胁迫下杜梨中 *PbCMO* 基因的表达特性, 发现该基因表达量在这 2 种胁迫下均有一定程度的提高。另外, 还有对山菠菜^[18]、茶树^[11]及辽宁碱蓬^[19]的胁迫研究中, 也有相似结果。本研究结果与他们基本一致, 这为进一步揭示北美海蓬子 *CMO* 基因耐盐机制及利用该基因进行遗传工程开发耐盐新品种提供理论基础。

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] CHEN T H, MURATA N. Glycine betaine: An effective protectant against abiotic stress in plants[J]. Trends in Plant Science, 2008, 13(9):499-505.
- [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] SHIRASAWA K, TAKABE T, TAKABE T, et al. Accumulation of glycine betaine in rice plants that overexpress choline monooxygenase from spinach and evaluation of their tolerance to abiotic stress[J]. Annals of Botany, 2006, 98(3):565-571.
- [5] RATHINASABAPATHI B, BURNET M, RUSSELL B L,

- et al. Choline monooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in plants: Prosthetic group characterization and cDNA cloning[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94(7):3454-3458.
- [6] ZHANG J, TAN W, YANG X H, ET al. Plastid-expressed choline monooxygenase gene improves salt and drought tolerance through accumulation of glycine betaine in tobacco[J]. *Plant Cell Reports*, 2008, 27(6):1113-1124.
- [7] 罗伯样, 肖自有, 邓力华, 等. 转山菠菜胆碱单加氧酶基因(*AhCMO*)水稻创制及其耐盐性研究[J]. *生命科学*, 2010, 14(3): 219-225.
- [8] 任小燕, 杜建中, 孙毅. 转 *AhCMO* 基因玉米后代获得及耐盐性鉴定[J]. *分子植物育种*, 2013, 11(3):332-338.
- [9] 石磊, 甘晓燕, 宋玉霞, 等. 梭梭 *CMO* 基因的克隆与植物表达载体的构建[J]. *西北植物学报*, 2010, 30(8): 1514-1519.
- [10] 李慧, 丛郁, 常有宏, 等. 杜梨胆碱单加氧酶基因克隆及胁迫表达[J]. *西北植物学报*, 2012, 32(6):1093-1098.
- [11] 曹红利, 岳川, 郝心愿, 等. 茶树胆碱单加氧酶 *CsCMO* 的克隆及甜菜碱合成关键基因的表达分析[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(15):3087-3096.
- [12] 李敏, 张健, 王奎山, 等. 耐盐柳树 *BADH* 基因克隆及表达分析[J]. *江苏农业学报*, 2013, 29(3):485-489.
- [13] 黑蕾. 青稞胆碱单加氧酶基因 cDNA 全长开放阅读框克隆及序列分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2010, 29(5):897-903.
- [14] LUO D, NIU X, YU J, et al. Rice Choline monooxygenase (*OsCMO*) protein functions in enhancing glycine betaine biosynthesis in transgenic tobacco but does not accumulate in rice (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*)[J]. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(9):1625-1635.
- [15] MITSUYA S, KUWAHARA J, OZAKI K, et al. Isolation and characterization of a novel peroxisomal choline monooxygenase in barley[J]. *Planta*, 2011, 234(6):1215-1226.
- [16] 冯潜, 弄庆媛, 麦秀英, 等. 植物胆碱单氧化酶的生物信息学分析[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(24):194-200.
- [17] 潘丽娟, 黄骥, 王州飞, 等. 水稻胆碱单加氧酶基因的克隆与表达分析. *分子植物育种*, 2007, 5(1):8-14.
- [18] 沈义国, 杜保兴, 张劲松, 等. 山菠菜胆碱单氧化物酶基因(*CMO*)的克隆与分析[J]. *生物工程学报*, 2001, 17(1):1-6.
- [19] 夏冰. 非生物胁迫下 *SICMO* 基因在辽宁碱蓬和 *pC-CMO* 转基因烟草中表达特性分析[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2013.

Cloning and Expression Analysis of Choline Monooxygenase (*CMO*) Gene in *Salicornia Bigelovii* Torr.

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

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Choline monooxygenase (*CMO*) is one of the key enzymes involved in the Glycine betaine (*GB*) biosynthesis pathway. In this study, *CMO* gene (GenBank accession No. KM884944) complete cDNA length is cloned from *Salicornia Bigelovii* Torr. based on RACE technology, and characterized for the sequence in terms of bioinformation by various software packages. The cDNA is comprised of 1834 bp, containing a 1317 bp ORF which encodes 439 amino acid residues with a predicted molecular mass of 49.537 kDa and theoretical pI of 6.15. The *Salicornia Bigelovii* Torr. *CMO* protein shares more than 50% amino acid sequence similarity with that of other plants except *Medicago truncatula* (46%) and *Oryza sativa Japonica* (49%). It contains two consensus domains and two functional domains. There is no transmembrane domain. The phylogenetic tree analysis indicates that *CMO* has the closest genetic relationship with *Salicornia europaea*. Real-time quantitative PCR reveals that the expressions of *Salicornia Bigelovii* Torr. *CMO* gene is up-regulated by NaCl. The results demonstrate that *CMO* gene expression of *Salicornia Bigelovii* Torr. can be induced by NaCl stress.

Key words: *Salicornia Bigelovii* Torr.; glycine betaine (*GB*); choline monooxygenase (*CMO*); bioinformatics; expression analysis

(责任编辑 章践立)