科学通报
第40卷 第8期 CHINESE SCIENCE BULLETIN 1995年4月

山菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因研究*

肖 岗 张耕耘 刘凤华 王 军 陈受宜**
(中国科学院遗传学研究所，北京 100101)
李 聪 耿华珠
(中国农业科学院畜牧研究所，北京 100094)

关键词 山菠菜 甜菜碱醛脱氢酶基因 序列分析 在大肠杆菌中表达

多种高等植物在盐碱或缺水的环境下，在细胞中积累甘氨酸甜菜碱类物质，以维持细胞的正常膨压．甜菜碱起着无毒渗透保护剂的作用，它的积累使得许多代谢中的重要酶类在渗透胁迫下能保持活性[1]．在植物中，甜菜碱由胆碱经两步氧化得到，两步反应均发生在叶绿体基质中[2]，催化第一步反应的酶是一类单氧化物酶，定名为胆碱单氧化物酶．催化第二步反应的

$$\underset{\text{胆碱}}{(CH_3)_3N^+CH_2CH_2OH} \rightarrow \underset{\text{甜菜碱醛}}{(CH_2)_3N^+CH_2CHD} \rightarrow \underset{\text{甜菜碱}}{(CH_3)_3N^+CH_2COO^-}$$

是甜菜碱醛脱氢酶(BADH, EC1.2.1.8.)，已纯化了波菜BADH酶并克隆及序列分析了菠菜及甜菜的BADH cDNA[2, 3]，已证明菠菜叶和根中BADH的合成是受盐胁迫诱导的．山菠菜与菠菜同属藜科，其耐盐性远高于菠菜．研究山菠菜BADH基因的结构特性及表达调控将有助于阐明植物调渗作用分子机制，同时为植物耐盐基因工程打下基础．本文报道了山菠菜BADH结构基因及菠菜与山菜中该基因3'端部分的序列分析以及BADH结构基因在大肠杆菌中的表达．

1 材料与方法

1.1 植物材料

山菠菜(*Atriplex hortensis*)和菠菜(*Spinacia oleracea* L.)均种于温室内，当植株生长至株高10cm左右(约30～40d)时，加入NaCl，终浓度为0.8%，胁迫5～10d.

1.2 BADH活性分析

(1)植物组织中BADH活性测定[4]．2g植物组织在液氮中研磨后于室温下加入提取液(50 mmol/L Hepes/KOH pH 8.0, 1mmol/L EDTA, 5mmol/L DTT)抽提，4℃下离心14 000r/min, 10min，取100μL上清液加入适量载样缓冲液，采用柱状聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析，凝胶浓度为7%, 140V, 6h. 电泳完毕后剥离凝胶条，立即进行酶的染色，染色液为150mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 5mmol/L甜菜碱醛，1mmol/L NAD, 300μg/mL Nitro blue tetrazolium, 20 μg/mL Phenazine methosulfate.

1994-06-14收稿，1994-10-17收修改稿
*国家高技术计划资助项目
**联系人

(2)转化菌中 BADH 活性测定. 按文献[5] 进行,以转化空载体 PKK223-3 的转化菌为对照.

1.3 植物总 DNA 和 cDNA 制备

取 4g 去脉叶组织为材料提取总 DNA,方法见文献[6]. cDNA 合成按照 Jurgen 1987 方法进行[7].

1.4 PCR 扩增

(1) 引物设计. 我们合成的 3 个引物分别为:

引物 1, 5′ AGAATGGCGTTCCCAATTCCTGCTC 3′;

引物 2, 5′ TTGGGTTAATTGCTCACAACCATGC 3′;

引物 3, 5′ TTCAAGGAGACTTGTACCATCCCCA 3′.

其中引物 1 和 3 用于山菠菜结构基因扩增,引物 2 和 3 用于基因 3′ 端部分片段扩增.

(2)扩增反应. 扩增反应总体积为 50μL 含 10mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 50mmol/L KCl, 1.5mmol/L $MgCl_2$, 200 μmol/L 每种 dNTP, 25pmol 每种引物,1μg 总 DNA 模板或 200 ~ 500ng 单链 cDNA,以及 1.25U Taq 聚合酶. 扩增条件为预变性 95 ℃, 10min 之后进入 93.5 ℃, 1min, 55 ℃, 1min, 72 ℃, 1.5min 的 30 圈循环过程,之后再于 72 ℃ 保温 10min,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析. 电泳后将所需条带切出,用 Gene Clean Kit 回收. 回收后的 DNA 插入质粒 pUC19,转化 *E. coli* JM83[8]. 所有克隆的 PCR 产生均经再次 PCR 扩增验证.

1.5 序列分析

所有的序列分析均以双链质粒为模板,用 Sanger(1977) 经双链全测序方法完成.

1.6 BADH 结构基因表达质粒的构建

所用大肠杆菌表达载体为 pKK233-3.

2 结果和讨论

2.1 山菠菜叶中 BADH 酶活性是受盐胁迫诱导的

藜科等高等植物细胞中甜菜碱的积累主要与生物合成有关. 菠菜的盐胁迫实验显示,在 300mmol/L NaCl 胁迫下 BADH 的 mRNA 量增加 2 倍以上,酶活性增加约 3 倍[4, 5]. 甜菜的盐胁迫实验也得到相似的结果. 山菠菜与菠菜同属藜科,山菠菜生长在海边及盐碱滩上,对盐害的耐受性远比菠菜强. 我们的实验结果显示在 0.8%NaCl 胁迫下,菠菜和山菠菜叶 BADH 同工酶活性比正常条件下分别增加约 1 倍和 3 倍(图 1). 说明 BADH 基因的表达是受盐胁迫诱导的. 而盐诱导作用在山菠菜中更为明显. 同时,山菠菜在正常及胁迫诱导下其 BADH 活性显著高于菠菜(图 1),表明 BADH 的活性与植物对盐胁迫的耐受性有一定的相关性.

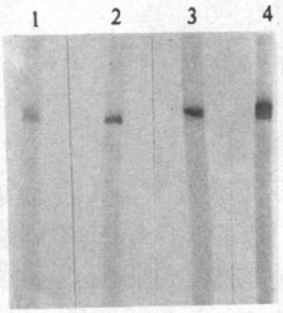


图 1 菠菜和山菠菜在正常和盐胁迫下 BADH 同工酶活性分析

1, 2 为正常条件下样品, 3, 4 为 0.8%NaCl 胁迫样品. 1, 3 为菠菜, 2, 4 为山菠菜. 1 上样量为 1.5mg, 2, 3, 4 上样量为 1.0 mg

虽然在高等植物中 BADH 分别存在叶绿体和细胞质中,表现为两种形式的同工酶. 但据报道,BADH 的活性主要存在于叶绿体中 (>90%)[5], 这两种形式同工酶的生化

性质极为相近，在酶反应的染色过程中，低活性的胞质区带常常会被叶绿体的区带所掩盖. 我们在菠菜与山菠菜中 BADH 活性的观察也证实了这一点.

2.2　山菠菜 BADH 结构基因克隆及序列特性

PCR 技术关键之一是引物设计，我们首先从植物其它醛脱氢酶结构基因中推知 BADH 中内含子的分布情况，再根据已发表的菠菜 cDNA 序列资料设计了引物 1, 2, 3. 3 个引物分别用于扩增 BADH 的结构基因(引物 1, 3)和 3'端部分基因(引物 2, 3).

以山菠菜 cDNA 为模板，运用引物 1 和 3 进行 PCR 扩增获得约 1.5kb 的单一条带(图 2)，序列分析表明该片段为 BADH 的 cDNA 全长基因，其长度为 1 509bp，有一编码 503 个氨基酸的开放读码框架(图 3，位于 773～811 密码子所相应十肽 Val-Thr-Leu-Geu-Gly-Gly-Lys-Ser-Pro 以及与酶功能有关的 868～870 位编码的 Cys(图 4)为醛脱氢酶高度保守的序列[5]. 同源性分析表明，山菠菜 BADH 基因与已发表的菠菜 BADH cDNA[2] 有 87.5% 的同源性，与甜菜 BADH cDNA[3] 有 88.1% 同源性(Dnasis Computer Program, Hitachi)(图 3) 由它们的核苷酸推测的氨基酸序列的同源性分别为 90.1% 及 87.8%(资料未列出).



图 2　以山菠菜 cDNA 为模板经引物 1, 2 PCR 扩增产物的琼脂糖电泳分析
1为标准分子量，2为山菠菜 cDNA PCR 扩增产物

山菠菜无论在正常还是盐胁迫下 BADH 活性均明显高于菠菜，两者间氨基酸序列的差异或许是其中一方面的原因，然而，甜菜与山菠菜均较菠菜更为耐盐，却未发现其结构基因有与耐盐性状相关处，因此，基因调控所起的作用或许更大，当然这还有待进一步实验证明.

```
                M  A  F  F  I  P  A  R  Q  L  F  I  D  G  E  W  R  E  F  L  L  K  N  R  I  P  I  I  M
山菠菜    1     AGAATGGCGTTCCCAATTCCTGCTCGTCAACTCTTCATCGATGGAGAGTGGAGAGAACCCCTTTTAAAAAATCGCATACCCATCATCAAC
菠菜      1     AGAATGGCGTTCCCAATTCCTGCTCGTCAGCTATTCATCGACGGAGAGTGGAGAGAACCCATTAAAAAAAATCGCATACCCGTCATCAAT

                P  S  T  E  E  I  I  G  D  I  P  A  A  T  A  E  D  V  E  V  A  V  V  A  A  R  K  A  F  K
 91     CCTTCTACTGAAGAAATCATCGGTGATATTCCTGCAGCAACTGCAGAGGATGTGGAGGTTGCAGTGGTGGCAGCTAGAAAAGCCTTTAAG
        CCGTCCACTGAAGAAATCATCGGTGATATTCCGGCAGCCACGGCTGAAGATGTGGAGGTTGCGGTGGTGGCAGCTCGAAGAGCCTTTAGG

                R  N  K  G  R  D  W  A  A  L  W  S  H  R  A  K  Y  L  R  A  I  A  A  K  I  T  E  K  K  D
 181    AGGAACAAAGGCAGAGATTGGGCTGCACTCTGGTCTCATCGTGCTAAATATTTGCGTGCTATTGCTGCTAAGATAACAGAGAAAAAAAGAT
        AGGAACAATTGGTCAGCAACATCTGGGGCTCATCGTGCCACATACTTGCGTGCTATTGCTGCTAAGATAACAGAAAAAAAAGATCATTTC

                H  F  V  K  L  E  T  L  D  S  G  K  P  R  D  E  A  V  L  D  I  D  D  V  A  T  C  F  E  Y
 271    CATTTTGTTAAACTGGAAACCCTTGATTCTGGAAAACCACGGGATGAAGCAGTGTTAGATATTGATGATGTTGCTACATGCTTTGAATAC
        GTTAAACTGGAAACCATTGATTCTGGGAAACCTTTTGATGAAGCAGTGCTGGACATTGATGACGTTGCTTCATGTTTTGAATATTTTGCC

                P  E  Y  F  A  G  Q  Q  A  E  A  L  D  A  K  Q  K  A  F  V  T  L  P  M  E  R  F  K  S  H  V
 361    TTTGAATACTTTGCCGGTCAAGCAGAAGCTCTGGATGCTAAACAAAAGGCTCCAGTCACCCTGCCTATGGAAAGATTTAAAAGTCATGTT
        GGACAAGCAGAAGCTCTTGATGGTAAACAAAAGGCTCCAGTCACCCTGCCTATGGAAAGGTTCAAAAGTCATGTTCTCAGGCAGCCCCTT

                L  R  Q  F  I  G  V  V  G  L  I  S  P  W  N  Y  P  L  L  M  D  T  W  K  I  A  P  A  L  A
 451    CTCAGGCAGCCCATTGGTGTTGTTGGATTAATATCCCCATGGAATTACCCACTTCTAATGGCTACATGGAAAATTGCTCCCGCACTTGCT
        GGTGTTGTTGGATTAATATCCCCATGGAATTACCCACTTCTAATGGCTACATGGAAAATTGCTCCAGCACTTGCTGCTGGGTGTACAGCT

                A  G  C  T  T  V  L  K  P  S  E  L  A  S  V  T  C  L  E  F  G  E  V  C  N  E  V  G  L  P
 541    GCTGGATGCACGACTGTACTTAAACCATCAGAATTGGCATCTGTGACTTGTCTAGAATTCGGTGAAGTTTGCAACGAAGTGGGACTTCCT
        GTACTTAAGCCATCCGAGTTGGCATCTGTGACTTGTCTAGAATTCGGTGAAGTTTGCAACGAAGTGGGACTTCCTCCAGGCGTGTTGAAT
```

```
    P  G  V  L  N  I  L  T  G  L  G  P  D  A  G  A  P  I  V  S  K  F  D  I  D  K  V  A  F  T
631 CCAGGCGTGTTGAATATCTTGACAGGATTAGGTCCTGATGCTGGTGCCCCAATAGTATCTCATCCTGATATTGACAAGGTAGCATTTACT
    ATCTTGACAGGATTAGGTCCAGATGCTGGTGCACCATTAGTATCACACCCCGATGTTGACAAGATTGCCTTTACTGGGAGTAGTGCCACT

    G  S  S  A  T  G  S  K  I  M  A  S  A  A  Q  L  V  K  F  V  T  L  E  L  G  G  K  S  F  V
721 GGGAGTAGTGCCACTGGAAGCAAGATTATGGCTTCTGCTGCCCAACTAGTTAAGCCTGTTACTTTGGAGCTTGGAGGTAAAAGTCCTGTT
    GGAAGCAAGGTTATGGCTTCTGCTGCCCAATTGGTTAAGCCTGTTACATTAGAACTTGGGGGTAAAAGTCCTATTGTAGTGTTTGAAGAT

    I  M  F  E  D  I  D  I  E  T  A  V  E  W  T  L  F  G  V  F  W  T  N  G  Q  I  C  S  A  T
811 ATCATGTTCGAAGATATTGATATTGAAACAGCTGTTGAATGGACTCTTTTTGGCGTTTTCTGGACAAATGGTCAAATCTGTAGTGCAACA
    GTTGATATTGATAAAGTTGTGGAATGGACTATTTTTGGCTGTTTCTGGACAAATGGTCAAATATGTAGTGCAACGTCTAGACTGCTTGTG

    S  R  L  L  V  H  E  S  I  A  A  E  F  V  D  R  M  V  K  W  T  K  N  I  K  I  S  D  F  F
901 TCTAGACTACTTGTGCATGAAAGCATTGCAGCTGAATTTGTTGATAGGATGGTGAAGTGGACAAAAAACATAAAAATTTCTGATCCATTT
    CATGAAAGTATTGCAGCTGAGTTTGTTGATAAGCTTGTAAAATGGACGAAAAACATTAAAATTTCTGACCCATTTGAAGAAGGATGCCGG

    E  E  G  C  R  L  G  P  V  I  S  K  G  Q  Y  D  K  I  M  K  F  I  S  T  A  K  S  E  G  A
991 GAAGAAGGATGCCGGCTTGGCCCCGTTATTAGTAAAGGACAGTACGACAAGATTATGAAGTTCATATCAACAGCGAAGAGTGAGGGGGCA
    CTTGGCCCTGTTATTAGTAAAGGACAGTACGACAAAATTATGAAGTTCATATCAACAGCAAAGAGTGAGGGGGCAACTATTTTGTATGGA

    T  I  L  C  G  G  S  R  F  E  K  L  K  K  G  Y  Y  I  E  F  T  I  I  T  D  I  T  T  S  M
1081 ACAATTTTGTGTGGAGGCTCCCGTCCTGAGCATTTGAAGAAAGGGTATTATATTGAACCCACCATTATAACTGATATTACCACATCCATG
     GGTTCCCGTCCTGAGCATTTGAAGAAAGGTTATTACATTGAACCCACCATTGTAACTGATATCTCCACATCCATGCAAATATGGAAAGAG

    Q  I  W  K  E  E  V  F  G  F  V  I  C  V  K  T  F  K  T  E  D  E  A  I  E  L  A  N  D  T
1171 CAAATATGGAAAGAGGAAGTGTTTGGCCCTGTCATATGTGTTAAAACATTTAAAACTGAAGATGAAGCCATTGAATTGGCAAATGATACA
     GAAGTTTTTGGCCCTGTCTTGTGTGTTAAAACATTTAGTTCCGAAGATGAAGCCATTGCATTGGCAAATGATACAGAGTACGGTTTAGCT

    E  Y  G  L  A  G  A  V  F  S  K  D  L  E  K  C  E  K  V  T  K  A  L  E  V  G  A  V  W  V
1261 GAGTATGGTTTAGCTGGTGCCGTGTTTTCTAAAGATCTTGAAAGATGTGAGAGGGTAACTAAGGCTCTAGAAGTTGGAGCTGTTTTGGTT
     GCTGCTGTGTTTTCTAATGATCTTGAAAGATGTGAGAGGATAACGAAGGCTCTAGAACTTGGAGCTGTTTGGGTTAATTGCTCACAACCA

    N  C  S  Q  P  C  F  V  K  A  F  W  G  G  V  K  K  S  G  F  G  K  E  L  G  E  W  G  I  E
1351 AATTGCTCACAACCATGCTTTGTTCATGCTCCATGGGGAGGAGTCAAGCGTAGTGGATTTGGACGTGAACTTGGGGAATGGGGTATCGAG
     TGCTTTGTTCAAGCTCCTTGGGGAGGCATCAAGCGTAGTGGTTTTGGACGTGAACTTGGAGAATGGGGTATCCAGAATTACTTGAATATC

    N  Y  L  N  I  K  Q  V  T  S  D  I  S  D  E  F  W  G  W  Y  K  S  F
1441 AATTACTTGAATATCAAGCAGGTGACGAGTGATATCTCTGATGAACCATGGGGATGGTACAAGTCTCCTTGAA
     AAGCAGGTGACTCAAGATATTTCTGATGAACCATGGGGATGGTACAAGTCTCCTTGAA
```

图 3 山菠菜与菠菜 cDNA 序列及据此推测的氨基酸序列

山菠菜 BADH	AAQLVKP	VTLELGGKSP	VIMFEDIDIETAVEWTLFGVFWTNGQI	C	SATSRLLV
菠菜 BADH	AAQLVKP	VTLELGGKSP	IVVFEDVDIDKVVEWTIFGCFWTNGQI	C	SATSRLLV
鸟巢菌 aldH	AKSNLKK	VTLELGGKSP	NIVFDDADIDNAISWANFGIFFNHGQC	C	CAGSRILV
马齿苋 alkH	ASKTLAS	VTLELGGKSP	TIIGPTANLPKAARNIVWGKFSNNGQT	C	IAPDHVFV
大鼠肝细胞质 ALDH	AAFHLTP	VTLELGGKSP	CYVDKDCDLDVACRRIAWGKFMNSGQT	C	VAPDYILC
大鼠线粒体 ALDH	GSSNLKR	VTLELGGKSP	NIIMSDADMDWAVEQAHFALFFNQGQC	C	CAGSRTFV
人细胞质 ALDH	GKSNLKR	VTLELGGKSP	CIVLADADLDNAVEFAHHGVFYHQGQC	C	IAASRIFV
马细胞质 ALDH	GKSNLKR	VTLELGGKSP	FIVFADADLETALEVTHQALFYHQGQC	C	VAASRLFV
马线粒体 ALDH	GRSNLKK	VTLELGGKSP	NIIVSDADMDWAVEQAHFALFFNQGQC	C	GAGSRTFV
牛线粒体 ALDH	GKSNLKR	VTLEIGGKSP	NIIMSDAEMDWAVEQAHFALFFNQGQC	C	CAGSRTFV

图 4 图示 BADH 和其它的醛脱氢酶在相似位置上都含有 10 个保守氨基酸序列和胱氨酸残基

2.3 菠菜与山菠菜 BADH 基因 3′ 端片段特性分析

以菠菜及山菠菜总 DNA 为模板，用引物 2 和 3 经 PCR 扩增分别得到 649 和 276bp 的单一条带(图 5)，序列分析结果显示 2 个片段分别包含了菠菜和山菠菜 BADH 结构基因 3′端部分序列和最后 1 个内含子的全部序列，符合引物设计时的构想．2 个不同来源 BADH 基因的编码序列有极高的同源性，而它们的内含子区却存在着很大的差异，山菠菜的内含子为 106bp，

菠菜为479bp, 它们之间无明显同源性(资料未列出).

山菠菜与菠菜的BADH全基因序列未全部测定,从它们的3′端部分的序列分析看来,两者的编码区是很相似的,而其内含子的长度与序列均有极大差异,说BADH基因在进化过程中受到很大压力,其结构相当保守,在植物对环境的适应中可能起到较大的作用.

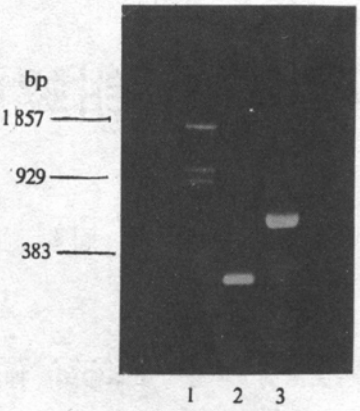


图5　经PCR扩增得到的BADH 3′端部分电泳图

1为标准分子量, 2为山菠菜, 3为菠菜

2.4　山菠菜BADH基因在大肠杆菌中的克隆和表达

将山菠菜BADH编码基因插入大肠杆菌表达质粒PKK223-3中,转化*E.coli* JM83,得到一批转化子,选取26个单克隆,提取质粒DNA,以其为模板用引物1和3进行PCR扩增,选取得到单一1.5kb扩增带质粒DNA,再以BADH 1.5kb结构基因为探针进行Southern杂交分析,得到12个阳性克隆,随机选取11个,以含有PKK223-2质粒的*E.coli* JM83为对照,测定BADH同工酶活力,含BADH结构基因的转化菌,活力为8.04U/mg蛋白,而对照酶活性很低,仅为0.6U/mg蛋白,转BADH基因菌比对照活性高13倍. 总的说来,转化菌BADH活性仍然偏低,这可能是由于转化菌缺乏翻译的后修饰过程,亦可能是因为在*E.coli*中不利于形成催化活性必需的二聚体结构所造成(后者对活性的影响可能是更主要的因素).当然,一般来说,植物偏爱的氨基酸密码子与大肠杆菌不同也会影响该基因的表达活性.

本文测定的3个序列:山菠菜BADH cDNA,山菠菜与菠菜BADH 3′端部分序列已纳入EMBL Data Library Accession No: X69770 AHBADH, X69771 SOBADHG, X69772 AHBADHG.

致谢　作者感谢谷冬梅小姐在打印论文工作中给予的帮助.

参　考　文　献

1 McCue K F, Hanson A D. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. TIBTECH, 1990, 8: 358～362

2 Weretilnky E A, Hanson A D. Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 2 745～2 749

3 McCue K F, Hanson A D. Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. Plant Mol Biol, 1992, 18: 1～11

4 Weigle P, Weretilnky E A, Hanson A D *et al*. Betaine-aldehyde oxidation by spinach chloroplast. Plant Physiol, 1986, 82: 753～759

5 Weretilnky E A, Hanson A D. Betaine-aldehyde dehydrogenase from spinach leaves: purification, in vitro translation of the mRNA and regulation by salinity. Arch Biochem Biophys, 1989, 271: 55～63

6 McCouch S R, Kochert G, Tanksley S. Molecular mapping of rice chromosome. Theor Appl Genet, 1988, 76: 815～829

7 Jurgen L, Schell J. Improved method for the isolation of RNA from plant tissue. Analytical Biochem, 1987, 163: 16～20