

硝酸盐对硝酸还原酶活性的诱导及硝酸还原酶基因的克隆

王利群 王 勇 董 英 王文兵*

(江苏大学生物与环境工程学院生命科学研究院, 镇江 212013)

摘 要 硝酸盐在植物体内的积累过多已成为影响蔬菜品质并影响人类健康的重要因素。硝酸还原酶(NR)是硝酸盐代谢中的关键酶,提高其活性有利于硝酸盐的降解。为了解植物不同组织中 NR 的活性,用活体测定法检测了经 50mmol/L 的 KNO_3 诱导不同时间后的油菜、豌豆和番茄幼苗根茎叶中 NR 活性,同时为了明确外源诱导剂浓度与植物体内 NR 活性的关系,检测了经不同浓度 KNO_3 诱导 2h 后的矮脚黄、抗热 605、小白菜和番茄叶片中的 NRA。结果表明,不同植物组织 NR 活性有很大差异,叶中 NR 活性较高,根其次,茎最低,不同植物的 NR 活性随诱导时间呈不同的变化趋势,相同植物不同组织的 NR 活性变化趋势相似;不同植物叶片 NRA 为最高时 KNO_3 浓度不同。用 30mmol/L 的 KNO_3 诱导番茄苗 2h 后,从番茄根和叶中提取总 RNA,用 RT-PCR 方法获得 NR cDNA,全长 2736bp,编码 911 个氨基酸。为进一步利用该基因提高植物对硝酸盐的降解能力打下基础。

关键词 硝酸还原酶,PCR,克隆,序列分析

中图分类号 Q781 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)05-0632-04

硝酸盐是强致癌物亚硝酸胺的前体,过量摄入会诱发动物消化器官癌变^[1]。蔬菜作为硝酸盐的最主要摄入源,其硝酸盐污染引起了国内外学者的普遍关注。

硝酸盐被植物体吸收后,首先必须在根或叶肉细胞质中由硝酸还原酶(NR)还原成 NO_2^- , NO_2^- 被迅速运进质体,在质体中被亚硝酸还原酶还原成 NH_4^+ 后,才能被植物体利用以合成氨基酸。NR 是这个代谢过程中的关键酶,也是限速酶^[2]。提高蔬菜中 NR 的活性,不仅可降低蔬菜硝酸盐的含量,还可增加同等施肥条件下蔬菜的产量,即提高肥料的利用率。

本研究比较了硝酸盐诱导对不同蔬菜 NR 活性(NRA)的影响,确定了 NRA 较高时的外界条件,用 RT-PCR 方法从番茄根和叶中分离出目的片段。克隆后测序结果表明,获得了 NR 的全长 cDNA,为后续通过基因工程手段提高蔬菜 NRA 的研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

用于 NRA 测定以及总 RNA 提取的蔬菜幼苗由本实验室培养。蔬菜种子(购自镇江市种子公司)经双蒸水浸泡 5~10h 后在室温下萌动一夜,然后将露白的种子铺在尼龙网上, $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 下以不含 NO_3^- 的 MS 培养基培养。光源为日

光灯,光强 1500 lx,光周期为 14h/d,约 2 周后作为实验材料。

1.2 试剂

TRIZOL 购自 Gibco BRL 公司。Taq 酶、LA Taq 酶购自 TaKaRa 公司。SuperScript™ 逆转录试剂盒购自 Invitrogen 公司。胶回收试剂盒购自上海华舜公司。pUCm-T 载体购自上海生工公司。DH5 α 为本实验室保存。

1.3 引物设计与合成

根据 NCBI 数据库中的 NR cDNA 序列设计了 3 对引物,引物由上海生工公司合成。(1)上游引物 P₁: 5'-ACC ATG GCG GCA TCT GTG GAA-3',下游引物 P₂: 5'-TAC CAA TCT CTC CCT TGT GA-3'。(2)上游引物 P₃: 5'-TAC CGA TGA GAC CCT CAA CA-3',下游引物 P₄: 5'-TTA GAA CAC CAA TAG TTC CT-3'。(3)上游引物 P₅: 5'-ATT CTG CAG ATG GCG GCA TCT GTG-3',下游引物 P₆: 5'-GAG TCT AGA TTA GAA CAC CAA TAG-3'。P₁、P₂ 和 P₃、P₄ 是为方便测序而设计的分段引物, P₅、P₆ 是为全长 cDNA 设计的引物。

1.4 NRA 的测定

将适量的幼苗根部浸泡在含 NO_3^- 的 MS 培养基中进行诱导,一定时间后取样,冲洗根部,吸干水分,取不同组织(根、茎或叶)进行 NRA 的测定,测定方法参照陈薇等^[3] NRA 活体测定方法,反应液为含 50mmol/L KNO_3 的磷酸缓冲液。分别测定不同诱导时间、不同诱导浓度下不同组织中的

NRA。NRA 以每克样品每小时产生 NO_2^- 的量来表示,单位为 $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

1.5 RNA 提取

经诱导的番茄幼苗根和叶约 100mg,用双蒸水冲洗,吸干水分,于液氮中研磨,加入 1mL TRIZOL,后续步骤根据 TRIZOL 操作说明书进行。

1.6 RT-PCR

提取的总 RNA 用 SuperScript™ 逆转录试剂盒进行逆转录,合成 cDNA 第一链。根据 SuperScript™ 逆转录试剂盒说明书操作。

逆转录产物用 3 对引物分别进行 PCR 扩增。(1)引物为 P_1 和 P_2 ,PCR 反应条件:50 μL 反应体系中加入 2 μL cDNA,5 μL 10 \times PCR 缓冲液,3 μL 25mmol/L MgCl_2 ,4 μL 2.5mmol/L dNTPs, P_1 、 P_2 (10 $\mu\text{mol/L}$)各 1.5 μL ,Taq 酶(5u/ μL)0.4 μL ,其余用超纯水补足。94 $^\circ\text{C}$ 预变性 2min,然后经 94 $^\circ\text{C}$ 50s;52 $^\circ\text{C}$ 50s;72 $^\circ\text{C}$,2min 35 个循环,最后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 8min。(2)引物为 P_3 和 P_4 ,PCR 反应条件与(1)相同,循环中退火温度为 48 $^\circ\text{C}$ 。(3)引物为 P_5 和 P_6 ,PCR 反应条件:25 μL 反应体系中加入 1 μL cDNA,2.5 μL 10 \times PCR 缓冲液,2 μL 2.5mmol/L dNTPs, P_5 、 P_6 (10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL ,LA Taq 酶(5u/ μL)0.3 μL ,其余用超纯水补足。94 $^\circ\text{C}$ 预变性 2min,然后经 94 $^\circ\text{C}$ 50s;40 $^\circ\text{C}$ 45s;72 $^\circ\text{C}$ 4min;35 个循环,最后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10min。

1.7 硝酸还原酶基因的克隆与序列分析

PCR 扩增产物回收纯化后分别与 pUCm-T 载体连接,转化 DH5 α 菌株,蓝白斑筛选阳性克隆,阳性克隆扩增后抽提质粒,酶切鉴定正确的克隆进行序列分析。

2 结果

2.1 硝酸盐诱导对 NR 活性的影响

2.1.1 诱导时间对植物幼苗不同组织 NRA 的影响 适龄的豌豆(*Pisum sativum L.*)、油菜(*Brassica campestris L.*)和番茄(*Lycopersicon esculentum Mill.*)幼苗在光周期开始 2h 时用含 50mmol/L 硝酸钾的 MS 培养基诱导,分别在诱导后 0、2、5、8、11h 时采样,测定了不同组织的 NRA,见图 1。

不同植物的 NRA 差异较大。NRA 还具有组织特异性,在这几种植物中,茎的 NRA 最低(数据未列出)。叶和根的李 NRA 随植物种的不同有较大差别。在豌豆幼苗中,叶和根的李 NRA 相差不大,总体上叶的李 NRA 稍高;油菜叶中 NRA 远高于根,番茄在未诱导时叶中 NRA 较高,诱导后根中 NRA 增加较快,根和叶中 NRA 差距较小。不同植物的 NRA 随诱导时间的增加呈现不同的变化规律。在试验时间内,豌豆的根和叶中 NRA 逐渐增加并达到峰值,随后有所下降,峰值时间为 8h。油菜的根和叶中 NRA 随时间的增加一直升高,11h 仍无下降趋势。而番茄幼苗诱导 2h 后,根和叶的李 NRA 分别达到最高和较高,5h 降至较低水平,随后又逐渐上升。这为在后续试验中选择诱导时间以提高 NR mRNA 丰度并克隆该基因提供了依据。

2.1.2 诱导剂浓度对植物叶中 NRA 的影响 根据以上实验,

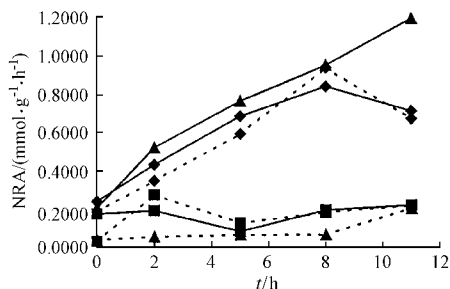


图 1 诱导时间对不同植物幼苗根和叶中 NRA 的影响

Fig. 1 Influence of inducing time on NRA in leaf and root of different plant seedlings
— Leaf; ... Root; ▲, Cole; ◆, Pea; ■, Tomato

硝酸钾诱导 2h 对 NRA 已有明显影响,因此,选择 2h 的诱导时间,用含 0、10、30、50mmol/L 硝酸钾的 MS 培养基来诱导矮脚黄(*Brassica chinensis L. cv. AJH*)、小白菜(*Brassica chinensis L. cv. XBC*)、抗热 605 青菜(*Brassica chinensis L. cv. KR-605*)和番茄幼苗,测定了各种植物幼苗叶中的 NRA,结果如图 2 所示。几种植物幼苗经不同浓度的硝酸钾诱导后,叶中 NRA 均有所增加。其中矮脚黄在硝酸钾浓度为 10mmol/L 时,叶中 NRA 达到最高,30mmol/L 时基本相等,50mmol/L 时有所下降。小白菜在 KNO_3 浓度为 30mmol/L 时,叶中 NRA 达到最高,50mmol/L 时也有所下降。抗热 605 在三种诱导浓度下,叶中 NRA 都较高,没有显著差异。番茄幼苗叶中 NRA 在 KNO_3 浓度为 10mmol/L 时最高,30mmol/L 时略下降。

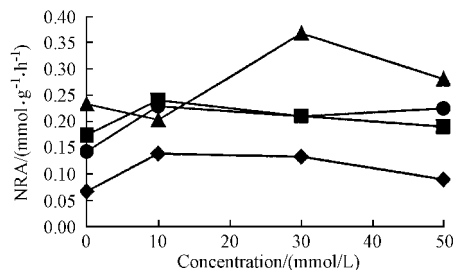


图 2 诱导剂浓度对植物幼苗叶片 NRA 的影响

Fig. 2 Influence of concentration of KNO_3 solution on NRA in leaf of different plant seedlings
◆, AJH; ▲, XBC; ●, KR-605; ■, Tomato

2.2 RT-PCR 结果

2 周龄番茄幼苗经 30mmol/L KNO_3 诱导 2h 后提取总 RNA, $A_{260}/A_{280} = 1.988$, 含量 2400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。逆转录后以 3 对特异引物进行 PCR,结果如图 3。泳道 1 是 P_1 、 P_2 引物的 PCR 产物,泳道 2 是 P_3 、 P_4 引物的 PCR 产物,泳道 3 是 P_5 、 P_6 引物的 PCR 产物。

2.3 NR 基因的克隆与测序结果

将上述 PCR 扩增得到的 3 个片段用胶回收试剂盒回收后,直接与 pUCm-T 载体连接,白色单菌落挑出扩增,抽提质粒后酶切鉴定,各选择一个鉴定正确的菌落进行序列测定,得到全长为 2736bp 的 cDNA 序列(测序结果未列出)。

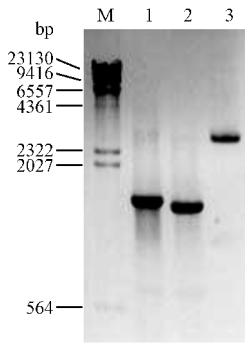


图 3 RT-PCR 产物

Fig.3 RT-PCR products

M. Marker(λ DNA/*Hind* III Fragments); 1. PCR product of primers P₁ and P₂; 2. PCR product of primers P₃ and P₄; 3. PCR product of primers P₅ and P₆.

3 讨 论

NR 是植物氮素代谢中一个重要的调节酶和限速酶,有报道指出, NR 重组基因 *nia* 的表达降低了莴苣叶中硝酸盐的含量^[4], 而将烟草 NR 基因与 CaMV 35S 启动子的融合基因导入土豆并在土豆中表达, 可使土豆块茎中硝酸盐含量下降 95%^[5]。在高等植物中 *nia* 基因拷贝数很低, 据报道菠菜为一个, 玉米、水稻、拟南芥、白桦树等为 2 个, 烟草为 4 个^[6]。因此, 要通过 RT-PCR 方法获得 NR cDNA 片段, 必须提高 *nia* 基因的转录水平。NR 是底物诱导酶, 硝酸盐的诱导可以刺激 *nia* 基因的表达。为了提高 NR-mRNA 的转录丰度, 研究了硝酸盐浓度和诱导时间对蔬菜 NR 活性的影响, 据此推测 *nia* 转录的水平。本研究中植物的 NRA 在诱导 2h 时已有明显提高, 继续诱导, NRA 继续升高或基本不变, 少数则有所下

降, 表明 *nia* mRNA 在诱导 2 h 时处于较高水平。NO₃⁻ 浓度在 30mmol/L 时, 大部分蔬菜叶片中 NRA 较高。因此, 番茄幼苗经含 30mmol/L KNO₃ 的 MS 培养基诱导 2h 后, 取根和叶片作为实验材料, 提取总 RNA, 用 RT-PCR 方法扩增出了该基因片段, 成功地克隆出了 *nia* 基因。获得的番茄 NR 全长 cDNA 序列, 其读码框包含 2736 个碱基, 编码 911 个氨基酸。该基因的成功克隆为进一步利用该基因降解蔬菜中的硝酸盐打下基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] CHEN J (陈君石), WEN Z M (闻芝梅). *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a global perspective* (食物、营养与癌症预防), Shanghai: Shanghai medical science college press, 1999
- [2] Barber M J, Desai S K, Marohnic C C *et al.* Synthesis and bacterial expression of a gene encoding the heme domain of assimilatory nitrate reductase. *Arch Biochem Biophys*, 2002, **402**(1): 38-50
- [3] CHEN W (陈薇), ZHANG D Y (张德颐). Extraction, Mensuration and Purification of Nitrate reductase in plant tissues. *Plant Physiology Communication* (植物生理学通讯), 1980, **16**(4): 45-49
- [4] Curtis I S, Power J B, De Laat A M M *et al.* Expression of a chimeric nitrate reductase gene in transgenic lettuce reduces nitrate in leaves. *Plant Cell Reports*, 1999, **18**(11): 889-896
- [5] Djennane S, Chauvin J E, Quillere I *et al.* Introduction and expression of a deregulated tobacco nitrate reductase gene in potato lead to highly reduced nitrate levels in transgenic tubers. *Transgenic Res*, 2002, **11**(2): 175-84
- [6] WU R (吴平), YIN L R (印莉萍), ZHANG L R (张立平) *et al.* *Molecular Physiology of Plant Nutrition* (植物营养分子生理学). Beijing: Science Press, 2001

Induced Activity of Nitrate Reductase by Nitrate and Cloning of Nitrate Reductase Gene

WANG Li-Qun WANG Yong DONG Ying WANG Wen-Bing*

(Institute of Life Sciences, School of Biological & Environmental of Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract Excessive nitrate accumulated in plants affects vegetable quality severely and excessive nitrate ingestion would do harm to human health. Assimilatory NADH: nitrate reductase (NR, EC 1.6.6.1), a complex Mo-pterin-, cytochrome (c557)- and FAD-containing protein, catalyzes the regulated and rate-limiting step in the utilization of inorganic nitrogen by higher plants. Enhancing the activity of NR is conducive to reduce the concentration of nitrate in plants. The experiments were

Received: 03-17-2003

This work was supported by Grants from the Natural Science Foundation of Jiangsu Provincial Education Committee (No. 01KJD550001) and key subject of National Education Committee (No. 02057).

* Corresponding author. Tel: 86-511-8797607; Fax: 86-511-8791923; E-mail: wenbingwang@ujs.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

conducted to investigate the activity of nitrate reductase in different plant tissues and the relationship between external inducing solution concentration and NR activity (NRA) in plant leaves. Six plant seedlings growing in solution culture were deprived of an external nitrogen (N) supply for 2 weeks. On selected days, three of six plant seedlings were exposed to 50mmol/L NO_3^- for 0, 2, 5, 8, 11h, and four of the six plant seedlings were exposed to 0, 10, 30, 50mmol/L NO_3^- for 2h. The NRA was determined *in vivo* at 538nm using spectrophotometer. The results showed that NRA increased when those plant seedlings were induced by nitrate solution. The change trends of NRA in roots and in leaves of cole, pea and tomato were different during treating time. The NRA in cole leaves was higher than that in its root and in other two plants and increased along with inducing time, but the NRA in bea and tomato was highest when the treating time was 8h and 2h, respectively. The highest NRA in leaves of three kinds of Chinese cabbages and tomato was induced by different concentrations of KNO_3 solution. In tomato leaves, the highest NRA was induced by 10~30mmol/L KNO_3 solution. In three Chinese cabbages, *Brassica chinensis* L. cv. *AJH*, *XBC* and *KR-605*, the highest NRA was induced by 10, 30, 10mmol/L KNO_3 solution, respectively. The results indicated that the response manners of NRA in plants to external nitrate solutions were different. According to these results, the level of NR mRNA in plants could be enhanced by nitrate inducement. The total RNA was isolated from tomato leaves and root which induced by 30mmol/L KNO_3 solution for 2h, and NR cDNA was obtained by RT-PCR using the specific primers. The fragments of PCR products were cloned and sequenced. There are 2736 base pairs in the whole cDNA fragment. The deduced protein sequence contains 911 amino acids. The NR gene can be fused to the CaMV 35S promoter, then introduced to higher plants, such as vegetables. It is hoped to decrease drastically the nitrate content of the transgenic plants.

Key words nitrate reductase, PCR, clone, sequence analysis

控制癌症发生的研究对策

有经典防御物质之称的疫苗是产生抗体、激发或增强免疫系统战胜各种疾病的最有利武器。它的应用已有悠久的历史传统。癌症这种恶性疾病能否采用现代疫苗技术加以防治呢？目前这方面的研究颇为活跃。在澳大利亚，研究人员研制抗癌疫苗方面取得了新进展，此疫苗用于抗癌安全，借助外源疫苗刺激免疫系统以攻击癌细胞，通常人类免疫系统一般对引发的瘤不会有对抗作用，因为机体免疫系统把瘤视为身体的一部分，而抗癌疫苗能使身体“误”认为癌变肿瘤是外来的，从而对其进行攻击（注：癌症患者有1%~2%的人能产生强烈自然免疫反应来杀死癌细胞），为此研制抗癌疫苗的本质就是模拟抗癌和杀灭癌细胞的一种手段，当初它并非用来治疗已确诊的癌症，而是防止那些已治愈的患者癌症复发。美国研究人员应用基因技术研制出一种新型肺癌疫苗，临床实验结果表明，这种疫苗对肺癌患者十分有效。这种新型肺癌疫苗叫G-VAX，也就是说，这种经修改的活体疫苗在治疗癌症方面取得重要突破，部分肺癌患者注射这种新型肺癌疫苗后，体内的癌细胞奇迹般地消失了，至今（2003年）仍未复发。研究人员是怎样研制G-VAX新疫苗的呢？先从肺癌患者的瘤中提取癌细胞，尔后在其中添加能刺激免疫系统产生抗体的基因，再将这些基因修饰过的细胞进行辐射处理后制成肺癌疫苗。当患者注射这种疫苗之后，疫苗就会在患者体内追踪和搜索癌细胞，并产生大量抗体对所识别的癌细胞必消灭之。目前这种抗癌疫苗（G-VAX）仍处于II级临床实验阶段，有望给肺癌患者的治疗带来希望。

不论何种癌症都是客观存在的，只不过因某种因素而处于“沉睡”或“休眠”状态，或者说，于机体内处于“溶原”状态，或又因某种原因发生癌症或细胞癌变，或其进一步扩散等等。然而，对付癌症的关键，除了抗癌疫苗的研制之外，加强如下三方面工作也是至关重要的。（1）养成坚持体育锻炼，不吸烟等良好生活习惯，使机体天然存在的抗癌系统和免疫系统不削弱并得到增强，这是降低各类癌症发病率和战胜它们的最重要的物质基础。（2）积极研制包括抗癌疫苗在内的治癌药物。其中最重要的是研制引发癌细胞“自杀”（自我毁灭）的高效药物，它不伤害周围健康细胞，只针对癌细胞，激活它“自杀”。已发现人体细胞内有一种叫caspase的生物酶，尽管产生的量很小，但它可加速癌细胞的死亡，值得探究。（3）积极寻找癌症的克星，即所谓“死亡基因”，这种基因位于人体23对染色体第4染色体的4~10个基因之间；“癌症的克星”就在其中。如果能找到这种基因的话，就有可能为战胜癌症提供一种重要的分子工具，应加强这方面研究。

（柯为供稿）