

# 菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因的克隆和序列分析

马德钦 吕文汤 岚\* 骆爱玲\* 梁 峥\*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(中国科学院植物研究所 北京 100044)\*

**摘要** 以耐盐的菠菜 mRNA 为模板,经反转录合成甜菜碱醛脱氢酶 (BADH) 基因第一链 cDNA。在人工合成的两端引物引导下,通过多聚酶链式反应 (PCR),扩增获得双链 cDNA。把重组有 BADH 基因的 pUC19 转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  菌株,亚克隆后测定了基因的全序列。所得到的 BADH 基因全长序列为 1491bp,编码 497 个氨基酸。与文献报道的相比较,核苷酸序列同源性 99.8%,氨基酸序列同源性达 99.6%。在此基础上,构建了 BADH 基因的高等植物表达载体。

**关键词** BADH 基因, cDNA 克隆, 甜菜碱, 耐盐

在干旱和盐碱胁迫下,许多高等植物积累了大量渗透调节剂,如脯氨酸、甜菜碱和甘露醇等,以保护细胞质抗增高的盐浓度,使细胞在逆境下仍旧发挥正常功能。这类渗透调节剂中,脯氨酸的作用已有很多研究。而近年来甜菜碱却引起人们很大注意<sup>[1,2]</sup>。由于甜菜碱的生物合成途径非常简单,积累甜菜碱比积累脯氨酸的植物对盐碱的耐受性高,因此被认为是最有希望的植物渗透调节剂之一,在植物抗盐抗旱基因工程研究中受到重视。

植物中甜菜碱是由胆碱经两步酶促反应合成。最后起关键作用的一步是由甜菜碱醛脱氢酶 (BADH) 所催化。对 BADH 的特性已有许多深入研究。1990 年 Hanson 从菠菜中克隆了 BADH cDNA<sup>[3]</sup>,1992 年又从甜菜中克隆了 BADH cDNA<sup>[4]</sup>,开创了 BADH 基因的植物基因工程研究。鉴于菠菜对盐碱有较高耐性,在盐胁迫下积累相当量甜菜碱,本研究在过去对菠菜 BADH 研究的基础上<sup>[5]</sup>,从菠菜分离得到 BADH 基因,并准备进一步转化植物,对今后研究其在植物中的表达及培育抗盐耐旱品种均有重要意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 菠菜种子于本所农场。实验前浇灌盐水,使 NaCl 浓度逐渐增至 300mmol/L。采叶片去中脉后贮于 -80℃ 冰箱待用。

1.1.2 实验用的 Taq DNA 聚合酶,质粒 pUC19 为 Promega 公司产品。各种限制酶来自 Promega 或华美公司。 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP 为 NEN 公司产品。PCR 引物由中国科学院微生物研究所技术室合成。cDNA 合成 Kit 购自 BRL 公司。

### 1.2 方 法

国家自然科学基金资助项目。  
本文于 1994 年 7 月 16 日收到。

1.2.1 菠菜总 RNA 的提取: 采用 De Vries 的热酚法进行<sup>(7)</sup>。菠菜叶子用液氮冷冻磨成粉后, 经酚-提取缓冲液混合物 (含 LiCl, SDS, Tris-NaOH, pH9.0, EDTA) 90℃ 提取, 再用氯仿提取, 并于 2mol/L LiCl 浓度下沉淀 RNA, 以乙醇反复沉淀和洗涤, 干燥, 溶于重蒸馏水, 再经测定  $A_{260}/A_{280}$  值琼脂糖凝胶电泳检查质量。

1.2.2 mRNA 的分离: 参照文献 [8] 的方法, 总 RNA 通过 Oligo (dT) 纤维素柱亲和层析, 收集合并含有 Poly (A)<sup>+</sup>RNA 部分, 用乙醇反复沉淀。

1.2.3 第一链 cDNA 的合成: 取 1 $\mu$ g 提取的 mRNA 为模板, 以 Oligo (dT)<sub>12-18</sub> 为引物, 用 BRL 公司的 cDNA 合成试剂盒, 并按 AMV 反转录酶系统 I 说明书所述的反应条件, 合成单链 cDNA。

1.2.4 PCR 扩增 BADH 基因: 根据文献报道的 BADH 基因序列<sup>(9)</sup>, 设计并合成 PCR 两端引物, 以引导 BADH 基因的扩增。

5'端引物 5'ATG GCG TTC CCA ATT CCT GC 3'

3'端引物 5'GCG GGA TCC AGA GTA GCT TTA AGG AGA CTT GTA C 3'

为使扩增的 cDNA 能容易连接到载体 pUC19 上, 在 3'端引物上加上 BamH I 位点, 引物使用前, 需将其 5'端磷酸化<sup>(9)</sup>。

取 5 $\mu$ l 单链 cDNA 产物, 加入两端引物各 1 $\mu$ mol/L, 0.2mmol/L dNTPs, 50mmol/L KCl, 10mmol/L Tris-HCl (pH9.0), 1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100, 1uTaq DNA 聚合酶, 总体积 100 $\mu$ l, 加矿物油覆盖液面防止挥发。进行 PCR 扩增的条件是, 93℃ 变性 1min, 53℃ 复性 1min 73℃ 延伸 2min, 共 30 个循环。扩增完毕, 取样经琼脂糖凝胶电泳检查效果, 再用低熔点胶电泳回收扩增的双链 cDNA 片段。

1.2.5 cDNA 的克隆: 回收的 cDNA 片段经 T4DNA 聚合酶作用后, 再用 BamH I 酶切, 这样 BADH 基因的 5'端为平末端, 3'端为 BamH I 粘性末端, 这样的片段连接到载体 pUC19 的 Sma I 和 BamH I 双酶切位点内, 所得重组质粒转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 在含有氨苄青霉素+IPTG+X-gal 的 SOB 琼脂平板上挑选白色的阳性菌落。DH5 $\alpha$  菌株感受态细胞的制备是用 CaCl<sub>2</sub> 法<sup>(8)</sup>, 重组子质粒是由快速的酚-氯仿一步抽提法提取<sup>(10)</sup>, 琼脂糖凝胶电泳检测加以确证。

1.2.6 BADH 基因的酶切分析及全序列测定: 重组质粒选用 EcoR I、Hind III 单酶切及 Kpn I 和 BamH I 双切酶, 以分析插入的 cDNA 大小及方向, 再以 BADH 基因内的 Hinc II 和 Hind III 的酶切片段, 构成三个亚克隆于 pUC19 质粒中, 对三个亚克隆的 cDNA 进行双向测序。序列分析是采用双脱氧终止法原理, 用 ABI 370A DNA 自动序列分析仪及其试剂盒进行。

## 2 结果和讨论

### 2.1 cDNA 的合成和 PCR 扩增

以菠菜分离出的 mRNA 为模板, 通过反转录合成单链 cDNA, 再以单链 cDNA 为模板, 加入两端引物进行 PCR 扩增。电泳检查结果, 双链 cDNA 大小约为 1.5kb 的单一片段, 与预期大小相符 (见图 1)。由此亦可说明, 我们在 cDNA 合成中所用的模板 RNA 及单链 cDNA 质量较高。

### 2.2 BADH 基因的克隆

将 5'端为平末端，3'端为 BamH I 粘性末端的 BADH 基因插入质粒 pUC19 的 Sma I 和 Ba 的 H I 双酶切位点，得到重组质粒，名为 pLS9 (见图 2)。此质粒用 EcoR I，Hind III 单酶切，均得到大小约 3.6kb 与 0.6kb 的片段，用 Kpn I 和 BamH I 双酶切，得到一约 2.7kb 的 pUC1 片段与一个 1.5kb 的 cDNA 片段 (见图 3)。结果表明，所克隆的 cDNA 与文献报道的菠菜 BADH cDNA 具有相同的酶切位点，是完整的 BADH 基因。

### 2.3 BADH 基因的亚克隆和全序列分析

BADH 基因内含有 Hinc II 和 Hind III 酶切位点，用这两种限制酶切 pLS9，得到 3 个亚克隆于 pUC19 中，PLH I (含有 685bp 的 Hinc II 片段)；pLHL (含有 930bp 的 Hind III 片段) 及 pLHS (含有 600bp 的 Hind III -Hind III 片段，见图 2 示意)，通过对 3 个亚克隆的 cDNA 进行双向测序，获得了 BADH 基因核苷酸序列及由此推导的氨基酸序列 (见图 4)。该基因全长序列为 1491bp，编码 497 个氨基酸，它含有一个完整的开放阅读框架，起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA，与文献报道的菠菜 BADH cDNA 相比较<sup>[3]</sup>，有 3 个

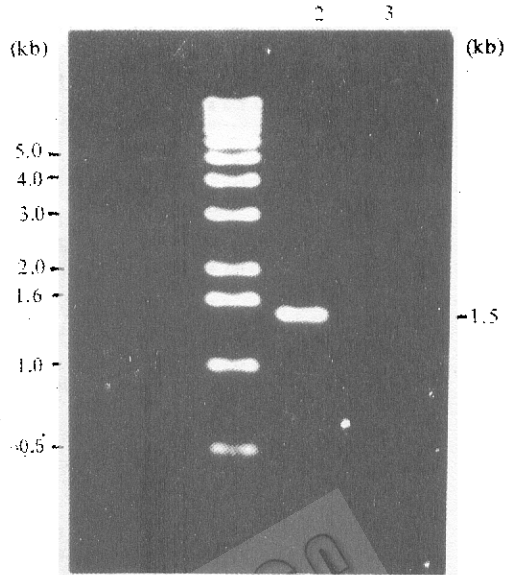


图 1 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳  
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product

1. 1kb DNA ladder marker, 2. cDNA, 3. Control

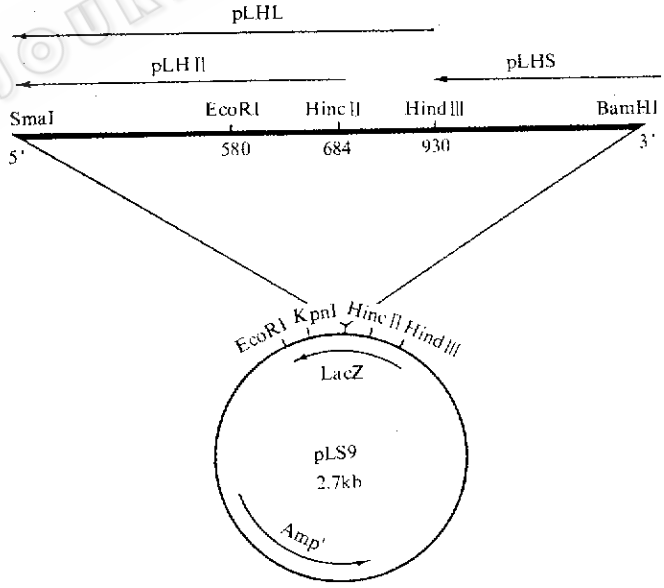


图 2 pLS9 质粒的结构及基因序列测定策略

Fig. 2 Schematic diagram showing the pLS9 plasmid and the strategy of sequencing  
Black bar indicates the BADH gene, arrows indicate subcloning and sequencing strategy

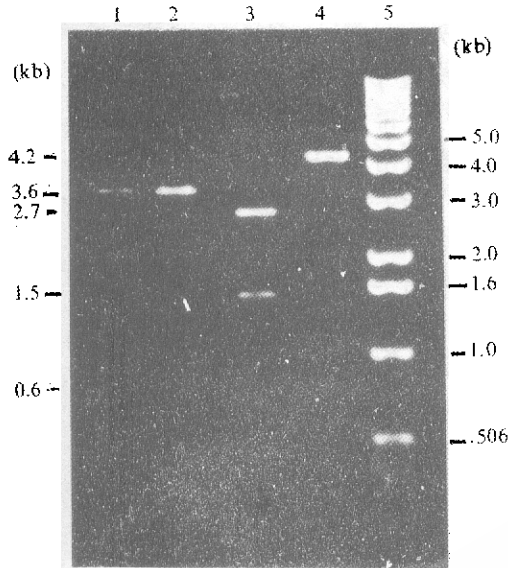


图 3 pLS9 质粒限制性酶切分析

Fig. 3 Restriction analysis of pLS9 plasmid

1. EcoR I digestion, 2. Hind III digestion, 3. Kpn I + BamH I digestion, 4. pLS9 Kpn I digestion, 5. 1kb ladder marker

核苷酸差异,但由此推导的氨基酸只有 2 个差异。其中由于第 542nt 和第 830nt 的差异导致氨基酸的改变,核苷酸的同源性达 99.8%,氨基酸的同源性 99.6%。在 BADH 基因核苷酸序列 759~789nt 处,亦存在一个编码十肽序列 VTLELGKSP,此序列在许多生物的醛脱氢酶 (ALDH) 中都是十分保守的,被认为是该酶活性反应中心。以上结果证明我们扩增的片段是 BADH 基因。

#### 2.4 BADH 基因植物表达载体的构建

BADH 基因含有起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA,将重组质粒 pLS9 用 Kpn I /BamH I 切出,插入到质粒 PYH 相对应的多克隆位点内,得到重组质粒 PYHT。再用 Sst I /Xho I 把 PYHT 中的 35S-BADH 基因-polyA 的片段切出,插入 pBin19 的 Sst I /Sal I 相对应位点,构成含有 BADH 基因的植物表达载体 pBHT。这一含菠菜 BADH 基因的双元载体对植物的转化正在进行中。

**致谢:** 洪益国博士 (现在英国 Dept. of Virus Research, John Innes Institute) 对本研究一直提出很多重要的建议并参加部分工作,审阅本文稿,特致热忱感谢。



## 参 考 文 献

- [1] Wyn Jones R G, Storey R. Betaines, In: Paley L G, Aspinall D eds, *The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*. Academic Press, Sydney, Australia, 1981, pp. 172~204.
- [2] Schroppe-Meier G, Kaiser W M. *Plant Physiol*, 1988, **87**: 822~827.
- [3] Weretilnyk E A, Hanson A D. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 2745~2749.
- [4] Mc Cue K F, Hanson A D. *Plant Mol Biol*, 1992, **18**: 1~11.
- [5] Liang Z, Luo A L, Tang L *et al*. *Chinese J Bot*, 1993, **5** (1): 58~64.
- [6] 梁 峥, 赵 原, 李裕春等. *植物学报*, 1991, **33**: 680~686.
- [7] De Vries S, Hoge H, Bisseling T. In: Gelvin S B, Schilperoort R A eds, *Plant Molecular Biology Manual*, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1988, **B6**: 1~13.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] 叶 寅, 徐雷新, 田 波. *科学通报*, 1991, **17**: 1340~1344.
- [10] 魏征宇, 王苏燕, 叶 寅等. *微生物学通报*, 1993, **20** (6): 375~376.

## A cDNA Cloning and Sequence Encoding Betaine Aldehyde Dehydrogenase (BADH) from Spinach

Ma Deqin Lü Wen Tang Lan\* Luo Ailing\* Liang Zheng\*

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

(*Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100044*)\*

**Abstract** A cDNA clone encoding betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) has been amplified from spinach mRNA through polymerase chain reaction (PCR) technique using two primers specific to spinach BADH cDNA. The authenticity of the BADH gene was confirmed by cleavage it with restriction endonuclease and nucleotide sequence analysis. This analysis demonstrated the presence of a 1491 bp open reading frame and of restriction cleavage sites identical with the previously determined sequence. Homology of the nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence in the spinach BADH gene with the previously determined sequence show 99.8% and 99.6% respectively. A plant expression vector with BADH gene has been constructed.

**Key words** BADH gene, cDNA cloning, betaine, osmotic stress, salt tolerance.