

转麻疯树甜菜碱醛脱氢酶基因提高烟草耐盐性

张富丽, 蔡峰, 吴军, 陈放, 王云霄, 赵小光, 高顺

(四川大学生命科学院, 成都 610064)

摘要: 【目的】研究麻疯树甜菜碱醛脱氢酶(*JcBD1*)的功能。【方法】通过 RT-PCR 和 RACE 的方法从麻疯树中克隆甜菜碱醛脱氢酶基因(*JcBD1*)的全长 cDNA 序列。将从麻疯树中克隆的 *JcBD1* cDNA 与 CaMV 35S 组成型启动子融合, 构建植物表达载体 pBI-JB, 利用根癌农杆菌介导转入烟草。对获得抗性的植株用 PCR、RT-PCR 及 Western 杂交检测分析, 同时测定转基因烟草植株的电导率、*JcBD1* 酶活性及抗盐性等特性。【结果】由 *JcBD1* cDNA 序列推测的 *JcBD1* 氨基酸序列与已知的 BADH 具有很高的同源性, 包括 BADH 家族绝对保守区域十肽“VSMELGGKSP”和半胱氨酸残基。这两部分区域在甜菜碱醛脱氢酶底物特异性结合过程中起着重要作用, 与酶的催化活性有关。PCR 及 RT-PCR 检测证明外源 *JcBD1* 已整合到烟草基因组中并成功表达, 转化率为 56.7%。转基因植株的电导率明显低于未转基因植株。盐胁迫处理后, 在转基因植株的蛋白提取样中能检测到 Western 杂交信号, 而在未转基因植株中没有检测到杂交信号; 转基因植株的蛋白提取样中能检测到甜菜碱醛脱氢酶活性, 而对照没有活性, 表明 *JcBD1* 在转基因植株中得到了表达。转 *JcBD1* 烟草在盐胁迫下, 生长势明显强于未转基因植株。【结论】*JcBD1* 能在异源植物中正常翻译、表达; *JcBD1* 是盐害胁迫相关的重要基因。

关键词: 麻疯树; 甜菜碱醛脱氢酶; 烟草; 转基因; 耐盐性

Enhancing Salt Tolerances of Tobacco by Transformation of *Jatropha curcas* Betaine Aldehyde Dehydrogenase Gene

ZHANG Fu-li, CAI Feng, WU Jun, CHEN-fang, WANG Yun-xiao, ZHAO Xiao-guang, GAO Shun

(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract: 【Objective】*JcBD1* gene was cloned from *Jatropha curcas* L. to research its function. 【Method】The full-length cDNA of *JcBD1* was isolated from *Jatropha curcas* L. by RT-PCR and RACE techniques. The expression plasmid pBI-JB was constructed by fusing the cDNA of *JcBD1* with the constitutive promoter CaMV 35S and introduced into tobacco plants by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. Transgenic assays were performed using PCR, RT-PCR and Western blot analysis. At the same time, *JcBD1* enzyme activity, relative conductivity and salt resistance of transgenic tobacco were measured. 【Result】The amino acid sequence deduced from *JcBD1* cDNA sequence showed substantially high similarities to BADH enzyme presented in other plants, including the absolute conservative decapeptide “VSMELGGKSP” and the cysteine residue in the possible active site. Both the decapeptide motif and the cysteine residue are proposed to play a role in substrate specificity and implicated in catalysis of BADH. The *JcBD1* gene was confirmed to be integrated into the genome of tobacco by PCR and RT-PCR analysis with an average frequency of 56.7%. The electrical conductivity of the transgenic lines was obviously lower than wild type both in natural condition and after salt stress. *JcBD1* specific activity and hybridization signal were detectable in transgenic plant leaves, while it was not in the control plants. Transgenic tobacco plants grew better than the untransformed plants under salt stresses. 【Conclusion】The *JcBD1* can be expressed accurately in the exogenous transgenic plants and that transformation of *JcBD1* into tobacco plants can confer them more tolerance to salinity. *JcBD1* is likely related to salt resistances.

Key words: *Jatropha curcas*; Betaine aldehyde dehydrogenase; Tobacco; Transformation; Salt tolerance

收稿日期: 2007-12-17; 接受日期: 2008-03-24

基金项目: 教育部博士点基金(20060610015); 国家自然资源平台项目(2005DKA21403)

作者简介: 张富丽(1978-), 女, 四川大竹人, 博士, 研究方向为发育生物学与生物技术。Tel: 028-85417281; E-mail: anne4935@yahoo.com.cn。
通讯作者陈放(1960-), 男, 浙江诸暨人, 教授, 博士, 研究方向为植物学、生化与分子生物学、生物安全。Tel: 028-85417281, Fax: 028-85417281; E-mail: scu_chenfang@yahoo.com.cn

0 引言

【研究意义】甘氨酸甜菜碱(以下简称甜菜碱)在植物抵抗外界胁迫过程中起重要作用,除了参与细胞的渗透调节外,还具有稳定生物大分子结构和功能的作用,能使许多代谢酶类在渗透胁迫下仍保持活性^[1-2]。在植物体内,胆碱经不可逆的两步氧化反应生成甜菜碱,甜菜碱醛脱氢酶(BADH, EC 1.2.1.8)是催化合成甜菜碱的关键酶之一^[1,3]。由于甜菜碱合成途径比较简单,遗传操作比较方便,因此甜菜碱合成酶基因被看作是最有利用价值的胁迫抗性基因之一。麻疯树又名小桐子、膏桐,属大戟科麻疯树属落叶灌木或小乔木,是一种耐干旱、耐贫瘠的油料植物^[4]。其种子具有很高的含油量,是加工生物柴油的优质原料。麻疯树还具有重要的药用价值,已有研究表明,麻疯树中富含抗肿瘤、抗病毒的活性成分^[4]。调查和研究麻疯树的抗逆性,探索麻疯树抗逆特性与调节机制,对麻疯树品种基因工程改造和麻疯树优良品种的筛选具有重要意义。【前人研究进展】1990年, Weretilnyk等^[5]从菠菜中首次克隆了BADH基因的cDNA,从此人们陆续从多种植物中克隆了BADH基因,并对BADH基因的结构、表达特性及其与植物系统进化的关系等方面在进行了有一定的研究。马铃薯、烟草、番茄等作物中无内源BADH基因,自身不能积累甜菜碱^[6-7],是验证BADH基因功能重要的遗传转化模式植物。BADH基因先后被转入烟草^[8]、水稻^[9]、小麦^[10]、豆瓣菜^[11]、番茄^[12]、胡萝卜^[13]等植物中得到表达,并增强了这些植物的耐盐性。【本研究切入点】本文报道了从麻疯树中克隆BADH同源基因的cDNA,命名为*JcBD1*(GenBank accession No. EF174190)。利用*JcBD1*的开放阅读框(ORF)与CaMV 35S组成型启动子融合,构建植物表达载体pBI-JB,利用根癌农杆菌介导转化烟草,获得转基因烟草。【拟解决的关键问题】通过对转*JcBD1*烟草的电导率、*JcBD1*酶活性等参数及转基因植株抗盐性特性测定,以了解该基因的功能,从而探讨麻疯树*JcBD1*与其抗逆性之间的关系。

1 材料与amp;方法

1.1 植物材料、菌株和质粒

麻疯树种子采自四川省攀枝花市郊区。将麻疯树幼苗移栽到花盆中,用200 mmol·L⁻¹ NaCl溶液连续浇灌7 d以模拟盐胁迫处理后,取叶片存放于-70℃,

备用。选用农艺性状好且再生频率高的烟草(*Nicotiana tabacum* L.)品种NC98,接种在含3%蔗糖的MS培养基上获得无菌试管苗,取5~6片真叶期植株的上部叶片作转化材料。大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株为Top10(笔者所在实验室保存),根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株为EHA105(四川大学生命科学学院遗传学实验室赠送),抗性筛选剂为利福平(Rif),克隆载体PMD18-T vector(大连宝生物有限公司),抗性标记为氨苄青霉素(Amp)。表达载体为pBI121,抗性标记为卡那霉素(Kan)。

1.2 麻疯树*JcBD1* cDNA全长的克隆

取胁迫处理后的叶片100 mg,加液氮磨碎,加1 ml Trizol 缓冲液(购自天根生化科技公司)提取总RNA,操作依照试剂盒说明书进行。以麻疯树总RNA为模板,oligo dT(5'-GCTGTCAACGATACGCTACG TAA CGGCATGACAGTG(T)₁₈-3')为引物进行反转录合成cDNA第一链。根据已知BADH基因的保守序列,设计简并引物BAD-L2(5'-GA(A,G)CTTGG(A,T,G)GG(T,C,G)AAAAGTCC-3')/BAD-R2(5'-CC(A,T,G)CCCCA(A,T)GGAGC(A,T)TG-3')。以反转录的cDNA为模板,利用引物BAD-L2和BAD-R2进行PCR扩增,回收特异扩增带。回收产物与PMD18-T vector连接,转化*E. coli* Top10。经菌落PCR检测后,挑取阳性克隆测序(Invitrogen公司,上海)。根据得到的中间片段序列设计3'端特异引物BAD3'-1(5'-ATTACGGTTTAGGTGCTGC-3')和BAD3'-2(5'-GTCTTCCGAGCAGGTATTG-3')。麻疯树cDNA为模板,参考3'RACE(TaKaRa, Japan)试剂盒说明书,以接头引物AP1(5'-GTCAACGATACGCTACGTAACG-3')/BAD3'-1,巢式引物AP2(5'-TACGTAACGGCATGACAGTG-3')/BAD3'-2进行嵌套PCR得到3'末端产物。同理,根据得到的中间片段序列设计5'端特异引物B5'-RT(5'-CCAAGTCTGCAACCTTCTTCCAAG-3'),B5'-1(5'-TCATGCA CAAGAAGACGGGATG-3'),B5'-2(5'-AGTCCATT CAGCAGCCTTATC-3')。以麻疯树总RNA为模板,B5'-RT为引物反转录合成cDNA,在5'末端加上polyA,以引物B5'-1和oligo dT,巢式引物B5'-2和AP1进行嵌套PCR得到5'末端产物。PCR反应条件为94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 52℃ 40 s, 72℃ 45 s, 32个循环; 72℃延伸6 min。用AlignX软件及DNAMAN软件对3段序列进行拼接和分析,设计编码区引物BRL(5'-ATGGCTTTTCTATACCAAATCG-3')/BRR(5'-

TTACAGCTTTGAAGGAGACTGATAC-3'), 以 cDNA 为模板进行 PCR, 得到该基因的 ORF 全长。回收测序, 并用 NCBI BLAST 软件和 DNAMAN 软件进行序列分析。所有引物由 Invitrogen 上海生物工程公司合成。

1.3 植物表达载体的构建

根据得到的麻疯树 *JcBD1* cDNA 序列, 设计引物 B-PG1 (5'-GCGGGATCCATGGCTTTTCCTATACCA AATCG-3') (含 *Bam*H I 酶切位点)/B-PG2 (5'-GCGG

AATTCTTACAGCTTTGAAGGAGACTGATAC-3') (含 *Eco*R I 酶切位点), 以麻疯树 cDNA 为模板, PCR 得到 *JcBD1* ORF 序列, 回收片段克隆到 PMD18-T 载体中, 得到质粒 pTJB (U-gene Plasmid Midiprep Kit 提取), 测序确定序列正确性。用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切质粒 pTJB 获得 *JcBD1* ORF 片段, 与相同酶酶切的 pBI121 片段连接, 得到重组表达质粒 pBI-JB (图 1)。采用冻融法将质粒 pBI-JB 导入根癌农杆菌 EHA105, 经 Rif 和 Kan 筛选、PCR 检测及提取质粒

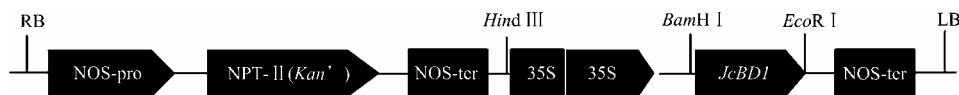


图 1 植物表达质粒 pBI-JB 结构示意图

Fig. 1 Diagram of plant expression plasmid pBI-JB

酶切检验后转化烟草。

1.4 烟草的遗传转化及转基因烟草的检测

采用叶盘法转化烟草, 具体操作过程见 Clark 等人的方法^[14]。转基因植株的筛选和再生参照 Zhou 等人的方法^[15]进行, 将外植体进行分化和抗性筛选后的再生苗, 4~6 周后移栽到花盆中温室培养, 采收种子。无菌条件下, 将种子在含有 100 mg·L⁻¹ 卡那霉素的 MS 培养基上萌发和培养, 再次进行抗性筛选, 获得转基因烟草植株。

用常规方法从转基因烟草叶片中提取 DNA。根据 *JcBD1* 序列设计扩增 ORF 全长特异性引物: BRL/BRR, 预期扩增片段大小分别为 1 509 bp。以各个植株 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。扩增程序为 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 45 s, 32 个循环; 72℃ 延伸 6 min。以未转化植株 DNA 作阴性对照, 重组 pBI-JB 质粒作阳性对照。重复 3 次进行检测。以分子检测为阳性的植株数占起始外植体的百分率计算转化率。

从转基因烟草叶片中提取植株总 RNA。未转化烟草作阴性对照, 重组 pBI-JB 质粒作阳性对照。将各个植株 RNA 反转录为 cDNA 为模板, 用 *JcBD1* 的 3' 端序列特异性引物: DL1 (5'-ATTACGGTTTAG GTGCTGC-3')/DR1 (5'-GCTTTGAAGGAGACTGATAC-3') 进行 RT-PCR 扩增检测, 预期扩增片段大小为 255 bp。扩增程序同上。以未转化植株 cDNA 作阴性对照, 重组 pBI-JB 质粒作阳性对照。重复 3 次进行

检测。

1.5 转基因烟草甜菜碱醛脱氢酶活性测定与 Western 杂交检测

以未转基因烟草作对照, 与转基因烟草幼苗同时移栽到装有大田土的花盆中, 取 5 个不同株系的转基因烟草植株, 6~7 叶期时用 200 mmol·L⁻¹ NaCl 溶液浇灌植株进行盐胁迫, 连续 7 d。胁迫处理后第 3 天取各植株第 3 或第 4 片叶测定 *JcBD1* 活性。转基因植株总蛋白的提取、烟草叶片 *JcBD1* 酶蛋白的提取及酶活性测定参考 Tijen 等^[16]的方法。以 BSA 为标准, 用 Bradford 法测定酶蛋白浓度^[17]。以每分钟消耗 1 nmol·L⁻¹ NAD 为 1 个酶活力单位 (U), *JcBD1* 酶比活力为每毫克蛋白质中所含的酶活力单位 (U·mg⁻¹)。同时, 选择 2 kg 左右的纯种新西兰兔, 用 *E. coli* BL21 中表达纯化得到的 *JcBD1* 蛋白^[18] (来自笔者实验室) 2 mg 进行第 1 次皮下免疫注射。3 周后, 取 1 mg 的 *JcBD1* 蛋白进行第 2 次加强免疫注射。5 周后, 再用 1 mg 的 *JcBD1* 蛋白进行第 3 次加强免疫注射。第 6 周, 收集抗血清备用。提取转基因烟草总蛋白, 以未转基因植株总蛋白为阴性对照, 以 *E. coli* 中表达纯化得到的 *JcBD1* 蛋白为阳性对照, 对转基因烟草 *JcBD1* 的表达进行 Western 杂交分析。各蛋白样品在 12% 的 SDS-PAGE 上分离, 用电转仪转移到硝酸纤维素膜上。按 Towbin^[19]的方法进行抗体结合和酶显色反应。一抗为麻疯树 *JcBD1* 的抗血清, 工作浓度为 1 : 1 000; 二抗为碱性磷酸酯酶 (AP) 偶联的山羊抗兔 IgG, 工作

浓度为 1 : 1 000, AP 的反应底物为氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 和 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸甲苯胺蓝 (BCIP)。

1.6 植物叶片相对电导率的测定

将转基因烟草幼苗移栽到花盆中, 温室常规培养管理。待长至 6~7 叶期时, 按每组 5 个株系 (编号为 L1, L2, L3, L4, L5), 分为 2 组处理。第 1 组继续常规培养; 第 2 组为盐胁迫, 连续 7 d 用 100 mmol·L⁻¹ NaCl 溶液浇灌植株。分别取各株系 0.5 g 新鲜叶片, 参照 Li 等^[20]的方法测定各株系烟草叶片的相对电导率。以未转基因烟草作对照。每株系取 3 个样, 取平均值。

1.7 转基因烟草耐盐性分析

以未转基因烟草植株作对照, 无菌条件下将长势一致的转基因烟草幼苗根系剪掉后, 转移到含不同浓度 NaCl 的 MS 培养基中, 于温室 25℃ 光照培养。设置 NaCl 浓度 0、100、200、400 mmol·L⁻¹ 4 个梯度处理。每个处理设 3 个重复, 每个重复 4 株苗。培养 20 d 后观察植株生长情况。

2 结果与分析

2.1 麻疯树 *JcBD1* 全长 cDNA 的克隆

以麻疯树 cDNA 为模板, 用简并引物通过 RT-PCR 技术得到 605 bp 长的条带, 与预期的片段大小一致。将该片段测序后通过 NCBI BLAST 进行同源比对发现, 该序列与已知 BADH 核苷酸序列具有很高同源性, 可达 84%, 由此可确定其为麻疯树 *JcBD1* 序列的片段。由已知序列设计引物, 用 RACE 和巢式 PCR 技术分别得到 904 bp 的 5'端序列和 412 bp 3'端序列。用 AlignX 软件对 3 段序列进行拼接得到 1 769 bp 的全长 cDNA 序列, 并在序列两端设计引物进行 PCR 扩增, 测序结果验证了拼接结果的正确性。该序列包括 1 509 bp 的 ORF, 及 44 bp 长的 5'非翻译区和 213 bp 3'非翻译区。在 poly (A) 尾端上游 149 bp 处具有加尾信号 (AATAAA)(图 2)。用 NCBI BLAST 软件和 DNAMAN 软件进行分析, 确定为甜菜碱醛脱氢酶的同源基因, 并推测得到 *JcBD1* 氨基酸序列, 命名为麻疯树甜菜碱醛脱氢酶基因, 英文简称为 *JcBD1* (GenBank accession no. EF174190)。通过比对, *JcBD1* 的核苷酸序列及相应的氨基酸序列和已经报道的诸如 *Gossypium hirsutum* (GenBank accession no. AAR23816)、*Panax ginseng* (GenBank accession no. AAQ76705)、*Medicago truncatula* (GenBank accession no. ABE82378)、*Spinacia oleracea* (GenBank accession no. AAB41696)

等具有很高的同源性, 可以达到 80% 以上的相似度。与大多数 BADH 一样, *JcBD1* 氨基酸序列中都存在高度保守十肽“VSMELGGKSP”和半胱氨酸残基(图 2)。据报道该十缩肽及半胱氨酸残基在甜菜碱醛脱氢酶底物特异性结合过程中起着重要作用, 与酶的催化活性有关^[21]。

2.2 烟草的遗传转化及转基因烟草的检测

用携带 pBI-JB 质粒的农杆菌浸染 60 片烟草叶片外植体后, 在分化培养基上形成丛生芽, 转入诱导培养基上诱导生根。经过 Kan 抗性筛选得到 40 株具有 Kan 抗性的烟草植株。农杆菌浸染的外植体能分化正常的愈伤组织, 形成丛生芽, 诱导生根; 最后得到的烟草植株健壮, 颜色鲜绿。而未经农杆菌侵染的烟草叶片在含有抗生素的分化培养基上不长芽, 不生根, 后渐渐退绿黄化直至变白枯萎。

为证明 *JcBD1* 是否整合到烟草基因组中, 以转基因烟草植株 DNA 为模板、*JcBD1* ORF 序列的特异引物 DRL/DRR 进行 PCR 检验。在 40 株抗性烟草中有 34 株植株都可扩增到 1 509 bp (图 3) 的特异片段, 这与特异引物界定片段的大小吻合, 而未转化的烟草株中无扩增产物 (部分 PCR 扩增结果如图 3)。以分子检测为阳性的植株数 (34) 占起始外植体 (60) 的百分率计算转化率, 得到的转基因植株频率约为 56.7%。同时以转基因烟草植株叶片 cDNA 为模板, *JcBD1* 的特异引物 DL1/DR1 进行 RT-PCR 检验。在 34 株供试的 DNA 检测为阳性的烟草中有 30 株植株都可扩增到 255 bp (图 4) 的特异片段, 未转化的烟草株中无扩增产物。3 次重复检测结果一致。结果表明未转基因的烟草中没有 BADH 基因或其同源基因。扩增检测结果表明外源 *JcBD1* cDNA 已成功整合到烟草基因组中, 且能够成功表达。

2.3 转基因烟草甜菜碱醛脱氢酶活性测定及 Western 杂交分析

对经盐胁迫处理的转基因烟草中的蛋白含量和酶活性进行了测定, 结果表明在转基因植株中能够检测到 *JcBD1* 酶活性, 而在未转基因的对照烟草植株中检测没有检测到 *JcBD1* 酶活性, 说明导入烟草中的 *JcBD1* 基因能够转录并能正确翻译成甜菜碱醛脱氢酶蛋白 (表)。外源基因的导入没有引起转基因植株总蛋白质含量的显著改变; 转基因植株的各个株系 BADH 酶的比活力在株系间有一定差异。

通过 Western 杂交检测, 抗体与纯化 *JcBD1* 蛋白具有特异的杂交带, 在转基因烟草株系中能检测到相

```

1   ACTTTACATCGCACAACTACTGGAACCAAGTGAACCGCGGAGCATGCTTTTCCTATACCAAAATCGGCAGTTATTCA
1   M A F P I P N R Q L F
79  TCGGCGGAGAATGGAGAGAACCTGTTTCTCAAGAAACGCATCCCTATTATCAACCCCTCTACGGAGGAGAGCATCGGTG
12  I G G E W R E P V L K K R I P I I N P S T E E S I G
157 ACATACCAGCAGCTACTGCAGAAGATGTTGGAGATAGCAGTAGAAGCAGCTCAGAAAGCATTACCAGGAACAAAGGCA
38  D I P A A T A E D V E I A V E A A Q K A F T R N K G
235 GAGATTGGGCCTTCACTTCTGGGGCTGTCGGTAAAGTATTACGTGCTATTGCTGCTAAGATAACGGAGAAAAAG
64  R D W A F T S G A V R A K Y L R A I A A K I T E K K
313 CTGAACTAGCGAAACTTGAAGCAATAGATTGTGGAACCCATTAGATGAAGCAGCGTGGGACATAGATGATGTTGCTG
90  A E L A K L E A I D C G K P L D E A A W D I D D V A
391 GATGTTTGGAGTACTATGCTGGCCTTGGCTGAAGGCTTAGATGCAAAGCAAAAAGCTCCTGTTCTTCCGTATGAAAA
116 G C F E Y Y A G L A E G L D A K Q K A P V S L P M E
469 CATTAAAGAGCTACGTTCTTAAAGAACCTATTGGTGTGTTGCTTTGATCACTCCTTGGAAATTATCCACTATTGATGG
142 T F K S Y V L K E P I G V V A L I T P W N Y P L L M
547 CTAGTGGAAAGTGGCTCCAGCCTTGGCAGCAGGTGACAGCAACTGAAGCCATCTGAAGCCATGACATGACAGTCAAGT
168 A T W K V A P A L A A G C T A I L K P S E L A S V T
625 GTTTAGAGTTGGCTGAAGTTGTAGAGAGGTTGGTCTTCTCCTGGTGTCTCAATATTCTAACTGGATTGGGCGCTG
194 C L E L A E V C R E V G L P P G V L N I L T G L G P
703 AAGCTGGTCTCCTTTGGTATCTCATCCCAAGTTGCAAGTTGCTTTTACTGGAAGCACAGCAGTACAGGACAGGAGCA
220 E A C A P L V S H P Q V D K V A P T G S T A T T C S R
781 TAATGGCATCTGCAGCTCAGATGGTCAAGCCTGTTTCTATGGAGCTTGGTGGGAAAGCCCAATGTTGTGTTGGAG
246 I M A S A A Q M V K P V S M E L G G K S P I V V F E
859 ATGTTGATCTGATAAGGCTGTAATGGACTGCCTTTGGTTGCTTTGGACAAATGGTCAGATATGACGGCCCAACAT
272 D V D L D K A A E W T A F G C F W T N G Q I C S A T
937 CCGCTCTTCTGTGCATGAAAGAATTGCATCTGAATTTCTGGACAGGCTTGTAAAGTGGTCAAAAACATTAATAAT
298 S R L L V H E R I A S E F L D R L V K W C K N I K I
1015 CAGACCCCTTGAAGAAGGTTGCAGACTTGGCCCGGTTGTCAGTGGAGGACACTATGACAAAGTATTGAAATTTATTT
324 S D P L E E G C R L G P V V S G G Q Y D K V L K F I
1093 CAACTGCTAAGAGTGAAGTGAACCATTTTGTCTGGTGGGCTCGTCCAAAGCACTTGAATAAGGGATTCTTCATTG
350 S T A K S E G A T I L S G G A R P K H L N K G F F I
1171 AACCAACCATATAAGTGATGTAATACTCCATGCAAAATTTGGAGAGAGGAAGTCTTTGGACCTGCTCTGTGTGTTA
376 E P T I I S D V N T S M Q I W R E E V F G P V L C V
1249 AAACATTTAGTCTGAAGATGAAGCCATTGAATTTGGCAAATGACACTCATTACGGTTTAGGTGCTGCAGTGATATCAA
402 K T P S S E D E A I E L A N D T H Y G L G A A V I S
1327 ATGATCTAGAAGGTGTGATCGAGTAAGCAAGTCTTCCGAGCAGGTATTGTTTGGATCAATTGCTCACAGCCATGCT
428 N D L E R C D R V S K S F R A G I V W I N C S P C
1405 TCTGTCAAGGCTCCATGGGGAGGCTCAAGCGTAGTGGTTTTGGGCGTGAATTAGGAGAATGGGACTCGATAATTACC
454 F C Q A P W G G L K R S G F G R E L G E W G L D N Y
1483 TGAGTGTGAAGCAGGTGACTCAATATATCTCCAATGAACCTTGGGGTGGTATCAGTCTCCTTCAAAGCTGTAATGAGA
480 L S Y K Q Y T Q Y I S N E P W G W Y Q S P S K L *
1561 TCTTCGTGAGAACAATAATGAAATAATGCCGGATAAGAGGTAATAAAAGGAAGAAGGATCAATGTAGTGAATCAAAGC
1639 TTGTATCGAACTAAAATATTGCAAAATCTATAAACCCCTTGTAACTCTCTTATGATCTGTATCGTTTGTGATATTGT
1717 TAGATTTAAATAGAGTTGGAAGTTTGGCATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

黑框中为起始密码子和终止密码子，阴影部分为保守“十缩肽”和半胱氨酸残基，下划线部分为加尾信号
 The conserved decapeptide sequences ‘VSMELGGKSP’ and cysteine residue are shadowed. The start (ATG) and stop codon (TAA) are black-boxed. The putative polyadenylation (AATAAA) signal is underlined

图 2 麻疯树 *JcBD1* 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列
 Fig. 2 The full nucleotide sequence and deduced amino acid sequences of *JcBD1*

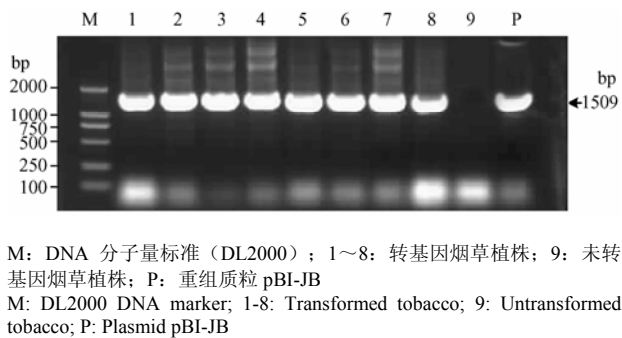


图 3 转化烟草植株 PCR 检测
 Fig. 3 PCR analysis of transgenic tobacco

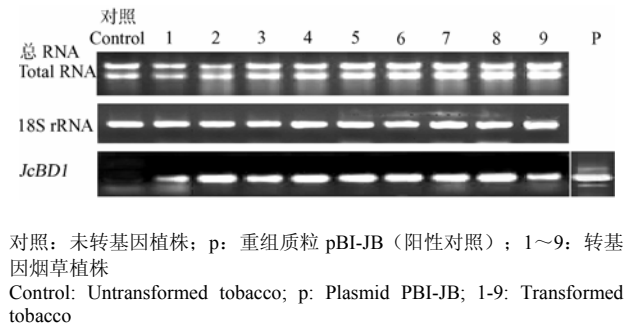


图 4 转化烟草植株的 RT-PCR 检测
 Fig. 4 RT-PCR analysis of transgenic tobacco

表 转基因烟草中 JcBD1 酶活性和蛋白含量测定

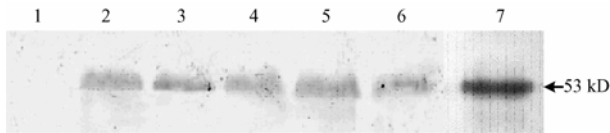
Table Protein content and JcBD1 enzyme activity assay in transgenic tobacco plants

测定项目 Tested items	株系 Plant line					
	对照 Control	1	2	3	4	5
JcBD1 酶活性 JcBD1 activity unit (U)	0	3.13±0.25	1.94±0.32	2.26±0.28	1.64±0.10	2.75±0.22
蛋白质含量 Protein content (mg·g ⁻¹ FW)	4.27±0.29	4.33±0.31	4.16±0.23	3.94±0.24	3.67±0.19	4.45±0.40
JcBD1 酶比活力 JcBD1 specific activity(U·mg ⁻¹)	0	0.723	0.466	0.574	0.447	0.618

对照: 未转基因烟草; 1~5: 转基因烟草株系

Control: Untransformed tobacco; 1-5: Transgenic tobacco plant lines

同的杂交信号, 反应条带都在 53 kD 的位置, 而在未转基因的烟草中没有检测到杂交信号 (图 5), 表明 JcBD1 在转基因烟草中得到了有效的表达。



1: 未转基因烟草 (阴性对照); 2~6: 盐胁迫后的转基因烟草; 7: 纯化 JcBD1 蛋白 (阳性对照)
1: Untransformed tobacco; 2-6: Transgenic tobacco after salt stress; 7: Purified JcBD1 protein

图 5 盐胁迫下转基因烟草的 Western 杂交分析

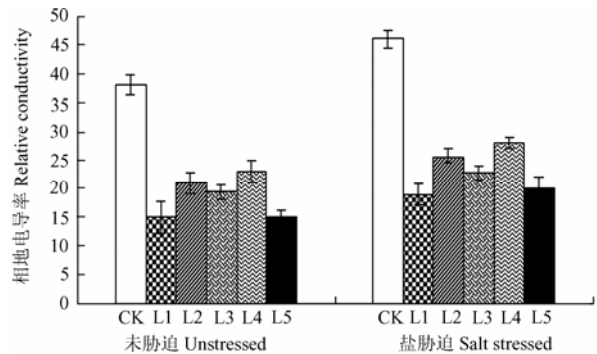
Fig. 5 Western blotting of transgenic tobacco plants under salt stress

2.4 盐胁迫转基因植株叶片相对电导率的测定

相对电导率测定的结果见图 6, 不管是在正常生长条件下, 还是在盐胁迫条件下, 转基因的烟草植株的电导率都低于未转基因植株。在正常生长条件下, 转基因烟草的 5 个株系植株相对电导率在 13%~25%, 而未转基因植株的电导率为 35%~42%。在盐胁迫条件下, 转基因烟草的 5 个株系植株相对电导率在 17%~27%, 而未转基因植株的电导率为 41%~52%。结果表明外源 *JcBD1* 在烟草中的表达, 在一定程度上保护了烟草叶片细胞膜的正常透性, 反映为相对电导率降低。

2.5 转基因烟草耐盐性试验

在无 NaCl 的 MS 培养基中, 转基因烟草与对照植株根系发达, 长势良好, 无明显区别。随着盐浓度的增加, 二者间的差别越来越明显。转基因烟草在 100 mmol·L⁻¹ 的培养基中能正常生长和长根, 植株形态学特征未见明显异常, 而对照植株在 100 mmol·L⁻¹ 的盐环境下, 生长缓慢, 部分叶片边缘出现卷缩和黄化,



结果代表 3 次重复测定结果的平均值产生, 竖条标示表示标准偏差。CK: 未转基因植株; L1~L5: 转基因植株
The result was the mean value of three experiments. The vertical bars represent standard deviations. CK: Untransformed tobacco; L1-L5: Transgenic tobacco plant lines

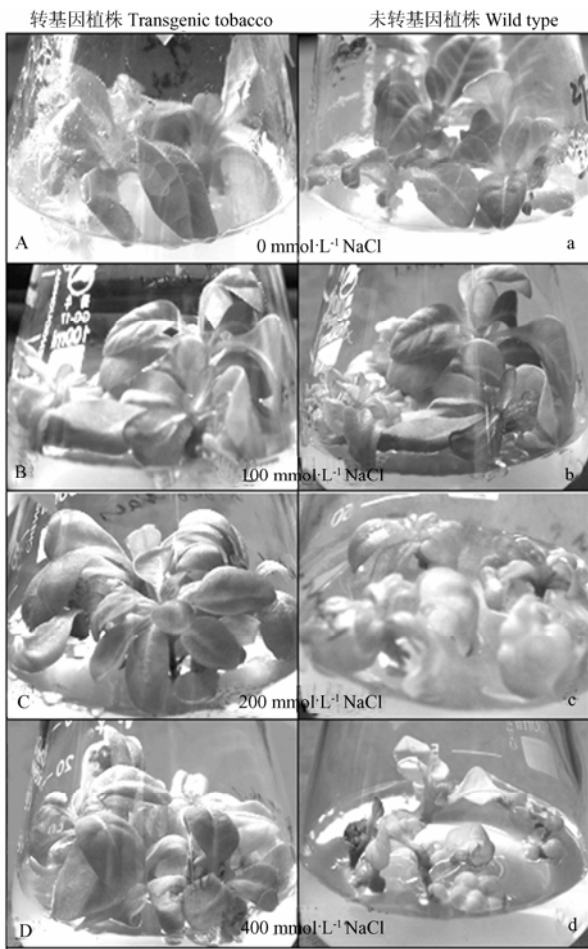
图 6 盐胁迫烟草植株叶片相对电导率测定

Fig. 6 Relative conductivity of transgenic tobacco after salt stress

根系不发达。转基因烟草在高盐浓度 (200 和 400 mmol·L⁻¹) 培养基中生长减慢, 可长出少量根, 植株可保持一定的生长势; 而对照植株在高盐 (200 和 400 mmol·L⁻¹) 下不长根, 且生长极其缓慢甚至停滞生长, 最后黄化死亡 (图 7)。总的来说, 在各盐浓度培养基中, 转基因烟草生长状态比对照植株良好, 生长势强于未转基因植株。结果表明外源基因的导入增强了转基因植株对盐胁迫的抗性。

3 讨论

细胞中脯氨酸、甜菜碱等小分子有机化合物和海藻糖、蔗糖等可溶性糖类等物质在逆境条件下大量积累, 作为渗透调节物质发挥功能, 维持渗透平衡, 也作为细胞的酶和蛋白质的保护物质发挥其非渗透调节功能, 双效功能增强了转化植株的抗逆能力^[2,22]。甜菜碱的增加是转 BADH 基因烟草植株抗逆性提高的



A~D: 转基因烟草植株, a~d: 未转基因烟草植株
A-D: Transgenic tobacco plants; a-d: Control plants

图7 转 *JcBD1* 烟草耐盐性

Fig. 7 The salt resistance of *JcBD1* transgenic tobacco

重要原因。无论是来自细菌的 *BetB* 基因（相当于高等植物的 *BADH* 基因），还是来自双子叶植物或单子叶植物的 *BADH* 基因，转入烟草后，转基因植株在耐盐、耐寒、耐冷等抗逆性方面都比对照有明显提高^[7]。Rathinasabapathi 等^[23]将来自菠菜和甜菜的 *BADH* cDNA 转入烟草，转基因烟草在遭受盐胁迫时，表现与菠菜叶片相似或稍高的 *BADH* 的活性，可将外源甜菜碱醛转变为甜菜碱，使甜菜碱含量高达 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW。Holmstrom 等^[24]将大肠杆菌 (*E. coli*) *Bet B* 基因导入烟草，转基因植株表现出了 *BADH* 活性，从而证明细菌 *BADH* 基因能在高等植物中有效表达。刘凤华等人^[8]将从山菠菜中克隆的 *BADH* 基因导入烟草，获得的转基因烟草抗盐性明显增强，且植株在盐胁迫时的受损伤程度明显降低。此外，衣艳君等^[25]和骆爱

玲等^[26]报道转 *BADH* 烟草叶片中抗氧化酶如过氧化氢酶、抗坏血酸过氧化物酶活性的提高，从而抗氧化酶活性的提高也是转基因植株抗逆性增强的重要原因。以上报道表明用烟草这样的外源基因遗传转化模式植物来验证 *JcBD1* 的功能是切实可行的。为了验证笔者所克隆的麻疯树 *JcBD1* 在其它物种中能否正常表达、表达产物是否具有甜菜碱醛脱氢酶活性以及在转基因植株耐盐作用中的生理功能，为下一步将 *JcBD1* 转入农作物并获得高抗逆品种提供基础，以及为麻疯树基因工程改造等研究奠定基础，笔者通过 PCR 扩增、RT-PCR 分析检测到麻疯树 *JcBD1* cDNA 成功导入到无内源 *BADH* 基因的烟草。转基因烟草中 *JcBD1* 酶活性测定、Western 杂交分析、电导率的检测及抗盐实验结果一致表明 *JcBD1* 在转化烟草植株中能够正常表达，并表现出比对照更强的应对逆境的能力。在转基因植株的各个株系间酶比活力存在差异，可能与 *JcBD1* 插入位点和拷贝数有关。Western 杂交表明盐胁迫后的转基因植株可以检测到杂交信号，而未转基因的烟草无杂交信号，说明外源 *JcBD1* 插入后，可受盐胁迫的诱导使 *JcBD1* 在烟草中表达。而 *JcBD1* 在体内合成的甜菜碱，发挥渗透物质调节功能及非渗透物质保护酶和蛋白的功能，在一定程度上保护了烟草叶片细胞膜的正常透性，反映为相对电导率降低（图6）和耐盐性的提高（图7），本文结果与司怀军等^[7]转菠菜 *BADH* 基因烟草表现的特性一致，甚至部分转 *JcBD1* 的烟草植株表现的酶活力高于转菠菜 *BADH* 基因的烟草。推测的 *JcBD1* 氨基酸序列中的十肽“VSMELGGKSP”和半胱氨酸残基与其它 *BADH* 具有很高同源性。在大多数 *BADH* 酶的氨基酸序列中含有的十肽为“VTLELGGKSP”，而在推测的 *JcBD1* 氨基酸序列的相应位置为“VSMELGGKSP”，即“SM”替代了“TL”残基^[18]。这个替代行为是否为 *JcBD1* 酶特性的决定性因素，从而使转 *JcBD1* 的烟草表现的酶活力高于转菠菜 *BADH* 基因烟草，尚需要作进一步的深入研究。在 *JcBD1* 酶氨基酸序列中，还有一个 C-末端微体定位信号（SKL-）。这一特点与大多数单子叶植物 *BADH*^[22]相同，而不同于大多双子叶植物，这是否为决定 *JcBD1* 功能的关键也是未知数。为双子叶植物的麻疯树，在细胞中是否存在另外一种无三肽“SKL-”残基而定位于叶绿体的 *BADH*，以及和已知的 *JcBD1* 之间生理功能是否存在差别，尚在研究之中。转 *JcBD1* 烟草植株的耐盐性的提高，在一定程度上阐释了 *JcBD1* 与麻疯树较强抗逆性的特性之间的关系，

JcBD1 在麻疯树的环境适应中起着重要作用。

4 结论

构建了源于麻疯树的 *JcBD1* 真核表达载体, 并将其成功转入了烟草基因组, 获得转基因植株。在转基因烟草中检测到甜菜碱醛脱氢酶活性, 转基因烟草电导率明显低于对照植株, 转基因烟草的耐盐能力明显提高。研究结果表明 *JcBD1* 能够在异源高等植物中正常表达, 可进一步用于植物抗逆基因工程研究, 同时在一定程度上证明麻疯树 JcBD1 与麻疯树抗逆性较强之间存在紧密联系。

致谢: 感谢四川大学生命科学院遗传室刘志斌博士提供农杆菌菌种。

References

- [1] Jeyanthi R L, Toshiya M, Izumi Y, Yutaka T, Kiyoo H, Yoshihiro Y, Nobuo T, Eiji H. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Avena sativa*. *Journal of Plant Research*, 2003, 116: 133-140.
- [2] Papageorgiou G C, Murata N. The unusually strong stabilizing effects of glycinebetaine on the structure and function in the oxygen-evolving photosystem II complex. *Photosynthetica*, 1995, 44: 243-252.
- [3] Hideki O, Masumi E. Isolation of cDNA and enzymatic properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Zoysia tenuifolia*. *Journal of Plant Physiology*, 2005, 162: 1077-1086.
- [4] Muanza D N, Euler K L, Williams L. Screening of antitumor and anti-HIV activities of nine medicinal plants from Zaire. *International Journal of Pharmacognosy*, 1995, 33: 98-106.
- [5] Weretilnyk E A, Hanson A D. Molecular cloning of a plant betainealdehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87: 2745-2749.
- [6] McCue K F, Hanson A D. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends in Biotechnology*, 1990, 8: 358-362.
- [7] 司怀军, 张 宁, 王 蒂. 转甜菜碱醛脱氢酶基因提高烟草抗旱及耐盐性. *作物学报*, 2007, 33(8): 1335-1339.
Si H J, Zhang N, Wang D. Enhancement of drought and salt resistances in tobacco by transformation of betaine aldehyde dehydrogenase gene. *Acta Agronomica Sinica*, 2007, 33(8): 1335-1339. (in Chinese)
- [8] 刘风华, 郭 岩, 谷冬梅, 肖 岗, 陈正华, 陈受宜. 转甜菜碱醛脱氢酶基因植物的耐盐性研究. *遗传学报*, 1997, 24(1): 54-58.
Liu F H, Guo Y, Gu D M, Xiao G, Chen Z H, Chen S Y. Salt tolerance of transgenic plants with BADH cDNA. *Acta Genetica Sinica*, 1997, 24(1): 54-58. (in Chinese)
- [9] 郭 岩, 张 莉, 肖 岗, 曹守云, 谷冬梅, 田文忠. 甜菜碱醛脱氢酶基因在水稻中的表达及转基因植株耐盐性的研究. *中国科学 (C 辑)*, 1997, 27(2): 151-155.
Guo Y, Zhang L, Xiao G, Cao S Y, Gu D M, Tian W Z. Expression of betaine aldehyde dehydrogenase gene and salinity tolerance in rice transgenic plants. *Science in China (Series C)*, 1997, 27(2): 151-155. (in Chinese)
- [10] 郭北海, 张艳敏, 李洪杰, 杜立群, 李银心, 张劲松, 陈受宜, 朱至清. 甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因转化小麦及其表达. *植物学报*, 2000, 42(3): 279-283.
Guo B H, Zhang Y M, Li H J, Du L Q, Li Y X, Zhang J S, Chen S Y, Zhu Z Q. Transformation of wheat with a gene encoding for the betaine aldehyde dehydrogenase (BADH). *Acta Botanica Sinica*, 2000, 42(3): 279-283. (in Chinese)
- [11] 李银心, 常凤启, 杜立群, 郭北海, 李洪杰, 张劲松, 陈受宜, 朱至清. 转甜菜碱醛脱氢酶基因豆瓣菜的耐盐性. *植物学报*, 2000, 42(5): 480-484.
Li Y X, Chang F Q, Du L Q, Guo B H, Li H J, Zhang J S, Chen S Y, Zhu Z Q. Genetic transformation of watercress with a gene encoding for betaine aldehyde dehydrogenase (BADH). *Acta Botanica Sinica*, 2000, 42(5): 480-484. (in Chinese)
- [12] Jia G X, Zhu Z Q, Chang F Q, Li Y X. Transformation of tomato with the BADH gene from *Atriplex* improves salt tolerance. *Plant Cell Reports*, 2002, 21: 141-146.
- [13] Shashi K, Amit D, Henry D. Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiology*, 2004, 136: 2843-2854.
- [14] Clark M S. 顾红雅, 瞿礼嘉译. 植物分子生物学-实验手册. 北京: 高等教育出版社, 1998, 307-333.
Clark M S. Translated by Gu H Y, Qu L J. *Plant Molecular Biology-A Laboratory Manual*. Beijing: Higher Education Press, 1998: 307-333. (in Chinese)
- [15] Zhou S F, Chen X Y, Zhang X G, Li Y X. Improved salt tolerance in tobacco plants by co-transformation of a betaine synthesis gene BADH and a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene *SeNHX1*. *Biotechnology Letter*, 2008, 30: 369-376.
- [16] Tijen D, Ismail T. Exogenous glycinebetaine affects growth and proline accumulation and retards senescence in two rice cultivars under NaCl stress. *Environmental and Experimental Botany*, 2006, 56:

- 72-79.
- [17] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annual Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [18] Zhang F L, Niu B, Wang Y C, Chen F, Wang S H, Xu Y, Jiang L D, Gao S, Wu J, Tang L, Jia Y J. A novel betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Jatropha curcas*, encoding an enzyme implicated in adaptation to environmental stress. *Plant Science*, 2008, 174: 510-518.
- [19] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76: 4350-4354.
- [20] Li Q L, Gao X R, Yu X H, Wang X Z, An L J. Molecular cloning and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Suaeda liaotungensis* and its use in improved tolerance to salinity in transgenic tobacco. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(17): 1431-1436.
- [21] Pocard J A, Vincent N, Boncompagni E, Smith L T, Poggi M C, Rudulier D L. Molecular characterization of the bet genes encoding glycine betaine synthesis in *Sinorhizobium meliloti* 102F34. *Microbiology*, 1997, 143: 1369-1379.
- [22] 李莹, 张利民. 植物甜菜碱及甜菜碱合成酶研究进展. 杂粮作物, 2006, 26(3): 191-193.
- Li Y, Zhang L M. Advances in study of betain and its synthesis enzyme in plant. *Rain Fed Crops*, 2006, 26(3): 191-193. (in Chinese)
- [23] Rathinasabapathi B, McCue K F, Gage D A, Hanson A D. Metabolic engineering of glycine betaine synthesis: plant betaine aldehyde dehydrogenases lacking typical transit peptides are targeted to tobacco chloroplasts where they confer betaine aldehyde resistance. *Planta*, 1994, 193: 155-162.
- [24] Holmstrom K O, Welin B, Mandal A, Kristiansdottir I, Teeri T H, Lamark T, Strom A R, Palva E T. Production of the *escherichia coli* betaine aldehyde dehydrogenase, an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in transgenic plants. *Plant Journal*, 1994, 6: 749-758.
- [25] 衣艳君, 刘家尧, 骆爱玲, 张其德, 马德钦, 王学臣, 梁 峥. 转BADH 基因烟草的光系统II和呼吸酶活性变化. 植物学报, 1999, 41(9): 993-996.
- Yi Y J, Liu J Y, Luo A L, Zhang Q D, Ma D Q, Wang X C, Liang Z. Changes of photosystem II and respiratory enzyme activity in transgenic tobacco enriched BADH gene. *Acta Botanica Sinica*, 1999, 41(9): 993-996. (in Chinese)
- [26] 骆爱玲, 刘家尧, 马德钦, 王学臣, 梁 峥. 转甜菜碱醛脱氢酶基因烟草叶片中抗氧化酶活性增高. 科学通报, 2000, 45(18): 1953-1956.
- Luo A L, Liu J Y, Ma D Q, Wang X C, Liang Z. Enhancement of anti-oxidase activity in transgenic tobacco leaves with BADH gene. *Chinese Science Bulletin*, 2000, 45(18): 1953-1956. (in Chinese)

(责任编辑 于 竞)