

# 互花米草 *BADH* 基因的克隆与定量表达分析

刘 振,张 侠,尹海波\*,陈世华,郭善利  
(烟台大学 生命科学学院,山东 烟台 264005)

**摘要:** 为研究甜菜碱醛脱氢酶(Bataine aldehyde dehydrogenase, *BADH*)基因的耐逆功能及分子机制,以盐生植物互花米草(*Spartina alterniflora*)为试验材料,利用 RACE 技术克隆了 cDNA 全长序列。生物信息学分析发现,该核苷酸序列全长 1 983 bp,开放阅读框 1 515 bp,编码 504 个氨基酸残基。Blast 比对发现,该氨基酸与细叶结缕草、二穗短柄草、高粱氨基酸的相似性分别达到 96%、87%、86%,且氨基酸数量基本相同。将该基因命名为 *SaBADH*。以 *tub* 为内参,对 *SaBADH* 基因在 600 mmol/L 的 NaCl、20% 的 PEG 处理下表达的定量分析表明,*SaBADH* 受 NaCl、PEG 诱导表达,随着处理时间的延长,*SaBADH* 基因的表达呈现先上升后下降的趋势,分别在处理 24、12 h 时达到最大值,分别约为对照的 7、4 倍,差异达到极显著水平,表明 *SaBADH* 基因可能在抵御盐和干旱对互花米草的胁迫中发挥重要作用。

**关键词:** 互花米草;甜菜碱;*BADH* 基因;基因克隆;抗旱耐盐性

**中图分类号:** S45;S153      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2018)11-0045-05

## Cloning and Quantitative Expression Analysis of *BADH* Gene from *Spartina alterniflora*

LIU Zhen,ZHANG Xia,YIN Haibo\*,CHEN Shihua,GUO Shanli  
(College of Life sciences,Yantai University,Yantai 264005,China)

**Abstract:** In order to study the inverse resistance function and molecular mechanism of *BADH* gene,the full-length cDNA of *BADH* gene was cloned from *Spartina alterniflora* by RACE strategy. Bioinformatic analysis showed that the full-length cDNA of *BADH* gene was 1 983 bp and the open reading frame was 1 515 bp which encoding 504 amino acids. Blast alignment found that amino acid sequence from *Spartina alterniflora* was similar to that of *Zoysia tenuifolia*, *Brachypodium distachyon* and *Sorghum bicolor* and shared 96%,87% and 86% identity, respectively. The number of amino acids were basically the same. So the gene was named *SaBADH*. Using *tub* as internal reference, the expression pattern of *Spartina alterniflora* under 600 mmol/L NaCl and 20% PEG treatments was studied. The results showed that *SaBADH* gene was induced by NaCl and PEG,suggesting that it may play an important role in salt and drought tolerance of *Spartina alterniflora*. With the prolongation of treatment time, the expression of *SaBADH* gene showed a trend of increasing first and then decreasing,reaching the maximum at 24 h, 12 h,respectively,about 7 times and 4 times of the control,respectively,and the difference reached a very significant level.

**Key words:** *Spartina alterniflora*; Glycine betaine; *BADH* gene; Gene cloning; Drought and salt tolerance

长期以来,对土地不合理的利用(不合理轮作、过度施用化肥、不合理浇灌、过度放牧等)及对植被资源的过度开采,导致土地受到不同程度的盐渍化

威胁,荒漠戈壁滩的面积也不断扩大,同时,盐渍化和干旱也成为制约农业发展的重要非生物胁迫因素。因此,如何有效地开发利用盐碱地、干旱地成为

收稿日期:2018-06-30  
基金项目:国家自然科学基金面上项目(31370296);烟台大学博士启动基金项目(TM09B25,HX10B23)  
作者简介:刘 振(1992-),女,山东临沂人,在读硕士研究生,研究方向:植物抗逆生理。E-mail:liulizhen92@163.com  
\* 通讯作者:尹海波(1976-),男,山东青岛人,副教授,博士,从事植物抗逆生理研究。E-mail:Yinhaibo76@163.com

社会关注的重点。

互花米草 (*Spartina alterniflora*) 是一种禾本科米草属的多年生草本植物,适宜生长在潮间带,起源于美国大西洋沿岸和墨西哥湾,引进中国后主要分布在沿海滩涂地带。互花米草叶互生、具盐腺,是挖掘耐盐基因良好的生物材料。1996 年 Wood 等<sup>[1]</sup>研究发现,禾本科植物含有甜菜碱醛脱氢酶基因。甘氨酸甜菜碱 (Glycine betain, 以下简称甜菜碱) 是以胆碱为底物,丝氨酸为原料,在胆碱单加氧酶的催化下先生成甜菜碱醛,再通过甜菜碱醛脱氢酶 (BADH) 的氧化作用生成的<sup>[2-3]</sup>。甜菜碱作为植物中重要的渗透调节剂,在植物遭受盐碱、干旱等逆境胁迫时,帮助植物维持细胞渗透平衡,并可保护蛋白酶活性,激活抗逆基因表达,显著提高植物的抗逆能力。目前已从菠菜<sup>[4]</sup>、辽宁碱蓬<sup>[5]</sup>、异苞滨藜<sup>[6]</sup>、大麦<sup>[7]</sup>、结缕草<sup>[8]</sup>、盐节木<sup>[9]</sup>、柳树<sup>[10]</sup>等植物中克隆出 BADH 基因。将 BADH 基因转入小麦<sup>[11]</sup>、水稻<sup>[12]</sup>、大豆<sup>[13]</sup>、玉米<sup>[14]</sup>、棉花<sup>[15]</sup>、羽衣甘蓝<sup>[16]</sup>等植物使其耐盐性或耐旱性得到不同程度的提高。本研究拟从盐生植物互花米草中克隆 BADH 基因,对其进行生物信息学及表达分析,为进一步研究其耐逆功能和分子机制提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

互花米草种子采集于山东莱州海滨,浸泡处理后 4 ℃ 保存。将保存的种子种植于基质中 (1/2 椰土 + 1/2 黑土),在 25 ℃、光照/黑暗为 16 h/8 h 的环境下培养 2 周。取长势一致的植株移到小方盆中,继续培养至 4 ~ 5 叶龄<sup>[17]</sup>。用 600 mmol/L 的 NaCl 溶液浇灌 4 ~ 5 叶龄幼苗 48 h,剪取幼嫩叶片,液氮速冻后 -80 ℃ 保存,用于 BADH 基因的克隆。用 600 mmol/L 的 NaCl 溶液、20% 的 PEG 溶液分别对幼苗进行浇灌和喷洒处理,分别胁迫 0、3、6、12、24、48 h,每个处理重复 3 次。洗样,剪取幼嫩叶片,液氮速冻后 -80 ℃ 保存,用于 BADH 基因的表达分析。

大肠杆菌 DH<sub>5α</sub> 为烟台大学植物发育分子生物学实验室保存;PCR 相关试剂、pMD18 - T Vector、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、限制性内切酶、DNA 凝胶回收试剂盒均购自 TaKaRa;BIOZOL RNA Kit 购自 BIOFLUX 公司;Reverse Transcriptase 试剂盒购自 Promega 公司;氨基青霉素购自 Sigma 公司;其他试剂多为国产分析纯;引物由北京华大六合基因公司合成。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 互花米草 BADH 基因的克隆 取冻存的用

于基因克隆的互花米草叶片,液氮研磨,利用 BIOZOL RNA Kit 提取 RNA,使用超微量紫外分光光度仪检测其纯度和浓度,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。利用 Reverse Transcriptase 试剂盒体外反转录合成 cDNA。根据烟台大学植物发育分子生物学实验室转录组测序结果,获得 BADH 基因的中间片段,在此基础上设计 RACE 引物 (S31 - BADH: 5' - CCAAGATTACTGAGAGGAAGCCTG - 3'; S32 - BADH: 5' - CCACCTTCAGAGAGACCCTATTGG - 3'; S51 - BADH: 5' - CCAATAGGGTCTCTCTGAAGGTGG - 3'; S52 - BADH: 5' - CAGGCTTCCTCTCAGTAATCTTGG - 3'),以 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s,68 ℃ 延伸 90 s,30 个循环;68 ℃ 充分延伸 10 min。DNA 凝胶回收试剂盒回收目的片段,加尾,与 pMD18 - T Vector 连接,转化 DH5α 感受态细胞,酶切,挑选阳性克隆送华大基因公司测序。比对分析测序结果,拼接获得互花米草 BADH 全长 cDNA 序列,登陆 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行 Blast 比对,确认其为互花米草 BADH 基因,将其命名为 SaBADH 基因。根据拼接获得的全长 cDNA 序列,设计引物 (SaBADH1 - oxF: 5' - CTCTAGACACCCAAAGCCCAAGCTCAGTG - 3'; SaBADH1 - oxR: 5' - GGTACCCACACGACTTCAGCACATGGTAC - 3'),以 cDNA 为模板,扩增 SaBADH 基因。反应条件为:94 ℃ 预变性 7 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s, 68 ℃ 延伸 120 s,35 个循环;68 ℃ 充分延伸 10 min。将扩增产物回收,加尾,连接,转化,酶切,挑选阳性克隆送测序,确认获得正确的 SaBADH 基因的 pMD18 - T 克隆载体。

1.2.2 互花米草 BADH 基因的生物信息学分析 利用 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 进行 Blast 比对分析,取部分高度相似 (相似度 > 70%) 的同源序列,利用 MEGA 6 进行同源序列比对,构建 N - J 进化树,分析 SaBADH 与其他植物 BADH 的进化关系。利用 Ex-pasy 软件 (<https://web.expasy.org/protparam>) 分析 SaBADH 蛋白的基本理化性质。利用 PredictProtein 软件 (<https://www.predictprotein.org/>) 预测 SaBADH 的二级结构和亚细胞定位。利用 Inter-ProScan 软件 (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) 分析蛋白质的结构域。利用 SWISS - MODEL 软件 (<https://swissmodel.expasy.org/>) 进行三维建模,预测其三级结构。

1.2.3 互花米草 BADH 基因的表达分析 取冻存的用于表达分析的互花米草叶片,用 BIOZOL RNA

Kit 提取 RNA,用 Reverse Transcriptase 试剂盒合成 cDNA,稀释 20 倍作为 qRT - PCR 的模板。根据 *SaBADH* 基因的 cDNA 全长序列,设计定量引物 (*SaBADH* - RTF: 5' - TAAGTGGTCACAGCACACG-GAAC - 3', *SaBADH* - oxR: 5' - GGTACCCA-CACGACTTCAGCACATGGTAC - 3')。以 *tub* 为内参,进行 PCR 反应得到扩增曲线。反应条件为:95 ℃ 预变性 10 min;95 ℃ 变性 10 s,57 ℃ 退火 15 s,72 ℃ 延伸 20 s,40 个循环)。循环结束后,从 72 ℃ 缓慢升温至 95 ℃ 获得溶解曲线。

1.3 数据分析

采用 Excel 2003 软件绘图,利用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。本研究采用单因素方差分析,进行方差齐性检验和 *LSD* 分析。

2 结果与分析

2.1 互花米草 *BADH* 基因的克隆

采用 RACE 技术获得的 *SaBADH* 基因的两端序列见图 1,将其与本课题组实验室通过转录组测序得到的中间片段进行拼接,得到 *SaBADH* 基因 cDNA 的全长序列,在 NCBI 网站进行 Blast 比对,发现 *SaBADH* 与细叶结缕草、二穗短柄草、高粱氨基酸的 *BADH* 相似性分别达到 96%、87%、86%,且氨基酸数量基本相同,确认拼接得到了 *SaBADH* 基因。根据 *SaBADH* 基因 cDNA 的全长序列设计引物,以 cDNA 为模板,扩增 *SaBADH* 基因(图 1),获得 *SaBADH* 的克隆载体 pMD18 - T::SaBADH。

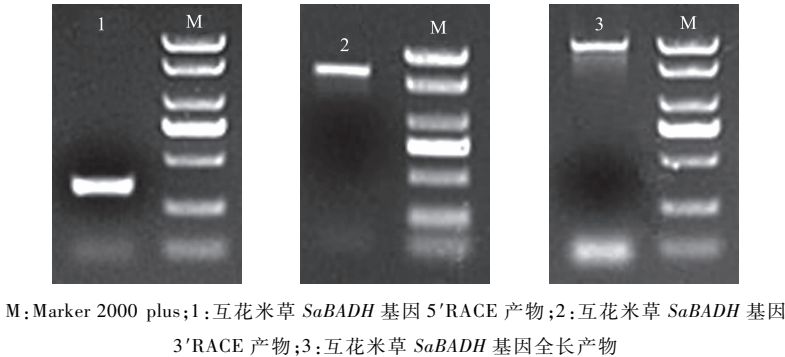
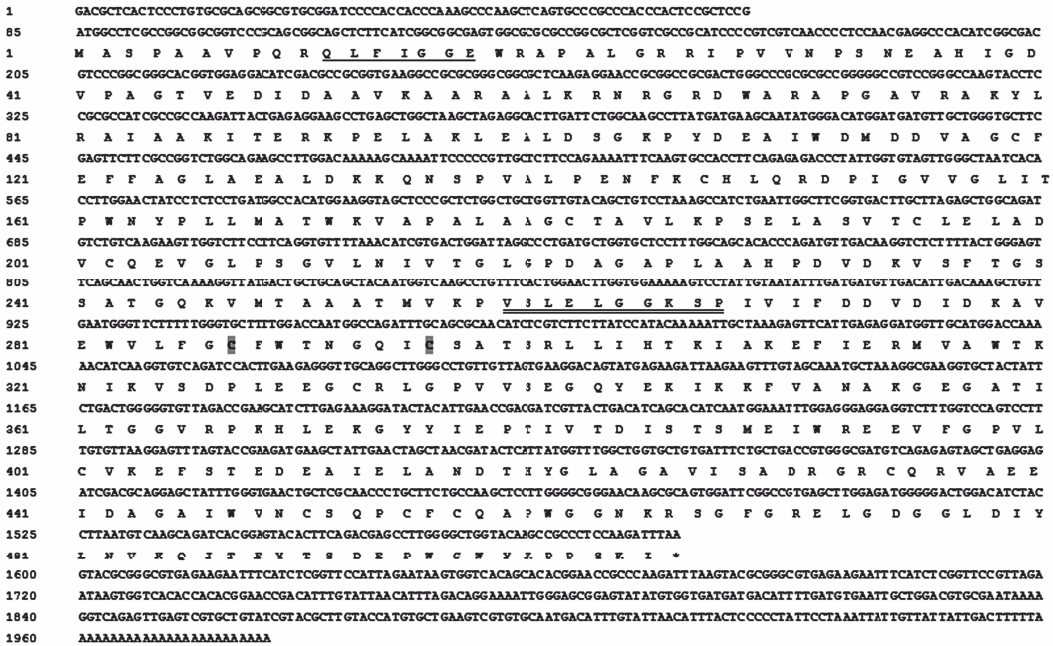


图 1 互花米草 *SaBADH* 基因电泳结果

2.2 互花米草 *BADH* 基因的生物信息学分析

*SaBADH* 基因的 cDNA 全长 1 983 bp,开放阅读框 1 515 bp,编码 504 个氨基酸(图 2)。Expasy 软

件预测 *SaBADH* 蛋白分子质量为 54.388 ku,理论等电点为 5.45,不稳定系数为 33.37,脂肪系数为 88.89,平均亲水系数为 -0.080,为稳定的亲水性蛋



单下划线为叶绿体定位序列;双下划线为信号肽;阴影为酶功能相关残基;\*为终止密码子

图 2 互花米草 *BADH* 的核苷酸序列及其所编码的氨基酸序列

白<sup>[18]</sup>。PredictProtein 软件预测 SaBADH 蛋白的二级结构由 43.65% 的 H、17.06% 的 E、39.29% 的 L 组成,SaBADH 蛋白定位于叶绿体。InterProScan 分析 SaBADH 具有碱醛脱氢酶结构域。SaBADH 的三级结构预测显示其为椭球形。SaBADH 的 Blast 比对发现,互花米草与细叶结缕草、二穗短柄草、高粱

的相似性达到 86% 以上。从 N-J 进化树(图 3)中可知,互花米草 BADH 与结缕草属细叶结缕草 BADH 亲缘关系最近,其次是短柄草属二穗短柄草、高粱属高粱、蜀黍属谷子等禾本科单子叶植物的 BADH,与棉花、山箭菜等双子叶植物的 BADH 亲缘关系较远。

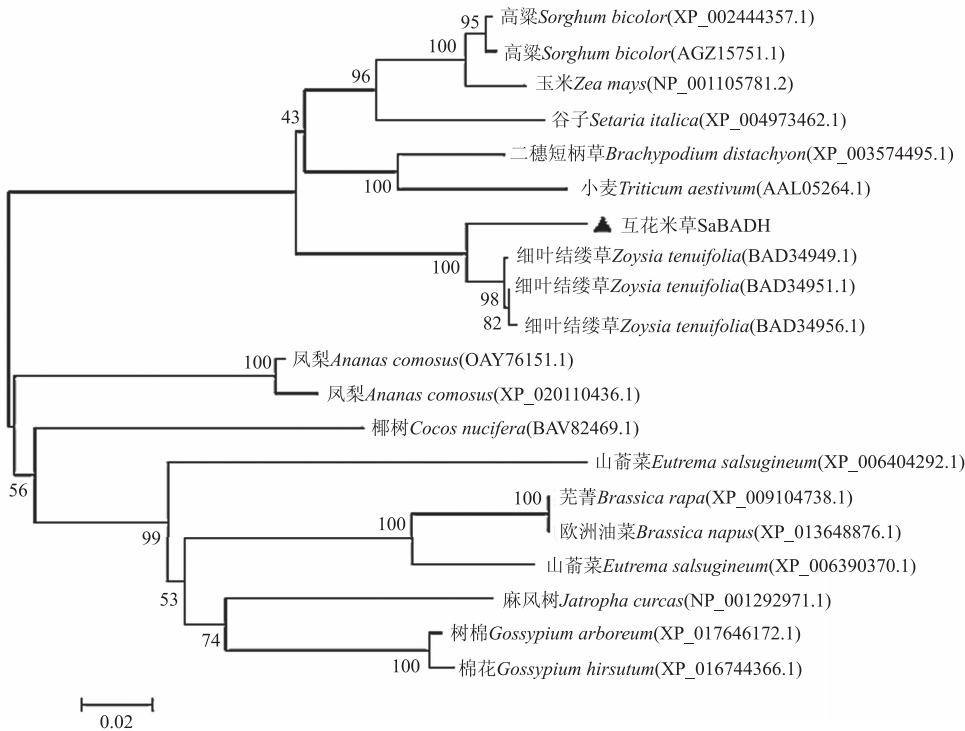


图 3 互花米草和其他植物的 BADH 系统进化树

2.3 互花米草 BADH 基因的表达分析

对在 600 mmol/L NaCl 和 20% 的 PEG 不同胁迫时间处理下的互花米草的 qRT-PCR 分析结果表明(图 4),随着处理时间的延长,SaBADH 基因的表

达呈现先上升后下降的趋势,分别在处理 24、12 h 时达到最大值,分别为对照的 7、4 倍,且与对照相比差异达到极显著水平,表明 SaBADH 受 NaCl、PEG 诱导表达,这与互花米草的耐盐耐早有密切关系。

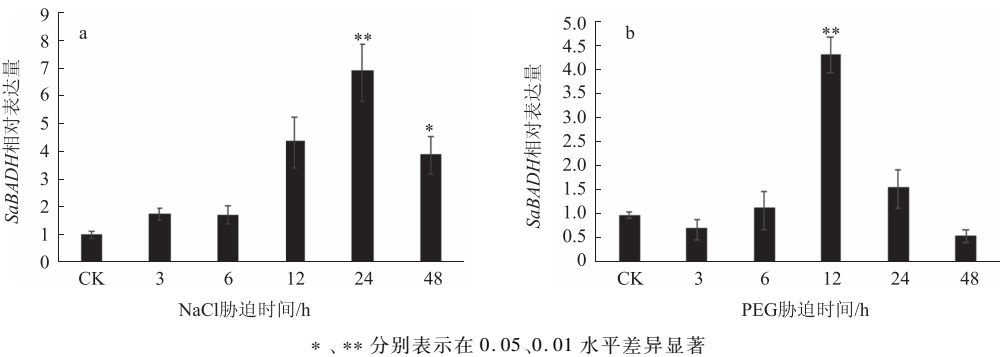


图 4 互花米草 BADH 在 NaCl、PEG 胁迫下的定量表达分析

3 结论与讨论

BADH 是甜菜碱合成过程中的关键酶,在植物耐逆过程中起重要作用<sup>[18-20]</sup>,随着全球土地盐渍化和干旱等非生物胁迫因素的加剧,研究植物的耐逆

基因意义愈发重大。目前,已经克隆出多种植物耐逆相关基因,主要有渗透物质合成酶基因、功能蛋白基因、信号转导相关基因等<sup>[21]</sup>。本研究通过 RACE 技术,从互花米草中克隆出 BADH 基因的全长 cDNA 序列。生物信息学分析预测 SaBADH 为稳定的

具有椭圆形三级结构的亲水性蛋白,定位于叶绿体。已有报道指出,*BADH* 定位于叶绿体的序列为 QLFIDGE<sup>[22]</sup>,推测 *SaBADH* 蛋白的氨基酸序列中的 QLFIDGE 指导其定位到叶绿体。InterProScan 分析 *SaBADH* 具有碱醛脱氢酶结构域。有报道指出,碱醛脱氢酶结构域有保守的 VTLELGKSP 十缩肽<sup>[23]</sup>,推测 *SaBADH* 蛋白的氨基酸序列中 VSLELGKSP 是该酶的保守十缩肽。系统进化分析显示,*SaBADH* 是序列保守的蛋白质,单子叶与双子叶 *BADH*、禾本科与非禾本科 *BADH* 在进化上有一定的差异,这与植物分类学上的亲缘关系一致。为进一步探讨 *SaBADH* 的耐盐机制,本研究利用 qRT-PCR 仪对 *SaBADH* 在 600 mmol/L NaCl、20% 的 PEG 胁迫处理下的表达量进行了相对定量表达研究。结果发现,*SaBADH* 的相对表达量发生了很大变化,这说明 *SaBADH* 受 NaCl、PEG 诱导表达。在 NaCl 胁迫处理时,随着处理时间的延长 *SaBADH* 的相对表达量逐渐增加,处理 24 h 时达到最大,约为对照的 7 倍,且差异达到极显著水平,之后 *SaBADH* 的相对表达量下降;在 PEG 胁迫处理时,随着处理时间的延长 *SaBADH* 的相对表达量逐渐增加,在处理 12 h 时达到最大,约为对照的 4 倍,且差异达到极显著水平,之后 *SaBADH* 的相对表达量下降。由此可见,*SaBADH* 在盐胁迫和干旱胁迫下基因表达上调,通过增加 *SaBADH* 的表达量来抵御盐和干旱胁迫对自身的毒害,这与互花米草在植物耐逆机制方面有较保守的功能密切相关。

随着土壤盐渍化和干旱问题的日益严重,利用基因工程技术培育耐盐耐旱新品种对于开发利用盐碱、干旱土地有重要意义。本实验室下一步将构建 *SaBADH* 的过量表达载体,转模式植物拟南芥,进一步研究 *SaBADH* 的耐逆功能与分子机制。

#### 参考文献:

- [1] Wood A J, Saneoka H, Rhodes D, *et al.* Betaine aldehyde dehydrogenase in *Sorghum* [J]. *Plantphysiol*, 1996, 110: 1301-1308.
- [2] Jeyanthi R L, Toshiya M, Izumi Y, *et al.* Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Avena sativa* [J]. *Journal of Plant Research*, 2003, 116: 133-140.
- [3] Hideki O, Masumi E. Isolation of cDNA and enzymatic properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Zoysia tenuifolia* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2005, 162: 1077-1086.
- [4] Weretilnyk E A, Hanson A D. Molecular cloning of a plant betaine aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990, 87(7): 2745-2749.
- [5] 李秋莉, 张毅, 尹辉, 等. 辽宁碱蓬甜菜碱醛脱氢酶基因 (*BADH*) 启动子分离及序列分析 [J]. *生物工程学报*, 2006, 22(1): 77-81.
- [6] 何宇锋. 麦冬 (*Ophiopogon japonicus*) 甜菜碱合成酶基因的克隆与表达研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2006.
- [7] Fujiwara T, Hori K, Ozaki K, *et al.* Enzymatic characterization of peroxisomal and cytosolic betaine aldehyde dehydrogenases in barley [J]. *Physiologia Plantarum*, 2008, 134(1): 22-30.
- [8] Hideki O, Masumi E. Isolation of cDNA and enzymatic properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Zoysia tenuifolia* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2005, 162: 1077-1086.
- [9] 高天鹏, 王春艳, 徐红伟, 等. 盐生植物盐节木甜菜碱醛脱氢酶基因的克隆与表达 [J]. *植物研究*, 2013, 33(3): 317-324.
- [10] 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.
- [11] 郭北海, 张艳敏, 李洪杰, 等. 甜菜碱醛脱氢酶 (*BADH*) 基因转化小麦及其表达 [J]. *植物学报*, 2000, 42(3): 279-283.
- [12] 杨晓玲, 东方阳, 孙耀中, 等. 转 *BADH* 基因水稻幼苗抗盐性研究 [J]. *西北植物*, 2006, 26(8): 1627-1632.
- [13] 秦迪, 赵翠兰, 郑成忠, 等. 转 *BADH* 基因大豆耐旱性分析 [J]. *中国油料作物学报*, 2015, 37(6): 752-758.
- [14] 郑成忠, 王丕武, 吴楠, 等. 转 *BADH* 基因玉米自交系的抗旱耐盐性分析 [J]. *吉林农业大学学报*, 2016, 38(3): 266-273.
- [15] 蒋玉蓉, 袁俊杰, 陈国林, 等. 转甜菜碱醛脱氢酶 (*BADH*) 基因的棉花的获得及其耐盐性鉴定 [J]. *分子植物育种*, 2015, 13(1): 125-131.
- [16] 李春枝, 潘彩霞, 刘宏伟, 等. 转甜菜碱醛脱氢酶基因增强羽衣甘蓝的耐盐性研究 [J]. *北方园艺*, 2018(5): 33-38.
- [17] 徐璐, 尹海波, 张侠, 等. 互花米草 *NHX1* 基因的 cDNA 的全长克隆、序列分析及定量表达分析 [J]. *江苏农业科学*, 2016, 44(8): 34-38.
- [18] 金杭霞, 董德坤, 杨清华, 等. 碱蓬 *SgBADH* 的克隆与分析及植物表达载体的构建 [J]. *核农学报*, 2016, 30(2): 246-251.
- [19] 母连胜, 何勇, 罗岸, 等. 质体基因工程在植物育种中的应用研究进展 [J]. *河南农业科学*, 2017, 46(6): 1-12.
- [20] 韩芸, 孙守钧, 裴忠有, 等. 高粱耐盐性研究进展 [J]. *河南农业科学*, 2012, 41(6): 1-8.
- [21] 化焱, 才华, 柏锡, 等. 植物耐盐基因工程研究进展 [J]. *东北农业大学学报*, 2010, 41(10): 150-156.
- [22] Nakamura T, Nomura M, Mori H, *et al.* An isozyme of betaine aldehyde dehydrogenase in barley [J]. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42(10): 1088-1092.
- [23] 曹红利, 郝心愿, 月川, 等. 茶树碱醛脱氢酶基因 (*Cs-BADH1*) 的全长 cDNA 克隆与表达分析 [J]. *茶叶科学*, 2013, 33(2): 99-108.