

川芎甜菜碱醛脱氢酶 cDNA 的克隆及其植物表达载体的构建

毛莹¹, 张艳军¹, 王万军¹, 陈劲松², 廖海², 周嘉裕²

(1. 西南交通大学 生命科学与工程学院, 四川 成都 610031; 2. 中国科学院 成都生物研究所, 四川 成都 610041)

摘要:以川芎为试材,从叶片中提取总 RNA,经过 RT-PCR 获得甜菜碱醛脱氢酶(Betaine aldehyde dehydrogenase)基因的 cDNA,纯化后与 pMD18-T 载体连接,转化大肠杆菌 Top10,获得甜菜碱醛脱氢酶全长基因序列,以期构建植物表达载体。结果表明:甜菜碱醛脱氢酶全长核苷酸长度为 1 527 bp,编码 508 个氨基酸。与 GenBank 中已发表序列 HM35276 进行比较,核苷酸同源性为 100%。将该基因片段克隆到植物表达载体 pBI121 中,构建重组质粒 pBI121/Betaine aldehyde dehydrogenase,并将所获重组质粒经过双酶切和 PCR 处理后进行序列测定,证实表达载体上含有目的片段,且连接、构建正确,为 BADH 的进一步表达奠定了基础。

关键词:川芎;甜菜碱醛脱氢酶;克隆;植物表达载体

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)05-0087-04

川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort.)属伞形科多年生草本植物,其干燥根茎,为我国传统中药材,对治疗冠心病、心脑血管缺血等心血管疾病有明显疗效^[1]。川芎生长喜低温,尤其是川芎种只能在低温的高海拔山区(1 500 m)进行繁育(时间长达 200 d),具有较强的适应低温的能力,也是开展植物抗低温研究的重要资源植物^[2]。大多数高等植物在受到低温胁迫时常常会合成并累积甘氨酸甜菜碱、脯氨酸和可溶性糖等渗透调节物质来提高细胞渗透压,这对抵御严寒具有重要作用。其中,甜菜碱是最主要的渗透调节剂之一^[3]。由于甜菜碱醛脱氢酶(Betaine aldehyde dehydrogenase, BADH)是合成甘氨酸甜菜碱途径中的关键酶。将 BADH 基因转入到苜蓿中,获得了具有抗盐碱能力的转基因苜蓿稳定株系。通过品种比较试验、区域试验和生产试验,表明在不同盐碱地条件下,转 BADH 基因的苜蓿植株产草量明

显高于对照,干草增产率明显提高^[4]。并且甘氨酸甜菜碱合成过程简单,遗传操作方便,因此选择对甘氨酸甜菜碱合成酶基因进行分离和转化可提高植物低温胁迫环境下的生长能力^[5-6]。

迄今为止,对川芎的研究仅限于药理、生理等方面。关于川芎抗逆的生化研究尤其是甜菜碱生物合成途径及关键酶基因的研究尚未大力展开。课题组曾利用 RT-PCR 和 RACE 方法从川芎叶片中分别分离了川芎 BADH 基因的 5'端片段、3'端片段以及中间片段的 cDNA 序列,通过软件拼接得到目的基因全长序列(GenBank 登录号:HM35276)^[7]。为了从分子水平对川芎的抗逆能力进行探究,充分利用其耐低温基因,并期望通过转基因手段在目标植物中发现一条较完善的甜菜碱合成途径。该试验根据川芎 BADH 基因的 cDNA 序列,根据软件设计并合成特异引物,从川芎叶片中提取川芎 BADH 总 RNA,经过反转录获得川芎 BADH 全长 cDNA,PCR 大量扩增且测序正确,构建植物表达载体,为研究甘氨酸甜菜碱生物合成分子机制以及利用生物工程技术等手段提高植物胁迫抗性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

川芎种采自都江堰市川芎 GAP 种植基地,按沙石:蛭石:泥炭 1.5:1:1(质量比)配置培养基质,川芎种于其中自然生长,加入 Hoagland 营养液培养。培养 6 d 待长出真叶后对部分幼苗进行 4℃低温胁迫处

第一作者简介:毛莹(1991-),女,在读硕士,现主要从事植物资源及生物技术等研究工作。E-mail:935497725@qq.com.

责任作者:周嘉裕(1976-),女,博士,副教授,现主要从事植物资源及生物技术等研究工作。E-mail:spinezhou@yahoo.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31271302);教育部中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(SWJTU11CX114);中国科学院成都生物研究所山地生态恢复与生物资源利用重点实验室及生态恢复与生物多样性保育四川省重点实验室开放课题资助项目;国家级大学生创新创业训练计划资助项目(201210613050);西南交通大学科技发展计划资助项目(2008B06)。

收稿日期:2012-11-09

理 3 d。与仅用 Hoagland 营养液培养的川芎幼苗进行对照。

Ex-Taq DNA 聚合酶、RNAase Inhibitor、dNTP、AMV 反转录酶、核苷酸末端转移酶(TdT)、氨苄青霉素、限制性内切酶、T4 连接酶、DNA 分子量标准 DL-2000 为大连宝生物工程有限公司产品;pMD18-T、农杆菌菌株为 GV3101(该实验室保存);胰蛋白胨和酵母提取物(OXOID 产品)、琼脂糖和琼脂粉(Amersham 产品)、其余试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计与合成 应用 Primer Premier 5.0 引物设计软件,参照在 GenBank 中发表的川芎 *BADH* (GenBank 登录号:HM35276)基因序列设计 1 对引物,在上游引物中加入 SmaI 酶切位点,下游引物中加入 SnaBI 酶切位点。该对引物理论跨幅包括川芎 *BADH* 基因的开放阅读框序列 1 173 bp,引物由上海英俊生物技术有限公司合成。上游引物: CXBADHORFS-2: 5'-TCC CCC GGG ATG GCA GCA GCA GCA ATG AAT-3';下游引物: CXBADHORFA: 5'-CCC TAC GTA TTA GAG CTT TGA TGG TGA TGG TGAC-3'。

1.2.2 川芎总 RNA 的提取 剪取在 4℃ 低温胁迫处理 3 d 后的幼嫩川芎叶片,加液氮迅速研磨成粉末,川芎叶片总 RNA 的提取及 RNA 中蛋白质、DNA 和盐离子的消除均使用上海华舜生物工程公司的植物总 RNA 提取试剂盒,具体按说明书步骤进行。电泳分析 RNA 质量。

1.2.3 逆转录合成川芎 *BADH* 基因 cDNA 用纯化后的川芎 *BADH* 总 RNA 提取物为模板,以 Oligo(dT)₁₈ AP, 5-GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC GGC ATG ACA GTG(T)₁₈ 为特异转录引物,采用 Reverse Transcriptase XL(AMV)反转录合成 cDNA。设计反应体系为: RNA 11 μL, 5× buffer 4 μL, dNTP (10 mM) 2 μL, RNase Inhibitor 20 Units, Oligo(dT)₁₈ AP 50 pM, AMV RTase 10 Units, 总体积为 20 μL。放置室温下冷却 10 min,先后在 42℃ 90℃ 条件下保温 1 h 和 10 min,将所得 cDNA 于 -20℃ 储存备用。

表 1 RT-PCR 的反应条件

Table 1 Reaction parameters of RT-PCR

步骤	预变性	热变性	退火	延伸	循环次数
Steps	Advance denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Cycle times
RT-PCR	95℃,4 min	94℃,30 s	66℃,30 s	72℃,90 s	30

注: RT-PCR 30 个循环后, 72℃ 延伸 5 min, PCR 产物在 4℃ 保存。

1.2.4 RT-PCR 体外扩增目的基因片段 以反转录产物为模板, PCR 扩增出川芎 *BADH* 基因的开放阅读框序列。在 25 μL PCR 反应体系中加入 10× PCR buffer 2.5 μL, 2.5 mM/L dNTPs 2.0 μL, 25 mM/L MgCl₂

1.5 μL, 10 μmol/L 引物各 1.0 μL, 5 U/μL Taq 聚合酶 0.2 μL, 50 ng/μL DNA 模板 2.5 μL, ddH₂O 14.3 μL。扩增反应条件按引物的碱基组成进行设置, 具体反应条件见表 1。产物用琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 *BADH* 基因的克隆与测序 将 RT-PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 采用北京天根生化科技有限公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的片段, 取回收产物与 pMD 18-T 载体加入连接反应体系中, 16℃ 连接 1 h, 转化 Top10 感受态细胞, 在含有 100 mg/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板培养基上培养 12 h。菌落 PCR 进行阳性克隆筛选, 选择 PCR 验证正确的菌落接种于含有 100 mg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养 12 h, 将样品送由上海英俊生物技术有限公司测序。利用 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) 的 BLAST 在线分析工具进行核苷酸序列分析, 检验克隆片段是否正确。

1.2.6 *BADH* 基因表达载体的制备及转化子的鉴定 将携带 pBI121 质粒的根癌农杆菌 GV3101 菌种接种于 LB 液体培养基中, 28℃ 摇床培养至对数生长期, 离心收集菌体。将菌体重悬于 10 mmol/L MES 缓冲液中。调整菌液浓度使其 OD₆₀₀ 在 1.0 左右, 室温静置放置 2~3 h, 提取 pBI121 质粒。将连有 *BADH* 基因的 pMD 18-T 载体与 pBI121 载体分别经 Sma I 和 SnaB I 双酶切, 纯化回收目的片段。由于是平端连接, 为防止 pBI121 载体自连, pBI121 回收产物经碱性磷酸酶处理去掉末端磷酸基, 再次回收 DNA 产物, 将其和 *BADH* 片段连接过夜, 构建重组质粒。采用冻融法将质粒转入农杆菌 GV3101 中, 于含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 28℃ 振荡培养 12 h, 按质粒提取试剂盒说明提取重组质粒, 进行 PCR 及双酶切电泳检测鉴定。选择 PCR 和酶切鉴定为重组阳性的质粒, 送由上海英俊生物技术有限公司测序, 检验重组质粒读码框是否正确。

2 结果与分析

2.1 川芎总 RNA 鉴定

通过琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA, 在电泳条件未见基因组 DNA 和蛋白质的污染, 28S 核糖体 RNA 和 18S 核糖体 RNA 条带明亮清晰且亮度比呈现 2:1 的比例, 说明提取的 RNA 可用于后续试验, 见图 1。

2.2 川芎 *BADH* 基因的克隆与测序

以川芎叶片总 RNA 反转录合成后的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增后得到与预期大小一致的约 1 600 bp 的扩增 DNA 片段(图 2)。测序结果表明核苷酸序列长度为 1 191 bp。除去两端引物中的多余碱基, 得到全长为 1 527 bp 的核苷酸序列, 含有 1 个完整的阅读框, 编码 508 个氨基酸(图 3)。与 GenBank 中川芎 *BADH* 基因 HM35276 序列进行比对分析, 核苷酸同源率为 100%。

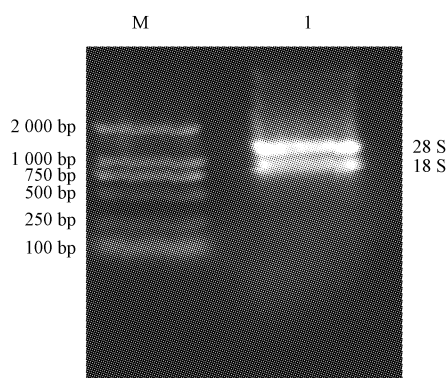


图1 川芎总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

注:M;DNA 分子量标准 DNA marker;1:总 RNA。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA of

Liguisticum chuanxiong leave

Note:M;DNA marker;1:The total RNA.

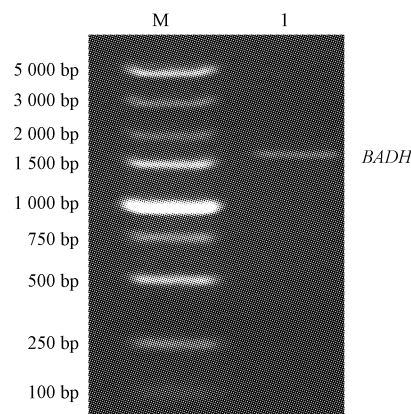


图2 川芎 BADH 的 RT-PCR 扩增结果

注:M;DNA 分子量标准 DNA marker;1:BADH 基因的 PCR 扩增产物。

Fig. 2 RT-PCR amplification results of *Liguisticum chuanxiong**BADH* geneNote:M;DNA marker;1:PCR amplified products of *BADH* gene.

```

1      CCCGGGATGGCAGCAGCAGCAATGAATATTCCAGTTCGACAGCTCTTCATTGATGGAGAT
1      M A A A A A M N I P V R Q L F I D G D
61     TGGAGAGTTCCTGTTGCAATAATCGTATCTCTGTCATCAATCCGCTACTGAACAGATC
21     W R V P V R N N R I S V I N P A T E Q I
121    ATCGGGGATATACCAGCAGCTACATCAGAAGATGTGGATATTGCTGTTGAAGCTGCTCGA
41     I G D I P A A T S E D V D I A V E A A R
181    AAAGCCCTTCTAGGAATAAGGGAAGGATTGGGCGTCTGCAACTGGTGCACATCGTGCT
61     K A L S R N K G K D W A S A T G A H R A
241    AAGTACTTGCGTGCTATTGCTGCCAAGATAACAGAGAGGAAAACGGAACCTCGCAAAACTT
81     K Y L R A I A A K I T E R K T E L A K L
301    GAGTCTTTAGATAGTGGGAAACCACTTGAAGAAGCAGCTTGGGATATTGATGATGTTGCT
101    E S L D S G K P L E E A A W D I D V A
361    GCATGTTTCGAGTACAACGCAGATCTTGCAGAGGCTTTGGATGGAAAAACAAAGTCTCCT
121    A C F E Y N A D L A E A L D G K Q K S P
421    ATAACTCTCCCAATGGAAACATTTAAGTGTATACCTAAAAGAACCAATTGGTGTGTT
141    I T L P M E T F K C Y T L K E P I G V V
481    GGTTTAATTACTCCATGGAATTACCTATGCTGATGGCTACATGGAAGGTAGCTCCCTGCT
161    G L I T P W N Y P M L M A T W K V A P A
541    TTGGCAGCTGGCTGTGCTGCAATACTTAAGCCCTCTGAAGTGGCATCCCTTACCTGTTTG
181    L A A G C A A I L K P S E V A S L T C L
601    GAGTTGGGGAAGTGTGTAAGATGTTGGGCTTCTCCTGGCATTCTTAATATTGTTACT
201    E L G E V C K D V G L P P G I L N I V T
661    GGTTTAGGCTCAGAAGCTGGAGCTCCGCTGGCATCTCATCCTAATGTCGACAAGATTGCA
221    G L G S E A G A P L A S H P N V D K I A
721    TTTACTGGAAGTACTGCTACAGGAAGTAAGATCATGACTGCTGCAGCACAACAAGTAAAG
241    F T G S T A T G S K I M T A A A Q Q V K
781    CCTGTGACACTCGAGCTTGGTGGCAAAAGTCCAATAATTGTATTGAGGATGTCGACTTA
261    P V T L E L G G K S P I I V F E D V D L
841    GATAAAGCTGCTGAGTGGACAGCTTTTGGTGTGTTTGGACCAACGGTCAGATTGTCAGT
281    D K A A E W T A F G C F W T N G Q I C S
901    GCAACCTCGCGCTGTTGGTGCATGAAAGCATTGCTGGAATTTTAGACAGACTCGTG
301    A T S R L L V H E S I A G K F L D R L V
961    AAGTGGATTGAAAATATTAAGATTTTCGATCCCTTAGAGGAAGGATGTAGGCTTGGGCTT
321    K W I E N I K I S D P L E E G C R L G P
1021   GTTGTAGTGGTGGACAGTATGAAAAGGTGATGCAGTTCATATCAACAGCTAAGAAAGAA
341   V V S G G Q Y E K V M Q F I S T A K K E
1081   GGAGCGACTATTTGTCTGGTGGGGAACGGCCTAAGCATTGAGAGAAAGTTTCTTCATT
361   G A T I L S G G E R P K H L E K G F F I
1141   ATGCCAACAAATTATAAGTGTGTAACAACCTCCATGCAATATGGAGAGAAGAAGTTTTC
381   M P T I I S D V T T S M Q I W R E E V F
1201   GGACCCGTTCTTTGTGTAAAAACATTTAAAACCGAAGACGAAGCTATTGAACTAGCAAAAT
401   G P V L C V K T F K T E D E A I E L A N
1261   GATACTCGTTATGGCTTGGGAGGTGCTGTAATGTCCAATGATCTAGAAAGATGTGAGCGT
421   D T R Y G L G G A V M S N D L E R C E R
1321   GTAACAAAGGCTCTACAATCAGGGATTGTGTGGGTTAATTGCTCCAGCCTTGCTTCTGT
441   V T K A L Q S G I V W V N C S Q P C F C
1381   CAAGCTCCGCGGTGGGAAAAAGCGTAGTGGTTTGGACGTGAATTGGGAGAATGGGGA
461   Q A P W G G K K R S G F G R E L G E W G
1441   CTTGATAACTACCTGAGTGTGAAACAGGTACACAGTACATATCCGATGAACCATGGGGA
481   L D N Y L S V K Q V T Q Y I S D E P W G
1501   TGGTATCAGTCACCATCACCATCAAAGCTCTAATACGTA
501   W Y Q S P S P S K L *

```

图3 川芎 BADH 基因开放阅读框 cDNA 序列及对应编码的氨基酸序列

Fig. 3 Nucleotide and amino acid sequence of ORF of *Liguisticum chuanxiong* *BADH* gene

2.3 重组载体的构建及鉴定

将连有 *BADH* 基因的克隆载体 pMD 18-T 与表达载体 pBI121 分别经 *Sma* I 和 *Sna* B I 双酶切,回收后 16℃ 过夜连接构建重组质粒转化根瘤农杆菌后,筛选方向正确的阳性菌落,提取质粒。质粒经 *Sma* I 和 *Sac* I 双酶切鉴定,琼脂糖凝胶电泳出现 2 条带,上面的条带为表达载体 pBI121(+),约 5 500 bp,下面的条带为所克隆的 *BADH* 基因片段,约 2 000 bp(由于切下了剩余的 GUS 序列和 OCS 终止子,所以切下的小分子量的条带较起始克隆的 *BADH* 片段更长)(图 4)。同时,提取质粒进行 PCR 检测,得到与 *BADH* 基因大小一致约 1 600 bp 的目的片段。回收测序表明,该阳性菌的质粒中确实连接有 *BADH* 基因片段,且读码框正确,重组质粒 pBI121/*BADH* 构建成功。

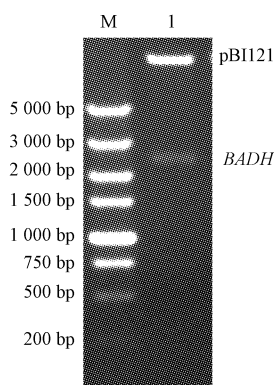


图 4 重组质粒双酶切鉴定图

注:M;DNA 分子量标准;1:重组质粒双酶切。

Fig. 4 Identification of recombinant plasmid using enzyme digestion method

Note:M;DNA marker;1:Recombinant plasmid using enzyme digestion method.

3 讨论

甘氨酸甜菜碱富集于植物细胞的胞质中,由胆碱经

两步脱氢氧化生成,反应简单,并且它是一类季铵类化合物,合成后几乎不再被进一步代谢,作为一种无毒害的渗透调节剂维持着细胞的渗透调节平衡,因此,甜菜碱合成酶基因作为最有希望的胁迫抗性基因之一,引起了分子生物学研究界的广泛关注^[3,5-6]。该研究成功地从川芎叶片中提取总 RNA,然后通过 RT-PCR 扩增出 *BADH* 基因,并通过 pMD-18T 载体,亚克隆到植物表达载体 pBI121 中。比对分析发现,该研究得到的川芎 *BADH* 基因开放阅读框序列与 GenBank 上登录的目的序列 HM35276 完全一致。川芎 *BADH* 基因开放阅读框由 1 527 个碱基组成,编码 508 个氨基酸。川芎 *BADH* 在 260~270 氨基酸序列中含有醛脱氢酶家族高度保守的 10 肽序列 VTI ELGGKSP,以及在 297 位点上含有与酶功能有关的半胱氨酸残基(图 3)。川芎 *BADH* 基因的克隆及植物表达载体的构建,既可为进一步研究基因在甘氨酸甜菜碱合成以及在后代中的遗传表现做好准备,又可为找到更有效的耐低温基因,提高植物的低温胁迫抗性打下基础。川芎 *BADH* 基因直接在烟草中表达等研究正在进行中。

参考文献

- [1] 舒冰,周重建,马迎辉,等. 中药川芎中有效成分的药理作用研究进展[J]. 中国药理学通报,2006,22(9):1043-1047.
- [2] 彭国照,彭骏,熊志强. 四川道地中药材川芎气候生态适应性区划[J]. 中国农业气象,200,28(2):178-182.
- [3] Chen T H, Murata N. Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications[J]. Plant Cell Environ, 2011,34(1):1-20.
- [4] 燕丽萍,夏阳,毛秀红,等. 转 *BADH* 基因紫花苜蓿山苜 2 号品种的抗盐性鉴定及系统选育[J]. 植物学报,2011,46(3):293-301.
- [5] Yang X, Liang Z, Wen X, et al. Genetic engineering of the biosynthesis of glycinebetaine leads to increased tolerance of photosynthesis to salt stress in transgenic tobacco plants[J]. Plant Mol Biol, 2008,66:73-86.
- [6] Fitzgerald T L, Waters D L, Henry R J. Betaine aldehyde dehydrogenase in plants[J]. Plant Biol, 2009,11(2):119-130.
- [7] 周嘉裕,廖海. 川芎甜菜碱醛脱氢酶基因的克隆及序列分析[J]. 西北农业学报,2011,20(3):45-51.

Cloning of Betaine Aldehyde Dehydrogenase cDNA in *Ligusticum chuanxiong* and Construction of its Plant Expression Vector

MAO Ying¹, ZHANG Yan-jun¹, WANG Wan-jun¹, CHEN Jin-song², LIAO Hai², ZHOU Jia-yu²

(1. College of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan 610031; 2. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu, Sichuan 610041)

Abstract: Taking *Ligusticum chuanxiong* as material, the total RNA was extracted from leaf of *Ligusticum chuanxiong* and cDNA of Betaine aldehyde dehydrogenase gene were obtained using RT-PCR. The purified RT-PCR products were constructed into pMD18-T vector. The results showed that the full length of *BADH* gene consists of 1 527 bp, which encoded 508 amino acids. The homology of its nucleotide sequence with HM35276 was 100%. Furthermore, the aim gene was cloned into plant expression vector pBI121 and a recombinant plasmid pBI121/Betaine aldehyde dehydrogenase were constructed successfully according to double enzyme digestion, PCR and sequencing.

Key words: *Ligusticum chuanxiong*; betaine aldehyde dehydrogenase; cloning; plant expression vector