

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2008.01153

青稞 *HvBADH1* 基因的克隆及其转化烟草的初步研究

赵宇玮 郝建国 步怀宇 王英娟 贾敬芬*

(西北大学生命科学学院 / 陕西省生物技术重点实验室 / 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 陕西西安 710069)

摘要: 应用 RT-PCR 结合 RACE 技术, 从青稞总 RNA 中扩增得长度为 1 512 bp 的甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因 cDNA 全长编码序列。通过氨基酸同源性比对, 发现该序列的推定表达产物与大麦 BADH 同工酶 BBD2 的同源性为 98.4%, 而与小麦、玉米和水稻等禾本科作物的 BADH 同源性分别为 97.0%、84.7%和 85.1%。将克隆到的青稞 cDNA 序列命名为 *HvBADH1*, 投递到 GenBank, 获得收录号 EF492983。 *HvBADH1* 可以在原核表达系统 TB1-pMAL c2x 中正常表达出分子量为 54.2 kD 的多肽链。将 *HvBADH1* 的编码 ORF, 插入到添加了植物表达 CaMV 35S 启动子和 Nos polyA 终止子调控元件的植物表达载体 pCambia1301 质粒相应的克隆位点中, 构建了 *HvBADH1* 基因的农杆菌植物转化系统 LBA4404(pCAM-ba)。进而采用农杆菌介导法, 将 *HvBADH1* 基因导入烟草中, 对所获得的潮霉素抗性烟草株系进行 PCR、Southern blot 和 RT-PCR 等分子生物学检测, 结果表明, 在得到的 2 个转基因株系中, *HvBADH1* 基因已整合到受体植物基因组中, 并且可以在 mRNA 水平上进行转录。

关键词: 青稞; *HvBADH1*; 基因克隆; 遗传转化; 耐盐性; RT-PCR; RACE

Cloning of *HvBADH1* Gene from Hulless Barley and Its Transformation in *Nicotiana tabacum*

ZHAO Yu-Wei, HAO Jian-Gao, BU Huai-Yu, WANG Ying-Juan, and JIA Jing-Fen*

(College of Life Science, Northwest University / Shaanxi Provincial Key Laboratory of Biotechnology / Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, Xi'an 710069, Shaanxi, China)

Abstract: Glycine betaine is a nontoxic osmolyte accumulated in the cytoplasm of salt or drought stressed plants, marine animals, and microorganisms. Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) catalyzes the final step in the synthesis of glycine betaine from choline in many plants. In order to reveal the relationship between the BADH expression and salt stress resistance of hulless barley (*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook.f.), a 1 512 bp cDNA encoding BADH was cloned from hulless barley using the methods of RT-PCR and RACE. This cDNA encoded a 54.2 kD protein containing 232 amino acid residues and *HvBADH1* was designated with the accession number of EF492983 in GenBank. *HvBADH1* exhibited the highest homology (98.4%) in amino acid sequence with BBD2 gene encoding an isoenzyme of BADH from barley. It also shared highly homology of 97.0%, 84.7%, and 85.1% with BADH wheat, maize, and rice respectively. The *HvBADH1* gene was inserted into pMAL c2x and transformed into *E.coli* cells (TB1) for expression. The recombinant TB1 (harboring pMAL c2x-*HvBADH1*) cells and control TB1 (harboring empty pMAL c2x) cells were then induced with IPTG. The results revealed that the recombinant *E. coli* cells could express a fusion protein with molecular weight of 96.3 kD. This fusion protein was fused by maltose binding protein (MBP, about 42.1 kD) and the peptide (about 54.2 kD) encoded by *HvBADH1*. The ORF of *HvBADH1* was inserted between CaMV 35S promoter and NOS polyA in T-DNA region of binary expression vector pCambia1301. The recombinant plasmid, designated as pCAM-ba, was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. The *HvBADH1* gene was transformed to tobacco mediated by *Agrobacterium*. Two hygromycin B (Hyg) resistant regenerated plant strains were selected. PCR detection and Southern blot analysis indicated that all the Hyg resistant tobacco plants contained the alien BADH gene. RT-PCR analysis showed that *HvBADH1* gene normally expressed on the mRNA level in the transgenic tobacco plants. The results suggest that *HvBADH1* gene is related with

基金项目: 陕西省教育厅基金项目(JH06238); 陕西省高校重点实验室重点项目(05JS48); 陕西省自然科学基金项目(2007c104)

作者简介: 赵宇玮(1977–), 男, 北京市人, 讲师, 博士, 专业植物生物技术。

* 通讯作者(Corresponding author): 贾敬芬(1938–), 女, 河北省深泽县人, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为植物细胞工程。

E-mail: Jiajf38@nwu.edu.cn

Received(收稿日期): 2007-10-31; Accepted(接受日期): 2008-02-19.

the salt tolerance in hulless barley and can express in transgenic plants.

Keywords: *Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook.f.; *HvBADH1*; Gene clone; Genetic transformation; Salt-tolerant resistance; RT-PCR; RACE

甜菜碱是广泛存在于生物界的一种组织相容性的渗透调节剂^[1-2]。许多高等植物,特别是藜科和禾本科植物,在受到水/盐胁迫时积累大量甜菜碱。在大麦^[3]和玉米^[4]中的研究结果表明甜菜碱在增强植物抗盐性中起至关重要作用。高等植物体内甜菜碱由胆碱经过连续两步不可逆氧化而合成。首先,胆碱单加氧酶(choline monooxygenase, CMO)催化胆碱氧化合成甜菜碱醛;继而在甜菜碱醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase, BADH)的作用下,被氧化成甘氨酸甜菜碱^[5]。通常认为,植物体在盐胁迫条件下内源甜菜碱积累量上升,主要是通过上调 *BADH* 基因表达而实现^[6-7]。传统农作物中耐盐性最强的是大麦^[8],青稞(*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook.f.)属于禾本科大麦属作物,其突出的农艺特点是环境适应性强,在高海拔、高寒、缺水地区都能种植,表现出极高的抗逆特性。甜菜碱积累量与大麦耐盐性之间的密切关系已得到证实, Nakamura 等^[9]的研究结果表明不同品种大麦体内的甜菜碱积累量与品种的耐盐性呈正相关。我们的实验通过 RT-PCR 结合 RACE 技术克隆到青稞 *BADH* 基因 cDNA 编码区,并进一步构建了二元植物表达载体,通过农杆菌介导的叶圆盘法将 *HvBADH1* 导入烟草。为下一步研究 *HvBADH1* 基因的表达特性及其与植物耐盐性的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

青稞品种青 4 种子购自青海省西宁市农牧局;烟草(*Nicotiana tabacum*)品种秦烟 95 种子购自陕西省烟草研究所。

1.2 青稞甜菜碱醛脱氢酶基因(*HvBADH1*)的克隆

1.2.1 cDNA 中间保守区的克隆和序列测定 选取常规表面消毒后的青稞种子在无菌水浸润的滤纸上室温萌发。萌发 7 d 后,用 200 mmol L⁻¹ NaCl 溶液浇灌一次。72 h 后切取青稞幼苗叶片,以 Trizol 法提取总 RNA,并用 DNase I (RNase Free)去除其中混杂的基因组 DNA,使用 MBI 公司的 RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis kit #K1631

M-MLV cDNA 第一链合成试剂盒合成 cDNA 第一链。参照大麦、小麦、玉米、菠菜、高粱、拟南芥 6 种植物的 BADH 基因保守区序列设计的一对简并引物引发 PCR 扩增青稞 *BADH* 基因 cDNA 中间保守区,选用 TaKaRa 公司的 LA Taq DNA polymerase。简并引物序列, APsen 为 ATH ACN CCN Tgg AAY TAY CC, APantisen 为 ACT ggN CCR AAN ACY TCYTC, H=ATC; N= AcgT; Y=CT; R=Ag。反应程序为: 94 预变性 180 s; 94 变性 50 s, 50 退火 40 s, 72 延伸 70 s, 35 个循环; 72 延伸 480 s。随机选择 PCR 产物和 pMD18-T 载体质粒连接的重组质粒克隆,由大连 TaKaRa 公司测序。

1.2.2 青稞 *BADH* 基因 3'端序列的克隆 按照 TaKaRa 公司 3'-Full RACE Core set 1.0 试剂盒说明书进行青稞 *BADH* 基因 cDNA 3'端序列的克隆,青稞幼苗的 NaCl 胁迫处理、总 RNA 提取和 PCR 产物的克隆、测序的方法同 1.2.1。3'-RACE 的特异性 PCR 引物 Q3R 序列为 CCACAATCACTgACATCAACAC。

1.2.3 青稞 *BADH* 基因 5'端部分序列的克隆 用 1.2.1 方法提取 NaCl 胁迫处理的青稞总 RNA。在 RNA 溶液中加入相当于总体积 7.5%的 DMSO, 99 热激 1 min, 冰浴 2~5 min。取适量变性后的总 RNA,由购自 TaKaRa 公司的 PrimeScript reverse transcriptase 催化逆转录合成 cDNA 第一链,反向序列定位于中间保守区 5'端的特异性引物 Qrt5 的序列为 gTCgACgTCagg。逆转录反应程序为: 55 延伸 30 min; 42 延伸 30 min; 70 15 min 中止反应。以逆转录产物为模板 5'RACE^[10]扩增青稞 *BADH* 基因 5'端部分序列。

1.3 青稞 *BADH* 基因 cDNA 编码区的获得

根据 5'和 3'-RACE 的结果并参考大麦 *BADH* 同工酶 BBD2 基因 cDNA 序列,设计用于克隆青稞 *BADH* 基因的上游引物 Qbamh₁ 和下游引物 Qxba₁, Qbamh₁ 序列为 5'-CgggATCCATggTCgCgCCggCCA AgATCC-3'; Qxba₁ 序列为 5'-gCTCTAgACTAgCCg gAgCCTTgTAC-3'。用 1.2.3 方法合成 cDNA 第一链为模板,以 Qbamh₁ 和 Qxba₁ 为引物 PCR 扩增青稞 *BADH* 基因编码区序列。测序正确的 *BADH*-cDNA

序列被命名为 *HvBADH1*。

1.4 *HvBADH1* 基因的原核表达

1.4.1 *HvBADH1* 基因的原核表达载体构建 将 *HvBADH1* 根据事先设计在引物两端的 *Bam*H I 和 *Xba* I 等酶切位点, 插入到 pMAL c2x 质粒的多克隆位点, 重组质粒记为 pMAL-Qba。取适量 pMAL-Qba 质粒转化宿主大肠杆菌 TB1 感受态细胞, 获得的携带 pMAL-Qba 质粒的 TB1 大肠杆菌记为 TB1(pMAL-Qba)。

1.4.2 *HvBADH1* 在大肠杆菌 TB1 中的诱导表达和 SDS-PAGE 检测 按 NewEngland 公司说明书进行大肠杆菌 TB1(pMAL-Qba)的诱导表达和表达产物的 SDS-PAGE。SDS-PAGE 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 10%。凝胶电泳胶片用考马斯亮蓝 R-250 染色, 光密度扫描仪扫描确认结果。

1.5 农杆菌介导的 *HvBADH1* 基因对烟草的遗传转化

1.5.1 *HvBADH1* 基因植物表达载体的构建 将 CaMV 35S 启动子序列、*HvBADH1* 和 NOS polyA 终止子序列串连在一起构建 *HvBADH1* 基因表达盒, 然后将其插入双元植物表达载体 pCambia-1301 质粒 T-DNA 区, 构建重组双元植物表达载体质粒 pCAM-ba(图 1)。用液氮冻融法将 pCAM-ba 质粒导入农杆菌 LBA4404 感受态细胞, 获得用于植物遗传转化实验的工程农杆菌 LBA4404(pCAM-ba)。

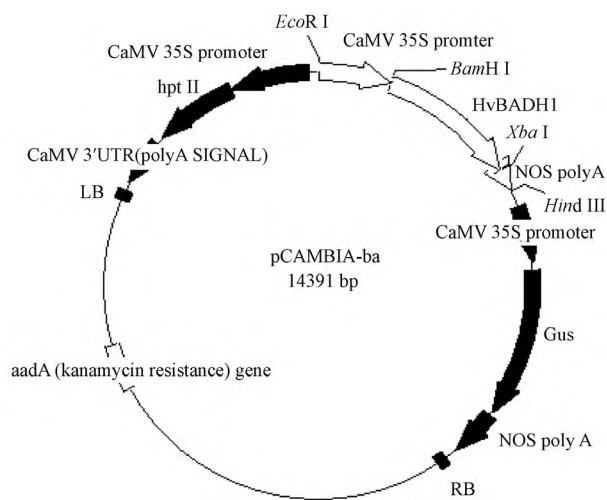


图1 植物双元表达载体 pCAM-ba 质粒结构示意图
Fig. 1 The sketch map of the binary expression vector plasmid of pCAM-ba

1.5.2 转 *HvBADH1* 基因烟草的获得 农杆菌 LBA4404(pCAM-ba)在附加 Str 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 、Rif 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 和 kan 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的 YEB 液体培养基中常规活化, 培养至 $OD_{600} \approx 0.5$ 。将烟草无菌苗叶片剪成 0.5 cm $\times$ 0.5 cm 圆盘, 放入农杆菌悬液侵染 8~12 min, 共培养 2 d, 然后转至含 30 mg L^{-1} 潮霉素、300 mg L^{-1} 头孢霉素的 Y1 培养基(附加 1 mg L^{-1} 6-BA 的 MS 培养基)上, 温度 25 ± 2 , 光强 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 光照 16 h d^{-1} , 诱导芽的分化。将分化后的小芽转入 1/2 MS₀ 培养基继代和生根培养, 每 21 d 继代培养一次。再生苗经炼苗, 移栽至混合土(营养土和沙土之比为 1:1)中温室培养。

1.5.3 转基因苗 PCR 扩增分析 用十六烷基三乙基溴化铵(CTAB)法分别提取烟草转基因苗和野生型植株基因组 DNA。以 PCR 检测 *HvBADH1* 基因和 *hpt II* 基因在转基因植物基因组中的插入状况。

1.5.4 转基因苗 RT-PCR 分析 用 1.2.1 方法提取烟草转基因苗和野生型植株总 RNA, 用 M-MLV 第一链 cDNA 合成试剂盒进行逆转录。以 ss cDNA 的为模板, PCR 扩增目的基因 *HvBADH1*。

1.5.5 转基因苗的 Southern blot 杂交检测 分别提取 30~40 μg 烟草转基因苗和野生型植株基因组 DNA, 以 *HvBADH1* 基因中间 509 bp 特异性序列为探针, 按 Roche 公司的 DIG High Primer DNA Labeling and Detection Starter Kit II 试剂盒使用手册进行 Southern blot, 质粒对照和基因组 DNA 均使用 *Eco*R I 酶切。

2 结果与分析

2.1 *HvBADH1* 基因 cDNA 中间保守片段的克隆、3'RACE 和 5'RACE 的实验结果

应用简并引物, 以 NaCl 胁迫下的青稞叶片总 RNA 为模板, RT-PCR 扩增得到 728 bp 扩增片段。在 www.ncbi.nlm.nih.gov 网站进行 Blast 的结果显示这个 cDNA 序列与 GenBank 中大麦、小麦、水稻、玉米、菠菜 *BADH* 基因的同源性较高。该序列的 GenBank 登录号为 DQ288724。根据已克隆出的中间保守区序列设计特异引物进行 3'RACE, 扩增出 538 bp 的 cDNA 片段。采用 5'RACE 法克隆目标基因 5' 端部分序列的实验最大可以得到约 450 bp 的有效扩增条带。

2.2 *HvBADH1* 基因 cDNA 编码区的获得和序列分析

用 RT-PCR 技术从青稞中扩增得到 *HvBADH1* 基因 cDNA 编码区 ORF 长度为 1 512 bp, 拼接先前 3'RACE 获得的 3' UTR 序列, 获得青稞 *HvBADH1* 基因 cDNA 全长 1 670 bp, 3' UTR 区有 2 个可能的 polyA 加尾信号。在 GenBank 上进行 Blast 检索, 发现该序列与大麦 BADH 同工酶编码基因 *BBD2* 序列同源性高达 98.7%。应用 DNASTar 软件推定青稞 BADH 蛋白序列由 503 个氨基酸组成, 在序列的 172~181 位置, 存在一个在不同物种醛脱氢酶中高度保守的 VTLELGKSP 十肽序列。表明实验获得的 cDNA 序列是青稞 BADH 基因编码序列, 将其命名为 *HvBADH1*, GenBank 登录号为 EF492983。

青稞 *HvBADH1* 基因推定氨基酸序列与大麦、水稻、小麦、玉米等 8 个已报道高等植物 BADH 氨基酸序列聚类分析结果见图 2, 从中发现, 青稞 BADH 与大麦 BADH 同工酶 *BBD2* 相似性最高, 可达 98.4%, 而与最早报道的大麦 BADH 同源性最低, 仅 67.0%。

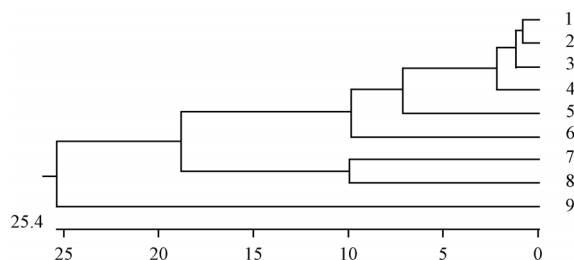


图2 青稞 *HvBADH1* 氨基酸序列与部分高等植物 BADH 基因序列的进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of *HvBADH1* with BADH genes from other plants

1: 大麦甜菜碱醛脱氢酶同工酶 *BBD2*; 2: 青稞甜菜碱醛脱氢酶; 3: 小麦甜菜碱醛脱氢酶; 4: 羊草甜菜碱醛脱氢酶; 5: 玉米甜菜碱醛脱氢酶; 6: 假定的水稻甜菜碱醛脱氢酶同工酶; 7: 大麦甜菜碱醛脱氢酶; 8: 水稻甜菜碱醛脱氢酶; 9: 苜蓿醛脱氢酶。
1: *Hordeum vulgare* *BBD2*; 2: *HvBADH1*; 3: *Triticum aestivum* beayne-aldehyde dehydrogenase; 4: *Leymus chinensis* beayne-aldehyde dehydrogenase; 5: *Zea mays* beayne-aldehyde dehydrogenase; 6: *Oryza sativa* putative beayne-aldehyde dehydrogenase; 7: *Hordeum vulgare* beayne-aldehyde dehydrogenase; 8: *Oryza sativa* beayne-aldehyde dehydrogenase; 9: *Medicago truncatula* beayne-aldehyde dehydrogenase.

2.3 *HvBADH1* 基因的原核表达

对青稞 *HvBADH1* 基因进行原核表达, SDS-PAGE 结果如图 3。经 IPTG 诱导的 TB1(pMAL-Qba)

可以表达出 96.3 kD(青稞 BADH 和麦芽糖结合蛋白 MBP)融合蛋白带。而经 IPTG 诱导的 TB1(pMAL-c2x 空载体)可以表达出 42.1 kD 的麦芽糖结合蛋白 MBP 蛋白带。这表明, 青稞 *HvBADH1* 可以在原核表达系统内正常表达出预期分子量为 54.2 kD 的蛋白质。

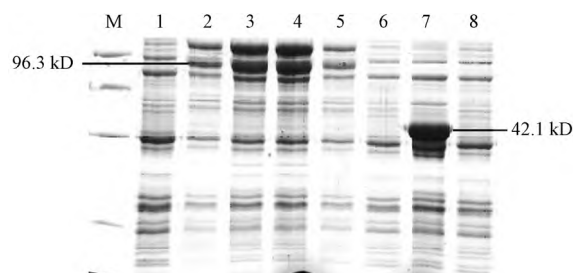


图3 *HvBADH1* 在大肠杆菌 TB1 中表达的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 3 Expressing of *HvBADH1* in *E.coli* TB1, detecting by SDS-PAGE

M: 中分子量蛋白质 marker; 1,8: 未诱导的 TB1(pMAL-Qba); 2~5: IPTG 诱导的 TB1(pMAL-Qba); 6: 未诱导的 TB1(pMAL c-2-X 空载体); 7: IPTG 诱导的 TB1(pMAL c-2-X 空载体)。
M: Middle molecular weight protein marker; 1,8: Uninduced TB1(pMAL-Qba); 2~5: IPTG induced TB1(pMAL-Qba); 6: Uninduced TB1(pMAL-c-2-X empty); 7: IPTG induced TB1(pMALc-2-X empty).

2.4 *HvBADH1* 基因对烟草的遗传转化及转基因株系的初步鉴定

应用农杆菌 LBA4404(pCAM-ba)植物转化系统对秦烟 95 进行遗传转化, 初步获得 2 个潮霉素抗性烟草再生苗系(图 4)。

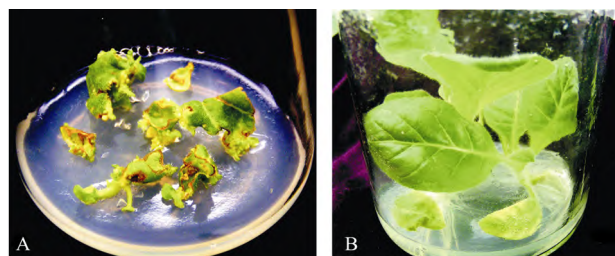


图4 转基因烟草苗的获得

Fig. 4 Obtaining of transgenic tobacco

A: 筛选中的潮霉素抗性烟草愈伤组织和芽; B: 基因烟草再生苗。
A: Hyq-resistant calli and buds of tobacco under selection; B: Regenerated transgenic plantlet.

2.4.1 转基因株系的 PCR 检测 以野生型植株及转基因苗的基因组 DNA 作为模板, 分别以潮霉素 B 抗性基因(*hpt II*)阅读框(509 bp)和目的基因 *HvBADH1*(1 512 bp)作为靶 DNA 进行 PCR 的结果表明, 野生型植株基因组没有扩增信号, 2 个转基因苗基因组都能够扩增出预期的两种目标产物(图 5)。说

明 *hpt II* 基因和 *HvBADH1* 基因均已整合到受体植物基因组中。

2.4.2 转基因苗中 *HvBADH1* 基因转录水平上表达的 RT-PCR 检测 对烟草 1、2 号转基因苗及野生型植株进行 *HvBADH1*(1 512 bp) 基因 RT-PCR 扩增的结果 (图 6) 显示, 野生型植株没有扩增信号, 而 2 个转基因苗的总 RNA 逆转录产物都扩增出 1.5 kb 目标产物。

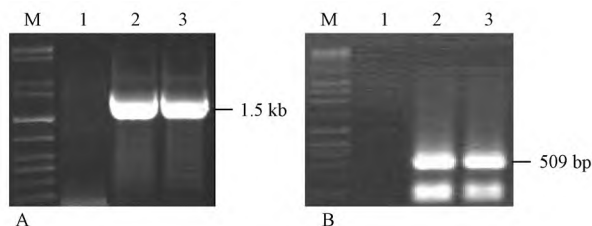


图 5 *HvBADH1*(A)和 *hpt II*(B)基因在转基因苗基因组中整合情况的 PCR 检测

Fig.5 Intergration of *HvBADH1* (A) and *hpt II* (B) genes in transgenic plant's genome detected by PCR

M: 1 kb DNA marker; 1: 野生型植株; 2: 1 号转 *HvBADH1* 基因烟草苗; 3: 2 号转 *HvBADH1* 基因烟草苗。

M: 1 kb DNA marker; 1: wild type tobacco; 2: transgenic tobacco strain No.1; 3: transgenic tobacco strain No.2.

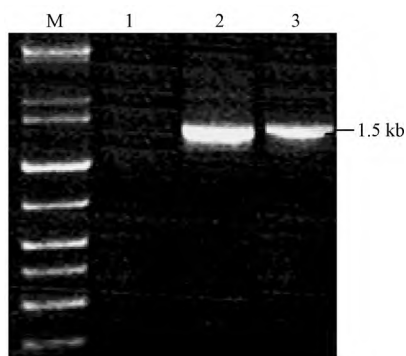


图 6 *HvBADH1* 在转基因苗中表达的 RT-PCR 检测

Fig. 6 Expression of *HvBADH1* in the transgenic plants detected by RT-PCR

M: 1 kb DNA marker; 1: 野生型植株; 2: 1 号转 *HvBADH1* 基因烟草苗; 3: 2 号转 *HvBADH1* 基因烟草苗。

M: 1 kb DNA marker; 1: wild type tobacco; 2: transgenic tobacco strain No.1; 3: transgenic tobacco strain No.2.

2.4.3 转基因植物的 Southern blot 杂交检测 分别制备野生型及 2 个经 PCR 检验初步确定为转基因苗的烟草植株基因组 DNA, 进行 Southern blot 检测 (图 7)。可以看出, 野生型植物基因组 DNA 没有阳性信号; 2 个转基因苗的基因组 DNA 中, 均出现阳性杂交信号。说明这 2 个假定转基因株系均是真实的转基因植株, *HvBADH1* 基因已经整合到烟草的基因组中。

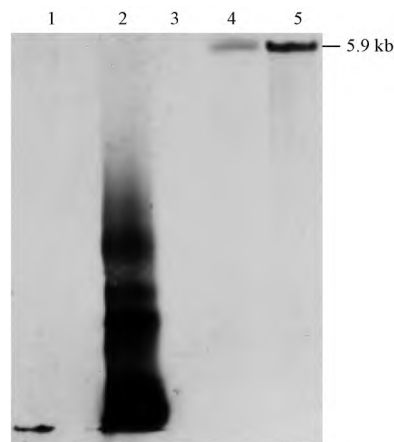


图 7 2 株 T_0 代转基因植株的 Southern blot 分析

Fig. 7 Southern blot analysis of two T_0 generation transgenic plants

1: 无 DNA 阴性对照; 2: pCAM-ba 质粒 DNA 阳性对照; 3: 野生型植株; 4~5: 1~2 号 T_0 代转基因植株。

1: negative control; 2: positive control of plasmid pCAM-ba; 3: wild-type plant; 4~5: T_0 generation transgenic plants No.1 and No.2.

3 讨论

目前, 利用常规 PCR 技术结合 3'和 5'RACE 技术扩增、克隆基因全长 cDNA 序列的研究有许多成功的报道^[11-16], 我们的研究结果显示该方案在扩增 5'端富含 GC 的 mRNA 全序列时具有一定的局限性。其原因可能在于以下两个方面: (1)实验选择的预处理条件并不是目标基因表达的最适诱导条件; (2)逆转录酶不能在通常实验条件下顺利通过 mRNA 近 5'端的复杂二级结构区, 导致第一链 cDNA 质量低, 全长 cDNA 相对不足。我们尝试用半定量 RT-PCR 实验来摸索青稞 *BADH* 表达的最佳诱导条件, 内参基因为 *EF1 α* 。分别取 200 mmol L⁻¹ NaCl 处理 12、24、48、72 和 96 h 的青稞种子苗叶片总 RNA 为模板, RT-PCR 扩增 *HvBADH1* 基因中间保守片段和内参基因 (图 8)。结果用 200 mmol L⁻¹ NaCl 胁迫处理 48~72 h, *HvBADH1* 基因的表达明显上调, 当 NaCl 处理时间延长至 96 h 时 *HvBADH1* 基因的表达下调。与此相吻合的是, 有报道认为^[17], *BADH* 基因的表达受较低水平 NaCl 胁迫的诱导, 受高盐胁迫的抑制; Yi 等^[18]的研究结果也显示, 200 mmol L⁻¹ NaCl 处理大麦种子苗 48 h 可以提高 *BADH* 的活性, 而处理 96 h 则抑制叶片中 *BADH* 的活性。据此, 可以确定 *HvBADH1* 基因最佳诱导表达条件是 200 mmol L⁻¹ NaCl 处理 72 h。在此诱导条件下, 我们应用 3'RACE 技术成功克隆到 *HvBADH1* 基因 3'端的 cDNA 全序

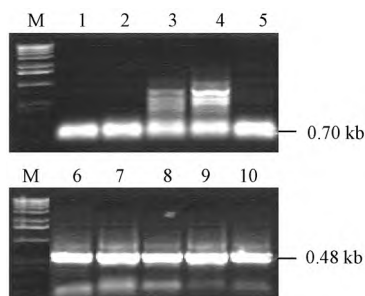


图8 *HvBADH1* 基因的半定量 RT-PCR 表达分析
Fig. 8 Expression analysis of *HvBADH1* by semi-quantitative RT-PCR

M: 1 kb DNA marker; 1~5: 200 mmol L⁻¹ NaCl 处理 12、24、48、72 和 96 h 青稞 *HvBADH1* 基因中间区段 RT-PCR 扩增; 6~10: 200 mmol L⁻¹ NaCl 处理 12、24、48、72 和 96 h 青稞 *EF1α* 基因 RT-PCR 扩增。

M: 1 kb DNA marker; 1~5: products of RT-PCR amplification of *HvBADH1* gene from the *H. vulgare* L. var. *nudum* Hook.f plants treated with 200 mmol L⁻¹ NaCl for 12, 24, 48, 72, and 96 h; 6~10: products of RT-PCR amplification of *EF1α* gene from the *H. vulgare* L. var. *nudum* Hook.f plants treated with 200 mmol L⁻¹ NaCl for 12, 24, 48, 72, and 96 h.

列。为了获得 *HvBADH1* 基因的全长 cDNA 序列, 我们尝试了 99 预处理总 RNA 使其先变性然后进行逆转录反应和使用适合于高 GC 含量模板的 LA *Taq* 酶 + GC buffer 进行 PCR 反应等改良方案, 但没能得到完整的青稞 *BADH* 基因 5'端 cDNA 序列。我们又尝试使用了两种耐热逆转录酶, 细菌来源的 *BcaBEST* polymerase 和改良的鼠源 M-MLV: Prime-Script reverse transcriptase 分别在 65 和 55 催化 cDNA 第一链的合成, 以提高 mRNA 5'端的逆转录效率。结果 5'RACE 的 PCR 有效延伸距离、扩增反应的精确性和特异性得到了一定程度的提高。使用 Cheng 等^[19]报道的 RNase H 鼠白血病病毒(M-MLV)逆转录酶和 Meyers 等^[20]报道的使用嗜热 DNA 多聚酶如 rTth(Perkin-Elmer)和 TetZ(Amersham)在高温(一般 60 到 70)中有效逆转录 mRNA 的方法, 可以克服由于高 GC/AU 比 mRNA 形成二级结构而导致在逆转录时产生截短的 cDNA 这一难题。这与我们使用耐热逆转录酶可以提高 *BADH* 基因部分 5 端序列克隆效率的结果相吻合。由于已克隆的 *HvBADH1* 基因 cDNA 中间保守片段与 2001 年发现的在大麦 *BADH* 同工酶 *BBD2* 基因^[21]cDNA 对应区域的序列同源性达 98%, 我们推测 *HvBADH1* 基因的结构应该与大麦 *BBD2* 基因高度相似, 进而根据 *BBD2* 基因 cDNA 编码框序列设计一条上游引物 Qbamh₁, 结合

根据已克隆的青稞 *BADH* 基因 3'序列设计的下游引物 Qxba₁ 运用 RT-PCR 技术成功克隆到 1 512 bp 的 *HvBADH1* 基因 cDNA-全长编码框。值得注意的是, 总 RNA 的 99 预变性、使用耐热逆转录酶、在 55~65℃ 进行逆转录及使用 LA *Taq* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增是克隆 *HvBADH1* 基因 cDNA 全长编码序列的必要条件, 而这些措施很可能是应用 RACE 及其衍生技术克隆其他 mRNA 5'端富含 GC/AU 的基因的有效手段。

HvBADH1 基因的表达受 200 mmol L⁻¹ NaCl 胁迫诱导(图 7)及其在原核细胞中可以正常表达的结果显示, 该基因具有应用于作物耐盐性状改良基因工程的可能。用农杆菌介导的叶圆盘法将克隆到的 *HvBADH1* 基因导入烟草, 成功获得 2 个转基因株系, PCR、Southern blot 和 RT-PCR 检测显示 *HvBADH1* 基因已经成功整合到转基因烟草的基因组中, 并且可以进行转录水平的表达。转基因苗后代的抗性分离比和耐盐性分析工作正在进行中。

4 结论

运用 RT-PCR 结合 RACE 技术克隆了青稞甜菜碱醛脱氢酶基因 *HvBADH1*, 其表达产物与大麦甜菜碱醛脱氢酶同工酶 *BBD2* 的同源性为 98.4%, 而与小麦、玉米和水稻的 *BADH* 同源性分别为 97.0%、84.7%和 85.1%。*HvBADH1* 基因可以在原核细胞内正常表达出分子量为 54.2 kD 的蛋白质。构建 *HvBADH1* 基因的双元植物表达载体 pCAM-ba 质粒, 进而应用工程农杆菌 LBA4404(pCAM-ba)对烟草进行了遗传转化。获得 2 个潮霉素抗性烟草苗, *HvBADH1* 基因已经成功整合到受体烟草的基因组中, 并且可以进行 mRNA 水平的转录表达。

References

- [1] Csonka L N. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev*, 1989, 53: 121-147
- [2] Rhodes D, Hanson A D. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol*, 1993, 44: 357-384
- [3] Grumet R, Hanson A D. Genetic evidence of an osmoregulatory function of glycinebetaine accumulation in barley. *Aust J Plant Physiol*, 1986, 13: 356-364
- [4] Saneoka H, Nagasaka C, Hahn D T, Yang W J, Premachandra G S, Joly R J, Rhodes D. Salt tolerance of glycinebetaine-deficient and-containing maize lines. *Plant Physiol*, 1995, 107: 631-638

- [5] Li Q(李秋), Yang H(杨华), Gao X-R(高晓蓉), Liu D-W(刘大伟), An L-J(安利佳). Molecular biology and gene engineering of betaine synthetase in plant. *Prog Biotechnol*(生物工程进展), 2002, 22(1): 84–86 (in Chinese with English abstract)
- [6] McCue K F, Hanson A D. Effects of soil salinity on the expression of betaine aldehyde dehydrogenase in leaves: investigation of hydraulic, ionic and biochemical signals. *Aust J Plant Physiol*, 1993, 19: 555–564
- [7] Ishitani M, Nakamura T, Han S Y, Takabe T. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol*, 1995, 27: 307–315
- [8] Peng B(彭斌). Progress in salt tolerance research in barley. *Barley Sci*(大麦科学), 2003, 3(1): 26–29(in Chinese)
- [9] Nakamura T, Ishitani M, Harinasut P, Nomura M, Takabe T, Takabe T. Distribution of glycinebetaine in old and young leaf blades of salt-stressed barley plants. *Plant Cell Physiol*, 1996, 37: 873–877
- [10] Chen X-Y(陈选阳), Yuan Z-N(袁照年), Zhang Z-J(张招娟), Wang S-L(王松良), Zheng J-G(郑金贵). Cloning of *lyc-b* gene from sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) and transferring the gene into tobacco. *Acta Agron Sin*(作物学报), 2007, 33(10): 1724–1728 (in Chinese with English abstract)
- [11] Chenchik A, Diachenko L, Moqadam F, Tarabykin V, Lukyanov S, Siebert P D. Full-length cDNA cloning and determination of mRNA 5' and 3' ends by amplification of adaptor-ligated cDNA. *Biotechniques*, 1996, 21: 526–534
- [12] De Melis L E, Whiteman P H, Stevenson T W. Isolation and characterisation of a cDNA clone encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase in *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Sci*, 1999, 143: 173–182
- [13] Reddy M K, Nair S, Singh B N, Mudgil Y, Tewari K K, Sopory S K. Cloning and expression of a nuclear encoded plastid specific 33 kDa ribonucleoprotein gene (33RNP) from pea that is light stimulated. *Gene*, 2001, 263: 179–187
- [14] Etienne P, Petitot A S, Houot V, Blein J P, Suty L. Induction of *tcl17*, a gene encoding a β -subunit of proteasome, in tobacco plants treated with elicitors, salicylic acid or hydrogen peroxide. *FEBS Lett*, 2000, 466: 213–218
- [15] Yao J-H(姚剑虹), Sun X-F(孙小芬), Tang K-X(唐克轩). Molecular cloning of lectin gene from *Pinellia Ternata*. *J Fudan Univ*(Nat Sci)(复旦学报·自然科学版), 2001, 40(4): 461–464(in Chinese with English abstract)
- [16] Tang K-X(唐克轩), Kai G-Y(开国银), Zhang L(张磊), Pan Z(潘征), Zhao L-X(赵凌侠), Sun X-F(孙小芬), Zheng J-G(郑金贵). Advances in RACE and its application in plant gene cloning. *J Fudan Univ*(Nat Sci)(复旦学报·自然科学版), 2002, 41(6): 704–709(in Chinese with English abstract)
- [17] Pan S M, Morean R A, Yu C, Huang H C. Betaine accumulation and betaine-aldehyde dehydrogenase in spinach leaves. *Plant Physiol*, 1981, 67: 1105–1108
- [18] Yi Y J, Xu C S, Zhao B S, Liu J Y, Wang X C. Betaine accumulation and the change of betaine aldehyde dehydrogenase activity in barley seedlings under KCl and NaCl stress. *J Envir Sci*, 1999, 11: 415–418
- [19] Cheng S, Fockler C, Barnes W M, Higuchi R. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 5695–5699
- [20] Meyers T W, Gelfand D H. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry*, 1991, 30: 7661–7666
- [21] Nakamura T, Nomura M, Mori H, Andre T, Ueda A, Takabe T. An isozyme of betaine aldehyde dehydrogenase in barley. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42: 1088–1092