

## 菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因在烟草中的表达

梁 峥<sup>1</sup> 马德钦<sup>2</sup> 汤 岚<sup>1</sup> 洪益国<sup>2\*</sup> 骆爱玲<sup>1</sup> 戴秀玉<sup>2</sup>

(中国科学院植物研究所 北京 100093)<sup>1</sup>

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)<sup>2</sup>

**摘 要** 质粒 pLS9 含有 1.5kb 的编码菠菜甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因。经限制酶切后克隆到植物表达载体的 35S 启动子和 PolyA 终止子之间。经农杆菌介导转化烟草,获得 90 多株抗卡那霉素再生植株,经 PCR 检测证明 60% 以上再生植株含有 BADH 基因。转基因植株经 Western blot, BADH 酶活性测定, BADH 酶活性特异性染色法检查和耐盐性分析,证明菠菜 BADH 基因在烟草正常表达,在叶绿体和胞液中均有 BADH 酶存在。转基因植株能耐较高浓度盐。

**关键词** 甜菜碱,甜菜碱醛脱氢酶,盐胁迫,高耐盐烟草

农作物的产量主要受干旱和盐碱所制约。在此逆境下植物通过在细胞中积累渗透调节物质,维持与环境的渗透平衡。甜菜碱是近来受到人们注意,认为是很有效的渗透调节剂之一,甜菜碱合成酶的基因工程具有实用前景。1990 年开始, Weretilnyk<sup>[1]</sup>和 McCue<sup>[2]</sup>分别从菠菜和甜菜克隆了甜菜碱醛脱氢酶(BADH)的 cDNA,此后又报道了将 BADH 基因引入烟草<sup>[3]</sup>和大麦<sup>[4]</sup>,并得到了表达。我们在克隆了菠菜 BADH 基因的基础上<sup>[5]</sup>,进一步构建了含有 BADH 基因的植物表达载体,通过农杆菌介导转化烟草,获得含有 BADH 基因的烟草植株,并测得 BADH 基因在烟草中高效表达。转基因烟草亦具有高耐盐性。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

所用的烟草品种为栽培品种 K326 及普通烟草品种黄苗榆(*Nicotiana tabacum* cv. Huangmiaoyu)。质粒 pYH 及 pBin19 由洪益国博士赠送。各种限制酶及 Taq 酶购自 Promaga 公司或华美公司。

#### 1.2 方法

**1.2.1 重组 DNA 方法:** 将 BADH 基因克隆到双元载体 pBin19 中所用的质粒 DNA 提取,酶切,DNA 片段的回收纯化,连接,琼脂糖凝胶电泳,大肠杆菌转化,重组子筛选等方法参考《Molecular Cloning》手册<sup>[6]</sup>。

**1.2.2 双元载体 pBinBADH-S 转移至农杆菌 LBA4404:** 采用三亲接合法<sup>[7]</sup>。

国家自然科学基金资助课题。

\* 现工作单位:Dept. of Biology, Imperial College of Science technology and medicine, London U. K.

本文于 1996 年 4 月 10 日收到。

**1.2.3 重组质粒中 BADH 基因的鉴定:** 用 PCR 扩增法。所用引物及反应条件按文献 [5]。

**1.2.4 烟草转化及再生植株:** 农杆菌 LBA4404 (pBinBADH-S) 转化烟草叶圆片后, 在含羧苄青霉素和卡那霉素  $200\mu\text{g}/\text{ml}$  的 MS 培养基上选择转化子, 以及再生植株, 参照文献 [7] 进行。

**1.2.5 BADH 基因在烟草中表达的检测:** 转基因烟草叶片的 BADH 提取<sup>[8]</sup>, 活性测定<sup>[9,10]</sup>, 酶活性的特异性染色<sup>[9,11]</sup>, Western blot<sup>[12]</sup>, 按相关文献进行。

**1.2.6 叶绿体分离:** 按 Weigel<sup>[11]</sup> 等方法。叶绿体蛋白用冻结-融溶方法分离。

**1.2.7 转基因植株耐盐性分析:** 参考文献 [13] 的方法。取 BADH 基因表达明显的 K326 烟草叶子, 以叶圆片法在含卡那霉素  $200\mu\text{g}/\text{ml}$  的 MS 分化培养基上诱导出芽, 再将芽切下移到含  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  卡那霉素和  $250\sim 350\text{mmol}/\text{L}$  NaCl 的无生长素 MS 培养基上, 观察植株再生及耐盐性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 BADH 表达载体的构建

质粒 pYH 的 35S 启动子和信号肽序列之间有多克隆位点。质粒 pLS9 含有 1.5kb 的 BADH 基因<sup>[5]</sup>, 经 KpnI 酶切, T4DNA 多聚酶补平 3' 端, 再用 BamHI 酶切, 所得的 BADH 基因片段一端为平末端, 另一端为粘性末端。将其连接到用 HindIII 酶切, T4DNA 多聚酶补平, 再用 BamHI 酶切的 pYH 质粒多克隆位点内。BADH 基因的起始子 ATG 与质粒 pYH 的 35S 启动子相连, 构成质粒 pBADH-S。该质粒再经 SacI/XhoI 酶切, 所得的 35S-BADH 基因-PolyA 片段连接到 pBin19 的 SacI/SalI 双酶切多克隆位点, 为二元植物表达载体 pBinBADH-S (图 1)。经转化入 DH5 $\alpha$  后, 通过三亲接合将其移动入农杆菌 LBA4404 中。通过对农杆菌质粒检测证明 LBA4404 含有 pBinBADH-S 二元载体。此外, 以该载体为模板, 进行 PCR 扩增, 能得到 1.5kb 的片段, 表明 BADH 基因已导入农杆菌中 (照片未示)。

### 2.2 烟草的转化及转化株的 PCR 鉴定

用农杆菌 LBA4404 (pBinBADH-S) 转化烟草获得抗卡那霉素的再生植株, 其中 K326 烟草 54 株, 黄苗榆烟草 40 株。从每一品种再生植株各取 20 株进行 PCR 扩增, 有 60% 以上呈 PCR 阳性。图版 I-1 所示为部分结果。其中 K326 烟草的转化子 bet-T2 和 bet-T3 以及黄苗榆烟草转化子 bet-N1, N6 均有明显的 1.5kb PCR 扩增带, 未转化株则没有, 表明上述两种烟草转化子均已导入了 BADH 外源基因。

### 2.3 BADH 基因在烟草中的表达

对 12 株转基因 K326 烟草 (由 bet-T1 至 T12) 和 10 株转基因黄苗榆烟草 (由 bet-N1

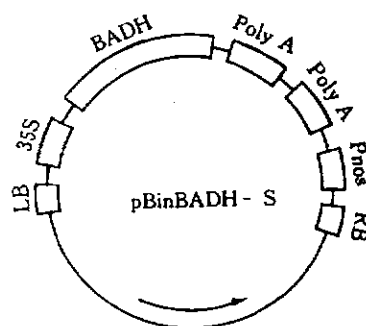


图 1 含 BADH 基因的植物表达载体  
Fig. 1 Plant expression vector pBin-BADH-S carrying BADH gene

至 N10)的叶片酶提取物进行 Western blot 分析,结果见图版 I-2, I-3。所检查的两种转基因烟草,大多数植株的酶提取物与菠菜 BADH 抗体呈阳性反应,表明菠菜 BADH 基因在烟草中表达。从图版可见,各植株的表达强度有所差异,bet-T1, T2, T3, T12 和 bet-N1, N2, N6, N9 表达最强。其中强表达的植株分别为 67% 和 50% 左右(表 1),未表达植株只占少数。亲本和未转化的烟草与 BADH 抗体不发生交叉反应。

表 1 BADH 基因在烟草中的表达

Table 1 Expression of BADH gene in the transgenic tobacco

Variety	Number of analysed plants	Strong expression		Weaker expression		Non-expression	
		Number	%	Number	%	Number	%
K326	12	8	66.7	2	16.7	2	16.7
<i>N. tabacum</i>	10	5	50.0	2	20.0	3	30.0

## 2.4 转基因烟草的 BADH 酶活性

从 Western blot 分析中,选择表达较强的烟草转化子 T2 和 T3(见图版 I-2),按以前方法<sup>[8]</sup>从叶片分离 BADH 酶,透析后测定其活性<sup>[9,10]</sup>,结果如图 2。两株转基因烟草的 BADH 活性分别为  $8.8$  和  $5.2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  蛋白,大约为甜菜的 BADH 活性的 4.5 和 2.5 倍。而甜菜被公认为 BADH 酶蛋白较多和活性较高的植物。上述活性与 Rathinasabapathi<sup>[3]</sup>等获得的转基因烟草的 BADH 的活性接近(约  $10 \text{ nmol/min} \cdot \text{mg}$  蛋白),而高于 Ishitahide<sup>[4]</sup>等获得的活性(约  $2.4 \text{ nmol/min} \cdot \text{mg}$  蛋白)。

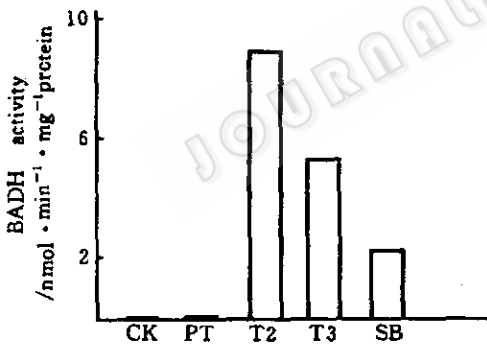


图 2 转基因烟草 bet-T2 和 bet-T3 的 BADH 酶活性

Fig.2 Activity of BADH enzyme in transformants bet-T2 and bet-T3

PT: parent plant, CK: non-transformed plant  
SB: sugar beet

由于 BADH 酶对底物甜菜碱醛和辅助因子 NAD 有很强的专一性<sup>[11,14]</sup>,因此所检测到的还原 NAD 的活性应为转基因烟草 BADH 酶的活性。烟草原本为不含 BADH 酶植物<sup>[3,4]</sup>,所以在未转化的对照植株(CK)和亲本植株也都未检查到 BADH 酶的活性。

为了进一步肯定 Western blot 和测定活性的结果,将 bet-T2 和 T3 的酶样进行 Native-PAGE,然后将凝胶片作 BADH 酶活性特异性染色<sup>[8,11]</sup>。图版 I-4 所示清楚表明,转基因株 T2 和 T3 有清楚的 BADH 酶活性特异性染色,其深度与甜菜的 BADH 酶染色差不多,而未转化的对照和亲本植株均未检查到 BADH 酶的活性。上述转基因烟草 BADH 酶的染色与 Rathinasabapathi 的结果差不多,但其试验中,蛋白质的上样量为  $400 \sim 500 \text{ mg}$ ,比本文中的上样量约高 10 倍。

## 2.5 BADH 酶在转基因植株中的分布

在菠菜,BADH 酶被认为定位在叶绿体<sup>[3]</sup>,但也有不同的意见,认为叶绿体虽有

BADH,但主要分布在胞液<sup>[14,15]</sup>。在转基因烟草,Rathinasabapathi 也认为定位于叶绿体。

我们按照 Weigel 等的 Percoll 垫底方法,分离转基因烟草叶片的叶绿体,悬浮<sup>[8]</sup>后,于  $-20^{\circ}\text{C}$  冻结,然后在室温下融溶,反复 3 次,使叶绿体破碎。离心收集上清液。一部分上清液进行 SDS-PAGE(图 3a),另一部分加入固体硫酸铵,取 30%~70% 饱和硫酸铵沉淀部分(图 3b),透析后作 SDS-PAGE。另取转基因烟草叶片,按以前方法<sup>[8]</sup>分离 BADH 酶,取 30%~50% 和 50%~70% 饱和硫酸铵部分(图 3c, d),透析后作 SDS-PAGE。上述样品进行 Western blot 分析,结果如图 3。分离的叶绿体,反复冻结-融溶后,BADH 酶释放于上清液。上清液及其 30%~70% 饱和硫酸铵沉淀部分虽有 BADH 酶存在,但其量似乎比在胞液中的少。这与我们以前结果一致<sup>[8,15]</sup>,即 BADH 在叶绿体和胞液中均有分布。

转基因烟草植株,由三角瓶移出盆栽后,大约经过 7~8 个月开花,取开花的植株叶片进行组培,诱导长芽,生根后,将幼苗盆栽,大约经 2~3 个月,植株开花,而不需要经过 7~8 个月栽培,表明再诱导的烟草植株与其母株有大体相同的生理年龄。用 Western blot 检查再诱导的植株均呈阳性。

## 2.6 转基因植株的耐盐性

以 BADH 基因有强表达的烟草 K326 转基因植株 bet-T2 为材料,用叶圆片法在含卡那霉素的分化培养基上诱导出芽,取约 2cm 长的芽移植到含有 300mmol/L(1.75%)NaCl 的无生长素 MS 培养基内,10d 以后,大部分芽均能长出发达的根系。但比在无 NaCl 的条件下稍差。而 pBin19 的转化子及亲代 K326 烟草叶圆片分化的芽,则不能生根,培养一个月后叶片枯黄坏死(图见版 I-5)。我们得到 21 株耐 NaCl 的再生植株,进一步移植到含有 300mmol/L NaCl 的 Hoagland 营养液水培,亦能正常生长。这在甜菜碱醛脱氢酶的植物基因工程研究中尚没见报道。

**致 谢** 中国科学院微生物研究所王桂玲同志和植物研究所毛大璋同志对本研究给予大力帮助,微生物研究所吕文和周坚同志参加部分工作,在此一并感谢。

## 参 考 文 献

- [1]Weretilnyk E A, Hanson A D. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87:2745~2749.
- [2]McCue K F, Hanson A D. Plant Mol Biol, 1992, 18:1~11.
- [3]Rathinasabapathi B, McCue K F, Gage D A *et al.* Planta, 1994, 193:155~162.
- [4]Ishitani M, Nakamura T, Han S Y *et al.* Plant Mol Biol, 1955, 27:307~315.
- [5]马德钦,吕文,汤岚,等. 生物工程学报, 1996, 12:1~6.
- [6]Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, a laboratory manual. 2nd, USA; Cold spring harbor laboratory press, 1989.

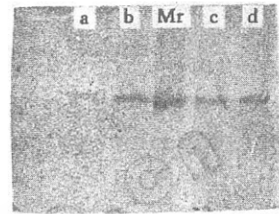


图 3 转基因烟草 BADH 酶分布

Fig. 3 Distribution of BADH enzyme in transgenic plants

- Supernatant of chloroplasts (4 $\mu\text{g}$  protein).
- Precipitated fraction with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (3 $\mu\text{g}$  protein).
- c and d: Fraction of 30%~50% and 50%~70%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  from the homogenate supernatant (8 $\mu\text{g}$  protein).
- Mr: Purified BADH protein (2 $\mu\text{g}$  protein).

- [7] An G, Ebert P R, Mitra A *et al.* Plant Mol Biol Manual A3 1~9, Gelvin S B, Schiperoot R A eds. Kluwer, Dordrecht, 1988.
- [8] 梁峥, 赵原, 李裕春等. 植物学报, 1991, 33: 680~686.
- [9] Liang Z, Luo A L, Tang L *et al.* Chinese J Bot, 1993, 5: 58~64.
- [10] Liang Z, Li Y C, Zhao Y *et al.* Chinese J Bot, 1993, 5: 154~158.
- [11] Weigel P, Weretilnyk E A, Hanson A D, Plant Physiol, 1986, 82: 753~759.
- [12] 骆爱玲, 王继伟, 李佳格. 植物学通报, 1995, 12: 63~64.
- [13] 刘俊君, 黄绍兴, 彭学贤等. 生物工程学报, 1995, 11(4): 381~384.
- [14] Pan S M, Moreau R A, Yu C *et al.* Plant Physiol, 1981, 67: 1105~1108.
- [15] 骆爱玲, 赵原, 李裕春等. 植物生理学报, 1995, 21: 117~122.

## Expression of the Spinach Betaine Aldehyde Dehydrogenase (BADH) Gene in Transgenic Tobacco Plants

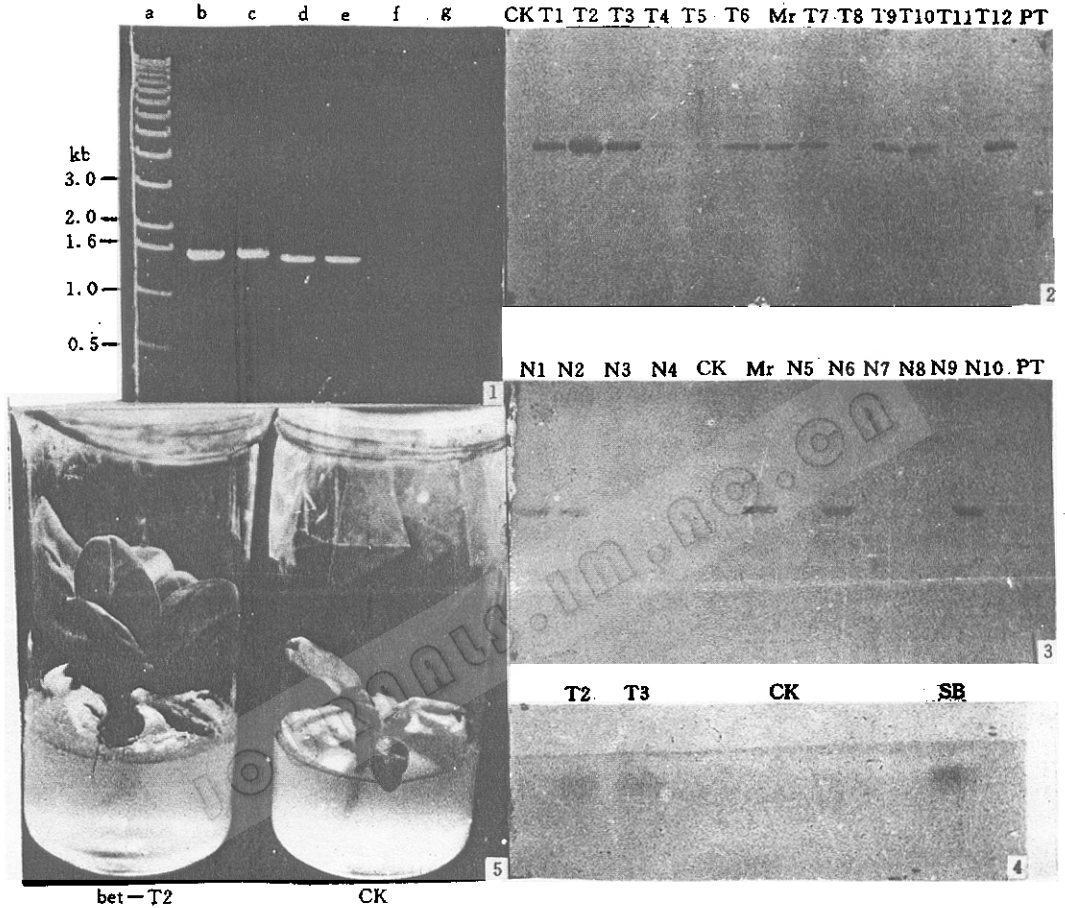
Liang Zheng<sup>1</sup> Ma Deqin<sup>2</sup> Tang Lan<sup>1</sup> Hong Yiguo<sup>2</sup> Luo Ailing<sup>1</sup> Dai Xiuyu<sup>2</sup>

(*Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100093*)<sup>1</sup>

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)<sup>2</sup>

**Abstract** Plasmid pLS9 contains a 1.5 kb of spinach BADH cDNA including its complete open reading frame. The 1.5 kb of BADH cDNA was cutted from pLS9 using restriction enzyme and was inserted into the expression cassette of pYH between the 35S promoter and polyA terminator. The 35S-BADH gene-polyA fragment was cloned into binary vector pBin19 in the polylinker site. Resulting plasmid pBinBADH-S was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. The BADH gene was transformed to tobacco plants mediated by agrobacteria. Ninety kanamycin resistant transformants were selected. PCR detection showed that more than 60% of transformed tobacco plants contain the foreign BADH gene. Western blot analysis, BADH activity assay and BADH specific activity stain showed that BADH gene was normally expression in the transgenic tobacco plants. The enzyme also occurred in chloroplasts and the cytosol in the transgenic plants. Plants having strong expression of BADH gene had an ability to tolerate high salinity.

**Key words** Betaine, BADH gene, transgenic tobacco, high salt tolerance



1. PCR production of transgenic tobacco plants

a: 1kb ladder marker, b~c: bet-T2 and T3, d~e: bet-N1 and N2, f~g: non-transformed plants, K326 and *N. tabacum* cv. H.

2 and 3. Western blot analysis of BADH synthesized in transgenic plants, K326 (P1. 2) and *N. tabacum* (P1. 3)

PT: Parent plant; Mr: purified BADH from spinach; CK: non-transgenic plant

4. Activity strain of BADH enzyme in transformants bet-T2 and bet-T3

Lanes contained 45μg protein from T2, T3 and CK; lanes contained 150μg protein from sugar beet (SB) leaves

5. Roots and growth of non-transgenic (CK) and transgenic (bet-T2) tobacco plants after 30 days of culture in MS medium containing NaCl (300mmol/L.)