

学校编码: 10384
学号: 20120051302053

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学

学 位 论 文

红树植物耐盐基因的克隆与分析

The Cloning and Analysis of Salt-tolerant Gene
from Mangrove

李 芳

指导教师姓名: 周涵韬 副教授
专业名称: 发育生物学
论文提交日期: 2008年8月1日
论文答辩时间: 2008年9月22日
学位授予日期:

答辩委员会主席: 林光辉 教授
评 阅 人: 蔡 峻 教授
朱福兴 教授

2008年9月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要

植物受盐碱和水分胁迫时, 细胞质中积累大量有机渗透调节剂, 如甘露醇、海藻糖、甜菜碱和脯氨酸等, 而将细胞质中的无机渗透调节剂(主要是 K^+)挤向液泡, 使胞质与细胞(液泡)外环境维持渗透平衡, 这样就避免了细胞质高浓度无机离子对酶和代谢的毒害。除维持细胞的正常膨压外, 甜菜碱还具有无毒渗透保护剂的作用, 能够稳定复杂蛋白质高级结构, 从而使得许多代谢过程中的重要酶类在渗透胁迫下继续保持活性。

甜菜碱是以胆碱为底物经两步酶催化氧化生成, 催化第二步反应的是甜菜碱醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase, BADH)。甜菜碱脱氢酶是一个限速酶, 甜菜碱的增加与它的活性有关, 因此BADH基因的有效表达可增强植物的耐盐性。自1981年从高等植物中首次分离得到BADH基因后, 对BADH基因的研究报告陆续有报道。目前, 已经先后从大肠杆菌、酵母以及多种高等植物中克隆到BADH基因的cDNA。据推测, 单子叶植物的BADH基因可能位于微体中, 而双子叶植物BADH基因位于叶绿体中。

本文对红树植物 *BADH* 基因的克隆与分析进行了初步的探索, 主要结果如下:

1、采用 CTAB 法提取白骨壤总 RNA, 经 1.0%琼脂糖凝胶电泳和 OD_{260} 与 OD_{280} 的检测, 结果显示, 28S rRNA 条带亮度是 18S rRNA 条带亮度 2 倍以上, 而且 OD_{260}/OD_{280} 值非常接近 2.0, 表明我们提取的白骨壤总 RNA 完整性较好, 基本上没有发生降解; 纯度较高, 所含杂质很少, 可用于后续实验中 RT-PCR 的进行。

2、以提取的白骨壤总 RNA 为模板, 用反转录酶反转录生成 cDNA, 利用简并引物, 通过递减 PCR(Touch down PCR)技术扩增出约 250bp 的 *BADH* 基因核心片段。经过比对, 它和已报道的白骨壤 *BADH* 基因同源性高达 80%。

3、根据扩增得到的白骨壤 *BADH* 基因片段设计引物, 分别进行 3'RACE 和 5'RACE, 扩增白骨壤 *BADH* 基因未知的 3'端和 5'端, 并分别得到约 350bp (3'RACE)和 1.0kb(5'RACE)的特异性片段。测序和比对后, 证实我们成功地扩增到了白骨壤 *BADH* 基因的 3'端和 5'端。

4、在以上实验基础上, 重新设计白骨壤 *BADH* 基因特异性引物, 从白骨壤

总 RNA 反转录生成的 cDNA 中扩增得到一条约 1.5kb 的特异性条带。经过测序和比对后,进一步确定成功克隆到白骨壤的 *BADH* 基因。*BADH* 基因编码区全长 1509bp, 编码 502 个氨基酸。对 *BADH* 基因的分析发现, 它与已报道的白骨壤 *BADH* 基因的同源性均在 90%以上。

5、用 T4 连接酶将 pGBKT7 和 *BADH* 基因连接起来, 转入酵母 AH109 中, 在含 NaCl 梯度浓度的 SD-Trp 培养基中生长, 通过测量生长曲线发现, 重组酵母 AH109(pGBKT7-*BADH*)对 NaCl 的耐受度由原有的 9%提高到 14%, 表明从白骨壤中扩增得到的 *BADH* 基因在酵母 AH109 中能有效转录并翻译出蛋白质, 具有生物学活性。

关键词: 植物耐盐; 基因克隆; 甜菜碱醛脱氢酶; 白骨壤

Abstract

Cell accumulates organic osmotic regulators in the cytoplasm (Mannitol, trehalose, betaine and proline, for example), while inorganic osmotic regulators in the vacuole from the cytoplasm (one and most of them is K^+), when the plant was stressed by salt or water. That will keep osmotic balance between the cytoplasm and outside (vacuole), avoiding the ion poison to the enzymes and metabolize when high concentration ion in the cytoplasm. Besides keeping the cell normal swell pressure, the glycinebetaine (hereafter GB) can be an innocuous osmoprotectant and stabilize the high structure of complex proteins. So the main enzymes in metabolism may keep activity under osmotic stress.

In plants, it has reported that GB is synthesized by two steps. The second step is catalyzed by betaine aldehyde dehydrogenase (BADH). Betaine aldehyde dehydrogenase is a rate-limiting enzyme, and the effective expression of *BADH* gene will enhance the plant's salt-tolerance for referring to the betaine's increase. Researches about *BADH* gene were reported after the *BADH* gene isolated for the first time from high plant in 1981. cDNAs of *BADH* gene were cloned from *E. coli*, yeast and kinds of high plant. Monocotyledon's *BADH* genes are located on mitochondrion and dicotyledon's *BADH* genes are located on chloroplast.

This study aimed to explore the clone and analysis of *BADH* gene of mangrove. Main results are followed:

1. The total RNA was extracted from *Avicennia marina* using CTAB, tested by 1.0% agarose gel electrophoresis and OD_{260} 、 OD_{280} . The strength of 28S rRNA was over twice to the 18S rRNA from the electrophoresis. The value of OD_{260}/OD_{280} was very close to 2.0. It indicated that the total RNA we extracted had good integrity and high purity for non-degradation and low impurity.

2. We got the cDNA with RNase from the extracted total RNA. A fragment about 250bp was amplified using a pair of degenerate primers by touch down PCR. It had a 80% homology to the reported *BADH* gene of *Avicennia marina*.

3. Based on the fragment above, we designed primers and processed 3'RACE

and 5'RACE respectively to amplified the unknown 3' terminus and 5' terminus of *BADH* gene. About 350bp(3'RACE) and 1.5kb(5'RACE) special fragments was amplified. Results of sequencing and analysis indicated that we obtained successfully the 3' RACE and 5' RACE of *BADH* gene.

4. A pair of gene special primers was redesigned and a 1.5kb fragment was amplified from the cDNA reversed from the total RNA. The fragment was confirmed after sequencing and analysis. The coding section of *BADH* gene was 1509bp and coded a polypeptide of 502 amino acids. Analysis of *BADH* gene indicated high homology to other *BADH* gene, and over 90% homology to the reported *Avicennia marina* *BADH* gene.

5. The *BADH* gene was ligated to pGBKT7 with T4 Ligase, and the recombined plasmid was transformed to *Saccharomyces cerevisiae* AH109. The tolerance to NaCl of recombined *Saccharomyces cerevisiae* AH109(pGBKT7-*BADH*) enhanced to 14% from 9%. It showed the protein transcribed and translated in recombined *Saccharomyces cerevisiae* AH109(pGBKT7-*BADH*) has biological activity.

Key words: plant salt-tolerance; gene cloning; betaine aldehyde dehydrogenase;
Avicennia marina

目 录

一 前言.....	1
1 植物的耐盐机理及研究概况.....	1
2 <i>BADH</i> 基因的研究背景.....	6
3 红树植物耐盐基因的研究概况.....	8
4 基因克隆常见方法简介.....	9
5 本研究的的目的和意义.....	12
二 材料与amp;方法.....	14
1 实验材料.....	14
2 实验方法.....	23
三 结果与amp;讨论.....	35
1 白骨壤总 RNA 提取.....	35
1.1 结果.....	35
1.2 讨论.....	36
2 核心片段的 PCR 扩增.....	37
2.1 结果.....	37
2.2 讨论.....	39
3 3'RACE.....	41
3.1 结果.....	41
3.2 讨论.....	43
4 5'RACE.....	44
4.1 结果.....	44
4.2 讨论.....	49
5 <i>BADH</i> 基因全序列的扩增.....	51
5.1 结果.....	51
5.2 讨论.....	60

6 <i>BADH</i> 基因在酵母 AH109 中的表达.....	62
6.1 结果.....	62
6.2 讨论.....	64
四 总结与展望.....	68
五 参考文献.....	70
致谢.....	78

厦门大学博硕士学位论文摘要

Catalogue

Introduction.....	1
1 Mechanism of salt-tolerant plant.....	1
2 Background of <i>BADH</i> gene.....	6
3 Research of salt-tolerant gene of Mangrove.....	8
4 Common methods' introduction of gene clone.....	9
5 Purpose and significance of this research.....	12
Materials and methods.....	14
1 Materials.....	14
2 Methods.....	23
Results and discussion.....	35
1 Extraction of total RNA of <i>Avicennia marina</i>	35
1.1 Results	35
1.2 Discussion.....	36
2 Amplification of core fragment.....	37
2.1 Results	37
2.2 Discussion.....	39
3 3'RACE.....	41
3.1 Results	41
3.2 Discussion.....	43
4 5'RACE.....	44
4.1 Results	44
4.2 Discussion.....	49
5 Amplification of the gene.....	51
5.1 Results	51
5.2 Discussion.....	60
6 Expression of <i>BADH</i> gene in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AH109.....	62
6.1 Results	62

6.2 Discussion.....	64
Conclusion and expectation.....	68
Reference.....	70
Acknowledgments.....	78

厦门大学博硕士论文摘要库

前 言

土地的盐渍化是一个世界性的资源问题和生态问题,它已严重制约了现代农业的发展。全世界各种盐碱土地约9.5亿 hm^2 , 占全球陆地面积的10%, 广泛分布于100多个国家和地区。我国盐渍土地面积约为1.3亿 hm^2 , 分布于16个以上的省和自治区。仅2001年华北、西北和东北地区的466.7万 hm^2 水稻的种植面积就因为缺水而减少了53.3万 hm^2 。在自然条件下, 由于环境胁迫而严重影响了植物生长发育, 其遗传潜力难以发挥, 干旱、盐渍不仅影响了植物的产量, 而且限制了植物的广泛分布。全球200多种大宗栽培植物中, 大多不耐盐, 难以在盐碱地种植或用海水浇灌。在人口不断增加、耕地日趋减少、淡水资源严重不足的情况下, 克隆有效的耐盐基因、加强植物耐盐的机理研究, 并运用现代生物技术方法培育耐盐植物, 开发利用盐碱荒地和海水资源来发展农业, 是当今生命科学领域急需解决的重大课题之一。

1 植物的耐盐机理及研究概况

自然环境中, 盐胁迫由土壤中高浓度的 Na^+ 和 Cl^- 引发(如海水灌溉), 导致植物生长发育受阻, 由此引起了各种生理生化变化, 其中包括: 光合作用受抑制, 营养物质摄取受阻, 质膜的解体, 活性氧的增多和代谢毒物的积累等, 严重的还会导致植株死亡^[1]。在植物分子生物学研究广泛开展以前, 关于盐胁迫应答的研究集中于形态结构和生理生化等方面, 发现了包括渗透剂在胞质中积累, 离子在液泡中“仓储”等许多现象。

1.1 植物形态结构特征对其耐盐机制的影响

1.1.1 根系

植物根系是植物直接吸收水分的重要器官, 它对植物的耐旱功能具有至关重要的作用。纵深发达的根系系统可使植物充分吸收利用贮存在土壤中的水分, 使植物度过干旱期。对高粱的根系解剖学研究发现, 高粱根系吸水每天以3.4 cm的稳定速率下伸, 直到开花后约10d, 在有限水分条件下, 吸水的多少由根系深度决定, 深层吸水差是由于根长不够所致。此外, 根水势能也能反映根系的吸收功能。根水势低, 吸水能力强。据报道, 高粱根水势一般为-1.22~-1.52 Mbar, 而玉米仅为-1.01~-1.11 Mbar, 高粱的吸水能力约是玉米的2倍, 对干旱的耐受能力也

强于玉米。一般认为抗旱性强的植物，根水势低，利于水分吸收。

1.1.2 叶片

作为同化和蒸腾器官的叶片，在长期干旱胁迫下，叶片的形态结构会发生变化，其形态结构的改变与植物的耐旱性有着密切的关系。主要表现在：叶片表皮外壁有发达的角质层，角质层是一种类质膜，其主要功能是减少水分向大气散失，是植物水分蒸发的屏障。厚的角质层可提高植物的能量反射与降低蒸腾，从而增强植物的抗旱性；具有表皮毛，可以保护植物避免强光照射，减少蒸腾；具有大的栅栏组织/海绵组织比和小的表面积/体积比，发达的栅栏组织，分布于叶的背腹两面，可使干旱缺水植物萎蔫时减少机械损伤。而小的表面积/体积比，可以最大程度减少水分丧失。

1.2 植物生理生化特征对其耐盐机制的影响

水分胁迫条件下会积累有机分子相溶性溶质或渗透剂，有效地提高植物的渗透调节能力、增强植物的抗逆性。

1.2.1 脱落酸

脱落酸(Abscisic acid, ABA)是植物五大类激素之一，大量的试验表明：当植物处于干旱、低温、盐碱、环境污染等不利环境下，植物体内脱落酸大量增加。脱落酸的增加，使植物对不利环境产生抗性^[2]。尤其是脱落酸的增加和气孔的关闭一致，这对植物抗旱是非常有利的。脱落酸除能调节气孔开闭外，还能促进根系对水和离子的吸收。另外，脱落酸能促进芽的休眠，使生长速度下降，促进同化物质的积累，这些都可以减少蒸腾，提高植物保水能力，对植物抗旱是十分有利的^[3]。

1.2.2 脯氨酸

脯氨酸积累是植物为了对抗干旱胁迫而采取的一种保护性措施。轻度水分胁迫，脯氨酸可保护蛋白质在水分胁迫下的不变性。脯氨酸亲水基与蛋白质亲水基相互作用，使蛋白质稳定性提高^[4]，乃至严重水分胁迫下代谢酶和结构蛋白质可能会受积累的脯氨酸的保护，减轻严重干旱对组织的危害程度。水分胁迫下脯氨酸的积累，一方面增强了植物的渗透调节作用，使组织的抗脱水力加大；另一方面脯氨酸的偶极性保护了膜蛋白结构的完整性，同时增强了膜的柔韧性。脯氨酸还有作为自由基清除剂，调节细胞质pH值，防止酶变性^[5]，防止细胞质酸化的作

用。

1.2.3 甜菜碱

近年研究结果指出,甜菜碱可能是作为植物的主要渗透调节物质之一而对植物的抗旱性起作用。其依据是渗透胁迫条件下,植物体内的甜菜碱醛脱氢酶(BADH)和胆碱单氧化酶(CMO)活性升高,这两种酶在高等植物中,具有将胆碱氧化为甜菜碱的作用,并在细胞质中积累甜菜碱,以保持细胞与外界环境的渗透平衡和稳定复合蛋白四级结构,从而提高植物对于干旱胁迫的适应性。因此,在受到干旱胁迫的细胞中,甜菜碱似乎是起到一种低分子量分子伴侣的作用,稳定RuBP羧化酶的构象并使其处于功能状态,部分抵消了干旱的胁迫。甜菜碱可作为一种渗透调节物质^[6],在植物受到环境胁迫时在细胞内积累降低渗透势,还能作为一种保护物质,具有极为重要的“非渗透调节”功能,维持生物大分子的结构和完整性,维持其正常的生理功能,解除高浓度盐对酶活性的毒害和保护呼吸酶及能量代谢过程^[7],还能影响细胞内离子的分布^[8]。

1.2.4 水孔蛋白

水孔蛋白是植物体中水分跨膜运输的主要途径,是作为跨膜通道的主嵌入蛋白(MIP)家族中有运输水分功能的一类蛋白质^[9],在调节细胞水势和胞内盐离子分布中起信号传导作用。植物体可以通过调控水孔蛋白等膜蛋白以加强细胞与环境的信息交流和物质交换,改变膜对水分的通透性,实现渗透调节,以增强植物的抗旱、耐盐能力。

1.2.5 活性氧清除

植物受到水分、盐分胁迫时,产生活性氧,对细胞造成损伤,具体表现在四个方面:1、活性氧能与酶的巯基或色氨酸残基反应,导致酶失活;2、活性氧会破坏核酸结构,攻击核酸碱基,使嘌呤碱和嘧啶碱结构变化,导致变异出现或变异的积累;3、DNA是蛋白质合成的信息,由于活性氧对DNA复制过程的损伤,从而妨碍蛋白质合成;4、启动膜脂过氧化反应,使维持细胞区域化的膜系统受损或瓦解。大量的研究实验表明,植物体内广泛存在的抗氧化酶系统(超氧化物歧化酶SOD、过氧化氢酶CAT、过氧化物酶POD等)能有效清除活性氧,保证细胞正常的生理功能,维持其对于干旱胁迫的抗性^[9]。有研究表明,耐旱植物在逆境条件下能使保护酶活力维持在一个较高水平,有利于清除自由基,降低膜脂过氧

化水平，从而减轻膜伤害程度^[3]。

1.3 植物耐盐基因的研究及应用

盐胁迫对植物造成的伤害，主要是盐分过高使植物吸收水分困难的渗透胁迫，过量的盐分对植物细胞造成了毒害，扰乱植物细胞中各种生化代谢途径和破坏细胞器功能的离子胁迫，细胞内某些营养物质缺乏和产生有害物质的营养胁迫，高盐抑制根际微生物生长从而影响根系的生长等。国内外学者研究了盐分对植物的伤害、植物耐盐的机理，克隆了一些耐盐相关基因，并通过耐盐相关基因转化，获得了一些耐盐性提高的转基因植物，展示了诱人的前景。

1.3.1 渗透调节物质合成的关键酶基因

在盐胁迫下，植物细胞中会积累一些可溶性的小分子有机物质作为渗透调节剂进行渗透调节，以适应外界的低水势胁迫。脯氨酸和甜菜碱是研究得比较多的渗透调节剂，此外还有多元醇、可溶性碳水化合物等^[10]。脯氨酸合成酶基因 *P5CS* 在胡萝卜等植物中表达使其耐盐能力得到明显的提高。转甜菜碱生物合成酶基因 (*coda*) 的拟南芥提高了对盐害的抵抗能力。

1.3.2 膜转运蛋白基因

在盐胁迫下，为抵御离子胁迫，植物细胞可以将细胞质中的 Na^+ 区域化到液泡中，液泡膜上的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白即具有这样的功能^[11]，编码 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的基因——*AtNHX1* 首先从拟南芥中成功克隆。人们从细菌、酵母、动物、和高等植物中相继分离克隆了多种编码 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因^[12]。目前，已经对 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的结构进行了分析。将编码 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的基因分别导入西红柿和拟南芥，植物的耐盐性得到了惊人的提高，而且在耐盐性上表现出主效基因的特点。

1.3.3 清除有毒物质基因

在逆境(高盐、低温、干旱)等胁迫下，植物细胞会产生过量的活性氧类物质和其它有害物质，对细胞造成危害。过氧化物酶(SOD)、乙醛脱氢酶等承担着氧自由基和相关有害物质的清道夫的角色，从而缓解盐胁迫造成的危害。转酵母 *SOD2* 基因的拟南芥对盐胁迫的耐受性明显提高。转乙醛脱氢酶基因的拟南芥增强了植株对盐、干旱、重金属及过氧化物等多种逆境的耐受性。酵母 *HAL2* 基因编码的蛋白酶具有消除含硫有毒物质的功能，转酵母 *HAL2* 基因番茄表现为耐盐

性提高^[13]。

1.3.4 LEA 基因与脱水素基因

将来自大麦的一种 LEA 蛋白基因 *HVA1* 转化水稻,使其在水稻中过量表达,结果发现水稻的耐旱能力明显提高,且提高幅度与 LEA 蛋白的表达量一致^[14],为 LEA 蛋白在植物耐旱、抗盐过程中的作用提供了直接证据。脱水素是一种广泛存在于高等植物中的干旱诱导蛋白,具有很强的亲水性和热稳定性,同时保护植物细胞的大分子在脱水过程中不受伤害的功能。由于脱水素是在种子成熟时发挥作用,因此也把它归于 LEA 蛋白。脱水素基因是一个大的基因家族,目前已有多个脱水素基因或相关基因被克隆及定位^[5]。

1.3.5 抗逆相关的转录因子及双组分系统基因

抗逆相关的转录因子的研究近来也日益受到重视,它们可以控制一系列的下游胁迫反应,从而启动信号传导中的级联反应,使细胞产生相应的抗逆性。至今,已克隆出了大量的与植物抗旱相关的转录因子。在拟南芥和烟草中还发现双组分系(Two-component System)基因的存在,其基因产物为“感受器”和“反应调节器”合二为一的激酶蛋白。双组分系统基因被诱导表达后,产生一系列的细胞应激反应,提高植物的干旱胁迫适应能力。

1.3.6 其它类型基因

酵母 *HAL1* 基因编码的蛋白可能和钾离子通道反馈抑制调节位点相互作用解除反馈抑制,增强钠离子胁迫时细胞吸收钾离子的能力^[15]。酵母 *HAL1* 基因的表达增强了番茄、西瓜等植物的耐盐性^[13]。高等植物中钙是多种信号传递的重要因子,钙受体已经证明在调控植物对盐、干旱、低温的反应中发挥作用^[16]。对拟南芥的钙结合蛋白类似物 CBL 的研究表明,CBL 对盐害和干旱有正调控作用,对冷害则具有负调控作用^[17]。一些逆境中表达的转录因子如拟南芥脱水应答元件转录因子 *DREB1A*、水稻的转录因子 *OsDREB* 等可能用来创造耐受多种逆境(盐害、干旱、冷害等)胁迫的植物。通过对拟南芥盐敏感突变体的研究,发现了一条特异的离子胁迫 SOS 信号转导途径。在植物中鉴定出的第一条 MAP 激酶级联途径;还有由 DRE/CRT 元件或 ABRE 元件参与的信号转导途径,ABA 可能作为信号分子起作用;还有编码渗透调节蛋白(Osmotin)等的有关基因,也可以提高植物的耐盐性^[18]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库