

胡杨甜菜碱醛脱氢酶基因的功能分化

刘佳琪¹, 杨雪², 李迪¹, 杨海灵¹

1 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083

2 中国科学院植物研究所 系统与进化植物学国家重点实验室, 北京 100093

刘佳琪, 杨雪, 李迪, 等. 胡杨甜菜碱醛脱氢酶基因的功能分化. 生物工程学报, 2012, 28(3): 329–339.

Liu JQ, Yang X, Li D, et al. Functional divergence of betaine aldehyde dehydrogenase genes in *Populus euphratica*, 2012, 28(3): 329–339.

摘 要: 甜菜碱醛脱氢酶 (BADH) 在植物抗逆反应中发挥着重要作用。文中从胡杨 cDNA 克隆到 2 个甜菜碱醛脱氢酶基因, 分别命名为 *PeBADH1* 和 *PeBADH2*。*PeBADH1* 和 *PeBADH2* 均编码 503 个氨基酸的蛋白质, 预测分子量分别是 54.93 kDa 和 54.90 kDa。组织表达模式分析发现这 2 个基因在正常生长、盐和 H₂O₂ 胁迫下, 在不同组织中的表达模式有较大差异。在大肠杆菌中表达并纯化了 2 个基因的重组蛋白。酶活性分析显示 *PeBADH1* 和 *PeBADH2* 蛋白对底物的活性分别是 0.073 μmol/(min·mg) 和 0.107 μmol/(min·mg)。热力学稳定性分析显示这 2 个蛋白的热力学稳定性具有明显差异。因此, 基因表达模式差异与蛋白质酶学性质的不同预示着这 2 个基因可能存在功能上的分化。

关键词: 甜菜碱醛脱氢酶, 胡杨, 克隆, 蛋白结构, 酶活性分析

Functional divergence of betaine aldehyde dehydrogenase genes in *Populus euphratica*

Jiaqi Liu¹, Xue Yang², Di Li¹, and Hailing Yang¹

1 College of Life Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

2 State Key Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

Abstract: Plant betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) is a physiologically important enzyme in response to salt or drought stress. In this study, two *BADH* genes (*PeBADH1* and *PeBADH2*) were cloned from *Populus euphratica*. Both *PeBADH1* and *PeBADH2* genes encode the proteins of 503 amino acid residues, with a calculated molecular mass of 54.93 kDa and 54.90 kDa,

Received: September 8, 2011; **Accepted:** December 5, 2011

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2009CB119104).

Corresponding author: Hailing Yang. Tel: +86-10-62336114; E-mail: yhailing@yahoo.com.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2009CB119104) 资助。

respectively. Reverse transcription PCR showed the divergence of expression pattern between the *PeBADH1* and *PeBADH2* genes in *P. euphratica*. The recombinant *PeBADH1* and *PeBADH2* proteins were overexpressed in *E. coli*, and purified by Ni-affinity chromatography. The *PeBADH2* protein had 1.5-fold higher enzymatic activity towards the substrate aldehyde than *PeBADH1* protein. The *PeBADH1* protein revealed higher thermal stability than *PeBADH2* protein. These results indicated obvious functional divergence between the *PeBADH1* and *PeBADH2* genes.

Keywords: betaine aldehyde dehydrogenase, *Populus euphratica*, cloning, protein structure, enzyme activity

甜菜碱是一类季铵化合物,普遍存在于细菌、藻类、动物和植物中^[1]。植物甜菜碱可以通过不同过程保护细胞免受胁迫压力的损害,包括参与细胞渗透调节,清除自由基,保护细胞膜完整性,稳定生物大分子结构与功能,保护细胞内组织免受脱水损害等。甜菜碱是以胆碱为底物经两步酶催化合成,首先由胆碱单加氧酶 (Choline monooxygenase, CMO) 催化胆碱形成甜菜碱醛,然后由甜菜碱醛脱氢酶 (Betaine aldehyde dehydrogenase, BADH, E.C.1.2.1.8) 催化形成甜菜碱,其中 BADH 是合成甜菜碱的关键酶^[2]。许多研究发现将 *BADH* 基因转入烟草^[3]、胡萝卜^[4]、水稻^[5]、棉花^[6]等植物中,转基因植株的抗旱、耐盐、抗冻性都得到一定程度的提高,比如在胡萝卜中过量表达 *BADH* 基因显著增强了植株的抗盐能力;在棉花中转入菠菜 *BADH* 基因明显增强其抗冻性能^[4],说明了转基因植株在低温下细胞膜的通透性能较好,这可能是甜菜碱对维持细胞膜的结构有一定程度的保护作用^[6]。因此,这些研究表明 *BADH* 在植物的抗逆反应中发挥着重要作用。

甜菜碱脱氢酶属于醛脱氢酶 (ALDH) 超基因家族中的一个亚家族^[7],迄今为止, *BADH* 基因已从拟南芥、菠菜、甜菜、碱蓬、水稻、小麦、豌豆等草本植物中得到分离和鉴定^[7-10],而木本植物 *BADH* 基因的研究报道较少。胡杨 *Populus*

euphratica 是杨柳科杨属中古老的一个种,具有耐盐碱、抗旱、抗寒、抗风沙、适应性强等特点,是我国西北干旱盐碱荒漠地带能形成纯林的唯一高大乔木树种^[11]。由于胡杨独特的抗逆能力使其能在干旱、盐碱化、多风沙的恶劣环境中生长,这对维持该地区脆弱的生态平衡具有非常重要的作用^[12]。本研究从胡杨中克隆得到 2 个 *BADH* 基因,对该基因的基因结构、系统进化、表达模式、所编码蛋白的结构与生化功能进行了详细的研究,为深入揭示 *BADH* 基因在植物逆境胁迫中的作用机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 *BADH* 基因序列的鉴定与命名

根据已知拟南芥 ALDH10A8 和 ALDH10A9 蛋白序列 (GenBank Accession No. AAM13070, AAK44148),利用 TBLASTN 检索 GenBank 中毛果杨 *Populus trichocarpa* 的基因组数据库,获得的 2 个与拟南芥 ALDH10A8 和 ALDH10A9 均具有较高相似性的序列。获得序列经过 Pfam 判读,确定该序列编码的蛋白具有 BADH 结构域特征。我们将这 2 组序列分别命名为 *PtBADH1* (GenBank Accession No. XM_002318594) 和 *PtBADH2* (GenBank Accession No. XM_002322111)。

1.2 胡杨 *BADH* 基因的克隆

胡杨苗取自新疆。取新鲜胡杨顶芽组织

0.1 g, 按照 Aurum Total RNA Kit (BIO-RAD) 试剂盒说明书步骤提取胡杨顶芽组织总 RNA, 并以总 RNA 为模板, 通过 RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 反转录试剂盒 (TaKaRa), 将总 RNA 反转录合成 cDNA。根据 *PtBADH1* 和 *PtBADH2* 基因序列分别设计引物 *PtBADH1-CL1/CL2* 和 *PtBADH2-CL1/CL2* (表 1)。引物由 Invitrogen 公司合成。以 cDNA 为模板, 利用 2 对引物分别进行 PCR 扩增。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收纯化目的条带, 纯化产物连接到 pGEM-T 载体上。将构建好的重组质粒转化到大肠杆菌 JM109 感受态细胞中。挑选多个阳性克隆进行双向测序, 测序分析使用载体通用引物。

1.3 系统发生关系分析

PeBADH1 和 *PeBADH2* 的蛋白序列与其他植物 ALDH 序列通过 Clustal X 1.83 进行氨基酸序列比对, 然后经 BioEdit 手动校对。利用 MEGA V.4.0 的 neighbour-joining (NJ) 模型构建进化树, Bootstrap 值为 1 000。

1.4 胡杨 *BADH* 基因的组织表达分析

为了研究 *BADH* 基因在胡杨不同组织中和不同胁迫下的表达分布, 分别对 1 年生胡杨进行了 NaCl 和 H₂O₂ 胁迫处理, NaCl 胁迫处理条件是: 150 mmol/L NaCl 处理 7 d, 而 H₂O₂ 胁迫处理条件是: 0.5% H₂O₂ 处理 12 h, 然后提取不同处理的顶芽、叶、韧皮部、茎和根等组织的总 RNA, 并反转录合成 cDNA。根据 *PeBADH1* 和 *PeBADH2* 的基因序列分别设计特异性引物 *PeBADH1-SP1/SP2* 和 *PeBADH2-SP1/SP2* (表 1)。在 PCR 反应中以含有目的基因的 pGEM-T 载体作为阳性对照, 以不加任何 cDNA 模板的 PCR

反应液作为阴性对照, 并以胡杨 *Actin* 基因作为内标。PCR 反应程序是: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 26 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 为了进一步验证所扩增到的是否为目的基因, 对 PCR 产物进行测序。

1.5 胡杨 *BADH* 蛋白表达载体的构建、融合蛋白的表达与纯化

根据 *PeBADH1* 和 *PeBADH2* 的 cDNA 序列设计表达引物 *PeBADH1-EX1/EX2* 和 *PeBADH2-EX1/EX2* (表 1)。通过定向克隆技术将 *PeBADH1* 和 *PeBADH2* 基因的编码序列亚克隆到带 6×His 标签的 pET30a 表达载体中, 转化大肠杆菌 Tuner 感受态细胞中。将测序验证正确的重组表达菌于含卡那霉素的 LB 培养基中培养过夜, 以 1:100 稀释后扩大培养至 A₆₀₀ 为 0.5~0.6, 加入 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L, 37 °C 诱导 4 h。诱导表达后的菌液于 4 °C、6 500×g 离心 10 min 收获菌体, 用缓冲液 A (20 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Na₃PO₄, pH 7.5) 重悬, 冰上超声破碎裂解。然后 4 °C、10 000×g 离心 30 min, 取少量原菌液、超声破碎离心后的上清液和沉淀, 经 SDS-PAGE 检测是否具有目的蛋白, SDS-PAGE 检测采用 10% 的分离胶, 5% 的浓缩胶。蛋白质纯化用 Ni 亲和柱 (Amersham pharmacia biotech)。首先用缓冲液 A 平衡 Ni 亲和柱, 将超声破碎后离心上清液上样, 然后以缓冲液 A 平衡, 最后用缓冲液 B (0.5 mol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Na₃PO₄, pH 7.5) 洗脱目的蛋白, 收集目的蛋白洗脱峰进行下一步酶学活性分析。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

| Gene | Primer names | Sequence (5'-3') |
|----------------|--------------|------------------------------|
| <i>PeBADH1</i> | PtBADH1-CL1 | GCATCATATTCAACCAACTCAC |
| | PtBADH1-CL2 | CTGCTGTTCCGCATTTTC |
| | PeBADH1-SP1 | AGATTGGTCCTCCGCATCA |
| | PeBADH1-SP2 | CAACCTTGTCAACATGGGGATGA |
| | PeBADH1-EX1 | AGATATCATGGCGATCCATCTACCTAAT |
| | PeBADH1-EX2 | TAAGCTTTTATAGCTTTGAGGGAGGCT |
| <i>PeBADH2</i> | PtBADH2-CL1 | GTATCGCACGGTGAATCTGT |
| | PtBADH2-CL2 | TCCATCATTTTGCTACGACTG |
| | PeBADH2-SP1 | GCTCCTGCCCTAGCTGCT |
| | PeBADH2-SP2 | ATACTGCCCTCCACTAACAACC |
| | PeBADH2-EX1 | AGATATCATGGCGATCCATCTACCAAT |
| | PeBADH2-EX2 | TAAGCTTTTATAGCTTGGCGGGAGAC |

1.6 胡杨 BADH 蛋白的酶学活性和热力学稳定性测定

植物 *BADH* 基因是植物醛脱氢酶 (ALDH) 超家族的一个亚类型,本实验对 ALDH 常见底物乙醛的活性测定参照 Black 的方法进行测定^[13]。以乙醛为底物,室温下 50 mmol/L Tris (pH 8.5)、1 mmol/L NAD⁺、100 mmol/L KCl、2 % TritonX-100 为反应缓冲液,将纯化得到的 BADH 蛋白酶分别在 25 ℃ 到 75 ℃ 之间每 5 ℃ 设定一个温度梯度下保温 10 min,在保温结束后检测酶对底物乙醛的催化活性。

1.7 胡杨 BADH 蛋白结构模拟

选取豌豆 AMADH 蛋白 (PDB:3iwj) 的 X 衍射晶体结构为模板,以 Align 2D 程序 (InsightII 的 Homology 模块) 进行序列比对,运用 InsightII 的 Modeler 模块构建蛋白质三维结构,产生 10 个结构,每个结构产生 10 个不同的环区结构,

优化水平为高等,以 Profiles-3D 对各结构进行评价,选取最优结构。

2 结果与分析

2.1 胡杨 *BADH* 基因的序列与系统发育关系分析

使用 RT-PCR 方法,以胡杨顶芽 cDNA 为模板,克隆获得 *PeBADH1* 和 *PeBADH2* 的 cDNA 序列 (GenBank Accession No. JN816361 和 JN816362)。*PeBADH1* 的 cDNA 编码 503 个氨基酸的蛋白,预测分子量为 54.93 kDa。*PeBADH2* 的 cDNA 编码 503 个氨基酸的蛋白,预测分子量为 54.90 kDa。*PeBADH1* 蛋白序列与毛果杨 PtBADH1 的蛋白序列仅有 4 个氨基酸差异,而 *PeBADH2* 蛋白序列与毛果杨 PtBADH2 的蛋白序列有 9 个氨基酸差异 (图 1)。

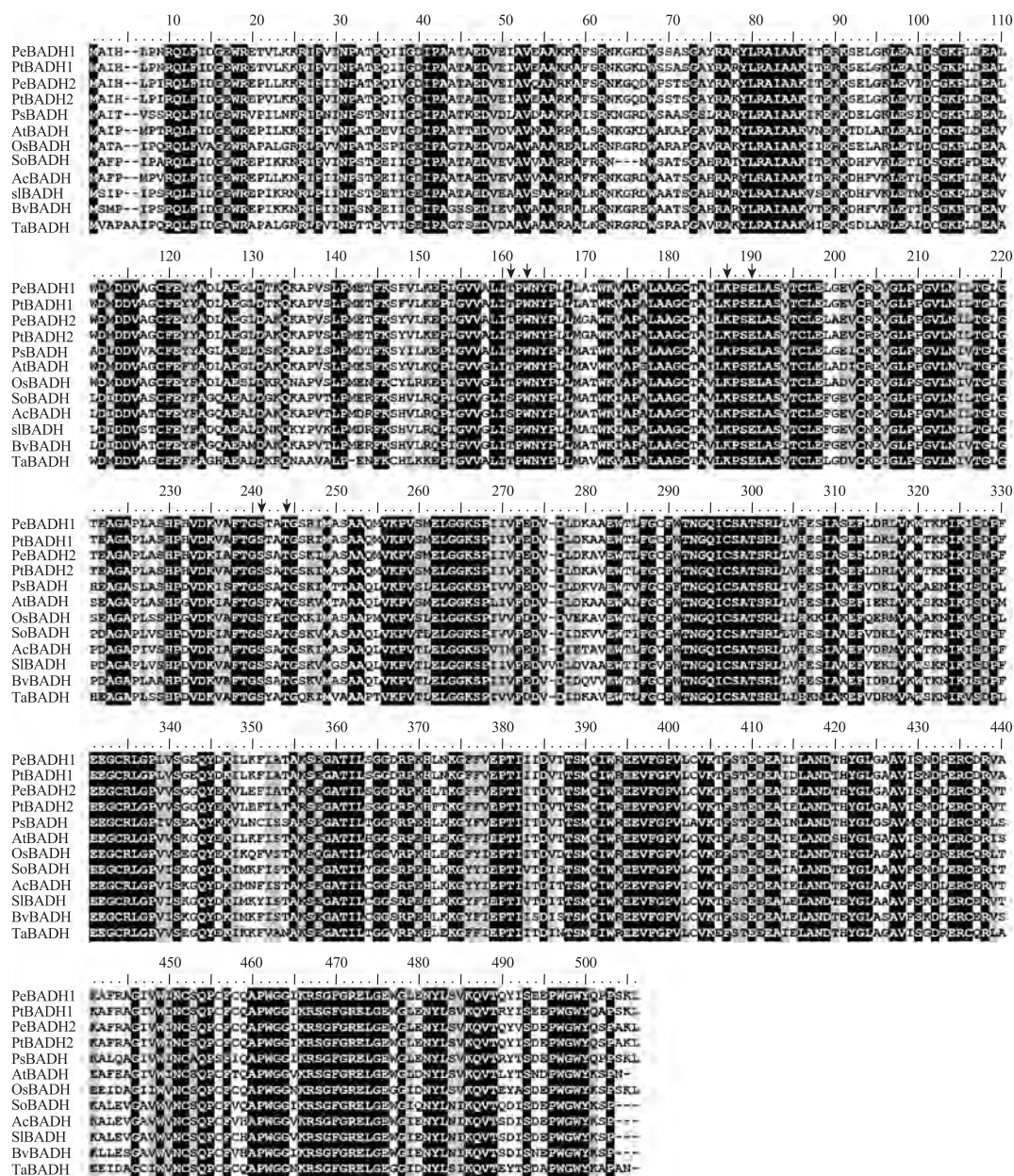


图1 植物BADH蛋白的序列比对分析

Fig. 1 Sequence alignments of plant BADH proteins. Conserved residues in all plant BADH proteins are marked in black. The NAD^+ -binding sites of plant BADH proteins are marked with black arrows. This sequence alignment was created using the following sequences: *PeBADH1* (GenBank Accession No. JN816361), *PeBADH2* (GenBank Accession No. JN816362), *PtBADH1* (GenBank Accession No. XM_002318594), *PtBADH2* (GenBank Accession No. XM_002322111), *PsBADH* (GenBank Accession No. CAC48392), *AtBADH* (GenBank Accession No. AAM13070), *OsBADH* (GenBank Accession No. BAC76608), *SoBADH* (GenBank Accession No. P17202), *AcBADH* (GenBank Accession No. AAM19157), *SIBADH* (GenBank Accession No. AAL33906), *BvBADH* (GenBank Accession No. P28237), *TaBADH* (GenBank Accession No. AAL05264).

为了研究胡杨 *BADH* 基因与其他植物 *BADH* 基因的序列相似性,我们选取多个代表不同进化历史的植物 *BADH* 基因为研究对象,包括双子叶植物拟南芥 *Arabidopsis thaliana*、菠菜 *Spinacia oleracea*、甜菜 *Beta vulgaris*、碱蓬 *Suaeda liaotungensis*、滨藜 *atriplex centralasiatica*、豌豆 *Pisum sativum*, 单子叶植物水稻 *Oryza sativa*、小麦 *Triticum aestivum* 等植物。序列比对分析发现所有 *BADH* 蛋白高度保守 (图 1), 其序列相似性范围是 70%~92%, 其中 *PeBADH1* 和 *PeBADH2* 蛋白的序列相似性最高为 92%, 而小麦 *BADH* 蛋白与豌豆 *BADH* 蛋白的序列相似性最低为 70%。

BADH 基因被证明是 *ALDH* 基因超家族的成员^[7], 植物 *ALDH* 基因超家族的其他亚家族类型, 包括 *ALDH2*、*ALDH3*、*ALDH7* 和 *GAPDH* 亚家族的蛋白序列也加入到系统发育分析中。系统发育树显示 *PeBADH1* 和 *PeBADH2* 与所有 *BADH* 聚成一枝, 支持率达到 100% (图 2), 这支持本研究克隆的 2 个基因为 *BADH* 基因。

2.2 胡杨 *BADH* 蛋白三维结构建模

图 3A 和图 3B 展示了模拟的 2 个胡杨 *BADH* 蛋白的三维结构。优化后的构象用 Profile-3D 进行氨基酸残基的兼容性考察, Profile-3D 分析结果如图 3C 所示, 从图中可以看到绝大部分氨基酸残基得分都是正值, 位于合理的范围。结构比较发现 *PeBADH1* 与 *PeBADH2* 的结构高度保守 (图 3D)。胡杨 *PeBADH1* 与 *PeBADH2* 蛋白都具有 3 个结构域: 辅酶 NAD^+ 结合结构域 (NAD-binding domain), 催化结构域 (Catalytic domain) 和寡聚反应结构域 (Oligomerization

domain) (图 3A 和 3B)。其中第 1~132 与 151~230 位氨基酸是辅酶 NAD^+ 结合结构域, 这个结构域特异结合辅酶尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸; 第 231~480 位氨基酸是催化结构域, 这个结构域能特异结合不同的反应底物; 而第 481~490 与 133~150 位氨基酸是寡聚反应结构域, 由 2 个长 β 折叠和 1 个短 β 折叠组成的。

2.3 胡杨 *BADH* 基因的组织表达模式

通过 RT-PCR 研究胡杨 *BADH* 基因在正常生长、盐胁迫、氧化胁迫下不同组织 (根、茎、叶、顶芽和韧皮部) 中的表达分布 (图 4)。RT-PCR 扩增后对 PCR 产物进行测序, 结果显示在正常生长、盐和 H_2O_2 胁迫下, *PeBADH1* 和 *PeBADH2* 基因在韧皮部中不表达。在正常生长情况下, *PeBADH1* 和 *PeBADH2* 基因在茎、叶、顶芽中都表达; 不同之处在于 *PeBADH2* 基因的表达丰度比 *PeBADH1* 高, 同时 *PeBADH2* 基因在根中表达较弱, 而 *PeBADH1* 基因在根中未检测到表达。盐胁迫明显地诱导根中 *PeBADH1* 基因的表达, 而抑制了 *PeBADH1* 和 *PeBADH2* 基因在其他组织中的表达。 H_2O_2 胁迫抑制了 *PeBADH1* 和 *PeBADH2* 基因在茎和顶芽中的表达。这些结果显示 *PeBADH1* 与 *PeBADH2* 存在表达模式的分化。

2.4 胡杨 *BADH* 蛋白表达、纯化及酶活性分析

将构建的表达载体 pET30a/*PeBADH1* 和 pET30a/*PeBADH2* 分别转化到大肠杆菌 Tuner 感受态细胞中, 经 IPTG 诱导后发现 *PeBADH1* 和 *PeBADH2* 在大肠杆菌 Tuner 中高效表达 (图 5)。通过镍柱亲和层析纯化后, 获得纯化的重组蛋

白, SDS-PAGE 结果显示蛋白分子量与预测的 PeBADH1 和 PeBADH2 蛋白分子量大小一致。

BADH 是植物 ALDH 超基因家族成员, 由于植物 ALDH 对底物多种脂肪醛和芳香醛具有广泛活性, 特别是大部分 ALDH 对乙醛具有很高的活性, 因此我们分别测定了 PeBADH1 和

PeBADH2 对乙醛的活性, 对乙醛的催化活性的测定参照 Black^[13] 的方法, PeBADH1 和 PeBADH2 的酶活性分别为 0.073 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 和 0.107 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$, PeBADH2 的酶活性是 PeBADH1 的 1.5 倍, 这说明胡杨 BADH 蛋白具有醛脱氢酶活性。

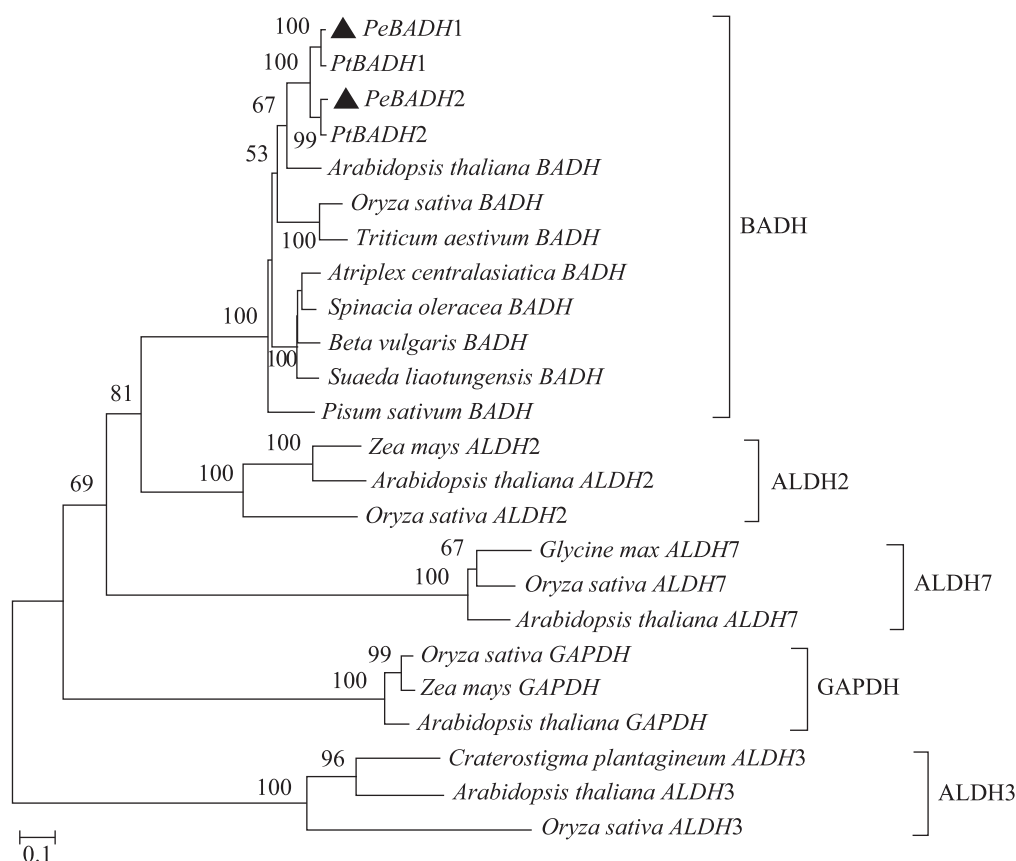


图 2 植物 BADH 基因的系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic tree showing relationships between *PeBADH* and other classes of plant *ALDH*. The affiliations of the plant *BADH* sequences used in the tree reconstruction are specified in the legend of Fig. 1. The affiliations of the other plant *ALDH* sequences are the following: *Oryza sativa* *ALDH3* (GenBank Accession No. AAD35089), *Arabidopsis thaliana* *ALDH3* (GenBank Accession No. AAL59944), *Craterostigma plantagineum* *ALDH3* (GenBank Accession No. CAC84900), *Zea mays* *GAPDH* (GenBank Accession No. Q43272), *Oryza sativa* *GAPDH* (GenBank Accession No. AAM00227), *Arabidopsis thaliana* *GAPDH* (GenBank Accession No. AAK59790), *Arabidopsis thaliana* *ALDH7* (GenBank Accession No. AAK55676), *Oryza sativa* *ALDH7* (GenBank Accession No. AAG43027), *Glycine max* *ALDH7* (GenBank Accession No. AAP02957), *Oryza sativa* *ALDH2* (GenBank Accession No. BAA96794), *Arabidopsis thaliana* *ALDH2* (GenBank Accession No. AAM27003), *Zea mays* *ALDH2* (GenBank Accession No. AAK58370).

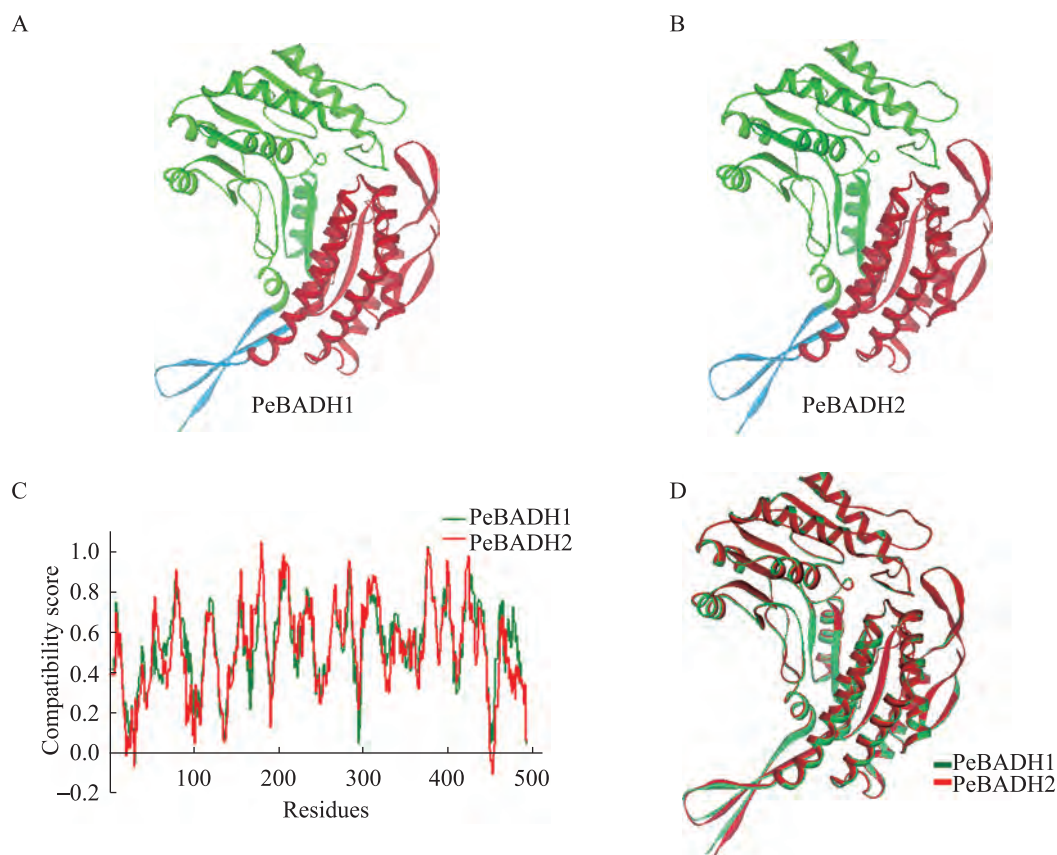


图3 胡杨 *PeBADH1* 和 *PeBADH2* 蛋白三维结构模拟

Fig. 3 Structure modelling of *PeBADH1* and *PeBADH2* proteins. (A,B) Structures of *PeBADH1* and *PeBADH2*. (C) Evaluation of the structure of *PeBADH1* and *PeBADH2* by Profile-3D program. (D) Structural comparison of *PeBADH1* (green) and *PeBADH2* (red).

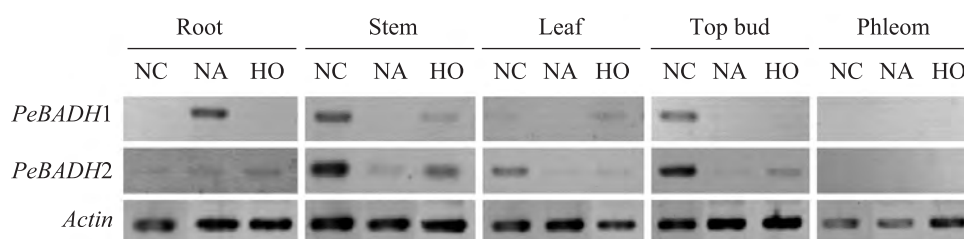


图4 胡杨 *PeBADH1* 和 *PeBADH2* 基因的表达模式

Fig. 4 Expression of the *PeBADH1* and *PeBADH2* genes in various tissues of *P. euphratica*. NC, NA and HO indicate the tissue under normal growth conditions and following NaCl and H₂O₂ treatments, respectively.

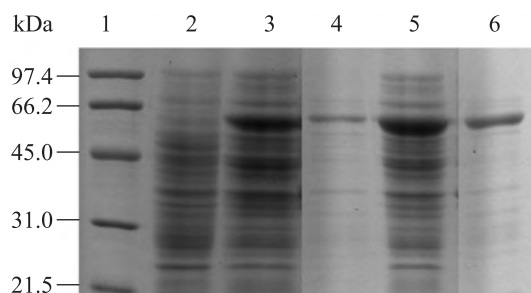


图5 胡杨 PeBADH1 和 PeBADH2 蛋白的表达与纯化

Fig. 5 Overexpression and purification of BADH proteins from *P. euphratica*. 1: molecular mass markers; 2: total cellular extract from *E. coli*; 3, 5: total cellular extracts from induced bacteria containing PeBADH1 and PeBADH2, respectively; 4, 6: the purified PeBADH1 and PeBADH2, respectively.

2.5 胡杨 BADH 蛋白的热力学稳定性分析

PeBADH1 和 PeBADH2 蛋白热力学稳定性结果如图 6 所示。结果显示 PeBADH1 和 PeBADH2 蛋白的热力学稳定性具有较大差异。PeBADH1 在 40 °C 时还保持着最高活性的 85%，而 PeBADH2 仅保持着最高活性的 25%。在 50 °C 时，PeBADH1 保持着最高活性的 60%，而

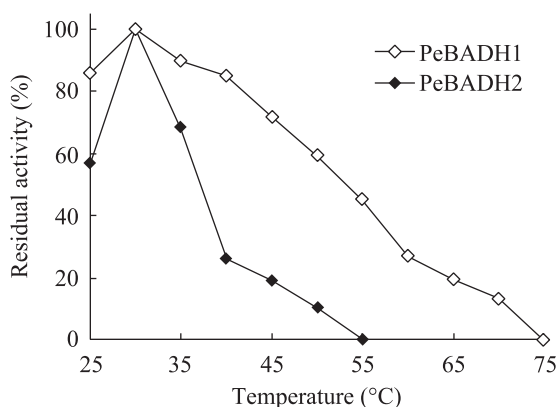


图6 PeBADH1 和 PeBADH2 蛋白的热力学稳定性

Fig. 6 Thermal stability of recombinant PeBADH1 and PeBADH2.

PeBADH2 仅保持着最高活性的 10%。这说明 PeBADH1 是一个热力学稳定性较高的酶，在 50 °C 以下都是稳定的，而相对于 PeBADH1，PeBADH2 是一个热力学稳定性较低的酶。

3 讨论

植物在干旱、盐碱等逆境条件下可积累大量的甜菜碱^[14]，而甜菜碱的积累对改善渗透调节、保护细胞膜具有重要作用。植物体内甜菜碱的合成途径相对简单，主要包含两步氧化反应完成，甜菜碱一旦被合成后就不能被进一步代谢，积累在细胞中作为永久性或半永久性渗透调节剂^[14]。因此，甜菜碱合成途径中的限速酶基因 *BADH* 被认为是最有希望的胁迫抗性基因之一，*BADH* 的分子生物学与生物化学研究引起广泛的关注。在本研究中，我们从胡杨中克隆到 2 个 *BADH* 基因，对该基因的基因结构、表达模式、所编码蛋白的结构与生化功能进行了比较详细的研究。

在水稻、大麦和甜菜中，Northern blotting 分析发现 *BADH* 在正常生长和盐胁迫条件下均表达，但在盐胁迫条件下表达量升高，进一步研究发现这些基因能够提高植物细胞的渗透调节能力，降低因渗透失水造成对细胞膜、酶及蛋白质结构与功能的伤害^[8-9,15]。在本研究中，在正常生长条件下的根中没有检测到胡杨 *PeBADH1* 基因的表达，但当受到盐胁迫时表达，这说明 *PeBADH1* 基因表达的积累与盐胁迫存在紧密关联，这个基因可能在胡杨细胞免受盐胁迫压力的损害中发挥重要作用。而 *PeBADH2* 基因在正常生长条件和盐胁迫下的根中微弱表达，说明 *PeBADH2* 可能在胡杨抗盐反应中没有发挥至关

重要的作用, 由于 *PeBADH2* 基因在正常生长条件下, 在根、茎、叶和顶芽中均表达, 说明这个基因在植物的生长发育中可能发挥着重要作用。

BADH 蛋白一般都具有辅酶 NAD^+ 结合结构域^[16], 结构模拟发现 *PeBADH1* 和 *PeBADH2* 蛋白中有 6 个氨基酸残基能与 NAD^+ 形成氢键 (图 7), 说明这 6 个氨基酸是和辅酶 NAD^+ 结合的关键活性位点氨基酸。在这 6 个氨基酸中, 除了第 159 位的 Thr 和 Trp 外, 其他 5 个氨基酸在其他物种的 BADH 蛋白中高度保守, 而第 159 位的

Thr 在菠菜、滨藜和碱蓬 BADH 蛋白中被 Ser 替代 (图 1)。*PeBADH1* 和 *PeBADH2* 蛋白的第 231~480 位氨基酸是催化结构域 (图 3), 这个结构域能特异结合不同的反应底物, 菠菜 BADH 蛋白的晶体结构显示在催化结构域有 1 个 Cys 残基是结合底物的关键活性位点氨基酸^[16], 序列比较分析显示这个氨基酸是 *PeBADH1* 和 *PeBADH2* 蛋白的第 294 位 Cys 残基, 这个氨基酸在所有的 BADH 蛋白中绝对保守 (图 1 中的第 297 位氨基酸位点)。

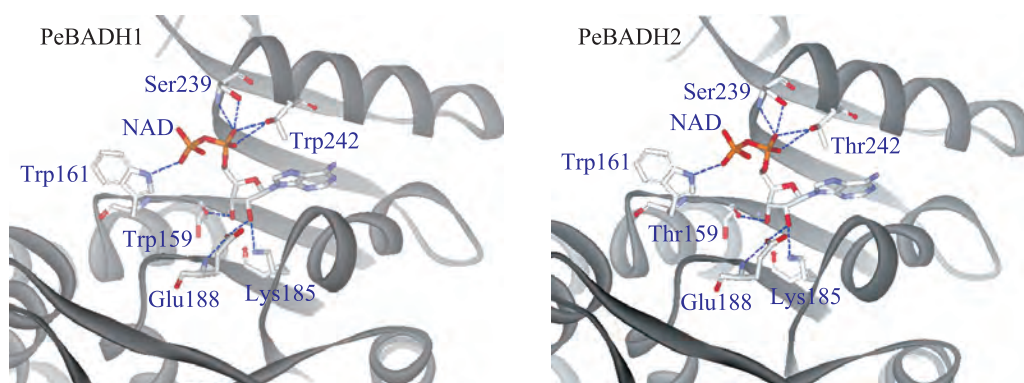


图 7 *PeBADH1* 和 *PeBADH2* 蛋白的辅酶 NAD^+ 结合位点分析

Fig. 7 The NAD^+ -binding sites of *PeBADH1* and *PeBADH2* proteins. Blue dashed lines represent hydrogen bond interaction.

PeBADH1 和 *PeBADH2* 蛋白的序列相似性高达 92%, 虽然蛋白序列相似性很高, 两蛋白的酶学活性却有较大差异, *PeBADH2* 的酶活性是 *PeBADH1* 的 1.5 倍, 而热力学稳定性分析发现 *PeBADH2* 的热力学稳定性低于 *PeBADH1*, 这说明两蛋白的生化性质有较大的差异。另外, 基因的表达模式结果也显示 *PeBADH1* 与 *PeBADH2* 表达模式上有较大的变异。因此, 本研究结果预示着胡杨 *PeBADH1* 与 *PeBADH2* 基因可能存在功能上的分化。

REFERENCES

- [1] Rhodes D, Hanson AD. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1993, 44: 357-384.
- [2] Hanson AD, Rhodes DC. ^{14}C Tracer evidence for synthesis of choline and betaine via phosphoryl base intermediates in salinized sugarbeet leaves. *Plant Physiol*, 1983, 71(3): 692-700.
- [3] Rathinasabapathi B, McCue KF, Gage DA, et al. Metabolic engineering of glycine betaine synthesis:

- plant betaine aldehyde dehydrogenases lacking typical transit peptides are targeted to tobacco chloroplasts where they confer betaine aldehyde resistance. *Planta*, 1994, 193(2): 155–162.
- [4] Kumar S, Dhingra A, Daniell H. Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiol*, 2004, 136(1): 2843–2854.
- [5] Kishitani S, Takanami T, Suzuki M, et al. Compatibility of glycinebetaine in rice plants: evaluation using transgenic rice plants with a gene for peroxisomal betaine aldehyde dehydrogenase from barley. *Plant Cell Environ*, 2000, 23(1): 107–114.
- [6] Luo XL, Xiao JL, Wang ZA, et al. Overexpression of *Spinacia oleracea* betaine aldehyde dehydrogenase (*SoBADH*) gene confers the salt and cold tolerant in *Gossypium hirsutum* L.. *Chin J Biotech*, 2008, 24(8): 1464–1469.
罗晓丽, 肖娟丽, 王志安, 等. 菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因在棉花中的过量表达和抗冻耐逆性分析. *生物工程学报*, 2008, 24(8): 1464–1469.
- [7] Kirch HH, Bartels D, Wei YL, et al. The ALDH gene superfamily of *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*, 2004, 9(8): 371–377.
- [8] Nakamura T, Yokota S, Muramoto Y, et al. Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. *Plant J*, 1997, 11(5): 1115–1120.
- [9] McCue KF, Hanson AD. Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. *Plant Mol Biol*, 1992, 18(1): 1–11.
- [10] Weretilnyk EA, Hanson AD. Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves: purification, *in vitro* translation of the mRNA, and regulation by salinity. *Arch Biochem Biophys*, 1989, 271(1): 56–63.
- [11] Zeng F, Yan H, Arndt SK. Leaf and whole tree adaptations to mild salinity in field grown *Populus euphratica*. *Tree Physiol*, 2009, 29(10): 1237–1246.
- [12] Chen SL, Li JK, Bi WF, et al. Genotypic variation in accumulation of salt ions, betaine and sugars in Poplar under conditions of salt stress. *Chin Bull Bot*, 2001, 18(5): 587–596.
陈少良, 李金克, 毕望富, 等. 盐胁迫条件下杨树盐分与甜菜碱及糖类物质变化. *植物学通报*, 2000, 18(5): 587–596.
- [13] Black S. Yeast aldehyde dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys*, 1951, 34(1): 86–97.
- [14] Hanson AD, May AM, Grumet R, et al. Betaine synthesis in chenopods: localization in chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(11): 3678–3682.
- [15] Ishitani M, Nakamura T, Han SY, Takabe T. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol*, 1995, 27(2): 307–315.
- [16] Johansson K, El-Ahmad M, Ramaswamy S, et al. Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Sci*, 1998, 7(10): 2106–2117.