

研究论文

Research Article

百脉根乙醇脱氢酶基因 *LjADH1* 的克隆、表达及酶特性分析

曾拓^{1,2,3}, 柳参奎², 罗汝叶^{1,3}, 巩鹏涛^{2,3}, 赵德刚¹, 方宣钧^{1,2,3}

1. 贵州大学生命科学院, 贵州省农业生物工程重点实验室, 贵阳, 550025
2. 东北林业大学盐碱地生物资源环境研究中心, 哈尔滨, 150040
3. 海南省农作物分子育种重点实验室, 海南省热带农业资源开发利用研究所, 三亚, 572025

✉ 通讯作者: xuanjunfang@hitar.org; 作者

豆科基因组学与遗传学, 2011年, 第2卷, 第5篇 DOI: 10.5376/lgg.cn.2011.02.0005

收稿日期: 2011年04月28日

接受日期: 2011年06月09日

发表日期: 2011年06月28日

本文首次以英文发表在 *Legume Genomics and Genetics* 上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 对其进行授权, 用中文再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。如果读者对中文含义理解有歧义, 请以英文原文为准。

建议的引用格式如下:

Zeng et al., 2011, Cloning and Expression of An Alcohol Dehydrogenase from *Lotus japonicus* and Characterization of *LjADH1*, *Legume Genomics and Genetics*(online), Vol.2 No.2 pp.6-13 (DOI: 10.5376/lgg.2011.02.0002)

摘要 乙醇脱氢酶(Alcohol Dehydrogenase ADH)是一种广泛分布在生物体中的酶, 通常以 NAD^+ 和 $NADP^+$ 为辅酶, 乙醇脱氢酶在植物的生长、发育和抗逆性中都发挥着重要的作用。本研究用原产于日本宫古岛的二倍体百脉根(*Lotus japonicus*) MG20 为材料, 借助 *ADH* 基因的保守性在百脉根 cDNA 中克隆同源基因, 并对基因进行表达与酶特性分析。该基因全长为 1 143 bp, 编码了 380 个氨基酸。同源比对结果表明, 该序列编码蛋白的氨基酸序列和 ADH 类蛋白具有较高同源性, 推测属于锌结合乙醇脱氢酶家族蛋白, 我们将其命名为 *LjADH1*。将该基因连接到原核表达载体 pQE30 和真核表达载体 pYES2, 构建成 pQE30-*LjADH1* 和 pYES2-*LjADH1*, 并且分别转入大肠杆菌 M15 和酵母 *INVSc1* 中。通过对诱导条件的优化, 在大肠杆菌中表达了具有乙醇脱氢酶活性的 His 融合重组蛋白, 表达量为 1.12 mg/mL, 酶活性 48.2 U/mg。通过在原核和真核的抗逆性研究, 我们发现该基因 *LjADH1* 融合蛋白的过量表达提高了原核重组菌株对过氧化氢的抗性。在 $CuCl_2$ 、 $CdCl_2$ 及 H_2O_2 的胁迫下, pYES2-*LjADH1* 重组酵母长势明显好于 pYES2 酵母菌, 而对 $NiCl_2$ 胁迫反应不明显。我们的研究初步说明 *LjADH1* 在是一个锌结合乙醇脱氢酶家族蛋白具有一定的抗非生物胁迫的能力。

关键词 百脉根; 乙醇脱氢酶; *LjADH1* (GenBank Accession No.: JN165714); 原核表达; 酵母表达; 非生物胁迫

Cloning and Expression of An Alcohol Dehydrogenase from *Lotus japonicus* and Characterization of *LjADH1*

Tuo Zeng^{1,2,3}, Shenkui Liu², Ruye Luo^{1,3}, Pengtao Gong^{2,3}, Degang Zhao¹, Xuanjun Fang^{1,2,3}

1. Guizhou Key Lab of Agro-Bioengineering, College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang, 550025
2. Alkali Soil Natural Environmental Science Center (ASNEC), Northeast Forestry University, Harbin, 150040
3. Hainan Key Lab of Crop Molecular Breeding, Hainan Institute of Tropical Agricultural Resources (HITAR), Sanya, 572025

✉ Corresponding author, xuanjunfang@hitar.org; 作者

This paper was first published in *Legume Genomics and Genetics*, which redistributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Abstract Alcohol dehydrogenase (ADH), usually using NAD^+ and $NADP^+$ as coenzymes, widely exists in living organisms, It plays extremely important roles in growth, development and stress resistance in plants. In this research, we used diploid *Lotus japonicus* MG20 (originated from Miyako Island of Japan) as plant material to identify the characteristics of alcohol dehydrogenase gene. Based on the conservative sequences of *ADH*, The *ADH* homologous gene was cloned from *Lotus japonicus* MG20 cDNA, whose full length gene was 1 143 bp in length encoding 380 amino acids. Homologous analysis showed that the amino acid sequence of the cloned gene was highly homologous with plant zinc-binding ADH family proteins. We have this gene named as *LjADH1* and ligated the gene into the prokaryotic vector pQE30 and yeast expression vector pYES2 to make the recombinant vectors of pQE30-*LjADH1* and pYES2-*LjADH1*, respectively and then were transformed into *E.coli* M15 and yeast *INVSc1*. Under the optimum conditions of expression, the His-tag fusion proteins were highly expressed with 1.12 mg/mL in *E. coli* and 48.2 U/mg ADH activity examined by the method of Vallee and Hoch. We found that *LjADH1* over expressed in prokaryotic cells can increase

the recombinant strains' tolerance to H₂O₂ stress, while *LjADH1* expressed in recombinant yeast can promote growth of the recombinant yeast under the stress of H₂O₂ and some heavy metal salts such as CuCl₂ and CdCl₂ except for NiCl₂. In this research we have preliminary clues that *LjADH1* is a member of zinc-binding ADH family proteins in plant and that has some functions for resistance to abiotic stresses.

Keywords *Lotus japonicus*; Alcohol dehydrogenase; *LjADH1* (GenBank Accession No.: JN165714); Prokaryotic expression; Yeast expression; Abiotic stress

研究背景

乙醇脱氢酶 (Alcohol dehydrogenase, ADH, EC-1.1.1.1) 是一种底物广泛性酶, 能够以 NAD⁺ 为辅酶, 催化伯醇和醛之间的可逆反应。在辅酶存在的条件下, 它催化包括乙醇在内的某些一级或二级醇、醛和酮的脱氢反应, 脱下的氢由 NAD⁺ 接受, 使之成为还原型辅酶 I。

ADH 广泛分布于各类植物及器官中, 其作用包括参与果实的发育、成熟和衰老 (Chervin, 1999), 在植物抗逆性中也具有一定作用。能被脱水寒冷诱导表达 (Dolferus et al., 1994)、缺氧诱导表达 (Newman and Vantoai, 1992) 以及与 Ca²⁺ 信号转导相关 (Chung and Ferl, 1999)。很多植物中 ADH 的长度大都为 370~380 个氨基酸, 螺旋、折叠和卷曲 3 种折叠结构分布较为均匀。各个物种之间其二级结构差异不大, 尤其是在保守功能域部分, 即使有个别氨基酸的不同, 但是肽链的折叠状态的差异性仍然很小, 这预示着高度保守的二级结构与功能的稳定有着紧密的联系。同时各物种间高度保守的序列表明乙醇脱氢酶在植物生长中发挥着重要作用, 以至于任何一点突变都会招致植株的死亡。

对 ADH 基因的研究最初是在玉米 (*Zea mays*) 中开始的, 研究人员先后从玉米中克隆了两个 ADH 同工酶基因 *ZmADH1* 和 *ZmADH2* (Gerlach et al., 1982), 两个 ADH 基因在核苷酸上有 82% 的相似性, 氨基酸序列有 87% 的相似性, 两者的近似关系表明它们可能由同一祖先进化而来, 但是定位于不同的染色体上, *ZmADH1* 被定位于第 1 染色体, *ZmADH2* 被定位于第 4 号染色体。迄今为止, 葡萄 (*Vitis vinifera*)、马铃薯 (*Solanum tuberosum*)、水稻 (*Oryza sativa*) 和小麦 (*Triticum monococcum*) 中已经有关于 ADH1 和 ADH2 基因的报道。在拟南芥中, *AtADH1* 基因被定位于第 1 染色体的 28 980 288~28 982 311 位置, 但迄今尚未见 *AtADH2* 基因的相关注释和报道。在百脉根中, 已经从四倍体的百脉根 (*Lotus*

corniculatus) 中鉴定了 *LcADH1* (GenBank ID: AA-O72531.1), 但尚未有关于在二倍体的百脉根中鉴定出 *LjADH1* 或 *LjADH2* 基因的报道。

百脉根属于豆科 (Leguminosae) 蝶形花亚科 (*Papilionoideae*) 百脉根属 (*Lotus*), 生活周期大约为 2~3 个月。由于四倍体百脉根 (*Lotus corniculatus*) 基因组较大, 因此一般研究都采用二倍体百脉根 (*Lotus japonicus*) 作为研究对象 (Handberg, 1992)。二倍体的百脉根细胞的染色体数目多为 2n=12, 基因组总长度约为 470 Mb。随着百脉根全基因组测序的完成, 从上世纪 90 年代初开始, 其已经成为豆科植物遗传学与基因组学研究的模式植物。本研究用原产于日本宫古岛的百脉根 MG20 种系为材料 (Kawaguchi, 2000), 借助 ADH 基因的保守性, 在百脉根 cDNA 中克隆同源基因, 并对基因进行表达与酶特性进行分析。

1 结果与分析

1.1 *LjADH1* 的克隆及序列分析

本研究根据 *LcADH1* 序列信息设计引物, 以百脉根 MG20 cDNA 为模版, 从百脉根中克隆到一个长度为 1 143 bp 的同源序列, 编码 380 个氨基酸。序列相似性分析发现其与百脉根基因组中一个序列的同源性达 99% (GenBank ID: CAG30579.1), 我们推测该序列可能为百脉根 ADH1 基因, 并将其命名为 *LjADH1* (GenBank Accession No.: JN165714)。

LjADH1 蛋白序列与玉米 (*Zea mays*)、一粒小麦 (*Triticum monococcum*)、水稻 (*Oryza sativa*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、百脉根 (*Lotus corniculatus*)、拟山羊草 (*Aegilops speltoides*)、葡萄 (*Vitis vinifera*)、马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 和高山芒 (*Miscanthus transmorrisonensis*) 的 ADH 蛋白序列进行多重序列比对 (图 1)。结果表明, 本研究从 MG20 克隆到的 ADH 蛋白序列与上述已知物种的 ADH 序列间具有非常高的同源性, 除了与 MtADH 的同源性为 80%

外, 与其它序列的同源性均在95%以上。这和石之光对*ADH*家族的研究一致, 植物的*ADH*蛋白都具有保守的锌结合位点、*ADH_N*以及*NADB_Rossmann*

保守结构域(石之光等, 2009)。系统进化分析表明百脉根*LjADH1*与拟南芥的*ADH*基因归属同一进化分支(图2)。

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|---|-----|----------|---------------------|----------------|------------|------------|------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| LcADH1 | 1 | MSS | TAGQV | IKCRAAV | SWEAGKPLVI | EEVEV | APPQAGEVRL | KILY | TSL | CHT | DVYFWEAK | QGTPL | PF | PRIF | FGHEAGGIV | ESVGG | GV | TL | HK | GDH | L | PVF | |
| OsADH1 | 1 | . | MATAGKVI | KCKAAVAWEAAKPLVI | EEVEV | XXXXXXXXXX | KILFTSL | CHT | DVYFWEAK | QGTPL | PF | PRIF | FGHEAGGIV | ESVGG | GV | TL | DL | LA | FDH | L | PVF | | |
| LjADH1 | 1 | MST | TAGQV | IKCRAAV | SWEAGKPLVI | EEVEV | APPQAGEVRL | KILY | TSL | CHT | DVYFWEAK | QGTPL | PF | PRIF | FGHEAGGIV | ESVGG | GV | TL | HK | GDH | L | PVF | |
| OsADH2 | 1 | . | MATG | KVIKCKAAVAWEAGEALS | IEEVEV | APPQMEVVR | KILY | TAL | CHT | DVYFWEAK | QGTPL | PF | PRIL | FGHEAGGIV | ESVGG | GV | TL | EL | AG | GDH | L | PVF | |
| TmADH2 | 1 | . | MATAGKVI | KCKAAVAWEAGKPLSI | EEVEV | APPQAMEVVR | KILY | TAL | CHT | DVYFWEAK | QGTPL | PF | PRIL | FGHEAGGIV | ESVGG | GV | TL | EL | VA | GDH | L | PVF | |
| AsADH2 | 1 | . | MATAGKVI | KCKAAVAWEAGKPLSI | EEVEV | APPQAMEVVR | KILY | TAL | CHT | DVYFWEAK | QGTPL | PF | PRIL | FGHEAGGIV | ESVGG | GV | TL | EL | VA | GDH | L | PVF | |
| ZmADH2 | 1 | . | MATAGKVI | KCKAAV | TWEAGKPLSI | EEVEV | APPQAMEVVR | KILY | TAL | CHT | DVYFWEAK | QGTPL | PF | PRIL | FGHEAGGIV | ESVGG | GV | TL | EL | VA | GDH | L | PVF |
| AtADH1 | 1 | MST | TG | QIIRCKAAVAWEAGKPLVI | EEVEV | APPQKHEVR | KILFTSL | CHT | DVYFWEAK | QGTPL | PF | PRIF | FGHEAGGIV | ESVGG | GV | TL | DL | QF | GDH | L | PVF | | |
| StADH1 | 1 | MST | TGQV | IRCKAAVAWEAGKPLVME | EVDVAPPQKMEVRL | KILY | TSL | CHT | DVYFWEAK | QNPVF | PRIL | FGHEAAGI | ESVGG | GV | TL | EL | FG | GDH | L | PVF | | | |
| StADH2 | 1 | MST | TGQV | IRCKAAVAWEAGKPLVME | EVDVAPPQKMEVRL | KILY | TSL | CHT | DVYFWEAK | QNPVF | PRIL | FGHEAAGI | ESVGG | GV | TL | EL | FG | GDH | L | PVF | | | |
| VvADH1 | 1 | MSG | TAGQV | ICCKAAVAWEAGKPLVI | EEVEV | APPQAMEVRL | KILY | TSL | CHT | DVYFWEAK | QGTPL | PF | PRIF | FGHEAGGIV | ESVGG | GV | TL | DL | KL | GDH | L | PVF | |
| VvADH2 | 1 | MSS | TAGQV | IRCKAAVAWEAGKPLVI | EEVEV | APPQAMEVRL | KILFTSL | CHT | DVYFWEAK | QGTPL | PF | PRIF | FGHEAGGIV | ESVGG | GV | TL | DL | QF | GDH | L | PVF | | |
| ZmADH1 | 1 | . | MATAGKVI | KCKAAVAWEAGKPLSI | EEVEV | APPQAMEVVR | KILFTSL | CHT | DVYFWEAK | QGTPL | PF | PRIF | FGHEAGGI | ESVGG | GV | TL | VA | GDH | L | PVF | | | |
| MtADH | 1 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | IESVGG | GV | TL | VA | GDH | L | PVF | | | |
| AsADH1 | 1 | . | MATAGKVI | KCKAAVAWEAGRPLSI | EEVEV | APPQAMEVVR | KILFTSL | CHT | DVYFWEAK | QGTPL | PF | PRIF | FGHEAGGIV | ESVGG | GV | TL | EL | LA | FDH | L | PVF | | |
| TmADH1 | 1 | . | MATAGKVI | KCKAAVAWEAGKPLSI | EEVEV | APPQAMEVVR | KILFTSL | CHT | DVYFWEAK | QGTPL | PF | PRIF | FGHEAGGIV | ESVGG | GV | TL | EL | LA | FDH | L | PVL | | |

图1 植物 ADH 家族成员同源序列的比较
 Figure 1 Homologous analysis of amino acid sequences among plant ADH family

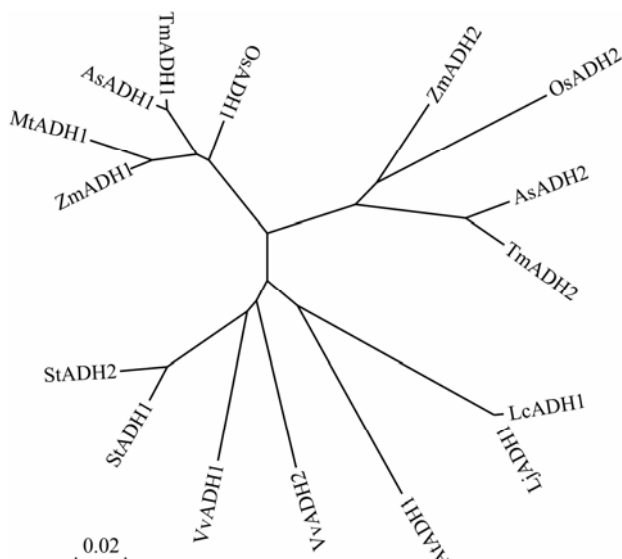


图2 植物物种间的ADH进化树构建

 Figure 2 Phylogenetic tree of ADH in plants

1.2 原核表达载体构建

为了在体外表达百脉根乙醇脱氢酶, 我们采用了目前常用于蛋白质表达的原核表达载体 pQE30。其特点是带有6个组氨酸标记, 与目的表达蛋白相比, 标记氨基酸的影响作用可忽略且易于纯化蛋白, 因此广泛应用于各种蛋白的原核表达(wang et al., 2010; liu et al., 2011)。本研究构建了原核表达质粒 pQE30-LjADH1, 该质粒经过 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切后, 琼脂糖凝胶电泳鉴定观察到一条 3.4 Kb 和 1.1 Kb 大小的片段(图3), 与 pQE30 及目的基因序列大小一致, 证明本研究正确构建了 pQE30-LjADH1 表达载体。

1.3 融合蛋白表达及浓度测定

为了检测融合蛋白在大肠杆菌中的表达情况, 我们将 pQE30-LjADH1 转化大肠杆菌 M15 菌株, 对融合蛋白质的表达条件进行了优化。结果表明, 重组质粒在 IPTG 的诱导下产生了重组蛋白, 随着诱导时间的延长, 重组蛋白的表达量也分别逐渐增大, 经过条件摸索, 我们得出重组蛋白的最适合诱导 IPTG 浓度为 0.1 mmol/L, 诱导温度为 30°C, 诱导时间在 180~240 min 时, 诱导蛋白的表达量达到最大值(图4)。纯化的融合蛋白通过 BCA 蛋白浓度测定, 6×His-LjADH1 蛋白浓度为 1.12 mg/mL。

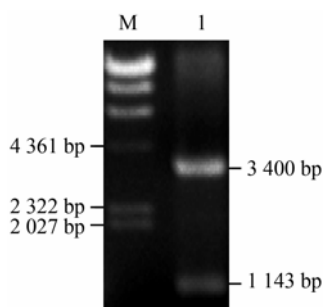


图3 pQE30-LjADH1 重组质粒的 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切鉴定

 M: λ DNA Marker; 1: *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切 pQE30-LjADH1;

 Figure 3 Recombinant plasmid pQE30-LjADH1 by restriction enzymes *Bam*H I and *Sac* I

 M: λ DNA Marker; 1: pQE30-LjADH1 double digested by restriction enzymes *Bam*H I and *Sac* I

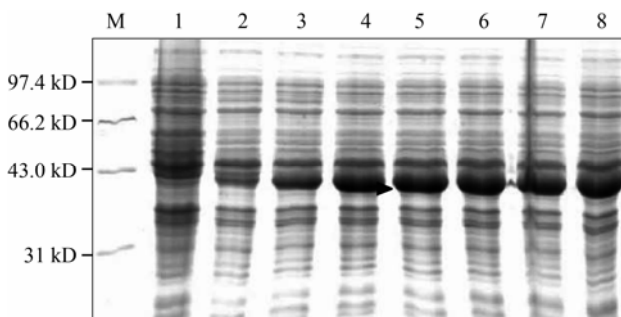


图4 在 0.1 mmol/L IPTG 诱导时间梯度诱导表达融合蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

 M: 小分子量蛋白质 Marker; 1: 未诱导菌体蛋白; 2: 30 min 诱导蛋白; 3: 60 min 诱导蛋白; 4: 120 min 诱导蛋白; 5: 180 min 诱导蛋白; 6: 240 min 诱导蛋白; 7: 300 min 诱导蛋白; 8: 360 min 诱导蛋白

 Figure 4 SDS-PAGE analysis of fusion protein expressed with time gradient under induction of 0.1 mmol/L IPTG

 M: Protein molecular marker; 1: No induction; 2: 30 min induction; 3: 60 min induction; 4: 120 min induction; 5: 180 min induction; 6: 240 min induction; 7: 300 min induction; 8: 360 min induction

1.4 融合蛋白酶活测定

我们推测本研究原核表达的蛋白是一个脱氢酶, 因此利用瓦勒和霍赫法(Vallee and Hoch, 1955)对蛋白酶活进行了测定, 测定酶活性的原理是鉴于 NADH 和 NAD⁺在 340 nm 及 260 nm 处有各自的最大吸收峰, 当 NAD⁺转化成 NADH 时会发生吸光度的变化, 而吸光度的变化值和酶促反应的速率成正比, 因此以 NAD⁺为辅酶的各种脱氢酶类都可通过 340 nm

光吸收值的改变来测定酶的含量。一个乙醇脱氢酶酶活单位相当于在37℃下每分钟还原1 μmol NAD⁺时所需的酶量。通过瓦勒和霍赫法在加入辅酶 I 和底物乙醇后, 反应液吸光度在 340 nm 有显著变化(图 5), 证明在反应中生成了还原性的 NADH, 使得在 340 nm 出现吸光度, 测得 LjADH1 乙醇脱氢酶每分钟吸光度变化为 0.108, 根据乙醇脱氢酶酶活力计算公式, $U/mg = E_{340} \times 3.1 / (6.2 \times E_w)$ 。E₃₄₀ 为 340 nm 处 5 min 吸光度吸光度增大的单位(0.001), E_w 为每毫升所用酶液中含酶的重量(mg)测得 LjADH1 酶活为 48.2 U/mg。

1.5 原核表达融合蛋白抗性分析

将重组M15菌株和含pQE30空载体的*E. coli* M15菌株分别加入H₂O₂, 进行抗逆性分析(图6), 结果表明在未加入H₂O₂的时候, 含pQE30空载体的*E. coli* M15菌株的生长状况优于重组载体组菌株。这可能是细菌过量表达异源蛋白反而影响细菌生长。但在加入终浓度为1 mmol/L H₂O₂时, 重组质粒菌株生长状态则优于含PQE30空载的*E. coli* M15菌株, 这说明LjADH1融合蛋白的过量表达提高了菌株对H₂O₂的抗性, 使重组载体菌株生长状况明显优于非重组载体菌株。这也表明LjADH1融合蛋白在提高原核细胞的抗氧化上有一定作用, 能够在氧化胁迫下提高原核细胞的生存力。

1.6 真核表达载体pYES2-LjADH1构建

酵母是一种单细胞真核微生物, 具有生长迅速、易于遗传操作和可表达外源蛋白等特点。同时, 它能对外源蛋白进行翻译后的加工和修饰, 而这是原核

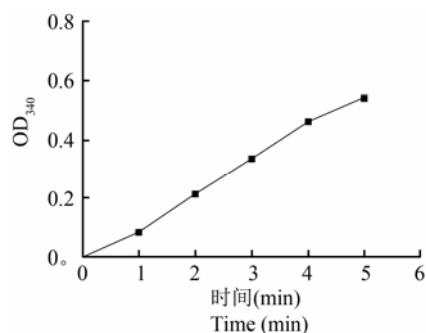


图5 重组蛋白吸光度
Figure 5 The absorbance of recombinant fusion protein at 340 nm

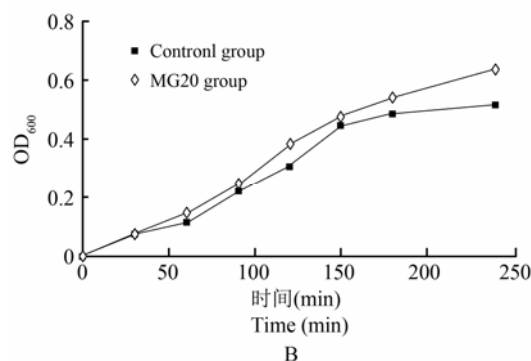
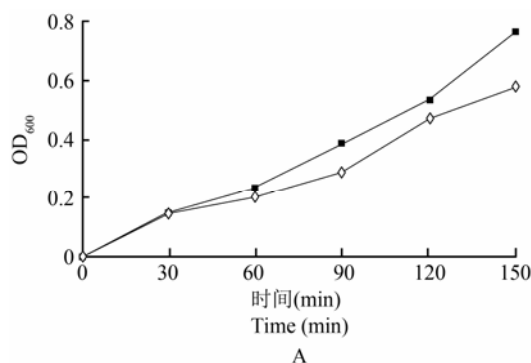


图6 H₂O₂对重组载体M15生长影响
Figure 6 Effects of H₂O₂ on the growth of recombinant *E. coli* M15 strain

表达系统所不及的(Liu et al., 2010, Wang et al., 2010)。本研究构建了真核表达载体pYES2-LjADH1, 将构建的pYES2-LjADH1表达载体用BamH I和Xba I进行双酶切, 琼脂糖凝胶电泳鉴定显示一条5.9 Kb和1.1 Kb片段(图7A), 与pYES2以及目的基因序列大小一致, 表明本研究正确构建了pYES2-LjADH1表达载体。将表达载体进行菌落PCR鉴定, 表明表达载体成功转入酵母中(图7B)。

1.7 真核表达的LjADH1蛋白抗性分析

为了研究LjADH1在不同逆境胁迫下的功能, 本实验将含有pYES2-LjADH1和pYES2的酵母菌(阴性对照)以不同浓度分别培养于材料与方法中介绍的不同逆境处理的YPG培养基中, 对进行抗逆性的非生物胁迫进行分析(图8)。结果表明, pYES2-LjADH1重组酵母和pYES2酵母菌在无逆境处理的YPG培养基条件下生长情况相似。在10 mmol/L CuCl₂、100 μmol/L CdCl₂、150 μmol/L CdCl₂和3.5 mmol/L H₂O₂的胁迫下pYES2-LjADH1重组酵母长势明显好于pYES2酵母菌。而在1.8 mmol/L

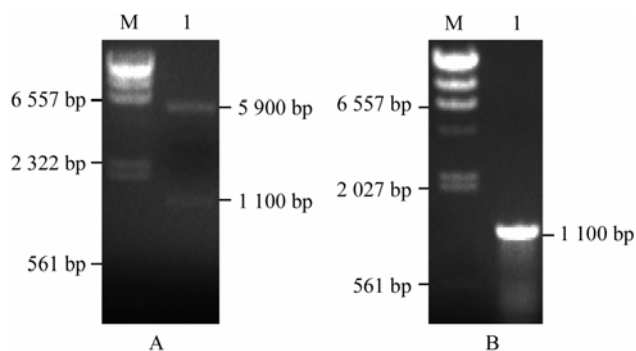


图 7 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切鉴定真核表达载体 pYES2-LjADH1

A: *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切鉴定 pYES2-LjADH1; B: pYES2-LjADH1 重组酵母菌液的 PCR 鉴定

Figure 7 identification of eukaryotic expression vector pYES2-LjADH1 by *Bam*H I 和 *Xba* I double digestion

A: Identification of pYES2-LjADH1 digested by *Bam*H I and *Xba* I ; B: Identification of recombinant yeast pYES2-LjADH1 by PCR

NiCl₂ 的差异不明显。Cd²⁺和Cu²⁺类重金属离子引起的胁迫属于氧化胁迫,这说明*LjADH1*基因表达的乙醇脱氢酶在氧化胁迫中对酵母的生长具有一定抗逆作用。在3.5 mmol/L H₂O₂胁迫下, pYES2-LjADH1重组酵母长势也明显好于pYES2酵母菌,这一结果也间接说明ADH具有一定的抗非生物胁迫的能力。已有研究表明ADH的突变能导致植物抗涝性下降,但单纯过量表达ADH并不能提高植物的抗涝性(Ismond et al., 2003)。显然*LjADH1*的这方面的抗逆性尚有待于进一步研究。

2 讨论

在本研究中,我们从二倍体百脉根MG20品种中克隆出了乙醇脱氢酶基因,并认为该基因编码一种典型的锌结合乙醇脱氢酶。我们将其命名为*LjADH1*。

在本实验中,我们将*LjADH1*基因连接到pQE30蛋白表达载体并加上6×His标签,优化诱导条件,通过Ni²⁺-NTA凝胶纯化并获得大量高纯化的非变性蛋白。利用瓦勒和霍赫法对蛋白酶活进行了测定,发现融合蛋白具有较强的乙醇脱氢酶活性。在对*LjADH1*蛋白原核抗性分析中发现,*LjADH1*的过量表达后,重组菌株生长状态明显好于对照组,这表明融合蛋白在原核生物的表达中表现出较强的抗氧化性。同时,我们再将*LjADH1*基因连接pYES2

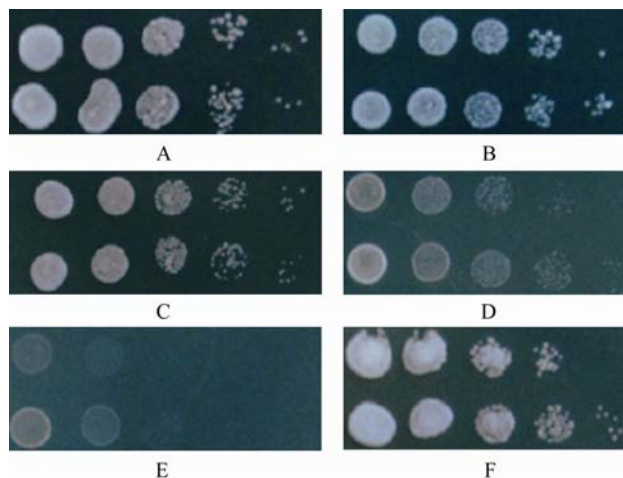


图 8 不同的非生物胁迫下 pYES2-LjADH1 重组酵母菌的过量表达

注: A 为对照组,即分别转化pYES2-LjADH1和pYES2酵母菌后在 YPD 培养基上的生长状况; B-F 为分别转化pYES2-LjADH1和pYES2酵母菌后,分别在添加10 mmol/L CuCl₂, 1.8 mmol/L NiCl₂, 100 μmol/L CdCl₂, 150 μmol/L CdCl₂和3.5 mmol/L H₂O₂等逆境处理后的 YPG 培养基上的生长状况

Figure 8 Over expression of pYES2-LjADH1 under different abiotic stresses

Note: A: The controls, Yeast cells harboring pYES2-LjADH1 and pYES2 vector, respectively, were inoculated in YPD medium, growth was 2~3 days at 30°C; B-F: Yeast cells harboring pYES2-LjADH1 and pYES2 vector were respectively inoculated in YPD media with different concentrations of 10 mmol/L CuCl₂, 1.8 mmol/L NiCl₂, 100 μmol/L CdCl₂, 150 μmol/L CdCl₂, and 3.5 mmol/L H₂O₂, growth status observation after 2~3 days incubation at 30°C

载体后转入酵母中,在酵母中过量表达该基因,发现在10 mmol/L CuCl₂、100 μmol/L CdCl₂、150 μmol/L CdCl₂和3.5 mmol/L H₂O₂胁迫下, pYES2-LjADH1重组酵母长势明显好于pYES2酵母。而在1.8 mmol/L NiCl₂的胁迫条件下,重组酵母与对照差别不明显。这说明*LjADH1*基因表达的乙醇脱氢酶在氧化胁迫中的对酵母的生长具有一定抗逆作用。我们的研究初步说明*LjADH1*是一个锌结合乙醇脱氢酶家族蛋白具有一定的抗非生物胁迫的能力。

3 材料与方法

3.1 供试材料

百脉根(*Lotus japonicus* L) MG20种子由中山大学教授罗达博士提供,并由海南省热带农业资源研究所保存。百脉根种子经消毒灭菌后,在30°C恒温室培

养 24 h 萌发, 选取萌发的种子播种到 5×7 cm 的花盆中, 光照 12 h/d, 培养温度为 26℃, 培养 14 d 后, 取全株洗净备用。

大肠杆菌 JM109、酵母菌株 INVSc1 (Clontech)、*E. coli* M15、pMD18-T (TaKaRa)、原核表达载体质粒 pQE30 (Qiagen) 及酵母表达载体 pYES2 (Clontech) 均由东北林业大学盐碱地生物资源环境研究中心提供。限制性内切酶、EX *Taq* TM、T4 DNA 连接酶和卡那霉素(Kana)等酶及试剂均购自Takara公司。

3.2 cDNA 获得、基因克隆及序列分析

百脉根总 RNA 提取采用 Biozol RNA 小量提取试剂盒(Biomiga)进行。百脉根 MG20 的 cDNA 采用 RNA kit (AMV) 反转录试剂盒(Takara)通过 RT-PCR 法获得, RT-PCR 程序为 30℃, 10 min; 42℃, 15 min; 50℃, 15 min; 55℃, 15 min; 60℃, 15 min; 90℃, 10 min; 5℃, 5 min; 进行 30 个循环。

本研究根据已知的 *ADH* 序列信息设计了一对 PCR 引物, 上游引物为 5'-TAGCTATGTCGACCA CAGCT-3', 下游引物为 5'-AACTCAGTCCCCAAA TAGGG-3'。以百脉根 MG20 的 cDNA 为模板, PCR 反应程序为 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 进行 30 个反应循环; 最后在 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳 30 min 后, 紫外灯下切取含有目的片段凝胶。胶回收后将纯化后的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 JM109, 对阳性克隆进行测序(华大基因测序), 在 NCBI 数据库中进行相似性比对, 绘制基因序列进化树。

3.3 原核表达载体构建

利用 Primer Premier 5.0 软件设计上游引物和下游引物, 并在上游引物上加上 *Bam*H I 酶切位点, 在下游引物加上 *Sac* I 位点。上游引物为 5'-GGGATCC-ATGTCGACCACAGCT-3' (下划线为 *Bam*H I 位点), 下游引物为 5'-CGGAGCTCACACATCATT-GTTTTTG-3' (下划线为 *Sac* I 位点)。以测序载体为模板, 进行 PCR 反应, PCR 反应程序为 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 变性 30 s, 54℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 进行 30 个反应循环; 最后在 72℃ 延伸 10 min。回收 PCR 产物并连接到 pMD18T 载体, 重组载体

命名为 pMD18T-LjADH1, 热激法转入 JM109 菌株; 菌液 PCR 以及双酶切鉴定后, 提取重组载体质粒及 pQE30 载体, 利用 *Sac* I 和 *Bam*H I 限制性内切酶分别进行酶切, 回收后连接到 pQE30 载体上构建成 pQE30-LjADH1, 转化到大肠杆菌 JM109。随机挑取单克隆, 提取质粒 DNA, 用 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切鉴定并转化大肠杆菌 M15 菌株。

3.4 融合蛋白的诱导表达及浓度测定

将含有重组质粒 pQE30 的大肠杆菌 M15 单克隆接种到于抗性培养基中, 37℃ 振荡培养过夜; 取 200 μL 过夜培养物, 分别加入到含抗性的 5 mL LB 液体培养基的摇菌管中, 37℃ 振荡培养, 当菌液达到对数生长期 OD₆₀₀=0.6 时, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 37℃ 振荡培养, 进行融合蛋白的诱导表达; 当菌液分别诱导至 0 min、30 min、60 min、120 min、180 min、240 min、300 min 和 360 min 时, 收集菌液; 14 000 r/min 4℃ 离心 1 min 菌液, 弃上清液, 加入 PBS 重新悬浮沉淀, 再加入等量的 2×SDS 上样缓冲液, 100℃ 变性 5 min, 于冰上放置 5 min 后, 13 000 r/min 4℃ 离心 5 min。取约 20 μL 的上述样品进行 SDS-PAGE 电泳。

蛋白质浓度测量使用 BCA 法(Walker, 1994)。37.5 μL 8 mg/mL BSA 加入 262.5 μL 稀释溶液(ddH₂O) 总体积为 300 μL (BSA: 1 mg/mL), 取 150 μL 连续倍比稀释 7 次。得到 BSA 标准溶液 500 μg/mL、250 μg/mL、125 μg/mL、62.5 μg/mL、31.25 μg/mL、15.625 μg/mL 和 7.813 μg/mL。以 ddH₂O 为对照, 在分光光度计下测 OD₅₉₅。将纯化的融合蛋白稀释。每一稀释度标准溶液各取 100 μL, 与 2 400 μL 考马斯亮蓝 (Coomassie Brilliant Blue, CBB) 混合。以 ddH₂O 为对照, 用分光光度计测 OD₅₉₅; 每一稀释度重复 3 次。

3.5 融合蛋白酶活测定

乙醇脱氢酶活性测定采用瓦勒和霍赫法(Vallee and Hoch, 1955)并稍加改动。将 150 μL 焦磷酸钠缓冲液, 50 μL 底物溶液和 100 μL 辅酶 I 溶液加入试管中, 置于 37℃ 恒温水浴, 加入同条件浴热的酶液 10 μL, 立即记时, 在连续 5 min 内, 每隔 1 min 读取 340 nm 处的吸光度直至每分钟吸光度增大值达到稳定为止。

3.6 原核融合蛋白抗性分析

原核抗性分析按照 Echave 等的方法并稍有改动 (Echave et al., 2003), 将分别含重组载体以及仅含 pQE30 空载体的 2.5 mL *E. coli* M15 菌液分别培养至 $OD_{600} \approx 0.3$, 加入 22.5 mL 含有 100 $\mu\text{g/mL}$ Amp 和 25 $\mu\text{g/mL}$ kana 的 LB 液体培养基以及终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 将菌液稀释 10 倍, 并将菌液等量分为两组, 其中一组加入终浓度为 1 mmol/L 的 H_2O_2 , 另一组不作处理作为对照, 在 30 $^\circ\text{C}$ 摇床下剧烈震荡, 每隔 30 min 测定其 OD_{600} , 以检查各时间段菌株的生长状况。

3.7 酵母表达载体构建

根据本研究克隆的 *LjADH1* 基因碱基序列信息特点设计引物, 上游引物: 5'-GGGATCCATGTCGACACAGCT-3' (*Bam*H I), 下游引物: 5'-CGTCTAGAACACATCATTGTTTTG-3' (*Xba*I), 将 pMD18T-*LjADH* (酶切位点为 *Bam*H I 和 *Xba*I) 和 pYES2 载体分别用 *Bam*H I 和 *Xba*I 双酶切, 回收和连接双酶切产物, 重组载体命名为 pYES2-*LjADH1*。酵母转化采用 LiAc/PEG 化学转化法 (Gietz et al., 1995) 将构建好的质粒 pYES2-MGADH 和载体 pYES2 导入到酵母 *INVScI* 中。

3.8 真核表达蛋白抗性分析

将分别转入重组酵母 pYES2-*LjADH1* 和载体 pYES2 *INVScI* 单克隆于 SC-U 培养基中, 30 $^\circ\text{C}$ 过夜培养, 当酵母生长至 $OD_{600} \approx 0.6$ 时, 将菌液用 YPG 培养基分别稀释到 10^{-1} 倍、 10^{-2} 倍、 10^{-3} 倍、 10^{-4} 倍和 10^{-5} 倍, 分别取 pYES2-*LjADH1* 和载体 pYES2 10^{-1} 倍、 10^{-2} 倍、 10^{-3} 倍、 10^{-4} 倍和 10^{-5} 倍的酵母菌液, 每个浓度取 5 μL , 分别点在于 10 mmol/L CuCl_2 、1.8 mmol/L NiCl_2 、100 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 、150 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 和 3.5 mmol/L H_2O_2 的 YPG 培养基中, 30 $^\circ\text{C}$ 培养 2 d。

作者贡献

曾拓、柳参奎是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 巩鹏涛、赵德刚参与完成数据分析, 论文初稿的写作; 方宣钧是项目的负责人, 包括负责实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究受国家科技支撑计划 (2007BAD59B05) 的资助。作者感谢东北林业大学盐碱地资源环境研究中心张欣欣博士在

本实验过程中的技术支持和有益的建议。感谢两位匿名的同行评审人的评审建议和修改建议。本文中提到了我们实验中涉及的有关试剂供应商和测序服务商, 这并非我们为这些试剂供应商和测序服务商的产品和服务提供推荐或背书。

参考文献

- Chervin C., Truett J.K., and Speirs J., 1999, Alcohol dehydrogenase expression and alcohol production during pear ripening, *American Society for Horticultural Science*, 124(1): 71-75
- Dolferus R., Jacobs M., Peacock W.J., and Dennis E.S., 1994, Differential interactions of promoter elements in stress responses of the Arabidopsis *Adh* gene, *Plant Physiol.*, 105(4): 1075-1087 doi:10.1104/pp.105.4.1075 PMID: 7972489 PMCID: 159435
- Echave P., Tamarit J., Cabisco E., and Ros J., 2003, Novel antioxidant role of alcohol dehydrogenase E from *Escherichia coli*, *Journal of Biological Chemistry*, 278(32): 30193-30198 doi: 10.1074/jbc.M304351200 PMID: 12783863
- Gerlach W.L., Pryor A.J., Dennis E.S., Ferl R.J., Sachs M.M., and Peacock W.J., 1982, cDNA cloning and induction of the *alcohol dehydrogenase* gene (*Adh1*) of maize, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79(9): 2981-2985 doi: 10.1073/pnas.79.9.2981
- Gietz R.D., Schiestl R.H., Willems A.R., and Woods R.A., 1995, Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure, *Yeast*, 11(4): 355-360 doi:10.1002/yea.320110408 PMID:7785336
- Handberg K., and Stougaard J.S., 1992, *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics, *The Plant Journal*, 2(4): 487-496 doi: 10.1111/j.1365-313X.1992.00487.x
- Hwa-Jee C., and Ferl R.J., 1999, Arabidopsis alcohol dehydrogenase expression in both shoots and roots is conditioned by root growth environment, *Plant Physiol.*, 121(2): 429-436 doi:10.1104/pp.121.2.429 PMID: 10517834 PMCID: 59405
- Ismond K.P., Dolferus R., Pauw M.D., Dennis E.S., and Good A.G., 2003, Enhanced low oxygen survival in Arabidopsis through increased metabolic flux in the fermentative pathway, *Plant Physiol.*, 132(3): 1292-1302 doi: 10.1104/pp.103.022244 PMID:12857811 PMCID: 167069
- Kawaguchi M., 2000, *Lotus japonicus* 'Miyakojima' MG-20: An early-flowering accession suitable for indoor handling, *Journal of Plant Research*, 113(4): 507-509 doi: 10.1007/

PL00013961

- Liu B.H., Watanabe S.H., Uchiyama T., Kong F.J., Kanazawa A., Xia Z.J., Nagamatsu A., Arai M., Yamada T., Kitamura K., Masuta C., Harada K., and Abe J., 2010, The Soybean stem growth habit gene *Dtl* is an ortholog of Arabidopsis *TERMINAL FLOWER1*, *Plant Physiology*, 153(1): 198-210 doi:10.1104/pp.109.150607 PMID: 20219831 PMCID:2862436
- Liu Z.M., Liu S.K., Li Y.Z., and Fang X.J., 2010, Heterologous expression and purification of *CryIAc22* toxin from *Bacillus thuringiensis* W015-1, *Bioscience Methods*, 2010, Vol.1 No.2 (DOI: 10.5376/bm.2010.01.0002)
- Liu Z.M., Zhou Y., Li Y.Z., Liu S.K., and Fang X.J., 2011, Construction of plant expression constructs harboring full-length *Bt CryIAc22* toxin gene and truncated functional *Bt CryIAc22* toxin gene and Arabidopsis transformation, *Bioscience Methods*, Vol.2, No.3 (DOI: 10.5376/bm.2011.02.0003)
- Newman, K.D., and Vantoi T.T., 1992, Molecular characterization of the soybean *alcohol dehydrogenase* gene family amplified *in vitro* by the polymerase chain reaction, *Plant Physiol.*, 100(1): 489-495 doi: 10.1104/pp.100.1.489 PMID: 16652988 PMCID: 1075576
- Shi Z.G., Ye L., Gong P.T., Zhao D.G., and Liu S.K., 2009, Analysis of alcohol dehydrogenase (ADH) family by bioinformatics, *Jiyizuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 28(3): 429-432 (石之光, 叶磊, 巩鹏涛, 赵德刚, 柳参奎, 2009, 乙醇脱氢酶 (ADH)家族生物信息学分析, *基因组学与应用生物学*, 28(3): 429-432)
- Vallee B.L., and Hoch F.L., 1955, Yeast alcohol dehydrogenase, a zinc metalloenzyme, *Journal of the American Chemical Society*, 41(6): 327-338
- Walker J.M., ed., 1996, *The protein protocols handbook*, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, pp.11-14 doi:10.1007/978-1-60327-259-9_3
- Wang S.L., Liu S.K., Yu G.H., Gong P.T., Zhao D.G., and Fang X.J., 2010, Studies on rice Epoxide hydrolase: Gene cloning and expressing in *E. coli*, yeast and Arabidopsis, *Rice Genomics and Genetics*, Vol. No.2 (DOI: 10.5376/rgg.2010.01.0002)
- Wang S.L., Liu S.K., Yu G.H., Gong P.T., Zhao D.G., and Fang X.J., 2010, Large preparation and purification of rice epoxide hydrolase expressed in *Escherichia coli*, *Genomics and Applied Biology*, Vol.1 No.5 (DOI: 10.5376/gab.2010.01.0005)



BioPublisher是一个致力于发表生物科学研究论文、开放取阅的出版平台

在BioPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://chinese.sophiapublisher.com>