

【研究简报】

菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因全序列分析

舒卫国 艾万东 陈受宜*

(中国科学院遗传研究所, 北京 100101. *联系人)

关键词 菠菜 基因组文库 甜菜碱醛脱氢酶基因 序列分析

在干旱和盐碱环境下,许多高等植物细胞中积累甜菜碱.一般认为甜菜碱是一种无毒渗透保护剂,它的积累使植物细胞在渗透胁迫下仍能维持正常功能^[1].最近通过对玉米甜菜碱醛脱氢酶近等基因系的研究,为甜菜碱的这一重要生理功能提供了直接的证据^[2].甜菜碱是由胆碱经过两步氧化反应生成.催化这两步氧化反应的酶分别是胆碱单氧化物酶(CMO)和甜菜碱醛脱氢酶(BADH, EC1, 2, 1, 8)^[3].从菠菜、甜菜、山菠菜、大麦和高粱中克隆了BADH cDNA^[4~8],但BADH基因组序列尚未见报道.现已证明BADH mRNA的合成是受盐诱导的^[5~8].为进一步研究BADH基因的结构特性和表达调控,本文构建了菠菜的基因组文库,克隆并分析了BADH基因全序列及5'端上游调控区序列.

1 材料与方 法

新鲜菠菜的幼嫩叶片.菠菜基因组DNA的提取按文献[9]描述的方法进行.

取约20 μ g菠菜DNA在120 μ L反应体系中加入0.2单位的Sau3AI,混匀后等分6份,37℃保温.间隔10 min取一次样.电泳检查酶切程度.取酶切片段(12~23 kb)亮度最强的酶切条件为最佳条件,据此大量酶切菠菜DNA,电泳后用透析袋法回收12~23 kb区域的DNA.以 λ Gem-11 BamHI Arms为载体,按3:1的质量比(λ Gem-11 BamHI Arms: 部分酶切片段)连接.包装后测定库的滴度.

文库筛选所用探针为山菠菜BADH cDNA.共进行3轮原位杂交以筛选阳性克隆.分子杂交按文献[10]方法进行.噬菌体DNA的Southern杂交按文献[10]方法进行.杂交所用探针分别为山菠菜BADH cDNA 5'端900 bp和3'端900 bp片段.

根据噬菌体插入片的物理图谱,使用酶切方法亚克隆.克隆载体为pUC18或pUC19.序列测定在ABI公司373A型DNA序列自动分析仪上完成.

根据已发表的BADH cDNA序列^[7],设计合成一对引物5'-AAGGCTCCAGTCAC-CCTGCC-3'和5'-CAACACGCCTGGAGGAAGTC-3'进行PCR扩增.扩增产物经OLAGENE Kit纯化后EcoRI酶切,将目的片段克隆至pUC19并测序.

2 结果与讨论

2.1 菠菜基因组文库的构建及筛选

提取高分子量菠菜DNA,根据酶切时间长短确定其Sau3AI部分酶切最佳反应条件,据此进行大量部分酶切反应.用透析袋法电泳回收12~23 kb区域的片段.将回收片段同载体分子 λ Gem-11 BamHI Arms(按1:3的质量比)进行连接反应.取大约3 μ g的连接产物进行体外包装.原始库的滴度约为 3×10^5 pfu.

插入片段约 12 kb.

2.3 BADH 基因全序列的测定

根据克隆 D 的物理图谱, 用酶切方法将杂交呈阳性的片段克隆至 pUC19 或 pUC18 上, 直接测序或亚克隆至合适的长度后测序(图 2(b)). 比较所测序列与已发表的菠菜 BADH cDNA

```

1  CTCGAGGGGC CATCCTTGCA AAAAAATTC CCATGACTTT TATTTAATAG TTGCAGCACT GGATAACATA GTAGAAAAAG CATATGCAAA
91  CAAGAGAAAT AATTACAGGA GATAGGATCA CCCTAGCGGA GGGGGGTTAC ATCACCCTGAA ATTACCCCAT TCACITTAAT
181 TGACAATGGT ACGCTTACCA GGCAGTCCAT CACCCTACGG ACACAACTCA CACTAAACCC CATTTTGTAC ATTTCACTCC AAAAAAATAA
271 ACTCATTCCA CTCTGTGTGA CGCTTTTGTG ATATCAAGTT TAAGAGCCAT AGACTCATCA CGACCCCTCCC CTCCTCTCC CTTCCTCTCT
361 TCATAGAAAT GAACATACCA AAAGCCACCA AAGCGCTATT TGTAAATCAAT CTGCTCGGAA CAAAAGCACT TTGAAGAAAT CATATGCGCC
451 TTTAATTGTA ATCATAAACT CATTTAGACA ATGGCACAAT TAATTGAAAT TATTTGTGCG ACTTGGATGG TACTTCAGAA GCGTTCATTA
541 TTGGCGCTGAA GCGCATGCTA AACAAAGACA AATATCCAA CTATCTTAGT AATGATTAAT ATAAAAAAT AAAAAAATAT AAAAAAATAT
631 GAAGTTGTTT CCGTCTTGTG AGTTGTGATG TGATCATGTG ATTGATTTAT TGCGGTGTTT GTGTTTTTTC TAAAGAGCCA CGAAATAATT
721 CCATATTTAT ATATAAAACC TAAAAAAGG CTGAAAAATG ACGTGTGATG CCGTCCAAAC CCAACACCGT TCACAATCGT AATTGTGCCA
811 TATTTCTTCAT CAATTATAAA TAAAAACAAT TAGCTTTTAA TGAACCAAT AGAATTCGAC ATAACTCACC ACCGAAAAAA AACGAAAAAA
901 AAAACCTAAT TATTTGTTTA GTAGTAGCTC ACAAATTCGT TTATTCATAA GTAGTTTATG CGTAAATGCG CAAAAAATAA AAACCACTAA
991 TATTTTCAGG GCAACGACAG GTCAATCTAA ATTGTCTCGT TTCTTTCATA ATTTTCATTT TCATTAGAAAT GATATAATTG AATATTAGGT
1081 GAGAATTGAA AATAAGTTTT TTTTCTGAAG CAAACTCAAA AATTGAGATT TCATTACCAT GAACATTATA ATGTTACTTT TTTAACCAAA
1171 TTACAAAAAT CATCATATTC TCACTATTGG CCGTTACCAA ATAACTGTA CATTAAATGG CAATAGATTA AGATATAGCA ATACCAAAAT
1261 GATTATAGAT CGAGTAGTAC AAAATTTTTT CTTCAAAAA TACCAAAATGA TAACCAATAT GAGTTATTGA GCGAGATTTT TTCCTATGAA
1351 AGATAACACA ATATTAGGA AAGCACAAC TAATAATCAA TCTAAGTTAT CGAACATGTT GGTACAAAA ATCTATGTTT TTTTCATTCC
1441 GGCTAATCTA ATTTTTTACT CTTTCCGTTT CTTTTTGTG CTACGCTTTG GACTTTTGA CGTTTATTAA CGTATAATAA AGATTCTTTT
1531 TCTTTTTTAT TAAAAAATA AATTCAATA AAACITCAAT CCACTAATCA TTACAACAAC CAATAAGATT GTTTTATTTA TCAAAATGAA
1621 CCAATAATGA AAAAGCACA AGATTGTTAC CTTAACATAT TTGGGAAAT GTAAAGAAAT TTAATGAGTT GAAAAAATG GAGTAATTA
1711 ATTAATAATTA AAGTTTGCA CAAAAATGA TAATAATAA GCTTTATCAA AAGAAATATT TTCCACGTA ACAAATATTG TGAACACCTC
1801 AAAAAAGATA CGTAACAAAC AAAAAAGAAC GGAGGAGTA ATTTCTTGTG TGACCTGATT TGGATTAAAG GAGAGCTAAT ATTTCAATAC
1891 GATCAAAAAA CATAGCTTGT AGACTTGTAG TTGTACCATA CATAAATCGA TGATTTAAAA GGTGACCGA TAGAAAAATG GTACTACCTC
1981 CGTTTCAAAA GGATCTTTAC AGTCACTATT TACACGGACT CCAATGCAAT ATTTAACTAT TAATATATCC AATTTCGTAT GTGAAAAAAT
2071 TATAAAAAAT TGATATTCTG AAAATACATC CGTGATCAAT CTAAACAAGAT CTCATATGTA ATGTTTTGAT ATATATAATG GGGCGAATTT
2161 AAGGTTAAAG TTTCTATACT TTGGACATAT TTTTCAAGT GTAAAGAAAT TTCTGAAACG AAGGTACTAG TATTGAAAG GCACCCATCA
2251 ACCCGGGCAA ATTTGCTCGG AGTAGCCACG TATTGTTTCA TCCTCATCCC AACAGTTAAT CAATCAATTC ATTTGCCAAT TAAGGTCAATC
2341 GTTAAGCTTT ATAAAAATG TCACATGCT CTCACTCTTT GCTCCCACT CTTTCTCTCT CTTACCCCTA CCCTCTCAAC TCAATTTCTT
2431 CAACCCAAAT TCTTCGCATT TAACCAAGAA TGGCGTTCCC AATTCCTGCT CGTCAGCTAT TCATCGACGG AGAGTGGAGA GAACCCATTA
2521 AAAAAAATCG CATACCCGTC ATCAATCCGT CCACTGAAGA AATCATCGCT TAGTTTTTTC AATTCAATG CTATAGATTA GGATTGTTGC
2611 AATTAATAAG CTGAATTTAA CTGTTTGAAA TATGAGAAAT TAATGTTTTG TCGTACACAC AAATACTCGG GCTATGACAC CAGTTGATCC
2701 GTGATTTTFA ACGAAGAAAA GGGAGTTTAT TGAGTATAAA ATCAAGAATT GTGATGTGGG TATTAATCAA AATGGGGTTT CAGGTGATAT
2791 TCCGGCAGCC ACGGCTGAAG ATGTGGAGGT TGGCGTGGTG GCAGCTCGAA GAGCCTTTAG GAGGAACAAT TGGTCAGCAA CATCTGGGGC
2881 TCATCGTGCC ACATACTTGC GTGCTATTGC TGCTAAGGTA ATGAAACTAA TCCTTTGAT TATTATATTT TTACATAATT TAGTTATTTG
2971 ATGTTGTCTT GAAGGTTATA ATTTCTGAAT TACTTGGGGT TTGAGGTTGG CATAATGTGC ATGTTGACTT TTAGATTTGG GAATTTGATT
3061 TGGCAGAAAT TCTTTGAATA ATGTTTCTA GTCAATTTTG AAATGAGCTA CAAGTGTCAT TATTGACAAA TTTTGAATAA ATAAATATAT
3151 GAATGTTAGT TTCAATTTTA CCAAGTTCAA TGAGTACTTT GTAGTTTCTA TCAAAACAGT ATTGTTAATC AATAATCATA ACAAGCTAAA
3241 AATTCAAAAT CATGCAACTT TAGGAGGTTT ATGGAGCTTG GACACAAGCA CCGGAGTCCC AGTAACATAG TATCAAGGCT ATCGATTTTG
3331 GCTGTTGACA TAGATGTCTC ATAGTGTACA ACTGTACATG TGAGTTTATG ACCCCTTTTG ATGCTGAGTT TAACCTCCAT AGGCTAATTG
3421 CTAAGGCGCT AAAGTCACTG AGGTGGTGGT AATGCTATTG TTTCTCAGTC ATGAGTCAATG AGAAAGCTTT GGTATAACAA TTGATATAGT
3511 GGAAGTAGGA CATGTAGTAG TTTCTTCACT TCTAGTCACT GCATTAGGTA GTTTCAGGCT TTCAGCTTGC AGCATAGCTG ATTAGCTGCT
3601 TAGATAAATC TCAGCTTCAT TGAATATAAA ACTAGAAGAA GTACTGTGTT AATGAACCTA GTCAATCAAG AACAAAAAGC TGCTCTTCAA
3691 ATGCAGAAAT GTGATATTA TTGTCCTCC ACCCTTGTC CCTACTCTCT TTGTACTGAT TACTATCTAC CATAAATTA CTGTCTTGG
3781 TGAACCATTC TCCATCATTC CGAGGTGGAT GTACATGAAA TCCTTTTGAG ATGTTTTTGT AATCATAATT AATCACTAAA GCTAAACTTA
3871 AAGAAATGACC TTATATAACC TTTAATCTCC ATGTATTGAA TTAAGGGTGA AATGCTGATG GTTACTTCTT GCTACCTTGG AGGTCAATAA
3961 TAGCAGTATG GACTGTGGAG ATCATCACTT CTGAACAATA GATATATATG AAGAAGTCAT AAATGGTAGC TTTACTTTTT ATTCTTTTAA
4051 ACACCGTAAA GGTACCCAAC TACTAATAGT AAAAAATGCT TTCATATAAG GTTATTCTTG AAAAAACAT TCTGCTAGTT ATTTAAAAAT
4141 TTCTGGTAGT TATTTAAAAA TTTACGCGT GTAACTGTGC TGGTACTGTC TAAGCAAGAA TGTGGTTAGT GAGATGTTAG GACTATGTTA
4231 CTTGGACTGT TGATACAGAA ACAAGGACTA GCTGTCACTC AGCAACTTAC GGCACACTG GAATTTTATC AAGAACTTTT CAAATTTAGT
4321 TTAAGTGTGT CAAGATTTAA AGTTTCATTC TGCTTATATC GTTATATATC GATCCATGTT TAGTTCGGGT TGAAAGGCTT TGTGACACAT
4411 GGATGTAAT TTGATGCTTT AGTCAAAATG AACTGACTCT AACTTTTTCT TTGCAGATA CAGAAAAAAA AGATCATTTT GTTAAACTGG
4501 AAACCATTGA TTTCTGGAAA CCTTTTGATG AAGCAGTGCT GCACATTGTC AAGCTAACAG TTTGAATTA TCTCTTTTTT GTTCCCTTA
4591 CTCTGCATTC ATACTGAGTT CCAATGCTTT CTTTCTCTTG TTTTAGGATC ACGTTGCTTC ATGTTTTTCA TATTTTCCG GACAAGCAGA
4681 AGCTCTTGA GTTAAACAAA AGGCTCCAGT CACCTGCTCT ATGAAAAGGT TCAAAAGTCA TGTCTCAGG CAGCCCCCTT GTGTGTGTGG
4771 ATTAATATCC CCATGGTAAT TCCTCACTCT CTCGCCACCT CAACACAAAA AAGTTGATG TTGGCAAAAG AAAGGAAAAAG
4861 AGACTGGAGT TTTGAAAGTA CATAGTAATA ATATATCGTG TTTTATGGAC TTTTTCATGC ACTTTTTCTG TTCAAGTATC TCTGTAGTG

```

```

4951 CTTTTATCA TCATGAATTC ATGGTAGACT AAGGAGATAA GGGATATCTG TAAGCTAAAG CTATATGCAG AGGTTTTACA TTTATGGCAT
5041 TTTAAGGTAA TTGATTGGAA GACTTTATCA AATATTGTAT CAACATACAA TTTGAGAAGT AAGTTGAAGA ATAAGTTGCT AACTTGTAAAT
5131 ATTATTTTCC TTATTGGCTT TCCCTTTTAG ATGCTCTTAA CTGGTTGTCT GGGTTTTAAT CTATTCCTTC GCTCTAAATG TGTATGTTTC
5221 TGAGACTCAG CTAGAATTGG TAGACACACA ACCCTGGCCC AAAGTATAAT TCTGGGCCAA TGTAAATTACC CGTAATAGTT TGCATGTTTC
5311 TGGGCTCAAA GCAAAAGCGT AAAGTCTCTG CAATCATATT GGAATAACAA ATATCTAGTG TTCTAGTCAA AACTCAAAATG AACAGTTCGA
5401 GTAACACAAA CCAAGTGTGG TGCCTGCTGT TATCTGTGTG CGCTGATCCC TTTTTTTTTT TCCTCTGTTG AAGGAATTAC CCACTTCTAA
5491 TGGCTACATG GAAAAATTGCT CCAGCACTTG CTGCTGGGTG TACAGCTGTA CTTAAGCCAT CCGAGTTGGC ATCTGTGCAT GTTACATATC
5581 AAATCTTCAA TTCTAAAACT GCTCTCTCTA GTGCAACACA CAGTGCTAAT GTCATAACA AAATGTATGG CTTTGTTCAT GCACCTGTCT
5671 AGAATTCGGT GAAGTTTGCA ACGAAGTGGG ACTTCTCCCA GCGGTGTTGA ATATCTTGAC AGGATTAGGT CCAGATGCTG TGCACCAATT
5761 AGTATCACAC CCCGATGTTG ACAAGCTTAT ACTTTCCTCG CTGGAAGTTT TACCTTTTCA GAACTTTCTT TTGTCATAT TGTGTGAAG
5851 GTGACCGTAT TTTCTGATTA AACAGATTGC CTTTACTGGG ACTAGTGCCA CTGGAAGCAA GGTATGGCT TCTGCTGCC AATTGGTTAA
5941 GGTGAGCCAT AGCACAATTA TTAGTGAGAA GTTTGGTTGA ATTTGATATT TTTTTCCTA TGGTTTGGAC ACCACCAATT CTAAATATTA
6031 ACTTGATTGC AGCCTGTTAC ATTAGAAGTT GGGGGTAAAA GCTCTATTGT AGTGTGTTGA GATGTTGATA TTGATAAAGG TTAGTTGATC
6121 TTATTTTACA CAAGATTGTG CCTTTTACTA TCTCGTAAAT CTTTTCTTTT CAGAATCAGT TTTCTTCTGA TTCTGCTCAT CTGAGATGCT
6211 TAATCAATTT CCGTCTTCTA ACATGTTGAT ATCTGTAATT GGGCAGTTGT GGAATGCACT ATTTTGGCT GTTCTGAC AAATGGTCAA
6301 ATATGTAAGT CAACGCTAG ACTGCTTGTG CATGTAAGCA TCCACATACC AAGAATTCTG CAAGGAATTT GAATTGACAT CAATTAATTA
6391 CTGAGATTGA TATTGTAAC AAAGTATGTA TGAGTCTGCT AATAAATAAT TTTTTCGGT GTTGAATTTG TCTGTTTTAT AGGAAAGTAT
6481 TCGAGCTGAG TTTGTTGATA AGCTTGTAAA ATGACGAAAA AACATTAATA TTTCTGACCC ATTTGAAGAA GGATGCCGGC TTGCCCTGT
6571 TATTAGTAAA GGACAGGTAT AAATATGATG AATTATTTTG TACCAAGTGA TTTTCCGCTT TCACAATGCT GAAGCAGAAC CATCTAATGT
6661 TACTTCATTT GCTTCAGTAC GACAAAATTA TGAAGTTTAT ATCAACAGCA AAGAGTGAGG GGGCAACTAT TTTGATGGA GGTTCGCCCT
6751 CTGAGCTAAA ACCAATGCAT ATTGTTTCTG AAATTAATTTG TTGAACACCA CATCAAGAGG AATTTAGTTT GTTGAACATC TTGATCAAA
6841 GGATATGGAT CTAATGCTTG GGGACCATAT CCATAATGCT ATTCGGGGCC ATGTATCATA AAGCCACCTA GATAGTCAAA ATCATTTCAC
6931 ATGCTCAGA AGCTGCAATT TTTAGGAACC CCGTTGATGC TATATCTTTC CCAAACTTGC ATATCCAGTT GACAAAATAC TTGCTGATAG
7021 ACCTGCTTAT CCGCCGGGAC GGGTCAGGGT CCGCCGGGGT CAAATACGGG CCGGGTATTA AAAGGGTCAAT TTTAGCGGG TCGATAATGG
7111 GCAGCTCAA AGCGGGTCCG GGGTCAATAG CCGCTCATTG CTGGGTGGGT CAATAACCGA CCAATGAAAA ATGGAACACA AAACAGCCAT
7201 TTGCAAGTAC AAGTGAATAC GAGCTATATC ACGTAATTTT TTGTATCATT ACTATTTTAA TTTTCAAAAT AATTGTAGTA TAAGTTTGAC
7291 CCTATAATGA CCCTGTCCAA TAAAGGCCCT GTCCAATAGA GCTCTGACCA ATAAAAGCCC TATTAACCTG ACCCTAACCC TATATCCATT
7381 GCAGTACCCT GTCCAATAAC CAGGTCTACT TGCTGATAAT AGCTAATGTC ACCTGCTTGC TTCAAGCTAA CTGTGAACCT CTAATGACAA
7471 TAATACCTAA ATCATTTGAT GTAACTATTG CAGCATTTGA AGAAAGGTTA TTACATTGAA CCCACCATTG TAACTGATAT CTCCACATCC
7561 ATGCAAAATG GGAAGAGGGA AGTTTTTGGC CCGTCTTGTG CTGTTAAAGC ATTTAGTTCC CAAGATGAAG CCATTGCAAT GGCATAATGT
7651 ACAGAGTAAG TTTTTCGAAT GATGATTGAG TATTCTGCTT TCATGAAGAA ACTCTTTCTT GTGTTGACCG TAGCTATGTA TTCCAGGTA
7741 CCGTTTAGCT GCTGCTGTGT TTTTAAATGA TCTTGAAGAA TGTGAGAGGA TAACGAAGGT AAGAATAACT GCACCAATCA AGCAAAACGT
7831 ATTGCTTCTT TGGTTGATAA AAAGTTTGGC TCTGCAAAAT TCGTTCAATC CTACCTATT TCGTTATGCA GGCTCTAGAA GTTGGAGCTG
7921 TTTGGGTTAA TTGCTCACA CCATGCTTTG TTCAAGCTCC TTGGGGAGGC ATCAAGCGTA GTGTTTITGG ACCTGAACCT GGCAATGGT
8011 GAGTCTAAAT TAACAGGGGT TGCTCTTTT CCTATTCAAG ATTGCAAAAT TAATAGATCT ATTTCTCATC ACAACACTTT TCTCGATCGA
8101 CAACGTGTCA GTAGTCCCAT GTACTAGGTT AGTCTGAAGT TACATGTTTG TCTAAGATAG AGGGAACCTC ATCTCCCTTG AGAAATGGCA
8191 GCGAGTCCAA GAAAGTACAC TACCTCATTC CAAATACTCT TCAGCTCTAA ACAGCTACTA CACTATTTTG CTCAATTTGA TTCAGTGTA
8281 ACTTTGATGA TGATTGGCCA ATTTTGGCCT GTAACTGCAA TTGTTATAGC AACAGCATAA AAAACACAGC AATTTTGTG TATAACTTGT
8371 TTCATAAAA TGCCCTTAGA ATATGAATTC CTGCCACGAA TCAACTAAAT CAATATTTTG TTCATGCTTT CTGCAACCAT GCTTCTCCCT
8461 TGACGTGCAC TCTACATAAA TTATGACGGG GTATCCAGAA TTACTTGAAT ATCAAGCAGG TGACTCAAGA TATTTCTGAT GAACCATGGG
8551 GATGGTACAA GTCTCCTTGA ACCTATGATC AAATTTGAAT CACGGTGTG TTTTGTGTTA GTGAGCAGCG GTTGGACTGT ACCTTGAAAT
8641 GCTTCGCAGA GAAGGTGCG TTTACAGTAA AAATGCAATT AATAAGGCT TGGTTGATGC ACAAGTCCAA CAAGCATAGC TTAATTTTGT
8731 TGTATCATGT ACTAGTGTGT ATTATTCAG ACAATTGAGT TGGATCAGAA ATAAGATGAT ACAGAGTTTG ACAATGAAAT TCTTTGTCA
8821 TCTACATTCG CAGTAACCCG ATGCTTACCG ATTTCC

```

图 3 菠菜 BADH 基因核苷酸序列, 划线部分为编码区

图 3 菠菜 BADH 基因核苷酸序列, 划线部分为编码区

序列^[7], 发现所测序列在编码区大约少 100 bp. 对照克隆 D 物理图谱可知, 该 100 bp 序列位于 4.0 kb 片段之后且与之相邻, 说明用酶切方法仅得到了克隆 D 物理图谱中位于 3' 端的 0.7 kb 片段克隆及其序列. 由该 100 bp 两侧的 cDNA 序列设计了一对引物, 以 D 克隆 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 用 EcoR I 酶切扩增产物, 结果得到了一个长约 0.7 kb 的片段, 将其克隆至 pUC19 测序, 得到了 712 bp 的核苷酸序列, 其中包含所少的 100 bp 编码区序列, 说明该片段即为克隆 D 物理图谱中位于 5' 端的 0.7 kb 片段. 所测得的 8 856 bp 的 BADH 基因序列示于图 3.

2.4 BADH 基因序列分析

与发表的菠菜 BADH cDNA 序列^[7]比较, 翻译的起始密码子 ATG 位于 2 460 bp 处, 终止密码子 TGA 位于 8 570 bp 处, 所测序列包含了 2 459 bp 的 5' 侧翼序列和 286 bp 的 3' 侧翼序列. 位于 8 570 bp 处的碱基 T 的发表的序列中为 C, 相应的氨基酸由原来的丝氨酸变成了苯丙氨酸.

所测 BADH 基因中共含有 14 个内含子, 其拼接点处的序列基本上遵从 GT-AG 规律(图 4)。唯一的一个例外是第 5 个内含子, 两次测序结果均显示其 5' 端序列是 GC 而不是 GT。第 5 个内含子位于扩增产生的 0.7 kb 片段中, 有一种可能是扩增过程中出现了复制错误, 致使序列发生了改变。包括 BADH 在内的一些醛脱氢酶在相似位置上都含有 10 个保守氨基酸序列和半胱氨酸残基^[8], 反映出相应基因编码序列是相对保守的。将所测 BADH 基因启动区序列和前三个内含子序列与 GenBank 中醛脱氢酶相应序列进行同源性比较, 并未发现有明显同源性的序列片段(资料未列出), 说明基因的启动子和内含子在进化过程中变异程度相对较大。现已证明盐胁迫条件下, BADH mRNA 含量会显著增加^[5~8], 反映出 BADH mRNA 的合成是受盐诱导的。这种诱导反应可能发生在转录水平, 也可能发生在转录后 RNA 的加工过程, 或者二者兼而有之, 为此需要对 BADH 基因启动子和内含子作进一步研究。

本文测定的菠菜 BADH 基因序列已纳入 GenBank Data Library. Accession No. U69142.

参 考 文 献

- 1 Rhodes D, Hanson A D. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1993, 44: 357~384
- 2 Yang Wenju, Nadolska-Orczyk A, Wood K V, et al. Near-isogenic lines of maize differing for glycinebetaine. *Plant Physiol*, 1995, 107: 621~630
- 3 McCue K F, Hanson A D. Drought and salt tolerance: understanding and application. *TIBTECH*, 1990, 8: 358~362
- 4 肖 岗, 张耕耘, 刘风华, 等. 山菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因研究. *科学通报*, 1995, 40(8): 741~745
- 5 Ishitani M, Nakamura T, Han S Y, et al. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol*, 1995, 27: 307~315
- 6 McCue K F, Hanson A D. Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. *Plant Mol Biol*, 1992, 18: 1~11
- 7 Weretilnyk E A, Hanson A D. Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 2 745~2 749
- 8 Wood A J, Saneoka H, Rhodes D, et al. Betaine aldehyde dehydrogenase in Sorghum. *Plant Physiol*, 1996, 110: 1 301~1 308
- 9 Thomas H T, Steven D T. A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydration plant tissue. *Plant Mol Biol*, 1990, 8: 297~301
- 10 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

内含子	拼接点序列(5'-3')
1	GTTAG.....TTCAG
2	GTAAT.....TGCAG
3	GTGAA.....TTTAG
4	GTAAT.....TGAAG
5	GCATG.....TTCAG
6	GTTAT.....AACAG
7	GTGAG.....TGCAG
8	GTTAG.....GCCAG
9	GTAAG.....TATAG
10	GTATA.....TTCAG
11	GTAAA.....TGCAG
12	GTAAG.....CCCAG
13	GTAAG.....TGCAG
14	GTGAG.....TGCAG

图 4 菠菜 BADH 基因 14 个内含子拼接点处序列

图 4 菠菜 BADH 基因 14 个内含子拼接点处序列

(1997-05-23 收稿, 1997-06-29 收修改稿)