

研究报告

Research Report

海马齿甜菜碱醛脱氢酶基因在大肠杆菌中表达

杨成龙^{1,2,3*} 刘姣^{1*} 周扬^{1,3,4} 李瑞梅¹ 段瑞军¹ 符少萍¹ 胡新文³ 郭建春^{1**}

1 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海口, 571101; 2 贵州省亚热带作物研究所, 兴义, 562400; 3 海南大学农学院, 海口, 570228; 4 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉, 430070

* 同等贡献作者

**通讯作者, jianchunguoh@163.com

摘要 本研究利用从海马齿中克隆到的甜菜碱醛脱氢酶基因构建到高效表达载体 pGEX-4T-1 上, 构建重组载体 pGEX-4T-*SpBADH*, 并对 GST-*SpBADH* 融合表达的 IPTG 诱导浓度、诱导不同温度、不同菌液浓度和诱导时间等条件进行优化。研究结果表明: 随诱导时间增长 GST-*SpBADH* 融合蛋白表达量提高, 在 37°C 时, OD 为 0.6 左右, 诱导 5 h GST-*SpBADH* 融合蛋白的表达量达到最大, 在 0.2 mmol/L IPTG 浓度下, 可以有效诱导 GST-*SpBADH* 融合蛋白的表达。本研究结果以期解析 *SpBADH* 基因的功能以及在海马齿抗盐过程中的作用机理。

关键词 海马齿, 甜菜碱醛脱氢酶, 原核表达

Expression of Recombinant Betaine Aldehyde Dehydrogenase of *Sesuvium portulacastrum* in *Escherichia coli*

Yang Chenglong^{1,2,3*} Liu Jiao^{1*} Zhou Yang^{1,3,4} Li Ruimei¹ Duan Ruijun¹ Fu Shaoping¹ Hu Xinwen³ Guo Jianchun^{1**}

1 Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Ministry of Agriculture, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, 571101; 2 Guizhou Institute of Subtropical Crops, Xingyi, 562400; 3 College of Agriculture Hainan University, Haikou, 570228; 4 College of Plant Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430070

* These authors contributed equally to this work

** Corresponding author, jianchunguoh@163.com

DOI: 10.13271/j.mpb.012.001275

Abstract A full-length *betaine aldehyde dehydrogenase* gene sequence of *Sesuvium portulacastrum* was cloned into the high expression vector pGEX-4T-1, and named pGEX-4T-*SpBADH*. The GST-*SpBADH* fusion protein was expressed induced by IPTG. The expression conditions such as IPTG concentration, the bacterium concentration, induction time and temperature were optimized. The results showed that the expression level of GST-*SpBADH* was increased by accompanying with the induction time. In the condition of 37°C, OD₆₀₀ is 0.6 and cultured 5 hours, GST-*SpBADH* fusion protein reached the highest expression. 0.2 mmol/L concentration of IPTG can induce GST-*SpBADH* expression effectively in *Escherichia coli* expression system. The aim of this research was to analyze the function and salt tolerance mechanism of *SpBADH* gene.

Keywords *Sesuvium portulacastrum* L., Betaine aldehyde dehydrogenase, Prokaryotic expression

海马齿(*Sesuvium portulacastrum* L.)是一种真盐生红树林植物, 该属一共有 8 个种, 在中国只有 1 个种, 多生长于热带和亚热带滨海(<http://frps.eflora.cn/frps/%E6%B5%B7%E9%A9%AC%E9%BD%BF>).

收稿日期: 2014-06-15

接受日期: 2014-07-10

网络出版日期: 2014-09-27

URL: <http://biopublisher.cn/index.php/mpbopa/article/view/2351>

基金项目: 本研究由海南省重大科技专项(ZDX2013023-1)、中国热带农业科学院农业杰出人才项目(CATAS-1630052014004)和中央级公益性科研院所基本科研业务专项基金(ITBB130302)共同资助

海马齿具有极强逆境耐受能力，且在海水和淡水环境中均能良好生长，是一种研究盐生植物耐盐机理的理想材料(杨成龙等, 2010)。甜菜碱是植物体内一种应对非生物胁迫的小分子渗透调节物质。甜菜碱不仅对提高植物的抗旱, 抗盐等方面起着重要作用, 还对很多代谢过程中的酶类结构稳定, 活性保持等有重要作用(Huang et al., 2000; Nishiyama et al., 2006; Yang et al., 2008; Chen and Murata, 2008; Fu et al., 2011; Fan et al., 2012)。

在植物体内, 甜菜碱以胆碱为底物, 经两步催化合成, 即乙酰胆碱→甘氨酸甜菜碱醛→甘氨酸甜菜碱, 其中甜菜碱醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase, BADHase)是甜菜碱醛氧化生成甜菜碱的关键酶。甜菜碱醛脱氢酶(BADHase)属于醛脱氢酶家族 10 (ALDH10), 调控甜菜碱合成与代谢的动态平衡。目前, 已在多种植物中克隆到 BADH 基因, 并成功地转入到植物中, 以提高植物的抗逆性。

本研究对首次克隆的海马齿甜菜碱醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase of *S. portulacastrum*, SpBADH) 基因在原核生物表达系统进行表达研究, 并诱导 SpBADH 蛋白表达及其最佳表达条件的优化, 最终得以使 SpBADH 蛋白在原核系统中高效表达, 为 SpBADH 的进一步纯化和生物活性研究及海马齿抗逆性研究奠定基础。

1 结果与分析

1.1 SpBADH 基因的克隆和重组基因片段的序列鉴定

海马齿 RNA 的提取参考曾会才(2003)和杨成龙等(2008)的方法, 提出总 RNA, 1%非变性琼脂糖凝胶检测, 结果表明, RNA 条带清楚, 且 28S rRNA 与 18S rRNA 之比为 2:1, 带与带之间无弥散现象, 说明 RNA 完整性比较好(图 1)。以反转录的 cDNA 为模板, 用 SpBADH 基因的上游和下游特异引物扩增, 得到一条 1 500 bp 左右特异条带(图 2)。将所得特异条带经 1%琼脂糖凝胶电泳后回收纯化连入 T 载体, 并转入大肠杆菌经菌液 PCR 检测选取阳性克隆进行测序。测序结果经 NCBI 中的 Blast 分析, 扩增得到的 SpBADH 序列与海马齿甜菜碱醛脱氢酶基因相似性为 100%。

1.2 SpBADH 基因及重组基因表达载体的鉴定

将连有 SpBADH 基因片段 pMD18-SpBADH 的质粒和 pGEX-4T-1 分别用 BamH I 和 Sal I 双酶切, 将两片段割胶回收并连接。将连接产物转化

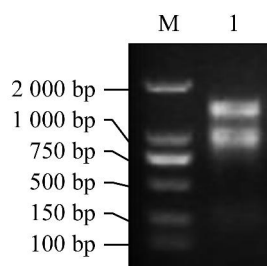


图 1 海马齿的总 RNA

注: M: DL2000 marker; 1: RNA

Figure 1 Total RNAs of *S. portulacastrum* L.

Note: M: DL2000 marker; 1: RNA

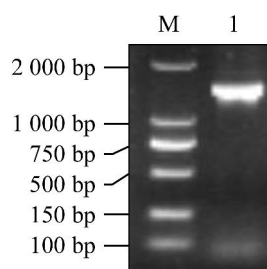


图 2 SpBADH 的 PCR 扩增

注: M: DL2000 marker; 1: SpBADH

Figure 2 PCR amplification of SpBADH

Note: M: DL2000 marker; 1: SpBADH

DH5 α , 得到重组 pGEX-4T-SpBADH 质粒, 将 PCR 扩增的阳性质粒经 BamH I 和 Sal I 双酶切鉴定所构建表达载体正确(图 3)。将所得到的阳性克隆进行测序, 结果验证了 SpBADH 基因成功定向克隆到了载体 pGEX-4T-1 中, 说明表达载体 pGEX-4T-SpBADH 构建成功。

1.3 重组 SpBADH 基因工程菌的构建及目的基因的表达

将重组质粒 pGEX-4T-SpBADH 和空载体 pG-

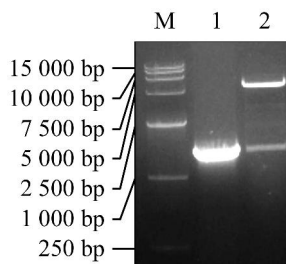


图 3 pGEX-4T-SpBADH 的 PCR 和酶切鉴定

注: M: DL15000 marker; 1: 酶切鉴定; 2: PCR 鉴定

Figure 3 The identifications of pGEX-4T-SpBADH by PCR and restriction enzyme digestion

Note: M: DL15000 marker; 1: Restriction enzyme identification; 2: PCR identification

EX-4T-1 分别转化 BL21(DE3) 表达菌株, 分别取鉴定正确的 pGEX-4T-*SpBADH* 和 pGEX-4T-1 阳性克隆进行单菌落培养。再分别以 1:100 比例加入新液体 LB 培养基中培养, $OD_{600}=0.6$ 时, 分别加入 0.2 mmol/L IPTG, 37°C 诱导 6 h, 并以诱导后的菌体为样品, 以未诱导的作为对照样品, 进行 SDS-PAGE 电泳。SDS-PAGE 电泳结束后以考马斯亮蓝染色, 可以看到重组 BL21(DE3) 表达菌经诱导后分别在 66 kD 和 25 kD 处有一条蛋白质带, 这与我们预测的海马齿 BADH 和 GST 的大小一致, 说明重组的 pGEX-4T-*SpBADH* 质粒能够在宿主菌 BL21(DE3) 中表达, 而空白菌株和带有目的片段但未诱导的菌体均无此产物出现(图 4)。

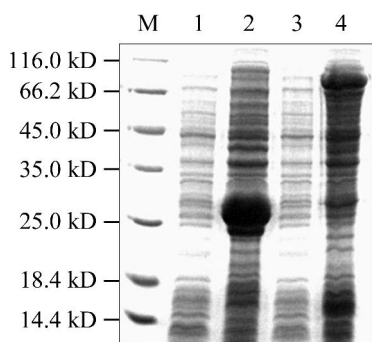


图 4 *SpBADH* 在大肠杆菌中诱导表达的 SDS-PAGE 分析

注: M: 蛋白质分子量标准; 1: 空载体 pGEX-4T-1 未诱导菌体总蛋白; 2: 空载体 pGEX-4T-1 诱导菌体总蛋白; 3: *SpBADH* 未诱导对照菌体总蛋白; 4: *SpBADH* 诱导菌体总蛋白

Figure 4 SDS-PAGE analysis of *SpBADH* inducible expression in *E. coli*

Note: M: Protein molecular weight marker; 1: Total protein of pGEX-4T-1 in BL21(DE3) without IPTG; 2: Total protein of pGEX-4T-1 in BL21(DE3) with IPTG; 3: Total protein of pGEX-4T-*SpBADH* in BL21(DE3) without IPTG; 4: Total protein of pGEX-4T-*SpBADH* in BL21(DE3) with IPTG

1.4 重组 *SpBADH* 基因工程菌诱导条件的优化

对重组 pGEX-4T-*SpBADH* 的工程菌的表达诱导条件进行优化, 筛选出重组工程菌最合适的诱导条件, 为蛋白质的纯化和生物活性的检验奠定基础。

(1) 最适 IPTG 浓度。对重组 *SpBADH* 大肠杆菌表达工程菌进行 IPTG 诱导浓度优化, 取工程菌 6 个浓度梯度诱导的菌体制样, 并经 SDS-PAGE 凝胶电泳, 经考马斯亮蓝染色和脱色分析。结果表明目的蛋白质均有表达, 但其表达量随着 IPTG 浓度的增加, 而没有显著差异(图 5)。结果说明重组 *SpBADH* 大肠杆菌的表达量与 IPTG 浓度关系相关性不紧密, 工程

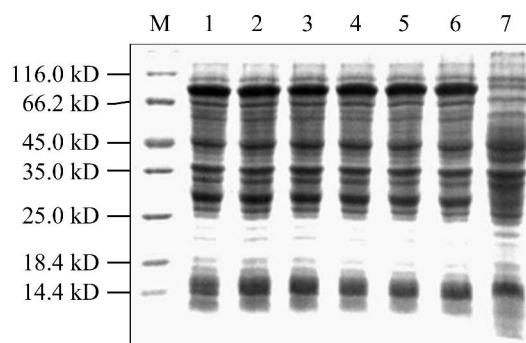


图 5 37°C 下最适 IPTG 浓度

注: M: 蛋白质分子量标准; 1~6: pGEX-4T-*SpBADH* 分别在 1.0 mmol/L, 0.8 mmol/L, 0.6 mmol/L, 0.5 mmol/L, 0.2 mmol/L 和 0.1 mmol/L 的 IPTG 浓度诱导下的菌体总蛋白; 7: pGEX-4T-*SpBADH* 未诱导对照菌体总蛋白

Figure 5 Confirmation of the optimum IPTG concentration at 37°C

Note: M: Protein molecular weight marker; 1~6: Total protein of pGEX-4T-*SpBADH* in BL21(DE3) induced with different concentration of IPTG 1.0 mmol/L, 0.8 mmol/L, 0.6 mmol/L, 0.5 mmol/L, 0.2 mmol/L and 0.1 mmol/L at 37°C; 7: Total protein of pGEX-4T-*SpBADH* in BL21(DE3) without IPTG

菌在不同 IPTG 浓度的表达量差异不显著, 为了考虑 IPTG 对菌体有毒害作用, 所以选择最佳 IPTG 浓度为 0.2 mmol/L。

(2) 最佳诱导菌株的起始生长量。对重组 *SpBADH* 大肠杆菌表达工程菌进行诱导起始 OD_{600} 优化, 取 6 个起始 OD_{600} 0.2、0.5、0.6、0.8、1.0 和 1.2 诱导的工程菌全蛋白进行制样, 取相同量的样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 通过考马斯亮蓝染色和脱色进行分析。从结果中可以看出重组大肠杆菌表达工程菌诱导起始 OD_{600} 为 0.6 时表达量增加幅度最高, 随着 OD_{600} 的增加工程菌的表达量也有所增加, 但幅度较平缓(图 6)。因此对重组大肠杆菌表达工程菌诱导起始的 OD_{600} 为 0.6。

(3) 最佳诱导温度。对重组 *SpBADH* 大肠杆菌表达工程菌进行诱导温度优化, 取 5 个温度 37°C、33°C、30°C 和 28°C 诱导的工程菌全蛋白进行制样, 取相同量的样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 通过考马斯亮蓝染色和脱色进行分析。重组大肠杆菌表达工程菌在 37°C 下诱导蛋白表达量最高, 在其他温度时工程菌也可诱导表达(图 7)。因此重组大肠杆菌表达工程菌 BL21(DE3)/pET-*SpBADH* 的诱导表达的最佳温度为 37°C。

(4) 最佳诱导时间。重组菌生长至 $OD_{600}=0.6$ 时, 向菌液中添加 0.2 mmol/L IPTG, 分别在诱导不同时

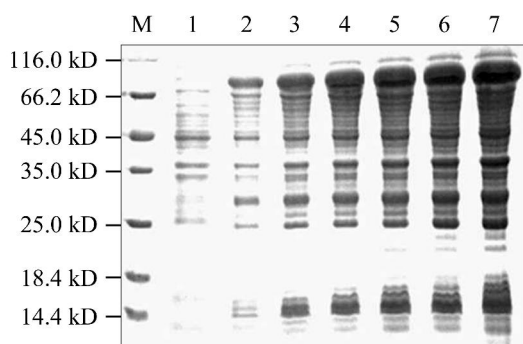


图 6 37°C 时最佳诱导起始生长量
注: M: 蛋白质分子量标准; 1: pGEX-4T-*SpBADH* 未诱导对照菌体总蛋白; 2~7: pGEX-4T-*SpBADH* 分别在 OD₆₀₀ 值为 0.2, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 和 1.2 时经 IPTG 诱导的菌体总蛋白
Figure 6 Confirmation of the optimum initial increment seed age at 37°C
Note: M: Protein molecular weight marker; 1: Total protein of pGEX-4T-*SpBADH* in BL21(DE3) without IPTG; 2~7: Total protein of pGEX-4T-*SpBADH* in BL21(DE3) induced at different OD₆₀₀ (0.2, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 and 1.2) at 37°C

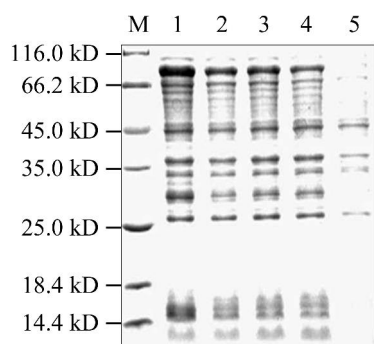


图 7 最佳诱导温度
注: M: 蛋白质分子量标准; 1~4: pGEX-4T-*SpBADH* 分别在 37°C, 33°C, 30°C 和 28°C 下经 IPTG 诱导的菌体总蛋白; 5: pGEX-4T-*SpBADH* 未诱导对照菌体总蛋白
Figure 7 Confirmation of the optimum temperature
Note: M: Protein molecular weight marker; 1~4: Total protein of pGEX-4T-*SpBADH* in BL21(DE3) induced at different temperature (37°C, 33°C, 30°C and 28°C); 5: Total protein of pGEX-4T-*SpBADH* in BL21(DE3) without IPTG

间后取菌液做 SDS-PAGE 电泳分析, 重组大肠杆菌表达工程菌诱导 5 h 时表达量最高, 随着时间的增加工程菌的蛋白表达量不变(图 8)。因此对重组大肠杆菌表达工程菌诱导时间最佳为 5 h。

2 讨论

盐胁迫是限制植物分布和影响农作物产量和品质的重要因素之一。为免受胁迫对植物体造成伤害, 植物通常形成许多保护机制来维护自身正常的生理

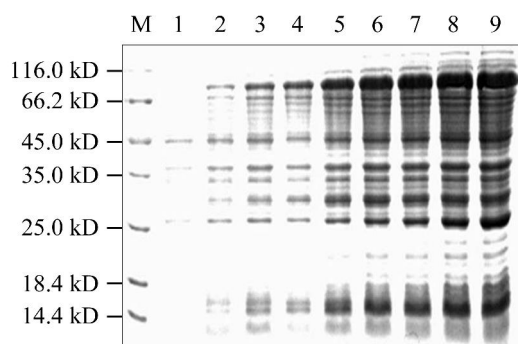


图 8 37°C 最佳诱导时间
注: M: 蛋白质分子量标准; 1: pGEX-4T-*SpBADH* 未诱导对照菌体总蛋白; 2~9: pGEX-4T-*SpBADH* 分别在 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h 和 8 h 经 IPTG 诱导的菌体总蛋白
Figure 8 Confirmation of the optimum induction time at 37°C
Note: M: Protein molecular weight marker; 1: Total protein of pGEX-4T-*SpBADH* in BL21(DE3) without IPTG; 2~9: Total protein of pGEX-4T-*SpBADH* in BL21(DE3) induced for different time (1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h and 8 h) at 37°C

代谢。植物在受到胁迫时, 迅速合成并积累大量的渗透调节物质来维持植物细胞内正常生理功能, 免受胁迫伤害。在许多渗透调节剂中, 甜菜碱是最理想的有机小分子渗透调节物质(Lehmann et al., 2010)。植物在正常生长条件下, 甜菜碱在植物体内积累量很少, 而当受到胁迫时, 甜菜碱的含量会迅速增加。由于甜菜碱在植物体内大量积累不会带来危害, 同时能提高植物对环境胁迫的抗性(Li et al., 2014)。目前, 对植物甜菜碱参与抗逆的分子机理的研究, 已成为当前研究植物抗盐机理和培育抗盐新品种的热点。

海马齿作为海滨盐生植物具有很强的抗盐能力, 且其机理有其独特的行为, 目前对海马齿在逆境下生长的自身调节机制使其能在逆境下完成生活史的调节机理不清楚。张艳琳等(2009)和杨成龙等(2010)通过不同浓度的海水处理海马齿进行研究, 结果均表明海马齿具有很强耐盐性, 渗透调节是其适应外界盐胁迫的机制之一。本研究将海马齿甜菜碱醛脱氢酶基因克隆到表达载体 pGEX-4T-1 中, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 得到能够表达 *SpBADH* 基因的重组菌株, 经 IPTG 诱导, 重组工程菌能够高效的表达 *SpBADH*。重组 *SpBADH* 工程菌最佳的高效表达的条件为: 在 37°C 下, 菌体起始浓度 OD₆₀₀ 为 0.6, 加入 IPTG 为 0.2 mmol/L, 诱导 5 h, 其重组工程菌表达蛋白的量最高。黄卓等(2013)对辽宁碱蓬中诱导甜菜碱脱氢酶 BADH 蛋白的最适条件为温度 22°C, IPTG 终浓度浓度 5 mmol/L, 200 r/min 振荡培养 4~6 h。罗笛等(2012)对水稻和菠菜甜菜碱脱氢酶 BADH

重组蛋白诱导表达的条件是 37℃ 摇床培养至 $OD_{600}=0.4\sim 0.6$, 加入 0.4 mmol/L IPTG, 18℃ 过夜培养。一般情况下, 大肠杆菌培养的最适温度为 37℃, 但有时温度高和振荡速度大都会引起重组蛋白降解, 不利于蛋白的表达。因此, 适当调整振荡速度、诱导温度和诱导时间可以保证 BADH 蛋白的表达量。另外, 不同基因在大肠杆菌中表达所需条件也会有所不同。本研究采用融合标签高效表达 SpBADH 蛋白, 为表达目的蛋白纯化, 体外研究 SpBADH 的蛋白的特性和揭示 BADH 蛋白在抗逆过程中的作用奠定基础。后续我们将对盐(以及其他逆境)处理下 SpBADH 蛋白的表达进行分析以及将重组 SpBADH 的可溶性蛋白进行了分离纯化, 并对它进行了酶学特性分析, 包括: SpBADH 酶活性的最适 pH 值、酶活性的最适温度及热稳定性、金属离子对酶活力的影响、醇类对酶活力和热稳定的影响。

3 材料和方法

3.1 试验材料

海马齿采自海南省海口市白沙门滨海, pMD18-T Vector 购自宝生物公司; 表达载体 pGEX-4T-1、大肠杆菌 DH5 α 菌株及大肠杆菌 BL21(DE3)由本实验室保存。

3.2 工具酶和主要试剂

DNA Marker 和蛋白质 Marker、小量质粒提取试剂盒、IPTG、*Bam*H I 和 *Sal* I 限制性内切酶购自上海生工公司; DNA 回收试剂盒购自申能博彩有限公司; 四甲基乙二胺(TEMED)购自 BBI 公司; T4 DNA 连接酶、*Taq* 酶购自 Sigma 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

3.3 重组载体 pGEX-4T-SpBADH 的构建与鉴定

根据海马齿甜菜碱醛脱氢酶全长基因 *SpBADH* 的 cDNA 序列(GenBank 登录号: JN192464), 设计一对可扩增 *SpBADH* 阅读框架区域的引物。上游引物为: 5'-ATCGGATCCATGGCGTTCCTATACCT-3', 引入 *Bam*H I 酶切位点(下划线部分), 下游引物为: 5'-ATCGTCTCAAGGAGACTTGTAC-3', 引入 *Sal* I 酶切位点(下划线部分)。引物由上海生工公司合成。以海马齿 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, PCR 反应体系(50 μ L)为: 5 \times PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺ plus) 10 μ L; dNTP (2.5 mmol/L each) 3 μ L; 引物各 2 μ L; 模板 2 μ L; PrimeSTAR HS DNA Polymerase (2.5 U/mL)

1 μ L; ddH₂O 30 μ L。PCR 程序: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 10 s, 60℃ 45 s, 72℃ 90 s, 35 个循环; 72℃, 10 min。取 3 μ L PCR 产物进行电泳分析, 其大小与预期一致, 并将目的片段切胶回收, 将回收目的片段加尾连接 pMD18-T Vector 送上海生工生物工程有 限公司测序, 将测序正确的阳性克隆提取质粒。将 pMD18-SpBADH 和 pGEX-4T-1 质粒分别用 *Bam*-H I 和 *Sal* I 双酶切, 将目的片段切胶回收, 分别取载体和目的片段连接, 置于 16℃, 8 h, 将连接产物转化, 将鉴定正确阳性克隆进行测序。

3.4 重组 *SpBADH* 大肠杆菌表达工程菌的表达

分别将 pGEX-4T-1 和 pGEX-4T-*SpBADH* 转化 BL21(DE3), 挑取阳性克隆, 对其进行 PCR 和双酶切鉴定。将鉴定正确的阳性克隆进行活化, 以 1:100 浓度加到带有 Kan^r 抗性的液体 LB 培养基中置于 37℃, 200 rpm, 培养至菌液浓度为 OD_{600} 0.6 左右, 加入 0.5 mmol/L IPTG 诱导 6 h, 分别取 1 mL 菌液制备蛋白质样品, 取 8 μ L 进行 SDS-PAGE 分析。

3.5 重组 *SpBADH* 基因工程菌诱导条件的优化

(1) 重组 *SpBADH* 大肠杆菌表达工程菌的诱导 IPTG 浓度的优化。将重组大肠杆菌表达工程菌进行 IPTG 浓度诱导表达的条件优化。设置 6 个浓度梯度, 分别为 0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.5 mmol/L、0.6 mmol/L、0.8 mmol/L 和 1.0 mmol/L, 诱导起始浓度 OD_{600} 为 0.6, 诱导时间 6 h, 诱导温度 37℃。诱导结束后, 取相同 OD_{600} 菌体制备样品进行凝胶电泳分析。

(2) 重组 *SpBADH* 大肠杆菌表达工程菌的诱导起始 OD_{600} 优化。将重组大肠杆菌表达工程菌进行起始 OD_{600} 诱导表达优化。设置 7 个诱导菌体起始 OD_{600} , 分别为 0.1、0.2、0.5、0.6、0.8、1.0 和 1.2 诱导 IPTG 浓度为 0.2 mmol/L, 诱导温度 37℃, 诱导时间 6 h。诱导结束后, 取相同 OD_{600} 菌体制备样品进行凝胶电泳分析。

(4) 重组 *SpBADH* 大肠杆菌表达工程菌的诱导时间优化。将重组大肠杆菌表达工程菌进行时间的诱导表达优化。设置 8 个时间点, 分别为 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、7 h 和 8 h, 诱导起始浓度 OD_{600} 为 0.6, 诱导 IPTG 浓度为 0.2 mmol/L, 诱导温度 37℃。诱导结束后, 取相同 OD_{600} 菌体制备样品进行凝胶电泳分析。

(3) 重组 *SpBADH* 大肠杆菌表达工程菌的诱导温度优化。将重组大肠杆菌表达工程菌进行温度诱导表达优化。设置 4 个诱导温度梯度, 分别为 28℃、30℃、33℃ 和 37℃, 诱导起始浓度 OD_{600} 为 0.6, 诱导

IPTG 浓度为 0.2 mmol/L, 诱导时间 6 h。诱导结束后, 取相同 OD₆₀₀ 菌体制备样品进行凝胶电泳分析。

作者贡献

杨成龙和刘姣是本研究的实验设计和实验研究的执行人, 完成数据分析和论文初稿的写作; 周扬和李瑞梅参与实验设计和实验研究的执行; 段瑞军参与数据分析; 符少萍参与实验设计, 试验结果分析; 胡新文参与项目的构思; 郭建春是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 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

本研究由海南省重大科技专项(ZDX2013023-1)、中国热带农业科学院农业杰出人才项目(CATA S-1630052014004)和中央级公益性科研院所基本科研业务专项基金(ITBB130302)共同资助。

参考文献

- Chen T.H.H., and Murata N., 2008, Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants, *Trends Plant Sci.*, 13(5): 499-505
- Fan W.J., Zhang M., Zhang H.X., and Zhang P., 2012, Improved tolerance to various abiotic stresses in transgenic sweet potato (*Ipomoea batatas*) expressing spinach betaine aldehyde dehydrogenase, *PLoS One*, 7(5): e37344
- Fu X.Z., Khan E.U., Hu S.S., Fan Q.J., and Liu J.H., 2011, Overexpression of the *betaine aldehyde dehydrogenase* gene from *Atriplex hortensis* enhances salt tolerance in the transgenic trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.), *Environ. Exp. Bot.*, 74: 106-113
- Huang J., Hirji R., Adam L., Rozwadowski K.L., Hammerlindl J. K., Keller W.A., and Selvaraj G., 2000, Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations, *Plant Physiol.*, 122(3): 747-756
- Huang Z., Wang P.W., Zhang Z., Ma J., and Dai L.Q., 2013, Expression, purification and functional identification of betaine aldehyde dehydrogenase gene in *Escherichia coli*, *Jilin Nongye Daxue Xuebao (Journal of Jilin Agricultural University)*, 35(5): 547-551 (黄卓, 王丕武, 张卓, 马建, 代力强, 2013, 甜菜碱醛脱氢酶基因在大肠杆菌中的表达、纯化及功能性鉴定, *吉林农业大学学报*, 35(5): 547-551)
- Lehmann S., Funck D., Szabados L., and Rentsch D., 2010, Proline metabolism and transport in plant development, *Amino*

- Acids*, 39(4): 949-962
- Li M.F., Guo S.J., Xu Y., Meng Q.W., Li G., and Yang X.H., 2014, Glycine betaine-mediated potentiation of *HSP* gene expression involves calcium signaling pathways in tobacco exposed to NaCl stress, *Physiologia Plantarum*, 150 (1): 63-75
- Luo D., Niu X.L., Yu J.D., and Liu Y.S., 2012, Recombination and activity assay of Betaine Aldehyde Dehydrogenase (BADH) protein of rice (*Oryza sativa* subs. *japonica*) and spinach (*Spinacia oleracea*), *Nongye Shengwu Jishu Xuebao (Journal of Agricultural Biotechnology)*, 20(12): 1390-1397 (罗笛, 牛向丽, 余进德, 刘永胜, 2012, 水稻、菠菜甜菜碱醛脱氢酶(BADH)重组蛋白表达及酶活性分析, *农业生物技术学报*, 20(12): 1390-1397)
- Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I., and Murata N., 2006, A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1757(7): 742-749
- Yang C.L., Duan R.J., and Guo J.C., 2008, Optimization methods for extracting total RNA from salt-living and succulent plant *Sesuvium portulacastrum* L., *Zhiwu Shenglixue Tongxun (Plant Physiology Communications)*, 44(5): 973-976 (杨成龙, 段瑞军, 郭建春, 2008, 盐生肉质化植物海马齿(*Sesuvium portulacastrum* L.)中总 RNA 提取方法的优化, *植物生理学通讯*, 44(5): 973-976)
- Yang C.L., Duan R.J., Li R.M., Hu X.W., Fu S.P., and Guo J.C., 2010, Preliminary study on physiological characteristics of salt-tolerance in *Sesuvium portulacastrum* L., *Shengtai Xuebao (Acta Ecologica Sinica)*, 30(17): 4617-4627 (杨成龙, 段瑞军, 李瑞梅, 胡新文, 符少萍, 郭建春, 2010, 盐生植物海马齿耐盐的生理特性, *生态学报*, 30(17): 4617-4627)
- Yang X.H., Liang Z., Wen X.G., and Lu C.M., 2008, Genetic engineering of the biosynthesis of glycinebetaine leads to increased tolerance of photosynthesis to salt stress in transgenic tobacco plants, *Plant Mol. Biol.*, 66(1-2): 73-86
- Zeng H.C., 2003, Cloning of salt tolerance-related cDNAs from mangrove plants *Sesuvium portulacastrum* L., Dissertation for Ph.D., South China University of Tropical Agriculture, Supervisor: Zhang C.F., pp.20-85 (曾会才, 2003, 红树林植物海马齿耐盐相关基因克隆, 博士学位论文, 华南热带农业大学, 导师: 张春发, pp.20-85)
- Zhang Y.L., Fan W., Cai Y.B., and Zhang Z.L., 2009, Growth and physiological responses of *Sesuvium portulacastrum* to hydroponics of different combinations of fresh and sea water, *Xibeizhiwu Xubao (Acta Botanica Boreali-Occidentali Sinica)*, 29(6): 1240-1245 (张艳琳, 范伟, 蔡元保, 张治礼, 2009, 海马齿对不同比例淡水水组培的生长和生理响应, *西北植物学报*, 29(6): 1240-1245)