DOI:10.20176/j.cnki.nxdz.20260201

宁夏枸杞抗坏血酸过氧化物酶基因*LbAPX1*的克隆及耐盐功能分析

麻玉荣[1]，梁旺利[1]，颜子怡[1]，于雯静[1]，梁文裕[1,2]，王玲霞[1,2*]
(1.宁夏大学 生命科学学院,宁夏 银川 750021；2.林木资源高效生产全国重点实验室,宁夏 银川 750021)

摘 要:抗坏血酸过氧化物酶(APX)是植物抗坏血酸-谷胱甘肽(AsA-GSH)循环的关键限速酶,在清除活性氧(ROS)、维持细胞氧化还原平衡中发挥核心作用。研究以宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)为材料,采用RACE技术克隆获得*LbAPX1*基因全长序列。该基因全长1 075 bp,开放阅读框753 bp,编码250个氨基酸。生物信息学分析表明,LbAPX1蛋白的分子质量为27.768 ku,理论等电点5.52;二级结构以α-螺旋和无规则卷曲为主,为稳定的亲水性蛋白。系统进化分析显示,其与刺萼枸杞(*Lycium ferocissimum*)同源性最高。亚细胞定位证实,LbAPX1蛋白主要分布于细胞质。qRT-PCR分析表明,*LbAPX1*基因在NaCl胁迫下显著上调表达,200 mmol/L NaCl处理时表达量最高。对转*LbAPX1*基因烟草进行0、75、100、200 mmol/L NaCl盐胁迫处理,结果显示,与野生型相比,转基因烟草在盐胁迫下表现出更强的耐盐性。在200 mmol/L NaCl处理条件下,过表达*LbAPX1*显著增强了超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)的活性,提高了羟自由基(·OH)清除能力;同时,过氧化氢(H_2O_2)与丙二醛(MDA)含量显著降低。综上,*LbAPX1*通过增强植物抗氧化防御能力、减轻氧化损伤,在盐胁迫响应中发挥重要的正调控作用。

关键词:*LbAPX1*;宁夏枸杞;氧化损伤;遗传转化;盐胁迫
分类号:(中图)S567.1+9;Q943.2 **文献标志码:**A

盐胁迫作为一种典型的非生物胁迫,能够诱导植物体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)过量积累,进而引发细胞氧化损伤。其中,过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)作为ROS中化学性质相对稳定的组分[1],可干扰细胞代谢稳态,诱发膜脂过氧化与氧化损伤,最终抑制植物的正常生长发育[2-3]。在这一过程中,抗坏血酸-谷胱甘肽(ascorbate-glutathione, AsA-GSH)循环作为植物的核心抗氧化机制,主要负责通过酶促反应清除H_2O_2。该循环的关键酶——抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)存在于高等植物、真核藻类及一些蓝细菌中,以抗坏血酸作为特异性电子供体,将H_2O_2还原为水,在源头上阻止羟基自由基等更具毒性的ROS形成[4]。*APX*基因家族在植物响应逆境胁迫中发挥着重要作用:在拟南芥中过表达猕猴桃*AcAPX1*或*AcAPX2*的组成型基因,可显著提高总AsA和GSH水平,增强拟南芥的耐盐性[5];水稻*OsAPX2*的过表达能够介导紫花苜蓿体内ROS的高效清除,增强植株的耐盐能力[6];菠菜通过提高*SoAPX*的表达量以应对盐、干旱、低温及氧化胁迫对植物产生的影响[7]。因此,氧化应激条件下,APX在维持细胞氧化还原平衡、保护蛋白质结构与功能、确保代谢途径正常运转等方面发挥着不可替代的核心作用,是对抗盐诱导氧化损伤的关键分子靶点[8]。

宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)为茄科枸杞属多年生灌木,广泛分布于宁夏、新疆、内蒙古等干旱与半干旱地区。其果实富含多糖、黄酮类及维生素等生物活性成分,是重要的药食同源植物[9-10]。宁

收稿日期:2025-11-13
基金项目:宁夏自然科学基金资助项目(2023AAC05024,2024AAC03097);国家自然科学基金资助项目(32301632,32560070)
作者简介:麻玉荣(2000—),女,硕士研究生,主要从事植物生理与分子生物学研究,(电子信箱)mayurong2023@163.com。
*通信联系人:王玲霞(1986—),女,副教授,博士,硕士研究生导师,主要从事植物生理与分子生物学研究,(电子信箱)lxwang@nxu.edu.cn。
引用格式:麻玉荣,梁旺利,颜子怡,等.宁夏枸杞抗坏血酸过氧化物酶基因*LbAPX1*的克隆及耐盐功能分析[J].宁夏大学学报(自然科学版中英文),2026,47(4):371-380.

夏枸杞对盐碱环境具有较强适应能力,不仅是盐碱地改良的优选物种,还是挖掘耐盐基因的重要资源[11]。而*APX*作为调控植物耐盐性的关键基因,课题组前期研究发现宁夏枸杞*LbAPX1*基因在NaCl胁迫下呈现差异表达[12],然而其分子特性与调控机制尚不明确。研究以宁夏枸杞为材料,利用cDNA末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE)克隆*LbAPX1*基因,通过烟草遗传转化及耐盐性表型分析,系统评估该基因在盐胁迫应答中的抗氧化功能,以期为解析宁夏枸杞*LbAPX1*响应盐胁迫的分子机制提供理论依据与试验支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料与处理

宁夏枸杞'宁杞1号'种子由宁夏农林科学院枸杞工程中心惠赠。挑选颗粒饱满的种子,经消毒处理后播种于腐殖土:蛭石:珍珠岩(1∶1∶1,体积比)基质中;在温度(25±2)℃、湿度42%、光周期12 h/12 h(光照/黑暗)、光照强度60 μmol/(m^2·s)的条件下培养两个月后,选择长势一致的健康幼苗,分别用0、100、200、300 mmol/L NaCl溶液进行胁迫处理,处理7 d后,剪下叶片迅速置于液氮中冷冻,随后转移至-80 ℃冰箱中保存备用[13]。每个处理设置3次生物学重复。

真核表达实验材料为本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*);植物双元表达载体pCAMBIA 2300-EGFP和农杆菌菌株GV3101均由本实验室保留。

1.2 宁夏枸杞*LbAPX1*基因克隆

采用TIANGEN多糖多酚植物总RNA试剂盒提取不同浓度NaCl处理的宁夏枸杞叶片总RNA。使用Fermentas公司的RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒进行cDNA第一链的合成。采用Primer 6.0软件,分别设计3′ RACE引物3′ *LbAPX1*-1和3′ *LbAPX1*-2,5′ RACE引物5′ *LbAPX1*-GSP1、5′ *LbAPX1*-GSP2、5′ *LbAPX1*-GSP3以及中间片段引物*LbAPX1*-F,*LbAPX1*-R(表1)。使用逆转录酶SMARTScribe™ Reverse Transcriptase、SUPERSCRIPT Ⅱ RT酶以及3′ CDS primer A、5′ *LbAPX1*-GSP1引物进行总RNA的逆转录,合成cDNA后进行PCR扩增;经凝胶电泳检测、切胶回收及测序后,分别获得中间片段、3′端序列、5′端序列。利用DNAMAN软件进行序列拼接,获得完整的mRNA序列,进而得到宁夏枸杞*LbAPX1*基因的全长cDNA序列。

表1 引物名称及序列

Tab. 1 Primer names and sequences

用途	引物名称	引物序列(5′~3′)
内参引物	*Actin*-F	GACTTCAAAATCTGGCTCTTCTGTC
	Actin-R	TCTATCAGCAATACCAGGGAACA
基因克隆引物	3′*LbAPX1*-1	TCAGGATATGAGGGACCATGGACT
	3′*LbAPX1*-2	ATCCAGTCTTCCGCCCCCTCGTTG
	5′*LbAPX1*-GSP1	GAACCGCAATGTCAAG
	5′*LbAPX1*-GSP2	TAAGTTCATCAGGGTGCC
	5′*LbAPX1*-GSP3	CCAGTTTTGGTTTTGACATC
	LbAPX1-F	TAGTTTGGAAATCAACGG
	LbAPX1-R	AGAGACAATTGAAACAGC
宁夏枸杞qRT-PCR引物	*LbAPX1*-QRT-F	ACTCGGCTGGGACATTTGAT
	LbAPX1-QRT-R	GCCTGAGGCAGACGACCTTC
过表达载体目的基因扩增引物	*LbAPX1*-CAM-EGFP-F	CATTTGGAGAGGACACGCATGGGAAAGTGTTATCCAACGG
	LbAPX1-CAM-EGFP-R	TCGCCCTTGCTCACCATGAACTCTGCATCTGCAAATCCGA
转基因烟草PCR鉴定引物	*LbAPX1*-T-F	GAAACCTCCTCGGATTCCATTG
	LbAPX1-T-R	GAATGCCATGCCAGTCGAAG
7个不同株系的转基因烟草qRT-PCR引物	*LbAPX1*-O-F	GAGACAGGACAAGACTGAACCA
	LbAPX1-O-R	CCAGAGTGTGAGCACCAGATAA
盐胁迫后的2个株系的转基因烟草qRT-PCR引物	*LbAPX1*-F-Y	CTCACACTCTGGGAAGGTGC
	LbAPX1-R-Y	TATTTTTCAACGAGGGGGCGG

注:加粗序列为与载体同源的序列。

1.3　宁夏枸杞 *LbAPX1* 基因序列分析

对克隆得到的宁夏枸杞 *LbAPX1* 基因序列进行生物信息学分析。利用 ProtParam 在线工具（https://web.expasy.org/compute_pi/）分析该基因编码蛋白的理化性质；通过 SMART 在线工具（http://smart.embl-heidelberg.de/）对蛋白的保守结构域进行分析；蛋白质的二级与三级结构分别采用 SOPMA 在线工具（https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html）与 SWISS-MODEL 在线工具（https://swissmodel.expasy.org/interactive）进行预测分析；序列同源性比对及系统进化树构建采用 MEGA Version 11.0.13 软件完成。

1.4　盐胁迫下宁夏枸杞 *LbAPX1* 表达量及 APX 酶活性分析

宁夏枸杞叶片 RNA 的提取与 cDNA 第一链的合成按照 1.2 方法执行。qRT-PCR 定量实验使用诺唯赞生物科技有限公司（中国，南京）的试剂盒完成。采用 Primer 6.0 设计宁夏枸杞目的基因扩增引物 *LbAPX1*-QRT-F、*LbAPX1*-QRT-R（表 1），以 *Actin* 基因为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对基因相对表达量进行分析。采用苏州梦犀生物医药科技有限公司的抗坏血酸过氧化物酶活性试剂盒，对不同浓度 NaCl 处理的宁夏枸杞叶片 APX 酶活性进行测定。

1.5　烟草 *LbAPX1* 遗传转化

LbAPX1 扩增后经 PCR 验证，凝胶电泳条带大小与预期位置一致。以 pCAMBIA 2300-EGFP 为真核表达载体，利用 *Xba* Ⅰ和 *EcoR* Ⅰ对其进行双酶切，采用 NovoRec® PCR 一步定向克隆试剂盒（无缝克隆）进行连接，连接产物转化至大肠杆菌感受态细胞中，利用扩增引物进行 PCR 验证及测序鉴定。提取测序正确且鉴定为阳性的 pCAMBIA 2300-EGFP-*LbAPX1* 重组质粒，将其转化至农杆菌 GV3101 感受态细胞中，菌液复苏后挑选单菌落进行 PCR 验证，将检测为阳性的农杆菌菌落制备成甘油菌，置于－80 ℃冰箱中长期保存。

将含阳性重组质粒的农杆菌菌液置于 28℃条件下活化，随后将本氏烟草外植体浸入重悬后的菌液中侵染 8～10 min；侵染完成后，将外植体接种至 MS 培养基，于 25 ℃黑暗条件下共培养 2～4 d。共培养结束后，将外植体转移至含卡那霉素（Kana）的 MS 培养基中进行抗性初步筛选；待外植体分化出抗性芽后，转接至含 Kana 的 1/2 MS 培养基中，继续培养至形成完整再生植株。采用 SDS 法提取再生植株叶片基因组 DNA，通过 PCR 技术鉴定转基因阳性株系。将鉴定获得的 T_0 代阳性植株进行自交，收获 T_1 代种子；T_1 代种子经表面消毒后，播种于含 Kana 的 MS 培养基中进行抗性筛选，对筛选得到的 T_1 代转基因烟草幼苗再次提取基因组 DNA 并进行 PCR 验证；验证阳性的 T_1 代植株自交后，收获并保存 T_2 代种子。

利用 Primer 6.0 软件设计转基因烟草 PCR 鉴定引物 *LbAPX1*-T-F 与 *LbAPX1*-T-R（表 1），PCR 扩增程序设置为：95 ℃预变性 10 min；95 ℃变性 30 s、60 ℃退火 30 s、72 ℃延伸 30 s，共 30 个循环；最后 72 ℃延伸 10 min。用于野生型及 7 个转基因烟草株系（OE1～OE7）qRT-PCR 检测的引物为 *LbAPX1*-O-F 和 *LbAPX1*-O-R（表 1）。

1.6　宁夏枸杞 *LbAPX1* 亚细胞定位

采用烟草表皮细胞瞬时转化法研究 *LbAPX1* 蛋白的亚细胞定位。将鉴定成功的含 pCAMBIA 2300-EGFP-*LbAPX1* 重组质粒的农杆菌菌液过夜扩大培养；取 1.5 mL 培养后的菌液离心，弃去上清液，加入 1 mL 渗透液重悬菌体，室温静置 1 h 后，用于侵染本氏烟草倒三叶和倒四叶。浸染完成后，向叶片表面喷水，套上保鲜袋，置于培养室黑暗条件下过夜培养，次日拆除保鲜袋。注射侵染 3 d 后，切取叶片浸染区域，撕取表皮并制片，采用奥林巴斯激光共聚焦显微镜观察 *LbAPX1*-EGFP 融合蛋白的荧光信号分布，确定其亚细胞定位。

1.7　转基因烟草 NaCl 胁迫处理及 *LbAPX1* 表达量检测

将野生型和 T_2 代转基因烟草种子（研究选取两种不同株系的转基因烟草，分别为 OE2 和 OE3）撒播于腐殖土∶蛭石、珍珠岩（1∶1∶1，体积比）混合基质中，培养条件设置为：温度（25±2）℃，湿度 42%、光周期 12 h 光照/12 h 黑暗、光照强度 60 μmol/（m^2·s）。待种子萌发后，将幼苗移至 5 cm×5 cm 的花盆中，每盆移栽 2 株，浇灌 Hoagland 营养液；继续培养 1 个月后，选取长势一致的野生型和 2 种不同株系的 *LbAPX1* 过表达转基因烟草，进行 NaCl 胁迫处理。考虑到烟草为甜土植物，盐胁迫浓度不宜过高，实验设置 0、75、100、200 mmol/L NaCl 四个浓度梯度，每个处理设置 3 次生物学重复。处理组每隔 2 d 浇灌含对应终浓度（75、100、200 mmol/L）NaCl 的 Hoagland 营养液，每盆每次浇灌 200 mL；对照组每隔 2 d 浇灌等量不含 NaCl 的 Hoagland 营养液。胁迫处理 7 d 后，观察植株生长表型，取各处理组叶片样品迅速冷冻保存，备用。采用 Primer 6.0 软件设

计用于检测野生型、OE2及OE3株系转基因烟草的qRT-PCR引物:*LbAPX1*-F-Y、*LbAPX1*-R-Y(表1),通过qRT-PCR技术检测盐胁迫后*LbAPX1*目的基因的相对表达量。

1.8 盐胁迫下转基因烟草的生理指标测定

采用苏州梦犀生物医药科技有限公司的对应试剂盒,分别测定野生型和转基因烟草(OE2、OE3株系)的APX、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、过氧化氢酶(catalase,CAT)、过氧化物酶(peroxidase,POD)活性、H_2O_2、丙二醛(malondialdehyde,MDA)的质量浓度及羟自由基(·OH)清除率。

1.9 数据处理

所有实验均设置3次生物学重复。采用SPSS Statistics 27.0软件进行差异显著性分析,使用Microsoft Excel 2021和Origin 2024软件整理数据并绘制图表。

2 结果与分析

2.1 宁夏枸杞*LbAPX1*基因克隆

宁夏枸杞叶片总RNA的28S和18S条带清晰(图1(a)),$OD_{260}/OD_{280}=2.11$,$OD_{260}/OD_{230}=2.23$,浓度为0.57 μg/μL,表明所提取的RNA未降解且无杂质污染,纯度合格,可用于后续逆转录合成cDNA。

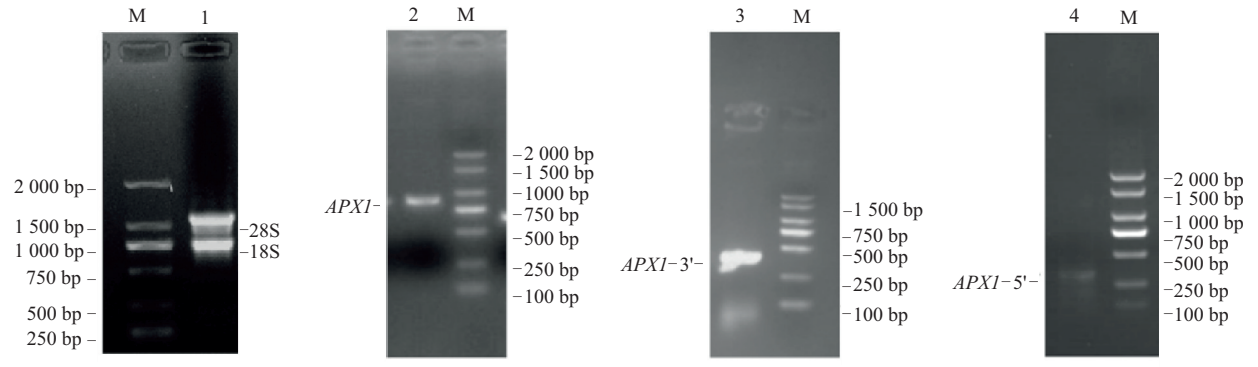
经PCR扩增获得宁夏枸杞*LbAPX1*基因的中间片段(图1(b))。将目的片段进行切胶回收、连接T载体并转化至大肠杆菌感受态细胞后,经测序分析确定,*LbAPX1*基因中间片段长度为753 bp。采用巢式PCR与梯度PCR相结合的方法,克隆获得*LbAPX1*基因的5′端和3′端序列(图1(c)、图1(d)),对目的条带进行切胶回收、连接载体及转化测序后,获得3′端和5′端碱基序列,长度分别为269 bp和367 bp。利用DNAMAN软件,将测序获得的基因中间片段序列与3′端、5′端序列进行拼接,最终得到*LbAPX1*基因的全长序列为1 075 bp,其中开放阅读框(CDS)序列长度为753 bp。

2.2 宁夏枸杞*LbAPX1*基因序列生物信息学分析

利用Prot Param软件对宁夏枸杞*LbAPX1*基因编码的蛋白质的基本特性进行分析(图2)。结果显示,LbAPX1蛋白的分子质量为27.768 ku,理论等电点为5.52,脂肪指数为80.04,不稳定系数为32.43(小于阈值40),因此推测该蛋白为稳定蛋白;亲水性平均系数(GRAVY)为−0.474<0,预测该蛋白为亲水性蛋白;其分子式为$C_{1252}H_{1935}N_{331}O_{372}S_6$。

采用SOPMA在线工具对LbAPX1蛋白的二级结构进行预测分析(图2(a))。结果表明,二级结构各组分中,α-螺旋含91个氨基酸,占比36.40%;无规则卷曲含110个氨基酸,占比44.00%;延伸链含29个氨基酸,占比11.60%;β-转角含20个氨基酸,占比8.00%。在SWISS-MODEL在线工具中,选取预测相似度最高的2y6b.1.A作为模板序列,对LbAPX1蛋白的250个氨基酸进行同源建模(图2(b)),该同源模型覆盖了宁夏枸杞*LbAPX1*氨基酸序列的83.87%。由图可见,LbAPX1蛋白的空间结构以α-螺旋和无规则卷曲为主,与二级结构预测结果基本一致。

将宁夏枸杞LbAPX1蛋白的氨基酸序列进行同源性比对,并利用MEGA Version 11.0.13软件构建系统进化树(图2(c))。结果显示,宁夏枸杞LbAPX1蛋白与刺萼枸杞(*Lycium ferocissimum*)的蛋白聚为一类,二者同源关系最近。



(a) 宁夏枸杞叶片总RNA (b) *LbAPX1*基因中间片段扩增 (c) *LbAPX1*基因3' 片段克隆 (d) *LbAPX1*基因5' 片段克隆

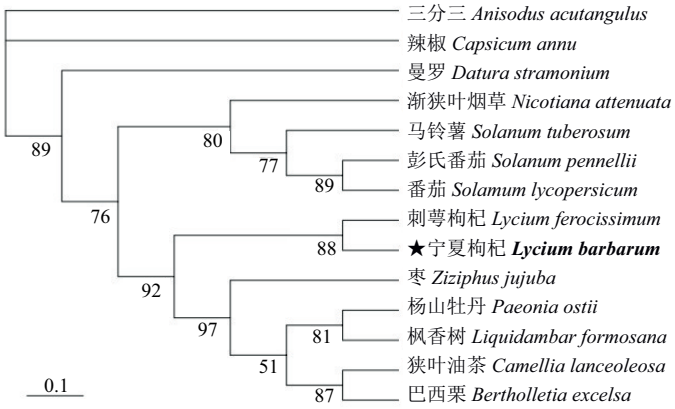
注:M为DL 2000;1为RNA;2为*LbAPX1*基因中间片段;3为3′ RACE PCR产物;4为5′ RACE PCR产物。

图1 宁夏枸杞叶片总RNA及*LbAPX1*基因克隆

Fig. 1 Total RNA extracted from *L. barbarum* leaves and cloning of *LbAPX1* gene



(a) *LbAPX1*基因推译蛋白氨基酸序列　　(b) *LbAPX1*基因推译蛋白三级结构



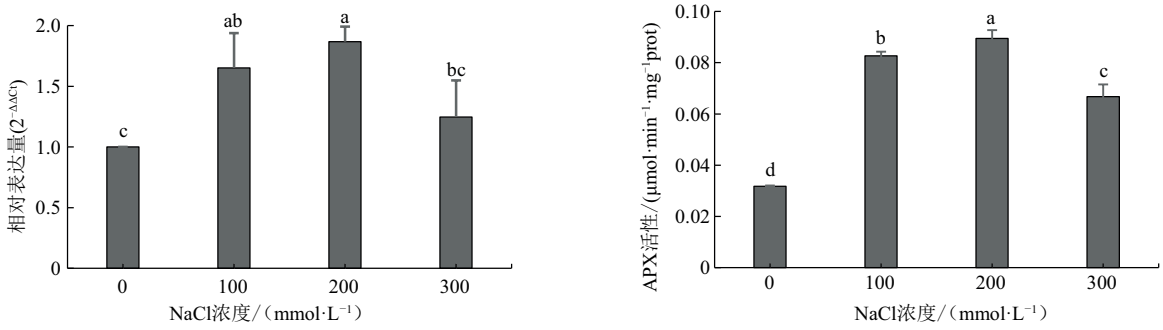
(c) 基于*LbAPX1*基因编码蛋白的氨基酸序列构建的系统进化树

图 2　宁夏枸杞 *LbAPX1* 基因序列生物信息学分析

Fig. 2　Bioinformatic analysis of the *LbAPX1* gene sequence from *L.* barbarum

2.3　盐胁迫下宁夏枸杞 *LbAPX1* 表达量分析及 APX 酶活性

对不同浓度 NaCl 处理的宁夏枸杞叶片 *LbAPX1* 基因进行 qRT-PCR 分析，结果见图 3。由图 3(a))可知，随着 NaCl 胁迫浓度的升高，*LbAPX1* 的相对表达量呈先上升后下降的趋势，在 200 mmol/L NaCl 处理下达到峰值；当 NaCl 浓度升高至 300 mmol/L 时，其表达量下降，且与对照组相比，差异不具有统计学意义。此外，对不同 NaCl 浓度处理下的宁夏枸杞叶片 APX 酶活进行测定。由图 3(b)可知，与对照组相比，各 NaCl 处理组的 APX 酶活性均显著升高，且酶活性的变化趋势与 *LbAPX1* 基因的表达模式基本一致，表明 *LbAPX1* 基因转录水平的上调可增强 APX 酶的催化活性。



(a) 盐胁迫下宁夏枸杞*LbAPX1*基因表达量　　(b) 盐胁迫下宁夏枸杞APX酶活性变化

注：数据以 3 次生物学重复的平均值±标准误表示，图中组间标注不同小写字母表示差异具有统计学意义（$P < 0.05$），下同。

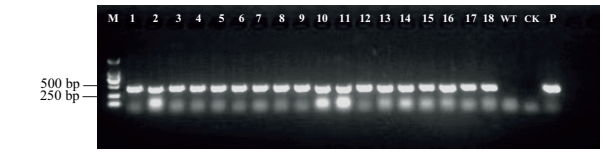
图 3　不同浓度 NaCl 处理下宁夏枸杞 *LbAPX1* 相对表达量及 APX 酶活性

Fig. 3　Relative expression of *LbAPX1* and APX activity in *L. barbarum* under different concentrations of NaCl

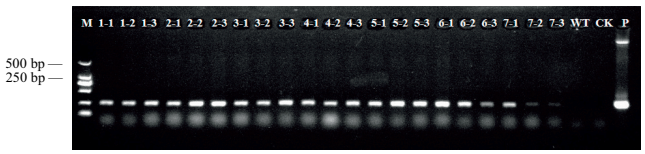
2.4　转基因烟草植株 DNA 鉴定及相对表达量分析

过表达 *LbAPX1* 烟草株系的 DNA 鉴定与目的基因的表达量分析结果见图 4。转基因烟草 PCR 鉴定结果显示，转 *LbAPX1* 烟草的目的片段大小为 300 bp，测序序列与 pCAMBIA 2300-EGFP 载体序列及部分 *LbAPX1* 目的基因片段序列相符，而野生型烟草未扩增出任何条带（图 4(a)、图 4(b)）。上述结果表明，*LbAPX1* 基因已成功连接至 pCAMBIA 2300-EGFP 载体内，且成功整合到烟草基因组中。采用 qRT-PCR 技术进一步检测 7 个转基因烟草株

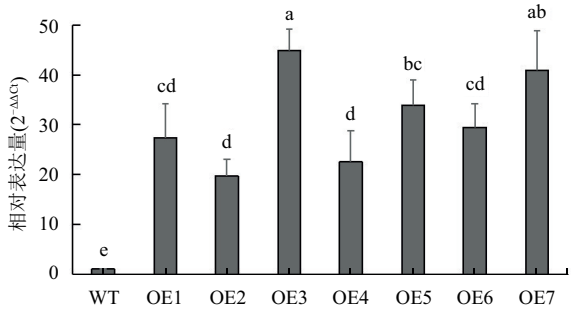
系中*LbAPX1*基因的相对表达量。结果显示(图4(c)),各转基因株系间*LbAPX1*表达水平存在明显差异,但均显著高于野生型烟草;其中,OE3株系的*LbAPX1*相对表达量最高,OE2株系的相对表达量最低。研究选取这两个表达量差异显著的转基因株系(OE2、OE3)进行后续相关实验。



(a) 过表达*LbAPX1*烟草T_0代DNA鉴定



(b) 过表达*LbAPX1*烟草T_1代DNA鉴定



(c) 野生型与转基因烟草(OE1~OE7)的*LbAPX1*表达量

注:M为DL 2000;1~18为18株转*LbAPX1*烟草DNA;1-1~7-3为7个株系的转*LbAPX1*烟草DNA;WT为阴性对照(野生型);CK为空白对照(水);P为阳性对照(农杆菌菌液)。

图4 过表达*LbAPX1*烟草株系的DNA鉴定与目的基因的表达量分析

Fig. 4 DNA identification and target-gene expression analysis in *LbAPX1*-overexpressing tobacco lines

2.5 宁夏枸杞*LbAPX1*亚细胞定位分析

亚细胞定位实验结果显示,实验组烟草表皮细胞的细胞质中可检测到明显的绿色荧光信号;同时,利用PSORT在线预测工具(https://www.genscript.com/tools/psort)对LbAPX1蛋白的亚细胞定位进行预测,结果显示其定位于细胞质的占比最高(52.2%)。结合烟草表皮细胞瞬时转化实验与在线预测两种结果,表明LbAPX1蛋白定位于细胞质中(图5)。

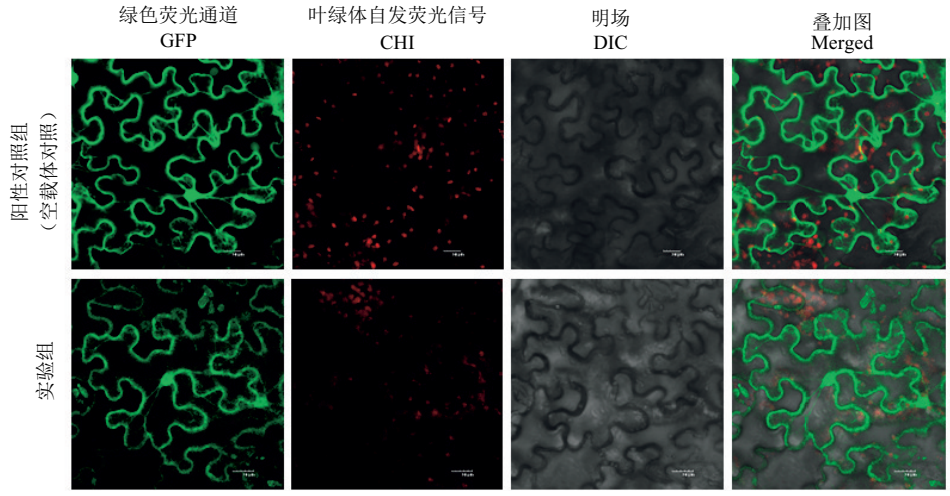


图5 宁夏枸杞*LbAPX1*亚细胞定位

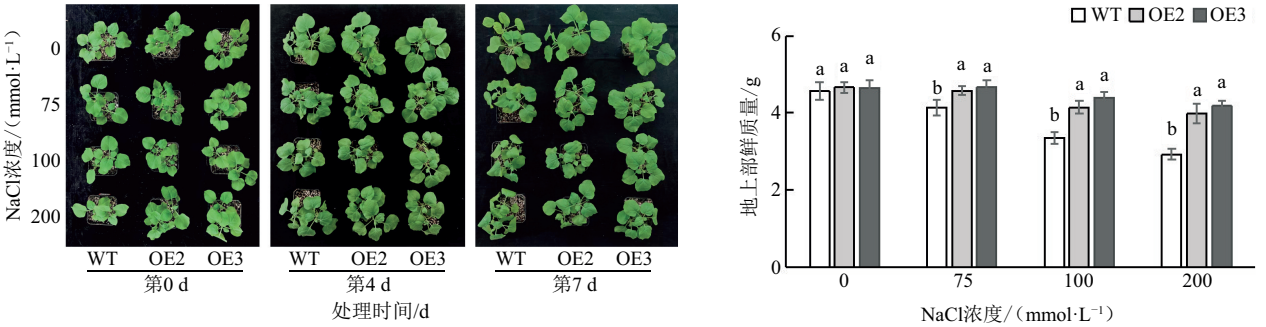
Fig. 5 Subcellular localization of *LbAPX1* in *L. barbarum*

2.6 盐胁迫下转基因烟草的表型分析

不同NaCl浓度处理下野生型及转*LbAPX1*基因烟草的表型变化和地上部鲜质量(FW)差异如图6所示。野生型烟草在100、200 mmol/L NaCl胁迫处理第7天时已出现明显萎蔫现象,而转*LbAPX1*基因烟草(OE2、OE3株系)叶片生长状态良好,无明显异常。盐胁迫处理7 d后,转基因烟草植株的鲜质量显著高于野生型烟草。上述结果表明,盐胁迫对*LbAPX1*过表达转基因烟草的伤害显著小于野生型,*LbAPX1*基因的过表达可增强烟草的耐盐性。

2.7 盐胁迫下转基因烟草的*LbAPX1*表达量分析

对盐胁迫下野生型及OE2、OE3两种不同株系的转*LbAPX1*基因烟草叶片进行qRT-PCR表达量分析。结果显示,在各浓度NaCl胁迫处理下,转*LbAPX1*基因烟草的*LbAPX1*相对表达量均显著高于野生型烟草;对比两个转基因株系发现,OE3株系在各NaCl处理组中的*LbAPX1*相对表达量均显著高于OE2株系(图7)。



(a)　野生型与转*LbAPX1*烟草植株的表型变化　　(b)　野生型与转*LbAPX1*烟草植株的地上部鲜质量差异

图 6　不同浓度 NaCl 胁迫下野生型和转 *LbAPX1* 烟草植株表型变化和地上部鲜质量

Fig. 6　Phenotypic changes and shoot fresh weight of wild type and *LbAPX1*-transgenic *N. benthamiana* plants under different concentrations of NaCl

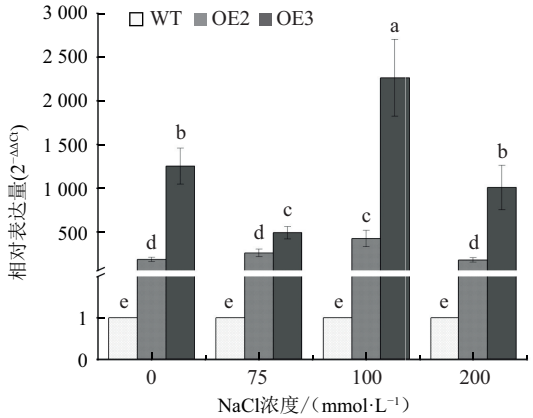


图 7　不同浓度 NaCl 胁迫下转 *LbAPX1* 基因烟草的相对表达量

Fig. 7　Relative expression of *LbAPX1* in transgenic *N. benthamiana* plants under different concentrations of NaCl

2.8　盐胁迫下转基因烟草相关抗氧化生理指标变化

对盐胁迫下野生型（WT）及 *LbAPX1* 过表达转基因烟草（OE2、OE3 株系）的相关抗氧化酶活性及氧化损伤指标进行测定，结果如图 8 所示。NaCl 胁迫处理后，与野生型（WT）相比，*LbAPX1* 过表达转基因烟草的 APX 酶活性在各浓度盐胁迫下均显著升高（图 8(a)），且 H_2O_2 含量均显著降低（图 8(b)）；在 200 mmol/L NaCl 胁迫下，转基因烟草的·OH 清除率及 SOD、POD、CAT 三种抗氧化酶活性均显著高于野生型（图 8(c)～(f)），而 MDA 含量显著低于野生型烟草（图 8(g)）。值得注意的是，在 200 mmol/L NaCl 胁迫条件下，OE3 株系的 SOD、POD、APX 三种酶活性及·OH 清除率均显著高于 OE2 株系。

3　讨论

宁夏枸杞是一种能够适应盐碱环境的药食同源植物，挖掘其耐盐基因并解析其功能，对阐明该物种响应盐胁迫的分子调控机制具有重要意义。研究利用 RACE 技术克隆获得宁夏枸杞 *LbAPX1* 基因，其全长 1 075 bp，开放阅读框 753 bp，编码 250 个氨基酸。生物信息学分析表明，LbAPX1 蛋白的二级结构以 α-螺旋和无规则卷曲为主，亚细胞定位预测显示该蛋白位于细胞质。系统进化分析进一步揭示，宁夏枸杞 *LbAPX1* 与茄科枸杞属的刺萼枸杞（*Lycium ferocissimum*）相应基因同源性较高，提示二者在调控植物生长与胁迫响应中可能具有相似功能。

在逆境胁迫下，植物细胞内代谢失衡会导致 ROS 迅速积累，引发氧化胁迫，进而通过脂质过氧化、蛋白质氧化等途径对 DNA 及其他细胞组分造成损伤。因此，维持细胞内 ROS 的动态平衡至关重要。*APX* 基因家族不仅参与植物生长发育调控[14-15]，还在多种非生物胁迫（如干旱、低温和盐害）应答中发挥关键作用[16-18]。APX 能够高效清除 H_2O_2，减轻 ROS 引起的细胞氧化损伤，并与其他抗氧化酶协同维持细胞内氧化还原稳态，抑制 MDA 等膜脂过氧化产物的生成，从而保护细胞膜结构的完整性[19]。研究发现，200 mmol/L NaCl 胁迫下宁夏枸杞 *LbAPX1* 基因表达量达到峰值，而 300 mmol/L NaCl 胁迫下其表达量开始下降，但与对照组相比变化不显著（图 3(a)）。这一现象可能源于高盐胁迫超出了宁夏枸杞的生理耐受阈值：当盐胁迫强度过高时，细胞内 ROS 爆发速度超过抗氧化系统的清除能力，进而损伤转录系统，导致 *LbAPX1* 基因转录水平受到抑制。进一步分析表明，APX 酶活性的变化趋势与 *LbAPX1* 基因表达模式高度吻合（图 3(b)），提示低浓度盐胁迫可诱导 *LbAPX1* 基因转录上调，进而增强 APX 酶催化活性，而高浓度盐胁迫则会干扰该基因的正常表达，最终影响酶活性[20]。

研究从 7 个转基因株系中，选取 *LbAPX1* 表达量最高的 OE3 和最低的 OE2 进行耐盐性分析。在 NaCl 胁迫处理 7 天后，野生型烟草叶片出现明显萎

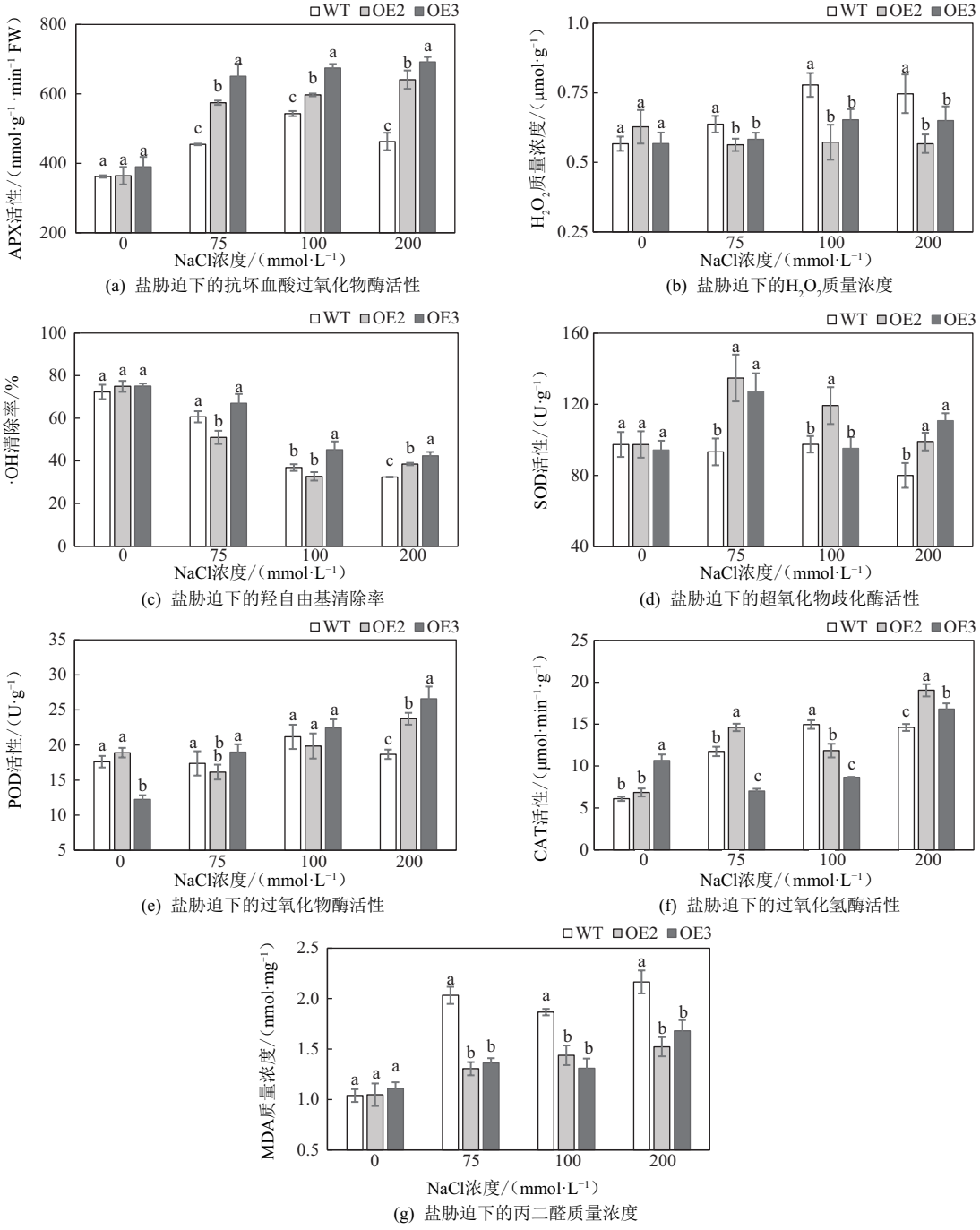


图8 转基因烟草抗氧化酶活性及氧化损伤指标的变化

Fig. 8 Changes in antioxidant enzyme activities and oxidative damage indicators of transgenic *N. benthamiana* plants

蔫(图6(a)),其地上部鲜质量也显著低于转基因株系(图6(b))。相比之下,转基因烟草叶片生长状态良好,OE3与OE2中*LbAPX1*的表达量显著高于野生型(图7)。在200 mmol/L NaCl胁迫下,转基因烟草的SOD、POD和CAT活性均显著高于野生型,而H_2O_2和MDA质量浓度在各浓度盐胁迫下均显著低于野生型。此外,转基因株系的·OH清除能力在200 mmol/L NaCl条件下也显著增强,同时伴随更高的APX活性(图8)。APX是AsA-GSH循环的核心酶类,可与SOD、CAT、POD协同维持细胞内氧化还原稳态,是植物抵御非生物胁迫的关键防线[21]。在抗氧化防御过程中,SOD首先催化毒性较强的超氧阴离子发生歧化反应,生成H_2O_2与O_2;随后APX与CAT、POD协同作用清除H_2O_2。与此同时,APX在清除H_2O_2的过程中产生单脱氢抗坏血酸(monodehydroascorbate, MDHA),该物质可通过AsA-GSH循环驱动GSH的合成。GSH不仅是抗坏血酸再生的关键底物,还能保护SOD、POD、CAT的蛋白结构免受氧化修饰,进而维持其催化活性的稳定性[22]。由此可见,在盐胁迫条件下,过表

达*LbAPX1*的转基因烟草中，APX可与其他抗氧化酶协同作用，构成植株抵御盐离子毒害与氧化损伤的重要防御机制之一。

此外，转基因株系OE3中*LbAPX1*的表达量显著高于OE2，且OE3株系的SOD、POD、APX酶活性及·OH清除率均显著优于OE2株系（图8）。这一结果表明，*LbAPX1*的表达水平差异可能影响其对抗氧化通路的调控效能[23]。具体而言，OE3株系中*LbAPX1*的高水平表达可直接提升APX酶活性，促进H_2O_2的高效清除以减轻氧化损伤[24]，最终实现植株抗氧化系统活性的稳定维持。

研究明确了宁夏枸杞*LbAPX1*基因的序列特征、表达模式，证实其异源过表达可提升植物耐盐性，为宁夏枸杞耐盐基因资源的挖掘与利用奠定了基础。但研究仍存在一定局限性：鉴于宁夏枸杞遗传转化体系尚未成熟，研究未在宁夏枸杞中开展过表达或基因敲除验证，仅通过烟草异源过表达系统间接阐明了*LbAPX1*在枸杞应答盐胁迫中的调控作用。因此，后续研究可重点构建高效的宁夏枸杞遗传转化体系，通过过表达与基因敲除相结合的策略，深入验证*LbAPX1*在宁夏枸杞自身应答盐胁迫过程中的调控机制。

4　结论

研究利用RACE技术从宁夏枸杞中成功克隆得到*LbAPX1*基因全长cDNA序列，该基因全长1 075 bp，开放阅读框753 bp，编码250个氨基酸。生物信息学分析表明，LbAPX1蛋白为稳定的亲水性蛋白，二级结构以α-螺旋和无规则卷曲为主，定位于细胞质（与前文生物信息学分析结果一致）。系统进化分析显示，LbAPX1与刺萼枸杞中的同源蛋白亲缘关系最近。qRT-PCR分析表明，盐胁迫可诱导*LbAPX1*基因上调表达，其中200 mmol/L NaCl处理时表达量达到峰值。将*LbAPX1*基因转化本氏烟草后，转基因烟草在盐胁迫下表现出更强的耐盐性，具体表现为：地上部鲜质量显著增加，APX、SOD、POD、CAT等抗氧化酶活性显著升高，H_2O_2和MDA质量浓度显著降低，ROS清除能力显著增强。综上所述，*LbAPX1*基因在植物盐胁迫应答中发挥正调控作用，其通过提升抗氧化酶活性，促进ROS的高效清除，维持细胞内代谢平衡，并增强植株整体抗氧化防御能力，最终提高植物对盐胁迫的适应能力。研究为深入解析宁夏枸杞响应盐胁迫的分子机制提供了理论依据，也为耐盐植物品种的分子育种提供了候选基因资源。

参考文献：

[1] 高海伶. 枸杞抗坏血酸过氧化物酶基因*LmAPX*的克隆及表达分析[D]. 天津：天津大学，2015.

[2] Zhao Shuangshuang, Zhang Qikun, Liu Mingyue, et al. Regulation of plant responses to salt stress[J/OL]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(9): 4609. https://doi/org/10.3390/ijms22094609.

[3] van Zelm E, Zhang Yanxia, Testerink C. Salt tolerance mechanisms of plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2020, 71: 403-433.

[4] 乔枫，耿贵工，曾阳，等. 枸杞抗坏血酸过氧化物酶基因的克隆与表达分析[J]. 中国农业大学学报，2019，24(4)：64-72.

[5] Guo Xiuhong, He Yan, Zhang Yu, et al. Kiwifruit (Actinidia chinensis 'Hongyang') cytosolic ascorbate peroxidases (*AcAPX1* and *AcAPX2*) enhance salinity tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2022, 21(4): 1058-1070.

[6] Zhang Qian, Ma Chao, Xue Xiang, et al. Overexpression of a cytosolic ascorbate peroxidase gene, *OsAPX2*, increases salt tolerance in transgenic alfalfa [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2014, 13(11): 2500-2507.

[7] 郁征宇，葛晨辉，王小丽，等. 菠菜抗坏血酸过氧化物酶基因家族的鉴定及表达分析[J]. 上海师范大学学报（自然科学版），2018，47(6)：664-672.

[8] 张馨月，王广龙，黄蔚，等. 胡萝卜抗坏血酸过氧化物酶基因的分离及其对非生物胁迫的响应[J]. 南京农业大学学报，2016，39(1)：55-62.

[9] 仇莹莹，郭二丹，彭雪，等. 宁夏枸杞研究开发综述[J]. 现代农业科技，2023(4)：188-191.

[10] 牛东玲，马婷婷，张自萍. 宁夏枸杞叶中总黄酮含量与抗氧化活性关系[J]. 宁夏大学学报(自然科学版)，2012，33(1)：55-57.

[11] 梁旺利，于雯静，胡进红，等. NaCl胁迫下宁夏枸杞ABA代谢相关基因差异表达分析[J]. 西北农业学报，2024，33(4)：664-672.

[12] 胡进红. 宁夏枸杞响应NaCl胁迫的基因差异表达及*TGA2*和*ALDH3F1*的功能分析[D]. 银川：宁夏大学，2023.

[13] 李晶晶，胡进红，梁旺利，等.‘宁杞1号’响应NaCl胁迫相关基因的差异表达分析[J]. 生物技术通报，2025，41(2)：202-209.

[14] Li Yuandong, Ma Rong, Zheng Yuxi, et al. Genome-wide identification of *APX* genes in flax (*Linum usitatissimum*) and functional characterization of *LuAPX12* in osmotic and salinity stress responses[J/OL]. BMC Plant Biology, 2025 25(1): 939. https://doi/org/10.1186/s12870-025-06902-2.

[15] Wu Bin, Li Lin, Qiu Ting, et al. Cytosolic *APX2* is

a pleiotropic protein involved in H_2O_2 homeostasis, chloroplast protection, plant architecture and fertility maintenance [J]. Plant Cell Reports, 2018, 37(6): 833-848.

[16] 汤莉,汤晖,Kwak Sang-Soo,等. 转铜/锌超氧化物歧化酶和抗坏血酸过氧化物酶基因马铃薯的耐氧化和耐盐性研究[J]. 中国生物工程杂志,2008,28(3): 25-31.

[17] 陆燕元,邓西平. 转入Cu/Zn SOD和*APX*基因对甘薯旱后复水的恢复作用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2010,38(1):67-74.

[18] 陈露,李卓夫,王晓楠,等. 低温下冬小麦SOD及APX酶相关基因的表达分析[J]. 麦类作物学报,2016,36(8):982-988.

[19] 王润豪,于永昂,胡海燕,等. 小麦抗坏血酸过氧化物酶*TaAPX*基因克隆与表达分析[J]. 华北农学报,2020,35(2):48-56.

[20] Georgieva M, Vassileva V. Stress management in plants: examining provisional and unique dose-dependent responses[J/OL]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(6): 5105. https://doi/org/10.3390/ijms24065105.

[21] Gill S S, Ttuega N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2010, 48(12): 909-930.

[22] Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes[J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53(372): 1305-1319.

[23] Birchler J, Veitia R. The gene balance hypothesis: From classical genetics to modern genomics[J]. The Plant Cell, 2007, 19(2): 395-402.

[24] 方涛,董艳苹,李亚楠,等. 水稻叶绿体抗坏血酸过氧化物酶在干旱和高盐胁迫中的作用[J]. 植物生理学报,2015,51(12):2207-2213.

Cloning and Functional Characterization of the Ascorbate Peroxidase Gene *LbAPX1* from *Lycium barbarum* L. in Salt Tolerance

MA Yurong[1], *LIANG Wangli*[1], *YAN Ziyi*[1], *YU Wenjing*[1], *LIANG Wenyu*[1,2], *WANG Lingxia*[1,2*]

(1. School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, China;
2. State Key Laboratory of Efficient Production of Forest Resources, Yinchuan 750021, China)

Abstract: Ascorbate peroxidase (APX) is a key rate-limiting enzyme in the ascorbate-glutathione (AsA-GSH) cycle and plays a central role in scavenging reactive oxygen species (ROS) and maintaining cellular redox homeostasis. In this study, *Lycium barbarum* L. was used as the experimental material, and the full-length sequence of *LbAPX1* gene was cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE) technology. The gene was 1,075 bp in length, contained a 753 bp open reading frame (ORF), and encoded a protein of 250 amino acids. Bioinformatic analysis revealed that the predicted molecular weight of the LbAPX1 molecular weight of the protein is approximately 27.768 ku, with a theoretical isoelectric point (pI) of 5.52. Its secondary structure was mainly composed of α-helices and random coils, and the protein was predicted to be stable and hydrophilic. Phylogenetic analysis indicated that *LbAPX1* shared the highest similarity with its homolog from *Lycium ferocissimum*. Subcellular localization analysis confirmed that the LbAPX1 protein was primarily localized in the cytoplasm. Quantitative real-time PCR (qRTPCR) analysis showed that *LbAPX1* expression was significantly upregulated under NaCl stress and reached its highest level under treatment with 200 mmol/L NaCl. *LbAPX1*-transgenic tobacco plants were subjected to salt stress treatments with 0, 75, 100, and 200 mmol/L NaCl. Compared with wild-type (WT) plants, *LbAPX1*-overexpressing tobacco plants exhibited enhanced salt tolerance under salt stress. Under treatment with 200 mmol/L NaCl, *LbAPX1* overexpression remarkably increased the enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX), as well as the hydroxyl radicals ($\cdot$OH)-scavenging capacity. Meanwhile, the contents of hydrogen peroxide (H_2O_2) and malondialdehyde (MDA) were significantly reduced. Taken together, *LbAPX1* plays an important positive regulatory role in plant response to salt stress by enhancing antioxidant defense and alleviating oxidative damage.

Key words: *LbAPX1*; *Lycium barbarum*; oxidative damage; genetic transformation; salt stress

(责任编辑 张 娣)