

灰绿藜和碱蒿 *NHX* 基因 3'-UTR 序列的差异性分析

李金耀 马纪 蔡伦 王艳 张富春*

新疆大学生命科学与技术学院分子生物学重点实验室, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046

Analysis of the Sequence Differences of the *NHX* Gene 3'-UTR in *Chenopodium glaucum* and *Artemisia anthifolia*

LI Jin-Yao, MA Ji, CAI Lun, WANG Yan, ZHANG Fu-Chun*

Key Laboratory of Molecular Biology, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Key Laboratory of Xinjiang Biological Resources and Genetic Engineering, Urumqi 830046

提要 采用3'末端快速扩增技术, 分别从新疆野生盐生植物灰绿藜和碱蒿中克隆 *CgNHX* 和 *AaNHX* cDNA 3'末端。测序结果表明克隆获得的片段为 *CgNHX* 和 *AaNHX* 基因3'末端, 并且 *CgNHX* 和 *AaNHX* 3'-UTR 的不同拷贝之间存在很大的差异性。序列同源性分析结果显示, *AaNHX* 基因3'-UTR 与 *CgNHX* 基因3'-UTR 同源性高达52%, 两者与 *SsNHX* (碱蓬 *NHX*) 同源性分别达到60%和54%, 表明 *NHX* 基因的加工方式可能相同, 同时说明该基因在野生盐生植物中的功能是很重要的。

关键词 灰绿藜; 碱蒿; *NHX* 基因; 3'-UTR; 植物耐盐

3'-UTR (3'-untranslated region) 不仅调控 mRNA 的体内稳定性及降解速率, 控制其利用效率, 协助辨认特殊密码子, 而且还决定 mRNA 的翻译位点及控制其翻译效率。Birnsteil 等^[1] 的研究表明, Poly(A) 位点的选择是通过其上游附近的几个具顺式作用的多聚腺苷酸化信号调节的。Wahle 和 Keller^[2] 采用缺失突变的实验表明, 3' 末端存在两个很重要的保守序列: 一是位于切割位点上游 10~35 核苷酸处的 AAUAAA 序列; 另一是 Poly(A) 位点下游的富含 U 或 GU 的序列, 它们可以被 pre-mRNA 加工复合物中特异的 RNA 结合蛋白所识别和结合。

液泡膜中的 Na⁺/H⁺ 反向运输载体 (Na⁺/H⁺ antiporter, NHX) 可促进离子在液泡中的区隔化效应, 跨液泡膜的 pH 为其提供能量。通过功能上恢复 Na⁺/H⁺ 反向运输载体 (*ScNHX1*) 缺陷型酵母突变体, 人们已从拟南芥中分离获得了 *AtNHX1* 基因, 其与哺乳动物 NHE (Na⁺/H⁺ exchanger) 反向运输载体在序列上具有相似性^[3~5]。另据报道, 在转基因拟南芥和转基因番茄中 *AtNHX1* 过量表达, 常会在液泡膜中积累大量的运输体, 从而极大地提高它们的耐盐性^[3, 5, 6]。这些结果显示, *AtNHX* 家族在钠离子的液泡区隔效应中起关键作用。

本文以新疆乌鲁木齐和五家渠地区盐碱地的野生盐生植物灰绿藜 (*Chenopodium glaucum*) 和碱蒿

(*Artemisia anthifolia*) 为实验材料, 研究 3'-UTR 在不同盐生植物 *NHX* 基因表达调控中的作用, 同时采用 3'-RACE (3'-rapid amplification of cDNA ends) 技术从灰绿藜和碱蒿总 RNA 中扩增出 *NHX* 3' cDNA 末端, 并对它们的序列做了分析比较。

材料与amp;方法

灰绿藜 (*Chenopodium glaucum*) 和碱蒿 (*Artemisia anthifolia*) 采自新疆乌鲁木齐和五家渠地区干旱盐碱地区, pMD18-T 测序载体购自 Takara 公司, 大肠杆菌 DH5a 菌株为我们实验室保藏的菌种。RNA 提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒、DNA 标准分子量、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III、exTaq 酶以及 3'-Full RACE Core Set 和 PCR 引物均购自 Takara 公司, 测序试剂盒购自美国 PE 公司, 其它试剂均为分析纯。

灰绿藜和碱蒿总 RNA 的提取依据操作试剂盒进行。

根据本实验室克隆获得的灰绿藜 *NHX* 基因核心片段序列, 设计 3'-RACE 引物序列为: P1, GAGCTCCATATTGCTTGG TTTACTCATG; P2,

收稿 2004-04-14 修订 2004-10-28

资助 国家科技攻关西部科技行动项目 (2001BA901A32) 和国家“863”项目 (2004AA227110-2)。

*通讯作者 (E-mail: zfc@xju.edu.cn, Tel: 0991-8583517)。

GATCACG AGCACTATAACTATTGTCC。依照 TaKaRa 3'-Full RACE Core Set 操作指南进行, 反转录用 oligo dT-3 sites Adaptor Primer 作下游引物, 反应条件: 42°C 30 min, 99°C 5 min, 5°C 5 min。第一次 PCR 反应用 *NHX* 基因序列设计的特异性引物 P1 和 3'-Adaptor Primer, 扩增参数: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 52.5°C 30 s, 72°C 2 min, 35 个循环; 72°C 10 min。反应产物进行琼脂糖凝胶电泳进行检测。半巢式 PCR 反应用 P2 和 3'-Adaptor Primer, 扩增参数同上, 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

CgNHX (灰绿藜 *NHX*) 和 *AaNHX* (碱蒿 *NHX*) 基因 cDNA 3' 末端的克隆按 Takara 公司 PCR 产物回收试剂盒说明书进行 PCR 产物的回收。回收的 *NHX* cDNA 片段与 pMD18-T 载体在 T_4 DNA 连接酶的作用下 16°C 过夜, 使 *NHX* cDNA 3' 末端连接到 pMD18-T 的载体上。连接产物转化感受态细胞 (感受态的制备及转化按文献 7 的方法)。

重组质粒的鉴定按文献 7 的方法, 少量提取质粒 DNA, 用 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切进行重组质粒的鉴定, 酶切反应结束后进行琼脂糖凝胶电泳鉴定, 正确的克隆进行质粒的大量提取。为鉴定克隆的 cDNA 序列, 对 pMD18-T/3' *NHX* 重组质粒进行纯化, 并用 BcaBEST primer RV-M 和 BcaBEST primer M13-47 对 *CgNHX* 和 *AaNHX* cDNA 3' 末端在 PE377 全自动测序仪进行双向 DNA 序列测定, 所得序列用 PE 公司 SeqEd v1.0.3 软件进行分析。

实验结果

1 3'-RACE 产物鉴定

采用提取的灰绿藜和碱蒿总 RNA, 分别以 oligo dT-3 sites Adaptor Primer 为引物进行反转录得到单链 cDNA, 再以设计的 PCR 引物进行扩增, 分别获得 *CgNHX* 和 *AaNHX* 基因 cDNA 的 3' 末端片段。3'-RACE 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 灰绿藜 3'-RACE 产物有 850 和 680 bp 2 条扩增条带 (图 1), 碱蒿 3'-RACE 产物有 820 和 670 bp 2 条扩增条带 (图 2), 与我们预计的大小一致。

2 测序载体的构建及其鉴定

3'-RACE 产物与克隆载体 pMD18-T 连接, 构

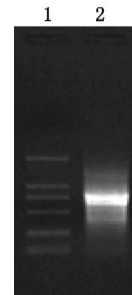


图1 *CgNHX* cDNA 3' 末端扩增
1: DL2000 DNA 分子量标准; 2: *CgNHX* cDNA。

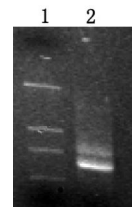


图2 *AaNHX* cDNA 3' 末端扩增
1: DL2000 DNA 分子量标准; 2: *AaNHX* cDNA。

建了重组质粒 pMD18-T/3' *NHX*, 不同克隆的编号分别为: pMD18-T/3' *CgNHX*1-1、1-2、1-3、1-4 和 pMD18-T/3' *AaNHX*1-1、1-2。重组质粒用 *Bam*HI 和 *Hind*III 酶切, pMD18-T/3' *CgNHX*1-1、1-2、1-3、1-4 分别切出约 680、840、790 和 900 bp 的 DNA 片段 (图 3), pMD18-T/3' *AaNHX*1-1、1-2 分别切出约 670 和 820 bp 的 DNA 片段 (图 4), 与预计的连接片段大小相同。

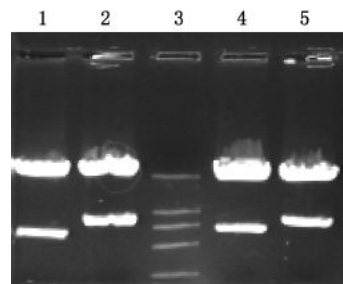


图3 重组质粒 pMD18-T/3' *CgNHX* 酶切分析
1、2、4、5: *Bam*HI 和 *Hind*III 酶切 pMD18-T/3' *CgNHX*1-1、1-2、1-3、1-4; 3: DL2000 DNA 分子量标准。

3 *CgNHX* 和 *AaNHX* cDNA 3' 末端序列测定及序列分析

对重组质粒 pMD18-T/3' *CgNHX*1-1、1-2、1-3、1-4 和 pMD18-T/3' *AaNHX*1-1、1-2 用 BcaBEST

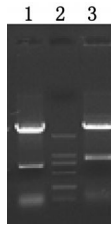


图4 重组质粒 pMD18-T/3' AaNHX 酶切分析
1、3: *Bam*HI 和 *Hind*III 酶切 pMD18-T/3' AaNHX1-1、1-2; 2: DL2000 DNA 分子量标准。

primer RV-M和BcaBEST primer M13-47进行双向测序的结果如图5和图6。

4 不同植物 *NHX* 序列的同源性分析

用DNAMAN对 *CgNHX*、*AaNHX* 和 *SsNHX* (碱蓬 *NHX*) 基因的 3'-UTR 进行同源性分析的结果表明, 其 3'-UTR 具有很高的同源性(图7), 说明不同盐生植物 *NHX* 基因可能具有相同的转录后加工方式。

```

3' CgNHX-1  EAAGCTAATTGAGGCTTAACTACTGAGGCTTGGGAGCTGAGAAATGGCCCTACCCAGGAACTGTAGTGTCTGCTGCG
GGGTGCTCTTTGAGAGTGTACACTAATCTGTTAATGCTAGTAACTACACTGAACTGCAACTTAAATTTCAATATAAT
CAACAGATGAGGATTTTGTGTGTATTTCTTAACTTACTGTACTAGACTAGACTGCAAGCTTTTGTAGTCTAATTCGTTG
GATTTCTTTTTCCTCGAAGAAAABAAAAM
3' CgNHX-2  EAAGCTAATTGAGGCTTAACTACTGAGGCTTGGGAGCTGAGAAATGGCCCTACCCAGGAACTGTAGTGTCTGCTGCG
GGGTGCTCTTTGAGAGTGTACACTAATCTGTTAATGCTAGTAACTACACTGAACTGCAACTTAAATTTCAATATAAT
CAACAGATGAGGATTTTGTGTGTATTTCTTAACTTACTGTACTAGACTAGACTGCAAGCTTTTGTAGTCTAATTCGTTG
GATTTCTTTTTCCTCGAAGAAAABAAAAM
3' CgNHX-3  EAAGCTAATTGAGGCTTAACTACTGAGGCTTGGGAGCTGAGAAATGGCCCTACCCAGGAACTGTAGTGTCTGCTGCG
GGGTGCTCTTTGAGAGTGTACACTAATCTGTTAATGCTAGTAACTACACTGAACTGCAACTTAAATTTCAATATAAT
CAACAGATGAGGATTTTGTGTGTATTTCTTAACTTACTGTACTAGACTAGACTGCAAGCTTTTGTAGTCTAATTCGTTG
GATTTCTTTTTCCTCGAAGAAAABAAAAM
3' CgNHX-4  GAACTAATTGAGGCTTAACTACTGAGGCTTGGGAGCTGAGAAATGGCCCTACCCAGGAACTGTAGTGTCTGCTGCG
GGGTGCTCTTTGAGAGTGTACACTAATCTGTTAATGCTAGTAACTACACTGAACTGCAACTTAAATTTCAATATAAT
CAACAGATGAGGATTTTGTGTGTATTTCTTAACTTACTGTACTAGACTAGACTGCAAGCTTTTGTAGTCTAATTCGTTG
GATTTCTTTTTCCTCGAAGAAAABAAAAM

```

图5 *CgNHX* 基因 cDNA 3'-UTR 序列
黑体字部分为推测的对 mRNA 腺苷酸化起重要作用的位点。

```

3' AaNHX-1  GGTAGTGGTGCCTAACTATTACCCBBBGTGCTACAGGTACTGCGCAAGAAAAGTGTCCCTTAACCAA
GAACAGTGGGGGTTGGTGTCTTGGGCGGAGTGAAGAGTTTTGCGGACTTCTATTATAGBEBGTAAGTTG
CAGCTACCCAGGGATTAAAACATATATTTATTTTTCACAGCATGGCBAATCAAGCAATTCCTTTTCTAAAAAAA
AAAAAAAAAATCBAAAAAAAAAAAAAA
3' AaNHX-2  GGTAGTGGTGCCTAACTATTACCCBBBGTGCTACAGGTACTGCGCAAGAAAAGTGTCCCTTAACCAA
GAACAGTGGGGGTTGGTGTCTTGGGCGGAGTGAAGAGTTTTGCGGACTTCTATTATAGBEBGTAAGTTG
CAGCTACCCAGGGATTAAAACATATATTTATTTTTCACAGCATGGCBAATCAAGCAATTCCTTTTCTAAAAAAA
TAGCTAGACTCTCCAGCATGTTTTGTAGCGGAGTGATCATCTAGGTTCCOCCACTTAAATGCTCTCTTTCA
AGGAGCGATTTGGTGAAGTGTCTTGGGATTAAGTGCACACTGAGCGGTTGCTGTCAAAAATCAGGGATTTTA
AATTATGCTGATCATTTTGTATAAAAA

```

图6 *AaNHX* 基因 cDNA 3'-UTR 序列
黑体字部分为推测的对 mRNA 腺苷酸化起重要作用的位点。

讨 论

本文结果显示 *AaNHX* 基因 3'-UTR 与 *CgNHX* 基因 3'-UTR 同源性高达 52%，两者与碱蓬同源性分别达到 60% 和 54%，表明 *NHX* 基因的加工方式可能相同，同时说明 *NHX* 基因在野生植物中的功能很重要。

Wahle和Keller^[2]的研究表明,动物体核基因的 mRNA 3' 末端存在 AAUAAA 及富含 U 或 GU 的两个重要保守序列。对许多 mRNA 而言,激活需要 3'-UTR 内存在的不连续的序列 (AAUAAA 或 U-rich) 以指导 Poly(A) -mRNA 的腺苷酸化,从而使翻译得以顺利进行。然而,大多数植物核基因 mRNA 的 3' 末端并不具有动物 AAUAAA 那样的保守序列,但其多聚腺苷酸化效率并不受到影响^[8]。而且,存在于少数植物中的 AAUAAA 也不能被很好地识别,说明对此顺式作用元件的需求在植物中并不像在动物中那样严格,其调控作用在动、植物中有一定的差异^[9]。本文的序列分析结果表明,克隆获得的 4 个 *CgNHX* 和 2 个 *AaNHX* 3'-UTR 中 3' *CgNHX1-1* 和 3' *AaNHX1-1* 没有 AAUAAA, 其余 4 个样品均含有该序列,其存在的位置并不像动物中那样保守,但均能进行有效的腺苷酸化,因此推测该序列对植物 mRNA 的腺苷酸化并不起关键作用,这与前人的结论相同。我们推测可能有另一些序列控制着 mRNA 的腺苷酸化并控制翻译的顺利进行,如 ATTCTTT, 该序列非常保守,在碱蓬、碱蒿和灰绿藜的 3'-UTR 中均存在。据此,我们还认为,3'-UTR 富含 T 的不连续的序列(图 5、图 6 划线部分)可能对 mRNA 的腺苷酸化也起作用。

灰绿藜为分布广的物种,生存于各种生境,适应能力强,与其 mRNA 3'-UTR 的差异性大呈正相关;而碱蒿的分布区域有限,仅生存于特定的环境中,与其 mRNA 3'-UTR 的差异性小也呈

正相关。这类相关性尚需要进一步研究证实。此外,植物 mRNA 3'-UTR 的差异性与其适应能力之间也可能有相关性,因为植物需要适应不同的生境,以致基因表达调控呈现多样性,这可能是造成植物和动物 3'-UTR 对 mRNA 的调控有很大差别的原因。

总之,*NHX* 基因在植物中是非常保守的,在植物耐高盐水平中起作用。这为进一步利用 *CgNHX* 和 *AaNHX* 3'-UTR 内部的调控元件提高 *NHX* 基因在植物体内的表达水平、研究植物 *NHX* 基因的功能以及为采用该基因提高植物耐盐水平以改良农作物品种中具有一定参考价值。

参考文献

- 1 Birnstiel ML, Busslinger M, Strub K. Transcription termination and 3' processing: the end is in site. *Cell*, 1985, 41: 349~359
- 2 Wahle E, Keller W. The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. *Annu Rev Biochem*, 1992, 61: 419~440
- 3 Apse MP, Aharon GS, Snedden WA et al. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science*, 1999, 285: 1256~1258
- 4 Gaxiola RA, Rao R, Sherman A et al. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 1480~1485
- 5 Quintero FJ, Blatt MR, Pardo JM. Functional conservation between yeast and plant endosomal Na⁺/H⁺ antiporters. *FEBS Lett*, 2000, 471: 224~228
- 6 Zhang HX, Blumwald E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 765~768
- 7 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 19~56
- 8 Joshi CP. Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants: a compilation and analysis. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15: 9627~9640
- 9 Hunt AG, Chu NM, Odell JT et al. Plant cells do not properly recognize animal gene polyadenylation signals. *Plant Mol Biol*, 1987, 8: 23~25