

## 拟南芥 *AtNHX5* 基因的 cDNA 克隆及其正义、反义表达载体的构建

石乐义<sup>1</sup> 李洪清<sup>2</sup> 李美茹<sup>1,\*</sup> 陈贻竹<sup>1</sup>

<sup>1</sup>中国科学院华南植物园, 广州510650; <sup>2</sup>华南师范大学生命科学院, 广州510631

**提要** 采用 RT-PCR 方法从拟南芥品种 Landsberg 的实生苗叶片中克隆 *AtNHX5* 基因的 cDNA, 核酸序列表明该基因编码区为 1 554 bp, 编码 538 个氨基酸。与 GenBank 发表的序列(AF490589)相比, 有三处碱基不同, 分别为 850 bp 处的 G (GenBank 的为 A)、904 bp 处的 T(A)、985 处的 G(A)。将该基因分别正向或反向置于 CaMV35S 启动子之后, 可构建正义、反义表达载体。

**关键词** *AtNHX5* 基因; 表达载体; 载体构建

## Molecular Cloning of *AtNHX5* and Construction of Plant Expression Vector for Sense and Anti-sense

SHI Le-Yi<sup>1</sup>, LI Hong-Qing<sup>2</sup>, LI Mei-Ru<sup>1,\*</sup>, CHEN Yi-Zhu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; <sup>2</sup>College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

**Abstract** *AtNHX5* gene from *Arabidopsis thaliana* (Landsberg) was amplified by RT-PCR, and the coding sequence of the gene was analyzed. The result demonstrated that the coding region of *AtNHX5* is 1 554 bp, encodes a protein consisting of 538 amino acids. Compared with the sequence in GenBank, there are three different bases from the gene AF490589. In order to study the function of this gene, binary vectors were constructed, in which the coding region of the gene was placed under the 35S promoter in either sense or anti-sense orientation.

**Key words** *AtNHX5* gene; plant expressing vector; construction

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白在细菌、酵母、藻类、动物和高等植物的膜系统上普遍存在, 它是负责 Na<sup>+</sup>、H<sup>+</sup> 交换的一种跨膜运输蛋白, 参与细胞内的 pH 值、Na<sup>+</sup> 浓度及细胞体积变化调节等生命活动<sup>[1,2]</sup>, 是目前世界上通过操作单一基因表达就能明显提高淡土植物抗盐性的蛋白之一<sup>[3,4]</sup>。同时, 液泡膜上的 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白也与调控植物液泡 pH 值变化和蓝色花的显现密切相关<sup>[5,6]</sup>。

拟南芥基因组中编码拟南芥 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白的 *AtNHX* 基因是个多基因家族, 有 8 个成员<sup>[7]</sup>。其中 *AtNHX1~6* 编码液泡膜上 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白; *AtNHX7* 和 *AtNHX8* 可能是编码 SOS1 蛋白, 位于质膜上<sup>[8,9]</sup>。酵母互补实验表明, *AtNHX1*、*AtNHX2*、*AtNHX5* 具有提高细胞抗盐性的作用。转 *AtNHX1* 的植株具有较高的耐盐性, 关于 *AtNHX5* 基因功能与植物的耐盐性关系还未见有报道<sup>[3]</sup>。鉴于此, 本文克隆 *AtNHX5* 基因, 并分别构建了正义和反义的表达载体, 以期能为研究

*AtNHX5* 基因在植物中的作用奠定基础。

### 材料与方法

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 品种为“Landsberg”。pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司, pCambia1390、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、农杆菌 EHA101 均有本实验提供, 限制性内切酶、Taq 酶、T<sub>4</sub> 连接酶及相关试剂盒购自宝生物工程有限公司和上海生工生物工程技术有限公司。参照已发表的 *AtNHX5* 核酸序列设计的 2 条引物, 序列分别是: 5' TGATTTCTCCGGTGGAGCACGACCC 3' 和 5' CTACTCCCCATCTCCATCTCCATCTC 3'。

拟南芥种子消毒后接种于 1/2MS 培养基上, 放入温度 22℃、光照度为 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  的培养

收稿 2004-12-17 修定 2005-05-17

资助 国家自然科学基金(30170667)。

\*通讯作者(E-mail: limr@scib.ac.cn, Tel: 020-37252750)。

箱中培养。1个月后,用 $300\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl处理植株2 h,称取200 mg叶片,于液氮中研磨成粉末状,采用申能博彩3S柱式RNA提取试剂盒制备RNA。

RT-PCR反应参照TaKaRa公司的试剂盒说明,略加修改。RT反应条件为:65℃ 1 min,50℃ 5 min后,15 min内匀速升温到65℃,65℃保温30 min,98℃ 5 min,4℃ 5 min。然后,以反转录合成的cDNA为模板,加入引物进行PCR扩增。PCR反应条件为:94℃变性30 s,65℃复性30 s,72℃延伸2 min,共40个循环。取10  $\mu\text{L}$ 反应液,加入1  $\mu\text{L}$  DNA上样缓冲液,进行1%琼脂糖凝胶电泳检测。

将PCR产物克隆于pGEM-T Easy上,转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞,在培养基上挑取白色菌落,用碱裂解法提取质粒,并用EcoRI酶切鉴定,取甘油保存的菌种送至上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

pHQS载体构建时,先将CaMV35S及castor bean intron<sup>[10]</sup>插入经HindIII和SalI酶切的质粒pCambia1390,构建质粒pHQS。其T-DNA区域的酶切位点如图1所示。

pHQS2-1载体的构建时,将由以下2条单链DNA构成的连杆插入经SalI和EcoRI酶切的pHQS。pHQS2-1的T-DNA区域的酶切位点如图2所示。

单链1:

TCGATAGGAATTCGAGCTCGGTACCGGATCCGTCGACC  
EcoRI SacI KpnI BamHI SalI

单链2:

ATCCTTAAGCTCGAGCCATGGCCTAGGCAGCTGGTTAA

将AtNHX5片段插入到载体pHQS2-1上时,用EcoRI酶切质粒pHQS2-1,去磷酸化酶处理防止自身连接,与用EcoRI酶切的AtNHX5片段连接。连接产物转化到DH5 $\alpha$ ,在培养基上挑取白色菌落,PCR鉴定,然后用碱裂解法提取质粒,酶切鉴定。

## 实验结果

### 1 AtNHX5基因cDNA的扩增、克隆及鉴定

以提取的拟南芥RNA为模板,用材料中提供的特异引物进行RT-PCR扩增,得到1.6 kb左右的DNA片段(图3)。此片段的大小与已知的AtNHX5的基因大小相近。扩增的PCR产物克隆入pGEM-T Easy,对其中1个克隆T1进行EcoRI酶切鉴定,切出了约1.6 kb大小的片段(图4),证明PCR扩增的片段已克隆到pGEM-T Easy载体中。

### 2 AtNHX5片段的测序

经3个反应的测序,得到完整的AtNHX5基因序列。测序结果表明,拟南芥AtNHX5基因全长1554 bp,编码518个氨基酸,其中,有三处的碱基与GenBank发表的序列(AF490589)不

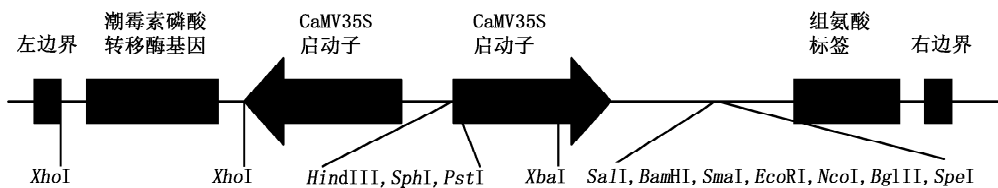


图1 质粒pHQS的T-DNA酶切位点  
Fig. 1 T-DNA restriction sites of pHQS

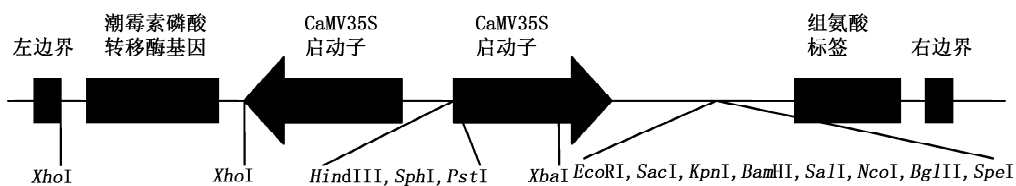


图2 载体pHQS2-1的T-DNA酶切位点  
Fig. 2 T-DNA restriction sites of pHQS2-1

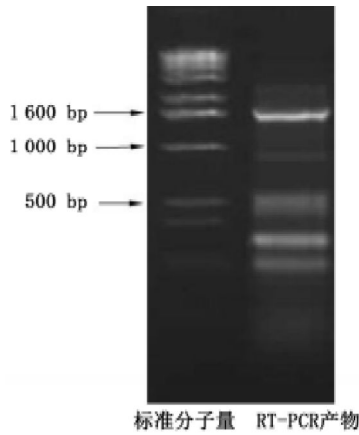


图3 琼脂糖电泳检测RT-PCR扩增片段  
Fig. 3 Agrose gel of electrophoresis of RT-PCR product

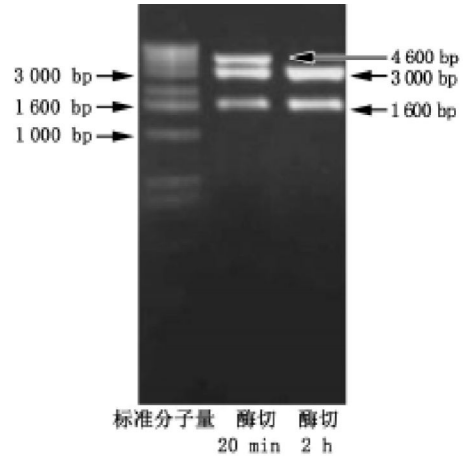


图4 重组质粒T1的酶切鉴定  
Fig. 4 Identification of restriction sites of T1

```

1  ATGATTTCTCCGGTGGAGCAGCACCCCTCAGGGCCAGGTTAAGCAGCAGCAAGCCGCGGGCTTGGTATACCTTCAGATTAAGATGCTC
M - S P V E H D P Q G Q V K Q Q Q A A G Y G I L L Q I M M L
91  GTGCTTTCCTTCGTTCTCGGCCATGTUUCUCCGGTCATCGATTCACATCTCTTCCGGAAGCCAGCGGTTGGCTTCGATTCGTTTAAATC
V L S F V L G H V L R R H R F H Y L P E A S G S L I T G L I
181  GTCCGTATACCTGCTAATATCCCGGATACCTGAGACTAGCATTAGGAGCTGGTTTAAATTCACCGAAGAGTCTCTCTCTCTTTTCTGTTG
V G I L A N I S D T E T S I R T W F N F R E E F F F L F L L
271  CCTCCGATCATATTCAGTCAGGTTTCAGTCTTCAACCTAAACCAATCTTTTCTAAGCTTGGAGCCATTGTTAGCTTTGCTATCATCGGA
P P I I F Q S G F S L Q P K P F F S K F G A I V T F A I I G
361  ACHTTTGTGGCTTCAGTGTGTAACCTGGTGGTCTTACTTGGCGGCTCTAIGTATCTCATGTATAAACCTCCCTTTGTTGAGTGTCTT
T F V A S V V T G G L V Y L G G S M Y L M Y K I P T V E C L
451  ATGTTTGTGGACTTAAATCAGGTAAGGACCCCTGTCAGTGTACTCTCTAATATCAGGATGTTGGCACTCGATGTAAGCTGTAAGCTTTC
M F G A L I S A T D P V T V L S I F Q D V G T D V X L Y A L
541  GTCTTTGGAGATTCAGTCTGAAATGATGCTATGGCAATATCATTTGTACAGAACATGTCCTTAGTAAACCGCCAGTCTCTGCTGGGGAA
V F G E S V L N D A M A T S I V R T M S I V N R Q S S S C E
631  GATTTTTTCATGGTGTGATCAGGTTTTCAGACTTTTGTCTGCTCAAATGCTTGGGGGTTGGGTTGGATTCAGCTTACCTTACCTTACTC
H F F M V V I R F F E T F A G S M S A G Y G V G F T S A L L
721  TTTAAGTATGAGGATTCGACAGGAGATCTTCAGAACCTGGAGTGTGCTCTTTGACTTTTCCCTATTTTTCATACATGCTTGGCA
F K Y A G I D F F N L Q V L E C C L F V L F P Y F S Y M L A
811  GAAGGTGTTGGTCTCCGCGATTTCTTATACCTTCGCA(ACA)GGAAATGTTATGAAGCGCTACACTTCTCAAATCTCTCAGAAGCTTCA
E G V G L S G I V S I L F A(T) I V M K R Y T F S N L S E A S
901  CAGTCT(ACG)TTGATATCTCTTTTTCAGCTGATATCTTTCAGGAGGAAACCTTCAGCTTCTTACATGGGAATTCATAATCTC(ATT)GAG
Q C(S) V S S I F H L I S S L A E T F T F I Y M G F D I A V(S)E
991  CAGCATAGCTGGTCCCATGTTGGGTTTATCTTTTCTCTATTTTGTATATGGGCTGGCTAGGGCTGCAATGTATTTGGTGTGGATAT
Q H S W S H Y G T I L F S I L T I G Y A R A V N V T G C A Y
1081  TTGGTGAAGCTATTTAGACAGGAGAACGAGAAGATACCTATGAAGCAGCAAAAAGCCCTTTGGTATAGTGGACTTCGAGGGGCAATGGCA
L V N L F R Q E N Q K I P M K H Q K A L W Y S G L R G A M A
1171  TTTCGACTTGCACITCAATCACTTCATGATCTACCAGAGGGTACGGCCAAATCATCTTACTGCAACCACAATATGTTGTTGTTCAGG
F A I A L Q S L H D L P E G H G Q I T F T A T T T V V V T
1261  GTTTTACTAATAGGAGTTCGAGAGGTAAGTGTGGAGCTTTGCAAGTTGTAGGTGACGATCTTGATGACTCAATGTAAGAGGCTTT
V L L I G G S T G K M L E A L E V V G D D L D D S M S E G F
1351  GAAGACAGGATCATCAGTATCTCCCTCTCTCTTTTACCATTCAGCTTATCTGAGGAGGATACATCATCATCAGGAGCAGCTTCAAC
E E S D H Q Y V P P P F S I G A S S D E D T S S S G S R F K
1441  ATGAAGCTGAGGAGTTTCAGAAAACCTATCAATCAATCCGCTTGGGACAAAACCTTCTGACTCGCTTCTTCACACCTAATAGTGA
M K L K E F H K T T T S F T A L D K N F L T P F F T T N S G
1531  GATGGAGATGGAGATGGGAGTAG
D G D G D G F *
    
```

图5 克隆的*AtNHX5*基因的碱基序列及氨基酸序列  
Fig. 5 Nucleotide sequence of *AtNHX5* gene and deduced amino acid sequence

同: 850 bp 处的 G (GenBank 的为 A)、904 bp 处的 T (A)、985 处的 G (A), 三处所对应编码的氨基酸也发生了改变: A (T)、C (S)、V (M), 即图 5 方框中字母所示。

**3 表达载体的构建**

由于将 *AtNHX5* 片段插入 pHQSN2-1 的 *EcoRI* 位点时, 会产生 2 种重组质粒: 正向插入基因的重组质粒 T2 和反向插入基因的重组质粒 T3。根据 *AtNHX5* 中存在 2 个 *HindIII* 切点(分别位于 892 和 1 296 bp), 可采用 *HindIII* 酶切片段的大小鉴定 *AtNHX5* 片段插入的方向。如果是正向插入的质粒, 用 *HindIII* 酶切会出现 400 和 1 900 bp 的片段; 反向的会出现 400 和 1 300 bp 的片段(图 6)。正向插入的质粒 pHQSN2-1Z, 其 T-DNA 酶切位点如图 7 所示; 反向插入的质粒为 pHQSN2-1F, 其 T-DNA 酶切位点如图 8 所示。

**讨 论**

在已知基因序列时, 采用 RT-PCR 克隆基因是一种简便、快速、有效的方法。本文根据 GenBank 已发表的 *AtNHX5* 序列设计引物, 采用 RT-PCR 方法克隆了 *AtNHX5* 基因, 碱基序列大小与已发表的一致, 但有三处碱基与原序列不同, 所编码的氨基酸也与原序列不同(图 5)。已有的研究表明, 组氨酸和天冬氨酸(Asp)在真核生物 Na<sup>+</sup>/

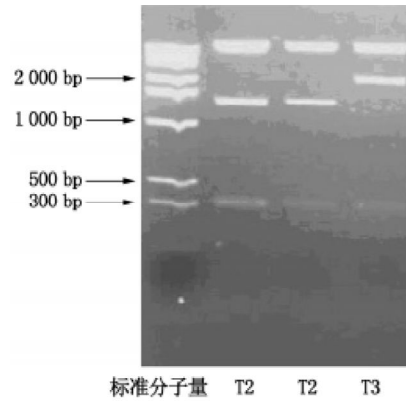


图 6 重组质粒 pHOSN2-1 的酶切鉴定  
Fig. 6 Identification of restriction sites of pHOSN2-1

H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白中起非常重要的作用。组氨酸常常是电子转运体系所必需的一种氨基酸, 在酶的活化的作用关键的位点都有组氨酸存在, 它对 pH 值敏感, 在转运 H<sup>+</sup> 中起重要作用。组氨酸离子化既可以通过影响蛋白质组成结构的变化从而影响起活性, 也可以通过影响其通道大小的变化而影响 H<sup>+</sup> 和其它离子的转运。疏水区 Asp 残基在真核生物的 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白中起着重要作用, SynNhaP 中的 Asp138 残基用 Glu 替代, SynNhaP 的活性就会丧失。在本研究中, 我们克隆的序列没有涉及到这两种关键氨基酸的变化, 其功能应该不会发生变化。具体结果我们将在以后的工作中

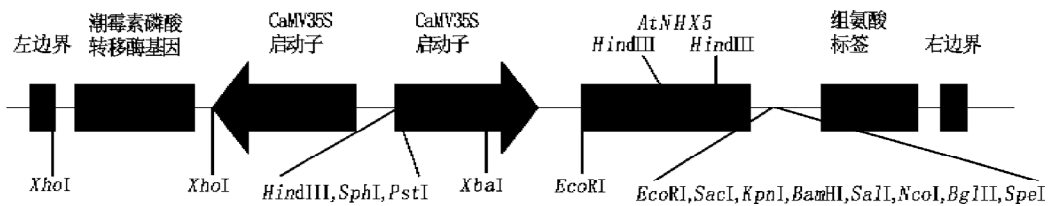


图 7 质粒 pHQSN2-1Z 的 T-DNA 酶切位点  
Fig. 7 T-DNA restriction sites of pHQSN2-1Z

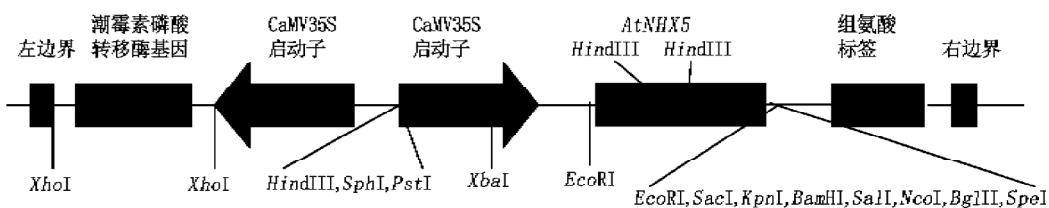


图 8 质粒 pHQSN2-1F 的 T-DNA 酶切位点  
Fig. 8 T-DNA restriction sites of pHQSN2-1F

进行论证。

我们在采用TaKaRa公司的BcaBest试剂盒扩增 *AtNHX5* 序列时发现, 从 50°C 开始(而不是原试剂盒推荐的 30°C)逐渐升温至 65°C, 明显地有利于扩增出目的片段。我们还发现, 扩增 *AtNHX5* 的效果与叶片的年龄和 NaCl 处理有关, 只有从苗龄 1 个多月的经 300 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理的植株叶片提取的 RNA 才能扩增出 *AtNHX5*, 而从苗龄 2 周左右的植株分离的 RNA 根本扩不到目的基因。说明 *AtNHX5* 基因表达受植物发育时期和盐处理的影响。

在农杆菌双元载体 pCambia1390 的基础上, 将 *AtNHX5* 基因的正义和反义序列分别置于植物表达所需要的 CaMV35S 启动子之后, 该质粒含有的潮霉素磷酸转移酶基因 (*HPT*) 可用于转化体的筛选。我们认为该载体可用于获得稳定的转基因植株, 对研究液泡膜 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白与植物抗盐性、液泡 pH 值及花色变化的关系可能有一定的意义。

#### 参考文献

- 1 Kulwich TA. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters. *Biochim Biophys Acta*, 1983, 726: 245~264
- 2 Pandan E, Schuldiner S. Intracellular pH and membrane potential as regulator in the prokaryotic cell. *J Membr Biol*, 1987, 95: 189~198
- 3 Apse MP, Aharon GS, Snedden WA et al. Salt tolerant conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in *Arabidopsis*. *Science*, 1999, 285: 1256~1258
- 4 Shi H, Lee BH, Wu SJ et al. Overexpression of a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 81~85
- 5 Fukada-Tanaka S, Inagaki Y, Yamaguchi T et al. Colour-enhancing protein in blue petals. *Nature*, 2000, 407: 581
- 6 Yamaguchi T, Fukada-Tanaka S, Inagaki Y et al. Gene encoding the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger and flower coloration. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42(5): 451~461
- 7 Yokoi S, Quintero FJ, Cubero B et al. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in the salt stress response. *Plant J*, 2002, 30(5): 529~539
- 8 Shi HZ, Ishitani M, Kim C et al. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6896~6901
- 9 Shi H, Quintero FJ, Pardo JM et al. The putative plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter *SOS1* controls long-distance Na<sup>+</sup> transport in plants. *Plant Cell*, 2002, 14: 465~477
- 10 Tanaka A, Mita S, Ohta S et al. Enhancement of foreign gene expression by a dicot intron in rice but not in tobacco is correlated with an increased level of mRNA and an efficient splicing of the intron. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(23): 6767~6770