

星星草质膜型 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因的克隆和特性分析

程玉祥*

东北林业大学园林学院, 哈尔滨 150040

提要: 用 RT-PCR 及 RACE 方法从盐生植物星星草中分离了 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因的 cDNA (*PtSOS1*, GenBank 登录号 EF440291), *PtSOS1* 的 cDNA 长度为 3 775 bp, 5' 非翻译区为 69 bp, 3' 非翻译区为 292 bp, 开放阅读框为 3 414 bp, 编码 1 137 个氨基酸。氨基酸同源性分析表明, *PtSOS1* 与小麦、水稻和拟南芥质膜型 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白的一致性分别为 88%、79% 和 66%。预测分析表明, *PtSOS1* 具有 11 个跨膜结构区域, 基因组 DNA 的 Southern 分析表明 *PtSOS1* 是单拷贝基因。半定量 RT-PCR 结果显示, *PtSOS1* 的 mRNA 受盐胁迫上调表达, 暗示 *PtSOS1* 可能在星星草较强的抗盐碱能力中起作用。

关键词: 星星草; 质膜型 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因(*SOS1*); 基因克隆; 盐胁迫

Cloning and Characterization of Plasma Membrane Na⁺/H⁺ Antiporter Gene from *Puccinellia tenuiflora* (Turcz.) Scribn. et Merr.

CHENG Yu-Xiang*

College of Landscape Architecture, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: A plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene (*PtSOS1*, GenBank accession No. EF440291) was isolated in halophyte *Puccinellia tenuiflora* by RT-PCR and RACE. The *PtSOS1* cDNA was a length of 3 775 bp including 5' untranslated region of 69 bp, 3' untranslated region of 292 bp with Poly A, and an open reading frame (ORF) of 3 414 bp encoding a protein of 1 137 amino acids. It showed by multiple sequence alignment analysis that the *PtSOS1* were 88%, 79%, and 66% identities in amino acids to plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter genes from *Triticum aestivum*, *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*, respectively. TMHMM prediction showed 11 transmembrane domains of *PtSOS1*, and *PtSOS1* was one-copy gene by genomic Southern analysis. Semi-quantitative RT-PCR assay revealed that *PtSOS1* was significantly up-regulated in *Puccinellia tenuiflora* seedlings under salt stress. It suggested that *PtSOS1* might play a role in highly alkaline and saline tolerances of *Puccinellia tenuiflora*.

Key words: *Puccinellia tenuiflora*; plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene (*SOS1*); gene cloning; salt stress

土壤中 Na⁺ 盐过多会引起植物体内离子不平衡、水分亏缺和离子毒害 (Tester 和 Davenport 2003; Zhu 2003; Serrano 和 Rodriguez-Navarro 2001)。对此, 植物体内会形成一些调节适应机制以保持胞质内较低的 Na⁺ 浓度。植物降低胞内 Na⁺ 浓度的方式有: 离子的选择性吸收、减少 Na⁺ 的吸入、Na⁺ 的区隔化和 Na⁺ 的外排 (Niu 等 1995), 其中 Na⁺ 的外排和区隔化是由 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白调节的。植物体中 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白分为液泡型和质膜型两类, Na⁺ 区隔化是指液泡膜上的 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白用液泡膜上 H⁺-ATPase 和 H⁺-焦磷酸酶 (H⁺-PPase) 建立起跨膜质子电势差作为驱动力, 将 Na⁺ 区隔化后进入液泡; 质膜型 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白参与植物的 Na⁺ 外排, 将 Na⁺

运入到胞外 (Blumwald 2000; Apse 和 Blumwald 2007)。Shi 等 (2000, 2002) 报道, 拟南芥质膜型 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白 (*AtSOS1*) 行使 Na⁺ 外排功能, 并控制 Na⁺ 长距离运输。过量表达的遗传转化体或基因突变体的抗盐生理分析表明, 液泡型或质膜型 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白可调节植物的耐盐能力 (Apse 等 1999; Zhang 等 2001; Ohta 等 2002; Brini 等 2007; Shi 等 2000, 2003; Martínez-Atienza 等 2007)。但盐生植物的质膜型 Na⁺/H⁺ 逆向转运

收稿 2007-10-21

资助 黑龙江省自然科学基金 (C200518) 和哈尔滨市青年科学研究基金 (2005AFQXJ024)。

* E-mail: chengyuxiang111@sina.com.cn; Tel: 021-54924142

蛋白基因和特性的报道不多。

星星草属禾本科碱茅属植物, 广泛分布于我国东北地区的盐碱地, 是盐碱地植被恢复的先锋物种, 其所具有的极强耐盐碱特性已受到人们的广泛关注(Peng 等 2004; Wang 等 2007)。本文克隆了星星草的质膜型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 cDNA (*PtSOS1*, GenBank 登录号 EF440291), 并分析了其特性。这对进一步了解 *PtSOS1* 的功能及其与星星草抗盐碱能力之间的关系可能具有一定的参考意义。

材料与方法

星星草 [*Puccinellia tenuifolia* (Turcz.) Scribn. et Merr.] 的培养和逆境胁迫处理时, 将其种子播于带蛭石和珍珠岩(1:1)混合成培养基质的营养钵中, 置于人工气候室培养。培养条件为: 24~28 °C、光照强度 $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 和光照 $16 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 、相对湿度 60%。生长至 30 d 时, 收取一部分星星草幼苗用于 RNA 和基因组 DNA 提取。另一部分幼苗进行 NaCl 胁迫处理, 分别将长有幼苗的营养钵浸在 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液和蒸馏水(用作对照)中, 胁迫处理 24 h 后液氮速冻, 保存于 -80 °C 中备用。

总 RNA 分离用 Trizol 试剂(Invitrogen 公司), 总 cDNA 合成用 TaKaRa RNA LA PCR™ Kit (AMV) Ver 1.1 反转录试剂盒(大连 TaKaRa 公司)。

PtSOS1 完整编码区的 cDNA 分离时, 先比较 GenBank 数据库中水稻(A Y785147)、小麦(A Y326952)及拟南芥(AF256224)质膜型 Na^+/H^+ 逆向运输蛋白基因 cDNA 保守同源序列, 根据保守同源序列设计简并引物: U_1 , TCCC(T)TA(G)-ATGAATGAC(T)GGGAC; D_1 , ACC(T)AA(G)A-(T)GCACTTTCCTGCCA。PCR 扩增出 *PtSOS1* 的保守核心片段。扩增的保守核心片段 cDNA 插入到 pMD18-T 载体(大连 TaKaRa 公司), DNA 序列测定由大连 TaKaRa 公司完成。*PtSOS1* 完整编码区 cDNA 的获得采用 cDNA 末端快速扩增法(rapid amplification of cDNA ends, RACE), RACE 用 5'-Full Race Kit 和 3'-Full Race Kit (大连 TaKaRa 公司)。5' RACE 的引物: GTGCTGTGAAGA (5' 端磷酸化修饰); S_1 , TCAGTACTATGGCTGGGCTT; A_1 , CAAAGCTCCAAGTGAAACT; S_2 ,

TCATAGAGATTTCACTTACTCT; A_2 , GTCCCGTCATTCATCAGGGA。3' RACE 的引物: P_1 , TGGTGCATTGTTTCTTCATT; P_2 , GTTTTCCCAGTCACGAC。*PtSOS1* 完整编码区 cDNA 扩增引物: F_1 , CAGCACCTTTGCCTCGCCCC; R_1 , ATAGGGATATGCACAAACAGCG。

基因组 DNA 分离采用 CTAB 法。Southern 杂交参照 Liu 等(2007)文中的方法。取 10 μg 基因组总 DNA, 分别用 *Pst*I、*Eco*RI、*Sac*I 单酶过夜酶切, 酶切产物琼脂糖凝胶电泳, 采用毛细管法转移 DNA 到 Hybond-N⁺ 尼龙膜(Amersham Pharmacia 公司); 用紫外线照射法交联 DNA 于尼龙膜上, 膜用 DIG 标记的 *PtSOS1* 完整编码区的 DNA 探针于 50 °C 杂交 16 h; 杂交后膜先用 2×SSC、0.1% SDS 于室温下轻摇清洗 5 min, 重复 1 次, 再用 0.1×SSC、0.1% SDS 于 68 °C 下轻摇清洗 15 min, 重复 1 次; 洗涤后膜用 CDP-Star™ 试剂(Roche 公司)覆盖, 杂交信号从 ImageMaster VDS-CL 化学发光成像系统(Amersham Pharmacia 公司)获得。

半定量 RT-PCR 时, 以相同量总 RNA (1 μg) 合成 cDNA, 合成的 cDNA 稀释 20 倍后作为模板, 进行半定量 RT-PCR。引物为: GGAAGTGGTA-TGGTCAAGGC 和 AGTCTCATGGATAACCGCAG。PCR 扩增体系为 100 μL , 循环数为 25。

生物信息学分析时的 BLAST 检索用 NCBI 在线软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), TMHMM Server v 2.0 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)预测 *PtSOS1* 跨膜结构区域, 氨基酸序列同源性分析和系统进化树分析用 Clustal-X 软件(1.83)和 TagIdent 工具(<http://us.expasy.org/tools/tagident.html>)预测理论分子量和等电点, *PtSOS1* 在细胞内的定位预测用 PSORT (<http://wolfsort.org/>)。

实验结果

1 星星草 *PtSOS1* 完整编码区 cDNA 的分离

根据水稻、小麦及拟南芥质膜型 Na^+/H^+ 逆向运输蛋白基因保守同源序列设计简并引物(U_1 、 D_1), 以体外反转录合成的星星草总 cDNA 为模板, PCR 扩增出星星草 *PtSOS1* 保守核心 DNA 片段, 核心片段经 DNA 测序为 1 929 bp。用 *PtSOS1* 保守核心片段的已知序列, 设计引物分别进行 5'

为EF440291, 氨基酸序列登录号为 ABO32636。

2 *PtSOS1* 完整编码区的 cDNA 序列分析

星星草 *PtSOS1* 的开放读码框(open reading frame, ORF)长度为 3 414 bp, 编码 1 137 个氨基酸组成的多肽, 理论分子量为 125.5 kDa, 等电点为 6.48。跨膜区域预测分析表明 *PtSOS1* 蛋白含有 11 个跨膜域(图 2)。推测氨基酸同源性表明,

星星草 *PtSOS1* 与已报道小麦、水稻、拟南芥 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白具有较高的同源性, 分别为 88%、79% 和 66% (图 3)。系统进化树分析表明星星草 *PtSOS1* 与质膜型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白如小麦 *TaSOS1*、水稻 *OsSOS1*、拟南芥 *AtSOS1*、酵母 *Nhalp* 等的亲缘关系较近, 而与液泡膜型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白如: 水稻 *OsNHX1*、拟南芥

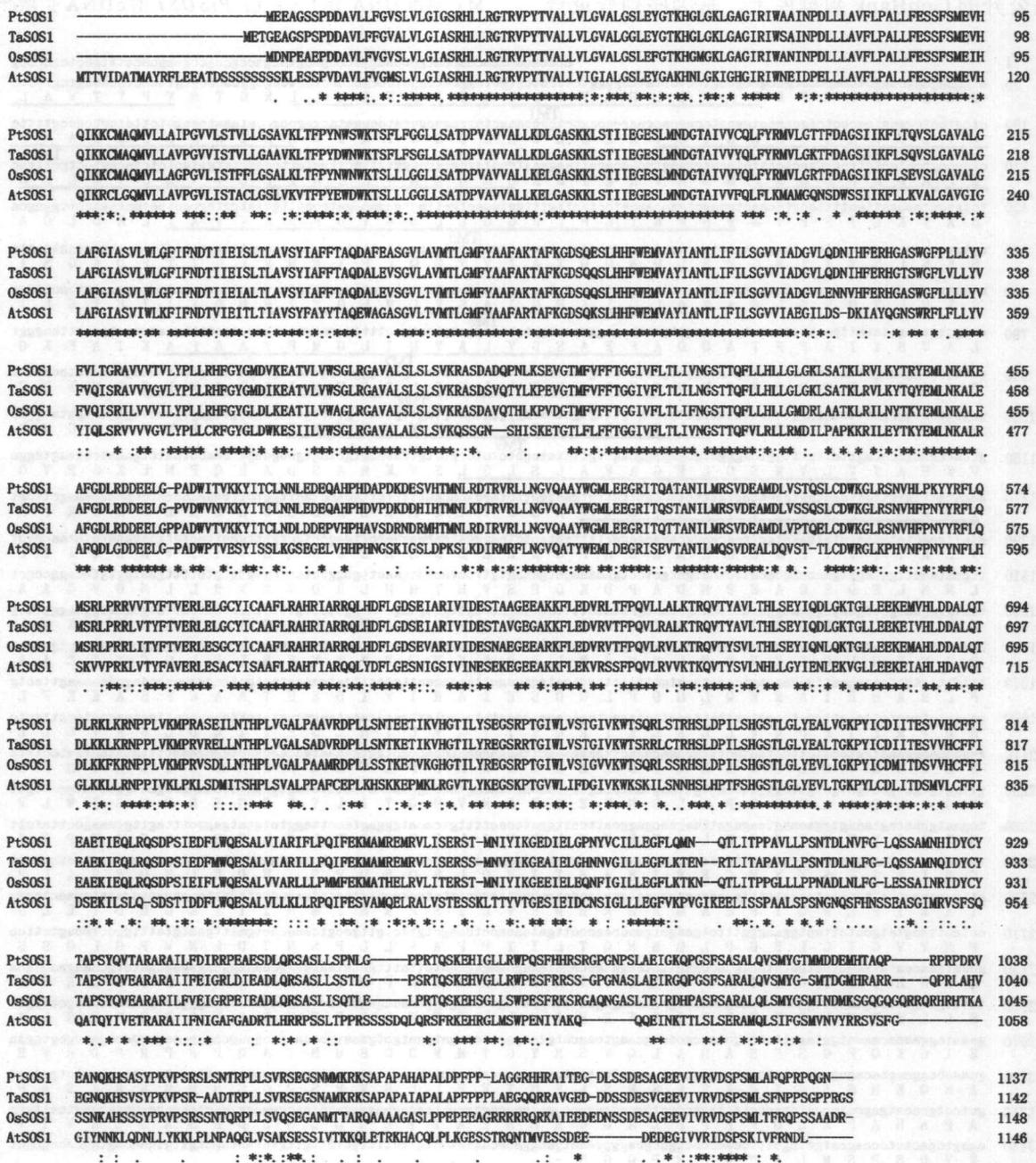


图 3 星星草、小麦、水稻及拟南芥的 *SOS1* 氨基酸序列同源性比对

Fig.3 Multiple sequence alignment of *SOS1* from *P. tenuiflora*, wheat, rice and Arabidopsis plants

* 表示该位置序列完全一致; :和. 分别表示该位置序列高度相似和相似; *PtSOS1*、*TaSOS1*、*OsSOS1* 和 *AtSOS1* 的 GenBank 登录号分别为: EF440291、AY326952、AY785147 和 AF256224。

AtNHX1 等的亲缘关系较远(资料未列出)。

讨 论

3 *PtSOS1* 基因特性

为了了解 *PtSOS1* 基因在星星草基因组中的拷贝数, 我们分离了星星草的基因组 DNA, 以 DIG 标记 *PtSOS1* 完整编码区 cDNA 的探针进行基因组 DNA Southern 杂交, *PtSOS1* 基因 cDNA 序列中各有 1 个 *Pst*I、*Sac*I 酶切位点, 而没有 *Eco*RI 酶切位点, 若是单拷贝则应分别出现 2 条带、2 条带和 1 条带。杂交的结果(图 4)表明 *PtSOS1* 基因在星星草基因组中是单拷贝基因。

半定量 RT-PCR 分析显示, 星星草的根和叶组织中 *PtSOS1* 基因 mRNA 表达水平基本上没有差别(图 5), 表明 *PtSOS1* 在星星草中没有呈现明显的组织特异性表达, 这与其所持有的向细胞外排 Na^+ 功能是一致的。但受 NaCl 盐胁迫的星星草叶和根中 *PtSOS1* 基因 mRNA 表达水平均明显增加(图 5), 这表明 *PtSOS1* 基因表达受 NaCl 盐胁迫上调。

本文以 RT-PCR 及 RACE 方法从盐生植物星星草中分离了具有完整编码区的质膜型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的 cDNA。生物信息学分析表明, 其氨基酸序列与高等植物中已知序列质膜型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因(*SOS1*)的同源性较高, 而与液泡型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白亲缘关系较远, 命名为 *PtSOS1*。预测分析表明 *PtSOS1* 定位于细胞的质膜, 并且含有 11 个典型的跨膜区域。用半定量 RT-PCR 分析表明 *PtSOS1* 基因表达明显受 NaCl 盐胁迫上调, 这表明所分离的 *PtSOS1* 可能起细胞内 Na^+ 的外排功能。据报道, 拟南芥质膜型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因(*AtSOS1*)不仅控制拟南芥的 Na^+ 长距离运输(Shi 等 2002), 在盐胁迫下还有保护质膜上 K^+ 运输的作用(Qi 和 Spalding 2004)。Peng 等(2004)认为, 星星草的抗盐胁迫是通过保持细胞内高浓度的 K^+ 进行的。我们推测 *PtSOS1* 基因也可能是通过保护质膜上 K^+ 的运输, 而增强星星草抗盐碱能力的。

拟南芥 *AtNHX1*、水稻 *OsNHX1* 等植物液泡型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因已得到分离, 北滨藜 (*Atriplex gmelini*) *AgNHX1* (Hamada 等 2001; Ohta 等 2002)等盐生植物的液泡型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因及其特性也有报道。转基因研究证明, 转单一液泡型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因能够明显提高植物的耐盐性(Apse 等 1999; Zhang 等 2001; Brini 等 2007)。但植物自身液泡的容量毕竟有限, 质膜上 Na^+ 的外排作用可能对植物耐盐性的作用更大。迄今, 在高等植物中尚未发现 Na^+/H^+ -ATPase 基因, 有人认为, 植物 Na^+ 胞外排出机制可能与质膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白有关。盐敏感植物拟南芥的 *AtSOS1* 功能报道已表明了这一点(Shi 等 2000, 2002, 2003)。但盐生物质膜上 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白功能是否与盐敏感植物的一样, 还不清楚。此外, 了解盐生物质膜型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白功能和采用转基因方法提高植物抗盐性, 可能是培育抗盐作物品种的一条途径。用过量表达 *PtSOS1*、反义 RNA 抑制 *PtSOS1* 表达、*PtSOS1* 与盐敏感植物(如拟南芥)的 *AtSOS1* 结构和功能之间差异等方法研究 *PtSOS1* 在星星草抗盐碱中的作用正在进行中。

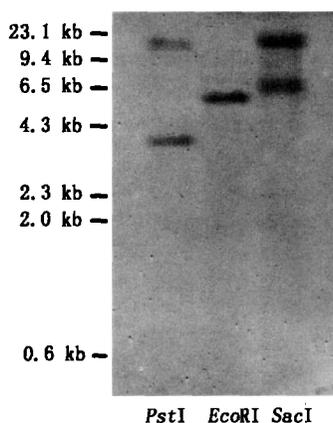


图 4 星星草基因组 DNA 的 Southern 杂交
Fig.4 Southern hybridization of genomic DNA from *P. tenuiflora*

10 μg 基因组 DNA 分别 *Pst*I、*Eco*RI、*Sac*I 单酶切、电泳、转膜, 膜用 DIG 标记的 *PtSOS1* DNA 探针杂交。

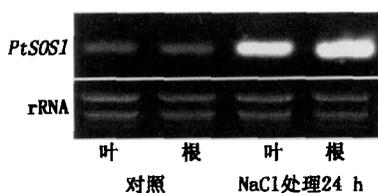


图 5 *PtSOS1* 基因 mRNA 表达的半定量 RT-PCR 分析
Fig.5 Semi-quantitative RT-PCR analysis of *P. tenuiflora* *PtSOS1* gene expression

参考文献

- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in *Arabidopsis*. *Science*, 285: 1256~1258
- Apse MP, Blumwald E (2007). Na⁺ transport in plants. *FEBS Lett*, 581: 2247~2254
- Blumwald E (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr Opin Cell Biol*, 12: 431~434
- Brini F, Hanin M, Mezghani I, Berkowitz GA, Masmoudi K (2007). Overexpression of wheat Na⁺/H⁺ antiporter *TNHX1* and H⁺-pyrophosphatase *TVPI* improve salt- and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants. *J Exp Bot*, 58: 301~308
- Hamada A, Shono M, Xia T, Ohta M, Hayashi Y, Tanaka A, Hayakawa T (2001). Isolation and characterization of a Na⁺/H⁺ antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelini*. *Plant Mol Biol*, 46: 35~42
- Liu SK, Cheng YX, Zhang XX, Guan QJ, Nishiuchi S, Hase K, Takano T (2007). Expression of an NADP-malic enzyme gene in rice (*Oryza sativa* L) is induced by environmental stresses; over-expression of the gene in *Arabidopsis* confers salt and osmotic stress tolerance. *Plant Mol Biol*, 64: 49~58
- Martínez-Atienza J, Jiang XY, Garcíadeblas B, Mendoza I, Zhu JK, Pardo JM, Quintero FJ (2007). Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice. *Plant Physiol*, 143: 1001~1012
- Niu XM, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM (1995). Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol*, 109: 735~742
- Ohta M, Hayashi Y, Nakashima A, Hamada A, Tanaka A, Nakamura T, Hayakawa T (2002). Introduction of a Na⁺/H⁺ antiporter gene from *Atriplex gmelini* confers salt tolerance to rice. *FEBS Lett*, 532: 279~282
- Peng YH, Zhu YF, Mao YQ, Wang SM, Su WA, Tang ZC (2004). Alkali grass resists salt stress through high [K⁺] and an endodermis barrier to Na⁺. *J Exp Bot*, 55: 939~949
- Qi Z, Spalding EP (2004). Protection of plasma membrane K⁺ transport by the salt overly sensitive1 Na⁺/H⁺ antiporter during salinity stress. *Plant Physiol*, 136: 2548~2555
- Serrano A, Rodríguez-Navarro A (2001). Ion homeostasis during salt stress in plants. *Curr Opin Cell Biol*, 13: 399~404
- Shi HZ, Ishitani M, Kim C, Zhu JK (2000). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 6896~6901
- Shi HZ, Lee BH, Wu SJ, Zhu JK (2003). Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol*, 21: 81~85
- Shi HZ, Quintero FJ, Pardo JM, Zhu JK (2002). The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter *SOS1* controls long-distance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell*, 14: 465~477
- Tester M, Davenport R (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann Bot*, 91: 503~527
- Wang YC, Chu YG, Liu GF, Wang M-H, Jiang J, Hou YJ, Qu GZ, Yang CP (2007). Identification of expressed sequence tags in an alkali grass (*Puccinellia tenuiflora*) cDNA library. *J Plant Physiol*, 164: 78~89
- Zhang HX, Hodson JN, Williams JP, Blumwald E (2001). Engineering salt-tolerant *Brassica* Plant: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 12832~12836
- Zhu JK (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol*, 6: 441~445