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(SOSI);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。植物降低细胞 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 ℃、光照强度120 µmol·m⁻²·s⁻¹和光照16 h·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 mmol·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 ℃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(AY785147)、小麦 (AY326952)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: U₁, TCCC(T)TA(G)-ATGAATGAC(T)GGGAC; D1, 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); S₁, TCAGTACTATGGCTGGGCTT; A_1 , CAAAGCTCCAAGTGAAACT; S_2 ,

TCATAGAGATTTCACTTACTCT; A_2 , GTCCCGTCATTCATCAGGGA。3' RACE 的引物: P_1 , TGGTGCATTGTTTCTTCATT; P_2 , GTTTTCCCAGTCACGAC。*PtSOSI*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 μ g 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 ℃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 ℃下轻摇清洗 15 min,重 复 1 次;洗涤后膜用 CDP-StarTM 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:GGAACTGGTA-TOGICAACOC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://wolfpsort.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(U₁、 D₁),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⁺ RACE、3' RACE。5' RACE 扩增产物经 DNA 测 序为 602 bp, 3' RACE 扩增产物经 DNA 测序为 1 284 bp。把这三部分序列拼接在一起,得到带 有完整编码区的星星草 *PtSOS1* 的 cDNA 序列。我 们又根据 *PtSOS1* 拼接的序列设计引物(F₁、R₁), PCR 扩增出约 3.6 kb 的特异条带(图 1),经 DNA 测序序列和拼接序列相同。至此,获得了星星草 *PtSOS1* 的 cDNA 序列 3 775 bp (图 2),其序列登 录在公开的 GenBank 数据库上,基因序列登录号





1	acccacacacacaacaacgcccacggccacgacgtacgaccgccgccgcagcacctttgcctcgccccg
70	atggaggaggocoggotocagococogacgacgcogtgotottattoggggtotocotogtgotoggotog
190	ctogtoctoggogtogcoctoggoagcotagagtacggcacgaagcacgaagcacggoagcoggoagcoggcatcoggatatgggcogccataaatcocgatcttctoctogcogtttto <u>L V L G V A L G S L E Y G T</u> K H G L G K L G A G I R I W <u>A A I N P D L L L A V F</u>
310	Ctccccgccccccctctcgagagctccttctccatggaagtacacccagattaagaaatgcatggcgcagatggtgttacttgctattccaggtgtggtgctctcaacagtcttgcttg
430	tetgeegtaaagettaettteegtaeaaetggagetggaaaaeateettettgttggtggaetgettagtgegaecgateegatee
550	agtaaaaagctcagcacaataattgaaggagaatccctgatgaatga
670	ataaagttettgacacaagttteaettggagetgttgetttgggeettgegtttggaattgeateagtaetatggetgggetttatttteaatgataeaateatagagattteaettaet I K F L T Q V S L G A V <u>A L G L A F G I A S V L W L G F I F</u> N D T I I E I S L T
790	ctcgctgtcagctatattgccttcttcacagcacaagatgcattcgaggccctcggtgtttfgctgtcatgactttggggatgttctatgctgcttttgcaaaaactgcttttaagggt L A V S Y I A F F T A Q D <u>A F E A S G V L A V M T L G M F Y A A F A</u> K T A F K G
910	gacagccaggaaagtttacatcatttotgggaaatggttgcttacattgcaaacacacttattttcatactgagtggggttgttattgcagatggtgtactacaagataatatccatttt D S Q E S L H H F W E M V <u>A Y I A N T L I F I L S G V V I A D G V L Q</u> D N I H F
1030	gagagacatggogcttcatgggggttcoctcttctgctatacgtgtttgtgctaacagggcgtgctgtagtgtcactgttttgtatccgttgttggcgtcactttgggtatggatgg
1150	gtcaaagaagccacagttcttgtttggtcagggctgcgaggggggtgttgctctatgctctctct
1270	acaatgtttgtgttcttcactggtggcatcgtgtttctacatgattgtaatggttctaccacaatttttgttgcacctactggtcttggaaaactatcagcaacaaagcttcgt <u>T M F V F F T G G I V F L T L I V</u> N G S T T Q F L L H L L G L G K L S A T K L R
1390	TM11 gtattgaagtatacaagatatgaaatgctaaacaagggcaaaaggggcttttggtgatctcaggggatgatgagggaacttgggcctgctgctgattgggttactgtgaagaaatatataacatgt V L K Y T R Y E M L N K A K E A F G D L R D D E E L G P A D W I T V K K Y I T C
1510	ttgaataacttggaagatgaacaagcacatcctcatgatgctcctgacaaagatgaaagtgttcataccatgaacttgagggatactcgagtgcgtcttttgaatggtgtacaggcgcct L N N L E D E Q A H P H D A P D K D E S V H T M N L R D T R V R L L N G V Q A A
1630	tactggggaatgcttgaagagggacggataactcaagccacagcaaatattttaatgagatcagttgatgaagctatggatcttgttctacccaatcattatgcgattggaagggttg Y W G M L E E G R I T Q A T A N I L M R S V D E A M D L V S T Q S L C D W K G L
1750	cggtccaatgttcatctcccaaagtactataggttccttcagatgagcaggttgccacgaagggttgttacttac
1870	tttottogtgotcatagaattgogaggagacaactacatgatttottggtgatagtgagattgocaggattgotagaaggtactgotgoggggggaggaagctaaaaagttootg F L R A H R I A R R Q L H D F L G D S E I A R I V I D E S T A A G E E A K K F L
1990	gaagatgtccgtottacattcoctcaggtgcttottgcattaaagactcgacaagtaacatatgcagtattgacacacctggaggagtatattcaagacottggaaagactgggtgctc E D V R L T F P Q V L L A L K T R Q V T Y A V L T H L S E Y I Q D L G K T G L L
2110	gaggaaaaggaaatggtccatcttgatgatgctttgcagacaga
2230	gttggtgcgctgcctgctgctgttcgggatccattgttaagtaatacagaagaaacaataaaagtacatggaacaatcctttatagtgaaggctcaaggccgactggtatatggcttgtt V G A L P A A V R D P L L S N T E E T I K V H G T I L Y S E G S R P T G I W L V
2350	tcgactggaatagtaagtggacaagtcggagaattaagcacgaggcattcatt
2470	tgtgacattattacggaatccgtggtgcattgtttcttcattgaagctgaaacaatagagccaattgcgcccagtctgatccattgaggatttttgtggcaggaaagtgctctagtt C D I I T E S V V H C F F I E A E T I E Q L R Q S D P S I E D F L W Q E S A L V
2590	attgcgaggatttttctccctcagatatttgagaaaatggcatggcgggggggg
2710	cotaattacgtatgcatcttactggaagggtttctgcagatgaaccaaaaccttgatcacacctccagotggtggcggtgaaccaaacactgattgaatgtatttggcctacagtcttca PNYVCILLEGFLOMNOTLITPPAVLLPSNTDLNVFGLOSS
2830	gocatgaaccatatagactactgotatactgocaccgagttatcaggtgacagctagagcgagggcgatcttatttgatataaggaggccagaggcagaggcgatctgaagaggggagatctgaagagggggggg
2950	totttgotgtotcocgaacottggaccaccacgaacacagagcaaagagcatatcggtttgotaaggtggcaccagagtttocaccacagagtcocagagggcotggaaatccaagcttagct S L L S P N L G P P R T Q S K E H I G L L R W P Q S F H H R S R G P G N P S L A
3070	gaaatcggaaaacaacctggtagottototgctagcgcocctgcaagtcagcatgtacggcaccatgatggatgatgaaatgcacactgcgcagcogcgcogagcoctgatcgcgtggaa E I G K Q P G S F S A S A L Q V S M Y G T M M D D E M H T A Q P R P R P D R V E
3190	gcaaaccagaagcacagcgcgtcotatcogaaggtgccctcaaggtcattgtccaacacaggcotctactctctgtgcgatcggagggttcaaatatgatgaaacgaaagtctgctcot A N O K H S A S Y P K V P S R S L S N T R P L L S V R S E G S N M M K R K S A P
3310	gctcctgcacatgcgcctgccctcgacccttttccgcccctggcaggaggccggcaccacagggcgataacagaaggcgacctctcgagcgatgagtccgggggaagaagtcattgtc A P A H A P A L D P F P P L A G G R H H R A I T F G D L S S D F S A G F F V I V
3430	agagtcgactctcccagcatgotgotttccaaccacggccggcgagggcaactgacggacaacataotactgttgttttgotcttgttgtataatagctgttgtgaacagtggcaacggcgcaccgcgct R V D S P S M L A F O P R P O G N -
3550	gttgtgcatatccctatattgttcaaaatgtacgataataagtattttctggttggctggttcgataagaaaaccaactgatgaattggttcttcgaccaaatcacttgttaggctttg
3670	gettet gag of gaac cett t gg accgett gt actget att caat ag cattert g t g cattert gaa ag a a a a a t g t g cett t att c gaa a a a a a a a a a a a a a a a a a

图2 星星草 PtSOS1 基因 cDNA 核苷酸序列及其推测的氨基酸序列

Fig.2 cDNA nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of *PtSOS1* from *P. tenuiflora* 划线部分为生物学软件预测 PtSOS1 蛋白质存在的跨膜区域,一共11 个,分别标记为 TM1~TM11。

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

tSOS1	MERAGSSPDDAVLLFGVSLVLGIGSRHLLRGTRVPYTVALLVLGVALGSLEVGTKHGLGKLGAGIRIWAAINPDLLLAVFLPALLFESSFSMEVH	
aSOS1	METGEAGSPSPDDAVLFFGVALVLGIASRHLLRGTRVPYTVALLVLGVALGGLEVGTKHGLGKLGAGIRIWSAINPDLLLAVFLPALLFFSSFSMEVH	
sS0S1	MDNPEAEPDDAVLFVGVSLVLGIASRHLLRGTRVPYTVALLVLGVALGSLEFGTKHGMGKLGAGIRIWANINPDLLLAVFLPALLFESSFSMEIH	
tSOS1	MTTVIDATMAYRFLEEATDSSSSSSSKLESSPVDAVLFVGMSLVLGIASRHLLRGTRVPYTVALLVIGIALGSLEYGAKHNLGKIGHGIRIWNEIDPELLLAVFLPALLFESSFSMEVH	1
	* ****:.*::*****.******************	
SOS1	QIKKCMAQMVLLAIPGVVLSTVLLGSAVKLTFPYNWSWKTSFLFGGLLSATDPVAVVALLKDLGASKKLSTIIEGESLMNDGTAIVVCQLFYRMVLGTTFDAGSIIKFLTQVSLGAVALG	2
SOS1	QIKKCMAQMVLLAVPGVVISTVLLGAAVKLTFPYDWNWKTSFLFSGLLSATDPVAVVALLKDLGASKKLSTIIEGESLMNDGTAIVVYQLFYRMVLGKTFDAGSIIKFLSQVSLGAVALG	2
SOS1	QIKKCMAQMVLLAGPGVLISTFFLGSALKLTFPYNWNWKTSLLLGGLLSATDPVAVVALLKELGASKKLSTIIEGESLMNDGTAIVVYQLFYRMVLGRTFDAGSIIKFLSEVSLGAVALG	2
SOS1	QIKRCLGQMVLLAVPGVLISTACLGSLVKVTFPYEWDWKTSLLLGGLLSATDPVAVVALLKELGASKKLSTIIEGESLMNDGTAIVVFQLFLKMAMGQNSDWSSIIKFLLKVALGAVGIG	2
	:*:.*** ***::** **: :*:****:*.****:*:.********	
SOS1	LAFGIASVLWLGFIFNDTIIEISLTLAVSYIAFFTAQDAFEASGVLAVWTLGMFYAAFAKTAFKGDSQESLHHFWEMVAYIANTLIFILSGVVIADGVLQDNIHFERHGASWGFPLLLYV	-
SOS1	LAFGIASVLWLGFIFNDTIIBISLTLAVSYIAFFTAQDALEVSGVLAVMTLCMFYAAFAKTAFKGDSQQSLHHFWENVAYIANTLIFILSGVVIADGVLQDNIHFERHGTSWGFLVLLYV	:
SOS1	LAPGIASVLWLGPIFNDTIIEIALTLAVSYIAFFTAQDALEVSGVLTVMTLGMFYAAFAKTAFKGDSQQSLHHFWEMVAYIANTLIFILSGVVIADGVLENNVHFERHGASWGFLLLLYV	:
SOS1	LAFGIASVIWLKFIFNDTVIBITLTIAVSYFAYYTAQEWAGASGVLTVMTLCMFYAAFARTAFKGDSQKSLHHFWEMVAYIANTLIFILSGVVIAEGILDS-DKIAYQCNSWRFLFLLYV	:

SOS1	FVLTGRAVVVTVLYPLLRHFGYGMDVKEATVLVWSGLRGAVALSLSLSVKRASDADQPNLKSEVGTMFVFFTGGIVFLTLIVNGSTTQFLLHLLGLGKLSATKLRVLKYTRYEMLNKAKE	
SOS1	FvQisravvvgvlypllrhfgygmdikeatvlvwsglrgavalslslsvkrasdsvqtylkpevgtmfvfftggivfltlilngsttqfllhlglgklsatklrvlkytqyem.nkalefvqlsravvvgvlypllrhfgygmdikeatvlvwsglrgavalslslsvkrasdsvqtylkpevgtmfvfftggivfltlilngsttqfllhlglgklsatklrvlkytqyem.nkalefvqlsravvvgvlypllrhfgygmdikeatvlvwsglrgavalslslsvkrasdsvqtylkpevgtmfvfftggivfltlilngsttqfllhlglgklsatklrvlkytqyem.nkalefvqlsravvgvlypllrhfgygmdikeatvlvwsglrgavalslslsvkrasdsvqtylkpevgtmfvfftggivfltlilngsttqfllhlglgklsatklrvlkytqyem.nkalefvqlsravvgvlypllrhfgygmdikeatvlvwsglrgavalslsvkrasdsvqtylkpevgtmfvfftggivfltlilngsttqfllhlglgklsatklrvlkytqyem.nkalefvqlsravvgvlypllrhfgygmdikeatvlvwsglrgavalslsvkrasdsvqtylkpevgtmfvfftggivfltlilngsttqfllhlglgklsatklrvlkytqyem.nkalefvqlsravvgvlypllrhfgygmdikeatvlvwsglrgavalslsvkrasdsvqtylkpevgtmfvftggivfltlilngsttqfllhlglgklsatklrvlkytqyem.nkalefvqlsravvgvlypllrhfgygmdikeatvlvwsglrgavalslsvkrasdsvqtylkpevgtmfvftggivfltlilngsttqflthgvgmdikeatvlvwsglrgavalslsvkravvgvlypllrhfgygmdikeatvlvwsglrgavalslsvkravvgvlypllrhfgygmdikeatvlvwsglrgavalslsvkravvgvlypllrhfgygmdikeatvlvwsglrgavalslsvkravvgvlypllrhfgygmdikeatvlvwsglrgavalslsvkravvgvlypllrhfgygmdikeatvlvwsglrgavalslsvkravvgvlypllrhfgygmdikeatvlvwsglrgavalslsvkravvgvlypllrhfgygmdikeatvlvwsgrmdikeatvlvwsgrmdikeatvlvwsgrmdikeatvlvwygvlypllrhfgygmdikeatvlvwygvlypllrhfgygmdikeatvlvwygvlypllrhfgygmdikeatvlvwygvlypllrhfgygmdikeatvlvwygvlypllrhfgygmdikeatvlvwygvlypllrhfgygmdikeatvlvwygvlypllrhfgygmdikeatvlvwygvlypllrhfgygmdikeatvlvwygvlypllrhfgygmdikeatvlvwygvlypllrhfgygmdikeatvlvwygvlypllrhfgygmdikeatvlvwygvlypllrhfgygmdikeatvlvwygvlypllrhfgygmdikeatvlvwygvlypllrhfgygmdikeatvlvwygvlypllrhfgygmdikeatvlvwgvlypllrhfgygmdikeatvlvwygvlypllrhfgygmdikeatvlvwygvlypllrhfgygmdikeatvlvwygvlypllrhfgygmdikeatvlvwgvlypllrhfgygmdikeatvlvwgvlypllrhfgygmdikeatvlvwgvlypllrhfgygmdikeatvlvwgvlypllrhfgygmdikeatvlvwgvlypllrhfgygmdikeatvlvwgvlypllrhfgygmdikeatvlvwgvlypllrhfgygmdikeatvlvwgvlypllrhfgygmdikeatvlvwgvlypllrhfgygmdikeatvlvwgvlypllrhfgygmdikeatvlvwgvlypllrhfgygmdikeatvlvwgvlypllrhfgygmdikeatvlvwgvvlypllrhfgygmdikeatv	
SOS1	FvQiSRilvvvilypllrhfgygldlkeatilvwaglrgavalslslsvkrasdavqthlkpvdgtmfvfftggivfltlifngsttqfllhlgmdrlaatklrilnytkyemlnkaleftqgivfltlifngsttqfllhlgmdrlaatklrilnytkyemlnkaleftqgivfltlifngsttqfllhlgmdrlaatklrilnytkyemlnkaleftqgivfltlifngsttqfllhlgmdrlaatklrilnytkyemlnkaleftqgivfltlifngsttqfllhlgmdrlaatklrilnytkyemlnkaleftqgivfltlifngsttqfllhlgmdrlaatklrilnytkyemlnkaleftqgivfltlifngsttqfllhlgmdrlaatklrilnytkyemlnkaleftqgivfltlifngsttqfllhgmdrlaatklrilnytkyemlnkaleftqgivfltlifngsttqfllhgmdrlaatklrilnytkyemlnkaleftqgivfltlifngsttqfllhgmdrlaatklrilnytkyemlnkaleftqgivfltlifngsttqfllhgmdrlaatklrilnytkyemlnkaleftqgivfltlifngsttqfllhgmdrlaatklrilnytkyemlnkaleftqgivfltlifngsttqflthgivflthgivflthgivflthgvdrlaatklrilnytkyemlnkaleftqgivflthgvdrlaatklringtqgivflthgvdrlaatklringtqgivflthgvdrlaatklringtqgivflthgvdrlaatklringtqgivflthgvdrlaatklringtqgivflthgvdrlaatklringtqgivflthgvdrlaatklringtqgivflthgvdrlaatklringtqgivflthgvdrlaatklringtqgivflthgvdrlaatklringtqgivflthgvdrlaatklringtqgivflthgvdrlaatklringtqgivflthgvdrlaatklringtqgivflthgvdrlaatklringtqqivflthgvdrlaatklringtqgivflthgvdrlaatklringtqgivflthgvdrlaatklringtqqivflthg	
SOS1	$\label{eq:construction} YIQLSRVVVVGVLYPLLCRFGYGLDWKESIILVWSGLRGAVALALSLSVKQSSGN-SHISKETGTLFLFFTGGIVFLTLIVNGSTTQFVLRLLRMDILPAPKKRILEYTKYEMLNKALR$	4
5051	AFGDLRDDEELG-PADWITVKKYITCLNNLEDEQAHPHDAPDKDESVHTMNLRDTRVRLLNGVQAAYWGMLEEGRITQATANILMRSVDEAMDLVSTQSLCDWKGLRSNVHLPKYYRFLQ	
50S1	AFGDLRDDEELG-PVDWVNVKKYITCLNNLEDEQAHPHDVPDKDDHIHTMNLKDTRVRLLNGVQAAYWGMLEBGRITQSTANILMRSVDEAMDLVSSQSLCDWKGLRSNVHFPNYYRFLQ	1
50S1	AFGDLRDDEELGPPADWVTVKKYITCLNDLDDEPVHPHAVSDRNDRMHTMNLRDIRVRLLNGVQAAYWGMLEEGRITQTTANILMRSVDEAMDLVPTQELCDWKGLRSNVHFPNYYRFLQ	1
S0S1	AFQDLGDDEELC-PADWPTVESYISSLKGSEGELVHHPHNGSKIGSLDPKSLKDIRMRFLNGVQATYWEMLDEGRISEVTANILMQSVDEALDQVST-TLCDWRGLKPHVNFPNYNFLH	1
	** ** ***** **: **: *: :.* * . :: :*:* *:::********	
SOS1	MSRLPRRVVTYFTVERLELGCYICAAFLRAHRIARRQLHDFLGDSEIARIVIDESTAAGEEAKKFLEDVRLTFPQVLLALKTRQVTYAVLTHLSEYIQDLGKTGLLEEKEMVHLDDALQT	
50S1	$\label{eq:scherk} we set for the set of th$	1
SOS1	$\label{eq:scylcaaflrahriarrolhdflgdsevarivides} Nagee arkfled with for the scale of the scale $	
SOS1	SKVVPRKLVTYFAVERLESACYISAAFLRAHTIARQQLYDFLGESNIGSIVINESEKEGEEAKKFLEKVRSSFPQVLRVVKTKQVTYSVLNHLLGYIENLEKVGLLEEKEIAHLHDAVQT	1
SOS1	DLRKLKRNPPLVKMPRASEILNTHPLVGALPAAVRDPLLSNTEETIKVHGTILYSEGSRPTGIWLVSTGIVKWTSQRLSTRHSLDPILSHGSTLGLYEALVGKPYICDIITESVVHCFFI	1
SOS1	$\label{eq:linear} DLKKLKRNPPLvKmPrvRellnthpLvGalsadvrdpllsntketikvhgtilyregsrrtgiwLvstgivkwtsrrlctrhsldpilshgstlglyealtgkpvicdiitesvvhcffi$	1
SOS1	$\label{eq:linear} DLKKFKRNPPLVKMPRVSDLLNTHPLVGALPAAMRDPLLSSTKETVKGHGTILYREGSRPTGIWLVSIGVVKWTSQRLSSRHSLDPILSHGSTLGLYEVLIGKPYICDMITDSVVHCFFI$	1
SOS1	GLKKLLRNPPIVKLPKLSDMITSHPLSVALPPAFCEPLKHSKKEPMKLRGVTLYKEGSKPTGVWLIFDGIVKWKSKILSNNHSLHPTFSHGSTLGLYEVLTGKPYLCDLITDSMVLCFFI	1
S0S1	EAETIEQLRQSDPSIEDFLWQESALVIARIFLPQIFEKMAMREMRVLISERST-MNIYIKGEDIELGPNYVCILLEGFLQMNQTLITPPAVLLPSNTDLNVFG-LQSSAMNHIDYCY	1
S0S1	EAEKIEQLRQSDPSIEDFMWQESALVIARILLPQIFEKMAMREMRVLISERSS-MNYYIKGEAIELGHNNVGILLEGFLKTENRTLITAPAVLLPSNTDLNLFG-LQSSAMNQIDYCY	1
SOS1	EAEKIEQLRQSDPSIEIFLWQESALVVARLLLPMMFEKMATHELRVLITERST-MNIYIKGEEIELEQNPIGILLEGFLKTKNQTLITPPGLLLPPNADLNLFG-LESSAINRIDYCY	1
S0S1	DSEKILSLQ-SDSTIDDFLWQESALVLLKLLRPQIFESVAMQELRALVSTESSKLTTYVTGESIEIDCNSIGLLLEGFVKPVGIKEELISSPAALSPSNGNQSFHNSSEASGIMRVSFSQ	1
12000		
50S1	TAPSYQVTARARAILFDIRRPEAESDLQRSASLLSPNLG-PPRTQSKEHIGLLRWPQSFHHRSRGPCNPSLAEIGKQPGSFSASALQVSMYGTMMDDEMHTAQP-RPRPDRV	1
50S1	TAPSYQVEARARAIIFEIGRLDIEADLQRSASLLSSTLGPSRTQSKEHVGLLRWPESFRRSS-GPGNASLAEIRGQPGSFSARALQVSMYG-SMTDGMHRARRQPRLAHV	10
50S1	TAPSYQVEARARILLFVEIGRPEIEADLQRSASLISQTLELPRTQSKEHSGLLSWPESFRKSRGAQNGASLTEIRDHPASPSARALQLSMYGSWINDMKSGQGQGQRRQRHRHTKA	10
50S1	QATQYIVETKARAIIFNIGAFGADRTLHRRPSSLTPPRSSSSDQLQRSFRKEHRGLMSWPENIYAKQ QQEINKTTLSLSERAMQLSIFGSMVNVYRRSVSFG	10
50S1	EANQKHSASYPKVPSKSLSNTKPLLSVRSEGSNMMKRKSAPAPAHAPALDPPPP-LAGGRHHRATTEG-DLSSDESAGEEVTVRVDSPSMLAPQPRPQGN-	1
SOS1	LUTHANDS VS 1/K WYSK-AAUTRYLLSVKSEGSNAMKKSAP A TAPALAPPPPLAEGQQRRAVGED-DDSSDESVGEEV VRVDSPSMLSENPPSGPPRGS	11
INI	SSNNAHSSSIPKVPSRSSNTUKPLLSVUSEGANMITARUAAAAGASLPPEPEEAGKKKKRQRKAIEEDEDNSSDESAGEEVIVRVDSPSMLTFRQPSSAADR-	11
2001		

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)。

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 PstI、SacI 酶切位点,而没有 EcoRI 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 PtSOSI 基因 mRNA 表达水平基本上没有差 别(图 5),表明 PtSOSI 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 PtSOSI 基因 mRNA 表达水平均明显增加 (图 5),这表明 PtSOSI 基因表达受 NaCl 盐胁迫上 调。



PstI EcoRI SacI 图 4 星星草基因 DNA 的 Southern 杂交

Fig.4 Southern hybridization of genomic
DNA from P. tenuiflora
10 μg 基因组 DNA 分别 PstI、EcoRI、SacI 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

讨 论

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⁺-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)。但盐生植物质膜上 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,了解盐生植物质膜型 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。

参考文献

- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na*/H* antiport 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 TVP1 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, Garciadeblas B, Mendoza I, Zhu JK, Pardo JM, Quinter 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 Apriplex 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, Rodriguez-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 longdistance 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