

喜盐鸢尾 Na^+/H^+ 逆转运蛋白基因 *IhNHX1* 的克隆及序列分析

赵沿海, 原海燕, 顾春笋, 黄苏珍^①

[江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园) 江苏省植物迁地保护重点实验室, 江苏 南京 210014]

摘要: 采用同源克隆和 RACE 法克隆获得喜盐鸢尾 (*Iris halophila* Pall.) Na^+/H^+ 逆转运蛋白基因 *IhNHX1* 的全长序列, 该基因序列的全长为 1 946 bp, 包含 1 个长度为 1 611 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 537 个氨基酸。序列对比及系统树分析结果表明: *IhNHX1* 基因编码的氨基酸序列与另外 11 种植物 *NHX1* 基因编码的氨基酸序列的一致性高达 96.2%, 相同序列占 61.7%, 表明该氨基酸序列保守性较高; 在系统树上喜盐鸢尾与其他植物的分支长均大于 1.2, 表明它们的亲缘关系均较远; *IhNHX1* 基因编码的氨基酸序列含有 2 个保守结构域, 即氨基吡嗪结合位点和 CaM 结合结构域, 分别是 *NHX1* 蛋白的标志性结合位点和重要调节区域。该蛋白质的二级结构和跨膜结构域分析结果表明: 在 *IhNHX1* 基因编码的蛋白质的二级结构中, α 螺旋占 48.60%、不规则卷曲占 32.03%、延伸链占 14.71%、氢键转角占 4.66%; 该蛋白质含有 10 个跨膜结构域。此外, 对 5'RACE 方法中 5'端正向引物的优化设计步骤进行了归纳, 以提高 PCR 扩增的特异性。

关键词: 喜盐鸢尾; Na^+/H^+ 逆转运蛋白基因 *IhNHX1*; 基因克隆; 序列分析; 系统树; 跨膜结构域

中图分类号: Q943.2; Q785 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2014)02-0011-08

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2014.02.02

Cloning and sequence analysis of Na^+/H^+ antiporter gene *IhNHX1* of *Iris halophila* ZHAO Yanhai, YUAN Haiyan, GU Chunsun, HUANG Suzhen^① (Jiangsu Province Key Laboratory for Plant *Ex-situ* Conservation, Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2014, 23(2): 11-18

Abstract: Through homology-based cloning and RACE (rapid amplification of cDNA ends) methods, the whole sequence of Na^+/H^+ antiporter gene *IhNHX1* of *Iris halophila* Pall. was cloned. The whole length of this gene is 1 946 bp, which contains an open reading fragment (ORF) with a length of 1 611 bp and encodes 537 amino acids. The results of sequence comparison and phylogenetic tree analysis show that the identity of amino acid sequences encoded by *IhNHX1* gene and by *NHX1* gene of other eleven species is up to 96.2%, the same sequence accounts for 61.7%, meaning that the conservation of this amino acid sequence is higher. The branch length of *I. halophila* and other species in phylogenetic tree is larger than 1.2, indicating that their genetic relationship is far away. There are two conserved domains in amino acid sequence encoded by *IhNHX1* gene, namely ammonia chloride pyrazine binding site and CaM binding domain, which is the typical binding site and important regulation domain of *NHX1* protein, respectively. The analysis results of the second structure and transmembrane domain of this protein show that in the second structure of protein encoded by *IhNHX1* gene, α helix accounts for 48.60%, random coil does 32.03%, extended strand does 14.71% and hydrogen bonding turn does 4.66%, and there are 10 transmembrane domains in this protein. Moreover, the optimization design steps of 5' end forward primer in 5'RACE method are concluded in order to improve the specificity of PCR amplification.

收稿日期: 2014-01-13

基金项目: 江苏省植物迁地保护重点实验室开放基金项目(迁 201101; 迁 201201)

作者简介: 赵沿海(1984—), 男, 江苏徐州人, 硕士研究生, 主要从事鸢尾属植物耐盐性方面的研究。

^①通信作者 E-mail: hsz1959@163.com

Key words: *Iris halophila* Pall.; Na^+/H^+ antiporter gene *IhNHX1*; gene cloning; sequence analysis; phylogenetic tree; transmembrane domain

在盐胁迫环境中, Na^+ 是危害植物生长发育甚至存活的主要胁迫离子, 高浓度 Na^+ 可严重干扰植物对矿质元素的吸收并影响气孔的开关及一些依赖 K^+ 活化胞质酶的活性^[1-2]。 Na^+/H^+ 逆转运蛋白 (NHX, Na^+/H^+ antiporter) 是位于细胞质膜和液泡膜上的一类跨膜载体蛋白, 它可以利用液泡膜上的 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 提供驱动力建立跨膜质子梯度, 将 Na^+ 和 K^+ 离子排出细胞质, 减少 Na^+ 对细胞的毒害作用, 从而提高植物的抗盐能力^[3-4]。1976年, Murer 等^[5] 在老鼠肾细胞中首次发现 NHX 蛋白; 同年, Ratner 等^[6] 在大麦 (*Hordeum vulgare* Linn.) 质膜上发现该蛋白质; 1985年, Blumwald 等^[7] 在甜菜 (*Beta vulgaris* Linn.) 根部的液泡膜上也发现该蛋白质。NHX1 蛋白在植物体中含量丰富且分布广泛, 目前已发现的 NHX 基因共有 6 种, 表现出不同的时空表达模式; 根据分布位置的不同及序列的相似性, 可以将 NHX 基因分为 2 组^[8-10], 一组为 NHX1 至 NHX4, 均分布在液泡膜上; 另一组为 NHX5 和 NHX6, 主要分布在高尔基体及反面高尔基网上, 在内涵体物质运输到液泡及调节内涵体 pH 值上发挥作用。

NHX 蛋白属于结构性蛋白质, 在无盐条件下活性较低; 经过盐处理后, NHX 蛋白的合成及活性均增加, 表明该蛋白质与植物耐盐性密切相关^[11]。目前, 许多研究均证实 NHX 蛋白在植物耐盐方面起重要作用。例如: 在 NHX 基因突变的酵母中表达拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] NHX 基因后可以使酵母由盐敏感型转变为盐耐受型^[12]; 在水稻 (*Oryza sativa* Linn.) 体内过量表达其自身的 NHX 基因能够提高其耐盐性^[13]; Li 等^[14] 的研究结果表明: 转 marker-free *AtNHX1* 基因的玉米 (*Zea mays* Linn.) 的抗旱性及产量都有一定程度的提高; Wu 等^[15] 认为: 在霸王 [*Zygophyllum xanthoxylum* (Bunge) Maxim.] 耐盐胁迫和干旱胁迫中 *ZxNHX* 基因均有重要作用; Apse 等^[16] 在拟南芥中过量表达 *AtNHX1* 基因, 可显著提高拟南芥的耐盐性; Zhang 等^[17] 将 *AtNHX1* 基因转入番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 中并过量表达也可显著提高其耐盐性。

喜盐鸢尾 (*Iris halophila* Pall.) 为多年生宿根性草本植物, 主要分布于新疆、甘肃和内蒙古^[18]。喜盐鸢

尾具有很强的耐寒性和耐旱性, 观赏价值很高; 其根、花和种子均可入药, 具有清热解毒、利尿和止血等功效^[19]。此外, 喜盐鸢尾还是一种典型的盐生植物, 在含 $308 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的培养液中仍然能够生长良好^[20], 对植物耐盐性的研究具有重要的学术价值。

为明确喜盐鸢尾耐盐的分子机制, 作者采用同源克隆和 RACE 法克隆获得喜盐鸢尾 *IhNHX1* 基因的全长序列, 并对该基因的 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列进行分析; 对该基因编码的氨基酸序列与另外 11 种植物 NHX1 基因编码的氨基酸序列进行同源性比较和系统树分析, 并分析了 *IhNHX1* 基因编码的蛋白质的二级结构和跨膜结构域, 以期对喜盐鸢尾耐盐基因的挖掘与利用研究提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用喜盐鸢尾种子为作者所在实验室保存。将喜盐鸢尾幼苗用 1/2 Hoagland 营养液水培 15 d 后, 用含 $308 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的 1/2 Hoagland 营养液水培 1 d, 采集新鲜叶片用于总 RNA 提取。

实验用 M-MLV 逆转录酶、*rTaq* DNA 聚合酶、TdT 末端加尾酶、T4-DNA 连接酶、DNA 凝胶回收试剂盒、pMD19-T 载体、MiMiBEST DNA 纯化试剂盒和 Marker 2000 均为宝生物工程 (大连) 有限公司产品; 抗生素及其他相关试剂购自上海浩嘉生物工程公司; RNA 提取试剂 Trizol plus 为南京天为生物科技有限公司产品; 转化使用的菌株为大肠杆菌 DH5 α 。

引物合成均由上海捷瑞生物工程有限公司完成; 测序则由南京思普金生物科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成 根据 Trizol plus 试剂说明书上的方法, 用喜盐鸢尾鲜叶提取总 RNA, 并使用 M-MLV 逆转录酶合成 DNA 第 1 条链, 即 cDNA。

1.2.2 基因中间序列的克隆 根据 GenBank 中已登录的 NHX1 同源基因的核苷酸序列和氨基酸序列, 利用 Clustal W 软件进行序列同源性在线比对, 并分析它们的保守区域; 利用 CODEHOP 软件、根据保守区

序列在线设计兼并引物。引物 NM1 的序列为 5'-CACTCAACGCCGCTTYCARGTNA-3';引物 NM2 的序列为 5'-TCGTCACGTTGTGCCANGTRTA-3'。其中,R=A/G、Y=C/T、N=A/C/G/T。

PCR 反应体系总体积为 25 μL ,包括模板 250 ng、10 \times PCR buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μL 、dNTPs 混合液(各 2.5 mmol \cdot L $^{-1}$) 2 μL 、正反向引物各 1 μL 、*Taq* DNA 聚合酶 0.15 μL ,用灭菌双蒸水补足体积至 25 μL 。PCR 扩增程序如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s、50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 50 s,共 32 个循环;最后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

将上述 PCR 扩增产物进行电泳凝胶回收,然后连接到 pMD19-T 载体上,并转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中;将经过转化的感受态细胞涂布到含有 50 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素 (ampicillin) 的 LB 固体培养基上,过夜培养;分别挑取单菌落,接种至含有相同浓度氨苄青霉素的 1 mL LB 液态培养基中,振荡培养 3 h 后,对培养菌液的 DNA 进行 PCR 鉴定;将含有目的条带(即 *IhNHX1* 基因中间序列)的样品送测序公司进行测序。

1.2.3 基因 3'端序列的克隆 采用 3'RACE 方法^[21] 克隆 *NHX1* 基因的 3'端序列,利用 Oligo 7 软件、根据测序获得的 *IhNHX1* 基因中间序列设计 3'端通用 PCR 引物和特异 PCR 引物。通用引物 Olig(dT) primer 的序列为 5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT-3',通用引物 dT-AP 的序列为 5'-GACTCGAGTCGACATCGA-3';特异引物 N31 的序列为 5'-CATTTGCTGGATTGCTTAGTGC-3',特异引物 N32 的序列为 5'-AGGCATTCTACTGATCGTGAAG-3'。

使用通用引物 Olig(dT) primer 逆转录合成 cDNA,并以 cDNA 为模板、用特异引物 N31 和通用引物 dT-AP 进行第 1 轮巢式 PCR;再以第 1 轮巢式 PCR 扩增产物稀释 100 倍后的溶液为模板、用特异引物 N32 和通用引物 dT-AP 进行第 2 轮巢式 PCR。巢式 PCR 的扩增程序如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s、50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s,共 32 个循环;最后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。巢式 PCR 产物经转化、克隆后,测序得到 *IhNHX1* 基因的 3'端序列。PCR 反应体系和转化、克隆等方法同上。

1.2.4 基因 5'端序列的克隆 采用 5'RACE 方法^[22] 克隆 *NHX1* 基因的 5'端序列,利用 Oligo 7 软件、根据测序获得的 *IhNHX1* 基因中间序列设计 5'端正向 PCR

引物和反向特异 PCR 引物。正向引物 5AP 的序列为 5'-GATGCGACTGCTCACTGACTGACTCTGACCCGCATCGGGGGGGGGH-3',正向引物 5NP1 的序列为 5'-GATGCGACTGCTCACTGACTG-3',正向引物 5NP2 的序列为 5'-TGACTGACTCTGACCCGCATC-3';反向特异引物 N51 的序列为 5'-CAAATGCTCCCAAGAAGGTG-3',反向特异引物 N52 的序列为 5'-ATCGAAGTTCTGTATTGCGTT-3',反向特异引物 N53 的序列为 5'-GCACCAAGAGAAATTATGACGAA-3'。

用反向特异引物 N51 逆转录合成 cDNA;经 MiMiBEST DNA 纯化试剂盒纯化后,用 TdT 末端加尾酶为 cDNA 加上 Poly(C)尾;以加尾后的 cDNA 为模板、用正向引物 5AP 进行 PCR 扩增,合成互补并加接头的双链 DNA。PCR 扩增程序如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 60 s;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s、65 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 70 s,共 5 个循环;最后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

以加接头的双链 DNA 为模板、用正向引物 5NP1 和反向特异引物 N52 进行第 1 轮巢式 PCR;再以第 1 轮巢式 PCR 扩增产物稀释 100 倍后的溶液为模板、用正向引物 5NP2 和反向特异引物 N53 进行第 2 轮巢式 PCR。巢式 PCR 扩增程序如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 40 s、55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 32 个循环;最后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。巢式 PCR 产物经转化、克隆后,测序得到 *IhNHX1* 基因的 5'端序列。PCR 反应体系和转化、克隆等方法同上。

1.3 序列及蛋白质二级结构分析

采用 DNAMAN 软件对克隆得到的 5'端、3'端和中间序列进行首尾拼接,得到 *IhNHX1* 基因的全序列;使用 Oligo 7 软件分析该基因编码的氨基酸序列。从 GenBank 数据库中选择与 *IhNHX1* 基因编码的氨基酸序列 BLAST 相似度大于 80% 的 11 种植物的同源氨基酸序列,通过 Clustal W 软件分析 *NHX1* 基因编码的氨基酸序列的保守性,并基于此基因编码的氨基酸序列、利用 MEGA 6 软件中的泊松分布模式构建 12 种植物的系统树。采用 SOPMA 软件在线分析 *IhNHX1* 基因编码的蛋白质的二级结构,并通过 TMHMM 2.0 软件在线分析该蛋白质的跨膜结构域。

2 结果和分析

2.1 *IhNHX1* 基因的 PCR 扩增结果

根据设计的引物分别对喜盐鸢尾 *IhNHX1* 基因的

中间序列、5'端序列和 3'端序列进行 PCR 扩增,结果见图 1。扩增得到的 *IhNHX1* 基因中间序列的片段长度约为 600 bp,5'端序列的片段长度约为 500 bp,3'端序列的片段长度约为 1 100 bp。

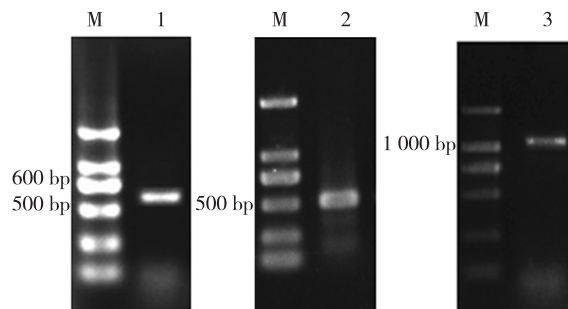
2.2 *IhNHX1* 基因 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列分析

采用 DNAMAN 软件将克隆获得的喜盐鸢尾 *IhNHX1* 基因的 5'端序列、中间序列及 3'端序列进行首尾拼接后得到 1 条全长 1 946 bp 的 cDNA 序列。通过 Oligo 7 软件分析可知:该基因包含 1 个长度为 1 611 bp 的开放阅读框(ORF),其编码的蛋白质共包含 537 个氨基酸。该基因的 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列详见图 2。

2.3 *IhNHX1* 基因及其他植物 *NHX* 基因编码的氨基酸序列比较及同源性分析

氨基酸序列比较结果(表 3)表明:喜盐鸢尾 *IhNHX1* 基因编码的氨基酸序列与平滑獐毛 [*Aeluropus lagopoides* (Linn.) Trin. ex Thwaites]、双

稗草 [*Diplachne fusca* (Linn.) Kunth]、结缕草 (*Zoysia japonica* Steud.)、芦苇 [*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.]、玉米、毛竹 [*Phyllostachys edulis* (Carr.) J. Houz.]、可可 (*Theobroma cacao* Linn.)、小米



M: 分子量标记 Marker 2000; 1: 中间序列 Middle sequence; 2: 5'端序列 5' end sequence; 3: 3'端序列 3' end sequence.

图 1 喜盐鸢尾 *IhNHX1* 基因的 PCR 扩增结果
Fig. 1 PCR amplification result of *IhNHX1* gene of *Iris halophila* Pall.

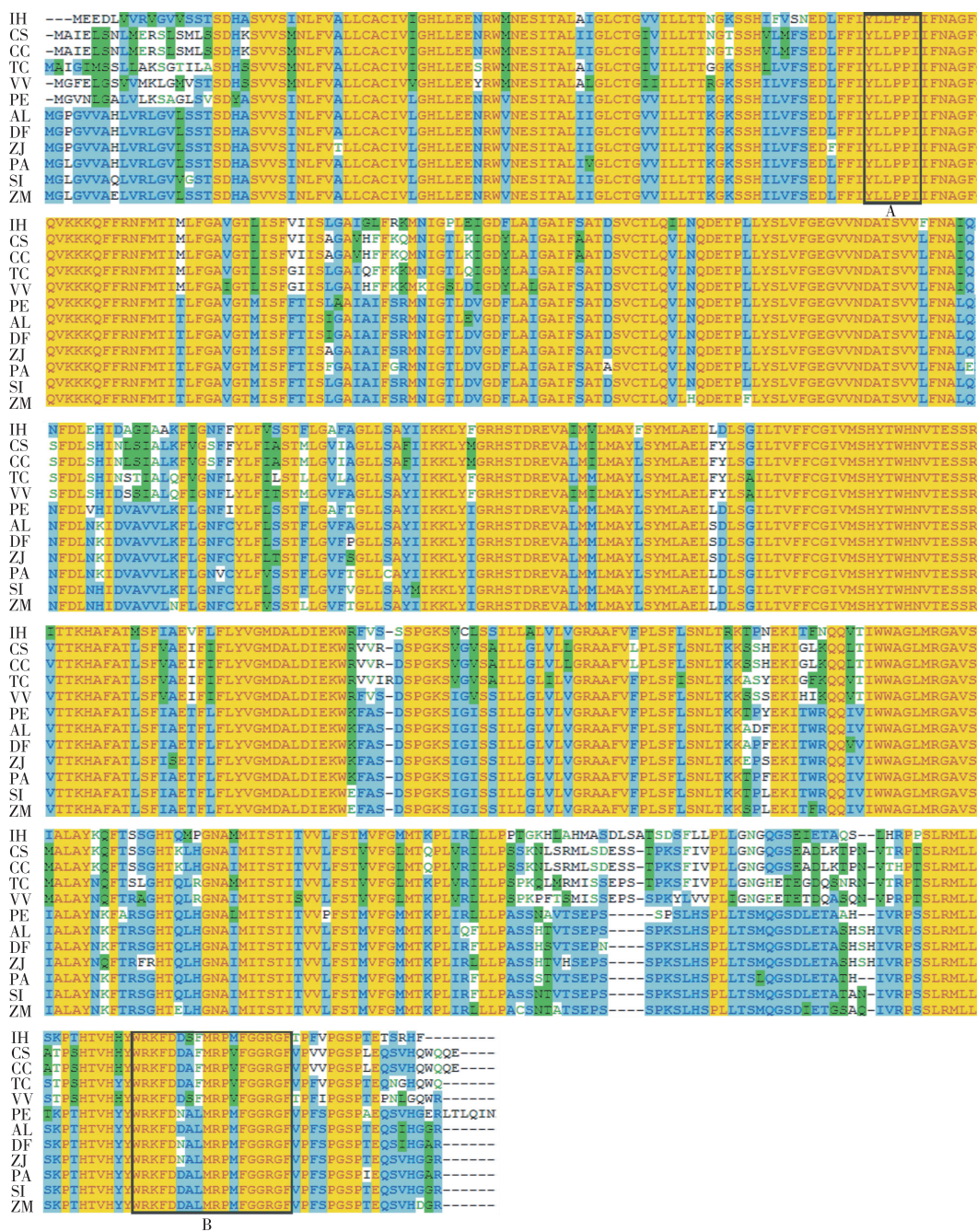
```

1  CGCGAGTGGGATGGAGGAGGATCTGGTGGTGGGTTGGTGTCTGCTCCACCTCCGACCATGCCTCCGTTGCTCCATCAACCTCTTC
1  M E E D L V V R V G V V S S T S D H A S V V S I N L F
92  GTAGCTCTCTCGCCATGCATAGTCATCGGACACCTACTGGAGGAGAATAGATGGATGAACGAGTCCATCACAGCTCTAGCCATCGGG
28  V A L L C A C I V I G H L L E E N R W M N E S I T A L A I G
182  TTGTGCAGCTGGCGTTGTGATCTTCTGACGACAAATGGAAGAGCTCTCATATATCGTATCTAAGCAAGATCTCTCTTCATCTACCTC
L C T G V V I L L T T N G K S S H I F V S N E D L F F I Y L
272  CTCCTTCCAATCATCTTCAACGCCGGCTTCAAGTGA AAAAGAAAACAATTTTCCGCAACTTCATGACAATTATGCTGTTTGGTGCAATT
58  L P P I I F N A G F Q V K K K Q F F R N F M T I M L F G A V
362  GGGACCCATCTCTCTGTCATAATTTCTCTGTGTCAAATGGTTTATTAGAAAATGAACATAGGTCCTGGAATTCGAGATTTT
118  G T L I S F V I I S L G A I G L F R K M N I G P L E I G D F
452  CTTGCAATGGGGCGATTTTCTGCAACAGATTCCGTTTGCACCTTGCAGATTCTTAACCAGGATGAAACACCATTATTATATAGCTTG
148  L A I G A I F S A T D S V C T L Q I L N Q D E T P L L Y S L
542  GTCTTTGGTGAGGGAGTGTCAATGATGCTACATCAGTGGTGTTTTTGCAACGCAATACAGAAGCTTCGATCTTGAACATATTGATGCGAGG
178  V F G E G V V N D A T S V V F F N A I Q N F D L E H I D A G
632  ATTCAGCAAAATTTATCGGAAATTTCTTTTATTTTTCAGCAGCAGCCTTCTGGGAGCATTGCTGGATTGCTTACTGCTGATATC
208  I A A K F I G N F I L F V S S T F L G A F A G L L S A Y I
722  ATAAAAAAGTTGTACTTTGGAAGGCATTTACTGATCGTGAAGTTGCAATTTATGGTCTCATGGCTTACTTTTCTTATATGCTGGCTGAA
238  I K K L Y F G R H S T D R E V A I M V L M A Y F S Y M L A E
812  TTATTAGATCTAAGTGGCATTCTACTGTATTTTCTGTTGGATAGTAATGTCACACTATACTGGCATAATGTCACAGAAAGTTCTAGA
268  L L D L S G I L T V F F C G I V M S H Y T W H N V T E S S R
902  ATCACCACFAAGCATGCTTTTGAACAATGTCATTCATCGCTGAGGTTTTTCTTCTTATGTTGGAATGGATGCGCTGGACATAGAG
298  I T T K H A F A T M S F I A E V F L F L Y V G M D A L D I E
992  AAGTGGAGATTGTGACGAGTACTCTGAAAATCAGATGCTGAGCTCAATTTTCTGCGCTTGGTTTACTGTGGAAGAGCGTGCATTT
328  K W R F V S S S P G K S V C L S S I L L A L V L V G R A A F
1 082  GTATTCCTACTCTCTTTCTATCCAAGTACGAGAAAGACTCCAAAAGCAAGATCACCTTTAATCAGCAAGTACGATATGGTGGGGC
358  V F P L S F L S N L T R K T P N E K I T F N Q Q V T I W W A
1 172  GGCTTATGCGTGGTGCAGTATCAATTGCACTTGCTTACAACAGTTTACAAGTTCTGGCCACACCAATGCCTGGCAATGCAATGATG
388  G L M R G A V S I A L A Y K Q F T S S G H T Q M P G N A M M
1 262  ATCACCAGTACCAATGAGTGTCTTATTCAGCACTATGGTATTCGGTATGATGACCAAGCCTCTCATAGGCTCCTACTGCCTCAACC
418  I T S T I T V V L F S T M V F G M M T K P L I R L L L P P T
1 352  GGAAGCATCTGGCCACATGGCTTCAGATCTCTCAGCTACTTCCGATTTCTTCTACTTCCCTACTCGGAAACGGTACGGGATCCGAG
448  G K H L A H M A S D L S A T S D S F L L P L L G N G Q G S E
1 442  ATTGAAACGGCCAAAGTCTACATCGCCACCAAGCCTCCGATGCTTCTTACTAAGCCGACCCACCCGCTCCACCATTGGCGTAAG
478  I E T A Q S L H R P P S L R M L L S K P T H T V H H Y W R K
1 532  TTTGAGCACTTTCATGAGGCTATGTTTGGCGGACGAGGCTTACTCCGTTTGTGCGCGGTTACCAACCGAAACGACGGCCATTTT
508  F D D S F M R P M F G G R G F T P F V P G S P T E T S R H F
1 622  TAACCTCGATGAGCTAGAACAGATTATGCGGAGGAGAGGCAAGAGAGAATCAGACTAAGTTACATTTATGTTCTATAGTGCCTT
1 712  GACATGTATGTAATCATGTCATAAGTTTGTATCTGCCCCTATAGTGTAAATGCTACTTAACTCATATCTTGTATCCACAGGAA
1 802  CTTACTTAAATGGCTTTCTATGTTTATATTTTTCTTCTCAGAACTACTGTATATATAACTTTTGTGTAAGGAGAAATGGACTCATT
1 892  CGAATGTTGCGTTTAAAGGAAATCATTTTTTAAAGTCTTGA AAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 2 喜盐鸢尾 *IhNHX1* 基因的 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列
Fig. 2 cDNA sequence of *IhNHX1* gene of *Iris halophila* Pall. and its amino acid sequence encoded

[*Setaria italica* (Linn.) P. Beauv.], 葡萄 (*Vitis vinifera* Linn.), 甜橙 [*Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck] 和金钱橘 (*Citrus clementina* Hort.) 11 种植物 *NHX1* 基因编码的氨基酸序列的一致性高达 96.2% (图中彩色区域所



A: 氨基吡嗪结合位点 Ammonia chloride pyrazine binding site; B: CaM 结合结构域 CaM binding domain.

IH: 喜盐鸛尾 *Iris halophila* Pall.; CS: 甜橙 *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck; CC: 金钱橘 *Citrus clementina* Hort.; TC: 可可 *Theobroma cacao* Linn.; VV: 葡萄 *Vitis vinifera* Linn.; PE: 毛竹 *Phyllostachys edulis* (Carr.) J. Houz.; AL: 平滑箴毛 *Aeluropus lagopoides* (Linn.) Trin. ex Thwaites; DF: 双稃草 *Diplachne fusca* (Linn.) Kunth; ZJ: 结缕草 *Zoysia japonica* Steud.; PA: 芦苇 *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.; SI: 小米 *Setaria italica* (Linn.) P. Beauv.; ZM: 玉米 *Zea mays* Linn.

图 3 喜盐鸛尾 *IhNHX1* 基因编码的氨基酸序列与其他植物 *NHX1* 蛋白氨基酸序列的比较
Fig. 3 Comparison of amino acid sequence encoded by *IhNHX1* gene of *Iris halophila* Pall. with that of *NHX1* protein of other species

示),其中完全一致的序列占 61.7% (图中黄色区域所示),表明该氨基酸序列保守性较高。

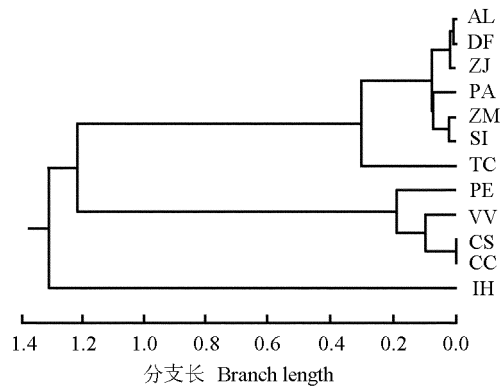
此外,喜盐鸢尾 *IhNHX1* 基因编码的氨基酸序列上有 2 个保守结构域即图 3 中的黑框 A 和黑框 B,这 2 个结构域均为 NHX1 蛋白上极为保守的结构域^[23]。其中,黑框 A 为 NHX1 蛋白上的氨基吡嗪结合位点,该位点是 NHX1 蛋白的标志性结合位点;黑框 B 为 NHX1 蛋白上的 CaM 结合结构域,该结构域是 NHX1 蛋白的重要调节区域。

基于喜盐鸢尾 *IhNHX1* 基因编码的氨基酸序列与上述 11 种植物 NHX1 蛋白的氨基酸序列、利用 MEGA 6 软件中的泊松分布模式构建系统树,结果见图 4。整体上看,同科植物间的亲缘关系最近,如禾本科(Poaceae)植物平滑獐毛、双稗草、结缕草、芦苇、玉米和小米之间的分支长都在 0.1 以内,而芸香科(Rutaceae)植物甜橙与金钱橘之间的分支长为 0。在此系统树中,喜盐鸢尾与其他植物的分支长均大于 1.2,表明从 NHX1 蛋白的氨基酸序列来看,喜盐鸢尾与其他 11 种植物间的亲缘关系均较远。

2.4 *IhNHX1* 基因编码的蛋白质二级结构分析

采用 SOPMA 软件在线分析喜盐鸢尾 *IhNHX1* 基因编码的蛋白质二级结构,结果见图 5;通过 TMHMM 2.0 软件在线分析该蛋白质的跨膜结构域,结果见图 6。由图 5 可见:在喜盐鸢尾 *IhNHX1* 蛋白的二级结构

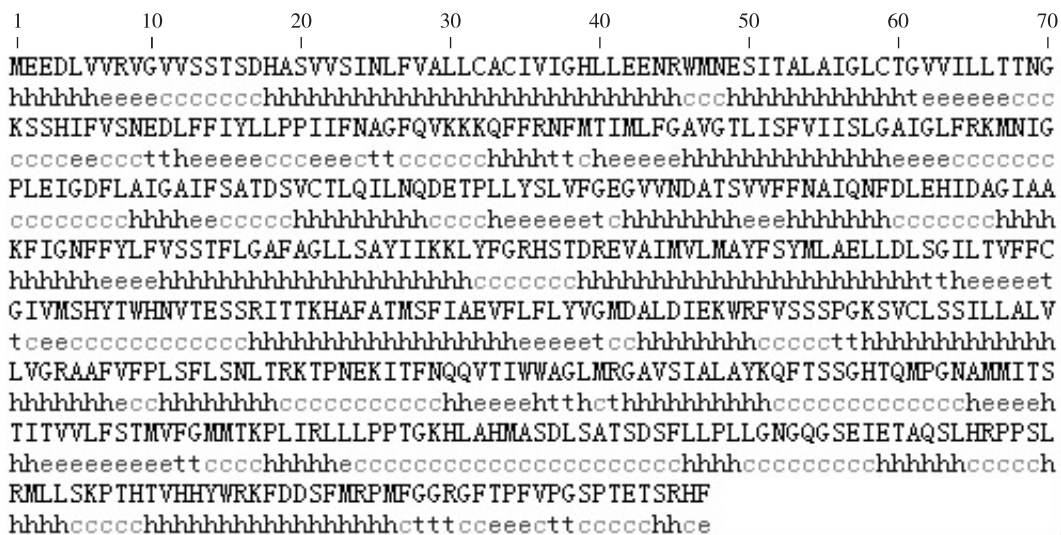
中, α 螺旋(α helix)占 48.60%,不规则卷曲(random coil)占 32.03%,延伸链(extended strand)占 14.71%,氢键转角(hydrogen bonding turn)占 4.66%。由图 6 可见:喜盐鸢尾 *IhNHX1* 蛋白共包含 10 个跨膜结构域。



IH: 喜盐鸢尾 *Iris halophila* Pall.; CS: 甜橙 *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck; CC: 金钱橘 *Citrus clementina* Hort.; TC: 可可 *Theobroma cacao* Linn.; VV: 葡萄 *Vitis vinifera* Linn.; PE: 毛竹 *Phyllostachys edulis* (Carr.) J. Houz.; AL: 平滑獐毛 *Aeluropus lagopoides* (Linn.) Trin. ex Thwaites; DF: 双稗草 *Diplachne fusca* (Linn.) Kunth; ZJ: 结缕草 *Zoysia japonica* Steud.; PA: 芦苇 *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.; SI: 小米 *Setaria italica* (Linn.) P. Beauv.; ZM: 玉米 *Zea mays* Linn.

图 4 基于 NHX1 蛋白氨基酸序列分析的喜盐鸢尾及其他 11 种植物的系统树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *Iris halophila* Pall. and other eleven species based on amino acid sequence analysis of NHX1 protein



h: α 螺旋 α helix; e: 延伸链 Extended strand; c: 不规则卷曲 Random coil; t: 氢键转角 Hydrogen bonding turn.

图 5 喜盐鸢尾 *IhNHX1* 基因编码的蛋白质的二级结构

Fig. 5 The second structure of protein encoded by *IhNHX1* gene of *Iris halophila* Pall.

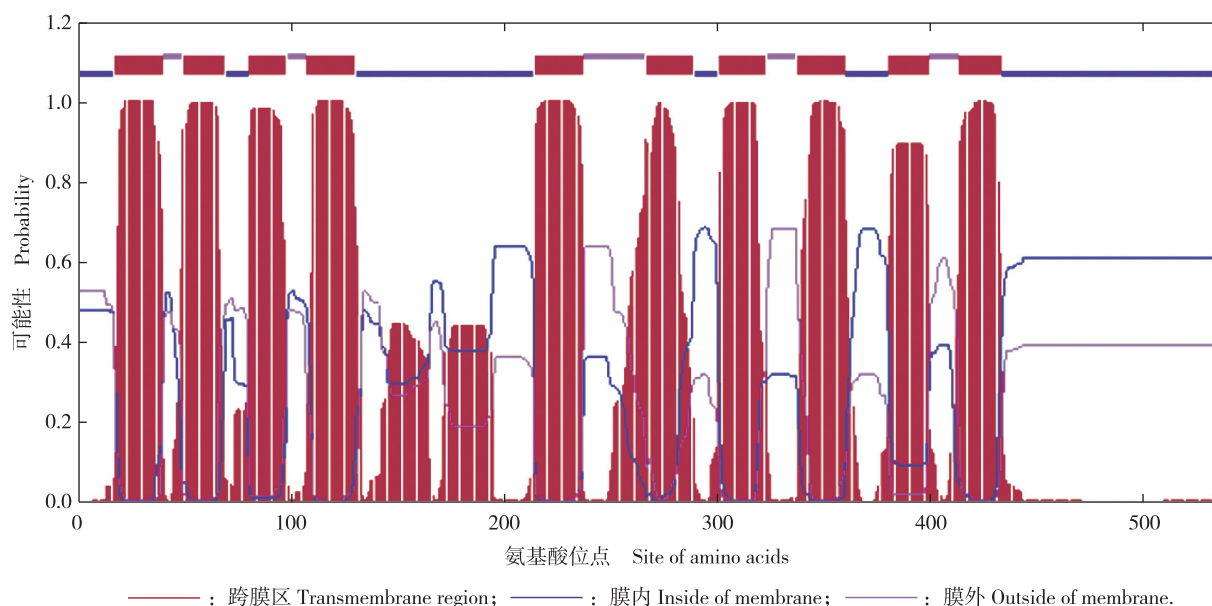


图6 喜盐鸢尾 *IhNHX1* 基因编码的蛋白质的跨膜结构域
Fig. 6 Transmembrane domain of protein encoded by *IhNHX1* gene of *Iris halophila* Pall.

3 讨论和结论

通过同源克隆和 RACE 方法克隆获得喜盐鸢尾 *IhNHX1* 基因的全序列,序列总长度为 1 946 bp,包含 1 个长度为 1 611 bp 的开放阅读框 (ORF),共编码 537 个氨基酸。喜盐鸢尾 *IhNHX1* 基因编码的氨基酸序列与其他 11 种植物 *NHX1* 基因编码的氨基酸序列的保守性均较高,存在很多完全一致的序列,这些保守区应是 *IhNHX1* 基因的功能区;而从系统树上却可看出喜盐鸢尾与其他 11 种植物的亲缘关系均较远。上述研究结果说明,在进化过程中,植物蛋白质功能区域序列的保守性能够有效保证该蛋白质的活性。比较分析结果表明:喜盐鸢尾 *IhNHX1* 基因编码的氨基酸序列与其他 11 种植物 *NHX1* 基因编码的氨基酸序列在非相同区域的差异较大,这些差异是否与喜盐鸢尾具有较高的耐盐性有关? 尚有待对 *IhNHX1* 基因进行进一步的研究确认。

对 *IhNHX1* 基因编码的蛋白质二级结构和跨膜结构域的分析结果表明:该蛋白质的 α 螺旋所占比例最高,达 48.60%;不规则卷曲占 32.03%,并且该蛋白质由 10 个跨膜结构域组成。Yamaguchi 等^[24]通过蛋白酶保护实验证明:拟南芥的液泡膜 *NHX* 蛋白由 12 个跨膜结构域组成,并提出 1 个拓扑结构模型。可

见,喜盐鸢尾的 *IhNHX1* 蛋白结构模型与 Yamaguchi 等提出的拓扑结构模型存在一定差异。

通常,在使用经典的 5'RACE 方法克隆基因的 5'端时,很容易产生很多非特异性条带,难以辨别目的条带,对此,有研究者已提出很多改进的 5'RACE 方法^[25]。在本研究中,作者在经典 5'RACE 方法基础上,结合一些通用的 5'端引物对 5'端正向引物进行优化设计,提高了 PCR 扩增的特异性。具体步骤如下:首先,在 5AP 引物的特异序列部分设计能够自身环化或形成双链的序列,以便露出 Poly(G)尾与模板链上的 Poly(C)结合;其次,在 5AP 引物末端加入兼并碱基 H(A/T/C),使之可以与除 C 外的其他碱基配对,帮助该引物锚定在模板 Poly(C)尾结束的第 1 个碱基上;再次,设计了 2 条巢式 PCR 引物,即 5NP1 和 5NP2,通过巢式 PCR 扩增减少非特异条带。此外,5AP 引物中的 Poly(G)部分连续超过 5 个 G 的序列较难合成,可以参照 AAP 引物序列“GGCCACGCGT CGACTAGTACGGGIIIGGGIIIGGGIIIG”的 Poly(G)部分进行合成,即在引物 Poly(G)中增加稀有碱基 I,即 GGGGIIIGGGIIIGGG。以上引物优化设计对基因 5'端正向引物的设计有一定的借鉴作用,但由于不同基因的 5'端结构存在一定差异,因此,不同基因的 5'端正向引物还需要通过不同的优化设计才能取得较好的扩增效果。

参考文献:

- [1] 马玉花. 植物耐盐分子机理研究进展[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(2): 255-257, 261.
- [2] 李彦强, 方升佐, 姚瑞玲, 等. NaCl 胁迫对不同种源青钱柳幼苗离子分配、吸收与运输的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(4): 29-33.
- [3] 赵祥强, 汤薇, 张燕, 等. 互花米草中 *NHX* 基因片段的克隆与序列分析[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(36): 17878-17882, 17907.
- [4] QIU Q S. Plant and yeast *NHX* antiporters: roles in membrane trafficking[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2012, 54(2): 66-72.
- [5] MURER H, HOPFER U, KINNE R. Sodium/proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney[J]. *The Biochemical Journal*, 1976, 154(3): 597-604.
- [6] RATNER A, JACOBY B. Effect of K^+ , its counter anion, and pH on sodium efflux from barley root tips[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1976, 27(5): 843-852.
- [7] BLUMWALD E, POOLE R J. Na^+/H^+ antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris*[J]. *Plant Physiology*, 1985, 78(1): 163-167.
- [8] BASSIL E, TAJIMA H, LIANG Y C, et al. The *Arabidopsis* Na^+/H^+ antiporters *NHX1* and *NHX2* control vacuolar pH and K^+ homeostasis to regulate growth, flower development, and reproduction[J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(9): 3482-3497.
- [9] BARRAGÁN V, LEIDI E O, ANDRÉS Z, et al. Ion exchangers *NHX1* and *NHX2* mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(3): 1127-1142.
- [10] BASSIL E, OHTO M, ESUMI T, et al. The *Arabidopsis* intracellular Na^+/H^+ antiporters *NHX5* and *NHX6* are endosome associated and necessary for plant growth and development[J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(1): 224-239.
- [11] 杜利霞, 董宽虎, 朱慧森. 植物 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白研究进展[J]. 草原与草坪, 2012, 32(2): 82-86.
- [12] GXIOLA R A, RAO R, SHERMAN A, et al. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, *AtNhx1* and *Avp1*, can function in cation detoxification in yeast[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(4): 1480-1485.
- [13] FUKUDA A, NAKAMURA A, TAGIRI A, et al. Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter from rice[J]. *Plant Cell Physiology*, 2004, 45(2): 146-159.
- [14] LI B, LI N, DUAN X G, et al. Generation of marker-free transgenic maize with improved salt tolerance using the FLP/FRT recombination system[J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, 145(2): 206-213.
- [15] WU G Q, XI J J, WANG Q, et al. The *ZxNHX* gene encoding tonoplast Na^+/H^+ antiporter from the xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum* plays important roles in response to salt and drought[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2011, 168(8): 758-767.
- [16] APSE M P, AHARON G S, SNEDDEN W A, et al. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in *Arabidopsis*[J]. *Science*, 1999, 285(5431): 1256-1258.
- [17] ZHANG H X, HODSON J N, WILLIAMS J P, et al. Engineering salt-tolerant *Brassica* plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(22): 12832-12836.
- [18] 杨宏伟, 周考文, 于春洋. 蓝花喜盐鸢尾和喜盐鸢尾的化学成分比较分析[J]. 光谱实验室, 2011, 28(5): 2723-2727.
- [19] 韩玉林. 铅与盐胁迫对喜盐鸢尾生长及生理抗性的影响[J]. 西北植物学报, 2008, 28(8): 1649-1653.
- [20] 佟海英, 马晶晶, 原海燕, 等. NaCl 和 Na_2CO_3 胁迫对 5 种鸢尾属植物生长的影响[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(11): 144-148.
- [21] 唐克轩, 开国银, 张磊, 等. RACE 的研究及其在植物基因克隆上的应用[J]. 复旦学报: 自然科学版, 2002, 41(6): 704-709.
- [22] 邓雪柯, 殷建华, 曹毅. 3 种 5' RACE 技术的比较与优化[J]. 成都医学院学报, 2007, 2(1): 20-25.
- [23] 李翠. 荞麦 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *FtNHX* 的克隆、功能验证及表达分析[D]. 上海: 华东师范大学生命科学学院, 2010.
- [24] YAMAGUCHI T, APSE M P, SHI H Z, et al. Topological analysis of a plant vacuolar Na^+/H^+ antiporter reveals a luminal C terminus that regulates antiporter cation selectivity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(21): 12510-12515.
- [25] 徐焯, 刘雅婷, 代文琼, 等. 几种主要的 RACE 技术及应用[J]. 中国农业科技导报, 2012, 14(2): 81-87.

(责任编辑: 佟金凤)