

张永利, 孟晓辉, 孙婷梅, 等. 珠美海棠 *Mz₂NHX1* 基因的克隆和序列分析[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(9): 20–25.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.005

珠美海棠 *Mz₂NHX1* 基因的克隆和序列分析

张永利¹, 孟晓辉^{1,2}, 孙婷梅¹, 李 爱¹, 彭立新¹

(1. 天津农学院园艺园林学院, 天津 300384; 2. 山东省经济林管理站, 山东济南 250013)

摘要:以珠美海棠幼苗根系的 cDNA 为模板, 根据珠美海棠 *NHX1* (GQ503257) 的保守序列设计引物, 通过 RT-PCR 扩增得到目的基因全长 1 865 bp, 包含 1 个 1 635 bp 的开放阅读框, 编码 544 个氨基酸, 其核苷酸序列与苹果 (GU338395)、玫瑰 (KC188664)、杨树 (ACU01853) 的核苷酸序列同源性分别是 95%、93%、91%。其对应的氨基酸序列与拟南芥 (AAF21755)、玫瑰 (BAD93487.1) 和大叶补血草 (BAB11940) 液泡型 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白的氨基酸序列的同源性分别是 79%、87%、79%, 说明该蛋白是一种定位于液泡膜的 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白, 该基因属于液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因。它编码的蛋白质分子量为 60.5 ku, 理论等电点 (pI) 为 8.85, 二级结构主要由 α-螺旋、β-折叠和不规则卷曲构成, 其 N-末端具有 12 个跨膜疏水片段, C-末端具有亲水的长链尾巴, 在跨膜片段内含有氨基酸保守序列 85-LFFIYLLPPI-94, 是 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白抑制剂氨氯吡嗪咪的结合位点。

关键词:珠美海棠; *Mz₂NHX1* 基因; 克隆; 生物信息学; 耐盐机理

中图分类号: Q785; S685.120.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2015)09-0020-05

盐害是影响植物生长发育和农作物产量的主要限制因子之一, 它对植物的伤害表现为离子不平衡、水分亏缺和离子毒害^[1]。土壤中过多的 Na⁺ 导致植物细胞的膜功能失调、代谢活动衰减及其他次生影响, 使植物生长受到抑制, 直至细胞死亡^[2-3]。为避免盐的毒害作用, 植物形成了特殊的耐盐机制, 即限制 Na⁺ 吸收、增加 Na⁺ 外排及 Na⁺ 区隔化^[4]。这 3 种途径主要与细胞质膜上和液泡膜上的 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白有关。编码质膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白的基因首先从酵母中克隆得到^[5], 随后从拟南芥中克隆到 *SOS1*^[6], *SOS1* 基因与真菌中编码质膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白的基因有很高的同源性, 并且 *SOS1* 基因的突变体对盐胁迫非常敏感, 盐胁迫可以增 *SOS1* 基因的表达, 说明 *SOS1* 在拟南芥的耐盐机制中起重要作用。由于 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白可以将 Na⁺ 外排或区隔化到液泡中, 因此它们在维持细胞渗透平衡中具有重要作用^[7]。在植物中, 液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白 (NHX1) 的活性最初在甜菜碱储藏组织的液泡形成体的小泡囊中观察到, 后来从拟南芥、水稻和冰叶日中花中分别克隆了液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因 *AtNHX1*^[8]、*OsNHX1*^[9] 和 *McNHX1*^[10], 并且发现盐胁迫可以增加它们的表达, 说明 *NHX1* 基因在植物的耐盐机制中起关键作用。因此通过研究 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因的耐盐机理, 可以为培育优良的耐盐种质资源提供理论依据。

珠美海棠为蔷薇科 (Rosaceae) 苹果属 (*Malus*) 多年生木

本植物, 有较高的应用价值。该树种耐盐碱、抗寒能力强, 在盐碱地较重的地区可作砧木嫁接苹果, 成活率较高。它在含盐量 0.6%、pH 值 9.2 的土壤中也正常生长^[11]。推测这种高度的耐盐能力与植物的耐盐基因有关。

关于植物的 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因的研究已有很多报道, 但是对珠美海棠的相关研究报道很少。笔者在前期研究 (GQ503257) 的基础上, 以珠美海棠组培生根苗为试材, 克隆了珠美海棠 *NHX1* 的同源基因 *Mz₂NHX1*, 并对 *Mz₂NHX1* 基因进行了序列分析和生物信息学分析, 旨在为研究该基因的功能、探讨珠美海棠的耐盐机制奠定基础, 同时也为耐盐基因的利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

珠美海棠 [*Malus zumi* (Matsum.) Reder] 组培生根苗, 由天津农学院果树学重点实验室提供。Recombinant DNase I (RNase-free)、Ribonuclease Inhibitor、Oligo d(T)₁₈ Primer、Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H⁻)、TaKaRa Ex Taq、TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 4.0 购自 TaKaRa 公司; RNase/DNase Free 枪头、RNase/DNase Free 离心管、Ampicillin、X-gal、IPTG、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; Marker 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 克隆载体试剂盒 pEASY-T1 Cloning Kit 和大肠杆菌感受态 Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell 购自北京全式金生物技术有限公司; 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, DNA 测序由华大基因有限公司完成。其他药品均为分析纯, 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 珠美海棠总 RNA 提取和反转录 取 0.1 g 珠美海棠幼苗根系, 用改良的 CTAB 法提取 RNA, 并用 DNase I 处理去

收稿日期: 2014-09-23

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 30671440, 31300564)。

作者简介: 张永利 (1987—) 女, 河北邯郸人, 硕士研究生, 主要从事果树生物技术和抗逆生理研究。E-mail: 904603613@qq.com。

通信作者: 彭立新, 博士, 教授, 主要从事植物逆境生理及分子生物学的教学和科研工作。Tel: (022) 23781301; E-mail: penglixin@tjau.edu.cn。

除 DNA 污染,电泳检测其质量;利用微量紫外分光光度计(NANODROP 2000)测定 RNA 浓度,根据宝生物反转录酶说明书取适量 M-MLV 酶和 RNA 进行反转录,合成 cDNA 第一链, -80 ℃ 保存备用。

1.2.2 引物设计与目的基因的扩增 根据已克隆的珠美海棠 *NHX1* 基因的保守序列,设计 1 对特异引物 P1:5'-AGGAGGCGGATACAATGGCT-3'和 P2:5'-CAACCGATGTGCT-TGGGAC-3',利用 RT-PCR 反应扩增目的基因的全长序列。根据全长序列设计特异引物 P3:5'-CGGGGTAC-CCCAGTGGCTGTTCACATTTC-3'和 P4:5'-CCGGAATTC-CGGTTGCCACTGAACGTTGTTG-3',扩增目的基因的开放阅读框序列。扩增体系(20 μL):10 × Ex PCR buffer 2.0 μL, dNTP Mix 1.6 μL,引物 P1 和引物 P2 各 0.8 μL, cDNA 模板 1.5 μL, Ex Taq 0.1 μL, DEPC-d₂H₂O 13.2 μL。反应条件:94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 变性 30 s,55.3 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 2 min,后延伸 10 min,30 个循环,4 ℃ 短暂保存。

1.2.3 目的片段的检测与鉴定 使用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit 回收目的片段,将目的片段与 pEASY-T1 载体连接 15 min,然后转化大肠杆菌感受态细胞,整个过程要轻柔。在不含 Amp 的 LB 液体培养基中 37 ℃ 条件下、200 r/min 摇菌 1 h,然后在含有 IPTG 和 X-gal 的 LB(+Amp) 固体培养基上 37 ℃ 恒温培养过夜。挑取白色单菌落至 LB(+Amp) 液体培养基中,在 37 ℃、200 r/min 下摇菌培养 8 h,以菌液为模板做 PCR,鉴定阳性重组子。提取质粒,通过双酶切法(*Eco*R I, *Kpn* I)鉴定目的片段是否成功连入载体,用鉴定正确的质粒送华大基因公司测序。

1.2.4 目的基因的生物信息学分析 利用 NCBI 的 BLASTn 和 BLASTp 进行核苷酸及氨基酸序列相似性分析;采用 DNAMAN 软件进行多序列比对,并预测蛋白质的疏水性和亲水性,采用 MEGA 5.0 软件进行系统进化树分析;利用 TMpred 在线准确预测跨膜蛋白的跨膜片段,利用 TMHMM 在线对目的基因进行跨膜结构域的预测;采用 ProtParam 软件分析蛋白质的理化性质。

2 结果与分析

2.1 珠美海棠 *Mz₂NHX1* 基因的克隆和测序分析

用质量分数 1% 的琼脂糖凝胶检测从珠美海棠中提取的 RNA 质量,总 RNA 基本无降解,无蛋白质污染,28 S、18 S 和 5 S 条带完整。RNA 反转录为 cDNA 第 1 条链后,以 cDNA 为模板,用引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增得到 1 条 1865 bp 的目的条带(图 1),与苹果(GU338395)、玫瑰(KC188664)、杨树(XM_002307158)的核苷酸序列的同源性分别为 95%、93%、91%。通过 NCBI 的 ORF Finder 在线分析,预测开放阅读框长 1 635 bp。根据该核苷酸序列设计引物 P3、P4,PCR 扩增出其开放阅读框序列(图 2),经与 pEASY-T1 连接、转化、蓝白斑筛选,菌液 PCR 和酶切鉴定后测序,得到 1 635 bp 的核苷酸序列,测序结果与预测序列吻合,我们将该基因命名为 *Mz₂NHX1*。

2.2 珠美海棠 *Mz₂NHX1* 基因的生物信息学分析

2.2.1 *Mz₂NHX1* 氨基酸序列分析 经 NCBI 的 ORF Finder 在线软件分析,*Mz₂NHX1* 基因开放阅读框长 1 635 bp,编码 1

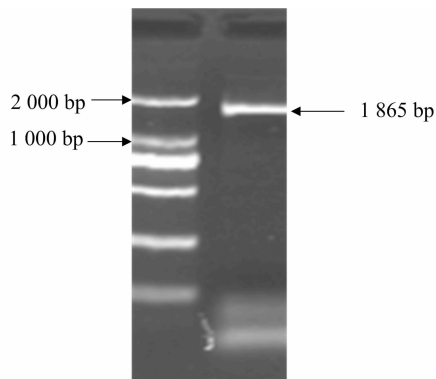
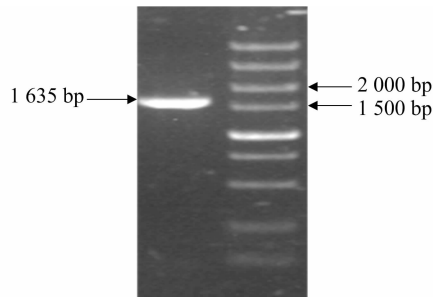


图1 珠美海棠 *Mz₂NHX1* 目的基因全序列 PCR 产物电泳图



P—PCR产物; M—DL5000

图2 珠美海棠 *Mz₂NHX1* 开放阅读框架 PCR 产物电泳图

个由 544 个氨基酸组成的蛋白 *Mz₂NHX1*(图 3)。

通过 ProtParam 在线分析可知,*Mz₂NHX1* 蛋白的分子质量为 60.5 ku,等电点(pI)为 8.85,分子式为 C₂₈₀₂H₄₃₇₇N₆₉₉O₇₄₉S₂₀。用 DNAMAN 软件分析发现,珠美海棠与拟南芥(AAF21755)、大叶补血草(BAB11940)和玫瑰(BAD93487.1)等液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白的氨基酸序列有较高的同源性,分别为 79%、79% 和 87%,并且含有保守序列 85-LFFIYLLPPI-94,是 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白抑制剂氨氯吡啶的结合位点;以及钙调素类蛋白(AtCaM15)的结合位点的氨基酸保守序列 515-RKFDNAFMRPVFGGRG-536(图 4)。

用 MEGA 5.0 软件对珠美海棠 *Mz₂NHX1* 编码的氨基酸与拟南芥、水稻及牵牛花、番杏、玫瑰、杨树的 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白的氨基酸序列进行了进化树分析。结果(图 5)发现,*Mz₂NHX1* 与苹果(ADB92598)和玫瑰(BAD93487)的 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白的氨基酸序列同源性达 100%,而与牵牛花同源性达 95%,与番杏和杨树的同源性为 90%,与水稻的同源性为 86%,亲缘关系比较近。以上植物的 *NHX* 基因编码蛋白均定位在液泡膜上,推测 *Mz₂NHX1* 也是定位于液泡膜上。其主要功能是将过量的 Na⁺ 区隔入液泡,避免 Na⁺ 积累对细胞造成离子毒害,降低细胞渗透势提高植物吸收水分的能力,抵御盐胁迫对植物的渗透胁迫。

2.2.2 *Mz₂NHX1* 基因编码蛋白的理化性质 对 *Mz₂NHX1* 编码的蛋白进行分析发现,该蛋白编码 544 个氨基酸,包含参与生物组成的所有氨基酸。用 DNAMAN 软件分析,*Mz₂NHX1* 蛋白分子量为 60.5 ku,等电点(PI)为 8.85。由疏水性分析(图 6)可知,*Mz₂NHX1* 蛋白 N-末端有 12 个跨膜疏水区域和 1 个较长的 C-末端亲水性尾巴。用 TMHMM Server v. 2.0 在线软件对其跨膜区域(图 7)进一步预测表明,*Mz₂NHX1* 的

cttaggagcgataca

atgctgttccacatttgagcatgttgatctcaaaagttacaaaaatctatccacttcggaccactcgtctgtggttcgatg
M A V P H L S M L I S K L Q N L S T S D H S S V V A L
aaccttttcgtggcactacttttagcttgattgtgatcggacatcttctcgaggagaatcgatgggtgaatgagtcgatc
L L A C I V I G H L L E V S M N L F E N R W V N E S I
accgcccttttgattggtatagtactggagtagttattctctgatcagtcgaggaaaagttcgatcttttggtttc TALLIGICTGVVILLISRKSSHLV
agtgaagatcttttctatatacctctccgcttatttttaattgccgggttcaggtgaaaaagaagcagttctt SEDLFFIYLLPIIFNAGFQVKKKQFF
gttaacttcagcaccattgactgtttggtgccattggtacattgctacatcctgactatcatcattaggcgctacacaa VNFSTIVLFGAIGTLVSCTHSLGATQ
ttctttaagaaattggatattggaaactctggaattgggggactttcttgcatgttgcaaatatttgcgtgcaacggattct
F F K K L D I G T L E L G D F L A I G A I F A A T D S
gtttgcacgttgcaggtgctcaatcaagatgagacacctttactctacagtccttggttcggggagggtgctggttaacgat
V C T L Q V L N Q D E T P L L Y S L V F G E G V V N D
gcgacatctgtggttcttttcaatgctatttcagagctttgatctcaccacacttgattccggcattgccttgacatttctg
A T S V V L F N A I Q S F D L T H L D S G I A L H F L
ggaaacttcttttattgttttgcgaagcaccatgctaggagtggtttgcagggtgcttagtgcttacattataaaaaa
G N F F Y L F F A S T M L G V F A G L S A Y I I K K
ctttatttgcgaaggcactctacggactgtaggttgctcttatgatgctcatggcatacctgtcatatatactggctgaa
L Y F A R H S T D R E V A L M M L M A Y L S Y I L A E
ttattctatttgagtgccattctcactgtgttcttttggtggatcgtgatgtcgcattacacttggcacaatgtgactgag
L F Y L S G I L T V F F C G I V M S H Y T W H N V T E
agtcaagagttacgaccaagcatgcttgcgaacctgtcattgttgcgaataatttattcttcttattgttggtatg SSRVTTKHAFATLSFVAEIFLYVGM
gatgccttggacattgaaaagtggagatttgaagcgacagtccttggaacatcagtggggtgagttcaatactgctaggt
D A L D I E K W R F V S D S P G T S V A V S S I L L G
cttcttatgtaggaagagcagcttttatttccccctatcattttgtcaaacttagcaaagaaaaaccaacatgagaaa
L L M L G R A A F I F P L S F L S N L A K K N Q H E K
atcagcctccggcagcaagtataatgttggtggctgctcatgagaggtgctgttttcgatatagcactagcttacaatcag
I S L R Q Q V I I W W A G L M R G A V S I A L A Y N Q
tttacgaggtcaggccacacgcagttgagagcaaatgcaatcatgatcactagcacgataactgttgttcttgcgcagcaca
F T R S G H T Q L R A N A I M I T S T I T V V L V S T
gtgggtgttcggattgatgacaaaaccttctataaggttcttgcctcattcatcaaaacaaacaccagcatgctgtca
V V F G L M T K P L I R F L L P H S S K Q T T S M L S
tcagaaccaaccactccaaatcaatcattattccactttagggcaggattctgtagatgatctcgttattccaagatatt
S E P T T P K S I I I P L L G Q D S V D D L V I Q D I
cgacggccagccagcattcgcgatcttctgacgactccatttaataggcacactgtccatcgtattggcgttaagttgat
R R P A S I R D L L T T P F N R H T V H R Y W R K F D
aacgccttcatgcgaccgggtgtttggaggccgggtttgttcccttgttcccggtcaccacgaacggaacaacaac
N A F M R P V F G G R G F V P F V P G S P T E R N N N
gttcagtggaatga
V Q W Q *

gaacaccgggaagatacatagccggggcaaaatgtgaataaattgtaccatatattcacccgaactcactcagcgtgcgatata
attcttcgatcccttggtttttatttagccttatgaaagggaagtagtgtaccataaatatgcgaccatgtttgatctacactgtatt
ttgatagcctgttcttttaattgggtgtctgtctgtctt

方框内为起始密码子和终止密码子

图3 *Mz2NHX1* 基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

N-端面向细胞质,推测 N-端的疏水区域可能含有与 Na⁺ 结合的重要氨基酸残基,并且可以形成跨膜螺旋,几乎全部存在于液泡内的 C-端亲水尾巴可能在 Na⁺ 和 K⁺ 的选择性吸收过程中发挥调节作用。研究发现,将拟南芥 *AtNHX1* 的亲水 C-端去掉后,则可导致 Na⁺/H⁺ 运输的相对比率增长^[12]。因此,NHX1 的跨膜结构和亲水尾巴可能在 Na⁺ 的转运过程中起着重要作用。

2.2.3 *Mz2NHX1* 蛋白结构分析 利用 PORTER 在线预测 *Mz2NHX1* 编码蛋白的二级结构,结果表明,*Mz2NHX1* 蛋白由 47.43% 的 α-螺旋、17.16% 的 β-折叠片、3.68% 的 β-转角和 31.80% 的无规则卷曲组成(图 8)。

3 讨论与小结

植物 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白是一种电中性转运蛋白,不同植物中的该蛋白的 N-末端具有高度同源性,该端是负责

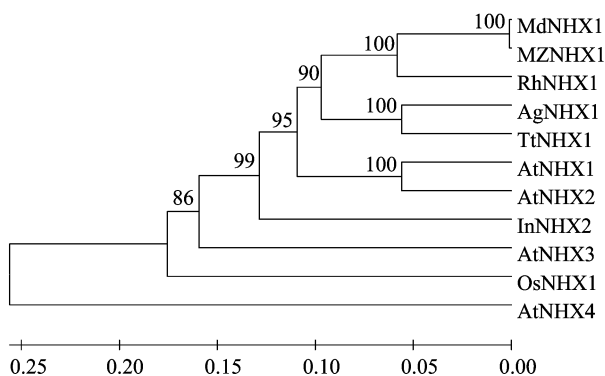
Na⁺ 转运的区域,对 Na⁺ 的竞争性抑制剂氨氯吡嗪脒及其衍生物敏感,C-末端是亲水性长链尾巴,位于细胞质或液泡囊腔内,此结构域内含有多个蛋白激酶作用位点,能与钙调素结合,参与启动多种信号的反应,是调节活性的区域^[13]。

有研究将 *AtNHX1* 基因在拟南芥上进行过量表达,结果发现转拟南芥植株在 200 mmol/L NaCl 溶液浇灌下能正常生长发育^[8]。将 *AtNHX1* 基因转入番茄中,过量表达 *AtNHX1* 基因的转基因番茄在 200 mmol/L NaCl 浓度中能够正常开花和结实,但是叶片中 Na⁺ 浓度高于果实中 Na⁺ 浓度^[14]。这些结果表明,转单一的 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因能够明显提高植物耐盐性,其原因可能是 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因导入植物细胞后,激活了一系列与耐盐相关的基因,从而明显提高植物的耐盐性,说明 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因属于耐盐关键基因。因此,在利用转基因技术培育耐盐品种中有很高的应用价值。

Mz2NHX1.seq	MAVPHISMLISKQLNISTSDHSVSVSMNLFVALLACIVIGHLLEENRWVNESITALLIGICTGVVIL	68
AtNHX1.seq	MDLSLVSKLPISLSTSDHASVVALNLFVALICACIVIGHLLEENRWVNESITALLIGICTGVITL	64
AgNHX1.seq	MWSQLSSLSLG..KMDAITSSDHASVSMNLFVALLCCGIVIGHLLEENRWVNESITALLIGLATGVVIL	68
RhNHX1.seq	MASHLAMMTKLPLQNLISADHSVSVSINLFVALICACIVIGHLLEENRWVNESITALLIGVSTGVIL	70
Consensus	1 k 1 sdh svv nlfvall civ ghllleenrw nesitallig tgv il	
Mz2NHX1.seq	LISRGKSSHLLVFSEILFFIYLLPPIIFNAGFQVKKQFFVNESTIVLFGAIGTLVSCTIISICATQFEK	138
AtNHX1.seq	LISKGKSSHLLVFSEILFFIYLLPPIIFNAGFQVKKQFFRNEFTIIMLFGAVGTIISICTIISIGVQFEK	134
AgNHX1.seq	LISGKSSHLLVFSEILFFIYLLPPIIFNAGFQVKKQFFRNEFTIIVLFGAVGTIISICTIISICALSIFEK	138
RhNHX1.seq	LISGKSSHLLVFSEILFFIYLLPPIIFNAGFQVKKQFFRNEFTIIVMFGAIGTLVSCTIISICATQIFEK	140
Consensus	lis gksshllvfseclffiyllppiifnagfqvkkqff nf ti fga gt s tii g fk	
Mz2NHX1.seq	KLDIGTLELGDFLAIGAIFAATDSVCTLQVLNQDETPLYSLVFGEGVVDATSVVLFNAIQSFDLTHLD	208
AtNHX1.seq	KLDIGTFDLGDYLAIGAIFAATDSVCTLQVLNQDETPLYSLVFGEGVVDATSVVVFNAIQSFDLTHLN	204
AgNHX1.seq	KLDIGTLELADYLAIGAIFAATDSVCTLQVLNQDETPLYSLVFGEGVVDATSVVLFNAIQSFDLTRID	208
RhNHX1.seq	KLDIGSLDIDYLAIGAIFAATDSVCTLQVLHQDETPLYSLVFGEGVVDATSVVLFNAIQSFDLTHLD	210
Consensus	kldig d laigaifaatdsvctqlv qdetplyslvfgegvvdatsvv fnaiqsfdlt	
Mz2NHX1.seq	SGIALHFTGNFFLYFFASTMLGVFAGLSAYTIKKLYEARHSTDREVALMMLMAYLSYLLAEFLYLSGIL	278
AtNHX1.seq	HEAAFHLLGNFLYFLLLSTLLCAATGLISAYTIKKLYEGRHSTDREVALMMLMAYLSYLLAEFLDLSGIL	274
AgNHX1.seq	HRIALQFMGNFLYLFIASTILGATGLISAYTIKKLYEGRHSTDREVALMMLMAYLSYLLAEFLYLSGIL	278
RhNHX1.seq	SRIALKFMGNFLYLFFASTMLGVITGLISAFITIKKLYEARHSTDREVALMMLMAYLSYLLAEFLYLSGIL	280
Consensus	a gnf ylf st lg gl sa ikklyf rhstdrevalmmlmaylsy laelf lsgil	
Mz2NHX1.seq	TVFFCGIVMSHYTWHNVTESSRVTTKHAFTLSEVAETIFLYVGM DALDIEKWRVSDSPGTSVAVSSI	348
AtNHX1.seq	TVFFCGIVMSHYTWHNVTESSRVTTKHAFTLSELAETIFLYVGM DALDIDKWRVSDTPGTSIAVSSI	344
AgNHX1.seq	TVFFCGIVMSHYTWHNVTESSRVTTKHAFTLSEVAEVLFLYVGM DALDIEKWRVSDSPGTSVAVSSI	348
RhNHX1.seq	TVFFCGIVMSHYTWHNVTESSRVTTKHAFTLSEVCEETIFLYVGM DALDIEKWRVSDSPGTSVAVSSI	350
Consensus	tvffcgivmshtwhnvtessrrttkhaftlsf e f flyvgmdaldi kwr vsd pg s avssi	
Mz2NHX1.seq	LLGLMLGRAAFVPLSFLSNLAKKNOHEKISLRQOVIIWWAGLMRGAVSIALAYNQFTRSGHTQLRANA	418
AtNHX1.seq	LMGLVMVGRAAFVPLSFLSNLAKKNOSEKINFNMQVVIWWAGLMRGAVSMALAYNKETRAGHTDVRGNA	414
AgNHX1.seq	LLGLVMVGRAAFVPLSFLSNLAKKNOSEKVTFNQOVIWWAGLMRGAVSMALAYNQFTRSGHTQLRANA	418
RhNHX1.seq	LLSLVMLGRAAFVPLSFLSNLAKKNOSEKISLRQOVIIWWAGLMRGAVSIALAYNQFTRSGHTQLRANA	420
Consensus	l l m graaf fpls n kk q ek q iww glmrgavs alayn ftr ght r na	
Mz2NHX1.seq	IMITSTIVVVLVSTVVFGLMTKPLIRLLPHSSKQTTSMLSSEPTPKSIIIPLLGQDS.....	477
AtNHX1.seq	IMITSTIVVCLSTVVFGLMTKPLISYLLPHQNA..TSMLSDDNTPKSIHIPLLDQDS.....FIEP	475
AgNHX1.seq	IMITSTISVVLESTVVFGLMTKPLIMFLLPQPKHFTSCSTVSDVSGSPKSYSLPLEGQDYEVVDVGNNGH	488
RhNHX1.seq	IMITSTISVVVLSTVVFGLMTKPLIRLLPHKQLTSTNSIMSDFPSPKSVIPLLDQDS.....	479
Consensus	imitsti v l st vfg tkpli llp s pks pll	
Mz2NHX1.seq	VDDLVIQDIRRPASIRDLITTFNHRHTVHRYWRKFDNAFMRPVFGGRGFVPFVPGSPTEERNNNVQWQ	544
AtNHX1.seq	SGN...HNVPRPDSIRGELTRPT..RTVHYWRKFDNDFMRPVFGGRGFVPFVPGSPTEERNPPDLASKA	538
AgNHX1.seq	EDTTEPRTIVRPSSRLMLINAPT..HTVHYWRKFDNDFMRPVFGGRGFVPFVPGSPTEQSTNNLVDR	554
RhNHX1.seq	EADLSGHEVRRPASIRDLITTF..HTVHYWRKFDNAFMRPVFGGRGFVPFVPGSPTEERNNTQWQ	543
Consensus	rp s r l p tvh ywr fd fmrpvfggrgfvpfvpgspte	

用方框标出的是氨氯吡嗪咪结合位点的氨基酸保守序列；下划线处是钙调素类蛋白(AtCaM15)结合位点的氨基酸保守序列

图4 Mz₂NHX1 氨基酸序列的同源性比较



珠美海棠Mz₂NHX1; 苹果MdNHX1 (ADB92598.1); 拟南芥 AtNHX1(AAF21755)、AtNHX2(AAM08403)、AtNHX3 (AAM08404)、AtNHX4(AAM08405); 水稻OsNHX1(AAQ63678.1); 牵牛花InNHX1(BAB16380); 番杏TtNHX1(AAQ08988.1); 玫瑰 RhNHX1(BAD93487.1); 大叶补血草AgNHX1 (BAB11940)

图5 Mz₂NHX1蛋白的系统发育树分析

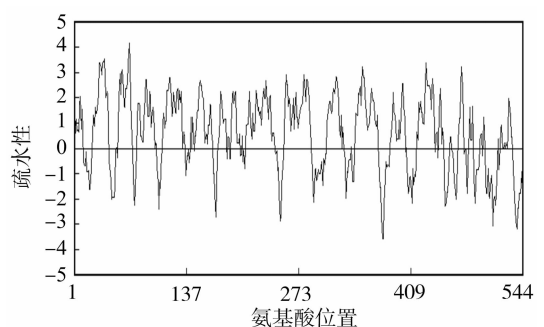
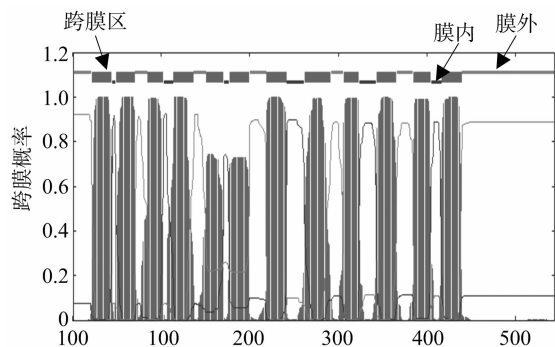
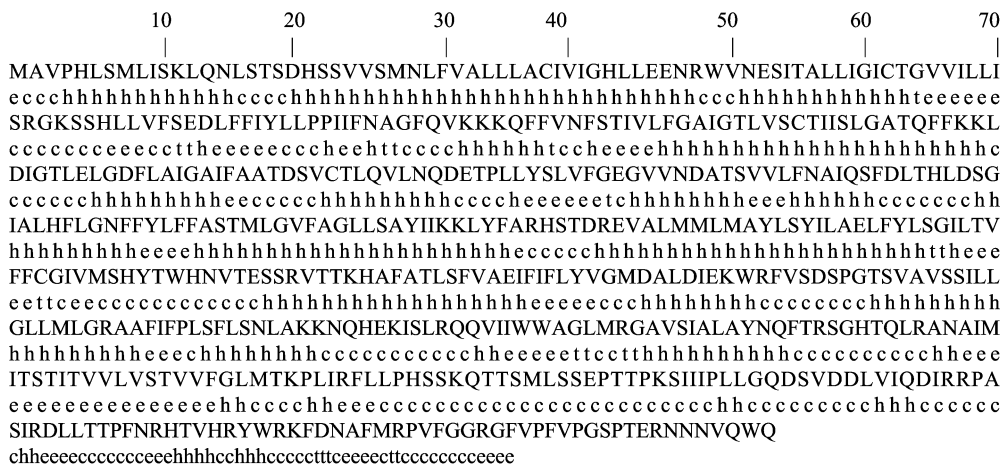


图6 Mz₂NHX1蛋白疏水性分布

本研究通过将 Mz₂NHX1 编码的 Mz₂NHX1 与已知 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白氨基酸序列的同源性对比及系统发育分析, 认为 Mz₂NHX1 是一种定位于液泡膜的 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白, 与拟南芥 (AAF21755)、大叶补血草 (BAB11940) 和玫瑰 (BAD93487.1) 等液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白的氨基酸序列有较高的同源性, 分别为79%、79%和87%, 因此,

图7 M_z2NHX1蛋白跨膜区域分布位置

h—α-螺旋；e—β-折叠片；t—β-转角；c—无规则卷曲

图8 M_z2NHX1 蛋白序列二级结构预测

M_z2NHX1 基因属于液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因。对 M_z2NHX1 核酸序列所翻译的蛋白序列预测发现 N-末端含有 12 个跨膜疏水区域和 1 个较长的 C-末端亲水性尾巴。对该蛋白质二级结构预测分析可知, M_z2NHX1 由 47.43% 的 α-螺旋、17.16% 的 β-折叠片、3.68% 的 β-转角和 31.80% 的无规则卷曲组成。

参考文献:

- [1] Hamada A, Shono M, Xia T, et al. Isolation and characterization of Na⁺/H⁺ antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelini* [J]. Plant Molecular Biology, 2001, 46: 35–42
- [2] Yeo A R. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology[J]. J Exp Bot, 1998, 49: 915–929
- [3] Glenn E P, Brown J J, Blumwald E. Salt tolerance and crop potential of halophytes[J]. Crit Rev Plant Sci, 1999, 18: 227–255
- [4] Padan E, Venturi M, Gerchan Y, et al. Na⁺/H⁺ antiporter[J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1505(1): 144–157
- [5] Jia Z P, McCullough N, Martel R, et al. Gene amplification at a locus encoding a putative Na⁺/H⁺ antiporter confers sodium/lithium tolerance in fission yeast[J]. EMBO J, 1992, 11: 1631–1640
- [6] Shi H, Ishitani M, Kim C, et al. The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 6896–6901
- [7] Rausch T, Kirsch M, Low R, et al. Salt stress responses of higher plants: the role of proton pumps and Na⁺/H⁺ antiporters[J]. Plant Physiol, 1996, 148: 425–433
- [8] 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.
- [9] Fukuda A, Nakamura A, Tanaka Y. Molecular cloning and expression of the Na⁺/H⁺ exchanger gene in *Oryza sativa* [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1999, 1446(1/2): 149–155.
- [10] Barkla B J, Zingarelli L, Blumwald E, et al. Topolast Na⁺/H⁺ antiporter activity and its energization by the vacuolar H⁺-ATPase in the halophytic plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. [J]. Plant Physiol, 1995, 109: 549–556
- [11] 顾迺良, 赵惠祥, 马继龙, 等. 珠美海棠对盐碱地适应范围及应用[J]. 天津农学院学报, 1996, 3(3): 48–52.
- [12] Yamaguchi T, Apse M P, Shi H, 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.
- [13] 石乐义, 李美茹, 李洪清, 等. 植物 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白功能及调控的研究进展[J]. 广西植物, 2006, 26(6): 602–607.
- [14] Zhang H X, Blumwald E. Transgenic salt-tolerance tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit[J]. Nat Biotechnol, 2001, 19: 765–768
- [15] Apse M P, Blumwald E. Na⁺ transport in plants[J]. FEBS Letters, 2007, 581(12): 2247–2254.
- [16] Blumwald E, Aharon G S, Apse M P. Sodium transport in plant cells [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1465(1/2): 140–151.
- [17] Ohta M, Hayashi Y, Nakashima A, et al. Introduction of a Na⁺/H⁺ antiporter gene from *Atriplex gmelini* confers salt tolerance to rice [J]. FEBS Letters, 2002, 532(3): 279–282.
- [18] Shi H Z, Lee B H, Wu S, et al. Overexpression of a plasmamembrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Nat Biotechnol, 2003, 21: 81–85
- [19] Xue Z Y, Zhi D, Xue G P, et al. Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing avacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na⁺ [J]. Plant Sci, 2004, 167: 849–859.

高 南, 李俊林, 郝东利, 等. 基因的生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(9): 25–27.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.006

OsAKT2/3 基因的生物信息学分析

高 南¹, 李俊林^{1,2}, 郝东利¹, 苏彦华¹

(1. 中国科学院南京土壤研究所土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 江苏南京 210008;

2. 南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏南京 210037)

摘要: Shaker 类型 K⁺ 通道在植物钾的吸收、转运及其他生理过程中发挥着重要作用。AKT2/3 是 Shaker 类型 K⁺ 通道中唯一既主导 K⁺ 内流, 又允许去极化情况下 K⁺ 渗漏性外流的通道。水稻 OsAKT2/3 蛋白的生物信息学分析表明, OsAKT2/3 蛋白含有 K⁺ 通道的标志性序列 TxxTxGYGD; 该基因分子式为 C₄₂₁₉H₆₆₉₃N₁₁₇₉O₁₂₃₃S₃₅, 理论等电点为 6.64, 氨基酸残基组成中亮氨酸残基含量最高; 有一定的亲水性, 为跨膜蛋白; 可能存在 31 个翻译后修饰位点、5 种结构域、52 个磷酸化位点, 不含信号肽; 序列主要构件为 α-螺旋和折叠延伸; 该蛋白与其他植物的 AKT2/3 家族成员具有较高的同源性。试验结果为 OsAKT2/3 基因生理功能的深入研究提供一定依据。

关键词: 水稻; 二级结构; 磷酸化位点; 三级结构; 系统进化

中图分类号: Q785; Q945.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)09-0025-03

钾是植物必需的大量元素, 对提高作物产量、改善产品品质起着重要作用。水稻 (*Oryza sativa* L.) 对钾素的需求量较大, 不同基因型的水稻对土壤中钾素的吸收利用存在很大差异^[1]。缺钾可影响细胞渗透压平衡, 进而引起器官机能的破坏, 影响植物的正常生长; 并通过植物激素调节破坏植物体内的代谢和转运过程, 导致作物的产量和品质大幅下降^[2]。我国大部分耕地土壤供钾不足, 其中严重缺钾土壤 (速效钾 < 50 mg/kg) 约 2 000 万 hm², 占耕地面积的 20% 以上, 且主要分布于我国的水稻产区; 因此, 需施用钾素化肥以保证水稻的丰产和品质, 而我国钾矿资源十分匮乏, 95% 以上的钾肥供应依赖进口^[3]。K⁺ 通道在植物体内的表达能改良植物的钾素营养性状^[4-5]; 因此, 挖掘植物中钾吸收利用的基因并研究其生理功能, 对水稻钾营养性状的改良及现有钾素资源的利用具有重要意义。Shaker 类型 K⁺ 通道在植物钾的吸收、转运及其他生理过程中发挥着重要作用^[2,6-7]。AKT2/3 是 Shaker 类型 K⁺ 通道中唯一既主导 K⁺ 内流、又允许去极化情况下 K⁺ 渗漏性外流的通道, 其电生理特征表现为弱内向整流、能

够感应 K⁺ 水平、受 Ca²⁺ 和 H⁺ 调控^[8-9]。其独有的渗漏型电流, 在过量 K⁺ 迅速吸收进入细胞而导致的膜电位去极化情况下, 通过胞内 K⁺ 的渗漏从而实现膜电位的精确微调作用^[10]。目前, 水稻的基因组测序已经完成, 但关于水稻 K⁺ 通道的研究尚较少^[11-13]。本研究利用生物信息学的方法对水稻 OsAKT2/3 蛋白的理化性质、核苷酸序列组成、跨膜结构、亲水性、疏水性、亚细胞定位进行分析, 并对其结构域、磷酸化位点、二级结构、三级结构进行预测, 最后进行系统进化分析, 以全面了解 OsAKT2/3 基因, 为该基因生理功能的深入研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

NCBI 中 GenBank 数据库已注册水稻 OsAKT2/3 基因 (JN989970.1)、拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.] 的 AKT2/3 (NP_567651.1)、大麦 (*Hordeum vulgare* L.) 的 HvAKT2 (ABE99811.1)、雨树 [*Samanea saman* (Jacq.) Merr.] 的 SPICK1 (AAD16278.1) 和 SPICK2 (AAD39492.1)、欧美杨 (*Populus tremula* L. × *Populus tremuloides* Michx.) 的 PTK2 (CAC05489.1)、玉米 (*Zea mays* L.) 的 ZMK2 (NP_001105120.1)。

收稿日期: 2013-12-30

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31000930)。

作者简介: 高 南 (1981—), 女, 辽宁黑山人, 博士, 助理研究员, 主要从事分子植物营养和植物逆境生理的研究。E-mail: springgn@163.com。

- [20] 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.
- [21] Zhao F, Wang Z, Zhang Q, et al. Analysis of the physiological mechanism of salt-tolerant transgenic rice carrying a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene from *Suaeda salsa* [J]. Journal of Plant Research, 2006, 119(2): 95–104.
- [22] 李金耀, 张富春, 马 纪, 等. 植物分子水平的耐盐机制 [J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(6): 715–719.

- [23] 吕慧颖, 李银心, 孔凡江, 等. 植物 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白研究进展 [J]. 植物学通报, 2003, 20(3): 363–369.
- [24] 吕慧颖, 李银心, 陈 华, 等. 番杏 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因的克隆及特性分析 [J]. 高技术通讯, 2004, 14(11): 26–31.
- [25] 郭会敏, 顾春笋, 刘兆磊, 等. 荷花液泡膜型 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因 *NnNHX1* 的克隆与特性分析 [J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(10): 1025–1032.
- [26] 严一诺, 孙淑斌, 徐国华, 等. 菊芋 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因的克隆与表达分析 [J]. 西北植物学报, 2007, 27(7): 1291–1298.