

徐璐,尹海波,张侠,等. 互花米草 *NHX1* 基因的 cDNA 全长克隆、序列信息及定量表达分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):34-38.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.008

互花米草 *NHX1* 基因的 cDNA 全长克隆、序列信息及定量表达分析

徐璐¹,尹海波¹,张侠¹,曹雪霖²,卢楠楠¹,闫丽华¹,陈世华¹,郭善利¹

(1. 烟台大学生命科学学院,山东烟台 264005; 2. 武警后勤学院二旅,天津 300309)

摘要:以盐生植物互花米草(*Spartina alterniflora*)为试验材料,利用 RACE 技术克隆到编码 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的 *NHX1* 基因的 cDNA 全长序列。利用生物信息学软件及网站对获得的基因核苷酸序列及编码的蛋白质序列进行分析,结果发现该核苷酸序列长度为 2 277 bp,开放阅读框为 1 623 bp,编码 540 个氨基酸残基,且该基因所编码的蛋白质与植物的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 *NHX1* 同源,所以命名为 *SaNHX1* 基因。同时氨基酸序列比对显示,其与芦苇(*Phragmites australis* NHX,BAD95562.1)、玉米(*Zea mays* NHX,XP_008653443.1)、水稻(*Oryza sativa* NHX,BAA83337.1)等的 *NHX* 亲缘关系相近,同源相似性依次为 94%、92%、91%。利用 Qiagen Rotor Gene Q 荧光实时定量 PCR 仪对不同时间盐处理及 ABA 处理的互花米草材料进行荧光定量 PCR 检测。结果发现,在盐处理及 ABA 处理的不同处理时期,该基因的相对表达量都发生了明显的变化,这表明该基因受到了盐胁迫及 ABA 胁迫的诱导,由此可以看出 *SaNHX1* 基因与植物的耐盐性有着密切的关系。

关键词:耐盐性;互花米草;*NHX1* 基因;相对定量表达

中图分类号: Q785;Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0034-05

随着土壤盐碱化面积的不断增加,植物面临着越来越严

峻的高盐挑战。土壤中高浓度的盐分会给植物带来生理干旱、离子毒害等多种危害,严重影响到植物的正常生长发育,从而抑制农作物的高产。对于大部分植物来说,高盐胁迫对植物的危害主要是由高浓度的 Na^+ 积累所导致的。虽然不同植物的耐盐机制存在差异,但是其基本策略都是保持胞内 Na^+ 的平衡^[1]。其中,植物体内的液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白(vacuolar Na^+/H^+ antiporter)在植物抗盐碱的过程中起着至关重要的作用,它可以将细胞质中过多的 Na^+ 区域化在液泡中,从而使得胞内的 Na^+ 处于相对平衡的状态,以此来使

收稿日期:2016-03-15

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:31370296);烟台大学研究生科技创新基金(编号:YDYB1624);烟台大学博士启动基金(编号:HY07B1、TM09B25)。

作者简介:徐璐(1990—),女,山东青岛人,硕士研究生,主要从事植物抗逆生理研究。E-mail:313145365@qq.com。

通信作者:郭善利,博士,教授,主要从事植物发育分子生物学研究。Tel:(0535)6902595;E-mail:gsl@ytu.edu.cn。

2016,64(1):44-47.

- [28] Salman H, Bergman M, Djaldetti M, et al. Citrus pectin affects cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells[J]. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2008, 62(9): 579-582.
- [29] Hexeberg B S, Hexeberg E, Willumsen N, et al. A study on lipid metabolism in heart and liver of cholesterol and pectin-fed rat[J]. British Journal of Nutrition, 1994, 71(2): 181-192.
- [30] 靳桂艳. 胶体果胶铋胶囊对胃癌前病变 *Bcl-2*、*P53* 基因蛋白影响的研究[J]. 中国医疗前沿, 2007, 1(2): 52-54.
- [31] Terpstra A H M, Lapre J A, Vries H T, et al. Dietary pectin with high viscosity lowers plasma and liver cholesterol concentration and plasma cholesteryl ester transfer protein activity in hamsters[J]. Journal of Nutrition, 1998, 128(11): 1944-1949.
- [32] Salman H, Bergman M, Djaldetti M, et al. Citrus pectin affects cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells[J]. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2008, 62(9): 579-582.
- [33] Craig W J. Phytochemical: guardians of our health[J]. Journal of American Dietetic Association, 1997, 97(10): 199-204.
- [34] 范玉莹. 人参果胶对细胞迁移的影响及其机理研究[D]. 长春:

东北师范大学, 2010.

- [35] 张燕燕, 木泰华, 张苗. 改性甘薯果胶对癌细胞增值的影响[J]. 中国农业科学, 2012, 45(9): 1798-1806.
- [36] Li F T, Yang H, Zhao Y, et al. Novel modified pectin for heavy metal adsorption[J]. Chinese Chemical Letters, 2007, 18(3): 325-328.
- [37] 郭晶晶. 改性果胶的制备及其对水溶液中的汞离子的去除研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2014.
- [38] 王春香, 杨鲲, 李玉静, 等. 改性果胶絮凝剂对废水中油脂和 Cr(VI) 的去除[J]. 西南师范大学学报, 2014, 39(1): 20-27.
- [39] Mielenz J R, Bardsley J S, Wyman C E. Fermentation of soy-bean hulls to ethanol while preserving protein value[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(14): 3532-3539.
- [40] 彭霞微, 谢响明, 白志辉, 等. 草酸青霉 BZH-2002 果胶酶系的纯化及其诱导抗病作用[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(6): 750-753.
- [41] 王虹霞, 胡诗保, 张瑜, 等. 果胶/魔芋胶复合膜结构及应用性能研究[J]. 西南民族大学学报, 2015, 41(1): 60-65.
- [42] 张晶莹, 王朝瑾, 沈宗霖, 等. 橙皮果胶可食性保鲜膜的应用[J]. 食品与发酵工业, 2012, 32(3): 128-131.

植物更好地适应盐渍生活^[2]。

目前,已经从多种植物中克隆到了编码 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的基因,如盐穗木(*Halostachys caspica*)^[1]、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[3]、水稻(*Oryza sativa*)^[4]、陆地棉(*Gossypium hirsutum*)^[5]、玉米(*Zea mays* L.)^[6]、甘蓝型油菜(*Brassica napus*)^[7]、冰叶日中花(*Mesembryanthemum crystallinum*)^[8]等。经过一系列研究发现,将这些基因过表达达到盐敏感植物中能明显提高转基因植株的耐盐性^[1,9-12],因此 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白对开发盐碱地以及提高农作物的产量具有非常重要的意义。

互花米草(*Spartina alterniflora*)隶属禾本科米草属,是典型高度耐盐的泌盐盐生植物。它起源于美洲大西洋沿岸和墨西哥湾,适宜生活于潮间带,同时具有很好的耐淹、抗风浪能力。它体内也存在着一类 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白,以此来减轻 Na^+ 毒害。因此,互花米草材料对于研究植物耐盐机制是一个很好的选择,但是目前我国关于互花米草作为耐盐基因资源方面的研究并不多见。为了进一步了解互花米草抗盐性的分子机制,本研究以互花米草为材料,克隆得到了互花米草 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *SaNHX1*,利用生物信息学软件及网站对获得的基因核苷酸序列及编码的蛋白质序列进行分析,利用 Qiagen Rotor Gene Q 荧光实时定量 PCR 仪对互花米草在 NaCl 及 ABA 不同处理时间条件下 *SaNHX1* 表达量的变化情况进行检测,为 *SaNHX1* 的进一步开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

互花米草种子来源于山东莱州海滨,放置于 4℃ 保存。取出保存的种子播种于耶土:黑土=1:1 的培养基质中,于 25℃、光照 16 h、黑暗 8 h 的温室条件下进行培养,2 周后选取长势一致的植株移栽到小方盆中继续培养至 4~5 叶龄。用于基因克隆的取材:用 600 mmol/L NaCl 溶液浇灌幼苗 48 h;用于定量表达的取材:分别用 600 mmol/L NaCl 溶液和 100 μmol/L ABA 溶液对幼苗进行浇灌和喷洒,处理时间为 0(对照)、3、6、12、24、48 h,每个处理重复 3 次。所有取材均经液氮速冻后于 -80℃ 保存。

大肠杆菌 DH_{5α} 为实验室保存;pMD18-T 载体、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA Ligase、dNTP Mix、DNA 限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司;BIOZOL RNA Kit 购于 BIOFLUX 公司;Reverse Transcriptase 试剂盒购于 Promega 公司;Kanamycin Sulfate 购于 Sigma 公司;试验中所用其他试剂大多为国产分析纯,部分试剂是参考文献[13]自行配制的,所有引物的合成均由北京华大六合基因公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 互花米草 *SaNHX1* 的克隆及序列分析 取出保存的互花米草叶片置于研钵中,加入液氮研磨成粉状,利用 Biozol 试剂法提取其总 RNA,使用超微量紫外分光光度计(NanoVue, USA)检测 RNA 的浓度和纯度,并用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,之后置于 -80℃ 保存。利用 Reverse Transcriptase 试剂盒进行体外反转录合成 cDNA,置于 -20℃ 保存。之后根据笔者实验室互花米草转录组测序结

果及 Blast 比对分析结果,在已知的 cDNA 序列的基础上分别设计 5' RACE 及 3' RACE 特异引物(*SaNHX1*-51:5'-TG-GCATCGTTTCACTCCTTCG-3';*SaNHX1*-52:5'-TGAG-GACCTGCAATGTGCAGAC-3';*SaNHX1*-31:5'-GTCTGCA-CATTGCAGGTCTCTCA-3';*SaNHX1*-32:5'-TTGTCAAG-CACCCTCCTTGAG-3'),以反转录得到的 cDNA 为模板进行扩增(反应条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,68℃ 延伸 90 s,30 个循环;68℃ 充分延伸 10 min)。纯化回收目的基因片段并与 pMD18-T 载体连接,连接产物转化至大肠杆菌 DH_{5α} 超级感受态细胞,于 37℃ 培养后挑选阳性克隆送至华大基因公司测序验证,对测序结果进行比对拼接后获得 *SaNHX1* 基因全长 cDNA 序列信息。

将获得的 *SaNHX1* 基因全长序列进行 Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 分析,与数据库中 NHX 同源序列比对,取高度相似(相似度>70%)的部分同源序列,使用 Clustal X 软件进行同源序列比对,利用 MEGA 5.0 软件构建 NJ 系统进化树,以分析 *SaNHX1* 与其他物种 NHX 之间的进化关系。其中 *SaNHX1* 蛋白质的基本理化性质使用 ExPASy (<http://web.expasy.org/>) 在线程序进行分析,蛋白质的跨膜结构域预测使用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) 在线程序进行分析。

1.2.2 互花米草 *NHX1* 表达分析 利用 Biozol 试剂法提取保存的互花米草的总 RNA,利用 Reverse Transcriptase 试剂盒进行体外反转录合成 cDNA,置于 -20℃ 保存。以提取的不同胁迫处理时间的 cDNA 为模板,进行荧光定量 PCR 检测(上游引物序列:5'-GAAGAGGAAGCATGAAGAGAAGC-3';下游引物序列:5'-GTCGACTGCTCGTCTTCTCTGCTGATCC-3';反应条件:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 10 s,55℃ 退火 10 s,72℃ 延伸 20 s;40 个循环),并分析试验结果。

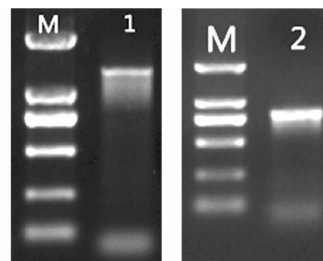
1.3 数据分析

数据采用 Origin 8.0 进行处理,利用 SPSS 19.0 进行统计分析,差异显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 互花米草 *SaNHX1* 的克隆及序列分析

根据实验室互花米草转录组测序结果及 Blast 比对分析设计特异引物,分别进行 5'RACE 及 3'RACE(图 1),根据测序结果进行比对拼接获得 *SaNHX1* 基因全长序列信息(图 2)。



M—Marker 2000; 1—*SaNHX1* 3'RACE⁺产物;
2—*SaNHX1* 5'RACE⁺产物

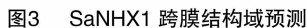
图1 第 2 次 RACE 后的琼脂糖凝胶电泳图

经分析,克隆得到的 *SaNHX1* 基因全长序列为 2 277 bp,开放阅读框(ORF)为 1 623 bp,编码 540 个氨基酸残基(图

且在 SaNHX1 蛋白上含有 NHX 抑制剂氨氯吡嗪结合位点 (LFFIYLLPPI) [15] 及糖基化位点(图 4)。从构建的 NJ 系统进化树(图 5)上可以看到 NHX 主要分为两大类,一类是定位于液泡膜上的蛋白,如 AtNHX1、AtNHX2 等;另一类是定位于质膜上的蛋白,如 AtNHX5、AtNHX6,其中 SaNHX1 蛋白归属于液泡膜蛋白。同时定位到液泡膜上的蛋白又分为单子叶与双子叶两类,这说明单子叶植物和双子叶植物的 NHX 在进化上存在差异[16],其中 SaNHX1 蛋白与单子叶植物的 NHX 蛋白亲缘关系较近。

单下划线为跨膜结构域；“*”表示终止密码子。

图2 *SaNHX1* 核苷酸序列及编码的蛋白质氨基酸序列



通过实时荧光定量 PCR 对互花米草在 NaCl 及 ABA 不同时间胁迫处理下 *NHXI* 的表达量进行分析,结果如图 6 所示。试验结果表明,在 ABA 胁迫及盐胁迫下,随着处理时间的延长,*SaNHXI* 的表达量都呈现先上升后下降的趋势,其中在 ABA 中 6 h 时,*SaNHXI* 的表达量达到最高,在盐处理 3 h 时,*SaNHXI* 的表达量达到最高,与对照相比都达到极显著差异水平。以上现象表明,互花米草 *NHXI* 的表达量分别受到

3 结论与讨论

很大的变化,这说明在这2种胁迫下*SaNHX1*的表达量

M. crystallinum	.MAFDLSNIVSTFKLQMLSTSDHASVSNINPFAALCAQCHGHILLEENRNWNESTALINGCHGVILITTKGKSHIUVFDDLEFFIYLLEPIIFENAGCVRKRFER	109
A. patens	.HNSCISLSSLSGKWDALSDHASVSNINPFAALCAQCHGHILLEENRNWNESTALINGCHGVILITTKGKSHIUVFDDLEFFIYLLEPIIFENAGCVRKRFER	109
AtNHX1	...MDSLSVS.KMPSLSTSDHASVSNINPFAALCAQCHGHILLEENRNWNESTALINGCHGVILITTKGKSHIUVFDDLEFFIYLLEPIIFENAGCVRKRFER	107
AtNHX2	...MTMFSLSVS.KMPSLSTSDHASVSNINPFAALCAQCHGHILLEENRNWNESTALINGCHGVILITTKGKSHIUVFDDLEFFIYLLEPIIFENAGCVRKRFER	107
H. vulgare	.MAFEVVAQALRLSDALSTSDHASVSNINPFAALCAQCHGHILLEENRNWNESTALINGCHGVILITTKGKSHIUVFDDLEFFIYLLEPIIFENAGCVRKRFER	110
T. aestivum	.MGYCVVAQALRLSDALSTSDHASVSNINPFAALCAQCHGHILLEENRNWNESTALINGCHGVILITTKGKSHIUVFDDLEFFIYLLEPIIFENAGCVRKRFER	110
A. littoralis	.MGFG.VVAHLVRLGVLSSTSDHASVSNINPFAALCAQCHGHILLEENRNWNESTALINGCHGVILITTKGKSHIUVFDDLEFFIYLLEPIIFENAGCVRKRFER	109
SanHX1	.MGFG.LMAHLARLGVLSSTSDHASVSNINPFAALCAQCHGHILLEENRNWNESTALINGCHGVILITTKGKSHIUVFDDLEFFIYLLEPIIFENAGCVRKRFER	109
P. australis	.MGLG.VVAHLVRLGVLSSTSDHASVSNINPFAALCAQCHGHILLEENRNWNESTALINGCHGVILITTKGKSHIUVFDDLEFFIYLLEPIIFENAGCVRKRFER	109
P. edulis	.MGVN.LGALVLRK.AGLVSSTSDHASVSNINPFAALCAQCHGHILLEENRNWNESTALINGCHGVILITTKGKSHIUVFDDLEFFIYLLEPIIFENAGCVRKRFER	108
O. sativa	.MEME.VAARLIG.ALYTSESTSDHASVSNINPFAALCAQCHGHILLEENRNWNESTALINGCHGVILITTKGKSHIUVFDDLEFFIYLLEPIIFENAGCVRKRFER	107
Z. mays	.MELG.VVAHLVRLGVLSSTSDHASVSNINPFAALCAQCHGHILLEENRNWNESTALINGCHGVILITTKGKSHIUVFDDLEFFIYLLEPIIFENAGCVRKRFER	109
AtNHX4MSIGLIEFVINKLAAEHFQVPSISVFAALCAQCHGHILLEENRNWNESTALINGCHGVILITTKGKSHIUVFDDLEFFIYLLEPIIFENAGCVRKRFER	105
AtNHX3MSIGLIEFVINKLAAEHFQVPSISVFAALCAQCHGHILLEENRNWNESTALINGCHGVILITTKGKSHIUVFDDLEFFIYLLEPIIFENAGCVRKRFER	105
糖基化位点		
M. crystallinum	.NSIHLIVFGALGLVFTTISLGLAMEFERKRLDGLSELGVLANGHISATTSVCTCLVQNCQDETHLYSLVVEGEGVNDATSVVENALQNEHLVHIDHRIAEKFAKNGE	219
A. patens	.NSIHLIVFGALGLVFTTISLGLAMEFERKRLDGLSELGVLANGHISATTSVCTCLVQNCQDETHLYSLVVEGEGVNDATSVVENALQNEHLVHIDHRIAEKFAKNGE	219
AtNHX1	.NSIHLIVFGALGLVFTTISLGLAMEFERKRLDGLSELGVLANGHISATTSVCTCLVQNCQDETHLYSLVVEGEGVNDATSVVENALQNEHLVHIDHRIAEKFAKNGE	215
AtNHX2	.NSIHLIVFGALGLVFTTISLGLAMEFERKRLDGLSELGVLANGHISATTSVCTCLVQNCQDETHLYSLVVEGEGVNDATSVVENALQNEHLVHIDHRIAEKFAKNGE	217
H. vulgare	.NSIHLIVFGALGLVFTTISLGLAMEFERKRLDGLSELGVLANGHISATTSVCTCLVQNCQDETHLYSLVVEGEGVNDATSVVENALQNEHLVHIDHRIAEKFAKNGE	220
T. aestivum	.NSIHLIVFGALGLVFTTISLGLAMEFERKRLDGLSELGVLANGHISATTSVCTCLVQNCQDETHLYSLVVEGEGVNDATSVVENALQNEHLVHIDHRIAEKFAKNGE	220
A. littoralis	.NSIHLIVFGALGLVFTTISLGLAMEFERKRLDGLSELGVLANGHISATTSVCTCLVQNCQDETHLYSLVVEGEGVNDATSVVENALQNEHLVHIDHRIAEKFAKNGE	219
SanHX1	.NSIHLIVFGALGLVFTTISLGLAMEFERKRLDGLSELGVLANGHISATTSVCTCLVQNCQDETHLYSLVVEGEGVNDATSVVENALQNEHLVHIDHRIAEKFAKNGE	219
P. australis	.NSIHLIVFGALGLVFTTISLGLAMEFERKRLDGLSELGVLANGHISATTSVCTCLVQNCQDETHLYSLVVEGEGVNDATSVVENALQNEHLVHIDHRIAEKFAKNGE	218
P. edulis	.NSIHLIVFGALGLVFTTISLGLAMEFERKRLDGLSELGVLANGHISATTSVCTCLVQNCQDETHLYSLVVEGEGVNDATSVVENALQNEHLVHIDHRIAEKFAKNGE	218
O. sativa	.NSIHLIVFGALGLVFTTISLGLAMEFERKRLDGLSELGVLANGHISATTSVCTCLVQNCQDETHLYSLVVEGEGVNDATSVVENALQNEHLVHIDHRIAEKFAKNGE	217
Z. mays	.NSIHLIVFGALGLVFTTISLGLAMEFERKRLDGLSELGVLANGHISATTSVCTCLVQNCQDETHLYSLVVEGEGVNDATSVVENALQNEHLVHIDHRIAEKFAKNGE	219
AtNHX4	.NSIHLIVFGALGLVFTTISLGLAMEFERKRLDGLSELGVLANGHISATTSVCTCLVQNCQDETHLYSLVVEGEGVNDATSVVENALQNEHLVHIDHRIAEKFAKNGE	215
AtNHX3	.NSIHLIVFGALGLVFTTISLGLAMEFERKRLDGLSELGVLANGHISATTSVCTCLVQNCQDETHLYSLVVEGEGVNDATSVVENALQNEHLVHIDHRIAEKFAKNGE	215
氨基吡啶结合位点		
M. crystallinum	.LIVFETSLGCAIGLHSAVIMKLIYGRHSTREVALMMIMAYLSYMLAEFLSGILTVFFCGIVMSHYTWNTESSRVTIKHAFALSELAEHDFIYVGLDALLI	329
A. patens	.LIVFETSLGCAIGLHSAVIMKLIYGRHSTREVALMMIMAYLSYMLAEFLSGILTVFFCGIVMSHYTWNTESSRVTIKHAFALSELAEHDFIYVGLDALLI	329
AtNHX1	.LIVFETSLGCAIGLHSAVIMKLIYGRHSTREVALMMIMAYLSYMLAEFLSGILTVFFCGIVMSHYTWNTESSRVTIKHAFALSELAEHDFIYVGLDALLI	325
AtNHX2	.LIVFETSLGCAIGLHSAVIMKLIYGRHSTREVALMMIMAYLSYMLAEFLSGILTVFFCGIVMSHYTWNTESSRVTIKHAFALSELAEHDFIYVGLDALLI	327
H. vulgare	.LIVFETSLGCAIGLHSAVIMKLIYGRHSTREVALMMIMAYLSYMLAEFLSGILTVFFCGIVMSHYTWNTESSRVTIKHAFALSELAEHDFIYVGLDALLI	330
T. aestivum	.LIVFETSLGCAIGLHSAVIMKLIYGRHSTREVALMMIMAYLSYMLAEFLSGILTVFFCGIVMSHYTWNTESSRVTIKHAFALSELAEHDFIYVGLDALLI	330
A. littoralis	.LIVFETSLGCAIGLHSAVIMKLIYGRHSTREVALMMIMAYLSYMLAEFLSGILTVFFCGIVMSHYTWNTESSRVTIKHAFALSELAEHDFIYVGLDALLI	329
SanHX1	.LIVFETSLGCAIGLHSAVIMKLIYGRHSTREVALMMIMAYLSYMLAEFLSGILTVFFCGIVMSHYTWNTESSRVTIKHAFALSELAEHDFIYVGLDALLI	329
P. australis	.LIVFETSLGCAIGLHSAVIMKLIYGRHSTREVALMMIMAYLSYMLAEFLSGILTVFFCGIVMSHYTWNTESSRVTIKHAFALSELAEHDFIYVGLDALLI	328
P. edulis	.LIVFETSLGCAIGLHSAVIMKLIYGRHSTREVALMMIMAYLSYMLAEFLSGILTVFFCGIVMSHYTWNTESSRVTIKHAFALSELAEHDFIYVGLDALLI	328
O. sativa	.LIVFETSLGCAIGLHSAVIMKLIYGRHSTREVALMMIMAYLSYMLAEFLSGILTVFFCGIVMSHYTWNTESSRVTIKHAFALSELAEHDFIYVGLDALLI	329
Z. mays	.LIVFETSLGCAIGLHSAVIMKLIYGRHSTREVALMMIMAYLSYMLAEFLSGILTVFFCGIVMSHYTWNTESSRVTIKHAFALSELAEHDFIYVGLDALLI	327
AtNHX4	.LIVFETSLGCAIGLHSAVIMKLIYGRHSTREVALMMIMAYLSYMLAEFLSGILTVFFCGIVMSHYTWNTESSRVTIKHAFALSELAEHDFIYVGLDALLI	325
AtNHX3	.LIVFETSLGCAIGLHSAVIMKLIYGRHSTREVALMMIMAYLSYMLAEFLSGILTVFFCGIVMSHYTWNTESSRVTIKHAFALSELAEHDFIYVGLDALLI	325
M. crystallinum	.EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...	437
A. patens	.EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...	437
AtNHX1	.EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...	433
AtNHX2	.EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...	435
H. vulgare	.EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...	438
T. aestivum	.EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...	437
A. littoralis	.EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...	437
SanHX1	.EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...	437
P. australis	.EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...	436
P. edulis	.EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...	436
O. sativa	.EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...	437
Z. mays	.EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...	435
AtNHX4	.EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...	435
AtNHX3	.EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...EKKRFVSDESGISIGVLSILLGLVWGAAAFVFLSHSLTKRTP...	435
M. crystallinum	.LTKPLIRLIRPFAS...SNGDSEFSESSKLSHSPILVSMQ...GSDLEAFPLF...IVRFSILRMLITKETHVYVYRFDALNRRMFGGRGFVFVPSGTE	543
A. patens	.LTKPLIRLIRPFAS...SNGDSEFSESSKLSHSPILVSMQ...GSDLEAFPLF...IVRFSILRMLITKETHVYVYRFDALNRRMFGGRGFVFVPSGTE	545
AtNHX1	.LTKPLIRLIRPFAS...SNGDSEFSESSKLSHSPILVSMQ...GSDLEAFPLF...IVRFSILRMLITKETHVYVYRFDALNRRMFGGRGFVFVPSGTE	529
AtNHX2	.LTKPLIRLIRPFAS...SNGDSEFSESSKLSHSPILVSMQ...GSDLEAFPLF...IVRFSILRMLITKETHVYVYRFDALNRRMFGGRGFVFVPSGTE	537
H. vulgare	.LTKPLIRLIRPFAS...SNGDSEFSESSKLSHSPILVSMQ...GSDLEAFPLF...IVRFSILRMLITKETHVYVYRFDALNRRMFGGRGFVFVPSGTE	532
T. aestivum	.LTKPLIRLIRPFAS...SNGDSEFSESSKLSHSPILVSMQ...GSDLEAFPLF...IVRFSILRMLITKETHVYVYRFDALNRRMFGGRGFVFVPSGTE	532
A. littoralis	.LTKPLIRLIRPFAS...SNGDSEFSESSKLSHSPILVSMQ...GSDLEAFPLF...IVRFSILRMLITKETHVYVYRFDALNRRMFGGRGFVFVPSGTE	533
SanHX1	.LTKPLIRLIRPFAS...SNGDSEFSESSKLSHSPILVSMQ...GSDLEAFPLF...IVRFSILRMLITKETHVYVYRFDALNRRMFGGRGFVFVPSGTE	531
P. australis	.LTKPLIRLIRPFAS...SNGDSEFSESSKLSHSPILVSMQ...GSDLEAFPLF...IVRFSILRMLITKETHVYVYRFDALNRRMFGGRGFVFVPSGTE	533
P. edulis	.LTKPLIRLIRPFAS...SNGDSEFSESSKLSHSPILVSMQ...GSDLEAFPLF...IVRFSILRMLITKETHVYVYRFDALNRRMFGGRGFVFVPSGTE	529
O. sativa	.LTKPLIRLIRPFAS...SNGDSEFSESSKLSHSPILVSMQ...GSDLEAFPLF...IVRFSILRMLITKETHVYVYRFDALNRRMFGGRGFVFVPSGTE	529
Z. mays	.LTKPLIRLIRPFAS...SNGDSEFSESSKLSHSPILVSMQ...GSDLEAFPLF...IVRFSILRMLITKETHVYVYRFDALNRRMFGGRGFVFVPSGTE	532
AtNHX4	.LTKPLIRLIRPFAS...SNGDSEFSESSKLSHSPILVSMQ...GSDLEAFPLF...IVRFSILRMLITKETHVYVYRFDALNRRMFGGRGFVFVPSGTE	523
AtNHX3	.LTKPLIRLIRPFAS...SNGDSEFSESSKLSHSPILVSMQ...GSDLEAFPLF...IVRFSILRMLITKETHVYVYRFDALNRRMFGGRGFVFVPSGTE	523
M. crystallinum	.QSTNNLNHSTEST...QSTNNLVDR...RNFPPDLKRA...RSNDELKSKP...PNVIVA...PNVLVE...QSIHNGR...QSVHGR...QSVHGERLTQINEI...QS.HGGR...RNFPPDLKRA...ENQPEC...ENQPEC...	556
A. patens	.QSTNNLNHSTEST...QSTNNLVDR...RNFPPDLKRA...RSNDELKSKP...PNVIVA...PNVLVE...QSIHNGR...QSVHGR...QSVHGERLTQINEI...QS.HGGR...RNFPPDLKRA...ENQPEC...ENQPEC...	555
AtNHX1	.QSTNNLNHSTEST...QSTNNLVDR...RNFPPDLKRA...RSNDELKSKP...PNVIVA...PNVLVE...QSIHNGR...QSVHGR...QSVHGERLTQINEI...QS.HGGR...RNFPPDLKRA...ENQPEC...ENQPEC...	538
AtNHX2	.QSTNNLNHSTEST...QSTNNLVDR...RNFPPDLKRA...RSNDELKSKP...PNVIVA...PNVLVE...QSIHNGR...QSVHGR...QSVHGERLTQINEI...QS.HGGR...RNFPPDLKRA...ENQPEC...ENQPEC...	538
H. vulgare	.QSTNNLNHSTEST...QSTNNLVDR...RNFPPDLKRA...RSNDELKSKP...PNVIVA...PNVLVE...QSIHNGR...QSVHGR...QSVHGERLTQINEI...QS.HGGR...RNFPPDLKRA...ENQPEC...ENQPEC...	538
T. aestivum	.QSTNNLNHSTEST...QSTNNLVDR...RNFPPDLKRA...RSNDELKSKP...PNVIVA...PNVLVE...QSIHNGR...QSVHGR...QSVHGERLTQINEI...QS.HGGR...RNFPPDLKRA...ENQPEC...ENQPEC...	540
A. littoralis	.QSTNNLNHSTEST...QSTNNLVDR...RNFPPDLKRA...RSNDELKSKP...PNVIVA...PNVLVE...QSIHNGR...QSVHGR...QSVHGERLTQINEI...QS.HGGR...RNFPPDLKRA...ENQPEC...ENQPEC...	540
SanHX1	.QSTNNLNHSTEST...QSTNNLVDR...RNFPPDLKRA...RSNDELKSKP...PNVIVA...PNVLVE...QSIHNGR...QSVHGR...QSVHGERLTQINEI...QS.HGGR...RNFPPDLKRA...ENQPEC...ENQPEC...	538
P. australis	.QSTNNLNHSTEST...QSTNNLVDR...RNFPPDLKRA...RSNDELKSKP...PNVIVA...PNVLVE...QSIHNGR...QSVHGR...QSVHGERLTQINEI...QS.HGGR...RNFPPDLKRA...ENQPEC...ENQPEC...	540
P. edulis	.QSTNNLNHSTEST...QSTNNLVDR...RNFPPDLKRA...RSNDELKSKP...PNVIVA...PNVLVE...QSIHNGR...QSVHGR...QSVHGERLTQINEI...QS.HGGR...RNFPPDLKRA...ENQPEC...ENQPEC...	544
O. sativa	.QSTNNLNHSTEST...QSTNNLVDR...RNFPPDLKRA...RSNDELKSKP...PNVIVA...PNVLVE...QSIHNGR...QSVHGR...QSVHGERLTQINEI...QS.HGGR...RNFPPDLKRA...ENQPEC...ENQPEC...	535
Z. mays	.QSTNNLNHSTEST...QSTNNLVDR...RNFPPDLKRA...RSNDELKSKP...PNVIVA...PNVLVE...QSIHNGR...QSVHGR...QSVHGERLTQINEI...QS.HGGR...RNFPPDLKRA...ENQPEC...ENQPEC...	541
AtNHX4	.QSTNNLNHSTEST...QSTNNLVDR...RNFPPDLKRA...RSNDELKSKP...PNVIVA...PNVLVE...QSIHNGR...QSVHGR...QSVHGERLTQINEI...QS.HGGR...RNFPPDLKRA...ENQPEC...ENQPEC...	529
AtNHX3	.QSTNNLNHSTEST...QSTNNLVDR...RNFPPDLKRA...RSNDELKSKP...PNVIVA...PNVLVE...QSIHNGR...QSVHGR...QSVHGERLTQINEI...QS.HGGR...RNFPPDLKRA...ENQPEC...ENQPEC...	529

图4 互花米草和其他物种 NHX 的多重序列比对

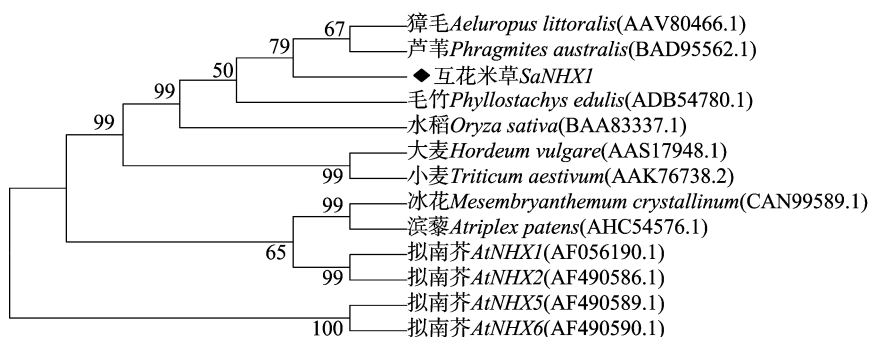


图5 互花米草和其他物种 NHX 的进化分析

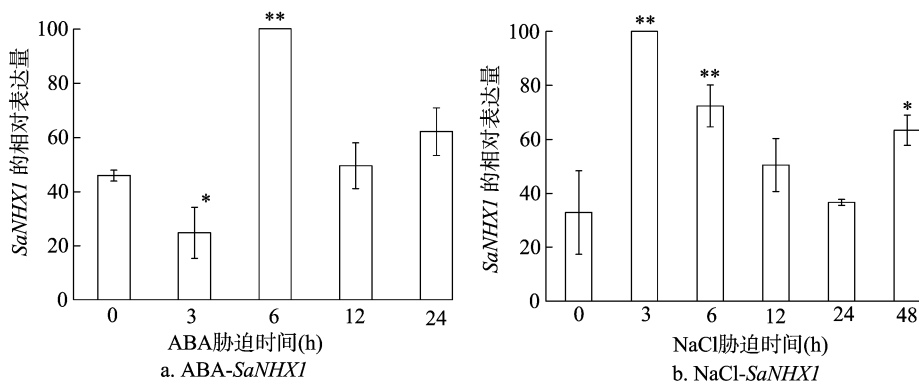


图6 互花米草 *NHX1* 在 ABA 胁迫及 NaCl 胁迫条件下的荧光定量分析

都受到了诱导。其中在 ABA 胁迫条件下, *SaNHX1* 的表达量在处理 6 h 后达到最高值, 约是对照的 2.5 倍, 达到极显著差异水平, 之后随着处理时间的延长, *SaNHX1* 的表达量呈逐渐下降的趋势。而在盐胁迫条件下, *SaNHX1* 的表达量则是在处理 3 h 后即达到最高值, 约是对照的 3 倍, 也达到极显著差异水平。由此可见, 在这 2 种胁迫短时间处理条件下, 互花米草试图通过增加 *SaNHX1* 的表达量以减轻对自身的毒害, 因此 *SaNHX1* 与植物耐盐有着密切的联系。

目前, 随着土壤盐渍化问题地日益加重, 依靠分子生物学手段来克隆相关耐盐基因^[17-18], 并将其转移到非抗盐的作物中, 以培育出耐盐的转基因新品种显得尤为重要, 这不仅可以在一定程度上开发利用盐碱土地, 而且对于提高农作物的产量具有非常重要的意义。目前关于 *SaNHX1* 的过量表达试验正在进行中。

参考文献:

- [1] Guan B, Hu Y Z, Zeng Y L, et al. Molecular characterization and functional analysis of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene (*HcNHX1*) from *Halostachys caspica* [J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38 (3): 1889 - 1899.
- [2] Qiu Q S. Plant and yeast NHX antiporters; roles in membrane trafficking [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2012, 54 (2): 66 - 72.
- [3] Gaxiola 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, 1999, 96 (4): 1480 - 1485.
- [4] Fukuda A, Nakamura A, Tanaka Y. Molecular cloning and expression of the Na^+/H^+ exchanger gene in *Oryza sativa* [J]. Biochimica et Biophysica Acta: Gene Structure and Expression, 1999, 1446 (1): 149 - 155.
- [5] Wu C A, Yang G D, Meng Q W, et al. The cotton *GhNHX1* gene encoding a novel putative tonoplast Na^+/H^+ antiporter plays an important role in salt stress [J]. Plant and Cell Physiology, 2004, 45 (5): 600 - 607.
- [6] Zorb C, Noll A, Karl S, et al. Molecular characterization of Na^+/H^+ antiporters (*ZmNHX*) of maize (*Zea mays* L.) and their expression under salt stress [J]. Journal of Plant Physiology, 2005, 162 (1): 55 - 66.
- [7] Wang J, Zuo K, Wu W, et al. Molecular cloning and characterization of a new Na^+/H^+ antiporter gene from *Brassica napus* [J]. DNA Sequence, 2003, 14 (5): 351 - 358.
- [8] Chauhan S, Forsthoefel N, Ran Y, et al. Na^+/myo - inositol symporters and Na^+/H^+ - antiport in *Mesembryanthemum crystallinum* [J]. The Plant Journal, 2000, 24 (4): 511 - 522.
- [9] Liu P, Yang G D, Li H, et al. Overexpression of *NHX1s* in transgenic *Arabidopsis* enhances photoprotection capacity in high salinity and drought conditions [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2010, 32 (1): 81 - 90.
- [10] Zhang H X, Blumwald E. Transgenic salt - tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit [J]. Nature Biotechnology, 2001, 19 (8): 765 - 768.
- [11] 边晨凯, 龙定沛, 刘雪琴, 等. 桑树 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 (*MnNHX1*) 的克隆与耐盐力表达 [J]. 林业科学, 2015, 51 (8): 16 - 25.
- [12] Zhang H, Liu Y, Xu Y, et al. A newly isolated Na^+/H^+ antiporter gene, *DmNHX1*, confers salt tolerance when expressed transiently in *Nicotiana benthamiana* or stably in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2012, 110 (2): 189 - 200.
- [13] 张志良, 瞿伟菁, 李小方. 植物生理学实验指导 [M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2009.
- [14] Shi H, Ishitani M, Kim C, et al. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na^+/H^+ antiporter [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, 97 (12): 6896 - 6901.
- [15] Gaxiola R A, Li J, Undurraga S, et al. Drought - and salt - tolerant plants result from overexpression of the *AVPI* H^+ - pump [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98 (20): 11444 - 11449.
- [16] 唐欣, 王瑞辉, 杨秀艳, 等. 唐古特白刺液泡膜 Na^+/H^+ 逆向运输蛋白基因 *NtNHX1* 的克隆与表达分析 [J]. 林业科学, 2014, 50 (3): 38 - 44.
- [17] 马玉花, 冶贵生, 冯志鹏. 柴达木盆地梭梭耐盐相关基因 *PrxQ* 的克隆及其蛋白结构预测 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43 (8): 27 - 30.
- [18] 王宏, 蔺经, 李晓刚, 等. 耐盐杜梨蛋白磷酸酶基因 *PbPP2C* 的克隆及表达分析 [J]. 江苏农业学报, 2014, 30 (6): 1464 - 1471.