

在胡杨 NHX 基因内发现细菌转座子 IS10-L 的存在

李金耀 马 纪 蔡 伦 曾幼玲 梅新娣 张富春*

(新疆大学生命科学与技术学院分子生物学重点实验室, 新疆生物资源基因工程重点实验室 乌鲁木齐 830046)

摘 要 采用 RT-PCR 扩增的方法, 从新疆不同地区的野生植物胡杨中分别克隆获得 1kb 和 2.3kb 的 cDNA 片段, 测序和序列分析表明这两个基因片段均包含 NHX 基因的部分读码框架, 分别命名为 *PtNHX* 和 *PwNHX*。 *PtNHX* 序列同源性分析结果显示胡杨 NHX 基因与滨藜 NHX 基因同源性高达 98%, 与碱蓬同源性达到 86%, 与拟南芥同源性为 84%, 与水稻同源性为 80% 表明它是植物中高度保守的一种基因, 同时说明野生植物胡杨中也存在与拟南芥相似的植物耐盐相关基因。 *PwNHX* 序列分析表明, 该基因内部含有一种转座酶的读码框, 大小约 1350bp, 与已发表的 *Shigella flexneri* 转座子 Tn10 基因序列 (AF162223) 同源性为 99%。 NHX 基因的蛋白产物在植物的耐盐性方面起着重要的作用。 推测 *PwNHX* 由于插入转座酶读码框可能会导致该基因的功能丧失。 胡杨生存于盐碱地, 其体内可能存在另一些机制使胡杨具有抗盐碱的能力。 对于这些机制的研究可能有助于进一步了解植物的抗盐机制。 利用 *PwNHX* 基因内的转座子作基因标签, 可进一步研究胡杨的其它基因, 从而有可能揭示胡杨叶子发育的变态过程、耐盐碱等性状。

关键词 胡杨, NHX, RT-PCR, 植物耐盐, 转座子

中图分类号 Q754 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)05-0628-04

转座子 (Transposon) 是指在生物细胞中能从同一条染色体的一个位点转移到另一个位点或者从一条染色体转移到另一条染色体上的 DNA 序列。 它是 McClintock^[1] 首先在玉米中发现的。 以后陆续在矮牵牛、金鱼草、飞燕草、甜豌豆等 35 种植物和一些多细胞绿藻中也证实了转座子的存在^[2,3]。 转座子的发现具有重要的意义, 它打破了传统遗传学上关于基因在染色体上固定排列及同源染色体交换的观念, 揭示了基因的流动性。

转座子的发现为基因工程和分子生物学研究提供了强有力的工具, 可以在不了解基因产物的生化性质和表达模式的情况下, 分离克隆植物基因, 即转座子标签 (Transposon tagging), 又称为转座子示踪法。 其原理是利用转座子的插入造成基因突变, 以转座子序列为基础, 从突变株的基因文库中筛选出带有此转座子的克隆, 它必定含有与转座子序列相邻的突变基因的部分序列, 再利用这部分序列从野生型基因文库中获得完整的基因^[4]。 1984 年, 用转座子标签法首先在玉米中分离了 *bronze* 基因^[5]。

NHX (Na⁺/H⁺ antiporter) 是液泡膜中的 Na⁺/H⁺ 反向运输体, 可促进离子在液泡中的区隔效应, 跨液泡膜的 pH 为其提供能量。 通过在功能上恢复 Na⁺/H⁺ 反向运输体

(ScNHX1) 缺陷型酵母突变体, 从拟南芥中分离出了 AtNHX1 基因, 并且与哺乳动物 NHE 反向运输体具有序列相似性^[6,8]。 在转基因拟南芥和转基因西红柿中过量表达 AtNHX1, 可在液泡膜中积累大量的运输体, 并且极大地提高了它们的耐盐性^[6,8,9]。 这些结果显示出 AtNHX 家族在钠离子的液泡区隔效应中起着关键的作用。

胡杨 (*Populus euphratica*) 为落叶乔木, 主要分布于塔里木盆地荒漠河流沿岸, 叶的发育具有变态过程, 幼叶为披针形或线形, 成熟叶为椭圆形或圆形。 耐盐碱, 其对于利用野生耐盐碱植物来改良作物性状, 培育作物新品种, 改良盐碱土壤具有重要意义。 NHX 基因是一类与植物耐盐性密切相关的基因, 据此本文运用 RT-PCR 技术从胡杨 mRNA 中扩增出 NHX 基因片段, 以期探讨植物的耐盐机制和作物优良品种的培育提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

胡杨采自新疆五家渠准噶尔盆地和塔里木盆地的干旱盐碱地区, pMD18-T 测序载体购自 TaKaRa 公司, 大肠杆菌 DH5 α 菌株为本实验室保藏菌种。 RNA 提取试剂盒购自

OMEGA Bio-Tek 公司 ;PCR 产物回收试剂盒、DNA marker、*Bam*H I 和 *Hind* III 限制性内切酶、*ex*Taq 酶以及 RT-PCR 和 PCR 引物均购自 TaKaRa 公司 ;测序试剂盒购自美国 PE 公司 其它试剂均为分析纯。

1.2 胡杨总 RNA 的提取

依据 OMEGA 公司的植物 RNA 提取试剂盒的操作进行。

1.3 RT-PCR 反应

根据已发表的各种 *NHX* 基因序列的保守区 ,设计 7 对 PCR 引物 其中的一对序列为 :

P1 :TTTCAAGTAAAAAGAAGCAGTTTTTCCG ;

P2 :ATCGTACTCGTGATCATGATTGCATT

依照 TaKaRa RNA PCR Kit 操作指南进行 反转录用寡聚脱氧胸腺嘧啶作下游引物 反应条件 :42℃ 30min 99℃ 5min , 5℃ 5min。 PCR 反应用 *NHX* 基因序列设计的特异性引物 ,扩增参数 :94℃ 5min ;94℃ 30s ,52.5℃ 30s ,72℃ 2min 35 个循环 ,72℃ 10min ,反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 *NHX* 基因 cDNA 的克隆

按 TaKaRa 公司 PCR 产物回收试剂盒说明书进行 PCR 产物的回收。回收的 *NHX* cDNA 片段与 pMD18-T 载体在 T4 DNA 连接酶的作用下 16℃ 过夜 ,使 *NHX* cDNA 连接到 pMD18-T 的载体上。连接产物转化感受态细胞 ,感受态的制备及转化按参考文献 [10]。

1.5 重组质粒的鉴定

按相关的参考文献 [10] 进行质粒 DNA 的小量提取 ,提取后的质粒分别用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切进行重组质粒的鉴定 酶切反应结束后进行琼脂糖凝胶电泳鉴定 ,正确的克隆进行质粒的大量提取。

1.6 胡杨 *NHX* cDNA 的序列测定及序列分析

为鉴定克隆的 cDNA 序列 ,对 pMD18-T/*NHX* 重组质粒进行纯化 ,并用 BcaBEST primer RV-M 和 BcaBEST primer M13-47 对胡杨 *NHX* cDNA 在 PE377 全自动测序仪进行双向 DNA 序列测定 ,所得序列用 PE 公司 SeqEd v1.0.3 软件进行分析。

2 结果

2.1 RT-PCR 产物鉴定

采用提取的总 RNA ,以寡聚脱氧胸腺嘧啶为引物进行反转录得到单链 cDNA ,再以设计的 PCR 引物进行扩增得到 *NHX* 基因片段。塔里木盆地的胡杨标本扩增得到的 *NHX* cDNA 命名为 *PtNHX* ,新疆五家渠的胡杨标本扩增得到的 *NHX* cDNA 命名为 *PwNHX* 。*PtNHX* RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 (图 1) ,可见一条约 1000bp 的条带 ,与我们预计的 1000bp 一致。*PwNHX* RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 (图 2) ,可见一条约 2300bp 的条带 ,比我们预计的 1000bp 的条带大。

2.2 测序载体的构建及其鉴定

RT-PCR 产物与克隆载体 pMD18-T 连接 ,构建了重组质粒 pMD18-T/*PtNHX* 和 pMD18-T/*PwNHX*。重组质粒用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切 ,分别切出约 1000bp 和 2300bp DNA

片段 ,与预计的连接片段大小相同。

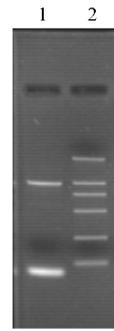


图 1 *PtNHX* RT-PCR 结果

Fig.1 Amplification of *PtNHX* cDNA by RT-PCR from *Populus*

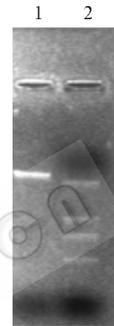


图 2 *PwNHX* RT-PCR 结果

Fig.2 Amplification of *PwNHX* cDNA by RT-PCR from *Populus*

2.3 *PtNHX* 和 *PwNHX* cDNA 序列测定及序列分析

对 pMD18-T/*PwNHX* 和 pMD18-T/*PtNHX* 重组质粒用 BcaBEST primer RV-M 和 BcaBEST primer M13-47 进行双向测序 ,测序结果如图 3。

TTTCAAGTAAAAAGAAGCAGTTTTTCCGCAACTTCATTACTACTCGTATTTGGTGGAGCTTTGGTACAT
GGTATCATTACCACATCATATCGTGGGAGCGTTGTCAATTTTAAGAAATGGATACCGTACTCTGGAG
TTGGCTGACTACTTTCGCAATTTGGTCAATATTTGCTGGCAGAGATCTGTTTGCACACTGCAGATCTTA
ATCAGGATGAGACCCCTCTGCTCTACAGCTCTGGTCTTTGGCGAGGGTGTGTTAAACGATGCCACATCAGT
GGTGCCTTTTCAACGCAATTCAGAGCTTTGACCTCACAAGAATTCATCAGAGAATCGCTTTGCAATTTATG
GGCACTTTCATATTTAATTTATCGCAAGCACTATACCTGGAGCATTTACTGGTTCCTCAGTGCCTTAGC
TTATCAAAAAGCTGTACTTTGGAAAGGCATCCACTGATCGTGGTTCCTTTAATGATGCTTTATGGCTTA
TCATCTTACATGCTTGGTGAACCTTTCTATTGAGTGGAAATTCACCTGATTTCTCTCGGGGATTTGTC
ATGTCACATTTACACCTGGCACAATGTGACGGAGAGCTCAAGAGTAACACCACAGCACTGATGAATCCCGT
AATGATTTGGTAAAAATCATTAAGTTAAGGTGGATACACATCTCGTCATATGATCAAAATGGTTTCCGGA
AAAATCAATAATCAGACACAAAGATGTGCGAACTCGATATTTTACACGACTCTCTTTACCAATCTCGCC
CGAATTTACCTTAAACGCACTCAACAGCTTAACGTTGGCTTGGCCAGCATTAATCTGACTGTAAAATCTC
ACTCTTACCGACTTTGGCCGTAACTGCCAACCAGCCAGGACAGAAACATTAACATCAACAGAAATCGACC
GATTTTGGTAGTAACTCGTCACTCCACAAGAGCACTCGCTGATATCCGTTGGCATGCTAGCTTTATCTG
TTCGGCAATACAGTACCCATTTGACTTTGTTGACTGGCTGATATTCGTTAGCAAAAACGACTTATGGTA
TTGCGAGCTCCAGTCGCATCACAGGTCGTTCTGTTACTCTTTATGAGAAGAGCTTCCCGCTTTCAGAGC
AATGTTCAAGAAGAGCTCATGACCAATTTCTAGCCAGCTTTCGCGACATTTACCAGAGTACACCCACCC
GCTCATTTGTCAGTGTGCTGGCTTTAAAGTCCATGGTATAAATCCGTTGAGAGCTGGGTGGTACTGG
TTAAGTCGAGTAAAGGAAAAGTACAATATCGAGACCTTAGGAGCGGAAACCTGGAAACCTTACAGCACT
TACATGATATGTCATCTAGTCACTCAAAGACTTTAGGCTATAAGAGGCTGACTAAAAGCAATCCAATCTC
ATGCCAAATCTATTGTTAATAATTCGCTCTAAAGGCCGAAAATAACAGCCCTCCAGCACCGAATCATTTGT
CACCCCGCTCACCTAAAATCTACTACGCTCGGCAAGGAGCCATGGGTTCTAGCAACTAACCTTACCTG
TTGAATTCGAGACCCAAACCACTTGTATATCTATTCGAAGCGAATGAGCATTTGAAGAACCTTCCG
AGACTTTGAAAAGCTCTGCTACGCACTTAGGCTACGCCATAGCCGAACGAGCAGCTCAGAGCTTTTGTG
ATCATGCTGCTAATCGCCCTGATGCTCAACTAACATTTGGCTTTCGGGGCTTCACTGCTCAGAAACAG
GTTGGGACAGCACCTCCAGGCTAACACAGCTCAGAAATCGAAACCTACTCTCAACAGTTCGCTTAGGCAT
GGAGATTTTGGCGGATTTCTGGCTACACAATTAACAGGGAGAGCTTACTCGTGGTGCACCCCTACTAGCT
CAAAATTTATTCACACATGGTTACCGCTTTGGGGAATATGAGGGGATCTCTCAGCACCAAGCATGCTTT
TGCAACACTGCTCTTTGTTGCTGAGGTTTCCTCTTTCTATATGTTGGTATGGATGCGTTGGACATTTAG
AAGTGGAGATTTCTGAGTATGATGCTCGGCAATTTCTGTTGCTGTGAGTTCATATTTGTTAGTCTCGTCA
TGGTTGGAAAGCAGACTTTTGTTCCTGGTCTTGGTAAATGAACCTTGGCCAAGAAATCACATAGTGA
AAGGTCACCTTCAACACAGCAGATGTCATATGGTGGGCTGGCTAATGAGAGTGTCTGTTCCATGGCA
CTTGGCTAATAATCAGTTTACAGGCTTGGACACACACAGCTTAGGGAAATGCAATCATGATCAGCAGTA
CGAT

图 3 *PtNHX* 基因 cDNA 序列 ,划线部分为 IS10-L 序列

2.4 对所测序列进行同源性分析

用 DNAMAN 对胡杨 NHX 基因与滨藜、碱蓬、拟南芥和水稻 NHX 基因进行同源性分析,其同源性分别为 98%、86%、84% 和 80%(图 4)表明所克隆的 cDNA 为 NHX 基因,测定序列区间包含了 NHX 的部分读码框架。

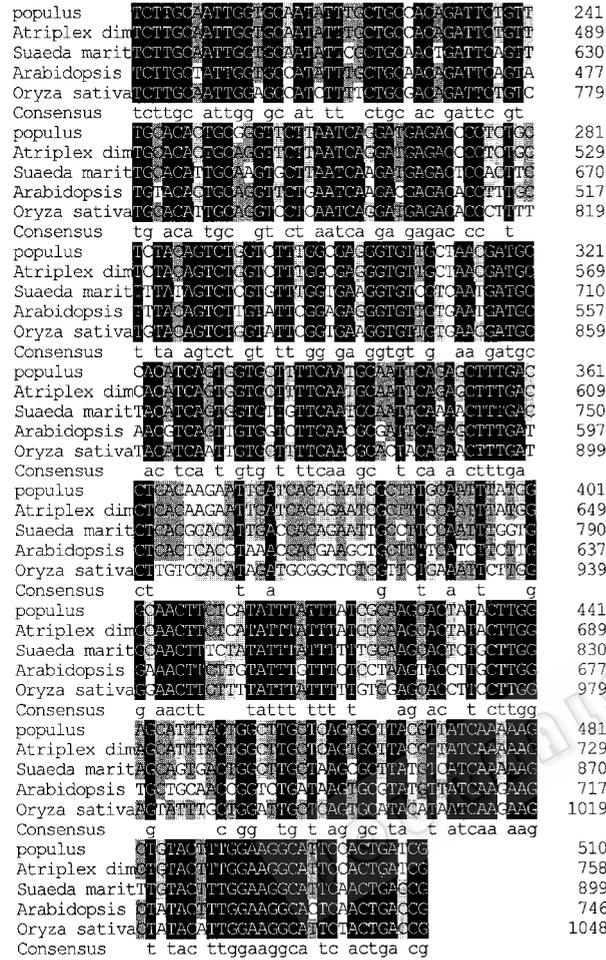


图 4 胡杨 NHX 基因与滨藜、碱蓬、拟南芥和水稻 NHX 基因的同源性比较

Fig.4 Homology analysis of the NHX cDNA of Populus euphratica with Atriplex dimorphostegia, Suaeda maritima, Arabidopsis thaliana and Oryza sativa

3 讨论

本文通过 RT-PCR 技术扩增胡杨 NHX 基因,根据已发表的各种 NHX 基因序列设计了 7 对引物,其中有一对可从胡杨总 RNA 中扩增出目的片段,其它引物因同源性不高而扩增不到相应的片段。扩增得到的片段与滨藜 NHX 基因同源性高达 98%,与碱蓬同源性达到 86%,与拟南芥同源性为 84%,与水稻同源性为 80%,NHX 基因可能编码了一种功能性蛋白,其功能在于提高植物的耐盐水平。

在扩增胡杨 NHX cDNA 时,发现从新疆五家渠地区的标本中扩增出的片段远远大于预期的 1000bp,得到了一条大约 2300bp 的条带,该片段经测序发现,基因内部含有 Shigella

flexneri. 转座子 Tn10 转座酶的读码框,大小约 1350bp,与已发表的基因序列(AF162223)同源性为 99%。该读码框编码了 IS10-left 转座酶(Transposase)。PwNHX 基因内部插入了转座子 Tn10 转座酶的读码框可能会导致该基因的插入失活,使得该基因的功能丧失。NHX 基因的蛋白产物在植物的耐盐性方面起着重要的作用,而胡杨生存于盐碱地,其体内可能存在另一些机制使胡杨具有抗盐碱的能力。对于这些机制的研究可能有助于进一步了解植物的抗盐机制。

目前转座子元件是植物分子生物学操作和植物基因工程中分离克隆基因和研究基因功能最有力的工具之一。早在 1981 年,Balcells 等人[1]就提出了转座子基因标签的概念,即用转座子的特异性片段作探针,通过杂交,分离出有转座子导致突变的目的基因。由于转座子的插入会引起基因的突变,因此可以把它作为一个插入突变源,并用来克隆因转座子插入而失活的基因。用这一方法克隆基因的优点是不需要鉴定基因的产物,也不需要了解基因表达的特征。Carpenter[12]在金鱼草中利用 Tam 转座子在 13000F1 代的群体中就发现了一个与花的发育有关的显性突变体,F2 代 40000 棵植株中至少发现有 7 个与花的型态有关的隐性突变体。因此利用 PwNHX 基因内的转座子作基因标签,可进一步研究胡杨的其它基因,从而可能揭示胡杨的一些特性,如:叶子发育的变态过程,耐盐碱性状等。

REFERENCES(参考文献)

[1] McClintock B. Mutable loci in Maize9. *Carnegie Inst Wash Year*, 1948 **47** :155 - 169

[2] Amutan M, Nyssonson E, Stubbs J *et al.* Identification and cloning of a mobile transposon from *Aspergillus niger var. a wamori*. *Current Genetics*, 1996 **29** :468 - 473

[3] Murai N, Li Z, Kawagoe Y *et al.* Transposition of the maize activator element in transgenic rice plants. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19** :617 - 622

[4] Alfons Girel, Heinz Saedler. Plant transposable elements and gene tagging. *Plant Mol Biol*, 1992, **19** :39 - 49

[5] Fedoroff N V, Furtek D B, Nelson O E. Cloning of the bronze locus in maize by a simple and gene realizable procedure using the transposable element Activator(Ac). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81** :3825 - 3829

[6] Apse M P, Aharon G S, Snedden W A *et al.* Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science*, 1999, **285** :1256 - 1258

[7] Gaxiola R A, Rao R, Sherman A *et al.* The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, *AtNhx1* and *Atp1*, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** :1480 - 1485

[8] Quintero F J, Blatt M R, Pardo J M. Functional conservation between yeast and plant endosomal Na⁺/H⁺ antiporters. *FEBS Lett*, 2000, **471** :224 - 228

[9] Zhang H X, Blumwald E. Transgenic salt-tolerant tomato plants

19 : 765 – 8

[10] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. *Molecular Cloning : A laboratory Manual* , (2nd ed) , New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989

[11] Balcells L , Swinburne J , Coupland G. Transposons as tools for the

isolation of plant genes. *TIBTECH* ,1991 **9** 31 – 37

[12] Carpenter R , Coen E S. Floral homeotic mutations produced by transposon mutagenesis in *Antirrhinum majus* . *Genes Dev* ,1991 **4** : 1483 – 1493

Sequence Analysis of Bacterial Transposon in NHX Gene of *Populus euphratica*

LI Jin-Yao MA Ji CAI Lun ZENG You-Ling MEI Xin-Di ZHANG Fu-Chun*

(Key Laboratory of Molecular Biology , College of Life Science and Technology , Xinjiang University ,
Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering , Urumqi 830046 ,China)

Abstract The United Nations Environment Program estimates that approximately 20% of agricultural land and 50% of cropland in the world is salt-stressed. The gene *NHX* (Na^+/H^+ exchanger) encodes functional protein that catalyzes the countertransport of Na^+ and H^+ across membranes and may play an important role in plant salt tolerance. To clone the *NHX* from the wild plant *Populus euphratica* collected in Tarim basin and Xinjiang Wujiaqu district into a T-vector , designed primer was used to amplify 1kb *NHX* cDNA fragment with RT-PCR. Total RNA was extracted from *Populus euphratica* tissue (plant tissue was collected from Tarim basin and Xinjiang Wujiaqu district and stored in liquid nitrogen) according to the Plant RNA Mini Kits of Omega. First cDNAs were synthesized from 1 μg total RNA of *Populus euphratica* seedling. A pair of primers were used to perform RT-PCR. The amplified DNA fragment was purified and cloned into pMD18-T vector. However , 1kb and 2.3kb fragment were obtained from Tarim basin and Xinjiang Wujiaqu district and named as *PtNHX* and *PwNHX* , respectively. Sequence analysis reveals that the cloned *PtNHX* fragment of *Populus euphratica* contains partial *NHX* coding region with 98% , 86% , 84% and 80% identity comparing with *Atriplex gemelini* , *Suaeda maritima* , *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* , respectively. This analysis suggests that *NHX* gene would be highly conserved in terms of evolution in plant ; and it also suggests that the *NHX* gene of *Populus euphratica* also would have the similarity with that of *Arabidopsis* . It may be of great importance in improvement of the plant salt tolerance and breed of crop. At the same time , sequence analysis shows that *PwNHX* gene includes a coding region about 1350bp with 99% identity comparing with transposon Tn10 IS10-left transposase of *Shigella flexneri* . On the one hand , the *NHX* gene may lose its function because it was inserted a fragment in coding region. On the other hand , its product may play a important role in salt tolerance. *Populus* grow in saline soil. It speculates that it may have other salt tolerance mechanism in *Populus* . The transposon can be used as transposon tagging to clone other genes and it will help us to understand farther the salt tolerance mechanism.

Key words *Populus euphratica* , *NHX* gene , RT-PCR , salt tolerance , transposon

Received : 03-31-2003

This work was supported by Grant from the State Key Technologies R&D Program of China(No. 2001BA901A32) .

* Corresponding author. Tel 86-991-8583517 ; Fax 86-991-8583259 ; E-mail : zfc@xju.edu.cn