

盐芥 ThNHX1 基因的3 RACE

蔡小宁, 杨平, 贲爱玲, 沈志花, 王敏^(1. 南京晓庄学院生命科学系, 江苏南京211171; 2. 安徽农业大学, 安徽合肥230036)

摘要 以盐芥为材料, 依据拟南芥 *AtNHX1* 基因的序列信息设计引物, 扩增出盐芥中 ThNHX1 基因的部分序列, 然后使用快速扩增 cDNA 3' 末端(3 RACE) 方法, 从盐芥中克隆到 ThNHX1 3' cDNA 序列。该序列全长 680 bp, 编码 104 个氨基酸, 其编码序列、氨基酸序列与拟南芥 *AtNHX1* 基因的相应序列同源性分别为 91% 和 91.5%, 而盐芥 ThNHX1 基因 3' 端非翻译区序列与拟南芥相应序列的同源性为 68.5%, 明显低于编码区。

关键词 盐芥; ThNHX1 基因; 克隆; 快速扩增 cDNA 3' 末端

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)21-5485-02

Rapid Amplification of cDNA 3' Ends of ThNHX1 Gene from *Thellungiella halophila*

CAI Xiao-ning et al. (Department of Life Sciences, Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing, Jiangsu 211171)

Abstract A gene fragment was amplified by a pair of primers designed from *Arabidopsis AtNHX1* gene from *Thellungiella halophila*. With this gene fragment, the cDNA 3' ends of ThNHX1 gene that was 680 bp and encoded 104 amino acids was obtained by 3' RACE. The codon sequence and amino acid sequence of the 3' ends of ThNHX1 gene shared 91% and 91.5% identity with those of *AtNHX1* gene respectively. The codon sequence of 3' UTR of ThNHX1 gene shared 68.5% identity, which was lower than the codon sequence identity, with one of *AtNHX1* gene.

Key words *Thellungiella halophila*; ThNHX1 gene; Cloning; Rapid amplification of cDNA 3' end

据联合国教科文组织(UNESCO)和粮食组织不完全统计, 全世界盐渍土地面积约 10 亿 hm^2 。仅我国就有盐渍土壤约 3 300 万 hm^2 , 其中盐渍耕地 660 万 hm^2 , 还有 2 000 万 hm^2 盐渍荒地有待开垦利用^[1]。高盐环境是影响植物生长和发育的主要环境因子之一。分子生物学的发展, 使人们能够在基因组成、表达调控及信号传导等分子水平上认识植物对盐逆境胁迫的耐(抗)性机理, 从而通过基因工程手段改良植物耐(抗)盐性^[2]。

迄今, 耐盐机制虽在众多非盐生植物中开展, 但进展较慢, 原因在于缺少盐生植物的基因分析^[3]。而最近研究发现, 盐生植物——盐芥是研究耐盐机制的最合适的植物。盐芥与拟南芥的遗传特性、生活特性相似, 同样具有植株矮小、生长周期短、易于转化的特点^[3]。甜土植物拟南芥全基因组序列测定已经完成, 而盐芥 EST 序列与拟南芥基因组序列有 90% 的同源性, 因此可以根据拟南芥基因组序列的信息来克隆盐芥中的相关基因, 比较拟南芥和盐芥的耐盐分子机制^[4]。

Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因在盐胁迫中起着重要的作用^[5,6], 有关盐芥中此类基因的克隆工作目前尚未见报道。笔者旨在利用快速扩增 cDNA 3' 末端(3 RACE) 技术^[7], 进行盐芥 ThNHX1 基因 3' 端片段的克隆及测序, 为进一步研究盐芥 ThNHX1 基因功能等奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 盐芥(*Thellungiella halophila*) 种子来源于美国 ABRC(Arabidopsis Biological Resource Center); 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 菌种由南京晓庄学院生命科学系实验室保存; 反转录酶、Taq 酶、T4-DNA 连接酶、IPTG 和 X-Gal, 及克隆生物工程有限公载体 pGEMT easy 购自 Promega 公司; 引物由

上海赛百盛生物技术(SBS)有限公司合成; 胶回收试剂盒购自上海华舜司; RNA 提取试剂、质粒提取试剂盒购自 Invitrogen 公司。

1.2 总 RNA 的提取 将盐芥种子播种于花卉土中, 1~2 个月以后以 200 mmol/L 的 NaCl 溶液处理 12 h, 然后取叶片 50~100 mg, 加入少许液氮研磨成粉末, 加入 0.5 ml 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 *Plant RNA Reagent*, 抽打匀浆, 使样品完全悬浮, 室温放置 5 min 后以转速 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清液至新的 1.5 ml 离心管中, 加 0.1 ml 1.5 mol/L NaCl, 轻拍混匀, 加入 300 μl 氯仿, 颠倒混匀(20~30 次), 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液至新的 1.5 ml 离心管中, 加等体积的异丙醇混匀, 室温静置 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 留沉淀, 加入 1 ml 75% 乙醇, 振荡悬浮沉淀, 室温 12 000 r/min 离心 1 min, 弃上清液, 加 10~30 μl RNase-free water 溶解沉淀。

1.3 反转录合成 cDNA 吸取 RNA 1~5 μg , 引物 *oligo(dT)* 1 μl , 补水到 11 μl , 温度 70 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 10 min。加 5 \times buffer 4 μl , dNTP 2 μl , DTT 2 μl , 混匀, 加入 1 μl 反转录酶, 再混匀。42 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1~1.5 h, 70 $^{\circ}\text{C}$ 15 min 终止反应。

1.4 盐芥 ThNHX1 基因部分编码序列的获得 根据拟南芥 *AtNHX1* 基因序列(AT5G27150)的信息, 利用 DNASTAR 软件设计 1 对引物: Up primer 1, 5'-GTGCTGCAACCGGTCTGATAA-3'; Down primer 2, 5'-TTGCCATGTTTTGCTTTCTGCTC-3', 经 PCR 扩增获得近 800 bp 的产物, 经提取纯化测序, 得到长度 592 bp 的 ThNHX1 基因部分编码序列。

1.5 3 RACE 按照 BD SMART RACE cDNA Amplification Kit 说明书操作步骤进行。先合成 3'-RACE Ready cDNA, 根据所获得的盐芥 ThNHX1 基因部分 cDNA 序列信息, 利用 DNASTAR 软件设计特异性引物 GSP, 5'-GCAAGTTGTCATTTGGTGGGCTGGTC-3'; 再设计 1 个 5' 端巢式 PCR 的引物 NHX1G2A, 5'-AAACCGCTCATAAGACACCTA-3'。通过 2 次 PCR 获得 3 RACE 扩增产物, 通过琼脂糖凝胶电泳分离此 PCR 产物, 切下条带提取纯化后, 用于随后的连接反应。

1.6 PCR 产物测序 将 3 RACE 扩增片段连接到 pGEMT Easy 载体上, 转入大肠杆菌 DH5 α , 蓝白斑筛选, 挑取白斑划

基金项目 南京晓庄学院重点项目(2004NXY04)和校生态学重点学科建设基金资助项目(2005-2008)。

作者简介 蔡小宁(1962-), 男, 江苏海安人, 副研究员, 从事农业生物技术研究。

鸣谢 美国 Utah State University 的 WU Ya-jun 博士对本项目给予了指导。

收稿日期 2006-08-16

(上接第5486页)

应基因序列的相似程度在90%以上^[3,4],因此可以利用这种相似性,参考拟南芥基因的序列信息设计引物,克隆出盐芥的有关基因的片段,然后再结合RACE技术得到相应基因的全长序列^[7],试验证明了此技术路线的有效性。

该研究结果表明,盐芥ThNHX1基因3端cDNA编码区序列与拟南芥相应序列的同源性为91%,而盐芥ThNHX1基因3端非翻译区序列与拟南芥相应序列的同源性为68.5%,明显低于编码区。显然编码区序列与3端非翻译区序列相比在进化上更为保守,这应该有其积极的意义,因为编码区序列发生变异有时比3端非翻译区序列发生变异更容易对植物造成伤害,推测植物在长期进化过程中形成了一种修复编码区序列变异的机制,使编码区序列最终的变异较少,这种机制有待于进一步研究。

由于盐芥和拟南芥具有很近的亲缘关系,而两者分别为盐生植物和非盐生植物,因此笔者可以比较两者基因序列的差异,更有效地研究揭示植物的耐盐机制。林洪宣研究小组研究了水稻中与拟南芥AtHKT1基因相似的基因SKC1后发现,耐盐水稻品种Nona Bokra耐盐性缘于SKC1基因的变异,与盐敏感品种Koshihikari不同,其SKC1基因编码的蛋白质中有4个氨基酸不同,从而使耐盐水稻品种的根部与顶部间循环运送钠离子的能力大大加强,因此表现出明显的耐盐性^[8]。笔者的研究结果表明,盐芥ThNHX1

基因的3端蛋白比拟南芥多1个氨基酸天冬酰胺,另外还有7个氨基酸不同,这为今后的进一步研究提供了线索。

基因克隆是分子生物学与基因工程应用研究的一项基础性工作,目前已建立了多种克隆基因的技术方法。RACE技术与先建立cDNA文库,再从文库中筛选目的基因的克隆方法相比,费时少、成本低、工作量小、操作相对简单,最重要的就是通过RACE的方法能够克隆到全长基因,为其后的分析提供完整的信息^[7]。

参考文献

- [1] 胡忠,曹军,庄东红.耐盐性植物转基因工程的研究进展[J].热带亚热带植物学报,2006,14(2):169-178.
- [2] 高峰,高强,岳桂东,等.小盐芥(*Thellungiella salsuginea*)CBF1基因的克隆[J].山东大学学报:理学版,2005,40(5):113-118.
- [3] BRESSAN RAY A,ZHANG CHANGQING,ZHANG HU,et al.Learning from the Arabidopsis experience.The next gene search paradigm[J].Plant Physiology,2001,127:1354-1360.
- [4] TAI TERUAKI,SEKI MOTOAKI,SATOU MASAKAZU,et al.Comparative genomics in salt tolerance between Arabidopsis and Arabidopsis-related halophyte salt stress using Arabidopsis microarray[J].Plant Physiology,2004,135:1697-1709.
- [5] APSE MP.Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in Arabidopsis[J].Science,1999,285(5431):1256-1258.
- [6] 李金耀,马纪,蔡伦,等.灰绿藜和碱蒿NHX基因3'-UTR序列的差异性分析[J].植物生理学通讯,2005,41(2):219-223.
- [7] 唐克轩,开国银,张磊,等.RACE的研究及其在植物基因克隆中的应用[J].复旦学报,2002,41(6):704-709.
- [8] REN ZHONG HAI,GAO JI-PING,LI LE GONG,et al.A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter[J].Nature Genetics,2005,37:141-146.