

文章编号 :1003-8701(2013)03-0031-04

角碱蓬 NHX1 基因的克隆及在烟草中的表达

张春玉^{1,2}, 关敏³, 宋凯³, 李望丰², 刘立侠^{2*}

(1. 长春职业技术学院食品与生物技术分院, 长春 130033 ; 2. 东北师范大学生命科学院, 长春 130024 ;
3. 长春师范学院, 长春 130000)

摘要 :Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白在植物抗盐碱的过程中起着至关重要的作用。本实验首次从角碱蓬中克隆出 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因 NHX1 ,并将其连接到真核表达载体 pBIGFP 中 ,通过农杆菌 LBA4404 介导转化至烟草中。最后的分子检测实验结果表明 ,NHX1 基因成功整合到了烟草的基因组中并得到了有效表达。

关键词 :角碱蓬 ;NHX1 基因 ;烟草

中图分类号 :Q943.2

文献标识码 :A

Cloning of NHX1 Gene from *Suaeda corniculata* and Expression in Tobacco

ZHANG Chun-yu^{1,2}, GUAN Min³, SONG Kai³, LI Wang-feng², LIU Li-xia^{2*}

(1. School of Food Production Technology and Biotechnology, Changchun Vocational Institute of Technology, Changchun 130031;

2. School of Life Science, Northeast Normal University, Changchun 130024;

3. Changchun Normal University, Changchun 130033, China)

Abstract: Na⁺/H⁺ antiporter played a vital role in the process of plant resistant to saline-alkali. In this study, Na⁺/H⁺ antiporter gene *NHX1* was cloned and connected to the eukaryotic expression vector pBIGFP, which was transformed into tobacco mediated by *Agrobacterium* LBA4404. Further molecular detection of experimental results showed that the *NHX1* gene was successfully integrated into the genome of tobacco and expressed effectively.

Keywords: *Suaeda corniculata*; *NHX1* gene; Tobacco

世界土地的盐渍化现象正呈现逐年上升的趋势,盐胁迫作为影响作物生长的非生物因素之一,已经严重制约着作物的产量^[1-2]。研究显示,在植物适应盐胁迫的过程中,植物液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白在植物耐盐的过程中发挥了至关重要的作用^[3-6]。为了提高盐碱地的开发利用,研究者一直致力于开发出相关的抗盐碱基因。随着对拟

南芥、水稻等植物的抗盐碱分子机理研究的深入,这些植物中的液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因被克隆出来,并且其较强的耐盐能力也得到了证实^[7-8]。

角碱蓬(*Suaeda corniculata*)作为重要的盐地植物,一向以耐盐碱著称,主要生长在盐碱土丰富的黑龙江、吉林、新疆、甘肃等地。目前关于角碱蓬液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因的研究尚未见有报道,因此,本研究首次从盐地植物角碱蓬中克隆出液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白 NHX1 基因,并对其转化烟草进行了研究,以为角碱蓬 NHX1 基因的进一步开发利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期 :2013-02-27

基金项目 :国家自然科学基金 (31072080) ;吉林省科技厅项目 (201205048) ;吉林省教育厅项目 (20111190)

作者简介 :张春玉 (1972-),女,博士,副教授,主要从事植物生物技术研究。

通讯作者 :刘立侠,女,博士,教授,博士生导师,

E-mail :liulx062@nenu.edu.cn

1.1.1 植物材料

角碱蓬(*Salsola collina* Pall)采自于吉林省松原盐碱地区;烟草 K326 (*Nicotiana tobacum*)种子由东北师大生物技术实验室保存。

1.1.2 质粒和菌种

中间载体 pBI 为东北师大生物技术实验室自主构建质粒;载体 pMD18-T 购自于大连宝生物公司,载体 pXW023 和农杆菌 LBA4404 由东北师大生物技术实验室保存。

1.1.3 酶类和试剂盒及生化试剂

DNA 限制性内切酶、Taq 酶、CIP 小牛肠碱性磷酸酶、RNA PCR kit、DNA 凝胶回收及质粒提取试剂盒、DNA Marker 均为大连宝生物公司产品;T4 DNA 连接酶购自 Neb-Lab 公司;氨苄青霉素,卡那霉素购于上海生工生物技术有限公司;实验中所用其他试剂皆为国产分析纯;引物合成和基因测序由上海生工生物公司完成。

1.1.4 培养基

烟草叶片分化培养基 MS1 :MS+0.5 mg/L BA+0.01 mg/L IAA ;

烟草叶片生根培养基 MS2 :1/2MS+0.5 mg/L IBA。

1.2 实验方法

1.2.1 角碱蓬 NHX1 基因编码区的克隆

根据角碱蓬 NHX1 基因全序列,采用 Fast-PCR3.0 version 软件设计引物序列如下:

上游引物 5'-ATGTTGTCACAGTTGAGCTCTTTTT-3';下游引物 5'-CTATGTTCTCTCTGT-CATATTATGGGT-3'。

提取角碱蓬的 RNA,逆转录后获得 cDNA,并以此为模板 PCR 扩增后获得 NHX1 基因的编码区序列,连接在 pMD18-T 载体上转化大肠杆菌,提取质粒酶切鉴定,最后进行测序。

逆转录反应体系为:RNA 样品 2 μ L,10 \times RT Buffer 1 μ L,RNase inhibitor 0.25 μ L,RNase Free H₂O 2.75 μ L,dNTP 1.0 μ L,Primer oligodT 0.5 μ L,AMV 0.5 μ L,MgCl₂ 2 μ L(总体积 10 μ L)。

PCR 反应体系(50 μ L):上步反应模板 cDNA 1.5 μ L,上游引物(20 nmol/ μ L)1 μ L,下游引物(20 nmol/ μ L) 1 μ L,PCR buffer 5 μ L,Taq 酶 0.25 μ L,dNTP (2.5 nmol/L) 1 μ L,ddH₂O 40.25 μ L。

1.2.2 植物荧光标记表达载体的构建

用 XbaI 和 SacI 双酶切载体 pXW023,分离出编码 GFP 的基因片段并回收;将 pBI121 载体上的 GUS 基因用 XbaI 和 SacI 双酶切,回收

pBI121。然后将 GFP 基因片段与 pBI121 连接,转化大肠杆菌,筛选重组子,酶切鉴定重组子,构建含有 GFP 荧光标记的植物表达载体,重组质粒命名为 pBIGFP。

1.2.3 植物表达载体 pBIGFP-NHX1 的构建

将含有 NHX1 基因的 pMD-NHX1 载体用 XbaI 分离,将 pBIGFP 用 XbaI 酶切后去磷酸化,然后将 NHX1 基因正向接入 pBIGFP 中,转化大肠杆菌,筛选重组子,酶切鉴定正向重组子,构建含有 NHX1 基因的植物表达载体,命名为 pBIGFP-NHX1。

1.3 农杆菌介导法转化烟草

参照施华中等^[9]的方法进行农杆菌介导的烟草转化。

1.4 转基因烟草目的基因的分子检测

取转化植株和对照植株叶片 2 g 放到研钵中,然后液氮充分研磨。参照王关林等^[10]的方法进行基因组 DNA 提取。取基因组 DNA (1 μ g) 作为 PCR 扩增模板,使用两套引物进行 PCR 扩增,引物序列分别是 NPTII 基因 5'-AACAGACAATCG-GCTGCTCT-3' 和 5'-CCACCATGATATTTCG-GCAAGCA-3',以及 GFP 基因 5'-tgaatggtcagcaagatagag-3' 和 5'-tccgagatatgcattggatgtg-3',前者能够扩增出 550bp 的条带,后者能够扩增出 500 bp 左右的条带。NPTII 扩增程序为,95 预变性 5 min,然后为 32 个循环,每个循环为 94 $^{\circ}$ C 30 s,57 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,然后是 72 $^{\circ}$ C 5 min。GFP 基因扩增程序为,95 预变性 5 min,然后为 32 个循环,每个循环为 94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,然后是 72 $^{\circ}$ C 5min。PCR 扩增完成后,使用 1.2% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。

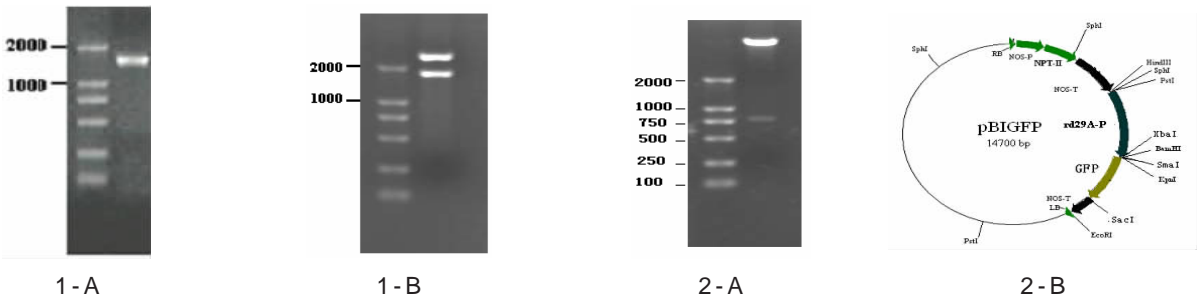
1.5 报告基因(GFP)的检测

取转化植株和对照植株的根尖放到载玻片上压片,使用配备 100 W 汞灯和 GFP PLUS Fluorescence[®] filter kit 的 Leica MZ12 荧光正置显微镜进行观察,GFP 观察结果用数码相机拍照。

2 结果和分析

2.1 角碱蓬基因的克隆

利用设计好的引物,从角碱蓬基因组中克隆了长度约 1 700 bp 的,两侧带有 XbaI 和 SacI 酶切位点的角碱蓬 NHX1 基因编码区全序列,鉴定结果如图 1-A;将该序列连接到 pMD18-T 载体中(图 1-B),从中挑选出正确的阳性克隆用于植物表达载体的构建。



1-A :PCR 扩增的 NHX1 基因编码区片断 1-B :NHX1 基因编码区片断连接进 pMD18-T 载体中
 2-A :NHX1 基因编码区片断连接进植物荧光标记表达载体 pBIGFP 中 2-B :植物表达载体 pBIGFP 示意图

2.2 植物荧光标记表达载体的构建

用 XbaI 和 SacI 酶切 pXW023 载体，获得大约 800 bp 的编码 GFP 的基因片段，然后将该片段连接到卸掉 Gus 标记的 pBI121 中。重组子用 XbaI 和 SacI 双酶切后获得 800bp 的片段，鉴定如图 2-A ;进一步用 XbaI 和 SacI 双酶切重组子，得到 GFP 目的基因，由电泳图证实编码 GFP 的基因片段已经连接到 pBI121 载体中，荧光标记载体构建成功，命名为 pBIGFP，如图 2-B。

2.3 植物表达载体 pBIGFP-NHX1 的构建

用 XbaI 酶切 pBIGFP，然后将 NHX1 正向接入 pBIGFP 中，转化大肠杆菌，筛选重组子。重组子分别用 XbaI 与 HindIII+ SmaI 酶切鉴定正向重组子，分别获得 1 700 bp 的目的基因 NHX1 和 2 500 bpNHX1+35 s 启动子片段，鉴定结果如图 3 所示。

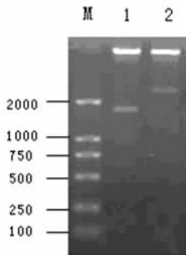


图 3 植物表达载体 pBIGFP-NHX1 的构建
 M :DL2000 ; 1 :XbaI 酶切 ; 2 :(HindIII+ SmaI)酶切

2.4 农杆菌的转化和检测

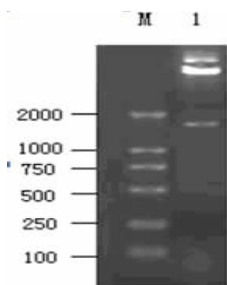


图 4 农杆菌的转化和检测
 M :DL2000 ;1 :XbaI 酶切

参照王关林等^[10]方法，使用电击转化法将表达载体 pBIGFP-NHX1 成功的转化到农杆菌 LBA4404 感受态细胞中，然后从转化的农杆菌中提取质粒，使用 XbaI 内切酶进行单酶切验证。酶切检测结果表明，能够获得一个 1 700 bp 的 NHX1 目的基因片段，结果如图 4 所示。

2.5 农杆菌介导法转化烟草

2.5.1 抗性植株的获得

将质粒 pBIGFP-NHX1 转入到农杆菌 LBA4404 中，采用农杆菌侵染烟草叶盘的方法，成功地在含有卡那霉素筛选培养基上筛选出抗性小芽，将此抗性小芽进一步转入生根培养基中，待长出强壮的根后移入花盆中进行炼苗，结果如图 5 所示。

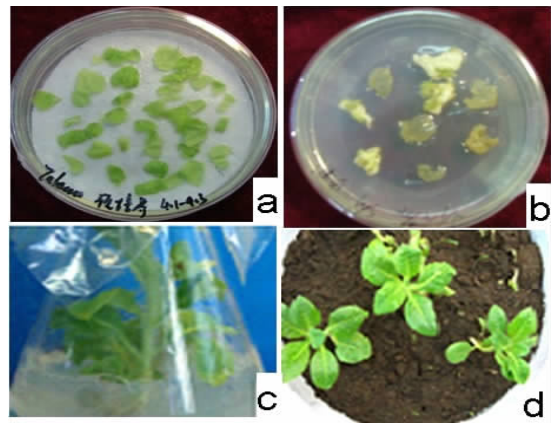


图 5 抗性植株的获得

- A :预培养 2 d 的根癌农杆菌感染后的材料
- B :诱导分化 15 d 后的愈伤组织
- C :诱导分化了 30 d 后的无根苗的材料
- D :生根苗转入温室炼苗

2.5.2 目的基因分子的检测

为验证本实验转基因成功与否，我们随机选取 6 份转化烟草材料进行 PCR 扩增检测，PCR 扩增使用 NPTII 和 GFP 基因两对引物。结果表明 :5 株抗性植株可扩增出与 NPTII 和 GFP 基因对应的 500 bp 和 550 bp 的片段 (泳道 3~8)，只有 1

株(泳道 7)没有扩增结果(图 6 和图 7)。此 PCR 扩增结果不仅表明了本研究建立的烟草转化体系转化效率比较高,同时也证明了外源基因确已经整合到烟草基因组中。

2.6 报告基因(GFP)表达的检测

本研究构建的 pBIGFP-NHX1 载体,其目的

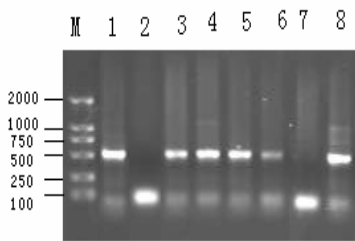


图 6 NPTII 基因的 PCR 检测结果

M:DL2000 1:CK⁺ 2:非转基因烟草
3~8:转基因烟草样品

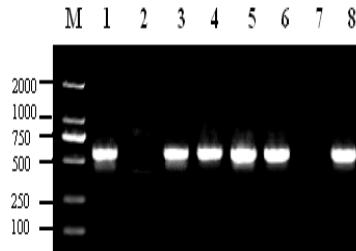


图 7 GFP 基因的 PCR 检测结果

M:DL2000 1:CK⁺ 2:非转基因烟草
3~8:转基因烟草样品

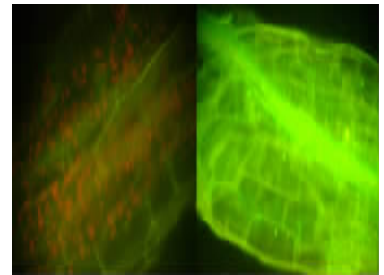


图 8 GFP 在组织中表达的检测结果

a: 对照植株 b: 转化植株

3 结 论

本研究首次从角碱蓬中克隆出 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 NHX1 基因,并将其构建到含有 GFP 荧光标记的植物表达载体 pBIGFP 中,并进一步通过农杆菌介导法将该基因进行了烟草转化。初步转化实验结果表明:从角碱蓬中克隆的 NHX1 基因已经成功转化到烟草植株中,6 株转基因烟草植株中,有 5 株得到了表达,仅有 1 株没有转化成功,说明本研究建立的烟草转化体系转化效率比较高。本研究结果与目前已报道的其他 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 NHX1 基因转化烟草的结果相一致,因此能够为角碱蓬 NHX1 基因应用于转基因耐盐植物培育的研究提供一定的理论依据。

参考文献:

- [1] Shabala S, Cuin TA. Potassium transport and plant salt tolerance[J]. *Physiol Plant* 2008(133): 651-669.
- [2] Kronzucker HJ, Britto DT. Sodium transport in plants: a critical review[J]. *New Phytol*, 2011(189): 54-81.
- [3] Liu P, Yang GD, Li H, et al. Overexpression of NHX1s in transgenic *Arabidopsis* enhances photoprotection capacity in high

基因下游带有绿色荧光蛋白(GFP)基因,该基因的表达状况,可以直接反映目的基因 NHX1 的表达。通过荧光正置显微镜检测抗性转化植株的根尖(图 8)。结果表明 GFP 基因在转化植株中已经成功表达,同时也间接地验证了目的基因已经成功的表达。

salinity and drought conditions[J]. *Acta Physiol Plant* 2010 (32): 81-90.

- [4] Yang Q, Wu M, Wang P, et al. Cloning and expression analysis of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene from alfalfa[J]. *DNA Seq*, 2005(16): 352-357.
- [5] Zhao J S, Zhi D Y, Xue Z Y, et al. Enhanced salt tolerance of transgenic progeny of tall fescue (*Festuca arundinacea*) expressing a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene from *Arabidopsis* [J]. *J. Plant Physiol*, 2007(164): 1377-1383.
- [6] Chen L H, Zhang B, Xu Z Q. Salt tolerance conferred by overexpression of *Arabidopsis* vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene *AtNHX1* in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*)[J]. *Transgenic Res*, 2008(17): 121-132.
- [7] Apse M P, Aharon G S, Snedden W S. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter in *Arabidopsis*[J]. *Science*, 1999(285): 1256-1258.
- [8] Fukuda A, Nakamura A, Tanaka Y. Molecular cloning and expression of the Na^+/H^+ exchanger gene in *Oryza sativa* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1446(1-2): 149-155.
- [9] 施华中,杨弘远,周 嫦,等.根癌农杆菌的高效电激转化[J]. *武汉大学学报(自然科学版)*, 1995, 41(6): 724-728.
- [10] 王关林,方宏筠. *植物基因工程* [M]. 北京: 科学出版社, 2002:742-744.