

文章编号: 1674-7054(2010)02-0105-05

木榄 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的克隆

郭庆水, 徐立新, 袁潜华, 于 伟

(海南大学 农学院, 海南 海口 570228)

摘 要: 根据北滨藜、胡杨、毛白杨、番杏、盐爪爪、盐角草等已发表的逆向转运蛋白的保守区设计简并引物, 通过 RT-PCR 和 RACE 技术, 从木榄 (*Bruguiera gymnorhiza*) 中克隆 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白长度为 2 130 bp 的 cDNA 全长序列, 开放阅读框 1 626 bp, 编码 541 个氨基酸和一个终止子, 含 10 个跨膜区。蛋白序列同源分析表明它与蓖麻、胡杨、葡萄、百脉根等植物的液泡膜型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白序列具有很高的同源性(80% 以上), 表明该序列确属 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白家族的基因, 在细胞中起到 Na^+ 区隔化作用。

关键词: 木榄; *BgNHX1*; Na^+/H^+ 逆向转运蛋白; 同源; 跨膜

中图分类号: Q 789

文献标志码: A

植物为了抵御盐胁迫, 形成了一套适应机制^[1], 即主要通过细胞质中积累小分子的无毒有机溶质和离子在液泡内区隔化来实现渗透平衡。对于植物来说, Na^+ 是细胞生长所需要的基本营养成分, 但 Na^+ 的区隔化是它在盐环境中生存的必要保障。 Na^+/H^+ 逆向运输蛋白是一种 Na^+ 的逆向转运体, 在细胞质膜和液泡膜上均有分布, 液泡膜上的 Na^+/H^+ 逆向运输蛋白将细胞质中的 Na^+ 逆着 Na^+ 浓度梯度运送到液泡中区隔化集中, 细胞质膜上的 Na^+/H^+ 逆向运输蛋白将细胞质中的 Na^+ 逆向运送到胞外高 Na^+ 环境中, 从而减少了钠离子对细胞质中细胞器的毒害, 对于维持细胞的渗透平衡起重要作用^[2-3]。Blumwald 等人克隆得到拟南芥液泡膜上的 Na^+/H^+ 逆向运输蛋白基因后, 将之转化得到了转基因拟南芥、西红柿和油菜, 转 *AtNHX1* 的拟南芥植株在 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 中能正常生长发育。过量表达 *AtNHX1* 基因的转基因西红柿在 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 胁迫下能正常生长、开花和结实, 尽管叶片中 Na^+ 浓度高, 但西红柿果实中 Na^+ 浓度很低^[4-6]。Fukada 等首次从单子叶植物水稻中克隆到了水稻液泡膜 Na^+/H^+ 逆向运输蛋白基因, 该基因过量表达的转基因水稻, 耐盐性增强^[7-8]。研究表明 Na^+/H^+ 逆向运输蛋白在植物耐盐性方面具有极重要的作用^[9]。目前, 除花粉管通道技术以外, 多基因导入技术上有难度, 理论上也不知究竟应导入哪些基因, 导入单个关键基因, 在一定程度上提高作物的耐盐能力是比较可行的方法。木榄作为一种盐生植物, 在淡土中也可以正常生长, 木榄没有盐腺, 但根部的拒盐作用使木质部中的盐分下降^[10-11], 可拒出 99% 的盐分, 这说明木榄 Na^+/H^+ 反向运输蛋白有很强的活性, 是研究植物耐盐机理的较好材料。研究木榄的 Na^+/H^+ 反向运输蛋白基因, 可以为耐盐作物的培育提供可能更有效的基因, 希望对耐盐基因的表达进行有效调控, 有助于对耐盐机理进行更深入的研究。

1 材料与方法

1.1 材料的采集与培养 在海南省东寨港红树林自然保护区内采集木榄母树发育良好、无病虫害及机械损伤的种子, 于海南大学作物遗传育种实验室进行沙培。沙粒取自海南大学生物技术科研基地, 装入一个花盆中, 种约 20 粒胚轴, 盆中加入含有 3% NaCl 的自来水, 自然光照状态下培养, 每天分别用蒸馏水

收稿日期: 2009-12-14

作者简介: 郭庆水(1983-), 男, 山东沾化人, 海南大学农学院 2007 级在读硕士研究生。

通信作者: 徐立新, 男, 副研究员, 博士, E-mail: xulixinn@163.com

补充水分,待长有 6~8 片叶片时采集幼嫩叶片,用蒸馏水冲洗干净后迅速用滤纸轻轻擦干,迅速加入液氮研磨成粉状,于 -80°C 冻存。

1.2 酶及生化试剂 实验所用的连接酶、T 载体、3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 等购自大连宝生物公司。SMARTTM RACE 试剂盒购于宝日医生物技术(北京)有限公司。其他生化试剂:氨苄青霉素、苯酚、氯仿、异丙醇、无水乙醇、乙酸钠、琼脂糖等试剂均购自海南青鸟生物技术有限公司。测序及引物合成由上海生工生物工程有限公司完成。

1.3 基因保守片段的克隆 利用 CTAB-LiCl 沉淀法提取木榄幼嫩叶片材料 RNA。根据已发表的液泡型 $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ 逆向转运蛋白保守序列(北滨藜、胡杨、毛白杨、番杏)设计简并引物,NHP1: 5'-ATTGGWG-CAATMTTYGCTGC-3',NHP2: 5'-TCTCAATRTCCARDGCATCC-3',反转录用 OligodT 作引物,反应条件: 65°C 5 min; 42°C 60 min; 70°C 5 min; 16°C 5 min。PCR 扩增按照 94°C 3 min; 94°C 30 s, 52°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min 进行,反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 3'RACE 根据获得的木榄 NHX 基因保守片段序列,设计 3'RACE 引物序列为: 3S1: 5'-CGGAT-TCTGTTTGCACATTGCAGGTC-3' 和 3S2: 5'-AGTATCGCTGGGCAGTTTGTGTC-3'。按照 TaKaRa 3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 说明书做 cDNA 第 1 链合成及巢式 PCR,第 1 轮 PCR 利用 3S1 和 3'-Outer Primer (来自 3'-Full RACE Core Set),巢式利用 3S2 和 3' Inner Primer (来自 3'-Full RACE Core Set)。

1.5 5'RACE 根据获得的木榄 NHX 基因保守片段序列,设计 5'RACE 引物序列为: 5A1: 5'-TC-CAGGGCATCCATCCCAACATAAA-3', 5A2: 5'-TGTCCAGGGCATCCATCCCAACAT-3'。反应按照 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit User Manual 进行,第 1 轮 PCR 利用 5A1 和 Universal Primer A Mix (来自 SMARTTM RACE Kit),第 2 轮 PCR 利用 5A2 和 Nested Universal Primer A (来自 SMARTTM RACE Kit)。

1.6 序列拼接及分析 根据测序结果对木榄 NHX cDNA 的全长序列进行拼接和分析,蛋白序列的预测,确定克隆获得了木榄 NHX cDNA 的开放阅读框(open reading frame, ORF)。跨膜区的预测由 TMHMM 软件进行,蛋白与核酸水平上同源性的比较利用 DNAMAN 软件进行。

2 结果与分析

2.1 木榄 RNA 的提取 利用 CTAB-LiCl 沉淀法提取木榄幼嫩叶片材料 RNA^[12],通过甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测所提 RNA(见图 1)。从图 1 可见,28 S,18 S 的 2 条带清晰,其中 28SRNA 亮度约为 18SRNA 的 2 倍,说明运用该方法所提取的木榄叶片的总 RNA 完整性好,几乎无降解。用紫外分光光度计测定提取的总 RNA 在 260 nm 和 280 nm 处的光吸收值,确定总 RNA 的纯度及浓度。

2.2 木榄逆向运输蛋白基因 PCR 扩增结果 利用 1.3 设计的简并引物进行 PCR 扩增,获得 1 条 500 bp 左右的条带,如图 2 所示。结果表明,扩增获得的条带与当初设计引物选用的保守区条带大小相近。将测序结果经 BLAST 比对,与胡杨上已公布的 *PeNHX2* 有 87% 的同源性。

2.3 木榄逆向运输蛋白基因 3'RACE 和 5'RACE 结果 对 3'RACE 和 5'RACE 的巢式 PCR 产物进行电泳检测,结果表明 PCR 反应扩增出 1 条特异的目的产物条带,3'RACE 片段大小在 1 200 bp 左右,5'RACE 在 1 000 bp 左右,与期望的片段大小一致。回收纯化扩增的片段,连接到载体 pMD20-T 上,转化大肠杆菌 DH5 α ,经蓝白斑筛选及采用载体上 M13-47, RV-M 通用引物进行 PCR 扩增验证,最后挑选阳性克隆送上海生工进行测序(见图 3,4)。

2.4 测序结果 对扩增的 3 个片段测序,将测序结果用 DNAMAN 拼接和分析,得到带有完整编码框的木榄逆向转运蛋白序列 2 130 bp,其开放阅读框为 1 626 bp,包括 541 个氨基酸编码区和 1 个终止密码(图 5)。

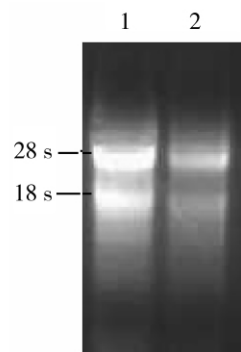


图 1 木榄 RNA 提取 1,2 叶片

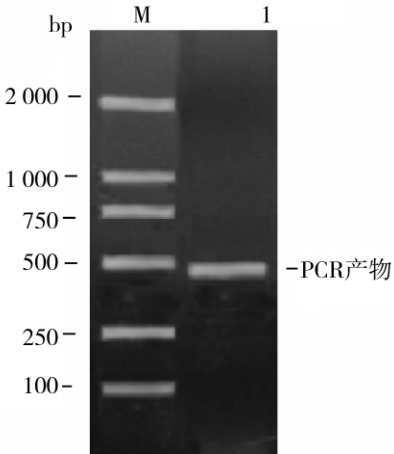


图 2 木榄逆向运输蛋白基因保守片段扩增产物

M: Marker; 1. PCR Product

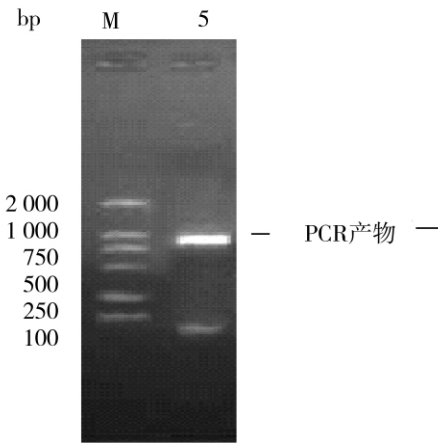


图 3 木榄 *BgNHX1* 5' RACE PCR 结果

M: Marker; 5: 5' RACE 扩增片段

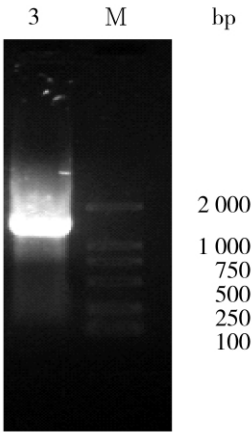


图 4 木榄 *BgNHX1* 3' RACE PCR 结果

M: Marker; 3: 3' RACE 扩增片段

```
1 ACGCGGGGCTAGCTGTCTCTCAGCTAAATCCGAGCAATATTCGAACCAGAGAGATCGGGTTT
61 CTTCCAATCTCCTCTCTCTGTGTGCGTAATTTGCTTGCCCTTTCTTTATGATGCGCTTGC
121 TTTCGCTTACTCGTTCGTTTGTGCGAGTTCGGAGATGTGAAGGGATCGTTGGATTTCGAGAG
181 CTCTGCGCCTTCTCGGAATGGACGGCTCAGAGACTTAGAAGTAGGAAAATTGTGCAGAAT
241 TTACATTTTCGAGAGAGAGAGATCTGAATTTTCATATACCCAATTGGGGTTAATTGGTTTT
301 GCAAAGAAAGGGTGACACAGAGACATAAGACCATGATTCGTACGTTAGCTCGGTTGTCT
1 CGAGATTGCAGATGCTTTACAGTCCGATCACTCCTCTGTGGTATCCATGAACCTATTCG
361 S R L Q M L Y T S D H S S V V S M N L F
10 TGGCGCTTCTCTGCGCTTGTATCGTGATTAGCCATCTTTTGAAGAGAATCGTTGGATGA
421 V A L L C A C I V I S H L L E E N R W M
30 ACGAGTCGATTACCGCCCTCATAATTGGTTTGTGCACTGGGGTTGTATCTTGTGCTGTTA
481 N E S I T A L I I G L C T G V V I L L V
50 GTGGAGGAAGGAGCTCGCATCTTTTGGTCTTCAGTGAGGATCTTTCTTATATATCTTC
541 S G G R S S H L L V F S E D L L F F I Y L
70 TACCACCAATTATCTTCAATGCCGGGTTTCAGGTGAAGAAGAAGCAGTTCTTTTCGTAATT
601 L P P I I F N A G F Q V K K K Q F F R N
90 TCATTGACCATCATGCTATATGGTGTCTGTTGGTACATTGATATCCTGTTGCATCATATCTG
661 F M T I M L Y G A V G T L I S C C I I S
110 TAGGTGCTACACTAGCCTTTAAGAAGATGGATATTGGTTCAGTATGTTGGCGATTATT
721 V G A T L A F K K M D I G S L D V G D Y
130 TGGCTATTGGTGCAATATTGTGCTGCCACGGATTCTGTTGACATTGCAAGTTCCTTAATC
781 L A I G A I F A A T D S V C T L Q V L N
150 AGGATGAGACACCTTTACTTTATAGTCTGTTTTCGGAGAAGGTGTTGTAATGATGCCA
841 Q D E T P L L Y S L V F G E G V V N D A
170 CGTCACTGTGCTTTTAAATGCAATCCAGAGCTTTGATCTCAGTCACTTTTAGTCCAGTA
901 T S V V L F N A I Q S F D L S H F S P S
190 TCGTGGGCGAGTTTGTGGCAGCTTTTATATTTATTTTTCACAAGCACTGTGCTGGGAG
961 I A G Q F V G S F L Y L F F T S T V L G
210 TGTTACAGGCGCTGTAGTGCCTTCATCATCAAAAACTTTATTTTGGCAGGCATTCAA
1021 V F T G L L S A F I I K K L Y F G R H S
230 CAGATCGTGAGGTGCTCTTATGATTCTCATGGCATACTTTTCGTATATGCTGGCTGAAC
1081 T D R E V A L M I L M A Y L S Y M L A E
250 TGTTTACTTTAAGTGGCATTCTCACTGTATTTTGTGGGATCGTGATGTCACATTACA
1141 L F Y L S G I L T V F F C G I V M S H Y
270 CCTGGCACAATGTAACAGAGAGTTCAAGAGTTACTACGAAGCACTGCTTTTGCAACCTTAT
1201 T W H N V T E S S R V T T K H A F A T L
290 CATTGTGTGCTGAGATTTTATCTTCTTATGTTGGGATGGATGCCCTGGACATTGAGA
1261 S F V A E I F I F L Y V G M D A L D I E
310 AGTGGCGTTTTGTAAGTGATAGCCCCGGAACATCAATTGCAGTGAGCTCAGTACTGCTAG
1321 K W R F V S D S P G T S I A V S S V L L
330 CTCTGTCTGATTGGGAGAGCAGCTTTTGTCTTTCCACTATCCTTCATATCCAACCTAT
1381 A L V L I G R A A F V F P L S F I S N L
350 CTAAGAAATCAACTAACGAGAAGATTGGCATCAAGCAGCAAATTATAATATGGTGGGCTG
1441 S K K S T N E K I G I K Q Q I I I W W A
370 GACTAATGAGAGGCGCTGTGTCAATGGCACTAGCATACAATAAGTTTACAAGCTTGGGTC
1501 G L M R G A V S M A L A Y N K F T S L G
390 ATACCAATGTGCGAGATAATGCAATAATGATCACAAGTACCATAACTGTTGTTCTCTTCA
1561 H T N V R D N A I M I T S T I T V V L F
410 GCACAGTGGTGTGTTGGTCTGCTGACTAAACCTCTTATAAGGCTTCTGCTGCCTCATACA
1621 S T V V F G L L T K P L L I R L L P H T
430 AACAAAAACCAAAAGGCATATTAGATCCAACTTCTCCAAAATCAAATACAGTGCCACTCC
1681 K Q K P K G I L D P T S P K S N T V P L
450 TTGGAGAGGGACAGGATTCTTGGATGACATCGGTGGGCAGGATGGTCTACGCCCAAACA
1741 L G E G Q D S L D D I G G Q D G L R P N
470 GTTTACGTGCGCTCCTGCACACCCCAACACACACCGTTCATTACTGCGCGCAAAATTCG
1801 S L R A L L T T P T H T V H Y W R K F
490 ACAATGCTTTCATGCGTCCCGTGTGTTGGCGGTGCGGGGTTTGTTCCTTCTGTTCCCGGCT
1861 D N A F M R P V F G G R G F V P F V P G
510 CACCGACAGAACGGAGCGTTCACAATCAATTGCAATGAAAGAAAGACAAGCAAGATGTA
1921 S P T E R S V H N Q L Q *
530 CAGATTATATAAAGTTATAAGCATCTTGAAGATGGTTAAACAGTATCATATATCTTTGAA
1981 CCTGCTGCTGAAAACAGTGGTTTGTGTTTTTCTATCTCTCACTCCTTAATTGATACCTG
2041 TTAAATTTATACCGTAGAAAAA
2101
```

图 5 木榄 *BgNHX1* 基因的 cDNA 序列及推测的氨基酸序列

2.5 *BgNHX1* 与其他 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白亲缘关系比较 应用软件 TMHMM (www.cbs.dtu.dk/services/) 进行跨膜性分析,结果表明,*BgNHX1* 基因可能含有 10 个跨膜区(图 6),每个跨膜区约含 18 ~ 23 个氨基酸,分别位于 84 - 93 密码子相应的十肽 Leu - Phe - Phe - Ile - Tyr - Leu - Leu - Pro - Pro - Ile (LFFIYLLPPI) 为氨氯吡啶(amiloride) 的结合位点,是多个物种 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的高度保守序列^[2]。

从 GenBank 中查找一些有代表性的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的氨基酸序列,对不同 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白之间的遗传关系进行了系统发育分析。分析结果(图 7) 表明,*BgNHX1* 与胡杨、白杨上扩增出的逆向转运蛋白具有较高的同源性,与植物液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白有较高的相似性,而与质膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的序列相似性较低。由此表明,*BgNHX1* 属于植物 Na^+/H^+ 逆向运输载体家族成员,编码木榄液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白,具有执行 Na^+ 区隔化功能。

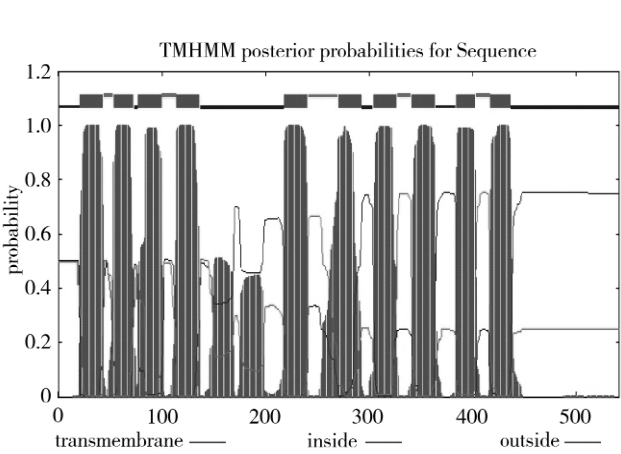


图 6 *BgNHX1* 跨膜区分析

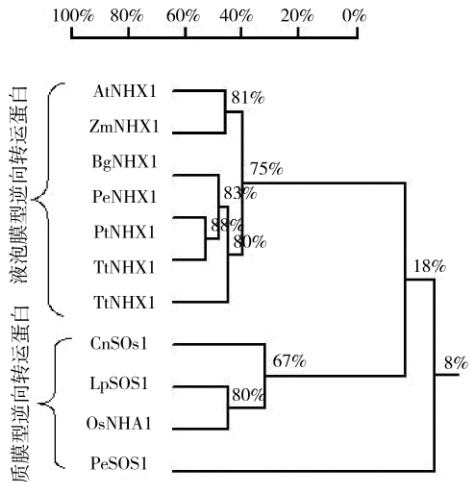


图 7 几种植物 *NHX1* 基因推测的氨基酸序列的同源分析

3 讨 论

要想得到高产率的产物,首先必须拥有高质量的模板 cDNA。对于克隆一个在正常生长条件下表达量较低的目的基因,适当处理材料诱导目的基因的大量表达,将提高 PCR 的扩增效率。因此,要成功克隆到目的基因,必须保证正确的处理材料方法和高质量的提取 RNA。在 RNA 的提取中,笔者首先选择了 Trizol 提取的方法,但效果不好。Trizol 实用于含糖量低的植物材料,而对于木榄这种植物来说,其内含有大量的胶质、多糖及酚类物质,使得木榄细胞裂解液变得极为粘稠。采用一般分离方法最终得到的 RNA 在纯度和数量上均不能达到预期的目的。最终选用了方孝东等提出的 CTAB 法,并稍做了部分改动,从而提高了模板的纯度。另外,在提取过程中动作要轻,要注意减少机械力对 RNA 的破坏,以获得完整的 RNA,这对有效的 RT - PCR 很关键。

耐盐性是一个复杂性状,是多个基因相互作用的结果,大量的盐胁迫反应的基因似乎也支持这个以前认为一个基因型的品种只有积累了多个耐盐基因才能具有耐盐性,单一的基因不能提高作物的耐盐性。然而,有研究表明,转单一的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因能够明显地提高作物的耐盐性,其原因可能是 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因转化进入植物细胞后激活了一系列与耐盐相关的基因,从而明显地提高了植物耐盐性。

已有报道,*NHX* 除了在盐胁迫中发挥一定作用外,在植物的生长发育中也起着关键作用,如通过调节液泡中的 pH 改变花的颜色^[3],调节细胞的渗透势在细胞分裂中增加细胞体积等。一方面,可解释在核酸蛋白功能水平上 *NHX* 基因在不同植物中同源性较高(图 7) 的原因,另一方面,*NHX* 蛋白组成的高度保守性可能表明甜土植物与盐生植物 *NHX* 基因功能水平上,也许并不存在显著性差异,而 *NHX* 在木榄耐盐中之所以起一定作用,也许在于 *BgNHX1* 的转录水平、翻译效率或是蛋白调控上存在某种差异。

Na^+/H^+ 逆向转运蛋白催化 Na^+ 的跨膜运输,调节细胞内 pH、细胞体积和细胞质内的 Na^+ 浓度。然而,无论在正常生长条件还是盐胁迫下, Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的活力和表达调控机制都不十分清楚。尽

管已经克隆了一些 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因,但是从不同植物中克隆 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因,有利于在分子水平上研究这些基因的结构和功能,从而研究调节 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白活力的转录及翻译后调控。因此,笔者从盐生植物木榄中分离了 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因。*NHX1* 类基因编码液泡型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白具有较高的同源性,克隆和分析鉴定这些基因,对理解植物耐盐机理是必不可少的,同时对发现更多的突变体和耐盐途径、培育耐盐的转基因植物,也具有一定的实践意义。笔者期望通过后续研究,对 *NHX* 基因转化模式植物进行研究,进一步了解这个 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因在盐胁迫下的表达情况,阐明 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白在植物耐盐性中的作用。

参考文献:

- [1] BOHNERT H J, NELSON D E, JENSEN R G. Adaptations to Environmental Stresses [J]. Am Soc Plant Biol, 1995, 7: 1099 – 1111.
- [2] RAUSCH T, KIRSCH M, LOEW R, et al. Salt Stress Responses of Higher Plants: The Role of Proton Pumps and Na^+/H^+ – Antiporters [J]. Journal of Plant Physiology, 1996, 148: 425 – 433.
- [3] BARKLA B J, PANTOJA O. Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants [J]. Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1996, 47(1): 159 – 184.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] RUIZ J M, BLUMWALD E. Salinity-induced glutathione synthesis in [J]. Brassica napus. Planta, 2002, 22: 214965 – 214969.
- [7] FUKUDA A, NAKAMURA A, TANAKA Y. Molecular cloning and expression of the Na^+/H^+ exchanger gene in Oryza sativa [J]. BBA–Gene Structure and Expression, 1999, 1446(1/2): 149 – 155.
- [8] 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 and Cell Physiology, 2004, 45(2): 146 – 159.
- [9] 肖前谷, 叶妙水, 钟克亚, 等. 北美海蓬子 Na^+/H^+ 逆向运输蛋白基因的克隆及拟南芥转化分析 [J]. 分子植物育种, 2007, 5(5): 619 – 624.
- [10] MALLERY C H, TEAS H J. The Mineral Ion Relations of Mangroves I. Root Cell Compartments in a Salt Excluder and a Salt Secreter Species at Low Salinities [J]. Plant and Cell Physiology, 1984, 25(7): 1123 – 1131.
- [11] MICHELET B, BOUTRY M. The Plasma Membrane H^+ -ATPase: A Highly Regulated Enzyme with Multiple Physiological Functions [J]. Plant physi, 1995, 108: 1 – 6.
- [12] 方孝东, 吴多桂, 林栖凤, 等. 一种适用于盐生植物的 RNA 提取方法 [J]. 海南大学学报: 自然科学版, 1998, 16(4): 311 – 313.
- [13] 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.
- [14] MAKOTO O, SACHIKO F T, ATSUSHI H, et al. Characterization of a Novel Na^+/H^+ Antiporter Gene In*NHX2* and Comparison of In*NHX2* with In*NHX1*, Which is Responsible for Blue Flower Coloration by Increasing the Vacuolar pH in the Japanese Morning Glory [J]. Plant Cell Physiol, 2005, 46(2): 259 – 267.

Cloning of Na^+/H^+ Antiporter Gene from *Bruguiera gymnorhiza*(L.) LAM

GUO Qing-shui, XU Li-xin, YUAN Qian-hua, YU Wei
(Agricultural College, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: According to the homologous sequences from *Atriplex gmelini*, *Populus euphratica*, *Tetragonia tetragonioides*, *Kalidium foliatum*, *Populus tomentosa* and *Salicornia europ*, PCR primers were designed and RT-PCR and RACE were used to amplify *NHX1* DNA fragment from the leaves of *Bruguiera gymnorhiza*. The results indicated that the Bg*NHX1* contains 2 130 bp, including an open reading frame of 1 626 bp, which encodes a predicted polypeptide of 541 amino acids, and there are 12 predicted transmembrane domains. Base on the data that the sequence showed high homologies (>80%) with Na^+/H^+ antiporter genes from *Ricinus communis*, *Populus euphratica*, *Citrus paradisi*, *vitis vinifera*, it was very possible that Bg*NHX1* was competent for Na^+ compartmentation in cells.

Key words: *Bruguiera gymnorhiza*; Bg*NHX1*; Na^+/H^+ antiporter; homologous; transmembrane