

文章编号: 1674-7054(2011)01-0006-08

红海榄液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的克隆与分析

翟金玲, 徐远峰, 马宏伟, 陈旭峰, 黄 惜

(热带生物资源教育部重点实验室; 海南大学 农学院, 海南 海口 570228)

摘 要: 根据液泡膜 Na^+/H^+ 反转运蛋白基因(*NHX1*)的保守序列设计引物, 通过 RT-PCR 扩增得到红海榄 Na^+/H^+ 反转运蛋白基因的 cDNA 片段, 然后采用 cDNA 末端快速扩增法(RACE)得到 *RsNHX1* 基因的全长 cDNA 序列, GenBank 登录号为 FJ627273, 被命名为 *RsNHX1*。该基因序列的长度为 2 094 bp, 包含有 1 个 1 614 bp 的开放阅读框, 编码 538 个氨基酸。该基因生物信息学分析表明: 其氨基酸序列与胡杨 *PeNHX1* (ABY86892) 和拟南芥 *AtNHX1* (AAM34759) 基因的同源性分别为 74% 和 69%, 序列存在较大差异。

关键词: 红海榄; 耐盐; Na^+/H^+ 反转运蛋白基因(*NHX1*)

中图分类号: Q 781

文献标志码: A

盐分是影响植物生长及其产量的重要环境因素, 几乎所有植物的活动都直接或间接地受到盐胁迫的影响。盐胁迫主要是通过渗透胁迫和离子毒害两个过程对植物进行危害^[1-2]。盐胁迫过程复杂且还能引起一系列生理生化变化, 土壤含盐量的增加使得土壤水分亏缺, 导致植物在吸收水分时吸收了过多的盐离子, 给植物带来离子毒害, 特别是 Na^+ 的毒害。土壤含盐量的增加使土壤溶液渗透压不断提高, 植物吸收水分的能力逐渐减小, 进而导致植物脱水。高浓度的 Na^+ 可置换植物质膜和细胞内膜系统所结合的 Ca^{2+} , 膜系统所结合的离子中 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 比增加, 膜的通透性增大, 植物体内活性氧代谢系统的平衡受到影响, 活性氧含量增加, 而活性氧清除剂的(SOD 等)活性及含量降低, 膜脂过氧化或膜脂脱脂作用被启动, 导致膜的完整性被破坏, 差别透性丧失, 电解质及某些小分子有机物大量渗漏, 细胞物质交换平衡被打破, 进而导致一系列生理生化代谢紊乱, 使植物受到伤害。

植物的耐盐机制也是相当复杂的, 虽然不能完全解释植物耐盐的实质, 但有些机制还是研究得相当深入了。植物在受到盐胁迫时, 往往会将盐从细胞质和细胞器中清除出去, 使其集中于液泡中, 这种现象称为盐分的区隔化^[3]。液泡是植物成熟细胞中最大的细胞器, 能贮存营养和代谢产物, 避免有毒溶质对细胞质形成伤害, 有利于细胞与环境间的物质交换。耐盐性植物把 Na^+ 排入液泡, 减少细胞质中 Na^+ 浓度, Na^+ 进入液泡是通过液泡膜上的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白完成的^[4], 液泡中积累的 Na^+ 也可以作为一种渗透调节剂, 适应高盐环境引起的水分胁迫。液泡膜上的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白行使功能时需要依赖液泡膜上的 $\text{H}^+ - \text{PPase}$ 和 $\text{H}^+ - \text{ATPase}$ 产生的跨膜质子电化学势梯度为驱动力, 将胞质 Na^+ 区隔化入液泡中^[5-6]。盐生植物和较耐盐的甜土植物细胞所吸收的 Na^+ , 主要依赖植物液泡膜上 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白来完成。当植物处于盐胁迫的情况下, 大量的膜蛋白($\text{H}^+ - \text{ATPase}$ 类、焦磷酸酶、 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 类、二级转运蛋白及各种通道蛋白)被激活, 并参与重建膜内外的离子平衡。 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白通过 Na^+ 外排和 Na^+ 区隔化来保持植物细胞内的低 Na^+ 水平, 是植物耐盐的关键所在。

目前, 人们从细菌、动物、酵母和高等植物中相继获得了多种的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的基因。1988

收稿日期: 2010-12-18

基金项目: 人力资源与社会保障部 2008 年度高层次留学人才回国工作资助项目; 海南大学 2009 年度科研项目(hd09xm60); 海南省自然科学基金项目(808109)资助

作者简介: 翟金玲(1969-), 女, 黑龙江富裕人, 海南大学农学院讲师。

通信作者: 黄惜, xihuang01@gmail.com

年 Karpel 等^[7] 率先从大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中分离出编码 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的 *ant* 基因。1989 年 Sardet 等^[8] 完成了人类的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的分子克隆。1999 年 Blumwald 等^[9] 首次从拟南芥中克隆得到液泡膜型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因, 并且获得了耐盐的拟南芥、西红柿和油菜的转基因植株。Fukada 等^[10] 从单子叶植物水稻中克隆得到了液泡型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因, 此外, 过量表达该基因的转基因水稻的耐盐性明显增强。将水稻逆向转运蛋白 *OsARP* 转入烟草中, 过量表达液泡 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的转基因烟草具有比野生型烟草高 3 倍的 Na^+/H^+ 交换率, 这说明了液泡 *OsARP* 编码蛋白将 Na^+ 隔离到液泡中, 提高了烟草的耐盐性^[11]。Apse 等^[9] 将拟南芥 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *AtNHX1* 过量表达后, 获得转录有该基因的拟南芥, 转录有该基因的拟南芥在 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液中能够正常生长发育。随着对盐生植物及植物耐盐分子机制研究的日益深入, 许多植物的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因已克隆成功, 包括胡杨 *PeNHX2*^[11]、葡萄 *VvNHX1*^[12]、番杏 *TtNHX1*^[13]、菊芋 *HtNHX1*^[14]、中间偃麦草 *TiNHX1*^[15]、滨藜 *AgNHX1*^[16]、水稻 *OsNHX2*^[17] 等。这些 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因都有着高度保守的氨基吡嗪咪结合位点(即 LFFIYLLPPI)。这些液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因对改造作物的耐盐性发挥着重要的作用, 在农业生产上有着不可估量的应用前景。笔者根据该基因已知的保守序列设计引物进行 PCR 扩增, 并利用 RACE 技术成功克隆出盐生植物红海榄的液泡 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的全长序列, 奠定了今后开发利用红树耐盐基因的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 红海榄 (*Rhizophora stylosa*), 采于海南东寨港红树林保护区。菌种 *Escherichia. coli* DH5 α 为本实验室保存。SuperscriptTM cDNA 第一链合成试剂盒购自 Invitrogen 公司; TaKaRa LA PCRTM Kit Ver. 2.1 购自大连宝生物有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶等购自 TIANGEN 公司; T4-DNA 连接酶、限制性内切酶等分子生物学试剂购自 Fermentas 公司; 其他生化试剂为国产分析纯。引物合成和 DNA 测序均由上海生工生物技术有限公司负责完成。本实验采用的大肠杆菌为 DH5 α , T-载体为 pMD-20 T-载体 (TaKaRa)。

1.2 方法

1.2.1 红海榄叶片总 RNA 的提取 采用改良的 CTAB 法提取红海榄叶片总 RNA。在液氮中研磨叶片, 取约 5 g 叶片粉末倒入预热的 15 mL 提取缓冲液中, 随后加入 15 mL 的苯酚: 氯仿: 异戊醇混合液 (体积比为 25:24:1), 充分混匀, 冰浴 15 min; 4°C $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清, 加入等体积的苯酚: 氯仿: 异戊醇混合液再抽提 1 次, 将上清转入另 1 支离心管, 加入预冷的 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAc (pH5.2) 1/10 体积和预冷的无水乙醇 2.5 倍体积, -20°C 下放置 30 min, 4°C $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 除去上清, 加入 1.5 mL DEPC 水溶解沉淀, 再加入 1.5 mL 预冷的 $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LiCl 溶液, 冰浴 1 h, 4°C $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清。沉淀用 $\varphi = 75\%$ 的冷乙醇洗涤 2 次, 晾干沉淀, 将沉淀溶于水中。紫外分光光度计定量后, 用 $\varphi = 1.4\%$ 的甲醛变性胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.2.2 反转录及利用简并引物的 PCR 扩增 以双链 cDNA 为模板, PCR 扩增红海榄 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 (*RsNHX1*) 的部分片段。PCR 反应体系为 $10 \times \text{PCR Buffer}$ 2.5 μL , dNTP Mix ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.0 μL , *Taq* 酶 (2.5 U) 0.5 μL , 引物 Rs-m1 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 μL , 引物 Rs-m2 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 μL , cDNA 0.5 μL , ddH₂O 20 μL 。简并引物: Rs-m1 (5'-CTTGCWATTGGDGCHATMTT3'); Rs-m2 (5'-GCATCCAT-NCCRACATABA3') (W 代表: A/T; D 代表: A/G/T; H 代表: A/C/T; M 代表: A/C; R 代表 A/G)。PCR 反应结束后, 吸取 5 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 剩余 PCR 产物保存在 -20°C 低温冰箱中。选择 pMD20-T 为连接载体, 向 1.5 mL 试管内分别加入 3.0 μL PCR 产物, 1.0 μL pMD20-T 载体, 5.0 μL 2 $\times$ Solution I, 1.0 μL ddH₂O, 混匀, 16°C 条件下温育 3 h。从 -80°C 冰箱中取出 2 管事先制备的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在冰上冻融, 向其中 1 个管加入 2 μL *RsNHX1* 载体连接产物, 另 1 个管加入 2 μL 的 H₂O 作为对照, 冰上放置 30 min。42 $^\circ\text{C}$ 热击 90 s, 然后冰浴 2~3 min, 再加入 200 μL 的 LB 液体培养基, 37 $^\circ\text{C}$ $190 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 45 min。取适量菌液涂布于 LB 固体培养基中, 37 $^\circ\text{C}$ 倒置培养 16 h 左右, 培养基表面生成蓝、白斑, 白斑为外源基因插入到 T-载体的重组子。挑取白色菌落进行 PCR 检测, 将阳性菌株送去测序。

1.2.3 *RsNHX1* 基因的 RACE 全长克隆 利用大连宝生物公司的 DNase I 酶去除 RNA 中残留的微量的 DNA, cDNA 第 1 链合成按 ClonTech 公司 SMART cDNA Library 操作手册的程序进行。根据 EST 测序结果设计 5'RACE 引物: *RsNHX1* 5'out: 5'-GGCAATGCTTGAGGTGCTAT-3'和 *RsNHX1* 5'in: 5'-AGAGAG-GTCGAAACGCTGG-3'。首先以 Oligo (dT) 和 SMART IV oligonucleotide (5'-AAGCAGTGGTATCAACG-

CAGAGTGGCCATTACGGCCGGG - 3') 和 CDS III/3' PCR Primer (ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG - d(T)30N - 1N) 为引物进行 cDNA 第 1 链合成, 反应产物经乙醇沉淀去除多余的 dNTP 和引物后, 利用 LA PCR™ Kit Ver. 2. 1 进行第 2 链的合成。RACE 扩增是以带接头的双链 cDNA 为模板, 以 *RsNHX1* 特异性引物和接头引物配对进行 2 轮扩增。第 1 轮扩增使用 5' PCR Prime 引物和特异性引物 *RsNHX1* 5' out, 浓度均为 $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在 $25 \mu\text{L}$ 反应体系中进行 PCR 扩增。扩增程序为: 首先, 94°C 预变性 4 min, 接着 94°C 变性 45 s, 52°C 退火 45 s, 72°C 延伸 2 min, 30 个循环后, 72°C 延伸 4 min。PCR 产物稀释 50 倍后, 取 $1 \mu\text{L}$ 按 1: 100 稀释产物作为模板, 使用终浓度均为 $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5' PCR Primer 和 *RsNHX1* 5' in 进行第 2 轮嵌套扩增, PCR 扩增程序为 94°C 预变性 4 min, 94°C 变性 45 s, 58°C 退火 45 s, 72°C 延伸 2 min, 30 个循环后 72°C 延伸 4 min。将扩增产物克隆到 pMD20 - T 载体上, 经 $\varphi = 1.2\%$ 的琼脂糖凝胶电泳后, 选择大小在 500 ~ 700 bp 的片段送上海生工公司测序。*RsNHX1* 3' 全长克隆以 *RsNHX1* 3' out (TCAGCCA-CAGATACCGTTTG) 引物 CDS III/3' PCR Primer 进行第 1 轮扩增, 第 2 轮嵌套扩增以 *RsNHX1* 3' in (CAGT-GTTCTTCTGCGGGATT) 和 CDS III/3' PCR Primer 进行, PCR 产物连接 T-载体进行测序。将已知 EST 序列和 5' 和 3' cDNA 序列进行拼接, 可以预知 *RsNHX1* 的全长 cDNA 序列。为了检验该序列是否正确, 根据该基因 cDNA 5' 端和 3' 端的拼接序列设计全长 cDNA PCR 引物 *RsNHX1*-FL-for (ATGGGTTTCAGTCTGGGT-TCA) 和 *RsNHX1*-FL-rev (TTATTGATTAAACTTTCAGTAGGTGAG) 进行全长 cDNA PCR 扩增。将 PCR 获得的 DNA 片段与克隆载体 pMD20 - T 的连接转化并进行测序, 得到的 DNA 序列再进行生物信息学分析。

2 结果与分析

2.1 *RsNHX1* 基因 cDNA 序列的全长克隆 根据已发表的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因保守序列设计简并引物 Rs-m1 和 Rs-m2, 以红海榄 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增得到 1 个 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的 cDNA 片段 (见图 1A), 该片段长度大约 500 bp, 通过与 pMD20 - T 载体连接, 转化大肠杆菌 *DH5 α* , 进行菌液 PCR 鉴定后进行测序, 测序表明克隆插入片段的 cDNA 大小为 542 bp。用 BLAST 比对发现该 cDNA 片段与多种植物的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因有很高的同源性, 其中与胡杨 (*Populus euphratica*) 的同源性高达 76%, 这表明 PCR 获得的 cDNA 片段是红海榄 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的一部分。

为了分离 *RsNHX1* 基因 cDNA 5' 端序列, 根据 cDNA 部分片段设计特异性引物 Rs - rev - 1 和接头引物 SEQ ID No1 进行 PCR 扩增, 扩增产物经 $w = 1.2\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增出 750 ~ 1 000 bp 的弥散带, 将扩增的 PCR 产物回收, 连接到 pMD20 - T 载体上, 转化到大肠杆菌 *DH5 α* , 进行菌液 PCR 鉴定 (见图 1B), 测序分析结果表明, 克隆插入片段的长度为 809 bp。

为了分离 *RsNHX1* 基因 cDNA 3' 端序列, 根据 cDNA 部分片段设计特异性引物 *RsNHX1* - 3' - out 和 *RsNHX1* - 3' - in, 先利用接头引物 SEQ ID No2 和特异性引物 *RsNHX1* - 3' - out 进行第 1 轮 PCR 扩增反应, 再利用引物 *RsNHX1* - 3' - in 和 cDNA Lbr - rev 进行第 2 轮的 PCR 扩增反应 (见图 1C), 对第 2 轮 PCR 扩增产物进行切胶回收, 连接到克隆载体 pMD20 - T 载体上, 转化大肠杆菌 *DH5 α* , 进行菌液 PCR 鉴定, 筛选重组子进行测序, 分析结果表明, 克隆插入片段大小为 1 125 bp。

将获得的 *RsNHX1* 基因 cDNA 部分片段、5' 端序列和 3' 端序列, 将 3 个片段拼接起来, 得到 1 个长度为 2 094 bp 的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因, 根据拼接的全长 cDNA 序列的编码区设计特异性引物进行全长 cDNA 的 PCR 扩增。得到 1 个全长约为 1 600 bp 的 cDNA (见图 1D), 进行序列测定。

2.2 *RsNHX1* 基因的生物信息学分析 分析 *RsNHX1* 基因 cDNA 全长序列, 可以发现该序列包含 1 614 bp 的开放阅读框, 编码 1 个长 538 个氨基酸的多肽, 以及 135 bp 的 5' UTR 和 364 bp 的 3' UTR 序列 (见图 2), 该序列已经在 GenBank 登录, 登录号为 FJ627273。

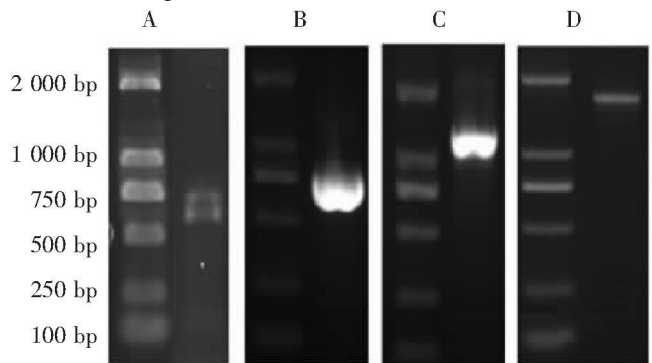


图 1 红海榄 *RsNHX1* 基因全长 cDNA 序列的 RACE 克隆 左边为 D2000 DNA marker; A: Na^+/H^+ 逆向转运蛋白简并引物 PCR 扩增片段; B: 5' RACE 扩增片段; C: 3' RACE 扩增片段; D: 全长 cDNA 编码区 PCR 扩增片段

1 ccagtgaattcgcgctcgggtaccgaggatccaagattaagcagtggtatcaacgcagag
63 tggcctttacggccgggaagaagacgagctacagttttcgaaaaggtaggctacggg
123 ggctgcgattggaggatgggtttcagctcgtgggtcaattgtttcaagattgggtggccca
1 M G F S L G S I V S R L V A P
183 ttggaggctgatgaagcctctgttactctgttactctgtttgtgcactcctctgtgct
16 L E A D E A S V H S V T L F V A L L C A
243 tgcgtactgattggtaacttcttgagaagaatcgctgggttaacgagtcactactgcc
36 C V L I G Q L L E K N R W V N E S I T A
303 ctgcacatcggtctcttactgggattattatcctgttaagcaccggatggagaagctca
56 L A I G L F T G I I I L L S T G W R S S
363 cgcataattgttatttagtgaagaacttttcttcatatattcttgcacctatcatattc
76 R I L L F S E E L F F I Y L L P P I I F
423 aatgctgggtccaggtaaaaaagaagcagttttccggaactttataacgattgtgttg
96 N A G F Q V K K K Q F F R N F I T I V L
483 tttgtgctgtggggactttaatatcctttgccatagtagttaggttcggcgatgatt
116 F G A V G T L I S F A I V S L G S A Q I
543 ttcagcaagatggatgtgggtctcttgaaacagtggtattcttgcacttgggcaatc
136 F S K M D V G L L E T V D Y L A L G A I
603 ttttcagccacagataccgtttgcacattacagatccttagtcaggaagagacacctta
156 F S A T D T V C T L Q I L S Q E E T P L
663 ctgtacagtctagtctttggggaaggtgtggtgaatgacgccactgctgtgtgtactattc
176 L Y S L V F G E G V V N D A T A V V L F
723 aatgcaatccagcgttttcacacctctcataccacctcaagcattgccatgcaattgttt
196 N A I Q R F D L S H T T S S I A M Q L F
783 ggcaatttcttatatctgttactacaagcacattgcttgggtggcggttggtgttg
216 G N F L Y L F T T S T L L G V A V G L L
843 agtgcttacatcataaagaagctttactttggcaggcactccactgatcgtgaagtggct
236 S A Y I I K K L Y F G R H S T D R E V A
903 ttgatgatactcatggcgtatctttcatatatgatagctgaattattcaatttaagtggc
256 L M I L M A Y L S Y M I A E L F N L S G
963 attctcacagtgttcttctgcgggattgccatgtccactacacctggcataatgtaact
276 I L T V F F C G I A M S H Y T W H N V T
1203 gaaagctcaagagtcacaacaagacatgcttttgcaacattgtcatttatatcagagatt
296 E S S R V T T R H A F A T L S F I S E I
1083 ttcattttcctttatgttggtatggatgccttgacattgagaagtggaaatttgtgagc
316 F I F L Y V G M D A L D I E K W K F V S
1143 aaaagtcctgggaagtcacttgggtgtcagttctatactgcttggactaactctgattgga
336 K S P G K S L G V S S I L L G L T L I G
1203 agagcagcttctgtatttcccttatctttcatatccaatctgacaagaagtctcagact
356 R A A S V F P L S F I S N L T K K S Q T
1263 gacaagattgggttaaggcagcaggtcattatctggtgggctggacttatgagaggagct
376 D K I G L R Q Q V I I W W A G L M R G A
1323 gtatctatggcacttgcataataaagtttactatgtcagggcatactcaattgcaagga
396 V S M A L A Y N K F T M S G H T Q L Q G
1383 gatgcaatcttgatcactagcaccatcacagttgttctctttagtactgtggtattgga
416 D A I L I T S T I T V V L F S T V V F G
1443 ttggcgaccaagcctcttataaggtggtgttaccgcagaaacactcgagtggcatggtg
436 L A T K P L I R W L L P Q K H S S G M V
1503 tcttctggcctttgacgagtcgaagtcattgttctacctcttattgcaaacggacaagat
456 S S G F D E S K S I V L P L I A N G Q D
1563 gcagaatctgagggcggtggaagtaatgtaacgcgtccaattagctctacgaattgctcctg
476 A E S E G G G S N V T R P I S L R M L G
1623 tctacgccaaccaatactgtccactattgttggcggaatttgatgatgccttcatgcgt
496 S T P T N T V H Y C W R K F D D A F M R
1683 ccggtgtttgggtgggagggtattgcaccttatcatcctggctcacctactgaaagtttt
516 P V F G G R G F A P Y H P G S P T E S F
1743 attcaataatggcaacaagaagcgcatactagattgtaaatgctgggaatatgagggtata
536 I Q -
1803 tattccaacatcagaggattcaaaggttcattttgtgtaaatagataggagtaataat
1863 tgagattggaggcttccactgattattaggcggaatatgcctgacgcccaggaaaaagtc
1923 gtattaattttatttggcaaatgtgataattgggtaattacacgcacaaaaagaaaaaaa
1983 aaaaaaacatgtcggccgctcaatccatatgactagtagatcctctagatcgacct
2043 gcaggcatgcaagcttccccgtatagtgtcacctaaatagcttggcgtaat

图 2 红海榄 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因 cDNA 全长核苷酸序列和推测的氨基酸序列
方框部分是氨基吡嗪嘧的结合位点

将克隆所得的红海榄 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白氨基酸序列与 GenBank 中已发表的氨基酸序列进行 BLAST 比对,结果显示 *RsNHX1* 编码蛋白与胡杨 (*Populus euphratica*)、葡萄 (*Vitis vinifera*)、冰叶日中花

(*Mesembryanthemum crystallinum*)、番杏(*Tetragonia tetragonioides*)、菊芋(*Helianthus tuberosus*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白氨基酸序列具有很高的同源性,分别为 74%, 74%, 72%, 72%, 73%, 69% (见图 3)。

VvNHX1	M.GFELGSMV.M.KL.GMVSTSDISSVVS.MNLFVALLC.ACTVVDHLEEYRW.NESITALAL	58
RsNHX1	M.GFSLGSI.VS.RIVAPLE.ADEASVHSVTLFVALLC.ACVLICQLBKNRWVNESITALAI	58
Consensus	M L D SV LFVALLC C LE RW NESITAL	
PeNHX1	GVG.....TGIVILLISGG.KSSRLV.FSE.LFFIYLLPPIIFNAGFQVKKQFFR.FMTIILFGA	118
McNHX1	GLA.....TGIVILLISGG.KSSHLV.FSE.LFFIYLLPPIIFNAGFQVKKQFFR.FITIIIVFGA	119
AtNHX1	GLG.....TSVTILLISKG.KSSHLV.FSE.LFFIYLLPPIIFNAGFQVKKQFFR.FVTIMIFGA	115
VvNHX1	GLC.....TGIIILLITRG.KSSHILV.FSE.LFFIYLLPPIIFNAGFQVKKQFFR.FMTIMIFGA	118
RsNHX1	GL.....FTGIILLITGWRSSRILLFSE.LFFIYLLPPIIFNAGFQVKKQFFR.FITIIIVFGA	123
Consensus	G T ILL G SS L FSE LFFIYLLPPIIFNAGFQVKKQFFR F TI FGA	
PeNHX1	AG.....TLCCATISIGAMQIFBKMDIGPLD.IGDYLAIGAIFAATDSVCTLQVLSQDDTPLLVS	178
McNHX1	LG.....TLVSFTIISIGAMEFFKNDIGSLE.LGDYLAIGAIFAATDSVCTLQVLSQDDTPLLVS	179
AtNHX1	VG.....TLISCTIISIGVTFQFKKLDIGTFD.MGDYLAIGAIFAATDSVCTLQVLSQDDTPLLVS	175
VvNHX1	IG.....TXISFGIISIGATHFFKMKIGSXD.IEDXLAGXIFSATDSVCTLQVLSQDDTPLLVS	178
RsNHX1	VG.....TLISFAIYSIGSAQIFSKMDVGLLETVDYLAIGAIFAATDSVCTLQVLSQDDTPLLVS	188
Consensus	G T I S G F K G D LA G IF ATD VCTLQ L Q TPLLVS	
PeNHX1	LV.....FGEGVNDATSVVIFNAIQSFDLITINAVIAWEFVRNFLYLFITSTMLGVLTGLVSAYI	239
McNHX1	LV.....FGEGVNDATSVVIFNAIQNFDLTHIDHRIAFKFAENFLYLFITSTMLGAITGLLSAYI	240
AtNHX1	LV.....FGEGVNDATSVVIFNAIQSFDLITLNHEAFAHLLCNFLYLFITSTMLGAATGLISAYV	236
VvNHX1	LV.....FGEGVNDATSVVIFNAIQSFDLSHIDSSIALQFIG.NFLYLFITSTMLGVFAGLLSAYI	239
RsNHX1	LV.....FGEGVNDATSVVIFNAIQRFDLSTITSSIAMQLFENFLYLFITSTMLGVAVGLLSAYI	254
Consensus	LV FGEGVNDAT VV FNAIQ FDL A NFLYLF ST LG GL SAYI	
PeNHX1	I.....KKLYFGRHSTDREVALMILMAYLSYMAELFYLSCILTVFFCGIIMSHYTWHNVTSSRV	300
McNHX1	I.....KKLYFGRHSTDREVALMILMAYLSYMAELFYLSCILTVFFCGIIMSHYTWHNVTSSRV	301
AtNHX1	I.....KKLYFGRHSTDREVALMILMAYLSYMAELFDLSCILTVFFCGIIMSHYTWHNVTSSRI	297
VvNHX1	I.....KKLYFGRHSTDREVALMILMAYLSYMAELFYLSCILTVFFCGIIMSHYTWHNVTSSRV	300
RsNHX1	I.....KKLYFGRHSTDREVALMILMAYLSYMAELFNLSGILTVFFCGIIMSHYTWHNVTSSRV	320
Consensus	I KKLYFGRHSTDREVA M LMAYLSYM AELF LS ILTVFFCGI MSHYTWHNVTSSRV	
PeNHX1	TTKHAFATLSFVNEIFIFLYVGM DALDIKWRVFS DSPGTSVAVSSILLGLVMVGRAAFV	360
McNHX1	TTKHAFATLSFVNEIFIFLYVGM DALDIKWRVFS DSPGTSVAVSSILLGLMLGRAAFV	361
AtNHX1	TTKHAFATLSFVNEIFIFLYVGM DALDIKWRVFS DSPGTSVAVSSILLGLVMVGRAAFV	357
VvNHX1	TTKHAFATLSFVNEIFIFLYVGM DALDIKWRVFS DSPGTSVAVSSILLGLVVERAAAFV	360
RsNHX1	TTKHAFATLSFVNEIFIFLYVGM DALDIKWRVFS DSPGTSVAVSSILLGLTIGRAAFV	386
Consensus	TT H FATLSF E FIFLYVGM DALDI KW VS PG S VS IL GL RAA V	
PeNHX1	FPLSFVSNLKKSPHEKIGFRQCFI.IWWAGLMRGAVSMALAYNKFTSAGHTNLRANAIMI..	420
McNHX1	FPLSFVSNLKKSPHEKIGFRQCFI.IWWAGLMRGAVSMALAYNKFTSAGHTNLRANAIMI..	421
AtNHX1	FPLSFVSNLKKSPHEKIGFRQCFI.IWWAGLMRGAVSMALAYNKFTSAGHTNLRANAIMI..	417
VvNHX1	FPLSFVSNLKKSPHEKIGFRQCFI.IWWAGLMRGAVSMALAYNKFTSAGHTNLRANAIMI..	420
RsNHX1	FPLSFVSNLKKSPHEKIGFRQCFI.IWWAGLMRGAVSMALAYNKFTSAGHTNLRANAIMI..	452
Consensus	FPLSF N KK K Q IWW GLMRGAVSMALAYN FT GHT AI I	
PeNHX1	...TSTITVVLSTVVFGLTKPLISILLPHK.YQS.RLSFS..DPATPKSFTVPLLGEGQD.	478
McNHX1	...TSTISVVLSTVVFGLTKPLISILLPHK.YQS.RLSFS..DPATPKSFTVPLLGEGQD.	479
AtNHX1	...TSTITVVLSTVVFGLTKPLISILLPHK.YQS.RLSFS..DPATPKSFTVPLLGEGQD.	470
VvNHX1	...TSTISVVLSTVVFGLTKPLISILLPHK.YQS.RLSFS..DPATPKSFTVPLLGEGQD.	476
RsNHX1	...TSTITVVLSTVVFGLTKPLISILLPHK.YQS.RLSFS..DPATPKSFTVPLLGEGQD.	511
Consensus	TSTI V L STVVFGL TKPL LLP S S K PL	
PeNHX1	.S.LD..DL.GG.RD....IPRPSSRALTTPTHTVHYWRFQFDFMRPVFGGRGFVPFVPGS	533
McNHX1	.S..ET.DL.GNQDSTDRIHGRPTSLRM.LNAPTHTVHYWRFQFDFMRPVFGGRGFVPFVPGS	540
AtNHX1	.SFIE..PS.QN.HN....VPRPDSIRGELTRPTHTVHYWRFQFDFMRPVFGGRGFVPFVPGS	526
VvNHX1	.T..ET.DQ.AS.QN....VPRPDSIRGELTRPTHTVHYWRFQFDFMRPVFGGRGFVPFVPGS	531
RsNHX1	ES..E....CGGSN....VTRPTSLRM.LNAPTHTVHYWRFQFDFMRPVFGGRGFVPFVPGS	570
Consensus	RP S R L P TVH WR FD FMRPV FGGRGF P PGS	
PeNHX1	PTERNPPQN..QWH	545
McNHX1	PTEQS.TNNL.N.HSTEST	556
AtNHX1	PTERNPP.DL.S.KA	538
VvNHX1	PTE...P.NLGQWR	541
RsNHX1	PTE...S.FI.Q	577
Consensus	PTE	

图 3 不同植物来源的液泡型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白氨基酸序列的同源性比较

胡杨 *PeNHX1* (ABY86892); 冰叶日中花 *McNHX1* (CAN99589); 拟南芥 *AtNHX1* (AAM34759);

葡萄 *VvNHX1* (AAV36562); 红海榄 *RsNHX1*

利用 DNAMAN 软件对来源于胡杨、冰叶日中花、拟南芥、葡萄、红海榄的液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白序列进行同源性比较分析,结果(见图 3)表明,在 *RsNHX1* 中有高度保守的 LFFIYLLPPI 序列,该序列在哺乳动物中被鉴定是真核生物

Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白抑制剂氨氯吡啶的结合位点。

从 GeneBank 中查找一些有代表性的 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白的氨基酸序列,利用 DNAMAN 软件对不同来源的 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(见图 4)表明,*RsNHX1* 编码蛋白与液泡型 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白如葡萄 *VvNHX1*、滨藜 *AgNHX1*、拟南芥 *AtNHX1* 编码蛋白的亲缘关系较近,而与质膜型 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白如拟南芥 *AtSOS1*、小盐芥 *ThSOS1*、胡杨 *PeSOS1* 编码蛋白的亲缘关系较远。滨藜 *AgNHX1*、拟南芥 *AtNHX1* 等蛋白被定位于液泡膜上,主要功能是将细胞质的 Na⁺ 逆浓度梯度转运到液泡区隔化,以维持细胞质较高的 K⁺/Na⁺,减少胞质因过多的 Na⁺ 对细胞生命过程的伤害。*PeSOS1* 等被定位在质膜上,其主要功能是介导 Na⁺ 外排。蛋白序列比对和系统发育分析都说明 *RsNHX1* 可能位于液泡膜上,执行 Na⁺ 的区隔化。

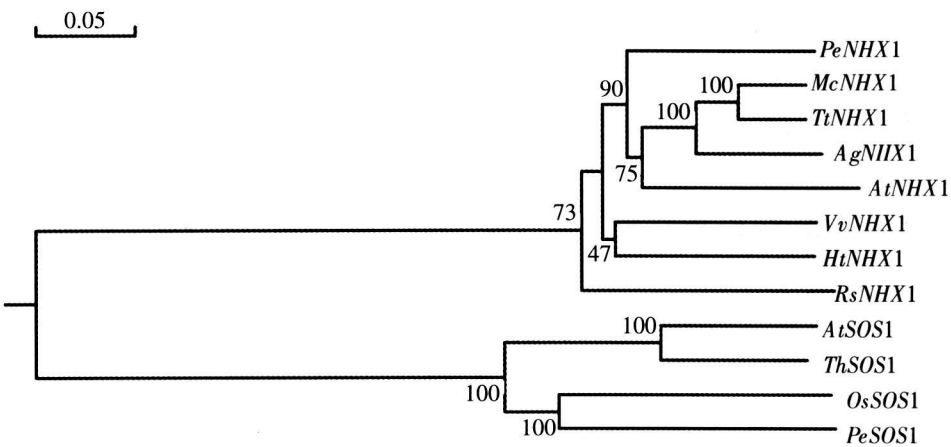


图 4 *RsNHX1* 逆向转运蛋白的系统发育分析

胡杨 *PeNHX1* (ABY86892); 冰叶日中花 *McNHX1* (CAN99589); 番杏 *TtNHX1* (AAQ08988); 滨藜 *AgNHX1* (BAB11940); 拟南芥 *AtNHX1* (AAM34759); 葡萄 *VvNHX1* (AAV36562); 菊芋 *HtNHX1* (ABM17091); 红海榄 *RsNHX1*; 拟南芥 *AtSOS1* (NM126259); 盐芥 *ThSOS1* (EF207775); 水稻 *OsSOS1* (AY785147); 胡杨 *PeSOS1* (DQ517530)

2.3 *RsNHX1* 基因编码的氨基酸序列结构性分析 利用 Espasy 的 ProtScale 程序预测红海榄逆向转运蛋白氨基酸序列的疏水性/亲水性,结果(见图 5)表明,多肽链第 48 位的色氨酸具有最低的分值 -2.211,第 35 位的丙氨酸具有最高的分值 3.189。依据氨基酸分值越低亲水性越强和分值越高疏水性越强(参考 ProtScale 软件)的规律,可以看出,在第 48 位的色氨酸亲水性最强,第 35 位的丙氨酸疏水性最强。总的来

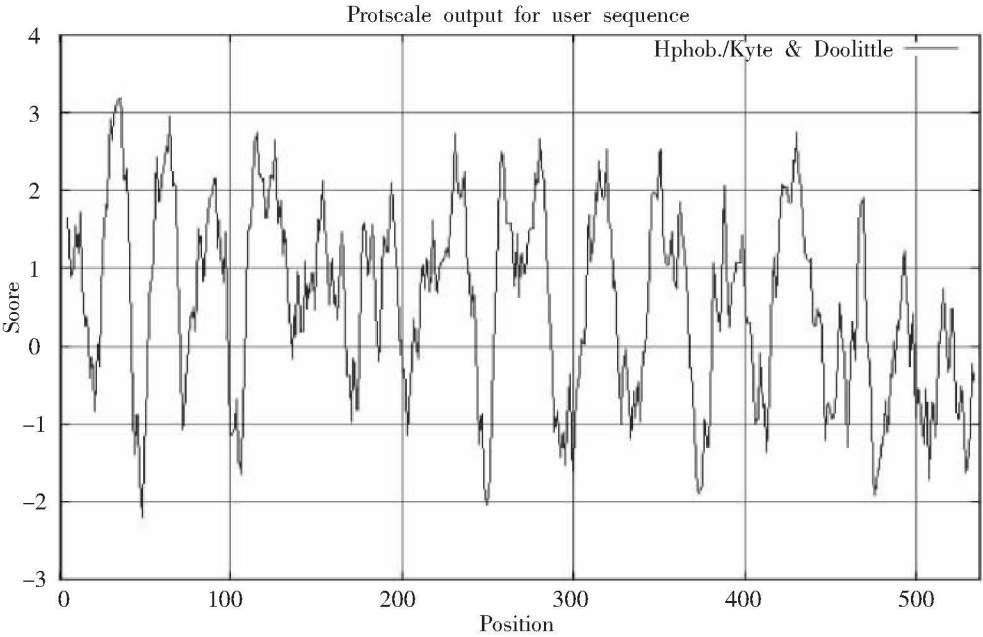


图 5 红海榄 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白的疏水性和亲水性分析

看,疏水性氨基酸多于亲水性氨基酸,总体上可认为红海榄 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白是疏水性蛋白。但疏水和亲水性氨基酸有规律地间歇性排列,表明该逆向转运蛋白具有跨膜蛋白的特征。通过应用软件 TMHMM(www.cbs.dtu.dk/services/)进行跨膜性分析,结果表明, *RsNHX1* 逆向转运蛋白可能含有 12 个疏水区域,其中 10 个跨膜(见图 6),另外 2 个可能与膜相关,但并不跨膜。这与中间偃麦草 *TiNHX1* 基因编码的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白具有 12 个跨膜区域有一定的差别。

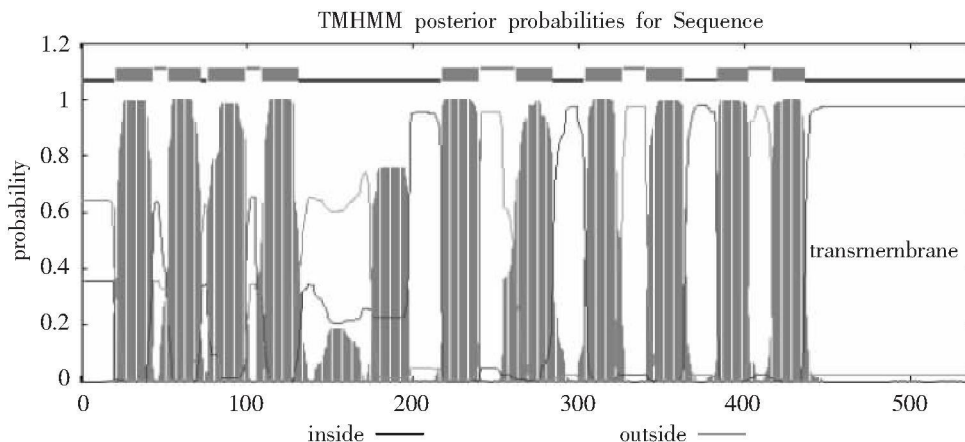


图 6 红海榄 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白跨膜性分析

3 讨 论

Na^+/H^+ 逆向转运蛋白转运 Na^+ , 调节细胞内的 pH 值、细胞体积和细胞质内的 Na^+ 浓度。从目前已经发表的文献看,转化液泡膜 Na^+/H^+ 反转运蛋白基因(*NHX1*)获得的植株耐盐效果最为明显,最具耐盐育种开发潜力,是目前已知的最重要的植物耐盐基因^[18]。但值得注意的问题是,液泡膜 Na^+/H^+ 反转运蛋白基因首先在拟南芥上克隆,基因的转化研究也大多都采用拟南芥 *AtNHX1*。然而,拟南芥本身并不是耐盐植物(halophyte),耐盐植物是否具有与拟南芥一样的耐盐机制,还是采取与拟南芥完全不同的耐盐机制目前还不清楚,如果是前者,那么耐盐植物就应该具有与拟南芥相似的耐盐同源基因,而且盐生植物的耐盐基因一定具有特殊的结构和功能域,使之赋予植物更多的耐盐性状;如果是后者,那么在拟南芥上的耐盐机理研究和耐盐基因克隆对耐盐育种没有太多的指导性。本研究克隆的红树 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因,为比较耐盐植物和非耐盐植物耐盐相关基因的耐盐性状差异打下了基础。

通过 NCBI 数据库同源性比对,发现 *RsNHX1* 编码蛋白与植物中已经克隆的液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的序列同源性在 60% ~ 70% 左右。对 *RsNHX1* 的氨基酸序列分析表明, *RsNHX1* 编码的蛋白质与液泡型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白如葡萄 *VvNHX1*、滨藜 *AgNHX1*、拟南芥 *AtNHX1* 的亲缘关系较近,而与质膜型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白如拟南芥 *AtSOS1*、小盐芥 *ThSOS1*、胡杨 *PeSOS1* 的序列差别较远。Hamada 等^[16] 人研究发现,液泡型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因间具有高度同源性,质膜型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因间也具有高度同源性,但二者之间同源性非常低。系统发育分析同样也证明,笔者克隆的 *RsNHX1* 与液泡膜型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的亲缘关系比较近,而与质膜型亲缘关系比较远,这些结果均表明, *RsNHX1* 是液泡型的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因,其编码蛋白可能具有将 Na^+ 转运至液泡,降低细胞质 Na^+ 浓度的功能。

与其他同源植物进行蛋白同源性比较分析发现,红海榄的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的氨基酸序列存在着 1 个相当保守的特殊序列 LFFIYLLPPI,该序列在哺乳动物中被鉴定是真核生物 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白抑制剂氨氯吡嗪的结合位点,这些区域在 Na^+ 与 H^+ 交换中可能起到重要作用^[19]。然而,也存在非同源性区域,例如, N - 末端和 C - 末端。高亲水性的 C - 末端拥有相似氨基酸的程度较低,另外,该区域是处于细胞质环境中^[20]。Yamaguchi 等^[21] 通过蛋白酶保护实验证明拟南芥的液泡型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白含有 12 个跨膜结构域。通过软件分析, *RsNHX1* 基因所编码的蛋白质的氨基酸也具有 12 个跨膜区段,与已报道的动植物 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的跨膜区域数目(10 ~ 12)一致。植物耐盐性状是一种典型的数量性状,其分子机制十分复杂,涉及多种基因和大分子的协同作用。以前研究认为,转化单一的基因不

能提高植物的耐盐性^[22]。但发表的研究论文结果表明,转化单一的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因也能够明显提高作物的耐盐性^[9,16]。因此,植物液泡型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因在培育耐盐作物和林木新品种方面将有较好的应用前景。

参考文献:

- [1] UDDIN M I, QI Y, YAMADA S, et al. Overexpression of a new rice vacuolar antiporter regulating protein *OsARP* improves salt tolerance in tobacco[J]. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(6):880–890.
- [2] TESTER M, DAVENPORT R. Na^+ Tolerance and Na^+ Transport in Higher Plants[J]. *Annals of Botany*, 2003, 91(5):503–527.
- [3] NIU X, BRESSAN R A, HASEGAWA P M, et al. Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments[J]. *Plant Physiology*, 1995, 109(3):735–742.
- [4] PARDO J M, QUINTERO F J. Plants and sodium ions: keeping company with the enemy[J]. *Genome Biology*, 2002, 3(6):1017–1021.
- [5] 陈敏,李平华,王宝山. Na^+ 转运体与植物的耐盐性[J]. *植物生理学通讯*, 2007, 43(4):617–622.
- [6] BLUMWALD E. Sodium transport and salt tolerance in plants[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2000, 12(4):431–434.
- [7] KARPEL R, OLAMI Y, TAGLICHT D, et al. Sequencing of the gene *ant* which affects the Na^+/H^+ antiporter activity in *Escherichia coli*[J]. *J Biol Chem*, 1988, 263(21):10408–10414.
- [8] SARDET C, FRANCHI A, POUYSSEGUR J. Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na^+/H^+ antiporter[J]. *Cell*, 1989, 56(2):271–280.
- [9] MARIS P, APSE E. Salt Tolerance Conferred by Overexpression of a Vacuolar Na^+/H^+ Antiport in *Arabidopsis*[J]. *Science*, 1999, 285(5431):1256–1258.
- [10] 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 Cell Physiol*, 2004, 45(2):146–159.
- [11] 张霞,曾幼玲,李金耀,等. 胡杨 Na^+/H^+ 反向运输载体(*PeNHX2*)基因的克隆与序列分析[J]. *生物技术*, 2006, 16(3):9–13.
- [12] HANANA M, CAGNAC O, YAMAGUCHI T, et al. A grape berry (*Vitis vinifera* L.) cation/proton antiporter is associated with berry ripening[J]. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(6):804–811.
- [13] 吕慧颖,李银心,陈华,等. 番杏 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的克隆及特性分析[J]. *高技术通讯*, 2004, 14(11):26–31.
- [14] 严一诺,孙淑斌,徐国华,等. 菊芋 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的克隆与表达分析[J]. *西北植物学报*, 2007, 27(7):1291–1298.
- [15] 张耿,王赞,关宁,等. 中间偃麦草 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的分钟克隆及生物信息学分析[J]. *遗传*, 2007, 29(10):1263–1270.
- [16] HAMADA A, SHONO M, XIA T, et al. Isolation and characterization of a Na^+/H^+ antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelini*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2001, 46(1):35–42.
- [17] QIU Sheng-ping, ZHOU Guo-an, LU Ju-fei, et al. Molecular Cloning and Expression Analysis of a New Vacuolar Na^+/H^+ Antiporter Gene in Rice[J]. *Chinese J Rice Sci*, 2006, 20(2):119–124.
- [18] ZHANG H X, HODSON J N, WILLIAM J P, et al. Engineering salt-tolerant *Brassica* plants: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(22):12832–12836.
- [19] DARLEY C P, VAN WUYTSWINKEL O C, VAN DER WOUDE K, et al. *Arabidopsis thaliana* and *Saccharomyces cerevisiae* *NHX1* genes encode amiloride sensitive electroneutral Na^+/H^+ exchangers[J]. *Biochem J*, 2000, 351(1):241–249.
- [20] 关宁,李聪,王涌鑫,等. 毛偃麦草 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的分子克隆及生物信息学分析[J]. *分子植物育种*, 2009, 7(1):169–176.
- [21] YAMAGUCHI T A M, SHI H, BLUMWALD E. Topological analysis of a plant vacuolar Na^+/H^+ antiporter revealed a luminal C terminal that regulates antiporter cation selectivity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100:12510–12515.
- [22] ZHANG H X, BLUMWALD E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit[J]. *Nat Biotech*, 2001, 19(8):765–768.

(下转第20页)

- [19] 李启辉. 以天蚕素为基础的抗菌肽设计及其基因表达[D]. 无锡: 江南大学, 2004.
- [20] MITTA G, HUBERT F, NOËL T, et al. Myticin, a novel cysteine – rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. *Europena Journal of Biochemistry*, 1999, 265: 71 – 78.
- [21] 杨绒, 陈松林. 水产动物抗菌肽的研究进展[J]. *生物技术通报*. 2005(2): 1 – 5.
- [22] BOMAN H G. Infection and Immunity: I. Characteristics of an inducible cell – free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynthiaipupae*[J]. *Infection and Immunity*, 1974, 10: 136 – 145.
- [23] 赵建民. 扇贝大防御素和 G 型溶菌酶的基因克隆与重组表达[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2006.
- [24] 赵洁, 孙燕, 李晶, 等. 动物抗菌肽的抗病毒活性[J]. *医学分子生物学杂志*, 2008, 5 (5): 466 – 469.
- [25] 李鹏, 仇妍虹, 李膈, 等. 家蝇防御素抗菌肽 Des – hf 突变体的抑菌活性[J]. *农业生物技术学报*, 2008, 16(1): 85 – 89.
- [26] 李思明. 鳄鱼抗菌肽的分离纯化和抗菌效果研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2006.
- [27] 李晔, 苏秀榕, 李太武, 等. 泥螺抗菌肽的初步研究[J]. *台湾海峡*, 2005, 24(2): 145 – 149.

Optimization of the Preparation Methods for Anti microbial Peptides from *Pinctada martensii*

YU Wen-yuan, WANG Shifeng, XIE Zhen-yu, CHEN-zhao, ZHOU Yong-can

(Key Laboratory of Tropical Aquatic Biotechnology of Hainan Province; College of Marine Sciences, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: The different processing methods were performed to extract the crude antimicrobial peptides extraction from the mantle and gill tissues of *Pinctada martensii*, and the activities of crude extractions were compared. The result suggested that the activities of crude extractions were not changed when *Pinctada martensii* was induced by *Streptococcus agalactiae* with 1.0×10^6 cfu $\cdot$ mL⁻¹ for 14 h; the antibacterial activity of crude extractions homogenated by IKAT-18 homogenate machine was higher than that by the tissue grinder and the agate mortar; the antibacterial activity against *Vibrio alginolyticus* was significantly improved when the extraction was heated at 100 °C for 10 min; and the antibacterial activity against *V. alginolyticus* was significantly reduced when the crude extractions of the mantle tissue from *P. martensii* was frozen and thawed repeatedly.

Key words: *Pinctada martensii*; antimicrobial peptides; isolation; optimization

(上接第 13 页)

Cloning and Sequence Analysis of Gene Encoding Vacuolar-type Na⁺/H⁺ Antiporter of *Rhizophora stylosa* (RsNHX1)

ZHAI Jin-ling, XU Yuan-feng, MA Hong-wei, CHEN Xu-feng, HUANG Xi

(Key Laboratory of Tropic Biological Resources of Ministry of Education/Institute of Bio Science and Technology,
Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Based on consensus sequence of vacuolar-type Na⁺/H⁺ antiporter genes (*NHX1*), the primers were designed to isolate a cDNA fragment of *NHX1* from *Rhizophora stylosa* by RT-PCR. The full length cDNA was obtained by rapid amplification of cDNA ends (RACE), and the gene was termed as *RsNHX1*. This gene is 2 094 bp in length and contains one open reading frame of 1 614 bp, encoding 538 amino acid residues. Accession number of GenBank is FJ627273. Bioinformatics analysis results showed that the amino acid sequence of the *RsNHX1* gene is 74% and 69% similar with that of *PeNHX1* (ABY86892, *Populus euphratica*) and *AtNHX1* (AAM34759, *Arabidopsis thaliana*), respectively. There are significant differences among these sequences.

Key words: *Rhizophora stylosa*; salt-tolerance; Na⁺/H⁺ antiporter genes (*NHX1*)