

# SeNHX1 表达蛋白的亚细胞定位及其对 $\text{Na}^+$ 的解毒功能

杨小玲<sup>1,3</sup> 季 静<sup>2</sup> 王 罡<sup>2</sup>

(1. 天津大学 化工学院, 天津 300072; 2. 天津大学 农业与生物工程学院, 天津 300072; 3. 天津市农业科学院, 天津 300192)

**摘要:**将带有目的基因 *SeNHX1*、*GFP* 的酵母表达载体 pYES2-*SeNHX1*、pYES2-*GFP*、pYES2-*SeNHX1-GFP* 分别导入 nhx1 酵母缺失型菌株 296H, 用共聚焦荧光显微镜观察 SeNHX1 表达蛋白的亚细胞定位; 通过菌株在含盐培养基中生长状况研究该蛋白对  $\text{Na}^+$  的解毒功能。结果表明, 296H(pYES2-*GFP*) 菌株的绿色荧光弥散于整个细胞质, 而 296H(pYES2-*SeNHX1-GFP*) 菌株的绿色荧光包围于液泡膜的一圈, 因此, SeNHX1 蛋白定位于液泡膜; 296H(pYES2-*GFP*) 和 296H 缺陷型菌株在含 0.5 mol/L NaCl 的培养基中生长受到抑制; 带有 *SeNHX1* 目的基因的转化子比以上 2 种菌株在含盐培养基中生长更快, 表明 *SeNHX1* 基因可恢复 nhx1 酵母突变体  $\text{Na}^+$  的解毒功能。SeNHX1 疏水性分析、氨基酸序列分析、亚细胞定位及其对  $\text{Na}^+$  的解毒功能结果说明, *SeNHX1* 基因是可提高生物体耐盐性的液泡膜  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白基因。

**关键词:** *SeNHX1* 基因; 酵母; 表达载体; GFP 绿色荧光; 耐盐性; 亚细胞定位

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)05-008-04

## SeNHX1 Protein Localization and Its Function of $\text{Na}^+$ -detoxification

YANG Xiao-ling<sup>1,3</sup> JI Jing<sup>2</sup> WANG Gang<sup>2</sup>

(1. Chemistry Engineering College, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Agricultural Bio-engineering College, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 3. Tianjin Academy of Agriculture Sciences, Tianjin 300192, China)

**Abstract:** Yeast expression vector pYES2-*SeNHX1*, pYES2-*GFP*, pYES2-*SeNHX1-GFP* were introduced into the nhx1 mutant strain 296H. The protein localization of SeNHX1 was observed by confocal laser scanning microscope and the function of  $\text{Na}^+$ -detoxification was studied by growth of 296H with different expression vector in medium containing 0.5 mol/L NaCl. The results showed that green fluorescence dispersed in the whole cell in 296H(pYES2-*GFP*), but only appeared on the vacuolar membrane and shaped a cyclic structure in 296H(pYES2-*SeNHX1-GFP*). So SeNHX1 was guessed to be localized on the vacuolar membrane. The strains of 296H(pYES2-*GFP*) and 296H were inhibited for growth when cultured in medium with NaCl, where the strains with *SeNHX1* gene grew better. The finding suggested *SeNHX1* gene could complement the function of nhx1 mutant. Therefore, on the base of amino acid sequence analysis and hydrophobicity analysis, SeNHX1 was confirmed as vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters, which conferred to the salt tolerance of plants.

**Key words:** *SeNHX1* gene; Yeast; Expression vector; GFP green fluorescence; Salt-tolerance; SeNHX1 localization.

盐碱胁迫是造成世界农作物减产的主要原因。盐胁迫下, 多数植物过多地吸收介质中的  $\text{Na}^+$ , 破坏细胞体内原有的  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  比, 对代谢酶造成伤害, 引起细胞代谢失调, 影响植物体正常的生理生化活动<sup>[1]</sup>。为了适应盐胁迫环境, 植物需要启动  $\text{Na}^+$  的

外排和  $\text{Na}^+$  的区隔化等离子调节系统, 将细胞质内过多的  $\text{Na}^+$  排出体外或将其储存在液泡中<sup>[1-2]</sup>。研究表明, 植物和酵母的耐盐性与  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白的有无与活性密切相关<sup>[2-3]</sup>。

液泡膜  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白可将  $\text{Na}^+$  区隔化

收稿日期: 2011-10-19

基金项目: 国家转基因重大专项(2009ZX08003-019B; 2008ZX08003-005; 2008ZX08004-001)

作者简介: 杨小玲(1968-), 女, 福建三明人, 研究员, 博士, 主要从事耐盐转基因研究。

通讯作者: 季 静(1965-), 女, 吉林长春人, 教授, 主要从事植物基因工程研究。

于液泡内,具有提高植物耐盐性的功能,受到普遍关注。1999年,Gaxiola等<sup>[4]</sup>在NaCl敏感的酵母nhx1突变菌株中表达拟南芥液泡膜Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运蛋白AtNHX1,结果表明,转化菌株抑制了nhx1突变体的盐敏感表型。2000年,Quintero<sup>[5]</sup>等将AtNHX1基因导入酵母突变体nhx1,研究AtNHX1基因功能对NaCl的吸收和对Na<sup>+</sup>在细胞中分布的影响,研究表明,转化子增加了对NaCl的吸收,但胞质中的Na<sup>+</sup>含量较低,液泡中Na<sup>+</sup>含量较高,转化子比nhx1突变体具有更高的耐盐性。随后,Fukuda等<sup>[6]</sup>和Hamada等<sup>[7]</sup>研究表明,滨藜液泡膜Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运蛋白基因(AgNHX1)和甜菜液泡膜Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运蛋白基因(BvNHX1)同样可弥补nhx1缺失型酵母的功能。

SeNHX1基因是中科院吕慧颖等<sup>[8]</sup>从典型的盐生植物盐角草中克隆得到的(GenBank序列号AY131235),通过疏水性分析和氨基酸序列分析推断SeNHX1为液泡膜Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运蛋白,但有关SeNHX1亚细胞的定位及其转化异源生物后的耐盐性很少报导。本研究旨在通过对SeNHX1在酵母中的亚细胞定位及对酵母缺陷型菌株296H(nhx1缺陷型)Na<sup>+</sup>的解毒功能的研究,分析SeNHX1基因性质、表达活性和功能,为植物耐盐分子育种提供可靠的基因资源。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株与载体

酵母表达载体pYES2-SeNHX1、pYES2-GFP、pYES2-SeNHX1-GFP是由表达载体pYES2分别融合SeNHX1、GFP和SeNHX1-GFP基因构建而成的<sup>[9]</sup>。

296H缺陷型菌株由美国亚历桑那州立大学生命科学院Gaxiola教授惠赠,它是将质粒pRG197(nhx1::HIS3)转化W303(*Saccharomyces cerevisiae*),组氨酸基因替换酵母液泡膜NHX1基因后产生的nhx1缺陷型菌株。SeNHX1基因模板由中国科学院植物所李银心教授惠赠,GFP基因模板、pYES2载体由天津大学农学院植物基因工程实验室保存。

### 1.2 培养基

完全极限培养基CM<sup>[10]</sup>:2%碳源+0.67%酵母氮源(YNB)+0.83g/L氨基酸混合物(Dropout powder)+1.5%的琼脂粉。

阳性克隆筛选培养基CM-1:以葡萄糖为碳源,氨基酸混合物中缺省了尿嘧啶和组氨酸的CM培养基。

荧光表达培养基CM-2:以gal为碳源,氨基酸

混合物中缺省尿嘧啶和组氨酸的CM培养基。

含NaCl的酵母培养基CM-3:以gal为碳源,氨基酸混合物中缺省尿嘧啶和组氨酸,加入0.5mol/L NaCl的CM培养基。

对照培养基CM-4:以葡萄糖为碳源,氨基酸混合物中缺省尿嘧啶和组氨酸的CM培养基。

### 1.3 试验方法

1.3.1 表达载体转入缺陷型菌株296H与阳性克隆的鉴定 采用酵母高效转化法将3种表达载体(pYES2-SeNHX1、pYES2-GFP、pYES2-SeNHX1-GFP)分别转入缺陷型菌株296H,在阳性克隆筛选培养基CM-1中筛选阳性酵母,并用菌落PCR方法鉴定阳性克隆<sup>[10]</sup>。

1.3.2 阳性克隆的培养和荧光表达鉴定 挑取经PCR鉴定的阳性转化子,在荧光表达培养基CM-2培养基平板上划线培养48h后,用Olympus BX51荧光显微镜观察酵母的荧光(U2MNB2滤光片组,激发光波长470~490nm,发射光波长520nm)。

1.3.3 SeNHX1亚细胞定位 挑取已发荧光的2种酵母菌株296H(pYES2-GFP)、296H(pYES2-SeNHX1-GFP),涂布载玻片,用Leica TCS SPS共聚焦显微镜观察荧光位置。

1.3.4 阳性转化子对Na<sup>+</sup>解毒功能的研究 将296H(pYES2-SeNHX1)、296H(pYES2-SeNHX1-GFP)和296H(pYES2-GFP)3种菌株分别接种于不含琼脂粉的CM-4液体培养基中培养,放置于30℃、185r/min的摇床中培养,当菌液的OD<sub>600</sub>值约为1.0时,用系列稀释法将3种菌液分别稀释1000倍后,吸取5μL菌液分别接种于CM-3及CM-4固体培养基中,静置1h以上,待菌液完全被培养基吸收后,将培养皿放置于30℃培养箱中,培养1~2d,观察菌落生长情况。

## 2 结果与分析

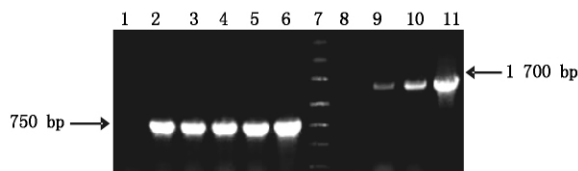
### 2.1 酵母表达载体转化菌株296H的阳性转化子鉴定

酵母表达载体pYES2-SeNHX1、pYES2-GFP、pYES2-SeNHX1-GFP分别转化296H菌株后,通过缺省组氨酸和尿嘧啶的CM-1培养基筛选阳性克隆,并经菌落PCR验证。图1表明296H(pYES2-GFP)和296H(pYES2-SeNHX1-GFP)分别扩增出约750bp的条带,296H(pYES2-SeNHX1)扩增出约1700bp的条带,表明已获得了3种阳性转化子。

### 2.2 目标基因在酵母细胞中的表达

296H(pYES2-GFP)、296H(pYES2-SeNHX1)、

296H( pYES2-*SeNHX1*-GFP) 3 种阳性转化子培养于荧光表达培养基 CM-2, 48 h 后分别用 Olympus BX51 荧光显微镜观察荧光。296H( pYES2-GFP)、296H( pYES2-*SeNHX1*-GFP) 2 种菌株可以看到绿色荧光, 296H( pYES2-*SeNHX1*) 菌株没有发出荧光(图 2), 表明了目标蛋白可在酵母细胞中正确表达。

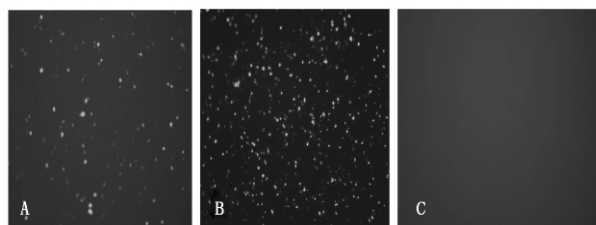


1 8. 阴性对照; 2 3. 菌株 296H( pYES2-GFP) 的菌落 GFP-PCR; 4 5. 菌株 296H( pYES2-*SeNHX1*-GFP) 的菌落 GFP-PCR; 6. GFP 阳性对照; 7. Marker III; 9 10. 菌株 296H( pYES2-*SeNHX1*) 的菌落 *SeNHX1*-PCR; 11. *SeNHX1* 阳性对照。

1 8. Control; 2 3. 296H( pYES2-GFP) strains GFP-PCR; 4 5. 296H( pYES2-*SeNHX1*-GFP) strains GFP-PCR; 6. pYES2-*SeNHX1*-GFP vector GFP-PCR; 7. Marker III; 9 10. 296H( pYES2-*SeNHX1*) strains *SeNHX1*-PCR; 11. pYES2-*SeNHX1* vector *SeNHX1*-PCR.

图 1 3 种转化子菌落 PCR 鉴定

Fig. 1 PCR identification of 296H with yeast expression vector



A. 296H( pYES2-GFP) 菌株; B. 296H( pYES2-*SeNHX1*-GFP) 菌株; C. 296H( pYES2-*SeNHX1*) 菌株。

A. 296H( pYES2-GFP) strains; B. 296H( pYES2-*SeNHX1*-GFP) strains; C. 296H( pYES2-*SeNHX1*) strains.

图 2 3 种转化子的 GFP 荧光表达鉴定

Fig. 2 Fluorescence microscope assays

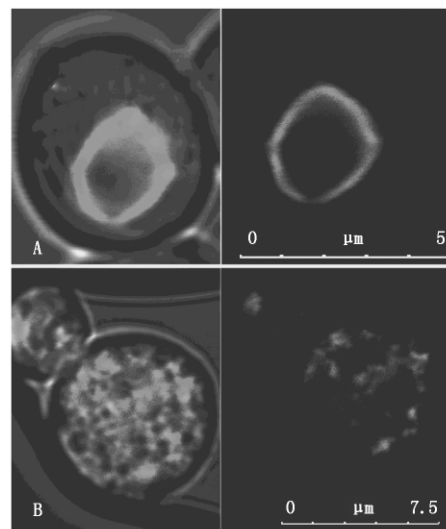
### 2.3 *SeNHX1* 表达蛋白的亚细胞定位

将在 Olympus BX51 荧光显微镜中发出荧光的 2 种酵母菌株 296H( pYES2-GFP)、296H( pYES2-*SeNHX1*-GFP) 分别涂片, 放置于 Leica TCS SPS 共聚焦显微镜观察。从显微镜中可以看出, 296H( pYES2-GFP) 的荧光弥散于整个细胞质, 而 296H( pYES2-*SeNHX1*-GFP) 荧光仅仅包围于细胞内液泡膜的一圈(图 3), 表明了 *GFP* 表达于整个细胞质, 而 *SeNHX1*-GFP 的表达于液泡膜。因此, *SeNHX1* 表达蛋白定位在液泡膜上。

### 2.4 *SeNHX1* 部分恢复了 296H 菌株 $\text{Na}^+$ 的解毒功能

野生型酿酒酵母 W303 能在含有 NaCl 的 YPD 培养基中正常生长。296H 是 W303 的 *nhx1* 基因缺陷型菌株, 对 NaCl 较为敏感。图 4 表明 296H 菌株和 296H( pYES2-GFP) 转化子培养于含有 0.5 mol/L

NaCl 的培养基中, 生长受到抑制。而将带有 *SeNHX1* 基因的 2 种转化子培养于含有 0.5 mol/L NaCl 的 CM-3 培养基中, 生长所受的抑制更小。因此, *SeNHX1* 可部分恢复  $\text{Na}^+$  的解毒功能, 提高了 *nhx1* 基因缺陷型酵母的耐盐性。

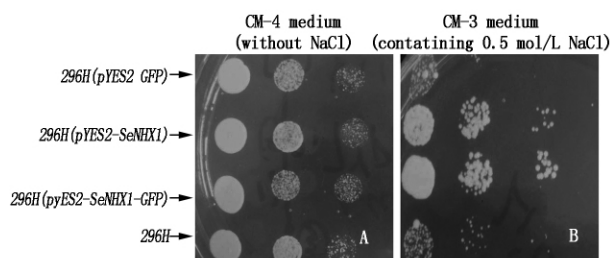


A. 296H( pYES2-*SeNHX1*-GFP) 菌株的荧光位于液泡膜; B. 296H( pYES2-GFP) 菌株的荧光分布于整个细胞。

A. Fluorescence emitted by 296H( pYES2-*SeNHX1*-GFP) appeared on the vacuolar membrane and shaped a cyclic structure; B. Fluorescence emitted by 296H( pYES2-GFP) dispersed in the whole yeast cell.

图 3 共聚焦显微镜的 *SeNHX1* 亚细胞定位

Fig. 3 Fluorescence localization under a confocal microscope



A. 菌株培养于不含 NaCl 培养基; B. 菌株培养于含有 0.5 mol/L NaCl 的培养基。

A. Cultured in medium without NaCl; B. Cultured in medium with NaCl.

图 4 *SeNHX1* 部分恢复缺陷型菌株 296H 的  $\text{Na}^+$  解毒功能

Fig. 4 *SeNHX1* function of  $\text{Na}^+$ -detoxification in mutant 296H

## 3 结论与讨论

$\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白在细菌、酵母、藻类、动物和高等植物膜系统上普遍存在, 它参与细胞质内的 pH 调节、 $\text{Na}^+$  浓度调节及细胞体积变化等生命活动。根据  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白在细胞中的定位, 可分为质膜  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白和液泡膜  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白<sup>[8]</sup>。

盐角草(*Salicornia* spp.) 是地球上迄今为止报道过最耐盐的陆生高等植物种类之一, 叶片肉质化, 尽管不含有盐腺或盐水囊, 但能在盐湖旁、潮湿盐沼中

生长,是典型的稀盐盐生植物。基于其显著的摄盐能力和盐集积特征,吕慧颖等克隆了盐角草 *SeNHX1* 基因。*SeNHX1* 基因包括 1 683 bp 碱基,编码 561 个氨基酸。序列疏水性分析表明,SeNHX1 蛋白有 12 个跨膜区;氨基酸序列分析表明,该基因与盐生植物液泡膜 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向运输蛋白基因,如北滨藜 (*AgNHX1*)、盐地碱蓬液泡膜 (*SsNHX1*) 等序列和结构相似性超过 70%;与已经报道的拟南芥 *AtNHX1*、水稻 *OsNHX1*、小麦 *TaNHX1* 同源性超过 55%。此外,SeNHX1 含有 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白活力的竞争性氯吡啶嘧啶的结合位点 (FFIYLLPPI)<sup>[8]</sup>。本研究表明,SeNHX1 基因的表达蛋白定位于液泡膜,并且可以互补液泡膜 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白功能。因此,通过序列疏水性分析、氨基酸序列分析和本研究的结论,可以推断 SeNHX1 是液泡膜 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白。

将液泡膜 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白基因导入植物并在植物中过量表达可提高植物的耐盐性。Zhang 等<sup>[11]</sup> 将拟南芥 *AtNHX1* 在番茄中过量表达,转基因番茄用 200 mmol/L NaCl 浇灌后,仍可正常生长、开花和结果;Chen 等<sup>[12]</sup> 将水稻 *OsNHX1* 转入水稻并在水稻中过量表达,在 100 ~ 150 mmol/L 的 NaCl 条件浇灌下,转基因植物生长状况明显比对照好。*SeNHX1* 来源于盐生植物盐角草,其耐盐性极强,本实验室已将 *SeNHX1* 转化烟草,转基因茎尖或带有侧芽的茎段可在含有 138 mmol/L NaCl 的培养基中生长、生根;转基因小苗可在含有 10.2 mg/g Na<sup>+</sup> 的基质土中生长<sup>[13]</sup>。但 *SeNHX1* 转基因植物是否比 *AtNHX1* 转基因植物的耐盐性更强还有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 邴雷,赵宝存,沈银柱. 植物耐盐性及耐盐相关基因的研究进展[J]. 河北师范大学学报 2008, 32(2): 243 - 247.
- [2] 聂莉莉,张越,刘仲齐. 植物抵御盐害的生理机制[J]. 天津农业科学 2008, 14(1): 6 - 9.
- [3] Shi H, Lee B H, Wu S J *et al.* Overexpression of a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Nat Biotech 2002, 21: 81 - 85.
- [4] Gaxiola R A, Rao R, Sherman A *et al.* The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNHX1 and AtVPL, can function in canonical detoxification in yeast [J]. Proc Natl Acad Sci 1999, 96: 1480 - 1485.
- [5] Quintero F J, Blatt M R, Pardo J M. Functional conservation between yeast and plant endosomal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter [J]. FEBS Letter 2000, 471: 224 - 228.
- [6] Fukuda A, Nakamura A, Tagiri A *et al.* Function intracellular localization and the importance of salt tolerance of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from rice [J]. Plant and Cell Physiology 2004, 45: 146 - 159.
- [7] Hamada A, Shono M, Xia T *et al.* Isolation and characterization of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelini* [J]. Plant Mol Biol 2001, 46: 35 - 42.
- [8] 吕慧颖. 盐生植物盐角草、番杏 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白基因克隆及特性研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2003.
- [9] 杨小玲, 季静, 王罡等. *SeNHX1* 与 GFP 融合基因在酵母中表达及其耐盐性表现[J]. 华北农学报, 2008, 23(4): 60 - 64.
- [10] 王海勇. UPR 信号通路遗传操作提高酵母异源表达[D]. 天津: 天津大学 2010.
- [11] Zhang H X, Blumwald E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit [J]. Nature Biotechnolog 2001, 19: 765 - 768.
- [12] Chen H, An R, Tang J H *et al.* Over-expression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene improves salt tolerance in an upland rice [J]. Mol Breeding 2007, 19: 215 - 225.
- [13] Yang X L, Ji J, Wang G *et al.* Over-expressing *Salicornia europaea* (*SeNHX1*) gene in tobacco improves tolerance to salt [J]. African Journal of Biotechnology 2011, 10(73): 16452 - 16460.