

SeNHX1 与 *GFP* 融合基因在酵母中表达及其耐盐性表现

杨小玲^{1,3}, 季 静², 王 罡², 杨少辉², 孙建学², 张达威¹

(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:通过构建盐角草的液泡型 Na^+/H^+ 反向转运蛋白 *SeNHX1* 基因的酵母表达载体, 研究该基因对酵母耐盐性的影响。将 *SeNHX1* 基因与荧光报告基因 *GFP* 融合, 分别构建酵母表达载体 pYES2-*SeNHX1-GFP*、pYES2-*SeNHX1* 和 pYES2-*GFP*, 转化酵母 W303, 诱导 3 个载体表达, 并测定含有不同表达载体的酵母生长曲线。结果表明, 荧光显微镜下观察到带有报告基因 *GFP* 的 2 个转化子 W303(pYES2-*SeNHX1-GFP*) 和 W303(pYES2-*GFP*) 均可发出绿色荧光, 而没有报告基因的转化子 W303(pYES2-*SeNHX1*) 不发出荧光; 在含有 0.8 mol/L NaCl 培养基中培养 0~48 h 内, W303(pYES2-*SeNHX1-GFP*) 和 W303(pYES2-*SeNHX1*) 菌株前期生长比对照菌株 W303(pYES2-*GFP*) 慢, 但在培养 48 h 后则大大超过对照菌株。表明所构建带有目的基因 *SeNHX1* 的酵母表达载体已表达, 且证实 *SeNHX1* 基因可提高酵母的耐盐性。

关键词: *SeNHX1* 基因; *GFP* 基因; 酵母; 表达载体; 生长曲线; 荧光; 耐盐性

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)04-0060-05

Expressing of Fusion Gene of *SeNHX1* and *GFP* and Its Tolerance to Salt in Yeast

YANG Xiao-ling^{1,3}, JI Jing², WANG Gang², YANG Shao-hui², SUN Jian-xue², ZHANG Da-wei¹

(1. Chemistry Engineering College of Tianjin University, Tianjin 300072, China;

2. Agricultural Bio-engineering College of Tianjin University, Tianjin 300072, China;

3. Tianjin Academy of Agriculture Sciences, Tianjin 300192, China)

Abstract: In order to study effect of the gene *SeNHX1* on yeast tolerance to salt, vector pYES2-*SeNHX1-GFP*, pYES2-*SeNHX1* and pYES2-*GFP* was constructed and transformed into yeast W303. Transformed W303 was cultured in CM-ura medium with D-gal which induced the vector expressing in Yeast. Bright green under fluorescence microscope was observed in W303(pYES2-*SeNHX1-GFP*) and W303(pYES2-*GFP*), but not in W303(pYES2-*SeNHX1*). W303(pYES2-*SeNHX1-GFP*) and W303(pYES2-*SeNHX1*) grew more slowly than W303(pYES2-*GFP*) in 0-48 h, it grew fast after 48 h. It indicated that the vector expressed correctly in yeast and gene *SeNHX1* could enhance the tolerance to salt

Key words: *SeNHX1* gene; *GFP* gene; Yeast; Vector; Growth curve; Fluorescence; Salt tolerance

SeNHX1 基因是从世界上最耐盐植物之一——盐角草中克隆获得的, 氨基酸序列和同源性分析表明, *SeNHX1* 基因是液泡型 Na^+/H^+ 反向运输蛋白基因^[1]。液泡型 Na^+/H^+ 反向运输蛋白可将细胞质中过多的 Na^+ 离子阻隔于液泡中, 以减少胞质中 Na^+ 对细胞代谢产生的毒性, 同时起到调节细胞渗透胁迫

的作用。目前, 已克隆了拟南芥、大麦、向日葵、盐生车前草、冰叶午时花等多种植物中的液泡 Na^+/H^+ 反向运输蛋白和酵母液泡 Na^+/H^+ 反向运输蛋白。Gaxiola^[2] 将拟南芥的 Na^+/H^+ 反向运输蛋白 AtNHX1 转化缺失液泡膜 NHX1 的酵母突变体 (Yeast nhx1 mutant), 突变体耐盐性得到回复, 证明

收稿日期: 2008-03-14

基金项目: 天津市科技发展计划项目(06YFGZNC 01700); 科技部农业科技成果转化项目(2006GBZA100013)

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

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。

了植物 Na^+/H^+ 反向运输蛋白在酵母中的活性。Hamada^[3] 将盐生植物滨藜的 AgNHX1 转化缺失液泡膜 NHX1 的酵母突变体, 得到了与 *Gaxiola* 相似的结论。有关植物 Na^+/H^+ 反向运输蛋白转化非突变体酵母(*Saccharomyces cerevisiae*), 提高酵母耐盐性的研究未见报道。本研究旨在通过构建 *SeNHX1* 与 *GFP* 融合基因的酵母表达载体, 并通过荧光观察验证融合基因的正确性, 在含有 NaCl 培养基中, 研究带有 *SeNHX1* 基因的酵母的耐盐性, 为构建植物表达载体和耐盐植物分子育种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌株及载体

克隆载体 PGM-T 购自北京天为时代公司, 酵母表达载体 pYES2 和酿酒酵母 W303 购自 Invitrogen 有限公司, 大肠杆菌 DH5 α 由天津大学农学院植物基因工程实验室保存。

1.2 试剂

表 1 *SeNHX1* 和 *GFP* 基因扩增引物序列

Tab. 1 PCR primer sequence of *SeNHX1* and *GFP* gene

序列 Sequence	
<i>SeNHX1-1</i>	5'-GGATCCATGTTGTCACAAATTGAGCF-3'
<i>SeNHX1-2</i>	5'-GGCCCTCTAGATGTTCTGTCTAGG-3'
<i>SeNHX1-3</i>	5'-GGGTCGACCTATGTTCTGTCTAGG-3'
<i>GFP-1</i>	5'-GGCCCTCTAGCCACCACCAACCAATGTCTAAAGGTGAAGAAT-3'
<i>GFP-2</i>	5'-GGCCCGGATCCTTATTTGTACAATTCATCCATACCATGGTAATACCA-3'
<i>GFP-3</i>	5'-GGCCCGGATCCATGTCTAAAGGTGAAGAAT-3'

1.3.2 目的基因的 PCR 扩增 目的基因盐角草 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 *SeNHX1* 基因模板由中国科学院植物所李银心教授惠赠, 扩增片段长 1 683 bp。绿色荧光蛋白 *GFP* 基因模板由天津大学农学院植物基因工程实验室保存, 扩增片段长 719 bp。根据表达载体酶切位点及融合基因连接要求, 以 *SeNHX1-1* 和 *SeNHX1-2*, *SeNHX1-1* 和 *SeNHX1-3* 两对引物分别扩增无终止密码子和有终止密码子的两种 *SeNHX1* 基因。以 *GFP-1* 和 *GFP-2*、*GFP-3* 和 *GFP-2* 两对引物分别扩增不同酶切位点的两种 *GFP* 基因。*SeNHX1* 和 *GFP* 基因扩增的反应体系为: 上游引物和下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , DNA 模板 1 μL , 2 \times Master Mix 12.5 μL , ddH₂O 9.5 μL , 反应总体积 25 μL 。

SeNHX1 基因扩增反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 3.5 min, 共 30 个循环, 再于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。*GFP-1* 和 *GFP-2* 两对引物较长, 扩增反应时降低退火温度, 程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min。

Pfu DNA 聚合酶购自北京天为时代公司, 连接酶和限制性内切酶购自东洋纺上海生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 引物设计 根据 GenBank 公布盐角草 Na^+/H^+ 逆向蛋白基因 *SeNHX1* 序列(序列号: AY131235)和绿色荧光蛋白基因 *GFP* 序列(序列号: AY013825), 应用 Primer premier 5.0 软件分析设计 *SeNHX1* 和 *GFP* 共 4 对(6 条)上、下游引物: *SeNHX1-1* 和 *SeNHX1-2*; *SeNHX1-1* 和 *SeNHX1-3*; *GFP-1* 和 *GFP-2*; *GFP-3* 和 *GFP-2*。其中, *SeNHX1-1* 含有酶切位点 *Bam*H iv 和起始密码子; *SeNHX1-2* 含有酶切位点 *Xba*l iv, 没有终止密码子; *SeNHX1-3* 含有酶切位点 *Sal* iv 和终止密码子; *GFP-1* 含有酶切位点 *Xba*l iv 和 6 个脯氨酸(18 个碱基)柔性 Linker, *GFP-2* 含有酶切位点 *Sal* iv 和终止密码子; *GFP-3* 含有酶切位点 *Bam*H iv 和起始密码子。引物由金思特科技有限公司合成。引物序列见表 1。

1.3.3 目的基因克隆、重组质粒鉴定 电泳检测扩增产物后, 将 PCR 产物按琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒产品说明书进行纯化回收, 纯化后的目的基因 PCR 产物与 PGM-T 载体的连接按试剂盒说明进行, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 的感受态细胞, 通过蓝白斑筛选, 挑取阳性克隆提取质粒^[4], 分别用 *Bam*H I 和 *Xba*l I 双酶切和 *Xba*l I/*Sal* I 双酶切鉴定筛选 PGM-T-*SeNHX1* 正向质粒(*Xba*l I 和 *Sal* I 两个酶切位点在目的基因的同侧), 用 *Xba*l I/*Sal* I 双酶切及 *Sal* I 单酶切鉴定和筛选 PGM-T-*GFP* 正向质粒(两个 *Sal* I 酶切位点在目的基因的同侧)。

1.3.4 *SeNHX1* 和 *GFP* 融合基因中间载体 PGM-T-*SeNHX1-GFP* 构建 PGM-T-*SeNHX1* 和 PGM-T-*GFP* 质粒经 *Xba*l I/*Sal* I 双酶切后, 分别回收 PGM-T-*SeNHX1* 大片段和 PGM-T-*GFP* 小片段, 按照载体 片段= 1: 3~ 1: 10 的摩尔比例进行连接反应, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 的感受态细胞, 经氨苄霉素筛选 PGM-T-*SeNHX1-GFP* 阳性质粒, 经 *Bam*H iv/*Sal* iv 双酶切鉴定。构建过程见图 1。

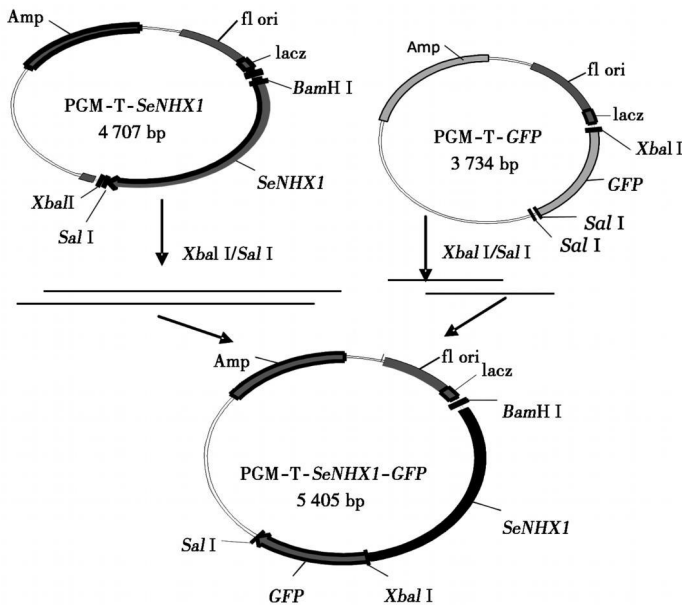


图 1 中间载体 PGM-T-SeNHX1-GFP 质粒的构建

Fig. 1 Construction of PGM-T-SeNHX1-GFP

1.3.5 酵母表达载体 pYES2-SeNHX1-GFP、pYES2-SeNHX1 和 pYES2-GFP 的构建 3 个质粒 PGM-T-SeNHX1、PGM-T-GFP 和 PGM-T-SeNHX1-GFP 均用 BamHI iv/Sal iv 双酶切后回收基因小片段,再将载体 pYES2 用 BamHI iv/Sal iv 双酶切后回收载体大片段,按 1.3.4 的方法构建和鉴定酵母表达载体 pYES2-GFP、pYES2-SeNHX1 和 pYES2-SeNHX1-GFP。

1.3.6 酵母表达载体转化酵母与鉴定 采用酵母高效转化法^[5]将 3 种酵母表达载体 pYES2-SeNHX1-GFP、pYES2-SeNHX1 和 pYES2-GFP 分别转化酿酒酵母 W303,在无尿嘧啶的完全极限培养基,即 Glu+CM-ura 培养基(2% 葡萄糖+ 0.67% YNB+ 0.83 g/L 氨基酸混合物)平板上的筛选阳性酵母,并用菌落 PCR 方法鉴定阳性转化酵母。

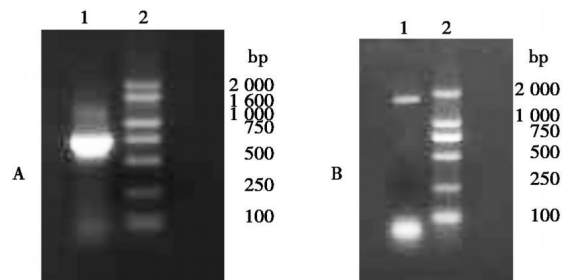
1.3.7 阳性转化酵母的培养和荧光表达 挑取已经鉴定的阳性转化酵母,分别在 Glu+CM-ura 培养基平板上划线培养后,挑取单菌落接种于以 2% D-半乳糖为碳源的 Glu+CM-ura 液体培养基(20 mL)中,29℃,185 r/min 的摇床中培养 48 h。吸取少量酵母培养液涂布载玻片,用 Olympus BX51 荧光显微镜进行酵母的发光表型检测(U2MNB2 滤光片组,激发光波长 470~490 nm,发射光波长 520 nm)。

1.3.8 酵母 W303 (pYES2-SeNHX1) 和酵母 W303 (pYES2-SeNHX1-GFP) 耐盐性研究 将 3 种阳性转化酵母分别接种于含有 0.8 mol/L NaCl、以 2% D-半乳糖为碳源的 Glu+CM-ura 液体培养基中,29℃,200 r/min 摇床中,培养 24,36,48,72,96 h 后比色测定 3 种酵母菌液的 OD_{600 nm} 值。

2 结果与分析

2.1 SeNHX1 和 GFP 基因的 PCR 扩增

SeNHX1 和 GFP 基因经相应的 PCR 程序扩增后,电泳结果分别扩增出约为 1700 bp(图 2-B)和 750 bp(图 2-A)的片段,与预期的结果一致。



A. GFP-PCR; Lane1. GFP-PCR; Lane2. Marker DGL2000.
B. SeNHX1-PCR; Lane1. SeNHX1-PCR; Lane2. Marker DL2000.

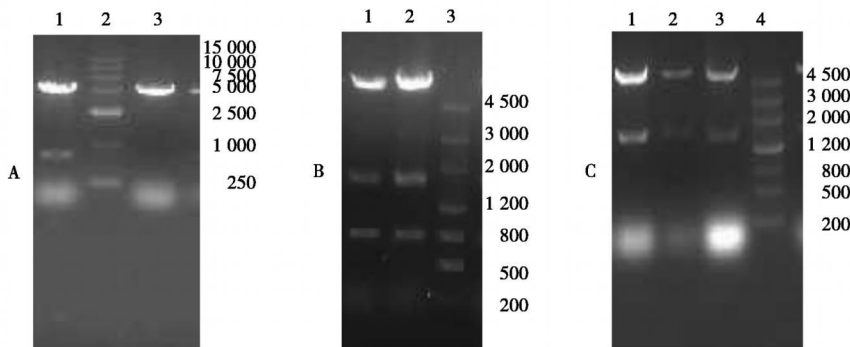
图 2 GFP 和 SeNHX1 基因的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 2 Electrophoresis analysis of PCR production of GFP and SeNHX1 gene

2.2 酵母表达载体 pYES2-GFP、pYES2-SeNHX1 和 pYES2-SeNHX1-GFP 的鉴定与图谱

酵母表达载体 pYES2-GFP、pYES2-SeNHX1 和 pYES2-SeNHX1-GFP 分别进行双酶切后,电泳分析,分别切下约 750,1700 bp 和 750,1700 bp 的片段(图 3),表明已获得三个酵母表达载体。

重组酵母表达载体 pYES2-SeNHX1-GFP 图谱如图 4, pYES2-GFP 和 pYES2-SeNHX1 表达载体与 pYES2-SeNHX1-GFP 图谱相似,将 SeNHX1-GFP 基因片段分别替换为 GFP 和 SeNHX1 片段。



A. pYES2-*GFP*; Lane 1. pYES2-*GFP* digested by *Bam*H I/ *Sal* iv; Lane 2. Marker D15 000; Lane 3. Control
B. pYES2-*SeNHX1*-*GFP*; Lane 1, 2. pYES2-*SeNHX1*-*GFP* digested by *Bam*H I/ *Xba* I; Lane 3. Marker (四)
C. pYES2-*SeNHX1* . Lane 1, 2, 3. pYES2-*SeNHX1* digested by *Bam*H I/ *Sal* iv; Lane 4. Marker (四)

图 3 三个酵母表达载体限制性酶切鉴定

Fig. 3 Restriction analysis of pYES2-*GFP*, pYES2-*SeNHX1*, pYES2-*SeNHX1*-*GFP*

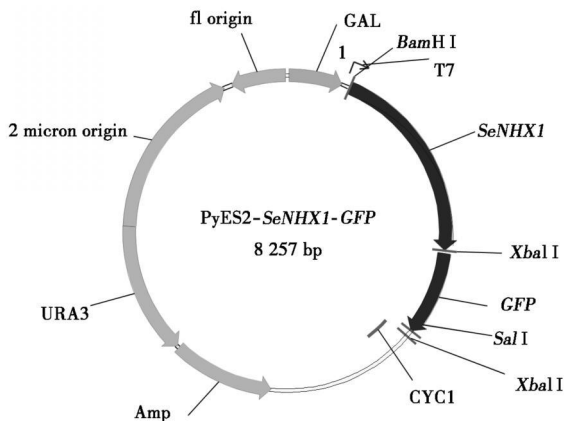
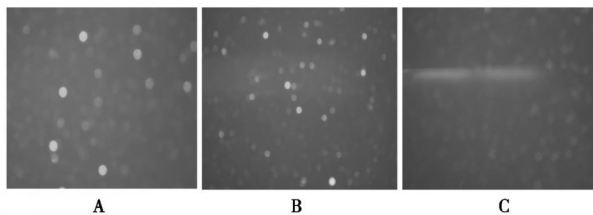


图 4 重组酵母表达载体 pYES2-*SeNHX1*-*GFP* 图谱

Fig. 4 Configuration of recombinant plasmid
pYES2-*SeNHX1*-*GFP*

2.3 阳性转化酵母的荧光表达

3 种重组质粒转化酵母 W303, 于含有 D-半乳糖的液体培养基中培养 48 h 后, 用荧光显微镜检测转化子, W303 (pYES2-*GFP*)、W303 (pYES2-*SeNHX1*-*GFP*) 两种酵母菌株可以看到绿色荧光(图 5), W303 (pYES2-*SeNHX1*) 酵母菌株没有看见荧光。表明酵母表达载体正确表达, 试验所设计的两个基因之间的柔性 Linker 正确。



A. W303(pYES2-*GFP*); B. W303(pYES2-*SeNHX1*-*GFP*);
C. W303(pYES2-*SeNHX1*)

图 5 荧光显微镜下的带有不同质粒的三种酵母菌株
Fig. 5 W303(pYES2-*GFP*), W303(pYES2-*SeNHX1*-*GFP*)
and W303(pYES2-*SeNHX1*) under fluorescence microscope

2.4 酵母 W303 (pYES2-*SeNHX1*) 和酵母 W303 (pYES2-*SeNHX1*-*GFP*) 的耐盐性

前期预备试验表明, 酵母 W303 在含有

0.8 mol/L NaCl 的 YPD 培养基中生长慢, 0~24 h 内是在含 0.2 mol/L NaCl 培养基中生长速度的 7.1%, 因而, 本研究以 0.8 mol/L NaCl 验证转化菌株的耐盐性。酵母 W303 (pYES2-*SeNHX1*)、酵母 W303 (pYES2-*SeNHX1*-*GFP*) 和酵母 W303 (pYES2-*GFP*) 菌株在 0.8 mol/L NaCl、D-半乳糖为碳源的完全极限液体培养基中培养的生长曲线如图 6 所示。对照菌株酵母 W303(pYES2-*GFP*) 培养 0~48 h 期间, OD 值增长比两个带有 *SeNHX1* 基因的酵母菌株快, 在第 48 h 时 OD 值达 1.19; 培养至 72 h 后, 生长处于停滞状态, OD 值几乎没有变化。两个带有 *SeNHX1* 基因的酵母菌株虽然前期生长较慢, 培养 0~48 h 期间, OD 值均小于 1, 但培养 48~96 h 期间, 2 个酵母菌株生长加快, OD 值超过 2.5。因此, 0.8 mol/L NaCl 抑制不带 *SeNHX1* 基因的酵母菌株的生长, 而不影响带有 *SeNHX1* 基因的 2 个菌株的生长, 带有 *SeNHX1* 基因的酵母表现出较高的耐盐性, 同时也证明了 *SeNHX1* 基因是一类与植物耐盐相关的基因。

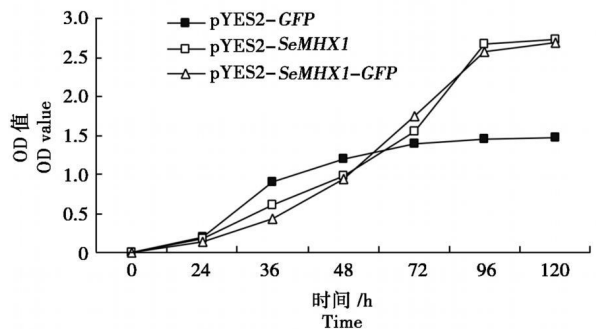


图 6 带有不同质粒的三种酵母菌株生长曲线

Fig. 6 Growth curve of W303(pYES2-*GFP*),
W303(pYES2-*SeNHX1*-*GFP*) and W303(pYES2-*SeNHX1*)

3 讨论

GFP 作报告基因有许多优点, 目前越来越多的研究人员用它作为报告基因筛选目的基因转化子和

用之研究细胞生理事件^[6]。但是, *GFP* 与其他目的基因构建在一起表达融合蛋白时, 应注意读码框准确, 不可以移码。本研究设计的融合基因中, 报告基因 *GFP* 在目的基因 *SeNHX1* 的 3' 端, 目的基因 *SeNHX1* 带有起始密码子(*ATG*), 没有终止密码子, *GFP* 既有起始密码子, 也有终止密码子, *SeNHX1* 和 *GFP* 两个基因连接之间增加了 6 个脯氨酸柔性 Linker, 这与 Anna^[7] 所设计的双功能融合基因一致。酵母荧光表达试验结果证明了融合基因设计的正确性, 不需要进行测序验证。

酵母 W303 (*pYES2-SeNHX1*) 和酵母 W303 (*pYES2-SeNHX1-GFP*) 耐盐性研究中发现, 转化的质粒大小影响酵母生长速度, 转化的质粒越大, 酵母前期生长越慢, 因而出现在 W303 (*pYES2-GFP*) 前期生长速度最快, W303 (*pYES2-SeNHX1*) 次之, W303 (*pYES2-SeNHX1-GFP*) 前期生长最慢的现象, 其原因需要进一步研究。带有 *SeNHX1* 基因的酵母在培养 72 h 后, 在含有 NaCl 的培养基中, 生长速度大大超过对照, 证明了该基因具有生物活性, 能提高酵母耐盐性, 为耐盐植物分子育种奠定的基础。

参考文献:

- [1] 吕慧颖. 盐生植物盐角草、番杏 Na^+/H^+ 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.
- [2] Gaxiola R A, Rao A, Sheman A, *et al.* The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and AtVp1, can function in cation detoxification in yeast [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96: 1480– 1485.
- [3] Hamada A, Shono M, Xia T, *et al.* Isolation and characterization of a Na^+/H^+ antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmdini* [J]. *Plant Mol Biol*, 2001, 46(1): 35– 42.
- [4] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 57– 64.
- [5] 周璐珈. 酿酒酵母蛋白 S61p 在产孢过程中功能研究 [D]. 天津: 天津大学, 2006.
- [6] 朱道圩, 米银法, 陈延惠, 等. *GFP* 基因在软枣猕猴桃愈伤组织原生质体中瞬间表达的初步研究 [J]. 河南农业大学学报, 2003, 37(2): 145– 148.
- [7] Stanislawski-Sachadyn A, Sachadyn P, Ihle K, *et al.* The construction of bifunctional fusion proteins consisting of MutS and GFP [J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 121: 134– 143.

《植物遗传资源学报》征订启事

《植物遗传资源学报》是中国农业科学院作物科学研究所和中国农学会主办的学术期刊, 为中国科技核心期刊、全国优秀农业期刊。该刊为中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库来源期刊(核心期刊)、中国核心期刊(遴选) 数据库收录期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊, 又被《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库、中文科技期刊数据库收录。据中国期刊引证研究报告统计, 2007 年度《植物遗传资源学报》影响因子达 0.914。

报道内容为大田、园艺作物, 观赏、药用植物, 林用植物、草类植物及其一切经济植物的有关植物遗传资源基础理论研究、应用研究方面的研究成果、创新性学术论文和高水平综述或评论。诸如, 种质资源的考察、收集、保存、评价、利用、创新, 信息学、管理学等; 起源、演化、分类等系统学; 基因发掘、鉴定、克隆、基因文库建立、遗传多样性研究。

季刊, 大 16 开本, 128 页。定价 20 元, 全年 80 元。各地邮局发行, 邮发代号: 82– 643。国内刊号 CN11– 4996/S, 国际统一刊号 ISSN 1672– 1810。

本刊编辑部常年办理订阅手续, 如需邮挂每期另加 3 元。

地 址: 北京市中关村南大街 12 号 中国农业科学院《植物遗传资源学报》编辑部

邮 编: 100081 电话: 010– 62180257; 010– 62180279(兼传真)

E-mail: zwyczyxb2003@163.com; zwyczyxb2003@sina.com