

大肠杆菌 Na^+/H^+ 反向运输体 A 基因的克隆及序列分析*

李金耀 张富春** 马 纪 单文娟 王 宾

(新疆大学生命科学与技术学院新疆生物资源基因工程重点实验室 乌鲁木齐 830046)

摘要: 为研究细菌的耐盐机理, 根据细菌中存在的 Na^+/H^+ 反向运输体 (*nhaA*) 的基因序列, 采用 PCR 扩增的方法, 从大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 中克隆获得了 1.1 kb 的 DNA 片段, 经过核酸序列分析, 发现基因片段包含了 *nhaA* 基因完整的读码框架。采用序列同源性分析方法, 结果显示 *nhaA* 基因在多种细菌中均存在, 表明 *nhaA* 基因是细菌中普遍存在的一种能够反向运输 Na^+ 的基因, 与细菌的耐盐性有着密切的关系, 在转基因提高生物耐盐性方面具有主要的应用价值。

关键词: *nhaA* 基因, 耐盐性, DNA 序列分析

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2004) 04-0034-04

Cloning and Sequencing Na^+/H^+ Antiporter A Gene of *Escherichia coli* DH5 α

LI Jin-Yao ZHANG Fu-Chun** MA Ji SHAN Wen-Juan WANG Bin

(Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046)

Abstract: The gene *nhaA* encodes functional protein that may play an important role in salt tolerance of *Escherichia coli*. In order to study bacteria salt tolerance, a pair of primers were designed according to public *nhaA* sequence and was used to amplify 1.1kb DNA fragment with PCR. The *nhaA* gene from *E. coli* DH5 α was cloned into a T-vector and sequence analyses reveal that the cloned fragment contains entire *nhaA* gene coding region. To apply the method of homology analysis, the result shows that many kinds of bacterium have *nhaA* gene, such as *E. coli* K12, *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enterica*, et al. This analysis suggests that *nhaA* gene lie generally in bacterial; and it has intimate relation with salt tolerance of *E. coli* that may be of great importance in improvement of the salt tolerance of plant.

Key words: *nhaA* gene, Salt tolerance, Sequence analysis

土壤盐分是制约作物产量的因素之一, 世界耕种土地的大约 20% 和接近一半的灌溉土地都遭到盐胁迫的伤害^[1]。高浓度盐会导致植物体离子的紊乱, 造成高渗胁迫, 并抑制植物组织和器官的生长和分化, 提早植物的发育进程。

Na^+/H^+ 反向运输体广泛地分布在细菌、动物和植物的细胞膜中。在所有生物中, 这种反向运输体在运输钠离子穿过细胞质膜时起着非常重要的作用^[2,3]。研究表明, 大肠杆菌有两种基因编码了 Na^+/H^+ 反向运输体, 分别为 *nhaA* 和 *nhaB*^[4,5], 这两种基因的产物对于大肠杆菌的耐盐性是非常重要的。

随着分子遗传学和植物转基因技术的发展, 采用生物技术提高作物的耐盐性, 使作物在盐胁迫环境中能正常生长并提高产量, 正受到越来越多的关注, 并取得了一定

* 国家科技攻关项目资助 (No.2001BA901A32)

** 联系人 Tel: 86-991-8582557, Fax: 86-991-8583259, E-mail: zfc@xju.edu.cn

收稿日期: 2003-08-25 修回日期: 2003-10-08

的成果。提高作物耐盐性的方法很多,如操纵生物合成途径,在作物体内表达耐盐相关基因或蛋白,改变基因的胁迫反应特性等^[6,7]。因此本文运用 PCR 技术从大肠杆菌基因组中扩增出 *nhaA* 基因片段,为探讨利用细菌耐盐基因来改良作物性状,培育作物新品种提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 菌株为本实验室保存菌种, pMD18-T 测序载体购自 Takara 公司。PCR 产物回收试剂盒、DNA marker、*Hind*Ⅲ 和 *Eco*R I 限制性内切酶、ExTaq 酶以及 PCR 引物均购自 Takara 公司;测序试剂盒购自美国 PE 公司,其它化学试剂为分析纯。

1.2 大肠杆菌 DNA 的提取

依据文献 [8] 进行。

1.3 PCR 反应

根据已发表的大肠杆菌 *nhaA* 基因序列 (J03879), 设计 PCR 引物序列为:

P1: GTGAAACATCTGCATCGATTGTTTAGCAG

P2: TCAAACCTGATGGACGCAAACGAACGCC

依照 TaKaRa PCR Kit 操作指南进行,扩增参数: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 70 s, 35 个循环; 72℃ 10 min, 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 *nhaA* 基因的克隆

按 Takara 公司 PCR Fragment Recovery Kit 说明书进行 PCR 产物的回收。回收获得的 *nhaA* 基因片段与 pMD 18-T 载体在 T4 DNA 连接酶的作用下 16℃ 过夜,使 *nhaA* 基因连接到 pMD 18-T 的载体上,转化感受态细胞。

1.5 重组质粒的鉴定

对构建的质粒 pMD 18-T/ *nhaA* 进行小量提取,提取后的质粒用 *Hind*Ⅲ 和 *Eco*R I 双酶切进行重组质粒的鉴定,酶切反应结束后进行琼脂糖凝胶电泳鉴定,筛选正确的克隆进行质粒的大量提取。

1.6 大肠杆菌 DH5 α *nhaA* 基因的序列测定及序列分析

为鉴定克隆的 *nhaA* 基因序列,对 pMD18-T/ *nhaA* 重组质粒进行纯化,并用 BcaBEST primer RV-M 和 BcaBEST primer M13-47 对大肠杆菌 *nhaA* 基因在 PE377 全自动测序仪进行双向 DNA 序列测定,所得序列用 PE 公司 SeqEd v1.0.3 软件进行分析。

2 结果

2.1 PCR 扩增产物鉴定

以 *nhaA* 基因序列设计的 PCR 引物,对提取的大肠杆菌基因组 DNA 进行扩增,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 (见图 1),可见一条约 1,100 bp 的条带,与预计的 *nhaA* 基因片段 1,100 bp 的大小一致。

2.2 测序载体的构建及其鉴定

PCR 扩增的 *nhaA* 基因片段,回收后与测序载体 pMD18-T 连接,构建形成重组质粒 pMD18-T/*nhaA*。重组质粒用 *Hind*Ⅲ 和 *Eco*R I 酶切,琼脂糖凝胶电泳显示出酶切获得的

1,100 bp 的 DNA 片段 (图 2), 与连接的 *nhaA* 基因片段大小相同, 证明构建的正确性。

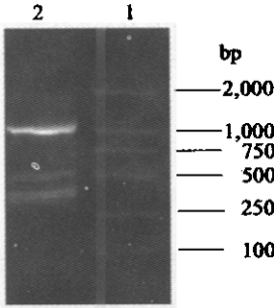


图 1 PCR 扩增产物电泳图谱

1 Marker: DL2000, 2 PCR 产物

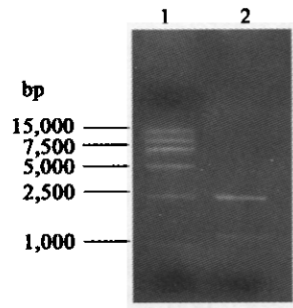


图 2 重组质粒酶切分析结果

1 Marker: DL15000,

2 pMD18-T/*nhaA* *Hind*III 和 *Eco*RI 酶切

2.3 大肠杆菌 DH5 α *nhaA* 基因序列测定及序列分析

对 pMD18-T/*nhaA* 重组质粒用 BcaBEST primer RV-M 和 BcaBEST primer M13-47 在 PE377 全自动测序仪进行双向测序, 测序结果已在国际基因库 (GenBank) 申请接受号为 bankit 574128 和 AY449719。

2.4 对 *nhaA* 基因所测序列进行同源性分析

用 DNAMAN 对大肠杆菌 DH5 α *nhaA* 基因与 *E. coli* K12、*E. coli* O157: H7 和 *Salmonella typhimurium* 以及 *Salmonella enterica* 的 *nhaA* 基因进行同源性分析, 其同源性分别为 100%、98%、82% 和 81% (见图 3), 表明所克隆的 cDNA 为 *nhaA* 基因, 测定序列区间包含了 *nhaA* 基因完整的读码框架。

<i>E. coli</i> DH5 α	GTGAAACATCTGCATCGATTCTTTAGCAGTGATGCCTCGG	40
<i>E. coli</i> K12 n	GTGAAACATCTGCATCGATTCTTTAGCAGTGATGCCTCGG	90
<i>E. coli</i> O157:	GTGAAACATCTGCATCGATTCTTTAGCAGTGATGCCTCGG	61
<i>Salmonella</i> t	GTGAAACATCTGCACCGATTCTTTAGCAGCGATGCCTCTG	102
<i>Salmonella</i> e	GTGAAACATCTGCACCGATTCTTTAGCAGCGATGCCTCTG	205
Consensus	gtgaaacatctgca cgatt tttagcag gatgcctc g	
<i>E. coli</i> DH5 α	GAGGCATTATTCTTATCATGCGCGCTATCCTGGCGATGAT	80
<i>E. coli</i> K12 n	GAGGCATTATTCTTATCATGCGCGCTATCCTGGCGATGAT	130
<i>E. coli</i> O157:	GAGGCATTATTCTTATCATGCGCGCTATCCTGGCGATGAT	101
<i>Salmonella</i> t	GGGGCATCATTCTCATCATCGCGCGCTGCGCTGGCTATGCT	142
<i>Salmonella</i> e	GGGGCATCATTCTCATCATCGCGCGCTGCGCTGGCTATGCT	245
Consensus	g gggcat attct atcat gccgct ctggc atg t	
<i>E. coli</i> DH5 α	TATGGCCAACAGCGGCGCAACCAAGTGGATGGTATCACGAC	120
<i>E. coli</i> K12 n	TATGGCCAACAGCGGCGCAACCAAGTGGATGGTATCACGAC	170
<i>E. coli</i> O157:	GATGGCCAACAGCGGCGCAACCAAGTGGATGGTATCACGAC	141
<i>Salmonella</i> t	GATGGCCAATATGGGCGGACCAAGTGGATGGTATCATGAT	182
<i>Salmonella</i> e	GATGGCCAATATGGGCGGACCAAGTGGATGGTATCATGAT	285
Consensus	atggccaa a ggcgc accagtggatggtatca ga	
<i>E. coli</i> DH5 α	TTTCTGGAGACGCCGGTTCAGCTCCGGGTTGGTTCACTCG	160
<i>E. coli</i> K12 n	TTTCTGGAGACGCCGGTTCAGCTCCGGGTTGGTTCACTCG	210
<i>E. coli</i> O157:	TTTCTGGAGACGCCGGTTCAGCTCCGGGTTGGTTCACTCG	181
<i>Salmonella</i> t	TTTCTGGAGACGCCGGTTCAGCTACGGGTTGGGGCGCTTG	222
<i>Salmonella</i> e	TTTCTGGAGACGCCGGTTCAGCTACGGGTTGGGGCGCTTG	325
Consensus	tttctggagacgccgggttcagct cgggttgg c ct g	

<i>E. coli</i> DH5 α	AAATCAACAAAAACATGCTGTTATGGATAAATGACGCGCT	200
<i>E. coli</i> K12 n	AAATCAACAAAAACATGCTGTTATGGATAAATGACGCGCT	250
<i>E. coli</i> O157:	AAATCAACAAAAACATGCTGTTATGGATAAATGACGCGCT	221
<i>Salmonella</i> t	AGATCAACAAAAACATGCTGTTGTGGATCAACGATGCGCT	262
<i>Salmonella</i> e	AGATCAACAAAAACATGCTGTTGTGGATCAACGATGCGCT	365
Consensus	a atcaacaaaaacatgctgtt tggat aa ga gcgct	
<i>E. coli</i> DH5 α	GATGGCGGTATTTTTCTGTTAGTCGGTCTGGAAGTTAA	240
<i>E. coli</i> K12 n	GATGGCGGTATTTTTCTGTTAGTCGGTCTGGAAGTTAA	290
<i>E. coli</i> O157:	GATGGCGGTATTTTTCTGTTAGTCGGTCTGGAAGTTAA	261
<i>Salmonella</i> t	GATGGCGGTATTTTTCTGTTAGTTGGCCTGGAAGTTAAG	302
<i>Salmonella</i> e	GATGGCGGTATTTTTCTGTTAGTTGGCCTGGAAGTTAAG	405
Consensus	gatggc gt tttttcctgtt t gg ctggaagttaa	

图3 大肠杆菌 DH5 α *nhaA* 基因与 *E. coli* K12、*E. coli* O157: H7 和 *Salmonella typhimurium* 以及 *Salmonella enterica* 的 *nhaA* 基因同源性比较

3 讨论

本研究通过 PCR 技术扩增大肠杆菌 DH5 α *nhaA* 基因, 根据大肠杆菌 *nhaA* 基因序列设计引物, 以合适的 PCR 条件即可扩增出目的基因片段。从大肠杆菌 DH5 α 基因组中扩增出的目的片段与 *E. coli* K12 *nhaA* 基因同源性高达 100%, 与 *E. coli* O157: H7 的同源性为 98%, 与 *Salmonella typhimurium* 的同源性为 82%, 与 *Salmonella enterica* 的同源性为 81%, 表明 Na^+/H^+ 反向运输体基因在细菌中是普遍存在的一种基因。

Roberto 等将拟南芥 *AtNHX1* 基因导入酵母 *nhx1* 突变体内, 结果恢复了酵母突变体的耐盐性。这就表明了植物与酵母有着相似的耐盐机制。在细菌中, 这种反向运输体排出钠离子或锂离子, 并用于交换质子。该过程的驱动力是质子穿膜的电化学势梯度, 该电化学势梯度是由呼吸链或 $\text{H}^+ - \text{ATPase}$ 产生的^[9]。 Na^+/H^+ 反向运输体有以下几种功能: 如维持细胞 pH 自身稳定, 解除细胞 Na^+ 毒素, 调控细胞体积, 以及建立 Na^+ 穿越细胞膜的电化学势。本研究克隆出了大肠杆菌 DH5 α *nhaA* 基因, 这为进一步研究细菌, 甚至整个生物界的耐盐机制, 以及为利用该基因改良农作物品种方面奠定了理论基础。

参考文献

- [1] Rhoades J D, Loveday J. In: Steward B A, Nielsen D R (eds). American Society of Civil Engineers, Irrigation of Agricultural Crops. American Society of Agronomists, 1990. 1089 ~ 1142.
- [2] Krulwich T A, Masahiro I, Guffanti A A. Biochim Biophys Acta, 2001, 1505: 158 ~ 168.
- [3] Padan E M, Venturi Y, Gerchman, et al. Biochim Biophys Acta, 2001, 1505: 144 ~ 157.
- [4] Pinner E E, Schuldiner S. J Biol Chem, 1994, 269: 26274 ~ 26279.
- [5] Taglicht D E, Schuldiner S. J Biol Chem, 1991, 266: 11289 ~ 11294.
- [6] Hasegawa P M, Bressan R A, Zhu J ~ K, et al. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 2000, 51: 463 ~ 499.
- [7] Zhu J K. Trends in Plant Sci, 2001, 6: 66 ~ 71.
- [8] Roberto A, Gaxiola, Rajini R, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 1480 ~ 1485.
- [9] West I C, Mitchell P. J Biochem, 1974, 144: 87 ~ 90.