

Cloning and Characterization of Na⁺ /H⁺ Antiporter Gene (nhaA) from Pseudomonas sp. cn4902

LU Guang-Fa¹, ZENG Huo-Shui², CHEN Qi-Wei¹, GAO Ya-Hui¹

(1. The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumour Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. The Third Institute of State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

Abstract: According to the sequences of the gene nhaA coding for Na⁺ /H⁺ antiporter, a structural gene was cloned from Pseudomonas sp. cn4902 by PCR reaction with a set of primers. It was 1 089 bp in length and codes for 362 amino acids sharing homology with the gene nhaA of E. coli K12 as high as 97.0%. It was inserted into plasmid pBV220 to form a high level expression reconstruction plasmid pBVA. So an overexpression 41 kD protein band could be found in the lane of transformant harbored with pBVA after SDS-PAGE electrophoresis. The detection of growth curve showed that the biomass of the transformant was 2.3 times over that of the control in the medium containing 1.0 mol/L NaCl. It was found that Na⁺ concentration in cytoplasm of the transformant was below 60.4% of the control by the detection of atomic absorption spectrum. Evidence of SDS-PAGE electrophoresis of membrane proteins also showed that the NhaA was located in membrane. Purified NhaA was harvested and digested by FXa proteinase. The sequence of eight amino acids in N-terminus of NhaA protein was entirely identical with the polypeptide deduced from the nhaA gene. Then ten strains of transformant were continuously cultivated for 18 generations under 42 °C hot shock condition, all of their reconstructed plasmids were lost with the result that salt-tolerance level went back to the original standard. In summary, all the experiments proved that the cloned gene is nhaA gene. The gene has been accepted in GenBank by the accession number AY643494.

Key words: Pseudomonas; nhaA gene; Na⁺ /H⁺ antiporter; salt tolerance

假单胞菌 Na⁺ /H⁺ 逆向转运蛋白基因 nhaA 的克隆与鉴定

刘广发¹, 曾活水², 陈启伟¹, 高亚辉¹

(1. 厦门大学生命科学学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005;

2. 国家海洋局第三海洋研究所, 厦门 361005)

摘要: 根据 3 种生物的 Na⁺ /H⁺ 逆向转运蛋白基因 (nhaA) 的两端序列设计引物, 利用 PCR 从假单胞菌 (Pseudomonas sp. cn4902) 中克隆得到一结构基因。该基因长 1 089 bp, 编码 362 个氨基酸, 与 E. coli K12 的

收稿日期: 2004 - 08 - 12; 修回日期: 2004 - 10 - 07

基金项目: 福建省科技计划重点资助项目 (编号: 2003N053) 和厦门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室项目 (编号: 2004106) [Supported by the Key Research Program of Fujian Province, China (No. 2003N053), and the Program of the Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumour Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University (No. 2004106)]

作者简介: 刘广发 (1949 -), 男, 副教授, 专业方向: 分子遗传学

通讯作者。E-mail: lugu@xmu.edu.cn; Tel: 0592-2181001

nhaA基因的同源性高达97.0%。将该结构基因与pBV220构建成重组载体pBVA。SDS-PAGE电泳表明:含pBVA的转化子产生较高浓度的分子量约为41 kD的蛋白,与预期相符。在含NaCl 1.0 mol/L的培养基中生长达到平衡期时,转化子的菌浓度约是对照的2.3倍。经原子吸收光谱测定,转化子细胞质中Na⁺浓度仅为对照菌的60.4%。SDS-PAGE电泳表明该基因的表达蛋白位于细胞膜(壁)上。提纯外源基因表达蛋白并对其N端8个氨基酸进行测序,与nhaA基因推测的氨基酸序列完全相符。这些实验证实,克隆得到的基因是假单胞菌的nhaA基因。该基因已经在GenBank登记,收录号为AY643494。

关键词:假单胞菌;nhaA基因;Na⁺/H⁺逆向转运蛋白;耐盐性

中图分类号:Q812 文献标识码:A 文章编号:0379-4172(2005)03-0309-06

Na⁺/H⁺逆向转运蛋白(antiporter)是镶嵌在质膜上的一类蛋白家族,在生物界的各个门类几乎都有分布,它们在细胞pH和Na⁺平衡方面发挥了主要的作用^[1]。Na⁺/H⁺逆向转运蛋白编码基因(nhaA)最早是在大肠杆菌中克隆的^[2],随后有些科学家从不同的生物体中也克隆得到nhaA基因^[3]。在原核生物,antiporter位于细胞膜上,其主要功能是将细胞内的Na⁺不断泵出胞外,以维持处在高盐环境下细胞的正常代谢;在高等植物,antiporter还可穿插于液泡膜上,将细胞质中的Na⁺转运入液泡内,形成离子区域化,从而保证耐盐植物能正常生长^[4]。

常规的基因克隆研究是相当繁琐的^[5~7]。而我们利用PCR扩增结合生物信息学研究的实验策略^[8,9],从一株极端耐盐的假单胞菌中克隆了与其耐盐性相关的编码antiporter的基因nhaA,并从转化子新出现的特征等方面对该基因的功能进行了多重鉴定。

耐盐相关基因是生物与盐代谢有关的多种基因的统称,涉及小分子有机物合成、离子进出以及能量代谢等细胞代谢多方面的机理^[10]。迄今为止,国内外已有一些克隆耐盐相关基因的报道^[11~13]。本文克隆的nhaA基因将为耐盐相关基因“家族”增添一个新的重要成员。同时很多实验也证明,通过转化单个耐盐相关基因从而较大幅度提高作物的耐盐性是可行的^[14~16]。Ruiz等^[17]即曾报道过,转nhaA基因的番茄可直接用含200 mmol/L的NaCl浇灌,并能开花、结果。本文克隆的假单胞菌的nhaA基因亦为培育高耐盐作物奠定了良好的工作基础。

1 材料和方法

1.1 材料

假单胞菌(*Pseudomonas* sp. cn4902)和*E. coli* JM101均由本实验室保存;限制性核酸内切酶

购于上海生工生物工程有限公司;pMD 18-T载体购于大连宝生物工程有限公司;原核基因表达载体pBV 220和融合表达载体pQE由本实验室保存。其余药品为国产分析纯试剂。

1.2 引物设计与PCR扩增

根据3种生物nhaA基因的两端序列设计若干对引物,分别在引物的5'端引入Sma^I和BamH^I内切酶位点,其中扩增效果最好的1对引物如下:

P₁: ACCCGGGATGATTATGGCCAACAGC;
Sma^I

P₂: TGGATCC TCAAAC TGATGGACGCAA
BamH^I

以假单胞菌总DNA为模板进行PCR扩增。反应程序:95 预变性7 min,94 变性1 min,51 复性1 min,72 延伸1.5 min,最后72 延伸10 min。扩增产物经电泳、胶回收后与pMD 18-T载体连接。

1.3 基因测序、同源性比较及原核基因表达载体构建

经上海博亚生物技术有限公司对克隆片段测序后,输入GenBank中进行DNA和推测的多肽同源性和保守区域比较。利用引物两端的限制性核酸内切酶位点将克隆基因从pMD 18-T载体中切下,插入原核基因表达载体pBV 220的多克隆位点中。

1.4 转化子耐盐性检测及生长曲线测定

将携带有克隆基因的转化子在LB液体培养基中培养至OD₆₀₀ = 0.9,42 诱导4 h,分别涂布于含系列浓度NaCl(0.8~1.2 mol/L)的LB琼脂培养基上,37 培养2 d观察生长情况,提取蛋白进行SDS-PAGE电泳。将转化子在含1.0 mol/L NaCl的液体培养基中37 震荡培养48 h,每隔6 h测定一次OD₆₀₀值,重复3次。

1.5 转化子表达蛋白提纯及其定位

将克隆基因插入融合表达载体 pQE 中。表达蛋白经亲和柱层析提纯,再利用 FXa 蛋白酶处理、电泳后即得到纯化的表达蛋白。将转化子 37 培养过夜,42 诱导 4 h,冰浴中超声破碎,低速离心除去未破碎细胞,然后超速离心(100 000 g, 10 min)收集细胞碎片;加重蒸水 100 μL,沸水浴 10 min,10 000 g 离心 10 min;取上清 20 μL 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,扫描并记录。

1.6 转化子胞内 Na⁺ 浓度测定

将转化子接种至含 NaCl 0.95 mol/L 的液体 LB 培养基中,37 震荡培养 36 h;定量离心收集菌体,50 mmol/L 葡萄糖溶液清洗两次后用滤纸吸干,加少量浓 HNO₃ 溶解,在电炉上加热 30 min;冷却,加 HNO₃-HClO₄ 混合液,加热 4 h,取浓缩液定量稀释,原子吸收光谱测定 Na⁺ 浓度。

1.7 转化子重组质粒丢失实验

将转化子培养于不加 Amp 的 LB 培养基中,42 继代培养 18 次,检测重组子的羧苄青霉素(Amp)抗性、耐盐水平以及质粒存在状况。

2 结果

2.1 假单胞菌 nhaA 基因克隆及编码多肽同源性比较

假单胞菌总 DNA 经 PCR 扩增得到一条清晰明亮的分子量约为 1.1 kb 的 DNA 片段。将该产物加上“A”后,与 pMD18-T 载体连接生成重组质粒 pMDA。经上海博亚生物技术有限公司测序,该基因长 1 089 bp,编码 362 个氨基酸,是一个具有起始密码和终止密码的完整结构基因。将上述序列输入 GenBank 进行 DNA 和蛋白质的同源性比较发现,该基因及其编码多肽与 E. coli K12 中的 nhaA 基因及其编码多肽(NhaA)的同源性分别高达 97.0% 和 95.3% (未示出)。该基因编码多肽与其他 5 种细菌的 NhaA 同源性比较见图 1。

图 1 表明,被克隆基因推测的多肽与其他 5 种细菌的 NhaA 蛋白具有很高的同源性。在 362 个氨基酸残基中完全相同的氨基酸高达 150 个,59 处

(阴影表示),占 41.4%。其中最大的保守区域由连续 13 个氨基酸残基组成(No. 192 ~ 205),连续 5 个以上氨基酸残基完全一致的保守区域就有 7 处。此外尚有 53 处在 6 个菌种中有 5 个菌种的氨基酸完全一致。因此可以初步认为,克隆的基因应该是假单胞菌编码 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白(antiporter)的基因 nhaA。该基因已提交美国 GenBank,收录号为 AY643494。

2.2 重组质粒构建及 antiporter 定位

利用克隆基因两端的限制性核酸内切酶位点将其插入原核基因温控高效表达载体 pBV220 中,转化 E. coli JM101。提取转化子中的总蛋白电泳后发现,在大约 41 kD 处转化子的蛋白含量比对照高得多,且该蛋白的分子量与克隆的 nhaA 基因推测的表达产物的分子量大小一致,说明该基因已经在转化子中得到较好表达。进一步检测表明,nhaA 基因表达的 antiporter 主要位于细胞膜(壁)上(图 2)。

2.3 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白(NhaA)的纯化及 N 端测序

为了获得纯化的 NhaA,将 nhaA 基因插于融合表达载体 pQE 的多克隆位点,表达后形成融合蛋白。经离子柱层析和 FXa 蛋白酶酶切,SDS-PAGE 电泳,发现只出现一条与预计分子量相符的 41 kD 左右的蛋白带,与转化子中的特异蛋白带完全一致。可见这是一条纯化的 NhaA 蛋白带。经测序,该蛋白 N 端的 8 个氨基酸为 MMANSGA,与 nhaA 基因推测的蛋白序列一致,进一步说明克隆的基因是假单胞菌的 nhaA 基因。

2.4 转化子耐盐性明显提高

为分析外源 nhaA 基因和受体菌耐盐性的关系,分别在含系列 NaCl 浓度的琼脂平皿上检测转化子的耐盐水平,同时在含 1.0 mol/L NaCl 的液体培养基中测定它的生长曲线。实验证实,转化子的耐盐极限达到 1.1 mol/L NaCl,比对照提高 0.1 mol/L (表 1)。同时从在盐胁迫下的生长曲线可以看到(图 3),虽然转化子和对照菌都到 6 h 后才有较明显的增长,36 h 后基本达到平衡期,但转化子的生长速度和最终菌浓度远高于对照组。转化子达到平衡期时的 OD₆₀₀ 值约为对照组的 2.3 倍。可

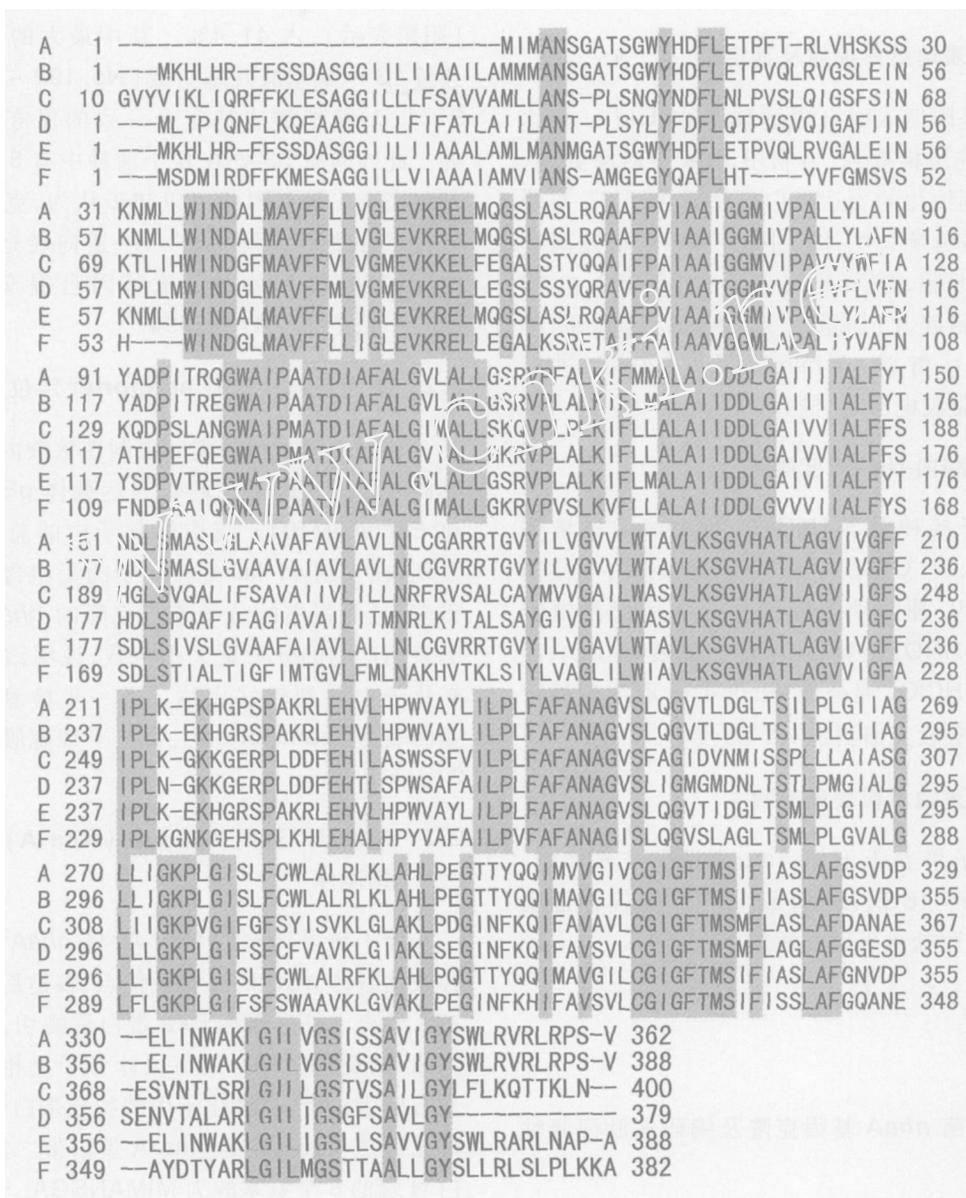


图 1 假单胞菌与其他 5 种细菌的 Nha A 多肽同源性比较

A:假单胞菌; B:大肠杆菌 K12; C:流感嗜血杆菌; D:多杀性巴斯德杆菌; E:鼠伤寒沙门氏杆菌; F:霍乱弧菌;完全相同的氨基酸残基之间用阴影表示。

Fig. 1 Nha A polypeptides comparison among Pseudomonas sp. cn 4902 and other five species of bacteria

A: Pseudomonas sp. cn4902; B: E. coli K12; C: Haemophilus influenzae; D: Pasteurella multocida; E: Salmonella typhimurium; F: Vibrio cholerae; The same amino acids are displayed in dark background

见,转入外源 nhaA 基因与转化子提高耐盐水平具有明显的正相关性。

2.5 转化子中的 Na⁺浓度明显降低

转化子 E. coli JM101/pBVA 细胞质消化后用原子吸收光谱测得的 Na⁺含量为 14.3 ng/10⁶ 个细胞,仅为对照的 60.4%。结合图 2 显示的转化子

拥有较大量的 Nha A 膜(壁)蛋白和图 3 中转化子在高盐环境中依然能基本正常地生长,可见这些蛋白功能正常,可持续不断地将 Na⁺泵出胞外。

2.6 转化子质粒丢失耐盐性下降

为了从反面进一步验证转化子中外源 nhaA 基因的功能,将转化子置 42 继代培养 18 次后发现,

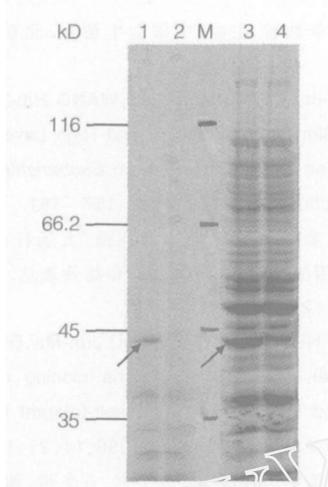


图 2 转化子细胞膜(壁)的蛋白质 SDS - PAGE电泳图谱

M:蛋白质分子量标记; 1:转化子膜蛋白; 2:对照菌膜蛋白; 3:转化子的总蛋白; 4:对照菌的总蛋白; 箭头指向转化子中大量表达的 NhaA 蛋白。

Fig. 2 The membrane proteins SDS - PAGE electropherogram of the transformant

M: Molecular standards; 1: Membrane proteins of transformant; 2: Membrane proteins of control; 3: Total proteins of transformant; 4: Total proteins of control. The arrows indicate overexpression Nha A protein in transformant.

表 1 转化子的耐盐性检测

Table 1 Test of salt-tolerant-level of transformant

菌株 Strains	琼脂培养基中 NaCl 浓度 Conc. of NaCl in agar media (mol/L)				
	0.8	0.9	1.0	1.1	1.2
转化子 Transformant	++	+	+	-	-
对照 Control	+++	++	+	+	-

+: 各种程度的生长; -: 不生长。

+: levels of growth; -: no growth.

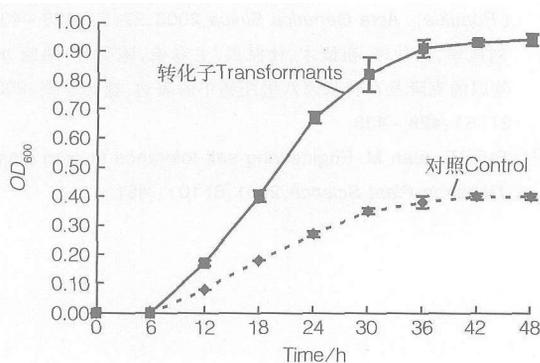


图 3 转化子中含 NaCl 1.0 mol/L 培养基中的生长曲线

Fig. 3 The growth curve of transformant growing in the medium containing NaCl 1.0 mol/L

在 10 株受检的转化子中原有的重组质粒 pBVA 全部丢失。丢失质粒后的转化子耐盐能力恢复到原有水平,从而进一步从反面证明了外源 nhaA 基因与该菌的耐盐性密切相关。

3 讨论

自 20 世纪 70 年代重组 DNA 技术异军突起以来,基因工程研究突飞猛进,克隆各种目的基因已经成了分子生物学工作者十分感兴趣的一个领域。现在,科学家已经达成共识,仅仅获得一段 DNA 序列是不够的,必须明确它编码的蛋白质的功能才可被确认为相应的基因。遵循上述原则,为了探究本文克隆的基因的生物学功能,我们运用多种实验手段从正反两方面加以求证。如,在 GenBank 中进行克隆基因及其编码多肽的同源性及其保守区域查询,基因表达蛋白的分子量检测、N 端序列分析及其在细胞膜(壁)的定位,转化子的最高耐盐性、胞内 Na⁺ 浓度和生长曲线检测;另一方面,进行消除转化子中外源基因的实验,发现其耐盐性回落至原初水平。这样,已有较充分的证据支持我们克隆的基因是编码 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白的 nhaA 基因。

通常,大肠杆菌基因组中含有 nhaA 基因,但估计只有单个,其表达的 Nha A 蛋白量自然较少;同时,由于实验中制备的膜(壁)蛋白浓度较低,导致图 2 中第二泳道(对照)未能检测到本应在约 41 kD 处出现的 Nha A 蛋白带。转化子中可能拥有多个外源 nhaA 基因,因此在第一泳道出现了较显著的约 41 kD 的 Nha A 蛋白带。

本实验获得的纯化 Nha A 蛋白将在蛋白质的三维立体空间构造以及细胞的 Na⁺/H⁺ 信号转导方面具有较高的研究价值;此外,纯化的 Nha A 蛋白还能用于免疫动物,从中获得免疫抗体,然后利用标记后的抗体作为探针,检测各种生物中 nhaA 基因的有无以及表达量的高低等,为筛选和培育耐盐作物提供理论依据。

参考文献 (References):

[1] Padan E, Venturi M, Gerchman Y, Dover N. Na⁺/H⁺ antiporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 501: 144 ~ 157.
 [2] Kape1 R, Okmi Y, Taglicht D. Sequencing of the gene at

- which affects the Na^+/H^+ antiporter activity in *Escherichia coli* J Biol Chem, 1988, 263 (21): 10408 ~ 10414.
- [3] Pinner E, Padan E, Schuldiner S. Cloning, sequencing, and expression of the nhaB Gene, encoding a Na^+/H^+ antiporter in *Escherichia coli* J Biol Chem, 1992, 267 (16): 11064 ~ 11068.
- [4] REN Zhong-Hai, MA Xiu-Ling, ZHAO Yan-Xiu, ZHANG Hui Na^+/H^+ Antiporter and Plant Salt Tolerance. Chinese J of Biotechnology, 2002, 18(1): 16 ~ 19.
任中海, 马秀灵, 赵彦修, 张慧. Na^+/H^+ 逆向转运蛋白和植物耐盐性. 生物工程学报, 2002, 18(1): 16 ~ 19.
- [5] DAIXiu-Yu, WU Da-Peng, ZHOU Jian. Cloning and expression of trehalase synthase genes in *Escherichia coli* Acta Genetica Sinica, 2000, 27(2): 158 ~ 164.
戴秀玉, 吴大鹏, 周坚. 大肠杆菌海藻糖合成酶基因的克隆和表达. 遗传学报, 2000, 27(2): 158 ~ 164.
- [6] XIE Guo-Sheng, LU Shen-Kui, Tetsuo Takano, YOU Zong-Bin, ZHANG Duan-Pin. Cloning and expression of VB12-independent methionine synthase gene responsive to alkaline stress in rice, Acta Genetica Sinica. 2002, 29(12): 1078 ~ 1084.
谢国生, 柳参奎, 高野哲夫, 尤宗彬, 张端品. 水稻中与盐碱适应性相关的 VB12 不依赖型蛋氨酸合成酶基因的克隆和表达. 遗传学报, 2002, 29(12): 1078 ~ 1084
- [7] LIDan, LU Guang-Xiu, FU Jun-Jiang, MO Ya-Qin, XNG Xiao-Wei, LU Gang. Molecular cloning and expression analysis of a novel human testis-specific gene. Acta Genetica Sinica, 2004, 31(6): 545 ~ 551.
李丹, 卢光秀, 傅俊江, 莫亚勤, 荆晓为, 刘刚. 一个新的人类睾丸特异基因的 cDNA 克隆和表达分析. 遗传学报, 2004, 31(6): 545 ~ 551.
- [8] ZHAO Guo-Ping ed. Bioinformatics. Beijing: Science Press. 2002.
赵国屏 主编. 生物信息学. 北京: 科学出版社, 2002.
- [9] LU Guang-Fa, TAN Jing, CHEN Qi-Wei Cloning and Expression of Mannitol-1-Phosphate Dehydrogenase Gene of *Pseudomonas* sp. cn4902. Oceanology et Limnology Sinica, 2004, 35(2): 183 ~ 188.
刘广发, 谭静, 陈启伟. 假单胞菌 (*Pseudomonas* sp. cn4902) 甘露醇-1 磷酸脱氢酶基因克隆及表达. 海洋与湖沼, 2004, 35(2): 183 ~ 188.
- [10] ZHAO Ke-Fu, LI Fa-Zeng eds. The Salt-Tolerant Plants in China. Beijing: Science Press, 1999.
- 赵可夫, 李法曾 主编. 中国盐生植物. 北京: 科学出版社, 1999.
- [11] LU Jun-Jun, PENG Xue-Xian, WANG Hai-Yun, MANG Ke-Qiang. Cloning, Sequencing and High Level Expression of mtd Gene and gud Gene from *Escherichia coli* Chinese J of Biotechnology, 1995, 11(2): 157 ~ 161.
刘俊君, 彭学贤, 王海云, 莽克强. 大肠杆菌 mtd 基因和 gud 基因的克隆、全序列测定和高效表达. 生物工程学报, 1995, 11(2): 157 ~ 161.
- [12] ZHANG Hui, DONG Wei, ZHOU Jun-Ma, DU Bao-Xing, GU Dong-Mei, CHEN Shou-Yi The cloning of levansucrase gene and its engineering of salt-tolerant tobacco plants. Chinese J of Biotechnology, 1998, 14(2): 181 ~ 186.
张慧, 董伟, 周骏马, 杜宝兴, 谷冬梅, 陈受宜. 果聚糖蔗糖转移酶基因的克隆及耐盐转基因烟草的培育. 生物工程学报, 1998, 14(2): 181 ~ 186.
- [13] WANG Yi-Qin, DAIXiu-Yu, WANG Yun-Xun, ZHOU Jian. Cloning and expression of otsA gene in *E. coli* Acta Microbiologica Sinica, 2000, 40(5): 470 ~ 474.
王忆琴, 戴秀玉, 王蕴恂, 周坚. 大肠杆菌 otsA 的克隆和表达. 微生物学报, 2000, 40(5): 470 ~ 474.
- [14] Kishor P B, Hong Z, Miao G H. Overexpression of delta-pyrroline-5- carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. Plant Physiol, 1995, 108: 1387 ~ 1394.
- [15] GUO Yan, ZHANG Li, XIAO Gang, CAO Shou-Yun, GU Dong-Mei, TAN Wen-Zhong, CHEN Shou-Yi Expression of betaine aldehyde dehydrogenase gene and salinity tolerance in rice transgenic plants Chinese Science (Ser C), 1997, 27(2): 151 ~ 155.
郭岩, 张莉, 肖岗, 曹守云, 谷冬梅, 田文忠, 陈受宜. 甜菜碱醛脱氢酶基因在水稻中的表达及转基因植株的耐盐性研究. 中国科学 (C 辑), 1997, 27(2): 151 ~ 155.
- [16] LU Feng-Hua, SUN Zhong-Xu, CUIDE-Cai, DU Bao-Xing, WANG Chun-Rong, CHEN Shou-Yi Cloning of *E. coli* mtd gene and its expression in transgenic *Balzhuangyang* (*Populus*). Acta Genetica Sinica, 2000, 27(5): 428 ~ 433.
刘风华, 孙仲序, 崔德才, 杜保兴, 王春荣, 陈受宜. 细菌 mtd 基因的克隆及在转基因八里庄杨中的表达. 遗传学报, 2000, 27(5): 428 ~ 433.
- [17] Ruiz T, Juan M. Engineering salt tolerance in crop plants. Trends in Plant Science, 2001, 6(10): 451.