

学校编号：10384
学 号：200126031

分类号：____ 密级：____
UDC：_____

学 位 论 文

假单胞杆菌 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因 (*nhaA*)克隆、鉴定与转化水稻初探

Cloning and identification of Na⁺/H⁺ antiporter gene
(*nhaA*) from *Pseudomonas* sp. & *Oryza sativa*
transformation

陈启伟

指导老师姓名：刘广发 副教授

申请学位级别：硕 士

专 业 名 称：生物化学与分子生物学

论文提交日期：2004 年 6 月

论文答辩日期：2004 年 6 月 30 日

学位授予单位：厦门大学

学位授予日期：

答辩委员会主席：郑天凌教授 博导

评阅人： 宋思扬 教授

陈新华 副研究员

2004 年 6 月

假单胞杆菌 $N_{2}+H_{2}$ 逆向转运蛋白基因 (nha) 克隆、鉴定与转化水稻初探

陈启伟

指导教师

刘广发

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文,是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果,均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人(签名):

年 月 日

目 录

一 . 中文摘要.....	1
二 . 英文摘要.....	3
三 . 前言.....	5
1 基因克隆策略研究进展.....	5
2 盐胁迫分子生物学研究进展.....	29
3 Na ⁺ /H ⁺ 逆向转运蛋白.....	44
四 . 材料与amp;方法.....	47
1 材料与设备.....	47
2 方法.....	52
五 . 结果与分析.....	64
1 假单胞杆菌耐盐相关基因 Na ⁺ /H ⁺ 逆向转运蛋白基因的克隆.....	64
2 <i>nhaA</i> 基因在大肠杆菌中有效表达.....	70
3 融合表达蛋白纯化及其 N 端分析.....	77
4 通过农杆菌介导 <i>nhaA</i> 基因转入水稻愈伤组织中.....	80
六 . 讨论.....	86
1 实验菌与耐盐相关基因的选择.....	86
2 <i>nhaA</i> 基因的高效表达.....	86
3 融合表达蛋白的纯化及其 N 端测序.....	87
4 本实验几个问题的探讨.....	88

七 . 参考文献.....	91
八 . 致谢.....	101

厦门大学博硕士学位论文摘要库

CONTENTS

一 . Chinese abstract.....	1
二 . English abstract.....	3
三 . Preface.....	5
1 Progresses of the gene clone strategy.....	5
2 Progresses of the molecular biology research on salt stress.....	29
3 Na ⁺ /H ⁺ antiporter protein.....	44
四 . Material and Methods.....	47
1 Material and instruments.....	47
2 Methods.....	52
五 . Results and Analysis.....	64
1 Cloning of <i>nha</i> A gene from <i>Pseudomonas</i> sp. cn 4902.....	64
2 Expression of <i>nhaA</i> gene in <i>E.coli</i> JM101.....	70
3 The purified Nha A protein and its amino acids of N termination	77
4 <i>nha</i> A gene transferred to the calli of <i>oryza sativa</i> mediated by <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	80
六 . Discussion.....	86
1 Selection of experimental bacterium and the gene related to salt tolerance.....	86
2 The expression of <i>nha</i> A gene.....	86
3 Purification of the fusion expression protein and its amino acids of N termination	87
4 Discussion of some problems in the experiments.....	88
七 . References.....	91
八 . Acknowledge.....	10

假单胞杆菌 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因(*nhaA*)克隆、鉴定与转化水稻初探

摘 要

Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 (Na^+/H^+ antiporter) NhaA (以下简称 NhaA) 具有逆浓度梯度向胞外或液泡转运 Na^+ 的特性, 从而使该生物或细胞能在较高的盐度下生存。根据原核基因无内含子的特点, 本实验参照大肠杆菌的 *nhaA* 基因的序列设计引物, 以极端嗜盐细菌假单胞杆菌 (*Pseudomonas* sp.cn 4902) 的总 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增出一新结构基因, 并将它克隆至 pMD18-T 载体上。测序结果表明: 该结构基因长 1089bp, 编码 362 个氨基酸。通过生物信息学方法, 经 GenBank 中 Blast 比较得知, 本序列与多种生物的 *nhaA* 基因高度同源, 与 *E. coli* iK12 的 *nhaA* 基因的同源性高达 98%。该基因已在 GenBank 登记, 代号为 AY643494。将该结构基因与 pBV220 质粒构建成大肠杆菌高效表达重组载体 pBVA。SDS-PAGE 电泳表明: 含 pBVA 的 *E. coli* JM101 转化子产生了较高浓度的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白, 分子量约为 41kDa, 与预期相符。通过生长曲线检测发现, 在含 NaCl 1.0mol/L 培养基中达到生长平衡期时, 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^+ 浓度约是对照菌 60.4%。经高温 42℃ 连续培养 18 代, 转化子中的重组质粒全部丢失, 其耐盐性随之回复到原水平。这些实验从多方面证实, 本文克隆的基因是假单胞杆菌的 *nhaA* 基因, 它的高效表达对提高受体细胞的耐盐性发挥了显著的作用。提取转化子的膜 (壁) 蛋白, SDS-PAGE 电泳结果表明 *nhaA* 基因的表达产物位于细胞膜 (壁) 上。

本实验还通过构建融合表达重组载体 pQEA, 使 *nhaA* 基因在融合表达载体中 pQE 中得到表达。利用离子柱层析纯化融合表达蛋白, 根据 pQE 上携带的 FXa 蛋白酶切位点进行蛋白酶切, 获得 *nhaA* 基因的表达蛋白。表达蛋白 N 端的 8 个氨基酸测序的结果与 *nhaA* 基因所推测的氨基酸序列完全一致。

为了使 *nhaA* 基因能在真核细胞中表达, 在该基因的 5' 端引入 35S 真核启动子, 构建植物双元表达重组质粒 pCA, 通过农杆菌介导的方法将 *nhaA* 基因转

入水稻愈伤组织中。利用 GUS 染色和 PCR 技术在抗羧苄青霉素 (Cb) 的水稻愈伤组织中发现该基因已经进入水稻愈伤组织中。

关键词：假单胞杆菌；*nhaA* 基因；耐盐性

厦门大学博硕士论文摘要库

Cloning and identification of Na⁺/H⁺ antiporter gene(*nhaA*) from *Pseudomonas* sp. & *Oryza sativa* transformation

Abstract

Na⁺/H⁺ antiporters are membrane proteins that play a major role in pH and Na⁺ homeostasis of cells throughout the biological kingdom, either pump Na⁺ out of the cells actively or translocate it from cytoplasm into vacuoles in the plant cells. This is one of the key reasons that bear responsibility for the organisms surviving in a high salinity environment. According to the essential character that no intron can be found in the genes of prokaryote, a pair of primer has been designed on the basis of the conserved sequence of Na⁺/H⁺ antiporter gene *nhaA* in *Escherichia coli*. The *nhaA* gene of halophilous *Pseudomonas* sp. cn 4902 has been amplified by PCR reaction of making use of its genomic DNA as template and inserted into pMD-18T vector. Sequence of this gene can be shown that it is 1089bp in length and codes for 362 amino acid residues. The nucleotide sequence and deduced amino acids of this gene share more than 90% homologies with *nhaA* gene of other organisms, especially for the *nhaA* from *E.coli* K12 that reaches as high as 98% by bioinformatics. The gene has been registered in GenBank by the accession number AY643494. Furthermore this gene was then subcloned to construct a high expression recombinant vector pBVA from pBV220 and transferred in *E.coli* JM101. An over expressed band of about 41kDa protein in the transformant was found after protein SDS-PAGE electrophoresis, indicating that it was coincided with the foreign expressed gene. The detection of growth curve showed that the biomass of the transformant is 2.3 times of the control in the liquid medium containing 1.0mol/L NaCl. It was found that Na⁺ concentration in cytoplasm of the transformant is low to 60.4% of control by the detection of atomic absorption spectrum, because of active transporting Na⁺ out of the cell membrane by the membrane fusion exporter, NhaA. After continuously cultivating for 18 generations under 42 hot shock (9d), all the transformants lost their reconstructed plasmids with the result that salt-tolerance-level went back to the original standard. In summary, all the experiments prove that the cloned gene mentioned above is *nhaA* gene of *Pseudomonas* sp. cn 4902. Evidence of SDS-PAGE electrophoresis of membrane protein also showed that the NhaA was located in membrane.

Purified NhaA has been harvested by ionic chromatographic column and

digested by FXa proteinase. This protein sequence of eight amino acids in N termination is entirely accordant with the sequence deduced from *nhaA* gene we cloned.

In order to transfer the *nhaA* gene into eukaryotic cell, a 35S promoter was adhibited in 5' end of the gene and form a reconstructed plasmid pCHA in *Agrobacterium rhizogenes*, then it was transferred into the calli of *Oryza sativa*. Nowadays the foreign gene could be detected by GUS staining in the function and PCR amplification in the calli resisting to Carbenicillin (Cb).

Key words: *Pseudomonas* sp.cn 4902; *nhaA* gene; salt tolerance

前 言

1 基因克隆策略研究进展(progresses of the gene clone strategy)

自从上世纪八十年代以来，随着现代分子生物学技术的迅猛发展以及科学家对基因本质的深入探究，陆续有一些科学家提出将多种优良经济性状的基因汇聚在同一生物体中，创造出具有高度应用价值的新品种的设想。为此，必须从现有的生物基因库中，根据需要克隆出目的基因，才能得到改良的物种，造福于人类。近年来随着生物技术的发展，克隆目的基因的方法和手段也越来越多，从早期简单的物理化学方法发展到现在的基因组减法技术、转座子标记技术、基因组定位、标记技术和 cDNA 微列阵技术等等^[1~3]，下面我们对各种方法作一简单介绍。

1.1 物理化学法(The physical and chemical clone)

在基因工程在发展初期，许多科学家利用不同基因片段物理化学性质的差异来分离目的基因。众所周知，DNA 分子的两条链存在着 GC、AT 碱基配对，其中 GC 间存在 3 个氢键、AT 间存在两个氢键。由于不同基因片段 GC 含量不同，导致其物理化学性质也不同，GC 含量越高，浮力密度越大，解链温度也随之升高。通过密度梯度离心或单链酶解法即可能达到分离基因的目的。此外，也可利用酶化学方法，根据目的基因两端限制性内切酶的酶切位点，酶切后，再经电泳及分子量大小分析等方法，也可能获得目的基因。

1.1.1 密度梯度离心法 由于富含碱基 GC 的双链 DNA 片段浮力密度较大，利用精密的密度梯度超速离心技术可使切割成适当片段的不同 DNA

按密度大小分离开来。然后通过与某种放射性标记的 mRNA 杂交来检测、分离相应的基因。

1.1.2 单链酶解法 DNA 分子中某基因片段 GC 碱基含量高,则该片段热稳定性高,解链温度(T_m 值)就高,因此可以通过控制解链温度使富含 AT 区域变性解链,而富 GC 区域仍维持双链状态,然后利用单链核酸酶 S1 酶切除解开的单链部分,得到富 GC 区域的片段^[4]。

1.1.3 限制性内切酶酶切分离法 这种方法适用于从原核简单基因组中分离目的基因,对已知定位的目的基因,只要根据目的基因两侧的已知的限制性核酸内切酶的识别位点,用适当的限制性核酸内切酶切割和琼脂糖凝胶电泳分离即可能获得目的基因,不过该方法克隆基因的精确度不高。目前已陆续有一些原核生物全基因组测序的报道,这为借助该方法分离目的基因创造了有利条件。

1.1.4 化学合成法 由于核苷酸是一个多功能团的化合物,在 3'-5'磷酸二酯键连接反应中除了特定的基团会发生反应外,其它如核糖和磷酸羟基、碱基上的氨基等基团也会参加反应产生错接等,从而降低真正需要的产物的得率并影响产物的分离纯化。因此,在 DNA 化学合成中总是将暂时不需要的基团保护起来,并在下一轮缩合反应之前将这些保护基有选择地除去,这样不断迅速地形成专一的 3'→5'磷酸二酯键特定核苷酸排列。

1.2 杂种细胞克隆法 (The hybrid-cell cloning)

杂种细胞克隆法,又叫核不均一 RNA 法(hnRNA approach)。该法常用于人类基因克隆。人类基因在人-仓鼠体细胞杂合体中的含量一般小于总 DNA 量的 1%。在人基因的内含子部分及 3' 端非转录区大都含有

特异的 *Alu* 重复序列，成熟 mRNA 中此类重复序列极少。用未成熟的 hnRNA 可增加鉴定出 *Alu* 序列的可能性，所以 mRNA 的前体 hnRNA 可以用来克隆人类基因。

(1) 用 *Alu* PCR 法扩增 hnRNA 得到 cDNA 即先合成第一链 hn cDNA，然后以 *Alu* 重复保守区衍生而来的两个方向相反的寡核苷酸做引物，分别合成 hn cDNA。由此得到的 cDNA 80% 来源于人类基因^[5]。

(2) 采用引物从 hnRNA 合成 cDNA，再用人类总基因组 DNA 作探针鉴别出人类基因。其引物是用与内含子 3' 剪接位点对应的六聚寡核苷酸或任意的六聚寡核苷酸(4 个六聚体)，用它们对杂种细胞中的 hnRNA 进行 cDNA 合成，构建一个 cDNA 文库，并以该文库为工具，从人类基因组文库中筛选人类基因转录的序列^[6]。

利用杂种细胞克隆法可快速地从具人类某号染色体或染色体片段的杂种细胞中分离出转录序列，并可用 PCR 扩增该序列，从而大大促进了对人类给定区域基因的分离步骤。

1.3 DNA 插入诱变法(The DNA-inserted mutation)

DNA 插入诱变法主要用于植物目的基因的克隆分离研究。其基本原理是：当一段特定的 DNA 序列插入到植物基因的内部或其邻近位置时，一般会诱导该基因发生突变并形成突变体植株，或者在插入位置产生一个新的基因。如果该 DNA 插入序列是已知的，便可用它作为 DNA 分子探针，从突变植株的基因组 DNA 文库中筛选到突变基因片段。然后再利用此突变基因片段制备探针，从野生型植株的基因组文库中克隆出野生型的目的基因。这样插入的 DNA 序列相当于在植物基因上贴一张标签，

因此 DNA 插入诱变法又叫 DNA 标签法。

1.4 消减杂交法(The subtractive hybridization)

消减杂交法^[7]的原理是：从两组对应的细胞群体中提取 mRNA，把其中一组逆转录成 cDNA，相互杂交后用 DNA 多聚酶合成 cDNA 第二条链，随后克隆到质粒中，建立筛选后 cDNA 文库。杂交 cDNA 及单链 mRNA 因不能克隆到质粒中而被筛选去掉。它是利用 DNA 复兴动力学原理来富集一个样品中有而另一个样品中无的 DNA，相同来源的细胞或组织中的 RNA 与 cDNA 之间、cDNA 与 cDNA 之间可以进行杂交，当某一类型细胞中某一目的基因不表达或缺失，而在另一类细胞中则正常表达或没有发生缺失，那么当把其中一种类型细胞的单链 cDNA 与另一类型细胞中的 mRNA 或单链 cDNA 进行杂交时，在两种细胞中都表达的 mRNA 就会形成 cDNA-mRNA 或者 cDNA-cDNA 杂交体，而目的基因或缺失的基因则仍保持单链状态。单链 cDNA 可通过羟基磷灰石柱层析或 oligo-dA 柱层析的方法得到分离，然后用随机引物法合成第二链或筛选 cDNA 文库，从而构建目的基因的消减文库。经过多轮变性和复姓，样品中特异性目的 DNA 序列得以富集，或用 PCR 进行体外扩增，通过遗传分析验证富集的克隆 DNA。

消减杂交法对检测有转录活性的基因很灵敏、有效，在医学研究领域可以对引发表型异常或染色体缺失的疾病的基因进行克隆。Monaco 等（1985）利用此方法克隆得到了人的杜兴氏肌营养不良基因（*dmd*）^[8]。

1.5 相同序列克隆法(The coincident sequence clone)

所谓相同序列克隆法是借助 PCR 从部分重叠的 DNA 片段中扩增共

有序列的方法^[9]，主要用来克隆两个靶 DNA 中均存在的基因 DNA 或 cDNA 序列。一个靶基因的 DNA 用限制性内切酶消化后克隆到 M13 中，产生单链而且带有粘性末端的 DNA。让“捕获”寡核苷酸与这些单链 DNA 退火；另一个靶基因的 DNA 用同样限制性内切酶消化，经碱变性后与第一个靶基因的 DNA 杂交，只有那些在两个靶 DNA 中都存在的 DNA 才会形成两端带有“捕获”寡核苷酸的双链 DNA，然后用 PCR 进行扩增并构建文库。利用相同序列克隆法把含有某一条人类染色体或染色体片段的杂种细胞株 DNA 与整个人类基因组 DNA 杂交，可以得到任一染色体或染色体片段特异性的基因组 DNA 或 cDNA 序列。

1.6 差异显示法(The differential display clone)

1.6.1 mRNA 差异显示法 mRNA 差异显示法又称差异显示反转录 PCR，是由 P. Liang 和 A. B. Pardee 于 1992 年在 PCR 技术基础上建立的一种分离、鉴定差异表达基因的方法，具有与 PCR 技术相似的简单、快捷和高效等特点^[10]。利用该技术，目前已有越来越多的差异表达基因得以分离和鉴定，在分子生物学和基因工程研究领域发挥了极大的作用。1999 年林慧馨^[11]利用培养于不同盐浓度下的巴氏杜氏藻 (*D. bardawil*) 作为克隆耐盐基因材料，通过 DDRT-PCR 获得了 424bp 的该藻叶绿体 ATP 合成酶亚基的基因片段。

1.6.2 代表性差异分析法 代表性差异分析技术^[12]是通过突变型（驱赶 DNA，Driver）与野生型（检测 DNA，Tester）基因组之间的差异比较来分离和鉴定突变基因的方法。以野生型基因组 DNA 为 Tester，突变型 DNA 为 Driver，可获得缺失序列；相反以突变型 DNA 为 Tester，野生型

DNA 为 Driver 可获得重排和扩增的基因。该方法的主要步骤有：

(1) 检测 DNA 和驱赶 DNA 的制备：正常或突变基因 DNA 经限制性内切酶作用后，连上含有该酶酶切位点的接头制成检测 DNA；异常或正常基因组 DNA 切下接头后，不再连上另组接头制成驱赶 DNA。这样检测 DNA 和驱赶 DNA 代表了基因组 DNA 的一部分，且由一系列小片段 DNA 组成，降低了基因组 DNA 的复杂度，使下步杂交快速和有效；

(2) 液相杂交：检测 DNA 和驱赶 DNA 按一定的比例，在适当的缓冲体系中高温变性，中温长时间复性后，90%的单链 DNA 都复性成稳定的双链结构，出现四种情况的组合 DNA 片段：检测 DNA 中仅有的片段自身复性，检测 DNA 和驱赶 DNA 复性形成异源双链，驱赶 DNA 自身复性以及一些仍处于单链状态的检测 DNA 和驱赶 DNA；

(3) 特异片段的富集：在上述四种组合的 DNA 片段中，经核酸酶处理除去单链 DNA，只有检测 DNA 两端带有接头，填平后，以填平的末端为引物的结合点，以原接头为引物进行 PCR 扩增，扩增产物正是检测 DNA 有的而驱赶 DNA 中缺失的 DNA 片段。以此 PCR 产物为检测 DNA 再次与过量的驱赶 DNA 杂交，重复三轮杂交后即能充分富集出驱赶 DNA 中缺失的片段。

1.6.3 基因组错配扫描技术 基因组错配扫描技术是通过比较两个个体间的基因组，进而克隆两个基因组间的相同序列。其依据的原理是：如果具有亲缘关系的不同个体具有相同的表型，那么该表型与其从同一远祖遗传来的基因必定相关，即两个个体具有相同的决定该表型的基因或者连锁的标记。因此，将两个个体的基因组 DNA 用限制性内切酶消化后，

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库