

# 柴达木盆地梭梭 *NHX* 基因的克隆及其编码蛋白的结构预测

马玉花, 冶贵生, 龙晓晨, 马娟, 冶桂莲

(青海大学 农牧学院, 青海 西宁 810016)

**摘要:**对柴达木盆地梭梭的 *NHX* 基因进行扩增, 并利用生物软件对 *NHX* 基因序列进行分析, 对蛋白结构进行预测。结果表明: 柴达木盆地梭梭 *NHX* 基因长度 1 677 bp, 编码 559 个氨基酸。 *NHX* 蛋白预测显示柴达木盆地梭梭 *NHX* 蛋白定位于液泡膜, 二级结构主要为  $\alpha$  螺旋和无规则卷曲, 具有 4 个 N-糖基化位点, 1 个 cAMP、cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点, 8 个蛋白激酶 C 磷酸化位点, 8 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点, 9 个 N-豆蔻酰基化位点及 1 个亮氨酸拉链模型。此外 *NHX* 蛋白的亲水性较弱, 具有 12 个跨膜螺旋区。三维结构预测显示 *NHX* 蛋白三维结构均主要由  $\alpha$  螺旋和无规则卷曲互相盘绕而成, 含有少量  $\beta$  折叠, 研究结果为下一步柴达木盆地梭梭 *NHX* 基因的表达特性及功能研究提供了依据。

**关键词:**梭梭; *NHX* 基因; 序列分析; 蛋白结构

**中图分类号:**S718.43      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2016)03-0086-05

Gene Analysis, Protein Prediction of *NHX* of *Haloxylon ammodendron* of Qaidam Basin

MA Yu-hua, YE Gui-sheng, LONG Xiao-chen, MA Juan, YE Gui-lian

(Institute of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016, China)

**Abstract:** *NHX* gene of *Haloxylon ammodendron* in Qaidam Basin was amplified by PCR and its protein structure was predict by biology software. The results showed that the length of the *NHX* gene and *NHX* protein were 1 677 bp and 559 aa respectively. *NHX* protein located in vacuole membrane,  $\alpha$ -helix and random coil were the main secondary structure. It had 4 N-glycosylation sites, 1 cAMP, cGMP- dependent protein kinase phosphorylation site, 8 protein kinase C-phosphorylation sites, 8 casein kinase II phosphorylation sites, 9 N-nutmeg acylation sites and 1 Leucine zipper model. *NHX* protein had a weaker hydrophilicity, and it had 12 transmembrane structures. The tertiary structure prediction showed the main tertiary structure of *NHX* protein included  $\alpha$ -helix and random coil, and a small amount of  $\beta$  fold. The results would lay a foundation for the further research of expression characteristics and functions of *NHX* gene of *H. ammodendron*.

**Key words:** *Haloxylon ammodendron*; *NHX* gene; sequence analysis; protein structure

梭梭 (*Haloxylon ammodendron*) 为藜科 (Chenopodiaceae) 梭梭属 (*Haloxylon*) 超旱生盐生小乔木或大灌木。梭梭广布于青海柴达木地区, 具有抗旱、耐盐碱等生态适应特征<sup>[1]</sup>, 是柴达木盆地旱生、盐生荒漠植被组成成分的主体, 也是寒冷干旱的荒漠或半荒漠区生态恢复的优良树种<sup>[2]</sup>。梭梭具有很强的耐盐力, 能忍受 6% 甚至更高浓度的 NaCl 溶

液, 其盐分含量占灰分含量的 57.78%<sup>[3]</sup>。在高盐环境中  $\text{Na}^+$  的吸收、转运和区室化作用是植物生存的关键因素<sup>[4-5]</sup>, 耐盐植物通过  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  反向转运蛋白将  $\text{Na}^+$  转运到液泡中或从胞质中转运到胞外, 从而避免  $\text{Na}^+$  毒害并保持离子平衡。梭梭在盐胁迫下主要通过离子区室化作用进行渗透调节, 因此,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  反向转运蛋白对梭梭耐盐性具有重要贡

献,甘晓燕<sup>[6]</sup>等对内蒙古阿左旗巴丹吉林沙漠的梭梭 *NHX* 基因进行了克隆及表达分析,但目前对青海省柴达木盆地梭梭 *NHX* 基因及其编码蛋白的结构预测方面的研究尚未见报道。本研究在柴达木盆地梭梭 *NHX* 基因核苷酸序列克隆的基础上,对 *NHX* 基因的核苷酸序列和氨基酸序列进行了分析,在此基础上对 *NHX* 蛋白的亚细胞定位、二级结构、三级结构、功能位点及跨膜区进行了预测,以期为进一步 *NHX* 基因的表达特性研究奠定基础。

## 1 材料与方法

供试梭梭的种子采自青海省柴达木盆地,实验室育苗后取同化枝提取总 RNA。RNA 提取试剂盒为北京艾德来生物技术有限公司产品,ExTaq DNA 聚合酶、反转录酶、DL2000 DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司。

参照试剂盒说明提取梭梭总 RNA。根据已发表的 *NHX* 基因序列设计扩增引物,由大连宝生物工程有限公司合成,预期目的片段长度为 1 677 bp。引物序列为: *NHX*-F: 5'-AAGTAG GTCGCTA-AGAGGAG-3', *NHX*-R: 5'-GTAGGTGCATT-TAGAAGCATG-3'。RT-PCR 过程为取梭梭总 RNA 5  $\mu$ L, *NHX*-R 4  $\mu$ L, DNTP Mixture 3  $\mu$ L, RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 3  $\mu$ L, 70℃ 预热 5 min,立即冰浴 2 min,加入 5 倍的反转录缓冲液 4  $\mu$ L,反转录酶 1  $\mu$ L,置于 42℃ 水浴 50 min, 95℃ 5 min,补加 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 至总体积为 50  $\mu$ L。PCR 扩增程序为: 94℃ 1 min, 52.5℃ 1 min, 72℃ 2 min, 35 个循环, 72℃ 10 min。将扩增正确的 PCR 产物送交生物公司进行序列测定, DNASTAR 软件进行序列分析并预测蛋白的二级结构和亲水性, Signal4.1 进行信号肽分析, TMHMM 进行蛋白跨膜螺旋区分析, Predictprotein 进行细胞定位及蛋白修饰位点分析, I-Tasser 在线服务器预测蛋白的三级结构。

表 1 *NHX* 基因核苷酸序列分析

Table 1 Nucleotide sequence analysis of <i>NHX</i> gene						
指标	A	G	T	C	A+T	C+G
含量/%	24.57	21.47	32.74	21.23	57.30	42.70
碱基数	412	360	549	356	961	716

2.3.2 氨基酸序列分析 推导的 *NHX* 氨基酸序列经 DNASTAR 软件分析后结果(表 2)表明,氨基酸序列长度为 559 aa,分子重量为 62 031.3 D,等电点为 6.77。各类氨基酸中碱性和酸性氨基酸的含量分别为 10.2%和 7.5%,疏水性和亲水性氨基酸的含量分别为 49.4%和 32.9%。

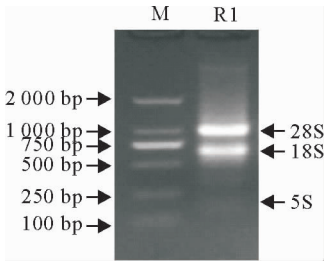
## 2 结果与分析

### 2.1 梭梭总 RNA 提取

提取的梭梭总 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 1)表明, RNA 所在泳道目的条带中 28S 和 18S 条带明亮、清晰,提取的总 RNA 可以满足后续试验的要求。

### 2.2 梭梭 *NHX* 基因 PCR 扩增

将 *NHX* 基因的 PCR 产物进行电泳,结果(图 2)表明 *NHX* 基因所在泳道出现目的条带,大小与预期的 1 677 bp 长度相符。



注: M. Marker; R. RNA。

图 1 柴达木盆地梭梭总 RNA 电泳图

Fig. 1 Total RNA of *Haoxylon ammodendron*

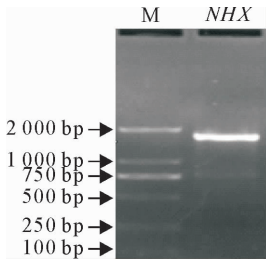


图 2 *NHX* 基因 PCR 产物电泳图

Fig. 2 Amplified results of *NHX* gene

### 2.3 *NHX* 基因核苷酸序列和氨基酸序列分析

2.3.1 核苷酸序列分析 *NHX* 基因序列经 DNASTAR 分析(表 1)可见 *NHX* 基因长度为 1 677 bp,腺苷酸的含量较高,达到 32.74%,整个基因序列中 A+T 的含量高于 G+C 的含量。

表 2 *NHX* 氨基酸序列分析

Table 2 Amino acid sequence analysis of <i>NHX</i>				
指标	碱性氨基酸	酸性氨基酸	疏水性氨基酸	亲水性氨基酸
数量/个	57	42	276	184
氨基酸种类	K, R	D, E	A, I, L, F, W, V	N, C, Q, S, T, Y

2.3.3 柴达木盆地梭梭 *NHX* 基因与参考基因核苷酸序列和氨基酸序列比较结果 将获得的柴达木盆地梭梭 *NHX* 基因与 GenBank 中登录的梭梭、滨藜 (*Atriplex halimus*)、灰绿藜 (*Chenopodium glaucum*)、盐穗木 (*Halostachys caspica*)、盐爪爪 (*Kalidium foliatum*)、冰叶日中花 (*Mesembryanthemum crystallinum*)、盐角草 (*Salicornia europaea*)、无翅猪毛菜 (*Salsola komarovii*)、海马齿

(*Sesuvium portulacastrum*)、灰叶碱蓬 (*Suaeda pruinosa*) 等植物的 *NHX* 基因核苷酸与氨基酸序列进行比较,结果(图 3、图 4)表明柴达木盆地梭梭与其他植物 *NHX* 基因序列间存在着丰富的变异,其核苷酸和氨基酸序列的同源性分别为 81.2%~94.3%和 81.4%~89.1%,与已登录的梭梭 *NHX* 基因核苷酸序列同源性为94.3%,存在着丰富的变异,但是其氨基酸序列同源性 100%,无突变发生。

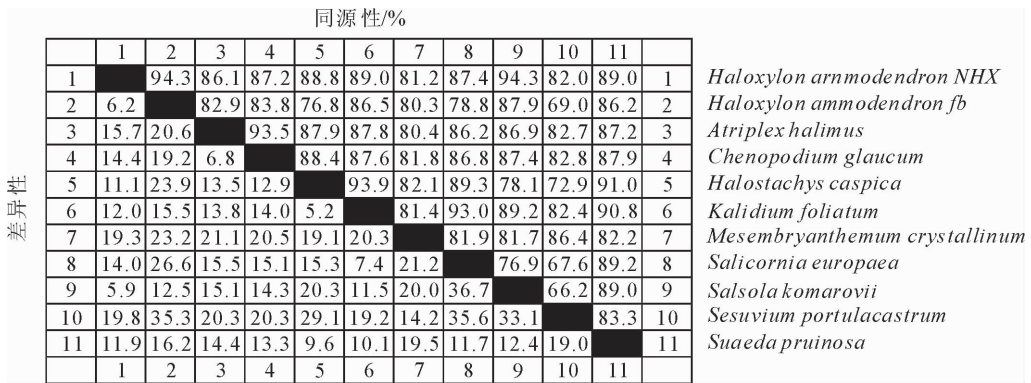


图 3 NHX 基因核苷酸序列同源百分比  
Fig. 3 Percentage homology of NHX gene



图 4 NHX 蛋白氨基酸序列同源百分比  
Fig. 4 The percentage homology of NHX protein

2.4 NHX 蛋白结构预测

2.4.1 NHX 蛋白亚细胞定位 梭梭 *NHX* 蛋白用 Predictprotein 进行蛋白的亚细胞定位,预测结果(图 5)可见梭梭 *NHX* 蛋白亚细胞定位于液泡膜,表明 *NHX* 蛋白可能在液泡中发挥功能。

2.4.2 NHX 蛋白二级结构预测 predictprotein 预测二级结构结果显示,梭梭 *NHX* 蛋白二级结构中  $\alpha$  螺旋占 62.43%, $\beta$  折叠占 5.01%,无规则卷曲占 32.56%,可见  $\alpha$  螺旋和无规则卷曲是二级结构的主要构成元件。

SignalP4.1 预测 *NHX* 蛋白信号肽,结果表明该蛋白不含信号肽,可能为膜蛋白。功能位点预测表明 *NHX* 具有 4 个 N-糖基化位点,分别为 51~55 位的 NESI,294~297 位的 NVTE,369~372 位的

邻域: 古细菌 细菌 真核生物



GO ID:GO0005774,预测可信度74

图 5 梭梭 *NHX* 蛋白亚细胞定位

Fig. 5 Protein subcellular localization of NHX protein

NFSK,554~557 位的 NLTQ,其糖基化的连接点均为天冬酰胺且糖基化的连接点均为天冬酰胺;1 个 cAMP、cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点,372

~375 位 KKSS;8 个蛋白激酶 C 磷酸化位点,分别为 251~253 位 TDR,298~300 位 SSR,302~304 位 TTK,371~373 位 SKK,376~378 位 SEK,464~466 位 SPK,506~508 位 SLR,556~558 位 TQR;8 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点,分别为 11~14 位 SNMD,17~20 位 STSD,205~208 位 THID,251~254 位 TDRE,374~377 位 SSSE,458~461 位 TVSD,490~493 位 THHD,546~549 位 SPTD;9 个 N-豆蔻酰基化位点,分别为 60~65 位 GLATGV,72~77 位 G GKSSH,118~123 位 GAL-

GTL,154~159 位 GAIFAA,230~235 位 GAMT-GL,284~289 位 GIVMSH,340~345 位 GTSV-AV,391~396 位 GLMRGA,463~468 位 GSP-KAF;此外 *NHX* 基因在 257~278 位 (LMMLMAYLSY MLAELFY LSGIL)形成了 1 个亮氨酸拉链模型。

Kyte-Doolittle 方法预测结果(图 6)显示,*NHX* 蛋白的亲水性较弱,分布区域较少,可见该蛋白疏水性较强,具有多个连续疏水区,具有跨膜蛋白疏水性较强的特征。

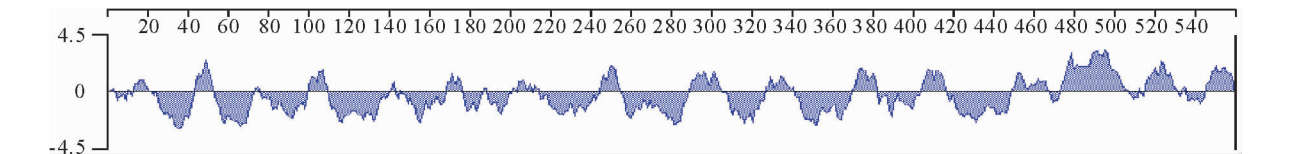


图 6 梭梭 *NHX* 蛋白亲水性分析  
Fig. 6 Hydrophilicity plot of *NHX* protein

MHMM 预测梭梭 *NHX* 基因跨膜区结果(图 7)显示 *NHX* 蛋白具有 12 个跨膜螺旋的结构;另外,柴达木盆地梭梭 *NHX* 跨膜蛋白的 N-端和 C-段均在膜外。

采用 I-Tasser 在线软件对柴达木盆地梭梭 *NHX* 蛋白进行蛋白三维结构的预测。结果(图 8)显示,所得模型的 C-score 达到了-1.67,说明所建模型可信度高,蛋白三维结构主要由  $\alpha$  螺旋和无规则卷曲互组成,含有少量  $\beta$  折叠。

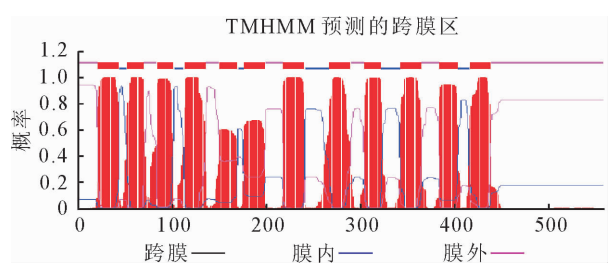


图 7 梭梭 *NHX* 蛋白跨膜结构域  
Fig. 7 Transmembrane structure of *NHX*

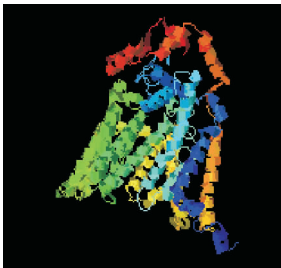


图 8 梭梭 *NHX* 蛋白三维结构  
Fig. 8 The 3D structure of *NHX*

### 3 结论与讨论

本研究获得的柴达木盆地梭梭 *NHX* 基因总

长 1 677 bp,编码 559 个氨基酸,序列比对分析表明柴达木盆地梭梭 *NHX* 基因与已发表的内蒙古巴丹吉林沙漠梭梭 *NHX* 基因的核苷酸序列同源性为 94.3%,存在一定的差异性,但其 *NHX* 氨基酸序列同源性 100%<sup>[6]</sup>,可见虽然不同地区的梭梭 *NHX* 基因在核酸水平存在着一定的变异,但由于密码子的兼并性,变异均为同义突变,不同地区梭梭 *NHX* 基因的氨基酸序列完全一致,无氨基酸的突变发生,既保证了不同环境下基因的一定程度的变异,也保证了蛋白结构的稳定和功能的正常发挥。

在蛋白质二级结构中,由于  $\alpha$  螺旋含有氢键不易形变,且其一侧由亲水性氨基酸组成,而另一侧则多由疏水性氨基酸组成,因此使蛋白质具有两亲的性质,即  $\alpha$ -螺旋的亲水侧形成空桶状结构,以使离子跨膜运输,而疏水的一侧则通过疏水键与脂质双分子层的磷脂作用而将蛋白固定在膜上,从而构成了稳定的跨膜结构域以执行离子运输的功能。 $\alpha$  螺旋为梭梭 *NHX* 蛋白二级结构的主要构成元件,符合 *NHX* 蛋白作为离子转运蛋白的功能特点。

A. Ratner<sup>[7]</sup>等最初在大麦中发现了  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白的活性,并发现其定位于质膜,E. Blumwald<sup>[8]</sup>等后来也在甜菜的液泡膜上发现了 *NHX* 蛋白。柴达木盆地梭梭 *NHX* 蛋白定位预测结果其定位于液泡膜上。液泡在植物细胞中起着储存营养物质和维持渗透压的重要作用,而 *NHX* 蛋白定位于膜上符合这类蛋白在细胞内负责离子转运的功能的要求。此外,定位于液泡膜使 *NHX* 蛋白具有将  $\text{Na}^+$  区隔化到液泡中,保持细胞中  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  稳态及调节 pH 的作用,符合液泡作为渗透调节器而发挥作用的特征<sup>[5,9]</sup>。

柴达木盆地梭梭 NHX 蛋白亲水性较弱,而疏水性较强,具有多个连续疏水区,这些疏水区形成跨膜结构域,与磷脂双分子层的疏水结构紧密结合,从而形成跨膜通道进行离子转运,符合跨膜蛋白具有跨膜蛋白疏水性较强的特征。跨膜区预测显示 NHX 蛋白具有 12 个跨膜螺旋结构,与 NHX 蛋白具有 10~12 个跨膜区一致<sup>[10-12]</sup>,但与内蒙古巴丹吉林沙漠梭梭 NHX 蛋白含有 9 个跨膜区域的结果不一致<sup>[6]</sup>。可见,不同地域梭梭 NHX 蛋白的跨膜区域数目存在着差异。柴达木盆地梭梭 NHX 蛋白的 12 个跨膜结构中包含了并没有完全跨过液泡膜的 2 个结构域,而这 2 个跨膜结构域是液泡型 NHX 蛋白活性的重要结构域,可与 Na<sup>+</sup> 结合<sup>[12-13]</sup>。

功能位点预测显示柴达木盆地梭梭 NHX 蛋白具有 4 个 N-糖基化位点,说明柴达木盆地梭梭可能通过 NHX 蛋白的糖基化实现蛋白的翻译后调控,并参与细胞信号识别等生命过程<sup>[14]</sup>;另外含有多个蛋白激酶磷酸化位点,说明梭梭 NHX 蛋白可在离子转运过程中通过磷酸化和去磷酸化的作用实现在膜内外两侧对所运输离子的亲和力的改变,从而完成离子的跨膜运输。此外柴达木盆地梭梭有 9 个豆蔻酰基化位点,该位点为结合豆蔻酸的位点,且在动植物中具有高度保守性<sup>[15-16]</sup>。可见柴达木盆地梭梭可能通过 NHX 蛋白的糖基化、磷酸化、豆蔻酰化等多种修饰对该蛋白的结构及功能进行调控,从而实现 Na<sup>+</sup> 的转运。

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白与植物耐盐性有着密切的关系,将液泡膜 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白基因导入拟南芥等植物并在植物中过量表达可提高植物的耐盐性<sup>[17-19]</sup>,但柴达木盆地梭梭 NHX 基因能否提高转基因植物的耐盐性以及与其他植物 NHX 基因提高转基因植物耐盐性的比较等还需进一步研究。

参考文献:

[1] 郑婷婷,李生字,靳正忠,等. 4 种固沙植物在塔克拉玛干沙漠腹地的水势特征[J]. 西北林学院学报,2011,26(3):21-25.  
ZHENG T T,LI S Y,JIN Z Z,*et al.* Characteris tics of water potential of four kinds of plants in the Taklimakan Desert[J]. Journal of Northwest Forestry University,2011,26(3):21-25. (in Chinese)

[2] 杜坤,王军辉,贾子瑞,等. 青藏高原 16 个灌木树种苗期生长特性研究[J]. 西北林学院学报,2014,30(5):7-11.  
DU K,WANG J H,JIA Z R,*et al.* Growth characteristics of 16 shrub species at seeding stage in the Qinghai-Tibet Plateau[J]. Journal of Northwest Forestry University,2014,30(5):7-11. (in Chinese)

[3] 张兆铭,李得禄. 梭梭属 2 种植物种子萌发时的耐盐性试验研究[J]. 甘肃林业科技,2009,32(2):12.

[4] BLUMWALD E,AHARON G S,APSE M P. Sodium transport in

plant cells[J]. Biochim. Biophys. Acta,2000(1465):140-151.

[5] APSE M P,BLUMWALD E. Na<sup>+</sup> transport in plants cells[J]. FEBS Lett. ,2007(581):2247-2254.

[6] 甘晓燕,石磊,陈虞超,等. 梭梭 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白基因克隆及分析[J]. 西北植物学报,2012,32(2):225-230.

[7] RATNER A,JACOBY B. Effect of K<sup>+</sup> its cournter anion and pH on sodium efflux from barley roots[J]. J. Exp. Physiol. ,1976,148:425-433.

[8] BLUMWALD E,POOLE R J. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris*[J]. Plant Physiol. ,1985,78(1):163-167.

[9] JIANG X Y,LEIDI E O,PARDO J M. How do vacuolar NHX exchangers function in plant salt tolerance[J]. Plant Signaling and Behavior,2010,5(7):792-795.

[10] SARDET C,FRANCHI A,POUYSSSEGUR J. Molecular cloning,primary structure and expression of the human growth factor-activatable Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter[J]. Cell,1989,56(2):271-280.

[11] 关宁,李聪,王涌鑫,等. 毛偃麦草 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白的分子克隆及生物信息学分析[J]. 分子植物育种,2009,7(1):169-176.  
GUAN N,LI C,WANG Y X,*et al.* Molecular cloning and bioinformatics analysis of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene in *Elytrigia trichophora*[J]. Molecular Plant Breeding,2009,7(1):169-176. (in Chinese)

[12] 唐欣,王瑞辉,杨秀艳,等. 唐古特白刺液泡膜 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向运输蛋白基因 *NtNHX1* 的克隆与表达分析[J]. 林业科学,2014,50(3):38-44.  
TANG X,WANG R H,YANG X Y,*et al.* Isolation and expression analysis of a vacuolar membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene *NtNHX1* from *Nitraria tangutorum*[J]. Scientia Silvae Sinicae,2014,50(3):38-44. (in Chinese)

[13] 张雨良,张智俊,杨峰山,等. 新疆盐生植物车前 *PmNHX1* 基因的克隆及生物信息学分析[J]. 中国生物工程杂志,2009,29(1):27-33.

[14] HELENIUS A,AEBI M. Intracellular functions of N-linked glycans[J]. Science,2001,5512:2370.

[15] WELLS L,VOSELLER K,HART G W. Glycosylation of nucleocytoplasmic protein:signal transduction and O-GlcNAc[J]. Science,2001,5512:2376.

[16] DARLEY C P,VAN WUYTSWINKEL O C,VAN DER WOUDE K,*et al.* *Arabidopsis thaliana* and *Saccharomyces cerevisiae* NHX1 genes encode amiloride sensitive electroneutral Na<sup>+</sup> H<sup>+</sup> exchangers[J]. Biochem. J. ,2000,351:241-249.

[17] CHEN L H,ZHANG B,XU Z Q. Salt tolerance conferred by overexpression of *Arabidopsis* vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene *AtNHX1* in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) [J]. Transgenic Research,2008,17(1):121-132.

[18] JIANG C Q,ZHENG Q S,LIU Z P,*et al.* Overexpression of *Arabidopsis thaliana* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene enhanced salt resistance in transgenic poplar (*Populus×euramericana* ‘Neva’) [J]. Trees,2012,26(3):685-694.

[19] YARRA R,HE S J,ABBAGANI S,*et al.* Overexpression of a wheat Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene (*TaNHX2*) enhances tolerance to salt stress in transgenic tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture,2012,111(1):49-57.