



拟南芥*AtNHX5* 基因启动子的克隆和组织定位分析

李静雯, 厚毅清, 陈 军, 朱天地

(甘肃省农业科学院 生物技术研究, 兰州 730070)

摘 要 为了探明拟南芥内膜反向转运体*AtNHX5* 基因启动子(*proNHX5*)功能及基因的组织表达模式,从基因组中克隆*AtNHX5* 基因开放阅读框(ORF)上游侧翼调控区 1 807 bp 序列,发现该启动子具有典型启动子一般特征,不仅具有 TATA-box、CAAT-box 等核心元件,还含有与光响应、激素响应、逆境诱导响应和分生组织表达调控元件。构建*AtNHX5* 基因启动子与 GUS 的融合表达载体,通过农杆菌花序浸染法转化野生型拟南芥获得转基因植株。利用组织染色法鉴定转基因拟南芥的 GUS 表达模式,发现在子叶、下胚轴和花中有显著的 GUS 酶活性,成熟叶片和根中只有局部检测到 GUS 表达,在未成熟果荚中只有在果荚顶端和基部存在 GUS 酶活性,说明*AtNHX5* 基因启动子与 GUS 的融合表达载体成功构建且正常启动 GUS 基因表达,同时也表明,*AtNHX5* 基因主要在这些部位表达,且表达具有时空特异性。

关键词 *AtNHX5* 基因;启动子;克隆;GUS;表达分析

中图分类号 Q785;Q786;Q944.62 **文献标志码** A **文章编号** 1004-1389(2019)12-2035-08

维持胞内离子和 pH 稳态对细胞的活动和功能至关重要^[1-2]。已有研究表明,植物 Na^+ 、 K^+ / H^+ 反向转运体(NHX)对维持细胞内离子平衡和调节 pH 平衡具有重要作用,并在各种细胞过程中扮演重要角色,包括逆境响应、膜微囊运输、蛋白存贮、细胞生长、渗透调节、 Na^+ 和 K^+ 离子运输及生长与发育等生理生化过程^[3-7]。NHX 是一类跨膜反向转运蛋白,属于一价阳离子/ H^+ 反向转运体(cation/proton antiporter, CPA)基因家族中的 CPA1 亚家族,生化活性是将 Na^+ 或 K^+ 与质子(H^+)进行跨膜反向转运,在酵母、细菌、植物和动物等生物体内广泛存在^[8-9]。

植物 NHX 基因家族分为三类,即质膜 NHXs、液胞 NHXs 和内膜 NHXs。模式植物拟南芥中 NHX 基因家族包含 8 个成员,其中质膜 NHXs (*AtNHX7/SOS1*、*AtNHX8*)、液胞 NHXs (*AtNHX1-4*)研究的相对较早,且对 *AtNHX7/SOS1* 的调节机制研究最为清楚^[10-15]。拟南芥内膜*AtNHX5* 和 *AtNHX6* 基因编码的反向转运体定位在高尔基、反面高尔基体管网状结构(TGN)、内质网(ER)和液胞前体(PVC)^[4,16-17]。

有研究表明,*AtNHX5* 既能抑制酵母突变体 *nhx1* 对潮霉素和盐胁迫的敏感性,又能增加对 Li^+ 的耐受性,在拟南芥中内膜 NHXs 调节胞内和内膜系统内的 pH 及离子平衡^[16],影响囊泡运输和蛋白存贮^[18-20],并通过调节生长素影响植株生长和发育^[3-4],这些结果说明,与拟南芥质膜和液胞 NHXs 而言,内膜 NHXs 具有独立功能,是 NHX 家族的重要组成部分。目前对拟南芥 *AtNHX5* 的亚细胞定位、功能已进行初步研究,但对其启动子及组织表达模式的研究较少,基于此,本研究克隆*AtNHX5* 基因启动子并进行序列分析,通过农杆菌介导的花序浸染法转化拟南芥,并利用 GUS 染色检测研究*AtNHX5* 基因在植株不同组织中的表达特性。以期探明 *AtNHX5* 在拟南芥幼苗和成株各组织内的表达强弱情况,为进一步探寻 *AtNHX5* 在离子转运和 pH 调节中的作用和调控机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料及生长条件

野生型拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 为

收稿日期:2019-05-21 修回日期:2019-07-01

基金项目:国家自然科学基金(31660391,31460350);甘肃省农业科学院农业科技自主创新专项现代生物育种项目(2019GAAS08);甘肃省农业科学院中青年基金(2017GAAS92)。

第一作者:李静雯,女,硕士,助理研究员,从事植物分子生物学研究。E-mail:lj-lg614@163.com

Col-0。所用植物材料生长室温 21 ℃,光强 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光周期为 16 h/8 h(光照/黑暗),相对湿度 50 % $\pm$ 10 %。无菌材料培养,先用 $\varphi=20\%$ 的次氯酸钠将种子表面消毒 13 min,再用无菌蒸馏水漂洗 6 次,然后点种在含有 10 g/L 琼脂,pH 5.8 的 MS 固体培养基中,置于 4 ℃ 冷藏箱中暗处春化 3 d 后转入温室萌发生长。需完成整个生长周期的材料,在萌发生长 7 d 后移入营养土内,置于温室内培养。

1.2 菌株、载体
所用大肠杆菌 DH5 α 和农杆菌 GV3101,均由甘肃省农业科学院生物技术研究所以遗传工程实验室保存提供。所用植物表达载体为 pCAM-BIA1391。

1.3 引物
试验所用各引物序列见表 1,引物序列利用软件 Primer Premier 5 设计。

表 1 试验所用引物序列
Table 1 Primers used in experiment

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primers sequence(5'→3')	用途 Purpose
PRNHX5-F	ACGCGTCGACTACATAAAGAAAGAGCA	启动子克隆 Promoter cloning
PRNHX5-R	CGGAATTCTCAGATTTGAGATTGGACCAC	启动子克隆 Promoter cloning
C-PRNHX5-F1	TGGGACAGTAATAAGTGAAG	测序 Sequencing
C-PRNHX5-F2	CATCCAAGAAAATACTAGTAC	测序、转基因植株鉴定 Sequencing,identification of transgenic plants
C-PRNHX5-R	AAAGAGCTTACTTCGCACAA	测序 Sequencing
GUS-R	AATAACGGTTCAGGCACA	转基因植株鉴定 Identification of transgenic plants

注:引物 PRNHX5-F 和 PRNH5-R 下划线序列分别为 *Sal* I 和 *Eco*R I 酶切位点。
Note:Underline sequences of PRNHX5-F and PRNH5-R were *Sal* I and *Eco*R I restricyion sites,respectively.

1.4 DNA 提取及*AtNHX5* 基因启动子克隆
以野生型拟南芥 Col-0 为材料,用生工植物基因组提取试剂盒从中提取拟南芥基因组 DNA。根据 TAIR 网站公布的拟南芥基因组数据,选取 *AtNHX5* 基因开放阅读框(ORF)上游 1 807 bp 启动子序列,运用引物设计软件 Primer Premier 5 设计特异性引物 PRNHX5-F 和 PRNHX5-R,并根据表达载体和启动子序列内酶切位点在引物 5'端分别添加 *Sal* I 和 *Eco*R I 酶切位点及保护碱基,引物序列由华大基因公司合成。以获得的拟南芥基因组 DNA 为模板,用高保真酶进行 PCR 扩增,扩增后的 PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收并纯化。

1.5 *AtNHX5* 基因启动子序列分析
利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线软件对 *AtNHX5* 基因转录起始位点前 1 807 bp 的启动子序列进行分析,预测顺式作用元件。

1.6 载体构建及植株转化、筛选
用 NEB 的 *Sal* I 和 *Eco*R I 限制性内切酶分别双酶切表达载体 pCAMBIA1391 质粒和 PCR 产物,并回收目的片段。利用 promage 公司 T4 连接酶将回收的 PCR 目的产物构建到表达载体

pCAMBIA1391 上并转入大肠杆菌扩增,获得 GUS(β -半乳糖苷酶)表达载体 pCAMBIA1391-proNHX5-GUS。经 PCR 扩增、酶切及测序鉴定正确的表达载体转入农杆菌 GV3101。农杆菌在 YEP 固体培养基培养,YEP 培养基成分为:5 g/L 牛肉膏,1 g/L 酵母提取物,5 g/L 蛋白胨,5 g/L 蔗糖,4 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,15 g/L 琼脂,pH 7.4。通过 PCR 鉴定获得转入成功的农杆菌菌株,并通过花序浸染法转染到野生型拟南芥中^[21]。转基因材料在含有 50 mg/L 的潮霉素(Hygromycin B)的 MS 培养板上进行筛选,选用启动子测序所用正向引物 C-PRNHX5-F2 和 GUS 基因内特异反向引物 GUS-R 对抗性筛选获得株系进行 PCR 鉴定,以便确定所选株系中存在融合目的基因序列。获得的第 3 代转基因植株的 3 个独立的纯合体株系用于 GUS 染色分析。

1.7 GUS 染色分析
选用生长在 MS 培养基上的整株幼苗和盆栽成熟植株的不同组织进行 GUS 组织化学检测分析。选取的材料浸透在染色液(100 mmol/L 磷酸缓冲液,pH 7.0,1.9 mmol/L 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-葡萄糖苷酸,0.5 mmol/L 铁氰化钾,0.5 mmol/L 亚铁氰化钾, $\varphi=0.1\%$ Triton

X-100,10 mmol/L EDTA 和 $\varphi=20\%$ 甲醇)中,于 37 ℃ 过夜染色后去掉染色液,加入 $\varphi=70\%$ 乙醇用于脱去叶绿素。去净叶绿素的材料在体视显微镜下观察照相。

2 结果与分析

2.1 拟南芥*AtNHX5* 基因启动子的克隆及顺式作用元件分析

根据已知拟南芥基因组序列信息,设计带有特异酶切位点和保护碱基的引物,正向扩增引物 PRNHX5-F 含有 *Sal* I 酶切位点,反向扩增引物 PRNHX5-R 含有 *Eco* R I 酶切位点,以拟南芥 Col-0 基因组 DNA 为模板,采用高保真酶进行 PCR 扩增,PCR 产物大小为 1 825 bp。将扩增产物进行核酸电泳检测,结果表明扩增条带符合预期大小(图 1)。

对 proNHX5 分析发现,序列中除了包含启动子典型的核心元件 TATA-box 和 CAAT-box

等外,还包含 AE-box、Box 4、GA-motif、GT1-motif、TCT-motif 光响应元件;ABA 响应元件 ABRE;茉莉酸甲酯响应元件 CGTGA-motif 和 TGACG-motif;生长素响应元件 TGA-element;分生组织表达调控元件 CAT-box;厌氧诱导的必须调控元件 ARE 和防御与应激相关元件 TC-rich repeats(表 2)。

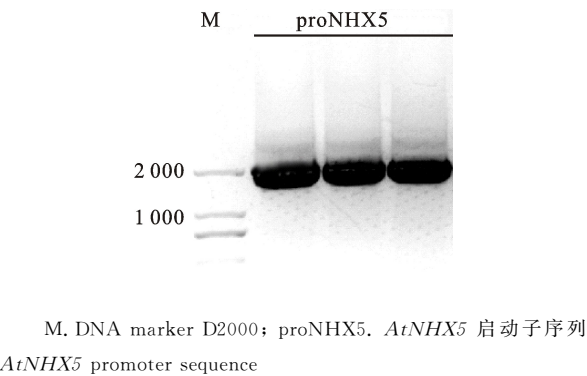


图 1 *AtNHX5* 基因启动子的克隆
Fig.1 Clone of *AtNHX5* gene promoter

表 2 *AtNHX5* 启动子区域顺式作用元件预测

Table 2 Prediction of cis-acting elements in promoter of <i>AtNHX5</i>			
顺式作用元件 Cis-acting element	核心序列 Core sequence	数量 Number	功能 Function
ABRE	GCAACGTGTC	1	ABA 响应元件 Responsive to ABA
AE-box	AGAAACAA	1	光响应元件 Light responsive element
ARE	AAACCA	2	厌氧诱导的必须调控元件 Regulatory element essential for anaerobic induction
Box 4	ATTAAT	2	光响应元件 Light responsive element
Box II-like sequence	TCCGTGTACCA	1	顺式调控元件 Cis-acting regulatory element
CAAT-box	CAAT/CAAT	35	顺式作用元件 Cis-acting element
CAT-box	GCCACT	1	分生组织表达调控元件 Regulatory element related to meristem expression
CGTCA-motif	CGTCA	2	茉莉酸甲酯响应调节元件 MeJA responsive regulatory element
GA-motif	ATAGATAA	1	光响应元件 Light responsive element
GT1-motif	GGTTAAT	1	光响应元件 Light responsive element
TATA-box	TATA	18	转录起始-30 核心启动子元件 Core promoter element around -30 of transcription start
TC-rich repeats	ATTCTCTAAC	1	防御与应激相关元件 Element involved in defense and stress responsiveness
TCT-motif	TCTTAC	2	光响应元件 Light responsive element
TGA-element	AACGAG	2	生长素响应元件 Auxin-responsive element
TGACG-motif	TGACG	2	茉莉酸甲酯响应调节元件 MeJA responsive regulatory element

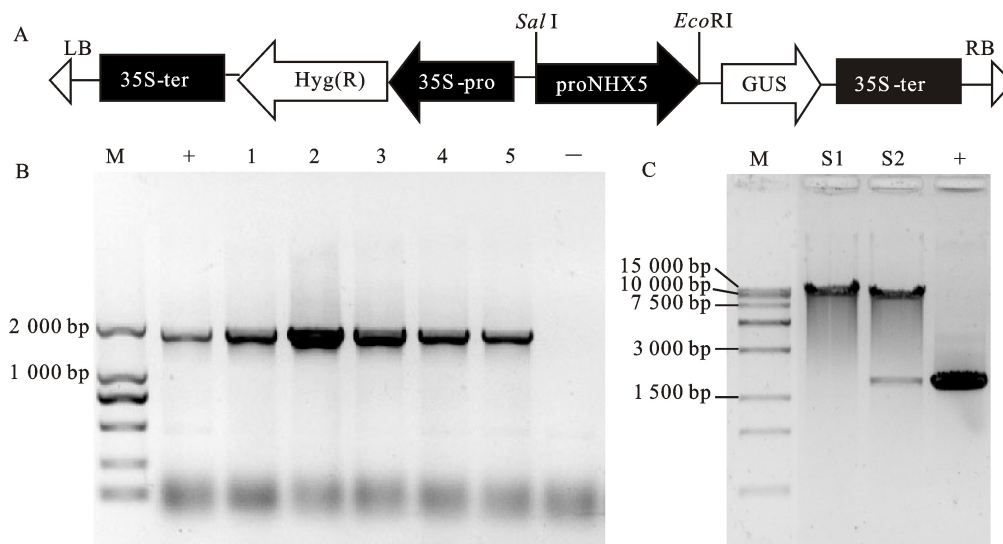
2.2 pCAMBIA1391-proNHX5-GUS 启动子表达载体的构建及鉴定

如图 2-A,为了研究*AtNHX5* 基因启动子的活性和组织表达模式,将启动子扩增产物 proNHX5 和植物表达载体 pCAMBIA1391 分别用 NEB 的 *Sal* I 和 *Eco* R I 双酶切后连接,经菌落 PCR 和质粒酶切验证获得正确的重组质粒

pCAMBIA1391-proNHX5-GUS。DH5 α 菌落 PCR 扩增产物大小为 1 825 bp,与预期结果相一致(图 2-B)。由于在构建中连接部位为 *Sal* I 和 *Eco* R I 酶切位点,重组成功的质粒单酶切后电泳应有一条大小为 12 454 bp 的目的条带,而双酶切后电泳应有一条大小分别为 10 641 bp 的线性质粒条带和一条 1 813 bp 与 proNHX5 几乎一致

的序列条带,酶切试验结果符合预期,说明 *At-NHX5* 启动子成功克隆到 pCambia1391 载体

中(图 2-C)。通过进一步测序验证,证实测序序列结果与数据库序列一致。



A: pCambia1391-proNHX5-GUS 表达载体构建示意图 Map of construction of pCambia1391-proNHX5-GUS expression vector; B: pCambia1391-proNHX5-GUS 表达载体的 PCR 分析 PCR analysis of pCambia1391-proNHX5-GUS vector; M, DNA marker D2000; +, proNHX5 启动子序列 *AtNHX5* promoter sequence; 1~5, 载体转化大肠杆菌菌液 PCR 产物 PCR product of fusion expression vector transformed into *E. coli* DH5α; -, 阴性对照 Negative control; C: pCambia1391-proNHX5-GUS 表达载体酶切鉴定 Identification of promoter analysis vector pCambia1391-proNHX5-GUS by digestion; M, DNA marker D15000; S1, *EcoRI* 单酶切 Single-digestion products by *EcoRI*; S2, *SalI* 和 *EcoRI* 双酶切 Double-digestion products by *EcoRI* and *SalI*; +, proNHX5 启动子序列 *AtNHX5* promoter sequence

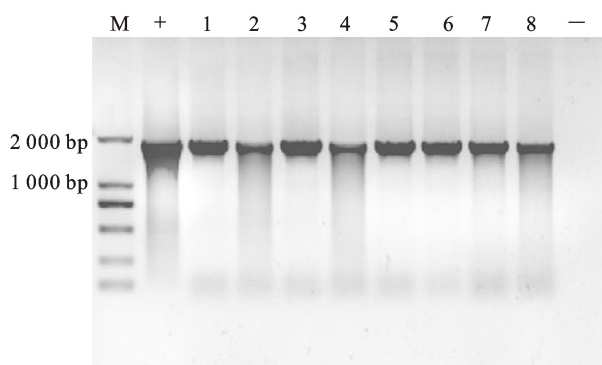
图 2 *AtNHX5* 启动子载体构建

Fig. 2 Vector construction of *AtNHX5* promoter

2.3 拟南芥转基因植株的获得

将测序正确的重组质粒转化农杆菌 GV3101, 在含有 Rif 和 Kan 抗生素的 YEP 固体培养基上筛选, 挑取单菌落, 通过菌落 PCR 筛选, 能够扩增出与 proNHX5 启动子克隆序列大小一致的条带为成功导入表达载体的阳性菌株

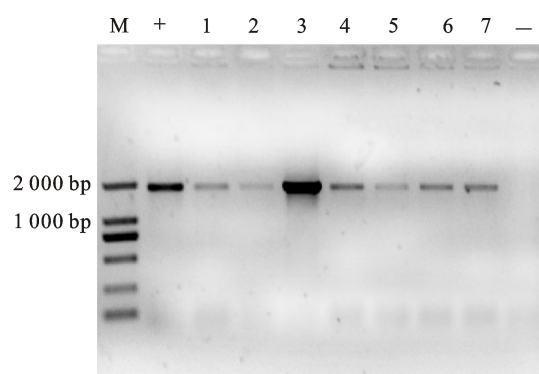
(图 3)。获得的阳性农杆菌通过花序浸染法转化拟南芥 Col-0, 将得到的 T0 代种子经消毒后播种于含有潮霉素的 MS 培养基中进行筛选, 具有抗性的植株经 PCR 检测为阳性的单株收获种子并加代, 获得 T3 代纯合转基因株系(图 4)。



M, DNA marker D2000; +, 阳性对照 Positive control; 1~8, 载体转化农杆菌菌液 PCR 产物 PCR product of expression vector transformed into *E. coli* DH5α; -, 阴性对照 Negative control

图 3 农杆菌菌液 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR detection of *Agrobacterium tumefaciens*



M, DNA marker D2000; +, 阳性质粒对照 Positive control; 1~7, 转基因植株 Transgenic fusion *Arabidopsis*; -, 野生型对照 Wild type

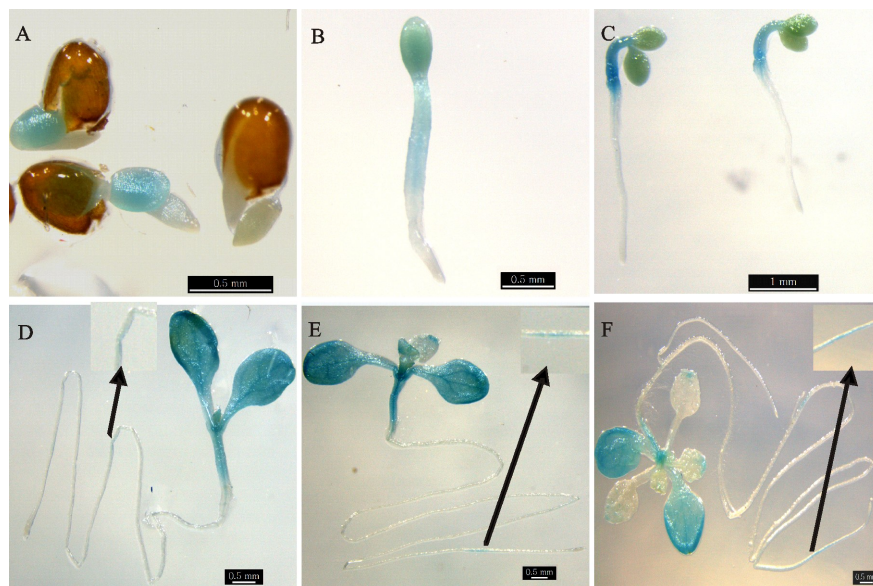
图 4 转基因拟南芥植株的 PCR

Fig. 4 PCR analysis of transgenic *Arabidopsis*

2.4 *AtNHX5* 启动子在拟南芥中的表达分析

为检测基因的组织表达模式,分别选取培养基上萌发生长 1 d、2 d、3 d、6 d、9 d、12 d 的整株转基因拟南芥幼苗和盆栽生长 45 d 植株的茎、叶、花和果荚进行 GUS 组织化学染色。试验证明,3 个独立的纯合转基因株系有着相似的表达模式。结果显示,由 *AtNHX5* 基因的启动子控制

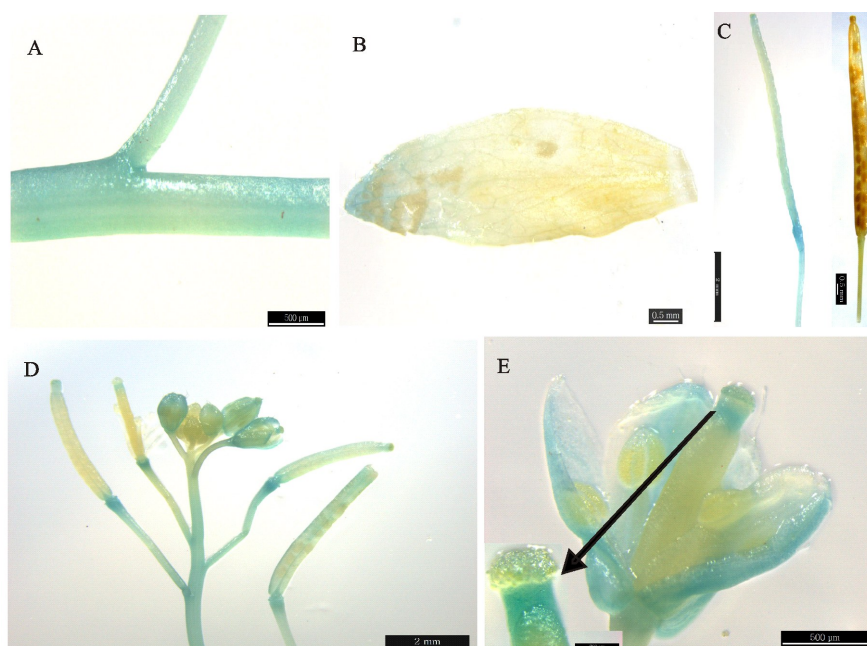
的 GUS 表达活性,在植株整个发育过程中一直都有表达(图 5 和图 6)。萌发 1 d 到 3 d 的幼苗中,GUS 活性在子叶和下胚轴中广泛表达,而种皮和胚根中未见表达(图 5-A—图 5-C)。随着幼苗生长,子叶和茎中 GUS 仍广泛表达,且子叶和茎中微管系统的 GUS 表达最为显著,真叶中仅局部检测到 GUS 表达,生长 6 d、9 d 和 12 d 的转



A~F. 生长 1 d、2 d、3 d、6 d、9 d、12 d 的转基因植株 *Arabidopsis* seedlings of 1 d 2 d、3 d、6 d、9 d、12 d

图 5 转基因拟南芥幼苗 GUS 染色

Fig. 5 GUS staining of transformed *Arabidopsis* seedlings



A. 茎 Stem; B. 叶 Leaf; C. 果荚 Silique; D. 花序与果荚 Inflorescences and silique; E. 花 Flower

图 6 转基因植株不同部位 GUS 组织定位分析

Fig. 6 Promoter-GUS assay of transgenic *Arabidopsis* in different parts

基因植株根中也只有局部区域检测到微弱 GUS 表达(图 5-D—图 5-F)。成熟植株中,茎中有明显的 GUS 表达(图 6-A 和图 6-D)。在成熟叶片中,有的检测不到 GUS 的表达,有的仅叶尖局部检测到 GUS 表达(图 6-B)。在花中,柱头、花柱、花柄和花瓣的微管中检测到 GUS 明显表达,花瓣部分区域微弱表达,而在花序顶端花苞未见 GUS 表达(图 6-D)。在未成熟果荚中,GUS 主要表达在果柄、果荚顶端和基部,早期幼嫩果荚表皮也有弱的表达,随着果荚发育,果荚表皮将检测不到 GUS 表达(图 6-C 和图 6-D)。接近成熟果荚中,只有果柄有很微弱的 GUS 表达,果荚顶端和基部未见 GUS 表达(图 6-C)。

3 讨论

植物基因表达调控过程主要有 DNA 水平调控、染色体水平调控、转录调控、转录后调控、翻译调控和翻译后调控,在这些调控方式中,转录水平调控是最为主要的。启动子是位于结构基因上游的 DNA 序列,不仅决定基因转录方向和 RNA 聚合酶类型,还是转录水平上基因表达调控的中心^[22]。在启动子区域,有很多在转录水平调控过程中具有重要作用的顺式作用元件,参与调控下游基因表达,从而调节生长发育和抵抗外界环境胁迫^[23]。在启动子的核心启动子区域通常包含 TATA-box 和 CAAT-box 元件,也是启动子的特征序列。通过对 *AtNHX5* 基因开放阅读框上游序列分析,发现该序列中具有多个 TATA-box 和 CAAT-box 核心启动子元件,说明其具有典型启动子特征。

启动子除了具有典型的核心启动子元件外,还有众多与基因功能相关的调节元件或结合位点。因此,在相近基因的启动子序列中,应该存在很多一致的顺式作用元件。李红婷等^[24]克隆分析醋栗番茄 *NHX4* 基因启动子发现,在启动子序列内含有多个与激素、逆境诱导相关元件和光反应相关元件。邹兰等^[25]克隆的盐生草 *HgNHX1* 基因启动子中包含多个与非生物胁迫、植物激素诱导及光应答元件。本研究也得到类似结果,在 *AtNHX5* 基因启动子序列内发现多个光响应元件和激素、逆境诱导相关元件,另外,还发现分生组织表达调控元件(表 2)。这些结果预示着 *AtNHX5* 基因的表达可能受到逆境胁迫、激素及光等信号的调控。有研究表明, *AtNHX5* 作为重

要的内膜 Na^+ , K^+ / H^+ 反向转运体,在应对盐胁迫、水分胁迫和钾营养代谢中具有重要作用^[16,26-28],同时,最新研究显示拟南芥内膜反向转运体参与生长素介导的生长与发育^[3-4],这都与启动子分析结果中的调节元件功能相一致,也预示着 *AtNHX5* 很可能在光响应、分生组织表达和茉莉酸调控中的作用还未被发现,值得进一步研究。

利用农杆菌介导法转化拟南芥,对获得的纯合体株系进行 GUS 组织化学染色,发现 proNHX5 正确启动 GUS 基因表达,说明克隆的 proNHX5 序列具有启动子活性。Bassil 等^[17]用荧光实时定量 PCR (RT-qPCR) 分析表明, *AtNHX5* 和 *AtNHX6* 基因在拟南芥生长发育的各个阶段的很多组织内均有表达,包括花、花芽、茎、莲座叶、根和果荚,且不同组织存在表达差异,有报道对 *AtNHX6* 基因启动子进行分析,也得到类似结果^[29]。本研究通过对幼苗期不同生长时间的植株 GUS 染色发现,proNHX5 不仅正确启动 GUS 基因表达,而且使 GUS 在不同生长时间幼苗各个部位的表达强弱存在差异。在幼苗期,子叶和茎中从萌发第 1 天开始就有 GUS 表达,而根中早期并未检测到 GUS 表达,直到生长到的第 6 天,根中有些部位才开始检测到 GUS 表达(图 5)。生长 6 d、9 d、12 d 的幼苗中发现,在茎顶端分生组织处有较强的 GUS 表达,且在第 6 天左右真叶开始长出,随着植株生长,真叶中 GUS 表达区域和强度逐渐变小和减弱,到成株时只在叶尖检测到微弱的 GUS 表达。前面启动子分析也发现,在 proNHX5 序列里有分生组织表达调控元件存在,这正好与 GUS 在茎顶端分生组织强表达相一致,这也暗示根中出现 GUS 表达的部位很可能也与分生组织有关。虽然在根尖和侧根中未检测到 GUS 表达,但有报道显示,与 *AtNHX5* 高度同源且功能冗余的内膜反向转运体的另一个成员 *AtNHX6* 的启动子在根尖和侧根原基部位驱动 GUS 强表达^[3,29-30],这可能是导致 proNHX5 驱动 GUS 表达在根中一些分生组织极不明显的原因。在成株中,茎中仍具有明显的 GUS 表达,而花中 GUS 表达随着生长发育发生变化,花序顶端花中未检测到 GUS 表达,而发育成熟花中具有明显的 GUS 表达,尤其雌蕊柱头、花柱和花瓣微管组织中。果荚中 GUS 也随果荚生长发育表现表达部位和强度差异,随着果荚发育从开始的果柄、果皮、果荚顶端和基部中明

显 GUS 表达达到仅在果柄有微弱表达。整个 GUS 染色结果显示,在拟南芥整个生长过程中,proN-HX5 驱动的 GUS 表达具有明显的时空特异性,预示着 *AtNHX5* 基因在拟南芥中也具有相同的表达模式,表明 *AtNHX5* 在拟南芥生长发育各个阶段都发挥着重要作用。

参考文献 Reference:

- [1] BASSIL E, COKU A, BLUMWALD E. Cellular ion homeostasis: emerging roles of intracellular NHX Na^+/H^+ antiporters in plant growth and development [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(16): 5727-5740.
- [2] PARDO J M, CUBERO B, LEIDI E O, et al. Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(5): 1181-1199.
- [3] DRAGWIDGE J M, FORD B A, ASHNEST J R, et al. Two endosomal NHX-type Na^+/H^+ antiporters are involved in auxin mediated development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2018, 59(8): 1660-1669.
- [4] FAN L, ZHAO L, HU W, et al. Na^+ , K^+/H^+ antiporters regulate the pH of endoplasmic reticulum and auxin-mediated development [J]. *Plant Cell and Environment*, 2018, 41(4): 850-864.
- [5] WANG L, FENG X, ZHAO H, et al. Functional analysis of the Na^+ , K^+/H^+ antiporter PeNHX3 from the tree halophyte *Populus euphratica* in yeast by model-guided mutagenesis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): 104-147.
- [6] REGUERA M, BASSIL E, BLUMWALD E. Intracellular NHX-type cation/ H^+ antiporters in plants [J]. *Molecular Plant*, 2014, 7(2): 261-263.
- [7] RODRIGUEZ-ROSALES M P, JIANG X, GALVEZ F J, et al. Overexpression of the tomato K^+/H^+ antiporter LeNHX2 confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization [J]. *New Phytologist*, 2008, 179(2): 366-377.
- [8] CAO B, LONG D, ZHANG M, et al. Molecular characterization and expression analysis of the mulberry Na^+/H^+ exchanger gene family [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 99: 49-58.
- [9] CHANROJ S, WANG G Y, VENEMA K, et al. Conserved and diversified gene families of monovalent cation/ H^+ antiporters from algae to flowering plants [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2012, 3: 25.
- [10] QUINTERO F J, MARTINEZ-ATIENZA J, VILLALTA I, et al. Activation of the plasma membrane Na^+/H^+ antiporter Salt-Overly-Sensitive 1 (SOS1) by phosphorylation of an auto-inhibitory C-terminal domain [J]. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(6): 2611-2616.
- [11] QIU Q S, GUO Y, DIETRICH M A, et al. Regulation of SOS1, a plasma membrane Na^+/H^+ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(12): 8436-8441.
- [12] SHI H, ISHITANI M, KIM C, et al. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na^+/H^+ antiporter [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6896-6901.
- [13] WU S J, DING L, ZHU J K. SOS1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition [J]. *The Plant Cell*, 1996, 8(4): 617-627.
- [14] YANG Z, WANG C, XUE Y, et al. Calcium-activated 14-3-3 proteins as a molecular switch in salt stress tolerance [J]. *Nature Communication*, 2019, 10(1): 1199.
- [15] YANG Y, GUO Y. Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses [J]. *The New Phytologist*, 2018, 217(2): 523-539.
- [16] WANG L G, WU X X, LIU Y F, et al. *AtNHX5* and *AtNHX6* control cellular K^+ and pH homeostasis in *Arabidopsis*; three conserved acidic residues are essential for K^+ transport [J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): 144716.
- [17] BASSIL E, OHTO M A, ESUMI T, et al. The *Arabidopsis* intracellular Na^+/H^+ antiporters NHX5 and NHX6 are endosome associated and necessary for plant growth and development [J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(1): 224-239.
- [18] WU X X, EBINE K, UEDA T, et al. *AtNHX5* and *AtNHX6* are required for the subcellular localization of the SNARE complex that mediates the trafficking of seed storage proteins in *Arabidopsis* [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): 151658.
- [19] REGUERA M, BASSIL E, TAJIMA H, et al. pH Regulation by NHX-Type antiporters is required for receptor-mediated protein trafficking to the vacuole in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(4): 1200-1217.
- [20] YOKOI S, QUINERO F J, CUBERO B, et al. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na^+/H^+ antiporters in the salt stress response [J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2002, 30(5): 529-539.
- [21] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 1998, 16(6): 735-743.
- [22] 杨鹏芳, 段国琴, 胡晓伟, 等. 高等植物启动子研究概述 [J]. *分子植物育种*, 2018, 16(5): 1482-1493.
- [23] YANG P F, DUAN G Q, HU X W, et al. Overview of higher plant promoters research [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(5): 1482-1493.
- [24] 马倩, 马宝月, 穆波, 等. 植物基因启动子的克隆及分析的研究进展 [J]. *中国农业文摘-农业工程*, 2018(3): 23-29.
- [25] MA Q, MA B Y, MU B, et al. Research progress on cloning and analysis of plant gene promoter [J]. *Agricultural Science and Engineering in China*, 2018(3): 23-29.
- [26] 李红婷, 魏露阳, 孙亚东, 等. 醋栗番茄 *NHX4* 基因及其启动子序列的克隆与分析 [J]. *分子植物育种*, 2018, 16(14): 4511-4519.
- [27] LI H T, WEI L Y, SUN Y D, et al. Cloning and analysis of vacuolar Na^+/H^+ antiporter 4 gene and its promoter from *Solanum pimpinellifolium* [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(14): 4511-4519.
- [28] 邹兰, 杨轲, 徐先良, 等. 盐生草 *HgNHX1* 基因启动

- 子的克隆及功能验证[J]. 草业学报, 2017, 26(11): 57-68.
- ZOU L, YANG K, XU X L, *et al.* Cloning and functional analysis of halophyte *Halogeton glomeratus* HgNHX1 promoter [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2017, 26(11): 57-68.
- [26] 安 静, 侯 蕾, 孔祥强, 等. *AtNHX5* 基因过量表达对拟南芥耐盐性的影响[J]. 西北植物学报, 2012, 32(6): 1106-1111.
- AN J, HOU L, KONG X Q, *et al.* Overexpression of *AtNHX5* increases salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Acta Botanica Boreal-Occident Sinica*, 2012, 32(6): 1106-1111.
- [27] LI M, LIN X J, LI H Q, *et al.* Overexpression of *AtNHX5* improves tolerance to both salt and water stress in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2011, 107(2): 283-293.
- [28] LI M, LI Y, LI H, *et al.* Overexpression of *AtNHX5* improves tolerance to both salt and drought stress in *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent [J]. *Tree Physiology*, 2011, 31(3): 349-357.
- [29] 王立光, 陈 军, 李静雯. 拟南芥 *AtNHX6* 基因启动子的克隆及表达分析[J]. 西北植物学报, 2019, 39(2): 191-198.
- WANG L G, CHEN J, LI J W. Cloning and expression analysis of *AtNHX6* gene promoter from the *Arabidopsis thaliana* [J]. *Acta Botanica Boreal-Occident Sinica*, 2019, 39(2): 191-198.
- [30] 王立光. 拟南芥内膜 Na^+ , K^+ / H^+ 反向转运体研究进展[J]. 生物工程学报, 2019, 35(8): 1424-1432.
- WANG L G. Progress in endosomal Na^+ , K^+ / H^+ antiporter in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(8): 1424-1432.

Molecular Cloning and Tissue Localization Analysis of *AtNHX5* Gene Promoter from *Arabidopsis thaliana*

LI Jingwen, HOU Yiqing, CHEN Jun and ZHU Tiandi

(Biotechnology Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China)

Abstract The endosomal *AtNHX5* is one of the genes encoding Na^+ , K^+ / H^+ antiporter in *Arabidopsis thaliana*. In order to test the function of proNHX5 and the tissue expression pattern of endosomal *AtNHX5* gene, the sequence of proNHX5 from *Arabidopsis thaliana* Col-0, a 1 807 bp upstream of reading frame (ORF), was amplified by PCR. The analysis showed that proNHX5 had the general characteristics of typical promoter, which not only contained TATA-box and CAAT-box core components, but also contained control elements for light response, hormone response, adversity-induced response, and meristem expression. The fusion expression vector of proNHX5 and *GUS* gene was constructed and introduced into the *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia 0) using the floral dip method. The expression pattern was monitored using GUS histochemical staining. As results, GUS staining was preferentially observed in cotyledons, hypocotyls and flowers of transgenic seedlings carrying the *AtNHX5* promoter. In true leaves and roots, GUS activity was only partially detected for the *AtNHX5* promoter. Whereas in the immature siliques, GUS staining was restricted to the silique tip and base. Collectively, these results suggested that fusion expression vector of *AtNHX5* gene promoter and *GUS* was successfully constructed and it driven the expression of *GUS* gene successfully, and *AtNHX5* gene predominantly expressed in these parts, and the expression had space-time specificity.

Key words *AtNHX5* gene; Promoter; Cloning; GUS; Expression analysis

Received 2019-05-21

Returned 2019-07-01

Foundation item National Natural Science Foundation of China (No. 31660391, No. 31460350), Modern Biological Breeding Project of Independent Innovation of Agricultural Science and Technology of Gansu Academy of Agricultural Sciences (No. 2019GAAS08); Youth Foundation of Gansu Academy of Agricultural Sciences (No. 2017GAAS92).

First author LI Jingwen, female, master, research assistant. Research area: plant molecular biology. E-mail: ljlg614@163.com

(责任编辑: 史亚歌 Responsible editor: SHI Yage)