

小金海棠抗缺铁相关基因——*Nramp* 基因片段的克隆

戚金亮^{1,2} 韩振海^{1*} 印莉萍^{2*} 许雪峰¹ 张连忠³

(¹ 中国农业大学农学与生物技术学院果树分子生物学实验室, 北京 100094; ² 首都师范大学生物系遗传与生物工程重点实验室, 北京 100037; ³ 山东农业大学园艺学院, 泰安 271018)

摘要: 以高效抗缺铁苹果种小金海棠 (*Malus xiaojinensis* Cheng et Jiang) 为试材, 以异源的小麦 *Nramp* 基因为探针进行杂交分析。Southern 杂交结果表明: 小金海棠基因组中存在该家族基因。Northern 杂交结果表明: 在根和叶中, *Nramp* 基因在正常供铁和缺铁胁迫下均能得以转录, 且叶中的转录受缺铁胁迫的诱导而加强。通过 PCR 方法已从基因组 DNA 中扩增出了 752 bp 的特异性产物, 该片段与水稻的 *OsNramp3* 具有 83% 的氨基酸序列同源性。

关键词: 小金海棠; 铁; *Nramp*; 杂交

中图分类号: S 661 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 03-0360-03

Cloning of *Nramp* Gene Fragment Being Relating to Resistance of Iron Deficiency Stress from *Malus xiaojinensis*

Qi Jinliang^{1,2}, Han Zhenhai^{1*}, Yin Liping^{2*}, Xu Xuefeng¹, and Zhang Lianzhong³

(¹ Molecular Biology Laboratory of Fruit Tree, College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China; ² The Key Laboratory of Genetics and Biotechnology, Biology Department of Capital Normal University, Beijing 100037, China; ³ Department of Horticulture, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: To initially study the role of *Nramp* gene in resisting iron deficiency stress, we analyzed this gene in *Malus xiaojinensis* Cheng et Jiang by using blot hybridization technique with *Nramp* gene fragment of wheat as probe. Southern blot result suggested that there was *Nramp* gene in the genome of *Malus xiaojinensis*. Northern blot confirmed that transcription of the *Nramp* gene is induced in both roots and leaves and strengthened in leaves by iron stress. A 752 bp fragment of *Nramp* gene was obtained by PCR from the genomic DNA, which has 83% identities to *OsNramp3* of rice in amino acid level. The results lead to the prediction that *Nramp* gene of *Malus xiaojinensis* may play a crucial role in resisting iron stress.

Key words: *Malus xiaojinensis* Cheng et Jiang; Iron; *Nramp*; Blot

1 目的、材料与方法

小金海棠 (*Malus xiaojinensis* Cheng et Jiang) 为高效抗缺铁胁迫基因型苹果种^[1]。研究表明, *Nramp* (natural resistance-associated macrophage protein) 基因与植物的抗缺铁能力有较大关系, 并受缺铁胁迫诱导加强表达^[2,3], 推测可能在一种全新的铁素吸收机理——内吞机理 (endocytotic mechanism)^[4,5] 系统中发挥着重要的作用。本研究对小金海棠中该基因做了初步探索。

小金海棠播种后长至 6~7 片真叶时进行试验处理。处理为 EDTA-Fe (II) (0, 40 $\mu\text{mol/L}$), 其它元素与完全营养液相同。提取叶片 DNA 分别进行 SalI、BamHI [宝生物工程 (大连) 有限公司] 单酶切, 并于处理后不同天数时取叶片和根系提取 RNA 进行甲醛变性胶电泳和转膜; 制备 [α -³²P] dCTP (亚辉生物公司) 标记的小麦 *Nramp* 基因片段 (首都师范大学生物系保存) 异源探针, 进行

收稿日期: 2003-09-23; 修回日期: 2004-02-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30170552); 教育部高等院校青年教师科教奖励基金资助项目; 北京市自然科学基金资助项目

* 通讯作者 Authors for correspondence

Southern 和 Northern 杂交。PCR 反应体系及条件: $1 \times$ Ex Taq buffer, $MgCl_2$ 2.0 mmol/L, dNTP Mixture 0.2 mmol/L, 引物 0.4 μ mol/L, 模板 DNA 0.8 μ g。94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 90 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。上游引物 F1: 5'-CAATCACTTGCAGCTAGGCTAGG 3', 下游引物 R1: 5'-GTCCCGCATAAGTTCCTGTAATTG 3'。PCR 扩增产物克隆于 pGEM-T 载体上进行测序(上海联众基因科技研究院测序)。序列在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> 网站提供的软件中进行同源性比较。

2 结果分析与讨论

2.1 小金海棠中 *Nramp* 基因的 Southern 和 Northern 杂交

由图 1, a 可以看出, 小金海棠基因组 DNA 酶切效果好, 酶切后产生大小不等的弥散条带。将此胶转膜用于 Southern 杂交, 两种单酶切均有明显的杂交信号(图 1, b), 证明小金海棠基因组中存在 *Nramp* 家族基因。进一步进行 Northern 杂交的结果(图 2, b)表明, 无论正常还是缺铁条件下, 根系和叶片中该家族基因均能得以转录; 与正常供铁处理的叶片相比, 缺铁胁迫处理第 3 天叶片 *Nramp* 转录最强, 第 6 天稍有降低, 第 9 天时与对照相比仍然有较强的杂交信号。说明该家族基因的转录受到缺铁胁迫的诱导而加强。

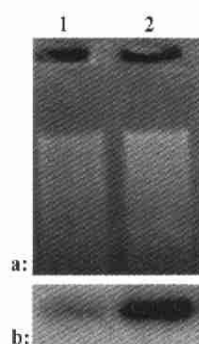


图 1 用小麦 *Nramp* 基因为探针小金海棠进行的 Southern 杂交分析
a: 小金海棠基因组 DNA 的限制性内切酶酶切; b: Southern 杂交结果。1: Sall 酶切; 2: BamHI 酶切。

Fig. 1 Southern analysis of *M. xiaojinensis* genomic DNA with wheat *Nramp* gene as probe

a: *M. xiaojinensis* genomic DNA digested by restriction endonuclease enzymes; b: Results of Southern blot. 1: By Sall; 2: By BamHI.

在缺铁胁迫下, 小金海棠可能合成更多的 NRAMP 蛋白, 从而能够从土壤和胞外空间中吸收转运更多的 Fe^{2+} 来满足细胞对铁的需求。值得注意的是, *Nramp* 在地上部能得以转录揭示了该基因可能在植物体内胞间铁素的高效利用或重新利用方面起着重要的作用, 因为在缺铁胁迫下, 植物体除了提高根系吸收转运 Fe^{2+} 的能力外, 对地上部的铁素利用效率及重新利用效率的提高可能也是其高效抗缺铁机理的一部分。

2.2 小金海棠中 *Nramp* 基因组 DNA 片段的克隆

根据 Genbank 中公布的植物 *Nramp* 基因家族的功能保守区设计引物, 以小金海棠基因组 DNA

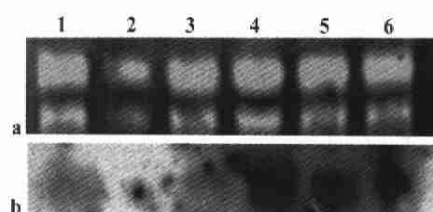


图 2 用小麦 *Nramp* 基因为探针小金海棠进行的 Northern 杂交分析

a: 小金海棠根系和叶片总 RNA; b: Northern 杂交结果。
1: 缺铁处理 6 d 根系; 2: 正常供铁 6 d 根系; 3~6: 叶片 (3: 正常供铁; 4: 缺铁 3 d; 5: 缺铁 6 d; 6: 缺铁 9 d)。

Fig. 2 Northern analysis of *M. xiaojinensis* total RNA with wheat *Nramp* gene as probe

a: Total RNA of *M. xiaojinensis* roots and leaves; b: Results of Northern blot. 1: Iron stress for 6 days of roots; 2: Control of roots; 3~6: Leaves (3: Control; 4: Iron stress for 3 days; 5: Iron stress for 6 days; 6: Iron stress for 9 days).

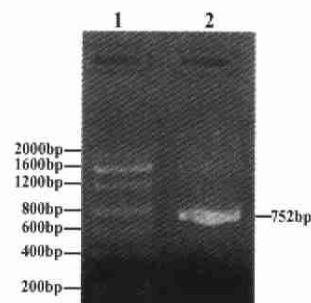


图 3 小金海棠中 *Nramp* 基因组 DNA 片段的 PCR 扩增结果

1: 100 bp marker; 2: 小金海棠中 *Nramp* 基因组 DNA 片段的 PCR 扩增产物。

Fig. 3 PCR results of *Nramp* genomic DNA fragment in *M. xiaojinensis*

1: 100 bp marker; 2: PCR products of *Nramp* genomic DNA fragment in *M. xiaojinensis*.

为模板, 扩增出了 752 bp 的特异性产物 (图 3)。将该片段回收纯化后克隆于 pGEM-T 载体并测序, 结果如图 4。该基因被命名为 *MxNramp1* 基因 (Genbank 登录号为 AY188777)。

```

5'GGTTGTGACTGGGAAGCATCTTGCTGAGCACTGCAGGGATGAATATCCCAAGGTCACAACTTCATCTTATGGATTCTTGCAAGACTGG
V V T G K H L A E H C R D E Y P K V T N F I L W I L A E L
CTGTAGTTGCGTGCGACATTCCTGAAGTAATTGGAACCGCTTTTGCTTTGAACATGCTCTTCAAAATCCGATATGGTGTGGTGTCTCATA
A V V A C D I P E V I G T A F A K N M L F K I P I W C G V L I
ACTGGGCTCAGCACTCTGATGCTCCTGTTCTGCAACAATATGGGGTCCGTAAGTGAATTTCTGATAGCATTTTGGTATTCTTGATAGC
T G L S T L M L L F L Q Q Y G V R K L E F L I A F L V F L I A
AACTTGCTTCTAGTTGAAGTTGGGTATTCTAAACCAAATCTTCAGAAGTTGTGCGAGGCCCTTTTGTTCCTGAAATTAAGGAGATGGAG
T C F L V E L G Y S K P N S S E V V R G L F V P E I K G D G
CTACAGGCTTGCTATCTCACTACTTGGTGCTATGGTGATGCCGACAACTCTTTTCTCCACTCAGCATTGGTACTGTCAAGAAAAGTACCA
A T G L A I S L L G A M V M P H N L F L H S A L V L S R K V P
CGATCAGTTTCATGGGATCAAAGAGGCCTGTAGATTCTATGATTGAAAGTGCATTTGCCCTCACAGTAGCATTCTCTGATCAACATCTCTAT
R S V H G I K E A C R F Y M I E S A F A L T V A F L I N I S I
CATATCTGTTAGTGGTGCAGTTTGCAGTGCAGATAATTTGAACCTGAAGACCGGATGAATTGCAATGATCTAGATCTTAACAAAGCTTCAT
I S V S G A V C S A D N L N P E D R M N C N D L D L N K A S
TCTTGTTAAAGAATGTCCTCGGAAATGGAGCTCAAAGGTGTTGCTATTGCCTTATGGGCATG3'
F L L K N V L G N W S S K V F A I A L W A

```

图 4 小金海棠 *MxNramp1* 基因部分核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig. 4 The partial nucleotide acid sequence and deduced amino acid sequence for *MxNramp1* gene of *Malus xiaojinensis* Cheng et Jiang

序列同源性比较表明, 该 DNA 片段与水稻 *OsNramp3* 和拟南芥 *AtNramp1* 基因分别具有 83% 和 80% 的氨基酸序列同源性。对小金海棠的 *MxNramp1* 基因片段与其他物种的 *Nramp* 基因家族成员之间进行了多序列比对分析并绘制出了它们之间的进化树聚类分析图 (图 5)。

试验为进一步通过反向 PCR 法或制备探针筛选基因组 DNA 文库等方法克隆该基因的全长及进一步研究其功能奠定了基础。

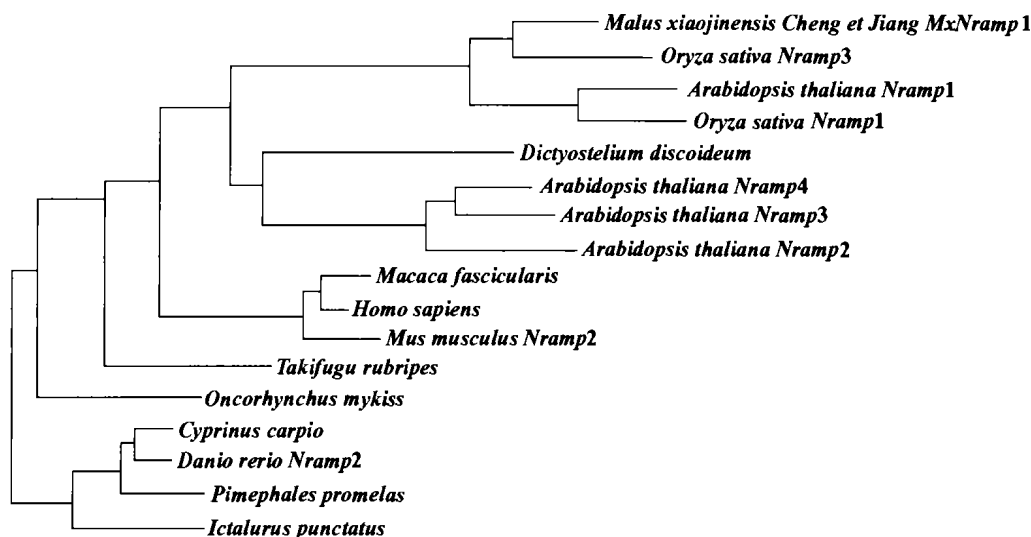


图 5 *MxNramp1* 与其他物种 *Nramp* 家族基因之间进化树聚类分析

Fig. 5 Average distance of *MxNramp1* with *Nramp* family genes of other biology species

参考文献:

- 1 韩振海, 许雪峰. 不同铁效率果树基因型研究的现状和前景. 园艺学年评, 1995, 1: 1~16
- 2 Curie C, Alonso J M, Jearr-M L, et al. Involvement of *Nramp1* from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem. J.*, 2000, 347: 749~755
- 3 Thomine S, Wang R, Ward J M, et al. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 25: 4991~4996
- 4 Mori S. Iron acquisition by plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 1999, 2: 250~253
- 5 戚金亮, 韩振海, 印莉萍, 等. 植物 *Nramp* 基因及其与金属离子转运的关系. *生命科学*, 2003, 15 (1): 46~49