

***TaNHX₂*基因表达载体、Na⁺/H⁺反向转运蛋白 RNAi 载体构建及功能研究**

原江锋

摘要: 植物在生长发育中时常要受到不良环境的胁迫, 如盐渍、干旱、低温等。其中盐胁迫严重影响植物的生长。为了减少盐胁迫造成的伤害, 植物在长期进化过程中, 形成了一套耐盐的机制, 或增加Na⁺的外排, 或限制Na⁺的吸收, 或将Na⁺束缚在液泡中。目前已经知道有些植物主要通过液泡膜Na⁺/H⁺反向转运蛋白将Na⁺束缚在液泡中以减少Na⁺的毒害。因此液泡膜Na⁺/H⁺反向转运蛋白在植物耐盐性方面具有重要作用。在耕地有限, 人口不断增长的今天, 培育耐盐能力相对提高的植物品种已成为植物分子育种工程的目标之一。

所以本课题以小麦中*TaNHX₂*为研究对象, 构建了含有*TaNHX₂*基因的植物表达载体。构建Na⁺/H⁺反向转运蛋白基因的RNA干涉表达载体。采用花粉管通道法成功的获得了转基因拟南芥, 并进行了相关的分子生物学鉴定及生理验证。为植物耐逆研究积累相关资料, 主要试验方法和结论如下:

1. 以植物双元载体pBIN438为基本元件, 构建含*TaNHX₂*基因的植物表达载体。利用花粉管通道法将*TaNHX₂*基因导入拟南芥, 并获得转基因植株。通过PCR、Southern杂交和RT-PCR鉴定, 表明外源基因已经成功整合到拟南芥基因组中, 并获得表达。将转基因拟南芥及野生拟南芥分别转到100mmol/LNaCl、150mmol/LNaCl、200mmol/LNaCl的MS培养基, 在盐胁迫条件下转基因植株在叶片大小、植株根长、生物量上均优于野生拟南芥。在含3%PEG6000、5%PEG6000、7%PEG6000的MS培养基上, 野生拟南芥表现为生长缓慢, 转基因拟南芥同样优于野生拟南芥。说明过表达*TaNHX₂*基因提高了转基因拟南芥的耐逆能力。

2. 克隆得到拟南芥Na⁺/H⁺反向转运蛋白基因的部分片段, 构建了抑制Na⁺/H⁺反向转运蛋白基因的RNA干涉表达载体。利用花粉管通道法将RNAi载体导入拟南芥, 并获得转基因植株。将转基因拟南芥及野生拟南芥分别转到100mmol/LNaCl、150mmol/LNaCl的MS培养基, 在盐胁迫条件下转基因植株表现为生长缓慢, 主根纤弱; 在200mmol/LNaCl的MS培养基上转基因植株叶片几乎停止生长。野生拟南芥在不同浓度盐胁迫下叶片大小、植株根长、生物量上均优于转基因植株。在含3%PEG6000、5%PEG6000、7%PEG6000的MS培养基上, 转基因植株表现为生长缓慢, 野生拟南芥同样优于转基因植株。说明Na⁺/H⁺反向转运蛋白基因的RNAi载体使转基因拟南芥的耐盐和耐旱能力下降。

关键词: Na⁺/H⁺反向转运蛋白 植物表达载体 盐胁迫 RNAi

**Study on construction and function of *TaNHX₂* gene plant
expression vector and plant RNAi vector
of Na⁺/H⁺ antiporter protein gene**

Yuan Jiangfeng

Abstract: The plant often suffer from adverse environmental stresses during the growth such as salinity, drought and low temperature etc. Among them, salt stress badly influences in the yields of the plant. In order to reduce harmness of salt stress, in the long run of evolution process, the plant has formed a set of endure the mechanism of salt. The plant increase the Na⁺ of outside row, or limit the Na⁺ of absorption, or Na⁺ is sequestered in vacuole. So far, we have known that some plants mainly sequester Na⁺ in vacuole in order to reduce Na⁺ harmness by the function of Na⁺/H⁺ antiport protein in vacuole. So Na⁺/H⁺ antiport protein in vacuole play an important part in protesting salt stress. With cultivated land being more and more limited, and the population continuously increasing, breeding relatively high salt resisting plant is one of targets in plant molecule breeding project.

In this research, *TaNHX₂* in wheat was used as experimental material, we constructed one plant expression vector, which contained *TaNHX₂* gene. Using RNA interference technique to constructed one plant expression vector, which contained Na⁺/H⁺ antiport protein gene fragment. The completion of this program gets the salt resisting transgenic *Arabidopsis thaliana* by vacuum infiltration method. And also we have the mechanism research and physiology research backloging data for the plant anti-salt. The main test method and conclusion of this thesis are as follows:

1. Using plant bivalent expression vector pBIN438 as the basic component, one plant expression vector, which contained *TaNHX₂* gene. The *TaNHX₂* gene was introduced into *Arabidopsis thaliana* and transgenic plantlets were obtained by vacuum infiltration method. The successful integration and expression of the gene was identified by PCR, Southern blot and RT-PCR. Wild type and transgenic lines were moved into MS medium. Salt and drought tolerance analysis showed that overexpression of *TaNHX₂* gene in *Arabidopsis thaliana* could improve the growth status at 3%, 5%, 7% PEG6000 and 100mmol/L, 150mmol/L, and 200mmol/L NaCl medium compared with the wild type. The results indicated that the adverse resistance of transgenic plants was

strengthened in different levels.

2. Gene encoding part of Na⁺/H⁺ antiport protein was cloned from *Arabidopsis thaliana*. Using RNA interference technology constructed plant expression vector which restrains expression of Na⁺/H⁺ antiport protein. The RNAi expression vector was introduced into *Arabidopsis thaliana* and transgenic plants were obtained by vacuum infiltration method. Wild type and transgenic lines were moved into MS medium containing 3%, 5%, 7% PEG6000 and 100mmol/L, 150mmol/L, and 250mmol/L NaCl medium. Salt and drought tolerance analysis showed that plant expression vector by RNA interference technology in *Arabidopsis thaliana* could constrain the growth status compared with the wild type. The results indicated that the salt resistance of transgenic plants was restrained in different levels.

Keywords: Na⁺/H⁺ antiport protein plant expression vector Salt stress
RNA interference

学位论文独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是我在导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除文中已经注明引用的内容外，论文中不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得陕西师范大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确说明并表示谢意。

作者签名： 原江锋 日期： 2005.5.17

学位论文使用授权声明

本人同意研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位属陕西师范大学。本人保证毕业离校后，发表本论文或使用本论文成果时署名单位仍为陕西师范大学。学校有权保留学位论文并向国家主管部门或其它指定机构送交论文的电子版和纸质版；有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆、院系资料室被查阅；有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索；有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。

作者签名： 原江锋 日期： 2005.5.17

英文缩写词表

Abbreviation

英文缩写	英文全称	中文全称
AA	amino acid	氨基酸
Amp	ampicillin	氨苄青霉素
bp	base pair	碱基对
cdNA	complementary deoxynucleic acid	互补 DNA
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
EB	ethidium bromide	溴化乙锭
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	大肠杆菌
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
IPTG	isopropyl-thio- β -D-galactoside	异丙基-硫代- β -半乳糖苷
kDa	kilo dalton	千道尔顿
LB	luria-benrtani medium	LB 培养基
2-ME	2-mercaptoethanol	β -巯基乙醇
min	minute	分钟
Wr	relative molcular weight	相对分子量
O.D	optical density	光密度值
ORF	open reading frame	开放阅读框
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链反应
PEG	polyethylene glycol	聚乙二醇
RNAi	RNA interference	RNA 干涉
RNase	ribonuclease	核糖核酸酶
r/m	rotate per minute	每分钟转速
shRNA	small hairpin RNA	小发夹 RNA
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
sec	second	秒
TAE	tris acetic acid ethylendiaminetetraacetic	Tris-乙酸
Taq	Taq DNA polyermase	Taq DNA 聚合酶
Tris	2-amino-2(hydroxymethyl)-1,3-propanediol	三羟甲基氨基甲烷
X-gal	5-bromo-4-cholro-3-indolyl- β -D-galactoside	5-溴-4-氯-3-吲哚- β -半乳糖苷

引 言

土壤盐渍化是影响农业生产和生态环境的严重问题。全球的盐碱地约占陆地面积的三分之一(Epstein, 1983), 我国也有大面积的盐碱地, 仅海岸带、滩涂地就达一亿多亩, 且有逐年增加的趋势(中国统计局, 1997), 而地球上的淡水资源仅占地球表面水资源的1.6%, 这对于一百多万种动植物和50多亿人口而言, 显然是不足的。在人口不断增加, 耕地日趋减少和淡水资源不足的严重压力下, 如何利用大面积的盐碱地、荒漠化土地和丰富的咸水资源发展农业, 这是国际上和生物科学技术迫切需要解决的重大课题。人们曾试图通过合理的排灌、淡水洗涤、施用化学改良剂等方式来改造盐碱地, 但常因耗资大, 见效少而难以推广。采用传统的方法选育耐盐碱的作物品种虽然简便可行, 但进展缓慢, 至今尚未培育出真正的耐盐品种。随着分子生物学技术的发展, 人们寄希望于基因工程育种(分子育种)。目前已有一些导入单个基因提高植物耐盐性的报道, 但还没有得到真正意义上的耐盐作物^[1]。这是因为植物的耐盐机制十分复杂, 涉及到一系列形态和代谢过程的变化, 转移单个基因往往只能获得部分耐盐性, 要获得可以在海滩种植并用海水浇灌的耐盐作物可能需要同时转移多个基因。耐盐作物的分子育种涉及到植物生理学、生物化学、分子生物学、遗传学、育种学等多个学科领域, 为了探讨分子育种的对策, 了解植物的耐盐机理以及植物耐盐性研究的状况和进展是十分必要的。

1. 文献综述

1.1 盐分对植物的影响

植物赖以生存的环境是多种多样的, 为了生长发育和繁衍后代, 植物对各种不同环境因子以不同方式加以感受、识别, 并做出相应的生理反应, 最终适应环境。通常将这种在植物适应过程中环境因素对植物的作用叫胁迫, 而土壤中盐对植物的作用则称为盐胁迫。盐胁迫下, 植物体必然做出一些相应的生理反应, 从这些生理反应可进一步分析盐胁迫机理及植物适应机制。盐胁迫下植物的主要生理反应可归纳为以下几方面。

1.1.1 盐分对植物外部形态的影响

盐分对植物个体发育的影响非常显著, 总的特征是抑制植物组织和器官的生长和分化, 加快植物的发育进程。小麦长时间处于盐胁迫下, 其叶片的面积缩小, 分蘖数和籽粒数减少, 影响了小麦的产量^[2]。高粱在盐胁迫下, 其叶片的生长区比对照明显降低, 同时, 生长区细胞的最大生长速率也受到了限制。

陆静梅等^[3]对松嫩平原的4种盐生植物根的结构研究表明，它们的根都具有发达的通气组织，可能与盐生植物的耐盐性有关。宁顺斌等^[4]提出，盐胁迫诱导的植物根尖细胞的凋亡可能是植物抗盐的一种生理机制。华栋等^[5]曾研究了盐分对杜氏藻叶绿体超微结构的影响，发现叶绿体结构在低浓度下为杯状，而在高浓度下却离解成多个相连的部分。Grieve等报道了盐分使小麦生殖结构的发生提前，加速了植物的成熟^[6]。此外，盐分还降低叶原基的发生率，减少叶片数，在生殖期，盐分延迟了小麦的分蘖^[7]。

1.1.2 盐胁迫对膜结构的影响

1980年，Levite就指出不同环境胁迫作用于植物时，都会发生水胁迫。盐分胁迫对植物生命活动的影响是广泛而深刻的，其中最明显的变化是由于脱水使膜系统受到损伤，原生质膜是细胞的最外层薄膜，为植物细胞阻抗外界不良环境的屏障，该质膜可使植物有效地防御逆境引起的损伤，从而维持细胞结构的稳定性，确保一系列生理活动的正常运行。当植物处于水分胁迫时，原生质膜对水分胁迫最敏感，首先感受到外界环境条件的变化，原生质膜组成和结构均发生明显变化，使原生质膜的通透性改变，导致细胞内含物质大量外渗，电导率增大。胁迫程度越强，原生质膜受伤越大，严重时造成细胞不能维持其高度稳定的有序结构而受害死亡。另外，由于 Na^+ 竞争性地取代了质膜上的 Ca^{2+} ，也会使膜结构改变，稳定性下降，质膜的透性增强。质膜透性越大，植物细胞受损害的程度也越严重。盐胁迫直接影响细胞的膜脂和膜蛋白，使脂膜透性增大和膜脂过氧化^[8,9]，从而影响膜的正常生理功能。

1.1.3 盐分使植物光合作用下降、能耗增强

在含盐量为0.35%以上时，盐渍土中大量的可溶性盐可导致土壤水势及水分有效性显著降低，使作物立苗困难。高盐造成的植物叶片气孔失水关闭，以保持叶内相对较高的水势，严重阻碍了 CO_2 进入叶肉细胞内，从而降低了植物的光合作用。研究表明， NaCl 短期处理下，菠菜光合作用降低以气孔限制为主，而在长期处理下光合作用的非气孔限制增大(Lu Yuan-fang, et al. 1999)。植物在逆境下生长发育需要额外的消耗能量，包括有机渗透调节物质的合成、离子主动吸收、区域化分配以及盐诱导的代谢变化所消耗的能量。

1.1.4 盐胁迫诱导的氧化胁迫对植物的影响

在盐胁迫等逆境条件下，植物体内活性氧代谢系统的平衡受到影响，这些活性氧若不能及时清除就会造成氧化胁迫。活性氧代谢失调是逆境下需氧生物受害的普遍表现，也是逆境损伤的重要原因之一。增加活性氧如 O_2^- 、 H_2O_2 、 $\cdot\text{OH}$ 的产生量，破坏或降低活性氧清除剂如SOD、CAT、POD、VitE、GSH等的活性或含量水

平。体内活性氧含量增高能启动膜脂过氧化或膜脱脂作用，从而导致膜的完整性被破坏，差别透性丧失，电解质及某些小分子有机物大量渗漏，细胞物质交换平衡破坏，进而导致一系列生理生化紊乱，使植物受到伤害。

1.1.5 盐分造成植物营养亏缺(养分离子吸收不平衡)

盐胁迫下，植物在吸收矿物元素的过程中盐离子与各种营养元素相互竞争而造成矿质营养胁迫，打破植物体内的离子平衡，严重影响植物正常生长，体内离子的不平衡是植物盐害的重要方面。如高浓度的 Na^+ 阻碍作物对 K^+ 和 Ca^{2+} 吸收和运输， Cl^- 抑制植物对 NO_3^- 及 H_2PO_4^- 的吸收，其原因可能是这些离子之间存在着吸收的竞争性抑制作用。

1.1.6 盐分对植物内源激素的影响

在盐分胁迫下，植物体内的 IAA、CTK、GA、ETH、ABA 等均发生不同程度的变化，但最复杂的变化是 ABA 和 CTK。目前，大家公认 ABA 是一种逆境激素，许多植物的 ABA 水平在逆境条件下都明显升高。近年来，人们利用分子生物学技术研究了 ABA 参与的逆境反应。许多研究发现，逆境条件诱导的基因表达也能被 ABA 所诱导。许祥明等^[10]认为，ABA 在植物对外界逆境的感受及其信号传导中起着关键的作用。盐分条件下，植物首先诱导合成了 ABA，而 ABA 又诱导了许多抗盐基因的表达。而且，ABA 对这些相关基因的调控主要是在转录水平上实现的，如有人发现了在某些抗盐基因的启动子附近区域都有 ABA 的顺式调控成分，如 ABA 反应因子等^[11]。

1.1.7 植物对盐胁迫的生理反应

生活在高盐环境中的植物，除了降低根对离子的吸收和阻止离子向地上部的运输外，还利用泌盐结构将已吸收入植物体内的离子排出体外，以维持体内离子浓度低于产生生理毒害的浓度。因而盐生植物在形态上常有泌盐结构，如怪柳、补血草、碱茅属植物的盐腺等。陆静梅等^[3]对采自山东垦利县黄河入海口的盐碱滩地的野生大豆的盐腺进行了研究，通过电镜观察发现在野生大豆茎和叶表皮外切向壁胞间层处着生有层出形成的盐腺，其头部由一个膨大的泡状圆球形细胞构成，基部由一小柄细胞构成。在叶片上分布的盐腺形成了泌盐孔。野生大豆的泌盐方式为：(1)根毛细胞在盐渍环境中汲取盐离子进入体内；(2)原生质体分泌出盐离子进入液泡；(3)由原生质体分泌形成的角质化层将含盐小液泡包裹成小液泡包；(4)含盐的小液泡包在传递细胞作用下，经过胞间连丝流入盐腺的柄细胞内；(5)柄细胞内的含盐小液泡包经过胞间连丝再进入圆球形的盐腺头细胞中，待盐腺的泌盐孔形成，盐腺向外分泌盐离子或盐腺完全成熟时，整体破碎释盐。幼嫩的野生大豆盐腺靠泌盐孔泌盐，成熟的盐腺靠整体破碎释盐。

气孔行为也是盐胁迫一个极为明显的生理变化。研究表明植物最初反应，是通过较小气孔口来调整气孔开度，尽可能地减少因蒸腾造成的水分散失^[12]，降低蒸腾作用将影响叶绿体的捕光和能量转换系统，CO₂可能成为限制因子，且光解水的效率降低。因此，在气孔关闭的同时，植物需要调整其光合作用和呼吸作用的水平。盐胁迫使植物的呼吸作用增强。Dai(1992)认为，呼吸的增强可能是由于水分胁迫引起气孔的关闭和蒸腾的降低，从而引起叶片温度的升高所造成的。它影响暗呼吸也影响光呼吸，但水分胁迫下呼吸作用增加和光合作用降低的程度因不同植物、不同胁迫程度而异^[12]。

脱落酸(ABA)在植物逆境反应中的意义和主要作用受到广泛重视。很早就发现在干旱条件下，小麦、玉米等作物体内 ABA 较正常高出数十倍，说明植物的水分状况与 ABA 的含量密切相关^[13]。除此而外，水分利用效率^[14]，水分饱和亏(WSD)，叶水势，根冠比等生理指标均被证实与水分胁迫有密切关系^[15]。

1.2 植物耐盐的机制

随着我国人口增加，耕地减少，盐碱地资源的开发利用有着极其重要的现实意义。而植物抗盐碱、耐干旱能力的提高和适宜在盐碱地上生长并具有较高经济和生态价值的物种或品系的选育，则是利用盐碱地经济、有效的措施。然而大多数植物对盐碱、干旱的耐受性差，只能生长在氯化钠含量为 0.3%以下的土壤上，这就极大地限制了这些植物在盐碱滩地上的生长。随着现代分子生物技术的飞速发展，克隆、鉴定目的基因、将目的基因转化到目标植物中并获得转基因工程植株，使植物育种取得了突破性进展。至今植物抗盐、耐旱基因工程研究已取得了长足的发展，已有较多研究将抗盐、耐旱基因克隆后整合进目标植物中，从而开辟了选育耐盐植物品种的新途径。然而，由于生物的抗盐、耐旱等是由多基因控制的数量性状，其生理、生化过程是基因相互作用、共同调节的结果，这无疑给研究植物抗盐、耐旱机制、基因表达调控等带来许多不便，但研究工作还是取得了很大的成就。目前已开展的研究主要包括：与渗透稳态(osmotic homeostasis)有关的物质和基因；与 K⁺、Na⁺的稳态和区隔化有关的蛋白质和基因；其他离子稳态(ionic homeostasis)和区隔化的研究；环境胁迫的条件下，细胞的信号传导和有关基因表达的调控。

1.2.1 与渗透稳态有关的物质和基因

当植物受到盐胁迫时，细胞内主动积累一些小分子有机化合物和蛋白类保护剂来维持渗透平衡和体内水分，一般称之为渗透调节剂。这些物质既能有效地调节渗透势，又不会对大分子溶质系统产生太大的干扰作用，还能有益于膜的稳定性。这种相容性物质主要有 4 类：(1)氨基酸类，如脯氨酸等；(2)季铵类化合物，

如甜菜碱和胆碱等；(3)糖醇类化合物，如甘露醇、山梨醇和海藻糖等。这三类物质都有较大的水溶性，能调节渗透势，但又不能进入蛋白质的水化膜内，不仅不会破坏蛋白质的卷曲结构，反而由于被排斥在膜的外表而有益于保护和稳定细胞蛋白质结构，防止酶变性失活。(4)蛋白类保护剂通过保持细胞的渗透压和亲水基团的保水作用发挥作用。

1.2.1.1 脯氨酸

脯氨酸(proline)是植物中主要的渗透调节物质之一，它不仅是生物大分子的保护剂或羟基的清除剂，还是植物从胁迫条件回复正常过程中迅速、有效的氮源、碳源和还原剂。许多物种，包括细菌、真菌和植物等，在渗透胁迫条件下常通过积累脯氨酸来达到渗透调节的作用。尽管对脯氨酸的积累究竟是由于盐胁迫引起植物损伤的征兆，还是耐盐的原因目前尚存有争议，但脯氨酸合成酶基因的克隆、分离和遗传转化却取得了很大成功，至今已从细菌、酵母、水稻、黑麦、大豆、拟南芥、苜蓿等中克隆出了多个脯氨酸合成酶或与之相关的基因，即脯氨酸合成酶基因族。在胁迫条件下由谷氨酸合成脯氨酸在植物脯氨酸合成的两条途径中占主导地位。脯氨酸合成发生在细胞质中。在番茄、拟南芥和苜蓿等真核基因组中有两个脯氨酸基因位点，一为编码合成 γ -谷氨酰激酶(γ -GK)和谷氨酸-5-半醛脱氢酶(GSA)的多顺反子mRNA，另一个即为 Δ' -吡咯啉-5-羧酸合成酶基因(Δ' -pyrroline-5-carboxylate synthase, P5CS)^[16]。P5CS基因是一个双功能基因，编码 γ -GK和GSA两种酶，催化从谷氨酸合成脯氨酸的最初两步反应。P5CS基因在积累脯氨酸以降低渗透胁迫，在正常和胁迫条件下反馈调控植物中脯氨酸合成水平等方面均起着重要作用。在胁迫条件下植物中脯氨酸的积累是两条途径相互调控的结果：即增加脯氨酸合成酶基因的表达量，同时抑制脯氨酸降解酶的活性^[16]。

研究表明烟草细胞在NaCl胁迫下，脯氨酸占游离氨基酸总量的80%以上^[17]。高粱在严重缺水条件下，叶组织中脯氨酸的含量增加了108倍，占游离总氨基酸的60%以上^[18]。在其它植物中也有类似报道，但脯氨酸的积累究竟是由于盐胁迫引起植物损伤的征兆，还是耐盐的原因，目前尚不清楚。有人认为脯氨酸的积累是耐盐的原因，而不是盐胁迫下的偶然结果，Van Swaaij等^[19]建立的大豆细胞系在无盐胁迫情况下也能积累大量脯氨酸，其中有的细胞系确实具有较强的耐盐能力，表明大量脯氨酸的积累也许具有对抗盐害的功能。另外有人则认为脯氨酸的积累是盐胁迫的偶然性结果，以大豆为例，在同样的盐胁迫条件下，脯氨酸的积累所显示的是一种栽培特性，其含量与抗渗透胁迫能力没有相关性^[20]，同样，在盐胁迫条件下培育的高粱细胞中发现耐盐性与脯氨酸的积累也没有相关性^[21]。由此可见，脯氨酸的积累与耐盐性状的关系还有待进一步研究。近年来，探讨P5CS

基因在转基因植物中的作用机制成了脯氨酸基因工程研究中的热点之一。目前的研究表明，在生物细胞中脯氨酸的生物合成主要有如下几种调控机制：在细菌和酵母中，GK 和 GSA 由分离的肽合成并形成异源双聚体。GK 由合成途径的终产物脯氨酸反馈抑制。在动物和植物中，GK 和 GSA 由双功能的 P5CS 基因编码。人类的 P5CS 基因由鸟氨酸(Orn)反馈调控，植物的 P5CS 基因则由脯氨酸变构调控 [16]。

1.2.1.2 甜菜碱(betaine)

甜菜碱(betaine)是生物界广泛存在的细胞相容性物质，也是公认的在微生物和植物细胞中起着无毒渗透保护剂作用的主要次生代谢积累物之一，其积累使许多代谢过程中的重要酶类在渗透胁迫下能继续保持活性。多种生物如细菌、藻类、高等植物等，在盐碱、水分和低温胁迫下，能诱导甜菜碱醛脱氢酶基因表达，积累甜菜碱类物质来维持细胞的正常膨压。由于甜菜碱的合成途径比较简单，且已证明甜菜碱合成后几乎不再被进一步代谢，属于永久性或半永久性渗透调节剂，因此甜菜碱被认为是最有希望的渗透保护剂之一，在植物抗盐、抗旱研究中已越来越受到重视。

自然条件下生物体合成的甜菜碱主要有两个方面的功能：(1)调解胞内渗透压。高盐和干旱环境直接导致细胞内水分因蒸腾作用而损失；低温冻害导致细胞膜两侧凝固点差异，随之引起胞内水分流失，这些作用都统称为渗透胁迫或水分胁迫 [21,22]。渗透胁迫下，植物在细胞内加速合成和积累高浓度的甜菜碱、脯氨酸等小分子化合物，可有效降低渗透势，避免水分过度丧失，从而维持细胞具有相对稳定的膨压。(2)保护细胞膜和酶类。高浓度的甜菜碱可以保护细胞膜和稳定细胞中的生物大分子，如蛋白酶的正常功能。甜菜碱、脯氨酸等小分子有机化合物溶解度高，本身不带电荷，而且在高浓度下对细胞也没有副作用，通过与细胞膜和生物大分子的亲水表面作用，能够对抗或部分缓解胁迫条件下细胞脱水后胞内引起离子浓度升高而导致的离子毒害作用 [23]。

植物体内甜菜碱是在叶绿体内通过光或激素(如 ABA)诱导合成的(Weigel *et al*, 1986; Ishitani *et al*, 1995)。一般认为甜菜碱的合成是以丝氨酸为原料，经过一系列的反应生成胆碱，再由胆碱经甜菜碱醛通过两步不可逆的氧化反应生成甜菜碱。这两步氧化反应需要两个酶的催化：第一个是胆碱单加氧酶(choline monooxygenase, CMO)，它催化胆碱氧化成甜菜碱醛(betaine aldehyde)；第二个是甜菜碱醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase, BADH)，它催化甜菜碱醛形成甜菜碱(betaine)。许多农作物如烟草、水稻、土豆、番茄等自身并不能积累甜菜碱，如果利用基因工程技术，把与甜菜碱合成相关的外源基因，转入普通作物使其积

累甜菜碱，将可能达到增强作物耐盐性的目的。迄今为止，已有不少植物被成功地导入了BADH基因及其它与甜菜碱合成相关的基因，并分别在不同程度上提高了这些植物的耐盐性。如烟草^[24]、拟南芥^[25]、水稻^[26]、小麦等。另外，转入外源BADH基因对植物耐寒、耐热等的影响也有一些报道。

1.2.1.3 多元醇(Polyol)

多元醇含有多个羟基，亲水性强，能够有效地维持细胞内水活度，从而有效地抵抗盐胁迫下的渗透脱水。多元醇包括单链代谢物，如甘露醇、山梨醇、环状多元醇、肌醇和它的甲基化衍生物。多元醇的积累与植物对干旱和盐胁迫的耐受性有关。多元醇在植物抗盐中起两方面作用：一是渗透调节，一是渗透保护。甘露醇和肌醇生物合成所需的酶基因mtlD(1-磷酸甘露醇脱氢酶基因)，其只在盐胁迫或低温下才被诱导表达。mtlD是由Tarczynski等人1993年从大肠杆菌中克隆到的。随后将该基因转入烟草中，在高浓度盐分下，通过导入1-磷酸甘露醇脱氢酶基因的转基因植株检测到了甘露醇的积累，与对照组相比有较高的盐耐受性，如长新根、新花，植株鲜质量和株高都有所提高^[27]。多元醇除了对细胞起到渗透保护作用外，还能清除活性氧，在这方面甲基肌醇比甘氨酸甜菜碱更为有效(Smirnoff等1989; Orthen等1994)，尤其在高毒性羟基存在下，甲基肌醇及肌醇能保护对活性氧敏感的酶和细胞膜^[28]。

1.2.1.4 糖类(Glucide)

糖类物质也是植物受到盐胁迫时常常积累的小分子有机物，如海藻糖、果聚糖、蔗糖等。它们既是一种贮藏性碳水化合物，又能作为渗透调节剂保护生物细胞和生物活性物质在不良环境条件下免遭破坏。其中，海藻糖(trehalose)是一种国际上新近开发的主要低聚糖之一，广泛存在于海藻、昆虫及高等植物体内，保护生物细胞在脱水、干旱、高温、冷冻、高渗透压等环境下免遭破坏；海藻糖还能在干燥状态下保持细胞组织的脂类、蛋白质、碳水化合物和核酸等不受破坏。在许多微生物中相继克隆了海藻糖代谢途径的各种酶基因，如酵母中海藻糖合成酶基因tsp1、tsp2及两种海藻糖酶的基因nth1和ath1；大肠杆菌中海藻糖合成酶基因ostA、ostB及海藻糖酶基因treB/C等。已有报道将大肠杆菌的ostA基因和ostB基因转化烟草和马铃薯。期望这些植物能积累海藻糖而获得抗渗透胁迫的特性^[29]。

1.2.1.5 调渗蛋白(Osmotic, OSM)

调渗蛋白是在盐胁迫、脱水或低水势条件下，植物在对渗透压力适应的过程中所合成的一类蛋白，它是蛋白质渗透胁迫保护剂。它由Singh等人于1983年在含NaCl的培养基上培养烟草细胞时发现^[30]，1989年LaRosa把这种蛋白称为调渗蛋白，随后获得了该蛋白的cDNA克隆。调渗蛋白基因表达受转录后水平的调节，脱落酸

诱导编码调渗蛋白mRNA的合成并使其稳定,但只有调渗胁迫才能导致调渗蛋白的积累。

1.2.1.6 晚期胚胎发生富集蛋白(LEA 蛋白)

1981年Dure等人首次从棉花种子发育晚期胚胎中发现大量积累的一类蛋白质,称之为LEA蛋白。LEA蛋白Mr较小,约10~30 kDa,富含甘氨酸和其他亲水氨基酸,疏水氨基酸含量很少,具有高亲水性和热稳定性。LEA蛋白的功能可能是作为脱水保护剂而发挥作用,在种子成熟、干燥过程中和渗透胁迫条件下保护细胞免受水势降低的损伤;LEA蛋白基因虽然是在种子成熟和发育阶段特异表达的基因,但也可在植物受到干旱、低温和盐渍等环境胁迫后造成脱水的营养组织中表达。在菜豆(*Phaseolus vulgaris*)的种子中发现一种新的LEA蛋白基因Pvlea-18,研究者发现这种LEA蛋白不仅在受到水分胁迫的菜豆秧苗中积累,而且在被良好灌溉的秧苗中也有积累^[31]。1996年Xu Deping用大麦的HVI1基因进行转基因水稻的研究,转基因水稻获得高的耐盐性。这一结果直接证明了LEA基因表达特点和LEA蛋白功能的假说。LEA基因可作为一种抗胁迫遗传工程的潜在的分子工具^[32]。

1.2.1.7 渗透剂的转运

不同的组织器官,新陈代谢率不相同,对营养物质的生产和需求也不相同。对于处在不同发育阶段的各组织而言,特定的发育过程也会有特定的营养物质需求。当植物处于胁迫环境条件下时,不同组织器官所受到的影响存在差异,对渗透剂的需求也各有不同。研究表明,脯氨酸在植物中各组织器官的沉积,除了各组织的新陈代谢调控系统以外,脯氨酸的转运系统也影响了脯氨酸在某些组织中的分布和沉积,且在部分组织中,脯氨酸的转运系统起着决定性的作用。在植物的花粉形成过程中,经历了脱水干旱过程,积累高浓度渗透剂以降低胞内渗透势,这对花粉细胞发育极其重要。在番茄花粉中脯氨酸的含量超过游离氨基酸总量70%,花粉器官中脯氨酸的含量占总氨基酸的比例是其他组织器官的60倍^[33]。在葡萄果实发育后期,脯氨酸大量积累,而相关合成酶如P5CS活性却未有增加^[34]。在对玉米根伸长区的研究中,发现外界胁迫条件如干旱、高盐分会促使根部大量积累脯氨酸^[35,36]。在以上组织中,脯氨酸合成和降解相关途径虽然受到适应性调节变化,但不是脯氨酸大量积累的主要原因,应用同位素标记的示踪底物进行生化分析显示,内源性脯氨酸的新陈代谢贡献很小,外源性脯氨酸的转运和积累才是主要原因。这使得脯氨酸的转运系统在最近成为一个新的逆境相关研究的热点。

1.2.2 与K⁺、Na⁺的稳态有关的蛋白质和基因

在正常生理条件下,植物细胞胞质K⁺浓度相对较高(100-150mmol/L),而Na⁺浓度相对较低(1-10mmol/L)^[37],有较高的K⁺/Na⁺比。K⁺涉及植物许多生理过程包括

酶活性调节、蛋白质合成及渗透调节等，并且是唯一一种植物所必需的以相对高浓度存在的阳离子。因此，保持胞质 K^+ 浓度，使其高于一特定值，对于植物的生长及耐盐性都是非常必要的^[38]。在盐渍化土壤中， Na^+ 是一种主要的有害离子。因为许多胞质酶活性对 Na^+ 都非常敏感，因而过高的 Na^+ 会对植物造成伤害。因此，在盐渍化土壤中，植物要想正常生长、发育并完成其生活史，必须保持较低的胞质 Na^+ 浓度。要想保持低的胞质 Na^+ 浓度，植物细胞应限制 Na^+ 内流，增加 Na^+ 的外排，或者把其区隔化至液泡^[39]。其简略的过程为： Na^+ 通过 Na^+-K^+ 共转运蛋白或 K^+ 通道大量“涌入”胞质， $H^+-ATPase$ ， Na^+/H^+ 逆向转运蛋白等被激活，协同工作以驱动 Na^+ 外排和运入液泡，最终形成胞外、胞质、液泡三者间的离子平衡。

1.2.2.1 Na^+ 内流与 K^+ 吸收

盐渍生境中，植物细胞质膜内负外正的膜电势和胞外 Na^+ 浓度的升高建立起的 Na^+ 电化学势梯度，都有利于 Na^+ 从外界环境到植物细胞内的被动运输^[45]。虽然目前还不清楚植物 Na^+ 吸收机制，但 Na^+ 和 K^+ 的水合半径非常相似，运输蛋白很难把它们区分开，各种证据均显示 Na^+ 可竞争 K^+ 跨膜运输进入细胞。一般认为 K^+ 运入植物细胞通过 K^+ 运输体^[40,41]。植物通过低亲和 K^+ 运输体和高亲和 K^+ 运输体从胞外介质中吸收 K^+ 。已确定的低亲和 K^+ 转运体大致可分为三种类型：内向整流 K^+ 通道 (K^+ inwardly rectifying channels, KIRCs)，外向整流 K^+ 通道 (K^+ outwardly rectifying channels, KORCs)，电压不依赖型阳离子通道 (voltage independent channels, VICs)。

内向整流 K^+ 通道，如AKT1^[40,41]，通过质膜超极化活化 K^+ 内流，在外界 Na^+ 、 K^+ 的生理浓度下具有较高的 K^+/Na^+ 选择性，随着外界 Na^+ 浓度的升高，它们可以显著地调节 Na^+ 的吸收。此外，*akt1-1*突变体在 NH_4^+ 存在下可在 K^+ 浓度低于 $100\mu mol/L$ 的培养基上生长，表明AKT1可在微摩尔 K^+ 浓度范围内介导 K^+ 吸收^[42]。

KORCs在质膜去极化时开放，介导 K^+ 外排及 Na^+ 内流^[43]。通过膜片钳技术已从许多植物品种和组织中鉴定到KORCs。Schachtman^[44]等人证明将小麦的根放入高 $NaCl$ 浓度溶液会诱导根细胞质膜去极化，从而活化外向整流 K^+ 通道，促进 Na^+ 顺电化学势梯度进入细胞。这些通道中有一种叫无选择性外向整流通道 (non-selective outwardly rectifying conductance, NORC)，它们对阳离子的吸收没有特殊的选择性，胞质内 Ca^{2+} 离子浓度的上升即可将其激活^[40,41]。研究表明 Na^+ 取代质膜上的 Ca^{2+} 可诱导质膜的去极化，质膜去极化将激活KORCs，因而引起 K^+ 的外流和 Na^+ 顺其电化学势内流。许多研究表明植物细胞质膜上还存在电压不依赖型阳离子通道 (voltage-independent cation channels, VIC)，这些通道比电压依赖型通道 (KIRCs和KORCs)具有较高的 Na^+/K^+ 选择性。1998年Amtmann和Sanders提出了不同阳离子通道的简单模型并认为电压不依赖性通道是高盐环境中 Na^+ 吸收的主要途

径^[45]。两个高亲和K⁺运输体家族可决定植物细胞的K⁺/Na⁺比。其一为高亲和K⁺运输体^[46](K⁺ uptake transporter-high affinity K⁺ transporter, KUP-HAK), 它在细菌、真菌、高等植物中广泛存在。拟南芥至少有6个基因, 大麦有2个基因编码KUP-HAK高亲和K⁺运输体。HAK运输体通过K⁺/H⁺协同作用发挥效应, 并有较高的K⁺选择性。Na⁺可在毫摩尔浓度范围内竞争性阻碍HAK运输体, 并且大麦HAK1允许Na⁺渗入。其二为HKT-TRK运输体, 它包括高亲和K⁺运输体HKT及其homologs。这类运输体在异源表达系统(如非洲爪蟾卵母细胞表达系统)中具有双重离子选择性: 小麦TaHKT1在微摩尔Na⁺浓度下为Na⁺/K⁺协同运输体, 在毫摩尔Na⁺浓度下为Na⁺单向运输体^[47]。而拟南芥AtHKT1只运Na⁺^[48]; 水稻HKT有两个基因编码, OsHKT1类似AtHKT1为Na⁺运输体, 而OsHKT2类似TaHKT1, 可作为Na⁺/K⁺协同运输体或单向运输体。OsHKT1基因转录在外界低K⁺浓度下增加, 而在外界高Na⁺浓度下降低^[49]。所有的研究结果表明HKT蛋白可能介导组成型的Na⁺吸收。

1.2.2.2 Na⁺外排

Na⁺从细胞内排出需要逆着其电化学势梯度, 是一个主动运输的过程。某些海藻的质膜存在Na⁺-ATPase, 水解ATP驱动Na⁺向胞外运输。Shono等^[50]用RACE技术在单细胞藻类*Heterosigma akashiwo*中克隆得到第一个植物Na⁺-ATPase基因HANA, 该基因编码含1330个氨基酸的多肽, 和Na⁺/K⁺ ATPase的 α -亚基有40%的同源性。目前, 在高等植物中还没发现Na⁺-ATPase的存在, 但在泌盐植物盐腺的分泌细胞是否具有质膜Na⁺-ATPase是一个值得探讨的问题。高等植物Na⁺的外排机制主要与质膜Na⁺/H⁺逆向转运蛋白有关, 质膜H⁺-ATPase水解ATP产生能量把H⁺从细胞质中泵出细胞, 产生跨质膜的H⁺电化学势梯度, 驱动质膜上的Na⁺/H⁺逆向转运蛋白, 使H⁺顺其电化学势进入细胞, 同时Na⁺逆其电化学势排出细胞^[51]。目前, 质膜Na⁺/H⁺逆向转运蛋白活性已在许多高等植物中检测到。不同物种的质膜Na⁺/H⁺反向转运蛋白其活性调节方式也有一些差异。例如*Dunaliella salina*和*Atriplex nummularia*的质膜Na⁺/H⁺反向转运蛋白活性会随胞外NaCl的浓度上升而上升。在对*Atriplex*的研究中还发现Na⁺/H⁺反向转运蛋白的活性增加不仅依赖于Na⁺离子浓度, 还与质膜H⁺-ATPase的活性有关: 用400mmol/L NaCl处理*Atriplex*植株发现其质膜的Na⁺/H⁺反向转运蛋白的转录水平有明显的增加。目前研究比较深入的植物质膜Na⁺/H⁺逆向转运体为拟南芥^[52](salt overly sensitive 1, SOS1)。SOS1为127kDa的多肽, 其N-末端有12个跨膜区, C-末端有一个长的亲水尾巴。SOS1跨膜区与细菌及真菌质膜Na⁺/H⁺逆向转运体有非常高的序列相似性。对SOS1突变体大量等位基因进行序列分析发现SOS1的跨膜区及亲水尾部对于植物耐盐性都非常重要。最近对*AtSOS1-promoter-GUS*转基因拟南芥进行分析, 发现SOS1主要在根尖表皮细胞和根

茎叶木质部/共质体边界薄壁细胞中表达^[53]。在拟南芥中过量表达*AtSOS1*明显增加了植物的耐盐性，进一步证明*SOS1*及 Na^+ 外排对于植物耐盐性的重要作用^[54]。

1.2.3 Na^+ 区隔化

1.2.3.1 Na^+ 区隔化与液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白

无论是盐生植物还是非盐生植物细胞质的酶都对 Na^+ 非常敏感。为了把胞质内的 Na^+ 保持在非毒性水平，许多植物把 Na^+ 区隔化入液泡。这一方面减少了胞质 Na^+ 浓度，避免胞质过高 Na^+ 对生理生化过程的干扰；另一方面减小了植物细胞的水势，促进植物从外界吸水，从而有利于植物在盐渍化土壤中的生存。这种作用一般认为是通过液泡膜上的 Na^+/H^+ 逆向转运体完成的^[41,55,56]，对液泡膜上 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的研究始于酵母。Nass^[57]在筛选酵母Calcineurin突变体(*cnb1*)的抑制子时发现了一个与耐盐性有关的新基因*NHX1*，它编码 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白，定位于前液泡膜和液泡膜上负责 Na^+ 的区隔化。多方面的证据证明酵母中去除 Na^+ 毒害的机制可能与植物相同。

液泡是植物成熟细胞中最大的细胞器，能贮存营养和代谢产物，避免有毒物质对细胞的伤害，大大提高细胞质表面积与体积之比，有利于细胞与环境的物质交换，在细胞化学能利用、信号转导、膨压调节和耐盐性中起重要作用。而盐分积累于液泡中是维持细胞质中高 K^+/Na^+ 比的最有效机理之一。在正常生理条件下，植物胞质维持着较高的 K^+/Na^+ 比值，盐胁迫必然导致 Na^+ 过量流入胞内。盐生植物和较耐盐的淡水植物不但能够吸收胞质内的 Na^+ 、 Cl^- 以消除其对胞质的毒害，并且将其贮存于液泡中作为渗透剂^[58,59,60]，此液泡膜必须有高效的运输机制以保持液泡内外的盐分梯度。鉴于液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白在植物盐适应过程中的重要作用，对它的研究得到了人们越来越广泛的重视并取得了很多重要的进展。

1.2.3.2 液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白的作用机制

盐分分隔化是依赖液泡膜上的 Na^+/H^+ 反向转运蛋白完成的。Blumward等人1985年首次于甜菜的贮藏组织中发现液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白^[61]。随后在大麦^[62]，春花(*Catharanthus roseus*)^[63]，海滨车前(*Plantago maritima*)^[64](Staal et al.,1991)，冰叶日中花(*Messembryanthemum crystallinum*)^[65]，向日葵^[66]等物种中发现类似现象。

液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白的动力来源于液泡膜上的质子泵产生的跨膜电势梯度，液泡膜的质子泵由液泡膜 H^+ -ATPase和 H^+ -PPiase组成。在逆境适应过程中，盐诱导液泡膜 H^+ -ATPase的基因表达，使其酶活性和泵运质子能力增强，但不是在盐适应之后。与之相反，尽管单位膜蛋白的 H^+ -PPiase质子转运活性比 H^+ -ATPase高2~3倍， Na^+ 却是 H^+ -PPiase的抑制剂，这或许是由于 Na^+ 竞争结合了

H⁺-PPiase 的钾离子结合位点的原因^[67]。因此液泡膜 Na⁺/H⁺反向运转蛋白一方面表现出利用液泡膜两侧的质子电化学是梯度作为驱动力将 Na⁺逆浓度梯度转运至液泡内贮存。该过程最终可使液泡膜积累 4~10 倍于胞质的 Na⁺浓度。另一方面证实加入 Na⁺都会使 ATP 依赖的酸性液泡间质变成为碱性^[68]，造成液泡间质碱化现象。而这一现象可抑制液泡膜 Na⁺/H⁺反向运转蛋白活性^[69,70,71,72,73,74]。体外实验中发现当液泡膜两侧的 pH 梯度达到 1.5 时液泡能积累高于胞质 10 倍的 Na⁺离子，而没有这一梯度则不能观测到这一活性^[66]。Na⁺/H⁺反向运转蛋白对盐胁迫的应答有三种形式：盐诱导一些植物的反向运转活性；一些植物无此效应；还有一些植物在无盐的情况下反向运转活性较低，盐促进其活性的增加。在对甜菜悬浮细胞的试验中发现，在培养基中增加 NaCl 的浓度并不改变这一反应的 Km 值，但是 Vmax 却增加了一倍^[68]。这一现象说明在这一过程中可能有更多的反向运输器被合成出来。与之相反，大麦的盐活化效应可在盐处理 30 分钟内发生，这种活化可能是在于激活液泡膜上已经存在的蛋白而不是依赖蛋白的诱导合成，因为在蛋白合成受抑制之后仍然能够观察到这一现象^[75]，在 *Plantago* 属的物种中，只有耐盐型的 *Plantago maritima* 液泡存在 Na⁺/H⁺反向运转活性，而在膜上的反向运转蛋白外排盐分而并不在液泡中积累，车前属植物 (*Plantago*) 中出现的这一现象或许与此有关。

1.2.3.3 液泡膜 Na⁺/H⁺反向运转蛋白研究现状

目前虽已有大量的生化证据说明植物的 Na⁺/H⁺反向运转蛋白在盐适应过程中的作用，然而由于相关的克隆和研究进展缓慢，阻碍了对盐适应过程该蛋白分子机理详细了解。酵母 *NHX1* 基因的分离鉴定及拟南芥基因组计划的进展为高等植物的液泡膜 Na⁺/H⁺反向运转器的分离鉴定奠定了基础。

近来从拟南芥中已分离得到的编码液泡膜 Na⁺/H⁺反向运转蛋白的基因 *AtNHX1* 以及它在酵母中异源表达的情况测定，该基因编码一个有 538 个氨基酸组成的蛋白，并含有一个氨氯吡嗪脒结合域。它与线虫 (*C.elegans*) 和人类的 Na⁺/H⁺反向运转器有很高的序列同源性，但 N 端和 C 端除外。在对潮霉素和 Na⁺敏感的 $\Delta nhx1$ 细胞中表达 *AtNHX1* 可部分抑制突变体的阳离子敏感表型。Northern 杂交分析发现，当植株分别在 250mmol/LNaCl 和 250mmol/LKCl 中处理后，*AtNHX1* 的 mRNA 转录产物分别提高了 4.2 倍和 2.5 倍，说明 *AtNHX1* 在阳离子平衡方面可能起着一定作用。该结果暗示着 *AtNHX1* 的功能在某些方面与酵母 *NHX1* 相当。

随后，Apse 等人为了检测 Na⁺/H⁺反向运转蛋白的活性，分别从野生型和过表达 *AtNHX1* 的拟南芥植株提取了完整的液泡，检测了各自的 Na⁺依赖的质子运输活性。实验发现，尽管 Na⁺/H⁺交换活性在野生型植株中很低，但在转基因植株中却

十分显著，而且转基因植株中液泡膜 Na^+/H^+ 离子交换活性的提高与 *AtNHX1* 的表达量呈正相关。另外，转基因植株能够在含有 200mmol/L NaCl 的环境中正常繁殖。综合上述结果，说明 Na^+/H^+ 反向运转蛋白在盐胁迫中起作用^[76]。

除拟南芥之外，Fukuda 等在水稻中也发现了 *AtNHX1* 的同源基因 *OsNHX1*，它与 *AtNHX1* 的氨基酸序列同源性的为 73%，并具有可能的氨氯吡嗪咪结合位点 LFFIYLLPPI。Northern 杂交分析表明 NaCl 可以诱导 *OsNHX1* 的转录。这些结果暗示着 *OsNHX1* 可能是一个液泡膜 Na^+/H^+ 反向运转蛋白，并且在水稻的盐适应过程中起作用，但 *OsNHX1* 的功能还需要进一步试验证实^[77]。

最近有人从盐生植物 *Atriplex gmelini* 中分离到一个编码 Na^+/H^+ 反向运转蛋白的基因 *AgNHX1*。这个基因编码一个由 555 个氨基酸组成的蛋白，Mr 为 61.9kDa，其氨基酸序列与 *AtNHX1* 和 *OsNHX1* 有 75% 的同源性。*AgNHX1* 的活性与液泡膜质子焦磷酸化酶活性相关，而不与 P 型 ATPase 相关，表明 *AgNHX1* 可能位于液泡膜；*AgNHX1* 的 mRNA 和蛋白水平都受到盐胁迫的诱导；酵母 $\Delta nhx1$ 突变体中表达 *AgNHX1* 增强了细胞内的盐分区隔化水平。也说明 *AgNHX1* 在盐胁迫中的作用。Yamaguchi 等人最近从 *Ipomoea nil* 中分离出一个编码 Na^+/H^+ 反向运转蛋白的基因 *InNHX1*，这个基因产物通过改变液泡的 pH 值控制花瓣蓝色的形成，酵母突变互补实验也证实该基因与盐胁迫有关^[78]。

耐盐性是一个复杂性状，是多个基因相互作用的结果 (Cheeseman, 1988; Barteland Nelson, 1994)。大量的盐胁迫反应的基因似乎也支持这个观点 (Zhu, 2000)。在一个基因型的品种中只有积累了多个耐盐基因才能具有耐盐性，单一的基因不能提高作物的耐盐性 (Ye 等, 1988; Cuartero 等, 1999)。然而对 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的遗传转化研究表明，转单一的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因能够明显提高作物的耐盐性。Apse 等 (1999) 对转 *AtNHX1* 基因的拟南芥植株进行了分析。过量表达 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的转基因拟南芥植株在 200mmol/L NaCl 中能正常生长发育。

此外，随着人们对液泡膜 Na^+/H^+ 反向运转蛋白了解的深入，以及相关基因的成功分离鉴定，它在农业生产上的应用也逐渐开始为人们所重视。最近，Zhang 和 Blumwald 在西红柿中过量表达拟南芥液泡膜 Na^+/H^+ 反向运转器，发现转基因植株能在含 200mmol/L NaCl 的土壤中正常生长，开花和结实。更令人感兴趣的是，尽管植株的叶片有很高的盐分积累，接触的果实只含有很低的盐分^[79]。随后 Zhang 等人又在油菜 (*Brassica napus*) 中过量表达 *AtNHX1*。他们发现尽管转基因植株体内的含盐量占到其干重的 6%，但高盐土壤 (200mM NaCl) 对植物的生长仅造成了很轻微的影响，而且作物的产量和质量都没有受到盐渍土壤的影响^[80]。上述试

验结果预示着植物的液泡膜 Na^+/H^+ 反向运转蛋白对于改造农作物的耐盐性状以及耐盐作物在农业生产中的应用有着较重要的作用。

1.2.4 其他离子的稳态(ionic homeostasis)和区隔化

1.2.4.1 Cl^- 的吸收和区隔化

Cl^- 的吸收可分为两个阶段，一是盐胁迫后，另一个是在离子稳态建立后^[81,82]，盐胁迫时， H^+ 电化学势梯度变化， Na^+ 的内流使膜电势减弱，有利于 Cl^- 顺电化学势进入细胞。在这一被动运输中，可能有阴离子通道介入。但在稳定状态(质膜两侧离子平衡和电化学势重新建立后)，质膜电势达 $-120\sim-200\text{ mV}$ ， Cl^- 内流伴随 H^+ 转运，可能通过 Cl^-/H^+ 同向转运蛋白进行跨膜运输。进入细胞后， Cl^- 可被区隔化入液泡。 Cl^- 向液泡的转运可能是通道或载体使得 Cl^- 顺 H^+ 梯度进入液泡，液泡膜内 $+50\text{ mV}$ 的电势完全可以使液泡内 Cl^- 浓度高达胞质中的10倍。关于盐胁迫过程中植物细胞 Cl^- 吸收及稳态重建的机制资料很少，是一个有待研究的领域。

1.2.4.2 Ca^{2+} 的稳态

Ca^{2+} 对植物细胞的结构和生理功能有重要作用。许多胁迫因子如温度、光照、盐等都能引起胞质游离 Ca^{2+} 水平的瞬间增加，高浓度的 Ca^{2+} 直接或间接(如 Ca^{2+} -CaM)活化一定靶酶，从而产生相应的生理生化反应。增加的 Ca^{2+} 对质膜和液泡膜上钙转运体产生反馈作用，激活转运体，将增加的 Ca^{2+} 泵回胞外或钙库中，恢复静息时的 Ca^{2+} 浓度，这一过程称为 Ca^{2+} 的稳态平衡过程^[83]。但若短暂、瞬息增加的胞质 Ca^{2+} 在行使完信使功能后仍长时间停留在胞质中，就会引起 Ca^{2+} 中毒，导致细胞结构的伤害，最终引起植物死亡。因此，调节 Ca^{2+} 转运系统活性，维持胞质 Ca^{2+} 稳态平衡，在植物抗逆性建立过程中具有重要作用。 Ca^{2+} 转运系统由介导 Ca^{2+} 内流的通道及介导 Ca^{2+} 外排的 Ca^{2+} 主动转运体组成。通过电生理及生化方法在质膜(PM)，液泡膜及内质网(ER)上确定了许多 Ca^{2+} 通道的存在。包括：大阳离子通道(Maxi-cation channel)，非选择性阳离子通道(nonspecific cation channel)，电压依赖 Ca^{2+} 通道 VDC(voltage-dependent calcium channel)，慢活化液泡通道 SV (slowly activating vacuolar channel)，IP₃(InSP₃-activated receptor)，cADPR-R (putative cyclic ADP-ribose activated receptor)以及 BCCI (Brionica Ca^{2+} channel)。但编码这些通道的基因尚未确定^[84]。

Ca^{2+} 主动转运体主要分两类，其一是 $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ 逆向转运体($\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter)如 CAX。CAX1 是第一个被成功克隆并有功能性表达的植物 $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ 逆向转运体^[91]。其二是 Ca^{2+} -ATPase(钙泵)，直接水解 ATP 转运 Ca^{2+} 。根据蛋白质序列分析，将植物 Ca^{2+} 泵分为 IIA 和 IIB 型 Ca^{2+} 泵，分别对应动物细胞上的 ER-型和 PM-型 Ca^{2+} 泵。从植物中已克隆出编码 IIA 型泵的基因，如番茄的 *LCAI*、水稻的 *OCAI*、拟南芥的

*ECAI/ACA3*等。这些IIA型泵是由一条多肽链组成,表现出相似的Mr: 115-116 kDa。编码IIB型泵的植物基因有拟南芥*ACAI*和*ACA2*、花椰菜的*BCAI*等。*BCAI*和*ACA2*及其同源物都是CaM刺激的Ca²⁺-ATPase,它们与CaM的结合区位于N末端,并且定位在细胞内膜上,具有相似的Mr(111-116kDa),可能有10个跨膜区^[84]。

有许多证据表明植物Ca²⁺转运体与盐适应有关。在NaCl处理的番茄、烟草和拟南芥中Ca²⁺-ATPase基因转录增加,表明随NaCl处理时间的延长,钙泵数量增加,从而使胞质中Ca²⁺水平降低,维持胞质Ca²⁺稳态,保证植物正常生长。最近从酵母中得到的实验数据证明Ca²⁺可活化盐胁迫信号,从而调控离子稳态以及耐盐性^[86]。高盐造成的高渗透诱导Ca²⁺通过Ca²⁺运输系统跨质膜内流,从而使胞内Ca²⁺浓度短时(1分钟)增加。进而活化PP2B(控制离子稳态化的盐胁迫信号的关键中间组分),诱导主要负责Na⁺跨质膜外排的P-型ATPase基因*ENAI*的转录。高渗透诱导的胞内Ca²⁺浓度增加还可活化钙调素,钙调素反过来又可通过Calcineurin(依赖于Ca²⁺,钙调素的蛋白磷酸酶PP2B)途径活化控制离子稳态和耐盐性的信号成分。植物中也存在类似的机制^[89]。盐胁迫引起植物胞质中Ca²⁺的快速增加,升高的Ca²⁺可启动信号级联反应,从而调节植物盐适应性^[88]。

1.2.5 跨膜电化学梯度的重建

盐胁迫导致Na⁺大量涌入胞内,破坏了植物细胞原有的跨膜电化学势梯度。而K⁺等营养物质向胞质的运输和Na⁺向液泡内的区隔化等都必须依赖跨膜电化学势梯度提供驱动力。因此,重建跨膜电化学势梯度是细胞存活的必要条件。细胞膜H⁺-ATPase与液泡膜H⁺-ATPase和H⁺-PPase主要负责建立和维持胞质(-120~200 mV)和液泡(+50 mV)的跨膜电化学势梯度,从而驱动各种溶质的次级转运。

质膜H⁺-ATPase由多基因家族编码,各等位基因的表达可以特异地受到调控,这些调控因素包括时间、空间、化学条件及环境诱导因子。酵母基因PMA1所编码的在植物和真菌中高度保守的H⁺-ATPase通过调节胞内H⁺浓度在耐盐中起到重要作用^[89]。

植物液泡膜H⁺-ATPase和H⁺-PPase水解ATP和焦磷酸把H⁺泵入液泡产生跨膜质子梯度。盐胁迫激活H⁺-ATPase酶活性和质子泵的H⁺转运能力,在液泡膜两侧建立质子梯度。这些激活包括蛋白丰度提高,动力学特征改变,亚基成分变化及表达调控的变化^[90]。研究表明:NaCl胁迫明显增加了碱蓬液泡膜H⁺-ATPase的水解活性和泵活性^[91,92],促进了A、B、H、C亚基转录及蛋白表达的增加。植物液泡膜H⁺-PPase参与H⁺向液泡内的转运,负责调控胞质pH和焦磷酸代谢^[93]。液泡膜H⁺-PPase的过量表达有可能增加质子驱动力从而提高植物的耐盐性。的确,异源表达拟南芥液泡膜H⁺-PPase恢复了盐敏感酵母突变体的耐盐性;过量表达拟南芥液泡膜H⁺-PPase

AVP1明显增加了转基因植株跨液泡膜质子梯度，促进了*AtNHX1*所介导的 Na^+/H^+ 反向转运活性，将 Na^+ 区隔化至液泡，因而明显增加了转基因植株的耐盐性及抗旱性^[94]。

1.2.6 水分的吸收

盐胁迫下水分吸收的研究开展较少。盐胁迫下细胞的膨压一般都下降，例如高盐胁迫时的玉米根细胞的水通透能力下降5倍。目前认为干旱、盐等胁迫能调控水通道蛋白在生物膜(质膜，质体和液泡膜)上的数量和相对丰度。水分的跨膜运输还与水通道蛋白的磷酸化程度密切相关^[95]。在菠菜中观察到低水势能降低PM28A的磷酸化程度，体外实验也证明PM28A的磷酸化程度降低，水分通透能力也随着下降^[96]。这些都说明盐胁迫在分子水平上通过影响水通道蛋白的性质和丰度，改变细胞对水分的吸收，降低细胞的膨压。

1.2.7 应答调控分子

盐胁迫导致的水分胁迫应答调控分子在信号传递途径中的作用分为两类：一类是信号传递过程中起级联放大作用的酶类-激酶；另一类是信号传递过程中，最后作用于基因，并参与基因表达调控的转录因子。

1.2.7.1 激酶

研究植物胁迫信号的传递过程可参考酵母中以阐明三条渗透胁迫信号传递途径。第一条为： $\text{SLN1} \rightarrow \text{SSK1} \rightarrow \text{SSK2/SSK22} \rightarrow \text{PBS2} \rightarrow \text{HOG1}$ (HOG1途径是渗透剂甘油的受控合成途径)，该途径属于两组分信号传递系统；第二条为： $\text{SHO1} \rightarrow \text{PBS2} \rightarrow \text{HOG1}$ 。这两条途径中的其他成员SSK2/SSK22，PBS2和HOG1分别相当于MAPK信号级联系统中激酶成员；第三条涉及一种依赖 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 的PP2B类型的蛋白磷酸酶calcineurin(CaN)，CaN与ENA(促进离子外排的ATPase)共同作用，将酵母细胞内的 Na^+ 和 Li^+ 排出，从而达到耐盐的目的。利用功能互补等方法从相应的酵母突变体中分离出许多个植物cDNA序列，它们在突变体中表达能恢复感盐突变体的表型。如PsMAPK对应于Hog1(MAPK)，AtMEK1和MAPKK1对应于MAPKK和MAPKKK，暗示这些cDNA基因可能参与了在植物盐胁迫中的信号传递级联反应。激酶植物在胁迫条件下，所产生的胁迫信号经调控分子间的传递，最终激活效应分子，引起植物抗逆应答。在信号传递中，首先伴随激酶的磷酸化和去磷酸化，这种转化对胁迫信号的传递起重要作用。目前酵母中已阐明三条渗透胁迫信号传递途径，与其相比，ZHU认为植物的胁迫信号的传递过程存在以下方式^[97]，如图1所示。

第一条信号途径通过丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶：MAPKKK激活MAPK级联信号系统来行使功能。在拟南芥基因组中，已经鉴定出了许多下游的MAPKK和

MAPK 基因。利用酵母突变体进行相关基因的功能互补实验发现渗透胁迫下，MAPK 的转变可能与细胞周期及细胞生长延缓有关。第二条传导途径是 CDPK 介导的，CDPK (Ca²⁺-dependent Protein Kinases 域，在渗透胁迫时可被诱导或激活，这表明它们是参与胁迫信号传递过程。在水稻中，与膜相关的 CDPK1 基因在冷胁迫下，酶活性增加，过量表达 OsCDPKS 能够增加水稻对冷和渗透胁迫的抗性。这表明它们能够增加植物的耐逆性。但是 CDPK 胁迫信号传递给下游的蛋白及它们相互作用的机制还不清楚。第三条传导途径是由 Ca²⁺参与的信号传递体是 SOS3 家族的 Ca²⁺结合蛋白。拟南芥中 SOS3 基因功能缺失后，植株对 NaCl 敏感增强，但增加培养基 Ca²⁺的浓度后能够降低 SOS 突变体对盐胁迫的敏感性，这表明体外高浓度 Ca²⁺可以减轻盐胁迫对植物的伤害。通过 SOS 的调控结构域，SOS3 与 SOS2 相互作用，形成 SOS3-SOS2 复合物，该复合物可以激活 SOS1^[98]。SOS1 编码 Na⁺/H⁺反向运转蛋白。由此看出该途径所传递的信号有调节 Na⁺的运输，调节离子胁迫的作用。

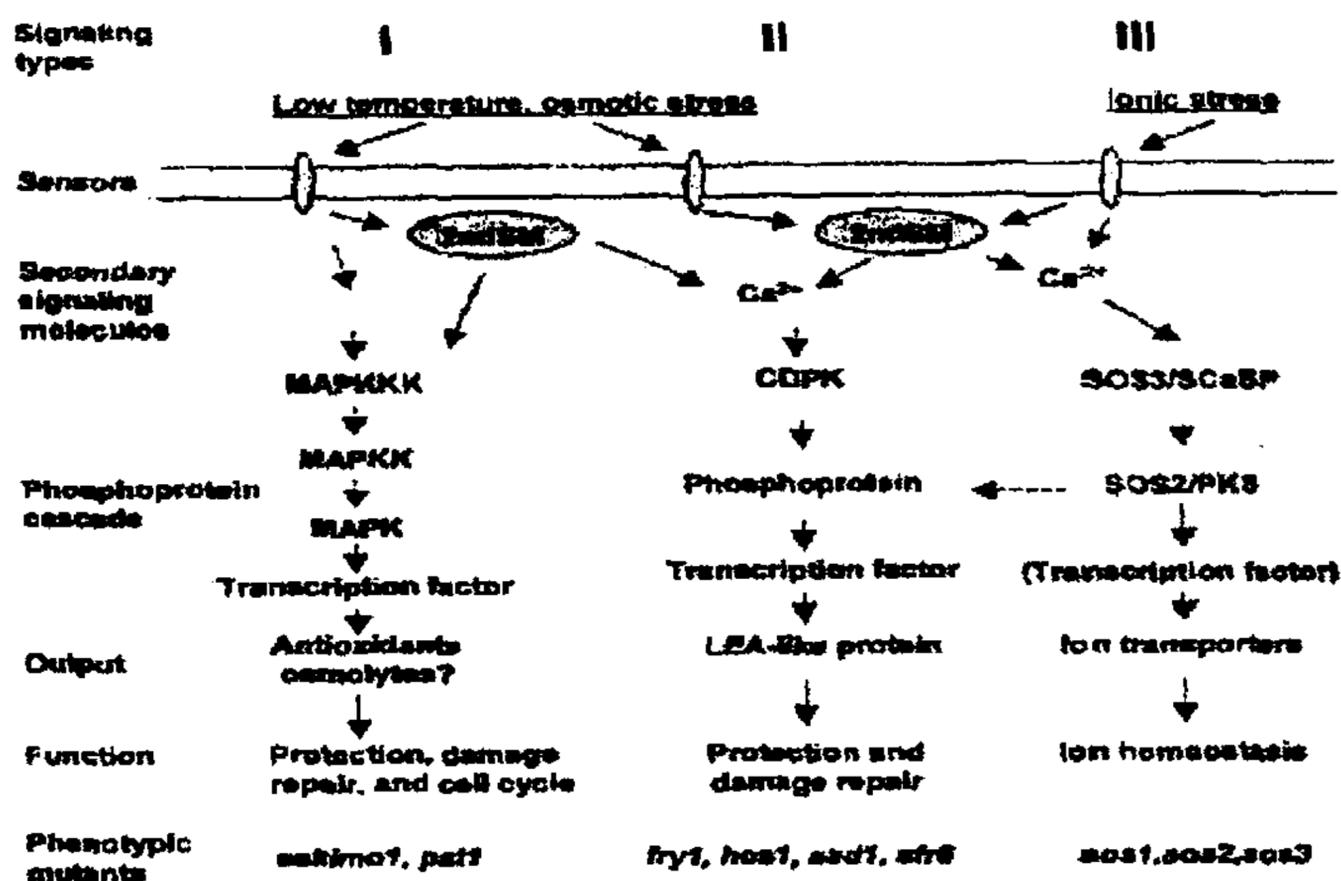


Fig 1 Major Types of Signaling for Plants during Cold, Drought and Salt Stress

1.2.7.2 转录水平调控

基因转录水平上的调控是植物盐胁迫应答过程中极其重要的一环。当植物细胞感受外界高盐信号，一些跨膜受体蛋白将胞外信号转化为胞内信号，并随即引发相应的信号传导途径。当胁迫信号传给转录因子后，转录因子与某一或某些基因启动子区域中的特异顺式作用序列结合，激活RNA聚合酶，从而促进或增强基

因在胁迫条件下的转录表达。然后通过基因产物的作用对外界在生理生化等方面作出适合的调节反应。迄今所分离的受盐和干旱诱导的转录因子基因主要有：具色氨酸簇(Trp cluster)结构域的MYB转录因子、含有碱性螺旋-环-螺旋(bHLH)和亮氨酸拉链的MYC转录因子、含有碱性区域和亮氨酸拉链的bZIP转录因子、锌指类转录因子STO、玉米VP1转录因子以及具有AP2结构域的DRE结合蛋白DERB1和DREB2转录因子^[99,100]等。通过构建启动子表达载体和酵母单项杂交(One-hybrid)方法,目前已发现植物中渗透胁迫应答基因的转录至少有四条独立的信号转导途径,其中两条是ABA依赖途径^[101]。图1所示为响应不同环境胁迫的转录因子所属调控途径模型。

1.2.7.3 依赖于ABA的表达调节途径

ABA作为一种受胁迫因子诱导的植物激素,在细胞对胁迫的耐受性方面所起的作用已得到广泛认可。一些渗透胁迫应答基因的表达受ABA诱导,分析这些基因的启动子发现了一些保守的ABA反映元件。在对水稻Rab16基因的启动子序列进行比较时发现了两个保守区域: motif1(GTACGTGGC)和motif2(CGG/CCGCGCT)。进一步研究表明motif1是对ABA反应的顺式作用元件^[102]。此外,大麦ABA诱导基因Em启动子的研究也发现了两个类似的保守元件: Emla(CACGTGGC)和Emlb(ACACGTGCC)^[103]。这类对ABA起反应的元件统称为ABRE(ABA responsive element),其保守序列为P_YACGTGGC。除ABRE之外,还存在另外一些对ABA反应的顺式作用元件,如CE₁序列TGCCACCGG和玉米C₁基因启动子的保守元件GGTCGTGTGGTCCATGCATGCAC^[104,105]。ABA诱导的基因的表达除了需要有一定的顺式作用元件外,还需要反式作用因子的参与。Guiltinan等最早从玉米中分离到ABRE结合蛋白EmBP1,其序列中具有保守的Leu拉链(bZIP)结构,该蛋白对玉米Em基因受ABA诱导表达是必须的。相关研究表明该转录因子也参与Em基因的表达调节,其可能的作用是通过影响ABRE及其结合蛋白复合物的结合特异性而间接调节Em基因的表达。也有一些胁迫应答基因如rd22能同RD22BR(MYB),AtMYB2(MYC)特异性结合,而启动子中却并不含有ABRE顺式元件。这表明转录因子(如MYB)调控是盐胁迫应答所必须,但具体到不同的调控途径还需要其他的调控分子参与共同完成。

1.2.7.4 不依赖ABA的表达调节途径

Yamaguchi-Shinozaki等(1993)研究发现在渗透胁迫及ABA存在的条件下,拟南芥RD29A基因的转录有两个高峰期,即胁迫后20分钟出现第一次高峰,大约3小时后出现第二次高峰^[106]。而在相同条件下,在拟南芥对ABA不敏感的突变体中RD29A基因的转录只有第一次高峰。这一结果表明RD29A基因第一次高水平的转录是受渗

透胁迫诱导的结果，而且这种诱导作用不依赖于ABA。进一步的研究发现RD29A基因的启动子中含有一个不依赖于ABA的9个碱基的顺式作用元件DRE(TACCGACAT)。最近已相继分离了DRE反式作用因子CBF1(Stockinger等, 1997)、DREB1、DREB2(Liu等, 1998)，其结构含AP2结构域。

除了DRE外，在RD29A 基因启动子中，同时还存在另一个顺式作用因子，即依赖于ABA的ABRE。Yamaguchi2Shinozaki等认为两种顺式作用因子的存在可以解释RD29A基因诱导表达的两个过程，即ABA合成积累前的快速诱导和ABA合成后缓慢而强烈的第二次诱导过程。

1.2.7.5 转录后水平调控

转录后水平调节是指以下几个方面：RNA拼接、加工及转移；mRNA稳定性及翻译效率；蛋白质翻译后的修饰、酶活性及蛋白质降解速度。LaRosa等(1992)发现在所有能诱导osmotin基因转录的因素中，包括干旱、盐、乙烯、细胞分裂素、病原菌侵染等，只有干旱、盐和乙烯能显著地诱导osmotin蛋白的积累。Cushman等(1989)也注意到胁迫下磷酸烯醇丙酮酸羧化酶基因转录水平与蛋白积累不一致的情况。这些实例说明一些渗透胁迫应答基因的表达调控也发生在转录后水平。

1.3 RNA干涉的研究进展

在许多生物体中导入双链RNA(dsRNA)后，会引起体内同源基因特异性的沉默，这种现象称作RNA干涉(RNA interference, RNAi)。由于RNAi现象先后在不同生物中被发现，不同领域的研究者给它作了不同的命名：植物学家称它为共抑制(co-suppression)或转录后基因沉默(post transcriptional gene silencing, PTGS)；线虫和果蝇的研究人员称它为RNAi，真菌的研究者称它为消除作用(quelling)。现在人们已经意识到这些现象之间存在着密切的联系，可能有着共同的生物学意义和相似的作用机制。这也表明RNAi现象在生物体中普遍存在而且在进化的很早阶段生物就获得了这种机制。

1.3.1 RNA干涉现象的发现

早在1990年，Rich Jorgensen及其同事在矮牵牛中发现了一种转基因同时抑制自身和相应内源基因表达的基因沉默现象^[107]。他们试图通过增加色素合成基因的拷贝数来创造一种紫色更深的矮牵牛，但其结果出人意料，一些转基因植株部分或完全开出白花，这表明色素的合成途径被关闭而不是被加强。事实上，不仅仅该基因不表达，而且植株中所有的色素合成基因都失活。他们将这一现象称为共抑制。

几年以后，英国的植物研究者Ruiz等在进行抗病毒的植物遗传工程研究时也发现了类似现象。他们将X病毒繁殖所必需的编码复制酶的基因转入西红柿中，结果

发现一些植株表现为抗病毒，而另一些则不抗病毒。进一步研究表明，抗病毒的植株产生非常少的复制酶，而感病的植株则大量表达X病毒复制酶，抗病植株不仅能使转入的基因而且还能使X病毒的复制酶基因沉默。

1994年，Cogni等人在野生型粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*)中转入胡萝卜素基因albino1或albino3时，发现在部分实验中，内源性al-1或al-3基因的表达水平反而大为减弱了。他们称这种现象为消除作用(quelling)。

1995年，康奈尔大学的Su Guo博士试图证明par-1基因的失活会破坏秀丽新小杆线虫第一次卵裂的不对称性，线虫(*Ceanorhabdiris elegans*)的第一次卵裂是不对称的，所形成子细胞的大小、胞浆成分以及将来的命运都不相同。她在关闭par-1基因的表达时使用了反义技术，即注入反义RNA(antisences RNA)，使它和par-1基因的转录物杂交，从而阻断蛋白的翻译过程。但令人惊讶的是，在她的对照试验中，正义RNA(senses RNA)也同样使par-1基因的表达关闭了。这与反义RNA技术的传统解释机制完全相违背。她们一直无法解释这一现象。

直到1998年2月，华盛顿卡耐基研究院的Andrew Fire和马萨诸塞大学癌症中心的Craig Mello首次将双链dsRNA正义链和反义链的混合物注入线虫，结果诱发了比单独注射正义链和反义链都要强得多的基因沉默。实际上每个细胞只要很少几个分子的双链RNA已经足够完全阻断同源基因的表达。后来的实验表明在线虫中注入双链RNA不单可以阻断整个线虫的同源基因表达，还会导致子一代的同源基因沉默。他们将之称为RNA干涉^[107~112]。Fire和Timmons继续实验，发现将一种能够表达c.elegans unc-22基因同源的双链RNA的基因工程细菌喂食线虫，结果线虫表现出类似unc-22缺陷的类型。后继实验表明将线虫浸入双链RNA中，同样可以诱导基因沉默。

随后，在短短的一年时间内陆续发现RNA干涉现象也存在于真菌(Alvarado, 1999)、拟南芥(Chuang等, 2000)、锥虫(Lohmann等, 1999)、水螅(Ngo等, 1998)、涡虫(Sharp等, 1998)、斑马鱼(Wargelius等, 1999)等几乎所有真核生物中。这说明RNA干涉很可能是在进化的很早阶段就已经产生了。在涡虫中发现RNA干涉现象也为再生的分子机制研究开辟了新的途径。2000年8月发现甚至在大肠杆菌中也存在与RNA干涉相类似的现象(Tchurikov等)。

2000年2月，剑桥大学的Wianny等人发现在哺乳动物小鼠的早期胚胎中双链RNA也能产生特异的RNA干涉效应。她们用双链RNA注射小鼠受精卵和着床前的胚胎，发现能够特异性的阻断相应c-mos、E-cadherin和GFP(绿色荧光蛋白)的基因表达。这表明RNA干涉也存在于哺乳动物中，同时也为RNA干涉研究人类基因功能和治疗人类疾病提供了希望。

2000年6月, 密歇根大学的Clemens等又发现了RNA干涉在体外培养的细胞系中也能实现。他们发现对于果蝇的S2细胞系, 只要在没有血清培养基中加入适量双链RNA, 就可以诱导产生RNA干涉效应。从此RNA干涉技术为研究细胞内复杂的信号转导途径的生化 and 分子机制提供了方便。

产生RNA干涉的技术途径也不断得到拓展。最早是通过生殖腺注射的方式在秀丽线虫中实现RNA干涉的。随后的研究发现: 体腔注射、肠细胞内注射也同样有效(Fire等, 1998)。后来又发现不需要注射双链RNA分子, 只要给线虫喂食能转录双链RNA的大肠杆菌(Timmons等, 1998)、甚至只要把线虫浸泡在双链RNA溶液中就能够产生RNA干涉效应(Clemens等, 2000)。在其他生物中有人尝试了电穿孔法、基因枪等方式转染双链RNA, 都取得了成功(Ngo等, 1998)。这就为RNA干涉技术用于植物体和体外培养细胞系铺平了道路。2000年2月, 用转录形成X链RNA的质粒对线虫进行转基因也获得了成功(Tavernarakis, 2000), 得到可以热诱导产生RNA干涉效应的线虫, 而且这一效应是可以稳定遗传的。与此同时, RNA干涉的分子机制也开始得到揭示。1999年德国普朗克研究院的Tusch, 和美国马萨诸塞州立大学的Zamore在果蝇胚胎裂解液中实现RNA干涉, 从而建立了RNA干涉的体外研究系统, 为解开RNA干涉的生化 and 分子机制铺平了道路(Tuschl等, 1999)。2000年3月, 他们利用这一体外研究系统发现, 在RNA干涉中, 双链RNA首先被降解成21~23nt的小片段, 然后相应的mRNA也在与双链RNA同源的区段内, 按照同样的间隔被降解成21~23nt的小片段, 这一过程依赖ATP, 但不与mRNA的翻译相偶联(Zamore等, 2000)。这与植物中的共抑制非常相似(Hamilton等, 1999), 从此线虫中RNA干涉的研究, 植物中基因表达共抑制现象的研究以及真菌中基因压制现象的研究几个独立的基因沉默研究领域因为发现相同的基本分子机制逐渐统一在一起了。犹他大学的Domeier等人发现无义RNA降解途径(nonsense-mediated decay)的相关基因(smg-1至smg-6)中有三个基因(smg-2, smg-5, smg-6)是RNA干涉效应的维持所必须的。这说明RNA干涉效应的维持是与细胞中其它基本基因的表达检测调控系统密切相关的。RNAi的发现掀起了dsRNA介导的基因沉默作用分子机制及其生物学功能研究的热潮, 使RNAi成为RNA领域的又一热点。

1.3.2 RNA干涉的作用机理

虽然遗传学和生物化学的方法都已用于探索 RNA 干涉的机理, 但其真正的机理尚未明了。目前认为其可能机制可分三步^[113-115], 如图 2 所示。

第一步: dsRNA 的形成。dsRNA 是诱导细胞 RNA 干涉的关键组分, 外源 DNA、RNA 序列均可激发细胞产生 dsRNA, 但产生的方式不同。RNA 病毒在病毒或细胞中 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RNA dependent RNA polymerases, RdRP) 的

催化下，合成病毒的 RNA 序列互补链，并与之结合形成 dsRNA、DNA 病毒、重组基因、转基因等 DNA 序列，在细胞转录出 RNA 后，经 RdRP 形成 dsRNA；而转座子由于其本身具有反向重复序列(inverted repeats)，细胞可以通过“通读转录”这种反向重复序列直接产生 dsRNA；细胞中正义和反义 RNA 的同时转录也可产生 dsRNA；在线虫中 (c.elegance) 可以通过直接注射 dsRNA 或将线虫浸泡在含 dsRNA 的溶液中等方式引入外源 dsRNA；这种 dsRNA 可以是分开的两个 RNA 分子互补形成分子内双链。然而，细胞是如何判定哪些 RNA 和 DNA 是“异己”进而产生相应的 dsRNA，其机制尚不清楚。

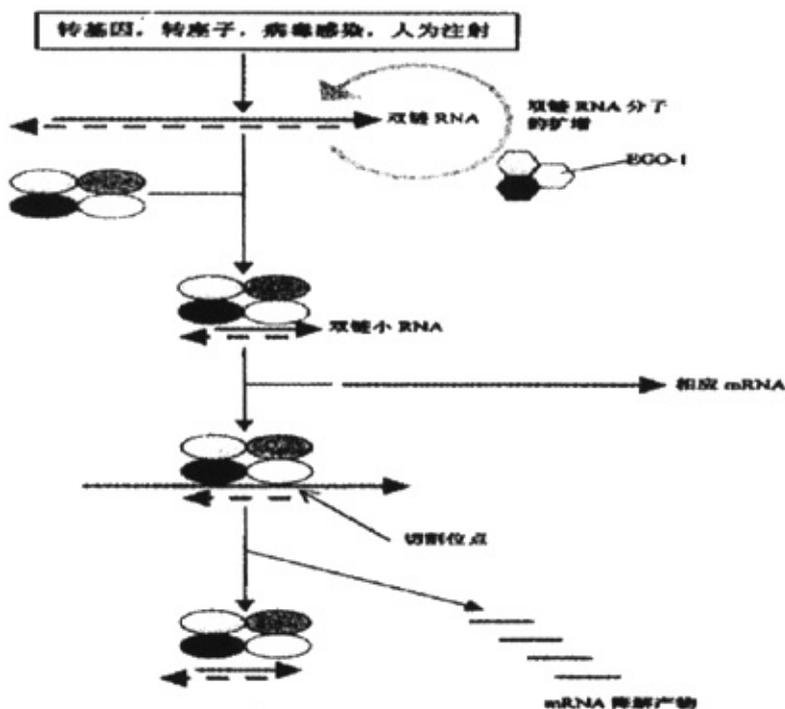


图 2 RNA 干涉的可能分子机制 (仿 Boshier)

第二步：siRNA 的形成。形成的 dsRNA 要在细胞中大量扩增，当其在细胞中达到一定量的时候，会被一种特异的核酸内切酶(一种具有 RNaseIII样活性的核酸酶，在果蝇中称为 Dicer，含有解旋酶活性以及 dsRNA 结合结构域和 PAZ 结构域)识别并与之结合形成酶-dsRNA 复合物。在该酶的作用下，细胞中的单链靶 mRNA(即与 dsRNA 具有同源序列的 mRNA)会与 dsRNA 的正义链发生链互换，原先 dsRNA 中的正义链被 mRNA 代替，从酶-dsRNA 复合物中释放出来，而 mRNA 则处于原先的正义链的位置。此后，在 ATP 的参与下，细胞中存在另一种复合体

RNA 诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex , RISC。由核酸内切酶、核酸外切酶、解旋酶等组成,对靶 mRNA 具有识别和切割作用)利用结合在其上的核酸内切酶活性切割靶 mRNA 分子中与 dsRNA 反义链互补的区域,形成了 21~23Nt 长的 dsRNA 小片段,称之为短干涉 RNA(short interfering RNA 或 small interfering RNA, siRNA)。它又可以指导形成 RISC 复合体。

第三步: RNAi 的形成。siRNA 还可作为一种特殊的引物,在 RdRP 酶的作用下以靶 mRNA 为模板合成 dsRNA 分子,这些 dsRNA 分子又可被 RISC 切割形成新的 siRNA,新的 siRNA 又可进入上述循环,这种过程称之为随机降解性聚合酶链式反应(random degradative PCR)。新生的 dsRNA 反复合成和降解,不断产生新的 siRNA,从而使靶 mRNA 渐进性减少,导致目的基因沉默,呈现 RNAi 现象^[116]。

目前发现, RNAi 涉及到的基因包括 *Neurospora* *gde-1*, *Arabidopsis* *SDE-1/SDE-2* 和 *C. elegans* *ego-1*(编码 RNA-dependent RNA polymerases, RdRPS)^[117] 线虫 *rde-1* 和 *rde-4* 基因参与 RNAi 机制的启动阶段^[118], *rde-7*, *mut-7*, *smg-2*, *smg-5*, *smg-6* 等基因参与干涉的维持阶段^[119,120]。

1.3.3 RNAi 作用的特点

- (1)高特异性:外源 dsRNA 总是能特异地干扰与其同源的基因的表达,使细胞不能产生相应的蛋白质,从而生物体表现为特异的功能缺陷^[121]。
- (2)高稳定性:以 3' 端悬垂 TT 碱基的双链尤为稳定,无须像反义核酸那样进行广泛的化学修饰以提高半衰期^[122]。
- (3)高效率:能在低于反义核酸几个数量级的浓度下,使目的基因降到极低水平甚至完全封闭,从而产生缺陷突变的表型。RNAi 技术比基因敲除技术更快更简单,可以在一周时间关闭 10 个基因表达^[123]。
- (4)对 dsRNA 长度的限制性:用 dsRNA 转染果蝇的 Schneider2(S2)细胞时发现 400~540 个核苷酸的 dsRNA 产生的 RNAi 效果非常明显,200~300bp 的 dsRNA 作用稍差,而 50~100 个核苷酸的 dsRNA 则不起作用^[124]。
- (5)RNAi 的遗传性:1998 年 Fire 及同事们就发现在线虫 RNAi 效应可以传给后代,以后 Worby 等在果蝇的培养细胞中也发现可类似的现象。由此可以推测, RNAi 效应可以通过生殖系统传递到后代中去。

1.3.4 RNAi 的生物学意义

RNAi 被称为基因组的免疫系统,与脊椎动物的免疫系统一样,针对进入机体的抗原可以产生相应的抗体。RNAi 是植物、线虫、真菌、昆虫、动物的一种强有力的基因表达抑制途径,在生物体的发生发育及防御系统的构成等方面具有十分

重要的作用。

(1)维持基因组稳定性：遗传研究证实，RNAi 缺陷可引起内源性转座子移动，转座子的重要特征之一是具有反向重复序列，生物体通过此序列可以产生 dsRNA 发卡，启动 PTGS 效应，从而抑制转座酶蛋白的产生和转座子的移动，有利于遗传稳定，防止遗传损害^[125]。因此 RNAi 的一个自然功能就是转座子封闭(transposon silencing)。

(2)保护基因组免受外源核酸侵入：在基因工程中将基因导入植物细胞时发现基因沉默现象也是宿主细胞通过 RNAi 机制实现的自我保护性反应。病毒产生特异性的 PTGS 以及非特异性的干扰素等抗病毒宿主反应^[126]。

(3)表达基因调控：近来，在生物界发现的大量的微小 RNAs(miRNAs)，大小在 22bp 左右。它们在细胞内多发挥调节基因表达的作用。另外，RdRp 可以识别过量的或异常的 mRNA，来抑制相应基因的表达^[127]。

1.3.5 RNAi 的应用

1.3.5.1 探索基因功能的有力工具

功能基因组学(functional genomics)的研究对象就是基因组中所有基因的表达、调控与功能。在功能基因组学的研究中，需要对特定基因进行功能丧失或降低突变研究，以确定其功能。由于 RNAi 具有高度的序列专一性和有效的干扰活力，可以特异地使特定基因沉默，获得功能丧失或降低突变，它可以作为功能基因组学的一种强有力的研究工具。将功能未知的基因的编码区(外显子)或启动子区，以反向重复的方式由同一启动子控制表达。这样在转基因个体内转录出的 RNA 可形成 dsRNA，产生 RNA 干涉，使目的基因沉默，从而进一步研究目的基因的功能。

再过去的几年研究中，RNAi 技术被应用在植物、线虫、真菌、昆虫等研究中^[128]。最近，更多的研究者将目光投在了将 RNAi 技术运用在哺乳动物包括人类的细胞研究中^[129]。

1.3.5.2 研究信号传导通路的新途径

联合利用传统的缺失突变技术和 RNAi 技术可以较为容易的确定复杂的信号传导途径中不同基因的上下游关系。RNAi 技术较传统的转染实验简单、效率高、重复性好，因此认为 RNAi 技术将可能成为研究细胞信号传导通路的新途径。

1.3.5.3 开展基因治疗的新策略

RNAi 具有抵抗病毒入侵，抑制转座子活动，防止自私基因序列过量表达等作用，因此可以利用 RNAi 现象产生抗病毒的植物和动物，并可利用不同病毒转录序列中高度同源区段相应的 dsRNA 抵抗多种病毒。目前，人们已经证明在培养的哺乳动物细胞中，RNAi 可用于抗病毒和抗肿瘤等的基因治疗。随着 RNAi 被成功地

应用于哺乳动物细胞，近而用于人类疾病的治疗已为期不远^[130,131]。

1.3.5.4 新药物的研究与开发

蛋白质是细胞功能的执行者，各种疾病的发生和蛋白质功能的异常是分不开的。虽然人类全基因组序列已被揭示，但是蛋白质功能的研究仍然任重道远，这也给药物的研制与开发带来巨大的挑战。RNAi 不仅使细胞产生特异基因缺陷表型，而且具有高效和简单的特点，因此，RNAi 在新药的开发与研究方面具有广阔的前景^[132]。

1.3.6 展望

RNAi 一经发现，立即成为科学研究的一大热点。这是因为 RNAi 这个生物领域的新兴事物，本身具有它的神秘性，同时又具有广阔的应用前景。RNAi 已经被应用到线虫的系统性功能基因组研究上，RNAi 作为一个工具，它的应用范围可以从单细胞的原生动物一直扩展到人。虽然，RNAi 已被广泛应用到不同种生物，但仍然有许多问题有待我们进一步阐明。例如，不同种生物是否沿用同一种 RNAi 机制？RNAi 机制本身又受到那些调控？

我们认为，今后对 RNAi 的研究可能会沿着以下方向发展：1. RNAi 具体分子机制研究；2. RNAi 生物功能研究；3. RNAi 技术在功能基因组学，基因治疗和药物开发等许多领域的应用研究。

1.4 结束语

综上所述，植物对盐胁迫的耐受反应是多年来植物与环境研究的一个重点，随着近十年分子生物学技术的不断发展，积累了越来越多的盐应答资料，它们从生理、生化、组织学、分子遗传学等多方面描述了植物在外界盐胁迫下启动的从分子信号传递，相关代谢途径调节到最终形成新的离子和渗透压平衡的一个错综复杂的应答体系。尽管如此，仍旧缺乏足够的信息和证据来描述一个相对完整和清晰的植物盐胁迫应答系统。这些空白都有待于目前飞速发展的分子生物学技术如微阵列、蛋白互补分析等来弥补。

本论文从上述目标和背景出发，通过构建小麦 Na^+/H^+ 反向运转蛋白表达载体，采用 RNAi 技术构建拟南芥 Na^+/H^+ 反向运转蛋白的 RNAi 表达载体，并对它的功能进行分析，以期耐逆机制的深入研究和利用基因工程改良作物提供信息和资源。

2. 实验材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 菌株及质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*):DH5 α): 菌株为本实验室保存。

农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*): GV3101菌株为本实验室保存。

pGEM-T Easy: 购自promega公司

pMD18: 购自Takara公司

2.1.2 主要仪器设备

PCR仪	MJ Research
台式高速离心机	德国Eppendorf公司Centrifuge 5714R
冷冻台式离心机	德国Eppendorf公司Centrifuge 5810R
超低温冰箱	-85 $^{\circ}$ C Ultralow Freezer NUANR
紫外透射反射分析仪	上海精科实验有限公司
Milli-Q ^{UF} 纯水器	Millipore公司
紫外分析仪	上海康华生化仪器制造
电泳仪	南京大学DY602V型
超净工作台	AIR TECH 苏州净化设备有限公司
恒温气浴摇床	福玛数显接种摇床
恒温生化培养箱	LRH-250 广东省医疗器械厂
杂交炉	Thermo Hybaid
数显恒温水浴锅	国华电器有限公司
一分钟凝胶成像仪	美国宝利来(Polaroid)公司FOTODYNE
一次性成像胶片	美国宝利来公司
精密微量仪液器	德国Eppendorf

2.1.3 植物材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)为哥伦比亚生态型, 播种于土:蛭石:珍珠岩(4:3:1)的混合土中, 用营养液每三天浇一次。温度20 $^{\circ}$ C~22 $^{\circ}$ C, 相对湿度60~70%, 光照16小时, 黑暗8小时, 光照强度110 mmolm⁻²s⁻¹。拟南芥(*Arabidopsis*)播种在蛭石中, 在温室中培养。

2.1.4 酶及试剂

各种限制性内切酶、DNA marker、pMD18购自大连宝生物工程公司(TaKaRa, Japan); 逆转录试剂、pGEM-T Easy Vector, T4DNA连接酶购自Promega公司; DNA快速纯化/回收试剂盒购自北京鼎国生物技术公司。

氨苄青霉素(Amp), 卡那霉素(Kana), 头孢霉素(Cafe), 氯霉素(Chl), 利福平(rif), 羧苄青霉素(car), 壮观霉素(spec), X-gal、异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG), RNase购自Sigma公司。

尼龙膜购自北京鼎国生物技术公司。

引物由北京奥科生物工程公司合成，测序由上海基康生物工程公司完成。

2.2 实验方法

2.2.1 细菌的培养和菌种的保存

大肠杆菌用LB培养基，37℃过夜培养。固体培养基中琼脂浓度为1.5%(W/V)，液体培养时摇床转速约为200r/m。保存菌种有以下几种方法：

- 1)菌株在LB平板上划线培养后置于4℃，至少可以保存一个月。
- 2)菌株在LB液体培养基中活化后，菌液保存在终浓度为15%的甘油中，-20℃至少可以保存一年以上。
- 3)菌株在LB液体培养基中活化后，穿刺培养，可以保存一年以上。
- 4)菌株在LB液体培养基中活化后，菌液保存在终浓度为15%的甘油中，-70℃长期保存。

2.2.2 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化

- 1)挑取大肠杆菌*E.coli* DH5α的单菌落，接种于5ml LB液体培养基中，37℃振荡培养12 h；
- 2)取1 ml菌液加入100 ml LB液体培养基中，扩大培养约2h，使OD₆₀₀为0.3~0.4；
- 3)菌液冰上放置30 min，无菌条件下倒入50 ml离心管中，4℃，5 000r/m离心8 min；
- 4)弃上清液，在冰浴中加入10ml预冷的无菌CaCl₂ (0.1mol/L)，轻摇使细胞悬浮，冰浴30min；
- 5) 4℃，5000 r/m离心7min，弃上清液；
- 6)用4ml预冷的无菌CaCl₂ (0.1mol/L)和1ml无菌75%甘油重新悬浮细胞，200μl/份分装到预冷的无菌Eppendorf管中，液氮冷激10 min后，-70℃保存备用；
- 7)取适量连接产物加到分装的感受态细胞中，混匀，冰浴30min；
- 8)42℃热激90S，冰浴2~3 min，加1ml 预热LB液体培养基，于37℃，120转/min振荡培养1h；
- 9)取适量菌液涂布LB平板(100mg/L Amp)，室温涂布均匀后，于37℃倒置培养过夜，观察菌落，筛选克隆。

2.2.3 大肠杆菌质粒的提取(碱裂解法)

- 1)取含质粒的单一菌落置于10 ml LB液体培养基中，37℃振荡培养过夜。
- 2)取1.5 ml菌液，12 500r/m离心2 分钟收集菌体。
- 3)取沉淀，重悬于300μl冰冷的溶液 I，完全分散，放置10分钟。
- 4)加入新配的溶液 II 300μl立即温和混匀，直到溶液变得澄清(细胞破碎)。
- 5)加入冰冷的溶液III300μl，温和混匀，出现白色沉淀。

6) 12 500r/m离心18分钟, 取上清, 注意不要取到沉淀。加10 μ l 10mg/ml RNase, 37 $^{\circ}$ C消化30分钟。

7) 加入等体积的Tris饱和酚:氯仿(1: 1)混匀, 12 000 r/m离心5分钟。

8) 取上清, 加入等体积的氯仿混匀, 12 500 r/m离心18分钟。

9) 取上清, 加入300 μ l 70%乙醇混匀, 12 500 r/m离心5分钟。

10) 弃上清, 除尽壁液, 充分干燥。

11) 加20 μ l灭菌双蒸水或TE Buffer, 溶解质粒DNA。

碱裂解法所需溶液:

溶液 I: 50mmol/L葡萄糖; 50mmol/L的Tris-HCl (pH 8. 0); 10 mmol/L的EDTA(pH 8.0)。

溶液 II: 0.2mmol/L的NaOH; 1%的SDS

溶液 III: 1.32mol/L的KAc (pH 4.8)

2.2.4 DNA片段的快速纯化/回收(参照北京鼎国产品说明书)

1) 切取含DNA片段的琼脂糖凝胶(100mg~300mg)用吸头捣碎按1: 3(切取DNA片段的凝胶:溶液A的体积比)加入溶液B。

2) 65 $^{\circ}$ C水浴5~10分钟, 直至胶完全溶化, 其间可旋涡震荡2~3次。如果体积大于500 μ l可适当增加溶胶时间。待溶化后置室温加入15 μ l溶液B, 充分混匀。

3) 将溶液置于离心柱中, 静置1~2分钟, \geq 8 000r/m离心30s, 若一次加不完, 可分两次离心。

4) 倒掉液体, 加入500 μ l溶液C(用无水乙醇1:1稀释)于离心柱中8000 r/m离心20~30s, 倒掉液体。

5) 重复步骤4。

6) 12 000r/m再次离心1分钟, 甩掉剩余液体以除去残余酒精。

7) 将离心柱置于新的离心管中, 室温敞盖离心管盖放置5~10分钟, 使乙醇挥发殆尽。

8) 加入50 $^{\circ}$ C预热的20~30 μ l溶液D, 静置2分钟。15 000r/m离心60s, 管底即DNA。

7) 将DNA储存于-20 $^{\circ}$ C。

2.2.5 表达载体的构建

构建策略: 将已经用RACE PCR扩增的*TaNHX₂*全长基因克隆于pGM-T Easy Vector, 通过引入新的酶切位点BamH I、Kpn I用PCR法扩增出所需片段。由于在*TaNHX₂*基因ORF内的5'端有Kpn I酶切位点, 所以通过定点突变的方法, 将表达甘氨酸的密码子GGG突变为GGT进行PCR(5'端引物: 5' >GGCGGATCCGGAGGCCACCATGGGTTACCAAGTGGTGGCGGCGCAG< 3'端引物: 5' >GGCGGTACCTCATTCCACGAGTACGTTTCGGATCGG<3'),

回收所需大小片段，PCR产物经BamH I / Kpn I 双酶切后定向连接于同样用BamH I /Kpn I 双酶切的表达载体pBIN438中，形成了含有TaNHX₂全长cDNA的正义pBIN438-TaNHX₂。将重组质粒转化E.coli DH5α，提取质粒，进行PCR验证，并用BamH I和Kpn I双酶切鉴定，并由上海基康生物公司测序。

2.2.6 植物表达载体的农杆菌转化

直接转化法转化农杆菌

- 1) -70℃保存的农杆菌GV3101活化后，接种于平板培养基 28℃培养2天；
- 2)挑取农杆菌单克隆接种于50 ml LB液体培养基中，28℃，220 r/m振荡培养至OD₆₀₀=0.5；
- 3) 5 000 r/m离心5 min，弃去清液，菌体用10 ml预冷的0.15 mol/L的NaCl重悬；
- 4) 5 000 r/m离心5 min，弃上清液，沉淀用1 ml预冷的20mmol/L CaCl₂重悬；
- 5)取200μl感受态细胞中加入1μg重组质粒，冰浴30 min；
- 6)液氮中冷冻1 min；37℃水浴，融化细胞2~3 min；
- 7)加1 ml LB, 28℃轻轻振荡2~4hr；轻轻离心1 min，用0.1 ml LB悬浮沉淀，将细胞悬液涂布于含50 mg/L卡那霉素，40 mg/L利福平的LB平板上，28℃培养2~3天；
- 8)筛出的克隆接种于液体培养基中培养，收集农杆菌菌体进行菌落PCR检测。

2.2.7 拟南芥的培养方法

2.2.7.1 拟南芥种子的表面灭菌

取适量干燥的拟南芥种子于1.5ml离心管中，加入70%乙醇处理5分钟后吸出乙醇，再加入新鲜配粉的15%漂洗剂泡10至15分钟后吸出，用无菌蒸馏水洗3至5次，然后加入无菌的0.1%的琼脂使种子分散均匀，种前置于4℃冰箱24至48小时以使种子萌发同步化。

2.2.7.2植物的生长

拟南芥种子播种于盛满培养土的直径为7cm的培养杯中，用一纱网覆盖，萌发2~3天后移至4℃光照培养箱中放置一周(进行春化)，再放到21℃的组织培养室中生长。植株长出顶生花序时，去除其顶生花序，以刺激腋生花序的生长，注意避免伤及腋生花序。待腋生花序长出，其下部的花出现授粉现象时进行转化。转化前，将已授粉花及荚果除掉。

2.2.8 菌液的准备

挑取鉴定好的农杆菌单克隆放于20 ml含有50 mg/L利福平，50mg/L卡那霉素的LB液体培养基中，28℃，250 r/m震荡培养至OD₆₀₀为0.5左右。在转化前1天，转入含50 mg/L利福平，50 mg/L卡那霉素的100mlLB培养基的大瓶培养过夜，第二天，当菌液OD₆₀₀在1.2~1.6之间时取出使用。

2.2.9 转基因拟南芥的制备

制备好已转化了植物表达载体质粒的农杆菌菌液100ml室温5 000r/m离心15分钟,弃上清液,沉淀悬浮于相应体积的渗透培养基(2.2gMS, 5%蔗糖, 1×B₅ Vitamins, 0.044mol/L 6-BA, 50μl/L Silwet L-77, 用0.4mol/LNaOH调pH至5.8)中。

将农杆菌悬浮液倒在小烧杯中,将长有拟南芥的培养小盆倒扣其上,保证莲座叶以上部分浸没于液体中,抽真空,维持0.05Mpa压力5分钟。取出植株,横放在塑料盘中,用保鲜膜封好以保持湿度,放在恒温室培养。第二天打开,竖直培养,仍用保鲜膜保持湿度3~4天。培养三至四周,待种子成熟后,收取成熟种子(T₀代),干燥器中存放2周。

2.2.10 阳性植株的筛选及纯系的获得

- 1)制备含卡那霉素和头孢霉素的MS选择培养基(1×MS大量元素, 1×B₅微量元素, 1×铁盐, 1×B₅有机元素, 100mg肌醇, 3%蔗糖, 琼脂7.8g, 用KOH调节pH值至5.8, 高压灭菌);
- 2)将表面消毒的T₀代种子平铺于含相应抗生素的MS选择培养基中,密度为500~800粒种子/皿, 22℃培养;
- 3)一周后挑选阳性植株,并将该植株转至正常的MS培养基中,10天后转至蛭石。可用培养液(1/3×MS大量元素, 1/3×B₅微量元素, 1/3×铁盐)浇灌。待成熟后分单株收取种子(T₁代);
- 4)收取的T₁代种子按单株在含卡那霉素的选择培养基上生长,选择有1/3分离的株系,移至蛭石上培养,单株收取种子(T₂代);
- 5)T₂代种子按单株在含卡那霉素的培养基上筛选,不分离的即为纯合体植株,可用做后续试验的各项分析。

2.2.11 转基因植物的分子鉴定

2.2.11.1 植物总DNA的提取方法(CTAB法)

- 1)将CTAB extraction bufer 60℃预热;准备鲜嫩的植物材料。
- 2)取植物材料0.2g,在液氮中研磨成粉状。
- 3)加入到预冷的离心管中,并加入600μl 60℃预热的CTAB提取缓冲液。
- 4)混匀,60℃的水浴1h。
- 5)加等体积的氯仿:异戊醇(24:1)处理,轻缓摇晃(5分钟),10 000r/m离心5分钟。
- 6)取上清,加400μl的氯仿:异戊醇(24:1)处理,轻缓摇晃(5分钟),10 000r/m离心。
- 7)取上清,加500μl预冷的异丙醇,-20℃或4℃放置30分钟。10 000r/m,离心10分钟。
- 8)取沉淀,加80%乙醇500μl,10 000 r/m,离心30sec。
- 9)重复步骤9

10)吹干。

11)吹干后的DNA用20 μ l TE或双蒸水溶解(可在60 $^{\circ}$ C水浴中加快溶解速度)。

CTAB法所需溶液:

0.1mol/L的Tris.Cl (pH 8.0)

1.4mol/L的NaCl

0.02mol/L的EDTA(pH 8.0)

2%的CTAB(pH 8.0)

2.2.11.2 Southern杂交:

2.2.11.2.1 探针的制备:

将合成的5'端引物1 μ g 加灭菌水至16 μ l于EP管中,加入4 μ l DIG-high prime,充分混匀,瞬时离心,收集液体,37 $^{\circ}$ C孵育24小时。65 $^{\circ}$ C煮沸10分钟,终止反应。加入2倍体积的无水乙醇,置于-20 $^{\circ}$ C放置30分钟,12500r/m离心15分钟,弃上清,晾干,溶于10 μ l灭菌水中(0.1 μ g/ μ l)备用。用标准DNA作对照检测探针的浓度。

转基因拟南芥的Southern Blotting检测

2.2.11.2.2 杂交膜的制备

用10单位的HindIII切取拟南芥基因组DNA,37 $^{\circ}$ C下消化24小时,0.7%琼脂糖凝胶电泳,稳压5~6小时,检测酶切结果。

将凝胶浸泡在100ml变性液(0.5M NaOH,1.5M NaCl)中,轻轻摇动,15min更换一次变性液,30min后用去离子水漂洗1~2次,再用100ml中和液(1M Tris-Cl pH 7.4,1.5M NaCl)浸泡30min,15min时更换一次中和液。

以20 \times SSC作为转膜缓冲液,依照《分子克隆》第二版转膜方法将变性DNA转至尼龙膜上。120 $^{\circ}$ C烘烤30min。

2.2.11.2.3 杂交

将杂交膜封入杂交管,加入预热的预杂交液封口,42 $^{\circ}$ C保温30min,其间轻轻摇动。加入含有探针的预杂交液DIG Easy Hyb混匀,弃去杂交液。加入含探针的杂交液,封口。42 $^{\circ}$ C杂交4小时或杂交过夜。

2.2.11.2.4 洗膜

室温下用洗液 I (2 \times SSC,0.1% SDS),洗涤5min,2次;然后用预热的洗液 II (0.5 \times SSC,0.1% SDS),65~68 $^{\circ}$ C下洗涤15min,2次。

2.2.11.2.5 检测:

(1)室温下将膜用Washing Buffer 冲洗1~5min;

(2)放将膜入100ml Blocking Solution中孵育30min;

(3)将膜在20ml Antibody Solution中孵育30min;

- (4)将膜用Washing Buffer 100ml清洗15min×2;
- (5)将膜在20ml Detection Buffer 中平衡2~5min;
- (6)将膜放入10ml新配置的Colour Substrate Solution , 置于黑暗中孵育16h显色;
- (7)在50ml双蒸水或TE-buffer中清洗5min, 终止反应。

2.2.11.3 异硫氰酸胍法提取总RNA

- 1)称取1g新鲜拟南芥叶片, 液氮研磨成粉末, 移入预冷50 ml离心管中。
- 2)加入3ml GT溶液, 混匀。加入0.3 ml 2 mol/L NaAc (pH4.8) , 反复摇匀。加入3 ml 酸酚, 摇匀。加入1 ml 氯仿, 摇匀。
- 3) 4℃, 8 500 r/m离心15 min, 弃沉淀, 取上清液至另一干净DEPC水处理过的离心管中加入2倍体积无水乙醇, -20℃或-70℃, 放置1 h。
- 4) 4℃, 8 500 r/m离心10min。弃上清液, 在沉淀中加入1ml 4 mol/L LiCl, 使沉淀溶解。
- 5)移入1.5 ml 用DEPC水处理过的Eppendorf管中。
- 6) 125 000 r/m离心15 min, 弃上清液。在沉淀中加入400 μl 0.1%DEPC- H₂O, 混匀后再加入200 μl氯仿, 混匀。
- 7) 125 000 r/m离心5 min。吸上清于另一DEPC水处理过的1.5 ml离心管, 加入等体积氯仿, 混匀。
- 8)125 000 r/m离心5 min。上清液加入1/10体积3mol/L NaAc(pH5.8)和两倍体积的无水乙醇, -20℃放置过夜。
- 9) 12 500 r/m离心15 min。 RNA沉淀室温下稍干燥。加20μlDEPC-H₂O溶解, -70℃保存备用。
- 10) 用核酸蛋白分析仪测定RNA纯度及浓度: 取2μlRNA样品加498μl 0.1%DEPC-H₂O至500μl, 在OD₂₆₀和OD₂₈₀分别读出光密度, 测定RNA浓度和纯度。
- 11) 取5μl样品经1.0%琼脂糖凝胶电泳分析RNA质量。

异硫氰酸胍法所需溶液:

0.1%DEPC-H₂O

GT溶液: 4mol/L异硫氰酸胍, 25mmol/L柠檬酸钠, 0.5%十二烷基氨酸钠, 灭菌后加β-巯基乙醇到1%

酸酚: 水饱和酚+0.1% 8-羟基喹啉

3mol/LNaAc(pH5.8)

2mol/LNaAc(pH4.8)

2.2.11.4 RT-PCR

- 1)反转录反应 (25μl反应体系)

4 μ g拟南芥总RNA, 1 μ l Oligo (dT)₁₅-Adaptor和DEPC水按总体积14 μ l在冰上混匀。65 $^{\circ}$ C温育10min, 然后依次加入: 5 μ l 5 \times buffer, 1.25 μ l 10mmol/LdNTP Mixtur; 1 μ lM-MLV(2000U/ μ l); 用DEPC水补足体积25 μ l。37 $^{\circ}$ C温育1h, 70 $^{\circ}$ C 10min以终止反应, 冰浴冷却, 用于PCR反应。

2) PCR扩增:按下列反应组成调制反应液:

10 \times PCR Bufer	5 μ l
灭菌蒸馏水	37.5 μ l
dNTP	1 μ l
TaKaRa Taq	0.5 μ l
上游引物	2 μ l
下游引物	2 μ l
模板(反转录产物)	2 μ l

轻轻混匀后, 按以下条件进行PCR反应: 预变性94 $^{\circ}$ C 5min; 变性94 $^{\circ}$ C 30sec, 退火56 $^{\circ}$ C 40sec, 延伸72 $^{\circ}$ C 2min30sec, 30个循环; 保温72 $^{\circ}$ C 10 min 利用1%的琼脂糖凝胶电泳检测基因扩增情况。

2.2.12 转基因植物的耐逆性分析

2.2.12.1 耐盐性分析

转基因拟南芥在含有100、150、200mmol/L NaCl的MS培养基, 将萌发一周的转基因拟南芥和非转基因对照转移到上述含盐和不含盐MS平皿中培养, 一周纪录整株状态和生物量。

2.2.12.2 耐旱、耐寒性表型分析

在MS培养基中按重量/体积比分别加入3%、5%和7%的PEG 6000, 将萌发一周的转基因拟南芥和非转基因对照转移到上述含盐和不含盐MS平皿中培养, 一周纪录整株状态和生物量。

2.2.12.3 表型分析

构建了*TaNHX₂*基因的正义表达载体, 利用花粉管通道法转化拟南芥获得T0代种子, 经卡那霉素筛选获得转基因植株。分别将转基因和野生拟南芥在MS培养基的条件下萌发观察表型。

2.2.13 Na⁺/H⁺反向运转蛋白RNAi表达载体的构建

①用250mmol/L的NaCl处理在蛭石上培养的拟南芥, 12小时后采用异硫氰酸胍法提取拟南芥总RNA, 用RT-PCR的方法克隆出拟南芥钠氢反向运转蛋白基因保守性非常强的211bp片段, 所用的引物为:

5' 端引物 5' >GCAGTTTTTCCGCAATTTCGTGACTATTATGC<3'

4 μ g拟南芥总RNA, 1 μ l Oligo (dT)₁₅-Adaptor和DEPC水按总体积14 μ l在冰上混匀。65 $^{\circ}$ C温育10min, 然后依次加入: 5 μ l 5 \times buffer, 1.25 μ l 10mmol/LdNTP Mixtur; 1 μ lM-MLV(2000U/ μ l); 用DEPC水补足体积25 μ l。37 $^{\circ}$ C温育1h, 70 $^{\circ}$ C 10min以终止反应, 冰浴冷却, 用于PCR反应。

2) PCR扩增:按下列反应组成调制反应液:

10 \times PCR Bufer	5 μ l
灭菌蒸馏水	37.5 μ l
dNTP	1 μ l
TaKaRa Taq	0.5 μ l
上游引物	2 μ l
下游引物	2 μ l
模板(反转录产物)	2 μ l

轻轻混匀后, 按以下条件进行PCR反应: 预变性94 $^{\circ}$ C 5min; 变性94 $^{\circ}$ C 30sec, 退火56 $^{\circ}$ C 40sec, 延伸72 $^{\circ}$ C 2min30sec, 30个循环; 保温72 $^{\circ}$ C 10 min 利用1%的琼脂糖凝胶电泳检测基因扩增情况。

2.2.12 转基因植物的耐逆性分析

2.2.12.1 耐盐性分析

转基因拟南芥在含有100、150、200mmol/L NaCl的MS培养基, 将萌发一周的转基因拟南芥和非转基因对照转移到上述含盐和不含盐MS平皿中培养, 一周纪录整株状态和生物量。

2.2.12.2 耐旱、耐寒性表型分析

在MS培养基中按重量/体积比分别加入3%、5%和7%的PEG 6000, 将萌发一周的转基因拟南芥和非转基因对照转移到上述含盐和不含盐MS平皿中培养, 一周纪录整株状态和生物量。

2.2.12.3 表型分析

构建了*TaNHX₂*基因的正义表达载体, 利用花粉管通道法转化拟南芥获得T0代种子, 经卡那霉素筛选获得转基因植株。分别将转基因和野生拟南芥在MS培养基的条件下萌发观察表型。

2.2.13 Na⁺/H⁺反向运转蛋白RNAi表达载体的构建

①用250mmol/L的NaCl处理在蛭石上培养的拟南芥, 12小时后采用异硫氰酸胍法提取拟南芥总RNA, 用RT-PCR的方法克隆出拟南芥钠氢反向运转蛋白基因保守性非常强的211bp片段, 所用的引物为:

5' 端引物 5' >GCAGTTTTTCCGCAATTTTCGTGACTATTATGC<3'

3' 端引物 5' >GGTGTCTCGTCTTGATTCAGAACCTGC<3' , 引物命名为 I。PCR反应程序如下: 94℃ 5min; 94℃ 30sec, 52℃ 40sec, 72℃ 1min(30循环); 72℃ 10min。以TaKaRa公司的LA Taqase和相应buffer扩增目的片段, PCR产物用2.0%琼脂糖凝胶分离, EB染色。回收目的片段(北京鼎国DNA片段的快速纯化/回收试剂盒, 按说明书操作), 与pGEM-T-easy载体在T4DNA连接酶作用下连接, 4℃ 24小时。将连接产物转化*E. coli*.DH5α感受态细胞, 37℃培养12~18小时。通过蓝白斑实验选取数个白色单克隆扩增, 提取质粒, 再以EcoR I、Pst I单酶切质粒, 并用引物 I 进行PCR验证, 阳性克隆由上海基康生物公司测序。将构建成功的质粒命名为pTR1, 该基因片段命名为TR1。

②以片段TR1为模板扩增, 在片段TR1外引入Cla I 和BamH I 位点。两端序列设计引物(5' 端引物: 5' GGCATCGATGCAGTTTTTCCGCAATTTTCGTGACTATTATGC <3' ; 3' 端引物: 5' >GGCGGATCCGGTGTCTCGTCTTGATTCAGAACCTGC <3' 引物命名为 II), PCR反应程序如下: 94℃ 5min; 94℃ 30sec, 52℃ 40sec, 72℃ 1min(30循环); 72℃ 10min。TaKaRa公司的LA Taqase和相应buffer扩目的片段。PCR产物用2.0%琼脂糖凝胶分离, EB染色。回收目的片段(北京鼎国DNA片段的快速纯化/回收试剂盒, 按说明书操作), 与pMD18载体在T4DNA连接酶作用下连接, 4℃ 24小时。将连接产物转化*E. coli*.DH5α感受态细胞, 37℃ 12~18小时。选取数个单克隆扩增, 提取质粒, 再以EcoR I 酶切质粒和用引物 II PCR验证, 阳性克隆由上海基康生物公司测序。将构建成功的质粒命名为pTR2, 该基因片段命名为TR2。

③以pTR1质粒为模板扩增, 在片段TR1外引入Kpn I 和Xho I 位点。片段TR1两端序列设计引物(5' 端引物: 5' >GGCGGTACCGCAGTTTTTCCGCAATTTTCGTGACTATTATGC <3' , 3' 端引物: 5' >GGCCTCGAGGGTGTCTCGTCTTGATTCAGAACCTGC <3' 引物命名为 III)。PCR反应程序如下: 94℃ 5min; 94℃ 30sec, 52℃ 40sec, 72℃ 1min(30循环); 72℃ 10min。以TaKaRa公司的LA Taqase和相应buffer扩增目的片段。PCR产物用2.0%琼脂糖凝胶分离, EB染色。回收目的片段(北京鼎国DNA片段的快速纯化/回收试剂盒, 按说明书操作), 与pGEM-T-easy载体在T4DNA连接酶作用下连接, 4℃ 24小时。将连接产物转化*E. coli*.DH5α感受态细胞, 37℃ 12~18小时。经蓝白斑实验选取数个白色单克隆扩增, 提取质粒, 再以EcoR I、Pst I单酶切质粒, 并用引物 III进行PCR验证, 阳性克隆由上海基康生物公司测序。构建成功的质粒命名为pTR3, 基因片段命名为TR3。

④质粒 pTR2 用 Cla I /BamH I 双酶切后, 用 2.0%琼脂糖凝胶分离, EB 染色。回收片段 TR2 (北京鼎国 DNA 片段的快速纯化/回收试剂盒, 按说明书操作), T4DNA

连接酶作用下, 16°C 24 小时, 片段 TR2 定向连入同样用 Cla I /BamH I 双酶切 pKANNIBAL 克隆载体中, 形成了含有片段 TR2 的载体 pKANNIBAL-2。将重组质粒转化 *E.coli* DH5 α 感受态细胞, 37°C 12~18 小时。选取数个单克隆扩增, 提取质粒, 用引物 II 进行 PCR 验证, 并用 Cla I /BamH I 双酶切鉴定阳性克隆。

⑤质粒 pTR3 用 Kpn I /Xho I 双酶切后, 用 2.0% 琼脂糖凝胶分离, EB 染色。回收片段 TR3 (北京鼎国 DNA 片段的快速纯化/回收试剂盒, 按说明书操作), T4 DNA 连接酶作用下, 16°C 24 小时, 片段 TR3 定向连入同样用 Kpn I /Xho I 双酶切阳性克隆 pKANNIBAL-2 克隆载体中, 形成了含有片段 TR3 的载体 pKANNIBAL-2-3。将重组质粒转化 *E.coli* DH5 α 感受态细胞, 37°C 12~18 小时。选取数个单克隆扩增, 提取质粒, 用引物 III 进行 PCR 验证, 并用 Kpn I /Xho I 双酶切鉴定阳性克隆。

⑥将阳性克隆载体 pKANNIBAL-2-3 带有两个 Not I 酶切位点, 用 Not I 单酶切后, 用 0.8% 琼脂糖凝胶分离, EB 染色。此时有一条大约 2960bp 和一条大约 3450bp 的两条带, 回收琼脂糖凝胶中较大的片段, 片段命名为片段 TR4。片段 TR4 连入同样用 Not I 单酶切 pART27 表达载体中, 形成了含有片段 TR4 的表达载体 pART27-4。将重组质粒转化 *E.coli* DH5 α 感受态细胞, 37°C 12~18 小时。选取数个单克隆扩增, 提取质粒, 用引物 II 和引物 III 分别进行 PCR 验证, 并用 Cla I /BamH I 双酶切和 Kpn I /Xho I 双酶切鉴定阳性克隆。

2.2.14 Na⁺/H⁺ 反向转运蛋白 RNAi 表达载体转化农杆菌、转基因拟南芥的获取及耐逆性分析

2 μ l (约 30ng) 表达载体 pART27-4, 加入 20 μ l 由 CaCl₂ 法制备的感受态细胞农杆菌 GV3101 并转化, 取 200 μ l 菌液涂布于含壮观霉素和利福平的 LB 固体培养基上, 于 28°C 倒置培养 1~2 天。挑选菌落鉴定阳性克隆。采用花粉管通道法和阳性植株的筛选方法获得 Na⁺/H⁺ 反向转运蛋白 RNAi 表达载体阳性植株进行耐盐、耐旱和表型耐逆性分析。

3 实验结果

3.1 *TaNHX*₂ 正义表达载体的构建及功能分析

3.1.1 表达载体 pBIN438-*TaNHX*₂ 的构建

通过在 *TaNHX*₂ 全长基因外引入新的酶切位点 BamH I、Kpn I, 扩增出所需片段。PCR 产物和 pBIN438 的表达载体用 BamH I /Kpn I 双酶切, 酶切产物连接后, 将重组质粒转化 *E.coli* DH5 α , 提取质粒, 进行 PCR 和相应位点的双酶切验证, 1% 琼脂糖凝胶电泳 (图 3-1)。PCR 产物和酶切产物均在 1600bp 处有一条带, 这与预期结果一致。

挑选其中一个鉴定为阳性表达载体 pBIN438-*TaNHX*₂ 的重组菌落, 由上海基康生

物公司测序,结果见附图1-5。将四个测序结果合并,得出*TaNHX₂*基因的序列。*TaNHX₂*基因全长1614bp,编码538个氨基酸。将测序结果与克隆载体比对,除通过定点突变的方法将表达甘氨酸的GGG突变为GGT,从而消除*TaNHX₂*基因ORF内的5'端Kpn I酶切位点外,其余的碱基完全匹配。由此可见,我们获得了*TaNHX₂*基因的表达载体。

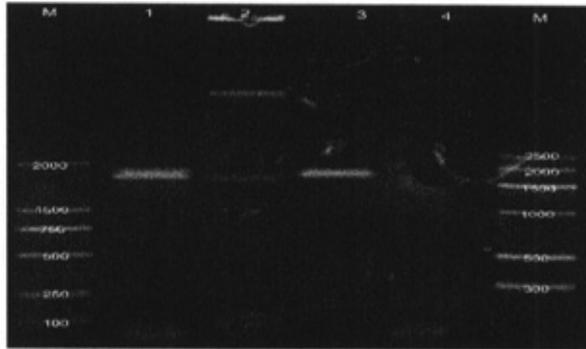


图 3-1 表达载体 pBIN438-*TaNHX₂* 酶切和 PCR 鉴定图谱

M: DNA Marker III, DNA Marker DL 2000; 1: pBIN438-*TaNHX₂*载体PCR扩增; 2: pBIN438-*TaNHX₂*载体双酶切(BamH I /Kpn I); 3: 克隆载体阳性对照; 4: PCR阴性对照

3.1.2 *TaNHX₂*表达载体的农杆菌转化

挑选培养在含卡那霉素和利福平的LB固体培养基平板上的单克隆,接种于液体培养基中培养,收集农杆菌菌体进行菌落PCR检测(图2),证明已将含有*TaNHX₂*基因的表达载体转入农杆菌GV3101中。

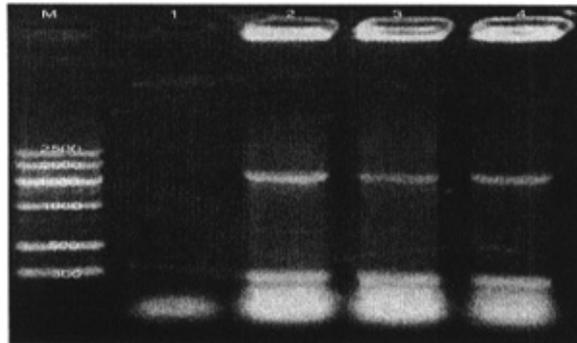


图 3-2 表达载体转入农杆菌 GV3101 PCR 鉴定图谱

M: DNA Marker III; 1: 阴性对照 2~4菌落PCR验证

3.1.3 抗性植株的获得

表达载体pBIN438-*TaNHX₂*经花粉管通道法转入拟南芥中。经卡那霉素抗性筛选得到能在50mg/L卡那霉素的MS培养基中正常生长的抗性植株T0代。转基因植株纯

系的获得及纯系植株的抗逆性分析正在进行中。

3.1.4 转基因植株的分子鉴定

3.1.4.1 转基因植株定量PCR鉴定

用CTAB法得到24株转基因植株总DNA后(图3-3),做PCR验证(图3-4)说明经花粉管通道法后筛选出的阳性植株是已经把 *TaNHX₂* 基因转到野生拟南芥中。

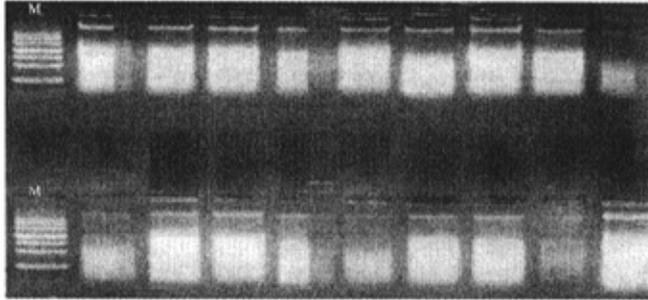


图 3-3 转基因植株总 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析
M: DNA Marker; 其余为转基因植株总 DNA

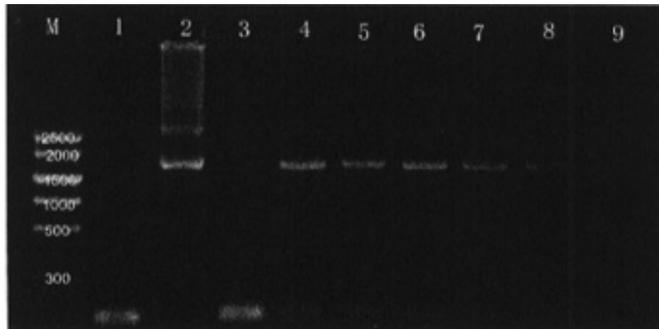


图 3-4 转基因植株的 PCR 鉴定

M: DNA Marker III; 1: 阴性对照; 2: 农杆菌质粒阳性对照; 3: 野生拟南芥阴性对照; 4~9: 转基因拟南芥PCR验证

3.1.4.2 转基因植株Southern印迹杂交

为获得更多的整合信息,对抗性筛选呈阳性的转基因拟南芥植株进行Southern印迹杂交,用CTAB法提取5株抗性植株的总DNA,用HindIII限制性内切酶完全酶解基因组DNA。未经酶切的pBIN438-*TaNHX₂*质粒为阳性对照,野生拟南芥植株DNA酶切产物为阴性对照,结果见图3-5。由图可见转化株中5株出现杂交信号,说明目的基因已成功整合到拟南芥基因组中。同时可以看到目的基因在不同的转化个体中拷贝数不同,同时存在单拷贝和双拷贝现象。

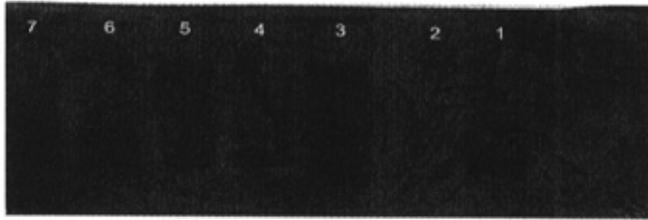


图 3-5 转基因植株 Southern blot 检测

1. pBIN438-TaMYK₂质粒; 2. 非转基因植株; 3-7 转基因植株

3.1.4.3 转基因植株RT-PCR鉴定

提取转基因植株总RNA后，120V行1%非变性胶琼脂糖凝胶电泳10分钟左右(图3-6)，可以看出RNA无降解。逆转录成cDNA后进行PCR。阴性对照为野生拟南芥cDNA为模板的PCR产物，无条带扩增。转基因植株PCR产物1600bp左右处有一条带，结果见图3-7。说明目的基因可以转录，但对外源基因转录情况的最后决定，还需与Northern杂交实验结果相结合。

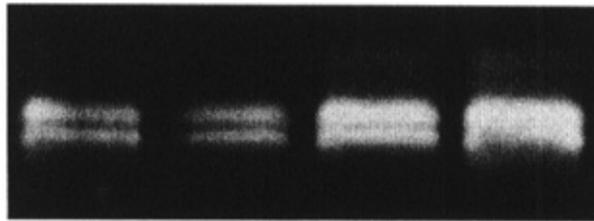


图 3-6 转基因植株总RNA非变性琼脂糖凝胶电泳分析

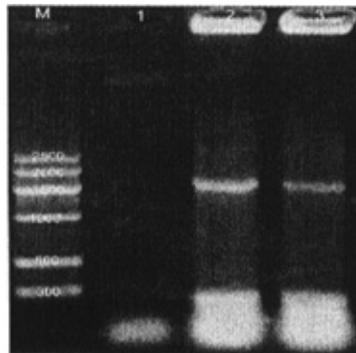


图3-7 转基因植株RT-PCR检测;

M: DNA Mark DL 2000; 1.非转基因植物; 2-3.为转基因植株

3.1.5 耐逆性分析:

3.1.5.1耐盐性分析

在不含NaCl的MS培养基上萌发一周的转基因拟南芥(T0代)和野生型同时移植到含盐的培养基中,经一周的培养,转基因拟南芥在100mmol/L、150mmol/LNaCl的胁迫条件下能维持生长,生物量增加,野生型则表现为生长缓慢,有个别叶片发白;在200mmol/LNaCl培养基中,野生型全部叶片发白,植株接近死亡,而转基因拟南芥部分植株有死亡症状,结果见图3-8。表明*TaNHX₂*基因的超量表达能提高植物的耐盐性。

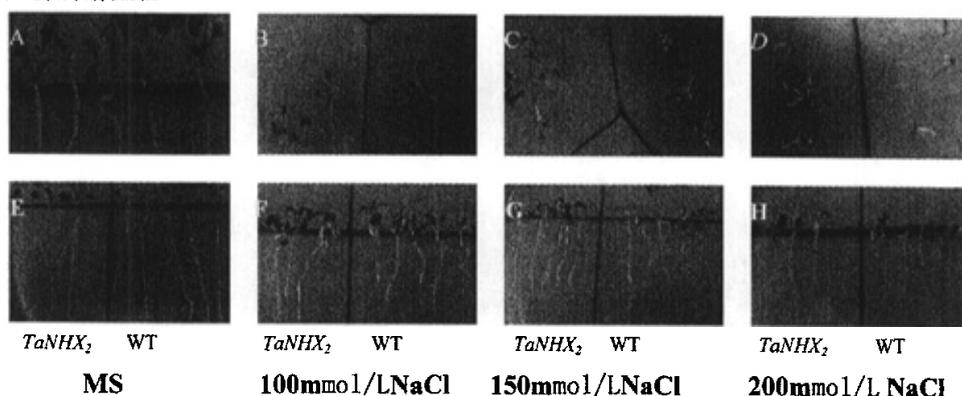


图3-8 转*TaNHX₂*基因拟南芥的耐盐性分析

图中所示: 转正义*TaNHX₂*基因拟南芥和野生型拟南芥耐盐性试验, 幼苗萌发一周后移植到盐培养基中继续培养一周后照像。A, E为对照; B, F为含100mmol/LNaCl MS培养基上野生和转*TaNHX₂*基因拟南芥; C, G为含150mmol/LNaCl MS培养基上野生和转*TaNHX₂*基因拟南芥; D, H为含200mmol/LNaCl MS培养基上野生和转*TaNHX₂*基因拟南芥。

3. 1. 5. 2耐旱性分析

在含3%和5%PEG6000的MS培养基上, 转基因拟南芥在叶片大小、植株长度、平均生物量上均优于野生型。在7% PEG6000的MS培养基上, 转基因拟南芥稍好于野生型, 但叶片明显萎蔫, 可见7% PEG6000持续两周已达到耐旱极限, 结果见图3-9。过表达*TaNHX₂*基因提高了转基因拟南芥的耐干旱能力。

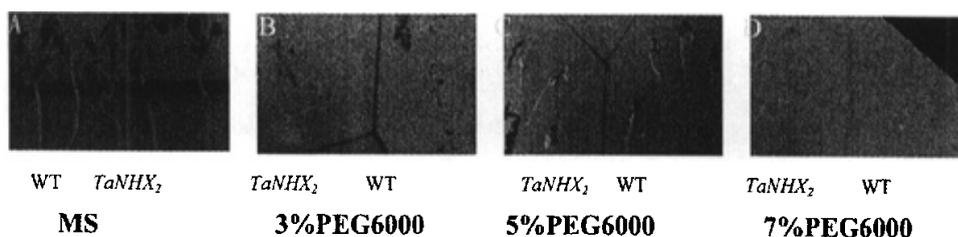


图3-9 转*TaNHX₂*基因拟南芥的耐旱性分析

图中所示: 转正义*TaNHX₂*基因拟南芥和野生型拟南芥耐盐性试验, 幼苗萌发一周后移植到干

早性培养基中继续培养一周后照像。

3.1.5.3 转化拟南芥表型分析

分别将转基因和野生拟南芥在MS条件下萌发观察表型。在MS培养基上萌发后，观察到转基因和野生拟南芥在细胞分裂旺盛的组织如根和叶中表现出了明显异常的表型，转基因拟南芥发生大量的侧根，根毛也多于野生型，而主根的伸长则明显受抑制；转基因拟南芥的叶片大于野生型植株(图3-10)。

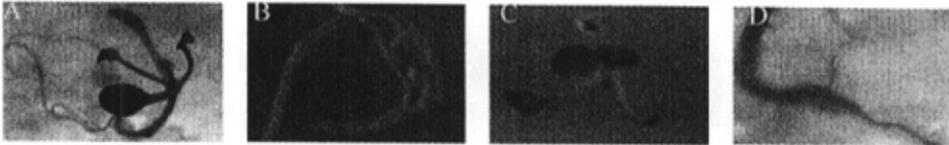


图3-10 转化拟南芥表型分析

图中所示：转*TaNHX₂*基因拟南芥(A, B)和野生拟南芥(C, D)萌发10天幼苗叶与根的表型照片。

3.2 Na⁺/H⁺反向运转蛋RNAi载体的构建和功能分析

3.2.1 Na⁺/H⁺反向运转蛋白RNAi表达载体pART27-4的构建

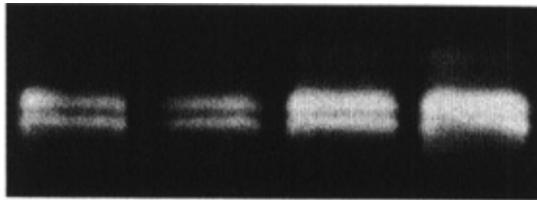
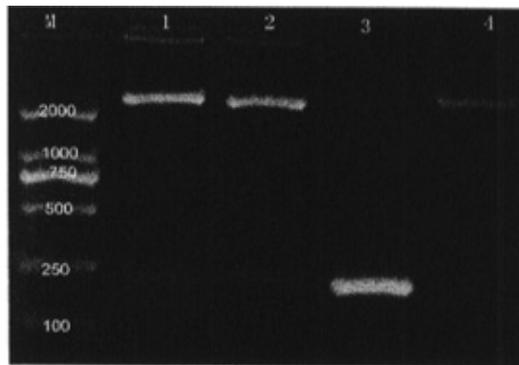


图 3-11转基因植株总RNA非变性琼脂糖凝胶电泳分析



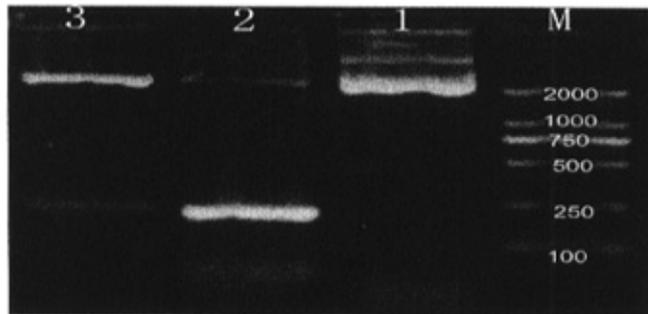
3-12 pTR1 酶切、PCR鉴定图谱

M: DNA Marker DL 2000; 1: pTR1 EcoR I 单酶切; 2: pTR1 Pst I 单酶切; 3: pTR1 PCR 扩增; 4: PCR阴性对照

①提取野生拟南芥总RNA，120V行2%琼脂糖凝胶电泳10分钟左右，由图3-11可见RNA无降解。采用RT-PCR方法克隆出拟南芥钠氢反向运转蛋白基因保守性非常强

的211bp片段，进行2%琼脂糖凝胶电泳后回收片段连与pGEM-T easy载体，转化感受态大肠杆菌DH5 α ，在含Amp的LB培养板上培养，经蓝白斑实验选取白色单克隆，提取质粒，经PCR验证和酶切验证，结果如图3-12所示，片段大小约211bp，与预期相符。挑选其中一个鉴定为阳性单克隆，由上海基康生物公司测序，结果见附图6。将测序结果提交NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)进行碱基比对，它与在拟南芥中已发现的与其它植物保守性可达80%~90%的钠氢反向转运蛋白(*AtNHX1*)基因的碱基完全匹配。由此可见，我们获得了野生拟南芥钠氢反向转运蛋白基因的一个片段。

②通过在TR1外引入新的酶切位点Cla I 和BamH I，扩出所需片段。PCR产物进行2%琼脂糖凝胶电泳回收后与pMD18载体相连，转化感受态大肠杆菌DH5 α ，在含Amp的LB培养板上培养，选取白色单克隆，提取质粒，经PCR验证和酶切验证，结果如图3-13所示，片段大小约211bp，与预期相符。挑选其中一个鉴定为阳性单克隆，由上海基康生物公司测序，结果见附图7。将测序结果提交NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)进行碱基比对，它与在拟南芥中已发现钠氢反向转运蛋白(*AtNHX1*)基因的碱基完全匹配。由此可见，我们获得了野生拟南芥带有酶切位点Cla I 和BamH I 的钠氢反向转运蛋白基因的一个片段。

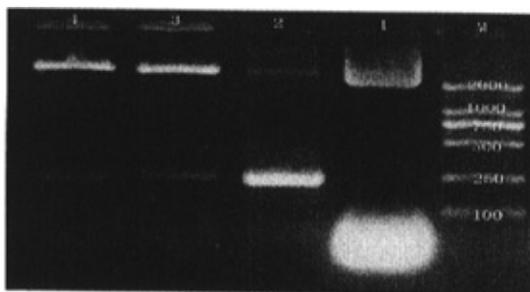


3-13 pTR2 酶切、PCR鉴定图谱

M: DNA Marker DL 2000; 1: pTR2 质粒; 2: pTR2 PCR 扩增; 3: pTR2 EcoR I 单酶切

③通过在TR1外引入新的酶切位点Kpn I 和Xho I，扩出所需片段。PCR产物行2%琼脂糖凝胶电泳回收后与pGEM-T easy载体连接，转化感受态大肠杆菌DH5 α ，在含Amp的LB培养板上培养，经蓝白斑实验选取白色单克隆，提取质粒，经PCR验证和酶切验证，结果如图3-14所示，片段大小约211bp，与预期相符。挑选其中一个鉴定为阳性单克隆，由上海基康生物公司测序，结果见附图8。将测序结果提交NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)进行碱基比对，它与在拟南芥中已发现的与其它植物保守性可达80%~90%的钠氢反向转运蛋白(*AtNHX1*)基因的碱基完

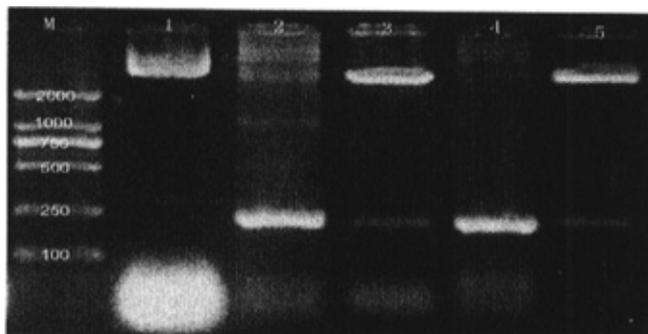
全匹配。由此可见，我们获得了野生拟南芥带有酶切位点Kpn I 和Xho I 钠氢反向运转蛋白基因的一个片段。



3-14 pTR3 酶切、PCR鉴定图谱

M: DNA Marker DL 2000; 1: pTR3 质粒; 2: pTR3 PCR 扩增; 3: pTR3 EcoR I 单酶切; 4: pTR3 Pst I 单酶切

④质粒pTR2和克隆载体pKANNIBAL用Cla I /BamH I 双酶切，酶切产物连接后，将重组质粒pTR4转化*E.coli* DH5 α ，提取质粒，进行PCR和相应位点的双酶切，进行2%琼脂糖凝胶电泳，结果见图3-15。PCR产物和酶切产物均在211bp左右处有一条带，这与预期结果一致。



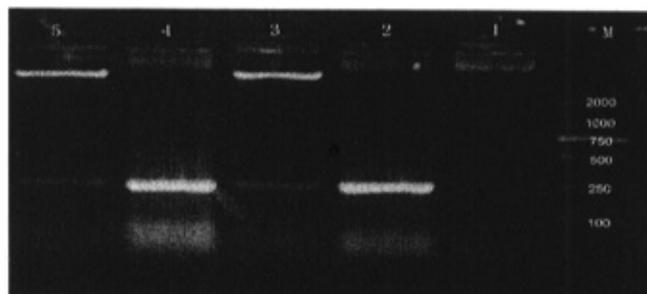
3-15 pTR5 酶切、PCR鉴定图谱

M: DNA Marker DL 2000; 1: PCR 阴性对照; 2: pTR4 PCR 扩增; 3: pTR4 双酶切 (Cla I /BamH I); 4: pTR5 PCR 扩增; 5: pTR5 双酶切 (Kpn I 和 Xho I)

⑤质粒 pTR3 和克隆载体 pTR4 用 Kpn I 和 Xho I 双酶切，酶切产物连接后，将重组质粒 pTR5 转化 *E.coli* DH5 α ，提取质粒，进行 PCR 和相应位点的双酶切，2%琼脂糖凝胶电泳，结果见图 3-15。PCR 产物和酶切产物均在 211bp 左右处有一条带，这与预期结果一致。

⑥阳性克隆载体 pKANNIBAL-2-3 和表达载体 pART27 用 Not I 单酶切，酶切产物连接后，将重组质粒转化 *E.coli* DH5 α ，提取质粒，进行 PCR 和相应位点的双酶切，行 2%琼脂糖凝胶电泳，结果见图 3-16。PCR 产物和酶切产物均在 211bp 左右处有

一条带，这与预期结果一致。由此可见，我们获得了野生拟南芥钠氢反向运转蛋白基因 RNAi 表达载体 pART27-4，接下来可进行该基因 RNAi 载体的耐逆性相关分析。



3-16 pTR6 酶切、PCR鉴定图谱

M: DNA Marker DL 2000; 1: PCR 阴性对照; 2: pTR6 以引物II进行 PCR 扩增; 3: pTR6 双酶切 (Cla I /BamH I); 4: pTR6 以引物III进行 PCR 扩增; 5: pTR6 双酶切 (Kpn I 和 Xho I)

3.2.2 pART27-4表达载体的农杆菌转化

挑选培养在含壮观霉素和利福平的LB固体培养基平板上的单克隆，接种于液体培养基中培养，收集农杆菌菌体进行菌落PCR检测(图3-17)，证明表达载体 pART27-4转入农杆菌GV3101中。

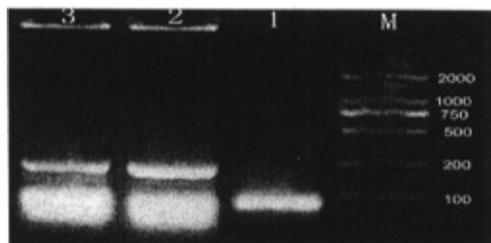


图 3-17 RNAi 载体转入农杆菌 GV3101 PCR 鉴定图谱

M: DNA Marker DL 2000; 1: 阴性对照; 2, 4菌落PCR验证

3.2.3 抗性植株的获得

表达载体pART27-4经花粉管通道法转入拟南芥中，收获T0代种子。经抗性筛选得到能在50mg/L卡那霉素的MS培养基中正常生长的抗性植株。转基因植株纯系的获得及纯系植株的耐逆性分析正在进行中。

3.2.4 耐逆性分析

3.2.4.1 耐盐性分析

在不含NaCl的MS培养基上生长一周的转基因拟南芥(T0代)和野生型同时移

植到含盐的培养基中，经一周的培养。野生型随着NaCl浓度的增加表现为生长缓慢，在200 mmol/L NaCl时有少数植株叶片发白(图3-18)；转基因拟南芥在100mmol/L、150mmol/L NaCl培养基中，几乎已经停止生长，生物量增加缓慢。在200 mmol/L NaCl时叶片几乎全部发白，萎蔫植株最终死亡，野生型植株的生物量及根长明显优于转入pART27-4质粒的转基因型。

3.2.4.2 耐旱性分析

在含3%和5%PEG6000的MS培养基上，野生型拟南芥在叶片大小、植株长度、平均生物量上均优于转基因型。在7% PEG6000的MS培养基上，野生型拟南芥叶片明显萎蔫，而转基因型叶片几乎全部发白，萎蔫植株最终死亡，可见7% PEG6000持续两周已达到耐旱极限，结果见图3-19。

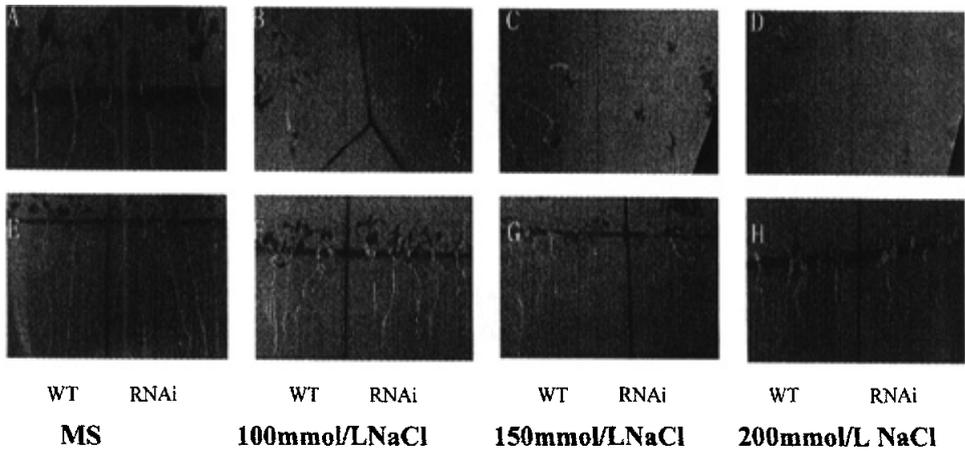


图3-18 转Na⁺/H⁺反向运转蛋白RNAi载体的拟南芥的耐盐性分析

图中所示：转Na⁺/H⁺反向运转蛋白RNAi载体拟南芥和野生型拟南芥耐盐性试验，幼苗萌发一周后移植到盐培养基中继续培养一周后照像。A，E为对照；B，F为含100mmol/L NaCl MS培养基上野生和转基因拟南芥；C，G为含150mmol/L MS培养基上NaCl野生和转基因拟南芥；D，H为含200mmol/L NaCl MS培养基上野生和转基因拟南芥。

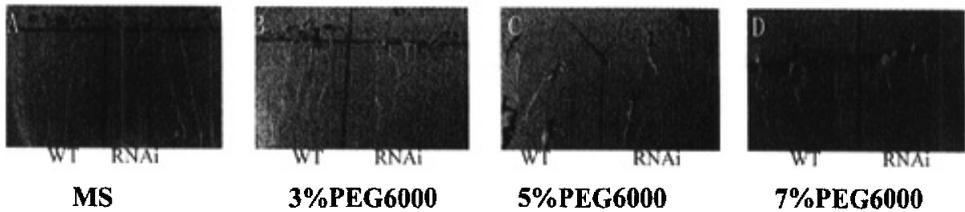


图 3-19 Na⁺/H⁺反向运转蛋白 RNAi 载体转化拟南芥的耐旱性分析

图中所示：转基因拟南芥和野生型拟南芥耐盐性试验，幼苗萌发一周后移植到干旱性培养基中继

续培养一周后照像。

3.2.4.3 表型分析

构建了 Na^+/H^+ 反向转运蛋白 RNAi 载体，利用花粉管通道法转化拟南芥获得 T0 代种子，经卡那筛选获得转基因植株。将转基因和野生拟南芥在 MS 条件下萌发观察表型。在 MS 培养基上萌发后，观察到转基因和野生拟南芥在细胞分裂旺盛的组织如根和叶中表现出了明显异常的表型，转基因拟南芥植株的高度明显小于野生型；转基因拟南芥的根明显小于野生型植株，结果见图 3-20。

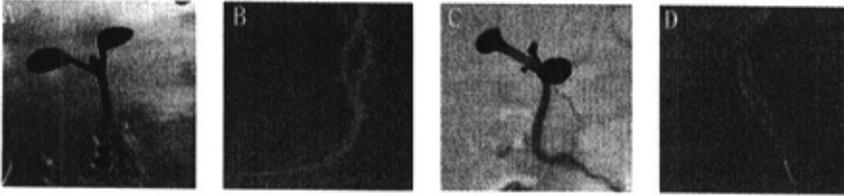


图3-20 转化拟南芥表型分析

图中所示：野生拟南芥(A, B)和转基因拟南芥(C, D)萌发10天幼苗叶与根表型照片。

综上所述，反义表达载体pART27-4可抑制拟南芥的耐盐和耐干旱能力。

4 讨论

4.1. 引物的设计及PCR反应条件的优化

对于整个PCR反应体系，引物设计占有重要的地位。引物设计的总原则是，提高PCR反应的效率和特异性。一般的原则是：引物长度以20~25bp为宜，引物过短会使特异性降低，过长则使反应效率过低及特异性降低；引物内部不应形成“发夹”结构，若“发夹”结构不可避免，也应使3'末端碱基游离；若两条引物之间尤其是在3'末端不应形成二聚体，即不应有互补链存在；GC含量在50~60%，避开局部富含GC或AT，为了使引物和模板稳定结合，3'端避开AT rich结构；引物3'末端碱基应与模板完全配对，最好终止于三联密码的第一密码子，以保证扩增的特异性；选择 T_m 温度相互接近的两条引物。我们在设计引物时，利用DNA Club软件辅助设计并进行分析。结果表明所设计的引物基本符合上述原则。

影响 PCR 反应结果的主要变量包括：①模板的完整性非常重要，要求模板无降解，模板的浓度也很关键，浓度过低，将不能得到足量的扩增产物，浓度过高，可大大增加反应得非特异性，而得不到特异的扩增带。我们在实验中首先确定模板的浓度和纯度，从而确定目的产物的特异性；②退火温度和时间取决于反应体系的组成、扩增引物的长度、GC 含量和浓度，退火温度低则反应敏感性高而特异性下降，退火温度高则反应特异性高而敏感性下降，因此最佳的退火温度十分重

要。③ Mg^{2+} 的浓度可影响扩增的特异性，一般 Mg^{2+} 的浓度选择在 1~2mM 左右较为合适，过量可影响扩增的特异性；④另外一些添加物可提高 DNA 聚合酶稳定性，促进聚合物反应进程或降低与模板的二级结构，提高反应的特异性；⑤此外，为保证扩增的特异性，我们再扩增较长的片断时还使用可少许 Pfu DNA 聚合酶（一种高保真耐高温 DNA 聚合酶，能纠正 PCR 扩增过程中产生的错误，而传统的 Taq DAN 聚合酶则不能）。

4.2 Na^+/H^+ 反向转运蛋白的研究

植物为了减少盐胁迫造成的伤害，在长期进化过程中，形成了一套耐盐的机制，或增加 Na^+ 的外排，或限制 Na^+ 的吸收，或将 Na^+ 束缚在液泡中。目前已经知道有些植物主要通过液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白将 Na^+ 束缚在液泡中以减少 Na^+ 的毒害。因此液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白在植物耐盐性方面具有重要作用。现有从小麦获得的一个液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白的基因 *TaNHX₂*，其 ORF 是 1612bp，编码一个含 538 个氨基酸， M_r 为 59.7 kD 的蛋白质。通过 SMART 分析，该蛋白具有 10 个跨膜区和 38 个氨基酸的膜定位信号，与小麦中已获得的 *TaNHX₁* 和水稻、拟南芥中来源的 NHX 基因进行氨基酸同源性比较，发现跨膜区的氨基酸序列十分保守，非同源区主要在 N 端 1~18 残基和 C 端 538~553 残基，变化最明显的区域主要在 450~498 位残基。一些实验已经证明同源蛋白序列间的差异将会导致功能上的差异，因此 *TaNHX₂* 与其它同源基因在氨基酸上表现出的差异可能意味着它们功能上会有所不同。

一些研究认为高等植物的液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白对盐胁迫的响应有 3 种形式。第一种是有无盐处理都不显示 Na^+/H^+ 反向转运蛋白活性；第二种 Na^+/H^+ 反向转运蛋白是诱导型的，未作盐处理的植物中没有 Na^+/H^+ 反向转运蛋白活性，只有在 NaCl 胁迫下才能诱导出 Na^+/H^+ 反向转运蛋白活性，表现出对 Na^+ 的 K_m 增加；第三种主要是盐生植物，其 Na^+/H^+ 反向转运蛋白是组成型的，无盐条件下 Na^+/H^+ 反向转运蛋白活性较低，盐处理后其活性增加，表现为液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白对 Na^+ 的 K_m 变化不大。盐胁迫可增强液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白基因的表达，并且这些基因的表达具有组织特异性，通常表现为 NaCl 处理下，叶、茎中转录水平的增加高于根中，表明植物对 Na^+ 的解毒机制是在根中主要将 Na^+ 排出，而在茎、叶中主要把 Na^+ 区隔化。

目前已经利用酵母模式系统做了功能互补实验及过量表达实验，证明 *TaNHX₂* 有效提高酵母耐逆性。本实验构建含 *TaNHX₂* 基因的表达载体转到拟南芥中，获得 T0 代抗性植株。在高盐、干旱和冷胁迫下可诱导 *TaNHX₂* 在根、叶的积累，使转基因拟南芥表现出一定的耐逆性。而转基因植株纯系的获得及纯系植株耐逆性分

析正在进行中。

4.3 RNAi 在植物的功能基因学研究

随着人类及小鼠基因组计划的相继完成，基因组研究工作的重心已从大规模测序阶段转移到功能基因组阶段。随着越来越多未知基因的发现，我们面临的问题是如何诠释这些遗传信息、如何将这些序列信息与生物学功能相互关联起来，其中反义 RNA 抑制及基因敲除等反向遗传学手段是最为常用的方法，并已成功应用于一些功能基因的研究。但这两种方法都存在着缺陷，如基因敲除能从根本上完全消除目标基因的活性，但可能不适用于研究特定基因在特定发育阶段的功能；反义 RNA 技术由于其对内源性基因表达的抑制较弱，往往产生一些过渡性的表型，误导我们对目标基因功能的判断。最近在线虫中发现的 RNAi 机制，通过试验手段导入 dsRNA 分子以选择性降解细胞内其同源 mRNA，导致内源性基因的表达被关闭，为从反向遗传学角度研究未知基因的功能提供了新的方法和思路。由于 RNAi 作用比反义 RNA 技术更有效、比基因敲除更省时，且可以通过导入多种 dsRNA 分子，同时抑制多个基因的表达，因此具有广阔的应用前景。

因为 RNAi 技术在植物中具有稳定性，随着更多的重要农作物的植物基因组测序计划的完成，RNAi 技术必将在基因功能、基因表达调控、抗病、抗虫和抗逆基因工程、雄性不育株系的培育、多倍体植物的研究以及植物发育和生理等方面得到更广泛的应用。目前 siRNA 的制备有五种方法：

①化学合成：适合于确定的需要大量 siRNA 的研究；由于价格昂贵，不适合用于筛选 siRNA 序列和长期研究。②体外转录：用于序列筛选；不适合长期研究和需要大量 siRNA 的研究。此方法相对化学合成，普通实验室就可制备。③RNase III 类核酸酶消化长的双链 dsRNA：快速研究特定基因被抑制后的表现型；不适合用于长期研究和测定特定 siRNA 序列对基因抑制的效果。此方法首先设计一个目的基因长 200~1000bp 的模板，然后体外转录获得长的双链 RNA，再经 RNase III 或 Dicer 核酸酶的酶解获得一系列 siRNA 混合物，经纯化后去除未酶解得 dsRNA，这些 siRNA 混合物就可用于转染细胞。因为是多不同序列的总 siRNA，因而一般都能很有效地抑制基因表达。由于使用的 siRNA 是多种序列的混合物，可能会导致非特异性基因的抑制，尤其是相关基因的非特异性抑制。④PCR siRNA 表达结构：通过 PCR 合成 siRNA 表达模板，然后直接导入细胞中，不须克隆到载体上。PCR 合成的表达模板包括 RNA 聚合酶 III 启动子，siRNA 发卡结构序列和 RNA 聚合酶 III 终止子。从中筛选 siRNA 序列和测试不同启动子的效果；不宜于长期抑制基因表达。⑤siRNA 表达载体：目前 siRNA 的表达载体主要选用三个不同 RNA 聚合酶 III 启动子来在哺乳动物细胞中表达小的发卡结构的 siRNA。这三个启动子为：Human U6、Mouse U6

和Human H1。RNA聚合酶III之所以用来表达siRNA，这是因为在哺乳动物细胞中RNA聚合酶III就是用来表达相当大量的小RNAs。此法可长期抑制基因表达，体内制备siRNA不许直接操作RNA。用于基因长期被抑制的分析研究；因为费时费力，不适用于siRNA的序列筛选。

利用RNAi技术研究植物基因的功能，具有高度的序列专一性，可以使特定的基因功能丧失或降低，从而使特定的基因沉默，因而可以确定基因的功能。因此，RNAi可以作为一种强有力的工具用于植物基因功能的研究，利用RNAi引起的生物体的反应，对某个功能基因群进行大规模的筛选，并确定其基因功能。本项研究通过对拟南芥的*AtNHX1*基因比对分析，掌握该基因的序列特征，寻找*AtNHX1*基因的保守序列来设计引物。把这段保守序列以正反方向插入克隆载体pKANNIBAL中，再将这段正反方向的序列切下连入pART27双元表达载体中，其转录产物预计可形成发夹结构，可以使内源性的*AtNHX1*基因的mRNA降解。利用花粉管通道法将表达载体导入拟南芥后通过降解*AtNHX1*基因的mRNA，阻断Na⁺/H⁺反向运转蛋白的生物合成，从而达到降低Na⁺/H⁺反向运转蛋白含量的目的。实验证实，该载体能有效地封闭*AtNHX1*基因的表达。这为随后用RNAi技术进一步深入研究Na⁺/H⁺反向运转蛋白基因的功能提供了一种良好的研究手段。

结 论

- 1 将 BamHI 和 KpnI 酶切位点引入 *TaNHX₂* 基因开放阅读框外, 并通过定点突变消除 *TaNHX₂* 基因内部的 KpnI 酶切位点, PCR 产物经 BamH I / Kpn I 双酶切后定向连接到同样用 BamH I / Kpn I 双酶切的 pBIN438 表达载体中, 形成了含有 *TaNHX₂* 全长 cDNA 的重组 pBIN438-*TaNHX₂*。DNA 序列测定, 证实基因序列除定点突变外, 其余序列完全正确, 无突变。
- 2 将植物表达载体 pBIN438-*TaNHX₂*, 转入农杆菌 GV3103 中。
- 3 用花粉管通道法将 pBIN438-*TaNHX₂* 转入野生拟南芥, 获得 T0 代转基因拟南芥。
- 4 对转基因植株进行 PCR、Southern、RT-PCR 分子生物学鉴定, 证实 *TaNHX₂* 基因整合到拟南芥基因组中, 在 DNA、RNA 水平均有表达。
- 5 对转基因拟南芥进行耐逆性实验分析, 证实过表达 *TaNHX₂* 基因能提高拟南芥的耐盐和耐旱能力。
- 6 从拟南芥中克隆了 Na⁺/H⁺ 反向转运蛋白 209bp 的片段, 构建了 Na⁺/H⁺ 反向转运蛋白 RNAi 表达载体。
7. 将表达载体 pATR-4 转入农杆菌 GV3103 中。
- 8 用花粉管通道法将 pATR-4 转入野生拟南芥, 获得转基因拟南芥 T0 代。
- 9 对转基因拟南芥进行耐逆性实验分析, 证实 Na⁺/H⁺ 反向转运蛋白 RNAi 表达载体使拟南芥的耐盐和耐旱能力降低。

参 考 文 献

- [1]Serrano R, Gaxiola R. Critical Reviews in Plant Sciences, 1994, 13 (2):121-138.
- [2]Munns R, Gardner A, Tonnet ML, *et al* . Growth and development in NaCl-treated plants II, Do Na^+ or Cl^- concentrations in dividing or expanding tissues determine growth in barley, Aust J Plant Physiol, 1988,15 :529-540.
- [3]陆静梅, 朱俊义, 李建东, 等.松嫩平原 4 种盐生植物根的结构研究, 生态学, 1998 , 18(3) :335 - 337.
- [4]宁顺斌, 宋运淳, 王玲, 等.胁迫诱导的植物细胞凋亡-植物抗盐的可能生理机制.实验生物学报, 2000, 33 (3):245 -251.
- [5]华栋,耿德贵. 盐度对盐生杜氏藻叶绿体超微结构的影响,徐州师范大学学报, 1999, 17(4):54 - 56.
- [6]Grieve CM, Francois LE, Maas EV. Salinity affects the timing of phasic development in spring wheat, Crop Sci, 1994 ,34 :1544-1549.
- [7]Grieve CM, Lesch SM, Maas EV, *et al* . Leaf and spimordiainitiation in salt-stressed wheat, Crop Sci, 1993, 33:1286 -1292.
- [8]Moran JF, Becana M, Iturkeonnaetxe I , *et al* . Drought in duces oxidative stress in pea plants, Planta ,1994 ,94 :346 - 352.
- [9]吕庆,郑荣梁.干旱及活性氧引起的膜脂过氧化与脱酯化,中国科学(C 辑) , 1996,26(1):26-30.
- [10]许祥明,叶和春,李国凤. 植物抗盐机理的研究进展,应用与环境生物学报,2000, 6(4):379 - 387.
- [11]Shinozaki K, Yamaguchi,Shinozaki K. Gene expression and signal transduction in water-stress response, Plant Physiol, 1997,115 :327-334.
- [12]王玮.植物对水分亏缺的某些生化反应,植物生理学通讯, 1998, 34(5): 388-393.
- [13]Tarczynski MC, Jensen RG, Bohonert HJ. Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol, Science 1993,259:508-510.
- [14]张正斌, 山仑.小麦旗叶水分利用效率比较研究, 科学通报: 1997, 42(17): 1876-1881.
- [15]周桂莲, 杨慧霞.小麦抗旱性鉴定的生理生化指标及其分析评价, 干旱地区农业研究, 1996, 14(2): 65-71.

- [16]Hong Z. Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress, *Plant Physiology*, 2000, 122 :1129-1136.
- [17]Tyagi S and Kramer FR. *Nature Biotechnol*, 1996, 14 :303 -309.
- [18]Nazarenko IA, et al. *Nucleic Acids Res* , 1997 , 25: 2516 -2521.
- [19]Rye HS, et al. *Nucleic Acids Res*,1992 ,20:2803-2812.
- [20]Cimino GD,et al. *Nucleic Acids Res* ,1991 ,19 :99 - 107.
- [21]沈义国.中科院遗传和发育生物学研究所博士论文, 2002.
- [22]Thomashow MF.Plant cold acclimation:freezing tolerance genes and regulatory mechanisms, *Plant Mol, Biol*, 1999, 50:571-599.
- [23]Rhodes D, Hanson AD Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants, *Annu Rev Plant Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1993 44:357-384.
- [24]Liljus G, Holmberg N Enhanced NaCl stress tolerance in transgenic tobacco expressing bacterial choline dehydrogenase, *Bio/technology* 1996.14:177-180.
- [25]Hayashi H, Alia, Mustardy L, Deshnum P, Ida M , Murata N, et al. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase accumulations of glycine betaine and enhanced tolerance to salt and cold stress, *plant J*, 1997, 12:133-142.
- [26]Sakamoto A, Alia, Murata N. Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycine betaine and tolerance to salt and cold, *Plant Mol Biol* 1998,38:1011 -1019.
- [27]郝贵霞. 杨树基因工程进展, *生物工程进展*,2000 ,20 (4) :6~9.
- [28]Bo Shen. Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals, *Plant physiol* , 1997, 115 : 527~532.
- [29]杨琳, 王金发. 海藻糖在生物工程中的应用, *生物学通报*,1999 ,34 (4) :11~13.
- [30]Ericson MC, Alfinito SH, Proteins produced during salt stress in tobacco cell culture, *Plant Physiol*, 1984, 74 :506~509.
- [31]Jose M. Pvlea-18, a member of a new late- embryogenesis -abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well- irrigated bean seedling, *Plant Mol*, 1999, 120:93~103.
- [32]Xu D. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice, *Plant Physiol*, 1996, 110 :249~257

- [33] Schwacke R, Grallath S, Breitzkreuz KE, Stransky E, Stransky H, Frommer WB, Rentsch D. LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine, and γ -amino butyric acid in tomato pollen, *Plant Cell*, 1999, 11: 377-391.
- [34] Stines AP, Naylor DJ, Hoj PB, Heeswijck RV. Proline accumulation in developing grapevine fruit occurs independently of changes in the levels of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase mRNA or protein, *Plant Physiol* 1999. 120: 923-93.
- [35] Verslues PE, Sharp RE. Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials II metabolic source of increased proline deposition in the elongation zone, *Plant Physiol*, 1999, 119:1349-1360.
- [36] Niu X, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM. Ionhomeostasis in NaCl stress environments, *Plant Physiology*, 1995, 109: 735- 742.
- [37] Niu X, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM. Ionhomeostasis in NaCl stress environments, *Plant Physiology*, 1995, 109:735- 742.
- [38] Xiong L. Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis* provides evidence for a critical role of potassium nutrition, *Plant Cell*, 1998, 10:1 181.
- [39] Niu X, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM. Ionhomeostasis in NaCl stress environments, *Plant Physiology*, 1995, 109:735- 742.
- [40] Blumwald E. Sodium transport and salt tolerance in plants, *Current Opinion in Cell Biology*, 2000, 12:431- 434.
- [41] Blumwald, Ekaharon G, Skapskem P. Sodium transport in plant cells, *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1465:140- 151.
- [42] Spaldin GE, Pkirsch HR, Eklewisd. Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel activity, Inhibition by ammonium and stimulation by sodium, *J. Gen. Physiol.*, 1999, 113:909- 918.
- [43] Schachtman DP. Molecular insights into the structure and function of plant K^+ transport mechanisms, *Biochim. Biophys Acta*, 2002, 1465:127- 139.
- [44] Schachtman D, Pkschroeder JI. Structure and transport mechanism of high affinity potassium uptake transporter from higher plants, *Nature*, 1994, 370:655- 658.
- [45] Amtman NA, Sanders D. Mechanisms of Na^+ uptake by plant cells, *Advances in Botanical Research*, 1998, 29:76- 112.
- [46] White PJ. The molecular mechanism of sodium influx to root cells, *Trend Plant Sci*, 1999, 4:245- 246.

- [47]Saman W, Kschroeder JI. Sodium driven potassium uptake by the plant potassium transports HKT1 and mutations conferring salt tolerance, *Science*, 1995, 270:1 660- 1 663.2000, 122:1 249-1 259.
- [48]Bressan RA, Kpardo JM, Khasegawa PM. The *A rabid opsis* HKT1 gene homolog mediates inward Na⁺ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomy cescerevisiae*, *Plant Physiol.* ,
- [49]Horie, Skshinm. A. Two types of HKT transporters with different properties of Na⁺ and K⁺ transport in *Oryza sativa*. *Plant J.* ,2001,270:129- 138.
- [50]Shono M, Kwadam, Kharayket *al.* Molecular cloning of Na⁺ -ATPase cDNA from a marine alga *KH eterosigm a akashiwo* , *Biochim. Biophys. Acta*,2001,1 511:193- 199.
- [51]Quintero F, Rkparda JM. Functional conservation between yeast and plant endosomal Na⁺-H⁺ antiporters, *FEBSLett*,2000,471:224- 228.
- [52]Ckzhu JK. The *A rabid opsis thaliana* salt to lerance gene *SOS 1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *PNAS* ,2000,97:6896- 6901.
- [53]Shihkou, Kzhu JK. The putative plasma membrane Na⁺ /H⁺ antiporter *SOS1* control long distance transport in plant. *Plant Cell*,2002,14:465- 477.
- [54]Apsem, Pkblumwald E. Engineering salt tolerance in plants, *Current Op inion in Biotechnology*, 2002, 13:146- 150.
- [55]Spaldin GE, Pkhirschrek, Sussman M ,Rklewis BD. Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel activity, Inhibition by ammonium and stimulation by sodium . *J. Gen. Phy siol.* ,1999,113:909- 918.
- [56]Pardo, Mjkouin, Tero J. Plants and sodiumions keeping company with the enemy, *Genome Biology*, 2002, 3:1017-1021.
- [57]Nassrkcunn, Krao R. Intracellular sequestration of sodium by a novel Na⁺/H⁺ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H⁺-ATPase Pinsights into mechanisms of sodium tolerance. *Biol. Chem.* ,1997, 272:26 145-26 152.
- [58]Binzel BJ, Zingarelli L, Blumwald E, Smith J.Tonoplast Na⁺/H⁺ Antiport Activity and Its Energization by the Vacuolar H⁺-ATPase in the Halophytic Plant *Mesembryanthemum crystallinum* L .*Plant Physiol* .1995, 109(2):549-556.

- [59]Hajibagheri M.A., Harvey D.M.R., Flowers T.J.Quantitative ion distribution within root cells of salt-sensitive and salt-tolerance maize varieties *New Phytol.*, 105 (1987),367-379.
- [60]Storey R., Pitman M.G., Stelzer R., Carter C., X-ray micrio-analysis of cells and cell compartments of *Atriplex spongiosa* *J.Exp.Bot.* 34(1983)778-794.
- [61]Blumwald E ., Poole R.j.:Na⁺/H⁺ antiport in isolated tonoplast vesicles form storage tissue of *Beta vulgaris*, *Plant Physiol* , 78(1985)163-167.
- [62]Garbarino J., Dupont F.M.,NaCl induces a Na⁺/H⁺ antiport in tonoplasr vesivles from barley root , *Plant Physiol* .86(1998)231-236.
- [63]Guern J., Mathieu Y., Kurkdjian A., Regulation of cacuolar pH in plant cells. *Plant Phusiol.*89(1989)27-36.
- [64]Staal M., Maathius F.J.M., Overbeek T.M., Prins H.B.A., Na⁺/H⁺ antiport activity in tonoplast vesicles form rootsof the salt-tolerant *Plantago maritime* and salt sensitive *plantago media*. *Physiol.Plant.*82(1991)179-184.
- [65]Barkla BJ, Zingarelli L, Blumward E .Smith J.Tonoplast Na⁺/H⁺ Antiport Activity and Its Energization by the Vacuolar H⁺-ATPaes in the Halophytic Plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Physiol.*1995, 109(2):549-556.
- [66]Ballesteros E.,Blumward E.Donaire J.P.,Blumward E.,Photolabeling of tonoplast from sugar beet cell suspensions by [³H]5-(N-methyl-N-Isobotyl)-Amiloride, and inhibitor of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiport.*Plant Physiol.*93(1990)924-930.
- [67]Zhien R.G, Kim E.,Rea P.A. The molecular and biochemical basis of pyrophosphate-energized ion translocation at the vacuolar membrane. *Adv.Bot. Res.*27(1997):297-337.
- [68]Blumward E., Poole R.J.:Salt tolerance in suspension cultured cell of sugar beet.Induction of Na⁺/H⁺ antiport activity at the tonoplast by growth in salt .*Plant Physiol*, 83(1987a)884-887.
- [69]Blumward E.,Vragoe Jr.E.J., Poole R.J. Inhibition Na⁺/H⁺ antiport activity by analogs amiloride. *Plant Physiol.*85(1987a)30-33.
- [70]Ballesteros E., Blumward E. Donaire J.P.,Belver A.:Na⁺/H⁺ antiport activity in tonoplast vesicles isolated form sunflower induced by NaCl stress. *Physiol.Plant* 99(1997)328-334.
- [71]Garbarion J., Dupont f.m, NaCl induces a Na⁺/H⁺ antiport in tonoplast from barley root, *Plant Physiol.* 86(1998)231-236.

- [72]Martinez V, Lauchli A, Effect of Ca^{2+} on the salt-stress response of barley roots as observed by in-vivo ^{31}P -nuclear magnetic resonance and in-vivo analysis. *Planta* 190(1993)519-524.
- [73]Matoh T., Ishikawa T., Takahashi E., Sodium, potassium, chloride, and betaine concentration in isolated vacuoles from salt-grown *Atriplex gmelini* leaves. *Plant Physiol*, 89(1989)180-183.
- [74]Staal M., Maathius F.J.M., Overbeek T.M., Prins H.B.A., Na^+/H^+ antiport activity in tonoplast vesicles from roots of the salt-tolerant *Plantago maritima* and salt sensitive *plantago media*. *Physiol. Plant*. 82(1991)179-184.
- [75]刘友良, 汪良驹.植物对盐胁迫反应和耐盐性,余叔文, 汤章诚主编: 植物生理与分子生物学(第二版), 科学出版社, 1998, P752-769.
- [76]Apse M.P., Aharon G.S., Snedden W.A., Blumward E.: Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in *Arabidopsis*, *Science* 285(1999) 1256-1258.
- [77]Fukuda A., Nakamura A., Molecular cloning and expression of the Na^+/H^+ exchanger gene in *Pryza sativa*, *Biochim. Biophys. Acta* 1446(1999)149-155.
- [78]Yamaguchi T, Fukada-Tanaka S, Inagaki Y, Saito N, Yonekura K, Tanaka Y, Kusumi T, Iida S. Genes encoding the vacuolar Na^+/H^+ exchanger and flower coloration. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42(5):451-161.
- [79]Zhang H.X., Blumward E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit, *Nat. Biotechnol*, 19(2001)765-768.
- [80]Zhang H.X., Hodson J.N., Williams J.P., Blumward E., Engineering salt-tolerant Brassica plants: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar accumulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(2001)12832-12836.
- [81]Niuxkbressan RA, Khasegawa PM, Kpardo JM. Ion homeostasis in NaCl stress environments, *Plant Physiol*, 1995, 109:735-742.
- [82]Czempin, Edeken, Kzimm, Ernamm, Skmuller, Ruber B. Molecular mechanisms and regulation of plant ion channels, *JExpBot.*, 1999, 50:955-966.
- [83]Bushdr. Calcium regulation in plant cell and its role in signaling, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1995, 46:95-122.

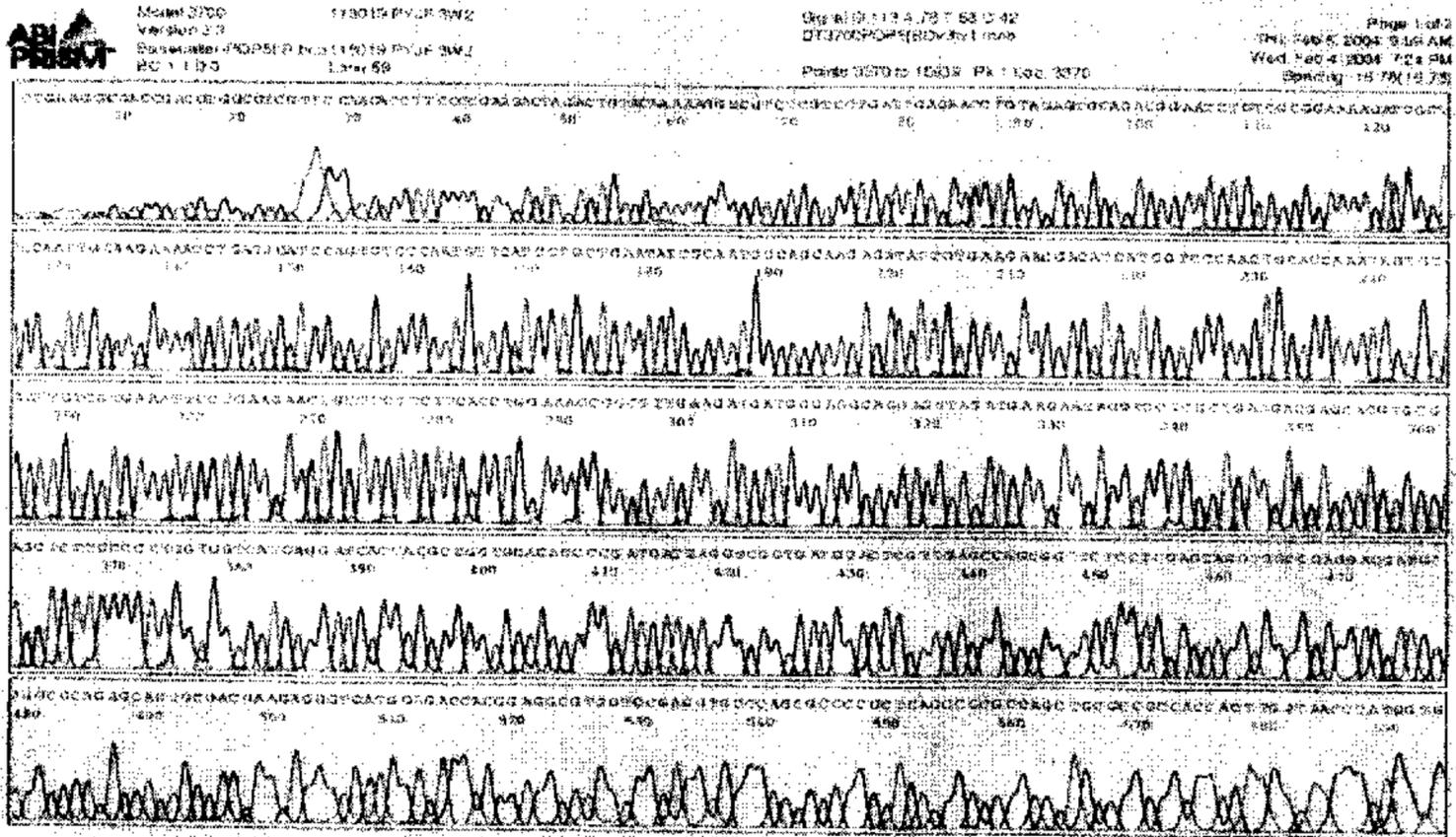
- [84]Szecklian G, Fkhwan G, Ckanrper JF. Diversity and regulation of plant Ca^{2+} pump Pinsights from expression in yeast, *Annu Rev Plant Physiol PlantMol Biol*,2000, 51:433- 462.
- [85]Hirschirk, Dkzhen R, Gkcummin, Ghamk. Pan $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter from *Arabidopsis*, *PNAS* , 1996, 93:8 782- 8 786.
- [86]Mendoza, Kpardo JM. The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bio. Chem.* ,1994,269:9 792- 9 796.
- [87]Pardo JM, Tada A, Kbressan RA, KHA Segawa PM. Stress signaling through Ca^{2+} /calmodulin dependent protein phosphatase calcineurin mediates salt adaptation in plants. *PNAS* ,1998, 95:9 681- 9 686.
- [88]Liujkzhu JK. A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance, *Science*, 1998, 80:1 943- 1 945.
- [89]Morsomm EP, Boutrym. Mutagenic study of the structure, function and biogenesis of the yeast plasma membrane H^+ -ATPase, *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1469: 133-157.
- [90]Ratajczka KR. Structure, function and regulation of the plant vacuolar H^+ -translocating ATPase, *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1465: 17-36.
- [91]Wang BS, *et al.* Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa*, *JExp Bot.*, 2001, 52: 2 355-2 365.
- [92]Liph, *et al.* Effect of K^+ nutrition on growth and activity of leaf tonoplast V- H^+ -ATPase and V- H^+ -PPase of *Suaeda salsa* under NaCl stress, *Acta*, Blumwald E. Sodium transport and salt tolerance in plants, *Current Opinion in Cell Biology*, 2000, 12:431- 434.
- [93]Maeshima M. Tonoplast transporters organization and function, *Plant Physiol. PlantMol Biol*, 2001, 52: 469- 497.
- [94]Gaxiola RA, *et al.* Drought and salt-tolerant plants result from overexpression of the H^+ -pump, *PNAS* , 2001, 98: 11444-11449.
- [95]Johanssono I, Larsson C, Ek B, Kjellbom P. The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to Ca^{2+} and apoplastic water potential, *Plant Cell* 1996. 8:1181-9.

- [96]Johansson I, Karlsson M, Shukla VK, Chrispeels MJ, Larsson C, Kjellbom P. Water transport activity of the plasma membrane PM28A is regulated phosphorylation. *Plant Cell* 1998,10:451-59.
- [97]Xiong L, Karen, S.S, Zhu, J.K. Cell signaling during cold, drought and salt stress. *Plant Cell* 2002, 14:S165-S183.
- [98]Qiu QS, Guo Y., Dietrich M.,Schumaker K.S, Zhu J.K.Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99:8436-8441.
- [99]曹志方, 清华大学博士论文, 2001.
- [100]沈义国, 中科院遗传和发育生物学研究所博士论文, 2002.
- [101]Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K Two transcription factors, DREB1 and DREB2 with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought-and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1998,10:1391-1406
- [102]Skriver K, Olsen FL, Rogers JC. Cis-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88: 7266-7270
- [103]Marcote, WR, Russell SH, Quantrano RS. Abscisic acid-responsive sequences from the Em gene of wheat. *Plant Cell* 1989, 1: 969-976
- [104]Hatori T, Vasil V, Rosenkrans L, Hannah LC, McCarty DR, Vasil IK. The viviparous-1 gene and abscisic acid activate the Cl regulation gene for anthocyanin biosynthesis during seed maturation in maize *Genes Deu* 1992. 6: 609-618
- [105]Shen Q, Ho T-HD. Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element, *Plant Cell*,1995, 7: 295-307.
- [106]Shinozaki YK, Shinozaki KA. novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature or high-salt stress, *Plant Cell*, 1994, 6: 251-26.
- [107]Marx J. Interfering with gene expression, *science*, 2000, 288:1370-1371.
- [108]Fire Axus, Montgomery M K, et al.potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *caenorhabditis elegans*, *Nature*, 1998, 391:806-811.
- [109]Napolie Lemieux c, Jorgensen R A .Introduction of a chimeric chalcone synthase

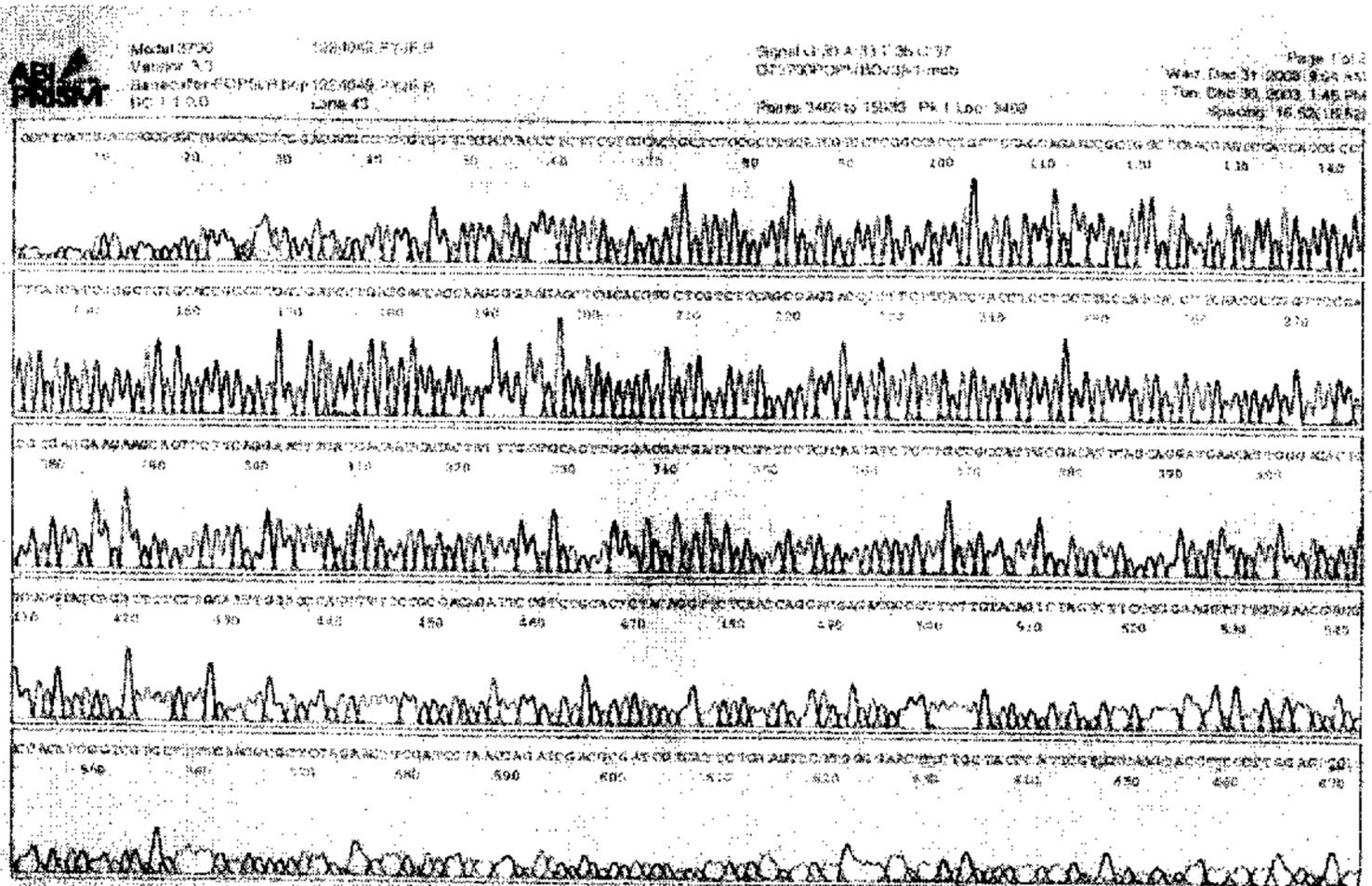
- gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans, *The plant cell*, 1990, 2:279-289.
- [110]Romano N, Macion G.Quelling:transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences, *Mol Microbiol*, 1992, 6:3343-3353.
- [111]Gonic C. Homology-dependent gene silencing mechanism in fungi, *Annu Rev Microbiol*, 2001, 55:381-406.
- [112]Guo S, Kempfuesk.par-1, a gene required for establishing polarity in *C.elegans* embryos, encodes a putative ser/thr kinase that is asymmetrically distributed, *cell*, 1995, 81:611-620.
- [113]汤富酬, 薛友纺.RNA 干涉与基因沉默, *遗传*, 2001, 23, (2): 167—172.
- [114]孙建国, 廖荣霞, 陈正堂.RNA 干涉分子机制研究进展, *生物化学与生物物理进展*, 2002,29(5): 678—681.
- [115]于乐成, 王升启, RNA.干扰作用(RNAi)研究进展, *中国生物化学与分子生物学报*, 2002,18(5): 525—528。
- [116]付金文, 巢时雄, 彭剑雄.RNA 干扰, *细胞生物学杂志*, 2002, 24(5): 279—283。
- [117]Cogonic, macino G.Post-transcriptional gene silencing across kingdoms, *Genes Dev*, 2000, 10:638-643
- [118]Tabara H. The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C.elegans* cell, 1999, 99:123.
- [119]Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel w, et al.Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells,*Nature*, 2001, 411 (6836):494-498.
- [120]Bass BL. RNA interference, The short answer, *Nature*, 2001, 411, (6836): 428-429.
- [121]Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, et al. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci*, 2001, 114 (24):4557~4565。
- [122]Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAi mediate RNA interference in cultured mammalian cell, *Nature*, 2001,411(6836): 494~498.
- [123]Bass BL. RNA interference: The short answer, *Nature*, 2001,411(6836):428 ~429.

- [124]Hammond S M, Bernstern E, Besch D, et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cell, *Nature*, 2000,404:293-296.
- [125]Zilberman D, Cao X, Jacobsen SE. *Science*, 2003, 299(5607):716-719 .
- [126]Mochiizuki K, Fine NA , Fujisawa T, et al . 2002, 110(6):689-699.
- [127]Harborth J, Elbashir S M, Bechert K, et al . Identification of essential genes in cultured mammalian cells usong small interfering RNAs. *J Cell Sci* , 2001 , 114(24):4557-4565 .
- [128]Elbashir S M, Harborth J , Lendeckel W, et al . Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells . *Nature* , 2001, 411 (6836):494-498 .
- [129]Bass B L . RNA interference . The short answer . *Nature* , 2001 , 411 (6836):428-429.
- [130]Hammond S M , Bernstern E , Beach D , Hannon G J . An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 2000, 404 : 293-296 .
- [131]Tabara H , sarkissian M , Kekky W G , Fleenor J , Grishok A , Timmons L , Fire A , Mello C C . The *rde-1* gene , RNA interference , and transposon silencing in *C . elegans* , *Cell* , 1999 , 99(2) :123-132 .
- [132]Dernbrug A F , Zalevsky J , Colaiacovo M P , Villeneuve A M . Transgene-mediated cosuoopression in the *C . elegans* gern line . *Genes Dev* ,2000 , 14(13) : 1578-1583 .

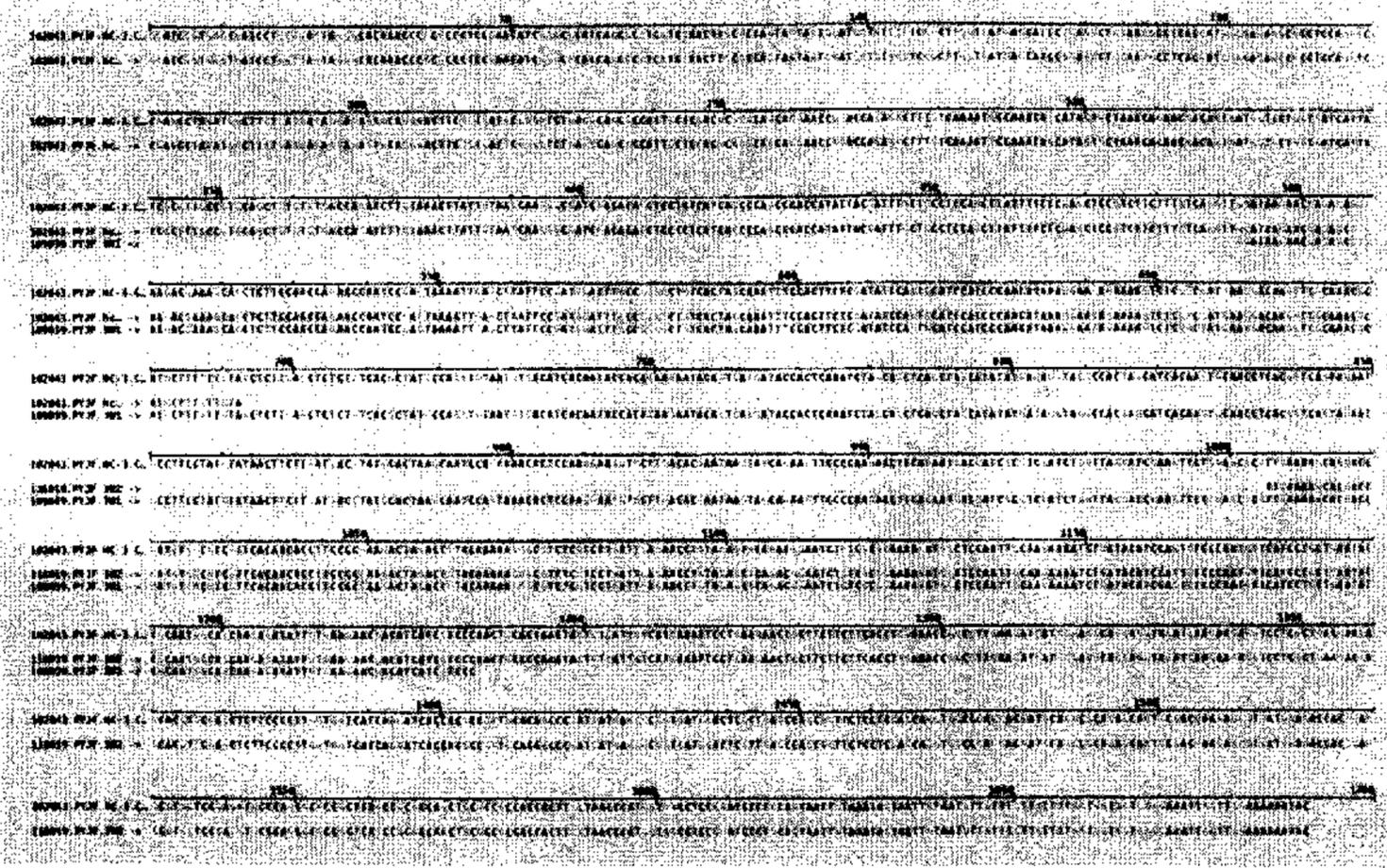
附图 1



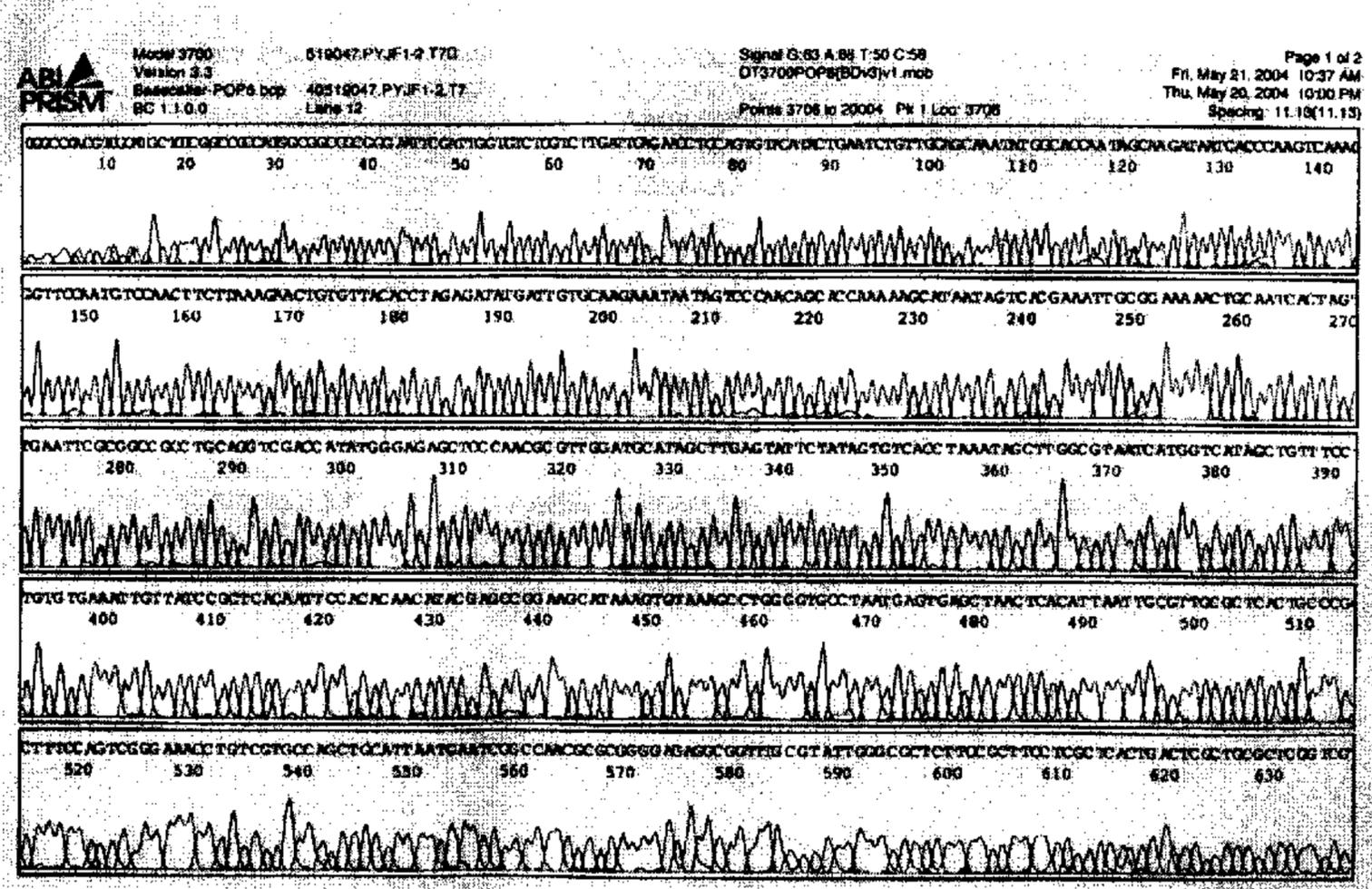
附图 2



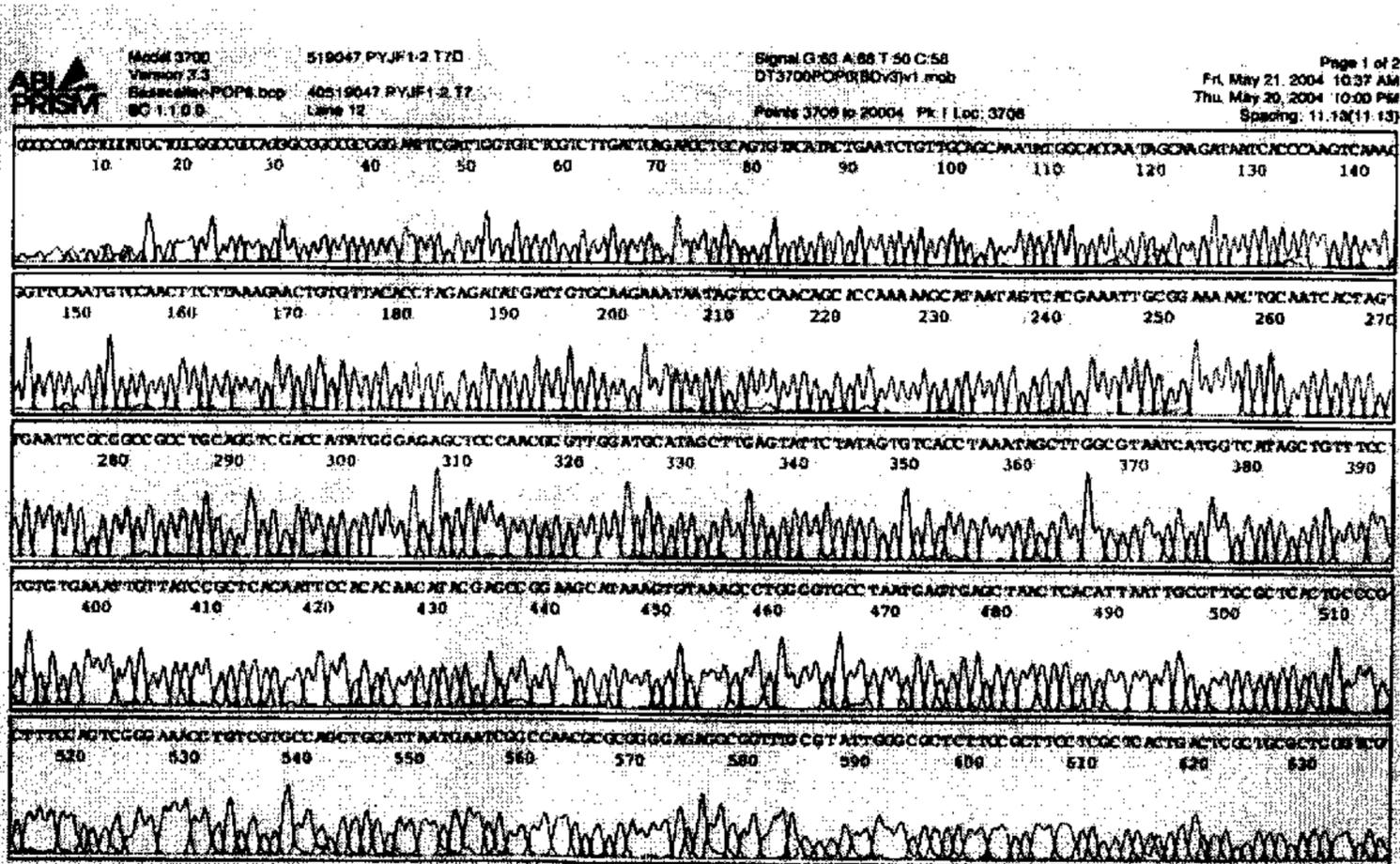
附图 5(TaNHX₂ 基因 4 次测序拼接结果)



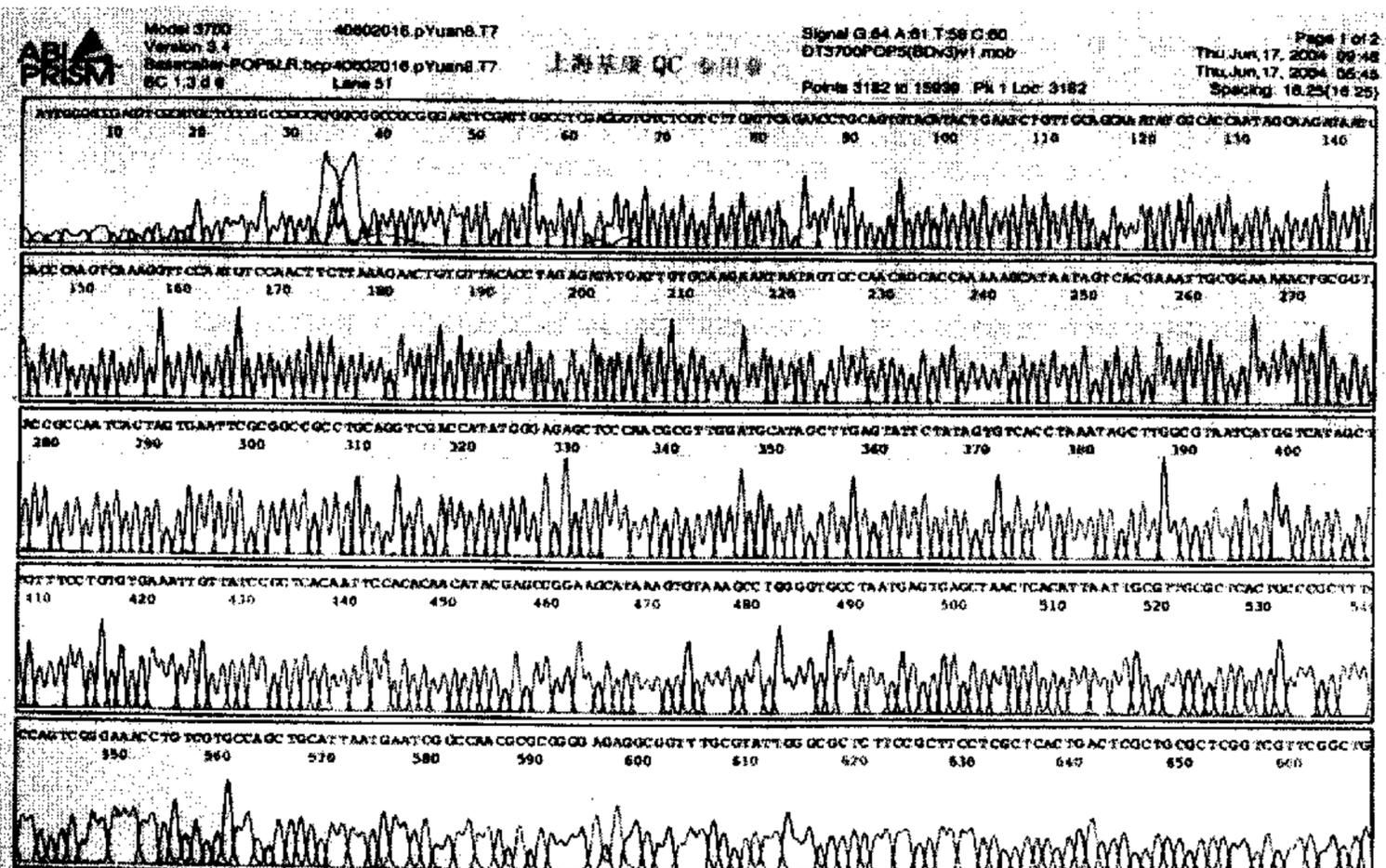
附图 6



附图 7



附图 8



致 谢

在师大读书已经七年了，我非常喜欢这开满玉兰花的美丽校园，我感激谆谆教诲的老师，感激每天和我一起欢笑的同学，心中有太多太多的回忆与感动。值此顺利完成毕业论文之际，向给予我指导、支持、关心和帮助的师长、同学、朋友和亲人致以衷心的感谢！

感谢敬爱导师杨建雄教授，导师严谨的学风、渊博的学识、诲人不倦的育人态度和孜孜不倦的敬业精神，均给我留下了深刻印象，在言传身教中影响着我，时刻在激励我知难奋进，使我在理论水平和科研能力等方面均获益菲浅，得到了很好的提高与锻炼。他那崇高的敬业精神和诚恳亲切的为人处世的态度为我在学习和生活上树立了光辉榜样。

在论文选题及实验过程中，俞嘉宁副教授热心帮助、大力支持，在此，谨向俞嘉宁副教授表示深深的感谢！我还要特别感谢生科院王喆之教授在论文完成的过程中给予的精心指导和大力支持。

感谢美国加利福尼亚州的董牛博士在实验上提供的广阔思路和宝贵经验，问题总能倾心解答，不吝指教。他精益求精的实验态度和娴熟的实验技能给我论文以很大的启发和帮助。实验过程中还得到了生科院杨章民副教授、叶海燕老师、李焘老师给与的真诚帮助，在此深表感谢。

我要特别感谢我的好舍友王丽娟硕士给予我实验的支持和生活上的帮助。我还得到了师妹包宇、师弟段飞、师妹黄亚亚、师妹柴渭莉、师弟张成的支持和帮助。感谢同级的赵永梅、陈如冰、王倩、闫亚平的真诚帮助。感谢生命科学学院02级本科生巨文峰、严复生、胡印州等同学的真诚帮助，在此表示衷心的感谢！

我要将满腔的感激之情和最诚挚祝福献给我的家人，感谢他们在我求学路上给予我无微不至的关怀和爱护，衷心祝愿他们平安、快乐、幸福。

最后，向所有关心和帮助我的师长、同学、朋友和亲人致以最崇高的敬意！谢谢你们！

原江锋 于陕师大
二零零五年四月

攻读学位期间研究成果

- ◆杨建雄, 原江锋, 李发荣. 柿叶黄酮的体外抗氧化作用研究. 营养学报.2003,2.
- ◆原江锋, 杨建雄. 蛇毒及其基因克隆研究进展. 陕西师范大学(自然科学版). 2004, 5.
- ◆原江锋, 俞嘉宁, 杨建雄. RNAi研究进展. 陕西师范大学(自然科学版).2004,5.
- ◆参编《生物化学解题指导》一书, 2005年8月将出版.