

技术与方法

跨膜逆向转运蛋白NHXFS1多克隆抗体的制备及应用

张辉 郭力榕 黄继斌 徐源 夏涛*

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要 *NHXFS1*基因是通过DNA家族改组(DNA family shuffling)技术,以拟南芥、水稻和菊花的液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因(*NHX1*)为亲本获得的活性显著增强的新基因。为制备该蛋白的多克隆抗体,对该蛋白进行跨膜结构分析,选取跨膜蛋白的C末端为靶标,并将其克隆到原核表达载体pET32a中,成功构建了原核融合蛋白pET32a-NHXFS1-抗原表达载体,转化大肠杆菌BL21(DE3)并诱导表达。通过镍柱亲和层析纯化该融合表达蛋白,获得了纯度约为80%的纯化蛋白,用于免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体。ELISA实验表明,该抗体的效价达到1:128 000,提取表达NHXFS1蛋白的酵母液泡经该多克隆抗体Western blot检测,证明该抗体具有较好的NHXFS1蛋白特异性。NHXFS1多克隆抗体的制备为进一步认识NHXFS1新蛋白结构与功能以及植物耐盐分子生物学的研究奠定了基础。

关键词 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白; 原核表达; 酵母液泡提取

土壤盐渍化导致的离子毒害和渗透失衡^[1]是影响植物生长和农作物产量的一个重要非生物胁迫因素。为了适应盐胁迫,植物体形成了一系列的适应机制。研究发现,位于液泡中的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白NHX1可以将植物体内过多的 Na^+ 区隔化到液泡中,对植物的离子转运起着极其重要的作用,这种转运功能一方面可以为植物细胞质中的各种酶提供低盐环境,另一方面,大量的 Na^+ 区隔化到液泡后,将建立新的渗透平衡,提高植物细胞的渗透势,利于植物体从外界吸收更多的水分,为植物体适应高盐环境奠定了基础^[2],因此该蛋白被认为最有希望应用于植物耐盐基因工程和耐盐新品种的选育。自1999年拟南芥 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因*AtNHX1*被克隆以来^[3],水稻*OsNHX1*^[4]、盐芥*ThNHX1*^[5]等高等植物的逆向转运蛋白基因也相继被克隆。近年来的研究发现,尽管将 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白转化到目标植物中进行表达是培育耐盐植物的有效方式^[6-8],但如何进一步提高该蛋白的 Na^+ 转运能力仍有待于进一步的深入研究,能否通过分子生物学技术获得具有强 Na^+ 转运能力的新基因是耐盐植物分子育种的关键。

DNA改组(DNA shuffling)技术是一项快速、高效的体外定向进化的分子生物学技术^[9]。该技术是目

前蛋白质研究、酶和多克隆抗体等体外定向进化的分子生物学方法,在改善蛋白质性能方面具有广阔的应用前景。Xu等^[10]采用DNA shuffling技术对拟南芥的*AtNHX1*进行改组,获得了功能增强的新基因,证明了该技术对植物 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白进行定向分子进化的可行性。为了进一步改造 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白离子的转运能力,我们在以前的研究中运用DNA家族改组(DNA family shuffling)技术对拟南芥的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因*AtNHX1*、水稻 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因*OsNHX1*及菊花 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因*DmNHX1*进行体外分子进化,获得一系列的重组文库,结合酵母高通量筛选平台,成功获得了一个功能显著提高的新基因,命名为NHXFS1^[11-12]。在本研究中,为了对我们所获得的新基因和蛋白功能进行进一步的研究,我们以NHXFS1氨基酸序列为模板,选取跨膜外区域为抗原蛋白的靶标进行引物设计,构建原核表达载体,免疫新西兰大白兔制备该蛋白的多克隆抗体。实验证明,我们成功地构建了NHXFS1蛋白的原核表达载体,同时获得了效价和

收稿日期: 2012-02-02 接受日期: 2012-03-05

上海市教委科技创新基金(No.52YC1064)资助项目

*通讯作者。Tel: 021-62235711, E-mail: txia@bio.ecnu.edu.cn

特异性良好的多克隆抗体。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌BL21(DE3)为本实验室保存,原核表达载体pET32a为本校钱旻教授实验室馈赠。

1.2 酶与试剂

Pfu DNA聚合酶、限制性内切酶、DNA marker、蛋白marker购于天根生化科技有限公司,异丙基硫代- β -D半乳糖苷(IPTG)、Tris(三羟甲基氨基甲烷)、考马斯亮蓝、PVDF膜购于BIO BASIC INC(BBI);TEMED、甲叉丙烯酰胺、Tween-20购于Amresco公司, Ni-NTA Superflow Cartridges、弗氏不完全佐剂、弗氏完全佐剂购于QIAGEN, AP羊抗兔二抗购于Bio-Rad, Ficoll购于GE公司。

1.3 实验动物

新西兰大白兔, 雄性, 体征状态良好, 体重2.0~2.5 kg, 购于中科院上海实验动物中心。

1.4 实验方法

1.4.1 重组基因表达蛋白NHXFS1的空间结构分析及引物设计 由于液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白为跨膜蛋白, 为了提高多克隆抗体的特异性, 我们首先利用SOSUI和PSIPRED软件^[10]对该NHXFS1蛋白进行了二维结构分析。以位于膜外蛋白区域的1 315-1 533 bp, 即氨基酸的第438~510位为抗原模板设计靶点, 该片段命名为NHXFS1-抗原。扩增引物序列为: 上游引物: 5'-CCG GAA TTC CCA TTG ATC AGG CTG CTG-3'(下划线部分为EcoR I酶切位点), 下游引物: 5'-CCC AAG CTT TCG CAT CAG CGC GTC GTC-3'(下划线部分为Hind III酶切位点)。引物由上海生工生物工程有限公司合成, 用于构建原核表达载体pET32a-NHXFS1-抗原。

1.4.2 目的蛋白的诱导表达 将构建好的pE-T32a-NHXFS1-抗原载体转化BL21, 选取阳性克隆子, 提取质粒, PCR, 酶切, 测序鉴定后进行蛋白的诱导表达。同时通过设定不同菌液诱导时期, 使 D_{600} 分别为0.4, 0.6, 0.8, 1.0时加入1 mol/L IPTG分别诱导2, 3, 4 h进行蛋白表达的优化, 培养温度分别为28 °C, 37 °C。

1.4.3 抗原表达蛋白的总蛋白及可溶性分析 无菌条件下取1 mL未诱导及诱导后的菌液, 重悬于上样缓冲液, 100 °C 3 min, 使蛋白变性后进行SDS-

PAGE(12%分离胶, 5%浓缩胶)电泳分析。同时收集诱导后的菌体, PBS洗涤重悬后, 在冰上超声波至菌液由浑浊变澄清(超声3 s, 停歇3 s), 12 000 r/min离心10 min, 分别取少量的上清和沉淀, 100 °C 3 min蛋白变性后进行SDS-PAGE检验。

1.4.4 目的蛋白的纯化 收集300 mL菌液, PBS洗涤, 重悬于30 mL PBS中, 加入300 μ L PMSF, 1% Triton X-100, 超声波进行破碎, 12 000 r/min离心10 min收集包涵体。分别用2 mol/L和4 mol/L的尿素洗涤, 最后沉淀用8 mol/L尿素溶液冰上溶解15 min至裂解液呈透明。按照QIAGEN公司Ni-NTA Superflow Cartridges镍柱使用说明书进行蛋白纯化 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白抗原蛋白。

1.4.5 动物免疫及抗血清的制备 将纯化后的蛋白SDS-PAGE进行纯度检验, 为防止纯化产物中微量的杂蛋白免疫家兔后造成多克隆抗体的特异性减弱, 我们利用预冷的0.25 mol/L KCl对SDS-PAGE蛋白胶进行染色, 切取目的条带液氮研磨, PBS调节终浓度至1 mg/mL。取1 mL与等体积的弗氏佐剂完全混匀后, 背部多点注射免疫新西兰大白兔, 共免疫4只。10天后蛋白含量减半与弗氏不完全佐剂混合后进行加强免疫2次。间隔一周, 末次免疫10天后耳缘静脉取血测定效价, 效价确定后进行颈动脉取血。将取得的血液37 °C倾斜放置1 h, 4 °C过夜, 3 000 r/min离心20 min, 上清即为抗血清。分装, -80 °C保存。

1.4.6 多克隆抗体的效价及特异性测定 以纯化后蛋白为抗原, PBS调浓度至30 μ g/mL, 取100 μ L加入酶标板中, 其中以PBS溶液代替抗原为空白对照, 免疫前的抗血清为阴性对照, 制备的多克隆抗体为阳性对照, 以制备的多克隆抗体为一抗, 一抗稀释浓度分别为1:2 000, 1:4 000, 1:8 000, 1:32 000, 1:64 000, 1:128 000; 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗, 进行间接ELISA测定多克隆抗体的效价, 以阳性血清(P)/阴性血清(N) ≥ 2.1 的血清最高稀释度为阳性。OPD显色后于492 nm下酶标仪读取数值。

为了进一步验证所制备的多克隆抗体的特异性, 我们选取含有NHXFS1抗原蛋白的包涵体蛋白进行Western blot检测。

1.4.7 NHXFS1抗血清用于检验NHXFS1蛋白在酵母中的表达 (1)酵母液泡的提取: 为了进一步检测该改组蛋白的耐盐功能, 我们构建了NHXFS1的表达载体, 通过醋酸锂方法转化液泡膜 Na^+/H^+ 逆

向转运蛋白缺失的酵母突变株。同时为了验证该蛋白在酵母中的表达,提取在酵母液泡中表达的NHXFS1蛋白进行检验^[11]。酵母于YPD中摇至 D_{600} 至0.8~1.2, 5 000 r/min离心3 min, 双蒸水洗涤2次, 1 mol/L山梨醇溶液重悬细胞, 加入0.2%蜗牛酶和10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的Zymolase, 30 $^{\circ}\text{C}$ 消化60~90 min。3 000 r/min离心5 min收集细胞, 1 mol/L山梨醇清洗2次; 12% Ficoll溶液重悬, 杜恩斯匀浆器匀浆, 匀浆过程中加入10 mmol/L PMSF和1 mmol/L的亮肽酶抑制剂。取6 mL匀浆液加入Backman试管中, 上层铺8%的Ficoll溶液, 17 400 r/min离心1 h, 上层白色物质即为含有NHXFS1蛋白的液泡粗提物; (2)目标蛋白的Western blot分析: Bradford方法测定液泡粗提物蛋白含量, 以500 μg 未表达NHXFS1的酵母突变株全蛋白, 液泡粗提物和梯度离心后的沉淀部分进行SDS-PAGE电泳, 电转移至预先用甲醇浸泡的PVDF膜, 脱脂奶粉封膜后, 加入多克隆抗体抗血清(1:2 000)孵育4 h, TBST(pH7.6)洗涤3次后, 加入碱性磷酸酶(AP)标记

的羊抗兔二抗(1:3 000)孵育2 h, 充分洗膜后, NBT/BCIP显色反应。

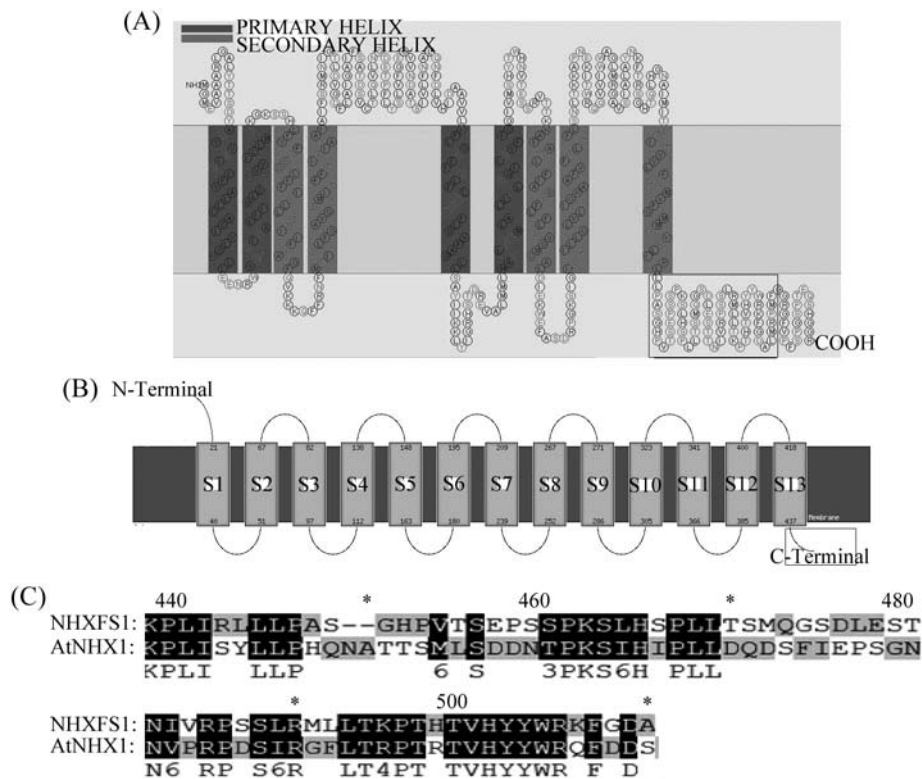
2 结果

2.1 改组逆向转运蛋白NHXFS1的跨膜结构分析

通过SOSUI和PSIPRED两种软件对改组后的蛋白进行二级结构分析(图1), 该蛋白含有多个跨膜结构, 为了提高抗原蛋白的免疫原性与特异性, 我们回避位于膜内的氨基酸序列, 选取位于液泡膜外的C末端为靶标, 进行抗原蛋白的表达。其中, 黑框部分为第438-510位氨基酸。

2.2 重组表达载体的鉴定

以pET32a-NHXFS1-抗原质粒为模板进行PCR鉴定以及EcoR I和Hind III双酶切鉴定。PCR扩增出预计大小的片段218 bp(图2, 泳道2), 双酶切结果显示酶切片段大小与预期相符, 载体大片段约5 700 bp, 小片段约200 bp(图2, 泳道3)。同时测序结果显示, 插入的载体序列与所选取的NHXFS1片段序列一致。



A: SOSUI软件输出结果, 黑框为抗原部分; B: PSIPRED软件输出结果, 黑框为抗原部分; C: 黑框中抗原蛋白序列与拟南芥 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白对应氨基酸序列比对。

A: the output result of SOSUI software, the black frame is the antigen region; B: the model output of PSIPRED software, the black frame is the antigen region; C: amino acid sequence alignment between the antigen region and AtNHX1 from *Arabidopsis*.

图1 NHXFS1二级结构分析及抗原片段选取

Fig.1 The secondary structure of NHXFS1 and the antigen region

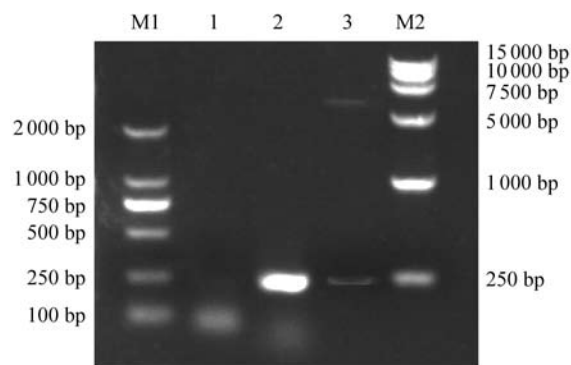
上述结果表明, 成功插入NHXFS1片段于原核表达载体pET32a中构建了重组表达载体。

2.3 表达蛋白的总蛋白及可溶性分析

将构建好的pET32a-NHXFS1-抗原表达载体转化BL21, 得到含目的蛋白的基因工程菌株, 该菌株经过不同条件的优化后, SDS-PAGE显示, 在28 °C培养条件下, BL21-pET32a-NHXFS1-抗原菌株在菌液 D_{600} 为0.8、诱导时间为4 h时, 目的蛋白表达量达到最大。与诱导前相比, 在25 kDa蛋白marker微上方有一明显增粗的蛋白条带。经预测所选取NHXFS1蛋白抗原片段约为7.1 kDa, 同时由于表达载体pET32a带有20 kDa大小的硫氧还蛋白, 所以预计新表达的目的蛋白大小约为27 kDa。图2显示, 新诱导的蛋白与预计大小一致, 表明融合蛋白成功表达。

将诱导后的菌株进行超声波破碎, 离心后分别收集上清与沉淀, 12% SDS-PAGE显示, 上清中在27 kDa处仅有较细的蛋白条带, 而在包涵体泳道中, 相应目的蛋白位置则有很粗的蛋白条带, 结果表明NHXFS1抗原蛋白在包涵体中表达。

超声波破碎诱导后的菌液, 收集并溶解包涵体, 经QIAGEN公司的Ni-NTA柱纯化包涵体, 蛋白胶显示纯化后的NHXFS1抗原蛋白纯度提升, 且与诱导蛋白大小一致, 表明成功纯化了该融合蛋白。



M1: DL 2 000 DNA marker; 1: 阴性对照; 2: NHXFS1抗原PCR产物; 3: *EcoRI*+*HindIII*双酶切结果; M2: DL 15 000 DNA marker。

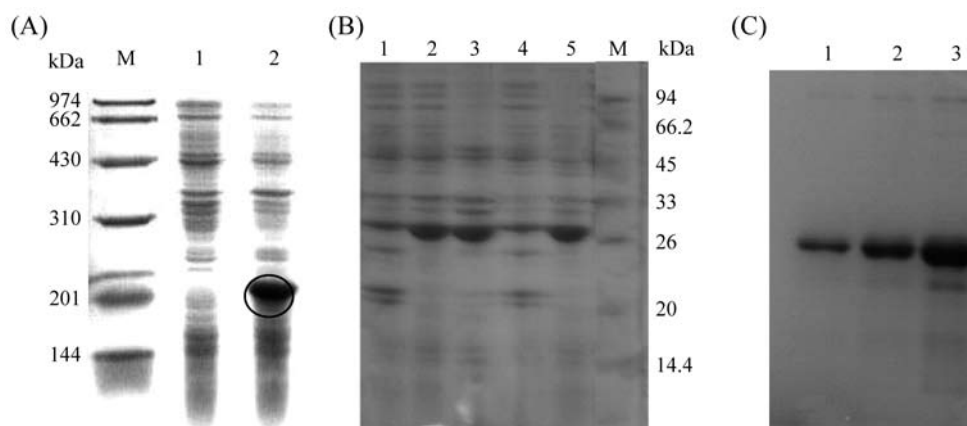
M1: DL 2 000 DNA marker; 1: negative control; 2: PCR product of NHXFS1 antigen; 3: restriction product of *EcoRI*+*HindIII*; M2: DL 15 000 DNA marker.

图2 重组表达载体的PCR及双酶切鉴定

Fig.2 PCR and restriction digestion of recombinant plasmid

2.4 NHXFS1抗原蛋白多克隆抗体的效价检测与应用

间接ELISA反应结果表明, 提取免疫后新西兰大白兔获得的抗血清效价达到1:128 000, 证明制备的多克隆抗体具有很高的灵敏度。以原核表达纯化的NHXFS1-抗原蛋白为抗原, Western blot表明在27 kDa处有明显的杂交带, 证明制备的多克隆抗体



A: 空白对照; M: 蛋白marker; 1: 未诱导的BL21-pET32a空载体; 2: IPTG诱导后的BL21-pET32a空载体, 其中, 圈中部分为载体的硫氧还蛋白标签; B: pET32a-NHXFS1抗原蛋白表达情况; 1: 未诱导的BL21-pET32a-NHXFS1抗原总蛋白; 2: 诱导的BL21-pET32a-NHXFS1抗原总蛋白; 3: 超声波后的总蛋白; 4: 超声波后上清; 5: 超声波后包涵体; M: 蛋白Marker; C: 镍柱纯化后的产物; 1-3上样量分别为5, 10, 15 μ L。

A: control; M: protein marker; 1: total protein of non-induced BL21-pET32a; 2: total protein of induced BL21-pET32a, the circle area was thioredoxin protein; B: the expression of pET32a-NHXFS1 antigen; 1: total protein of non-induced BL21 with pET32a-NHXFS1 antigen; 2: total protein of induced BL21 with pET32a-NHXFS1 antigen; 3: total product after ultrasonication; 4: supernatant after ultrasonication; 5: deposit product after ultrasonication; C: purified NHXFS1 antigen protein with Ni-NTA superflow cartridge; the loading quantities of 1-3 are 5, 10, 15 μ L, respectively.

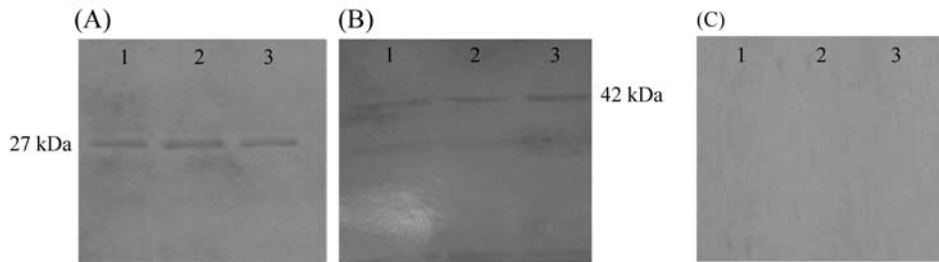
图3 融合蛋白pET32a-NHXFS1-抗原的可溶性分析及纯化

Fig.3 The expression analysis of pET32a-NHXFS1 antigen and purification

有很好的特异性。

由于在抗原的制备过程中我们仅选取了位于C末端的氨基酸(大约7.1 kDa)进行了原核表达,所以整个融合蛋白的大小约为27 kDa(硫氧还蛋白20 kDa,图3A,泳道2)。为了进一步检验该改组蛋白在酵母

中的表达,我们以表达改组后整个 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白NHXFS1酵母液泡膜提取物为新的抗原,制备的兔抗血清为一抗,碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗兔抗体为二抗(1:3 000),进行表达量的分析,结果表明制备的NHXFS1膜外蛋白片段抗体可以与NHXFS1



A: 包涵体NHXFS1-抗原蛋白抗血清检测; 1-3: 包涵体蛋白的Western blot检测; B: 表达NHXFS1基因的酵母消化破碎,密度梯度离心后的悬浮部分(液泡粗提物)抗血清检测; 1-3: 酵母液泡Western blot检测; C: 1: 空白对照; 2: Na^+/H^+ 逆向转运蛋白缺失的酵母突变株全蛋白; 3: 表达NHXFS1基因的酵母消化破碎,密度梯度离心后的沉淀部分进行Western blot检测。

A: NHXFS1-antigen protein from deposit product of BL21 strain after ultrasonication; 1-3: Western blot analysis of deposit protein of NHXFS1-antigen; B: antiserum analysis of vacuolar protein from yeast with plasmid containing Na^+/H^+ antiporter gene NHXFS1; 1-3: Western blot analysis of yeast vacuolar expressing NHXFS1-antigen; C: 1: blank control; 2: whole protein of yeast mutant without NHX1; 3: Western blot analysis of sediment after yeast digestion and centrifugation expressing NHXFS1.

图4 原核表达的包涵体NHXFS1-抗原蛋白和酵母液泡蛋白的Western blot检测

Fig.4 Western blot analysis of deposit product of BL21-NHXFS antigen and yeast vacuolar expressing NHXFS1 protein

进行特异性结合,在45 kDa处出现杂交带,与其他蛋白没有杂交条带,证明了该基因可以在酵母中顺利表达,且该基因定位于液泡膜上,同时证明了制备的多克隆抗体具有较高的灵敏性与特异性。

3 讨论

在以前的研究中,我们通过DNA家族改组(DNA family shuffling)技术成功地获得了 Na^+ 转运能力显著增强的新基因NHXFS1,为进一步认识植物耐盐性的分子机制和耐盐植物基因工程提供了新的思路 and 手段。在本研究中,我们在获得NHXFS1蛋白全长的基础上,选取C末端构建原核表达载体,诱导表达出27 kDa的抗原蛋白,经过诱导条件优化,该原核表达菌株在 D_{600} 为0.8, 28 °C培养4 h时表达含量达到最大,可溶性分析证明表达蛋白位于包涵体中,通过免疫新西兰大白兔获得的多克隆抗体为进一步研究新基因和新蛋白的结构与功能关系、蛋白特性、研究该功能增强的基因在酵母以及植物中的功能及表达量分析等提供了必要条件。同时,本文采用的体外改组方法获得新基因,从另一个层面上也为其他基因和蛋白的体外进化提供了新的思路。

由于该基因为液泡膜跨膜蛋白(图1),我们通过对二级结构的分析,由于不同的软件会有不同的算法及分析结果,在这项工作中,我们采用两种不同的方法进行比对和运算,选取该基因胞外域编码序列,特异性较强且亲水的氨基酸片段为靶标,同时由于该多克隆抗体会应用于转NHXFS1拟南芥的后续工作,为了减少交叉反应,以选取作为抗原的片段和拟南芥的AtNHX1蛋白进行序列比对(图1C),最终选取同源性低的NHXFS1氨基酸第438-510位设计引物对目的片段进行扩增,构建融合蛋白载体,进行原核表达。本项研究作为其他跨膜蛋白抗体制备提供了借鉴。

在本研究中我们发现,原核表达的融合蛋白主要以包涵体的形式存在。虽然表达在包涵体中的蛋白复性有着很大的困难,但由于本研究的目的是为了制备特异性较高的多克隆抗体,而包涵体中含有纯度较高(约90%)的目的表达蛋白,并且目的蛋白位于包涵体中还可以使得目的蛋白免受蛋白酶的水解。因此,选择包涵体有利于制备高特异性的多克隆抗体。

后续进行新西兰大白兔的免疫以制备兔抗

NHXFS1蛋白的多克隆抗体, 以包涵体中的蛋白为抗原进行特异性检测, Western blot结果证明该多克隆抗体可以很好地识别在BL21中表达的NHXFS1蛋白, 说明所选取的NHXFS1抗原片段具有良好的特异性。

为了进一步利用该多克隆抗体检验NHXFS1基因在酵母突变株中的表达及功能, 我们提取转入NHXFS1基因的酵母细胞液泡膜蛋白, 进行新的Western blot检测, 实验结果表明, 制备的多克隆抗体可以很好地鉴别在酵母中表达的目的蛋白, 为进一步研究改组蛋白NHXFS1的蛋白质及功能特性奠定了免疫学基础。由于酵母有较厚的细胞壁, 因此其亚细胞结构的提取存在很大的困难。为了更好地提取液泡结构, 在此过程中通过对消化酶的摸索, 得出在蜗牛酶和Zymolase消化酶共同作用下, 30 °C震荡消化60 min以上, 细胞壁消化效果较好, 为酵母亚细胞结构的提取提供了新的实践经验, 同时也为蛋白的亚细胞定位提供了借鉴方法。另一方面, 通过不同细胞器的沉降系数对其进行密度梯度分离的方法同样可以在分子与细胞生物的其他领域得到广泛的应用。

研究表明, 当植物体处于高盐环境下时, 位于液泡膜上的Na⁺/H⁺逆向转运蛋白NHX1可以将植物体内过多的Na⁺区隔化到液泡中来提高植物的耐盐性, 在植物耐盐分子育种中具有重要的价值^[1]。本研究中通过DNA体外家族改组技术获得新Na⁺/H⁺逆向转运蛋白, 该蛋白在酵母功能互补实验中的功能表现需要我们对该重组蛋白的结构与功能进行进一步的研究, 关于该基因多克隆抗体的成功制备为后续的工作提供了免疫学基础。但是, 如何利用分子生物学手段进一步提高这类蛋白的Na⁺转运能力仍有待于进一步的深入研究。

参考文献 (References)

- 1 Blumwald E, Aharon GS, Apse MP. Sodium transport in plant cells. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1465(1/2): 140-51.
- 2 Amtmann A, Sanders D. Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. In: Callow JA (ed) *Adva Bota Res* 1999; (29): 75-112.
- 3 Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, Grisafi P, Alper SL, Fink GR. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(4): 1480-5.
- 4 Fukuda A, Nakamura A, Tanaka Y. Molecular cloning and expression of the Na⁺/H⁺ exchanger gene in *Oryza sativa*. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1446(1/2): 149-55.
- 5 Wu C, Gao X, Kong X, Zhao Y, Zhang H. Molecular cloning and functional analysis of a Na⁺/H⁺ antiporter gene ThNHX1 from a halophytic plant *Thellungiella halophila*. *Plant Mol Biol Rep* 2009; 27(1): 1-12.
- 6 Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* 1999; 285(4531): 1256-8.
- 7 Zhang HX, Blumwald E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat Biotechnol* 2001; 19(8): 765-8.
- 8 Zhang HX, Hodson JN, Williams JP, Blumwald E. Engineering salt-tolerant Brassica plants: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(22): 12832-6.
- 9 Stemmer WP. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* 1994; 370(6488): 389-91.
- 10 Xu K, Zhang H, Blumwald E, Xia T. A novel plant vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene evolved by DNA shuffling confers improved salt tolerance in yeast. *J Biol Chem* 2010; 285(30): 22997-3004.
- 11 Tao X, Hui Z, Kai X. A novel salt tolerance gene NHXFS1 with its encoding protein and application: China, No.PCT/CN2009/001278. 2009.
- 12 夏 涛, 张 辉, 徐 凯. 一种新的植物强耐盐基因NHXFS1及其编码蛋白和应用: 中国, 国家发明专利申请号200810203311.2. 2008.
- 13 Jones DT. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* 1999; 292(2): 195-202.
- 14 Yamaguchi T, Apse MP, Shi HZ, Blumwald E. Topological analysis of a plant vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter reveals a luminal C terminus that regulates antiporter cation selectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(21): 12510-5.

The Preparation and Application of NHXFS1 Polyclonal Antibody

Zhang Hui, Guo Lirong, Huang Jibin, Xu Yuan, Xia Tao*

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract *NHXFS1* was a novel powerful vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene which was obtained from *Arabidopsis thaliana* antiporter gene *AtNHX1*, *Oryza sativa* antiporter gene *OsNHX1* and *Dendranthema morifolium* antiporter gene *DmNHX1* by DNA family shuffling technology. In this study, we prepared and identified the polyclonal antibody against the C-terminal fragment of NHXFS1. For expression and purification of NHXFS1-C terminal protein, the expression vector pET32a-NHXFS1 antigen containing 6×His tag was constructed and transferred into the *E.coli* strain BL21 (DE3). After IPTG induced, the fusion protein was purified by Ni-NTA superflow cartridges and was immunized with rabbits for polyclonal antibody preparation. The ELISA results showed that the potency of polyclonal antibody reached 1:128 000. To identify the antibody specificity, the vacuolar was extracted from the yeast stain expressing NHXFS1 and OsNHX1 protein and analyzed by Western blot. The result indicated that we have obtained high specificity polyclonal antibody that could be used for further study of Na⁺/H⁺ antiporter and the molecular mechanism of plant salinity.

Key words Na⁺/H⁺ antiporter; prokaryotic expression; yeast vacuolar preparation

Received: February 2, 2012 Accepted: March 5, 2012

This work was supported by the Grant of Innovation Fund of Shanghai Municipal Education Commission (No.52YC1064)

*Corresponding author. Tel: 86-21-62235711, E-mail: txia@bio.ecnu.edu.cn