

## Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> 转运蛋白 *NHX* 基因的研究进展

李 静, 刘 明, 孙 晶, 李思楠, 李文滨, 武小霞

(东北农业大学 农学院, 大豆生物学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘 要:** Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> 转运蛋白是液泡膜中的一种离子反向运输体, 是生物界普遍存在的负责 Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> 交换的一种跨膜运输蛋白。Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白由 *NHX* 家族基因调控表达。过表达 *NHX* 家族基因能提高植物中 Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白的活性。从而调节细胞质内 pH 值、维持 Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>) 浓度、K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> 比、保持细胞膨压、控制细胞扩增的功能, 是植物耐盐的关键因子。该文主要对 Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白的发现、功能以及调控其表达的 *NHX* 基因的克隆、分类及其与抗旱耐盐之间的关系进行了综述, 旨在全面了解其功能和作用机理后将其转入到大豆基因组中, 获得抗旱耐盐的转基因大豆种质。

**关键词:** Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> 转运蛋白; *NHX* 基因; 研究进展

**中图分类号:** Q946.2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-9841(2011)06-1035-05

## Progress of Research on Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> Antiporter *NHX* Gene

LI Jing, LIU Ming, SUN Jing, LI Si-nan, LI Wen-bin, WU Xiao-xia

(Agriculture College of Northeast Agricultural University, Key Laboratory of Soybean Biology of Chinese Ministry of Education, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

**Abstract:** Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> antiporter are ubiquitous membrane proteins which catalyze the exchange of Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>) for H<sup>+</sup> across membranes and play important roles in controlling cellular pH, Na<sup>+</sup> homeostasis cell turgor pressure and cell proliferation. In particular, the vacuolar Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> antiporter has been investigated and proposed to play an important role in salt tolerance. *NHX* gene control the expression of Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> antiporter, overexpress *NHX* gene in plants can improve the activity of Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> antiporter. In the study of plant stress tolerance, more and more researchers have paid attention to Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> antiporter. *NHX* gene which control expression of Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> antiporter were found in many crops, and proved its relationship with the resilience. In this study, the found and functions of Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> antiporter, together with cloning and classification of *NHX* gene and the relationship between drought tolerance were reviewed. In order to obtain the transgenic soybean with drought resistance, understanding of function and action mechanism made a foundation for soybean *NHX* gene transformation.

**Key words:** Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> antiporter; *NHX* gene; Research progress

土壤干旱和盐碱化对农作物产量造成严重影响。近年来我国陆续遭遇干旱天气, 给农作物造成巨大损失。而许多地区由于灌溉不当、植被的破坏和海水入侵等因素, 也造成相当大面积的次生盐渍化土壤, 盐碱土的面积与日俱增。干旱和盐碱化影响植物生长的方式多种多样, 但是对于干旱敏感和盐敏感的植物而言, 主要是细胞中钾、钠离子的毒害。植物细胞质中钾、钠离子大量积累导致细胞生理生化代谢活动受到抑制, 细胞内离子平衡遭受破坏。对于干旱盐碱的研究表明, 植物中存在某种蛋白可以通过将钠、钾离子排出细胞质, 保持细胞质渗透平衡, 这种蛋白被称为 Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> 转运蛋白,

受 *NHX* 家族基因控制。Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白通过 Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>) 外排和 Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>) 区隔化来保持植物细胞内的低 Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>) 水平, 具有调节细胞质内 pH 值和 Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>) 浓度的功能, 是植物抗旱耐盐的关键因子<sup>[1]</sup>, 也是维持细胞质中高 K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> 比的最有效机制之一。

由于土壤干旱盐碱给大豆生产造成巨大损失, 培育抗旱耐盐大豆新品种是解决问题的关键。但是由于资源和育种年限的限制, 传统育种方式一直无法获得抗旱耐盐性较强的大豆新品种。近年来随着分子生物学的发展, 基因克隆和转基因技术的成熟, 使通过基因工程手段获得转基因抗旱耐盐大

收稿日期: 2011-05-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(3107438); 黑龙江省教育厅课题资助项目(11551048); 转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2011ZX08004-002); 东北农业大学博士后基金与博士启动基金资助项目(2009RC47)。

第一作者简介: 李静(1984-), 女, 在读硕士, 研究方向为大豆遗传育种及生物技术。E-mail: lijing191314@yahoo.com.cn。

通讯作者: 武小霞(1971-), 女, 博士, 研究员, 从事大豆遗传育种与生物技术应用研究。E-mail: dadousuo@yahoo.com.cn。

豆品种成为可能。该文对  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白的发现、功能以及 *NHX* 基因的克隆、分类及与抗旱耐盐之间的关系等方面内容进行综述,为大豆 *NHX* 基因遗传转化,培育抗旱耐盐大豆品种奠定理论基础。

## 1 $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$ 逆向转运蛋白及 *NHX* 基因的发现

$\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白已经在许多物种的质膜上被测量出来。第一个质膜上的  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白是 1976 年在老鼠肾细胞中发现的<sup>[2]</sup>。植物中的  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白是在大麦质膜上首次发现<sup>[3]</sup>。

1999 年 Gaxiola 等<sup>[4]</sup>首先在植物拟南芥基因组测序中发现  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  转运蛋白基因,该基因与编码动物血浆蛋白细胞膜  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白的 *NHE* 家族的基因有很高的同源性,同时与酵母 *ScNHX1* 有同源性,在当时命名为 *AtNHX1*。*AtNHX1* 被确定为一个重要的与抗旱耐盐性相关的基因,它能够促进钠离子在液泡中积累。*AtNHX1* 和家族其它成员在 pH 和  $\text{K}^+$  稳态调节方面也发挥关键作用,调节过程包括囊泡转运、细胞功能和植物的进化<sup>[5]</sup>。随着研究的深入更多的 *NHX* 基因在植物、真菌和动物中被确定,包括烟草、大麦、长春花、棉花、海滨车前、向日葵、冰叶日中花、拟南芥、碱蓬、盐角草、小麦、玉米、酿酒酵母、芦苇、互花米草、橄榄型油菜、甜菜等。

## 2 $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$ 逆向转运蛋白的生理功能

植物受到盐胁迫时,通常把盐从细胞质和细胞器中清除,使其集中于液泡中,这种现象称之为盐的区隔化,而盐分区隔化是依赖于液泡膜上的  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白来完成的。 $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白定位于质膜和液泡膜上,逆着  $\text{Na}^+(\text{K}^+)$  浓度梯度运输,将细胞质内的  $\text{Na}^+(\text{K}^+)$  外排或将  $\text{Na}^+(\text{K}^+)$  区隔化到液泡中,以维持细胞质中低  $\text{Na}^+$  浓度,降低细胞渗透势,促使细胞从外界环境中吸水,避免水分胁迫。 $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白参与了细胞质内的 pH、 $\text{Na}^+(\text{K}^+)$  浓度调节及细胞体积变化等生命活动<sup>[6]</sup>。Yamaguchi 等<sup>[7-8]</sup>构建了液泡膜  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白的一种拓扑结构,由 *AtNHX1* 蛋白的 C 端来选择调节逆向转运蛋白阳离子的运输。亲水性 C 端的去除导致了  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  转运的显著增加, $\text{Na}^+/\text{K}^+$  运输的比例也是未修饰 *AtNHX1* 的 2 倍。*AtNHX1* C 末端对

$\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白底物选择性调控以及液泡中的 pH 值对  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  转运蛋白与阳离子亲和性的调控表明:液泡腔内可能存在调控转运蛋白活性的一些表达机制。

$\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白转运  $\text{Na}^+(\text{K}^+)$  进入液泡的动力来源于液泡膜上的质子泵产生的跨膜电化学势梯度<sup>[9]</sup>。液泡膜的质子泵由液泡膜  $\text{H}^+ \text{-ATPase}$  和  $\text{H}^+ \text{-PPiase}$  组成。 $\text{H}^+ \text{-ATPase}$  是植物耐盐能力的决定因素之一,通常盐胁迫初期液泡膜  $\text{H}^+ \text{-ATPase}$  基因表达增强,使其酶活性和泵运质子能力增强<sup>[10]</sup>。而质膜  $\text{H}^+ \text{-ATPase}$  ( $\text{P-ATPase}$ ) 用水解 ATP 产生的能量将  $\text{H}^+$  从细胞质中泵出细胞,产生跨质膜的  $\text{H}^+$  电化学势梯度,提供能量<sup>[11]</sup>,从而驱动质膜上的  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白,使  $\text{H}^+$  顺其电化学势进入细胞, $\text{Na}^+(\text{K}^+)$  则逆电化学势排出细胞<sup>[12]</sup>。

## 3 $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$ 逆向转运蛋白 *NHX* 基因的克隆

1989 年 Sardet 等<sup>[13]</sup>完整的克隆了第一个人类  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白(NHE)。第一个高等植  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白基因的克隆是由 Barkla 等<sup>[14]</sup>在 1994 年完成的,在当时也只是克隆出了这个基因的一部分,包含 1.65 kb 编码跨膜区域和 1 个大的亲水 C 末端。近年来随着分子生物学的深入发展,对植物  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白基因的克隆也在逐渐发展。Fukuda 等<sup>[15]</sup>在水稻中分离出 1 个含 1 608 bp 的开放阅读框的 2 330 bp 的 *OsNHX1* 基因,此基因氨基酸序列和哺乳动物的 *NHX1* 基因相似,同时研究结果显示这个基因的表达提高了植物的耐盐性。Fukuda 等<sup>[16]</sup>利用 RT-PCR 及 RACE 的方法从盐生植物大麦中克隆出  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白基因 *HvNHX1*;吕慧颖等<sup>[17]</sup>通过 RT-PCR 及 RACE 的方法从盐生植物番杏中克隆出了 1 个可编码 554 个氨基酸的液泡型  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白基因;对于  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白 *NHX* 基因的研究自 2005 年开始迅速发展,Brini 等<sup>[18]</sup>通过 PCR 手段克隆出小麦 *NHX1* 基因,并通过功能分析表明小麦的抗旱性来自于 *NHX1* 基因调控表达的逆向转运蛋白的功能;Zorb 等<sup>[19]</sup>成功克隆出了 6 个玉米质膜型 *NHX* 基因 *ZmNHX1* ~6;Lu 等<sup>[20]</sup>从大麦中克隆出  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  转运蛋白基因 *HbNHX1*。2006 年,杨树的 *NHX* 基因 *PtNHX1* 和 *PtNHX6*、酿酒酵母 *NHX1* 和胡杨的 *PeNHX2* 分别被克隆出来;随后胡杨 *PeNHX1*、菊芋 *Ht*-

*NHX1*、紫花苜蓿 *MsNHX1* 和獐毛 *AlNHX* 也逐渐以不同的方法被克隆出来。至今克隆出 *NHX* 基因的植物还包括互花米草、甘蓝型油菜、芦苇、紫羊茅、大叶补血草和木榄等。

不同植物 *NHX* 基因有较高序列同源性(图1)<sup>[21]</sup>。Zorb 等<sup>[19]</sup>对比 *ZmNHX1* ~ 6 与 *AtNHX1*、*LeNHX1* 氨基酸序列显示 *ZmNHX1* ~ 6 基因序列与 *AtNHX1* 相似度达 78%, 与番茄 *LeNHX1* 基因序列相似度达到 63%; 张霞等<sup>[22]</sup>研究表明胡杨 *PeNHX2* 基因与毛白杨 *PtNHX* 基因在核酸及蛋白质水平上的同源性均达到最高, 分别为 90.60% 和 88.25%, 与新疆盐生植物中所克隆的犁苞滨藜 *AdNHX1*、灰绿藜 *CgNHX1*、盐爪爪 *KfNHX* 同源性也较高, 核酸水平上依次为 75.1%、74.0%、74.3%, 蛋白质水平依次为 78.3%、79.0%、78.3%; 安宝燕等<sup>[23]</sup>对紫花苜蓿定位在液泡膜上的 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白基因进行序列分析表明, 该基因所编码的 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白与拟南芥、水稻和棉花中液泡型 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白具有较高的同源性, 基因的相似度分别为 77.3%、75.7% 和 72.7%; 赵祥强等<sup>[24]</sup>对互花米草 *NHX* 基因进行序列分析表明该基因与水稻 *NHX* 基因氨基酸序列一致性达 95%; 与拟南芥 *AtNHX5* 和 *AtNHX6* 氨基酸序列一致性分别为 82%、86%; 郭庆水等<sup>[25]</sup>研究表明木榄 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白序列与蓖麻、胡杨、葡萄、百脉根等植物的液泡膜型 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白序列具有很高的同源性(80% 以上)。Wu 等<sup>[26]</sup>的报告显示霸王花的 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 转运蛋白基因 *ZxNHX* 与其它物种液泡 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 转运蛋白的 *NHX* 基因有很高的相似度; *NHX* 基因保守性很高, 说明 *NHX* 基因在家族许多物种的生长和生理调节过程中起着重要作用。

#### 4 Na<sup>+</sup>(K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白及 *NHX* 基因的分类

根据 Saier 等<sup>[27]</sup>的分类, 阳离子/质子逆向转运蛋白可分为 CPA1 和 CPA2 家族。现阶段越来越多的细胞内 Na<sup>+</sup>(K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> 转运蛋白在植物、动物和真菌中被发现, 构成一个特别的转运蛋白家族——*NHX* 家族。这个家族又分为 Class-I 和 Class-II 2 种序列类型, 这 2 种序列有 20% ~ 25% 的同源性。Class-I 家族逆向转运蛋白存在于陆生植物中并具有其专门的功能, Class-I 家族 *NHX* 亚型被证实定位在液泡膜上, 这似乎是 Class-I 家族的特征。植物 Class-II 序列在裸子植物和被子植物云杉与苔藓植物中被发现。创始成员由 IC-NHE/*NHX* 家族的 Sc-

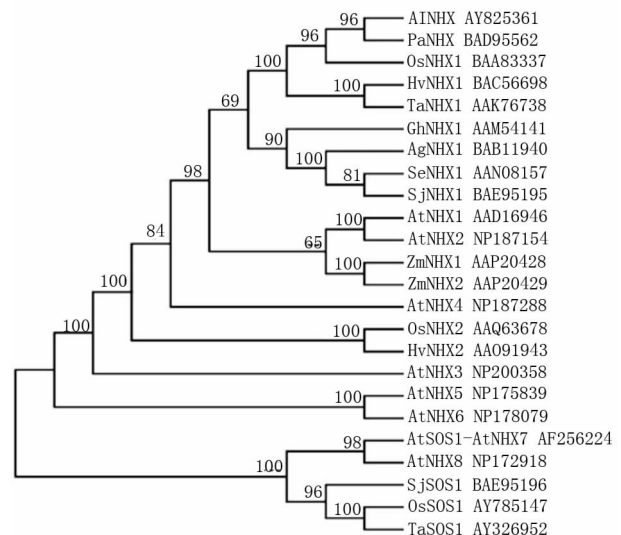


图1 部分 *NHX* 家族基因亲缘关系进化树

Fig.1 Evolutionary tree of partial *NHX* gene

*NHX1* 和人类的 NHE6 与 NHE7 组成, 这种逆向转运蛋白的功能主要表现在植物的各种小囊泡内, 如定位在液泡膜周围的小泡上、高尔基体上等。

Na<sup>+</sup>(K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白基因在动物体内已经发现了 7 类同型体(NHE), 广泛存在于各类组织细胞中, NHE1 ~ 5 分布在细胞膜上, NHE6、NHE7 分布在线粒体膜上。Na<sup>+</sup>(K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> 转运蛋白也已经从植物中分离出来, 主要分为 2 类, 分别是存在于质膜上的 Na<sup>+</sup>(K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> 转运蛋白以及液泡膜上的转运蛋白<sup>[20]</sup>, 它们通过将 Na<sup>+</sup> 排出细胞质或通过 Na<sup>+</sup> 区隔化于液泡中以维持植物细胞质中低 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> 浓度。随着拟南芥基因组序列的完成, 发现了拟南芥 *NHX* 基因家族, 该家族共有 8 个成员, Yokoi 等<sup>[28]</sup>将 6 个拟南芥 *NHX* 家族进行分类表明, *AtNHX1* ~ 4 分为一组, *AtNHX5* 和 *AtNHX6* 分为一组, 原因是 *AtNHX2* ~ 4 与 *AtNHX1* 的相似度达到 56.0% ~ 87.5%, 而 *AtNHX5* 与 *AtNHX6* 相似度达 78.7%; Zorb 等<sup>[19]</sup>克隆出 6 个玉米 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 转运蛋白 *NHX* 基因 *ZmNHX1* ~ 6 并进行分析报告表明, 玉米 *ZmNHX1*、2、6, 拟南芥 *AtNHX1*、2, 水稻 *OsNHX* 以及小麦 *TaNHX2* 相似划分为一类, *ZmNHX3* ~ 5 和拟南芥 *AtNHX4* ~ 6 以及番茄 *LeNHX2* 相似划分为一类; Wu 等<sup>[26]</sup>将 *NHX* 家族分为 Class-1 和 Class-2 家族, 其中 Class-1 家族 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 转运蛋白包括 *AtNHX1* ~ 4、*OsNHX1*、2、4、5、*SlNHX1* 和 *ZxNHX*; Class-2 家族 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 转运蛋白包括 *AtNHX5*、*AtNHX6*、*SlNHX2*、*OsNHX3* 和 *OsNHX6*。现阶段发现的高等植物 *NHX* 基因分别为拟南芥 *AtNHX1* ~ 8, 玉米 *ZmNHX1* ~ 6, 水稻 *OsNHX1* ~ 5, 大麦 *HvNHX1* 和 *HvNHX2*, 番

茄 *LeNHX1* 和 *LeNHX2*, 大豆 *GmNHX1* 等。

## 5 过表达 *NHX* 基因与抗旱耐盐性的关系

大多数耐盐植物经盐胁迫后  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白的活性均会增加, 并且质子泵的活性也会增加。在膜质子泵提供的能量下,  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白将  $\text{Na}^+$  要么区隔化于液泡中, 要么排到植物体外, 从而降低细胞质中  $\text{Na}^+(\text{K}^+)$  的浓度, 使过多的  $\text{Na}^+(\text{K}^+)$  离开代谢位点, 减轻其对酶和膜系统的伤害, 特别是  $\text{Na}^+(\text{K}^+)$  的区隔化还可降低细胞水势, 抵抗盐分造成的渗透胁迫。所以,  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白与植物的抗盐性有着重要关系, 特别是  $\text{Na}^+$  通过  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运在液泡中的积累是盐生植物和耐盐植物的主要特征。

越来越多的研究结果显示, 液泡膜  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白在植物中过量表达可以提高植物的耐盐性。Apse 等<sup>[1]</sup> 将拟南芥液泡膜  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白基因转入拟南芥中, 获得了可在  $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$  中正常生长发育的转基因植株; Zhang 等<sup>[29-30]</sup> 将 *AtNHX1* 转入在番茄和油菜中, 均获得了在  $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$  胁迫下能够正常生长、结实的转基因植株; Ohtaetal 等<sup>[31]</sup> 将滨藜属中的  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白基因转入水稻, 赋予了水稻耐盐性; 过表达水稻、拟南芥、大麦中的  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白 *NHX* 基因能够提高水稻、玉米、小麦、烟草的抗旱耐盐性; He 等<sup>[32]</sup> 在棉花中过表达 *AtNHX1* 基因发现在温室中  $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$  处理条件下转基因棉花产量增加并产生更多的棉纤维, 田间种植的转基因棉花也能够产出更多更好的棉纤维, Wu 等<sup>[33]</sup> 将水稻液泡型  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白 *OsNHX1* 基因转入獐毛中, 转基因獐毛植株能够在  $350 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$  处理 10 周后正常存活。

2006 年以来, 过表达小麦、大豆、碱蓬、盐角草、拟南芥、水稻、獐毛、紫花苜蓿植物的  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白 *NHX* 基因获得的转基因植株也都体现了耐盐性的增强; 随着对转基因植物安全的重视, 对于转基因载体的要求也逐渐增加。为了转基因作物能够商业化生产, 有很多科学家也开始设计 marker-free 载体, 2010 年 Li 等<sup>[34]</sup> 报道转 marker-free *AtNHX1* 基因的玉米在提高抗旱耐盐性的同时也提高了玉米的产量; Wu 等<sup>[26]</sup> 报道 *ZxNHX* 基因在盐胁迫和干旱胁迫中有重要作用。 *ZxNHX* 基因所调控表达  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白能够将  $\text{Na}^+$  从细胞质中分隔到液泡中, 特别是在芽中, 从而降低细胞的渗透压, 增加植物的吸水能力, 保持植物在盐

害和干旱条件下正常生长; Tian 等<sup>[35]</sup> 将 *AtNHX1* 基因转入猕猴桃中, 实验结果显示转 *AtNHX1* 基因猕猴桃能够抵抗  $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$  胁迫, 证明过表达拟南芥 *AtNHX1* 基因能够增加猕猴桃的抗盐胁迫能力。

## 6 展 望

$\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白在大豆中具有广泛的研究价值和应用潜力。了解  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白基因 *NHX* 的功能, 可为其在大豆中的应用奠定基础。在大豆基因组中过表达  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  逆向转运蛋白基因, 提高大豆的抗旱耐盐能力, 培育出抗旱耐盐的大豆新品种, 对于缩短育种年限, 提高大豆品种的抗旱耐盐能力具有重要意义。

## 参考文献

- [1] Apse M P, Aharon G S, Snedden W A. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 1999, 285: 1256-1258.
- [2] Murer H, Hopfer V, Kinne R. Sodium/proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney [J]. *Biochemical Journal*, 1976, 154: 597-604.
- [3] Ratner A, Jacoby B. Effect of  $\text{K}^+$ , its counter anion and pH on sodium efflux from barley roots [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1976, 148: 425-433.
- [4] Gaxiola R A, Rao R, Sherman A. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, *AtNHX1* and *Atp1* can function in cation detoxification in yeast [J]. *Proceeding of the National Academy of Science of USA*, 1999, 96: 1480-1485.
- [5] Sze H, Padmanaban S, Cellier F, et al. Expression patterns of a novel *AtCHX* gene family highlight potential roles in osmotic adjustment and  $\text{K}^+$  homeostasis in pollen development [J]. *Plant Physiology*, 2004, 136: 2532-2547.
- [6] Pandan E, Schuldner S. Intracellular pH and membrane potential as regulators in the prokaryotic cell [J]. *Journal of Membrane Biology*, 1987, 95(3): 189-198.
- [7] Yamaguchi T, Aharon G S, Sottosanto J B, et al. Vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter cation selectivity is regulated by calmodulin from within the vacuole in a  $\text{Ca}^{2+}$  and pH-dependent manner [J]. *Proceeding of the National Academy of Science of USA*, 2005, 102(44): 16107-16112.
- [8] Yamaguchi T, Apse M P, Shi H, et al. Topological analysis of a plant vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter reveals a luminal C terminus that regulates antiporter cation selectivity [J]. *Proceeding of the National Academy of Science of USA*, 2003, 100(21): 12510-12515.
- [9] Rausch T, Kirsch M, Zhigang A. Salt stress responses of higher plants: the role of proton pumps and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters [J]. *Journal of Plant Physiology*, 1996, 148: 425-433.
- [10] Niu X, Narasimhan M L, Hasegawa P M, et al. NaCl regulation of plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase gene expression in a glycophyte

- and halophyte[J]. *Plant Physiology*, 1993, 106: 713-718.
- [11] Waki T, Higashida Y, Watanabe Y. Characterization of flsecond gene ZS(OD22) of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter from salt tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* and functional expression of ZSOD2 and ZSOD22 in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Yeast*, 1998, 14: 1167-1174.
- [12] Schachtman D P, Liu W. Molecular pieces to the puzzle of the interaction between potassium and sodium up take in plants[J]. *Trend Plant Science*, 1999, 4(7): 281-287.
- [13] Sardet C, Franchi A, Pouyssegur J. Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter[J]. *Cell*, 1989, 56(2): 271-280.
- [14] Barkla B J, Apse M P, Blumwald E. The plant vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport[J]. *Symposia of the Society Experiment Biology*, 1994, 48: 141-153.
- [15] Fukuda A, Nakamura A, Yoshiyuki T. Molecular cloning and expression of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger gene in *Oryza sativa*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1446(1-2): 149-155.
- [16] Fukuda A, Nakamura A, Yoshiyuki T, et al. Effect of salt and osmotic stresses on the expression of genes for the vacuolar  $\text{H}^+$ -pyrophosphatase,  $\text{H}^+$ -ATPase subunit A, and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter from barley[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(397): 585-594.
- [17] 吕慧颖, 李银心, 陈华. 番杏  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白基因的克隆及特性分析[J]. *高技术通讯*, 2004(11): 26-31 (Lv H Y, Li Y X, Chen H.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene cloning and sequence analysis in *Tetragonia*[J]. *High Technology Letters*, 2004(11): 26-31.)
- [18] Brini F, Gaxiola R A, Berkowitz G A, et al. Cloning and characterization of a wheat vacuolar cation/proton antiporter and pyrophosphatase proton pump [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, 43(4): 347-354.
- [19] Zorb C, Noll A, Karl S, et al. Molecular characterization of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters (ZmNHX) of maize (*Zea mays* L.) and their expression under salt stress[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2005, 162(1): 55-66.
- [20] Lu S Y, Jin X Y, Li Y F. Antiporter gene from *Hordum brevisubulatum* (Trin.) link and its over expression in transgenic tobaccos [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2005, 47(3): 343-349.
- [21] Zhang G H, Su Q, Wu S. Characterization and expression of a vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene from the monocot halophyte *Aeluropus litoralis* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2008, 46: 117-126.
- [22] 张霞, 曾幼玲, 张富春. 胡杨  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  反向运输载体 (*PeNHX2*) 基因的克隆与序列分析[J]. *生物技术*, 2006, 16(3): 8-13 (Zhang X, Zeng Y L, Zhang F C.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene cloning and sequence analysis in *Populus* [J]. *Biotechnology*, 2006, 16(3): 8-13.)
- [23] 安宝燕, 罗琰, 高新起. 紫花苜蓿  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白基因在拟南芥中表达提高转基因植株的耐盐性[J]. *作物学报*, 2008, 34(4): 557-564. (An B Y, Luo Y, Gao Y Q. Overexpression *Alfalfa*  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene increased salt tolerance of *Arabidopsis* [J]. *Crops*, 2008, 34(4): 557-564.)
- [24] 赵祥强, 汤巍, 李鑫. 互花米草中 *NHX* 基因片段的克隆与序列分析[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(36): 17878-17907. (Zhao X Q, Tang W, Li X. *NHX* gene cloning and sequence analysis in the *Spartina* [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2009, 37(36): 17878-17907.)
- [25] 郭庆水, 徐立新, 于伟. 木榄  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白基因的克隆[J]. *热带生物学报*, 2010, 1(2): 105-109. (Guo Q S, Xu L X, Yu W.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene cloning in *Gymnorhiza* [J]. *Tropical Biology*, 2010, 1(2): 105-109.)
- [26] Wu G Q, Xi J J, Wang S M. The *ZxNHX* gene encoding tonoplast  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter from the xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum* plays important roles in response to salt and drought[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2011, 168(5): 51149-51159.
- [27] Saier M H, Eng B H, Hutchinson W J, et al. Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses[J]. *Biochimica et Biophys Acta*, 1999, 1422(1): 1-56.
- [28] Yokoi S, Beatriz Cubero, Jose M, et al. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters in the salt stress response[J]. *The Plant Journal*, 2002, 30(5): 529-539.
- [29] Zhang H X, Blumwald E. Transgenic salt-tolerant tomato Plants accumulate salt in fruit [J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19: 765-768.
- [30] Zhang H X, Hodson J N, Blumwald E. Engineering salt tolerant Brassica plants: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation [J]. *Proceeding of the National Academy of Science of USA*, 2001, 98: 12832-12836.
- [31] Ohta M, Hayashi Y, Hayakawa T. Introduction of a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene from *Atriplex gmelini* confers salt tolerance to rice[J]. *FEBS Letters*, 2002, 532(3): 279-283.
- [32] He C, Yan J, Zhang H, et al. Expression of an *Arabidopsis* vacuolar sodium/proton antiporter gene in cotton improves photosynthetic performance under salt conditions and increases fiber yield in the field[J]. *Plant Cell Physiology*, 2005, 46(11): 1848-1854.
- [33] Wu Y Y, Chen Q J, Wang X C. Salt-tolerant transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene[J]. *Plant Science*, 2005, 169: 65-73.
- [34] Li B, Li N, Zhang J R, et al. Generation of marker-free transgenic maize with improved salt tolerance using the FLP/FRT recombination system[J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, 45: 206-213.
- [35] Tian N, Wang J, Xu Z Q. Overexpression of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene *AtNHX1* from *Arabidopsis thaliana* improves the salt tolerance of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) [J]. *South African Journal of Botany*, 2011, 77: 160-169.