doi: 10.11707/j.1001-7488.20140306

唐古特白刺液泡膜 Na^+/H^+ 逆向运输蛋白基因 *NtNHX1* 的克隆与表达分析*

唐 欣[1,2,3] 王瑞辉[1] 杨秀艳[2,3] 朱建峰[2,3] 刘正祥[2,3] 倪建伟[2,3] 张华新[2,3]

(1. 中南林业科技大学 长沙 410004; 2. 国家林业局盐碱地研究中心 北京 100091;
3. 林木遗传育种国家重点实验室 北京 100091)

摘 要: 植物液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白具有将胞质中过多的 Na^+ 区隔化在液泡内,从而减轻过量 Na^+ 对细胞质的伤害,同时维持细胞的渗透势,利于植物抵御盐胁迫。以2年生唐古特白刺嫩叶为试材,采用 RT-PCR 和 RACE 方法从叶片中获得1个 *NHX* 基因 cDNA 全长,命名为 *NtNHX1*,GenBank 登录号为 KF751928。序列分析结果表明: *NtNHX1* 全长2 134 bp,包含281 bp 的5′非编码区、218 bp 的3′非编码区和29 bp 的 poly(A)尾巴。该 cDNA 编码1个544个氨基酸的多肽,等电点为8.14,推测分子质量为59.9 kDa。通过与其他物种的 NHX1 氨基酸序列比对,*NtNHX1* 基因与柑橘同源性最高达81%。*NtNHX1* 基因存在12个跨膜结构域,其中 TM3 跨膜结构域上具有高度保守的氨氯吡嗪脒结合位点(LFFIYLLPPI)。该位点与 Na^+ 有竞争作用。相对荧光定量 PCR 分析表明, *NtNHX1* 在根、茎、叶中均有表达,叶中的表达量明显高于茎和根; 在高浓度盐(200 mmol·L^{-1} NaCl)处理下, *NtNHX1* 在叶中的转录水平显著增强,在处理12 h 后表达量达到最大值。由此推断,*NtNHX1* 基因的表达与盐胁迫的诱导和调节有关。

关键词: 唐古特白刺; 液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白; *NtNHX1* 基因; 基因克隆; 表达分析
中图分类号: S718.46 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-7488(2014)03-0038-07

Isolation and Expression Analysis of a Vacuolar Membrane Na^+/H^+ Antiporter Gene *NtNHX1* from *Nitraria tangutorum*

Tang Xin[1,2,3] Wang Ruihui[1] Yang Xiuyan[2,3] Zhu Jianfeng[2,3] Liu Zhengxiang[2,3]
Ni Jianwei[2,3] Zhang Huaxing[2,3]

(1. *Central South Forestry University of Science and Technology Changsha* 410004; 2. *Research Center of Saline and Alkali Land of State Forestry Administration Beijing* 100091; 3. *State Key Labortory of Tree Genetics and Breeding Beijing* 100091)

Abstract: The plant Na^+/H^+ antiporter (NHX) can regionalize the excess Na^+ of cytoplasm in the vacuole. This process can avoid the noxious effects of Na^+ in the cytosol and maintain osmotic balance by using Na^+ amassed in the vacuole to drive water into the cell, thus facilitating the plants to resist salt stress. In this work, a full-length cDNA sequence of *NtNHX1* gene was obtained from leaves of *Nitraria tangutorum* using RT-PCR and RACE, named *NtNHX1* (GenBank accession number KF751928). Sequence analysis indicated that *NtNHX1* is 2 184 bp in full length, containing a 5′-untranslated region (5′-UTR) of 281 bp, a 3′-UTR of 218 bp and 29 bp of the ploy(A) tail. The *NtNHX1* cDNA encodes a protein of 544 amino acids with a pI of 8.14 and a deduced molecular mass of 59.9 kDa. Amino acid sequence alignment with other species showed that the *N. tangutorum* of *NtNHX1* displayed the highest similarity(81%) to citrus. *NtNHX1* has twelve putative transmembrane (TM) domain structures, of which the TM3 transmembrane structure includes the conserved amilorude-binding sites (LFFIYLLPPI). The amilorude-binding site was found to be responsible for playing a competitive role. Relative Real-Time PCR analysis indicated that *NtNHX1* expressed in root, stems and leaves. The expression in leaves was highest. The transcript level of *NtNHX1* in the leaves was obviously increased by 200 mmol·L^{-1} NaCl treatment, and the expression of *NtNHX1* reached to the highest in 12 h of treatment. The study indicated that the expression of *NtNHX1* gene was related to the induction and regulation of salt stress.

收稿日期: 2013-11-14; **修回日期:** 2013-12-31。
基金项目: 中央公益科研院所基本科研业务费专项资金项目(CAFYBB2011005-5)。
* 张华新为通讯作者。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Key words: *Nitraria tangutorum*; Na^+/H^+ antiporter; *NtNHX1*; gene cloning; expression analysis

盐胁迫是限制植物生长的重要环境因素之一。在大多数盐环境中,NaCl 是盐的主要种类(Wu *et al.*, 2009)。盐胁迫下 Na^+ 在植物细胞中大量累积,导致细胞内代谢活动减弱及扰乱胞内的离子平衡是其对植物生长发育的主要危害表现(张智俊等, 2011)。为了避免盐碱条件下细胞出现离子平衡紊乱情况,植物体必须在胞质内维持一个低 Na^+ 高 K^+ 的环境,从而保证各种代谢活动的正常运行(Zörb *et al.*, 2005)。盐胁迫下,植物采用不同的方式保持胞质内低 Na^+ 浓度,包括限制 Na^+ 涌入、保持积极的 Na^+ 外排和将 Na^+ 区隔化至液泡等(Rubio *et al.*,1995)。众多研究表明, Na^+ 在液泡内区隔化是植物在高盐浓度下耐盐机制的重要环节(Barkla *et al.*, 1996; Rausch *et al.*, 1996)。在植物将 Na^+ 区隔化至液泡的过程中,液泡膜上 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白(Na^+/H^+ antiporter, NHX) 控制 Na^+ 的跨液泡膜转运和它在液泡中的积累 (Rausch *et al.*, 1996; Barkla *et al.*, 1996),其运输活性的强弱直接关系到此机制在耐盐过程中的作用大小(严一诺等, 2007)。液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白不仅在离子区隔化和离子稳态平衡中发挥着非常重要的作用,还可以调节液泡 pH 变化(Yoshida *et al.*, 2005) 和影响植物的发育(Apse *et al.*, 2003)。Apse 等(1999) 在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) 中鉴定了第 1 个高等植物的液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *AtNHX1*,并将其转入拟南芥且成功获得了能在 200 mmol·L^{-1} NaCl 中正常生长发育的转基因植株; 进一步研究发现转基因植株叶中 Na^+ 的含量比野生型植物高,其耐盐性提高的原因是 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白将大量 Na^+ 区隔化在液泡中(Apse *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2001)。过表达 *AtNHX1* 可引起耐盐性的改善,相继在油菜(*Brassica campestris*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*)、小麦(*Triticum aestivum*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、甜菜(*Beta vulgaris*)、水稻(*Oryza sativa*) 等单、双子叶植物中都同样得到了验证(Kronzucker *et al.*, 2011)。

唐古特白刺(*Nitraria tangutorum*) 隶属于蒺藜科(Zygophyllaceae) 白刺属(*Nitraria*),是中国特有的盐生植物,主要分布于西北盐渍化荒漠(刘瑛心, 1987)。唐古特白刺根系发达,叶小且肉质化,具有抗风沙、抗干旱和耐盐碱等抗逆能力(王镜泉, 1989),是典型的聚盐型(将盐离子聚于液泡中) 盐生植物,可在土壤含盐量达 2% 的地域正常生长(闫永庆等, 2010),是我国西北荒漠植被的重要建群种之一。目前对白刺属植物的研究主要集中在生理耐盐机制方面(王秀娟等, 2010; 高暝等, 2011; 倪建伟等, 2012; 杨秀艳等, 2013),但对其耐盐性分子机制的研究鲜见报道。本研究组前期研究发现,盐胁迫下,唐古特白刺在累积 Na^+ 同时,通过增加对 K^+、Ca^{2+} 等植物必需营养离子的选择性吸收及运输来维持地上部较稳定的离子含量及 Ca^{2+}/Na^+、K^+/Na^+ 比值,从而维持盐胁迫下体内正常的生理代谢(杨秀艳等, 2013)。为了探究盐胁迫下白刺维持体内离子平衡的分子机制,挖掘其耐盐基因资源,本研究依据 *NHX1* 基因家族保守序列设计引物,采用 RT-PCR 和 RACE 2 种方法进行唐古特白刺液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的克隆,并通过相对荧光定量分析 NaCl 胁迫条件下 *NtNHX1* 在唐古特白刺组织中的表达情况,以期为探讨唐古特白刺耐盐分子机制和合理利用白刺属耐盐基因资源提供参考资料。

1　材料与方法

1.1　试验材料与处理方法

唐古特白刺种子采自内蒙古磴口县。种子播种在蛭石∶草炭为3∶1(*V*/*V*) 的混合介质中,置于中国林业科学研究院温室培养。选择生长正常且大小一致的 3 月龄苗用自来水培养,培养期间每隔 4 天换水 1 次。水培 1 周左右,采用 0(CK) 和 200 mmol·L^{-1} NaCl 处理幼苗 1,3,6,12,24,48 h,每个处理 3 个重复,每个重复 3 株,共计 72 株。2013 年 9 月 22 日上午 10∶00—11∶00 统一采取嫩根、嫩茎及嫩叶并用锡箔纸包好后速冻,保存于 -80 ℃ 冰箱以备 RNA 提取。

1.2　总 RNA 的提取

用北京天恩泽基因有限公司的柱式植物 RNAout 试剂盒提取唐古特白刺生长期嫩叶总 RNA。按照 SuperScript III Reverse Transcriptase 说明书进行反转录合成 cDNA,置于 -20 ℃ 冰箱保存备用。

1.3　*NtNHX1* 全长 cDNA 序列的克隆

基于已克隆(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) 的霸王(*Sarcozygium xanthoxylon*) ZxNHX(ABU92562.1)、拟南芥 AtNHX1 (NP_198067.1)、盐地碱蓬(*Suaeda salsa*) SsNHX1(AAP15178.1)、盐

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

角草(*Salicornia europaea*) SeNHX1(AAN08157.1)、盐爪爪(*Kalidium foliatum*) KfNHX1(AAV73803.1)、小盐芥(*Thellungiella halophila*) ThNHX1(BAJ33874.1)、水稻(*Oryza sativa*) OsNHX1(BAA83337.1)等进行多序列比对,然后在氨基酸保守区,利用 Primer Premier 5.0 软件设计简并引物(表1)。以唐古特白刺叶片总 RNA,反转录后得到第1条链 cDNA 并以此为模板进行 PCR 扩增,获得中间片段序列。在中间片段序列基础上利用 Primer Premier 5.0 软件设计 3'RACE 和5'RACE引物,通过巢式扩增得到全长序列。

以唐古特白刺嫩叶片的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。中间片段扩增程序为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,30 个循环;72℃ 7 min。3'5'末端扩增:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 30 s,72 ℃ 3 min,5 个循环;94 ℃ 30 s,70 ℃ 30 s,72 ℃ 3 min,5 个循环;94 ℃ 30 s,62 ℃ 30 s,72 ℃ 3 min,30 个循环。扩增全长 cDNA 程序为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,58 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,30 个循环;72 ℃ 7 min。所有扩增反应体系均为 25 μL。

表1 PCR 引物及扩增程序

Tab. 1 Primers used in this study and the processes of PCR

引物 Primer	引物序列 Primer sequence(5'—3')	扩增长度 Amplication length/bp	作用 Function
M1 M2	TTGGAAGAGCAGCTTTTGTT GCATTGAAAAGMACCACHGATG	565	扩增保守片段 For the conservative fragment
UPM M3	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT CTTGAAGAGAATAGGTGGATGAATGA	1 636	3'-RACE 扩增3'末端序列 3' ending amplification by 3'-RACE
UPM M4	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT CTTCACTAAACACTAATAGATGCGAGC	929	5'-RACE 扩增5'末端序列 5' ending amplification by 5'-RACE
M5 M6	ATGGATCAATTAAGTTCGGTTGTATCG TCAGTTCCATTGACGGACGCTC	1 635	全长 cDNA 扩增 Full-length cDNA amplification
M7 M8	CCTCCTAAATGCTCCTACACACACG CGGAACGAAGGGAACAAAACC	155	检测 *NtNHX1* For the expression of *NtNHX1*
Act-F Act-R	TTGCTGACCGTATGAGCAAG TGGATGGACCAGACTCATCA	179	扩增内标 For the internal control

1.4 *NtNHX1* 基因生物信息学分析

利用 NCBI 将 *NtNHX1* 基因序列翻译成氨基酸,在线分析蛋白质和 DNA 同源性(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/);运用 DNAMan 软件进行 *NtNHX1* 基因序列的整理和蛋白氨基酸多重序列比对;运用 Compute pI /Mw 软件预测 *NtNHX1* 基因编码蛋白分子质量和等电点;采用 Mega 5 软件对系统进化树进行构建,进化距离的计算用 Neighbor-Joining 方法。利用在线 SOPMA 软件(Geourjon *et al.*, 1995)进行唐古特白刺 NtNHX1 蛋白二级结构的预测;运用 Scanprosite 寻找编码蛋白的 Motif(http://us.expasy.org/prosite);运用 TMHMM 软件对编码蛋白跨膜结构域进行预测(http://genome.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/);利用 ProtFun 进行 NtNHX1 蛋白的功能预测(http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun);利用 Signal P 软件进行 N-末端的信号肽序列的分析(http://genome.cbs.dtu.dk/services/Signalp/);利用 Protscal 程序对 *NtNHX1* 基因序列疏水性预测分析。

1.5 相对荧光定量 PCR 表达特征

为了研究 *NtNHX1* 在唐古特白刺不同组织中的表达情况,分别从幼叶、幼茎和幼根中提取总 RNA,分别取500 ng 为模板并反转录合成 cDNA 第1链。基于 *NtNHX1* cDNA 全长序列,设计1对特异引物 M7 和 M8(表1)成功获得扩增长度为155 bp 的片段。参考小果白刺(*Nitraria sibirica*) *Actin* 基因(AB617805.1)序列,设计其特异引物 Act-F 和 Act-R(表1)作为内参,用于相对荧光定量分析。

2 结果与分析

2.1 cDNA 编码区全长的克隆及序列分析

采用引物 M5 和 M6 扩增目的基因开放阅读框(ORF),测序结果表明该序列长度为1 635 bp。拼接 RT-PCR 及 RACE-PCR 扩增片段,最终获得长度为2 134 bp 的唐古特白刺 *NHX* cDNA 全长序列,命名为 *NtNHX1*(GenBank 登录号:KF751928;2014 年5月28日公布)。将 *NtNHX1* cDNA 全长序列提交至 NCBI 提供的 ORF Finder 程序进行分析发现,该 cDNA 全长的开放阅读框为1 635 bp,共编码544个氨基酸,3′非翻译区长 218 bp,5′非翻译区长 281 bp。

为了比较 NtNHX1 蛋白与其他 Na^+/H^+ 转运蛋

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

白的亲缘关系,将唐古特白刺 NtNHX1 氨基酸序列提交 NCBI 进行在线比对(http: // blast. ncbi. nlm. nih. gov/Blast. cgi) ,从 GenBank 中选取 7 个来源于不同植物中的 Na^+/H^+ 逆向运输蛋白的氨基酸序列,分别为柑橘 (*Citrus reticulata* AAT36679. 1) 、霸王 (ABU92562. 1) 、盐角草 (AAN08157. 1) 、北滨藜 (*Atriplex gmelini* BAB11940. 1) 、犁苞滨藜(*Atriplex dimorphostegia* AAO48271. 1) 、拟南芥(NP_198067. 1) 、水稻(BAA83337. 1) 。利用 DNAMAN 软件进行了多重比较,结果显示,NtNHX1 氨基酸序列与已克隆的柑橘 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 CrNHX1 同源性达 81% ,和其他植物的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白也有较高的同源性(图 1) 。从图 1 可以看出,NtNHX1 中红色方框处序列 LFFIYLLPPI 与其他植物的此序列都是高度保守的,该序列在哺乳动物中被鉴定为真核生物 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白竞争抑制剂氨氯吡嗪脒的结合位点(Gaxiola *et al.*, 2001) 。

在多重比较的基础上,为进一步了解 NtNHX1 与其他植物 NHX1 之间的进化关系,运用 Mega5 软件构建系统进化树,采用 Neighbor-Joining 方法进行进化距离的计算。结果表明: NtNHX1 与液泡型的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的亲缘关系近,其中与柑橘 CrNHX1 的亲缘关系最近,其次是与拟南芥 AtNHX1 和同为蒺藜科的霸王 ZxNHX 亲缘关系较近; 而与同样来源于植物的质膜型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 SOS1 的亲缘关系较远(图 2) 。这表明唐古特白刺 NtNHX1 为液泡型Na^+/H^+ 逆向转运蛋白。

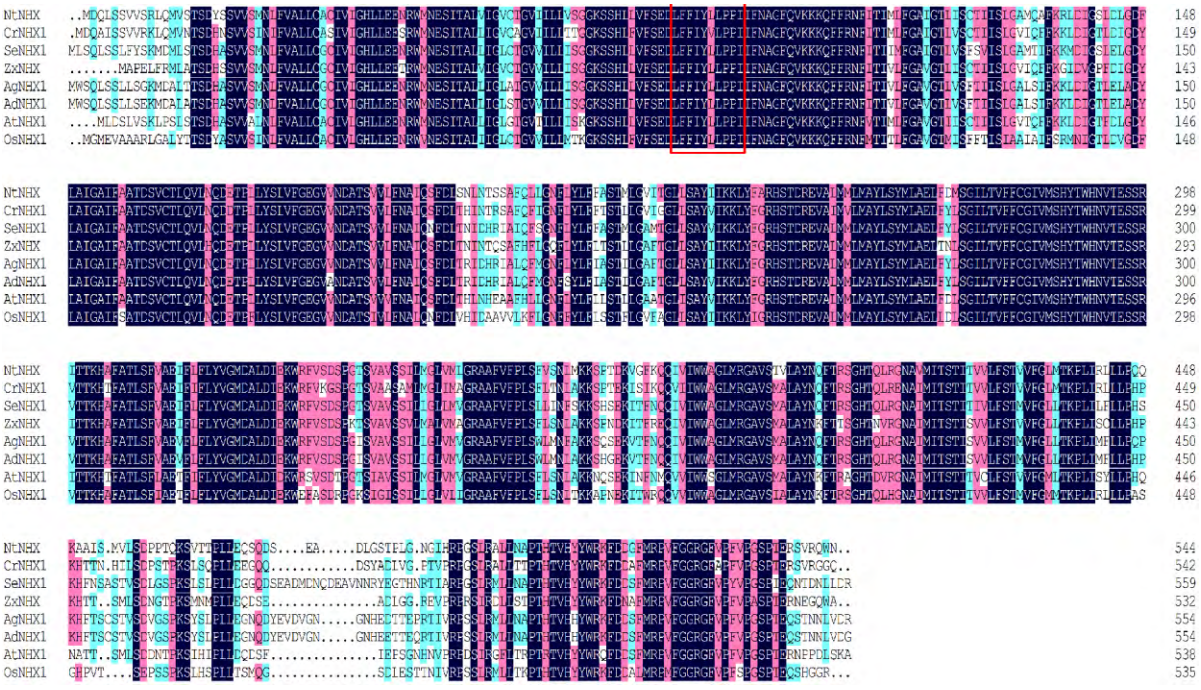

图 1　唐古特白刺 NtNHX1 与其他植物 NHX1 同源序列的比较

Fig. 1　Comparison of NtNHX1 with other plant NHX1 antiporter

红色方框表示氨氯吡嗪脒结合位点 Antiporter inhibitor' s amiloride-binding motif is marked with red box.

Nt: **唐古特白刺** *Nitraria tangutorum*; Cr: **柑橘** *Citrus reticulata*; Se: **盐角草** *Salicornia europaea*; Zx: **霸王** *Sarcozygium xanthoxylon*; Ag: **北滨藜** *Atriplex gmelini*; Ad: **犁苞滨藜** *Atriplex dimorphostegia*; At: **拟南芥** *Arabidopsis thaliana*; Os: **水稻** *Oryza sativa*. **下同。** The same below.

2.2　生物信息学分析

预测 NtNHX1 逆向运输蛋白相对分子质量为 59. 9 kDa,等电点为 8. 14; 二级结构预测表明,NtNHX 蛋白含有 269 个 α 螺旋、187 个随意卷曲和 88 个延伸链且分别占到 49. 45% ,34. 38% ,16. 18% (图 3A) ,α 螺旋和随意卷曲结构交错构成了二级结构的主要部分。疏水性分析(http: // web. expasy. org/cgi-bin/protscale/protscale. pl) 发现,N 末端部分具有很强的疏水性,而 C 末端的亲水性较强。从图中可以看出整个肽链中均匀地分布着疏水性氨基酸,且多于亲水性氨基酸,因此,整个多肽链表现为疏水性,说明 NtNHX1 蛋白符合膜蛋白的特征,属于疏水性蛋白(图 3B) 。利用 TMHMM 软件进行跨膜性预测,表明 NtNHX1 含有 12 个跨膜区(图 3C) ,并且其中包含并没有完全跨过液泡膜的 TM5 和 TM6 两个跨膜结构域,相关研究证明这 2 个跨膜结构域是液泡型

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Na^+/H^+ 逆向运输蛋白活性的重要结构域，可与 Na^+ 结合(张雨良等，2009)。另外，NtNHX 蛋白的 C 末端氨基酸序列差别较大且有一个长的亲水性“尾巴”(图 1)，而长的“尾巴”在 Na^+ 运输中起着重要的作用(伍国强，2008)。因此，可以进一步推断唐古特白刺 NtNHX1 逆向转运蛋白为一个跨膜转运蛋白。

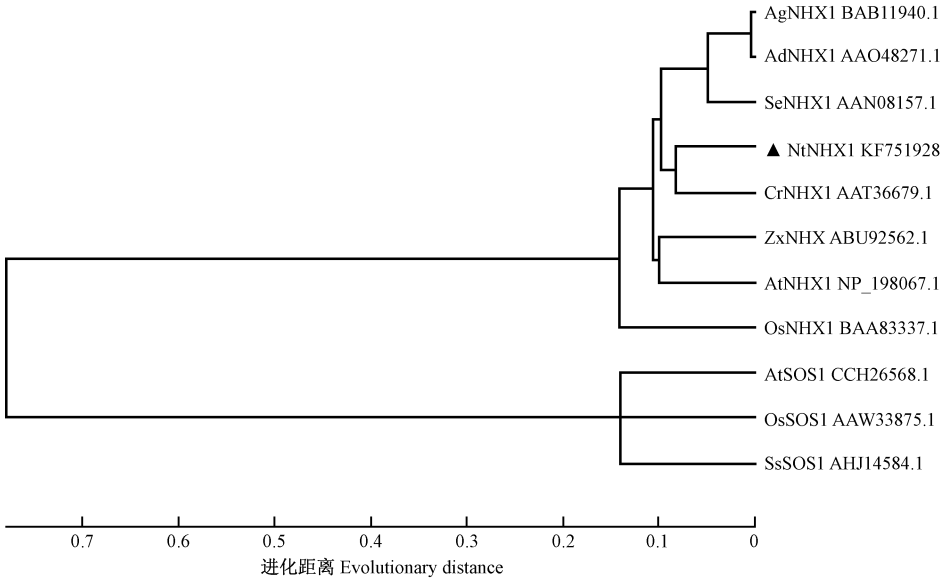

图 2 几种植物 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的系统进化关系分析

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of Na^+/H^+ antiporters from various plant species

Ss：盐地碱蓬 *Suaeda salsa*.

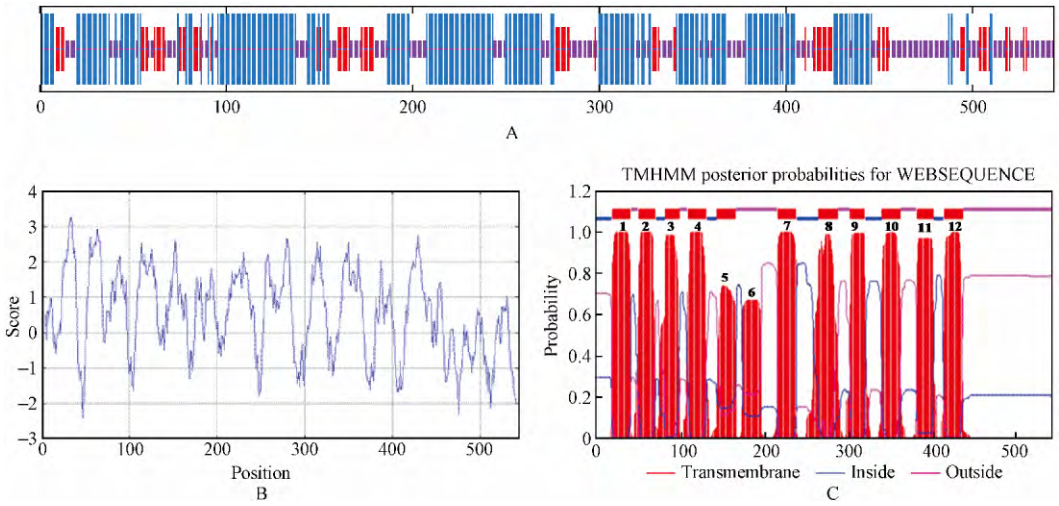

图 3 唐古特白刺 NtNHX1 蛋白的生物信息学分析

Fig. 3 Bioinformatics analysis of NtNHX1 protein in *Nitraria tangutorum*

A. 二级结构预测；B. 疏水性分析；C. 跨膜结构分析。A. Secondary structure prediction；B. Hydrophobicity analysis；C. Transmembrane structure prediction of the antiporter protein NtNHX1.

2.3 盐胁迫下唐古特白刺 *NHX1* 基因的表达分析

以小果白刺 *Actin* 基因为内参照，采用荧光定量 PCR 检测正常生长条件下唐古特白刺不同器官中 *NtNHX1* 的表达，结果(图 4A)表明，*NtNHX1* 在不同器官中均有表达，且在叶片中的表达量显著高于茎和根。为探究唐古特白刺 *NHX1* 基因是否受盐诱导和调节，检测了 200 $mmol \cdot L^{-1}$ NaCl 胁迫 1，3，6，12，24，48 h 时叶片中 *NtNHX1* 的表达水平。结果显示随着盐胁迫时间的延长，唐古特白刺 *NHX1* 基因在叶片中表达量持续增加，胁迫 12 h 时表达量与对照相比增加了 3 倍，而后逐渐减弱，从图中还可以看出盐分处理 3 h 时 *NtNHX1* 基因的表达量也迅速升高(图 4B)。这些结果说明 *NtNHX1* 可能在唐古特白刺的耐盐机制中发挥重要作用。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

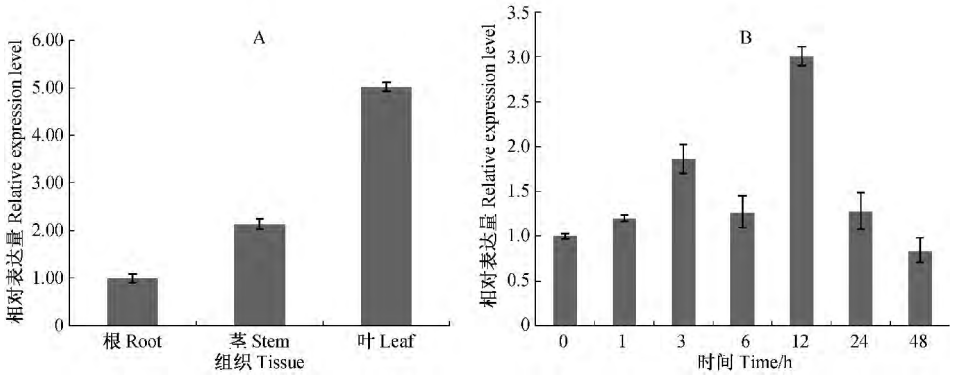

图 4　唐古特白刺 *NtNHX1* 基因的相对表达量分析

Fig. 4　Analysis of relative expression level of *NtNHX1* in *Nitraria tangutorum*

A. 不同组织中 *NtNHX1* 基因的相对表达量; B. NaCl 胁迫下唐古特白刺叶片中 *NtNHX1* 基因的相对表达量。

A. Relative expression level of *NtNHX1* in different tissues; B. Expression of *NtNHX1* in the leaf under NaCl stress.

3　讨论

本研究首次从唐古特白刺中克隆到 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *NtNHX1*，对其核酸序列所翻译的蛋白序列预测发现含有 12 个跨膜区域，这与已报道的动植物 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的跨膜区域数目(10 ~ 12)一致且与其他逆向转运蛋白的跨膜区高度同源。NtNHX1 蛋白的高度保守区包括 1 个特殊的序列 LFFIYLLPPI，该序列在哺乳动物中被鉴定是真核生物 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白抑制剂氨氯吡嗪脒的结合位点(Hamada *et al.*, 2001)。另外，NtNHX1 与来源于植物的质膜型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 SOS1 的亲缘关系较远，表明研究中所克隆到基因是液泡型的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因，其功能可能是跨液泡膜运输 Na^+，并在液泡内积累。NtNHX1 系统发育分析表明 NtNHX1 与柑橘 CrNHX1 亲缘关系最近，而与水稻 OsNHX1 亲缘关系较远，表明植物 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白在进化上具有多样性，这种差异在单子叶与双子叶植物之间更为明显(马清等, 2011)。

大量研究表明，液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白具有将胞质中过多的 Na^+ 区域化到液泡的功能，并且 NaCl 能调控其基因的表达(Apse *et al.*, 1999; Hamada *et al.*, 2001; Fukuda *et al.*, 2004)。本研究结果表明唐古特白刺 *NtNHX1* 表达具有组织的差异性并受盐胁迫的诱导和调控。与拟南芥 *AtNHX1*(Apse *et al.*, 1999)、盐地碱蓬 *SsNHX1*(Ma *et al.*, 2004)、陆地棉 *GhNHX1*(Wu *et al.*, 2004)的表达模式相似，正常生长条件下的 *NtNHX1* 基因在唐古特白刺的根、茎、叶中都有表达，且在叶中的表达量最高(是根中的 5 倍)，表明 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白在植物生长和发育方面发挥着重要作用。基于 *NtNHX1* 在唐古特白刺中的组织表达情况，本试验开展了高浓度盐(200 mmol·L^{-1})处理下叶片 *NtNHX1* 的表达分析，在短期盐分处理(3 h)后，*NtNHX1* 基因的表达量明显上升，与同为蒺藜科植物的霸王 *ZxNHX* 的表达相似(伍国强, 2008)，说明唐古特白刺可能存在与霸王相似的信号传递机制，在受到盐分胁迫时能快速感受盐分胁迫信号并向地上器官快速传递，进而启动 *NtNHX1* 特异性表达的信号转导系统。在盐处理 12 h 时 *NtNHX1* 的表达量最大，而后呈逐渐下降趋势，24 h 时接近 NaCl 处理前水平，48 h 时明显低于处理前水平。这一研究结果与碱地肤(*Kochia sieversiana*) *KsNHX1*(付寅生等, 2012)、霸王 *ZxNHX*(伍国强, 2008)、番杏(*Tetragonia tetragonioides*) *TtNHX1*(吕慧颖等, 2004)的报道相一致。

植物将 Na^+ 区隔化至液泡以适应盐胁迫的过程中，液泡膜上 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白(NHX)起着重要作用。之前的研究已经表明 *AtNHX1* 敲除的拟南芥突变体和 *LeNHX2* 基因沉默的番茄都变得对盐胁迫更加敏感(Rodríguez-Rosales *et al.*, 2008)。众多研究表明在多种植物中超表达 *AtNHX1* 或其他植物 *NHX* 亚型都能明显增加植物的耐盐性(Apse *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2001; Pardo *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008)。唐古特白刺为盐生植物，耐盐能力极强，*NtNHX1* 基因与非盐生植物中的同源基因(如 *AtNHX1*)在功能上是否存在差异还有待研究。在后续研究中，本研究组将构建 *NtNHX1* 的植物表达载体，并对模式植物和唐古特白刺进行遗传转化，从而对 *NtNHX1* 的功能进行深入研究。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

参 考 文 献

付寅生,崔继哲,陈广东,等. 2012. 盐碱胁迫下碱地肤 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *KsNHX1* 表达分析. 应用生态学报,23(6): 1629-1634.

高 暝,李 毅,种培芳,等. 2011. 渗透胁迫下不同地理种源白刺的生理响应. 草业学报, 20(3): 99-107.

吕慧颖,李银心,陈 华,等. 2004. 番杏 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的克隆与特性分析. 高技术通讯,14(11):26-31.

刘瑛心. 1987. 中国沙漠植物志. 北京: 科学出版社, 303-306.

马 清,包爱科,伍国强,等. 2011. 质膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白与植物耐盐性. 植物学报,46(2): 206-215.

倪建伟, 武 香, 张华新, 等. 2012. 3 种白刺耐盐性的对比分析. 林业科学研究,25(1): 48-53.

王镜泉. 1989. 白刺属植物的分类分布及其生物生态学特性研究. 干旱造林研究,(2): 47-63.

王秀娟,杨会青. 2010. 盐碱胁迫下西伯利亚白刺的渗透调节物质的变化. 热带农业科学,30(2): 34-36.

伍国强. 2008. 多浆旱生植物霸王液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的克隆与表达. 兰州: 兰州大学硕士学位论文.

严一诺,孙淑斌,徐国华,等. 2007. 菊芋 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的克隆与表达分析. 西北植物学报,27(7): 1291-1298.

闫永庆,刘兴亮,王 崑,等. 2010. 白刺对不同浓度混合盐碱胁迫的生理响应. 植物生态学报,34(10): 1213-1219.

杨秀艳,张华新,张 丽,等. 2013. NaCl 胁迫对唐古特白刺幼苗生长及离子吸收、运输与分配的影响. 林业科学,49(9): 165-171.

张雨良,张智俊,杨峰山,等. 2009. 新疆盐生植物车前 *PmNHX1* 基因的克隆及生物信息学分析. 中国生物工程杂志,29(1): 27-33.

张智俊,杨 洋. 2011. 毛竹液泡膜 Na^+/H^+ 逆向运输蛋白基因克隆及表达分析. 农业生物技术学报, 19(1):69-76.

Apse M P, Aharon G S, Snedden W A, *et al*. 1999. Salt tolerance conferred by over expression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter in *Arabidopsis*. Science, 285(4): 1256-1258.

Apse M P, Sottosanto J B, Blumwald E. 2003. Vacuolar cation/H^+ exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of AtNHX1, the *Arabidopsis* vacuolar Na^+/H^+ antiporter. Plant Journal, 36(2): 229-239.

Barkla B J, Pantoja O. 1996. Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 47(1):159-184.

Chen L H, Zhang B, Xu Z Q. 2008. Salt tolerance conferred by overexpression of *Arabidopsis* vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene *AtNHX1* in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). Transgenic Research, 17(1): 121-132.

Fukuda A, Nakamura A, Tagiri A, *et al*. 2004. Function, intracellular localization and the importance in salt-tolerance of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter from rice. Plant and Cell Physiology, 45(2): 146-159.

Gaxiola R A, Li J, Undurraga S, *et al*. 2001. Drought-and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H^+-pump. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98(20): 11444-11449.

Geourjon C, Deleage G. 1995. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. Computer Applications in the Biosciences: CABIOS, 11(6): 681-684.

Hamada A, Shono M, Xia T, *et al*. 2001. Isolation and characterization of a Na^+/H^+ antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelini*. Plant Molecular Biology, 46(1):35-42.

Kronzucker H J, Britto D T. 2011. Sodium transport in plants: a critical review. New Phytologist, 189(1): 54-81.

Ma X L, Zhang Q, Shi H Z, *et al*. 2004. Molecular cloning and different expression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene in *Suaeda salsa* under salt stress. Biologia Plantarum, 48(2): 219-225.

Pardo J M, Cubero B, Leidi E O, *et al*. 2006. Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. Journal of Experimental Botany, 57(5): 1181-1199.

Rausch T, Kirsch M, Low R, *et al*. 1996. Salt stress responses of higher plants: The role of proton pumps and Na^+/H^+ antiporters. Journal of Plant Physiology, 148(3): 425-433.

Rubio F, Gassmann W, Schroeder J I. 1995. Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. Science, 270(5242):1660-1662.

Rodríguez-Rosales M P, Jiang X, Gálvez F J, *et al*. 2008. Overexpression of the tomato K^+/H^+ antiporter LeNHX2 confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization. New Phytologist, 179(2): 366-377.

Wu C X, Gao X H, Kong X Q, *et al*. 2009. Molecular cloning and functional analysis of a Na^+/H^+ antiporter gene *ThNHX1* from a halophytic plant *Thellungiella halophila*. Plant Molecular Biology, 27(1):1-12.

Wu C A, Yang G D, Meng Q W, *et al*. 2004. The cotton *GhNHX1* gene encoding a novel putative tonoplast Na^+/H^+ antiporter plays an important role in salt stress. Plant and Cell Physiology, 45(5): 600-607.

Yoshida K, Kawachi M, Mori M, *et al*. 2005. The involvement of tonoplast proton pumps and $Na^+(K^+)/H^+$ exchangers in the change of petal color during flower opening of morning glory, *Ipomoea tricolor* cv. Heavenly Blue. Plant and Cell Physiology, 46(3): 407-415.

Zhang H X, Blumwald E. 2001. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. Nature. Biotechnology, 19(8): 765-768.

Zörb C, Noll A, Karl S, *et al*. 2005. Molecular characterization of Na^+/H^+ antiporters (*ZmNHX*) of maize (*Zea mays* L.) and their expression under salt stress. Journal of Plant Physiology, 162(1): 55-66.

(责任编辑 徐 红)

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net