

Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因 *PsnhaA* 的克隆 及在大豆中的功能验证

罗茜¹, 张海玲², 徐香玲¹, 姚琳¹, 王全伟¹

(1. 哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院/黑龙江省分子细胞遗传与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150025; 2. 黑龙江省农业科学院, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 高盐对作物造成渗透胁迫和离子毒害, Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白是生物耐盐的关键因子, 能够维持高盐胁迫下生物体的正常生长代谢。为促进作物的遗传转化, 选育耐盐作物品种, 从施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*) 中克隆质膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因 *PsnhaA*, 并构建到植物表达载体 pBI121 上, 通过发根农杆菌介导的整株生长点注射法转化大豆。结果表明: *PsnhaA* 基因已整合到转化大豆基因组中, 并在转录水平获得表达。耐盐相关生理指标检测结果显示, 盐胁迫后转基因植株的质膜相对电导率显著低于对照植株, 叶绿素含量和脯氨酸含量显著高于对照植株。*PsnhaA* 基因显著提高了大豆的耐盐水平, 为农作物的耐盐性改良提供了优良的候选基因。

关键词: Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白; 克隆; 大豆; 遗传转化

中图分类号: S567 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2015)05-0006-07 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.05.0006

盐胁迫是影响植物生长发育、产量和品质的主要逆境因子之一。目前, 全球盐碱地的面积约有 10 亿 hm², 严重制约了农业生产, 对生态环境和人类可持续发展造成严重危害^[1]。高盐对植物的影响主要表现在渗透胁迫^[2]、离子毒害^[3-4] 及其引起的一系列次级胁迫如氧化胁迫等^[5-7]。植物通过 Na⁺ 的吸收、外排和区隔化等方式来抵御盐害^[8]。Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白是维持高盐胁迫下植物体内离子平衡的关键因子, 它是普遍存在于生物体内的一种膜蛋白, 分为质膜型和液泡膜型两种, 分别利用质膜 H⁺-ATPase 或液泡膜 H⁺-ATPase 及 H⁺-PPiase 建立的跨膜 H⁺ 质子梯度为驱动力, 把 Na⁺ 排出细胞或区隔化入液泡中, 以维持细胞内 Na⁺ 的平衡和细胞器不被破坏^[9]。质膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白是目前唯一一种介导 Na⁺ 外排的质膜整合蛋白, 首次在粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 中被克隆, 随后

相继在啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、鲁氏接合酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*)、集胞藻 (*Synechocystis* sp. PCC 6803) 和蓝藻 (*Synechococcus* sp. PCC 7942) 中克隆到该编码基因^[10]。

植物中质膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白 (NHA 或 SOS1) 的活性首先在大麦 (*Hordeum vulgare*) 中被发现^[11], 已从多种植物中克隆到该基因, 包括拟南芥 (*AtSOS1*)^[12]、水稻^[13-14]、番茄 (*LeSOS1*)^[15]、黎麦 (*CqSOS1*)^[16]、胡杨 (*PeSOS1*)^[17]、星星草 (*PtSOS1*)^[18]、盐芥 (*ThSOS1*)^[19]、海蓬子 (*SbSOS1*)^[20]、盐地碱蓬 (*SsSOS1*)^[21]、冰叶日中花 (*McSOS1*)^[22] 等, 并证实转 SOS1 基因能显著提高植株的耐盐性^[23]。

原核细胞中 Na⁺ 的代谢主要依靠质膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白, 已分离的细菌 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因有 *nhaA*、*nhaB*^[24-25]、*nhaC*^[26]、*nhaD*^[27]、*napA*^[28]、*nhaP*^[29]。*nhaA* 是细菌 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因中的一个家族, 最早是在大肠杆菌中克隆的^[30], 随后相继从不同的生物体中也克隆得到 *nhaA* 基因, 如肠炎沙门氏菌、副溶血性弧菌、溶藻弧菌等。

本研究将从施氏假单胞菌 (*pseudomonas stutzeri*) 中克隆的质膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因 *PsnhaA* 与高效组成型启动子 CaMV35S 融合, 构建成植物表达载体, 通过农杆菌介导的整株

收稿日期: 2014-12-25

基金项目: 黑龙江省自然科学基金重点资助项目 (ZD 201003); 哈尔滨市科技创新人才研究专项资金资助项目 (RC2013QN002103); 黑龙江省教育厅科学技术研究资助项目 (125111154); 哈尔滨师范大学博士科研启动基金资助项目 (KGB200903)

第一作者简介: 罗茜 (1992-), 女, 黑龙江省龙江县人, 学士, 从事基因工程方面的相关研究。E-mail: luqian1992@126.com。

通讯作者: 王全伟 (1978-), 女, 博士, 副教授, 从事植物分子遗传学与基因工程研究。E-mail: wqw125@126.com。

转化法导入大豆中,以鉴定该基因能否在高等植物中进行正常表达并提高转基因植株的耐盐性,希望获得一个能够广泛应用于作物耐盐品质改良的优良基因,为进一步利用该基因进行作物的遗传转化、获得耐盐作物新品种奠定基础,同时也为研究该基因在真核细胞中的表达调控机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

遗传转化采用大豆品种合丰 50,由黑龙江省农业科学院提供;施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)、大肠杆菌 JM109、农杆菌 R1000、植物表达载体 pBI121 由本实验室保存;pMD18-T 载体购自 Takara。

1.2 方法

1.2.1 *PsnhaA* 基因的克隆 根据 GenBank 中收录的 *nhaA* 基因的保守区序列,利用 Primer Premier5.0 软件设计引物 *PsnhaA*-1 和 *PsnhaA*-2。以施氏假单胞菌基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环;然后 72℃ 延伸 10 min。将 PCR 产物连接至 pMD18-T 载体中,转化大肠杆菌 JM109,提取阳性质粒进行 *Xba* I / *Sac* I 双酶切鉴定和基因的序列测定。

PsnhaA-1:5'-CGTCTAGAATGAAACATC TGCATCGA-3'(带 *Xba* I 酶切位点);*PsnhaA*-2:5'-TGAGCTCTCAAAGTATGGACGCAA-3(带 *Sac* I 酶切位点)。

1.2.2 植物表达载体的构建 分别对含目的基因的质粒 pMD-*PsnhaA* 和植物表达载体 pBI121 用 *Xba* I / *Sac* I 进行双酶切,琼脂糖凝胶电泳后分别回收 *PsnhaA* 基因片段和 pBI121 载体片段,用 T₄ DNA 连接酶于 16℃ 过夜连接。利用热激法将连接产物转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞,在含有 50 mg·L⁻¹ Kan 的 LB 培养基上筛选,挑取抗性菌落,提取质粒用 *Xba* I / *Sac* I 双酶切鉴定,获得超量表达载体 pBI-*PsnhaA*。

1.2.3 大豆的遗传转化 通过冻融法将重组载体 pBI-*PsnhaA* 转化到发根农杆菌 R1000 中。选取成熟饱满的大豆种子,用水浸泡吸胀 2 h 后播种于蛭石中。待两片子叶刚刚张开时,用 1 mL 无菌注射器吸取制备好的农杆菌 R1000 菌体悬

液(OD₆₀₀ = 0.5~0.6,附加 100 μmol·L⁻¹ 乙酰丁香酮)进行生长点注射,7 d 后重复注射一次,每天用 Hoagaland 营养液浇灌培养。

1.2.4 转化植株的鉴定 待植株长至 3~4 片以上复叶后,提取对照植株和转化大豆基因组 DNA,用目的基因引物 *PsnhaA*-1 和 *PsnhaA*-2 进行 PCR 检测。将 PCR 阳性植株转至土壤基质中继续培养至成熟后收获 T₀ 种子,播种,对 T₁ 植株进行 PCR 检测。提取对照植株和 T₁ PCR 阳性植株总 RNA,反转录成 cDNA 后进行 RT-PCR 检测。

1.2.5 转化植株的耐盐性分析 将 T₁ 阳性大豆植株和对照植株移入含有 200 mmol·L⁻¹ NaCl 的 Hoagaland 营养液中胁迫处理 48 h,然后剪取叶片测定相对电导率、叶绿素含量、游离脯氨酸含量等生理指标^[31],每个指标重复测定 3 次,根据平均值进行分析。

2 结果与分析

2.1 *PsnhaA* 基因的生物信息学分析

用引物 *PsnhaA*-1 和 *PsnhaA*-2 从假单胞菌基因组中扩增出 1 167 bp 的目的 DNA 片段(见图 1)。该产物与 pMD18-T 载体连接产生的重组质粒经 *Xba* I / *Sac* I 酶切鉴定后(见图 2),对基因进行序列测定,证明该基因是施氏假单胞菌 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因 *nhaA*(GenBank 登录号为 EU545468),命名为 *PsnhaA*。用 DNAMAN 软件预测编码蛋白的等电点为 9.44,分子量为 41.3 kD。疏水性分析结果表明,该蛋白中含有多个疏水性区域,几乎遍布整个蛋白结构中,其中 N 端疏水性最强,C 端有一短的亲水尾部(见图 3)。

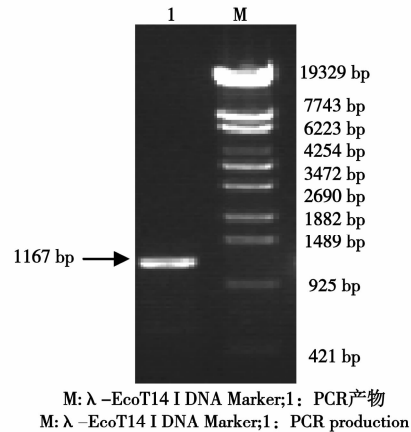
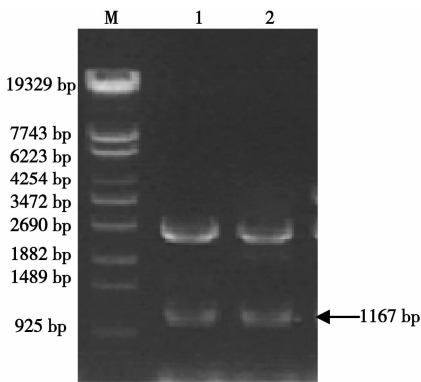


图 1 PCR 扩增 *PsnhaA* 基因
Fig. 1 PCR amplification of *PsnhaA* gene



M: λ-EcoT14 I DNA Marker;1: 质料酶切产物
M: λ-EcoT14 I DNA Marker;1: pMD-nhaA
digested with XbaI and SacI product

图 2 质粒 pMD-*PsnhaA* 的酶切鉴定

Fig. 2 Digestion identification of pBI-*PsnhaA*

二级结构分析显示,该蛋白的二级结构中螺旋结构(Helices)(50.5%)和卷曲结构(Coils)(33.0%)构成了该蛋白质二级结构的骨架(见图 4),这种结构特征利于蛋白质疏水性跨膜结构域的形成,从而与 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白跨膜转运 Na^+ 功能相适应。对该蛋白质与来源于不同细菌的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 *PsnhaA* 进行系统发育分

析,结果表明,*PsnhaA* 基因与肠杆菌科的大肠杆菌(*E. coli*)、志贺氏痢疾菌(*S. dysenteriae*)的 *nhaA* 亲缘关系最近,与来源于假单胞菌菌株 *P. sp. cn4902* 的 *nhaA* 亲缘关系稍次之,而与来源于假单胞菌属的恶臭假单胞菌(*P. putida*)、荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)、丁香假单胞菌(*P. syringae*)亲缘关系却很远(见图 5)。可见 *nhaA* 基因在假单胞菌属的不同种间差异较大。本研究克隆的 *PsnhaA* 基因是施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)*nhaA* 基因家族的成员之一,与大肠杆菌 *nhaA* 的同源性较高,推测是 *PsnhaA* 基因在进化过程中逐渐趋同于大肠杆菌 *nhaA* 基因,产生与大肠杆菌 *NhaA* 相同或相似的功能。

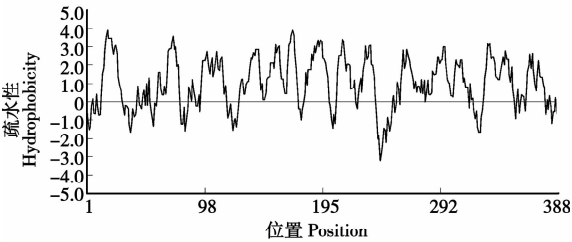


图 3 *PsnhaA* 基因编码产物的疏水性分布
Fig. 3 Hydrophobicity profile of *PsnhaA* gene product

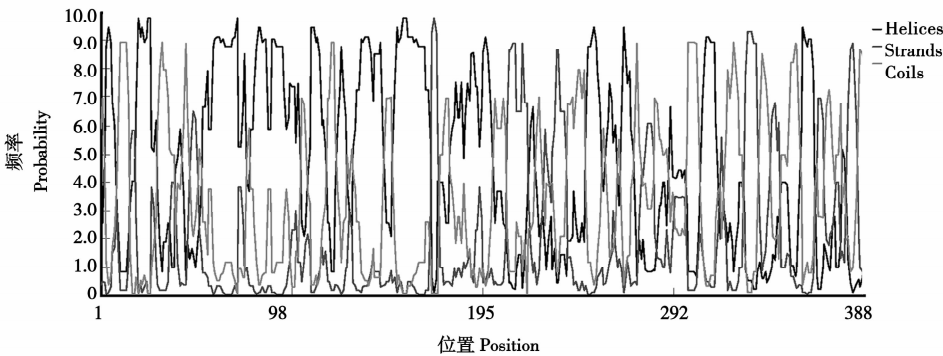


图 4 *PsnhaA* 基因编码产物的二级结构
Fig. 4 Secondary structure of *PsnhaA* gene product

2.2 植物表达载体的构建及对农杆菌的转化

将经 *Xba* I /*Sac* I 双酶切后回收的目的基因 *PsnhaA* 和载体 pBI121 连接成重组质粒,转化大肠杆菌 JM109 后 Kan 抗性筛选培养,挑取阳性单菌落提取质粒,经 *Xba* I /*Sac* I 双酶切后进行凝胶电泳分析,切出 1 167 bp 的目的基因条带(见图 6),表明植物表达载体构建成功,命名为 pBI-*PsnhaA*。通过冻融法将该重组载体转化发根农杆菌 R1000 感受态细胞,提取质粒,经 PCR 鉴定证明获得阳性克隆(图略)。

2.3 转基因大豆植株的分子生物学鉴定

通过农杆菌介导的整株生长点注射转化法进行转化。以质粒 pBI-*PsnhaA* 作阳性对照,未转化植株作阴性对照,经 PCR 检测证明获得 10 株 T_0 PCR 阳性植株(见图 7),对其混合收种,播种于蛭石中, T_1 植株经 PCR 检测只有 1 株呈阳性(见图 8)。提取该植株总 RNA,反转录成 cDNA 后,用 *PsnhaA* 基因引物对其进行 PCR 扩增。电泳结果显示,扩增得到 1 167 bp 的特异基因条带(见图 9),表明导入大豆的 *PsnhaA* 基因已在转录水平获得表达。

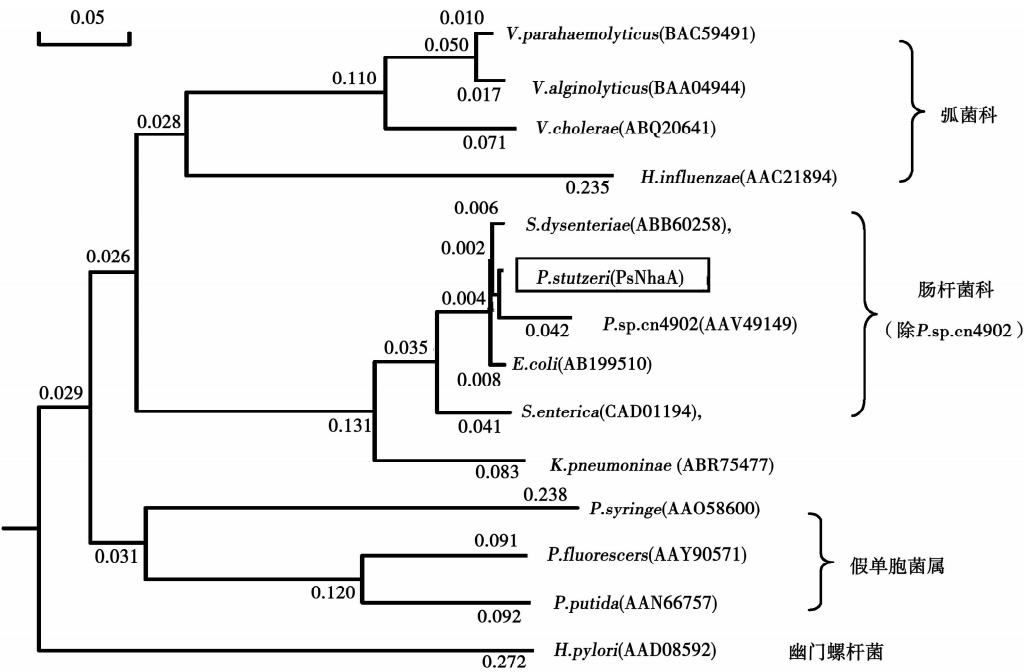


图 5 *PsnhaA* 基因蛋白产物的系统发育分析
Fig. 5 Phylogenetic development analysis of *PsnhaA* gene product

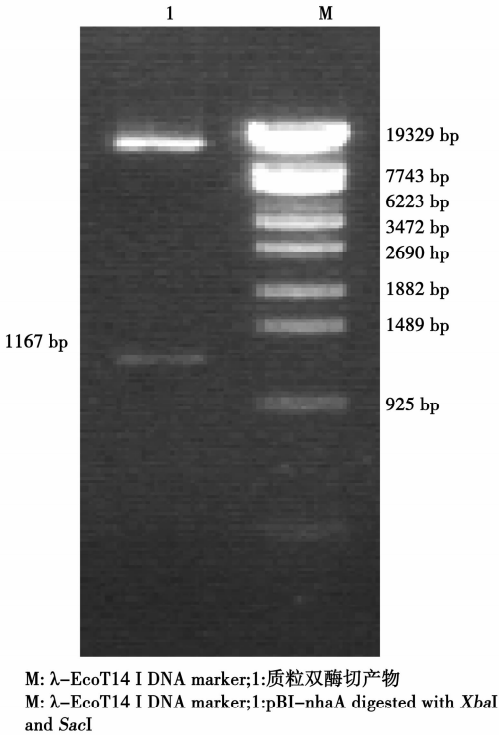


图 6 重组质粒 *pBI-nhaA* 的酶切鉴定
Fig. 6 Identification of recombinant plasmid *pBI-nhaA* digested with *Xba*I and *Sac*I

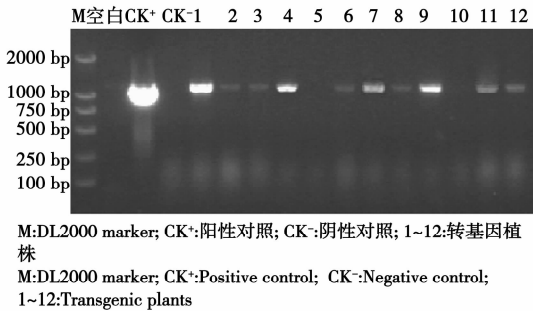


图 7 *T₀* 转基因植株的 PCR 鉴定
Fig. 7 PCR identification of *T₀* transgenic plants

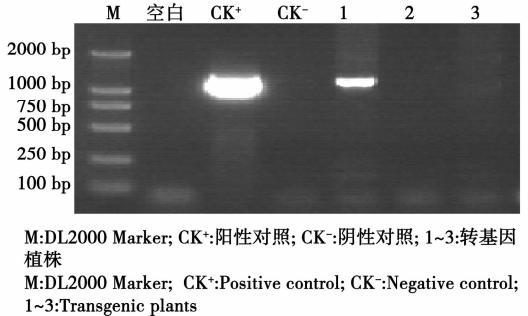


图 8 *T₁* 转基因植株的 PCR 鉴定
Fig. 8 PCR identification of *T₁* transgenic plants

2.4 转基因大豆植株的耐盐生理指标检测

T₁ 转基因植株和对照植株经 200 mmol·L⁻¹ NaCl 胁迫处理后,选取 3 个盐胁迫相关的生理指

标进行测定,结果显示,转基因植株和对照植株在盐胁迫前后质膜相对电导率、叶绿素含量和脯氨酸含量均无显著差异;盐胁迫后,各指标均表现出显著差异:质膜相对电导率均较胁迫前升高,但转

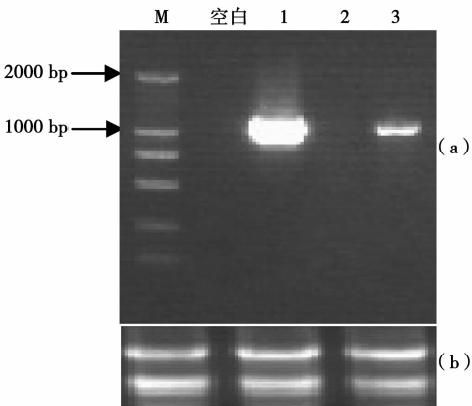


图 9 T₁转基因植株的 RT-PCR 鉴定

Fig. 9 RT-PCR identification of T₁ transgenic plants

基因植株显著低于对照,膜受损伤程度小;叶绿素含量均较胁迫前下降,但转基因植株下降缓于对照,是对照的 2.14 倍,转基因植株具有更稳定的光合系统;脯氨酸含量均升高,但转基因植株显著高于对照,是对照的 2.36 倍,转基因植株具有更强的渗透调节能力。生理指标检测结果表明 *PsnhaA* 基因在大豆中的表达提高了大豆的耐盐能力。

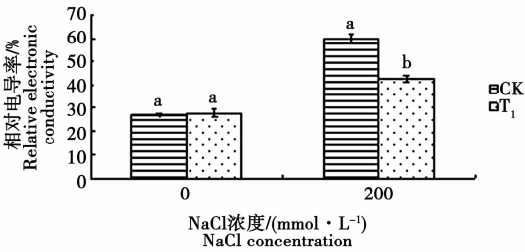


图 10 转基因植株的相对电导率

Fig. 10 The relative electronic conductivity of transgenic plants

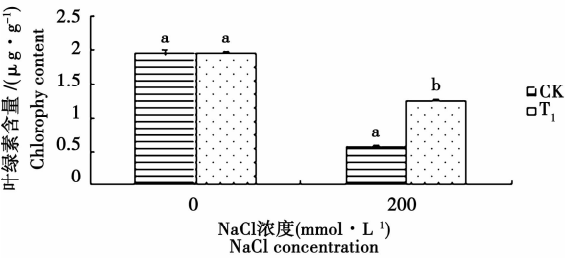


图 11 转基因植株的叶绿素含量

Fig. 11 The chlorophyll content of transgenic plants

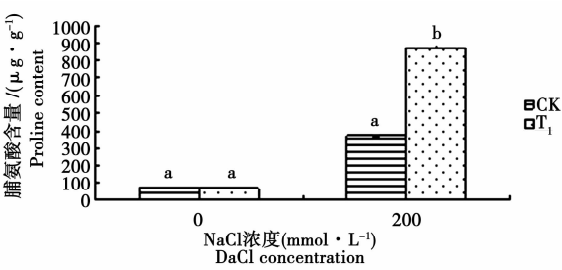


图 12 转基因植株的脯氨酸含量

Fig. 12 The proline content of transgenic plants

3 结论与讨论

高盐对植物的毒害作用一方面体现在,盐胁迫使植物被迫吸收过量 Na⁺ 离子,导致活性氧的产生和修复系统的破坏,造成膜脂或膜蛋白过氧化,质膜透性增加,胞内容物外渗,植物表现出盐害特征。另一方面,高盐使植物由于生理干旱而细胞失水,造成渗透胁迫,植物根系吸水困难,从而因水分亏缺生长受到抑制。植物可以通过离子的跨膜运输和区隔化来抵御盐害。Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白是植物完成 Na⁺ 外排和区隔化的主要载体蛋白。通过基因工程手段向植物中导入 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因,能够显著提高植物的耐盐性,获得真正意义上的耐盐新品种。

在细菌中质膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白的作用主要表现在四个方面:①建立 Na⁺ 穿过细胞质膜的电化学势,这种电化学势是与 Na⁺ 偶联进程的驱动力,也是由 Na⁺ 驱动的鞭毛相变的驱动力^[32];②排出细胞中积累的较高浓度的 Na⁺ 和 Li⁺,以减轻细胞的离子毒害^[33-34];③在碱性条件下调控细胞内的 pH^[35];④调节细胞体积,维持细胞渗透压^[35]。

本研究对克隆的施氏假单胞菌质膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因 *PsnhaA* 在大豆植株中进行了 DNA 水平导入、RNA 水平转录及蛋白水平表达情况的分析,结果表明,*PsnhaA* 基因已经整合到大豆基因组中,并能够正常转录,其表达产物赋予了大豆植株一定的耐盐性,主要体现在盐胁迫下耐盐相关生理指标的变化。植物在逆境胁迫下的相关生理指标的变化,可以反映植株对逆境胁迫的响应和植株的整体抗逆性。本研究只测定了 3 个盐胁迫相关的生理指标,虽然不能全面反映出转基因植株的耐盐水平,但可以初步判定 *PsnhaA* 基因能否提高植物的耐盐能力。选择的 3 个生理指标分别是质膜相对电导率、叶绿素含

量和游离脯氨酸含量。相对电导率反映质膜的受损程度,其值越小,质膜破坏程度越低;叶绿素是植物光系统中吸收、捕捉、传递光能的重要的色素分子,是衡量植物耐盐性的重要指标之一。盐害会使叶绿体趋于分解,同时提高叶绿素酶的活性,造成叶绿素降解,光合效率下降,植物生长受到抑制^[36]。

叶绿素含量越高,即表明叶绿体和光系统完整性越好,光合作用越强,植株抗逆性越强;植物为了适应高盐引起的渗透胁迫细胞通过从外界吸收无机离子和自身合成有机小分子物质作为渗透调节剂,降低细胞水势,保证自身的生理需要^[37]。脯氨酸是盐胁迫下易于积累的一种渗透调节剂,它的积累有利于提高植物对逆境的抵抗能力,并且其积累量和耐盐性之间存在一定的线性关系。本研究对 T₁转基因植株和对照植株的 3 个盐胁迫相关生理指标的测定结果显示,盐胁迫后,转基因植株质膜相对电导率显著低于对照,叶绿素和脯氨酸含量显著高于对照,来自于施氏假单胞菌的质膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因 *PsnhaA* 能够提高大豆的耐盐能力,推测其作用机制可能是通过 Na⁺ 的外排,维持了细胞内环境的相对稳态,同时激活了一系列盐诱导相关基因,共同维持了胞内的离子平衡和渗透平衡。

参考文献:

- [1] Li J, Jia H, Wang J, et al. Hydrogen sulfide is involved in maintaining ion homeostasis via regulating plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter system in the hydrogen peroxide-dependent manner in salt-stress *Arabidopsis thaliana* root[J]. Protoplasma, 2013(7): 899-912.
- [2] Zhu J K. Plant salt tolerance[J]. Trends Plant Science, 2001, 6(2): 66-71.
- [3] Chen S L, Li J K, Wang S S, et al. Effects of NaCl on shoot growth, transpiration, ion compartmentation, and transport in regenerated plants of *Populus euphratica* and *Populus tomentosa*[J]. Canadian Journal of Forest Research, 2003, 33 (6): 967-975.
- [4] Ma L, Zhang H, Sun L, et al. NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* function in ROS-dependent regulation of Na⁺/K⁺ homeostasis in *Arabidopsis* under salt stress[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63 (1): 305-317.
- [5] Hasegawa P M, Bressan R A, Zhu J K, et al. Plant cellular and molecular responses to high salinity[J]. Annual Reviews Plant Physiol Plant Mol Biol, 2001, 51: 463-499.
- [6] Krauke Y, Sychrova H. Functional comparison of plasma-membrane Na⁺/H⁺ antiporters from two pathogenic *Candida* species[J]. BMC Microbiol, 2008, 8(1): 80.
- [7] Sun J, Wang M J, Ding M Q, et al. H₂O₂ and cytosolic Ca²⁺

- signals triggered by the PM H-coupled transport system mediate K⁺/Na⁺ homeostasis in NaCl-stressed *Populus euphratica* cells[J]. Plant Cell Environ, 2010, 33 (6): 943-958.
- [8] Niu X, Bressan R A, Hasegawa P M, et al. Ion homeostasis in NaCl stress environments[J]. Plant Physiology, 1995, 109: 735-742.
- [9] Maeshima M. Tonoplast transporters: organization and function[J]. Annu Rev Plant Physiol and Plant Mol Biol, 2001, 52: 469-479.
- [10] 马清, 包爱科, 伍国强, 等. 质膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白与植物耐盐性[J]. 植物学报, 2011, 46 (2): 206-215.
- [11] Ratncr A, Jacoby B. Effect of K⁺ its counter anion and pH on sodium efflux from barley root tips[J]. Journal of Experimental Botany, 1976, 27(5): 813-852.
- [12] Shi H, Ishitani M, Kim C, et al. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter[J]. PNAS USA, 2000, 97(12): 6896-6901.
- [13] Martincz-Atienza J, Jiang X Y, Uarciadeblas B, et al. Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice[J]. Plant Physiology, 2007, 143(2): 1001-1012.
- [14] Zhou G A, Jiang Y, Yang Q, et al. Isolation and characterization of a new Na⁺/H⁺ antiporter gene *OsNHA1* from rice (*Oryza sativa* L.) [J]. DNA Seq, 2006, 17(1): 24-30.
- [15] Olias R, Eljakaoui G, Li J, et al. The plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of Na⁺ between plant organs[J]. Plant Cell and Environment, 2009, 32 (7): 904-916.
- [16] Maughan P J, Turner T B, Coleman C E, et al. Characterization of Salt Overly Sensitive (SOS1) gene homoeologs in quinoa (*Chenopodium quinoa* Wild.) [J]. Genome, 2009, 52: 617-657.
- [17] Wu Y X, Ding N, Zhao X, et al. Plant Molecular Biology Molecular characterization of *PeSOS1*: the putative Na⁺/H⁺ antiporter of *Populus euphratica* [J]. Plant Molecular Biology, 2007, 65: 1-11.
- [18] Kobayashi S, Abe N, Yoshida K T, et al. Molecular cloning and characterization of plasma membrane and vacuolar-type Na⁺/H⁺ antiporters of an alkaline-salt-tolerant monocot, *Puccinellia tenuiflora* [J]. Journal of Plant Research, 2012, 125: 587-594.
- [19] Wu C, Gao X, Kong X, et al. Molecular cloning and functional analysis of a Na⁺/H⁺ antiporter gene *ThNHX1* from a halophytic plant *Thellungiella halophila* [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2009, 7(1): 1-12.
- [20] Yadav N S, Shukla P S, Jha A, et al. The *SbSOS1* gene from the extreme halophyte *Salicornia brachiata* enhances Na⁺ loading in xylem and confers salt tolerance in transgenic tobacco [J]. BMC Plant Biology, 2012, 12: 188.
- [21] 王生银, 马清, 王锁民. 盐生植物盐地碱蓬质膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因片段的克隆及其序列分析[J]. 草业科学, 2012, 29(6): 918-923.
- [22] Cosentino C, Fischer S E, Bertl A, et al. Na⁺/H⁺ antiporters are differentially regulated in response to NaCl stress in leaves

- and roots of *Mesembryanthemum crystallinum*[J]. New Phytologist, 2010, 186(3): 669-680.
- [23] Shi H, Lee B H, Wu S J, et al. Overexpression of a plasma membrane Na^+/H^+ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(1): 81-85.
- [24] Pinner E, Padan E, Schuldiner S. Cloning, sequencing, and expression of the *nhaB* gene, encoding a Na^+/H^+ antiporter in *Escherichia coli* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1992b, 267: 11064-11068.
- [25] Nakamura T, Enomoto H, Unemoto T. Cloning and sequencing of the *nhaB* gene encoding an Na^+/H^+ antiporter from *Vibrio alginolyticus* [J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1275: 157-160.
- [26] Ivey D M, Guffanti A A, Bossewitch J S, et al. Molecular cloning and sequencing of a gene from alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 that functionally complements an *Escherichia coli* strain carrying a deletion in the *nhaA* Na^+/H^+ antiporter gene [J]. Journal of Biological Chemistry, 1991, 266: 23483-23489.
- [27] Nozaki K, Kuroda T, Mizushima T, et al. A new Na^+/H^+ antiporter, NhaD, of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1369: 213-220.
- [28] Waser M, Hess B D, Davies K, et al. Cloning and disruption of a putative Na^+/H^+ antiporter gene of *Enterococcus hirae* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267: 5396-5400.
- [29] Utsugi J, Inaba K, Kuroda T, et al. Cloning and sequencing of a novel Na^+/H^+ antiporter gene from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1398: 330-334.
- [30] Karpel R, Ohuni Y, Taglicht D, et al. Sequencing of the gene which affects the Na^+/H^+ antiporter activity in *Escherichia coli* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1988, 263(21): 10408-10414.
- [31] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [32] Jackowski S, Alix J H. Cloning, sequence, and expression of the pantothenate permease (*panF*) gene of *Escherichia coli* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1990, 172: 3842-3848.
- [33] Inaba K, Kuroda T, Shimamoto T, et al. Lithium toxicity and $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{H}^+$ antiporter in *Escherichia coli* [J]. Biol Pharm Bull, 1994, 17: 395-398.
- [34] Nozaki K, Inaba K, Kuroda T, et al. Cloning and sequencing of the gene for Na^+/H^+ antiporter of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Biochem Biophys Resource Commun, 1996, 222: 774-779.
- [35] Padan E, Tzuberly T, Herz K, et al. NhaA of *Escherichia coli*, as a model of a pH regulated Na^+/H^+ antiporter [J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1658: 2-13.
- [36] 朱新广, 张其德. NaCl 对光合作用影响的研究进展 [J]. 植物学通讯, 1999, 16(4): 332-338.
- [37] 李彦, 张英鹏, 孙明, 等. 盐胁迫对植物的影响及植物耐盐机理研究进展 [J]. 中国农学通报, 2008, 24(1): 258-265.

Cloning of Na^+/H^+ Antiporter Gene *PsnhaA* and Analysis on Function in Soybean

LUO Qian¹, ZHANG Hai-ling², XU Xiang-ling¹, YAO Lin¹, WANG Quan-wei¹

(1. Key Laboratory of Molecular Cytogenetics and Genetic Breeding of Heilongjiang Province, College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025; 2. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: In order to promote crop genetic transformation, breed salt-tolerant crop varieties, the osmotic stress and ion toxicity caused by high salt is one of the major abiotic stress factors that affect the crop growth and development. Na^+/H^+ antiporter is the key factor in the salt-stress tolerance in organism. It can maintain normal growth and metabolism of organism under high salt stress. A plasma membrane Na^+/H^+ antiporter gene *nhaA* was cloned from *Pseudomonas stutzeri*, and the plant expression vector pBI121 was constructed. *PsnhaA* gene was transformed into soybean growing point via Agrobacterium-mediated transformation. The results showed that *PsnhaA* was integrated into the soybean genome, and could transcribed. Salt resistance analysis showed that the relative electronic conductivity of the transformed plants plasma membrane was significantly lower than that of the control under salt stress. While the content of chlorophyll and proline in the transformed plants were significantly higher than that in the controls. The expression of *PsnhaA* increased the salt stress tolerance of the transgenic soybean and provided excellent candidate genes for improving salt tolerance of crops.

Keywords: Na^+/H^+ antiporter gene; cloning; soybean; genetic transformation