

东方山羊豆液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因的克隆与分析

李鑫^{1,2}, 王赞², 王学敏², 高洪文^{1,2,*}, 陈小芳², 董洁², 徐博²

¹兰州大学草地农业科技学院, 兰州 730020; ²中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193

摘要: 采用 RT-PCR 及 RACE 的方法从东方山羊豆中克隆了一种新的 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因。该基因全长 2 280 bp, 开放阅读框为 1 626 bp, 编码 542 个氨基酸残基。预测该蛋白分子量为 60.0 kDa, 可能有 10 个跨膜区域。RT-PCR 检测结果表明, 在 NaCl 胁迫条件下东方山羊豆 *GoNHX1* 基因可在根、茎、叶中诱导表达, 在叶中的表达量随着处理时间的延长而逐渐增加, 到 24 h 表达量下降。

关键词: 东方山羊豆; Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白; *GoNHX1*; RACE

Cloning and Analysis of a Vacuolar Na⁺/H⁺ Antiporter Gene in *Galega orientalis*

LI Xin^{1,2}, WANG Zan², WANG Xue-Min², GAO Hong-Wen^{1,2,*}, CHEN Xiao-Fang², DONG Jie², XU Bo²

¹College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China; ²Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: The full length cDNA of a new vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene (*GoNHX1*) in *Galega orientalis* was cloned by RT-PCR and RACE. The data showed that the full length of *GoNHX1* gene was 2 280 bp, the open reading frame of *GoNHX1* was 1 626 bp and encoded a putative protein of 542 amino acid residues. The analysis showed that the putative protein was 60.0 kDa and had 10 potential transmembrane domains. RT-PCR results revealed that *GoNHX1* expression could be induced in the roots, stems and leaves by NaCl. The expression level of *GoNHX1* in leaves increased with the increasing of treatment time, but decreased after 24 h with the treatment of NaCl.

Key words: *Galega orientalis*; Na⁺/H⁺ antiporter; *GoNHX1*; RACE

盐胁迫是影响植物生长、降低农作物产量的主要逆境因素之一。盐对植物的伤害包括渗透胁迫和离子毒害两方面(Tester 和 Davenport 2003), 首先盐分所产生的土壤溶液低渗透势妨碍了植物对水分的吸收, 造成植物的“生理干旱”(Zhu 2001); 其次Na⁺的积累还导致其他营养物质的亏缺(Silberbush 和 Ben-Asher 2001)。为了能够适应高盐环境, 植物在进化过程中, 演化出3种机制来阻止过多的Na在胞液中积累, 即Na的外排、Na的区隔化和植物细胞对Na的选择性吸收。其中液泡内Na区隔化主要依赖于液泡膜上的Na⁺/H⁺逆向转运蛋白来完成。液泡具有较大的吸收面积和单层的膜结构, 因此相对于植物细胞内部其他结构, 液泡十分适合吸收离子(Apse 等 1999)。液泡膜Na⁺/H⁺逆向转运蛋白利用液泡膜上的H⁺-ATPase 和H⁺-PPiase建立的跨膜质子梯度为驱动力(Blumwald 2000), 并且液泡膜Na⁺/H⁺逆向转运蛋白上存在一段高度保守的氮氯吡嗪结合位点(LFFIYLLPPI), 这一结构域对液泡膜Na⁺/H⁺反向转运蛋白的底物竞争性抑制剂氮

氯吡嗪及其衍生物敏感, 负责将Na⁺运入液泡区隔化。

Blumwald 和 Poole (1985)最早在甜菜(*Beta vulgaris*)贮藏组织中发现液泡膜Na⁺/H⁺逆向转运蛋白。Fukuda 等(1999, 2004)从单子叶植物水稻中克隆得到了液泡膜型Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因, 并且该基因超表达的转基因水稻的耐盐性明显增强, 表明单一液泡膜Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因对于改造农作物的耐盐性状有显著的效果。

东方山羊豆(*Galega orientalis*)是一种多年生的豆科牧草, 品质好、产量高、抗病抗逆性强、使用年限长, 反刍家畜青饲食用不得臃胀病, 并具有促进奶牛泌乳等功能(张清斌等 2001)。广泛种植于俄罗斯、爱沙尼亚、白俄罗斯等国, 在北欧和

收稿 2009-01-04 修定 2009-03-16

资助 国家“973”项目(2007CB108905)和“十一五”科技支撑项目(2007BAD56B02; 2008BADB3B01)。

* 通讯作者(E-mail: gaohongwen@263.net; Tel: 010-62894560)。

加拿大等地也已开始种植(张自和 2002)。近年来我国将其引进,并在天山草甸草原区、阿尔泰山山前地带以及平原井灌区种植,生长发育良好(张清斌等 2001)。东方山羊豆在我国主要种植在西北地区,而这一地区有些地方的土壤盐碱化问题严重,因此研究东方山羊豆耐盐基因等方面的工作对扩大种植面积,改良盐碱土均可能有积极意义。本文旨在从东方山羊豆中分离 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因,进行生物信息学分析,为这一优良牧草的分子改良奠定基础。

材料与amp;方法

东方山羊豆(*Galega orientalis* Lam)由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所牧草资源研究室提供;大肠杆菌DH5 α 购自北京天根生化科技有限公司; cDNA Synthesis Kit, 为Promega公司产品; 克隆载体 pMD 18-T、Taq 酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、3'-Full RACE Core Set 为 TaKaRa 公司产品; Trizol 总 RNA 提取试剂盒为 Invitrogen 公司产品; SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司。

将种子用氯气消毒 24 h, 播种于铺有滤纸的培养皿上, 置于光照培养箱中培养至种子发芽(培养箱内温度为 24 $^{\circ}\text{C}$, 光照时间为 12 h $\cdot\text{d}^{-1}$)。将发芽后的种子移至花盆(蛭石与珍珠岩的比例为 3:1)中继续培养 30 d, 幼苗用浓度 250 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理 8 h 后, 用于提取总 RNA。

用 Trizol 法提取 250 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理 8 h 后的幼叶总 RNA。根据柠条锦鸡儿的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因序列设计一对引物, 引物序列为 P1: 5'-GGTGGACGAGATGGCTTTTG-3'; P2: 5'-CCAGTAGTTACCGCAACTCT-3'。高保真酶 RT-PCR 扩增 cDNA 片段, 纯化回收后克隆至 pMD-18 载体。重组质粒转化大肠杆菌 DH5 α , 菌液送至上海英俊生物技术有限公司测序。分别用 3'-Full RACE 试剂盒和 SMART RACE 试剂盒扩增获得 cDNA 片段的 3' 末端和 5' 末端, 测序后进行序列拼接得到基因全序列。

核酸及氨基酸序列的组成成分分析、理化性质分析、开放阅读框(open reading frame, ORF)的查找和翻译以及序列拼接用 DNASTar 6.13 软件进行分析; 序列同源比较系统进化树由 DNAMAN 5.0

软件完成。蛋白质二级结构和跨膜结构域亲水性/疏水性的分析分别用 SOPMA、TMHMM 2.0 和 ProtScale 软件完成。

取同一批东方山羊豆幼苗, 分成对照组和盐处理组(250 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理 8 h), 分别提取其根、茎、叶的 RNA, 根据开放阅读框序列设计引物 P1 和 P2 进行 RT-PCR 半定量表达。P1: ATGGCTTTTGAAATGACTTCTGTTGTCT; P2: TCACGCGATTGATGACCATTGCGTT。

取同一批东方山羊豆幼苗, 分别用 250 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理 2、4、8、12 和 24 h。提取其叶 RNA, 以 P1 和 P2 为引物进行 RT-PCR 半定量表达。

实验结果

1 东方山羊豆 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的克隆

用东方山羊豆的 cDNA 为模板, 通过 RT-PCR 得到 1 636 bp 片段。Blast 比对分析发现该片段与已发表的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因具有很高的同源性, 表明获得的 cDNA 片段是东方山羊豆中 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的一部分。

RACE 试剂盒分别克隆了 cDNA 3' 末端序列和 5' 末端序列, 测序结果表明, 3' 和 5' 端片段的长度分别为 480 bp 和 1 044 bp, 将以上片段拼接, 得到全长 2 280 bp (图 1), 其中开放阅读框 1 626 bp, 该基因命名为 *GoNHXI*, 蛋白质序列 GenBank 登录号为 ABY59540。

2 *GoNHXI* 基因生物信息学分析

用 DNASTar 6.13 软件对 *GoNHXI* 基因 cDNA 序列进行分析, 该基因全长 2 280 bp, 其中开放阅读框 1 626 bp, 编码 542 个氨基酸。对氨基酸序列进行分析表明, 该蛋白分子量为 60.0 kDa, 等电点为 8.558, pH 7.0 时的电荷为 8.350; 碱性氨基酸(K、R) 41 个; 酸性氨基酸(D、E) 35 个; 疏水氨基酸(A、I、F、W、V) 231 个; 极性氨基酸(N、C、Q、S、T、Y) 144 个。通过 SOPMA 软件预测东方山羊豆 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的二级结构(图 2), 表明该蛋白含约 44.18% 的 α -螺旋、19.96% 的 β -折叠、5.36% 的 β -转角和 30.50% 的不规则卷曲。用 ProtScale 软件预测东方山羊豆 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白氨基酸序列的疏水性/亲水性的结果(图 3)表明, 整体来看, 疏水性氨基酸均匀分布在整条肽链中, 且多于亲水性氨基酸。因此, 推测整个多肽链

```

1      TCTTCATCTTCATTCATCCAACCAATTTCAAATCTTCCCAATTTACACGGGAATTCGAACAAGGGATTGTTTCTCACCTTTCTCTGTCGAATTTCT
97     TCAACTTCTCTTTTTTAATTCATATAACAAAATCATCACAGATCTTTGTAATGCTGCTATCATTCTTTTGAGATCTTATGTTGATGAGAT
193    CAGAAGGTTCTTAATAATGGACAGCTCAGAAACATAAATTTGGATCATTATTACTACTCAACTTTCAAATTTATAACTCGGCAATAATCTGAATG
289    GTTTTAAATCTGCTTTTGTAAATAATTCATTAATCTGTGGAGGGTGGACGACATGGCCTTTGAAATGACTTCTGTTCTCAAAGTTACAAAAATTT
1      M A F E M T S V V S K L Q N L
385    ATCGACTTCGGACCATGCCTCCGTTGTTTCGATGAACCTGTTGTTGCACTTCTATGTGCTTGTATTGTCATTGGTCACTTCTTGGAGAGAATAG
16     S T S D H A S V V S M N L F V A I L C A C I V I G H L L E E N R
481    GTGGATGAATGAATCCACTACCTCTTTGATTGGTGTTCAGTGGTGTAGTCAATTTGTTGTTAGTGGTGGAAAAAGCTCGCATATCTTGT
48     W M N E S I T T L L I G V C T G V V I L L F S G G K S S H I L V
577    TTTGAGTGAAGATCTTTCTTATATACCTTCTGCCGCTATAATATTCAACGCCGGTTCAGGTGAAAAAGAAGCAGTCTTTAAAACTTCAT
80     F S E D L F F I Y L L P P I I F N A G F Q V K K K Q F F K N F M
673    GATTATTATGTCATTTGGAGCTATTGGCAGCATTGATATCTTGTTCATCATAACTTTTGGTGCATCCCAAGCTTTAAGAGGATGGATATTGGGCC
112    I I M S F G A I G T L I S C C I I T F G A T Q A F K R M D I G P
769    ACTGGAGATAGGCGATTACCTAGCAATTTGGAGCAATTTGCGCGACAGATTTCTGTTTGCACATTGCAGGTGCTAAGTCAAGTATGAGACACCTTT
144    L E I G D Y L A I G A I F A A T D S V C T L Q V L S Q D E T P L
865    GTTGTATAGTCTGTATTGGGGAAGGTGTTGTAATGATGCTACTTCAGTGGTCTTTCAATGCAATCCAAAGCTTTGATCTCAACCGGCTTAA
176    L Y S L V F G E G V V N D A T S V V L F N A I Q S F D L N R L N
961    CCCTCAATTCGAATGCAATTTTGGGCACTCTTTTATTTGTTTATAGCAAGCACACTTGGCGTTTGACAGTCTGCTTGTAGTCTTGTAGTCTTAC
208    P S I A M Q F L G N F F Y L F I A S T L L G V L T G L L S A Y I
1057   TATTAAGAGCTGTACATTGGCAGCCTCTACAGATCGTAGGTTGCTCTTATGATGCTAATGGCATACCCCTCTATATGCTGGCTGAGTTAGC
240    I K K L Y I G R H S T D R E V A L M M L M A Y P S Y M L A E L A
1153   CTATCTGAGTGGCATTCTCAGATATCTTTTGTGTTGTTATGTCACATTACACTTGGCATAATGACTCAGAGTCAAGAGTCAACACCAA
272    Y L S G I L T V F F C G I V M S H Y T W H N V T Q S S R V T T K
1249   GCATCTTTTGTACCTTGTGCTTGTGTTGGAGACCTTTATCTCTTTATGTTGGTATGGATGCCATGGACATCGATAAATGGAAGTTGTTAG
304    H S F A T L S F V C E T F I F L Y V G M D A M D I D K W K F V S
1345   TGATAGTCGGAACATCTATAGCCACAAGTGAATTTGTTGGTCTAATACTTCTTGGAAAGCAGCGTTTGTTCCTTATCTTCTTATC
336    D S R G T S I A T S A I L L G L I L L G R A A F V F P L S F L S
1441   CAACTTGACTAAAAAGTCACAGCATCAGAAGATCTCCTTCAGACAGCAAGTATGATTTGGTGGGCTGGTCTTATGAGAGTGTGTTTCAATGGC
368    N L T K K S Q H Q K I S F R Q Q V I I W W A G L M R G A V S M A
1537   ACTCGGATAAACAAGTTCACAGGTCGGGGCATACTCAACTGCGTAGCAATGCAATCATGATCACCAGCACCACCTGTTGCTTTTCAGCAC
400    L A Y K Q F T R S G H T Q L R S N A I M I T S T I T V V L F S T
1633   AGTGTGTTGGTTGCTGACTAAACCACTCATAAGGCTTCTACTACCTATCCTAAACACACAAGCAGCATGACAACGCAAGCACCCTACTCTC
432    V L F G L L T K P L I R L L L P H P K H T S S M T T T E P S T P
1729   AAAATCAGTATTGTCCTCTAGGAGACCACGAGATTCTGAAGCTGATCTGAAGCCATGAAATCACCGTCCAAACAGCCTTCGTGCCTT
464    K S V I V P L L G D H R D S E A D L E G H E I H R P N S L R A L
1825   ACTATCCACTCCAACACTGTTTCATCGATTATGGCAAGTTGATGATTCATTCAGTCCAGTTTTGGTGGCAGGGGTTTGTCCCGT
496    L S T P T H T V H R L W R K F D D S F M R P V F G G R G F V P V
1921   TGAACCTGGCTACCAAGTGAACGCAATGGTCATCAATCGCGTGGAGAAGAGAAAGTCAGAAATGTATAAAATGTGTGTACTATGATGTAT
528    E P G S P S E R N G H Q S P *
2017   GATTTGTTGAAATCAAGCAATTTATGTATGCTGCATCATAAGAACCTTGTAAATTTGTCAGTGTGTTGAGTAGCTAGTACGAGAAGGC
2113   TGTGTCCATAAGCCATCACTGCCTCTTCTGTAACACTACGATATTCAATGATTCTCTGAGCCACTAAATGTTAGTGTATGTTGATTTTGT
2209   TGTGCAGTTTCTGCTTCCAATGAACAGATGATGAATTTTGTGTAACCCGATTATCAAGAAAAA

```

图1 东方山羊豆液泡膜Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因cDNA全长核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig.1 The full nucleotide and deduced amino acid sequences of *GoNHX1* in *Galega orientalis*

阴影部分是 *GoNHX1* 基因的氨氯吡嗪结合位点, 下划线部分分别是翻译起始和终止密码子。

表现为疏水性, 没有明显的亲水区域。运用 TMHMM 软件对东方山羊豆的Na⁺/H⁺逆向转运蛋白跨膜结构进行分析, 结果显示 *GoNHX1* 含有 12 个疏水区域, 其中 10 个是跨膜区域(图4), 另外 2 个镶嵌于膜结构内。这与在番杏(*Tetragonia tetragonoides*) *TtNHX1* 基因编码的Na⁺/H⁺逆向转运蛋白具有 12 个跨膜区域以及菊芋(*Helianthus tuberosus*) *HtNHX1* 基因编码的Na⁺/H⁺逆向转运蛋白具有 11 个跨膜区有一定的差别(吕慧颖等 2004; 严一诺等 2007)。

3 *GoNHX1* 与其他Na⁺/H⁺逆向转运蛋白亲缘关系比较

图5结果表明, *GoNHX1* 与液泡型Na⁺/H⁺逆向

转运蛋白如柠条锦鸡儿 *CkNHX1*、紫花苜蓿 *MsNHX1* 以及大豆 *GmNHX1* 亲缘关系较近, 与质膜型Na⁺/H⁺逆向转运蛋白如拟南芥 *AtSOS1*、番茄 *SISOS1* 等的亲缘关系较远。

4 RT-PCR 分析东方山羊豆中 *GoNHX1* 基因的表达特性

GoNHX1 基因在对照组的东方山羊豆中根、茎、叶中均不表达, 在 250 mmol·L⁻¹ NaCl 处理 8 h 后在根、茎、叶中都有表达, 且叶和茎中的表达量高于根(图6)。分别用 250 mmol·L⁻¹ NaCl 处理东方山羊豆叶 2、4、8、12 和 24 h, *GoNHX1* 基因表达量逐渐增强, 到 12 h 表达量最大, 到 24 h 明显减弱(图7)。

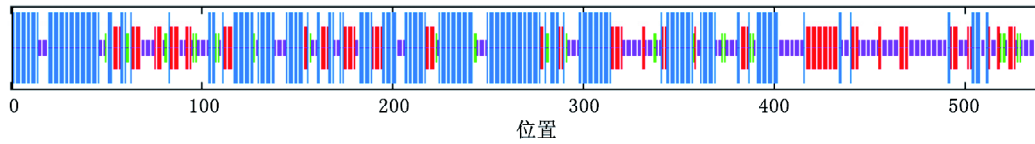
图2 东方山羊豆Na⁺/H⁺逆向转运蛋白二级结构的预测

Fig.2 Predicted secondary structure of GoNHX1

α-螺旋: 蓝色; 延伸链: 红色; β-转角: 绿色; 不规则卷曲: 紫色。

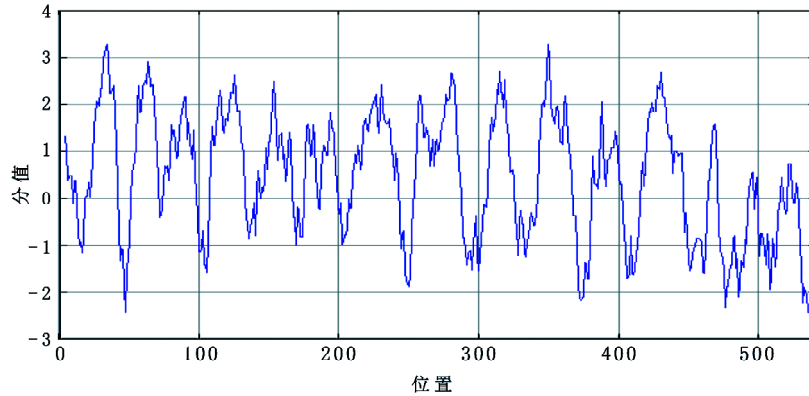
图3 东方山羊豆Na⁺/H⁺逆向转运蛋白疏水性/亲水性的预测

Fig.3 Predicted hydrophobicity/hydrophilic of GoNHX1

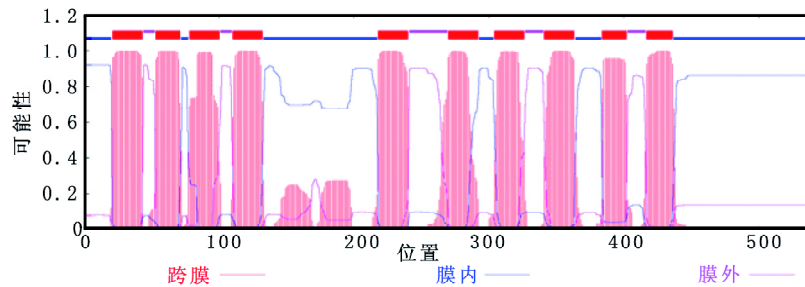
图4 东方山羊豆Na⁺/H⁺逆向转运蛋白跨膜区分析

Fig.4 Analysis of prediction of transmembrane helices of GoNHX1

讨 论

比较东方山羊豆液泡型Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因 *GoNHX1* 与柠条锦鸡儿 *CkNHX1*、紫花苜蓿 *MsNHX1* 以及大豆 *GmNHX1* 基因的结果表明, 它们的亲缘关系较近, 与NHX基因家族其他基因如拟南芥的 *AtNHX2*、*AtNHX3*、*AtNHX4*、*AtNHX5* 和 *AtNHX6* 基因比较, 其亲缘关系较远, 与质膜型Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因如拟南芥 *AtSOS1* 和番茄 *SISOS1* 等基因比较, 其亲缘关系更远。此外, *GoNHX1* 氨基酸序列包括一段Na⁺/H⁺逆向转运蛋白上存在高度保守的氨基吡嗪啉的结合位点(即

LFFIYLLPPI), 这充分说明了本研究所克隆的 *GoNHX1* 是植物液泡膜Na⁺/H⁺反向转运蛋白基因。正常条件下东方山羊豆的Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因 *GoNHX1* 在东方山羊豆的根、茎、叶中均不表达, 但受到盐诱导后根、茎、叶均有不同程度的表达, 并且在叶中表达量随着处理时间的延长而逐渐增加, 到了12 h达到最大, 到24 h表达量下降, 这可能由于Na⁺在叶片中积累到一定程度后, 破坏了液泡膜渗透性。

*AtNHX1*的C末端亲水区定位于液泡膜内并对它的转运活性起调节作用(Yamaguchi等2003), 已

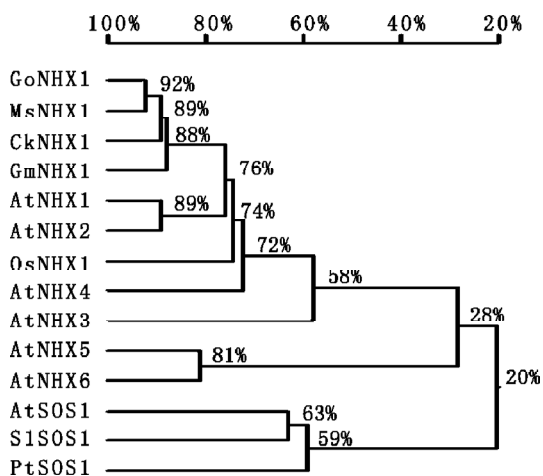


图5 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的进化树

Fig.5 A phylogenetic tree of *GoNHX1*

序列号为 *GoNHX1* (ABY59540)、*MsNHX1* (AAS84487)、*CkNHX1* (ABG89337)、*GmNHX1* (AAY43006)、*AtNHX1* (ABQ58865)、*AtNHX2* (NP_187154)、*OsNHX1* (AB021878)、*AtNHX3* (NP_200358)、*AtNHX4* (NP_187288)、*AtNHX5* (NP_175839)、*AtNHX6* (NP_178079)、*AtSOS1* (AAF76139)、*SlSOS1* (CAG30524)、*PtSOS1* (ABO32636)。

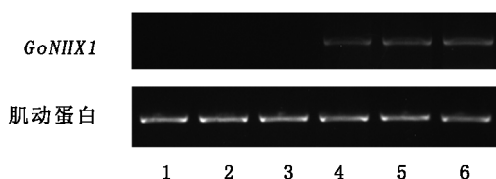


图6 RT-PCR 分析 $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理的东方山羊豆不同组织中 *GoNHX1* 基因的表达

Fig.6 RT-PCR of *GoNHX1* in the different organs of *Galega orientalis* with $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl treatment

1~3 分别是对照组根、茎、叶; 4~6 分别是盐处理组($250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理 8 h)根、茎、叶。

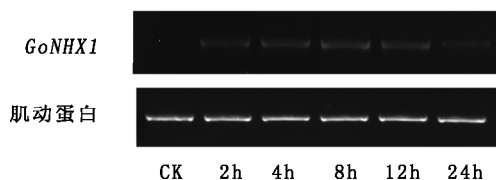


图7 $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理的东方山羊豆叶片不同时间的 *GoNHX1* 基因的表达

Fig.7 Expression levels of *GoNHX1* in the leaves of *Galega orientalis* with the treatment of $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl

有研究表明一个钙调蛋白 *AtCaM15* 能和 *AtNHX1* 的

C 末端结合。结合了 *AtCaM15* 的 *AtNHX1* Na^+/K^+ 选择性提高而 Na^+/H^+ 交换的活性降低(Yamaguchi 等 2005)。由于 *GoNHX1* 与 *AtNHX1* 蛋白质 C 末端有较高的同源性, 且 *GoNHX1* 的 C 末端亲水区也定位于液泡膜内, 据此可以推测 *GoNHX1* 与 *AtNHX1* 一样也受相似的调控。这些结果暗示了液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因在转录水平的调节可能是决定东方山羊豆耐盐能力的重要因子, 这也为利用过量表达液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因进行东方山羊豆品种的基因工程改良提供了依据。

参考文献

- 吕慧颖, 李银心, 陈华, 刘晶, 李平, 杨庆凯(2004). 番杏 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的克隆及特性分析. 高技术通讯, 14 (11): 26~31
- 严一诺, 孙淑斌, 徐国华, 刘兆普(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
- 张清斌, 杨志忠, 贾纳提, 顾祥, 孟辉, 刘万胜(2001). 东方山羊豆引种研究初报. 中国草地, 23 (4): 17~20
- 张自和(2002). 东方山羊豆的生物学特性与栽培技术. 草原与草坪, (1): 19~21
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter in *Arabidopsis*. Science, 285: 1256~1258
- Blumwald E (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. Curr Opin Cell Biol, 12: 431~434
- Blumwald E, Poole RJ (1985). Na^+/H^+ antiporter in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris*. Plant Physiol, 78: 163~167
- Fukuda A, Nakamura A, Tagiri A, Tanaka H, Miyao A, Hirochika H, Tanaka Y (2004). Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter from rice. Plant Cell Physiol, 45: 146~159
- Fukuda A, Nakamura A, Tanaka Y (1999). Molecular cloning and expression of the Na^+/H^+ exchanger gene in *Oryza sativa*. Biochim Biophys Acta, 1446: 149~155
- Silberbush M, Ben-Asher J (2001). Simulation study of nutrient uptake by plants from soilless cultures as affected by salinity buildup and transpiration. Plant Soil, 233: 59~69
- Tester M, Davenport R (2003). Na^+ tolerance and Na^+ transport in high plants. Ann Bot, 91: 503~527
- Yamaguchi T, Aharon GS, Sottosanto JB, Blumwald E (2005). Vacuolar Na^+/H^+ antiporter cation selectivity is regulated by calmodulin from within the vacuole in a Ca^{2+} - and pH-dependent manner. Proc Natl Acad Sci USA, 102: 16107~16112
- Yamaguchi T, Apse M, Shi H, Blumwald E (2003). Topological analysis of a plant vacuolar Na^+/H^+ antiporter revealed a luminal C terminal that regulates antiporter cation selectivity. Proc Natl Acad Sci USA, 100: 12510~12515
- Zhu J-K (2001). Plant salt tolerance. Trends Plant Sci, 6: 66~71