



嗜盐耐盐微生物抗盐胁迫相关离子转运蛋白研究进展

马欣, 马想蓉, 朱德锐, 李永臻, 邢江娃*

青海大学医学部基础医学研究中心, 青海 西宁 810016

马欣, 马想蓉, 朱德锐, 李永臻, 邢江娃. 嗜盐耐盐微生物抗盐胁迫相关离子转运蛋白研究进展[J]. 微生物学报, 2024, 64(3): 651-671.

MA Xin, MA Xiangrong, ZHU Derui, LI Yongzhen, XING Jiangwa. Advances in ion transporters associated with tolerance of halophilic and halotolerant microorganisms to salt stress[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(3): 651-671.

摘要: 离子转运蛋白在维持细胞内 pH 稳态、离子动态平衡等方面发挥着重要作用。钠离子转运体和钾离子转运体在嗜盐耐盐微生物中广泛存在, 其“保钾排钠”机制是微生物抗盐胁迫的两大策略之一。近年来, 嗜盐耐盐微生物中许多新型钠、钾离子转运体被陆续发现, 如 RDD 蛋白、UPF0118 蛋白、DUF 蛋白和 KimA 蛋白等; Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 等其他金属离子的转运蛋白也被证实可通过影响微生物胞内相容性溶质的合成起到渗透调节的作用。本文综述了嗜盐耐盐微生物中抗盐胁迫相关的各类离子转运蛋白, 分析其分子结构和工作机理, 并对这些蛋白在农业方面的应用进行了展望。继续发现新的离子转运蛋白, 探究抗盐胁迫相关离子转运蛋白的结构和机理, 解析各转运系统的协同作用及分子调控机制, 将进一步加深对嗜盐耐盐微生物抗盐胁迫调控的认识, 并为盐碱地农作物的改良等提供新的思路。

关键词: 盐胁迫; 微生物; 离子转运蛋白; 钠离子转运体; 钾离子转运体

资助项目: 国家自然科学基金(31860030); 人社部 2021 年度高层次留学人才回国资助项目; 青海大学青年科研基金(2022-QYY-15)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31860030), the 2021 Return of Overseas High-level Talents Program by the Ministry of Human Resources and Social Security, and the Youth Science and Technology Project of Qinghai University (2022-QYY-15).

*Corresponding author. E-mail: xingjiangwa66@163.com

Received: 2023-08-17; Accepted: 2023-11-30; Published online: 2023-12-05

Advances in ion transporters associated with tolerance of halophilic and halotolerant microorganisms to salt stress

MA Xin, MA Xiangrong, ZHU Derui, LI Yongzhen, XING Jiangwa*

Research Center of Basic Medical Sciences, Medical College, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

Abstract: Ion transporters play an important role in maintaining intracellular pH homeostasis and ionic equilibrium. Sodium ion transporters and potassium ion transporters exist widely in halophilic and halotolerant microorganisms, and their function of retaining potassium and excreting sodium is one of the two major strategies for microbial tolerance to salt stress. In recent years, new sodium and potassium ion transporters, such as RDD, UPF0118, DUF, and KimA, have been discovered in halophilic and halotolerant microorganisms. The transporters of other metal ions, such as Fe^{3+} and Mg^{2+} , have been proved to play a role in microbial osmoregulation by participating in the synthesis of intracellular compatible solutes. This paper reviews the ion transporters associated with salt stress tolerance in halophilic and halotolerant microorganisms, analyzes their molecular structures and working mechanisms, and prospects for their applications in agriculture. Discovering new ion transporters, revealing the structures and mechanisms of ion transporters associated with salt stress tolerance, and analyzing the synergistic effect of coexisting transporter systems and their regulation mechanisms will deepen the understanding of the regulatory mechanisms of salt stress tolerance of halophilic and halotolerant microorganisms and provide new ideas for the improvement of crops in saline-alkali land.

Keywords: salt stress; microorganism; ion transporter; sodium ion transporter; potassium ion transporter

钠、钾等是微生物生存所必需的微量元素，通常以离子形态存在，在维持微生物的生理状态和正常生长代谢等方面发挥着不可或缺的作用。然而，当外界环境中 Na^+ 浓度过高时，会破坏微生物细胞内的渗透压平衡，使其生长繁殖受阻甚至死亡。嗜盐耐盐微生物是一类能在一定盐度范围内进行专性或兼性生长的微生物^[1]，在长期进化过程中，主要形成了两种对抗盐胁迫的生理机制。一种是在胞内合成和累积糖、多元醇、甜菜碱、氨基酸及其衍生物等一类被称为相容性溶质的小分子极性物质，以调节细胞内外渗透压平衡，起到渗透保护作用^[2]；另一种是通过离子转运调节 Na^+ 、 K^+ 等离子的排出和输入，以维持胞内各离子浓度的动态平衡^[3]。由于依赖相容性溶

质的抗盐胁迫机制需要微生物进行一系列的反应以生成所需的相容性溶质，离子转运相较于相容性溶质合成来说耗能较少，是更直接快速的微生物应对高盐环境的调节工具^[1]。

近年来，盐境适应机制相关的离子转运蛋白研究日益热门。研究者在 NhaA 蛋白、TrkA 蛋白等常见离子转运蛋白的基础上，新发现了 RDD 蛋白^[4]、UPF0118 蛋白^[5]、KimA 蛋白^[6]等新型的钠、钾离子转运蛋白。同时，越来越多的研究表明，离子转运在嗜盐耐盐的过程中可能发挥着比传统认识上更为重要的作用，在依赖相容性溶质合成的嗜盐耐盐微生物中也是不可或缺的^[7]。通过离子转运对抗盐胁迫的生理机制主要由位于细胞膜上的离子转运蛋白介导。离子转运

蛋白广泛存在于细菌、植物和动物体中, 在维持细胞内离子动态平衡、pH 稳态等方面发挥着重要作用^[8]。本文主要关注嗜盐耐盐微生物的离子转运蛋白, 以嗜碱盐单胞菌 (*Halomonas alkalicola*)、盐沼盐杆菌 (*Halobacterium salinarum*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和蓝藻 (*Cyanobacteria*) 等为例, 从离子转运蛋白的种类、结构和应用等方面进行综述。

1 钠氢离子转运蛋白

1.1 Na⁺/H⁺转运蛋白的类型和特征

在高盐环境中, 嗜盐耐盐微生物依赖的 Na⁺

外排系统主要是各种 Na⁺/H⁺转运蛋白, 其转运过程以质子电化学梯度为动力, 大多可独立发挥转运功能^[9]。目前已发现的 Na⁺/H⁺转运蛋白包括 CPA-1 家族、CPA-2 家族、CPA-3 家族、Na⁺/H⁺转运蛋白超家族以及其他一些尚未明确结构和机制的离子转运蛋白等^[10-11] (表 1)。值得一提的是, 虽然这些 Na⁺/H⁺转运蛋白的英文名称各不相同, 但却都表示同样的意思, 如数量最多的 Nhaxx 蛋白, 是从“Na⁺/H⁺ antiporter”中得到^[30], 说明其是一个同时转运钠离子和氢离子的逆向转运蛋白, 还有 CPA-2 家族的 NapA 蛋白, 意为“NaH-antiporter”^[31], 与前者几乎同义。

表 1 嗜盐耐盐相关的主要 Na⁺/H⁺转运蛋白

Table 1 Main halophilic and halotolerant Na⁺/H⁺ antiporters

Halophilic and halotolerant related antiporters	K_m [Na ⁺] (mmol/L)	V_{max} ($\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g})$)	Substrates	Main characteristics	References
CPA-1 family					
NhaP	6.0 (pH 7.5)	42	Na ⁺ , Li ⁺ , K ⁺ , Rb ⁺ , Ca ²⁺ , NH ₄ ⁺	The transport process depends on the potential energy. Most of them are single-subunit	[12-13]
NhaK	88.0 (pH 8.0) 24.0 (pH 8.5)	—	Na ⁺ , Li ⁺ , K ⁺ , Rb ⁺	secondary sodium pumps, mainly involved in regulating intracellular pH homeostasis	[14]
YjcE	—	—	Na ⁺	and resisting salt stress	[15]
CvrA	—	—	Na ⁺ , K ⁺		[15]
NhaG	—	—	Na ⁺ , Li ⁺		[16]
CPA-2 family					
NhaA	1.98	253	Na ⁺ , Li ⁺	Mainly found in prokaryotes such as <i>Enterococcus haideri</i>	[17]
NapA	1.0 (pH 7.5)	—	Na ⁺ , Li ⁺	and <i>Bacillus cereus</i> , with functional features similar to the CPA-1 family	[18]
KefA	—	—	K ⁺		[19]
KefB	—	—	Na ⁺ , K ⁺		[20]
GerN	1.5 (pH 8.0) 25.0 (pH 7.0)	—	Na ⁺ , Li ⁺		[21]
KefC	—	—	Na ⁺ , Li ⁺ , K ⁺ , Rb ⁺		[20]
CPA-3 family					
Mrp	—	—	Na ⁺ , Li ⁺ , K ⁺	Mrp antiporter, the only member of this family, is a polysubunit secondary sodium pump, containing 6–7 subunits that function in the form of a heterologous complex	[22]

(待续)

(续表 1)

Halophilic and halotolerant related antiporters	K_m [Na^+] (mmol/L)	V_{\max} ($\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g})$)	Substrates	Main characteristics	References
Antiporter superfamily					
MFS	—	—	Na^+ , Li^+ , K^+	The homology with other families is low, and some members have the function of transporting Na^+ , which is still to be explored	[23]
Ha-ydjM	0.43±0.05 (pH 8.0)	—	Na^+ , Li^+ , K^+		[24]
Other antiporters					
NhaD	0.89 (NhaD1, pH 8.5) 0.47 (NhaD2, pH 9.5) 0.42 (Ha-NhaD, pH 9.0)	—	Na^+ , Li^+	It not only makes the strain tolerant to hypersaline environments, but also to highly alkaline environments, where it is generally most active	[25-26]
NhaH	0.83 (pH 8.5)	—	Na^+ , Li^+	It's the first Na^+/H^+ antiporter cloned from a moderately halophilic bacterium	[27]
NhaB	1.3 (pH 8.0)	404	Na^+ , Li^+	It functions primarily at low Na^+ concentrations and low pH	[12]
NhaC	—	—	Na^+	It has a limited role in maintaining Na^+ -dependent pH homeostasis and does not participate in high salt-induced adaptive responses	[28]
RDD	1.29±0.14 (pH 9.0)	—	Na^+ , Li^+ , K^+	It has $\text{Na}^+(\text{Li}^+, \text{K}^+)/\text{H}^+$ reverse transport activity which can be affected by amino acid residues, and has no homology with other ion transporters	[4]
UPF0118	1.13±0.09 (pH 9.0)	23.08±0.48	Na^+ , Li^+	It has $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{H}^+$ reverse transport activity, and has no homology with other ion transporters	[5]
DUF	0.25±0.06 (pH 9.0)	—	Na^+ , Li^+ , K^+	DUF1 and DUF2 form DUF1-2 complex, which has $\text{Na}^+(\text{Li}^+, \text{K}^+)/\text{H}^+$ reverse transport activity	[29]

—: No relevant information found in literature.

1.1.1 CPA-1 家族

阳离子/质子逆向转运蛋白-1 家族(the cation/proton antiporter-1 family, CPA-1 family)广泛分布于革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌、植物和动物等膜系统上, 具有 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白活性, 主要参与调控胞内 pH 稳态和对抗盐胁迫。该家族大多是单亚基型次级钠泵, 到目前

为止, 主要包括 YjcE、CvrA^[15]、NhaG^[16]、NhaP 和 NhaK 等, 其中得到广泛关注的是 NhaP 蛋白和 NhaK 蛋白。

(1) NhaP 蛋白

NhaP 是 CPA-1 家族的主要成员之一^[32], 在结构和功能方面具有一定的多样性。系统发育分析表明, NhaP 转运蛋白经长期进化后, 主要分

为 NhaP1 和 NhaP2 两种类型^[33], 且 NhaP2 除转运 Na^+ 外, 对 K^+ 也有一定的亲和力^[13]。NhaP 蛋白广泛存在于极端嗜热古生菌 (*Pyrococcus abyssi*) 和詹氏甲烷球菌 (*Methanocaldococcus jannaschii*) 等嗜盐古菌^[34-35], 以及铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、蓝藻等嗜盐耐盐微生物中^[13,32-33]。王姝杰等将蓝藻中 NhaP 的编码基因转移到烟草中^[36], 发现转基因烟草的耐盐性从 0.1 mol/L NaCl 提高到了 0.2 mol/L NaCl, 且该基因可在烟草中稳定遗传。

(2) NhaK 蛋白

NhaK 蛋白也称为 YvgP 蛋白, 最早发现于枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中, 后又在金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 中发现了它的存在^[14,37]。研究表明, 枯草芽孢杆菌中的 NhaK 蛋白具有 Na^+ (K^+ , Li^+ , Rb^+)/ H^+ 逆向转运活性, 且 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 会抑制其转运活性^[14]。截至目前, 未见其他嗜盐耐盐微生物中发现 NhaK 蛋白的报道, 其转运机制和特性也有待进一步研究。

1.1.2 CPA-2 家族

阳离子/质子逆向转运蛋白-2 家族 (the cation/proton antiporter-2 family, CPA-2 family) 主要存在于细菌和古菌等原核生物中, 较少出现在真核生物膜系统中, 其家族成员主要有 NhaA、NapA、KefA^[19]、KefB、KefC^[20] 和 GerN^[21] 等。目前重点研究的主要是以下 3 种。

(1) NhaA 蛋白

NhaA 蛋白是从细菌中分离出来的第一种 Na^+ / H^+ 转运蛋白, 也是目前研究最丰富的转运蛋白^[38]。NhaA 最早从大肠杆菌中克隆得到^[30], 在维持其胞内渗透压和 pH 稳态方面发挥着至关重要的作用, 缺失会导致菌株在高盐环境中出现生长缺陷。NhaA 蛋白活性具有 pH 依赖性, 对周

围环境的 pH 值十分敏感, 只有当 pH 值达到 6.5 时才会被激活^[39]。将一株嗜盐假单胞菌的 NhaA 蛋白编码基因转移到大肠杆菌表达载体中, 发现转化子的耐盐极限由对照组的 1 mol/L NaCl 提升到 1.1 mol/L NaCl, 且相同盐度条件下生长速度和最终菌浓度远高于对照组^[40]。

(2) NapA 蛋白

NapA 蛋白是从海氏肠球菌 (*Enterococcus hirae*) 中鉴定出的一种 CPA-2 家族蛋白。研究者们使用基因片段切除与插入技术, 证实了 NapA 蛋白在高盐环境中的离子转运能力。破坏 NapA 编码基因导致大肠杆菌克隆子在 0.15 mol/L NaCl 的情况下无法生长, 而恢复该蛋白的表达之后, 菌株又对高盐环境表现出耐受能力^[31]。在一项针对假坚强芽孢杆菌 (*Bacillus pseudofirmus*) 的研究中, 研究者通过基因序列分析发现其可能有 NapA 蛋白的表达, 但具体的功能分析尚不明确^[41]。同时, 基因序列分析也表明, 钠氢离子转运蛋白 GerN 与 NapA 来源于同一个祖先^[9], 说明该蛋白也是 CPA-2 家族的一员。

(3) KefB 蛋白

KefB 是从大肠杆菌中分离出的 CPA-2 家族蛋白^[20], 是一种谷胱甘肽门控的 K^+ 离子输出蛋白, 早期还被称为 TrkB。在盐胁迫下, 嗜盐古菌科库里盐红菌 (*Halorubrum kocurii*) 2020YC7 中的 *kefB* 转录水平可随 NaCl 浓度的升高显著上调^[42]。研究者将结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 的 KefB 蛋白基因剔除, 发现突变子仅在高 K^+ 环境下生存受损, 而在低 K^+ 环境下的生存不受影响, 说明 KefB 蛋白主要在高 K^+ 环境中发挥 K^+ 的外排功能^[43]。

1.1.3 CPA-3 家族

阳离子/质子逆向转运蛋白-3 家族 (the cation/proton antiporter-3 family, CPA-3 family) 广泛存在于原核生物中。钠离子/质子逆向转运蛋

白 Mrp (multiple resistance and pH-related antiporter)是目前该家族的唯一分支,也是最重要成员,属于多亚基型次级钠泵^[11]。由于早期命名系统的混乱,Mrp 蛋白曾被赋予多种名称,例如 Mnh、Pha、Sha 和 Sno 等^[8]。

Mrp 蛋白最早发现于耐盐芽孢杆菌(*Bacillus halotolerans*)中^[44],其蛋白结构通常包含 6-7 个亚基(MrpA-MrpG),以复合体的形式发挥功能,在维持胞内外渗透压平衡与酸碱平衡方面具有重要作用。根据亚基数量的不同,可以将 Mrp 蛋白分为 Mrp-I和 Mrp-II两种类型,分别主要存在于革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌中^[45]。Mrp-I由完整的 7 个亚基组成;Mrp-II由 6 个亚基组成,缺少 MrpB,但其 MrpA 亚基中包含了 MrpB 的结构域,所以功能并未受到影响^[9]。2019 年, Mormile 等从华盛顿州皂湖中分离出一株皂湖 7 号盐单胞菌(*Halomonas* sp. Soap Lake #7),是已知的首个体内同时存在 Mrp-I和 Mrp-II两种转运复合体的嗜盐嗜碱微生物^[22]。在嗜碱盐单胞菌(*Halomonas alkalicola*) CICC 11012s 中,研究者发现 Mrp 蛋白在中性和碱性环境中发挥作用,在 pH 11.0 时表达量最高,说明 Mrp 蛋白可能主要在碱性条件下参与菌株的 pH 调节^[46]。嗜碱性拟坚强芽孢杆菌(*Bacillus pseudofirmus*)中的 Mrp 蛋白在维持细胞 Na^+ 平衡和酸碱平衡中都发挥着重要作用^[47]。此外,Mrp 蛋白还存在于许多其他的嗜盐耐盐微生物中,如超嗜热古菌(*Thermococcus eurythermalis*) A501^[48]、嗜中性枯草芽孢杆菌^[49]、中华根瘤菌(*Sinorhizobium*)^[50]以及金黄色葡萄球菌^[51]等。

1.1.4 转运蛋白超家族

除已经明确家族分类的离子转运蛋白之外,还存在一些具有 Na^+ 转运功能,但与已知家族列同源性的较低的蛋白质,分属于不同的质子转运

体超家族(proton antiporter-superfamily),其中较具有代表性的是 MFS 超家族和 Ha-ydjM 蛋白。

(1) MFS 超家族

主要促进者超家族(major facilitator superfamily, MFS)是目前已知最大的膜转运蛋白超家族之一^[52],家族成员众多,可促进糖、药物分子、肽、 Na^+ 和 H^+ 等溶质在电化学梯度下进行跨膜运输。研究者在海洋扁球菌(*Planococcus maritimus*) DS 17275^T中发现了一种功能未知的 MFS 转运体,命名为 Mdrp 蛋白^[23],发现其具有 Na^+ (Li^+ , K^+)/ H^+ 逆转活性,对 3 种离子表观亲和力的大小为 $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Li}^+$ 。在 pH 9.0 时, Mdrp 蛋白对 Na^+ 和 Li^+ 的转运活性最高;在 pH 8.5 时,对 K^+ 的转运活性最高。王艳红等在盐单胞菌(*Halomonas*) YH-I 中发现 MFS 转运蛋白基因,但经过转基因筛选实验之后,发现菌株中起耐盐作用的并不是 MFS 超家族成员,而可能是开放阅读框 3 (open reading frame 3, ORF3)和 ORF4 两个结构未知的膜蛋白^[53]。截至目前, MFS 超家族依然有十几个功能未知的亚家族蛋白^[54],这些蛋白中具有 Na^+ 转运功能的究竟有多少种,仍待研究者们后续探索。

(2) Ha-ydjM 蛋白

Ha-ydjM 蛋白由殷奎德课题组于 2018 年发现于中度嗜盐菌喜盐芽孢杆菌(*Halobacillus*) Y5 中,研究者通过基因功能互补的方法,证实它是 YdjM 超家族的一个新成员,对细菌胞内外的 Na^+ / H^+ 转运具有重要影响^[24]。Ha-ydjM 蛋白能够恢复大肠杆菌突变株 KNaabc 在 0.2 mol/L NaCl 条件下的生长能力,并呈现出 pH 依赖的 Na^+ / H^+ 转运蛋白活性,在 pH 8.0 时,可以更好地发挥转运作用。YdjM 超家族的其他成员大多不具有 Na^+ 转运功能,所以 Ha-ydjM 蛋白的发现不仅丰富了离子转运蛋白的研究,也为更多新型 Na^+ / H^+ 转运蛋白的发现提供了一个新思路。

1.1.5 其他蛋白

随着全基因组测序技术和分子生物学技术的发展,除了上文描述的 Na^+/H^+ 转运蛋白家族外,嗜盐耐盐微生物中相继发现了许多其他类型的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白,如 NhaH^[27]、NhaC^[28]、NhaB^[55]和 NhaD^[56],以及新发现的 RDD 蛋白和 UPF0118 蛋白等。这些蛋白已被证实参与了细菌在高盐环境中的适应作用,但其具体的蛋白分类还不明确,本文主要介绍以下 4 种蛋白。

(1) NhaD 蛋白

NhaD 蛋白最早发现于副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)中,能够使菌株耐受高盐、高碱环境。插入了 NhaD 蛋白编码基因的大肠杆菌转化子 KNabc 可在高盐环境中生长,且表达的 NhaD 蛋白仅在碱性条件下具有转运活性,在 pH 8.5–9.0 时活性最高^[56]。通过改变细菌生长的盐度和 pH 值,发现霍乱弧菌的 NhaD 蛋白同样在碱性环境(pH 7.25–8.50)中发挥作用^[57]。除转运 Na^+ 以外,拥有 NhaD 蛋白的大肠杆菌缺陷菌株还表现出了 Li^+ 耐受性,甚至在 0.5 mol/L Na^+ 浓度、10 mmol/L Li^+ 浓度的情况下,仍然保留了较强的生长能力^[58]。NhaD 蛋白可分为不同的亚型,其活性特点略有不同。Cui 等从盐单胞菌(*Halomonas* sp.) Y2 的基因组 DNA 中克隆出 NhaD1 和 NhaD2 两种 NhaD 蛋白,可在中性及弱酸性条件下检测到转运活性,但在碱性条件下活性最高^[25]。其中 NhaD1 的最高活性值在 pH 8.0–8.5, NhaD2 的最高活性值在 pH 9.5 左右。宋娜在嗜碱盐单胞菌(*Halomonas alkaliphila*) DSM 16354^T 中发现了 NhaD 蛋白的另一亚型,命名为 Ha-NhaD 蛋白,插入了这个蛋白编码基因的大肠杆菌转化菌株在 pH 9.0 时拥有最大的耐盐生长活性^[26]。这些研究结果表明,同一离子转运蛋白的不同亚型保持活性的最佳 pH 值可能不同,进一步加深了关于离子转运蛋白的研究。

(2) NhaH 蛋白

Yang 等通过功能互补的方法,首次从中度嗜盐菌达坂盐杆菌(*Halobacillus dabanensis*) D-8^T 中克隆得到一个编码 Na^+ 转运蛋白的基因,并将其编码的蛋白命名为 NhaH^[27]。NhaH 蛋白对 Na^+ 具有高亲和性,主要参与碱性环境下 Na^+ 的转运,可提高大肠杆菌转化子的耐盐能力^[59]。进一步的蛋白质亲疏水性图谱分析显示, NhaH 蛋白的 C 端区域仅存在 9 个亲水性氨基酸残基, Na^+ 转运活性较低。

(3) UPF0118、RDD 蛋白

UPF0118 和 RDD 蛋白均由姜巨全课题组从安达喜盐芽孢杆菌(*Halobacillus andaensis*) NEAU-ST10-40^T 中先后筛选发现,与已知的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白无相似性^[4-5]。其中, UPF0118 具有 $\text{Na}^+ (\text{Li}^+)/\text{H}^+$ 逆向转运活性, RDD 蛋白具有 $\text{Na}^+ (\text{Li}^+, \text{K}^+)/\text{H}^+$ 逆向转运活性,且氨基酸残基 R124、R129 和 D158 在后者的逆转运活性中发挥重要作用^[4]。将 *upf0118* 和 *rdd* 基因分别转移到大肠杆菌突变株 KNabc 中,均可恢复突变株的抗盐能力(最高耐受盐度为 0.2 mol/L),并提高突变株对碱性环境的耐受性,使其可以在 pH 8.0–8.5 的条件下生长^[5]。

(4) DUF 蛋白

贾桂燕等从盐单胞菌 DSM 16354^T 中筛选出了 2 个具有耐盐功能的蛋白编码基因 *duf1* 和 *duf2*, 将其分别导入大肠杆菌缺陷菌株中发现,只有 DUF1 蛋白和 DUF2 蛋白共同表达时,菌株才具有 $\text{Na}^+ (\text{Li}^+, \text{K}^+)/\text{H}^+$ 逆向转运活性,最高可在 0.5 mol/L NaCl 条件下生长,表现出显著的耐盐能力^[29]。进一步的结构分析发现, DUF1 蛋白和 DUF2 蛋白均含有 7 个跨膜区和 10 个螺旋,螺旋的两侧末端连续排布亲水性氨基酸,是构成离子通道的重要组成部分。

1.2 Na⁺/H⁺转运蛋白的结构和机理

Na⁺转运系统可分为初级钠泵和次级钠泵，Na⁺/H⁺转运蛋白多属于后者，是一类高度保守的膜蛋白。根据 Na⁺/H⁺转运蛋白所包含亚基的数量，可进一步划分为单亚基型钠泵和多亚基型钠泵^[8]。本文以单亚基型钠泵 NhaA 蛋白和多亚基型钠泵 Mrp 蛋白为例，初步揭示抗盐胁迫相关 Na⁺/H⁺转运蛋白的分子作用机制。

1.2.1 单亚基型钠泵 NhaA

NhaA 蛋白是从细菌中分离出来的第一种 Na⁺/H⁺转运蛋白，在每转运 2 个 H⁺到胞内的同时，可转运 1 个 Na⁺到胞外^[60]。其空间构型中存在 2 个漏斗状结构，两者朝向相反。其中，由 TMSII、IX、IVc 和 V 形成的带负电荷的离子漏斗开口于细胞基质，终止于细胞质膜内推测的离子结合位点；另一个带负电荷的漏斗由 TMSII、VIII和XI_p 形成，开口于细胞质周质^[61]。NhaA

蛋白的 pH 感应器位于 TMS IX 跨膜区，在胞质漏斗结构的开口部位；Na⁺结合位点则位于 TMS IV-XI 结构的延伸链上，非常靠近胞质漏斗结构的底部区域。pH 感应器能够感应环境信号，引起 TMS IX 跨膜螺旋区构型的改变，并最终完全释放 Na⁺结合位点(图 1)^[62]。当 NhaA 蛋白与 Na⁺结合后，引起电荷失衡，打开周质离子屏障，将 Na⁺离子结合位点暴露于周质漏斗结构的底部区域，最终完成 Na⁺的释放。

1.2.2 多亚基型钠泵 Mrp

Mrp 蛋白属于多亚基型次级钠泵，每个亚基都参与复合体的激活过程^[8]，但各亚基之间是如何发挥协同作用的，目前尚没有明确定论。Lee 等研究发现，Mrp 蛋白可分为 MrpA-MrpD 和 MrpE-MrpG 两个模块，两者之间相互影响，任何一个模块的亚基发生改变，都会影响另外一个模块的功能^[63]。MrpA 和 MrpD 是 Mrp 系统中最

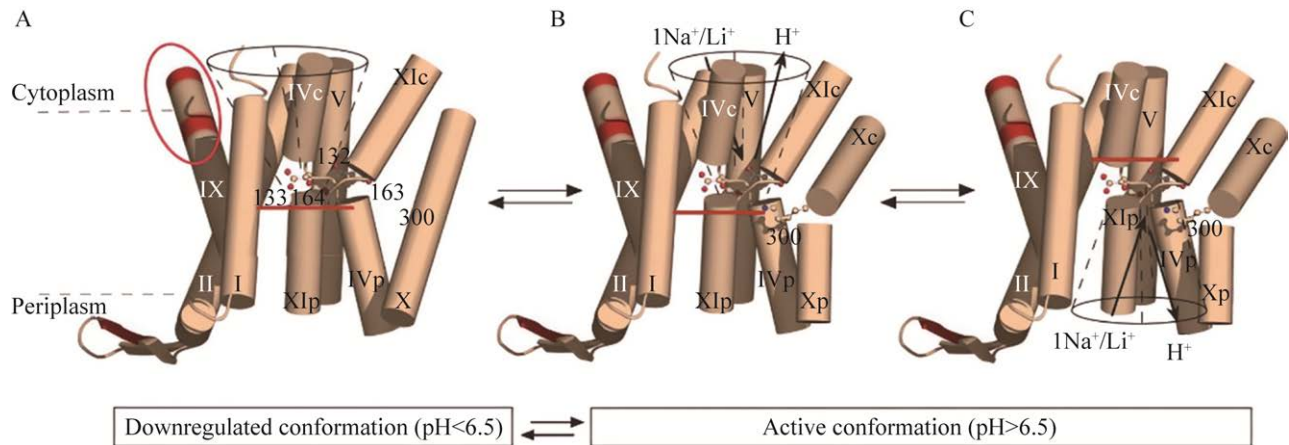


图 1 Na⁺/H⁺转运蛋白 NhaA 的作用机制^[62]

Figure 1 Mechanism of action of pH-regulated Na⁺/H⁺ transporter NhaA^[62]. A: When pH<6.5, ion transport is blocked by periplasmic ion barriers, and only Asp164 residues are exposed to the bottom region of the cytoplasmic funnel structure. B: When pH>6.5, the pH sensor of NhaA protein can sense environmental signals and cause the configuration change of the TMS IX transmembrane helix region, leading to the relocation of the TMS IVc, XI_p and X transmembrane helix region, and finally the complete release of Na⁺ binding site. C: When NhaA protein binds to the substrate Na⁺ ion, it causes charge imbalance, opens the periplasmic ion barrier, exposes the Na⁺ ion binding site to the bottom region of the periplasmic funnel structure, and finally completes the Na⁺ ion release process.

大的 2 个亚基, 其中 MrpA 是 Na^+ 转运通道, MrpD 是 H^+ 转运通道, 两者共同形成 Na^+/H^+ 逆向转运体^[64], 其高表达可能与菌株的强耐碱性有关^[65]。Li 等通过构建 Mrp 复合体的分子模型, 提出 MrpE、MrpF、MrpG 这 3 种膜蛋白会在作用时维持复合体的稳定性^[66]。Mrp 系统的具体结构和功能尚未研究透彻, 以上发现为后续的研究奠定了基础。

2 钾离子转运蛋白

2.1 K^+ 转运蛋白的类型和特征

钾是生物体必需的微量元素, 通常以 K^+ 的形式存在。盐胁迫下, 许多嗜盐耐盐微生物可通过升高胞内 K^+ 浓度来维持渗透压的平衡^[67]。这些微生物拥有一系列负责 K^+ 摄入的蛋白转运系统, 其转运过程需要消耗 ATP, 且大多需要多个蛋白相互配合, 共同发挥转运作用^[68]。目前已发现的 K^+ 蛋白转运系统主要包括 Trk 家族、Ktr 家族、Kdp 家族和 Kup 家族等(表 2)。 K^+ 转运蛋白的命名规律与 Na^+/H^+ 转运蛋白非常相似, 如 Trk 家族蛋白和 Ktr 家族蛋白, 均是指“ K^+ transporter”, 虽字母顺序不一样, 但都表达了同样的意思^[69]。

2.1.1 Trk 家族

Trk 系统是嗜盐耐盐微生物转运 K^+ 的主要系统之一, 本质上是一个质子转运体, 由跨膜蛋白和结合核苷酸的外周膜蛋白组成, 在转运过程中需要质子动力和 ATP^[82]。主要家族成员包括 TrkI^[69]、TrkA、TrkG^[72] 和 TrkH 等, 其中研究较多的是 TrkA 和 TrkH。

(1) TrkA 蛋白

细胞膜表面蛋白 TrkA 主要存在于细菌和古菌中, 是一种 NAD^+ 结合蛋白, 主要负责 Trk 系统的激活, 与 Ktr 家族的 KtrA 蛋白具有一定的同源性^[83]。一项针对嗜盐放线菌(*Haloactinomyces*)

AFM 10258^T 的研究表明, 在高盐条件下, TrkA 蛋白的表达在转录和蛋白水平上调^[84], 说明该菌株可能通过加强 K^+ 转运来提高胞内渗透压, 以对抗高盐环境。Kraegeloh 等发现, 在大肠杆菌突变体中, 只保留 TrkA 蛋白和只剔除 TrkA 蛋白的菌株转运 K^+ 的能力都受到限制^[69], 说明 TrkA 蛋白是一个结合蛋白, 需要与其他的转运蛋白协同发挥转运功能。在嗜盐解淀粉碱单胞菌(*Alkalimonas amylolytica*) N10 中发现, TrkA 可与 K^+ 通道蛋白 TrkH 结合, 发挥 K^+ 转运功能, 且在 pH 7.5–8.5 时, 转运活性最高^[85]。进一步的研究表明, TrkA 是 TrkH 的转运调节蛋白, 可通过与 ATP 的结合打开 TrkH 离子转运通道^[86]。

(2) TrkH 蛋白

跨膜蛋白 TrkH 属于典型的 Trk 家族 K^+ 转运蛋白, 在同样的条件下, 缺少 TrkH 蛋白的大肠杆菌菌株表现出的生长抑制不明显, 说明其对 K^+ 的亲合力不高^[72], 但仍可表现出较高的离子转运速率^[87]。从嗜盐解淀粉碱单胞菌 N10 中分离的 TrkH 蛋白被证明在高盐培养基中对菌株的生长起关键作用^[85]。同时, TrkH 蛋白需要借用 TrkA 蛋白作为 ATP 结合亚单位完成对 K^+ 的转运, 表现出对其他转运蛋白的“依赖”现象^[88]。

2.1.2 Ktr 家族

Ktr 系统是一种 Na^+ 依赖的 K^+ 转运系统, 主要存在于细菌中, 可以在高盐高渗环境中通过调节 K^+ 的转运来对抗盐胁迫。Ktr 家族成员主要分为膜嵌入型蛋白(如 KtrB 和 KtrD)和膜连接型蛋白(如 KtrA、KtrC 和 KtrE)两种^[73,76], 通过复合体的形式来发挥作用, 目前得到深入研究的是 KtrA 和 KtrB。

(1) KtrA 蛋白

KtrA 是 Ktr 家族研究最深入的转运蛋白, 最早发现于溶藻弧菌(*Vibrio lysolyticus*)中, 通常与跨膜蛋白 KtrB 结合形成复合物, 发挥 K^+ 转运

表 2 嗜盐耐盐相关的主要 K⁺转运蛋白Table 2 Main halophilic and halotolerant K⁺ transporters

Halophilic and halotolerant related transporters	K_m [K ⁺] (mmol/L)	V_{max} (μ mol/(min·g))	Substrates	Main characteristics	References
Trk family					
TrkA	–	–	–	TrkA is a binding protein which needs to cooperate with other transporters and has the highest transport activity at pH 7.5–8.5	[69]
TrkH	6.0±1.0	800±180	K ⁺ , Rb ⁺	TrkH transporter has a low affinity for K ⁺ , and is dependent on other transporters	[70]
TrkG	0.8	200	K ⁺ , Rb ⁺ , Na ⁺	TrkG is an integral membrane protein consisting of twelve transmembrane helices and requires Na ⁺ for its K ⁺ transport function	[70-72]
TrkI	1.12	176	K ⁺	Similar to TrkH, TrkI is also dependent on other transporters	[69]
Ktr family					
KtrA	–	–	–	It usually binds to the transmembrane transporter KtrB to form the K ⁺ transporter complex	[73-74]
KtrB	0.015 (KtrB) 1 (KtrAB)	16 (KtrB) 40–100 (KtrAB)	K ⁺ , Na ⁺	There was a strong Na ⁺ dependence when KtrA and KtrB work together for K ⁺ transport. However, KtrB still retained low K ⁺ transport capacity when present alone	[73-75]
KtrC	–	–	–	It usually binds to KtrD to form the K ⁺ transporter complex	[73]
KtrD	10	40–100	K ⁺	It binds to KtrC to form the K ⁺ transporter complex, which has a low affinity for K ⁺	[73]
KtrE	–	–	–	KtrE was a regulatory protein to supplement the K ⁺ transport system	[76]
Kdp family					
KdpFABC	–	–	K ⁺	KdpA is responsible for the transport of K ⁺ in the complex, and all components are essential in this process	[77]
KdpD/E	–	–	–	It is mainly present in bacteria, and KdpD is the most important transporter component of the Kdp family, receiving stimulus and transmitting the signal to KdpE, thus activating the Kdp transporter system	[78]
KdpQ	–	–	–	It is present in archaea and responsible for initiating the Kdp transporter system	[79]
Kup family					
Kup	0.37±0.13	27±5	K ⁺ , Rb ⁺ , Cs ⁺	It is mainly involved in K ⁺ transport in low potassium environments, and has low homology with other transporter families	[80-81]
KimA	0.215±0.024	245±7	K ⁺	It has strong activity in acidic environments, and has low homology with other K ⁺ transporter families	[6]

–: No relevant information found in literature.

功能^[74]。同时, Ktr 家族的 KtrC 和 KtrD 蛋白也是通过复合体的形式发挥作用, 其中 KtrC 与 KtrA 同源, KtrD 与 KtrB 同源, 但整体对 K^+ 的亲合力较低, 只有 KtrAB 蛋白的十分之一^[73]。鲜先毅等用 RT-PCR 和基因敲除的方法, 发现缺少 KtrA 编码基因的耐辐射异常球菌(*Deinococcus radiodurans*) R1 菌株在面对高盐环境时抗性降低, 说明 KtrA 蛋白在菌株耐受高盐和高渗透胁迫方面有一定的保护作用^[89]。

(2) KtrB 蛋白

KtrB 蛋白是 Ktr 转运系统复合体的核心组件, 在微生物转运 K^+ 、维持胞内外渗透压平衡方面起着至关重要的作用^[90]。虽然 KtrB 经常和 KtrA 共同发挥作用, 但 Zulkifli 等研究发现, 在较高的 K^+ 浓度(10 mmol/L KCl)下, 单独表达 KtrB 蛋白也能够维持蓝藻菌株 PCC 6803 的生长。当 KtrA 与 KtrB 共表达时, 其转运效应表现出强烈的 Na^+ 依赖性; 而当 KtrB 蛋白单独存在时, 即使不施加额外的 Na^+ 刺激, KtrB 依旧保留了较低的 K^+ 转运能力^[76]。对 KtrB 蛋白的深入研究将进一步加深对离子转运蛋白家族的认识。

2.1.3 Kdp 家族

Kdp 系统是一种可诱导、高亲和性的 K^+ 转运系统^[84], 主要存在于细菌和古菌中, 与前面两种 K^+ 转运家族相比, 转运效率较低^[91]。Kdp 家族成员包括 KdpA、KdpB、KdpC、KdpD、KdpE、KdpF 和 KdpQ 等。其中, KdpA、KdpB、KdpC 和 KdpF 形成钾离子泵 KdpFABC, 负责 Kdp 系统中 K^+ 的转运; KdpD 和 KdpE 主要存在于嗜盐耐盐细菌中, 形成双组分系统 KdpD/E, 负责 Kdp 转运系统的激活; KdpQ 仅存在于嗜盐古菌中, 取代 KdpD/E、激活钾离子泵 KdpFABC。

(1) KdpFABC 复合体

KdpFABC 复合体是一种 ATP 驱动的多亚基钾泵^[77]。其中, KdpA 蛋白负责 K^+ 的转运; KdpB

是一种 ATP 水解酶, 提供离子转运过程中所需要的能量; KdpC 充当催化伴侣, 以增加 KdpB 亚单位与 ATP 结合的亲合力; KdpF 负责维持 KdpFABC 复合体的稳定性。研究者在一项针对沙门氏菌的研究中发现, 低钾时 *kdpF* 的过表达会降低 *kdpD* 和 *kdpA* 的转录水平, 说明 KdpF 蛋白在复合物中主要发挥调节作用^[92]。

(2) KdpD/E 系统

KdpD 可以响应胞内外 Na^+ 浓度的变化^[78]。被激活后, 磷酸化的 KdpD 可将磷酸基团传递给 KdpE 蛋白, 启动 Kdp 转运系统, 维持细胞内外的渗透压平衡。张燕飞等曾敲除溶藻弧菌 HY9901 中的 KdpD 编码基因, 发现 KdpD 编码基因的缺失影响了菌株对 K^+ 的吸收能力, 降低了对高渗环境的抗性^[93]。

(3) KdpQ

KdpQ 是在嗜盐古菌中发现的 Kdp 家族成员。Strahl 等在嗜盐古菌盐沼盐杆菌 R1 和极端嗜盐古菌(*Halobacterium* sp.) NRC-1 中检测到了一个功能未知的基因 *cat3*^[79,94]。将盐沼盐杆菌 R1 中的 *kdpFABC* 和 *cat3* 一起敲除, 只恢复 *kdpFABC* 基因的表达, 菌株没有恢复对 K^+ 的摄取能力; 同时恢复 *kdpFABC* 和 *cat3* 的表达, 菌株重新拥有了 K^+ 摄取功能。这说明 *cat3* 对 Kdp 系统的转运有重要的调节作用, 研究者将其命名为 *kdpQ*。

2.1.4 Kup 家族

Kup 家族对 K^+ 的转运能力十分微弱, 且与其他的 K^+ 转运蛋白家族同源性极低, 其本质是 K^+/H^+ 同向转运蛋白。Sato 等用火焰光度法测量了大肠杆菌中由 Kup 蛋白介导的 K^+ 摄取转运活性, 发现 Kup 蛋白主要参与低钾环境中的离子转运^[95]。Trchounian 课题组用两种大肠杆菌的突变体对比 Kup 蛋白、TrkA 蛋白和 Kdp 蛋白在 pH 为 5.5 的酸性环境中对 K^+ 的摄取情况, 发现 Kup

蛋白是胁迫下大肠杆菌主要的 K^+ 吸收系统^[6]。2020 年, 研究者对枯草芽孢杆菌中发现的 KimA 蛋白做了功能表征^[6], 验证了其是 Kup 家族的一个新成员。

2.2 K^+ 转运蛋白的结构和机理

抗盐胁迫相关 K^+ 转运蛋白广泛存在于各种嗜盐耐盐微生物中, 因家族分类的不同, 其结构和机理存在较大差异。Trk 家族和 Ktr 家族同源性较高, 转运 K^+ 的机制相似; Kdp 家族的 K^+ 转运机制则与前两者不同。本文以这两类不同的 K^+ 转运蛋白为例, 简要阐述其转运 K^+ 的分子机制。

TrkA 蛋白与 KtrA 蛋白同源, TrkH 蛋白与 KtrB 蛋白同源, 研究者常把其放在一起, 进行对比研究。TrkH 和 KtrB 分别与 TrkA 和 KtrA 蛋白结合形成 TrkHA 和 KtrBA 复合物, 通过 RCK 门控环介导和调节 K^+ 的转运^[88]。研究发现, ATP 在 Trk 和 Ktr 转运家族的 K^+ 转运过程中发挥着重要作用。ATP 对于 Trk 家族的 K^+ 转运是必需的^[85]。当与 ADP 结合时, TrkA 呈四聚体, 使 TrkH 呈现闭合构象, K^+ 通道关闭; 当与 ATP 结合时, TrkA 环分裂成 2 个 TrkA 二聚体, 释放对 TrkH 的限制, K^+ 通道开放(图 2)^[97]。对于 Ktr 家族来说, 当 ATP 结合在 KtrA 等转运蛋白上时, 会增强 Ktr 家族的 K^+ 转运能力^[67]。KtrA 蛋白的 RCK 结构域可与 ATP 或 NADH 结合, 为 K^+ 的转运提供能量^[98]。

Kdp 家族同样是通过复合体的形式发挥作用, 其 KdpFABC 复合体属于多亚基钾泵, 在嗜盐古菌和嗜盐耐盐细菌中均广泛存在, 负责 K^+ 的转运。然而, KdpFABC 复合体的激活在细菌和古菌中存在明显差异。嗜盐耐盐细菌中, 由双组分系统 KdpD/E 负责盐浓度的感知和 Kdp 转运系统的激活^[78]; 嗜盐古菌中, 并不能检测到 *kdpD* 和 *kdpE* 的基因同源物, 而是由 KdpQ 取代 KdpD 和 KdpE, 发挥着启动 Kdp 转运系统的作用^[79]。

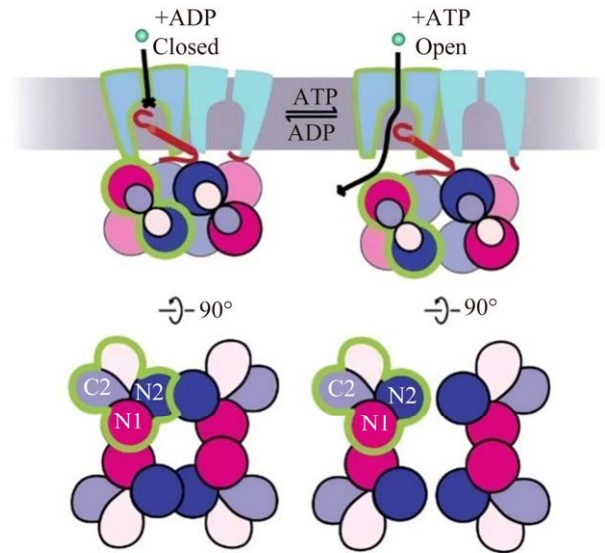


图 2 TrkHA 的门控机制^[97]

Figure 2 The gating mechanism of TrkHA^[97]. Upper: Cartoon illustration of TrkHA in the closed (left) and open (right) states, with TrkH at the transmembrane part. The green outlines mark one TrkH and one TrkA protomer; Lower: The tetrameric TrkA ring in the presence of ADP (left) and the two TrkA dimers in the presence of ATP (right). In the presence of ADP, TrkA forms a tetramer and closes TrkH through interactions at interfaces. In the presence of ATP, the tetrameric TrkA gating ring is split into two dimers and move downward, and the two TrkH protomers rotate relative to each other, resulting in the opening of the potassium ion channel.

此外, 在 K^+ 稳态调节过程中, 环状二腺苷单磷酸(cyclic diadenosine monophosphate, c-di-AMP)是非常重要的调节因子, 可在细胞内高钾的情况下抑制各 K^+ 蛋白转运系统, 以降低环境中钾离子的摄取。C-di-AMP 可以降低 KtrCD、Kim A 等 K^+ 转运蛋白的转录表达水平^[99], 并可与 TrkH、KtrA、Kim A 和 Kup^[68,100-102]等 K^+ 转运蛋白结合, 降低其 K^+ 转运效率。

3 其他金属离子转运蛋白

除了 Na^+ 、 H^+ 、 K^+ 等直接参与微生物盐境调节的离子之外, 其他金属离子的转运如 Fe^{3+} 、

Mg²⁺等,也在微生物的盐境适应过程中发挥了一定调节作用。与 Na⁺和 K⁺转运蛋白对胞内渗透压大小的直接调节作用不同,Fe³⁺和 Mg²⁺的转运蛋白主要通过影响胞内相容性溶质的合成起到渗透调节的作用。

3.1 Fur 蛋白

Argandoña 等首次证明了铁离子转运蛋白 Fur是需盐色盐杆菌(*Chromohalobacter salexigens*) DSM 3043 应对高盐胁迫复杂通路的一部分^[103]。研究者构建了缺失 Fur 蛋白的突变菌株,通过 RT-PCR 的方法,将其与拥有 Fur 蛋白的野生株进行对比观察,结果发现在高盐环境中,突变菌株的 *ectABC* 基因表达水平下调了 10 倍左右,说明 Fur 蛋白是相容性溶质合成基因的正调节器。在需盐色盐杆菌 CHR61 的培养基中额外添加 FeCl₃,可显著增加胞内的铁含量,并使高盐条件(2.5 mol/L NaCl)下菌株羟基四氢嘧啶的产量增加 20%,而四氢嘧啶的产量却有所下降,菌株的总体生长趋势强于对照组^[104]。这些结果表明,铁离子转运可调节微生物在应对高盐环境时的相容性溶质合成产量,提高微生物的盐适应能力。

3.2 CorA 蛋白

Mg²⁺是所有生物最重要的金属离子之一,可参与各种生理生化反应。CorA 蛋白是第一个被鉴别出来的 Mg²⁺转运体,也是细菌中最主要的 Mg²⁺转运体^[105]。Mg²⁺在微生物应对盐境时发挥的作用与 Fe³⁺较为相似,同样可以促进微生物胞内相容性溶质的生成。笔者课题组在盐单胞菌(*Halomonas* sp.) QHL5 的培养基中添加了不同浓度的 MgCl₂,结果显示四氢嘧啶的积聚量可随 Mg²⁺的浓度增加而逐步升高^[106]。类似地,顾頔测定了不同 MgSO₄ 浓度下一株中度嗜盐杆菌(*Brachy bacterium muris*)的生长曲线,发现菌株在高 MgSO₄ 浓度(10 g/L)的条件下生长状态更

好,同时,菌株内谷氨酸的产量也随着 MgSO₄ 浓度的升高而升高^[107]。四氢嘧啶和谷氨酸都属于微生物在胞内积聚的相容性溶质,这二者产量的升高说明了微生物在面对盐胁迫时,胞内一定浓度的 Mg²⁺会增强微生物的耐盐能力,而介导这一作用的转运蛋白,就是 CorA 蛋白。

4 展望

Na⁺、K⁺等离子的转运调控对于嗜盐耐盐微生物在盐胁迫下的生存极为重要,有助于维持胞内外的渗透压平衡和 pH 稳态。在具体的转运过程中,同一微生物中一种离子的转运可能依靠多种转运蛋白来共同发挥作用,且不同菌株中存在的转运蛋白不同。如盐单胞菌 Y2 中同时存在 Mrp 转运蛋白、NhaP 转运蛋白和 KefA 转运蛋白以共同完成 Na⁺转运功能^[108],而笔者课题组从青藏高原盐湖中分离出的盐单胞菌新种柴达木盐单胞菌(*Halomonas qaidamensis*) XH36 中参与 Na⁺转运的主要为 Mrp 蛋白和 NhaC 蛋白^[109]。目前,现有的研究多集中在各种新型离子转运蛋白的发现、转运蛋白的分子结构和工作机理,以及具体的分子调控机制等方面,但对这些冗余的多种转运系统如何协同发挥离子转运功能、以帮助菌株适应各种生存环境方面探索不足。最新的研究表明,冗余的 K⁺转运系统可保证粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)在不同应激条件下得以存活^[110],但具体的分子调控网络和调控机制尚不明确。

与此同时,Fe³⁺、Mg²⁺等离子的转运虽被证明可通过提高相容性溶质的合成和累积过程来促进嗜盐耐盐微生物适应盐胁迫,但其具体的作用机制仍待阐明。笔者课题组最新的研究表明,除 Fe³⁺和 Mg²⁺外,Ca²⁺的跨膜转运可能也在嗜盐耐盐微生物的盐境适应过程中发挥了一定调节作用^[111]。运用转录组学技术分析盐激条件下坎

帕尼亚盐单胞菌 (*Halomonas campaniensis*) XH26 的上调表达基因, 筛选出一个随盐度增加而显著上调的新型基因 *orf03282*。通过克隆该新型基因并将其异源表达到大肠杆菌中发现, 重组菌株胞内的 Ca^{2+} 浓度和盐耐受性均明显提高。结合蛋白序列比对和结构功能预测结果, 推测 Orf03282 蛋白可能与 Ca^{2+} 离子转运相关, 可通过增加胞内 Ca^{2+} 浓度提高细胞的耐盐能力。这些金属离子转运蛋白参与渗透压调节的分子作用机制究竟是什么, 以及 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 等其他金属离子通道是否也与嗜盐耐盐微生物的渗透压调节有关, 是后续亟待解答的问题。

近年来, 嗜盐耐盐微生物中抗盐胁迫相关 Na^+ 、 K^+ 等离子转运蛋白已陆续被应用于盐碱地农作物的改良。如在大豆植株中异源表达施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*) 中的 NhaA 蛋白后, 能够显著提高大豆对盐胁迫的耐受性, 促进大豆耐盐新品种的选育和广泛应用^[112]; 在棉花中异源表达中度嗜盐菌菌株的 NhaD 蛋白可以提高棉花的抗旱耐盐碱能力^[113-114]; 在烟草和玉米中异源表达细菌 TrkH 蛋白, 可明显改善植物在缺钾且盐渍化的土壤上的生长状态等^[115-116]。然而, 由于菌株的嗜盐耐盐特性更多是多基因协同作用的结果, 现有的单一基因过表达仍具有一定的局限性。采用高通量筛选和其他分子生物学等研究手段, 发现新的抗盐胁迫相关离子转运蛋白, 探索各离子转运蛋白的应答和协同作用机制, 将为转基因工程技术在培育抗盐碱农作物方面的进一步应用提供更多的理论和实践支撑。

参考文献

- [1] 陈龙, 金阿南, 马香娟, 吴镛, 冯华军. 微生物高盐渗透适应策略及其耐盐强化研究进展[J]. 微生物学报, 2022, 62(9): 3306-3317.
CHEN L, JIN AN, MA XJ, WU D, FENG HJ. Research progress on osmotic pressure adaptation strategy and salt tolerance enhancement of microorganisms under high salinity environment[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(9): 3306-3317 (in Chinese).
- [2] KEMPF B, BREMER E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments[J]. *Archives of Microbiology*, 1998, 170(5): 319-330.
- [3] PADAN E, VENTURI M, GERCHMAN Y, DOVER N. Na^+/H^+ antiporters[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2001, 1505(1): 144-157.
- [4] SHAO L, ABDEL-MOTAAL H, CHEN J, CHEN HW, XU T, MENG L, ZHANG ZL, MENG FK, JIANG JQ. Characterization of a functionally unknown arginine-aspartate-aspartate family protein from *Halobacillus andaensis* and functional analysis of its conserved arginine/aspartate residues[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 807.
- [5] DONG P, WANG LD, SONG N, YANG LN, CHEN J, YAN MX, CHEN HW, ZHANG R, LI JC, ABDEL-MOTAAL H, JIANG JQ. A UPF0118 family protein with uncharacterized function from the moderate halophile *Halobacillus andaensis* represents a novel class of $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{H}^+$ antiporter[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 45936.
- [6] TASCÓN I, SOUSA JS, COREY RA, MILLS DJ, GRIWATZ D, AUMÜLLER N, MIKUSEVIC V, STANSFELD PJ, VONCK J, HÄNELT I. Structural basis of proton-coupled potassium transport in the KUP family[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 626.
- [7] HOBMEIER K, CANTONE M, NGUYEN QA, PFLÜGER-GRAU K, KREMLING A, KUNTE HJ, PFEIFFER F, MARIN-SANGUINO A. Adaptation to varying salinity in *Halomonas elongata*: much more than ectoine accumulation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 846677.
- [8] 杨礼富, 赵百锁, 杨苏声. 细菌钠离子输出系统的类型及其可能机制[J]. 微生物学报, 2007, 47(6): 1110-1114.
YANG LF, ZHAO BS, YANG SS. Sodium ion transportation system and its possible mechanisms in bacteria[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(6): 1110-1114 (in Chinese).
- [9] 徐宁, 程海娇, 刘清岱, 刘君, 马延和. 细菌 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42(10): 2002-2011.
XU N, CHENG HJ, LIU QD, LIU J, MA YH. Advances in the study of bacterial Na^+/H^+ inverse transporters[J]. *Microbiology*, 2015, 42(10): 2002-2011 (in Chinese).

- [10] MASRATI G, DWIVEDI M, RIMON A, GLUCK-MARGOLIN Y, KESSEL A, ASHKENAZY H, MAYROSE I, PADAN E, BEN-TAL N. Broad phylogenetic analysis of cation/proton antiporters reveals transport determinants[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 4205.
- [11] 张凯. 膜蛋白结构动力学[M]. 北京: 科学出版社, 2021.
ZHANG K. Structural Dynamics of Membrane Proteins[M]. Beijing: Science Press, 2021 (in Chinese).
- [12] KURODA T, FUJITA N, UTSUGI J, KURODA M, MIZUSHIMA T, TSUCHIYA T. A major Li^+ extrusion system NhaB of *Pseudomonas aeruginosa*: comparison with the major Na^+ extrusion system NhaP[J]. *Microbiology and Immunology*, 2004, 48(4): 243-250.
- [13] RESCH CT, WINOGRODZKI JL, HÄSE CC, DIBROV P. Insights into the biochemistry of the ubiquitous NhaP family of cation/ H^+ antiporters[J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 2011, 89(2): 130-137.
- [14] FUJISAWA M, KUSUMOTO A, WADA Y, TSUCHIYA T, ITO M. NhaK, a novel monovalent cation/ H^+ antiporter of *Bacillus subtilis*[J]. *Archives of Microbiology*, 2005, 183(6): 411-420.
- [15] VERKHOVSKAYA ML, BARQUERA B, WIKSTRÖM M. Deletion of one of two *Escherichia coli* genes encoding putative Na^+/H^+ exchangers (*ycgO*) perturbs cytoplasmic alkali cation balance at low osmolarity[J]. *Microbiology*, 2001, 147(11): 3005-3013.
- [16] GOUDA T, KURODA M, HIRAMATSU T, NOZAKI K, KURODA T, MIZUSHIMA T, TSUCHIYA T. *nhaG* Na^+/H^+ antiporter gene of *Bacillus subtilis* ATCC 9372, which is missing in the complete genome sequence of strain 168, and properties of the antiporter[J]. *The Journal of Biochemistry*, 2001, 130(5): 711-717.
- [17] INABA K, KURODA T, SHIMAMOTO T, KAYAHARA T, TSUDA M, TSUCHIYA T. Lithium toxicity and $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{H}^+$ antiporter in *Escherichia coli*[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 1994, 17(3): 395-398.
- [18] STRAUSAK D, WASER M, SOLIOZ M. Functional expression of the *Enterococcus hirae* NaH-antiporter in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(35): 26334-26337.
- [19] RUDD KE. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 10: the physical map[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(3): 985-1019.
- [20] FUJISAWA M, ITO M, KRULWICH TA. Three two-component transporters with channel-like properties have monovalent cation/proton antiport activity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(33): 13289-13294.
- [21] SOUTHWORTH TW, GUFFANTI AA, MOIR A, KRULWICH TA. GerN, an endospore germination protein of *Bacillus cereus*, is an $\text{Na}^+/\text{H}^+-\text{K}^+$ antiporter[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(20): 5896-5903.
- [22] MORMILE MR, EDWARDS T, FRANK R, GEURIN Z, HAENDIGES J, HOFFMANN M, MILLER J. Whole-genome analysis of *Halomonas* sp. soap lake #7 reveals it possesses putative *mnp* antiporter operon groups 1 and 2[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2019, 11(6): 1706-1709.
- [23] ABDEL-MOTAAL H, MENG L, ZHANG ZL, ABDELAZEZ AH, SHAO L, XU T, MENG FK, ABOZAED S, ZHANG R, JIANG JQ. An uncharacterized major facilitator superfamily transporter from *Planococcus maritimus* exhibits dual functions as a $\text{Na}^+(\text{Li}^+, \text{K}^+)/\text{H}^+$ antiporter and a multidrug efflux pump[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1601.
- [24] 王艳红, 刘艳双, 石德喜, 朱保国, 吕保磊, 付诗雨, 徐苗, 王伟, 殷奎德. 新型 YdjM 超家族成员的钠/氢逆向转运蛋白功能鉴定[J]. *中国生物工程杂志*, 2018, 38(12): 32-40.
WANG YH, LIU YS, SHI DX, ZHU BG, LV BL, FU SY, XU M, WANG W, YIN KD. Functional identification of Na^+/H^+ antiporter in novel YdjM superfamily members[J]. *China Biotechnology*, 2018, 38(12): 32-40 (in Chinese).
- [25] CUI YB, CHENG B, MENG YW, LI CF, YIN HJ, XU P, YANG CY. Expression and functional analysis of two NhaD type antiporters from the halotolerant and alkaliphilic *Halomonas* sp. Y2[J]. *Extremophiles*, 2016, 20(5): 631-639.
- [26] 宋娜. 嗜碱盐单胞菌中新型的 NhaD 型钠/氢逆向转运蛋白基因的克隆与功能分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2017.
SONG N. Cloning and functional analysis of a novel NhaD-type sodium/hydrogen antiporter gene from *Halomonas hydrophila*[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [27] YANG LF, JIANG JQ, ZHAO BS, ZHANG B, FENG DQ, LU WD, WANG L, YANG SS. A Na^+/H^+

- antiporter gene of the moderately halophilic bacterium *Halobacillus dabanensis* D-8T: cloning and molecular characterization[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 255(1): 89-95.
- [28] PRÁGAI Z, ESCHEVINS C, BRON S, HARWOOD CR. *Bacillus subtilis* NhaC, an Na⁺/H⁺ antiporter, influences expression of the *phoPR* operon and production of alkaline phosphatases[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(8): 2505-2515.
- [29] 贾桂燕, 王永杰, 陈志康, 陈星, 殷奎德, 李雯, 王艳红. 盐单胞菌 DSM 16354^T 中新型耐盐基因的克隆及解析[J]. *中国生物工程杂志*, 2022, 42(3): 27-37.
- JIA GY, WANG YJ, CHEN ZK, CHEN X, YIN KD, LI W, WANG YH. Cloning and analysis of novel functional genes in *Halomonas alkaliphila* DSM 16354^T[J]. *China Biotechnology*, 2022, 42(3): 27-37 (in Chinese).
- [30] WEST IC, MITCHELL P. Proton/sodium ion antiporter in *Escherichia coli*[J]. *The Biochemical Journal*, 1974, 144(1): 87-90.
- [31] WASER M, HESS-BIENZ D, DAVIES K, SOLIOZ M. Cloning and disruption of a putative NaH-antiporter gene of *Enterococcus hirae*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(8): 5396-5400.
- [32] UTSUGI J, INABA K, KURODA T, TSUDA M, TSUCHIYA T. Cloning and sequencing of a novel Na⁺/H⁺ antiporter gene from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1998, 1398(3): 330-334.
- [33] CHANROJ S, WANG GY, VENEMA K, ZHANG MW, DELWICHE CF, SZE H. Conserved and diversified gene families of monovalent cation/H(+) antiporters from algae to flowering plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2012, 3: 25.
- [34] OKAZAKI KI, WÖHLERT D, WARNAU J, JUNG H, YILDIZ Ö, KÜHLBRANDT W, HUMMER G. Mechanism of the electroneutral sodium/proton antiporter PaNhaP from transition-path shooting[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 1742.
- [35] WARNAU J, WÖHLERT D, OKAZAKI KI, YILDIZ Ö, GAMIZ-HERNANDEZ AP, KAILA VRI, KÜHLBRANDT W, HUMMER G. Ion binding and selectivity of the Na⁺/H⁺ antiporter MjNhaP1 from experiment and simulation[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2020, 124(2): 336-344.
- [36] 王姝杰, 王法龙, 李世访, 闫淑珍. 转 Na⁺/H⁺ antiporter (Nhap)基因烟草植株的获得及耐盐性鉴定[J]. *农业生物技术学报*, 2006, 14(1): 74-78.
- WANG SJ, WANG FL, LI SF, YAN SZ. Overexpression of Na⁺/H⁺ of antiporter (Nhap) gene improves salt tolerance in tobacco[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2006, 14(1): 74-78 (in Chinese)
- [37] CASEY D, SLEATOR RD. A genomic analysis of osmotolerance in *Staphylococcus aureus*[J]. *Gene*, 2021, 767: 145268.
- [38] SEREIKI M, PETRIGLIERI F, JENSEN TBN, SANNIKOV A, HOPPE M, NIELSEN PH, MARSHALL IPG, SCHRAMM A, ALBERTSEN M. Closed genomes uncover a saltwater species of *Candidatus* Electronema and shed new light on the boundary between marine and freshwater cable bacteria[J]. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 2023, 17(4): 561-569.
- [39] WINKELMANN I, UZDAVINYS P, KENNEY IM, BROCK J, MEIER PF, WAGNER LM, GABRIEL F, JUNG S, MATSUOKA R, BALLMOOS C, BECKSTEIN O, DREW D. Crystal structure of the Na⁺/H⁺ antiporter NhaA at active pH reveals the mechanistic basis for pH sensing[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 6383.
- [40] 刘广发, 曾活水, 陈启伟, 高亚辉. 假单胞菌 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因 *nhaA* 的克隆与鉴定[J]. *遗传学报*, 2005, 32(3): 309-314.
- LIU GF, ZENG HS, CHEN QW, GAO YH. Cloning and characterization of Na⁺/H⁺ antiporter gene (*nhaA*) from *Pseudomonas* sp. Cn4902[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2005, 32(3): 309-314.
- [41] JANTO B, AHMED A, ITO M, LIU J, HICKS DB, PAGNI S, FACKELMAYER OJ, SMITH TA, EARL J, ELBOURNE LDH, HASSAN K, PAULSEN IT, KOLSTØ AB, TOURASSE NJ, EHRlich GD, BOISSY R, LI G, XUE YF, MA YH, HU FZ, et al. Genome of alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF₄ reveals adaptations that support the ability to grow in an external pH range from 7.5 to 11.4[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(12): 3289-3309.
- [42] DING RT, YANG N, LIU JG. The osmoprotectant switch of potassium to compatible solutes in an extremely halophilic archaea *Halorubrum kocurii* 2020YC7[J]. *Genes*, 2022, 13(6): 939.
- [43] KHARE G, REDDY PV, SIDHWANI P, TYAGI AK. KefB inhibits phagosomal acidification but its role is

- unrelated to *M. tuberculosis* survival in host[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 3527.
- [44] HAMAMOTO T, HASHIMOTO M, HINO M, KITADA M, SETO Y, KUDO T, HORIKOSHI K. Characterization of a gene responsible for the Na^+/H^+ antiporter system of alkalophilic *Bacillus* species strain C-125[J]. *Molecular Microbiology*, 1994, 14(5): 939-946.
- [45] SWARTZ TH, IKEWADA S, ISHIKAWA O, ITO M, KRULWICH TA. The Mrp system: a giant among monovalent cation/proton antiporters?[J]. *Extremophiles*, 2005, 9(5): 345-354.
- [46] ZHAI L, XIE JY, LIN YF, CHENG K, WANG LJ, YUE F, GUO JY, LIU JQ, YAO S. Genome sequencing and heterologous expression of antiporters reveal alkaline response mechanisms of *Halomonas alkalicola*[J]. *Extremophiles*, 2018, 22(2): 221-231.
- [47] MORINO M, SUZUKI T, ITO M, KRULWICH TA. Purification and functional reconstitution of a seven-subunit mrp-type Na^+/H^+ antiporter[J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(1): 28-35.
- [48] ZHAO WS, MA XP, LIU XX, JIAN HH, ZHANG Y, XIAO X. Cross-stress adaptation in a piezophilic and hyperthermophilic archaeon from deep sea hydrothermal vent[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 2081.
- [49] ITO M, GUFFANTI AA, OUDEGA B, KRULWICH TA. *Mrp*, a multigene, multifunctional locus in *Bacillus subtilis* with roles in resistance to cholate and to Na^+ and in pH homeostasis[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(8): 2394-2402.
- [50] YAMAGUCHI T, TSUTSUMI F, PUTNOKY P, FUKUHARA M, NAKAMURA T. pH-dependent regulation of the multi-subunit cation/proton antiporter Phal system from *Sinorhizobium meliloti*[J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2009, 155(Pt 8): 2750-2756.
- [51] SWARTZ TH, ITO M, OHIRA T, NATSUI S, HICKS DB, KRULWICH TA. Catalytic properties of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus* members of the secondary cation/proton antiporter-3 (Mrp) family are revealed by an optimized assay in an *Escherichia coli* host[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(8): 3081-3090.
- [52] FLUMAN N, ADLER J, ROTENBERG SA, BROWN MH, BIBI ET. Export of a single drug molecule in two transport cycles by a multidrug efflux pump[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4615.
- [53] 王艳红, 尹圣祥, 王吉宏, 王于, 乔志刚, 纪思雨, 贾桂燕. 盐单胞菌 YH-I 中 MFS 超家族转运蛋白基因的克隆、生物信息学分析及其功能初步验证[J]. *中国生物制品学杂志*, 2018, 31(5): 473-478, 484.
- WANG YH, YIN SX, WANG JH, WANG Y, QIAO ZG, JI SY, JIA GY. Cloning, bioinformatic analysis and preliminary functional identification of MFS transporter gene from *Halomonas* YH-I[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2018, 31(5): 473-478, 484 (in Chinese).
- [54] 邓东, 颜宁. MFS 超家族转运蛋白结构基础及转运机制[J]. *科学通报*, 2015, 60(8): 720-728.
- DENG D, YAN N. Structural basis and transport mechanism of MFS superfamily transporters[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2015, 60(8): 720-728 (in Chinese).
- [55] PINNER E, PADAN E, SCHULDINER S. Kinetic properties of NhaB, a Na^+/H^+ antiporter from *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(42): 26274-26279.
- [56] NOZAKI K, KURODA T, MIZUSHIMA T, TSUCHIYA T. A new Na^+/H^+ antiporter, NhaD, of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1998, 1369(2): 213-220.
- [57] DZIOBA J, OSTROUMOV E, WINOGRODZKI A, DIBROV P. Cloning, functional expression in *Escherichia coli* and primary characterization of a new Na^+/H^+ antiporter, NhaD, of *Vibrio cholerae*[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2002, 229(1): 119-124.
- [58] 李春芳. 中度嗜盐嗜碱菌 *Halomonas* sp. 19-A 中相关 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的克隆与功能研究[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2015.
- LI CF. Cloning and functional study of Na^+/H^+ antitransporter gene from *Halomonas* sp. 19-A[D]. Jinan: Master's thesis of Shandong University, 2015 (in Chinese).
- [59] YANG LF, ZHANG B, WANG L, YANG SS. The short C-terminal hydrophilic domain of NhaH Na^+/H^+ antiporter from *Halobacillus dabanensis* with roles in resistance to salt and in pH sensing[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2008, 53(21): 3311-3316.
- [60] PADAN E. Functional and structural dynamics of NhaA, a prototype for Na^+ and H^+ antiporters, which

- are responsible for Na⁺ and H⁺ homeostasis in cells[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2014, 1837(7): 1047-1062.
- [61] HUNTE C, SCREPANTI E, VENTURI M, RIMON A, PADAN E, MICHEL H. Structure of a Na⁺/H⁺ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH[J]. *Nature*, 2005, 435(7046): 1197-1202.
- [62] PADAN E, KOZACHKOV L, HERZ K, RIMON A. NhaA crystal structure: functional-structural insights[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2009, 212(Pt 11): 1593-1603.
- [63] LEE YC, HAAPANEN O, ALTMAYER A, KÜHLBRANDT W, SHARMA V, ZICKERMANN V. Ion transfer mechanisms in Mrp-type antiporters from high resolution cryoEM and molecular dynamics simulations[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 6091.
- [64] SPERLING E, GÓRECKI K, DRAKENBERG T, HÄGERHÄLL C. Functional differentiation of antiporter-like polypeptides in complex I; a site-directed mutagenesis study of residues conserved in MrpA and NuoL but not in MrpD, NuoM, and NuoN[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0158972.
- [65] FANG H, QIN XY, ZHANG KD, NIE Y, WU XL. Role of the group 2 Mrp sodium/proton antiporter in rapid response to high alkaline shock in the alkaline- and salt-tolerant *Dietzia* sp. DQ12-45-1b[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(8): 3765-3777.
- [66] LI B, ZHANG KD, NIE Y, WANG XP, ZHAO Y, ZHANG XC, WU XL. Structure of the *Dietzia* Mrp complex reveals molecular mechanism of this giant bacterial sodium proton pump[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(49): 31166-31176.
- [67] GRÜNDLING A. Potassium uptake systems in *Staphylococcus aureus*: new stories about ancient systems[J]. *mBio*, 2013, 4(5): e00784-e00713.
- [68] 蔡霞, 何进. 第二信使分子 c-di-AMP 调控细菌中钾离子转运的机制[J]. *微生物学报*, 2017, 57(10): 1434-1442.
- CAI X, HE J. Second messenger c-di-AMP regulates potassium ion transport in bacteria[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(10): 1434-1442 (in Chinese).
- [69] KRAEGELOH A, AMENDT B, KUNTE HJ. Potassium transport in a halophilic member of the *Bacteria* domain: identification and characterization of the K⁺ uptake systems TrkH and TrkI from *Halomonas elongata* DSM 2581^T[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(3): 1036-1043.
- [70] SCHLÖSSER A, MELDORF M, STUMPE S, BAKKER EP, EPSTEIN W. TrkH and its homolog, TrkG, determine the specificity and kinetics of cation transport by the Trk system of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(7): 1908-1910.
- [71] TANUDJAJA E, HOSHI N, YAMAMOTO K, IHARA K, FURUTA T, TSUJII M, ISHIMARU Y, UOZUMI N. Two Trk/Ktr/HKT-type potassium transporters, TrkG and TrkH, perform distinct functions in *Escherichia coli* K-12[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2023, 299(2): 102846.
- [72] SCHLÖSSER A, KLUTTIG S, HAMANN A, BAKKER EP. Subcloning, nucleotide sequence, and expression of *trkG*, a gene that encodes an integral membrane protein involved in potassium uptake via the Trk system of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(10): 3170-3176.
- [73] HOLTSMANN G, BAKKER EP, UOZUMI N, BREMER E. KtrAB and KtrCD: two K⁺ uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(4): 1289-1298.
- [74] NAKAMURA T, YUDA R, UNEMOTO T, BAKKER EP. KtrAB, a new type of bacterial K⁺-uptake system from *Vibrio alginolyticus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(13): 3491-3494.
- [75] THOLEMA N, BRÜGGEN MV, MÄSER P, NAKAMURA T, SCHROEDER JI, KOBAYASHI H, UOZUMI N, BAKKER EP. All four putative selectivity filter glycine residues in KtrB are essential for high affinity and selective K⁺ uptake by the KtrAB system from *Vibrio alginolyticus*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(50): 41146-41154.
- [76] ZULKIFLI L, AKAI M, YOSHIKAWA A, SHIMOJIMA M, OHTA H, GUY HR, UOZUMI N. The KtrA and KtrE subunits are required for Na⁺-dependent K⁺ uptake by KtrB across the plasma membrane in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(19): 5063-5070.
- [77] GREIE JC. The KdpFABC complex from *Escherichia coli*: a chimeric K⁺ transporter merging ion pumps with

- ion channels[J]. *European Journal of Cell Biology*, 2011, 90(9): 705-710.
- [78] EPSTEIN W. The KdpD sensor kinase of *Escherichia coli* responds to several distinct signals to turn on expression of the kdp transport system[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 198(2): 212-220.
- [79] STRAHL H, GREIE JC. The extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* R1 responds to potassium limitation by expression of the K⁺-transporting KdpFABC P-type ATPase and by a decrease in intracellular K⁺[J]. *Extremophiles*, 2008, 12(6): 741-752.
- [80] BOSSEMEYER D, SCHLÖSSER A, BAKKER EP. Specific cesium transport via the *Escherichia coli* Kup (TrkD) K⁺ uptake system[J]. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171(4): 2219-2221.
- [81] TANUDJAJA E, HOSHI N, SU YH, HAMAMOTO S, UOZUMI N. Kup-mediated Cs⁺ uptake and Kdp-driven K⁺ uptake coordinate to promote cell growth during excess Cs⁺ conditions in *Escherichia coli*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 2122.
- [82] JOHNSON HA, HAMPTON E, LESLEY SA. The *Thermotoga maritima* Trk potassium transporter: from frameshift to function[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(7): 2276-2284.
- [83] DURELL SR, HAO Y, NAKAMURA T, BAKKER EP, GUY HR. Evolutionary relationship between K(+) channels and symporters[J]. *Biophysical Journal*, 1999, 77(2): 775-788.
- [84] 姜影影. 死海放线菌新物种的多相分类鉴定及白色嗜盐多孢菌 AFM 10251 嗜盐机制的多组学研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2018.
- JIANG YY. Multiphase classification and identification of a new actinomycetes species from the Dead Sea and a multiomics study on halophilic mechanism of *Polyspora halophilus albicans* AFM 10251[D]. Yangling: Doctoral dissertation of Northwest A&F University, 2018 (in Chinese).
- [85] GUO YH, XUE YF, LIU J, WANG QH, MA YH. Characterization and function analysis of a halo-alkaline-adaptable Trk K⁺ uptake system in *Alkalimonas amylolytica* strain N₁₀[J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2009, 52(10): 949-957.
- [86] CAO Y, PAN YP, HUANG H, JIN XS, LEVIN EJ, KLOSS B, ZHOU M. Gating of the TrkH ion channel by its associated RCK protein TrkA[J]. *Nature*, 2013, 496(7445): 317-322.
- [87] 张晓燕. 海洋微生物钾转运蛋白基因 *trkH* 的克隆与表达[D]. 大连: 大连理工大学硕士学位论文, 2015.
- ZHANG XY. Cloning and expression of marine microbial potassium transporter gene *trkH*[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian University of Technology, 2015 (in Chinese).
- [88] LEVIN EJ, ZHOU M. Recent progress on the structure and function of the TrkH/KtrB ion channel[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2014, 27: 95-101.
- [89] 鲜先毅, 江世杰, 崔广艳, 刘盈盈, 代其林, 陈明, 王劲. 耐辐射异常球菌 K⁺吸收蛋白 *ktrA* 基因功能研究[J]. *中国农业科技导报*, 2014, 16(1): 76-81.
- XIAN XY, JIANG SJ, CUI GY, LIU YY, DAI QL, CHEN M, WANG J. Functional analysis of *ktrA* gene encoding potassium uptake protein from *Deinococcus radiodurans*[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2014, 16(1): 76-81 (in Chinese).
- [90] MATSUDA N, KOBAYASHI H, KATOH H, OGAWA T, FUTATSUGI L, NAKAMURA T, BAKKER EP, UOZUMI N. Na⁺-dependent K⁺ uptake *ktr* system from the *Cyanobacterium synechocystis* sp. PCC 6803 and its role in the early phases of cell adaptation to hyperosmotic shock[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(52): 54952-54962.
- [91] MATSUDA N, UOZUMI N. Ktr-mediated potassium transport, a major pathway for potassium uptake, is coupled to a proton gradient across the membrane in *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2006, 70(1): 273-275.
- [92] GANNOUN-ZAKI L, BELON C, DUPONT C, HILBERT F, KREMER L, BLANC-POTARD AB. Overexpression of the *Salmonella* KdpF membrane peptide modulates expression of *kdp* genes and intramacrophage growth[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2014, 359(1): 34-41.
- [93] 张燕飞, 庞欢瑛, 简纪常, 鲁义善, 吴灶和. 溶藻弧菌 *kdpD* 基因敲除突变株的构建及其表型特征[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(9): 1770-1778.
- ZHANG YF, PANG HY, JIAN JC, LU YS, WU ZH. Construction and characterization of the *kdpD* gene knock-out mutant of *Vibrio alginolyticus*[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(9): 1770-1778 (in Chinese).
- [94] KIXMÜLLER D, STRAHL H, WENDE A, GREIE JC. Archaeal transcriptional regulation of the prokaryotic KdpFABC complex mediating K⁺ uptake in *H. salinarum*[J]. *Extremophiles*, 2011, 15(6): 643.

- [95] SATO Y, NANATANI K, HAMAMOTO S, SHIMIZU M, TAKAHASHI M, TABUCHI-KOBAYASHI M, MIZUTANI A, SCHROEDER JI, SOUMA S, UOZUMI N. Defining membrane spanning domains and crucial membrane-localized acidic amino acid residues for K⁺ transport of a Kup/HAK/KT-type *Escherichia coli* potassium transporter[J]. *The Journal of Biochemistry*, 2014, 155(5): 315-323.
- [96] TRCHOUNIAN A, KOBAYASHI H. Kup is the major K⁺ uptake system in *Escherichia coli* upon hyper-osmotic stress at a low pH[J]. *FEBS Letters*, 1999, 447(2/3): 144-148.
- [97] ZHANG HZ, PAN YP, HU LY, HUDSON MA, HOFSTETTER KS, XU ZC, RONG MQ, WANG Z, PRASAD BVV, LOCKLESS SW, CHIU W, ZHOU M. TrkA undergoes a tetramer-to-dimer conversion to open TrkH which enables changes in membrane potential[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 547.
- [98] CORRIGAN RM, CAMPEOTTO I, JEGANATHAN T, ROELOFS KG, LEE VT, GRÜNDLING A. Systematic identification of conserved bacterial c-di-AMP receptor proteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(22): 9084-9089.
- [99] GIBHARDT J, HOFFMANN G, TURDIEV A, WANG MY, LEE VT, COMMICHAU FM. c-di-AMP assists osmoadaptation by regulating the *Listeria monocytogenes* potassium transporters KimA and KtrCD[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(44): 16020-16033.
- [100] FUSS MF, WIEFERIG JP, COREY RA, HELLMICH Y, TASCÓN I, SOUSA JS, STANSFELD PJ, VONCK J, HÄNELT I. Cyclic di-AMP traps proton-coupled K⁺ transporters of the KUP family in an inward-occluded conformation[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 3683.
- [101] ROCHA R, TEIXEIRA-DUARTE CM, JORGE JMP, MORAIS-CABRAL JH. Characterization of the molecular properties of KtrC, a second RCK domain that regulates a Ktr channel in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Structural Biology*, 2019, 205(3): 34-43.
- [102] KIM H, YOUN SJ, KIM SO, KO J, LEE JO, CHOI BS. Structural studies of potassium transport protein KtrA regulator of conductance of K⁺ (RCK) C domain in complex with cyclic diadenosine monophosphate (c-di-AMP)[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(26): 16393-16402.
- [103] ARGANDOÑA M, NIETO JJ, IGLESIAS-GUERRA F, CALDERÓN MI, GARCÍA-ESTEPA R, VARGAS C. Interplay between iron homeostasis and the osmotic stress response in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(11): 3575-3589.
- [104] SALVADOR M, ARGANDOÑA M, NARANJO E, PIUBELI F, NIETO JJ, CSONKA LN, VARGAS C. Quantitative RNA-seq analysis unveils osmotic and thermal adaptation mechanisms relevant for ectoine production in *Chromohalobacter salexigens*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1845.
- [105] SMITH RL, BANKS JL, SNAVELY MD, MAGUIRE ME. Sequence and topology of the CorA magnesium transport systems of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Identification of a new class of transport protein[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(19): 14071-14080.
- [106] 朱德锐, 龙启福, 沈国平, 李丹丹, 刘德立. 青海湖樊氏盐单胞菌 QHL5 四氢嘧啶合成影响因素分析[J]. *环境化学*, 2015, 34(1): 111-116.
- ZHU DR, LONG QF, SHEN GP, LI DD, LIU DL. Accumulation and influential factors of ectoine synthesis in *Halomonas ventosae* QHL5 isolated from Qinghai Lake[J]. *Environmental Chemistry*, 2015, 34(1): 111-116 (in Chinese).
- [107] 顾頔. 中度嗜盐菌 *Brachybacterium muris* 生物学特性、盐胁迫应答的相容性溶质分子鉴定及其作用机制研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2021.
- GU D. Biological characteristics of moderately halophilic bacterium *Brachybacterium muris*, molecular identification of compatible solute in response to salt stress and its mechanism of action[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2021 (in Chinese).
- [108] MENG YW, LV PW, CUI YB, ZHANG LN, WANG Y, MA CQ, XU P, YANG CY. Potassium resistance of halotolerant and alkaliphilic *Halomonas* sp. Y2 by a Na⁺-induced K⁺ extrusion mechanism[J]. *Microbiology*, 2019, 165(4): 411-418.
- [109] ZHANG TT, CUI TQ, CAO YN, LI YZ, LI FH, ZHU DR, XING JW. Whole genome sequencing of the halophilic *Halomonas qaidamensis* XH36, a novel species strain with high ectoine production[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2022, 115(4): 545-559.
- [110] ACCIARRI G, GIZZI FO, TORRES MANNO MA, STÜLKE J, ESPARIZ M, BLANCATO VS, MAGNI C.

- Redundant potassium transporter systems guarantee the survival of *Enterococcus faecalis* under stress conditions[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1117684.
- [111] 舒志万, 王智博, 陶宇杰, 王嵘, 沈国平, 邢江娃, 朱德锐. 盐单胞菌假定蛋白基因的功能预测与克隆表达及耐盐相关性[J]. *生物学杂志*, 2023: 1-7.
SHU ZY, WANG ZB, TAO YJ, WANG R, SHEN GP, XING JW, ZHU DR. Correlation between functional prediction, cloning and expression and salt tolerance of halomonas putative protein gene[J]. *Journal of Biology*, 2023: 1-7 (in Chinese).
- [112] 罗茜, 张海玲, 徐香玲, 姚琳, 王全伟. Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因 *PsnhaA* 的克隆及在大豆中的功能验证[J]. *黑龙江农业科学*, 2015(5): 6-12.
LUO Q, ZHANG HL, XU XL, YAO L, WANG QW. Cloning of Na⁺/H⁺ antiporter gene *PsnhaA* and analysis on function in soybean[J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2015(5): 6-12 (in Chinese).
- [113] 赵亚楠. 转 *GNA*、*ACA*、*NhaD*、*HEWL* 和 *CP4-EPSPS* 基因棉花新材料的创制[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2020.
ZHAO YN. Creation of new cotton materials with *GNA*, *ACA*, *NhaD*, *HEWL* and *CP4-EPSPS* genes[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020 (in Chinese).
- [114] GUO WF, LI GQ, WANG N, YANG CF, ZHAO YN, PENG HK, LIU DH, CHEN SF. A Na⁺/H⁺ antiporter, K2-NhaD, improves salt and drought tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. *Plant Molecular Biology*, 2020, 102(4): 553-567.
- [115] DING BJ, ZHANG XY, XU YS, AN LJ, LIU XG, SU Q. The bacterial potassium transporter gene *MbtrkH* improves K⁺ uptake in yeast and tobacco[J]. *PLoS One*, 2020, 15(8): e0236246.
- [116] 丁宝娟, 安利佳, 苏乔. 过表达钾转运蛋白基因 *trkH* 提高玉米的钾营养[J]. *植物研究*, 2020, 40(1): 141-147.
DING BJ, AN LJ, SU Q. Overexpression of K⁺ transporter gene *trkH* in enhancing K⁺ nutrition in maize[J]. *Plant Research*, 2020, 40(1): 141-147 (in Chinese).