

付世英,刘夏燕. 拟南芥 ERA-1 蛋白的原核表达及多克隆抗体制备[J]. 江苏农业科学,2017,45(8):33-36.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.08.009

拟南芥 ERA-1 蛋白的原核表达及多克隆抗体制备

付世英,刘夏燕

(西北农林科技大学生命科学学院,陕西杨凌 712100)

摘要:将拟南芥 *ERA-1* 基因除信号肽外的剩余编码序列克隆到原核表达载体 pET28a 上,转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达,发现表达的目的蛋白位于包涵体中,大量表达目的蛋白并用镍柱亲和层析法进行纯化,获得足量的重组蛋白后将其作为抗原免疫家兔,获得抗血清。用重组蛋白亲和纯化抗血清中的 ERA-1 多克隆抗体。利用野生型拟南芥 *ERA-1* 敲除突变体和 *ERA-1* 过表达系的叶片总蛋白进行免疫印迹试验,检测 ERA-1 多克隆抗体的特异性,发现纯化后的 ERA-1 多克隆抗体(1:1 000 体积比稀释)能特异地检测到拟南芥中的 ERA-1 蛋白。本试验成功制备了 ERA-1 蛋白的多克隆抗体,可以用于今后对 *ERA-1* 基因功能的研究。

关键词:拟南芥 ERA-1;原核表达;蛋白纯化;抗血清;多克隆抗体制备

中图分类号: Q946.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)08-0033-03

ERA (*Escherichia coli* ras-like protein, 简称 ERA) 基因最早在大肠杆菌中发现,因其蛋白序列与真核生物的大鼠肉瘤 (Ras) 蛋白相似度高,所以命名为 ERA^[1]。但随后的研究表明,ERA 与 Ras 蛋白序列相似性主要集中于 N 端的 GTP 酶结构域,而其 C 端与包括 Ras 在内的其他小 GTP 酶不具有同源性,因而把它列为一类新的小 GTP 酶。对大肠杆菌 *ERA* 功能的研究表明,该基因是大肠杆菌生存繁殖所必需的^[2]。大肠杆菌 *ERA* 表达量降低突变体表现为细胞分裂异常、细胞增长呈丝状、拟核数目增多,表明 ERA 在染色体分离后,胞质分裂前发挥重要作用^[3-4]。另有研究表明,ERA 的 C 端能与核糖体 16S RNA 结合,对核糖体小亚基的组装成熟起重要作用^[5-6]。细菌的 ERA 蛋白序列具有高度保守性,不同种类细菌的 ERA 蛋白可以互补大肠杆菌 ERA 的功能^[7-8]。

真核生物的 *ERA* 基因起源于原核生物,真核生物的 ERA 蛋白序列与原核生物具有高度相似性,大多分布于线粒体或叶绿体中^[9]。人类 ERA 同源蛋白 ERAL1 定位于线粒体^[10],能与线粒体 12S rRNA 结合,参与核糖体小亚基的组装^[11]。ERAL1 功能缺陷细胞从 G1 期进入到 S 期受阻,进而引发细胞凋亡^[12]。拟南芥 ERA 家族有 2 个成员 *ERA-1* 及 *ERA-2*,亚细胞定位研究表明 *ERA-1* 定位于叶绿体,而 *ERA-2* 定位于线粒体^[13]。目前植物中 *ERA* 的功能尚未见报道,为了方便研究 *ERA-1* 在拟南芥叶绿体中的功能,将拟南芥 *ERA-1* 基因在大肠杆菌中表达,获得重组 ERA-1 蛋白经过纯化后免疫家兔制备多克隆抗体。ERA-1 多克隆抗体的成功制备,为后续研究 *ERA-1* 的生物学功能提供了条件。

1 材料与方法

收稿日期:2016-03-21

作者简介:付世英(1989—),女,河南修武人,硕士研究生,从事植物分子生物学研究。E-mail:shiyinfu123@163.com。

通信作者:刘夏燕,副教授,从事植物分子生物学研究。E-mail:xiayanliu@gmail.com。

1.1 材料

野生型拟南芥、*era-1-1* 纯合突变体、*ERA-1* 过表达株系(*ERA-1_{OE-1}*、*ERA-1_{OE-13}*、*ERA-1_{OE-4}*、*ERA-1_{OE-5}*)均为 Columbia-0 生态型背景,由笔者所在实验室保存。

试验中使用的限制性内切酶、T4 连接酶等各种酶类均购自 TaKaRa。琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒等购自天根生化科技(北京)有限公司。His 标签蛋白纯化柱填料 Ni 琼脂糖凝胶 6 Fast Flow 购自 GE Healthcare Life Science。完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂为 Sigma 公司产品;HRP 标记的羊抗兔抗体 G&R 购自北京康为世纪生物科技有限公司;蛋白免疫印迹化学发光试剂盒购自 Bio-Rad。其他试剂均为进口或国产分析纯试剂。

pBluescript-*ERA-1* 为包含 *ERA-1* 基因编码区全长序列的重组质粒,该质粒及原核表达载体 pET28a、大肠杆菌 Top10 感受态细胞和 BL21 (DE3) 菌株均由笔者所在实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 原核表达载体的构建 以质粒 pBluescript-*ERA-1* 为模板,设计引物 F1、R1,PCR 扩增 *ERA-1* 除去叶绿体定位信号肽序列的剩余编码区序列。回收的 PCR 产物经 *Bam*H I 酶切后连入 pET28a 表达载体,转化大肠杆菌 Top10。挑选阳性克隆提质粒,用 *Bam*H I 酶切鉴定是否有目的片段插入,再用 *Hind* III 酶切鉴定插入方向。将酶切鉴定正确的重组质粒送去测序,测序验证正确的重组质粒命名为 pET28a-*ERA-1*。所用扩增引物序列为: F1, 5'-CATGGATCCAAATCA-CATCTCCAGCGGCAC-3'; R1, 5'-CATGGATCCCTA-CATAGCTCGATCTGTCC-3'(下划线部分为 *Bam*H I 酶切位点)。

1.2.2 重组蛋白的原核表达分析 将重组质粒 pET28a-*ERA-1* 转化至 BL21 (DE3) 宿主菌,挑取阳性单克隆,接种于含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养液中过夜培养,次日按体积比 1:100 接种至 25 mL 含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养液中,200 r/min,37 ℃ 摇床培养至 $D_{600\text{ nm}}$ 达到 0.5~1.0,取 1 mL 诱导前菌液,离心,弃上清,沉淀重悬于 500 μL 裂解液 [50 mmol/L NaH₂PO₄ (pH 值 8.0)、300 mmol/L NaCl] 中,留

作诱导前对照。然后加入异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside, 简称 IPTG, 终浓度 1 mmol/L), 继续 37 °C 摇培 4 h, 摇培结束后取出 1 mL 菌液, 处理同诱导前的 1 mL 菌液。将剩余的诱导后的菌液离心, 沉淀重悬于 11.5 mL 裂解缓冲液中, 冰浴, 超声波破碎, 结束后离心, 收集上清, 将沉淀部分溶解在 11.5 mL 裂解缓冲液中。分别取 5 μ L 诱导前菌体总蛋白、诱导后菌体总蛋白、诱导破菌后上清蛋白、诱导破菌后沉淀蛋白样品液进行 10% SDS-PAGE 电泳, 分析重组蛋白的表达形式。

1.2.3 重组蛋白的大量表达和亲和纯化 挑取含重组质粒 pET28a-ERA-1 的阳性克隆, 按照“1.2.2”节中的方法摇培、诱导, 获得 1 L 表达重组蛋白的菌液; 破菌, 离心, 将获得的沉淀用含有 8 mol/L 尿素的裂解缓冲液溶解, 离心, 收集上清液。上清液经 0.22 μ m 滤膜过滤后与 1 mL Ni 琼脂糖凝胶 6 Fast Flow 填料孵育 30 min, 然后转入层析柱中; 用 20 mmol/L 咪唑洗脱液洗涤杂蛋白, 然后依次用 2 mL 咪唑液 (100, 200, 400 mmol/L) 洗脱重组蛋白, 每个浓度的咪唑洗脱液分 2 管收集 (1 支管 1 mL)。将不同浓度咪唑液洗脱的蛋白及 0.25 mg/mL 牛血清蛋白 (BSA) 进行 SDS-PAGE 电泳, 以检测重组蛋白的纯度和浓度。

1.2.4 抗血清的制备及验证 将纯化后的 ERA-1 重组蛋白测定浓度, 作为抗原免疫家兔。首免按 200 μ g/只, 加入等体积弗氏完全佐剂涡旋混匀后, 背部多点皮下注射^[14]。之后每 2 周进行 1 次加强免疫, 蛋白用量按 100 μ g/只, 佐剂使用弗氏不完全佐剂。3 次加强免疫之后, 心脏采血并收集血清。

将纯化后的重组蛋白进行梯度稀释, 然后分别取 100、10、1 ng 进行 SDS-PAGE 电泳。蛋白样品经半干法转移到硝酸纤维素膜上, 封闭液 (5% 脱脂牛奶/TBST) 室温封闭 1 h 后, 加入经封闭液稀释的抗血清 (1:5 000) 室温孵育 1 h; 用 TBST [20 mmol/L Tris-HCl (pH 值 7.5)、150 mmol/L NaCl、0.1% Tween 20] 洗涤 3 次; 用 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:10 000 稀释) 室温孵育 1 h 后, 再用 TBST 洗涤 3 次; ECL 显色处理, 化学发光仪成像^[15]。

1.2.5 多克隆抗体的纯化 将 1 mg 纯化后的重组蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳, 转膜, 番红染色。然后将重组蛋白条带从 NC 膜上切下, 用 100 mmol/L 甘氨酸/HCl (pH 值 2.5) 洗膜 5 min, 然后用 TBS [20 mmol/L Tris (pH 值 7.4)、500 mmol/L NaCl、0.05% Tween 20] 洗 2 次, 每次 2 min。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后, 取 5 mL 抗血清加入到 5 mL TBS 中, 与膜在摇床上 4 °C 过夜孵育。保留上清, 将膜先用 TBS 洗涤 2 次, 再用 PBS [20 mmol/L 磷酸钠 (pH 值 7.2)、150 mmol/L NaCl] 洗涤 2 次。洗脱抗体时加入 1 mL 甘氨酸, 孵育 10 min, 然后将洗脱液移入新管中并加入 100 μ L Tris (pH 值 8.0) 使 pH 值调到 7.0。

1.2.6 植物叶片总蛋白中 ERA-1 的检测 将拟南芥种子点种于泥炭营养土上, 4 °C 放置 2 d 诱导种子萌发, 然后在 22 °C 持续光照下培养。

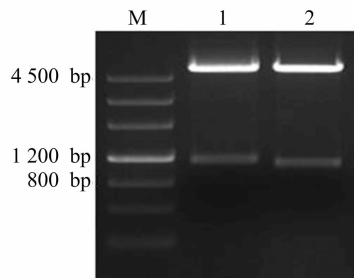
当植物生长到 2 周大时, 每株植物取 2 张真叶于 1.5 mL 离心管中, 记录管中叶片的质量, 液氮中研磨。根据管中叶片的质量, 加入对应体积的蛋白抽提液 [0.125 mg/L Tris (pH 值 6.8)、20% 葡萄糖、4% SDS、1% β -巯基乙醇], 使得蛋白抽提液终浓度为 0.1 mg/ μ L, 充分研磨成匀浆; 最后将样品于

65 °C 加热 2 h, 离心, 取上清。将上清及 10 ng 重组蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳, 用“1.2.5”节中纯化得到的多克隆抗体 (1:1000 稀释) 进行蛋白免疫印迹检测。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pET28a-ERA-1 的构建

阳性质粒酶切鉴定结果如图 1 所示, 用 BamH I 酶切鉴定, 获得的质粒骨架及插入片段大小符合预期 (1.16、5.3 kb); 用 Hind III 鉴定是否为正向插入 (插入片段和 pET28a 质粒上各有 1 个 Hind III 酶切位点, 若正向插入两者距离约为 1.08 kb), 酶切结果符合正向插入。将酶切鉴定正确的质粒送去测序, 所测得的序列与预期完全一致。

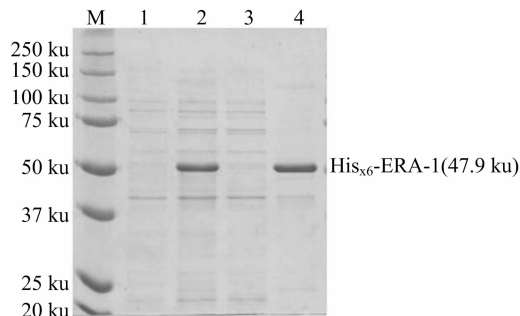


M—DNA marker; 1—阳性质粒用 BamH I 酶切;
2—阳性质粒用 Hind III 酶切

图1 重组质粒 pET28a-ERA-1 的酶切结果

2.2 目的蛋白在大肠杆菌中的表达分析

将构建好的重组质粒 pET28a-ERA-1 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株, 挑取单菌落接种于 LB 培养基上, 培养至对数生长期时加 IPTG 诱导, 收集诱导前及诱导后的菌体经 10% SDS-PAGE 检测。结果如图 2 中 1、2 泳道所示, 与诱导前相比, 诱导后的菌液在 50 ku 附近多出明显的蛋白条带, 符合预期, 说明目的蛋白已成功表达。在进行大量表达和纯化之前, 须对目的蛋白的可溶性进行分析, 因此将诱导后的大肠杆菌细胞经超声破碎, 分离上清液和沉淀, 并将沉淀溶于裂解液中, 进行 SDS-PAGE 电泳, 结果如图 2 中 3、4 泳道所示, 所表达的重组蛋白质几乎全部在沉淀中, 以包涵体的形式存在。



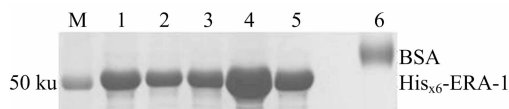
M—蛋白 marker; 1—诱导前的 BL21(DE3)/pET28a-ERA-1 菌液; 2—IPTG 诱导后的 BL21(DE3)/pET28a-ERA-1 菌液;
3—破菌后的上清; 4—溶有沉淀的裂解液

图2 重组质粒 pET28a-ERA-1 的诱导表达

2.3 His₆-ERA-1 蛋白的大量表达与亲和纯化

在获知重组蛋白主要以不溶性的包涵体形式存在后, 开始大量诱导表达重组蛋白, 并将获得的包涵体溶解于含 8 mol/L 尿素的裂解液中, 通过镍琼脂糖亲和柱分离, 再用不

同浓度的咪唑液洗脱。SDS - PAGE 结果如图 3 所示,第 1 支管 100 mmol/L 咪唑洗脱液(泳道 4)中的目的蛋白浓度最高,用 0.25 mg/mL BSA 对该管洗脱液中的蛋白浓度进行粗定量,结合软件分析其蛋白浓度大于 1 mg/mL,可用于后续免疫家兔试验。

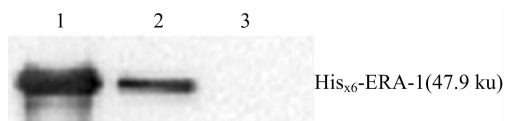


M—蛋白 marker; 1—穿出液; 2~5—20、20、100、100 mmol/L 咪唑洗脱液; 6—0.25 mg/mL BSA

图3 重组蛋白 His₆-ERA-1 的纯化和定量

2.4 抗血清的制备与检测

利用纯化得到的 His₆-ERA-1 重组蛋白免疫家兔,将获得的抗血清作免疫印迹试验,分析其结合抗原有效性。结果表明,His₆-ERA-1 抗血清 1:5 000 稀释后,能够清晰地检测到 10 ng 的 His₆-ERA-1 重组蛋白(图 4)。

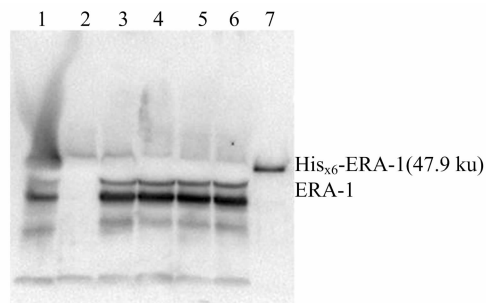


1~3—100、10、1 ng 的 His₆-ERA-1 抗原

图4 His₆-ERA-1 抗血清的免疫印记检测

2.5 免疫印迹法检测植物叶片总蛋白中的 ERA-1

用 ChloroP 预测表明,具有 427 个氨基酸残基的 ERA-1 蛋白的前 39 个氨基酸残基为叶绿体定位信号肽,切去前 39 个信号肽的成熟野生型 ERA-1 蛋白的分子量约为 42.88 ku,而 pET28a-ERA-1 载体表达的加上 His₆ 标签的重组 ERA-1 蛋白大小约为 47.9 ku。提取 WT、era-1-1 纯合突变体及 ERA-1 过表达株系 ERA-1_{OE-1}、ERA-1_{OE-13}、ERA-1_{OE-4}、ERA-1_{OE-5} 的叶片总蛋白,并用 10 ng 的 His₆-ERA-1 重组蛋白抗原作为阳性对照,与经重组蛋白 His₆-ERA-1 亲和纯化过的多克隆抗体(1:1 000 稀释)进行免疫印迹试验。结果如图 5 所示,野生型、过表达株系在预期分子量大小(42.88 ku)位置附近出现了 2 条带,而 era-1-1 纯合突变体没有对应条带。野生型、过表达株系都出现 2 条特异性条带,说明 ERA-1 在植物体内可能有 2 种不同的存在形式。本试验所制备的多克隆抗体能清晰地检测到植物叶片总蛋白中的 ERA-1,并在负对照 era-1-1 突变体中无特异性带的产生,可满足后续试验的需求。



1~6—野生型、era-1-1 突变体、ERA-1_{OE-1}、ERA-1_{OE-13}、ERA-1_{OE-4}、ERA-1_{OE-5} 叶片总蛋白; 7—10 ng His₆-ERA-1 抗原

图5 His₆-ERA-1 抗血清在植物样品中的特异性检测

3 结论与讨论

ERA 基因在原核生物及真核生物中广泛存在,并具有很高的保守性。对大肠杆菌及人的 ERA 的研究都表明,ERA 在核糖体小亚基的成熟过程中起重要作用,参与细胞周期调控,然而 ERA 蛋白在植物中的功能却鲜有报道。本试验通过原核表达重组蛋白,抗体制备和抗体的亲和纯化成功获得了拟南芥 ERA-1 蛋白的多克隆抗体,为后续深入研究植物 ERA-1 的生物学功能提供了条件。

参考文献:

- [1] Ahnn J, March P, Takiff H, et al. A GTP-binding protein of *Escherichia coli* has homology to yeast RAS proteins[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986, 83(23): 8849-8853.
- [2] Chen X, Chen S, Powell B, et al. Purification, characterization and crystallization of ERA, an essential GTPase from *Escherichia coli*[J]. FEBS Letters, 1999, 445(2/3): 425-430.
- [3] Britton R, Powell B, Dasgupta S, et al. Cell cycle arrest in Era GTPase mutants: a potential growth rate-regulated checkpoint in *Escherichia coli*[J]. Molecular Microbiology, 1998, 27(4): 739-750.
- [4] Britton R, Powell B, Court D, et al. Characterization of mutations affecting the *Escherichia coli* essential GTPase era that suppress two temperature-sensitive dnaG alleles[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(14): 4575-4582.
- [5] Sayed A, Matsuyama S, Inouye M. Era, an essential *Escherichia coli* small G-protein, binds to the 30S ribosomal subunit[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999, 264(1): 51-54.
- [6] Tu C, Zhou X, Tarasov S, et al. The era GTPase recognizes the GAU-CACCUCC sequence and binds helix 45 near the 3'-end of 16S rRNA[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(25): 10156-10161.
- [7] Zuber M, Hoover T, Dertzbaugh M, et al. A francisella tularensis DNA clone complements *Escherichia coli* defective for the production of era, an essential ras-like GTP-binding protein[J]. Gene, 1997, 189(1): 31-34.
- [8] Pillutla R, Sharer J, Gulati P, et al. Cross-species complementation of the indispensable *Escherichia coli* era gene highlights amino acid regions essential for activity[J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(8): 2194-2196.
- [9] Suwastika I N, Denawa M, Hata A, et al. Energy from the Sun[M]. Netherlands: Springer Netherlands, 2008: 1137-1140.
- [10] Dennerlein S, Rozanska A, Wydro M, et al. Human ERAL1 is a mitochondrial RNA chaperone involved in the assembly of the 28S small mitochondrial ribosomal subunit[J]. The Biochemical Journal, 2010, 430(3): 551-558.
- [11] Uchiyama T, Ohgaki K, Yagi M, et al. ERAL1 is associated with mitochondrial ribosome and elimination of ERAL1 leads to mitochondrial dysfunction and growth retardation[J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38(16): 5554-5568.
- [12] Akiyama T, Gohda J, Shibata S, et al. Mammalian homologue of *E. coli* Ras-like GTPase (ERA) is a possible apoptosis regulator with RNA binding activity[J]. Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms, 2001, 6(11): 987-1001.

郝东利, 杨顺瑛, 黄亚楠, 等. 拟南芥铵转运蛋白 AtAMT1.3 的电生理功能[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(8): 36–40.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.08.010

拟南芥铵转运蛋白 AtAMT1.3 的电生理功能

郝东利^{1,2}, 杨顺瑛¹, 黄亚楠^{1,2}, 苏彦华¹

(1. 中国科学院南京土壤研究所/土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 江苏南京 210008; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要:在生理条件下, 植物铵的吸收主要由定位于细胞膜上的铵转运蛋白(ammonium transporter, AMT)介导完成, 研究模式植物拟南芥 AMT 的功能特性及调控机制对于解析植物的铵吸收过程具有重要意义。本研究克隆了拟南芥 AtAMT1.3 并将其在蛙卵异源系统中表达, 电生理结果表明, AtAMT1.3 是一个典型的对铵有高度选择性、高亲和的铵吸收系统 [$K_m = (25.5 \pm 3.2) \mu\text{mmol/L}$]。同时, AtAMT1.3 也能介导铵的同系物甲基铵的吸收 [$K_m = (3.3 \pm 0.2) \text{mmol/L}$], 对铵和甲基铵的吸收具有浓度依赖性和电压依赖性。AtAMT1.3 的铵转运能力不受 pH 值调控, 它的转运底物是 NH_4^+ , 运输机制是 NH_4^+ 单向运输。

关键词:拟南芥; 铵转运蛋白 AtAMT1.3; 介导; 电生理; 功能特征; 铵吸收系统; 运输机制

中图分类号: S184; Q946.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)08-0036-05

铵态氮是植物能够直接吸收的重要无机氮素形态。模式植物拟南芥是一种喜铵植物, 在相同浓度供应下, 铵态氮的吸收速率高达硝态氮的 20 倍^[1], 植物对铵的吸收主要是由铵转运蛋白 (AMT) 介导的^[2-4]。拟南芥基因组中一共有 6 个 AMT, 即 AtAMT1.1、AtAMT1.2、AtAMT1.3、AtAMT1.4、AtAMT1.5、AtAMT2^[5]。除了 AtAMT1.4 专一地在花粉和花粉管中表达外^[6], 其他 5 个 AMT 在根部均有表达^[5,7]。拟南芥突变体试验证明, 3 个 AtAMT1 (AtAMT1.1、AtAMT1.2、AtAMT1.3) 贡献了约 90% 的铵吸收, 其中 AtAMT1.1 和 AtAMT1.3 各贡献了约 30%^[3,5], AtAMT1.2 贡献率略小 (18%~26%)^[5]。AtAMT_s 通过时空定位以及对铵亲和力的差异来满足拟南芥生长合适的氮素需要^[5]。简单来说, AtAMT1.1、AtAMT1.3 和 AtAMT1.5 主要定位于表皮细胞, 其对铵的亲合力很强, 三者负责将铵从土壤溶液中吸收到根内并通过共质体途径运输; 而 AtAMT1.2 主要定位于内皮层, 且对铵的亲合力相对较低, 通过质外体途径运输的铵受阻于凯氏带, 此时 AtAMT1.2 将其运进细胞, 进入共质体途径, 最终完成同化或木质部的输送。由于植物体的复杂, 将单个铵转运蛋白在异源系统中表达更有利于研究其转运、调控机制。酵母和蛙卵是 2 种常用的表达系统, 酵母铵吸收缺失突变体 31019b 不能在 $<5 \text{ mmol/L NH}_4^+$ 作为唯一氮源的培养基上

生长^[8-9], 转入任意一个 AtAMT1 均能使其恢复生长, 再次证实了它们直接吸铵的功能^[5-6,10-11]。蛙卵系统除了能够验证其吸铵功能外, 还有一个重要的作用就是可以用来解析其转运机理。虽然植物 AMT1 之间同源性很高, 但是其转运机理却大不相同^[12], 目前对于 AtAMT1.3 的蛙卵电生理功能特征研究尚缺少。本试验克隆了 AtAMT1.3 并将其在蛙卵系统中进行表达, 通过电生理技术研究其离子选择性, 对铵及其同系物甲基铵的亲合性、pH 值响应, 初步阐明了 AtAMT1.3 的运输机制及功能特征。

1 材料与方法

1.1 材料

拟南芥 (*Arabidopsis*)、大肠杆菌 DH5 α 和蛙卵表达载体 pCI 由笔者所在实验室保存, 非洲爪蟾由笔者所在实验室饲养; PCR 扩增高保真酶 PrimeSTAR 购自 TaKaRa 公司; T4 连接酶、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xba* I 购自 NEB 公司; 引物由上海英骏生物技术有限公司合成; 胶原酶 A 购自 Roche 公司; 电生理用试剂购自 Ameresco 公司; 双电极电压钳设备购自 Axon 公司。放大器型号为 pClamp 900A, 数模转换型号为 Digidata 1440, 质粒注射仪器型号为 Nanoliter 2000。

1.2 AtAMT1.3 开放阅读框的扩增及表达载体的构建

取冻存的拟南芥样品约 100 mg, 液氮研磨, 根据说明书提取 RNA。利用反转录试剂合成 cDNA 第 1 链, AtAMT1.3 序列登录号为 At3g24300.1。以 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。引物序列: P1, 5' - GTCGAATTCATGTCAGGAGCAATAA-CATGC - 3'; P2, 5' - GTCTCTAGATTAAACGCCGAGGAGGAG-TAGC - 3'。PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 1 min,

收稿日期: 2016-01-12

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项 (编号: XDB15030202)。

作者简介: 郝东利 (1987—), 男, 河南周口人, 博士, 从事分子植物营养学研究。Tel: (025) 86881553; E-mail: dlhao@issas.ac.cn。

通信作者: 苏彦华, 博士, 教授, 研究员, 从事植物营养与分子生物学研究。E-mail: yhsu@issas.ac.cn。

[13] Suwastika I, Denawa M, Yomogihara S, et al. Evidence for lateral gene transfer (LGT) in the evolution of eubacteria-derived small GTPases in plant organelles[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 678.

[14] 李芳, 罗军, 许会芬, 等. 西农萨能羊 MAT 基因的原核表达

及多克隆抗体制备[J]. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 2014, 42(12): 1-6, 12.

[15] Yu F, Park S, Liu X, et al. Suppressor of variegation4, a new var2 suppressor locus, encodes a pioneer protein that is required for chloroplast biogenesis[J]. *Molecular Plant*, 2011, 4(2): 229-240.