

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.

53 ℃ 1 min, 72 ℃ 1.67 min, 24 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。割胶回收, 将产物“3′-”端加 A 尾后连到 PMD19-T vector, 转入大肠杆菌 DH5 α , 阳性克隆送往华大基因科技有限公司测序。用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xba* I 将测序正确地克隆切下来, 通过 T4 连接酶连入蛙卵表达载体 pCI。

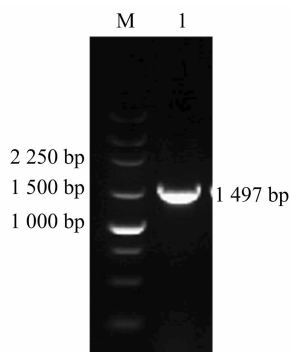
1.3 注射蛙卵及电生理检测

首先, 将蛙卵从非洲爪蟾中取出, 用 1 mg/mL 胶原酶 A 消解 1.5~2.0 h, 然后挑选健康的单个蛙卵保存于 ND96 溶液中, 其中 ND96 溶液成分包括 96 mmol/L NaCl, 2 mmol/L KCl, 1.8 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L HEPES (用 NaOH 调 pH 值至 7.4)。将 59.8 nL 的质粒 pCI-OsAMT1.3 注射进入健康的蛙卵, 同体积的无菌水注射进入蛙卵, 作为对照。将蛙卵置于 ND96 溶液 (2.5 mmol/L 丙酮酸钠) 中, 19 ℃ 培养 3 d, 检测。蛙卵钳置于 -70 mV 中, 利用连续 ramp 记录。膜电位施加程序的电压为 -140~20 mV, 与之前的报道一样, 注射水的蛙卵对 1 mmol/L NH₄⁺ 或 10 mmol/L MeA⁺ 不敏感^[12]。电生理用基本溶液成分包括 100 mmol/L NaCl, 2 mmol/L CaCl₂, 2 mmol/L MgCl₂, 4 mmol/L Tris (用 MES 调 pH 值至 7.4), NH₄Cl 或者 MeAcl 根据图表的指示添加。在做离子选择性试验时, 基本溶液中的 NaCl 换成相同浓度的 CholineCl。

2 结果与分析

2.1 AtAMT1.3-pCI 载体的构建

以拟南芥 cDNA 为模板, 以 P1、P2 为引物进行 PCR 扩增, 获得长度为 1 497 bp 目的片段 (图 1), 割胶回收, 连入 PMD19-T vector 载体, 经转化、筛选、测序得到正确的 AtAMT1.3-PMD19-T, 用 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切 AtAMT1.3-PMD19-T 和 pCI, 割胶回收 AtAMT1.3 片段和 pCI 大片段, 通过 T4 连接酶连接目的片段和大载体片段, 转化后筛选获得阳性质粒 AtAMT1.3-pCI, 酶切验证正确后浓度浓缩至 >1 μ g/ μ L, 备用 (图 2), AtAMT1.3-pCI 质粒构成见图 3。

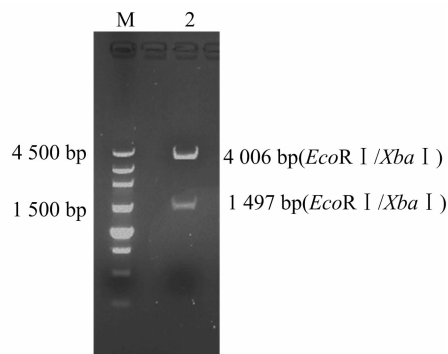


1—AtAMT1.3 PCR 产物; M—250 bp DNA ladder marker

图1 AtAMT1.3 PCR 产物扩增图谱

2.2 AtAMT1.3 的氨基酸序列分析

氨基酸序列分析表明, AtAMT1.3 在进化上与 AtAMT1.5 亲缘关系最近, AtAMT1.1 次之 (图 4)。它们都属于 AMT-1 亚家族, 其中 AtAMT1.3 与 AtAMT1.2 之间的亲缘关系在该亚家族内部最远 (图 4)。基于 AtAMT1.1 和 AtAMT1.2 已较



2—AtAMT1.3-pCI 质粒酶切, 酶切位点 *EcoR* I/*Xba* I

图2 AtAMT1.3-pCI 质粒酶切图谱

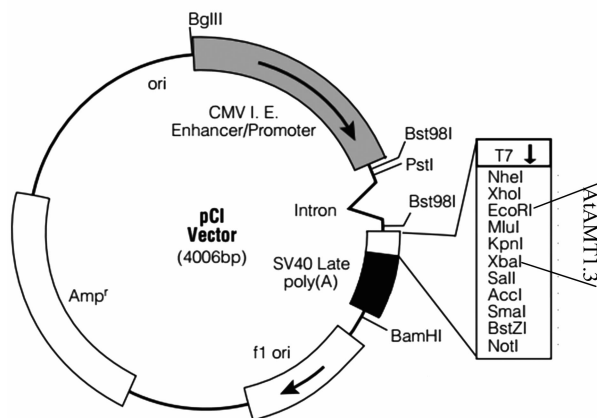


图3 AtAMT1.3-pCI 质粒构成图示

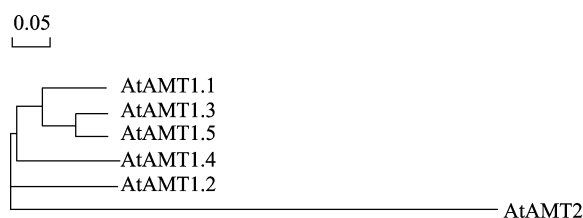


图4 拟南芥AMT的系统发育树

为明了的功能特征^[11,13-15]进行预测, 结果显示, AtAMT1.3 在功能特征方面的表现与 AtAMT1.1 相近, 而与 AtAMT1.2 差异较大。

2.3 AtAMT1.3 的离子选择性

在 -70 mV 下添加 1 mmol/L 碱性阳离子 Li⁺、Na⁺、K⁺、Rb⁺、Cs⁺ 入电生理基本溶液, 对 AtAMT1.3 介导的电流没有明显影响, 而用 1 mmol/L NH₄⁺ 灌流能产生大幅内向的电流 (图 5-a), 说明 AtAMT1.3 是一个高度选择性的铵吸收系统。这种高度铵的选择性在整个电压区间内 (-140~20 mV) 皆是如此 (图 5-b), 说明 AtAMT1.3 对铵吸收的高度选择性是不依赖于膜电位的。

2.4 AtAMT1.3 的铵浓度响应

在 -70 mV 下, AtAMT1.3 介导的内向铵电流随着铵浓度的增加而增加, 在 <400 μ mol/L 的铵浓度下, 电流急剧增大; 而在 1 000 μ mol/L 下, 接近饱和, 说明 AtAMT1.3 介导的铵吸收具有浓度依赖性 (图 6-a); AtAMT1.3 介导的内向铵电流随着膜电位的增加而增加, 说明 AtAMT1.3 的铵吸收具

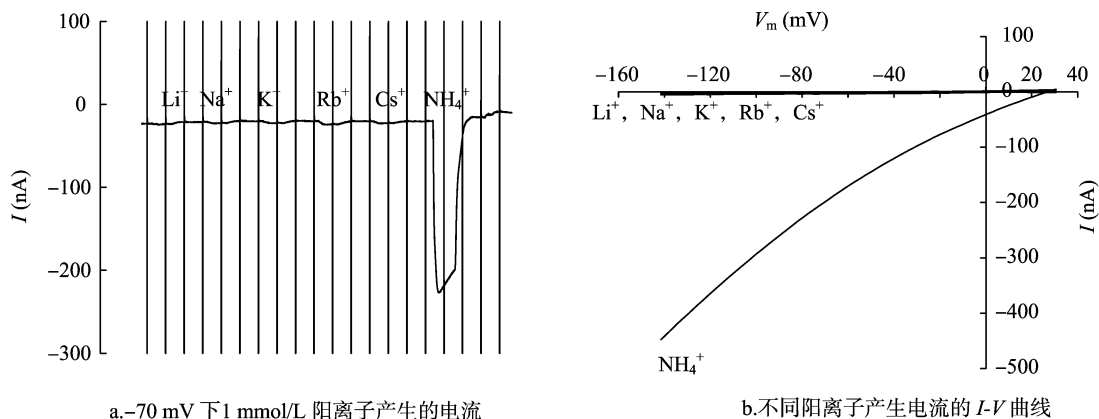


图5 蛙卵表达系统中 AtAMT1.3 对铵吸收的专一性

有电压依赖性(图 6-b)。通过米氏方程拟合得到 AtAMT1.3 介导的铵吸收在 1 mmol/L 左右达到饱和(图 6-c)。在 -140 mV 下, K_m 值(达到 1/2 最大吸收速率时的铵浓度)为 $(18.1 \pm 2.8) \mu\text{mol/L}$; 在 -130 mV 下, K_m 值为 $(21.4 \pm 3.01) \mu\text{mol/L}$; 在 -120 mV 下, K_m 值为 $(25.5 \pm 3.2) \mu\text{mol/L}$; 在 -110 mV 下, K_m 值为 $(28.2 \pm 3.5) \mu\text{mol/L}$; 在 -100 mV 下,

K_m 值为 $(35.0 \pm 3.5) \mu\text{mol/L}$; 在 -90 mV 下, K_m 值为 $(44.6 \pm 4.0) \mu\text{mol/L}$; 在 -80 mV 下, K_m 值为 $(57.8 \pm 5.2) \mu\text{mol/L}$, 由此可见 K_m 值具有电压依赖性, 即膜电位越正, K_m 值越大, 说明铵是以离子的形态进入细胞膜的(图 6-d)。假设在膜内有 1 个 NH_4^+ 的结合位点, 则这个位点应位于整个膜电场 52% 的位置。

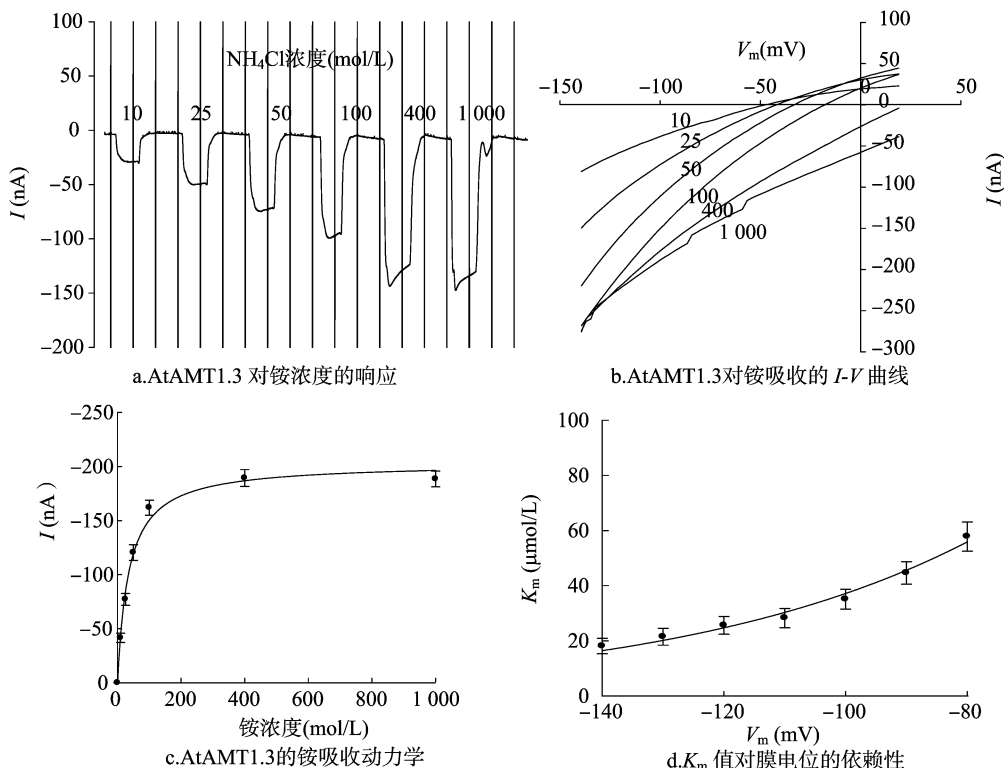


图6 蛙卵异源系统中 AtAMT1.3 的铵吸收特征

2.5 AtAMT1.3 的甲基铵浓度响应

甲基铵是铵的同系物, 广泛应用于 AMT 的功能研究。在 -70 mV 下, AtAMT1.3 介导的内向甲基铵电流也具有浓度依赖性, 即随着甲基铵浓度的增加而增加, 在铵浓度 $< 7.5 \text{ mmol/L}$ 下, 电流急剧增大; 而在铵浓度为 10 mmol/L 下, 电流接近饱和(图 7-a)。AtAMT1.3 介导的内向甲基铵具有电压依赖性, 即膜电位越负, 电流越大(图 7-b)。通过米氏方程拟合得到甲基铵亲和力常数 K_m 值在毫摩尔级: 在 -140 mV 下, $K_m = (2.5 \pm 0.1) \text{ mmol/L}$; 在 -130 mV 下,

$K_m = (2.9 \pm 0.1) \text{ mmol/L}$; 在 -120 mV 下, $K_m = (3.3 \pm 0.2) \text{ mmol/L}$; 在 -110 mV 下, $K_m = (3.8 \pm 0.2) \text{ mmol/L}$; 在 -100 mV 下, $K_m = (4.4 \pm 0.2) \text{ mmol/L}$; 在 -90 mV 下, $K_m = (5.1 \pm 0.3) \text{ mmol/L}$; 在 -80 mV 下, $K_m = (5.7 \pm 0.4) \text{ mmol/L}$ 。 K_m 值具有电压依赖性, 即膜电位越正, K_m 值越大(图 7-c), 说明甲基铵是以离子的形态进入细胞膜的。假设在膜内有 1 个 MeA^+ 的结合位点的话, 则这个位点应位于整个膜电场 34% 的位置。

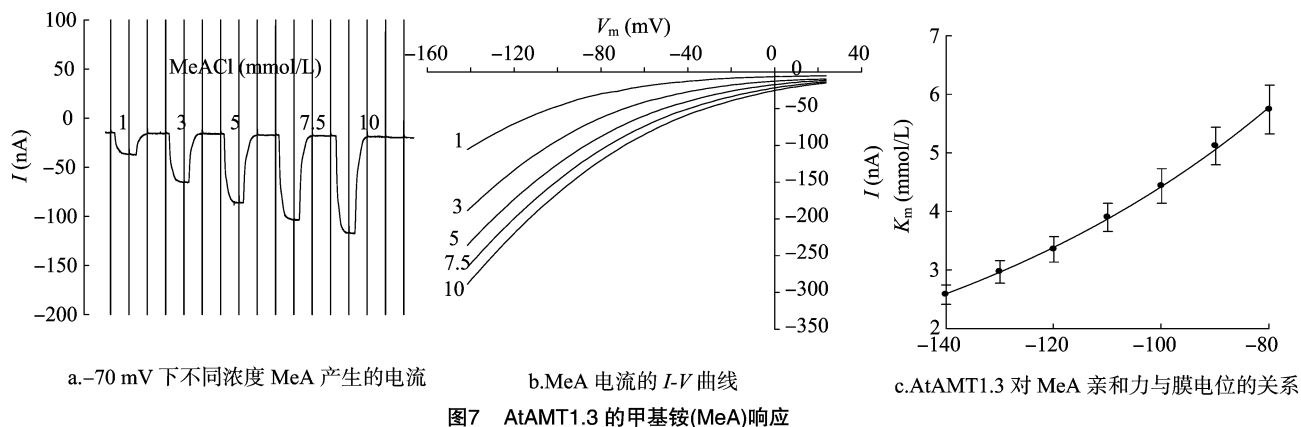


图7 AtAMT1.3 的甲基铵(MeA)响应

2.6 AtAMT1.3 的 pH 值响应

在 -70 mV 下, AtAMT1.3 介导的铵电流不受外界 pH 值调控, 即酸性条件和接近中性的 pH 值对铵电流基本没有影

响(图 8-a)。在不同膜电位下, AtAMT1.3 介导的铵电流皆不受 pH 值调控(图 8-b、图 8-c)。

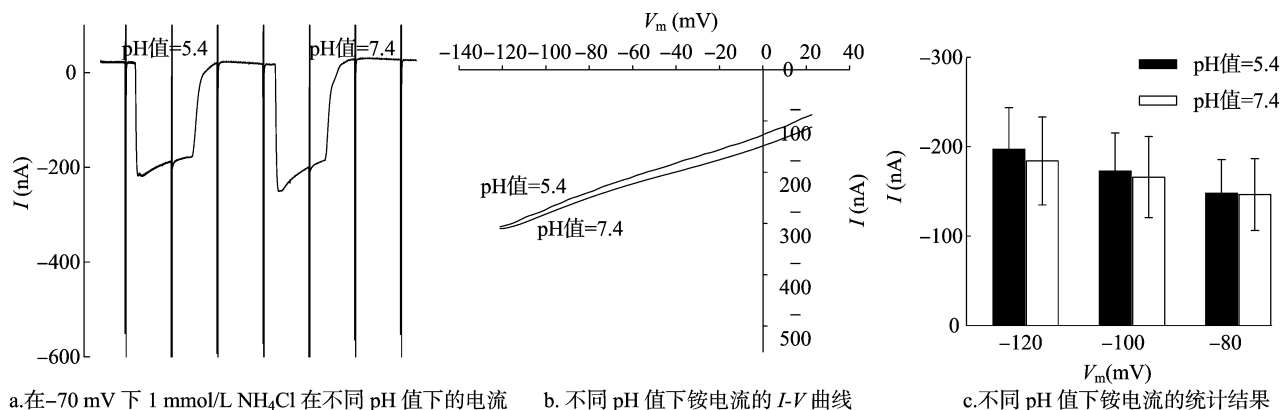


图8 AtAMT1.3 对铵的 pH 值的响应

3 结论与讨论

在同一氮素水平供应下, 拟南芥对铵的吸收速率是硝的 20 倍^[1], 说明铵态氮对其生长极其重要, 植物的铵吸收是由 AMT 介导完成的^[2-4]。AtAMT1.3 虽然贡献于根部的铵吸收, 但是其功能特征如对铵吸收专一与否、对膜电位的响应、不同电压下的亲和力、运输机理等还不清楚。本研究结果表明, AtAMT1.3 是一个典型的高度选择性的、高亲和铵吸收系统(图 5、图 6), 其 K_m 值为 25 $\mu\text{mol/L}$, 与 AtAMT1.1 的 K_m 值很接近^[13], 但与 AtAMT1.2 差距很大^[11]。AtAMT1.3 与 AtAMT1.1 亲缘性近, 而与 AtAMT1.2 远(图 4), 再根据结构决定功能的原理可知, 这种 K_m 值的差异反映了 AtAMT1.3 与 AtAMT1.1 的相似性。AtAMT1.3 不仅能通透 NH_4^+ , 也能通透 NH_4^+ 的同系物 MeA⁺, 但其对 MeA⁺ 的通透性要低, 亲和力降低了约 100 倍(图 7), 这与大多数报道的 AMT-1 亚家族的铵转运类似^[11, 16-17]。AMT 既能通透 NH_4^+ 、又能通透 MeA⁺ 的种特性有利于对 AMT 功能特征的研究, 如在酵母表达系统中, 通过 ^{14}C 标记的 MeA 来研究 AMT 的吸收以及亲和特征^[18-19]。

尽管 AMTs 在结构上同源性很高, 但其转运底物和转运机理却大不相同^[12], 甚至对相同的 AMT 提出不同的转运机制。Khademi 等通过解析大肠杆菌 EcAmtB 晶体结构提出该

蛋白结合的是 NH_4^+ , 但是最终运输的是 NH_3 ^[20]。因为记录得到了离子态的 NH_4^+ 内流, 这个 NH_3 运输的观点受到挑战^[21]。对于植物 AMT, 研究者们根据一系列的试验证据提出了 4 种运输机制: 如番茄 LeAMT1.1、水稻 OsAMT1.1 的运输机制是 NH_4^+ 单向运输^[16-17]; 拟南芥 AtAMT1.2、小麦 TaAMT1.1 的运输机制是 NH_3/H^+ 共运^[22-23]; 菜用大豆的 PvAMT1.1 运输机制是 NH_4^+/H^+ 同向运输^[24]; 拟南芥 AtAMT2 的运输机制是 NH_3 运输^[25]。本研究解析出 AtAMT1.3 的运输机制是 NH_4^+ 单向运输, 原因如下: (1) 酵母功能互补证明了 AtAMT1.3 具有吸铵功能^[5], 电生理记录得到了 NH_4^+ 产生的电流(图 3), 说明进入蛙卵的铵形态是离子态的(因分子进入不会产生电流), 排除了 NH_3 运输的机制。(2) AtAMT1.3 介导的铵内流不受 pH 值调控(图 8), 排除了 NH_4^+/H^+ 同向运输和 NH_3/H^+ 共运 2 种可能, 因为如果是这 2 种机制的话, 外界 pH 值改变(pH 值由 5.4 转变到 7.4)使得溶液中 H^+ 的浓度减小 100 倍, 即其中的一个底物量急剧减少, 势必会对其运输产生巨大的影响。事实上, AtAMT1.3 介导的铵内流不受外界 pH 影响(图 8), 那么 AtAMT1.3 的铵运输机理只可能是 NH_4^+ 单向运输。(3) 吸收动力学拟合得到 AtAMT1.3 的希尔吸收等于 1, 说明只有 1 种底物(图 6)。通过拟合 K_m 值对电压的依赖性, 得到这个底物

的结合位点位于整个膜电场 52% 的位置;进一步说明 AtAMT1.3 的运输机制是 NH_4^+ 单向运输。AtAMT1.3 运输机制与 AtAMT1.1 相同,而与 AtAMT1.2 不同;在同源性上前两者之间也比 AtAMT1.3 与 AtAMT1.2 之间近(图 4)。由此推测,决定 AtAMT1.3 与 AtAMT1.2 运输机制不同的很可能是与 AtAMT1.1 相同、而与 AtAMT1.2 差异较大的氨基酸区域,这个猜想需要进一步的试验证实。

拟南芥中 AtAMT1.3 缺失突变体引起的侧根分化差异表型,只能由 AtAMT1.3 补回,而不能由 AtAMT1.1 补回^[26]。AtAMT1.3 在基本功能特征上与 AtAMT1.1 很相似,如对铵的高度选择性和很高的亲和力, NH_4^+ 作为转运底物,不受 pH 值调控(图 5 至图 7)。功能如此相似,表型却不能被相似的 AtAMT1.1 恢复,进一步说明 AtAMT1.3 在植物体内除了养分吸收外还扮演其他的角色,如影响侧根分化。

总体来说,本试验通过研究拟南芥的 AtAMT1.3 电生理功能特征,证明该蛋白是典型的高度选择性的高亲和铵吸收系统,其对铵的亲和力在微摩尔级,而对甲基铵的亲和力至少低了 10 倍。AtAMT1.3 介导的铵内流不受外界 pH 值调控,其运输机制是 NH_4^+ 单向运输。

参考文献:

- [1] Gazzarrini S, Lejay L, Gojon A, et al. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into arabidopsis roots[J]. The Plant Cell, 1999, 11(5): 937-947.
- [2] von Wirén N, Merrick M. Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi, and plants[J]. Top Current Genetics, 2004, 9: 1-26.
- [3] Loque D, Yuan L X, Kojima S, et al. Additive contribution of AMT1.1 and AMT1.3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots[J]. Plant Journal, 2006, 48(4): 522-534.
- [4] Ludewig U, Neuhauser B, Dynowski M. Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants[J]. FEBS Letters, 2007, 581(12): 2301-2308.
- [5] Yuan L X, Loque D, Kojima S, et al. The organization of high-affinity ammonium uptake in *Arabidopsis* roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters[J]. The Plant Cell, 2007, 19(8): 2636-2652.
- [6] Yuan L X, Graff L, Loque D, et al. AtAMT1.4, a pollen-specific high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane in *Arabidopsis*[J]. Plant and Cell Physiology, 2009, 50(1): 13-25.
- [7] Birnbaum K, Shasha D E, Wang J Y, et al. A gene expression map of the *Arabidopsis* root[J]. Science, 2003, 302(5652): 1956-1960.
- [8] Marini A M, Soussi-Boudekou S, Vissers S, et al. A family of ammonium transporters in *saccharomyces cerevisiae*[J]. Molecular and Cellular Biology, 1997, 17(8): 4282-4293.
- [9] 杨顺瑛, 丛郁, 郝东利, 等. 利用异源酵母功能互补法研究水稻铵转运体 OsAMT1.1 功能及调控机制[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(1): 27-31.
- [10] Loque D, Lalonde S, Looger L L, et al. A cytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake[J]. Nature, 2007, 446(7132): 195-198.
- [11] Neuhauser B, Dynowski M, Mayer M, et al. Regulation of NH_4^+ transport by essential cross talk between AMT monomers through the carboxyl tails[J]. Plant Physiology, 2007, 143(4): 1651-1659.
- [12] Mayer M, Dynowski M, Ludewig U. Ammonium ion transport by the AMT/Rh homologue LeAMT1.1[J]. Biochemical Journal, 2006, 396(3): 431-437.
- [13] Loque D, Mora S I, Andrade S L, et al. Pore mutations in ammonium transporter AMT1 with increased electrogenic ammonium transport activity[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(37): 24988-24995.
- [14] Mayer M, Ludewig U. Role of AMT1.1 in NH_4^+ acquisition in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Biology, 2006, 8(4): 522-528.
- [15] Wood C C, Poree F, Dreyer I, et al. Mechanisms of ammonium transport, accumulation, and retention in oocytes and yeast cells expressing *Arabidopsis* AtAMT1.1[J]. FEBS Letters, 2006, 580(16): 3931-3936.
- [16] Ludewig U, von Wiren N, Frommer W B. Uniport of NH_4^+ by the root hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1.1[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(16): 13548-13555.
- [17] Yang S Y, Hao D L, Cong Y, et al. The rice OsAMT1.1 is a proton-independent feedback regulated ammonium transporter[J]. Plant Cell Reports, 2015, 34(2): 321-330.
- [18] D'apuzzo E, Rogato A, Simon-Rosin U, et al. Characterization of three functional high-affinity ammonium transporters in *Lotus japonicus* with differential transcriptional regulation spatial expression[J]. Plant Physiology, 2004, 134(4): 1763-1774.
- [19] Shelden M C, Dong B, de Bruxelles G L, et al. *Arabidopsis* ammonium transporters, AtAMT1.1 and AtAMT1.2, have different biochemical properties and functional roles[J]. Plant and Soil, 2001, 231(1): 151-160.
- [20] Khademi S, O'Connell J, Remis J, et al. Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.3.5 Å[J]. Science, 2004, 305(5690): 1587-1594.
- [21] Wacker T, Garcia-Celma J J, Lewe P, et al. Direct observation of electrogenic NH_4^+ transport in ammonium transport (Amt) proteins[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(27): 9995-10000.
- [22] Neuhauser B, Ludewig U. Uncoupling of ionic currents from substrate transport in the plant ammonium transporter AtAMT1.2[J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(17): 11650-11655.
- [23] Sogaard R, Alsterfjord M, Macaulay N, et al. Ammonium ion transport by the AMT/Rh homolog TaAMT1.1 is stimulated by acidic pH[J]. Pflügers Archiv (European Journal of Physiology), 2009, 458(4): 733-743.
- [24] Ortiz-Ramirez C, Mora S I, Trejo J, et al. PvAMT1;1, a highly selective ammonium transporter that functions as H^+/NH_4^+ symporter[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(36): 31113-31122.
- [25] Neuhauser B, Dynowski M, Ludewig U. Channel-like NH_3 flux by ammonium transporter AtAMT2[J]. FEBS Letters, 2009, 583(17): 2833-2838.
- [26] Lima J E, Kojima S, Takahashi H, et al. Ammonium triggers lateral root branching in *Arabidopsis* in an ammonium transporter 1, 3-dependent manner[J]. The Plant Cell, 2010, 22(11): 3621-3633.