

水稻吸铵基因 *OsAMT1.2* 和 *OsAMT3.3* 在不同生育期中的表达量差异及其在酵母细胞中吸铵功能初析^①

曹 玉^{1,2}, 李素梅¹, 施卫明^{1*}, 苏彦华¹

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室 (中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘 要: 本文利用定量 PCR 技术分析了 *OsAMT1.2* 和 *OsAMT3.3* 在水稻根中的表达水平, 并应用铵吸收功能缺陷型酵母突变体分析 *OsAMT1.2* 和 *OsAMT3.3* 对 NH_4^+ 的转运功能及影响基因功能异源表达的可能因素。结果表明, *OsAMT1.2* 和 *OsAMT3.3* 在分蘖期的表达水平较苗期高; 苗期 *OsAMT1.2* 与 *OsAMT3.3* 的转录水平差异不显著, 但分蘖期 *OsAMT1.2* 的表达水平快速升高, 较苗期提高了 5 倍, 而 *OsAMT3.3* 的表达量只提高了一倍, 导致两者的表达水平存在显著差异。缺 N 处理 2 天两基因均有被诱导增强表达的趋势, 其中苗期的增加幅度明显高于分蘖期。当外源供给 1mmol/L NH_4^+ , *OsAMT1.2* 在铵吸收功能缺陷型酵母突变体上仅表现部分功能, 而 *OsAMT3.3* 则不能实现吸铵功能互补。以 *AtAMT1.1* 为对照, 分析 *OsAMT1.2* 在酵母中的表达水平, 结果表明异源系统中 *OsAMT1.2* 的相对表达量仅有 *AtAMT1.1* 的 50%。本文的结果说明, 外源基因在酵母异源系统中的异源表达, 除了与基因产物本身的功能有关, 还取决于宿主酵母细胞对其表达水平的调控, 因而表现出受内源机制调控的特征。

关键词: *OsAMT*; Real-time RT-PCR; 酵母异源表达系统

中图分类号: S511; S143.1

氮 (N) 是作物从土壤中吸收量最多的元素, 对作物的生命活动和产量形成具有重要的意义。现阶段水稻对 N 肥的利用效率仅 30%~35%^[1-2], 一方面造成肥料的浪费, 另一方面对生态环境造成极大威胁^[3-9]。 NH_4^+ -N 是主要的 N 肥形态, 植物通过铵转运蛋白 (ammonium transporter, AMT) 从土壤溶液中吸收 NH_4^+ -N。水稻是典型的喜铵作物, 其基因组序列中有 10 个 *OsAMTs* 基因^[10], 但是对其研究并不多, 大部分局限于 *OsAMT1* 家族的 3 个基因上^[10-11], 结论还存在一定的争议。Kumar 等^[11]研究了水稻 *OsAMT1* 家族的 3 个基因的表达规律, 认为 *OsAMT1.1* 受低 N 诱导, 高 N 抑制; *OsAMT1.2* 受 N 调节的规律同 *OsAMT1.1*, 但变化幅度只有 *OsAMT1.1* 的 50%; 而 *OsAMT1.3* 对 N 的效应没有前两者明显, 主要受光照诱导表达。此外, Suenaga 等^[12]对 *OsAMT2* 家族的 *OsAMT2.1* 和 *OsAMT3.1* 也进行了初步的研究, 发现 *OsAMT2.1* 主要在根中表达, 且受 N 的影响不是很明显; 叶中的 *OsAMT2.1* 受缺 N 和加 N 诱导表达; 缺 N 也诱导 *OsAMT3.1* 的表达。以上均是 Northern 杂交或半定量

PCR 所得到的研究结果。由于 Northern 杂交需要所检测的基因有相对高的表达水平和该基因特异性的探针, 而 AMT 各基因的表达水平相对比较低, 尤其是 AMT2 家族的基因, 因此很难精确定量和直观地比较各 AMT 基因的表达水平。另外, 虽然对 *OsAMT1* 家族的 3 个基因的研究较为深入, 但是对 *OsAMT2* 家族基因的报道很少, *OsAMT* 基因的表达水平在不同生育期是否有不同的变化也还有待明确。

①基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (40671100) 和国家 973 项目 (2007CB109303) 资助。

* 通讯作者 (wmshi@issas.ac.cn)

作者简介: 曹玉 (1982—), 男, 江苏如皋人, 硕士研究生, 主要从事分子植物营养方面的研究。E-mail: caoyutt1223@yahoo.com.cn

Ninnemann 等^[13]以酵母铵缺失突变体为材料利用功能互补原理首先证明了拟南芥 *AtAMT1.1* 是编码高

①基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (40671100) 和国家 973 项目 (2007CB109303) 资助。

* 通讯作者 (wmshi@issas.ac.cn)

作者简介: 曹玉 (1982—), 男, 江苏如皋人, 硕士研究生, 主要从事分子植物营养方面的研究。E-mail: caoyutt1223@yahoo.com.cn

出 AMT1 家族的其他基因, 如拟南芥中的 *AtAMT1.2*、*AtAMT1.3*^[18]和 *AtAMT1.5*^[19]。这些发现表明, 在植物中 AMT1 基因家族由至少 3~5 个成员组成。除 *LeAMT1.1* 作为单向转运的吸铵基因在爪蛙卵母细胞异源表达系统实现明确的功能验证以外, 其他绝大部分 AMT1 家族蛋白的功能都通过其在酵母铵吸收缺失突变体的功

能互补得以证明^[16,20-21]。2000 年, 另一类型的铵转运蛋白 *AtAMT2.1* 从拟南芥中分离出来, 它是拟南芥中唯一一个与 AMT1 家族相差较大的铵转运蛋白, 而与细菌 AMT 以及酵母 MEP 转运蛋白则具有较高的同源性^[22]。Suenaga 等^[12]通过酵母异源互补系统, 初步表明了水稻 *OsAMT2.1* 也具有吸铵功能。但是, 有关 *OsAMT3.3* 是否具有吸铵功能则尚没有报道。

酿酒酵母是单细胞真核生物, 既具有大肠杆菌等原核生物繁殖快、易培养的优点, 又可对蛋白质产物进行适当加工, 如修饰、折叠和分泌等, 是功能优良的基因工程宿主菌之一。

酵母表达体系具有许多优点: ①作为真核细胞表达体系, 操作简单、培养周期较短; ②相对简便成熟的遗传操作技术, 可以产生丰富多样的酵母突变体; ③较为完善的表达控制系统; ④可以对所表达的蛋白进行多种翻译后修饰, 对某些蛋白可以进行糖基化修饰; ⑤酵母的遗传背景清楚, 可以利用基因调控机制, 实现外源基因的高水平表达。由于生物基因功能在进化过程中的保守性, 使酵母表达系统可广泛用于研究其他高等生物重要基因的功能特征^[23]。

但是, 酵母表达系统也存在一些缺点: 如外源基因的表达水平较低, 仅占细胞总蛋白的 5% 左右, 质粒不稳定, 容易丢失且转化困难, 转化效率低等。因此, 利用酵母表达系统进行基因功能研究中也存在一定的不确定性。这种不确定性是否与外源基因表达水

平的高低有一定的联系尚不清楚。

本研究以水稻 N 高效品种桂单 4 号为材料, 利用荧光定量 PCR 技术检测了苗期和分蘖期根中铵转运蛋白基因对缺 N 处理的响应水平, 并借以推测 *OsAMT1.2* 和 *OsAMT3.3* 在水稻根获取低浓度铵的过程中发挥的生理功能。同时, 将 *OsAMT* 基因通过酵母附加型载体在酿酒酵母中进行胞内表达, 构建一个酵母异源表达系统, 异源鉴定水稻 *OsAMT* 基因的吸铵功能, 并探讨 *OsAMT* 基因在酵母细胞中表达水平高低与吸铵功能的可能联系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

N 高效型水稻栽培种桂单 4 号为本实验室长期使用品种。铵吸收功能缺陷型酵母 (*S.cerevisia*) 突变株系 31019b 及其表达载体 pFL61 (5.4kb) 由德国 Hohenheim 大学的 Nicolaus von Wirén 教授惠赠。目标基因插入到 Not I 位点, 置于酵母细胞的组成型启动子 PGK5'和终止子 PGK3'之间。

1.2 水稻 N 处理及总 RNA 的提取

水稻品种桂单 4 号种子发芽后在温室 (25℃, 相对湿度 60%, 16 h 光照/8 h 黑暗) 用 Kimura B 营养液进行培养, N 源为 0.5 mmol/L NH₄NO₃。取 2 周苗龄的植株进行缺 N 处理 2 天, 收获水稻幼苗期样品, 取根后迅速放入液 N 中速冻, 然后置于 -80℃ 冰箱中保存。以 4 周苗龄的处于分蘖期的植株为材料, 进行缺 N 处理 2 天, 收获样品, 取根后迅速放入液 N 中速冻, 然后置于 -80℃ 冰箱中保存。按下述 1.5.1 所述方法提取根系总 RNA。

1.3 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR)

按照 NCBI (美国国立生物技术信息中心) 公布的各基因 cDNA 序列设计特异引物 (表 1), 应用荧光定量 PCR 技术分析各基因在酵母和水稻不同处理下的表达水平差异。

表 1 基因扩增与 RT-PCR 分析所用的引物序列

Table 1 Sequences of specific primers used for gene cloning and RT-PCR analysis

基因	引物序列	
	正向	反向
<i>AtAMT1.1</i>	5'-TTTAAGCTTATGTCTTGCTCGGCCACCG-3'	5'-TTCGGATCCTCAAACCGAGTAGGTGTAGTATTAG-3'
<i>OsAMT1.2</i>	5'-TTTAAGCTTATGGCGACGTGCTTGGAC-3'	5'-TTTGGATCCCTACACAACTGGCCCCGCCG-3'
<i>OsAMT3.3</i>	5'-TTCAAGCTTCCAGTTCTGAGTTCTGAC-3'	5'-TTCGGATCCTGCTATAATACGAGGGATG-3'
<i>OsAMT1.2</i>	5'-ATGGCGACGTGCTTGGACAG-3'	5'-CGAGCACGTGGTGAGCATG-3'
<i>OsAMT3.3</i>	5'-GCTGGCGCACTATTGTCA-3'	5'-CATTCTGTGTCACTC-CTACA3'
<i>AtAMT1.1</i>	5'-GATGGAAGGTATGGATATGAC-3'	5'-TCAAACCGAGTAGGTGTAGTATTAG-3'
<i>Actin1</i>	5'-GGAATAAATAGGG GCTTG-3'	5'-TACCGACGAT AGATGGGA-3'
<i>OsActin</i>	5'-CTTCATAGGAATGGAAGCTGC-3'	5'-CGACCACCTTGATCTTCATGCTGC-3'

标准曲线的制定: 将 PCR 产物克隆到 T/A 载体 pMD18T (TaKaRa, 大连宝生物) 上, 测序确认基因片段的正确性, 用质粒小提试剂盒 (TaKaRa, 大连宝生物) 进行抽提纯化, 然后用紫外分光光度计 (Bio-Rad, 美国) 测定其在 260、280 nm 处的吸收值, 确定质粒纯度, 并计算质粒的浓度。依次将质粒稀释为 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 拷贝数的标准浓度以制备一系列浓度梯度。PCR 反应体系为 25 μ l, 其中加入 10 μ l 模板, 进行 40 个循环, 反应液中加入荧光染料 SYBR Green I (Clontech, USA)。分别以酵母 *Actin 1* 和水稻的 *OsActin* 基因作为基因表达量的内标。

1.4 主要试剂、培养基

Taq DNA 聚合酶, T₄ DNA 连接酶, 限制性核酸内切酶 EcoRI、SacI、NotI、BamHI 和 BglII 均购自 NEB 公司; 小量质粒制备试剂盒、pMD18-T 载体、逆转录试剂盒 Reverse Transcriptase XL (AMV) 等购自大连宝生物公司 (TaKaRa); Yeast Nitrogen Base w/o amino acid 和 (NH₄)₂SO₄ 为 Difco 公司产品; Trizol Reagent 购自美国 Invitrogen 公司; 高保真 DNA 聚合酶 Herculase II Fusion DNA Polymerase 购自美国 Stratagene 公司。

使用的培养基以及配制详见参考文献[24]。

1.6 酵母表达载体的构建、转化与筛选

含目的基因的 DNA 和载体均用 Not I 酶切, 回收纯化, 按照一定比例进行连接反应, 转化大肠杆菌 *DH5a*, 筛选转化子, 经典碱裂解法提取质粒, 酶切鉴定重组载体, 并用相应酶切鉴定插入方向。将涂板的酵母突变体 31019b 转接至液体 YPD 培养基 (28℃) 培养, 待生长至 OD_{600nm} 0.4 ~ 0.5 时, 制备酵母感受态细胞。重组载体按照《毕赤酵母表达实验手册》所述标准方法电击转化入酵母感受态细胞中, 加入 500

1.5 cDNA 合成和目的基因的扩增

1.5.1 水稻根组织总 RNA 制备 取冻存的根系样品, 液 N 条件下研磨成细末, 取约 100 mg 样品加入 1 ml Trizol 按照说明书操作步骤进行抽提, 为去除基因组 DNA 污染, 得到的 RNA 采用 DNase I 于 37℃ 进行酶解 30 min, 氯仿抽提, 酒精沉淀, 得到沉淀用 70% 乙醇洗涤后晾干, 溶解于 40 μ l DEPC (焦碳酸二乙酯) 水中待用。

1.5.2 cDNA 合成 将上述用 DEPC 溶解的 RNA 样品, 用分光光度计测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀, 计算得到两者的比值介于 1.6 ~ 1.8 之间, 说明提取的 RNA 质量尚好。取 5 μ g 总 RNA 样品做甲醛变性凝胶电泳, 确定其完整性, 确定提取的 RNA 没有降解。以此 RNA 为模板, 用 AMV (大连宝生物公司) 按照说明书合成 cDNA 第一链。

1.5.3 OsAMT 全长基因的扩增 根据 NCBI 公布的目标 AMT 基因序列, 设计包含 ORF (开放阅读框) 的特异性引物 (由大连宝生物公司合成, 表 1)。进行 50 μ l 体系的 PCR 扩增, 反应条件为: 第一步, 94℃ 变性 5 min; 第二步, 按下列参数重复 30 个循环: 94℃ 变性 1 min, 60℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min; 第三步, 72℃ 延伸 7 min。扩增产物克隆到 T/A 载体上并测序验证。

μ l 酵母预培养液, 于摇床 220 r/min、30℃ 培养 3 h, 然后均匀涂布于尿嘧啶营养缺陷型平板上, 倒置, 30℃ 培养 48 ~ 72 h。对获得的转化子进行菌落 PCR 鉴定, 以空载体和拟南芥 *AtAMT1.1* 转化的酵母作为阴阳对照。

1.7 OsAMT 蛋白在吸铵缺陷型酵母突变体中的表达

挑选重组菌及对照菌的单一菌落, 接种到 SD 培养基中, 振荡培养, 待菌液 OD_{600nm} 为 2, 即达到对数生长后期时, 取 20 μ l 菌液, 离心收集菌体, 用无

菌水洗涤并重悬, 均匀涂板于含有 1 mmol/L、20 mmol/L NH_4^+ 为唯一 N 源的培养基上, 30℃ 培养 72 h。

1.8 酵母总 RNA 的提取

挑选携带 *AtAMT1.1* 和 *OsAMT1.2* 的重组菌及阴性对照菌的单一菌落, 接种到含有 5 mmol/L 精氨酸的培养基中, 30℃ 振荡过夜培养, 待菌液 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 达 0.4~0.6 时取样, 使总菌数为 10^7 个, 离心收集菌体, 用 Omega 总 RNA 提取试剂盒提取各样品的总 RNA。按照 1.3 所述用荧光定量 PCR 技术分析各基因在酵母中的表达水平。

2 结果与分析

2.1 *OsAMT1.2* 和 *OsAMT3.3* 在水稻不同生育期的表达水平

OsAMT 是编码水稻 NH_4^+ 转运蛋白的基因。已有的研究报道水稻基因组中至少存在 10 个 *OsAMT* 基因^[10]。根据同源性将其分为 4 个家族, 命名为: *OsAMT1.1-1.3*, *OsAMT2.1-2.3*, *OsAMT3.1-3.3* 和 *OsAMT4.1*。目前对水稻 *OsAMT* 功能及表达特征的研究多集中在 *OsAMT1* 家族的 3 个基因上。本研究利用荧光定量 PCR 技术检测苗期和分蘖期根中 *OsAMT1.2* 和 *OsAMT3.3* 的表达水平及 N 对其表达的影响调控。图 1 表明, *OsAMT* 在水稻分蘖期的表达量较苗期高, 这与分蘖期需要吸收更多量的 N 相一致。其中值得关注的是两基因在苗期和分蘖期表达水平差异, 苗期 *OsAMT3.3* 的转录水平稍高于 *OsAMT1.2*, 差异不显著; 但是到分蘖期 *OsAMT1.2* 的表达水平快速升高, 较苗期提高了 5 倍, 而 *OsAMT3.3* 的表达量只提高了一倍, 导致两者的表达水平存在显著差异。缺 N 处理 2 天后两基因均有被诱导增强表达的趋势, 但不同生育期影响不同。苗期缺 N 处理显著诱导了 *OsAMT1.2* 与 *OsAMT3.3* 表达量的增加, 而分蘖期的效果不显著。由以上结果可以推测, *OsAMT1.2* 与 *OsAMT3.3* 可能在水稻获取低浓度铵的过程中发挥重要的生理功能。

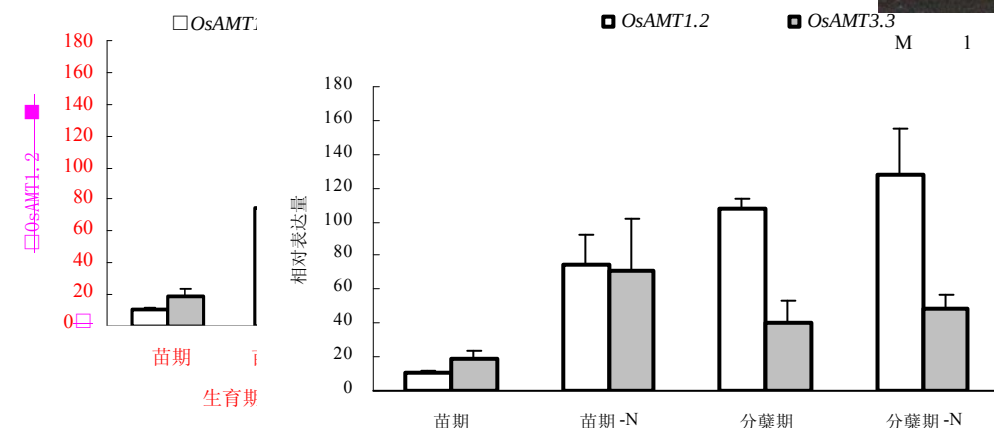


图 1 苗期和分蘖期水稻根中 *OsAMT1.2* 和 *OsAMT3.3* 的相对表达量 (目标基因/*OsActin*) (柱图上的误差线代表 SD, $n=3$)

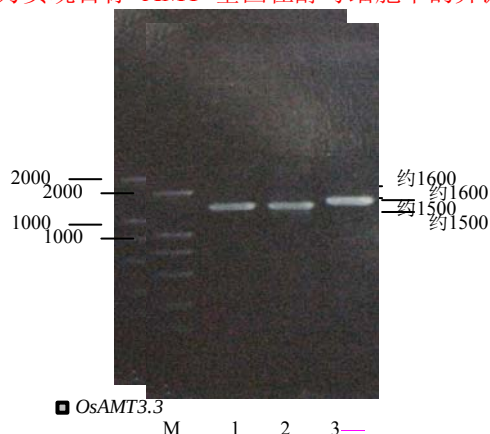
Fig. 1 Relative expressing abundance of *OsAMT1.2* and *OsAMT3.3* in rice root

2.2 目标 AMT 基因全长片段的克隆

由于后续实验需求, 我们同时也扩增拟南芥的 *AtAMT1.1* 作为酵母功能互补实验的阳性对照。针对 *AtAMT1.1*、*OsAMT1.2* 和 *OsAMT3.3* 设计专一性引物时于基因 5' 和 3' 端引入限制性酶切位点 NotI 以便于后续克隆。以对应植物的 cDNA 为模板, 利用高保真酶进行 PCR 扩增 (见 1.5.3), 得到了 3 个基因的全长编码序列。相应 PCR 产物的琼脂糖电泳结果如图 2 所示。从电泳条带的迁移位置, 与 DNA Marker 相对照, PCR 扩增产物与公布的相应 *OsAMT* cDNA 长度大小相一致。将 PCR 产物克隆到 T/A 载体上, 并进行测序验证, 测序结果分析表明, 图 3 中的扩增产物 1、2、3 分别为完整的 *AtAMT1.1*、*OsAMT1.2* 和 *OsAMT3.3* 全长序列。

2.3 酵母表达载体 pFL61-AMT 的构建及鉴定

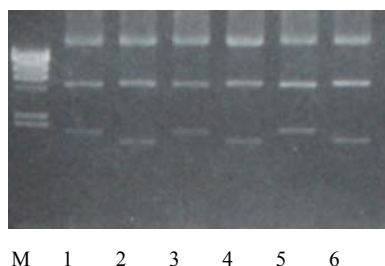
为实现目标 AMT 基因在酵母细胞中的异源表



基因的
因的扩增

产物, M: DL2000-DNA Marker)

Fig. 2 PCR amplified *OsAMT* gene fragments



1、3、5: *AtAMT1.1*、*OsAMT1.2*、*OsAMT3.3* 基因重组质粒 *Sac* I 酶切; 2、4、6: *AtAMT1.1*、*OsAMT1.2*、*OsAMT3.3* 基因重组质粒 *Not* I 酶切; M: λ Hind III DNA Marks

图 3 重组质粒 pFL61-*OsAMT* 方向判定酶切图

Fig. 3 Restriction identification of insert orientation in recombinant pFL61-*OsAMT*

2.3 酵母表达载体 pFL61-*AMT* 的构建及鉴定

为实现目标 *AMT* 基因在酵母细胞中的异源表达, 需要构建适合的酵母表达型质粒载体。本文采用 pFL61 作为表达载体。目标 *AMT* 编码序列片段插入到该载体的 *Not*I 酶切位点之间。将含有目的基因 *AMT* 的质粒与 pFL61 载体同时进行 *Not* I 酶切, 切胶回收目的产物片段, 电泳确定合适的比例使用 *T*₄ 连接酶 16℃ 反应过夜, 转化、抽提质粒, 筛选可能的重组质粒, 使用 *-Not*I 酶切鉴定 *AtAMT1.1*、*OsAMT1.2*、*OsAMT3.3* 基因的 pFL61 重组载体。同时, 由于采用单酶切位点进行连接, 而上述单一酶切位点的 *Not* I 酶切仅能证明重组质粒中携带有目标基因, 不能确定目标基因插入的方向, 因此, 必须对重组载体上连接的片段进行方向鉴定。采用两种不同的内切酶或者分别作用于载体骨架和目标基因内部单一酶进行酶切反应, 可以由所产生片段的大小判断目标基因的连接方向。经分析发现目的基因内部和载体上均含有唯一的 *Sac*I 酶切位点, 酶切后可以根据产生的小片段判定插入方向, 故选择采用 *Sac*I 酶切鉴定插入片段方向。酶切结果如图 3 所示, 其中条带 1、3、5 分别为 *AtAMT1.1*、*OsAMT1.2*、*OsAMT3.3* 基因重组质粒的 *Sac* I 酶切; 条带 2、4、6 分别为该 3 个基因重组质粒的 *Not* I 酶切。根据 *Sac* I 双酶切片段与预测的片段大小比较判断, 获得的 3 个基因的连接方向均与载体中启动子 PGK 的方向一致, 可以进行下面试验。

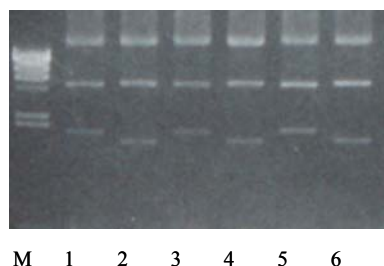


图 3—重组质粒 pFL61-*OsAMT* 方向判定酶切图

(1、3、5: *AtAMT1.1*、*OsAMT1.2*、*OsAMT3.3* 基因重组质粒 *Sac* I 酶切; 2、4、6: *AtAMT1.1*、*OsAMT1.2*、*OsAMT3.3* 基因重组质粒 *Not* I 酶切; M: λ Hind-III-DNA Marks

Fig. 3—Restriction identification of insert orientation in recombinant pFL61-*OsAMT* L61-*OsAMT* on site *Not* I

2.4 重组酵母转化子的筛选与鉴定

用上述插入方向正确的重组质粒转化铵吸收突变型酵母菌株 31019 b, 通过质粒本身赋予的尿嘧啶功能互补在不含尿嘧啶的 SD 培养基上筛选重组酵母转化子, 并同时转化空载体 pFL61。为排除由空载体导入而造成的尿嘧啶功能互补 (亦即酵母生长的恢复), 需要进一步检测初步筛选得到的转化子是否带有目标基因。采用菌落 PCR 方法对筛选得到的转化子进行鉴定。结果如图 4 所示。图中的条带 1~3 分别为以转化 *AtAMT1.1*、*OsAMT1.2*、*OsAMT3.3* 基因重组质粒的酵母菌落为模板的 PCR 产物。由 PCR 产物片段的大小, 可判定重组酵母中确实携带上述 3 个 *AMT* 基因; 条带 4~6 为阴性对照, 以未转化的酵母 31019 b 为模板的 PCR 反应, 均未见有产物扩增。

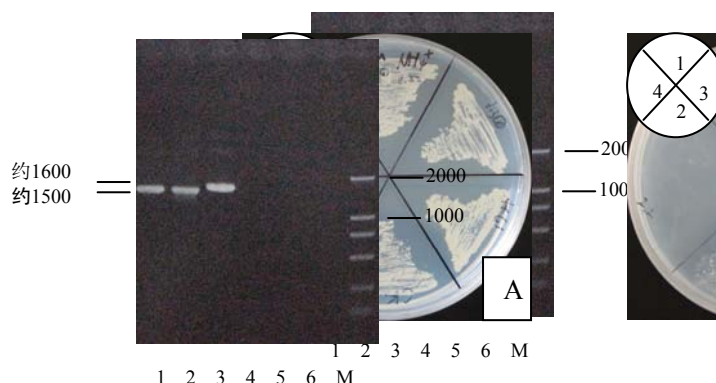


图 5 *OsAMT* 基因在酵母突变体中的异

(1: 系统对照, 携带 *AtAMT1.1* 基因的酵母重组子; 2: 正对照, 携带 *OsAMT*

图 4 重组酵母菌落 PCR

(1~3: 转化重组质粒的酵母菌落为模板的 PCR 产物; 4~6: 以未转化的酵母 31019 b 为模板 PCR 反应; M: DL2000 DNA Marker)

Fig. 4 Colony PCR on recombinant yeast

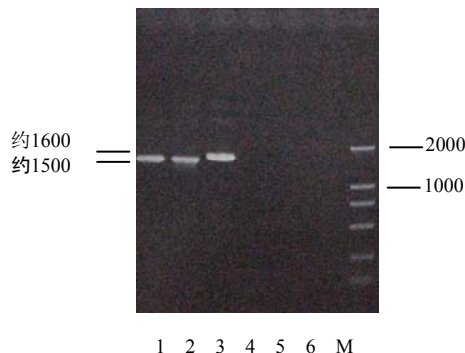


图 4 重组酵母菌落 PCR

(1~3: 转化重组质粒的酵母菌落为模板的 PCR 产物; 4~6: 以未转化的酵母 31019 b 为模板 PCR 反应; M: DL2000 DNA Marker)

图 4 重组酵母菌落 PCR

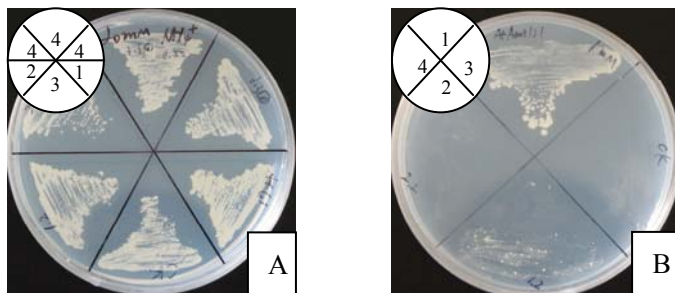
2.5 AMT 基因的功能鉴定

将筛选得到的携带 *AtAMT1.1*, *OsAMT1.2*, *OsAMT3.3* 等基因的重组酵母菌株接种至以 5 mmol/L 精氨酸为唯一 N 源的液体培养基上进行预培养, 接种调节各菌株使其生长状态一致, 并摇至菌液的 OD_{600nm} 值为 0.5 左右, 取样涂板于以 1 mmol/L 和 20 mmol/L NH_4^+ 为唯一 N 源的培养基上, 测试其功能互补的效果 (酵母突变体恢复生长的能力)。以携带空载质粒的酵母突变体作为阴性对照 (CK)。

在含有 20 mmol/L NH_4^+ 的充足 N 源的培养基上 (无选择压力), 所有的重组酵母以及 CK 都能够正常生长 (图 5A)。而在 1 mmol/L NH_4^+ 为唯一 N 源的培养基上 CK 不能生长 (图 5B), *AtAMT1.1* 表现出互补功能, *OsAMT1.2* 有部分恢复生长的功能, 而 *OsAMT3.3* 则完全不能互补。

精氨酸为唯一 N 源的液体培养基上进行预培养, 接种调节各菌株使其生长状态一致, 并摇至菌液的 OD_{600nm} 值为 0.5 左右, 取样涂板于以 1 mmol/L 和 20 mmol/L NH_4^+ 为唯一 N 源的培养基上, 测试其功能互补的效果 (酵母突变体恢复生长的能力)。以携带空载质粒的酵母突变体作为阴性对照 (CK)。

在含有 20 mmol/L NH_4^+ 的充足 N 源的培养基上 (无选择压力), 所有的重组酵母以及 CK 都能够正常生长 (图 5A)。而在 1 mmol/L NH_4^+ 为唯一 N 源的培养基上 CK 不能生长 (图 5B), *AtAMT1.1* 表现出互补功能, *OsAMT1.2* 有部分恢复生长的功能, 而 *OsAMT3.3* 则完全不能互补。



1: 系统对照, 携带 *AtAMT1.1* 基因的酵母重组子; 2: 正对照, 携带 *OsAMT1.2* 基因的酵母重组子; 3: CK, 携带空载质粒的酵母突变体; 4: 携带 *OsAMT3.3* 基因的酵母重组子

图 5 *OsAMT* 基因在酵母突变体中的异源互补

(1: 系统对照, 携带 *AtAMT1.1* 基因的酵母重组子; 2: 正对照, 携带 *OsAMT1.2* 基因的酵母重组子; 3: CK, 携带空载质粒的酵母突变体; 4: 携带 *OsAMT3.3* 基因的酵母重组子)

2.6 AMT 在酵母中的相对表达水平

在酵母异源表达系统中, 拟南芥的 *AMT* 能很好的进行功能互补, 而水稻的 *AMT* 部分或不能进行功能互补。为了探寻水稻 *OsAMT* 在酵母异源表达系统

中未能很好的实现功能互补的原因, 我们利用实时荧光定量 PCR 对 *AtAMT1.1* 和 *OsAMT1.2* 在酵母中相对表达量进行定量分析。为了定量的可比性, 根据参照基因的 ΔC_T 法对每个基因的表达量进行了归一化处

理。结果如图 6 所示，能够进行功能互补的 *AtAMT1.1* 有较高的表达水平，而功能上仅有部分互补的 *OsAMT1.2* 表达水平低于 *AtAMT1.1*，仅约为 *AtAMT1.1* 的 50%，存在显著性差异。由此我们判断基因在异源系统中的相对表达水平的差异可能是引起其不能有效互补吸铵功能的原因之一。可能的解释是，酵母与植物在 RNA 成熟过程中的修饰和稳定机制、蛋白质的分拣、翻译后修饰以及折叠机制等方面存在一定差异，而可能导致异源基因的功能互补失败。

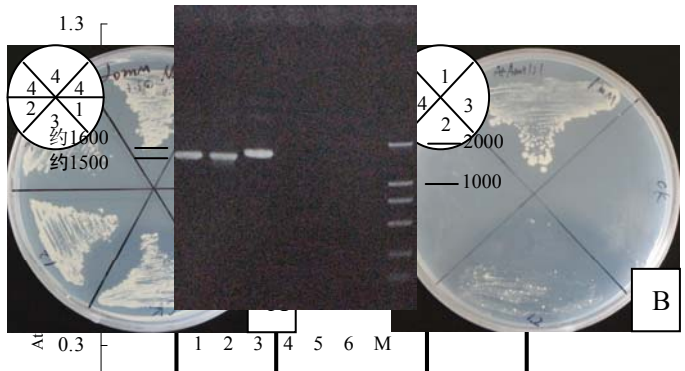
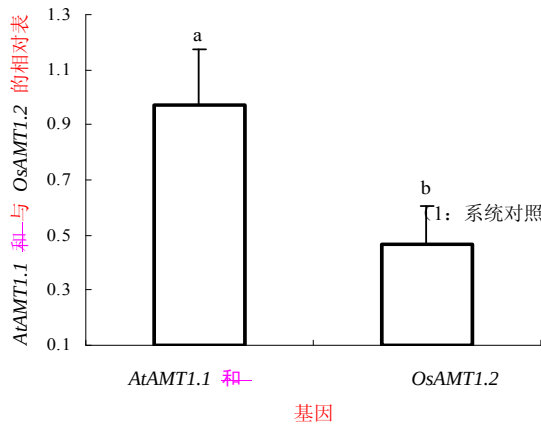


图 4 重组酵母菌落 PCR (1~3: 转化重组质粒的酵母菌落为模板的 PCR 产物; 4~6: 以未转化的酵母 31019 b 为模板 PCR 反应; M: DL2000 DNA Marker)

2.6 AMT 在酵母中的相对表达水平

在酵母异源表达系统中，拟南芥的 *AMT* 能很好地进行功能互补，而水稻的 *AMT* 部分不能进行功能互补。为了探寻水稻 *OsAMT* 在酵母异源表达系统中未能很好地实现功能互补的原因，我们利用实时荧光定量 PCR 对 *AtAMT1.1* 和 *OsAMT1.2* 在酵母中相对表达量进行定量分析。为了量化的可比性，根据参照基因的 ΔC_T 法对每个基因的表达量进行了归一化处理。结果如图 6 所示，能够进行功能互补的 *AtAMT1.1* 有较高的表达水平，而功能上仅有部分互补的 *OsAMT1.2* 表达水平低于 *AtAMT1.1*，仅约为

AtAMT1.1 的 50%, 存在显著性差异。由此我们判断基因在异源系统中的相对表达水平的差异可能是引起其不能有效互补吸铵功能的原因之一。可能的解释是, 酵母与植物在 RNA 成熟过程中的修饰和稳定机制、蛋白质的分拣、翻译后修饰以及折叠机制等方面存在一定差异, 而可能导致异源基因的功能互补失败。

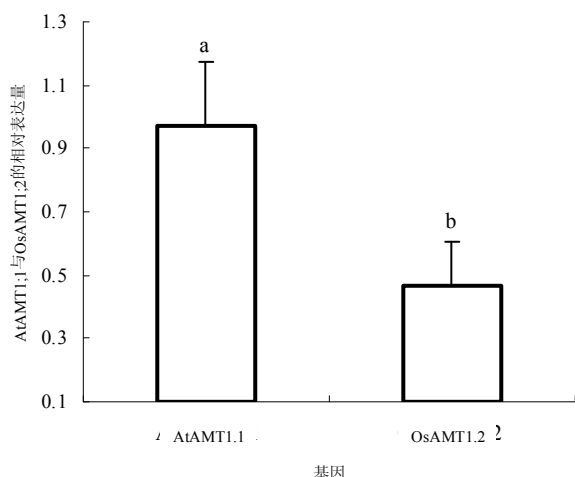


图6 *AtAMT1.1* 和 *OsAMT1.2* 在酵母中的相对表达量
(柱图上的误差线代表 SD, $n=3$)

Fig. 6 Relative expressing abundance of *AtAMT1.1* and *OsAMT1.2* in yeast mutant

3 讨论

实时荧光定量 PCR 技术虽然已经较广泛地应用于核酸的定量, 但是从目前的应用情况来看, 绝大多数用于医学或动物研究上^[25-26], 而在植物上的应用研究还不多。以往的研究中多数都用半定量的方法进行, 定量 PCR 技术的应用无疑使 *OsAMT* 表达规律的研究手段又前进了一步, 能够对基因家族各成员的表达量变化进行精确定量分析。

N 素在植物生长发育以及农业生产中都是不可替代的元素, 对于其吸收机理的研究虽然取得了一定的成就, 但仍处于起步阶段。水稻中的 10 个 *OsAMT* 基因, 大部分研究集中于 *OsAMT1* 家族的 3 个基因上^[10-12]。土壤溶液中 NH_4^+ 浓度范围一般大约在 0.3 ~ 2 mmol/L^[27], 现已知的 *OsAMT* 基因也都是在低浓度下起作用。前人研究表明, 外界 N 素供应状况对植物铵转运蛋白基因的表达具有明显的调控作用^[28]。Sonoda 等^[10]的研究表明, *OsAMT1.1* 为组成型表达, 在根和地上部都可以明显检测到; *OsAMT1.2* 和

OsAMT1.3 只在根中诱导表达; Kumar 等^[12]认为 *OsAMT1.1* 受低 N 诱导, 高 N 抑制; *OsAMT1.2* 受 N 调节的规律同 *OsAMT1.1*, 但变化幅度只有 *OsAMT1.1* 的 50%^[9]; 本课题组的研究结果表明, *OsAMT1.2* 和 *OsAMT3.3* 在根和地上部都有表达, 且 N 诱导^[29-31]。这些研究都集中在苗期或同一个时期表达量的变化, 对 *OsAMT* 基因的表达水平在不同时期不同的变化少有报道。本研究通过定量 PCR 的应用, 以 N 高效品种桂单 4 号为材料, 对 *T1.2* 和 *OsAMT3.3* 在正常和缺 N 处理条件下不同生育期的相对表达量进行了定量研究。结果 *OsAMT1.2* 和 *OsAMT3.3* 在分蘖期的表达水平高; 这与分蘖期需要吸收更多量的 N 相一致。*OsAMT1.2* 与 *OsAMT3.3* 的转录水平差异不显著, 分蘖期 *OsAMT1.2* 的表达水平较苗期提高了 5 倍, *OsAMT3.3* 的表达量只提高了一倍, 导致两者表达水平存在显著差异。缺 N 处理 2 天两基因均诱导增强表达的趋势, 其中苗期的增加幅度明显高于分蘖期。由此推测 *OsAMT1.2* 与 *OsAMT3.3* 应该在水稻获取低浓度铵的过程中发挥重要的生理功能。

酵母表达体系具有高效快捷的特点, 是进行基因功能分析常用的异源系统之一。酵母基因组具有编码 3 个高亲和铵转运蛋白的基因 (*Mep1*、*Mep2* 和 *Mep3*), 上述基因的协同表达调节酵母对介质中 NH_4^+ 的吸收^[32]。缺失上述基因功能的酵母突变体, 缺乏对生长介质中 NH_4^+ 的吸收功能, 或吸收 NH_4^+ 的功能明显减弱。因此, 缺少上述某一种或全部铵转运蛋白基因功能的酵母突变体, 已成为鉴定植物等其他物种铵转运蛋白基因功能的有效手段之一^[33]。 NH_4^+ 吸收缺陷的酵母突变体 31019 b 是目前鉴定铵转运蛋白功能的常用酵母突变体之一, 该突变体同时缺失了 *Mep1*、*Mep2* 和 *Mep3* 功能, 在 NH_4^+ 作为唯一 N 源时, 不能在浓度低于 5 mmol/L 的情况下生长^[34]。

本研究利用分子克隆技术, 通过 PCR 扩增了水稻的 *OsAMTs* 基因并试图利用吸铵缺陷型酵母突变体系统对其功能进行分析鉴定。在 1 mmol/L 铵为唯一 N 源的限制性供 N 条件下, 仅 *OsAMT1.2* 表现出部分的吸铵功能, 而 *OsAMT3.3* 则没有实现功能互补。*OsAMT3.3* 未能互补的原因可能是: ①由于质粒不稳定, 导致基因不能表达; 或者基因有表达, 但是因为是外源基因而被迅速降解了; ②虽然基因表达了, 但是其蛋白需要精确定位和修饰; 或者需要伴随基因才能起作用。这种需要伴随基因的情况在衣藻、大麦和拟南芥上都有发现^[35-37]。例如大麦中的硝转

运蛋白基因 *HvNRT2.1* 的功能表达就需要 *HvNAR2.3* (NAR2 类似) 基因的陪伴^[38]。

为了探寻它们在酵母表达体系中未能实现明显功能互补的原因, 我们利用定量 PCR 方法比较了 *OsAMT1.2* 与能够成功互补的拟南芥 *AtAMT1.1* 这两个基因在酵母中的相对表达量。结果发现 *OsAMT1.2* 基因的相对表达量仅约为 *AtAMT1.1* 的 50%, 这很可能是导致酵母异源表达未能获得功能完全互补的原因之一。由于表达量的降低而造成基因功能互补的差异可能是由以下 2 方面造成: ①由于不同物种 AMT 在结构上存在差异^[37], 从而也有可能导致表达的差异; ②*OsAMT1.2* 在该酵母细胞中的表达需要其他因子的协同表达^[38]。当然, 还有其他许多因素可以导致酵母异源表达不能完全功能互补。蛋白结构和蛋白活性调节位点 (如 N-糖基化位点、蛋白激酶 C 磷酸化位点和酪蛋白激酶 II 磷酸化位点) 在蛋白质中的位置和分布数量的不同, 都可能使上述基因编码蛋白在吸收或转运 NH_4^+ 的能力、作用方式和调节特性方面可能存在着较大差异。同时, 酵母与植物在 RNA 成熟过程中的修饰和稳定机制、蛋白质的分拣、翻译后修饰以及折叠机制等方面存在一定差异, 可能导致蛋白质发生降解、定位或折叠错误而失去其应有的生物活性^[39]。本研究通过试验数据证明了酵母宿主菌通过对外源基因表达水平的调控而抑制其功能发挥的可能性。研究结果对于利用酵母异源表达系统进行外源基因类似研究具有重要的借鉴意义。

致谢: 感谢德国 Hohenheim 大学袁力行博士在本研究工作中的大力帮助和热情指导以及 von Wiren 教授提供的酵母突变体材料和表达质粒。

参考文献:

- [1] 朱兆良. 中国土壤氮素. 江苏: 江苏科技出版社, 1992: 37-59
- [2] 朱兆良. 农田中的氮肥损失与对策. 土壤与环境, 2000, 9(1): 1-6
- [3] Zhu ZL. Efficient management of nitrogen fertilizer for flooded rice in relation to nitrogen transformations in flooded soils. *Pedosphere*, 1992, 2(2): 97-114
- [4] Zhang SL, Cai GX, Wang XZ, Xu YH, Zhu ZL, Freney JR. Losses of urea-nitrogen applied to maize grown on a calcareous fluvo-aquic soil in North China Plain. *Pedosphere*, 1992, 2(2): 171-178
- [5] 司友斌, 王慎强, 陈怀满. 农田氮、磷的流失与水体富营养化. 土壤, 2000, 32(4): 188-193
- [6] 张国梁, 章申. 农田氮素淋失研究进展. 土壤, 1998, 30(6): 291-297
- [7] 王德建, 林静慧, 孙瑞娟, 夏立忠, 连纲. 太湖地区稻麦高产的氮肥适宜用量及其对地下水的影响. 土壤学报, 2003, 40(3): 426-432
- [8] 苏成国, 尹斌, 朱兆良, 沈其荣. 稻田氮肥的氨挥发损失与稻季大气氮的湿沉降. 应用生态学报, 2003, 14(11): 1884-1888
- [9] 田玉华, 尹斌, 贺发云, 张启明, 朱兆良. 太湖地区稻季的氮素径流损失研究. 土壤学报, 2007, 44(6): 1070-1075
- [10] Sonoda Y, Ikeda A, Saiki S, von Wiren N, Yamaya T, and Yamaguchi J. Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (*OsAMT1.1-1.3*) in rice. *Plant and Cell Physiology*, 2003, 44: 726-734
- [11] Kumar A, Silim SN, Okamoto M. Differential expression of three members of the *AMT1* gene family encoding putative high-affinity NH_4 transporters in roots of *Oryza sativa* sub-species indica. *Plant Cell Environ.*, 2003, 26(6): 907-914
- [12] Suenaga A, Moriya K, Sonoda Y, Ikeda A, Von Wirén N, Hayakawa T, Yamaguchi J, Yamaya T. Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter *OsAMT2* in rice plants. *Plant Cell Physiol.*, 2003, 44(2): 206-211
- [13] Ninnemann O, Jauniaux JC, Frommer WB. Identification of a high affinity NH_4^+ transporter from plants. *EMBO J.*, 1994, 13: 3464-3471
- [14] Lauter FR, Ninnemann O, Bucher M, Riesmeier J, Frommer WB. Preferential expression of an ammonium transporter and two putative nitrate transporters in root hairs of tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93: 8139-8144
- [15] von Wirén N, Bergfeld A, Ninnemann O, Frommer WB. *OsAMT1-1*: A high-affinity ammonium transporter from rice (*Oryza sativa* L.cv. Nipponbare). *Plant Mol. Biol.*, 1997, 3: 681
- [16] von Wirén N, Lauter FR, Ninnemann O, Gillissen B, Walch-Liu P, Engels C, Jost W, Frommer WB. Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. *Plant J.*, 2000, 21: 167-175
- [17] Saiki S, Sonoda Y, Ikeda A, Yamaya T, Yamaguchi J. Functional analysis of rice ammonium transporter gene *OsAMT1.3*. *Plant Cell Physiol.*, 2002, 43 (suppl.): 127
- [18] Gazzarrini S, Lejay L, Gojon A, Ninnemann O, Frommer WB, vonWirén N. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into Arabidopsis roots. *Plant Cell*, 1999, 11: 937-947

- [19] Yuan LX, Loque D, Kojima S, Rauch S, Ishiyama K, Inoue E, Takahashi H, von Wiren N. The organization of high-affinity ammonium uptake in Arabidopsis roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. *The Plant Cell*, 2007, 11: 67–75
- [20] Ludewig U, von Wirén N, Rentsch D, Frommer W-B. Rhesus factors and ammonium: A function in efflux? *Genome Biol.*, 2001, 2: 1010.1–1010.5
- [21] Gazzarrini S, Lejay L, Gojon A, Ninnemann O, Frommer WB, vonWirén N. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into Arabidopsis roots. *Plant Cell*, 1999, 11: 937–947
- [22] Sohlenkamp C, Shelden M, Howitt S, Udvardi M. Characterization of Arabidopsis *AtAMT2*, a novel ammonium transporter in plants. *FEBS Lett.*, 2000, 467: 273–278
- [23] 秦俊川. 基因工程. 南京: 南京大学出版社, 2000: 132–133
- [24] A. 亚当斯 A, D.E. 戈特施林 DE, C.A. 凯泽 CA, 卡斯特恩斯 T. 酵母遗传学方法实验指南. 北京: 科学出版社, 2000: 110–111, 81–82, 105–102
- [25] 蔡霞. 定量 PCR 技术及其应用现状. 现代诊断与治疗, 2005, 16(2): 112–115
- [26] 陈英剑, 胡成进, 赵苗青. SYBR Green 实时荧光定量 PCR 技术平台的建立. 实用医药杂志, 2004, 21(11): 997–999
- [27] 廖继佩, 林先贵, 曹志洪, 张杨株. 土壤固定态铵的影响因素. 土壤, 2003, 35(1): 36–40
- [28] Loqué D, von Wirén N. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55: 1293–1305
- [29] Li SM, Shi WM. Quantitative characterization of nitrogen regulation of *OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* and *OsAMT2.2* expression. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2006, 53(6): 837–843
- [30] 赵首萍, 赵学强, 施卫明. 高等植物氮素吸收分子机理研究进展. 土壤, 2007, 39(2): 173–180
- [31] 赵首萍, 施卫明. 水稻 NH_4^+ 转运蛋白基因 *OsAMT1.1* 和 *OsAMT3.1* 和 *OsAMT4.1* 表达部位及表达特性初析. 土壤, 2007, 39 (3): 460–464
- [32] Marini AM, Springael JY, Frommer WB, Andre B. Crosstalk between ammonium transporters in yeast and interference by the soybean SAT1 protein. *Molecular Microbiology*, 2000, 35: 378–385
- [33] Dubois E, Grenson M. Methylamine/ammonia uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae*: Multiplicity and regulation. *Molecular Genomics and Genetics*, 1979, 175: 67–76
- [34] Marini AM, Soussi Boudekou S, Vissers S, Andre B. A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 1997, 17: 4282–4293
- [35] Quesada A, Galvan A, Fernandez E. Identification of nitrate transporter genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.*, 1994, 5: 407–419
- [36] Tong Y, Zhou JJ, Li ZS, Miller AJ. A two-component high-affinity nitrate uptake system in barley. *Plant J.*, 2005, 41: 442–450
- [37] Uwe L, Benjamin N, Marek D. Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. *FEBS Letters*, 2007, 581: 2301–2308
- [38] Okamoto M, Anshuman K, Li WB, Wang Y, Yaesh Siddiqi M, Crawford N-M, Glass ADM. High affinity nitrate transport in roots of Arabidopsis depends on expression of the NAR2-like gene *AtNRT3.1*. *Plant Physiol.*, 2006, 140: 1036–1046
- [39] Kauffman KJ, Pridgen EM, Doyle 3rd FJ, Dhurjati PS, Robinson AS. Decreased protein expression and intermittent recoveries in BiP levels result from cellular stress during heterologous protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.*, 2002, 189: 42–50

Expression of *OsAMT1.2* and *OsAMT3.3* in Rice Root with Relation to Different Growth Stages and Functional Characterization in Yeast Mutant

CAO Yu^{1,2}, LI Su-mei¹, SHI Wei-ming¹, SU Yan-hua¹

(State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), Nanjing 210008, China)

Abstract: Two cDNAs encoding respectively, *OsAMT1.2* and *OsAMT3.3*, were isolated from rice cultivars Guidan 4. The expressions of both

genes in the roots of rice seedlings were induced significantly under nitrogen starvation. A yeast mutant deficient in ammonium (NH_4^+) transport was employed to elucidate their functional aspects. Expression of *OsAMT1.2* in the yeast mutant partially complemented NH_4^+ uptake deficiency of the mutant cells, while *OsAMT3.3* did not confer functional complementation. Relative gene expression analysis in yeast revealed a 50% lower abundance of *OsAMT1.2* mRNA than the Arabidopsis *AtAMT1.1*, a functional NH_4^+ transporter characterized in the same system. Thus, the low abundant expression in the yeast system may be one of the reasons that the *OsAMTs* was not consequently capable for functional complementation. Our results give a clue to the consideration of using yeast for functional characterization of foreign genes in such heterologous system.

Key words: OsAMT, Real-time RT-PCR, *S.cerevisiae* foreign gene expression