

氮素吸收调控中铵转运蛋白与锚蛋白的互作研究

刘婷, 张永建, 安霞, 陈范骏, 王章奎, 袁力行*

(中国农业大学资源与环境学院, 农业部植物营养学重点实验室, 教育部植物-土壤相互作用重点实验室, 北京 100193)

摘要: 铵转运蛋白(AMT)介导的高亲和力铵跨膜运输是植物根系吸收铵态氮的主要途径。AMT 蛋白水平上的调控能够快速有效地控制根系铵吸收能力,但参与调控的互作蛋白尚未见报道。本研究通过生物信息学手段预测得到铵转运蛋白 AtAMT1;3 可能和锚蛋白 AtAnkTm8 存在互作。基因表达分析实验发现 AtAMT1;3 和 AtAnkTm8 的根中组织特异性表达模式一致,并同时受到缺氮胁迫的上调表达,结果支持了它们互作的可能性。筛选鉴定出 AtAnkTm8 缺失突变体,分析在供铵条件下及对甲基铵敏感性的生长表型,结果发现 AtAnkTm8 的缺失没有影响拟南芥根的铵吸收能力,推测可能存在其他家族成员的功能冗余。AMT 与 AnkTm 的互作为理解植物铵吸收调控过程提供了可能的新颖机制。

关键词: 铵吸收; 氮调控; AtAMT1;3; AtAnkTm8; 蛋白互作

中图分类号: Q945.18 文献标识码: A 文章编号: 1008-505X(2011)06-1293-07

Interaction between AMT and AnkTm in regulation of ammonium uptake in *Arabidopsis* roots

LIU Ting, ZHANG Yong-jian, AN Xia, CHEN Fan-jun, WANG Zhang-kui, YUAN Li-xing*

(College of Resources and Environmental Sciences, China Agricultural University/Key Laboratory of Plant Nutrition, Ministry of Agriculture/Key Laboratory of Plant-Soil Interaction, Ministry of Education, Beijing 100193, China)

Abstract: In plant roots AMT-type ammonium transporters have been demonstrated to mediate high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane. To tightly control ammonium uptake process, the regulation of AMTs at protein levels is essential. However, the underlying molecular mechanism remains unclear. Here, based on the available bioinformatics database, we predicted the putative interaction between AtAMT1;3 with AtAnkTm8 which encodes an ankyrin repeat protein. Gene expression analyses further supported this interaction because both genes were mainly expressed in the similar root tissues, and also expressed up-regulatedly under nitrogen deficiency. Two independent T-DNA insertion lines were isolated and characterized, in which the expression of AtAnkTm8 was defective. The growth of AtAnkTm8 insertion lines in the medium supplied with either ammonium as a sole nitrogen source or ammonium toxic analog methylammonium (MeA) did not differ from that of their corresponding wild type plants. No effect on ammonium uptake capacity in AtAnkTm8 insertion lines was observed, which could be explained by the possible genetic redundancy of other AnkTm homologs. Taken together, our results describe a putative interaction between AMT and AnkTm, providing a novel regulatory mechanism on fine tuning ammonium uptake in roots.

Key words: ammonium uptake; nitrogen regulation; AtAMT1;3; AtAnkTm8; protein interaction

收稿日期: 2011-03-31 接受日期: 2011-07-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(30870189)资助。

作者简介: 刘婷(1981—),女,河北省石家庄市人,博士研究生,主要从事植物营养分子生物学研究。E-mail: liuting_81@163.com

* 通讯作者 E-mail: yuanlixing@cau.edu.cn

氮素作为植物必需的矿质营养元素之一,是合成蛋白质、核酸和多种生物活性物质的必需组分。氮肥在农业生产中的大量使用极大地提高了作物产量,但也增加了农业生产成本,同时氮肥的流失也在逐步引起生态环境的恶化。基于经济效益和环境保护的双重考虑,在现代农业生产中氮高效作物品种的种植已日益重要。能否快速有效地选育氮高效新品种在很大程度上取决于我们对植物自身氮素吸收和利用机理的认知程度。

土壤中的铵态氮和硝态氮是高等植物根系吸收无机氮的主要形式。铵盐的浓度在土壤中通常很低(不超过 50 $\mu\text{mol/L}$),而硝酸盐是铵盐浓度的 10 ~ 1000 倍之多。但在低温、淹渍条件下或者酸性土壤中,铵盐是被植物吸收的主要氮源^[1]。生理学研究发现,在植物根内存在两种不同的铵吸收系统,即高亲和与低亲和铵吸收系统^[2-3]。分子生物学研究进一步发现,AMT 形式的铵转运蛋白(Ammonium transporters, AMT)介导高亲和力的铵跨膜运输是植物根部吸收铵的主要途径^[4-7]。

铵不仅作为氮源被植物根吸收并同化,同时也是细胞自身分解代谢过程中的重要产物,而过量的铵对细胞有毒害作用。为了精确地控制细胞质内铵浓度,铵在根内的跨膜运输需要被高度调节^[8]。在生理水平上的研究发现氮素供应水平的变化会引起植物铵吸收速率的变化^[4]。在分子水平的研究结果显示,缺氮会诱导拟南芥根中相关铵转运蛋白基因的表达,从而提高铵吸收能力。进一步研究发现,缺氮后恢复供铵可以抑制铵转运蛋白基因的表达^[4, 9]。相对在转录水平上的调控,AMT 基因在蛋白水平上的调控能够更加快速有效地调节其转运活性,使得植物能够准确快速地应答外界环境中氮素供应和本身内部氮营养水平的变化,然而这方面的研究尚未见报道。

在生物医学研究中,Soht 等^[10]发现定位于人肾上皮细胞的铵转运蛋白 RhBG 与锚蛋白 G Ankyrin-G 存在互作。RhBG C 末端酪氨酸位点的磷酸化状态的改变会影响 RhBG 与 Ankyrin-G 之间的互作,从而影响 RhBG 在质膜上的稳定性,抑制 RhBG 介导的转铵活性。目前这种机制只在人肾上皮细胞中的 RhBG 中发现,植物铵转运蛋白 AMT 家族成员是否存在类似机制有待进一步研究。

本研究利用生物信息学手段,发现模式植物拟南芥中主要负责根系吸铵功能的铵转运蛋白 AtAMT1; 3 可能与锚蛋白 AtAnkTm8 存在互作; 通

过基因表达分析研究它们的组织表达特异性及缺氮胁迫下的表达模式。利用筛选到的 AtAnkTm8 缺失纯合突变体,对其进行铵吸收功能研究,为理解植物铵吸收调控机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本实验所用植物材料为拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)。野生型材料为 *Columbia-0* (*Col-0*),拟南芥 *AtAnkTm8* 缺失突变体材料从拟南芥突变体库 *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC) 购买。

1.2 生物信息学数据分析

利用 Genemania 基因互作数据库、*Arabidopsis Interactions Viewer* 蛋白互作数据库及 Genevestigator 数据库提供的数据,查询和拟南芥铵转运蛋白 AMT1 家族成员 (*AtAMT1;1*、*AtAMT1;2*、*AtAMT1;3*、*AtAMT1;4* 和 *AtAMT1;5*) 互作的蛋白。利用 Genevestigator 数据库查询 *AtAMT1;3* 与 *AtAnkTm8* 基因组织特异性表达数据。

1.3 拟南芥在缺氮胁迫下 *AtAMT1;3* 与 *AtAnkTm8* 的表达

拟南芥种子在黑暗中萌发 4 d 后放置于浸透水分的石棉上预培养。1 周后,将蒸馏水更换为营养液,营养液成分包含 1 mmol/L KH_2PO_4 , 1 mmol/L MgSO_4 , 250 mmol/L K_2SO_4 , 250 mmol/L CaCl_2 , 100 mmol/L Na-Fe-EDTA, 50 mmol/L KCl, 50 mmol/L H_3BO_3 , 5 mmol/L MnSO_4 , 1 mmol/L ZnSO_4 , 1 mmol/L CuSO_4 和 1 mmol/L NaMoO_4 , 用 KOH 调节 pH 值为 6.0,除了以上成分外,2 mmol/L NH_4NO_3 作为充足氮源。植株水培环境生长条件为: 10/14 h 光照/黑暗; 光强 280 $\text{mmol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$; 温度 22 $^\circ\text{C}$ /18 $^\circ\text{C}$; 湿度 70%。植物培养正常供氮 6 周后进行缺氮处理,缺氮处理 2 d、4 d 后收样。取植物根(每个基因型 10 株),提总 RNA,为了消除 DNA 污染,总 RNA 用 RQ-DNase I (Promega) 进一步纯化,利用 M-MLV 试剂盒 (Promega) 反转录合成 cDNA 第一条链。利用 RT-PCR (ABI 7500 Real-Time PCR System) 分析基因表达水平。运用 SYBR Green Realtime PCR Master Mix Kit (TOYOBO) 进行扩增反应,反应的引物退火温度 62 $^\circ\text{C}$,扩增产物约 180 bp。检测基因的表达水平运用 *Ubiquitin10* (*At4g05320*) 的表达水平进行标准化。基因特异性引物见表 1。反应体系共 25 μL ; 模板 2 μL ,引物各 1 μL , SYBR Green Realtime PCR Master Mix 12.5 μL ,加 H_2O 至 25 μL 。

表 1 引物列表
Table 1 The list of primers

引物名称 Primer	序列 Sequences
<i>AtAnkTm8</i> -Forward	5'ACGTATGTTGCGGTAAGCCATC3'
<i>AtAnkTm8</i> -Reverse	5'ACCAGCAGCCAAAAGCTTAAGG3'
<i>AtAMT1;3</i> -Forward	5'GAAGGCCATATGGACTATTTATGGG3'
<i>AtAMT1;3</i> -Reverse	5'CGAGGAGGAGTAGCTGATCGAGG3'
LP-057432	5'GAGACCAAATAGGAAGCGACC3'
RP-057432	5'TTGTTCATGCAGCAAATCCC3'
LP-088794	5'TTCCACGGTTCGTTCACTAAG3'
RP-088794	5'CTGATGAAGAACGAGTCTCGG3'
LBb1.3	5'ATTTTGCCGATTTCCGGAAC3'

1.4 拟南芥 *AtAnkTm8* 缺失突变体纯合体筛选与分子鉴定

提取 *AtAnkTm8* 缺失突变体分离群体单株总 DNA。以所提取的植株总 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 所用引物的设计参照 SIGnAL 的相关资料 (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.html>), PCR 试剂盒由北京盛旭百川生物科技公司提供。基因特异性引物见表 1。反应体系共 10 μ L: 模板 1 μ L, 引物各 0.5 μ L, 10 \times Reaction Buffer 1 μ L, dNTP mixture (10 mmol/L) 0.2 μ L, Taq 酶 0.2 μ L, H₂O 加至 10 μ L。将各种成分混匀后进行 PCR, PCR 反应程序如下: 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 64 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 进行 30 个循环。1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

取 2 周龄植物体(20 ~ 100 mg)为实验材料。RT-PCR 分析基因表达水平。*Ubiquitin10* (At4g05320) 作为内参基因,对目的基因的表达水平进行标准化。基因特异性引物见表 1。反应体系及程序同筛选实验。

1.5 锚蛋白基因 *AtAnkTm8* 缺失突变体在供铵条件及 MeA 敏感性的生长表型

转基因拟南芥种子消毒后播种在 1/2MS(-N) + 5 mmol/L KNO₃ + 1% 蔗糖 (pH 5.8, 包含 5 mmol/L KNO₃ 作为唯一氮源) 固体培养基上预处理,垂直培养 7 d 后移栽至含有相应浓度试剂处理的 1/2MS 固体培养基 [10/0 mmol/L MeA + 1/2MS + 1 mmol/L KNO₃ + MES (pH 5.8) + 1% 蔗糖]; 500 μ mol/L NH₄⁺/NO₃⁻ + 1/2MS + MES (pH 5.8) 上垂直培养 10 d,对生长表型进行拍照,称取地上部鲜重 ($n=3 \sim 4$),实验数据用统计学软件 SigmaStat 单因素分析显著性差异。

2 结果与分析

2.1 生物信息学预测 *AtAMT1;3* 与 *AtAnkTm8* 互作

利用 Genemania 基因互作数据库 (<http://genemania.org>) 分析得到: 拟南芥中主要负责铵吸收的铵转运蛋白 AMT1 家族中的 5 个成员 (*AtAMT1;1*、*AtAMT1;2*、*AtAMT1;3*、*AtAMT1;4* 和 *AtAMT1;5*), 只有 *AtAMT1;3* 与 *AtAnkTm8* 基因存在互作(图 1)。利用 *Arabidopsis* Interactions Viewer 蛋白互作数据库 (<http://bar.utoronto.ca>) 进一步说明了 *AtAMT1;3* 与 *AtAnkTm8* 蛋白可能存在互作。

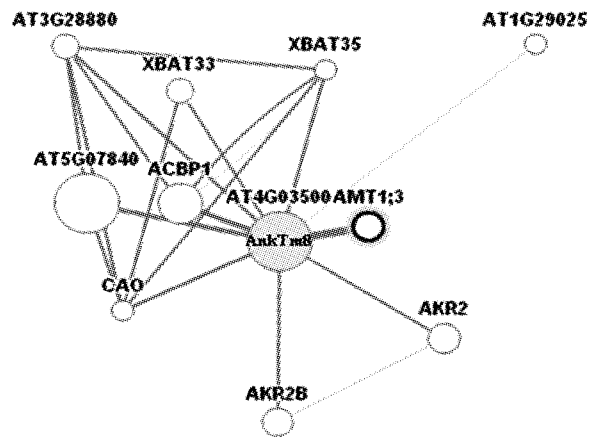


图 1 利用生物信息学数据预测拟南芥中 *AtAnkTm8* 与 *AtAMT1;3* 互作

Fig. 1 The prediction of the putative interaction between *AtAnkTm8* and *AtAMT1;3* of *Arabidopsis* by the bioinformatic database

2.2 拟南芥中 *AtAMT1;3* 与 *AtAnkTm8* 的组织特异性表达及缺氮胁迫下表达模式一致

利用 Genevestigator (<http://www.genevestigator.com>) 公布的基因芯片数据分析表明, *AtAnkTm8* 与 *AtAMT1;3* 基因在组织表达特异性方面具有一致性。*AtAnkTm8* 在根部的表达量较高,与 *AtAMT1;3* 基因在根部特异性表达一致(图 2A)。在根的不同组织中伸长区和根毛区表达量较高, *AtAMT1;3* 基因也主要在同样组织部位中表达(图 2B)。组织特异性表达分析说明, *AtAnkTm8* 与 *AtAMT1;3* 基因在根系铵吸收主要部位的表达量都比较高。在缺氮胁迫条件下 *AtAMT1;3* 表达量明显上调, *AtAnkTm8* 的表达同样也受到缺氮诱导(图 3),进一步支持了 *AtAnkTm8* 与 *AtAMT1;3* 互作的可能性。

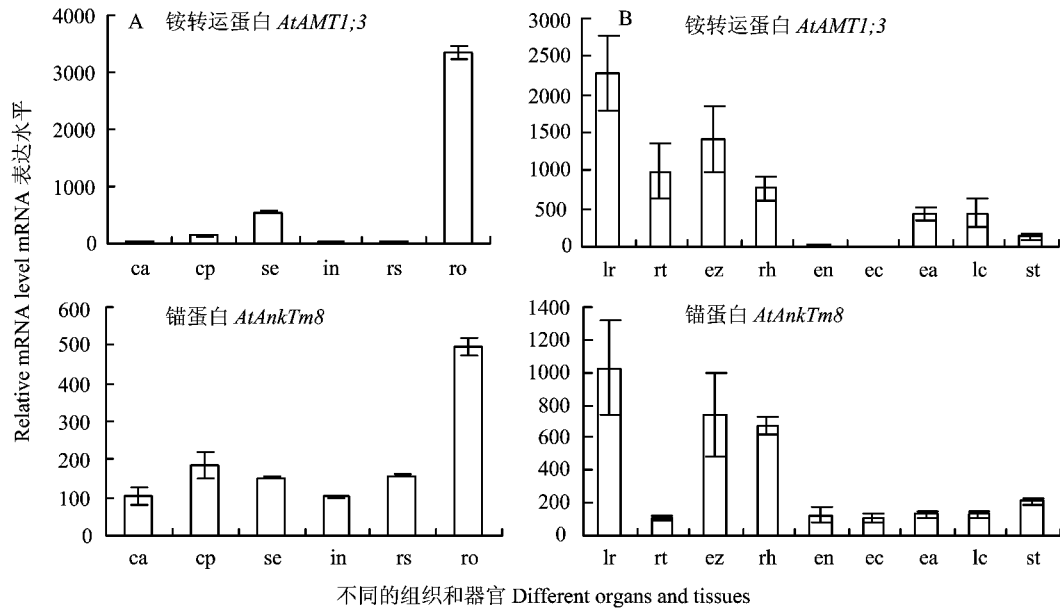


图2 拟南芥中 *AtAMT1;3* 与 *AtAnkTm8* 的器官和组织特异性表达模式

Fig. 2 Relative expression levels of *AtAMT1;3* and *AtAnkTm8* in different organs and tissues of *Arabidopsis*

[注 (Note): A—*AtAMT1;3* 与 *AtAnkTm8* 在拟南芥不同器官和组织中的表达水平 Relative expression levels of *AtAMT1;3* and *AtAnkTm8* in different organs and tissues of *Arabidopsis*; B—*AtAMT1;3* 与 *AtAnkTm8* 在拟南芥根不同组织中表达水平 Relative expression levels of *AtAMT1;3* and *AtAnkTm8* in different tissues of *Arabidopsis* roots. ca—愈伤组织 Callus; cp—初生分生组织 Cell culture/primary cell; se—幼苗 Seedling; in—花序 Inflorescence; rs—莲座叶 Rosette; ro—根 Roots; lr—侧根 Lateral root; rt—根尖 Root tip; ez—伸长区 Elongation zone; rh—根毛区 Root hair zone; en—内皮层 Endodermis; ec—内皮层 + 皮层 Endodermis + Cortex; ea—根毛 Epididymal atrichoblasts; lc—侧根尖 Lateral root cap; st—中柱 Stele.]

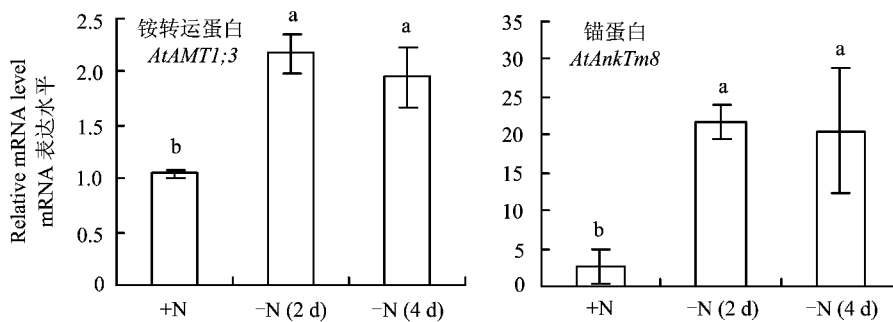


图3 缺氮胁迫下拟南芥根中 *AtAMT1;3* 与 *AtAnkTm8* 基因的表达

Fig. 3 Relative expression levels of *AtAMT1;3* and *AtAnkTm8* in *Arabidopsis* roots under nitrogen deficient conditions

[注 (Note): 柱上不同字母表示差异达 $P < 0.1\%$ 显著水平 Different letters indicate the significant differences with each treatment at $P < 0.1\%$ level.]

2.3 拟南芥 *AtAnkTm8* 缺失突变体纯合体筛选与分子鉴定

为了研究 *AtAnkTm8* 基因是否参与了根系铵吸收调控,利用双引物法筛选到了 *AtAnkTm8* 纯合缺失突变体,并对其进行了分子鉴定。

双引物法 PCR 产物鉴定结果如图 4A、B 所示,野生型拟南芥 (*Col-0*) 用基因特异性引物 LP-RP 进行扩增可以得到特异性扩增条带,大小约为 1000 bp,而用 T-DNA 特异性引物 LB1.3-RP 进行扩增没有产物。在 T-DNA 插入突变系 (057432) 群体中 (图 4A),1、3 号植株用引物 LP-RP 进行扩增没有产

物,而用 LB1.3-RP 进行扩增可以得到扩增条带,大小约为 500 ~ 600 bp,说明 1、3 号植株为 *AtAnkTm8* 纯合缺失突变体。在 T-DNA 插入突变系 (088794) 群体中 (图 4B),1 ~ 6 号植株用引物 LP-RP 进行扩增没有产物,而用 LB1.3-RP 进行扩增可以得到扩增条带,大小约为 500 ~ 600 bp,说明 1 ~ 6 号植株均为 *AtAnkTm8* 纯合缺失突变体。

为了确定 *AtAnkTm8* 纯合缺失突变体植株没有 *AtAnkTm8* 的表达,分别从 *AtAnkTm8* 基因转录水平对 T-DNA 插入突变系 (057432 和 088794) 的纯合缺失突变体进行了 RT-PCR 鉴定 (图 5)。结果显示,

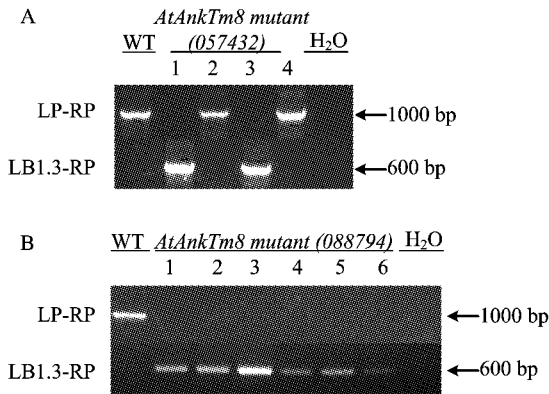


图4 拟南芥锚蛋白基因 *AtAnkTm8* 缺失突变系纯合子筛选

Fig. 4 Isolation of *AtAnkTm8* T-DNA insertion lines in *Arabidopsis*

[注 (Note): A—T-DNA 插入突变系 (057432) 纯合子筛选 Isolation of *AtAnkTm8* T-DNA insertion homozygotes in line 057432; B—T-DNA 插入突变系 (088794) 纯合子筛选 Isolation of *AtAnkTm8* T-DNA insertion homozygotes in line 088794; WT—野生型 Wild type.]

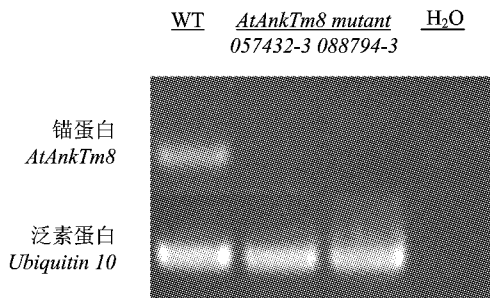


图5 拟南芥锚蛋白基因 *AtAnkTm8* 缺失突变纯合体的 RT-PCR 鉴定

Fig. 5 Characterization of *Arabidopsis AtAnkTm8* T-DNA insertion lines by RT-PCR

[注 (Note): WT—野生型 Wild type]

野生型 (WT, wild type) 拟南芥的营养体可扩增出预计大小的 *AtAnkTm8* 片段 (扩增片段长度为 180 bp); T-DNA 插入突变系 (057432 和 088794) 的纯合缺失突变体的材料均无表达产物。

2.4 *AtAnkTm8* 纯合缺失突变体植株对其铵转运活性的影响

为了研究 *AtAnkTm8* 的缺失是否影响植物根系铵吸收功能,对 *AtAnkTm8* 纯合缺失突变体进行铵作为唯一氮源条件下的生长试验,供硝酸盐处理作为实验对照。如图 6 所示,硝酸盐和铵盐生长条件下,*AtAnkTm8* T-DNA 插入突变系 (057432 和 088794) 的纯合缺失突变体与野生型地上部鲜重没有明显差异。

MeA 是铵的类似物,可以被 AMT 蛋白转运,由

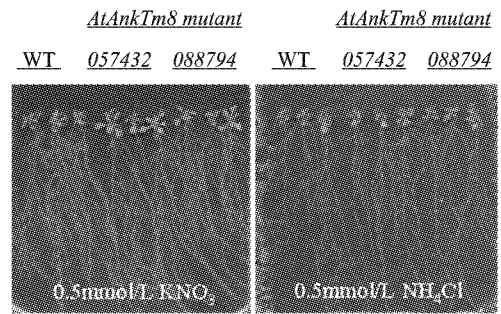


图6 锚蛋白基因 *AtAnkTm8* 缺失突变体在供铵条件下的生长表型

Fig. 6 The growth phenotype of *AtAnkTm8* T-DNA insertion lines in ammonium as sole nitrogen source

[注 (Note): 上图为生长表型,下图为地上部鲜重 ($n = 3 \sim 4$) The upper panel represents the growth phenotype and the lower panel for shoot fresh weights ($n = 3 \sim 4$); WT—野生型 Wild type; 柱上不同字母表示差异达 $P < 0.1\%$ 显著水平 Different letters indicate the significant differences with each treatment at $P < 0.1\%$ level.]

于 MeA 对植物有毒害作用,因此植物生长对 MeA 的敏感性能更灵敏地反映植物吸收铵的能力。对 *AtAnkTm8* 纯合突变体表型试验发现:在 MeA 处理表型试验中 (图 7),野生型植物 (WT) 在 MeA 培养基上生长受到抑制,地上部鲜重明显下降。*AtAnkTm8* T-DNA 插入突变系纯合缺失突变体也对 MeA 敏感,同样出现了生长受到抑制,地上部鲜重明显下降的现象。供铵处理和 MeA 敏感性表型试验的结果说明了 *AtAnkTm8* 的缺失没有影响到植物根系铵的转运能力。

3 讨论

铵作为氮源被植物吸收,但过量的铵对细胞有毒害作用,所以铵在根中的跨膜运输需要被严格调控。为了满足生长需求,植物氮素吸收需在多个层面上被严格调控,其中蛋白水平上的调控更加快速有效^[4-5,9]。目前有一些间接证据表明 AMT 可能存在蛋白水平上的调控,如 Rawat 等^[9]在对缺氮胁迫下的拟南芥根恢复供氮时,发现铵吸收能力较

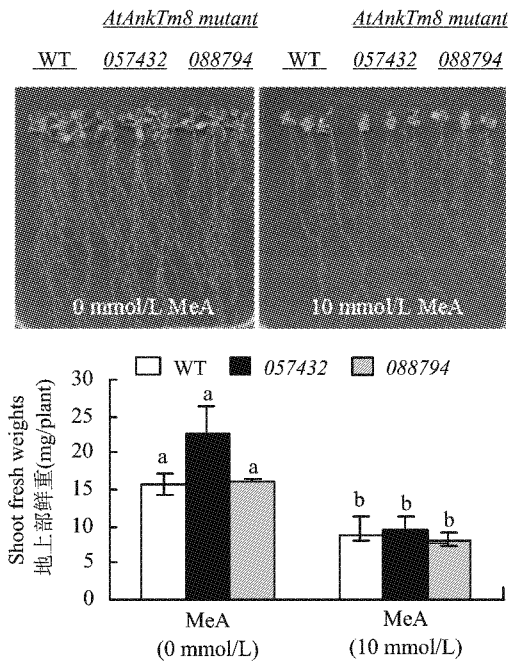


图7 锚蛋白基因 *AtAnkTm8* 缺失突变体对甲基铵的敏感性

Fig. 7 The growth phenotype of *AtAnkTm8* T-DNA insertion lines under supply of MeA

[注 (Note): 上图为生长表型, 下图为地上部鲜重 ($n=3\sim4$) The upper panel represents the growth phenotype and the lower panel for shoot fresh weights ($n=3\sim4$); WT—野生型 Wild type; 柱上不同字母表示差异达 $P < 0.1\%$ 显著水平 Different letters indicate the significant differences with each treatment at $P < 0.1\%$ level.]

AMT1;1 转录本水平被抑制得更快, 从而推测可能存在着蛋白水平上的调控。

蛋白质互作是蛋白水平调控研究的重点。利用生物信息学手段来研究蛋白质相互作用具有巨大优势, 主要包括蛋白质相互作用网络的绘制与显示、拓扑结构分析、结构模块的研究及比对等。多个蛋白互作的数据库分析得出存在蛋白互作的蛋白之间存在基因表达模式一致、生理学功能交叉、细胞信号转导途径相通、蛋白定位相同等特征^[11-13]。本研究利用生物信息学数据筛选到了可能与铵转运蛋白 AMT1;3 互作的锚蛋白 *AtAnkTm8*。*AtAnkTm8* 是 Ankyrin repeat (ANK) 家族的一个成员。ANK 蛋白分布于多种组织细胞^[14], 由重复序列结构域构成^[15], 主要生物功能是介导蛋白与蛋白之间的相互作用^[16]。人们对于 ANK 蛋白的功能研究主要集中在动物中, 作为细胞内重要的连接蛋白, ANK 蛋白可直接将膜蛋白锚定在细胞骨架蛋白网络上, 同时介导膜蛋白与其他细胞蛋白之间的相互作用, 比如与细胞骨架蛋白^[17]、细胞黏附分子^[18]、蛋白激酶

C^[19]、兰尼碱受体^[20]、电压门控钠通道^[21]等。拟南芥 ANK 蛋白分为 16 个家族, 其中 *AtAnkTm* 亚家族编码 40 个基因^[15]。对植物内 ANK 蛋白的功能研究很少, 仅在植物防御^[22]和发育过程^[23]中有所报道。

根是植物吸收养分的主要器官。负责吸铵功能的 *AtAMT1;3* 主要是在根部表达^[7], *AtAnkTm8* 也在根中特异性表达, 与 *AtAMT1;3* 一致。并且 *AtAnkTm8* 与 *AtAMT1;3* 都在铵吸收的主要部位 (伸长区和根毛区) 的表达量高, 预示了 *AtAnkTm8* 可能与铵吸收有关, 而这种相关是通过与 *AtAMT1;3* 的互作完成的。Gazzarrini 等 1999 年发现, 拟南芥中铵转运蛋白基因受缺氮诱导, 其表达量与吸收能力的变化一致^[4]。本研究也发现缺氮胁迫条件下 *AtAMT1;3* 表达量增高, 并且 *AtAnkTm8* 的表达量同样受缺氮诱导增高。*AtAMT1;3* 与 *AtAnkTm8* 在根中的组织特异性表达一致并都受到缺氮诱导, 支持了它们之间互作的可能性。

为了获得 *AtAnkTm8* 参与植物根铵吸收调控过程的遗传学证据, 我们利用反向遗传学策略分离得到了 *AtAnkTm8* 的缺失突变体。对 *AtAnkTm8* 缺失突变体进行供铵处理和 MeA 敏感性表型实验发现, *AtAnkTm8* 的缺失没有影响植物铵的吸收能力。*AtAnkTm* 亚家族中有 8 个同源基因与 *AtAnkTm8* 非常相似, 并且其中 7 个基因在染色体上成串存在^[15]。由于进化上非常保守, *AtAnkTm* 亚家族中其他成员也可能与 *AtAMT1;3* 发生互作, 所以使得 *AtAnkTm8* 基因缺失造成的影响得到功能补偿。所以还有待于通过构建多缺失突变体来解决遗传冗余问题, 及进一步通过酵母双杂交和双分子荧光互补等体外互作技术来进一步明确 *AtAnkTm* 是否与 *AtAMT1;3* 存在互作, 以何种方式参与铵吸收调控的分子机制。

综上所述, 本研究通过生物信息学和基因表达分析推测铵转运蛋白 *AtAMT1;3* 可能和锚蛋白 *AtAnkTm8* 存在互作, 为理解植物铵吸收调控过程提供了可能的新颖机制。

参考文献:

- [1] Marschner H. Mineral nutrition of higher plants [M]. London, UK: Academic Press, 1995.
- [2] Wang M Y, Siddiqi M Y, Ruth T J *et al.* Ammonium uptake by rice roots (II. Kinetics of $^{13}\text{NH}_4^+$ influx across the plasmalemma) [J]. Plant Physiol., 1993, 103(4): 1259-1267.
- [3] Kronzucker H J, Siddiqi M Y, Glass A. Kinetics of NH_4^+ influx in

- Spruce[J]. *Plant Physiol.*, 1996, 110(3): 773–779.
- [4] 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]. *Plant Cell*, 1999, 11(5): 937–947.
- [5] Kaiser B N, Rawat S R, Siddiqi M Y *et al.* Functional analysis of an *Arabidopsis* T-DNA “knockout” of the high-affinity NH_4^+ transporter AtAMT1; 1[J]. *Plant Physiol.*, 2002, 130(3): 1263–1275.
- [6] Loque D, Yuan L, 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 J.*, 2006, 48(4): 522–534.
- [7] Yuan L, 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]. *Plant Cell*, 2007, 19(8): 2636–2652.
- [8] Loque D, von Wiren N. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots[J]. *J. Exp. Bot.*, 2004, 55(401): 1293–1305.
- [9] Rawat S R, Silim S N, Kronzucker H J *et al.* AtAMT1 gene expression and NH_4^+ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels[J]. *Plant J.*, 1999, 19(2): 143–152.
- [10] Sohet F, Colin Y, Genetet S *et al.* Phosphorylation and ankyrin-G binding of the C-terminal domain regulate targeting and function of the ammonium transporter RhBG[J]. *J. Biol. Chem.*, 2008, 283(39): 26557–26567.
- [11] Mrowka R, Patzak A, Herzel H. Is there a bias in proteome research? [J]. *Gen. Res.*, 2001, 11(12): 1971–1973.
- [12] Deane C M, Salwinski L, Xenarios I *et al.* Protein interactions: two methods for assessment of the reliability of high throughput observations[J]. *Mol. Cell. Proteom.*, 2002, 1(5): 349–356.
- [13] Mewes H W, Frishman D, Mayer K F *et al.* MIPS: analysis and annotation of proteins from whole genomes in 2005[J]. *Nucl. Acids Res.*, 2006, 34: 169–172.
- [14] Sedgwick S G, Smerdon S J. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework[J]. *Trends Biochem. Sci.*, 1999, 24(8): 311–316.
- [15] Becerra C, Jahrmann T, Puigdomenech P, Vicient C M. Ankyrin repeat-containing proteins in *Arabidopsis*: characterization of a novel and abundant group of genes coding ankyrin-transmembrane proteins[J]. *Gene*, 2004, 340(1): 111–121.
- [16] Li J, Ji C, Zheng H *et al.* Molecular cloning and characterization of a novel human gene containing 4 ankyrin repeat domains[J]. *Cell Mol. Biol. Lett.*, 2005, 10(1): 185–193.
- [17] Song A H, Wang D, Chen G *et al.* A selective filter for cytoplasmic transport at the axon initial segment[J]. *Cell*, 2009, 136(6): 1148–1160.
- [18] Dubreuil R R, MacVicar G, Dissanayake S *et al.* Neuroglian-mediated cell adhesion induces assembly of the membrane skeleton at cell contact sites[J]. *J. Cell. Biol.*, 1996, 133(3): 647–655.
- [19] Brechet A, Fache M P, Brachet A *et al.* Protein kinase CK2 contributes to the organization of sodium channels in axonal membranes by regulating their interactions with ankyrin G[J]. *J. Cell Biol.*, 2008, 183(6): 1101–1114.
- [20] Bourguignon L Y, Chu A, Jin H, Brandt N R. Ryanodine receptor-ankyrin interaction regulates internal Ca^{2+} release in mouse T-lymphoma cells[J]. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270(30): 17917–17922.
- [21] Malhotra J D, Kazen-Gillespie K, Hortsch M, Isom L L. Sodium channel beta subunits mediate homophilic cell adhesion and recruit ankyrin to points of cell-cell contact[J]. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275(15): 11383–11388.
- [22] Yan J, Wang J, Zhang H. An ankyrin repeat-containing protein plays a role in both disease resistance and antioxidation metabolism[J]. *Plant J.*, 2002, 29(2): 193–202.
- [23] Zhang H, Scheirer D C, Fowle W H, Goodman H M. Expression of antisense or sense RNA of an ankyrin repeat-containing gene blocks chloroplast differentiation in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 1992, 4(12): 1575–1588.