

膜泡相关蛋白 OsSEC27P 增强缺铁转基因烟草根的 H⁺ 分泌

杨光^{①*}, 古丽·巴哈尔·阿巴拜克力^{①*}, 马峰^①, 闫莉婕^①, 王怡^①, 冯长庚^①, 李鹏^①, 许越^③, 赵伟忠^{②†}, 印莉萍^{①†}

① 首都师范大学生命科学学院, 北京 100048;

② 首都师范大学数学学院, 北京 100048;

③ 旭月(北京)科学技术有限公司, 北京 100080

* 同等贡献

† 联系人, E-mail: zhaowz100@163.com; yinlp@cnu.edu.cn

2009-06-01 收稿, 2009-10-13 接受

国家自然科学基金(批准号: 30971856)和北京市自然科学基金 B 类重点项目(编号: KZ200710028013)资助

摘要 铁是植物必需的微量元素. 除了铁的吸收机理 I 和机理 II 外, 膜泡运输过程参与铁吸收及铁稳态的维持也有所报道. 报道了一个新的膜泡(vesicle)相关基因 *OsSEC27P*, 并对其功能进行了分析. 基因芯片和实时定量 PCR 证明, *OsSEC27P* 受缺铁条件诱导上调表达. 在转基因烟草悬浮细胞 BY-2 中表达的 *OsSEC27P*-GFP 融合蛋白和 FM4-64 共定位, 证明 *OsSEC27P* 蛋白主要集中于细胞内的膜泡中. *OsSEC27P* 过量表达的转基因烟草液体培养基的 pH 明显下降, 通过离子选择性电极扫描技术(SIET), 证明是小苗根部缺铁响应的质子分泌显著加强所致. 综上所述, 膜泡相关蛋白 *OsSEC27P* 在缺铁条件下, 对增强根的 H⁺ 释放起着重要的作用.

关键词

水稻
OsSEC27P
缺铁
膜泡
H⁺外流
离子选择性扫描微
电极技术(SIET)

饥饿每天夺走约 20000 名儿童的生命, 全世界三分之一的儿童仍处于营养不良、体重不足的状态, 因此提高主要农作物营养价值刻不容缓^[1]. Fe 是所有生命必需的微量元素. 作为多种酶的主要成分, 铁参与了电子传递链、呼吸链和光合作用等重要生命活动, 起到电子受体供体的功能. 尽管 Fe 在土壤中的含量较丰富(>6%), 但其通常以难溶的氢氧化铁形式存在, 难以被植物利用. 为提高铁的吸收, 植物进化出两种机制. 一种是基于还原机制的机理 I. 双子叶植物和非禾本科的单子叶植物利用此机制, 通过 H⁺-ATPase 分泌 H⁺酸化根际、通过 NADH/NADPH 还原酶(FROs)将 Fe³⁺还原成 Fe²⁺, 最后通过 Fe²⁺转运蛋白(IRTs)实现 Fe 离子的吸收^[2]. 另一种是基于螯合机制的机理 II. 禾本科的单子叶植物利用此机制; 它们向根际分

泌麦根酸(MA)家族化合物等高铁载体(PS), 结合 Fe³⁺形成 Fe³⁺-PS 螯合物(麦根酸 MA), 再通过根表面上的 Fe³⁺-PS 螯合物的转运蛋白(YSLs)来实现 Fe 离子的跨膜运输^[3]. 水稻属于机理 II 植物, 是分泌 MA 最少的禾本科植物^[4]. 近期研究表明, 水稻兼有两种机理的性能, 当它体内分泌的唯一一种 PS 脱氧麦根酸(DMA)受阻时, 就可以启动机理 I 的酸化还原系统应对缺铁环境^[5]. 除此之外, 在细胞内负责铁转运的基因^[6,7]和叶绿体膜上的铁转运基因不断涌现^[8,9]. 可见铁离子转运蛋白在植物的矿质营养中的作用非常重要, 而它们在细胞间、细胞器间转运铁离子的这一过程常常涉及到膜泡运输^[6].

Negishi 等人^[10]用含有 8987 个水稻 EST 的基因芯片检测大麦根部在缺铁胁迫下的表达谱, 通过

RNA 杂交分析表明, 缺铁诱导的基因中有 5 个膜泡相关基因表达模式呈昼夜周期性变化, 并与 MA 的分泌节律相关, 于是他们提出膜泡的极性运输参与了 MA 的分泌, 推测质膜附近的膜泡内包含有 Fe-MA 螯合物. 而 Yin 等人^[11]和 Li 等人^[12]发现, 含有铁转运蛋白 MxIRT1 的膜泡能够响应环境 Fe 浓度, 在内质网到质膜之间移动. 虽然上述膜泡功能有所不同, 但都说明了膜泡运输确实参与了植物缺铁响应的过程. 然而膜泡与土壤酸化作用间的关系却知之甚少.

H⁺的外排是铁吸收过程的重要步骤, 并且是一个连续的缓慢的过程. 离子选择性电极扫描技术 (SIET) 是一种以非损伤的方法获得离子或分子跨膜流动信息的新技术^[13-15]. 虽然部分这类信息有些可以通过膜片钳^[13]与荧光显微技术^[16]的方法来获得, 但 SIET 技术具有以上技术所没有的独特的空间及时间优势, 已经成为离子或分子跨膜蛋白功能研究中一种不可或缺的实用技术.

本研究在缺铁 5 d 的水稻根部克隆到了 *OsSEC2-7P* 基因, 并获得了过量表达的转基因植株. 采用激光共聚焦扫描显微技术来确定 *OsSEC27P-GFP* 融合蛋白的定位, 并通过 SIET 技术研究了在转基因烟草根毛中该蛋白与质子外排之间的关系.

1 材料与amp;方法

(i) 植物材料及培养方法. 水稻 (*Oryza sativa* L. cv. *Japonica*) 种子用 2% NaClO 处理 30 min, 置于湿润的滤纸上, 在 28℃ 黑暗条件下萌发. 萌发后的小苗在 25~30℃, 16 h 光照/8 h 黑暗条件下蒸馏水水培. 小苗生长至三叶期时分为两组, 分别在正常铁条件 (100 μmol/L EDTA-Fe, 以 +Fe 表示) 及缺铁 (不添加 EDTA-Fe, 以 -Fe 表示) 条件下培养, 每天用 1 mol/L HCl 调整培养液至 pH 5.0~6.0. 处理第 5 天分别从两组采集组织样品.

野生型与转基因烟草种子 (*Nicotiana tabacum* var. Samsun NN) 表面消毒后, 在含 3% 蔗糖的 MS 固体培养基上 25℃ 萌发, 在无菌, 25℃, 14 h 光照/10 h 黑暗条件下培养. 经过抗性筛选、PCR 检测后, 获得的 T₂ 代过表达植株用于后续实验.

野生型及转基因烟草悬浮系细胞 (Bright yellow 2, BY-2) 均在 NT 液体培养基 (改进 MS) 中, 黑暗, 120 r/min, 26℃ 条件下培养, 每 7 d 继代一次.

(ii) 实时定量 PCR. 以正常铁条件及缺铁条件

下培养 5 d 的水稻根为材料, 使用 RNA PCR Kit (TaKaRa, Japan) 提取总 RNA. 以总 RNA 为模板, 在 Rotor-Gene 3000 (Corbett Research) 系统上完成实时 PCR. 引物为 P1 (5'-TGTGAGCATGGCAATGTATG-3') 和 P2 (5'-AGGTAGCACCAGGTTGATCC-3'). 根据产品说明, 该程序分为两个阶段: 第一阶段, 30℃ 10 min, 42℃ 30~50 min, 95℃ 5 min, 4℃ 5 min 反转录过程; 第二阶段, 用 QuantiTect SYBR Green 来激活实时 PCR 的 HotStar Taq DNA 酶, 共 40 个循环 (94℃, 15 s, 60℃, 20 s, 72℃, 20 s. 以 18S RNA 作为实时定量的转录本内参.

(iii) 重组质粒的构建. *OsSEC27P* 基因的全长序列通过 RT-PCR 克隆得到, 并连接到 pMD18T 克隆载体进行测序. *OsSEC27P* 基因的可读框 (ORF) 区被克隆到 pCAMBIA1302 载体上构建成 CMV35s-*OsSEC27P::GFP*, 其中引物序列为 P3 (5'-GGCTCATGATGAGTAATGGCCACAGC-3') 和 P4 (5'-GTCAGTAGTCCAGAACCGGTCCTTGTTTC-3'). 将构建好的载体通过冻融法转入到农杆菌 EHA105 菌株中.

(iv) 植物的转化. 将含有 CMV35s-*OsSEC27P::GFP* 载体的农杆菌 EHA105 在 YEB 培养基中摇培, 达到 A₆₀₀ 0.4~0.5. 将洋葱表皮接到 MS 培养基上 25℃ 暗培养 1 d, 农杆菌侵染 40~60 min, 转至 100 μmol/L 乙酰丁香酮的 MS 平板上, 2 d 后, 检测 *OsSEC27P::GFP* 融合蛋白在洋葱表皮细胞中的表达情况. 取继代 3 d 的 BY-2 悬浮细胞, 加入 20 μmol/L 乙酰丁香酮, 与农杆菌在 28℃ 黑暗共培养 3 d, 经过头孢霉素的清洗, 再转至含有潮霉素 (20 mg/mL) 和头孢菌素 (300 mg/mL) 的 NT 固体培养基上进行筛选, 培养温度为 26℃. 2~3 周后阳性转化细胞可以形成细胞团.

(v) 荧光显微技术. 使用激光共聚焦扫描显微技术对转基因洋葱表皮细胞和 BY-2 细胞进行荧光检测. 激发光波长为 488 nm, 荧光检测波长为 505~520 nm. 洋葱表皮组织浸泡于碱性品红染液中 5~10 min 后再用超纯水冲洗完后进行观察. 烟草 BY-2 细胞在含有 FM4-64 的 NT 培养基中染色 15~45 min, 用超纯水冲洗, 最后进行观察.

(vi) PCR-斑点杂交. 用 PCR-斑点杂交技术鉴定了 8 个转基因烟草株系. 取转基因烟草和野生型烟草的新鲜嫩叶, 用 CTAB 法提取各株系基因组 DNA. PCR 中以 3 ng 基因组 DNA 为模板, 用 P3 和 P4 引物进行 30 个循环扩增, 条件为: 94℃, 30 s, 57℃, 40 s, 72℃, 20 s. 用 1% 琼脂糖电泳分离 PCR 产物. 采用手

提式基因芯片点样仪(Glass Slide Microarrayer VP 478, V&P Scientific), 将 PCR 产物点在尼龙膜上, 印记后, 利用紫外交联仪进行交联(CL-508.G, UVitec), 利用 *OsSEC27P* 为探针进行杂交, 对 X 光胶片进行曝光、显影和照相。其检测方法严格按试剂盒说明书操作(North2South[®] Biotin Random Prime DNA Labeling and Detection Kit)。

进行 RT-PCR 时, 从野生型和转基因小苗鲜嫩叶子中提取总 RNA, 1 μg RNA 作为 RT-PCR 的模板。用 P3 和 P4 引物扩增 cDNA 的条件如下: 30 个循环; 94℃, 30 s, 57℃, 40 s, 72℃, 20 s, 72℃延伸 10 min。产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳中检测。内标为烟草的肌动蛋白基因 *ACTIN*。引物为 Pactin1 (5'-CTATTCTCCGC TTTGGACTTGGCA-3') 和 Pactin2 (5'-AGGACCTCA G GACAACGGAAACG-3')。

(vii) SIET 检测 H⁺流。离子选择性电极扫描技术(SIET)(Xuyue (Beijing) Sci. & Tech Co. Ltd. Applicable Electronics, Inc., Sciencewares Inc. and Younger USA Corp.)是专门检测离子/分子流向和流速的选择性微电极技术^[17-19]。按照选择性微电极的采样规则在样品表面相距 15 μm 的检测点间振动^[15], 经计算后获得离子/分子的通量数据。质子选择性电极方法的具体步骤如下: 1.5 mm 直径的毛细管(TW150-4; World Precision Instruments, Inc.)先端开口拉制为直径 2 μm (P97; Sutter Instrument Co.), 毛细管用 *N,N*-二甲基三甲基硅胺(Fluka)在 140℃硅化 50 min, 用 pH 7.0 的 40 mmol/L KH₂PO₄ 和 15 mmol/L NaCl 从电极管后端充填满, 前端吸入 H⁺离子交换剂(LIX)。将氢离子选择性电极套入 Ag/AgCl 电极线基座(Xuyue (Beijing) Sci. & Tech Co. Ltd.)。其中的银电极丝需要在每次检测前进行氯化。参比电极是一个固体低渗透性电极(WPI)。氢电极在 pH 5.5 和 6.0 的校正液中标定, 其能斯特值应大于 56 mV。H⁺流基于 Fick 扩散定律, 通过在线软件 MageFlux[®] (Younger USA Corp. <http://youngerusa.com/mageflux>) 计算。H⁺流的方向由两方面决定: 电极相对样品的振动方向和计算出的氢离子流的正负。氢离子流检测数据是通过旭月(北京)科技有限公司的网站软件完成。

2 结果与讨论

2.1 *OsSEC27P* 在铁缺乏水稻根中上调表达

在前期实验中, 曾使用含有 10532 个 cDNA 的 EST 基因芯片检测水稻缺铁条件下基因的转录表达

情况^[11]。其中 203 个转录本为缺铁诱导上调基因, 其中包括一个 -Fe/+Fe 值为 8.205 的转录本。由于其 EST 序列与酵母的 *Sec27p* 具有相似性, 将该基因命名为 *OsSEC27P*。用常铁和缺铁分别处理 5 d 的水稻根为材料, 进行实时定量 PCR。结果表明, 缺铁条件下 *OsSEC27P* 的表达量上调约 6 倍(图 1(a))。由此证明, *OsSEC27P* 在转录水平的变化与芯片实验中获得的结果一致, 表明 *OsSEC27P* 是一个水稻根中的缺铁诱导上调基因。

2.2 *OsSEC27P* 基因的分离与序列分析

以 RT-PCR 获得的 cDNA 为模板, 用引物 P1 和 P2 扩增获得 1753 bp 的 *OsSEC27P* ORF。将其克隆到 pMD18-T 载体上测序。根据结果推测, 该基因编码 584 个氨基酸的多肽链, 包括一个信号锚定位点和一个跨膜结构域。NCBI BLAST 结果显示, 它位于水稻的染色体 II 上, 并且在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*), 水稻(*Oryza sativa*), 葡萄(*Vitis vinifera*), 白杨(*Populus trichocarpa*)中有 9 个相似的蛋白质序列。系统发生分析显示, 拟南芥的 3 个蛋白和水稻的 2 个蛋白与 *OsSEC27P* 具有较高的同源性(图 1(b)), 说明该基因

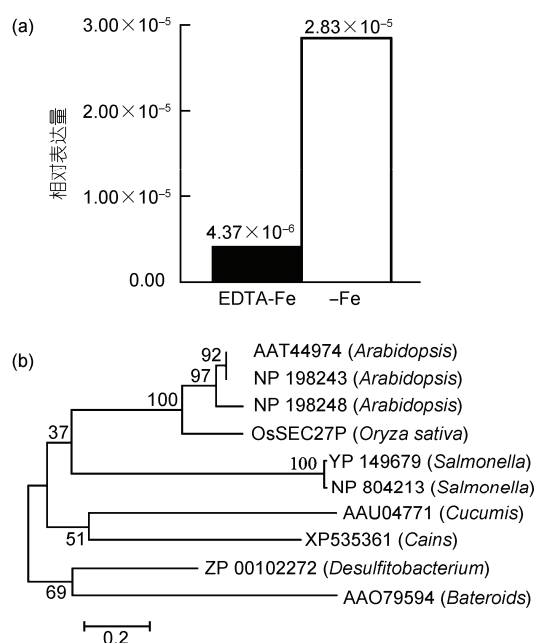


图1 *OsSEC27P* 的实时定量 PCR 和分子进化树分析 (a) *OsSEC27P* 的实时定量 PCR 结果。黑, +Fe 处理 5 d; 白, -Fe 处理 5 d。 (b) *OsSEC27P* 的分子进化树。采用 MEGA3 软件程序建立分子进化树

在禾本科植物和非禾本科植物中具有保守性. 然而, 以上这些相似蛋白质均为功能未知蛋白.

芯片和实时定量 PCR 的结果显示, *OsSEC27P* 的转录受到根部铁环境的调控, 推测其参与根细胞中的铁吸收和分配. 分子进化树的系统发生分析(图 1(b))表明, *OsSEC27P* 基因属于一个小型的功能不明的基因家族, 这些基因在水稻等机理 II 的禾本科植物和拟南芥及葡萄等机理 I 的非禾本科植物中高度保守. 加之它们缺铁上调表达, 说明 *OsSEC27P* 在这两种铁摄入方式不同的植物中可能参与相同的缺铁响应^[20].

2.3 *OsSEC27P* 在转基因烟草中的过表达分析

用农杆菌介导的叶盘法将 *OsSEC27P* 基因转到烟草中. 对转化后代进行潮霉素筛选, 用 PCR-dot-blot 方法检测出含有转基因标记潮霉素抗性的株系(图 2(a)). 用 RT-PCR 方法分析 *OsSEC27P* 基因的转录水平表达(图 2(b)). 通过激光扫描共聚焦荧光显微镜检测 *OsSEC27P*-GFP 蛋白水平表达, 图 2(c)显示在转基因植物的根细胞中检测到绿色荧光, 而野生型的烟草根中没有荧光. 稳定的转基因烟草株系被用来做进一步实验.

2.4 *OsSEC27P* 与根毛 H⁺分泌相关

水培野生型和转基因烟草苗分为两个处理: 常铁和缺铁. 定期对培养液 pH 进行测定(每周一次, 测定后再次将培养液的 pH 调到 5.8, 6 次重复). 根据 2 个月的观察和统计数据发现, 野生型烟草对缺铁反应较小, pH 从+Fe 的 5.40 降到 -Fe 的 5.02(表 1), 而转基因烟草培养液 pH 变化明显, 尤其是缺铁条件下 pH 发生显著变化, 从+Fe 的 5.20 降到 -Fe 的 3.96(表 1). 这些结果说明, 转基因烟草根可以分泌一些酸性物质以响应缺铁胁迫.

为进一步验证这一推测, 我们采用扫描离子选择电极技术^[14,15]检测根及根毛周围的质子流. 根尖的质子流差别不显著, 而在缺铁的条件下转基因烟草根毛与野生型相比有明显质子外流(图 3). 尽管野生型苗也能在铁缺乏的情况下分泌一些质子, 但其趋势不如转基因型苗强烈. 这些结果表明, *OsSEC27P* 基因的过表达可以增强根毛的 H⁺分泌.

植物通过分泌 H⁺或酸性小分子金属螯合物酸化其根周围的环境. 在这个实验中, 转基因烟草在缺铁的环境下其培养液的 pH 显著降低且转基因烟草根毛有显著的 H⁺外流. 由此我们证明转基因烟草根中 *OsSEC27P* 过表达导致的酸化主要是由于 H⁺的外流.

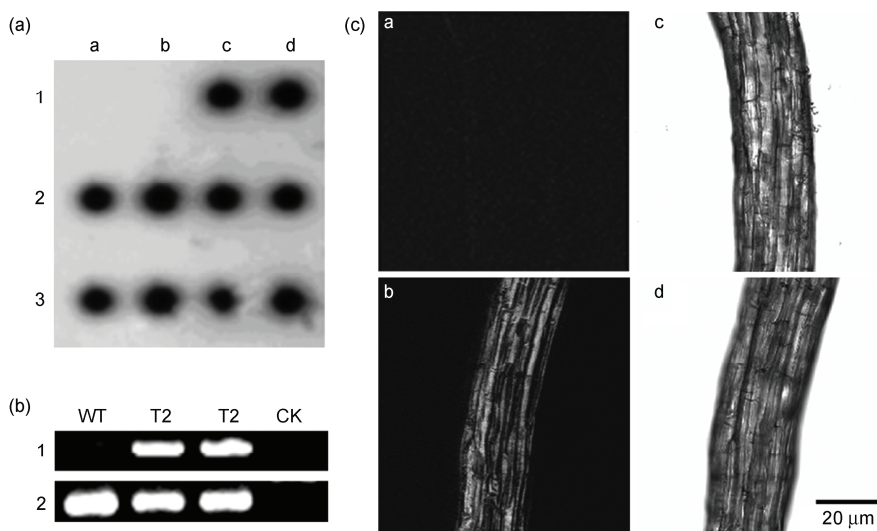


图 2 T2 代转基因烟草的鉴定

(a) T2 代转基因烟草系的 PCR-斑点杂交分析. a1, b1 为非转基因植株(负对照); c1, d1 为 *OsSEC27P* 质粒(正对照); a2, b2, c2, d2, a3, b3, c3, d3 为独立的转基因系. (b) T2 代转基因烟草系的 RT-PCR 分析. 由左至右模板分别为 WT (野生型烟草)、T2 (*OsSEC27P* 过表达 T2 代转基因烟草的两个独立的转基因系)、CK (H₂O). 1, *OsSEC27P* 检测条带; 2, *ACTIN*. (c) *OsSEC27P*-GFP 融合蛋白的观察. a 和 b 为野生型烟草根; c 和 d 为转基因烟草根; a 和 c 为 *OsSEC27P*-GFP 的荧光图像; b 和 d 为透射光图像

表 1 Fe 和+Fe 处理的野生型及 *OsSEC27P* 株系培养液的 pH

pH	野生型	<i>OsSEC27P</i> 株系
+Fe	5.40 ± 0.200	5.20 ± 0.520
-Fe	5.02 ± 0.596	3.96 ± 0.586

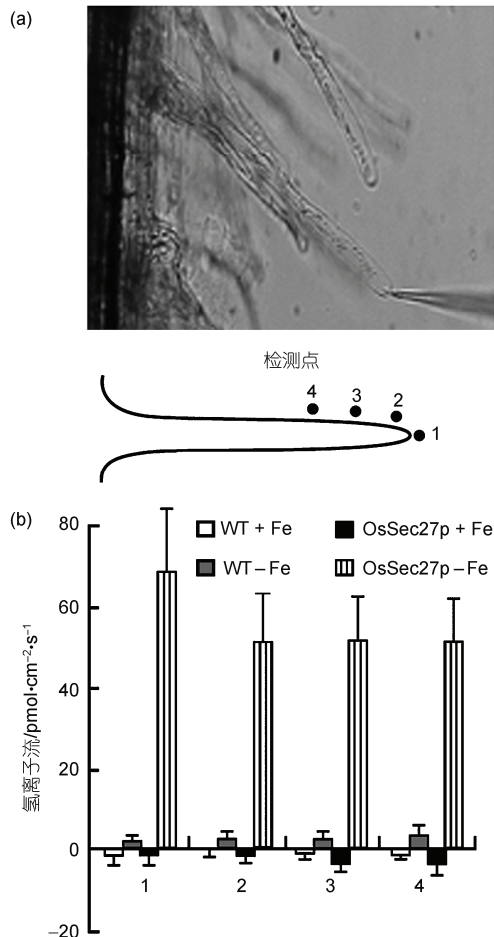


图 3 转基因烟草根毛的 H⁺流分析

(a) 烟草小苗根毛附近的 H⁺流, 确定测量位点的模式图, 微电极垂直于根的表面振动. (b) 野生型和转基因小苗根毛 H⁺流图. H⁺流值为 4 个独立植株根毛的平均, 带有标准差

2.5 *OsSEC27P* 与细胞质中的膜泡共定位

研究未知功能的新基因, 定位工作是必要的. 为确定 *OsSEC27P* 在细胞中的定位, 将 *OsSEC27P*-GFP 融合蛋白分别转化了洋葱表皮细胞和烟草 BY-2 悬浮细胞. 用激光扫描共聚焦显微镜观察, *OsSEC27P*-GFP 融合蛋白的荧光在洋葱表皮细胞(图 4(a))和 BY-2 悬浮细胞(图 4(b))中都出现在细胞质中的膜泡中; 而单独表达 GFP 的转基因细胞中, 整个细胞质

及细胞核中都显示荧光; 相反非转基因的细胞中没有检测到任何荧光(结果未显示). 为确定这些膜泡是属于内膜系统还是其他膜结构细胞器, 使用一种亲脂性的苯乙烯染料 FM4-64 作为内体的标记物^[16]. FM4-64 通过质膜的内吞作用内化, 可作为植物细胞内吞途径上各膜结构的标记物. 荧光观察结果中, 12 μmol/L FM4-64 孵育 15 min 后, 绿色荧光代表的 *OsSEC27P*-GFP 定位于细胞质膜泡上, 红色荧光代表 FM4-64 只标记了质膜(图 4(c)). 而孵育 45 min 后, *OsSEC27P*-GFP (绿色)和 FM4-64 (红色)共定位于膜泡上(图 4(d)). 这表明: (i) *OsSEC27P*-GFP 定位于内体膜泡, 而不是定位于大小类似的过氧化物酶体上; (ii) FM4-64 从细胞质膜到细胞质的膜泡或液泡的内化过程通常大于 30 min 左右, Lam 等人^[16]的工作同样支持这一观点. 用 1.5 mol/L NaCl 溶液进行的质壁分离实验排除了 *OsSEC27P* 定位在细胞壁上的可能(图 4(e)).

目前已在哺乳动物^[21]和酵母^[22]中发现了 3 种不同的膜泡衣被蛋白. 其一是同时涉及内吞途径及分泌(外排)途径膜泡的网格蛋白. 另外 2 种衣被蛋白分别是 COP I 和 COP II^[23]. COP I 由酵母中的 Arf1 (GTPase), Ret1, Ret2, Ret3, Sec21, Sec26, Sec27 组成^[24]. COP II 由 Sar1 (GTPase), Sec12, Sec23/24 和 Sec13/31 复合体组成. Sec23/24 和 Sec13/31 可以自我组装形成 COP II 的衣被^[25]. 这里要特别提到的是衣被蛋白的信号锚定位点这一特征. 例如, 植物细胞 COP I 中 COP α 和 COP β 的亚单位均具有信号锚定位点, 可以在识别 COP I 包含物信号 Lys-Lys-X-X (KKXX)中起到重要作用^[26]. 又如 COP II 中的 Sec24 亚单位的信号锚定位点, 具有识别双氨基酸信号 Asp-X-Glu 的功能. 与这些衣被蛋白类似, *OsSEC27P* 也具有信号锚定位点. 同时 *OsSEC27P* 还具有跨膜结构域, COP I 膜泡上的 ARF 受体和 COP II 膜泡上的 SEC12 也具有跨膜结构域.

虽然植物中与 *OsSEC27P* 具有同源性的 9 种蛋白的功能尚未确定, 但 *OsSEC27P* 在微阵列实验中的 EST 序列与酵母中 Sec27 的序列片段有相似性. 在酵母中, SEC27p 作为 COPI 的 β' -COP 衣被蛋白出现在从高尔基体转移到 ER 的逆向转运膜泡过程中^[22,24]. 而本研究结果, 尤其是洋葱表皮的定位结果表明, *OsSEC27P*-GFP 与细胞质膜附近的内体的标记物 FM4-64 共定位, 说明 *OsSEC27P* 可能不属于 COPI 膜泡衣被家

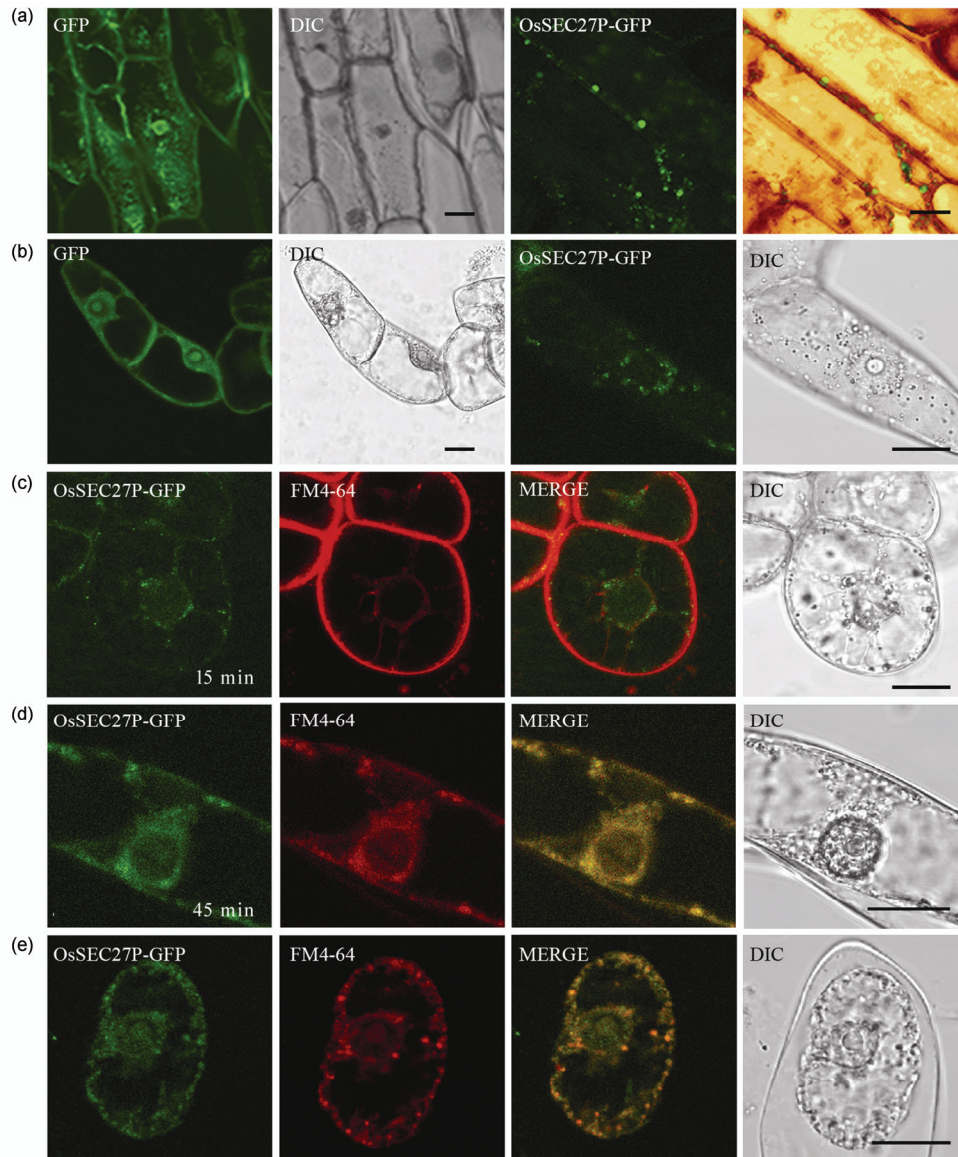


图4 OsSEC27P: GFP融合蛋白的亚细胞定位

(a) OsSEC27P-GFP 在洋葱表皮的激光共聚焦图像分析. 只有 GFP 的蛋白定位没有细胞专一性, 分布在细胞的各个部分, 而 OsSEC27P-GFP 则定位于细胞质中, MERGED 图肯定了 OsSEC27P-GFP 是定位在质膜附近的膜泡中. (b) OsSEC27P-GFP 在烟草悬浮细胞(BY-2)的激光共聚焦图像分析. 只有 GFP 的蛋白定位没有靶向专一性, 而 OsSEC27P-GFP 则定位于细胞质的膜泡中. (c) OsSEC27P-GFP 定位于细胞质的膜泡中. 用内体膜的标记膜染料 FM4-64 染色 15 min, 只有细胞质膜可以染红色. MERGED 图没有发现 OsSEC27P-GFP (绿色)和 FM4-64 (20 $\mu\text{mol/L}$, 红色) 可以共定位. (d) 细胞经 FM4-64 染色 45 min 后, 可以观察到细胞质膜和细胞质中的膜泡都被染上红色. MERGED 图显示 OsSEC27P-GFP 与 FM4-64 染色的膜泡可以共定位. (e) 用 1.5 mol/L NaCl 处理的质壁分离的 BY-2 细胞, 可见 OsSEC27P-GFP 定位于细胞质的膜泡中. MERGED 图显示 FM4-64 (20 $\mu\text{mol/L}$)染色 45 min 后, 大多数的 OsSEC27P-GFP 都与细胞质的红色膜泡共定位. DIC, 微分干涉图. 标尺示 20 μm

族的成员. 生物信息学预测, OsSEC27P 具有信号锚定位点和跨膜结构域及较大的分子量(图 2)都符合膜泡衣被的条件.

综上所述, OsSEC27P 是一个在缺铁条件下上调表达的新基因. 通过扫描离子选择电极技术发现过

量表达 OsSEC27P 可引起质子大量外排的生理功能. 亚细胞定位研究表明 OsSEC27P 与细胞质内内体膜泡共定位. 结合序列分析, 我们认为, OsSEC27P 可能作为衣被蛋白亚基通过加强根部质子分泌在铁的吸收过程中发挥作用.

参考文献

- 1 Guerinot M L, Yi Y. Iron: Nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiol*, 1994, 104: 815—820
- 2 Eide D, Broderius M, Fett J, et al. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 5624—5628
- 3 Curie C, Panaviene Z, Loulergue C. Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature*, 2001, 409: 346—349
- 4 Marschner H, von Blanckenburg F. Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *J Plant Nutr*, 1986, 9: 695—713
- 5 Yang X, Huang J, Jiang Y, et al. Cloning and functional identification of two members of the ZIP (Zrt, Irt-like protein) gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Biol Rep*, 2009, 36: 281—287
- 6 Lanquar V, Lelievre F, Bolte S. Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J*, 2005, 24: 4041—4051
- 7 Xiao H H, Yin L P, Xu X F. The iron-regulated transporter, MbNRAMP1, isolated from *Malus baccata* is involved in Fe, Mn and Cd trafficking. *Ann Bot*, 2008, 102: 881—889
- 8 Duy D, Wanner G, Meda A R, et al. PIC1, an ancient permease in *Arabidopsis* chloroplasts, mediates iron transport. *Plant Cell*, 2007, 19: 986—1006
- 9 Han J H, Song X F, Li P, et al. Maize ZmFDR3 localized in chloroplasts is involved in iron transport. *Sci China Ser C-Life Sci*, 2009, 52: 864—871
- 10 Negishi T, Nakanishi H, Yazaki J, et al. cDNA microarray analysis of gene expression during Fe-deficiency stress in barley suggests that polar transport of vesicles is implicated in phytosiderophore secretion in Fe-deficient barley roots. *Plant J*, 2002, 30: 83—94
- 11 Yin L P, Sun T, Li W. Transcripts and proteome analysis and membrane vesicle trafficking in rice roots under Fe-deficient condition. *Prog Nat Sci*, 2004, 14: 522—527
- 12 Li P, Qi J L, Wang L. Functional expression of MxIRT1, from *Malus xiaojinensis*, complements an iron uptake deficient yeast mutant for plasma membrane targeting via membrane vesicles trafficking process. *Plant Sci*, 2006, 171: 52—59
- 13 Cao Z S, Kang H G, Zou S B. Application of patch-clamp technique into the study of cell secretion. *Prog Biochem Biophys*, 1992, 19: 14—18
- 14 Sun T, Li P, Xu Y, et al. Non-invasive scanning ion-selective electrode technique and its applications into the research of higher plants. *Prog Nat Sci*, 2007, 17: 265—269
- 15 Xu Y, Sun T, Yin L P. Application of non-invasive microsensing system to simultaneously measure both H⁺ and O₂ fluxes around the pollen tube. *J Integr Plant Biol*, 2006, 48: 823—831
- 16 Lam S K, Siu C L, Hillmer S, et al. Rice SCAMP1 defines clathrin-coated, trans-golgi-located tubular-vesicular structures as an early endosome in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell*, 2007, 19: 296—319
- 17 Kuhlreiber W M, Jaffe L F. Detection of extracellular calcium gradients with a calcium-specific vibrating electrode. *J Cell Biol*, 1990, 110: 1565—1573
- 18 Kunkel J G, Cordeiro S, Xu Y, et al. The Use of Non-invasive Ion-selective Microelectrode Techniques for the Study of Plant Development: Plant Electrophysiology Theory and Methods. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2005
- 19 Reid B, Nuccitelli R, Zhao M. Non-invasive measurement of bioelectric currents with a vibrating probe. *Nat Protoc*, 2007, 2: 661—669
- 20 Walker E L, Connolly E L. Time to pump iron: Iron-deficiency-signaling mechanisms of higher plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2008, 11: 530—535
- 21 Waters M G, Serafini T, Rothman J E. 'Coatomer': A cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature*, 1991, 349: 248—251
- 22 Duden R, Hosobuchi M, Hamamoto S, et al. Yeast beta- and beta'-coat proteins (COP) two coatomer subunits essential for endoplasmic reticulum-to-Golgi protein traffic. *J Biol Chem*, 1994, 269: 24486—24495
- 23 Aridor M, Bannykh S I, Rowe T, et al. Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J Cell Biol*, 1995, 131: 875—893
- 24 Eugster A, Frigerio G, Dale M, et al. The alpha- and beta'-COP WD40 domains mediate cargo-selective interactions with distinct di-lysine motifs. *Mol Biol Cell*, 2004, 15: 1011—1023
- 25 Stagg S M, Gurkan C, Fowler D M, et al. Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. *Nature*, 2006, 439: 234—238
- 26 Pimpl P, Movafeghi A, Coughlan S, et al. *In situ* localization and in vitro induction of plant COPI-coated vesicles. *Plant Cell*, 2000, 12: 2219—2236