

苹果蔗糖载体蛋白MdsUT1多克隆抗体的制备及MdsUT1蛋白表达特异性分析

彭昌操, 肖文芳, 李文燕, 赵小兰*

华南农业大学林学院, 广东省森林植物种质创新与利用重点实验室, 热带亚热带林业生物技术实验室, 广州510642

摘要: 高等植物光合同化产物蔗糖的质外体运输主要是靠蔗糖载体蛋白来完成的。MdsUT1是从苹果果实中克隆的蔗糖载体家族基因, 本文将MdsUT1构建到酵母表达载体pMET α B中, 重组质粒转化毕赤酵母PMAD16经0.5%甲醇诱导后获得MdsUT1表达。纯化的MdsUT1异源表达蛋白免疫Balb/C小鼠制备多克隆抗体, 抗体特异性分析结果显示该抗体对酵母表达和苹果中的MdsUT1识别具有较高的特异性。免疫共沉淀实验结果也证明抗体能够应用于苹果果实中MdsUT1的功能分析。

关键词: 苹果; 蔗糖载体; 多克隆抗体; 蛋白质互作

Polyclonal Antibody Preparing and Specific Expression Analyzing of Sucrose Transporter MdsUT1 in Apple

PENG Chang-Cao, XIAO Wen-Fang, LI Wen-Yan, ZHAO Xiao-Lan*

Bio-technology Laboratory of Tropical and Subtropical Forestry, Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm, College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract: Apoplast transport of sucrose is mainly mediated by sucrose transporters in high plants. MdsUT1 is a member of sucrose transporter (SUT) family isolated from apple fruit. In this study, the cDNA of MdsUT1 was subcloned into pMET α B and the recombinant plasmid was used to transform the *Pichia methanolica* PMAD16. The fusion proteins induced by 0.5% methanol were used for standard immunization protocols in Balb/C mouse to prepare MdsUT1 polyclonal antibody. The affinity-purified antisera were evaluated by immunoblotting and shown to recognize MdsUT1 *in vivo* and *in vitro* specifically. Co-immunoprecipitation assay also confirmed that the prepared antisera were specific and reliable enough to be used to analyze the function of MdsUT1 in apple fruit.

Key words: apple (*Malus domestica* cv. Starkrimson); sucrose transporter; polyclonal antibody; protein-protein interaction

大多数高等植物光合作用的产物主要是蔗糖(Rolland等 2006)。在植物体内, 蔗糖的运输依赖于作为蔗糖分子载体的蔗糖载体蛋白(sucrose transporters, SUTs), 又称蔗糖-H⁺共转运蛋白(sucrose co-transporters, SUCs)。这是一类典型的膜结合蛋白分子, 广泛存在于高等植物的组织和细胞中, 能够利用细胞内外H⁺浓度梯度, 对蔗糖分子进行跨膜转运。根据氨基酸序列结构与特性分析, 蔗糖转运蛋白属于MFS (major facilitator superfamily)超家族中的一员, 它们的序列高度保守, 是高疏水性蛋白, 含有12个跨膜结构域, 中央面向细胞质的部分有一个大的胞质环, 将蛋白分为各含6个跨膜结构域的2个半区, 即前半区和后半区(彭昌操和赵小兰2010; 杨彩菊等2006)。

作为肉质果的苹果果实是贮存光合同化物蔗糖的主要库器官(Lalonde等1999; Patrick 1997; Oparka 1990), 而在果实发育过程中韧皮部光合同化物的卸载以质外体路径为主(Zhang等2004), 因此包括蔗糖载体在内的糖载体形成了一套有效的机制来提升库器官的糖吸收或者糖贮存的水平。一些蔗糖或单糖载体基因已经从葡萄(Vignault等

收稿 2010-10-15 修定 2011-01-27

资助 国家自然科学基金(30771759和30972388)、广东省自然科学基金团队项目(9351064201000002)、广东省自然科学基金重点项目(7118121)。

* 通讯作者(E-mail: xiaolanpeng@scau.edu.cn; Tel: 020-85280259)。

2005; Manning等2001; Ageorges等2000; Davies等1999; Fillion等1999)、酸樱桃(Gao等2003)和番茄(Hackel等2006; Gear等2000; Barker等2000; Weise等2000)的果实中克隆并鉴定。苹果山梨醇载体基因也陆续从叶片(Watari等2004)和果实(Gao等2005)中被克隆,但是有关苹果蔗糖载体的功能人们知之甚少。我们先前从苹果果实中克隆并鉴定了一个对蔗糖具有高亲和力($K_m=0.63 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)的蔗糖载体MdsUT1 (Fan等2009),它在韧皮部蔗糖的跨膜转运中起着关键性的作用,然而这种蔗糖载体在细胞中的定位机制以及调节功能并不清楚,这就需要来自不同动物免疫的特异性抗体作精确分析。同时,我们也证明了MdsUT1与苹果果实细胞色素b5蛋白(MdCyb5)存在体内互作,这同样需要多种抗体的体外实验加以综合印证。

由于蔗糖载体含有众多的跨膜结构域,不易在原核表达系统中纯化到基因全长表达的融合蛋白,现有的研究中大多采取原核表达其可溶性的中央胞质环片段来制备多克隆抗体(Fan等2009)。然而蔗糖载体的中央胞质环片段一般来说只有几十个氨基酸的长度,这可能会影响到抗体的免疫原性。因此,本研究构建了苹果蔗糖载体MdsUT1的酵母表达体系,表达并纯化了MdsUT1融合蛋白,且制备多克隆抗体,对多克隆抗体的特异性进行了检测,以期为苹果蔗糖载体的定位、功能以及蛋白质互作研究打下基础。

材料与amp;方法

1 材料

以北京西郊农场十年生苹果品种新红星(*Malus domestica* Borkh. cv. Starkrimson)为植物试材。酵母菌PMAD16 (*Pichia methanolica*) (*ade2-11pep4Δ prb1Δ*)购自Invitrogen公司。Cyb5抗体、V5抗体、AP (碱性磷酸酶)标记的各种二抗为SANTA公司产品。免疫用Balb/C小鼠由中国科学院遗传与发育生物学研究所提供。

2 方法

2.1 载体构建、重组质粒转化及诱导

根据已克隆的MdsUT1序列(GenBank登录号:AY445915)设计引物:PPMET5, 5'-cgctggatccCATGCCAGCTCCAGACACAGACC-3' (划线部分为

*Bam*HI酶切位点);PPMET3, 5'-gactactagtGTGACA-GCTCTGGGCTTAGGTGC-3' (划线部分为*Spe*I酶切位点)。将PCR产物构建到表达载体pMETαB (目的基因的3'端为融合表达的V5肽标签序列),pMETαB转化大肠杆菌DH5α菌株,将酶切鉴定正确的单克隆送交上海生工生物工程公司测序。

重组质粒pMETαB-MdsUT1经化学方法(LiCl法)转化酵母感受态细胞PMAD16,转化子在MD (Ade⁻)基本培养基上筛选。甲醇诱导表达按照Invitrogen公司*Pichia methanolica* Expression Kit使用说明进行。

2.2 融合蛋白纯化及小鼠免疫

采用ProBand 6-His亲和层析法纯化融合蛋白,具体参照Invitrogen公司*Pichia methanolica* Expression Kit使用说明。考马斯亮蓝G-250测定洗脱液浓度后进行SDS-PAGE和Western Blot分析。用上述纯化的融合蛋白免疫Balb/C小鼠,每次每只小鼠注射50~100 μg纯化的融合蛋白。首免时将纯化的融合蛋白与Freund完全佐剂按1:1混合乳化,背部多点皮内注射,注射卡介苗50 μL;二免与三免时将纯化的融合蛋白与Freund完全佐剂按1:1混合乳化,背部多点皮内注射;取耳部血液进行效价测定。三免后10 d尾部小量采血,用酶联免疫吸附测定(ELISA)方法测定血清效价,若血清效价合格,于四免后10 d眼部采血,取全血,每次免疫间隔期为10 d,免疫血清在4 °C下静置过夜,5 000×g离心10 min,取上清液待用。上述免疫小鼠过程于中国科学院遗传与发育生物学研究所进行。

2.3 微粒体的制备

苹果果肉微粒体的制备参照Zhang等(2001)的方法,略有改动。称取苹果果肉50 g,加入150 mL的研磨液[100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.5)、250 mmol·L⁻¹蔗糖、10 mmol·L⁻¹ MgCl₂、5 mmol·L⁻¹乙二胺四乙酸(EDTA)、10%甘油、0.2%巯基乙醇、1 mmol·L⁻¹苯甲基磺酰氟(PMSF)、5 mmol·L⁻¹维生素C、3.5%交联聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)、2 μg·mL⁻¹亮抑酶肽(leupeptin)、抑肽酶(aprotinin)、抑肽素(pepstatin A)]浸泡,待果肉变软后,放入组织破碎器中破碎成匀浆。4层纱布过滤,滤液进行10 000×g离心20 min,弃去沉淀,上清液100 000×g离心1 h,所得沉淀即为微粒体组分,上清液为可溶

性组分。沉淀用少量悬浮液[5 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.0)、1 mmol·L⁻¹二硫苏糖醇(DTT)、5 mmol·L⁻¹维生素C、0.5 mmol·L⁻¹ PMSF]悬浮,测定蛋白浓度后分装,液氮速冻后保存于-80 °C备用。以上实验均在4 °C下进行。按照Bradford (1976)的方法测定蛋白质含量,以牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白质。

2.4 抗血清效价的测定

用ELISA法测定抗血清的效价。蛋白经SDS-PAGE电泳后电转移至硝酸纤维素膜上(4 °C, 100 mA转移9 h),浸入10 mL封闭液(TBST) [TBS (10 mmol·L⁻¹ pH 7.5的Tris-HCl和150 mmol·L⁻¹ NaCl)+0.05% (V/V) Tween 20+3% (W/W) BSA, pH 7.5]中,在摇床上封闭2~3 h。按效价加入一抗(1:2 000)于10 mL TBST中,在摇床上轻摇2~3 h,使抗原和抗体发生免疫反应。用TBST1 [TBS+0.05% (V/V) Tween-20]洗膜3次,每次10 min。加入二抗(1:1 000,用TBST1进行稀释),室温轻摇2 h。TBST2 [50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.5)、150 mmol·L⁻¹ NaCl、0.1% Tween-20]洗膜3次,每次10 min。TBS洗膜2次,每次10 min。加入5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸盐/氯化硝基四氮唑蓝(BCIP/NBT)底物反应液,混匀后于黑暗中显色2~5 min至蛋白谱带出现,取出硝酸纤维素膜,置于重蒸水中终止反应,并清洗2~3次。苹果不同器官的Western Blot方法与以上方法相同。

2.5 体外免疫共沉淀实验

参照Li等(2002)的方法,略加修改。重悬苹果果实微粒体蛋白于膜溶解缓冲液中,4 °C下100 000×g离心30 min,上清加入30 μL Protein A Agrose和20 μL抗体(一抗),4 °C缓慢摇动过夜(8~10 h)。分别用Buffer A、Buffer B洗涤沉淀2次,12 000×g离心10 min,弃上清,沉淀用1×SDS Sample Buffer溶解并用相应的抗体作Western Blot分析。膜溶解缓冲液组分为:10 mmol·L⁻¹ Tris-Cl (pH 7.3)、150 mmol·L⁻¹ NaCl、1 mmol·L⁻¹ EDTA、1%甘油、0.1% Triton X-100、1 mmol·L⁻¹ PMSF、1 μg·mL⁻¹亮抑酶肽、10 μg·mL⁻¹抑肽酶、10 μg·mL⁻¹抑凝乳蛋白酶素(chymostatin)。Buffer A组分为:50 mmol·L⁻¹ Tris-Cl (pH 8.0)、150 mmol·L⁻¹ NaCl、0.1% Triton X-100; Buffer B组分为:50 mmol·L⁻¹ Tris-Cl (pH 8.0)、0.1% Triton X-100。

实验结果

1 *MdsUT1*在毕赤酵母细胞中的表达

1 497 bp的苹果蔗糖载体基因(*MdsUT1*)的开放阅读框(ORF)经RT-PCR扩增后,克隆到pMETαB酵母表达载体,重组质粒命名为pMETαB-*MdsUT1*。重组质粒pMETαB-*MdsUT1*转化酵母菌PMAD16,转化子在MD (Ade⁻)基本培养基上筛选,4~6 d长出白色单克隆(资料未列出)。随机挑选20个Ade⁺阳性酵母转化子进行甲醇诱导的蛋白小量表达,相应的空载体(pMETαB)转化子作为对照,从中筛选出甲醇快速利用型(Mut⁺)转基因菌株,用于后续的大量表达和蛋白纯化。SDS-PAGE检测蛋白小量表达的结果表明,30 °C培养条件下目标蛋白的表达量随着甲醇诱导时间的延长而增加,到第4天达到最大(图1-A)。在酵母表达菌株的培养基上清液中未检测到目的蛋白条带(资料未列出),说明目的蛋白只在胞内表达而没有分泌到胞外。因此后续

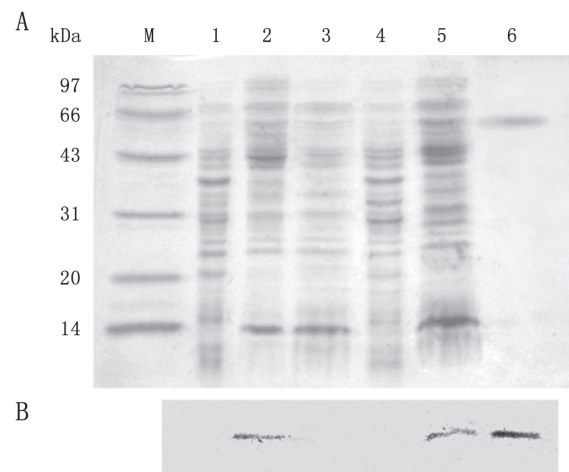


图1 甲醇诱导毕赤酵母表达*MdsUT1*蛋白的凝胶电泳(A)及其免疫(B)分析

Fig.1 SDS-PAGE (A) and Western Blot (B) analysis of *MdsUT1* expression induced by methanol in *P. methanolica*

M: 蛋白质分子量标准; 1: 空载体(pMETαB)转化子甲醇诱导0 d表达的总蛋白; 2: 阳性转化子甲醇诱导3 d表达的总蛋白; 3: 阳性转化子甲醇诱导2 d表达的总蛋白; 4: 空载体(pMETαB)转化子甲醇诱导4 d表达的总蛋白; 5: 阳性转化子甲醇诱导4 d表达的总蛋白; 6: 纯化的目的蛋白。蛋白表达受体菌株为酵母菌PMAD16,其基因型为 $ade2-11pep4\Delta prb1\Delta$,表现型为Ade⁺Mut⁺。表达蛋白用Invitrogen公司ProBond™纯化试剂盒纯化,融合蛋白C端的6-His蛋白与含Ni树脂结合。以融合蛋白尾部的抗V5抗体作Western Blot分析,每泳道上样总蛋白为20 μg。

取诱导表达的酵母细胞进行目标蛋白的提取和纯化。

2 融合蛋白的纯化

30 °C培养条件下经过4 d的甲醇诱导, 转*MdSUT1*酵母细胞总蛋白裂解液经过ProBand 6-His亲和层析法纯化到58 kDa的目标蛋白(图1-A)。利用融合表达标签V5肽的抗体进行Western Blot分析结果显示, 经过甲醇诱导3或4 d, 目标蛋白得到表达(图1-B), 而且蛋白分子量与纯化的目标蛋白一致。空载体对照无论是诱导前还是诱导后均未检测到信号。这说明图1-A中的纯化蛋白确实是目标蛋白MdSUT1。同时, 纯化的MdSUT1融合蛋白不能被PAS试剂染色(资料未列出), 说明该融合蛋白不是糖蛋白, 其免疫原性没有受到蛋白翻译过程中糖基化的影响, 可以直接进行动物免疫制备抗体。SDS-PAGE结果还显示, 得到的纯化蛋白纯度较高, 达到95%以上。纯化蛋白的浓度测定结果表明, 1 L菌体纯化得到的蛋白量约为200 μg。

3 MdSUT1多克隆抗体的特异性分析

经纯化的MdSUT1抗体(1:2 000)进行Western Blot分析的结果显示, MdSUT1抗体检测到苹果果实微粒体蛋白中大约为58 kDa的多肽, 其表观分子量大小与酵母表达纯化的MdSUT1基本一致(图2-A)。当抗体经过量的MdSUT1抗原(酵母表达后纯化)封闭后, Western Blot检测不到先前出现的58

kDa蛋白(图2-B), 而BSA则不能封闭MdSUT1抗体的识别反应(图2-C)。以上结果表明, MdSUT1抗体识别苹果蔗糖载体MdSUT1是特异的。

4 MdSUT1在苹果各器官中的表达特异性

我们之前的拟南芥原生质体瞬时表达亚细胞定位结果显示MdSUT1定位于细胞质膜上(Fan等2009)。于是我们提取了苹果不同器官的微粒体蛋白进行Western Blot分析, 检测结果表明, MdSUT1的表达在翻译水平表现出器官的特异性。从图3-A可以看到, MdSUT1在苹果果实发育的前期(花后30 d)和中后期(花后80 d)表达量较高, 中期(花后60 d)表达次之, 后期(花后110 d)较低。MdSUT1在枝条皮层、雄蕊、花瓣和叶片中均有表达, 相对而言, 叶片和枝条皮层中蛋白表达量较高, 暗示MdSUT1在叶片和韧皮部的运输中具有蔗糖转运功能; 然而在种子中未检测到MdSUT1的表达(图3-B)。

5 MdSUT1与MdCyb5的体外互作

我们曾经用膜蛋白酵母双杂交系统筛选到MdSUT1的互作蛋白MdCyb5 (Fan等2009)。为了进一步验证本研究制备的多克隆抗体是否可用于上述互作蛋白的体外实验分析, 我们开展了免疫共沉淀实验。实验发现, MdSUT1抗体的沉淀组分中能检测到MdCyb5 (图4-A); 反过来, MdCyb5抗体的沉淀组分中也能检测到MdSUT1 (图4-B)。

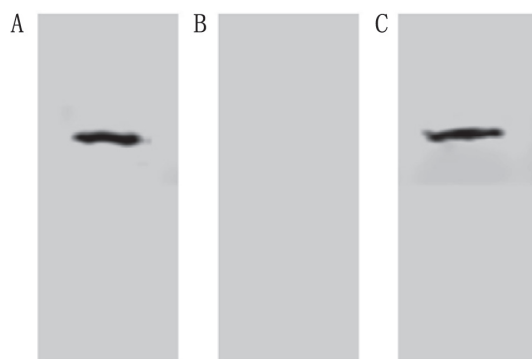


图2 MdSUT1抗体特异性分析

Fig.2 Specificity assay of the anti-MdSUT1 serum

A: MdSUT1抗血清识别苹果果实微粒体蛋白中的MdSUT1蛋白; B: MdSUT1抗血清经过量的MdSUT1蛋白封闭后消除了对苹果果实微粒体蛋白中MdSUT1的识别反应; C: 对照, BSA预温育MdSUT1抗血清不影响MdSUT1抗血清对苹果果实微粒体蛋白中MdSUT1的识别反应。所有泳道中样品均为苹果果实微粒体蛋白。

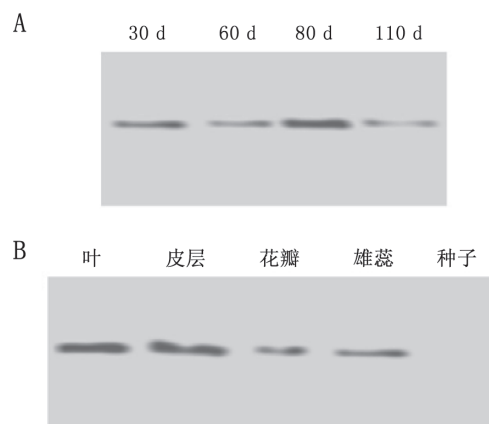


图3 MdSUT1在苹果器官中表达的特异性

Fig.3 Organ-specific expression pattern of MdSUT1 in apple

A: MdSUT1在果实发育不同时期的表达; B: MdSUT1在苹果不同器官中的表达。微粒体蛋白分别提取自盛花期后30、60、80、110 d的果实(A)以及不同器官(B)。蛋白经SDS-PAGE分离后转入NC膜, 再用MdSUT1抗体作免疫印迹分析, 总蛋白上样量24 μg。

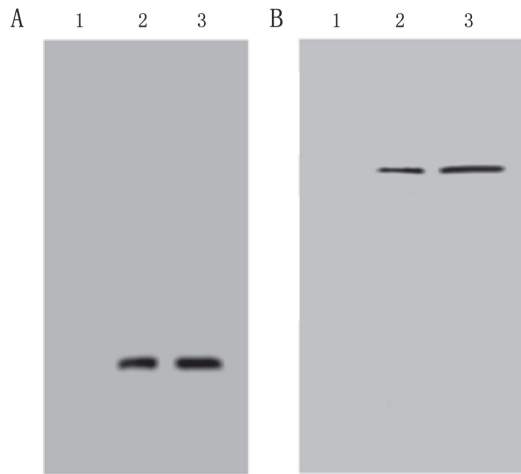


图4 免疫共沉淀检测苹果果实中MdsUT1与Mdcyb5互作
Fig.4 Detection of interaction between MdsUT1 and Mdcyb5 by co-immunoprecipitating assays in apple fruit

A: MdsUT1抗体(抗鼠)免疫沉淀Mdcyb5蛋白, Cyb5抗体用作免疫印迹分析。1: 免疫前血清免疫沉淀苹果果实总蛋白; 2: 总蛋白中Mdcyb5免疫印迹; 3: MdsUT1抗体免疫沉淀苹果果实总蛋白。B: Cyb5抗体(抗羊)免疫沉淀MdsUT1蛋白, MdsUT1抗体用作免疫印迹分析。1: 免疫前血清免疫沉淀苹果果实微粒体蛋白; 2: 微粒体蛋白中MdsUT1免疫印迹; 3: Cyb5抗体免疫沉淀苹果果实微粒体蛋白。

MdsUT1与Mdcyb5的免疫共沉淀结果佐证了MdsUT1与Mdcyb5体内蛋白互作的结果。这从另一个方面说明本研究所制备的多克隆抗体对识别苹果果实MdsUT1蛋白有较高的专一性。

讨 论

据统计, 植物基因组中有20%~30%的基因编码膜蛋白, 这显示了膜蛋白在植物体中的重要性(Krogh等2001)。膜蛋白虽然具有重要的功能, 然而天然蛋白的分离纯化极其困难, 难以满足其功能研究的需要(Fleishman等2006)。所以, 体外重组表达和纯化膜蛋白成为最重要的方法和手段。膜蛋白在细胞内的表达是一个十分复杂的生化过程, 其中有两个环节至关重要, 其一是核糖体上翻译的多肽只有正确折叠后才能进入高尔基体(Ellgaard等1999), 而那些未被正确折叠的蛋白质则被细胞降解(Meusser等2005; Tsai等2002); 其二是膜蛋白被定位于质膜之前必须经过蛋白质磷酸化等翻译后修饰环节(Coughlan等2004)。因此, 体外重组表达膜蛋白常常表现为表达量低或对宿主细胞

产生毒性而导致宿主细胞死亡。本研究中所表达的MdsUT1是一个具有12个跨膜结构域的膜蛋白, 从理论上讲要获得正确的定位和大量表达是很困难的。尽管我们试图优化酵母细胞的表达条件, 但所获得的表达量仍然很低, 每升培养基能纯化到目的蛋白200~300 μg 。实验中我们还碰到表达不稳定的问题, 即某一批培养细胞能纯化到目的蛋白, 而同样的条件下有时纯化到的目的蛋白很少或几乎没有。这可能是酵母细胞翻译过程中的后内质网质量控制体系(Coughlan等2004)使得未正确折叠蛋白质降解的缘故。

目前, 使用酵母表达系统表达的重组跨膜蛋白来免疫动物制备抗体是一种行之有效的方法。本研究将MdsUT1构建到真核表达载体pMET α B中, 经甲醇诱导酵母表达后纯化到表达的融合蛋白, 并制备了效价(1:3 000)和特异性较高的多克隆抗体。经检测抗体的特异性与我们先前报道的MdsUT1中央胞质环片段MdsUT1^{CL}(可溶性, 原核表达)免疫兔获得的抗体相当(Fan等2009), 这说明本研究所制备的抗体适宜于开展MdsUT1的免疫定位和表达模式的研究。苹果蔗糖载体MdsUT1的时空表达在翻译水平表现出器官的差异性。一方面, 苹果果实发育的前期(花后30 d)和中后期(花后80 d)表达量较高, 中期(花后60 d)表达次之, 后期(花后110 d)则较低。这可能同果实的发育进程相关, 果实发育的前期和中后期是体积和重量增加的关键时期, 胞内需要大量蔗糖的积累, 果实接近成熟的后期, 因胞内糖分积累已达到相当水平, 糖的转运速率减缓。因为苹果果实同化物的卸出主要是靠质外体途径(Zhang等2004), 这必然涉及到负责包括蔗糖在内的糖分跨膜转运的糖载体。在果实发育中后期有大量的蔗糖需要从胞外转运到胞内贮存或转化(Zhang和Wang 2002), 而韧皮部组织同周围薄壁组织间空间上又存在着共质体隔离(Zhang等2004), 所以需要蔗糖载体的大量表达来完成蔗糖的卸载和跨膜转运。在果实发育后期胞外蔗糖浓度相对较低, 因而蔗糖载体的表达量也相对较低。另一方面, MdsUT1在枝条皮层、雄蕊、花瓣和叶片中均有表达, 而成熟的种子中未见表达。枝条皮层中MdsUT1蛋白表达量高, 说明MdsUT1在韧皮部的运输过程中亦行使功能。种

子成熟后各种贮藏物质相对稳定,不涉及到蔗糖的转运,故而MdSUT1不表达。事实上,许多实验证明蔗糖载体可同时在库/源的不同器官中表达,如马铃薯中负责同化物装载的蔗糖转运蛋白StSUT1在块茎的韧皮部卸载中也起着重要作用(Kuhn 2003);番茄、烟草、拟南芥、胡萝卜、水稻和大豆等多种植物中鉴定出的SUT基因在源器官如叶中大量表达,同样在种子、根、花粉等库器官中表达(Scholz-Starke等2003; Meyer等2000; Shakya和Sturm 1998; Ylstra等1998; Harrington等1997; Gahrtz等1996; Riesmeier等1993; Turgeon 1987);在甜橙(*Citrus sinensis*)、葡萄(*Vitis vinifera*)等果实上克隆的蔗糖载体基因同样在源器官叶片中表达(Ageorges等2000; Davies等1999)。

免疫共沉淀技术普遍应用于蛋白质互作的体外分析。我们已经利用MdSUT1^{Cl}抗体(抗兔)证实了MdSUT1与MdCyb5的体外互作(Fan等2009),本研究再次用MdSUT1全长蛋白抗体(抗鼠)和Cyb5抗体进行了免疫共沉淀实验,结果与我们先前报道的相似,即苹果果实中MdSUT1与MdCyb5能发生体外互作。这也从侧面证明本研究中的MdSUT1多克隆抗体对蔗糖载体的识别是特异的。

综上所述,我们成功地从毕赤酵母细胞中表达了MdSUT1蛋白,并制备得到特异性良好的多克隆抗体,抗体可用于苹果蔗糖载体MdSUT1的表达水平检测。前期研究中我们还发现MdSUT1的表达受ABA的诱导,将MdSUT1转入蔗糖吸收功能缺失酵母突变体SUSY7/ura3细胞后,外源ABA能显著提高酵母细胞对¹⁴C标记蔗糖的吸收活性(未发表资料)。我们将继续利用该抗体通过免疫组化的方法来分析蔗糖载体对ABA的响应,甚至进行蛋白质互作因子的体外筛选。因此,该抗体的制备对进一步研究蔗糖载体的蔗糖转运功能以及调控信号打下了基础。

参考文献

彭昌操,赵小兰(2010).植物体内蔗糖转运蛋白的功能和调控.植物生理学通讯,46:317~324
杨彩菊,郝大海,杨素祥,王芳,李灿辉,陈善娜(2006).高等植物中的蔗糖载体.植物生理学通讯,42:767~776
Ageorges A, Issaly N, Picaud S, Delrot S, Romieu C (2000). Identification and functional expression in yeast of a grape berry sucrose carrier. Plant Physiol Biochem, 38: 177~185

Barker L, Kuhn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Ward JM, Frommer WB (2000). SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. Plant Cell, 12: 1153~1164
Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248~254
Coughlan CM, Walker JL, Cochran J C, Wittrup KD, Brodsky JL (2004). Degradation of mutated bovine pancreatic trypsin inhibitor in the yeast vacuole suggests post-endoplasmic reticulum protein quality control. J Bio Chem, 279: 15289~15297
Davies C, Wolf T, Robinson SP (1999). Three putative sucrose transporters are differentially expressed in grapevine tissues. Plant Sci, 147: 93~100
Ellgaard L, Molinari M, Helenius A (1999). Setting the standards: quality control in the secretory pathway. Science, 286: 1882~1888
Fan RC, Peng CC, Xu YH, Wang XF, Li Y, Shang Y, Du SY, Zhao R, Zhang XY, Zhang LY, Zhang DP (2009). Apple sucrose transporter sut1 and sorbitol transporter SOT6 interact with cytochrome b5 to regulate their affinity for substrate sugars. Plant Physiol, 150: 1880~1901
Fillion L, Ageorges A, Picaud S, Coutos-Thevenot P, Lemoine R, Romieu C, Delrot S (1999). Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of grape berry. Plant Physiol, 120: 1083~1093
Fleishman SJ, Unger VM, Ben-Tal N (2006). Transmembrane protein structures without X-rays. Trends Biochem Sci, 31: 106~113
Gahrtz M, Schmelzer E, Stolz J, Sauer N (1996). Expression of the *PmSUC1* sucrose carrier gene from *Plantago major* L. is induced during seed development. Plant J, 9: 93~100
Gao Z, Jayanty S, Beaudry R, Loescher W (2005). Sorbitol transporter expression in apple sink tissues: implication for fruit sugar accumulation and watercore development. J Am Soc Hortic Sci, 130: 261~268
Gao Z, Maurousset L, Lemoine R, Yoo SD, van Nocker S, Loescher W (2003). Cloning, expression, and characterization of sorbitol transporters from developing sour cherry fruit and leaf sink tissues. Plant Physiol, 131: 1566~1575
Gear ML, McPhillips ML, Patrick JW, McCurdy DW (2000). Hexose transporters of tomato: molecular cloning, expression analysis and functional characterization. Plant Mol Biol, 44: 687~697
Hackel A, Schauer N, Carrari F, Fernie AR, Grimm B, Kuhn C (2006). Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. Plant J, 45: 180~192
Harrington GN, Franceschi VR, Offler CE, Patrick JW, Harper JF, Frommer WB, Tegeder M, Hitz WD (1997). Cell specific expression of three genes involved in plasma membrane sucrose transport in developing *Vicia faba* seed. Protoplasma, 197: 160~173
Krogh A, Larsson B, von Heijine G, Sonnhammer ELL (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov

- model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, 305: 567~580
- Kuhn C (2003). A comparison of the sucrose transporter systems of different plant species. *Plant Biol*, 5: 215~232
- Lalonde S, Boles E, Hellmann H, Barker L, Patrick JW, Frommer WB, Ward JM (1999). The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *Plant Cell*, 11: 707~726
- Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC (2002). BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell*, 110: 213~222
- Manning K, Davies C, Bowen HC, White PJ (2001). Functional characterization of two ripening-related sucrose transporters from grape berries. *Ann Bot*, 87: 125~129
- Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T (2005). ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol*, 7: 766~772
- Meyer S, Melzer M, Truernit E, Humer C, Besenbeck R, Stadler R, Sauer N (2000). *AtSUC3*, a gene encoding a new *Arabidopsis* sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *Plant J*, 24: 869~882
- Oparka KJ (1990). What is phloem unloading? *Plant Physiol*, 94: 393~396
- Patrick JW (1997). Phloem unloading: sieve element unloading and post-sieve element transport. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48: 191~222
- Riesmeier JW, Hirner B, Frommer WB (1993). Expression of the sucrose transporter from potato correlates with the sink-to-source transition in leaves. *Plant Cell*, 5: 1591~1598
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Ann Rev Plant Biol*, 57: 675~709
- Scholz-Starke J, Buttner M, Sauer N (2003). AtSTP6, a new pollen-specific H⁺-monosaccharide symporter from *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 131: 70~77
- Shakya R, Sturm A (1998). Characterization of source- and sink-specific sucrose/H⁺ symporters from carrot. *Plant Physiol*, 118: 1473~1480
- Tsai B, Ye Y, Rapoport TA (2002). Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3: 246~255
- Turgeon R (1987). Phloem unloading in tobacco sink leaves: insensitivity to anoxia indicates a symplastic pathway. *Planta*, 171: 73~81
- Vignault C, Vachaud M, Cakir B, Glissant D, Dedaldechamp F, Buttner M, Atanassova R, Fleurat-Lessard P, Lemoine R, Delrot S (2005). *VvHT1* encodes a monosaccharide transporter expressed in the conducting complex of the grape berry phloem. *J Exp Bot*, 56: 1409~1418
- Watari J, Kobae Y, Yamaki S, Yamada K, Toyofuku K, Tabuchi T, Shiratake K (2004). Identification of sorbitol transporters expressed in the phloem of apple source leaves. *Plant Cell Physiol*, 45: 1032~1041
- Weise A, Barker L, Kuhn C, Lalonde S, Buschmann H, Frommer WB, Ward JM (2000). A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low-affinity/high-capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *Plant Cell*, 12: 1345~1355
- Ylstra B, Garrido D, Busscher J, Tunen AJ (1998). Hexose transport in growing petunia pollen tubes and characterization of a pollen-specific, putative monosaccharide transporter. *Plant Physiol*, 118: 297~304
- Zhang DP, Chen SW, Peng YB, Shen YY (2001). Abscisic acid-specific binding sites in the flesh of developing apple fruit. *J Exp Bot*, 52: 2097~2103
- Zhang DP, Wang YZ (2002). Post-translational inhibitory regulation of acid invertase induced by fructose and glucose in developing apple fruit. *Sci China (Ser C)*, 45: 309~321
- Zhang LY, Peng YB, Pelleschi ST, Fan Y, Lu YF, Lu Y, Gao XP, Shen YY, Delrot S, Zhang DP (2004). Evidence for apoplasmic phloem unloading in developing apple fruit. *Plant Physiol*, 135: 574~586