

甘薯蔗糖转运蛋白IbSUT1x在酵母细胞中的定位*

李 岩^{1,2} 王海燕¹ 张义正^{1**}

(¹四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川省分子生物学与生物技术重点实验室 成都 610064)

(²山东农业大学农学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东省作物生物学重点实验室 泰安 271018)

摘 要 蔗糖转运蛋白是植物特有的一类载体蛋白, 酿酒酵母突变株SUSY7/ura3常被利用来研究蔗糖转运蛋白的功能, 但在研究中发现, 有的蔗糖转运蛋白在酵母中未表现出蔗糖转运的功能。但这或许并不是其实际功能的体现, 而是由于这类蛋白无法准确定位到酵母的细胞膜上造成的。IbSUT1x是本实验室从甘薯中分离到的一个蔗糖转运蛋白基因, 但是在SUSY7/ura3中未表现出明显的蔗糖转运功能。本研究通过用激光共聚焦显微镜对IbSUT1x与绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)的融合蛋白的表达和定位的观察, 发现IbSUT1x不仅在酵母细胞中有表达, 而且表达的蛋白质定位在酵母的细胞膜上。结果表明, IbSUT1x在酵母细胞中不能转运蔗糖, 该蛋白很可能不具有蔗糖转运功能, 或者其与蔗糖的亲合力很低。图4表1 参21

关键词 甘薯; 蔗糖转运蛋白; 基因表达; 定位; 绿色荧光蛋白; 酿酒酵母

CLC Q786

Localization of IbSUT1x Protein from *Ipomoea batatas* (L.) Lam in Yeast Cells*

LI Yan^{1,2}, WANG Haiyan¹ & ZHANG Yizheng^{1**}

(¹Key Laboratory of Biology Resource & Eco-environment, Ministry of Education, Sichuan Key Laboratory of Molecular Biology & Biotechnology, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

(²State Key Laboratory of Crop Biology, Shandong Key Laboratory of Crop Biology, College of Agronomy, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract Sucrose transporters (SUTs), or termed as sucrose carriers (SUCs), only exist in plants and play important roles in long-distance transport of photosynthate through phloem from source organs to sink ones. Its function was always studied with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strain SUSY7/ura3 which is usually used as a model for sucrose uptake activity research. Researchers found that some sucrose transporters could not transport sucrose, which might be on account of the failed localization (not target to plasma membrane) in yeast cells. IbSUT1x is a sucrose transporter gene isolated from sweet potato (*Ipomoea batatas*), and it does not display apparent sucrose uptake activity. In the present study, it was revealed that IbSUT1x could be successfully targeted to plasma membrane of yeast cells by the localization of IbSUT1x-green fluorescent protein (GFP) fusion protein using laser scanning confocal microscopy. The result suggests that IbSUT1x can not load sucrose into yeast cells, or just has low sucrose affinity. Fig 4, Tab 1, Ref 21

Keywords *Ipomoea batatas*; sucrose transporter; gene expression; localization; GFP; *Saccharomyces cerevisiae*

CLC Q786

在高等植物中, 蔗糖是光合产物从源器官运送到库器官的主要形式^[1], 在这一过程中, 蔗糖转运蛋白(Sucrose transporter, 简称SUT)起着重要的作用^[2]。蔗糖转运蛋白是典型的膜蛋白, 具有多个保守的跨膜结构域(通常为12个)^[3]。根据氨基酸序列的同源性, Sauer将蔗糖转运蛋白分成4个Group, 其中Group-II类蔗糖转运蛋白均来自双子叶植物, 其重要功能之一就是将细胞外的蔗糖转运到细胞内: 在成熟叶中, 将胞外的蔗糖转运到筛管里, 以使光合产物经筛管进行长距离运输; 在库器官中, 将胞外的蔗糖转运到库细胞里, 以供库细胞生长或碳水化合物的储存^[2]。另外, 有证据显示, 某些Group-II类蔗糖转运蛋白可能在库器官的蔗糖卸载过程中发挥作用^[4-5]。

在对蔗糖转运蛋白的研究过程中, 科学家常常使用酿

酒酵母突变株SUSY7/ura3对其蔗糖转运功能进行验证, 该菌株只能利用胞内蔗糖而不能利用胞外蔗糖, 只有在导入外源的蔗糖转运蛋白的情况下才能在以蔗糖为唯一碳源的培养基上正常生长^[6]。但在研究过程中, 发现有些蔗糖转运蛋白无法使SUSY7/ura3在以蔗糖为唯一碳源的培养基上正常生长, 如Group-II类蔗糖转运蛋白中的NtSUT3^[7]、PvSUF1^[5]和PsSUF1^[5]。出现这种情况有两种可能的原因: 一是这种蔗糖转运蛋白不具有将胞外蔗糖转运到胞内的功能, 或者其与蔗糖的亲合力很低^[5]; 另一种原因则是这类蛋白在酵母中由于某种原因无法准确定位到酵母的细胞膜上, 因而也就无法转运胞外的蔗糖。

本实验室曾经从甘薯(*Ipomoea batatas*)中克隆到两对蔗糖转运蛋白基因, 其中一对(IbSUT1x和IbSUT1y)无法使SUSY7/ura3酵母菌株在以蔗糖为唯一碳源的培养基上正常生长^[8]。为进一步说明导致这一现象的原因, 并阐明IbSUT1的功能, 本试验对绿色荧光蛋白(GFP)-IbSUT1x融合蛋白在酵母中的表达和定位进行了研究。

收稿日期: 2010-03-13 接受日期: 2010-05-26

*国家科技支撑计划项目(No. 2007BAD78B03)和四川省“十一五”重点攻关项目(No. 07SG111-003-1)资助 Supported by the National Science & Technology Pillar Program of China (No. 2007BAD78B03) and the “11th Five-year Plan” Key Project of Sichuan, China (No. 07SG111-003-1)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: yizhang@scu.edu.cn)

DNA聚合酶进行PCR反应,得到一条特异的约1.5 kb的扩增条带(图2,泳道1),大小与*IbSUT1x* cDNA全长编码序列的大小(1 512 bp)相似,因为扩增模板是容易扩增的质粒,因此,可以认定该条带为*IbSUT1x*的扩增条带.将从大肠杆菌JM109中提取并纯化的质粒pDDGFP-2用*Sma* I完全酶切,使其线性化,图2的泳道2即为pDDGFP-2酶切后的电泳结果.

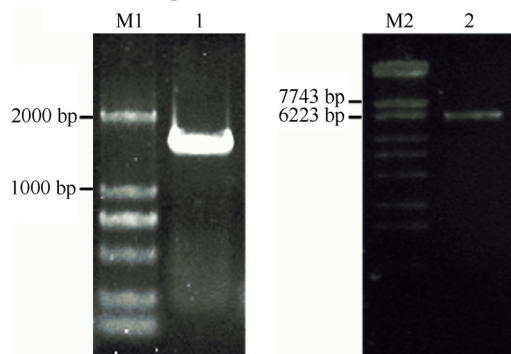


图2 *IbSUT1x* PCR产物及线性化pDDGFP-2的凝胶电泳

Fig. 2 Electrophoresis of PCR product of *IbSUT1x* and linearized vector pDDGFP-2

M1: DNA分子量标准DL2000; M2: DNA分子量标准 λ -*Eco*T14 I digest; 1: *IbSUT1x* PCR产物; 2: 线性化pDDGFP-2

M1: DL2000 marker; M2: λ -*Eco*T14 I digest marker; 1: PCR product of *IbSUT1x*; 2: linearized vector pDDGFP-2

2.2 *IbSUT1x*在酵母菌中的定位

将在选择培养基中生长的酿酒酵母先通过酵母菌落PCR验证,发现含有*IbSUT1x*全长编码序列的酵母单菌落(数据未列出),然后从酵母中提取重组质粒*IbSUT1x*-pDDGFP-2送深圳华大基因测序,发现*IbSUT1x*与原序列完全一致,未因PCR反应引入碱基突变.将上述酵母菌经半乳糖诱导表达后涂到载玻片上,在激光共聚焦显微镜下观察,发现荧光主要集中在酵母菌的细胞膜上(图3-A),表明*IbSUT1x*蛋白主要定位在酵母的细胞膜上,而阴性对照则未发现荧光(图3-B).

2.3 一致性分析与多序列比对

系统进化树分析表明,*IbSUT1x*属于Group-II类蔗糖转运蛋白^[8].将*IbSUT1x*与Group-II中9种具有不同功能的蔗糖转运蛋白的核苷酸序列和氨基酸序列进行比较分析,结果(表1)显示,在核苷酸水平上,*IbSUT1x*与*IbSUT2x*的一致性最高(64.8%),与*PsSUF1*的一致性最低(56.8%);而在氨基酸水平上,*IbSUT1x*与*StSUT1*的一致性最高(65.0%),与*PsSUF1*的一致性最低(55.1%).

将*IbSUT1x*与上述9种蔗糖转运蛋白的氨基酸序列进行多序列比对(N端部分的结果见图4),结果显示,在目前发现的所有蔗糖转运蛋白中均存在的,位于第一个胞外结构域

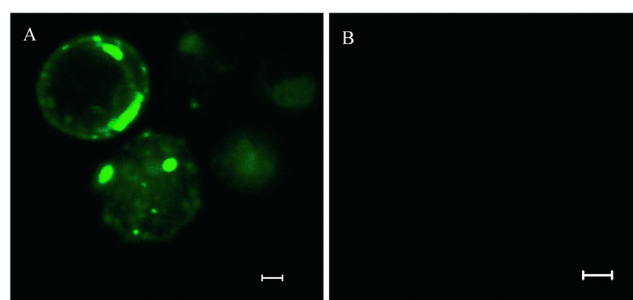


图3 *IbSUT1x*蛋白在酵母细胞中的定位 (bars=1 μ m)

Fig. 3 Localization of *IbSUT1x* in yeast cells as visualized by *IbSUT1x*-GFP fusion proteins (bars=1 μ m)

A: 表达*IbSUT1x*-GFP的酵母细胞; B: 阴性对照 A: Yeast cells expressing *IbSUT1x*-GFP; B: Negative control

的第65位(在*AtSUC2*中的位置)的His,以及位于第2和第3个跨膜结构域的R-X-G-R模体在*IbSUT1x*氨基酸序列中均存在(图4).

3 讨论

本研究所用酵母表达载体pDDGFP-2没有合适的酶切位点,不适于用酶切连接的方式插入待表达的目的基因(*Sma* I位点在相位上合适,但*Sma* I酶切后产生的是平末端,连接效率较低),所以采用同源重组的策略.首先在用于扩增目的基因的引物的5'端加上与线性化载体末端同源的部分序列,然后将目的基因与线性化载体同时转化酵母,使其在酵母细胞内通过同源重组得到最后的表达载体.采用此策略,关键是减少背景.*Sma* I线性化的质粒在琼脂糖凝胶电泳后切胶回收纯化,排除了未切开的质粒带来的污染,另外,*Sma* I酶切后产生平末端,也减少了发生自身环化的可能性^[10].此外,转化的目的基因与载体分子的质量比约为10:1,由于载体分子的相对分子质量约为目的基因的4倍(图2),所以,物质的量之比则更高(约40:1),这样做的目的也是减少线性化载体自身环化导致的背景.

在本研究中,甘薯蔗糖转运蛋白*IbSUT1x*与GFP形成融合蛋白,通过激光共聚焦显微镜对融合蛋白的定位,可以确定*IbSUT1x*在酵母中的定位情况,结果显示,*IbSUT1x*定位到酵母的细胞膜上.*IbSUT1x*可以准确地定位在细胞膜上,但是却无法使*SUSY7/ura3*在以蔗糖为唯一碳源的培养基中正常生长,由此可见,该蛋白很可能不具有蔗糖转运功能,或者其与蔗糖的亲合力很低^[5].该蛋白可能具有其他未知的功能.

本研究还将*IbSUT1x*与Group-II中其它9种具有不同功能的蔗糖转运蛋白序列进行了对比分析.其中*NtSUT3*在酵母中未检测到蔗糖转运活性^[7]; *PvSUF1*和*PsSUF1*可以将蔗糖以易化运输的方式进行双向运输,与蔗糖的亲合力很低^[5];

表1 *IbSUT1x*与来自Group-II的9种蔗糖转运蛋白的一致性分析

Table 1 Identity analysis of *IbSUT1x* and nine sucrose transporters from Group-II

一致性 Identity (%)	NtSUT3	PvSUF1	PsSUF1	IbSUT2x	AtSUC2	StSUT1	NtSUT1	PmSUC2	DcSUT2
核苷酸水平 Nucleotide	57.7	60.3	56.8	64.8	61.2	62.3	62.2	60.4	61.4
氨基酸水平 Amino acid	57.3	58.5	55.1	64.4	62.6	65.0	64.7	62.0	62.6

用于分析的序列 The sequences used for the analysis: *AtSUC2* (*Arabidopsis thaliana*, CAA53150), *DcSUT2* (*Daucus carota*, CAA76369), *IbSUT2x* (*Ipomoea batatas*, GQ979979), *NtSUT1* (*Nicotiana tabacum*, X82276), *NtSUT3* (ADD34610), *PmSUC2* (*Plantago major*, CA159556), *PsSUF1* (*Pisum sativum*, DQ221698), *PvSUF1* (*Phaseolus vulgaris*, DQ221700), *StSUT1* (*Solanum tuberosum*, CAA48915)

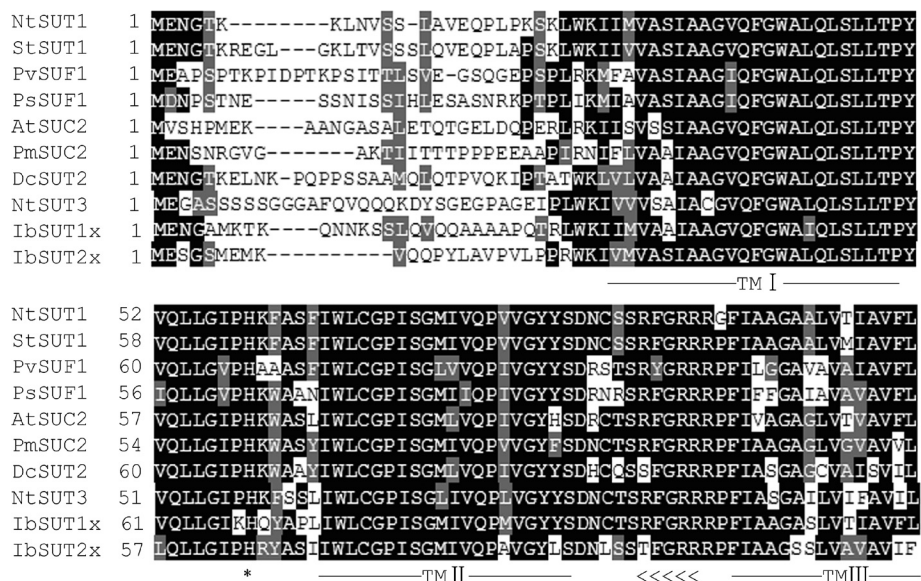


图4 IbSUT1x与来自Group-II的9种蔗糖转运蛋白氨基酸序列的多序列对比
Fig. 4 Multialignment of IbSUT1x and nine sucrose transporters from Group-II

TM: 跨膜结构域; *: 保守的组氨酸; <<<<: R-X-G-R 模式
TM: Transmembrane domain; *: The conserved histidine residue described in the text; <<<<: R-X-G-R motif

IbSUT2x、AtSUC2、StSUT1、NtSUT1、PmSUC2和DcSUT2可以使酵母SUSY7/ura3在以蔗糖为唯一碳源的培养基上正常生长,在植物中,除DcSUT2在库器官中负责将胞外的蔗糖转运到库细胞内以外,其余的蔗糖转运蛋白在源叶中负责将胞外的蔗糖转运至筛管^[8, 13-19],此外, IbSUT2x^[8]和StSUT1^[4]也可能在库器官负责蔗糖的卸出。结果显示, IbSUT1x与上述9种蔗糖转运蛋白的核苷酸和氨基酸序列的一致性在55%~65%之间(表1)。奇怪的是, IbSUT1x与在酵母中功能类似的NtSUT3、PvSUF1和PsSUF1在序列上一致性较低,却与在酵母中具有蔗糖转运功能的几个蔗糖转运蛋白序列有较高的一致性(表1)。然而, Group-II类蔗糖转运蛋白的功能比较复杂, StSUT1和IbSUT2x甚至表现出了双重功能的特点,所以,序列相似性分析的结果也是可以理解的,甚至预示了IbSUT1x在甘薯中可能具有的卸载功能。目前,蔗糖转运蛋白的三维结构仍不清楚,蔗糖转运蛋白结构与功能的关系方面的研究也很少,现在所能见到的相关报道主要涉及两点:蔗糖转运蛋白位于胞内的N-端可能与蛋白同底物(蔗糖)的亲合性有关^[20];而位于第一个胞外结构域的第65位(在AtSUC2中的位置)的His可能参与蛋白和底物(蔗糖)的结合^[21]。由于不同蔗糖转运蛋白的N-端保守性差^[3],无法判断出IbSUT1x的蔗糖转运功能与N-端序列的关系,而IbSUT1x对应于AtSUC2第65位的氨基酸,也是保守的His。所以,根据现有的试验结果和文献资料,无法阐明IbSUT1x在酵母细胞中无明显蔗糖转运功能的原因,解决这一问题还需要做大量的研究工作,相关工作正在进行中。

References

1 Lalonde S, Wipf D, Frommer WB. Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, **55**: 341~372

2 Sauer N. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Lett*, 2007, **581**: 2309~2317

3 Lemoine R. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1465**: 246~262

4 Kühn C, Hajirezaei M-R, Fernie AR, Roessner-Tunali U, Czechowski T, Hirner B, Frommer WB. The sucrose transporter StSUT1 localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development. *Plant Physiol*, 2003, **131**: 102~113

5 Zhou Y, Qu H, Dibley KE, Offler CE, Patrick JW. A suite of sucrose transporters expressed in coats of developing legume seeds includes novel pH-independent facilitators. *Plant J*, 2007, **49**: 750~764

6 Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J*, 1992, **11** (13): 4705~4713

7 Lemoine R, Bürkle L, Barker L, Sakr S, Kühn C, Regnacq M, Gaillard C, Delrot S, Frommer WB. Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein NtSUT3 from tobacco. *FEBS Lett*, 1999, **454**: 325~330

8 Li Y, Gu Y, Qin H, Zhang Y. Two pairs of sucrose transporters in *Ipomoea batatas* (L.) Lam are predominantly expressed in sink leaves and source leaves respectively. *Plant Sci*, 2010, **179**: 250~256

9 Newstead S, Kim H, von Heijne G, Iwata S, Drew D. High-throughput fluorescent-based optimization of eukaryotic membrane protein overexpression and purification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104** (35): 13936~13941

10 Drew D, Newstead S, Sonoda Y, Kim H, von Heijne G, Iwata GS. GFP-based optimization scheme for the overexpression and purification of eukaryotic membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Protoc*, 2008, **3** (5): 784~798

11 Gietz RD, Schiestl RH. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc*, 2007, **2** (1): 31~34

- 12 Ausubel FM (奥斯伯), Kingston RE (金斯顿), Scheidemann JG (赛德曼). Short Protocols in Molecular Biology. 4th ed. Beijing, China: Science Press (北京: 科学出版社), 2005
- 13 Bürkle L, Hibberd JM, Quick WP, Kühn C, Hirner B, Frommer WB. The H⁺-sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiol*, 1998, **118**: 59~68
- 14 Riesmeier JW, Hirner B, Frommer WB. Potato sucrose transporter expression in minor veins indicates a role in phloem loading. *Plant Cell*, 1993, **5**: 1591~1598
- 15 Shakya R, Sturm A. Characterization of source- and sink-specific sucrose/H⁺ symporters from carrot. *Plant Physiol*, 1998, **118**: 1473~1480
- 16 Schmitt B, Stadler R, Sauer N. Immunolocalization of solanaceous SUT1 proteins in companion cells and xylem parenchyma: New perspectives for phloem loading and transport. *Plant Physiol*, 2008, **148**: 187~199
- 17 Stadler R, Brandner J, Schulz A, Gahrz M, Sauer N. Phloem loading by the PmSUC2 sucrose carrier from *Plantago major* occurs into companion cells. *Plant Cell*, 1995, **7**: 1545~1554
- 18 Stadler R, Sauer N. The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. *Bot Acta*, 1996, **109**: 299~306
- 19 Truernit E, Sauer N. The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H⁺ symporter gene directs expression of p-glucuronidase to the phloem: Evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta*, 1995, **196**: 564~570
- 20 Schulze W, Weise A, Frommer WB, Ward JM. Function of the cytosolic N-terminus of sucrose transporter AtSUT2 in substrate affinity. *FEBS Lett*, 2000, **485**: 189~194
- 21 Lu JM-Y, Bush DR. His-65 in the proton-sucrose symporter is an essential amino acid whose modification with site-directed mutagenesis increases transport activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 9025~9030



糖工程概论

(“十一五”国家重点图书出版规划项目 应用生物技术大系) 焦庆才 主编
科学出版社出版 (2010年10月) ISBN 978-7-03-029208-7 ¥68.00 16开本 平装

内容简介

本书分三部分内容介绍糖生物学与糖基化工程、天然多糖的结构功能及修饰和多糖的工程化应用。第一部分重点介绍糖蛋白中寡糖链的生物合成和代谢及其生物学功能,以糖基转移酶等为例介绍糖蛋白的工程化改造和应用。第二部分主要介绍天然多糖的种类、提取分离、理化特征、化学结构及功能,以功能应用为目的介绍天然多糖的结构修饰。第三部分主要介绍多糖在医药保健、食品工业、农业、石油化工和日用化工方面的工业化应用。

本书可作有机化学、生物化学、细胞生物学、免疫学、药学、医学和精细化工、轻工及农业等相关专业本科生和研究生的教材和参考书,以及供相关专业研究人员学习和参考。

流式细胞术——原理、操作及应用

陈朱波 曹雪涛 著 科学出版社出版 (2010年10月) ISBN 978-7-03-029171-4 ¥48.00 B5开本 平装

内容简介

本书主要介绍流式细胞术的原理、操作和应用,分为概述、流式细胞术的原理、流式图、流式细胞术的基本操作和技巧、流式分析的应用和流式分选的应用6个部分。概述部分主要介绍流式细胞术的基本概念和几款分析型流式细胞仪和分选型流式细胞仪;原理部分具体介绍流式细胞仪的液流系统、光路系统、检测分析系统和分选系统;流式图部分主要介绍了流式直方图、流式散点图和流式等高线图;操作部分介绍了单细胞悬液样品的制备、荧光素偶联抗体标记、光电倍增管电压设置、对照设置、补偿设置、阈值设定、死细胞问题处理、分选模式选择、上样速度控制、分选设门原则、分选基本步骤共11个部分的内容;流式分析应用部分具体介绍了流式细胞术在免疫学方面的应用,并且扩展到基础医学和生物学方面的应用;流式分选应用部分阐述了不同条件下流式分选的策略选择和注意事项,同时还介绍了各种干细胞包括肿瘤干细胞等的流式分选方法。

本书特别适合于流式细胞术的初学者,也可以作为有一定经验的操作者的参考书;本书特别适用于免疫学研究者,对其他领域研究者也具有很好的参考价值。

联系人: 科学出版社科学销售中心 周文宇 电话: 010-64031535 E-mail: zhouwenyu@mail.sciencep.com

网上订购: <http://shop.sciencepress.cn>

科学出版中心生物分社 电话: 010-64012501 网址: www.lifescience.com.cn E-mail: lifescience@mail.sciencep.com