

小麦无机氮转运蛋白原核表达与纯化特点

韦一昊^{2,3}, 王君君¹, 能芙蓉¹, 王露露², 焦浩¹, 肖福星¹, 王小纯^{1,3*}

1 河南农业大学 生命科学学院, 河南 郑州 450002

2 河南农业大学 农学院, 河南 郑州 450002

3 河南农业大学 省部共建小麦玉米作物学国家重点实验室, 河南 郑州 450002

韦一昊, 王君君, 能芙蓉, 王露露, 焦浩, 肖福星, 王小纯. 小麦无机氮转运蛋白原核表达与纯化特点[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3795-3809.

WEI Yihao, WANG Junjun, NAI Furong, WANG Lulu, JIAO Hao, XIAO Fuxing, WANG Xiaochun. Prokaryotic expression and purification of inorganic nitrogen transporters in wheat[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3795-3809.

摘要: 硝酸转运蛋白(nitrate transporter, NRT)与铵转运蛋白(ammonium transporter, AMT)是小麦无机氮素吸收、转运、分配的一类重要跨膜蛋白, 获得 NRT/AMT 蛋白并制备其抗体有助于了解其组织定位特点, 理解小麦的氮素利用过程。本研究从前期鉴定到的 405 个 *TaNRT/TaNPF* 基因和 23 个 *TaAMT* 基因中, 筛选并克隆到了 4 个表达量较高的基因: *TaNPF4.5*、*TaNPF8.3*、*TaNRT3.1*、*TaAMT1.2*。利用 HMMER 软件对 4 个转运蛋白进行跨膜结构域预测, 确定拟表达区段, 并进行原核表达和纯化。在 37 °C、1 mmol/L IPTG 诱导条件下, 非跨膜区段 *TaNPF4.5*、*TaNPF8.3*、*TaNRT3.1* 诱导 4 h 后表达量最大且为包涵体形式, *TaAMT1.2* 诱导 3 h 后表达量最大, 主要是可溶性表达。非跨膜区段 *TaNPF4.5*、*TaNPF8.3*、*TaNRT3.1* 采用 pH 梯度分离纯化, *TaNPF4.5* 在 pH 2.0 时蛋白纯度约为 87%, *TaNPF8.3* 在 pH 3.0 时纯化蛋白纯度约为 85%, 均可用于抗体制备, *TaNRT3.1* 的蛋白纯度未达到 85%; *TaAMT1.2* 采用咪唑梯度分离纯化, 在咪唑浓度为 20 mmol/L 时纯度约 95%, 并成功制备了抗体。*TaAMT1.2* 的表达纯化与抗体制备, 为 *TaNPF4.5*、*TaNPF8.3* 等膜蛋白表达纯化及抗体制备提供了思路, 为研究小麦膜蛋白表达与定位特点奠定了基础。

关键词: 硝酸转运蛋白; 铵转运蛋白; 原核表达; 蛋白纯化

资助项目: 国家自然科学基金(32071956); 国家重点研发计划(2021YFD1700900); 河南省自然科学基金(232300420193)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32071956), the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1700900), and the Henan Provincial Natural Science Foundation (232300420193).

*Corresponding author. E-mail: xiaochunwang@henau.edu.cn

Received: 2023-12-10; Accepted: 2024-05-11

Prokaryotic expression and purification of inorganic nitrogen transporters in wheat

WEI Yihao^{2,3}, WANG Junjun¹, NAI Furong¹, WANG Lulu², JIAO Hao¹, XIAO Fuxing¹, WANG Xiaochun^{1,3*}

1 College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China

2 College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China

3 State Key Laboratory of Wheat and Maize Crop Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China

Abstract: The nitrate transporter (NRT) and ammonium transporter (AMT) are crucial transmembrane proteins involved in the absorption, transport, and distribution of inorganic nitrogen in wheat. Obtaining NRT/AMT and preparing corresponding antibodies are conducive to probing into their tissue localization and comprehending the nitrogen utilization process in wheat. In this study, four genes (*TaNPF4.5*, *TaNPF8.3*, *TaNRT3.1*, *TaAMT1.2*) with high expression levels were chosen and cloned from 405 genes of the *TaNRT/TaNPF* family and 23 genes of the *TaAMT* family identified previously. The transmembrane domains of the four transporters were predicted by HMMER to determine the putative expression segments, followed by prokaryotic expression and purification. Under the induction with 1 mmol/L IPTG at 37 °C, the non-transmembrane segments of *TaNPF4.5*, *TaNPF8.3*, and *TaNRT3.1* reached the highest expression levels (as inclusion bodies) after 4 h, while *TaAMT1.2* was expressed at the highest level (as a soluble protein) after 3 h. *TaNPF4.5*, *TaNPF8.3*, and *TaNRT3.1* were purified by a pH gradient. The purity of *TaNPF4.5* and *TaNPF8.3* reached about 87% and 85% at pH 2.0 and pH 3.0, respectively, both of which were suitable for antibody preparation. However, the purity of *TaNRT3.1* did not reach 85%. *TaAMT1.2* was purified by an imidazole gradient, reaching the purity of about 95% at 20 mmol/L imidazole, and the antibody was prepared successfully. The expression, purification, and antibody preparation of *TaAMT1.2* not only provides insights into the expression, purification, and antibody preparation of membrane proteins including *TaNPF4.5* and *TaNPF8.3* but also lays a foundation for studying the expression and localization of membrane proteins in wheat.

Keywords: nitrate transporter; ammonium transporter; prokaryotic expression; protein purification

小麦是我国最主要的粮食作物，也是世界上种植最广泛的粮食作物之一^[1]。氮(N)是小麦生长发育最重要的矿质元素之一，也是影响小麦产量提高的关键因素^[2]。铵态氮(NH₄⁺-N)和硝态氮(NO₃⁻-N)是小麦吸收的主要氮素形式^[3]。小麦根系所吸收的 NO₃⁻-N 有小部分被根系直接

还原、同化为氨基酸，大部分被转运到地上部，在绿色组织中被还原为 NH₄⁺，再被同化为氨基酸^[4-7]，没有被还原的 NO₃⁻-N 也可被储存在液泡中^[8-9]。小麦根系吸收的 NH₄⁺-N 则常被直接同化为氨基酸再转运至地上部分^[10]。在以上过程中小麦主要依赖硝酸转运蛋白(nitrate transporter,

NRT) 和铵转运蛋白 (ammonium transporter, AMT) 参与无机氮的吸收、转运和分配。

小麦有众多硝酸转运蛋白, 可进一步分为 3 个家族, 包括硝酸盐转运蛋白 1/肽转运蛋白家族[nitrate transporter 1 (NRT1)/peptide transporter (PTR) family, NPF]、硝酸盐转运蛋白 2 (nitrate transporter 2, NRT2)、硝酸盐同化相关 2 (nitrate assimilation related 2, NAR2)^[11-12], 其中 NPF 又可分为 NPF1-NPF8 共计 8 个亚家族^[13]。在拟南芥中, AtNRT2 与 AtNRT3 家族成员中除了 AtNRT2.7 外均定位于根系, 参与根系 NO_3^- -N 的吸收, 其中 AtNRT3 是 AtNRT2 的伴侣蛋白, AtNRT3.1 可以促进 AtNRT2.1 的转运活性^[14-15]。AtNPF1 定位于展开叶主脉的伴胞中^[16], AtNPF2、AtNPF3、AtNPF5 分布于拟南芥根系、叶片、花药及花丝等部位^[17-18], AtNPF4、AtNPF6、AtNPF8 定位于根系^[19-20]。在小麦中鉴定到 23 个 AMT 成员, 但关于其详细分类与定位的报道较少。拟南芥中鉴定到 6 个 AMTs, 其中 AtAMT1.1-AtAMT1.5 属于 AMT1 亚家族, AtAMT2.1 属于 AMT2 亚家族^[21]。植物根系对铵态氮的吸收主要依赖于 AMT1.1、AMT1.2 和 AMT2.1。在这些转运体中, 植物根系中 AMT1.1 和 AMT1.2 能够吸收约 70% 的 NH_4^+ -N^[22]。

目前, 拟南芥 NRT 和 AMT 的定位和功能已有较多研究, 但在小麦中的相关研究还比较少。阐明小麦中 NRT、AMT 的组织定位, 对于明确小麦的无机氮利用特点至关重要。利用特异性抗体开展免疫组化实验是对目的蛋白进行组织定位研究的常用方法, 但是目前尚缺少有效的小麦 NRT、AMT 抗体, 因此严重限制了对小麦无机氮吸收、转运、分配的相关研究。基于前期的小麦三代转录组测序结果, 本课题组在小麦中共鉴定到了 405 个 *TaNRT/TaNPF* 基因和 23 个 *TaAMT* 基因。为此, 本研究应首先筛选出合适的拟表达基因, 再通过原核表达的方

式获取可用于抗体制备的 NRT、AMT 蛋白, 从而为进一步研究 NRT、AMT 的定位和功能奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株和载体

大肠杆菌菌株 DH5 α 、Roestta、原核表达载体 pET-32a 均由本实验室保存。

1.2 拟表达 *TaNRT* 及 *TaAMT* 基因的筛选

使用两种方法筛选拟表达 *TaNRT* 与 *TaAMT* 基因。从网上数据库(<https://www.wheatproteome.org/>)及本实验室小麦不同组织器官三代转录组数据库^[23]查找 *TaNRT* 与 *TaAMT* 基因, 对小麦不同组织部位每百万个映射片段的每千碱基外显子模型片段数 (fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments, FPKM) ≥ 5 的基因进行统计分析, FPKM 值取 $\log_2(\text{FPKM} + 0.125)$ 后, 通过热图进行表达量分析。选取表达量大的 *TaNRT* 与 *TaAMT* 进行克隆与表达。

1.3 qRT-PCR 验证筛选基因

对筛选基因进行 qRT-PCR 验证, 使用 RNE05 超快速植物 RNA 提取试剂盒(诺贝莱生物科技有限公司)提取‘周麦 27’根、茎、叶、穗、籽粒的 RNA, 利用 HiscriptIII 1st Strand cDNA Synthesis Kit (诺唯赞生物技术有限公司)将 RNA 逆转录为 cDNA。设计 qRT-PCR 引物(表 1), 使用 MonAmpTM SYBR Green qPCR Mix (莫纳生物科技有限公司)分别进行小麦根、茎、叶、穗、籽粒不同组织的 qRT-PCR 验证。小麦根、茎、叶、穗、籽粒 cDNA 等量混匀后, 再次进行 qRT-PCR 验证。qRT-PCR 反应程序: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 10 s, 62 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环。

1.4 目的基因扩增和克隆载体构建

从 NCBI 获得小麦 *TaNPF4.5* (GenBank 登录号: XP_044457092.1)、*TaNPF8.3* (GenBank 登录号:

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 qRT-PCR primer sequences

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Annealing temperature (°C)
<i>qTaNPF4.5-F</i>	AGCAGCAACCTACAAGCAGT	61.2
<i>qTaNPF4.5-R</i>	TGGAAGCTCTCACTCCTCCA	60.8
<i>qTaNPF8.3-F</i>	ATTCCTTCTCCCTCCCCGAA	60.5
<i>qTaNPF8.3-R</i>	GCTGGGATACTCTGCTCGGA	60.3
<i>qTaNRT3.1-F</i>	CCCCAGCTCTTCTCTTGC	60.2
<i>qTaNRT3.1-R</i>	TCACCGGCAGCTTGGAGA	60.8
<i>qTaAMT1.2-F</i>	GCTCGTTCCTCACCATCCTC	61.0
<i>qTaAMT1.2-R</i>	GTTGCAGACGTCCAGCAC	60.3
<i>ATPase-F</i>	CGAGGCCACCAATGACG	60.5
<i>ATPase-R</i>	AGTATGGTTTCAAGAAGGCGTC	61.3

KAF6995185.1)、*TaNRT3.1* (GenBank 登录号: XP_044409420.1)、*TaAMT1.2* (GenBank 登录号: XP_044413215.1)基因序列,使用 RNE05 超快速植物 RNA 提取试剂盒提取‘周麦 27’旗叶 RNA,利用 HiscriptIII 1st Strand cDNA Synthesis Kit 将旗叶 RNA 逆转录为 cDNA。以旗叶 cDNA 为模板,使用特异性克隆引物(表 2),用 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase (诺唯赞生物技术有限公司)进行 PCR 扩增。PCR 扩增反应程序:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 15 s,退火 15 s (退火温度见表 2),72 °C 延伸 1 min 20 s,35 个循环。使用琼脂糖凝胶回收试剂盒(天根生化科技有限公司)纯化扩增产物,连接 T 载体,转化 DH5 α 感受态细胞,37 °C 倒置培养过夜。筛选阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有

限公司测序鉴定。

1.5 TaNRT 和 TaAMT 结构预测

TaNRT、TaAMT 属于跨膜蛋白,其跨膜区域增加了其原核表达的难度。利用 HMMER 对 TaNPF4.5、TaNP8.3、TaNR3.1、TaAMT1.2 蛋白序列的跨膜区域、膜外区域、膜内区域进行分析预测。

1.6 非跨膜区 TaNRT 和 TaAMT 抗原性与特异性预测

使用 DNASTar-Protean 软件,分别采用 Jameson-Wolf 法、Emini 法、Kyte-Doolittle 法预测 NPF4.5、NPF8.3、NRT3.1 和 AMT1.2 非跨膜区段序列的抗原性、表面可及性和亲水性。所选制备抗体区段氨基酸序列在小麦数据库中进行 BLAST 分析,分析比对到蛋白的同源性与特异性。

表 2 *TaNRT* 与 *TaAMT* 特异性克隆引物Table 2 *TaNRT* and *TaAMT* specific cloning primers

Primer name	Primer sequences (5'→3')	Annealing temperature (°C)
<i>TaNPF4.5-F</i>	ACAAGCAGTGCAGAATCTGCTA	56.0
<i>TaNPF4.5-R</i>	TAGTTTGGTCGTGTATCATCATCTA	55.5
<i>TaNPF8.3-F</i>	GGAAGGTGAGGTGAGAGAGAGTCG	60.2
<i>TaNPF8.3-R</i>	CTGTTCCAAAGGCACCTTTTATATT	60.8
<i>TaNRT3.1-F</i>	CTCTTGCCTTGTCCGATCGA	60.9
<i>TaNRT3.1-R</i>	TCATTCGTAGTCATTACACGCTCA	60.3
<i>TaAMT1.2-F</i>	CCTATCAGACACTGCACCTGTCA	60.1
<i>TaAMT1.2-R</i>	CCGAGGTGTATGAAATACGTGTATC	60.1

1.7 非跨膜区 TaNRT 和 TaAMT 原核表达载体构建

以测序正确 *TaNPF4.5*、*TaNPF8.3*、*TaNRT3.1*、*TaAMT1.2* 质粒为模板,设计无缝克隆引物(表 3),扩增非跨膜区段 *NT-TaNPF4.5*、*NT-TaNPF8.3*、*NT-TaNRT3.1*、*NT-TaAMT1.2*, PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 15 s, 退火 15 s (退火温度见表 3), 72 °C 延伸 1 min 20 s, 35 个循环。利用 *Hind* III、*Kpn* I 消化 pET-32a 质粒, 利用琼脂糖凝胶纯化回收线性质粒。使用 ClonExpress One Step Cloning Kit (诺唯赞生物技术有限公司)构建 pET-32a 重组载体, 转化 DH5 α , 筛选阳性克隆并进行 DNA 测序鉴定。提取 pET-32a 重组质粒转化 Rosetta 菌株, 挑取阳性单克隆, 接种于 5 mL LB 液体培养基[含 1 mmol/L 羧苄青霉素(carbenicillin, Car)、34 μ g/mL 氯霉素(chloramphenicol, Cm)], 37 °C、220 r/min 培养过夜, 将菌种分管保存于-80 °C。

1.8 非跨膜区 TaNRT 和 TaAMT 原核表达

将含有 *NT-TaNPF4.5*、*NT-TaNPF8.3*、*NT-TaNRT3.1*、*NT-TaAMT1.2* 质粒的 Rosetta 菌种活化, 接入 200 mL 含 50 μ g/mL Car、34 μ g/mL Cm 的 LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 培养至 *OD*₆₀₀ 值约 0.6 时, 加入终浓度 1 mmol/L IPTG, 37 °C、220 r/min 诱导表达, 每小时收集 1 mL 培养液的菌体。菌体中加入 100 μ L 裂解液(50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L imidazole, 0.05%

Triton X-100, 100 μ g/mL PMSF, pH 8.0), 25 μ L 5 \times SDS loading buffer 混匀煮沸变性。收集剩余诱导后菌体, 每克菌体加入 10 mL 裂解液悬浮沉淀, 高压低温破碎后分离上清与沉淀, 加入 SDS loading buffer 变性。变性样品进行 SDS-PAGE 电泳, 检测融合蛋白表达量与表达特点。

1.9 非跨膜区 TaNRT 和 TaAMT 融合蛋白纯化

37 °C、1 mmol/L IPTG、220 r/min 诱导 *NT-TaNPF4.5*、*NT-TaNPF8.3*、*NT-TaNRT3.1* 表达 4 h, *NT-TaAMT1.2* 表达 3 h, 收集菌体。每 g 菌体加入 10 mL 裂解液悬浮沉淀, 然后进行高压低温破碎。

离心收集表达 *NT-TaAMT1.2* 菌液的高压破碎后上清, 将上清转移入 1 mL 50% Ni-NTA, 4 °C 缓慢振荡吸附 2.5 h。加入不同咪唑浓度的洗脱液(50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, imidazole, pH 8.0)进行洗脱并收集洗脱液。

分别离心收集表达 *NT-TaNPF4.5*、*NT-TaNPF8.3*、*NT-TaNRT3.1* 菌液的高压破碎后沉淀, 重悬于 5 mL 包涵体溶解液(100 mmol/L NaH₂PO₄, 10 mmol/L Tris-HCl, 8 mol/L urea, pH 8.0)中, 室温搅拌 60 min。10 000 \times g 离心 30 min, 取上清, 加入 1 mL 50% Ni-NTA, 在室温下轻轻摇晃吸附 60 min。加入不同 pH 梯度的洗脱液(100 mmol/L NaH₂PO₄, 10 mmol/L Tris-HCl, 8 mmol/L 尿素)进行洗脱并收集洗脱液。

表 3 非跨膜区 TaNRT 与 TaAMT 无缝克隆引物

Table 3 TaNRT and TaAMT are seamless cloning primers for non-transmembrane segments

Primer name	Primer sequences (5'→3')	Annealing temperature (°C)
<i>NT-TaNPF4.5</i> -F	GACAGCCCAGATCTGGGTACCCCTGCAGTCCCCTGGC	61.5
<i>NT-TaNPF4.5</i> -R	CTCGAGTGC GGCCGCAAGCTTTTATCAGGCCGTGTCGAACTG	61.0
<i>NT-TaNPF8.3</i> -F	GACAGCCCAGATCTGGGTACCTACAGGGTTCAACTTCCTACTGGAAG	62.6
<i>NT-TaNPF8.3</i> -R	CTCGAGTGC GGCCGCAAGCTTTTATCACTCCACCTGAGTTACTGTGC	61.9
<i>NT-TaNRT3.1</i> -F	GACAGCCCAGATCTGGGTACCGCCTCCCCAGTCCCG	61.1
<i>NT-TaNRT3.1</i> -R	CTCGAGTGC GGCCGCAAGCTTTTATCAGACGTTGAAGGCGGAG	62.0
<i>NT-TaAMT1.2</i> -F	GACAGCCCAGATCTGGGTACCCGCATCTCCGCCGAGG	61.1
<i>NT-TaAMT1.2</i> -R	CTCGAGTGC GGCCGCAAGCTTTTATCAGACCGAGCTGCTCGG	62.8

1.10 NT-TaAMT1.2 抗体检测

获取并分析南京钟鼎生物科技有限公司抗体检测报告。通过免疫印迹实验验证 NT-TaAMT1-2 抗体特异性。取液氮研磨小麦根 0.1 g, 加入 200 μ L 2 \times SDS loading buffer 混匀煮沸变性, 离心取上清得到根的总蛋白。取 10 μ L 根总蛋白进行 SDS-PAGE, 电泳结束后, 分离胶转聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride membrane, PVDF), 5%脱脂奶粉 4 $^{\circ}$ C过夜封闭。NT-TaAMT1.2 一抗 1:1 000 常温孵育 1 h, TBST (20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.5 mL Tween-20, pH 7.4)洗 PVDF 膜 3 次, 每次 10 min。HRP Goat Anti-Rabbit IgG (爱博泰克生物技术有限公司) 二抗 1:20 000 常温孵育 1 h, TBST 洗 PVDF 膜 3 次, 每次 10 min, 显影仪拍照记录实验结果。

2 结果与分析

2.1 筛选高水平表达的 *TaNRT* 和 *TaAMT* 基因

TaNRT 与 *TaAMT* 作为 NO_3^- -N 与 NH_4^+ -N 的转运蛋白在小麦各组织中表达量与其功能相对应。选取表达量大的 *TaNRT* 与 *TaAMT* 作为拟表达的抗原蛋白, 才能在后续研究中检测到其在小麦中分布与组织定位, 保证制备出的抗体在小麦组织中具有广泛的抗原分布。从网络数据库(<https://www.wheatproteome.org/>)中鉴定到 117 个 *TaNRT*/*TaNPF* 家族基因, 选择 FPKM \geq 5 的基因进行差异表达分析。网上数据库分析显示, *TaNRT*/*TaNPF* 在小麦不同组织器官中表达存在差异, 根系表达量最高, 其次为茎, 叶片中表达量较低, 选取根系中表达量高的基因为 *TaNRT3.1* (IWGSC 登录号: TraesCS6B01G238700.1)。茎中表达量高的 *TaNPF4.5* (IWGSC 登录号: TraesCS2A01G264500.1)进行原核表达(图 1A)。从三代转录组测序中鉴定到 405 个

TaNRT/*TaNPF* 家族基因、23 个 *AMT* 家族基因, 选择 FPKM \geq 5 的基因进行表达量分析。选择 *TaNRT*/*TaNPF* 家族基因中表达量最大的 *TaNPF8.3* (IWGSC 登录号: TraesCS1A02G197600), *TaAMT* 家族基因中表达量最大的 *TaAMT1.2* (IWGSC 登录号: TraesCS6B02G254800)进行原核表达(图 1B)。

2.2 候选 *TaNRT* 和 *TaAMT* 基因的表达特点分析

对筛选基因进行 qRT-PCR 验证, 结果如图 2 所示, *TaNPF4.5* 在茎秆中表达量较高, *TaAMT1.2*、*TaNRT3.1* 在根中表达量大, *TaNPF8.3* 在茎、叶、穗中表达量较大(图 2A)。小麦根、茎、叶、穗、籽粒 cDNA 等量混匀后进行 qRT-PCR, 结果显示 *TaNPF8.3* 表达量最高(图 2B)。qRT-PCR 结果与三代转录组测序一致。

2.3 获取候选 *TaNRT* 和 *TaAMT* 基因

使用特异性克隆引物, 以‘周麦 27’叶片的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证检测, 分别扩增出大小约为: 1 800、1 950、850 和 1 600 bp 的 4 条带, 与 *TaNPF4.5*、*TaNPF8.3*、*TaNRT3.1*、*TaAMT1.2* 的预期大小一致(图 3), 且测序结果与原序列一致。

2.4 选取 *TaNRT* 和 *TaAMT* 的待表达非跨膜区段

对 *TaNPF4.5*、*TaNPF8.3*、*TaNRT3.1* 及 *TaAMT1.2* 跨膜区段进行分析发现: *TaNPF4.5* 有膜外区段 6 个, 膜内区段 7 个, 跨膜区段 12 个; *TaNPF8.3* 有膜外区段 6 个, 膜内区段 7 个, 跨膜区段 12 个; *TaNRT3.1* 有膜外区段 1 个, 膜内区段 1 个, 跨膜区段 1 个; *TaAMT1.2* 有膜外区段 6 个, 膜内区段 6 个, 跨膜区段 11 个(图 4, 表 4)。因蛋白跨膜区段的疏水性高, 难以进行原核表达, 故选取 *TaNRT* 与 *TaAMT* 的膜外或膜内区段进行原核表达。为保证后续制备抗体

时抗原具有较高的抗原性，选取具有 50 个及以上氨基酸残基且无卷曲折叠区域的非跨膜区段进行原核表达。TaNPF4.5 选取 aa121-170 膜外区段(图 4A)、TaNPF8.3 选取 aa240-330 膜内区段(图 4B)、TaNRT3.1 选取 aa40-160 膜外区段(图 4C)，TaAMT1.2 选取 aa440-503 膜外区段(图 4D)进行原核表达。

2.5 非跨膜区多肽的抗原性及特异性分析

使用 Protean 软件分析 TaNRT 与 TaAMT 非跨膜区的抗原性、表面可及性和亲水性。NT-NPF4.5、NT-NPF8.3、NT-NRT3.1 和 NT-AMT1.2 的抗原性、表面可及性和亲水性(表 5)总体大于成功制备多克隆抗体谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)同工酶多肽序列的抗原性、表面

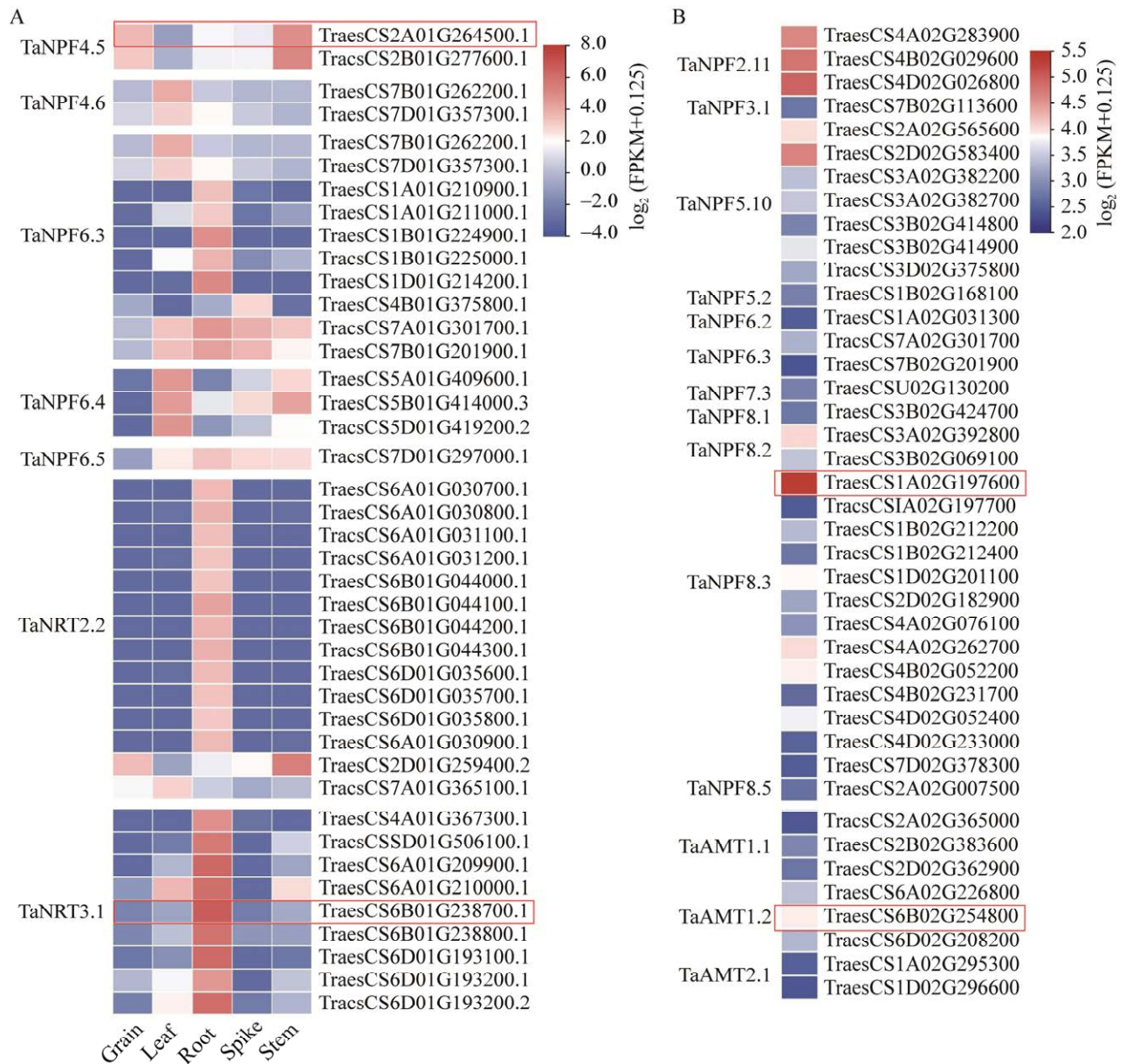


图 1 TaNRT/TaNPF 与 TaAMT 家族基因表达分析

Figure 1 Expression analysis of TaNRT/TaNPF and TaAMT gene families. A: Data from online databases. B: Data from third-generation transcriptome sequencing.

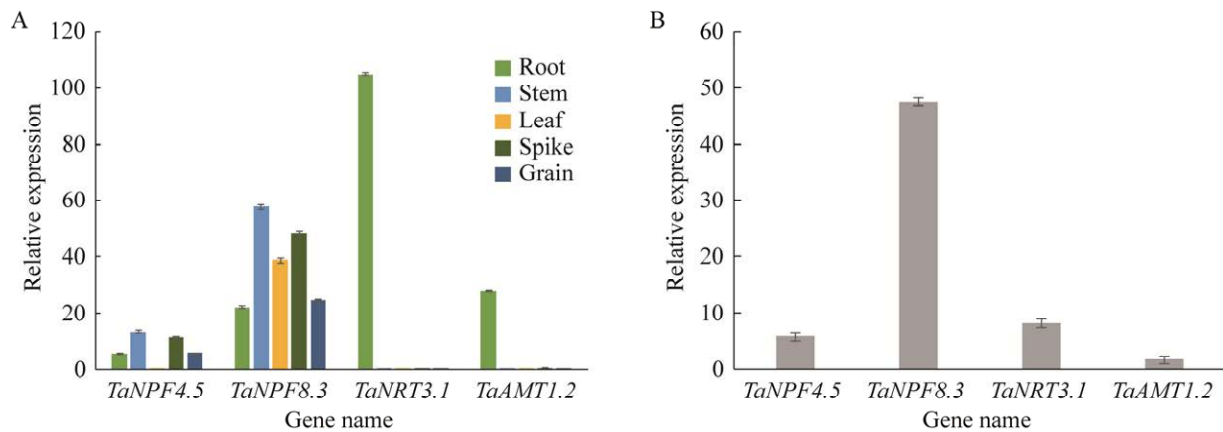


图2 qRT-PCR测定目的基因表达特点

Figure 2 The expression characteristics of target gene were determined by qRT-PCR A: qRT-PCR detection of target genes in different tissues of wheat. B: qRT-PCR detection of target genes in mixed samples of different tissues of wheat.

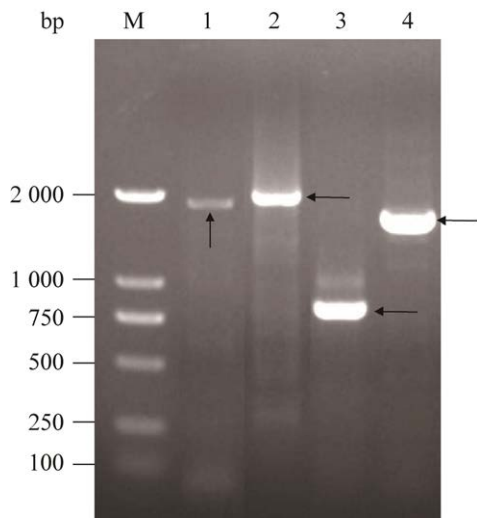


图3 目的基因的扩增

Figure 3 Amplification of target genes. Lane 1: *TaNPF4.5*; Lane 2: *TaNPF8.3*; Lane 3: *TaNRT3.1*; Lane 4: *TaAMT1.2*. M stands for DL2000 DNA Marker. Arrows: Target genes.

可及性和亲水性^[24]。本研究中 NPF4.5、NPF8.3、NRT3.1 和 AMT1.2 非跨膜区段的融合蛋白的抗原性满足制备抗体的条件。

所选 NT-TaAMT1.2、NT-TaNPF8.3、NT-TaNRT3.1 和 NT-TaNPF4.5 的氨基酸区段在 NCBI 小麦数据库中进行 BLAST 分析, NT-TaAMT1.2

比对到 4 个 *TaAMT1.2*, 同源性 100%; 4 个 *TaAMT1.1*, 同源性 68%。

NT-TaNPF4.5 比对到 13 个 *TaNPF4.5*, 其中同源性 98%–100% 只有 4 个; 与其余的 *TaNPF4.5*、10 个 *TaNPF4.6*、3 个 *TaNPF8.5* 和 35 个 *TaNPF8.3* 的同源性在 34% 至 68% 之间。NT-NPF8.3 比对到 40 个 *TaNPF8.3*, 其中同源性大于 96% 的只有 6 个; 与其余的 *TaNPF8.3*、4 个 *TaNPF8.5*、6 个 *TaNPF8.1* 及 9 个 *TaNPF8.2* 的同源性小于 50%。NT-TaNRT3.1 比对到 7 个 *TaNRT3.1* (*TaNAR2.1*)、4 个 *TaNAR2.2*, 同源性 86%–98%。目标区段是蛋白质的功能域, 其同源性高的蛋白属于同一家族, 其特异性与保守性满足抗体制备的条件。

2.6 构建非跨膜区多肽的原核表达载体

以测序正确的重组质粒为模板, 用无缝克隆引物进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证, 分别扩增出大小约为 160、300、400、200 bp 的目的条带(图 5A)。将 4 个目的片段纯化后与双酶切后的 pET-32a (图 5B) 载体同源重组, 成功构建出 *NT-TaNPF4.5*、*NT-TaNPF8.3*、*NT-TaNRT3.1*、*NT-TaAMT1.2* 重组载体。

2.7 非跨膜区多肽融合蛋白的诱导表达

预测 NT-TaNPF4.5、NT-TaNPF8.3、NT-TaNRT3.1、NT-TaAMT1.2 重组蛋白大小分别为 21.33、26.31、29.52、22.82 kDa。诱导前后菌体 SDS-PAGE 显示, 重组载体的融合蛋白在 37 °C 均有表达, 且 NT-TaNPF4.5、NT-TaNPF8.3、NT-TaNRT3.1 融合表达蛋白与理论值一致, 诱导 4 h 后表达量达最大; NT-TaAMT1.2 融合蛋

白特异表达带约 22 kDa, 与理论值一致, 诱导 3 h 后表达量达到最大(图 6A、6B)。将菌体超声破碎后分别将上清和沉淀进行 SDS-PAGE 鉴定后发现, NT-TaNPF4.5、NT-TaNPF8.3、NT-TaNRT3.1 诱导蛋白存在于沉淀中, 为包涵体蛋白, NT-TaAMT1.2 在上清和沉淀中都检测到目的蛋白条带, 并且上清液中的蛋白量多于沉淀中(图 6C)。

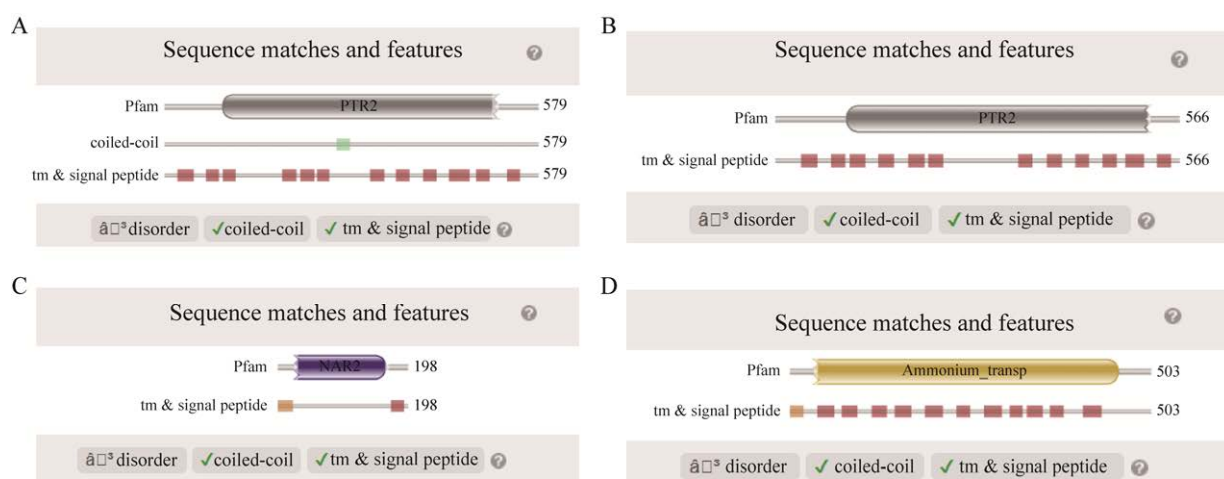


图 4 TaNRT 与 TaAMT 蛋白序列特征

Figure 4 Sequence characteristics of NRT and AMT proteins. A: TaNPF4.5. B: TaNPF8.3. C: TaNRT3.1. D: TaAMT1.2. ■: Signal peptide; ■: Transmembrane region; ■: Folded region.

表 4 TaNRT 与 TaAMT 跨膜区域统计

Table 4 Statistics of TaNPF and TaAMT transmembrane

Protein name	Transmembrane	Inside	Outside
TaNPF4.5	aa21-45, aa65-84, aa91-110, aa182-203, aa210-231, aa237-255, aa318-339, aa359-379, aa400-420, aa440-471, aa483-503, aa530-549	aa1-20, aa85-90, aa204-209, aa256-317, aa380-399, aa472-482, aa550-579	aa46-64, aa111-181 , aa232-236, aa340-358, aa421-439, aa504-529
TaNPF8.3	aa36-58, aa78-97, aa104-125, aa145-166, aa187-209, aa215-235, aa341-360, aa380-400, aa421-439, aa459-478, aa490-515, aa535-554	aa59-103, aa167-186, aa167-186, aa236-340 , aa401-420, aa479-489, aa555-566	aa1-35, aa126-144, aa210-214, aa361-379, aa440-458, aa516-534
TaNRT3.1	aa172-191	aa192-198	aa1-23 (signal peptide), aa24-171
TaAMT1.2	aa38-61, aa73-94, aa114-134, aa146-168, aa188-212, aa233-251, aa271-295, aa307-324, aa330-351, aa363-381, aa408-433	aa62-72, aa135-145, aa213-232, aa296-306, aa352-362, aa434-503	aa1-19 (signal peptide), aa20-37, aa95-113, aa169-187, aa252-270, aa325-329, aa382-407

The bolded section indicates the presentation section.

表 5 TaNRT 与 TaAMT 非跨膜区序列的抗原性、表面可及性、亲水性

Table 5 The antigenicity, surface accessibility and hydrophilicity of non-transmembrane regions of TaNRT and TaAMT

Name	Length (aa)	Antigenicity	Surface accessibility	Hydrophilicity
NT-TaNPF4.5	50	1.4	3.4	0.5
NT-TaNPF8.3	91	1.7	1.1	0.2
NT-TaNRT3.1	121	1.7	1.6	0.5
NT-TaAMT1.2	64	1.7	3.9	0.7

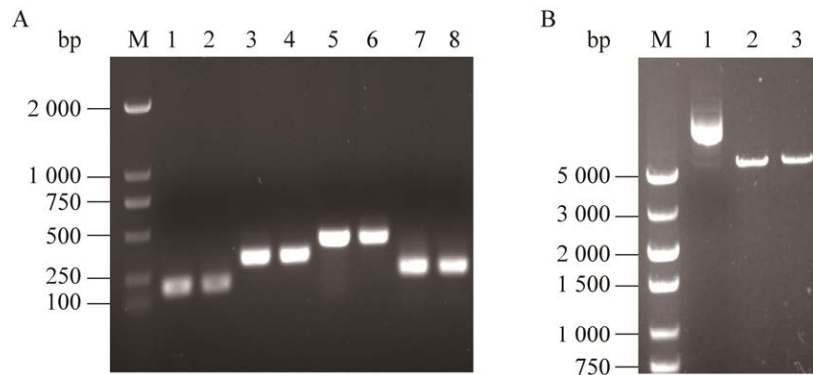


图 5 非跨膜区目的基因扩增(A)与质粒酶切(B)

Figure 5 Amplification of non-transmembrane region target gene (A) and plasmid enzyme digestion (B). A: Lane 1-2: *NT-TaNPF4.5*; Lane 3-4: *NT-TaNPF8.3*; Lane 5-6: *NT-TaNRT3.1*; Lane 7-8: *NT-TaAMT1.2*. M stands for DL2000 DNA marker. B: Lane 1: pET-32a plasmid; Lane 2-3: pET-32a vector digested by *Hind* III and *Kpn* I. M stands for DL5000 DNA marker.

2.8 非跨膜区多肽融合蛋白纯化

纯化融合蛋白纯度大于等于 85%时,可用于抗体的制备。pH 3.0 时有少许 NT-TaNPF4.5 融合蛋白被洗脱下来, pH 2.0 时蛋白洗脱量最大且纯度高,泳道 23、24、25 目的蛋白纯度分别为 85%、87%、87%,可用于抗体的制备(图 7A)。pH 4.0 时有少许 NT-TaNPF8.3 被洗脱下来, pH 3.0 时蛋白洗脱量大且纯度最高,泳道 21 目的蛋白纯度可达到 85%,可制备抗体(图 7B)。NT-TaNRT3.1 在 pH 6.3、pH 5.9 时大部分杂蛋白被洗脱, pH 4.5 时大量目的蛋白被洗脱,但可以看到目的蛋白的下方还有一些可能由于目的蛋白降解而产生的条带(图 7C)。NT-TaAMT1.2 作为可溶蛋白,采用咪唑梯度分离纯化,在咪唑浓度为 20 mmol/L 时目的

蛋白首先被洗脱下来,泳道 13 目的蛋白纯度高达 95%。咪唑浓度为 40 mmol/L 时泳道 14 目的蛋白纯度 92%,但当咪唑浓度再升高时,目的蛋白洗脱量增加的同时,杂蛋白也增多,对于 NT-TaAMT1.2,咪唑浓度为 40 mmol/L 即可(图 7D)。

2.9 非跨膜区 TaAMT.2 抗体检测

研究分化成熟组织蛋白质定位首选方法是稳定可靠的基于蛋白质抗体的免疫组化方法,抗原蛋白的表达与纯化是制备有效抗体的第一步。已制备获得 NT-TaAMT1-2 抗体,效价大于 9 841.5 K,抗体纯度大于 85%(图 8A),抗体效价与纯度达到要求。通过免疫印迹验证 NT-TaAMT1-2 抗体特异性(图 8B),杂交条带单一,抗体特异性良好。

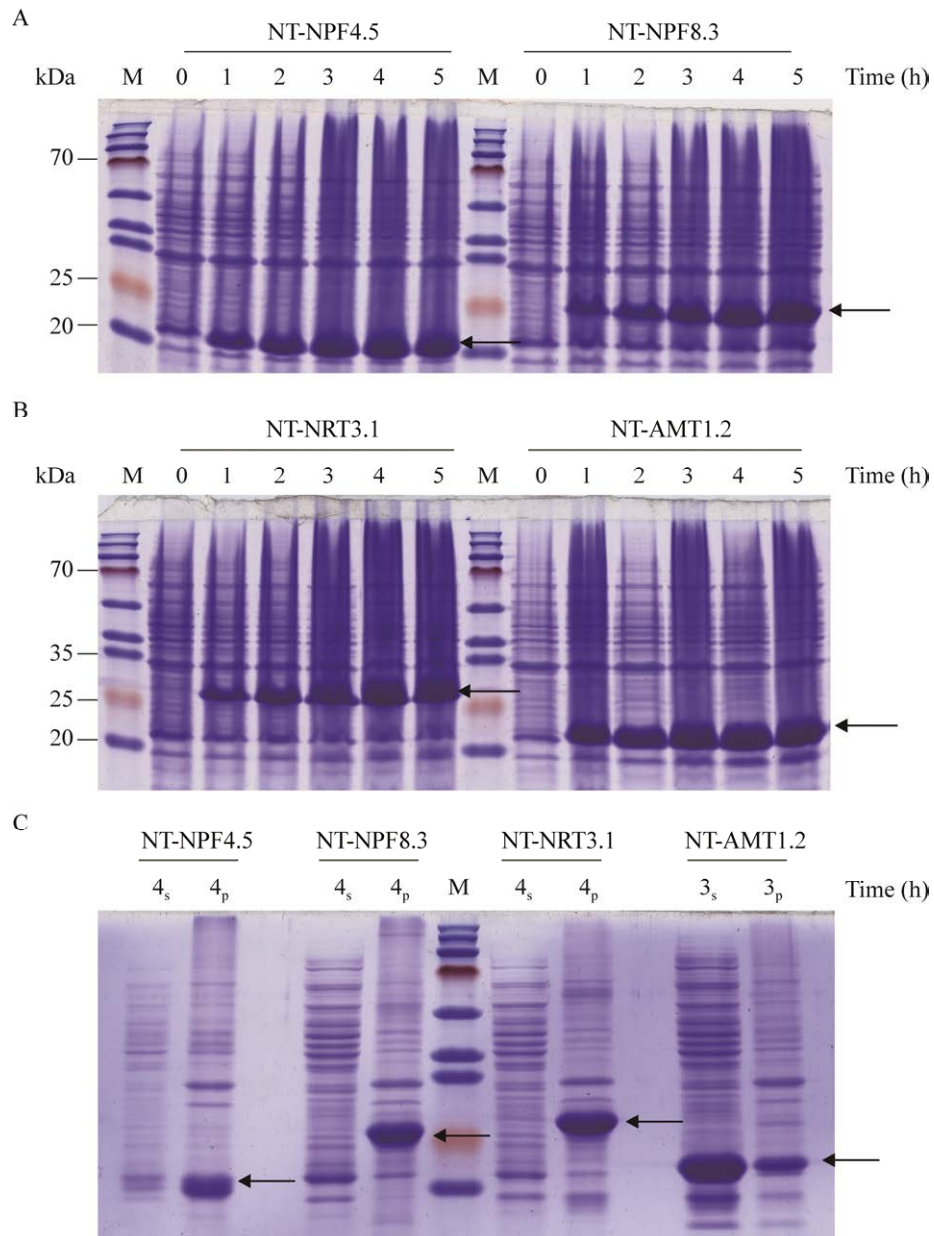


图 6 非跨膜区 TaNRT 与 TaAMT 重组蛋白诱导表达

Figure 6 Recombinant expression of non-transmembrane region TaNRT and TaAMT proteins. A, B: Induction expression of NT-TaNPF4.5, NT-TaNPF8.3, NT-TaNRT3.1, and NT-TaAMT1.2. C: Identification of induced proteins in the supernatant (s) and pellet (p). M stands for protein marker. Arrows: Target proteins.

3 讨论与结论

NRT 与 AMT 在植物氮素吸收与转运过程中起关键作用, NRT 通过植物根的表皮和皮层细胞从土壤中吸收 NO_3^- -N, 并进入木质部, 经

长距离运输至地上部。 NO_3^- -N 在植株体内的转运分别由位于根毛及根系表皮细胞质膜和内层组织细胞质膜上的 NRT 介导^[25]。植物主要通过 AMT 吸收、转运 NH_4^+ -N, 调控 AMT 蛋白的表达可有效控制根系对 NH_4^+ -N 的吸收。

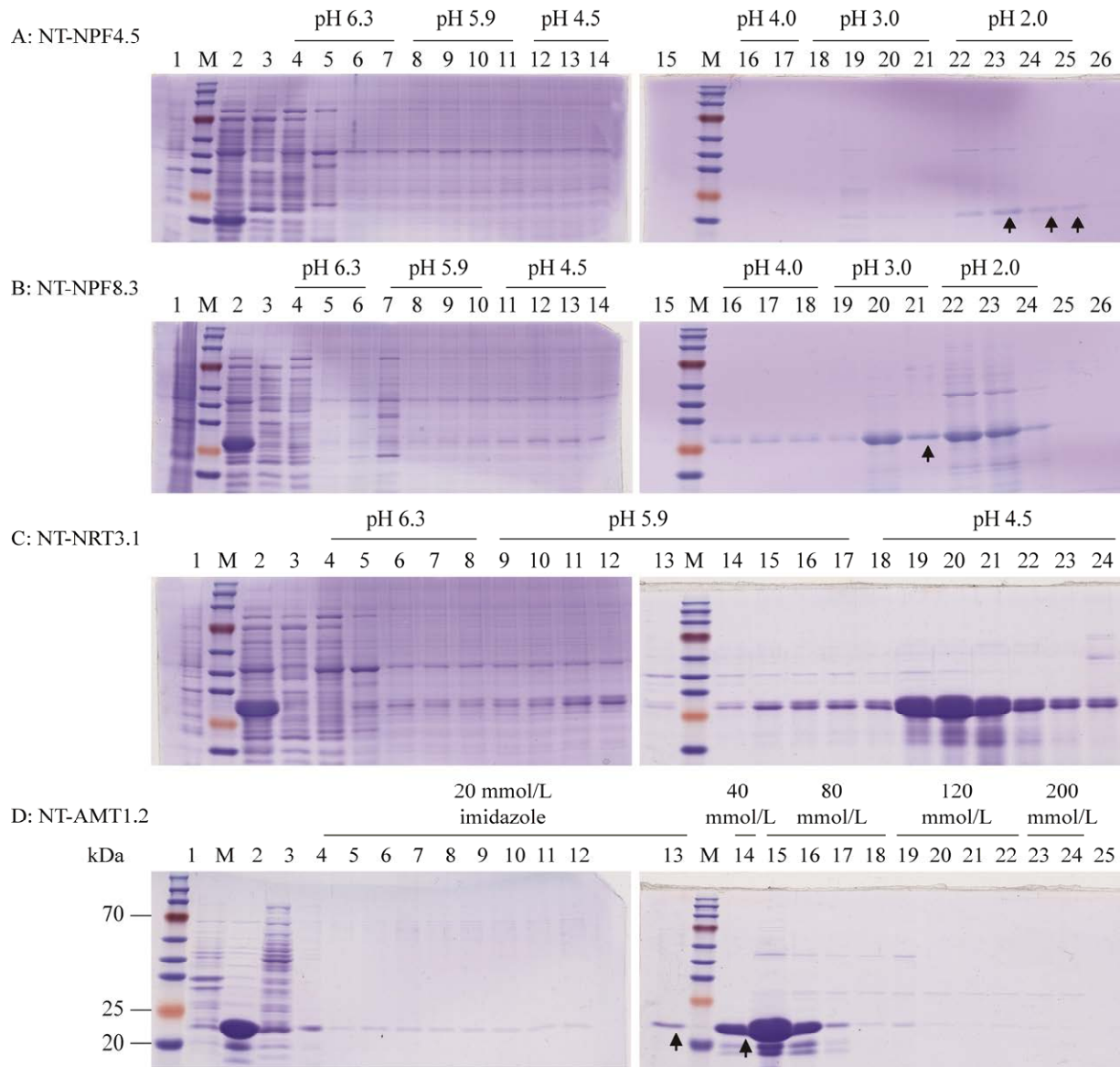


图 7 非跨膜区 TaNRT 与 TaAMT 重组蛋白纯化

Figure 7 Purification of non-transmembrane region TaNRT and TaAMT recombinant proteins. A: NT-TaNPF4.5. Lane 1: Before induction; Lane 2: After induction; Lane 3: After adsorption; Lane 4–7: Wash buffer pH 6.3; Lane 8–11: Elution buffer pH 5.9; Lane 12–14: Elution buffer pH 4.5; Lane 16–17: Elution buffer pH 4.0; Lane 18–21: Elution buffer pH 3.0; Lane 22–25: Elution buffer pH 2.0. B: NT-TaNPF8.3. Lane 1: Before induction; Lane 2: After induction; Lane 3: After adsorption; Lane 4–6: Wash buffer pH 6.3; Lane 7–10: Elution buffer pH 5.9; Lane 11–14: Elution buffer pH 4.5; Lane 16–18: Elution buffer pH 4.0; Lane 19–21: Elution buffer pH 3.0; Lane 22–24: Elution buffer pH 2.0. C: NT-TaNRT3.1. Lane 1: Before induction; Lane 2: After induction; Lane 3: After adsorption; Lane 4–8: Wash buffer pH 6.3; Lane 9–17: Elution buffer pH 5.9; Lane 18–24: Elution buffer pH 4.5. D: NT-TaAMT1.2. Lane 1: Before induction; Lane 2: After induction; Lane 3: After adsorption; Lane 4–13: Wash buffer 20 mmol/L imidazole; Lane 14: Elution buffer 40 mmol/L imidazole; Lane 15–18: Elution buffer 80 mmol/L imidazole; Lane 19–22: Elution buffer 120 mmol/L imidazole; Lane 23–24: Elution buffer 200 mmol/L imidazole. M stands for protein marker. Arrows: Proteins purity greater than or equal to 85%.

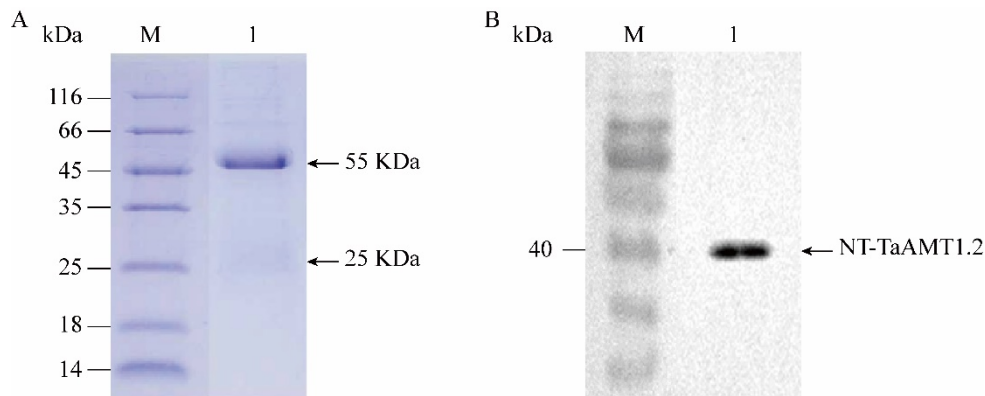


图 8 NT-TaAMT1.2 抗体纯度(A)与特异性检测(B)

Figure 8 Purity (A) and specificity (B) detection of NT-TaAMT1.2 antibody. A: Purity detection of NT-TaAMT1.2 antibody. Lane 1: 55 kDa antibody heavy chain, 25 kDa antibody heavy chain. B: Specificity validation of NT-TaAMT1.2 antibody. Lane 1: NT-TaAMT1.2. M: Stands for protein marker. Arrows: Target proteins.

普通小麦为异源六倍体($2n=6x=42$, AABBDD)的作物, 拥有着庞大而复杂的基因组^[26]。前期采用三代转录组测序方法, 在小麦中共鉴定到了 405 个 TaNRT/TaNPF 家族基因和 23 个 TaAMT 家族基因。在网上数据库与三代测序基础上, 选取表达量较大的 *TaNPF4.5*、*TaNPF5.10*、*TaNRT3.1*、*TaAMT1.2* 共 4 个基因作为拟表达蛋白。为了特异扩增基因的氨基酸编码序列(coding sequence, CDS), 首先在其非编码区设计特异性引物, 克隆成功后, 再设计引物克隆其 CDS。但 *TaNPF4.5*、*TaNPF5.10*、*TaNRT3.1*、*TaAMT1.2* 的 CDS 全长序列原核表达均未成功, 目前尚未见 NRT 与 AMT 的 CDS 全长序列表达成功的报道, 但有研究人员在拟南芥中使用 AtNRT1.7 的 N 末端非跨膜区 50 个氨基酸的肽产生了抗 AtNRT1.7 兔多克隆抗体^[27]。使用 SIET4 的非跨膜区 16 个氨基酸免疫家兔获得抗 SIET4 的抗体^[28]。转运蛋白的多段疏水跨膜结构, 增加了原核表达的难度。通过对蛋白跨膜结构的分析, 重新扩增了 *TaNPF4.5*、*TaNRT3.1* 膜外非跨膜区段, *TaNPF5.10*、*TaAMT1.2* 膜内非跨膜区段, 构建了 pET-32a 重组载体, 并成功表达了融合蛋白。其中 NT-TaNPF4.5、

NT-TaNPF8.3、NT-TaNRT3.1 为包涵体蛋白, NT-TaAMT1.2 在上清液和包涵体均有表达, 且上清液表达量大于沉淀。

同样作为吸收、转运氮的转运蛋白, 转运 NO_3^- -N 的 NT-TaNPF4.5、NT-TaNPF8.3、NT-TaNRT3.1 表达为包涵体, 而转运 NH_4^+ -N 的 NT-TaAMT1.2 则为可溶形式表达。包涵体蛋白采用 pH 梯度分离纯化。NT-TaNPF4.5 在 pH 2.0 时纯化蛋白纯度可达到 87%。NT-TaNPF8.3 在 pH 3.0 时纯化蛋白纯度可达到 85%, 但从 pH 2.0 的纯化结果可以看出, 杂蛋白洗脱不够充分, 应增加 pH 6.3、pH 5.9 的洗脱液体积, 把大部分杂蛋白洗脱, 从而在 pH 2.0 时得到纯度更高且量更多的目的蛋白。NT-TaNRT3.1 在 pH 4.5 时大量目的蛋白被洗脱, 但可以看到目的蛋白的下方还有可能由于目的蛋白降解而产生的条带, 后续可通过 his 抗体的免疫印迹实验验证, 若为蛋白降解, 则不影响抗体的制备。即使同样对 NO_3^- -N 进行吸收、转运的 NRT, 其洗脱目的蛋白的 pH 也不相同。NT-TaAMT1.2 作为可溶蛋白, 采用咪唑梯度分离纯化, 咪唑浓度为 20 mmol/L 时, 泳道 13 蛋白纯度高达 95%。

咪唑浓度为 40 mmol/L 时蛋白纯度 92%，但当咪唑浓度升高时，目的蛋白洗脱量增加的同时，杂蛋白也增多，因此对于 NT-TaAMT1.2，咪唑浓度为 40 mmol/L 即可。纯度达到制备抗体要求的蛋白，其蛋白量较少，可大量表达纯化后，NT-TaNPF4.5、NT-TaNPF8.3、NT-TaNRT3.1 可使用透析袋对包涵体蛋白在磷酸盐缓冲液中进行复性，NT-TaAMT1.2 使用超滤管进行超滤浓缩。对于有杂蛋白存在的泳道可通过蛋白胶回收或蛋白电洗脱的方式直接对目的融合蛋白进行回收。

膜蛋白的表达与纯化一直是难题，本研究中 NRT 与 AMT 的表达纯化方法可为膜蛋白的表达提供一种借鉴思路。获得非跨膜区段纯化蛋白，为后续制备目的蛋白的多克隆抗体提供了有效抗原，TaAMT1.2 抗体的成功制备进一步证明这一思路的可行性，也为深入研究 TaNRT 和 TaAMT 的表达特点与组织定位奠定了基础。

REFERENCES

- [1] 姚海坡, 张经廷, 姚艳荣, 崔永增, 郑孟静, 崔江慧, 贾秀领. 长期定位条件下氮肥对优质小麦氮素利用率及产量的影响[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(24): 71-77.
YAO HP, ZHANG JY, YAO YR, CUI YZ, ZHENG MJ, CUI JH, JIA XL. Influences of nitrogen fertilizer on nitrogen use efficiency and yield of high-quality wheat under long-term location condition[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2023, 51(24): 71-77 (in Chinese).
- [2] ZHAN N, XU K, JI GX, YAN GX, CHEN BY, WU XM, CAI GQ. Research progress in high-efficiency utilization of nitrogen in rapeseed[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(9): 7752-7766.
- [3] 杨婷, 钟全林, 李宝银, 程栋梁, 徐朝斌, 邹宇星, 张雪, 周宗哲. 短期铵态氮与硝态氮配施对刨花楠幼苗生长及叶片性状的影响[J]. 应用生态学报, 2022, 33(1): 25-32.
YANG T, ZHONG QL, LI BY, CHENG DL, XU CB, ZOU YX, ZHANG X, ZHOU ZZ. Effects of short-term combined application of ammonium nitrogen and nitrate nitrogen on the growth and leaf traits of *Machilus pauhoi* seedlings[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2022, 33(1): 25-32 (in Chinese).
- [4] CAÑAS RA, QUILLERÉ I, GALLAIS A, HIREL B. Can genetic variability for nitrogen metabolism in the developing ear of maize be exploited to improve yield?[J]. The New Phytologist, 2012, 194(2): 440-452.
- [5] XU GH, FAN XR, MILLER AJ. Plant nitrogen assimilation and use efficiency[J]. Annual Review of Plant Biology, 2012, 63: 153-182.
- [6] HAWKESFORD MJ. Genetic variation in traits for nitrogen use efficiency in wheat[J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(10): 2627-2632.
- [7] TEGEDER M, MASCLAUX-DAUBRESSE C. Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use[J]. The New Phytologist, 2018, 217(1): 35-53.
- [8] MILLER AJ, CRAMER MD. Root nitrogen acquisition and assimilation[J]. Plant and Soil, 2005, 274(1): 1-36.
- [9] AMTMANN A, ARMENGAUD P. Effects of N, P, K and S on metabolism: new knowledge gained from multi-level analysis[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2009, 12(3): 275-283.
- [10] 韦一昊. 小麦谷氨酰胺合成酶同工酶的定位、表达与功能研究[D]. 郑州: 河南农业大学博士学位论文, 2020.
WEI YH. Study on cellular localization, expression and function of glutamine synthetase isozymes in wheat[D]. Zhengzhou: Doctoral Dissertation of Henan Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [11] BAJGAIN P, RUSSELL B, MOHAMMADI M. Phylogenetic analyses and in-seedling expression of ammonium and nitrate transporters in wheat[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 7082.
- [12] ALUKO OO, KANT S, ADEDIRE OM, LI CZ, YUAN G, LIU HB, WANG Q. Unlocking the potentials of nitrate transporters at improving plant nitrogen use efficiency[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1074839
- [13] LÉRAN S, VARALA K, BOYER JC, CHIURAZZI M, CRAWFORD N, DANIEL-VEDELE F, DAVID L, DICKSTEIN R, FERNANDEZ E, FORDE B, GASSMANN W, GEIGER D, GOJON A, GONG JM, HALKIER BA, HARRIS JM, HEDRICH R, LIMAMI AM, RENTSCH D, SEO M, et al. A unified nomenclature of nitrate transporter 1/peptide transporter family members in plants[J]. Trends in Plant Science, 2014, 19(1): 5-9.

- [14] OKAMOTO M, KUMAR A, LI WB, WANG Y, SIDDIQI MY, CRAWFORD NM, GLASS ADM. High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the NAR2-like gene *AtNRT3.1*[J]. *Plant Physiology*, 2006, 140(3): 1036-1046.
- [15] LEZHNEVA L, KIBA T, FERIA-BOURRELLIER AB, LAFOUGE F, BOUTET-MERCEY S, ZOUFAN P, SAKAKIBARA H, DANIEL-VEDELE F, KRAPP A. The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT2.5 plays a role in nitrate acquisition and remobilization in nitrogen-starved plants[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2014, 80(2): 230-241.
- [16] HO CH, LIN SH, HU HC, TSAY YF. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants[J]. *Cell*, 2009, 138(6): 1184-1194.
- [17] HE YN, PENG JS, CAI Y, LIU DF, GUAN Y, YI HY, GONG JM. Tonoplast-localized nitrate uptake transporters involved in vacuolar nitrate efflux and reallocation in *Arabidopsis*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 6417.
- [18] TAL I, ZHANG Y, JORGENSEN ME, PISANTY O, BARBOSA ICR, ZOURELIDOU M, REGNAULT T, CROCOLL C, OLSEN CE, WEINSTAIN R, SCHWECHHEIMER C, HALKIER BA, NOUR-ELDIN HH, ESTELLE M, SHANI E. The *Arabidopsis* NPF3 protein is a GA transporter[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11486.
- [19] KOMAROVA NY, THOR K, GUBLER A, MEIER S, DIETRICH D, WEICHERT A, SUTER GROTEMAYER M, TEGEDER M, RENTSCH D. AtPTR1 and AtPTR5 transport dipeptides in planta[J]. *Plant Physiology*, 2008, 148(2): 856-869.
- [20] KANNO Y, KAMIYA Y, SEO M. Nitrate does not compete with abscisic acid as a substrate of AtNPF4.6/NRT1.2/AIT1 in *Arabidopsis*[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2013, 8(12): e26624.
- [21] LOQUÉ D, WIRÉN NV. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(401): 1293-1305.
- [22] PORRAS-MURILLO R, ZHAO YF, HU JL, IJATO T, RETAMAL JP, LUDEWIG U, NEUHÄUSER B. The wheat AMT2 (ammonium transporter) family, possible functions in ammonium uptake and pathogenic/symbiotic interactions[J]. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2023, 186(2): 164-168.
- [23] WANG XC, WANG LL, ZHANG ZY, QIN BT, YU MQ, WEI YH, MA XM. Transcription characteristics of wheat glutamine synthetase isoforms and the sequence analysis of their promoters[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2021, 47(4): 761-769.
- [24] WEI YH, XIONG SP, ZHANG ZY, MENG XD, WANG LL, ZHANG XJ, YU MQ, YU HD, WANG XC, MA XM. Localization, gene expression, and functions of glutamine synthetase isozymes in wheat grain (*Triticum aestivum* L.)[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 580405.
- [25] WANG YY, HSU PK, TSAY YF. Uptake, allocation and signaling of nitrate[J]. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(8): 458-467.
- [26] ALAUX M, ROGERS J, LETELLIER T, FLORES R, ALFAMA F, POMMIER C, MOHELLIBI N, DURAND S, KIMMEL E, MICHOTÉY C, GUERCHE C, LOAEC M, LAINÉ M, STEINBACH D, CHOLET F, RIMBERT H, LEROY P, GUILHOT N, SALSE J, FEUILLET C, et al. Linking the International Wheat Genome Sequencing Consortium bread wheat reference genome sequence to wheat genetic and phenomic data[J]. *Genome Biology*, 2018, 19(1): 111.
- [27] FAN SC, LIN CS, HSU PK, LIN SH, TSAY YF. The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.7, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate[J]. *The Plant Cell*, 2009, 21(9): 2750-2761.
- [28] MITANI-UENO N, YAMAJI N, HUANG S, YOSHIOKA Y, MIYAJI T, MA JF. A silicon transporter gene required for healthy growth of rice on land[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 6522.

(本文责编 郝丽芳)