

李志伟, 李本杰, 刘志兵, 等. 基于 FRET 原理构建 AtLHT1 转运底物筛选探针 [J]. 华南农业大学学报, 2022, 43(1): 77-84.
LI Zhiwei, LI Benjie, LIU Zhibing, et al. Construction of AtLHT1 probe for its transport substrate screening based on FRET principle[J]. Journal of South China Agricultural University, 2022, 43(1): 77-84.

基于 FRET 原理构建 AtLHT1 转运底物筛选探针

李志伟¹, 李本杰¹, 刘志兵¹, 林 菲¹, 徐汉虹¹, 舒 薇²

(1 华南农业大学 天然农药与化学生物学教育部重点实验室, 广东 广州 510642;

2 华南农业大学 测试中心, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】为提高导向药物筛选通量, 加快导向农药分子设计、合成、筛选等研发速度, 构建基于拟南芥氨基酸转运蛋白 AtLHT1 的荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)探针作为导向农药筛选平台。【方法】构建 CFP-LHT1-YFP 的三明治探针, 分别在大肠埃希菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 原核细胞和 BY4741 酵母细胞中进行表达、鉴定和纯化。采用荧光酶标仪和激光共聚焦检测 FRET 效率的变化。【结果】CFP-AtLHT1-YFP 融合蛋白探针纯化后, 分别与供试氨基酸和草甘膦混合, 供试氨基酸和草甘膦的加入导致探针蛋白的 FRET 比率发生明显变化, 草甘膦处理使 $D_{535\text{ nm}}/D_{480\text{ nm}}$ 升高 7%~12%, 其变化趋势与阳性配体甘氨酸和谷氨酸接近, 而加入阴性配体精氨酸则没有明显变化。同时, FRET 比率呈现底物浓度依赖。样品中分别加入 1、5 和 30 mmol/L 的草甘膦溶液, 20 min 后检测到 $D_{535\text{ nm}}/D_{480\text{ nm}}$ 分别升高 3%、1% 和 13%, 阳性配体也存在 FRET 比率随着底物浓度上升而升高的趋势, 而阴性配体变化不规则。利用光漂白法检测到氨基酸或草甘膦处理后单个酵母细胞的 FRET 效率发生明显变化。加入阳性对照的甘氨酸和谷氨酸后, FRET 效率变化明显, 其中, 甘氨酸和谷氨酸的 FRET 效率分别达到 30% 和 26%; 加入草甘膦处理的 FRET 效率与谷氨酸接近, 达 26%; 含 PBS 的空白对照组没有明显的 FRET 效率变化。【结论】AtLHT1-FRET 探针可以与中性氨基酸甘氨酸和酸性氨基酸谷氨酸结合, 但不结合碱性氨基酸精氨酸; FRET 效率因不同底物有所差异, 且具有一定的底物浓度依赖性; 同时, 证明了草甘膦能够被氨基酸转运蛋白 AtLHT1 转运。

关键词: 荧光共振能量转移; AtLHT1; FRET 探针; 导向农药
中图分类号: S482 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2022)01-0077-08

Construction of AtLHT1 probe for its transport substrate screening based on FRET principle

LI Zhiwei¹, LI Benjie¹, LIU Zhibing¹, LIN Fei¹, XU Hanhong¹, SHU Wei²
(1 Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 Instrumental Analysis & Research Center, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】In order to improve the efficiency of guided-pesticides screening and accelerate the research and development of molecular design, synthesis and screening of guided-pesticides, a fluorescence resonance energy transfer (FRET) probe based on *Arabidopsis thaliana* amino acid transporter AtLHT1 was

constructed as guided-pesticide screening platform in this study. 【Method】 The sandwich molecular probe of CFP-LHT1-YFP was constructed and expressed in prokaryotic cell of *Escherichia coli* BL21(DE3) and BY4741 yeast cell, respectively, then identified and purified. The change of FRET efficiency was detected with fluorescence microplate reader and laser scanning confocal microscope. 【Result】 The CFP-AtLHT1-YFP fusion protein probe was purified and mixed with the tested amino acids and glyphosate, respectively. The addition of the tested amino acids and glyphosate resulted in significant changes in the FRET ratio of the probe protein. Glyphosate treatment resulted in the $D_{535\text{ nm}}/D_{480\text{ nm}}$ increase of 7% to 12%. The similar tendency was also observed in the treatments of positive ligands using glycine and glutamic acid, but no obvious change was observed in the treatment of negative ligand using arginine. The FRET ratio showed substrate concentration dependence. At 20 min after the addition of 1, 5 and 30 mmol/L glycine, the increase of $D_{535\text{ nm}}/D_{480\text{ nm}}$ were 3%, 1% and 13% respectively. FRET ratio increased with the increase of substrate concentration in treatments with positive ligand, while the changes were not regular in treatments with negative ligand. Significant changes in FRET efficiency were also detected in individual yeast cells after treatment with amino acids or glyphosate using the photobleaching method. Changes in FRET efficiency were more pronounced with the addition of positive controls of glycine and glutamic acid, with 30% FRET efficiency for glycine and 26% for glutamic acid. The addition of glyphosate resulted in 26% FRER efficiency which was close to that of glutamic acid. The blank control containing PBS buffer showed no significant change in FRET efficiency. 【Conclusion】 The AtLHT1-FRET probe can bind to the neutral amino acid glycine and the acidic amino acid glutamic acid, but not to the basic amino acid arginine. The FRET efficiency varies among different substrates with some concentration dependence. It is demonstrated that glyphosate can be transported by the amino acid transporter protein AtLHT1.

Key words: Fluorescence resonance energy transfer; AtLHT1; FRET probe; Guided pesticide

导向农药是将农药有效成分与导向载体偶联后使其能在植物体内特定部位(果实、叶、芽或病虫害造成的伤口)定向累积的新型农药^[1]。在大多数情况下,农药是通过被动扩散或离子捕获机制跨生物膜运输。此外,一些小的农用化学分子可以通过物质膜转运系统转运^[2],这表明这些转运蛋白的特异性并不严格受限于它们的天然生理底物^[3]。在制药领域,一些转运蛋白被广泛认为是药物动力学的重要决定因素,在某些药物进入靶器官的过程中起着至关重要的作用^[4]。因此,农药分子定向修饰后,可以被植物体内的转运蛋白识别并转运,从而提高农药分子在植物体内的靶向输导能力。选择合适的植物转运蛋白并分析其结构与底物之间的构效关系,是导向农药化学结构设计和优化的关键。潜在的农药转运蛋白应具有相对较高的通量和较宽的底物特异性,并且不影响韧皮部组织液的循环^[5]。由于糖、氨基酸和寡肽的植物转运系统在植物组织中的表达和功能,它们被认为是新农药创制的可能靶标。其中一些转运蛋白已经被证明具有广泛的底物特异性,例如拟南芥蔗糖转运蛋白 AtSUT2,除转运蔗糖外,还能够转运一系列糖苷,包括天然存在的香豆素糖苷^[6];拟南芥组氨酸/赖氨酸转运蛋白 AtLHT1 可以转运 L-谷氨酰胺-氟虫腈等一系列

保留 α 氨基的电中性共轭物^[7];蓖麻单糖转运蛋白 RcSTP1 可以转运葡萄糖基-氟虫腈 (GTF) 等一系列糖基偶合物^[8]。

LHT1 属于拟南芥氨基酸转运蛋白家族 (Amino acid transporter family, ATF), ATF 是植物中最先报道的氨基酸转运蛋白家族。ATF 在植物对氨基酸的吸收、转运、长距离运输及“源”和“库”再分配过程中扮演着重要角色。在植物根部吸收氨基酸的转运蛋白研究中,Chen 等^[9]报道了拟南芥第 1 个参与植物根部吸收氨基酸的转运蛋白——AtLHT1,后续研究表明其对中性氨基酸和酸性氨基酸有很高的亲和力,是植株在自然浓度下从土壤中吸收氨基酸的关键性转运蛋白^[10]。在以氨基酸或氨基酸衍生物为导向农药的研究中,Chen 等^[11]利用电生理技术证明了甘氨酸甲酯-氯虫苯甲酰胺 (CAP-Gly-2) 会引起表达有 AtLHT1 的爪蟾卵母细胞的膜电位变化,并且在植株水平上,AtLHT1 转录水平的变化会影响拟南芥对甘氨酸甲酯-氯虫苯甲酰胺的吸收,从而证明了该药物可能被 AtLHT1 转运。Xie 等^[12]在植株水平和爪蟾卵母细胞异源水平均证明了 AtLHT1 可以影响甘氨酸甲酯-氯虫苯甲酰胺的吸收。由于 AtLHT1 转运底物的广谱性,以其为基础设计开发一种简单快速的导向农药输导性的检测

方法, 有可能得到在植株中具有良好输导性的化合物, 从而加快导向农药的研发进程。

如果 2 个荧光团相距为 1~10 nm, 且 1 个荧光团 (供体) 的发射光谱与另 1 个荧光团 (受体) 的吸收光谱有重叠, 当供体被入射光激发时, 可通过偶极-偶极耦合作用将其能量以非辐射方式传递给受体分子, 供体分子衰变到基态而不发射荧光, 受体分子由基态跃迁到激发态, 再衰变到基态同时发射荧光, 这一过程称为荧光共振能量转移 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET)^[13]。FRET 现象最早由 Förster^[14] 阐明, 在绿色荧光蛋白发现后基于荧光蛋白的 FRET 探针在生命科学领域已广泛应用, 如蛋白质与蛋白质相互作用、蛋白质构象的变化、酶类活性研究、细胞信号通路的研究等^[15], 常用的 FRET 荧光基团有 CFP-YFP、CFP-dsRED、BFP-GFP、Cy3-Cy5、YFP-TRITC、YFP-Cy3 等^[16]。FRET 探针被用于蛋白与底物的检测, 如基于麦芽糖结合蛋白与底物结合后的构象变化构建出麦芽糖检测的 FRET 探针, 其探针构建是在麦芽糖结合蛋白的两端分别添加 YFP 和 CFP 形成“三明治”融合蛋白。当麦芽糖结合蛋白与底物结合后, 使蛋白构象发生变化, FRET 探针的荧光效率发生变化^[17]。本研究基于 FRET 原理, 将氨基酸转运蛋白 AtLHT1 两端添加青色荧光蛋白 (Cyan fluorescence protein CFP) 和黄色荧光蛋白 (Yellow fluorescence protein, YFP) 基团构建 FRET 探针, 拟通过酵母细胞或原核表达蛋白的荧光比率变化来验证 AtLHT1 参与多种

氨基酸的转运功能, 并运用于农药的筛选。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试药物 草甘膦 (Glyphosate)、谷氨酸 (Glutamic acid)、精氨酸 (Arginine)、甘氨酸 (Glycine) 均购于 Sigma-Aldrich 公司。

1.1.2 质粒与菌株 含有 CFP 和 YFP 基因序列的 Ubi-YFP-CFP-SV40-NOS 载体由华南农业大学生命科学学院陈乐天教授课题组惠赠, 大肠埃希菌 DH5α、BL21(DE3) 感受态细胞购自天根生物试剂公司, pREST 系列载体购于 Takara 公司。BY4741 酵母和 pDR196 载体由华南农业大学天然农药与化学生物学教育部重点实验室保存。

1.1.3 主要仪器 PCR Thermal Cycler Dice TP600 (Takara), Power Pac Universal 型恒压恒电流泳仪 (Biorad), ND1000 核算蛋白定量仪 (Eppendorf), Tanon 1600 凝胶成像仪 (广州誉维), 荧光显微镜 (日本 Olympus), Leica TCS SP8 STED 3X 激光共聚焦显微镜 (德国 Leica), FLx800 荧光分析仪 (美国 BioTek)。

1.2 方法

1.2.1 表达载体构建 在 CFP 的 C 端和 YFP 的 N 端分别添加 linker 序列 GGTACCGGAGGCGCC 和 GGCGCCGGTACCG^[18], 构建的 CFP-LHT1-YFP 三明治探针, 分别连接到 pRSET-A 原核表达载体和 pDR196 酵母表达载体, 构建方法如图 1 所示。

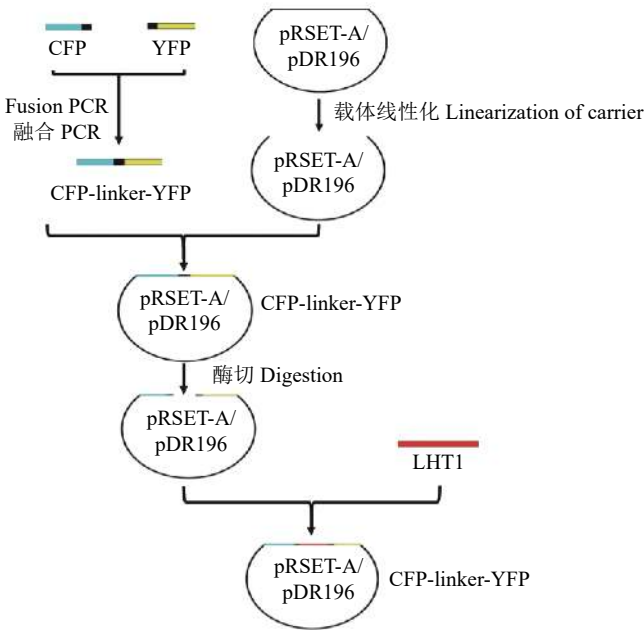


图 1 CFP-LHT1-YFP 三明治探针表达载体的构建

Fig. 1 Construction of expression vector of CFP-LHT1-YFP sandwich probe

1.2.2 原核表达及酶标仪荧光检测 将测序结果正确的 pDR196-CFP-linker-LHT1-YFP 质粒转入 BL21(DE3) 感受态细胞中, 挑取经氨苄青霉素抗性 LB 平板筛选的阳性克隆接种于 5 mL SOB 液体培养基, 30 ℃ 摇床培养至 $D_{600\text{ nm}} = 0.4\sim0.6$, 取 1 mL 菌液至 100 mL 新鲜 SOB 培养基, 加入终浓度为 0.05 mmol/L 的 IPTG 诱导剂, 30 ℃ 摇床继续培养。加入 IPTG 时的时间记为 0 h, 间隔 1 h 取 1 mL 菌液, 试验进行 6 h, 所取样品经 SDS-PAGE 电泳后用考马斯亮蓝染色确定表达时间, 通过 Western blot 验证该条带是否为目的条带。采用全式金公司的 ProteinIso Ni_NTA 填料柱对诱导表达后的蛋白进行纯化。

在 96 孔黑色底部不透光的酶标板内, 加入经 BL21 表达后纯化的蛋白探针和待测底物, 选择 430 nm 激发光激发, 检测 $480 \pm 20\text{ nm}$ 和 $535 \pm 20\text{ nm}$ 2 个波段的光强变化及 FRET 比率($D_{535\text{ nm}}/D_{480\text{ nm}}$)。如果有明显的 FRET 发生, CFP 的能量会通过 FRET 传递给 YFP, 从而使 YFP 荧光强度增加, 最终导致 FRET 比率升高。在不同底物浓度对 LHT1-FRET 探针光强变化影响试验中, 作为阳性对照的甘氨酸加入浓度为 0.5、5 和 100 mmol/L, 谷氨酸加入浓度为 5 和 50 mol/L, 草甘膦加入浓度为 1、5 和 30 mmol/L, 作为阴性对照的精氨酸、2, 4-二氯苯氧乙酸、乙氧氟草醚, 加入浓度均为 10 mmol/L。

1.2.3 酵母真核表达及共聚焦检测 把保存的 BY4741 酵母在固体 YPDA 培养基上划线活化用于制备酵母感受态, 利用酵母转化试剂盒(Takara) 将 pRSET-A-CFP-linker-LHT1-YFP 质粒转入 BY4741 酵母感受态细胞后涂板。设置序列扫描, 序列 1 的

激发光波长为 405 nm, 发射光检测波长范围为 450~490 nm, 序列 2 的激发光波长为 514 nm, 发射光检测波长范围为 525~570 nm。挑选阳性克隆至载玻片, 分序列扫描确定 YFP 和 CFP 在酵母中的表达是否正确, 筛选表达正确的克隆。将转入质粒的酵母单克隆转至 YPD 培养基中, 30 ℃、250 r/min 培养至 $D_{600\text{ nm}} = 1$, 取 1 mL 菌液离心后去上清液, 沉淀用 20 mmol/L pH 7.0 的 PBS 缓冲液漂洗 3 次后, 在 PBS 缓冲液中处理 24 h 后, 加入浓度均为 10 mmol/L 的药物处理, 取处理液 10 μL 至多聚赖氨酸处理后的共聚焦培养皿, 设置供体激发光波长为 405 nm, 受体激发光波长为 514 nm, 选定发光区域后, 用 100% 的 514 nm 激光漂白 YFP, 观察 CFP 的荧光强度是否增加, 根据 FRET 效率公式计算:

$$\text{FRET效率} = (\text{处理后荧光强度} - \text{处理前荧光强度}) /$$
$$\text{处理后荧光强度} \times 100\%。$$

1.2.4 统计分析 数据整理和分析采用 IBM SPSS Statistics 25 和 ExceL 2003 软件, 结果用 3 次重复的平均值 $\pm$ 标准误表示。用 Duncan's 法比较分析各处理间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 目的基因片段的获取及表达载体的构建

在 CFP 的 C 端和 YFP 的 N 端分别添加 linker 序列, 第 1 轮 PCR 扩增分别得到 760 bp 的 CFP-linker 和 linker-YFP 片段(图 2A)。经第 2 轮融合 PCR 扩增拼接获得 1.5 kb 的 CFP-linker-YFP 片段。再以第 2 轮产物为模板, 进行第 3 轮融合 PCR, 大量扩增 CFP-linker-YFP 片段(图 2B), 胶回收后的 CFP-

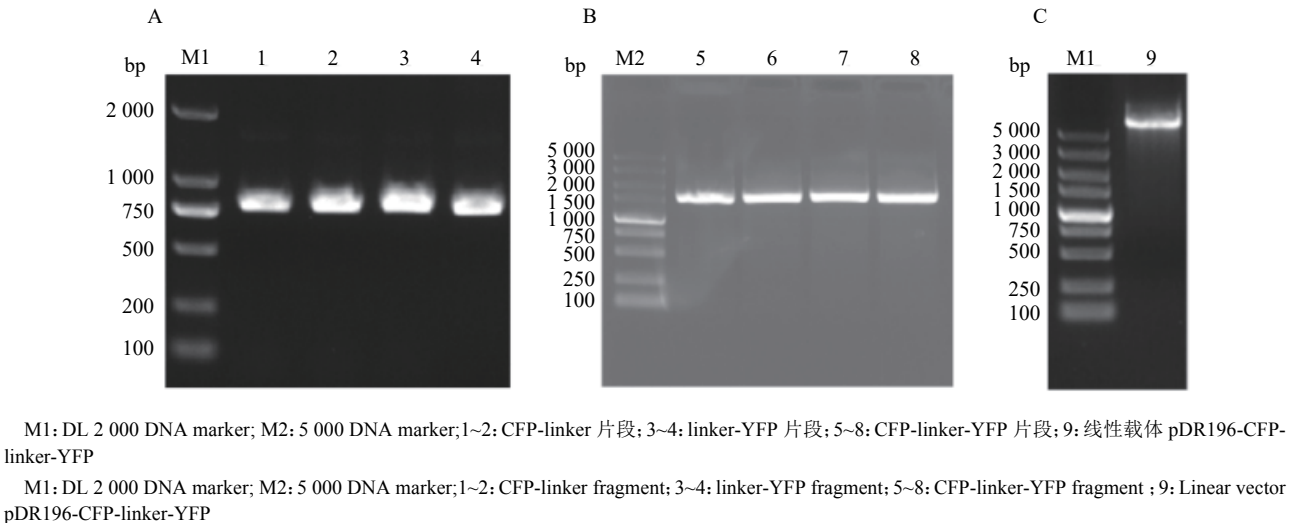


图 2 目的基因片段的获取及表达载体的构建

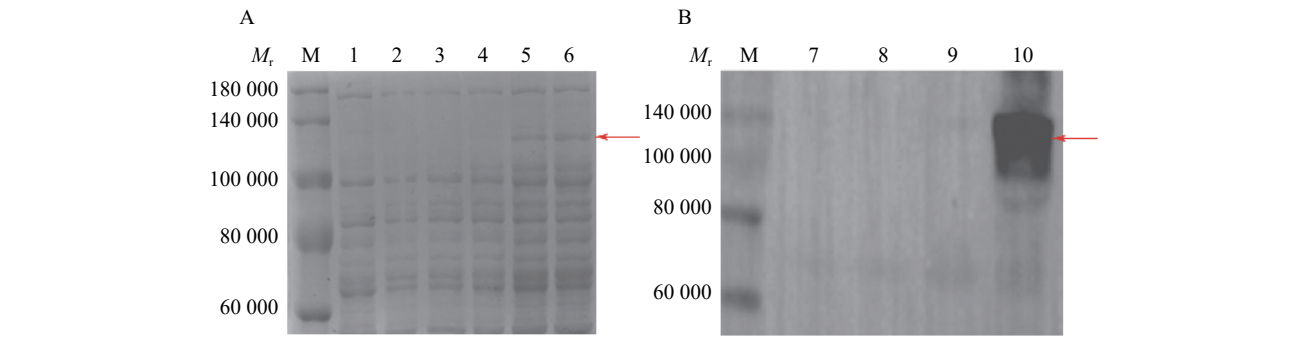
Fig. 2 Acquisition of target gene fragment and construction of expression vector

linker-YFP 片段与经双酶切、胶回收后的线性 pDR196 空载体经 *infusion* 酶连接后转化, 挑选阳性克隆, 经测序验证成功获得 6.7 kb 的载体 pDR196-CFP-linker-YFP(图 2C)。

2.2 原核表达分析

CFP-LHT1-YFP 融合蛋白理论相对分子质量为 125 000。BL21(DE3) 经诱导后, 分别对诱导后不

同时间点取样, SDS-PAGE 分析结果表明, 在加入 IPTG 后 4 h 内融合蛋白表达不明显, 5 h 后融合蛋白的表达明显 (图 3A), 且 6 h 后表达量增加。为避免 BL21 过量表达融合蛋白后形成包涵体, 时间没有继续延长。蛋白电泳检测融合蛋白的表观相对分子质量大小与理论接近。用抗 GFP 兔源抗体的 Western blot 验证, 融合蛋白带有 GFP, 且相对分子质量与理论值接近 (图 3B)。



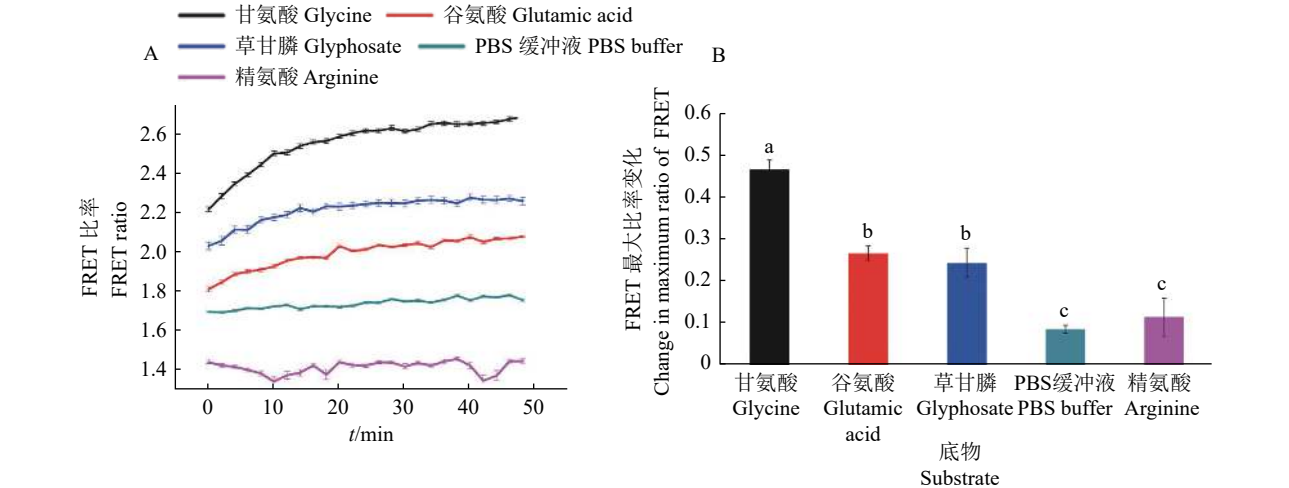
M: 180 000 蛋白 marker; *M_r*: 蛋白相对分子质量; 1~6 分别表示 0、1、3、4、5、6 h 诱导蛋白; 7~10 分别表示 0、1、3、5 h 诱导蛋白 Western blot 验证
M: Blue plus 180 000 marker; *M_r*: Relative molecular weight of protein; 1-6: Induced protein at 0, 1, 3, 4, 5, 6 h; 7-10: Western blot validation of induced protein at 0, 1, 3, 5 h

图 3 原核表达分析
Fig. 3 Prokaryotic expression analysis

2.3 不同底物对 LHT1-FRET 探针的光强变化

取纯化后的原核表达蛋白, 分别与 PBS 缓冲液、精氨酸、甘氨酸、谷氨酸、草甘膦混合后检测 YFP 和 CFP 的荧光比率变化。试验结果 (图 4) 显示, 在加入不同底物后, $D_{535\text{ nm}}/D_{480\text{ nm}}$ 的变化会有明显差异。其中加入阳性对照的甘氨酸和谷氨酸后, $D_{535\text{ nm}}/D_{480\text{ nm}}$ 明显升高, 在加入药物 10 min 后, 甘氨酸的 $D_{535\text{ nm}}/D_{480\text{ nm}}$ 增加 13%, 谷氨酸的增加

6%; 在加入药物 20 min 后, 甘氨酸的 $D_{535\text{ nm}}/D_{480\text{ nm}}$ 增加 17%, 谷氨酸的增加 12%; 在加入药物 40 min 后, 甘氨酸的 $D_{535\text{ nm}}/D_{480\text{ nm}}$ 增加 20%, 谷氨酸的增加 15%; 随着时间推移, 比率变化趋缓。草甘膦处理同样使 $D_{535\text{ nm}}/D_{480\text{ nm}}$ 升高, 其趋势与甘氨酸和谷氨酸接近, 在 10、20、40 min 分别增加 7%、10% 和 12%。加入用作阴性对照的精氨酸后, $D_{535\text{ nm}}/D_{480\text{ nm}}$ 没有变化。仅含 PBS 缓冲液的空白对照组



不同小写字母者表示 0.05 水平差异显著 (Duncan's 法)
Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level (Duncan's method)

图 4 不同底物对 LHT1-FRET 探针光强变化
Fig. 4 Changes in light intensity of the LHT1-FRET probe with different substrates

的 $D_{535\text{ nm}}/D_{480\text{ nm}}$ 同样没有明显变化 (图 4A)。不同底物的光强比率最大变化 (图 4B) 也进一步表明, 所构建的 LHT1 的 FRET 探针对甘氨酸、谷氨酸、草甘膦光强有较大影响, 说明对底物有较强的转运能力; 而对 PBS 缓冲液和精氨酸影响较小, 说明对该底物的转运能力低或不转运。

2.4 不同底物浓度对 LHT1-FRET 探针光强变化的影响

为了检测 LHT1-FRET 探针的检测域和灵敏度, 以不同浓度底物对 LHT1-FRET 探针光强比率影响进行检测。加入不同浓度底物后, $D_{535\text{ nm}}/D_{480\text{ nm}}$ 变化会有明显差异。其中阳性对照的甘氨酸

分别按照 0.5、5 和 100 mmol/L 加入后, 20 min 后 $D_{535\text{ nm}}/D_{480\text{ nm}}$ 分别升高 3%、3% 和 10%(图 5B); 阳性对照的谷氨酸分别按照 5 和 50 mmol/L 加入后, 20 min 后的 $D_{535\text{ nm}}/D_{480\text{ nm}}$ 分别升高 2% 和 9% (图 5C); 草甘膦处理同样以 1、5 和 30 mmol/L 浓度加入后, 20 min 后的 $D_{535\text{ nm}}/D_{480\text{ nm}}$ 分别升高 3%、1% 和 13%(图 5A)。而加入浓度为 10 mmol/L 的阴性对照精氨酸 2, 4-二氯苯氧乙酸 (2, 4-D)、乙氧氟草醚, $D_{535\text{ nm}}/D_{480\text{ nm}}$ 没有升高 (图 5D)。由此说明, FRET 变化明显受底物浓度影响。底物浓度越高, FRET 比率变化越明显, 在较低底物浓度下, FRET 比率变化会较小, 说明该探针在灵敏度方面需要进一步改进。

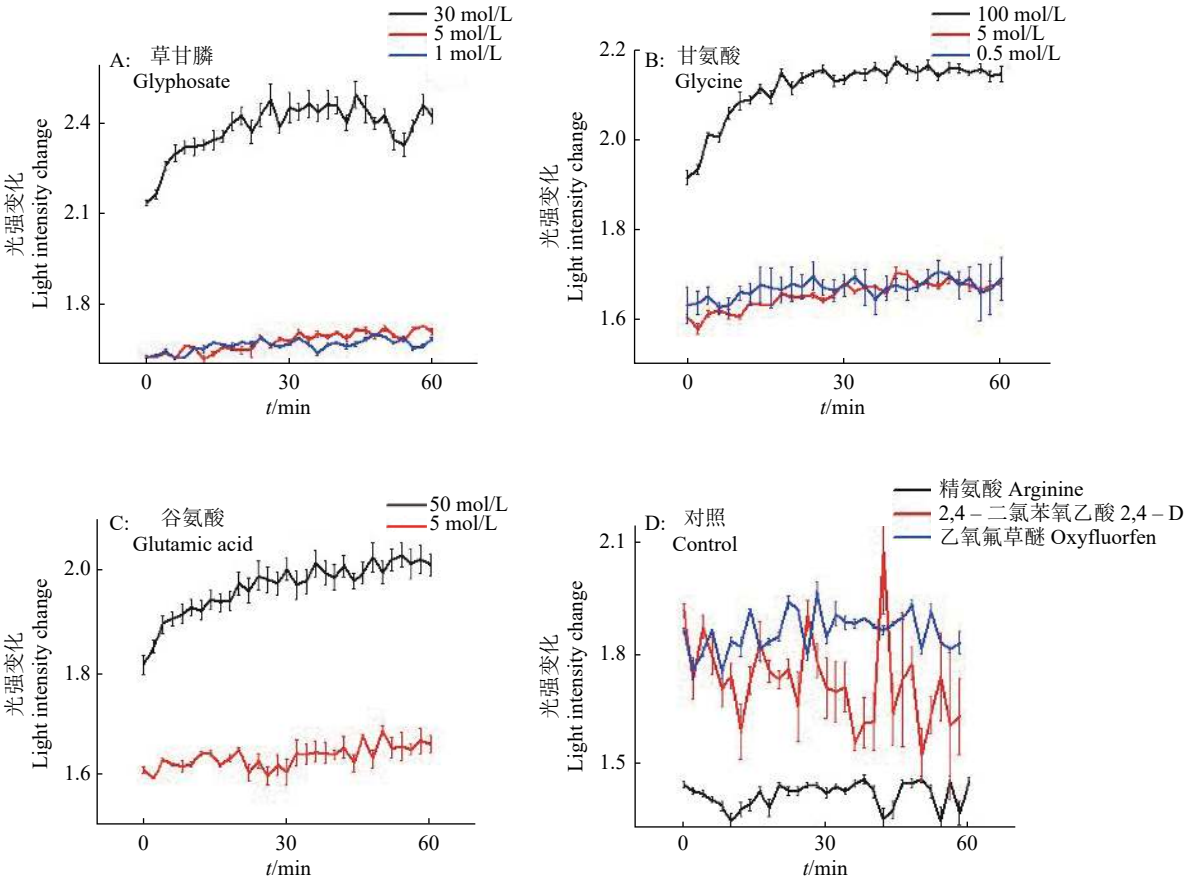


图 5 不同底物浓度对 LHT1-FRET 探针光强变化 ($D_{535\text{ nm}}/D_{480\text{ nm}}$) 的影响

Fig. 5 Effects of substrate concentrations on the light intensity ($D_{535\text{ nm}}/D_{480\text{ nm}}$) of the LHT1-FRET probe

2.5 酵母真核表达的共聚焦检测

当供体荧光分子和受体荧光分子存在能量转移时, 对受体荧光分子进行光漂白后, 供体荧光分子的荧光会升高, 通过检测其漂白前、后的光强变化来计算 FRET 效率。结果显示, 在加入浓度均为 10 mmol/L 的不同底物后, 漂白前 (图 6A)、后 (图 6B), FRET 效率变化会有明显差异。其中

加入阳性对照的甘氨酸和谷氨酸后, FRET 效率变化比较明显, 其中甘氨酸的 FRET 效率达到 30%, 谷氨酸的 FRET 效率也达到 26%。加入草甘膦处理的 FRET 效率与谷氨酸接近, 也达到 26%。含 PBS 缓冲液的空白对照组没有明显的 FRET 效率变化 (图 7)。与原核表达的探针检测结果一致。

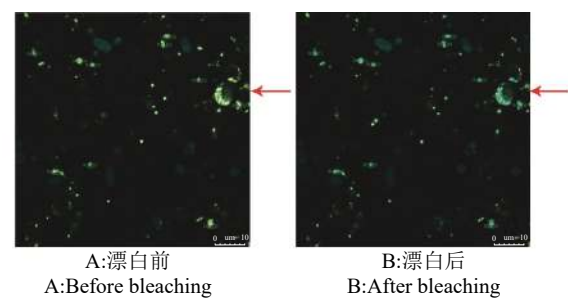


图 6 荧光分子漂白 (514 nm 激光) 前、后的光强变化
Fig. 6 Changes of light intensity in fluorescent molecules before and after 514 nm laser bleaching

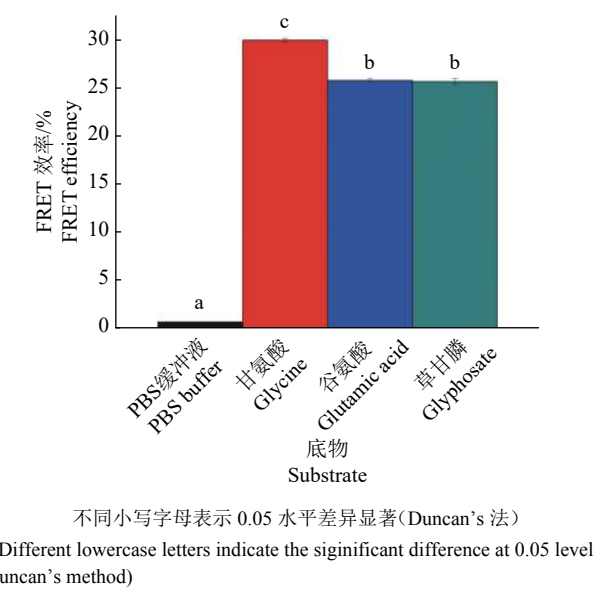


图 7 光漂白法测定不同底物处理后的 FRET 效率
Fig. 7 FRET efficiencies of treatments with different substrates measured by photobleaching method

3 讨论与结论

自被报道参与拟南芥根部氨基酸的吸收以来, LHT1 已有大量研究。对唯一氨基酸氮源的筛选证明, LHT1 对中性氨基酸和酸性氨基酸有较高亲和力, 而对碱性氨基酸亲和力最低 [19-20]。Chen 等 [11] 证明拟南芥 LHT1 可以转运氨基酸衍生物 CAP-Gly-2。本研究结果显示, 在原核表达中 LHT1-FRET 探针可以与中性氨基酸甘氨酸和酸性氨基酸谷氨酸、谷氨酰胺结合, 而不结合碱性氨基酸精氨酸, 结果与文献报道的一致。另外, 本文试验证明了 LHT1 可能与草甘膦发生结合, 进一步拓展了 LHT1 转运底物的范围。

本研究以 LHT1 转运蛋白为主要研究对象, 选用 CFP 和 YFP 结合 FRET 技术, 构建基于 LHT1 的 FRET 探针, 进一步研究 LHT1 对多种氨基酸的转运。本文构建了 2 种表达系统质粒, 分别在原核细胞和酵母细胞中表达, 用作阳性对照的氨基酸处

理后, FRET 比率均有明显的变化, 说明成功构建了 FRET 探针。LHT1 是拟南芥氨基酸转运蛋白, 为跨膜转运蛋白, 其在低等的原核细胞 BL21 中表达的蛋白结构与拟南芥天然 LHT1 蛋白有所差异, 在试验中表现出较低灵敏度, 但原核细胞 BL21 表达系统操作简单, 且通过酶标仪即可检测, 方便实验室快速操作, 但 Vanoaica 等 [21] 报道 Arg-FRET 探针检测到 μmol 级别, 有可能是不同的表达体系造成的, 说明更高级的表达系统 HEK293T 细胞对 FRET 探针的灵敏度有帮助, 可以通过更高级的表达系统获得高灵敏度的 LHT1-FRET 探针, 从而用于筛选体外药物。利用酵母体系表达 LHT1-FRET 探针, 灵敏度似乎要高于原核表达体系。但酵母表达的探针进行单细胞检测需要在激光共聚焦显微镜下操作, 光漂白处理对细胞有影响, 不利于在单细胞中多次测量, 同时也不能进行实时动态检测 [22]。另一方面也可以在 LHT1-FRET 探针结构上尝试更多的组合, 改变蛋白之间的 linker, 来提高探针的灵敏度 [23]。

综上所述, 本研究成功构建了基于拟南芥氨基酸转运蛋白 LHT1 的 FRET 探针, 并分别在原核细胞和真核细胞中成功表达, 证明 LHT1 确实参与了多种氨基酸的转运, 同时证明了草甘膦能够被氨基酸转运蛋白 LHT1 转运, 为氨基酸导向农药的设计提供了理论依据, 为导向农药的快速筛选提供了平台。

参考文献:

[1] 徐汉虹. 农药研究的新理念: 导向农药[C]//中国化工学会新农药创制交流会. 沈阳: 中国化工学会, 2003.

[2] DELÉTAGE-GRANDON C, CHOLLET J F, FAUCHER M, et al. Carrier-mediated uptake and phloem systemy of a 350-dalton chlorinated xenobiotic with an alpha-amino acid function[J]. *Plant Physiology*, 2001, 125(4): 1620-1632.

[3] YOU G, MORRIS M E. Drug transporters: Molecular characterization and role in drug disposition[M]. Canada: Wiley & Sons, 2007.

[4] DEGORTER M K, XIA C Q, YANG J J, et al. Drug transporters in drug efficacy and toxicity[J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2012, 52: 249-273.

[5] WU H, XU H, MARIVINGT-MOUNIR C, et al. Vectorizing agrochemicals: Enhancing bioavailability via carrier-mediated transport[J]. *Pest Management Science*, 2019, 75(6): 1507-1516.

[6] DE MOLINER F, KNOX K, REINDERS A, et al. Probing binding specificity of the sucrose transporter AtSUC2 with fluorescent coumarin glucosides[J]. *Journal of Ex-*

- perimental Botany, 2018, 69(10): 2473-2482.
- [7] JIANG X Y, XIE Y, REN Z F, et al. Design of a new glutamine-fipronil conjugate with alpha-amino acid function and its uptake by *A. thaliana* lysine histidine transporter 1 (AtLHT1)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(29): 7597-7605.
- [8] MAO G L, YAN Y, CHEN Y, et al. Family of *Ricinus communis* monosaccharide transporters and RcSTP1 in promoting the uptake of a glucose-fipronil conjugate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(30): 6169-6178.
- [9] CHEN L, BUSH D R. LHT1, a lysine- and histidine-specific amino acid transporter in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 1997, 115(3): 1127-1134.
- [10] SVENNERSTAM H, JÄMTGÅRD S, AHMAD I, et al. Transporters in *Arabidopsis* roots mediating uptake of amino acids at naturally occurring concentrations[J]. New Phytologist, 2011, 191(2): 459-467.
- [11] CHEN Y, YAN Y, REN Z F, et al. AtLHT1 transporter can facilitate the uptake and translocation of a glycinergic-chlorantraniliprole conjugate in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(47): 12527-12535.
- [12] XIE Y, ZHAO J L, WANG C W, et al. Glycinergic-fipronil uptake is mediated by an amino acid carrier system and induces the expression of amino acid transporter genes in *Ricinus communis* seedlings[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(19): 3810-3818.
- [13] 张志毅, 周涛, 巩伟丽, 等. 荧光共振能量转移技术在生命科学中的应用及研究进展[J]. 电子显微学报, 2007, 26(6): 620-624.
- [14] FÖRSTER T. Energiewanderung und fluoreszenz[J]. Naturwissenschaften, 1946, 33(6): 166-175.
- [15] 王盛, 陈典华, 蒋驰洲, 等. 基于荧光蛋白的荧光共振能量转移探针的构建及应用[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, 34(12): 1258-1267.
- [16] 孟坤, 何庆瑜, 王通, 等. 基于 C6 流式细胞仪平台应用 FRET 技术在活细胞中研究蛋白质相互作用[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(5): 45-51.
- [17] FEHR M, FROMMER W B, LALONDE S, et al. Visualization of maltose uptake in living yeast cells by fluorescent nanosensors[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(15): 9846-9851.
- [18] LAGER I, LOOGER L L, HILPERT M, et al. Conversion of a putative *Agrobacterium* sugar-binding protein into a FRET sensor with high selectivity for sucrose[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(41): 30875-30883.
- [19] SVENNERSTAM H, GANETEG U, BELLINI C, et al. Comprehensive screening of *Arabidopsis* mutants suggests the lysine histidine transporter 1 to be involved in plant uptake of amino acids[J]. Plant Physiology, 2007, 143(4): 1853-1860.
- [20] HIRNER A, LADWIG F, STRANSKY H, et al. *Arabidopsis* LHT1 is a high-affinity transporter for cellular amino acid uptake in both root epidermis and leaf mesophyll[J]. Plant Cell, 2006, 18(8): 1931-1946.
- [21] VANOICA L, BEHERA A, CAMARGO S M, et al. Real-time functional characterization of cationic amino acid transporters using a new FRET sensor[J]. Pflugers Archiv-European Journal of Physiology, 2016, 468(4): 563-572.
- [22] 张建伟, 陈同生. 荧光共振能量转移 (FRET) 的定量检测及其应用[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2012, 44(3): 12-17.
- [23] KAPER T, LOOGER L L, TAKANAGA H, et al. Nano-sensor detection of an immunoregulatory tryptophan influx/kynurenine efflux cycle[J]. PLoS Biology, 2007, 5(10): e257. doi: 10.1371/journal.pbio.0050257.

【责任编辑 霍 欢】