

# GuPIP1 抗体的制备及其在 GuPIP1 组织定位上的应用

王芳\* 董乐 袁建军

(泉州师范学院化学与生命科学学院, 泉州 362000)

**摘要** 利用 PCR 技术, 从甘草质膜水通道蛋白 1 (plasma membrane intrinsic protein 1 from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch, GuPIP1) 的 cDNA 中扩增其保守区段(420 bp), 并将其构入 pGEX-KG。酶切、测序分析表明, 重组质粒 pGEX-GuPIP1 结构正确。IPTG 诱导表达分子量约 40 kDa 融合蛋白 GST-GuPIP1, 该蛋白质主要以非包涵体的形式存在于大肠杆菌中。诱导表达后的菌体超声裂解液经谷胱甘肽亲和层析纯化得到高纯度的 GST-GuPIP1, 以纯化的融合蛋白为抗原免疫兔子制备甘草质膜水通道蛋白的抗体。抗血清经过纯化后以酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和 Western 印迹检测抗体的效价和特异性。结果表明, 抗体具有高的效价和特异性。免疫组织化学定位表明, GuPIP1 在胚根根尖的表皮细胞和根冠细胞中强烈表达。

**关键词** 水通道蛋白; 抗体; 原核表达; pGEX-KG; pGEX-GuPIP1

水通道蛋白(aquaporin, AQP)为水分跨细胞膜的运输提供了一条选择性通道。已经测序的植物基因组揭示植物水通道蛋白是一个超家族。根据氨基酸序列同源性和亚细胞定位将其划分为四个家族<sup>[1,2]</sup>: 质膜内在蛋白<sup>[3]</sup>(plasma membrane intrinsic proteins, PIPs)、液泡膜内在蛋白<sup>[4]</sup>(tonoplast membrane intrinsic proteins, TIPs)、类 Nodulin26 (NOD26)膜内在蛋白<sup>[5]</sup>(NOD26-like intrinsic proteins, NIPs)和小分子碱性膜内在蛋白<sup>[1]</sup>(small basic intrinsic proteins, SIPs)。PIPs 定位于原生质膜上<sup>[6]</sup>。目前有关植物水通道蛋白结构的研究表明水通道蛋白分子的基本结构是一条单肽链, 包括两个同向重复单元, 每个单元含有一个高度保守的 Asn-Pro-Ala (NPA) 氨基酸组单元<sup>[7]</sup>, 拓扑结构表明, 整个分子含有 6 个跨膜结构域(TM1、TM2、TM3、TM4、TM5、TM6), 氨基酸链在膜两侧形成五个环形结构(A、B、C、D、E)。在所有已知的高等植物 PIPs 中, 存在两个高度保守的区域: GGGANXXXXGY 和 TGI/TNPARSL/FGAAI/VI/VF/YN, 分别位于 C 环和 E 环, 可能与 PIPs 功能的特异性有关<sup>[7]</sup>, 两个高度保守序列之间的长度为 420 bp 左右。

植物水通道蛋白单个基因的表达具有器官、组织、细胞的特异性<sup>[2,8,9]</sup>。一种水通道蛋白基因可能在不同时间、不同细胞和组织中表达, 这是由植物器官功能发挥的时空差异决定的<sup>[10]</sup>。植物水通道蛋

白的特异性分布表明, 其所在区域发生了强烈的水分跨膜流动<sup>[11]</sup>。植物水通道蛋白在植物种子萌发、细胞伸长、气孔运动、受精等过程中调节水分的快速跨膜运输。大多数植物水通道蛋白还受环境因子, 如干旱、盐害、激素和光质等诱导表达。因此研究水通道蛋白与植物抗逆性的关系引起了广泛关注。有研究表明, 植物主要通过调控细胞质膜水通道蛋白的表达来消除水分供应中的波动<sup>[12]</sup>。

甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch)是豆科(Leguminosae)、甘草属(*Glycyrrhizalinn*)的多年生草本植物, 又称乌拉尔甘草、甜甘草<sup>[13]</sup>, 是典型的阳性旱生植物。甘草主要分布在内蒙古、甘肃、宁夏、新疆等生态环境脆弱的干旱、半干旱及荒漠、半荒漠地区, 是荒漠地区维持和保护生态环境的重要植被<sup>[5]</sup>。Wang 等<sup>[14]</sup>克隆了甘草质膜水通道蛋白 1 基因(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch plasma membrane intrinsic proteins 1, *GuPIP1*)全长编码区序列, 并以 Real-time PCR 研究表明, 其表达受干旱、脱落酸(abscisic acid, ABA)和 NaCl 的胁迫而上调。

收稿日期: 2009-04-13 接受日期: 2009-09-08

福建省自然科学基金资助项目(No.2008J04011); 福建省高校服务海西建设重点项目(No.A101); 福建省教育厅科技计划项目(No.2007JA07151); 泉州市科技局技术与开发项目(No.2007N6); 泉州师范学院重点学科建设经费资助; 泉州师范学院大学生基金资助项目(No.2008DA008 和 No.2008DA009)

\* 通讯作者。Tel: 0595-22919563, E-mail: dwf320@163.com

本研究在 *GuPIP1* cDNA 的 2 个高度保守区段的上、下游设计 2 个特异引物, 利用 PCR 技术扩增植物质膜水通道蛋白中高度保守的区段, 并将它构入原核表达载体 pGEX-KG, 使其在 *E. coli* 中大量表达, 利用亲和层析纯化表达蛋白, 制备甘草质膜水通道蛋白保守区段的抗体。通过免疫组织细胞化学定位, 初步研究甘草质膜水通道蛋白在胚根中的分布, 为探讨它们在植株水分运输中的作用打下基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株 质粒载体 pGEX-KG、*E. coli* 感受态菌株 DH5a、JM109 和 *GuPIP1* cDNA<sup>[16]</sup> 由本实验室保存。

1.1.2 实验兔 纯种新西兰兔子。

1.1.3 PCR 引物 在 *GuPIP1* cDNA 的质膜水通道蛋白保守区段附近设计一对引物 5'-Primer: 5'GTTGGATCCGTGAAGGCATTT3'; 3'-Primer: 5'GGCTAAGCTTCTGAATGAACCG3', 在 5' 引物及 3' 引物的 5' 端分别引入 *Bam*HI 和 *Hind*III 识别位点, 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.1.4 工具酶及试剂 *Bam*HI、*Hind*III、T4DNA 连接酶、 $\lambda$ DNA/*Hind*III、PCR marker、溶菌酶等购自厦门泰京生物技术有限公司; *Taq* DNA 聚合酶、碱性磷酸酶、低熔点琼脂糖、IPTG 购自 Promega 公司; Glutathione Sepharose 4B 购自 Pharmacia 公司; 还原型谷胱甘肽、盐酸胍购自 Boehringer Mannheim 公司; Freund's 佐剂购自 Gibco BRL 公司; Tris、glycine、Acr、Bis、DTT、Triton X-100、SDS 为 Sigma 公司的产品; 蛋白质分子量标准为 Bio-Rad 产品; 其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

1.1.1 PCR 扩增、表达载体构建等 按文献<sup>[15]</sup>进行; DNA 测序由上海生工生物技术工程服务有限公司完成。

1.1.2 重组质粒在 *E. coli* 的表达<sup>[16]</sup> 重组质粒 pGEX-*GuPIP1* 转化 *E. coli* JM109 中, 挑取阳性单菌落, 活化后用终浓度为 0.1 mmol/L IPTG 37 °C 诱导 3 h, 用 SDS-PAGE 检测表达产物, 其中分离胶浓度为 12.5%。

1.1.3 菌体超声裂解液制备及 GST-*GuPIP1* 融合蛋白的纯化 将离心收集的菌体重悬浮于预冷的 PBS, pH 7.3; 冰浴下超声破碎细胞; 再加 Triton X-100

至终浓度 1%, 4 °C 温和搅拌 30 min, 离心, 收集超声破碎的上清液过 Glutathione Sepharose 4B 层析柱; PBS (pH 7.3) 充分洗脱至基线; 然后用 5~10 倍柱床体积的还原型谷胱甘肽洗脱, 浓缩收集成分即为纯化的 GST-*GuPIP1*。

1.1.4 GST-*GuPIP1* 抗血清的制备及效价检测 按文献进行<sup>[17,18]</sup>。

1.1.5 GST-*GuPIP1* 抗血清 IgG 的纯化 按文献进行<sup>[19]</sup>。

1.1.6 甘草质膜囊泡的制备 按文献进行<sup>[20]</sup>。

1.1.7 蛋白质含量测定 按文献<sup>[21]</sup>的方法进行, 以 BSA 为标准。

1.1.8 GST-*GuPIP1* 抗血清的 Western 印迹 按文献进行<sup>[14]</sup>。

1.1.9 *GuPIP1* 的免疫组织细胞化学定位 按文献进行<sup>[22]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 pGEX-*GuPIP1* 表达质粒构建

以设计的 *GuPIP1* 的 5' 端引物及 3' 端引物, 从 *GuPIP1* cDNA<sup>[15]</sup> 中扩增出约 420 bp 左右的 DNA 片段, 与引物设计的片段相符(图 1)。产物回收后, 利用引物所引入的 *Bam*HI 和 *Hind*III 位点, 将其装入 pGEX-KG 的 *Bam*HI 和 *Hind*III 位点, 得到重组表达质粒 pGEX-*GuPIP1*。用 *Bam*HI 和 *Hind*III 对重组质粒 pGEX-*GuPIP1* 双酶切, 可切出 420 bp 的左右片段, 表明扩增的 *GuPIP1* 片段已插入到载体质粒中(图 2)。

### 2.2 重组质粒 pGEX-*GuPIP1* 在 *E. coli* 中的表达

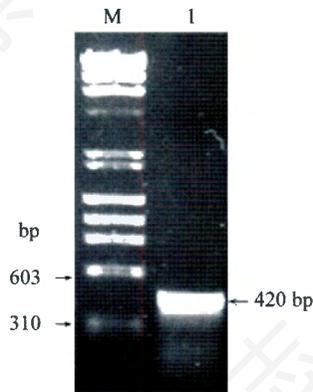
由图 3 可见, 对照 JM109 (转化有载体质粒 pGEX-KG) 可诱导表达分子量为 26 kDa 特异蛋白 (GST 片段), 转化有重组质粒 pGEX-*GuPIP1* 的 JM109 经 IPTG 诱导后, 在 40 kDa 左右有一条蛋白质带(箭头所指), 与预期的分子量大小相吻合, 而在 26 kDa 处的蛋白质带消失了, 说明插入的外源基因已经成功地在大肠杆菌中表达, 并与 GST 形成了融合蛋白。

### 2.3 重组质粒 pGEX-*GuPIP1* 的测序鉴定

对酶切及诱导实验挑选出的阳性重组子进行测序。将测序结果与发表的 *GuPIP1* 序列进行比较<sup>[14]</sup>, 表明扩增片段序列正确, 构建质粒未出现移码现象。

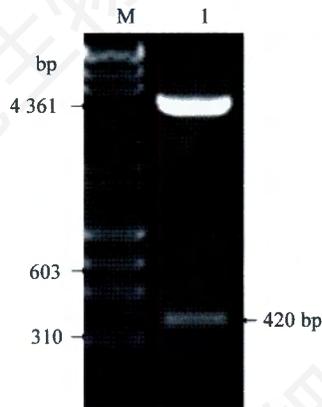
### 2.4 GST-*GuPIP1* 融合蛋白的纯化

由图 4 可见, 表达的融合蛋白以可溶性的形式存在于大肠杆菌中, 菌体超声裂解液经 Glutathione Sepharose



**Fig.1** Agarose gel electrophoresis analysis of PCR product of *GuPIP1* cDNA

M:  $\lambda$ -HindIII+ $\phi$ X174-HaeIII; 1: the PCR product of *GuPIP1*.



**Fig.2** Identification of recombinant expression plasmid pGEX-*GuPIP1* by restriction digestion

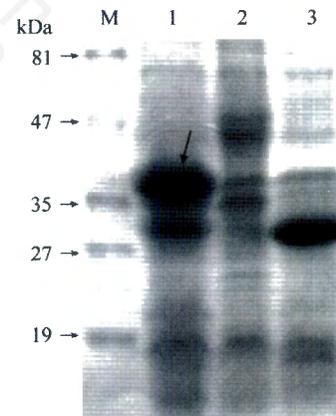
M:  $\lambda$ -HindIII+ $\phi$ X174-HaeIII; 1: pGEX-*GuPIP1* by restriction digestion.

4B 层析柱纯化后得到了高纯度的 GST-*GuPIP1*, 面积定量扫描表明纯化的 GST-*GuPIP1* 已达电泳纯。

### 2.5 抗 GST-*GuPIP1* 抗血清制备及其效价检测和特异性分析

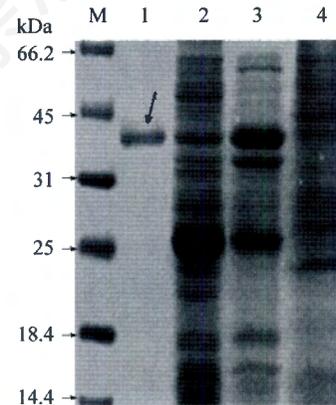
以亲和纯化的 GST-*GuPIP1* 为抗原制备甘草质膜水通道蛋白的抗血清。以未免疫的兔血清作为阴性对照, 将免疫的兔抗血清做不同稀释后, 进行 ELISA 检测。标本孔的吸收值与阴性标本孔的吸收值的比值(P/N)大于 2 时判断为阳性。结果显示, *GuPIP1* 的兔抗血清效价达到  $1 : 1.00 \times 10^5$  (图 5)。

Western 印迹结果显示, 用免疫前的血清进行 Western 印迹时不显示条带; 未纯化的抗血清由于含有很多非特异性抗体, 所以有非特异性条带; 而用纯



**Fig.3** SDS-PAGE analysis for the product of pGEX-*GuPIP1*

M: molecular weight standards; 1: total proteins of induced *E. coli* transformed with pGEX-*GuPIP1*; 2: total proteins of uninduced *E. coli* transformed with pGEX-*GuPIP1*; 3: total proteins of induced *E. coli* transformed with pGEX-KG.



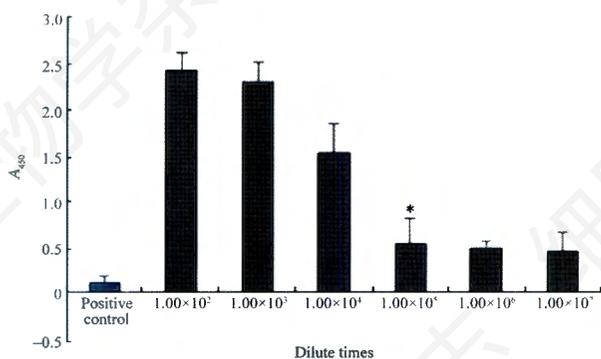
**Fig.4** Expression and purification of GST-*GuPIP1* fusion protein from *E. coli* JM109 transformant

M: protein molecular weight standards; 1: elution following purification of bacterial sonicated supernatant on Glutathione Sepharose 4B; 2: bacteria proteins from JM109 transformed with pGEX-*GuPIP1* induced with 0.1 mmol/L IPTG; 3: the supernatant of bacterial lysate; 4: pellet of bacterial lysate.

化的 *GuPIP1* 特异性的抗体(1 : 800 稀释), 则无非特异性条带(图 6)。以上结果初步表明, 制备和纯化后的 *GuPIP1* 多克隆抗体特异性较强。

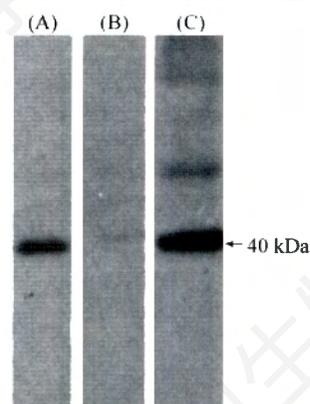
### 2.6 *GuPIP1* 免疫组织细胞学定位

以甘草胚根根尖为材料制作石蜡切片, 脱水、复水后, DAB 染色, 用苏木精复染。实验对照是用未免疫的兔血清为一抗, 阳性信号为棕色(图 7)。结果表明, *GuPIP1* 在胚根根尖的表皮细胞和根冠细胞中强烈表达, 其它部位未见表达信号。



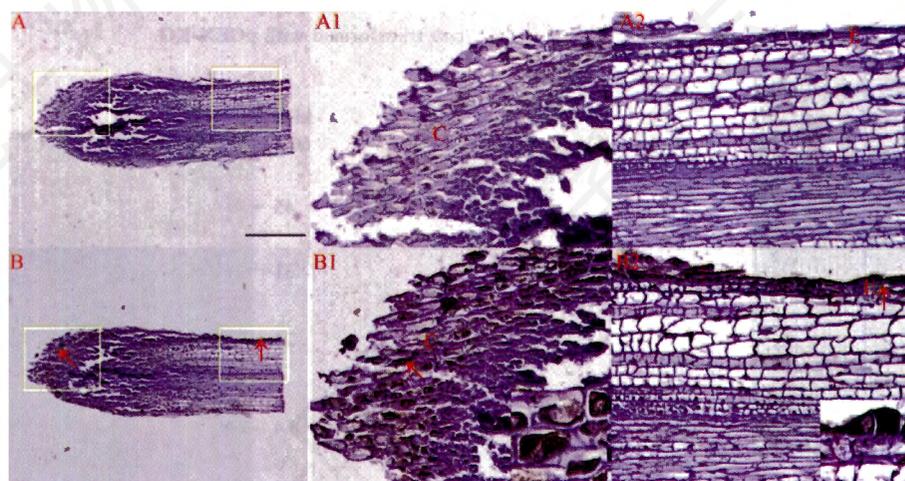
**Fig.5 The titer of GuPIP1 antibody by ELISA**

\* $P/N > 2$ ,  $P < 0.01$ , compared with positive control.



**Fig.6 Western blot analysis of GuPIP1 expressed in *E. coli***

A: purified GuPIP1 antibody; B: pre-immuserum; C: no-purified GuPIP1 antibody.



**Fig.7 Immunocytochemical localization of GuPIP1 in radicles**

A: non-specific labelling in control; A1-A2: an enlarged part marked in A; B: high immunolabelling (red arrows) of GuPIP1 protein in radicles. The expression signal is brown; B1-B2: an enlarged part marked in B; E: root epidermis; C: root cap.

### 3 讨论

已经测序的植物基因组揭示了植物水通道蛋白是一个超家族: 拟南芥中有38个水通道蛋白基因编码的35种水通道蛋白同源物, 玉米和水稻中分别有35和33个水通道蛋白基因<sup>[1,2]</sup>。植物水通道蛋白的单个基因的表达具有器官、组织、细胞的特异性<sup>[23-25]</sup>。一种水通道蛋白基因可能在不同时间、不同细胞和不同组织中表达<sup>[2,8,9]</sup>。植物水分在植株中的运输依赖于植株中的不同的水通道蛋白的级联反应<sup>[26]</sup>。由于植物水通道蛋白的多样性, 因此每种植物每种水通道蛋白表达的组织和细胞特异性还不是很详细。目前, 根据序列同源性和亚细胞定位, 植物水通道蛋白分为四个家族。其中PIPs和TIPs分别定位于原生质膜和液泡膜或液泡形成体上<sup>[6,27]</sup>。NIPs中原始型的NOD26定位于细菌和植物的共生体膜(peribacteroid

membrane, PBM)<sup>[5,28]</sup>上。SIPs定位于内质网膜<sup>[29]</sup>上。迄今为止, 在几乎所有类型的根系细胞中都已经检测到水通道蛋白的表达。其中, PIPs被检测到在根顶端分生组织和侧根原基<sup>[6,30-32]</sup>、伸长和分化区<sup>[25,31-32]</sup>、表皮<sup>[6,25,33]</sup>、根毛<sup>[25]</sup>、皮层<sup>[25,31]</sup>、维管束(管状分子、木质部、韧皮部、次生韧皮部、韧皮部相关细胞及形成层附近的细胞)<sup>[6,25,30-32]</sup>的细胞表达。这表明, 植物水通道蛋白的表达谱很广泛。植物水通道蛋白除转运水分外, 能允许多种中性小分子的通透。PIPs分为PIP1和PIP2两个亚类<sup>[1,34]</sup>。在爪蟾卵母细胞中表达时, PIP2通常比PIP1的水通透活性高。PIP1水通透活性低, 但能通透甘油<sup>[10,35]</sup>、硼酸<sup>[11]</sup>、尿素<sup>[36]</sup>、二氧化碳<sup>[37]</sup>、甲醛<sup>[37]</sup>、过氧化氢<sup>[38]</sup>和少量的酒精<sup>[39]</sup>。根系原生质膜上的PIPs可能在根系轴向水分和共质体运输中起着重要作用<sup>[40]</sup>。

免疫组织化学定位表明, GuPIP1在胚根根尖的表皮细胞中强烈表达。这与 Kirch 等<sup>[25]</sup>、Chaumont 等<sup>[6]</sup>和 Yamada 等<sup>[33]</sup>的研究结果相似。植物根表皮为根外表的一层生活细胞, 富有通透性, 是植物所需水分和营养物质进出的屏障。GuPIP1 在表皮中表达, 说明 GuPIP1 可能参与营养物质的吸收过程以及生长环境中突然的水势变化时对渗透平衡的快速调节, 因此在根部水分和共质体离子跨膜吸收中发挥了作用。实验表明, GuPIP1 在胚根根尖的根冠细胞中也强烈表达。目前尚未见相似结果的其它报道。根冠细胞位于根的最顶端, 由多层不规则排列的薄壁细胞组成。当根不断生长时, 根冠易受破坏而脱落, 此时根冠上方的分生组织可不断分裂产生新的根冠细胞予以补充。根冠细胞需要水分和物质供应其生长、维持内环境的稳定并保持一定的形态。因为根冠细胞与根的输导组织间无联系, 所以对水分和物质的吸收依赖于自身。水分跨膜运输可能在根冠吸水 and 物质吸收中起主要作用。

植物水通道蛋白虽是一个多基因家族, 但水通道蛋白之间有高度的同源性。因此, 不同的水通道蛋白在器官、组织、细胞中特异性表达的同时, 也会有表达模式的重叠。例如, 冰花中的水通道蛋白 PIP1 家族中的 MIP A 和 MIP B 在皮层细胞同时表达<sup>[25]</sup>。目前, 我们只从甘草中克隆了 PIP1 家族中的一个水通道蛋白基因 *GuPIP1*, 因此, 本实验中免疫组织化学定位的结果是一种还是几种蛋白质的表达产物还有待于进一步的实验证实。

### 参考文献(References)

- [1] Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E, *et al.* Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize, *Plant Physiol*, 2001, 125(3): 1206-1215
- [2] Johanson U, Karlsson M, Johansson I, *et al.* The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in Arabidopsis provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants, *Plant Physiol*, 2001, 126(4): 1358-1369
- [3] Frangne N, Maeshima M, Schaffner AR, *et al.* Expression and distribution of a vacuolar aquaporin in young and mature leaf tissues of *Brassica napus* in relation to water fluxes, *Planta*, 2001, 212(2): 270-278
- [4] Johnson KD, Höfte H, Chrispeels MJ. An intrinsic tonoplast protein of protein storage vacuoles in seeds is structurally related to a bacterial solute transporter (GlpF), *Plant Cell*, 1990, 2(6): 525-532
- [5] Weaver CD, Crombie B, Stacey G, *et al.* Calcium-dependent phosphorylation of symbiosome membrane proteins from nitrogen-fixing soybean nodules: evidence for phosphorylation of Nodulin-26, *Plant Physiol*, 1991, 95(1): 222-227
- [6] Chaumont F, Barrieu F, Herman EM, *et al.* Characterization of a maize tonoplast aquaporin expressed in zones of cell division and elongation, *Plant Physiol*, 1998, 117(4): 1143-1152
- [7] Heymann JB, Engel A. Aquaporins: phylogeny, structure and physiology of water channels, *News Physiol Sci*, 1999, (14): 187-193
- [8] Zhang R, Vanhoek AN, Biwersi J, *et al.* A point mutation at cysteine-189 blocks the water permeability of rat kidney water channel CHIP28, *Biochemistry*, 1993, 32(12): 2938-2941
- [9] Borstlap AC. Early diversification of plant aquaporins, *Trends Plant Sci*, 2002, 7(12): 529-530
- [10] Moshelion M, Becker D, Biela A, *et al.* Plasma membrane aquaporins in the motor cells of *Samanea saman*: diurnal and circadian regulation, *Plant Cell*, 2002, 14(3): 727-739
- [11] Dordas C, Chrispeels MJ, Brown PH. Permeability and channel-mediated transport of boric acid across membrane vesicles isolated from squash roots, *Plant Physiol*, 2000, 124(3): 1349-1362
- [12] Törnroth-Horsefield S, Wang Y, Hedfalk K, *et al.* Structural mechanism of plant aquaporin gating, *Nature*, 2006, 439(7077): 688-694
- [13] Tyerman SD, Niemietz CM, Bramley H. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding role, *Plant Cell Environ*, 2002, 25(2): 173-194
- [14] Wang F, Jiang Y, Feng XC, *et al.* Molecular cloning of a *Glycyrrhiza uralensis* F. aquaporin *GuPIP1* that is up-regulated in response to drought, salt and ABA stress, *Chem Res Chinese U*, 2007, 23(1): 52-57
- [15] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 597-701
- [16] Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase, *Gene*, 1988, 67(1): 31-40
- [17] Catty D. *Antibodies: A Practical Approach*, Washington: IRL Press, 1993, 97-152
- [18] 郭雪艳, 时永全, 翟惠虹, 等. 核糖体蛋白 S13 的原核表达、纯化及多克隆抗体的制备, *细胞与分子免疫学杂志*, 2007, 23(4): 363-366
- [19] 杨威, 王琨, 陈岩, 等. 重组肌肉抑制素功能分析及其对鸡肌肉发育的抑制作用, *生物化学与生物物理学报*, 2003, 35(11): 1016-1022
- [20] 朱美君, 陈珈, 朱庆鸿, 等. 两相分配法制备玉米根质膜及其纯度鉴定, *生物化学杂志*, 1997, 13(6): 686-690
- [21] Bradford MM. A rapid and sensitive method of or the quantitation of microgram quantitative of protein using the principle of protein — dye binding, *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254
- [22] Cho HT, Kende H. Tissue localization of expansins in deepwater rice, *Plant J*, 1998, 15(6): 805-812
- [23] Chaumont F, Barrieu F, Jung R, *et al.* Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity, *Plant Physiol*, 2000, 122(4): 1025-1034
- [24] Höfte H, Hubbard L, Reizer J, *et al.* Vegetative and seed-specific forms of an intrinsic protein in the vacuolar membrane of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol*, 1992, 99(2): 561-570

- [25] Kirch HH, Vera-Estrella R, Golladck D, *et al.* Expression of water channel proteins in *Mesembryanthemum orystrallnum*, *Plant Physiol*, 2000, 123(1): 111-124
- [26] Barriue F, Chaumont F, Chrispeels MJ. High expression of the tonoplast aquaporin ZmTIP1 in epidermal and conducting tissues of maize, *Plant Physiol*, 1998, 117(4): 1153-1163
- [27] Chaumont F, Moshelion M, Daniels MJ. Regulation of plant aquaporin activity, *Biol Cell*, 2005, 97(10): 749-764
- [28] Fortin MG, Morrison NA, Verma DP. Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment, *Nucleic Acids Res*, 1987, 15(2): 813-824
- [29] Ishikawa F, Suga S, Uemura T, *et al.* Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Lett*, 2005, 579(25): 5814-5820
- [30] Opperman CH, Taylor CG, Conkling MA. Root-knot nematode-directed expression of a plant root-specific gene, *Science*, 1994, 263(5144): 221-223
- [31] Jones JT, Mullet JE. Developmental expression of a turgor-responsive gene that encodes an intrinsic membrane protein, *Plant Mol Biol*, 1995, 28(6): 983-996
- [32] Otto B, Kaldenhoff R. Cell-specific expression of the mercury-insensitive plasma-membrane aquaporin NtAQP1 from *Nicotiana tabacum*, *Planta*, 2000, 211(2): 167-172
- [33] Yamada S, Katsuhara M, Kelly WB, *et al.* A family of transcripts encoding water channel proteins: tissue-specific expression in the common ice plant, *Plant Cell*, 1995, 7(8): 1129-1142
- [34] Kammerloher W, Fischer V, Piechotta GP, *et al.* Water channels in the plant plasma membrane cloned by immunoselection from an expression system, *Plant J*, 1994, 6(2): 187-199
- [35] Biela A, Grote K, Otto B, *et al.* The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol, *Plant J*, 1999, 18(5): 565-570
- [36] Liu LH, Ludewig U, Gassert B, *et al.* Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in *Arabidopsis*, *Plant Physiol*, 2003, 133(3): 1220-1228
- [37] Uehlein N, Lovisolo C, Siefritz F, *et al.* The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO<sub>2</sub> pore with physiological functions, *Nature*, 2003, 425(6959): 734-737
- [38] Henzler T, Steudle E. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> across water channels, *J Exp Bot*, 2000, 51(353): 2053-2066
- [39] Hertel A, Steudle E. The function of water channels in *Chara*: The temperature dependence of water and solute flows provides evidence for composite membrane transport and for a slippage of small organic solutes across water channels, *Planta*, 1997, 202(3): 324-335
- [40] Javot H, Maurel C. The role of aquaporins in root water uptake, *Ann Bot*, 2002, 90(3): 301-313

## Preparation of the Antibody against GuPIP1 and Immunocytochemical Localization

Fang Wang\*, Le Dong, Jian-Jun Yuan

(School of Chemical & Biology Science, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, China)

**Abstract** Employing PCR, a 420 bp cDNA conserved fragment encoding the plasma membrane intrinsic protein 1 from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch (GuPIP1) was PCR amplified and subcloned into pGEX-KG. Restriction endonuclease analysis and sequence confirmed the corrected construction, and IPTG can induce high expression of 40 kDa GST-GuPIP1 fused protein, which mainly existed in *E. coli* in soluble form. Employing Glutathione Sepharose 4B column, the expressed GST-GuPIP1 fusion protein can be absorbed specifically on the column and thus separated from lysates. The purified fusion protein was used to immune rabbits directly. The antisera were purified and characterized by ELISA and Western blot. The results showed that the antibodies had high titer and specificity. GuPIP1 was abundantly expressed in epidermis cells and root cap cells of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch radicles through immunocytochemical method.

**Key words** aquaporin; antibody; prokaryotic expression; pGEX-KG; pGEX-GuPIP1

Received: April 13, 2008 Accepted: September 8, 2009

This work was supported by the Natural Scientific Foundation of Fujian Province (No.200804011), the Key Program for the Economic Zone Construction of Strait West Coast Specialized in the Higher Education Institutions of Fujian Province (No.A101), the Scientific Research Foundation of Educational Committee of Fujian Province (No.JA07151), the Technology Research and Development Program of Quanzhou Science and Technology Bureau (No.2007N6), the Special Funds for the Major Subject Program of Quanzhou Normal University and the Funds for college students of Quanzhou Normal University (No.2008DA008 and No.2008DA009)

\*Corresponding author. Tel: 86-595-22919563, E-mail: dwf320@163.com