

# 一个大豆质子转运体 *GmMRP5* 的克隆与表达分析

许 玲, 张大勇, 何晓兰, 徐照龙, 刘晓庆, 黄益洪, 马鸿翔, 易金鑫

(江苏省农业生物学重点实验室, 江苏省农业科学院 农业生物技术研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 为探明大豆中 MRP 蛋白基因的作用机理, 从大豆材料中克隆到 *GmMRP5* 基因完整的编码序列, *GmMRP5* 基因的开放阅读框(ORF)全长 4 479 bp, 编码 1 492 个氨基酸。序列比对与进化树分析表明: *GmMRP5* 拥有 13 个推断的跨膜结构域(TMD)和典型的 ABC 转运蛋白保守结构域。系统进化树分析表明, *GmMRP5* 与 *AtMRP5* 同缘关系最近, 同属于 ABC 转运蛋白家族 C 亚家族; 该基因是组成型表达基因, 在大豆的根、茎、叶及荚中均有表达; 经不同浓度脯氨酸和柠檬酸处理后, 该基因在大豆根中的表达被强烈诱导并高效表达。Real-Time PCR 结果表明, 该基因在酸性缓冲液处理后表达量上调, 推测其作为质子转运体参与大豆阴阳离子交换反应。

**关键词:** 大豆; *GmMRP5*; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)06-0030-06

## Cloning and Expression Pattern Analysis of a Proton Transporter *GmMRP5* in Soybean

XU Ling, ZHANG Da-yong, HE Xiao-lan, XU Zhao-long, LIU Xiao-qing,  
HUANG Yi-hong, MA Hong-xiang, YI Jin-xin

(Provincial Key Laboratory of Agrobiotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences Institute  
of Biotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** In order to investigate the mechanism of the MRP protein genes in soybean, a novel soybean gene *GmMRP5* was identified in soybean cultivar. *GmMRP5* containing an open reading frame(ORF) of 4 479 bp nucleotides. The ORF encoded a protein of 1 492 amino acids. Sequence alignment and evolutionary tree clustering analysis showed that *GmMRP5* contains 13 putative transmembrane-spanning domains(TMDs) and ABC transport protein conserved domain. Phylogenetic tree analysis showed that *GmMRP5* was closely related to *AtMRP5* and both belonged to ABCC subfamily. *GmMRP5* was a constitutive expression gene and expressed in root, stem and leaves by using Real-Time PCR analysis in soybean. *GmMRP5* was strongly induced and highly expressed in root after treatment by proline and citrate solution. Real-Time PCR showed the expression level of *GmMRP5* was increased by different pH buffer solution treatment, suggesting that *GmMRP5* gene may be as a proton transporter to participate in the stress response in soybean.

**Key words:** Soybean; Proton transporter; Gene cloning; Expression analysis

ABC(ATP-binding cassette)转运蛋白是存在于生物体中的一类重要跨膜运输蛋白, 大多数 ABC 转运蛋白是通过利用水解 ATP 释放的能量来跨膜转运脂肪、蛋白质、糖、类固醇、重金属螯合物、生物碱、无机离子和谷胱甘肽结合物等多种化合物<sup>[1-2]</sup>。ABC 转运蛋白在生物体内与一些重要的生理过程如细菌耐药性、次生代谢产物积累、生物及非生物胁迫等密切相关, 因此引起了科学家的广泛关注<sup>[1]</sup>。

目前, 拟南芥(*A. thaliana*)和水稻(*Oryza sativa*)全基因组测序工作已经完成, 序列分析表明拟南芥和水稻中 ABC 基因家族分别含有 129 和 128 个成员, 通过系统进化和功能分析可将这些 ABC 转运蛋白分为八大亚家族(亚家族 A—亚家族 H), 包括多向耐药性(Pleiotropic drug resistance, PDR)蛋白、多药耐药性(Multidrug resistance, MDR)蛋白、多药耐药性相关蛋白(MDR-associated protein, MRP)、AB-

收稿日期: 2013-07-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101166); 江苏省自然科学基金项目(BK2010474); 江苏省农业科技自主创新资金项目(cx(11)2052)

作者简介: 许玲(1983-), 女, 安徽安庆人, 硕士, 主要从事大豆耐盐分子机理研究。

通讯作者: 易金鑫(1969-), 男, 安徽滁州人, 研究员, 博士, 主要从事植物耐盐研究。

CA 亚家族<sup>[3-4]</sup>, 其中 MRP 是 ABC 转运蛋白家族中 C 亚族, 能从药物抗性的肿瘤细胞中输出谷胱甘肽结合物和有机阴离子。

近几年, 拟南芥和水稻基因组中有关 MRPs 的报道陆续增多<sup>[5-10]</sup>, 其中拟南芥基因组中包含 15 个 MRPs, 而水稻基因组中则有 18 个 MRPs 成员。据报道, 拟南芥 MRPs 亚族中 AtMRP1 和 AtMRP2 不同于拟南芥中其他的 MRPs, 区别在于这 2 个蛋白的 C-端有接近 150 个氨基酸残基序列扩展, 标注为 C1 和 C2 域, 这种结构非常类似于酵母液泡膜上的 YLL015 蛋白<sup>[11]</sup>。Tommasini 等<sup>[12]</sup>发现, AtMRP1、AtMRP2 和 AtMRP3 可以转运 GSH 连接复合物, 并有证据表明三者以及它们谷胱甘肽酰基化化合物的接合形式的功能类似于对除草剂、外源物质和植物抗毒素的外排作用。但只有异源表达 AtMRP2 和 AtMRP3 基因时可以转运衰老叶片叶绿素降解的代谢物<sup>[13]</sup>。研究发现, 拟南芥 *AtABCC5*, 玉米 *ZmMRP4* 和水稻 *OsMRP13* 等同源基因在肌醇六磷酸的运输中有重要作用, 突变体分析表明, 上述基因突变会降低种子内的肌醇六磷酸的含量, 同时无机磷酸的含量提高<sup>[9-10]</sup>。Bovet 等<sup>[14-15]</sup>发现, 拟南芥的 *AtMRP3* 基因表达随着  $Cd^{2+}$  浓度的上升而呈现上调, 猜测其是一种解毒蛋白。

本研究利用 RT-PCR 技术从大豆中克隆了一个质子转运体 *GmMRP5* 基因, 分析了其编码蛋白的保守结构域和系统进化过程, 利用实时定量 PCR 技术对其组织表达、非生物胁迫以及酸性环境下的表达进行了分析, 并构建了植物表达载体, 为后期转基因功能验证奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料、菌株、试剂

试验用大豆材料为 willimas82, 大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$  为江苏省农业生物学重点实验室保存。pGEM-T Easy Vector T 克隆试剂盒、DNA marker、Trizol reagent、T4 DNA 连接酶来自 Fermentas 公司; 引物由上海英潍生物技术有限责任公司提供, RNA 提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒购于 Promega 公司, *Taq* DNA 聚合酶、反转录试剂等其他生物学试剂购自上海皓嘉科技发展有限公司。

### 1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

幼苗期的根、茎、叶, 开花期的根、茎、叶、花和结荚期的根、茎、叶、荚, 以及经脯氨酸、柠檬酸和 pH 缓冲液处理 0 (CK), 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 h 的根部组织等样品在液氮中研磨后用 Promega RNA 提取

试剂盒进行总 RNA 的提取, 经 DNase I 消化去除 DNA, 并经质量体积分数 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的浓度和完整性。cDNA 合成采用上海皓嘉科技发展有限公司反转录试剂盒操作流程进行。

### 1.3 基因克隆

利用 RT-PCR 方法从大豆幼苗根部组织 mRNA 中扩增全长 ORF, 所用正向引物序列为 Primer F: 5'-ATGGTGAAATGCCCTTTTTC-3' 和反向引物序列为 Primer R: 5'-CTAAAAGTCTGGTATGCCACTTG-3', 以 cDNA 为模板扩增基因全长 DNA 序列, 扩增体系为: cDNA 或 DNA 稀释样, 适量; 5  $\times$  PS Buffer 5  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2  $\mu$ L, 10 mmol/L 上下游引物各 0.5  $\mu$ L, 5 U/mL PimerSTAR DNA 聚合酶 0.25  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足至 25  $\mu$ L。反应程序为: 98  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 98  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 55  $^{\circ}$ C 复性 10 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 35 个循环; 暂停 PCR 程序, 加入 1  $\mu$ L *Taq* DNA 聚合酶, 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物连入 pCX-SN Vector T 克隆试剂盒载体中, 送交南京金斯瑞生物科技有限公司测序, 获得目的序列。

### 1.4 序列分析

采用 BlastP 搜索 NCBI 的核苷酸和蛋白质数据库进行序列相似性分析及氨基酸保守性预测; 利用 Clustal X 进行氨基酸序列比对及功能结构域查找与相似序列分析; 利用 TMpred 在线分析软件在线预测蛋白的跨膜结构域; 利用 <http://www.soybase.org/> 网站提供的 Blast 程序比对分析基因的拷贝数; 进化树采用 MEGA 5.05 程序运行获得, 保存 JPEG 格式备用。

### 1.5 基因表达分析

采用 Real-Time-PCR 分析法, 利用提取的幼苗根、茎、叶组织和花以及豆荚的 cDNA 为模板检测基因组织表达情况。利用经脯氨酸、柠檬酸和 pH 缓冲液处理 0 (CK), 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 h 的根部组织 cDNA 为模板来分析基因的诱导表达, 基因正向引物序列为 5'-GAGGAAATGCGTGGAGTAGAG-3', 反向引物序列为 5'-GAAAGTAGCCAGAGCAGAAA G-3', 以大豆持家基因 (*Glycine max actin-1-like*) (*GmActin* 登录号: XM\_003552652) 为内参, 正向引物序列为 5'-CGGTGGTTCTATCTTGGCATC-3', 反向引物序列为 5'-GTCTTTCGCTTCAATAACCCTA-3', PCR 反应试剂盒体系采用 Takara 公司购买的 SYBR Green Supermix, 反应程序参照 Roche 2.0 Real-Time PCR Detection System 设计, 所有操作均按说明书进行, 试验重复 3 次。

## 1.6 *GmMRP5* 基因植物表达载体的构建

将获得的全长 ORF 片段利用 T/A 克隆到 pCX-SN-vector<sup>[16]</sup> 构建 pCXSN-*GmMRP5* 植物表达载体, 热激法转入大肠杆菌, 利用 35s-protomer 正向引物 5'-CAATCCCACTATCTTCGCAAGACC-3' 和基因反向引物 5'-CTAAAAGTCTGGTATGCCACTTG-3' 检测阳性克隆, 并用质粒提取试剂盒提取质粒, 然后采用冻融法将载体转入农杆菌 EHA105 中, 利用液氮冻后保存于超低温冰箱。

## 2 结果与分析

### 2.1 *GmMRP5* 基因的克隆

根据 <http://www.phytozome.net/cgi-bin/gbrowse/soybean/> 提供的序列 (Glyma03g32500.1) 设计 ORF (open reading frame) 全长上下游引物, 利用 RT-PCR 技术从大豆幼苗根 cDNA 中扩增获得 5 kb 左右的清晰单一条带 (图 1-A), 回收条带并克隆、测序比对发现该序列与理论参考序列基本一致, 只有少数核苷酸不同, 但仍然是一个完整的 ORF; 该基因 ORF 全长 4 479 bp, 编码 1 492 个氨基酸, 理论分子量

166 kDa, 等电点 pI 值 8.0。Blast P 分析发现该基因编码蛋白序列与拟南芥、水稻、玉米等植物中 MRPs 同源性较高, 故命名为 *GmMRP5*。将用高保真酶扩增获得的 PCR 片段加 A, 然后连接到植物表达载体 pCX-SN 上, 挑取单克隆并测序验证, 为后续转基因功能鉴定奠定基础 (图 1-B)。

### 2.2 *GmMRP5* 序列分析

利用 <http://www.soybase.org/> 网站提供的 Blast 核苷酸序列比对发现, 该基因在大豆基因组中仅有 1 个拷贝, 即 Glyma03g32500.1, 推断的氨基酸序列 BlastP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 比对发现该蛋白含有典型的 MRP 家族蛋白保守结构域, 推测 *GmMRP5* 属于大豆 ABC 转运蛋白家族 MRP 亚族成员。根据 TMpred 在线分析软件推测 *GmMRP5* 包含 13 个跨膜结构域, 并且含有保守的 ABC 转运蛋白家族保守基序: Walker A (GMVSGSK 和 GRTGSGK) 和 Walker B (YLLD 和 ILVLD), 其中 C-端的 Walker B 是一个变异的 Walker B (ILVLD), 同时还含有 2 个典型的 ABC 转运蛋白信号 (LSGGQKQVRQLARAL 和 SVGQRQLVALG) (图 2-A)。

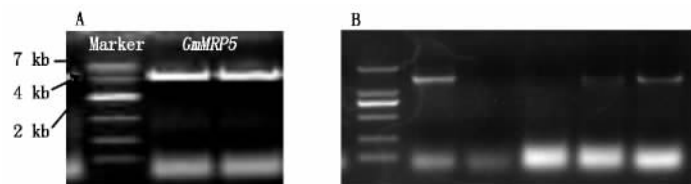


图 1 *GmMRP5* 基因的克隆 (A) 和阳性克隆 PCR 鉴定结果 (B)

Fig. 1 Cloning of *GmMRP5* gene in soybean (A) and PCR identification of positive clones (B)

利用 ClustalX 1.83 软件对 *GmMRP5*、拟南芥 AtMRP5、水稻 OsMRP13 和玉米 ZmMRP4 进行多重序列比对发现, *GmMRP5* 与 AtMRP5、OsMRP13、ZmMRP4 的相似性分别为 74%、66%、66%, 并且它们在 ABC 转运蛋白家族保守结构域处具有高度一致性 (图 2-B)。来源于不同植物的 20 个 MRP 蛋白进化分析表明, *GmMRP5* 与 AtMRP5 同缘关系最近, 其次是 OsMRP13 和 ZmMRP4, 且同属于 ABC 转运蛋白家族 C 亚家族 (图 2-C)。

### 2.3 *GmMRP5* 基因表达分析

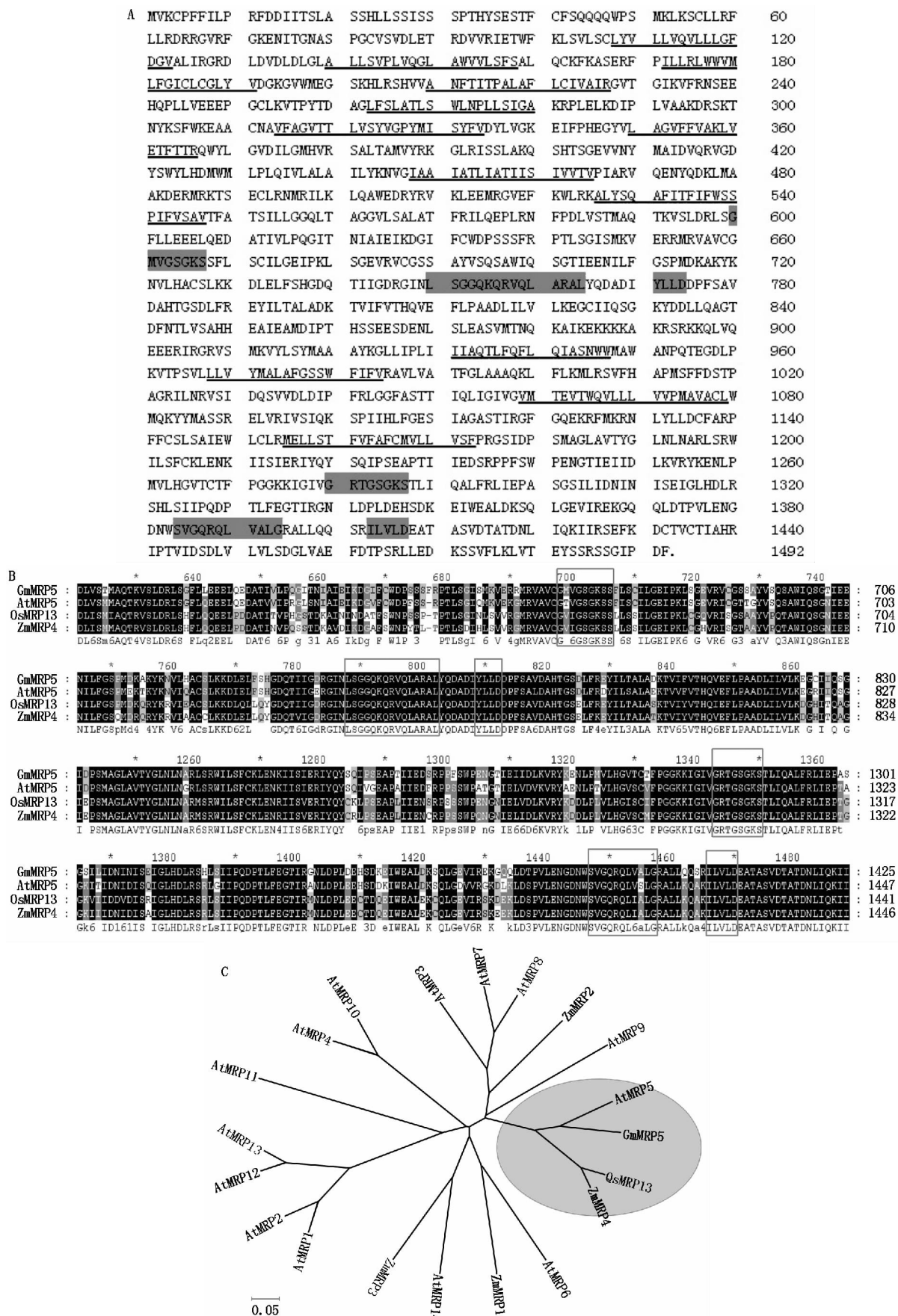
采用 Real-Time PCR 的方法分析了 *GmMRP5* 基因的组织表达特异性, 结果显示, *GmMRP5* 在大豆的整个生理发育期以及所有组织中均有表达。从生理发育时期来看, 幼苗期和成熟期的表达量相对较弱, 开花期的表达量相对较高; 从不同组织来看, *GmMRP5* 在开花期的茎中表达量最高, 其次是在幼苗期的叶中表达量相对较高 (图 3-A)。

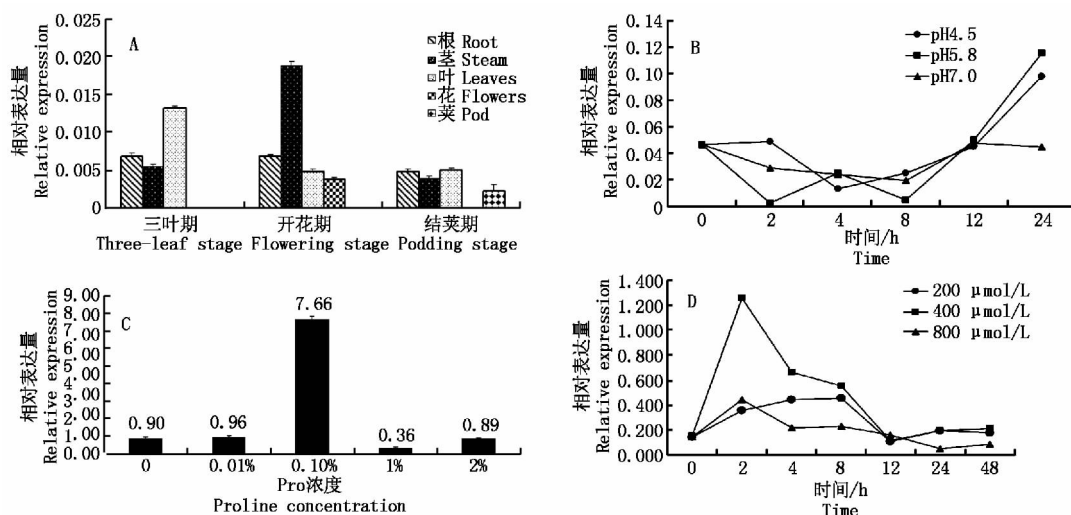
为了研究 *GmMRP5* 基因在非生物胁迫下的表达特征, 利用 Real-Time PCR 方法分析了 *GmMRP5*

基因在不同浓度脯氨酸、柠檬酸和 pH 缓冲液处理后的表达模式 (图 3), 结果表明, 在 pH 7.0 缓冲液 (中性对照) 处理下, *GmMRP5* 基因的表达量基本保持不变, 但是在 pH 4.5 和 pH 5.8 这 2 种酸性缓冲液中, *GmMRP5* 基因的表达呈现波动变化, 并且在处理 24 h 时达到最高 (图 3-B); 同时对不同浓度脯氨酸处理 24 h 的表达进行了分析, 结果表明 *GmMRP5* 基因受脯氨酸诱导表达, 并且脯氨酸浓度为 0.1% 时达到最大值, 随后降低 (图 3-C); 另外不同浓度的柠檬酸处理不同时间后, *GmMRP5* 基因的表达量也随之变化, 并且在 400  $\mu\text{mol/L}$  的柠檬酸处理 2 h 时表达量达到最大值 (图 3-D), 这些结果都表明该基因是受酸性环境诱导的。

## 3 讨论

在植物中, 最具特征的 ABC 转运蛋白是全分子的 ABC 转运蛋白亚家族, 包括 MRP、PDR 和 PGP 亚家族<sup>[17-19]</sup>。已知 MRP 转运体作用于谷胱甘肽结合物和叶绿素代谢物、糖基结合物和葡萄糖苷酸的空泡

A. *GmMRP5* 序列结构分析; B. *GmMRP5* 保守结构域序列比对分析; C. *GmMRP5* 进化树分析。A. Sequence structure of *GmMRP5*; B. ABC motifs in predicted *GmMRP5* protein; C. Phylogenetic tree analysis of soybean *GmMRP5* with other MRP proteins.图 2 *GmMRP5* 结构特征与进化树分析Fig. 2 Sequence structure characterization and phylogenetic tree analysis of *GmMRP5*



A. *GmMRP5* 组织表达特异性分析; B. pH 缓冲液处理后 *GmMRP5* 诱导表达分析; C. 脯氨酸处理后 *GmMRP5* 诱导表达分析; D. 柠檬酸处理后 *GmMRP5* 诱导表达分析。  
A. Tissue expression analysis of *GmMRP5*; B. Soybean root under different pH buffer solution treatment;  
C. Soybean root under proline solution treatment; D. Soybean root under citrate solution treatment.

图3 *GmMRP5* 基因表达分析

Fig. 3 Expression analysis of *GmMRP5* in soybean

隔离以及监控细胞离子通量<sup>[20]</sup>。在结构上,MRPs的核心结构通常由4个结构域组成,包括2个跨膜结构域(Transmembrane domain,TMD)和2个核苷酸结构域(Nucleotide-binding fold,NBF),其中,核苷酸结构域包含了3个模体(Motif),分别为Walker A(P-loop)、Walker B和Walker C,后者位于前2个模序中间。3个模体的序列都十分保守,Walker A模体的特征氨基酸残基序列为G-X-X-G-X-G-X-S/T,Walker B模体为T/I-Y-L-L-D<sup>[21]</sup>,而Walker C模体则为([LIVMFY]-S-[SG]-G-X(3)-[RKA]-[LIVMYA]-X-[LIVMF]-[AG])<sup>[22]</sup>。本研究发现,*GmMRP5*含有13个跨膜结构域,并含有MRP家族蛋白保守结构域,与拟南芥*AtMRP5*同源性最高,因此推测,*GmMRP5*属于ABC转运蛋白家族C亚族。在结构上,*GmMRP5*的核心结构也是由4个结构域组成,其核苷酸结构域含有2个保守的典型ABC转运蛋白信号的Walker A和Walker B。

组织表达特异性分析发现,*GmMRP5*在大豆的整个生理发育期以及所有组织中均有表达,与*AtMRP1*、*AtMRP2*、*AtMRP3*和*AtMRP5*的表达模式一致<sup>[23-24]</sup>。拟南芥中存在酞酰基脲受体(SUR)类型的蛋白,此蛋白的作用类似于囊纤维跨膜传导调节剂(CFTR),主要是调节气孔保卫细胞运动期间外部的K<sup>+</sup>通道<sup>[25]</sup>。这也说明拟南芥中的MRPs可能归属于通道蛋白或通道调节蛋白。Gaedeke等<sup>[24]</sup>研究发现*AtMRP5*启动子GUS染色后集中在茎、叶和根的维管束中表达。另外ABCC亚家族包括12种完整的转运体,具有离子转运、细胞表面受体和毒素

分泌活性等功能,其主要成员MRPs是有机阴离子转运体<sup>[26]</sup>。本研究利用pH缓冲液处理大豆幼苗,结果表明,*GmMRP5*基因在酸性缓冲液(pH值4.5和pH值5.8)中的表达量明显比中性缓冲液中表达量高,并且在pH缓冲液处理24 h后达到最大值;同时我们又用脯氨酸和柠檬酸处理大豆幼苗,结果都表明,*GmMRP5*基因响应外界酸性环境,因此,我们推测*GmMRP5*在大豆中扮演质子泵或者有机阴离子转运体的作用,这为后期*GmMRP5*的功能研究奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] Theodoulou F L. Plant ABC transporters [J]. Biochim Biophys Acta 2000, 1465(1/2): 79-103.
- [2] Goossens A, Hakkinen S T, Laakso I, et al. Secretion of secondary metabolites by ATP-binding cassette transporters in plant cell suspension cultures [J]. Plant Physiol, 2003, 131(3): 1161-1164.
- [3] Verrier P J, Bird D, Burla B, et al. Plant ABC proteins—unified nomenclature and updated inventory [J]. Trends Plant Sci 2008, 13(4): 151-159.
- [4] 霍晓奎, 刘克辛. ATP结合盒转运体介导的肝癌多药耐药研究进展 [J]. 药物评价研究 2012, 35(1): 1-5.
- [5] Sanchez-Fernandez R, Davies T G, Coleman J O, et al. The Arabidopsis thaliana ABC protein superfamily: a complete inventory [J]. J Biol Chem 2001, 276: 30231-30244.
- [6] Martinoia E, Klein M, Geisler M, et al. Multifunctionality of plant ABC transporters more than just detoxifiers [J]. Planta 2002, 214: 345-355.

- [7] Kolukisaoglu U H ,Bovet L ,Klein M *et al.* Family business: the multidrug-resistant associated protein ( MRP) ABC transporter genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant* 2002 216: 107 – 119.
- [8] Jasinski M ,Ducos E ,Martinoia E *et al.* The ATP-binding-cassette transporters: structure ,function and gene family comparison between rice and *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol* 2003 ,131: 1169 – 1177.
- [9] Rea P A ,Sanchez-Fernandez R ,Chen S *et al.* The plant ABC transporter superfamily: the functions of a few and the identity of many in: ABC Transporters: From Bacteria to Man [J]. *Plant Physiol* 2001 ,132: 335 – 355.
- [10] Garcia O ,Bouige P ,Forestier C ,*et al.* Inventory and comparative analysis of rice and *Arabidopsis* ATPbinding cassette( ABC) systems [J]. *J Mol Biol* 2004 ,343: 249 – 265.
- [11] 王利国 ,李 玲. 拟南芥中 ABC 转运蛋白的研究进展 [J]. *生命科学研究* 2002 6( 1) : 13 – 17.
- [12] Tommasini R ,Vogt E ,Fromenteau M ,*et al.* An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity [J]. *Plant Journal* ,1998 ( 13) : 773 – 780.
- [13] Hinder B ,Schellenberg M ,Rodonj S ,*et al.* How plants dispose of chlorophyll catabolites: directly energized uptake of tetrapyrrolic breakdown products into isolated vacuoles [J]. *Journal of Biological Chemistry* ,1996 ,271: 27233 – 27236.
- [14] Bovet L ,Eggmann T ,Meylan Bettex M *et al.* Transcript levels of AtMRPs after cadmium treatment: induction of AtMRP3 [J]. *Plant Cell Environ* 2003 26: 371 – 381.
- [15] Hofmann K ,Stoffel W. TMbase-A database of membrane spanning protein segments [J]. *Biol Chem Hoppe-Seyler* ,1993 347: 160 – 166.
- [16] Songbiao C ,Pattavipha S ,Jianli L *et al.* A versatile zero background T-vector system for gene cloning and functional genomics [J]. *Plant Physiology* 2009 ,150: 1111 – 1121.
- [17] Jerome Crouzet ,Tomasz Trombik A *et al.* Staffan Frayssse ,Organization and function of the plant pleiotropic drug resistance ABC transporter family [J]. *FEBS Lett* ,2006 4( 580) : 1123 – 1130.
- [18] Markus Geisler ,Angus S Murphy. The ABC of auxin transport: the role of Pglycoproteins in plant development [J]. *FEBS Lett* 2006 4( 580) : 1094 – 1102.
- [19] Markus Klein ,Bo Burla ,Enrico Martinoia. The multidrug resistance-associated protein( MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants [J]. *FEBS Lett* 2006 4( 580) : 1112 – 1122.
- [20] Rea Philip A. Plant ATP-binding cassette transporters [J]. *Annu Rev Plant Biol* 2007 58: 347 – 375.
- [21] Walker J E ,Saraste M ,Runswick M J *et al.* Distantly related sequences in the a-and b-subunits of ATP synthase ,myosin ,kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold [J]. *EMBO J* ,1982 ,1: 945 – 951.
- [22] Higgins C F. ABC transporter: from microorganisms to man [J]. *Annu Rev Cell Biol* ,1992 8: 67 – 113.
- [23] Tommasini R ,Evers R ,Vogt E *et al.* The human multidrug resistance-associated protein functionally complements the yeast cadmium resistance factor 1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1996 93: 6743 – 6748.
- [24] Nicola Gaedeke ,Markus Klein ,Uener Kolukisaoglu. The *Arabidopsis thaliana* ABC transporter AtMRP5 controls root development and stomata movement [J]. *The EMBO Journal* Vol 2006 20: 1875 – 1887.
- [25] Eun Kyung Lee ,Minjae Kwon ,Jae-Heung Ko. Binding of sulfonylurea by AtMRP5 ,an *arabidopsis* multidrug resistance-related protein that functions in salt tolerance [J]. *Plant Physiol* Vol 2004 ,134: 528 – 538.
- [26] 马云芳 ,梁国鲁 ,裴得胜 ,等. ABC 转运蛋白研究的新进展 [J]. *生物技术通报* 2008 5: 35 – 41.