

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2017.05.039

重组植物 AHA2 蛋白的真核表达及纯化

吴兴翰¹, 陈敏², 李硕¹

(1. 四川大学生命科学学院, 成都 610064; 2. 成都市第三人民医院, 成都 610031)

摘要: AHA2 蛋白位于植物细胞质膜上, 该蛋白在原核蛋白表达体系中无法重组表达. 已经报道的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 表达体系操作复杂, 成本高昂. 本文将拟南芥 *aha2* 基因 (全长 2984bp) 插入真核表达载体 pPICZ α A 中, 线性化质粒 pPICZ α A-*aha2*, 电转化毕赤酵母 X33 细胞, 通过同源重组获得工程菌. 以 0.5% 甲醇诱导表达 72 h 后, 收获细胞. 冷冻研磨细胞, 离心并收集上清进行亲和层析和分子筛纯化. SDS-PAGE 分析结果显示, 目的蛋白为 97kD 的条带. 本研究成功的在毕赤酵母 X33 细胞中实现了拟南芥 AHA2 蛋白的表达和纯化.

关键词: *aha2*; 基因克隆; 重组蛋白表达; 蛋白纯化

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0490-6756(2017)05-1119-06

Eukaryotic expression and purification of recombinant plant AHA2 protein

WU Xing-Han¹, CHEN Min², LI Shuo¹

(1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, 610064, China;
2. The Third People's Hospital of Chengdu, Chengdu, 610031, China)

Abstract: AHA2 protein anchors within the cytoplasm membrane of plant cell. In prokaryotic expression system, the protein can't be recombinant expressed. In *Saccharomyces cerevisiae* expression system, the procedures of AHA2 purification stay complex and expensive. The *aha2* gene sequence of *Arabidopsis thaliana*, at a length of 2984bp, was inserted into vector pPICZ α A. The constructed recombinant plasmid pPICZ α A-*aha2* was linearized and transfected to x33 cells by electroporation. X33 cells was harvested after 72 hours induced by 0.5% methyl alcohol. Refrigeration-rubbing the cells, collected the supernatant. Purified the interest protein by affinity chromatography and molecular sieve chromatography. Various components were obtained and determined for protein content by SDS-PAGE. The SDS-PAGE showed that the AHA2 protein was located in lane with relative molecular masses of 97kD. So the AHA2 protein of *Arabidopsis thaliana* was successfully expressed and purified in *PiChia* X33 expression system.

Keywords: *aha2*; Gene cloning; Recombinant protein; Protein purification.

1 引言

很多生命活动都与膜蛋白有直接关系, 膜蛋白

在能量转换、信号转导和物质运输等重要生命过程中都发挥着至关重要的作用. 植物质膜上的 AHA2 蛋白作为质子泵, 在植物质膜两侧形成跨

收稿日期: 2016-08-15

基金项目: 国家自然科学基金(31300618)

作者简介: 吴兴翰(1990-), 男, 黑龙江伊春人, 硕士研究生, 研究方向: 衰老细胞的分子机理. E-mail: xinghanwu@foxmail.com

通讯作者: 李硕. E-mail: lishuo@scu.edu.cn; 陈敏. E-mail: 150325684@qq.com

膜质子驱动力,用于 ATP 的形成^[1].与此同时,它还参与次级离子或溶质的传递,并且控制着植物生长发育的诸多过程,近期还有研究表明 AHA2 与植物根系结构应对氮源供给有重要联系^[2].

物质膜上的 AHA2 蛋白属于 P 型 ATP 酶^[3],在转运质子的过程中涉及磷酸化和去磷酸化^[4].AHA2 蛋白在组成上包含一个 α 亚基和一个 β 亚基,具有一个 10 次跨膜螺旋,氨基端和羧基端都位于细胞质一侧.细胞质内最大的肽链环中包含有催化过程中磷酸化的天冬氨酸残基以及 ATP 的结合区^[5].

物质膜上的 AHA2 蛋白在植物的抗盐性^[6]、气孔的开闭^[7,8]、渗透压的调节,细胞内 pH 值的调节^[9]及植物根系的发育、植物对氮源的吸收^[2]等过程中可以起到十分重要和广泛的作用.它是植物适应不同环境的生理元件,广泛的参与植物细胞中多条信号通路^[10],通过自身活性的调节,使植物得以适应环境和发育过程中的变化.

因为 AHA2 蛋白在植物的生长分化,抗逆,免疫^[11,12],代谢上具有极其重要的作用.一直以来人们对该蛋白的研究不曾停止.由于该蛋白现有的表达提纯方法流程复杂,成本高昂,一般实验室难以实施^[5,13],这使得针对于 AHA2 蛋白的体外实验受到限制,严重制约了对 AHA2 蛋白功能的研究.本文克隆了 *aha2* 基因;并利用毕赤酵母 (*PiChia*) 对 AHA2 蛋白加以表达,构建了 AHA2 蛋白的表达载体;采用了新的简单易行的方法对目的蛋白进行了提纯;经过浓缩、富集和分子筛层析,获得了与 14-3-3 结合的目的蛋白,14-3-3 作为分子伴侣,可以进一步激活 AHA2 的活性^[14,15]为后续研究提供便利的同时,也为其他科研工作者提供了借鉴.

2 材料和方法

2.1 材料

2.1.1 菌株与质粒 大肠杆菌为 DH5 α 菌株, *PiChia* 酵母表达菌株 X33, pPICZ α A 酵母表达质粒(实验室改造,去除了多克隆位点,保留了 *Nde* I 与 *Xho* I 两个酶切位点),均为实验室保存.

2.1.2 工具酶和试剂 DNA 聚合酶 pfu,限制性内切酶 *Nde*I、*Xho*I、*Sac*I 为 NEB 公司(英国)产品,其余生化试剂购于 Sigma 公司(美国),镍柱柱材购于 QIAGEN 公司(德国),DDM(十二烷基- β -D-麦芽糖苷, n-Dodecyl- β -D-maltopyranoside) 购自 Anatrace 公司(英国).

2.2 方法

2.2.1 序列分析 用 Snapgen 软件进行多序列比对,用 HMMTOP 软件进行跨膜结构域的预测,用 DNAMAN 软件进行了序列同源性分析.

2.2.2 *aha2* 的 PCR 扩增 根据 *aha2* cDNA 序列,设计了 *aha2* 的引物,上游引物序列为 5'-GGGAAT-TCCATATGTCGAGTCTCGAAGATATC-3',下游引物序列为 5'-CCGCTCGAGCACAGTGTAGTGACT-GGG-3'.反应以拟南芥根系 cDNA 为模板,在上下游分别采用 *Nde* I 和 *Xho* I 作为酶切位点,使用高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 反应,反应的条件为:95 $^{\circ}$ C 5min;95 $^{\circ}$ C 15s,54 $^{\circ}$ C 15s,72 $^{\circ}$ C 2.5min,进行 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 5min;4 $^{\circ}$ C 储存 PCR 产物.扩增的产物为 AHA2 蛋白的全长编码序列,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离后切胶回收后备用.

2.2.3 毕赤酵母表达载体的构建 将 2.2.2 所获得的 PCR 产物进行双酶切,所使用的酶为 *Nde* I 和 *Xho* I,将酶切产物克隆到相同酶切后的 pPICZ α A 酵母表达载体中.

2.2.4 毕赤酵母表达载体的线性化 酵母表达载体 pPICZ α A-*aha2* 先转化大肠杆菌,经振荡培养后,提取质粒,质粒纯化后用 *Sac* I 完全酶切,使质粒线性化,线性化的质粒经琼脂糖凝胶电泳分离后切胶,回收后备用.

2.2.5 酵母的转化与抗性筛选 将 100 μ L 感受态细胞 X33 与 20 μ g 线性化的 DNA 轻柔的混合;将混合后的感受态细胞转移至洁净的电转杯中,置于冰上 5 min 以上;选择真菌转化,进行电转;加入 1mL 1mM 的山梨醇,将细胞与 DNA 的混合液转移至 1mL 管中,在 30 $^{\circ}$ C 条件下孵育 1 h;14000r/min 30s 将混合液离心,弃去上清;用 1 mL 预热后的 YPD 培养基将沉淀悬起,转移到 50mL 管中,30 $^{\circ}$ C 220r/min 孵育 2 h.

将孵育好的酵母细胞涂抹在具有 100 μ g/mL Zeocin 的 YPD 培养基上进行初步抗性筛选;选择生长速度快的菌落转接到具有 250 μ g/mL Zeocin 的 YPD 培养基上进行再一次抗性筛选.

2.2.6 AHA2 蛋白在毕赤酵母中的小量表达测试 挑取 YPD 培养基上筛选出的单克隆转接到 5mL BMGY 培养基中,30 $^{\circ}$ C 220r/min 培养 16 个小时,使培养液 OD₆₀₀ 达到 4~6;抽取 0.5mL 过夜培养液用双蒸水稀释至 OD₆₀₀ 低于 2.5,计算每个培养样品的稀释倍率;将剩余的培养液离心,用双蒸馏水冲洗 3 次,根据计算得出的稀释倍率,用

BMMY培养基稀释至OD为20;抽取以上稀释后的培养基各5mL,确保样品中菌体量一致,在30℃条件下进行蛋白表达培养;同时保存未经BMMY培养基诱导表达的酵母培养液各0.5mL作为阴性对照;之后每隔24h取诱导表达酵母培养液0.5mL,另外在培养体系中补充0.5mL BMMY培养基,直至第72h。

2.2.7 AHA2蛋白在毕赤酵母中表达的免疫印迹试验检测 将2.2.6中所保留的样品(0.5mL)离心,将沉淀用50 μ L含有蛋白酶抑制剂PMSF的PBS缓冲液重悬;每个样品加入5 μ L Lyticase (5U/ μ L),在37℃,30min条件下将酵母细胞壁消化;加入70 μ L 200mM NaOH溶液进一步消化10min;将样品反复冻融10次,确保细胞壁完全打开;加入150 μ L 2 \times Loading Buffer后样品进行蛋白免疫印迹试验检测。

2.2.8 诱导AHA2的大量表达 利用BMGY培养基对工程菌进行大量培养,在30℃、220r/min的条件下,酵母培养液的OD₆₀₀值在18h后会达到6~8;将工程菌的菌体在3800r/min离心10min条件下离心,并用高温湿热灭菌后的4℃双蒸水将菌体清洗三次;将清洗过的菌体用BMMY培养基重悬至OD为2;在30℃ 250r/min的条件下继续培养工程菌72h,使AHA2蛋白充分表达。

以3800r/min离心10min收集工程菌,将菌体用双蒸水清洗三次,用PBS重悬,用液氮冷冻研磨机对重悬菌液进行研磨;13cps 10个循环;将研磨后的粉末置于四度冷室化开;13000r/min 4℃离心30min;将沉淀用含有2% DDM(十二烷基- β -D-麦芽糖苷, n-Dodecyl- β -D-maltopyranoside)的PBS缓冲液重悬,并用匀浆机充分打匀;将破碎菌体溶液置于4℃冷室,孵育2小时,使AHA2蛋白充分从细胞质膜上脱离下来;将该溶液13000 r/min 4℃离心30min,取上清抽滤后进行亲和层析提纯。

2.2.9 AHA2蛋白的亲和层析提纯 将2.2.8中超速离心的上清反复充填Ni-NTA亲和柱柱材三遍,使蛋白和柱材充分混合。

每12L培养基所培养出的酵母量需要用12mL的Ni-NTA亲和柱材。然后每2mL Ni-NTA亲和柱材加入三次10mL Wash Buffer(含25mM咪唑和0.2% DDM的PBS缓冲液),从而将非特异性结合的杂蛋白除去。

最后每2mL柱材加入10mL Elution Buffer(含250mM咪唑和0.2% DDM的PBS缓冲液),

将目的膜蛋白从亲和柱材上洗脱下来。

2.2.10 蛋白的浓缩 将流出的洗脱液加入浓缩离心管中,在台式冷冻离心机中以4℃条件进行离心,最终浓缩体积视实验需求而定。使用Centri-con[®]进行浓缩时离心力不应超过2500g,而使用Centriprep[®]进行浓缩时离心力不应超过1100g,否则将会造成浓缩膜的破裂。

2.2.11 蛋白的凝胶排阻色谱纯化 预先用SD200分子筛纯化缓冲液平衡Superdex-200色谱柱,将2.2.10得到的浓缩液注入色谱仪的进样器中,启动色谱仪,流速设定为0.5mL/min,限压不超过1.5MPa。

设定色谱仪的组分收集器,每0.5mL收集一个流出组分,收集范围为洗脱体积7.0mL至24.0mL。根据紫外吸收色谱图估计含有目的蛋白组分的位置,并用SDS-PAGE进行分析,选取含量最大、纯度最高的几个组分作为蛋白纯化的最终产品。

2.2.12 蛋白浓度的测定 根据Bio-Rad生产的Protein Assay试剂盒的操作说明操作:(1)染色剂稀释.将蛋白染色剂用超纯水稀释5倍,充分溶解后用0.44 μ m的滤膜过滤(可以室温保存两周)。(2)配制牛血清白蛋白(BSA)标准品.将1mg/mL的BSA分别稀释成0.2、0.4、0.6、0.8mg/mL,另加一组超纯水做负对照。(3)染色.向1.5mL染色剂中分别加入各浓度的BSA、超纯水和样品各30 μ L,摇匀,每管两个重复,室温放置5min。(4)用分光光度计测量600nm处吸光值,记录并绘制标准曲线确定样品浓度。

3 实验结果

3.1 植物aha2基因的克隆

本研究基于植物aha2(NCBI序列号:NC_003075.7),设计了序列特异性引物.以拟南芥根系组织的cDNA为模板扩增植物aha2基因.如图1琼脂糖凝胶电泳所示,植物aha2基因扩增结果为2984bp,理论编码蛋白大小约为97kD.经菌落PCR检验和测序,证明是正确的PCR扩增。

3.2 植物aha2基因表达载体的构建及诱导表达

本实验中将实验室改造过的pPICZ α A质粒作为真核表达载体.我们将PCR产物及质粒纯化回收、双酶切(采用Nde I和Xho I进行双酶切)、连接得到pPICZ α A-aha2重组质粒。

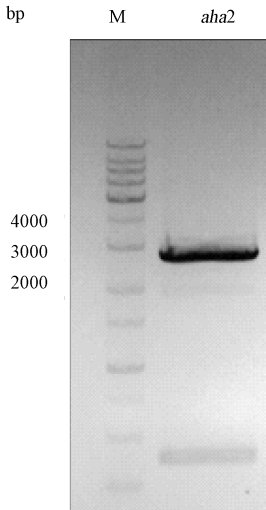


图 1 植物 *aha2* 基因 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of plant *aha2* PCR products

将 pPICZ α A-*aha2* 重组质粒用 *Sac* I 进行单酶切后,利用线性化质粒具有的同源臂将基因序列整合到毕赤酵母基因组中.经抗性筛选和特异引物 PCR 菌落筛选得到含有重组质粒的工程菌.用免疫印迹试验检测甲醇浓度梯度和时间梯度诱导效果,因为浓度过高的甲醇会对酵母产生毒害,故选择了 0.1%、0.3%、0.5% 的浓度进行测试(如图 2).图 2(A)、图 2(B)、图 2(C)分别检测到 97kD 的 AHA2 融合蛋白.该蛋白的最佳甲醇诱导浓度为 0.5%,最佳诱导时间为 72 h.

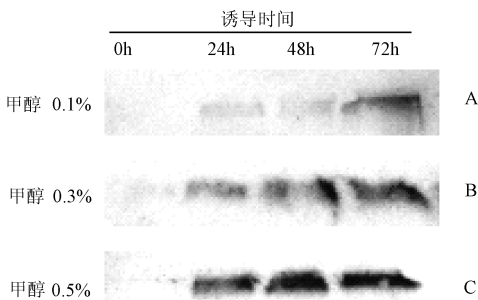


图 2 植物 AHA2 蛋白在 *PiChia* 体系中真核表达时,甲醇浓度及诱导时间测试
Fig. 2 Plant AHA2 eukaryotic expression in *PiChia*

3.3 植物 AHA2 重组蛋白的纯化

用含有不同咪唑浓度的蛋白洗脱缓冲液(Wash Buffer),浓度梯度洗脱杂蛋白,得到 AHA2 洗脱杂蛋白的最佳浓度均为 25mM 咪唑(如图 3).经 25mM 咪唑浓度清洗杂蛋白后,用 250mM 咪唑洗脱目的蛋白,我们得到了粗提纯的蛋白样品(如图 3).

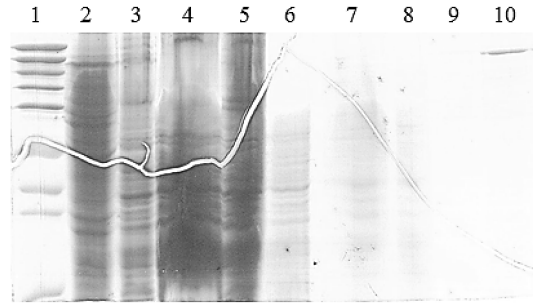


图 3 植物 AHA2 蛋白亲和层析纯化产物的 SDS-PAGE 分析

从左到右依次是 1. Marker、2. 细胞匀浆、3. 第一次高速上清、4. 第一次高速沉淀、5. 第二次高速上清、6. 流穿镍柱取样、7. 第一次 Wash Buffer 清洗、8. 第二次 Wash Buffer 清洗、9. 第三次 Wash Buffer 清洗、10. AHA2 蛋白从镍柱上洗脱

Fig. 3 Affinity chromatography purification product analysis of plant AHA2 by SDS-PAGE
From left to right the lanes are 1. Marker, 2. cell homogenate, 3. supernatant of 1st high speed centrifugation, 4. precipitate of 1st high speed centrifugation, 5. supernatant of 2nd high speed centrifugation, 6. sample of flowing through Ni-NTA, 7. 1st wash by Wash Buffer, 8. 2nd wash by Wash Buffer, 9. 3rd wash by Wash Buffer, 10. elute AHA2 from Ni-NTA(97kD).

将此蛋白质样品浓缩至 2mL 以内,我们发现蛋白浓缩液中主要存在两种蛋白,一种大小在 97kD 左右,与 AHA2 蛋白大小一致.一种大小在 33kD 左右,与已经报道的 14-3-3 大小一致(如图 5),14-3-3 一直以来被认为是 AHA2 蛋白的分子伴侣,并可以进一步激活 AHA2 的转运活性.由于 14-3-3 的丰度不高,大小为目的蛋白三分之一,故在图 4 中没有检测到.将蛋白混合液注入 Superdex 200 凝胶排阻色谱柱中,我们得到了纯度很高的 AHA2 蛋白,令人惊喜的是我们表达得到的蛋白为 AHA2 蛋白与分子伴侣 14-3-3 结合的高活性状态(如图 4),这种蛋白活性高,性质良好,为后期 AHA2 蛋白的功能研究提供了特别好的实验材料.

4 讨论

我们通过 RT-PCR 技术成功克隆到了 *aha2* 这个植物中极为重要的质子泵和 ATP 酶基因,并且创建了 AHA2 蛋白的 *PiChia* 表达纯化系统,这种纯化系统与已有的酿酒酵母表达纯化 AHA2 蛋白的系统相比,具有以下优势:1 因为 AHA2 蛋白在酵母中表达为异源表达的质膜蛋白,该蛋白的表达量极低,根据已有报道,在酿酒酵母表达体系,需要使用 50kg 发酵罐进行表达^[13].本实验采用表达

体系用摇瓶即可实现,十分经济、方便;2 该表达体系只需 90 h 即可完成目的蛋白的表达,更为省时;3 该表达体系所获得的目的蛋白为 AHA2 蛋白的高活性态,证明表达过程中修饰完善,对后期实验具有十分积极的影响.经 SDS-PAGE 检测,重组 AHA2 蛋白被 14-3-3 蛋白激发的活性态纯度在 90%以上,和 14-3-3 蛋白的结合比例约为 1:1~1:2.人们对 AHA2 蛋白功能的研究还不是很全面,特别是由于高度提纯的 AHA2 蛋白较难获得,使相关体外实验的进行受到限制.使用 *PiChia* 酵母表达体系对该蛋白进行重组表达,为科研工作者提供了获得 AHA2 重组表达蛋白的又一有效方法.

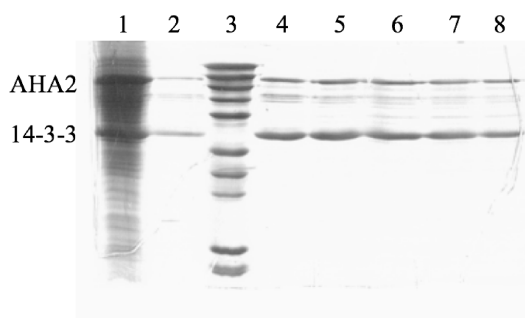


图4 植物 AHA2 蛋白凝胶排阻色谱纯化产物的 SDS-PAGE 分析

1. 为蛋白浓缩液,3. 为 Marker,其余泳道为纯化得到的高活性态 AHA2 蛋白(97kD)和 14-3-3 蛋白(33kD)

Fig. 4 Gel filtration chromatography purification product analysis of plant AHA2 by SDS-PAGE

1st lane is protein concentration,3rd lane is marker, the other lanes are highly active AHA2(97kD) with 14-3-3 protein(33kD)

4.1 植物 AHA2 蛋白的诱导表达

经检测 AHA2 蛋白的最佳甲醇诱导浓度为 0.5%。在真核表达 AHA2 蛋白的过程中,我们做了大量的甲醇浓度梯度诱导,但诱导效果均不佳.经过总结分析后发现:0.5%的甲醇可以在不毒害酵母的情况下,表达最高产量的 AHA2 蛋白.工程菌中重组蛋白的表达量与培养基营养、生长温度、蛋白生产速率(包括不同的因素,如基因剂量、启动子活性、mRNA 稳定性等)等因子有关.为了提高重组蛋白的表达水平,我们采用 30℃,220r/min,1L 体系培养工程菌,使用 30℃,250r/min,1L 体系诱导工程菌表达目的蛋白,经检测得到了目的蛋白.说明使用 *PiChia* 表达 AHA2 蛋白这一分子量且具有 10 次跨膜螺旋的异源目的蛋白是可能的.

4.2 植物 AHA2 重组蛋白的纯化

本实验选择了十分温和的非离子型去垢剂 DDM 对目的蛋白进行了有效的抽提,这是能使我们获得高活性态 AHA2 蛋白的关键.众所周知,酵母细胞壁的成分与大肠杆菌有很大不同,是否能将 AHA2 蛋白从 *PiChia* 酵母致密的细胞膜上抽提出来,关键在于 DDM 浓度的选择,经过不断实践,我们选择了 2%的 DDM 作为抽提 AHA2 蛋白所使用的去垢剂浓度.

经过 25mM 咪唑浓度的 Wash Buffer 洗除杂蛋白,我们得到了纯度约为 90%的蛋白样品(如图 5).在蛋白纯化过程中,His 标签可以特异的与 NTA 表面螯合的镍离子结合(His 的侧链基团有咪唑基);因此融合蛋白可以特异的结合到镍柱表面,而其它蛋白随溶液流出.当需要将目的蛋白洗脱时,加入高浓度的咪唑可以跟 His 标签竞争镍离子的结合位点,将融合蛋白洗脱.

本研究同时选择了凝胶排阻色谱法对 AHA2 蛋白进行了进一步提纯,这样我们提纯的目的蛋白可以应用到 MST(微量热涌动法)、ITC(等温滴定量热法)和脂质体包裹转运等对目的蛋白具有较高纯度要求的实验中.我们采用全程 4℃冷室操作,并在液氮冷冻研磨时加 PMSF 抑制蛋白酶活性.表达的蛋白经过 SDS-PAGE 检测跟预期大小一致.

参考文献:

- [1] Veshaguri S, Christensen S M, Kemmer G C, *et al.* Direct Observation of Proton Pumping by a Eukaryotic P-Type AtPase [J]. *Science*, 2016, 351: 1469.
- [2] Mlodzinska E, Klobus G, Christensen M D, *et al.* The Plasma Membrane H(+)-ATPase Aha2 Contributes to the Root Architecture in Response to Different Nitrogen Supply[J]. *Physiol Plant*, 2015, 154: 270.
- [3] Nissen P. An Introduction to P-Type AtPase Research [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1377: 1.
- [4] Buch-Pedersen M J, Palmgren M G. Mechanism of Proton Transport by Plant Plasma Membrane Proton AtPases[J]. *J Plant Res*, 2003, 116: 507.
- [5] Pedersen B P, Buch-Pedersen M J, Morth J P, *et al.* Crystal Structure of the Plasma Membrane Proton Pump[J]. *Nature*, 2007, 450: 1111.
- [6] Bose J, Rodrigo-Moreno A, Lai D, *et al.* Rapid Regulation of the Plasma Membrane H(+)-ATPase

- Activity Is Essential to Salinity Tolerance in Two Halophyte Species, *Atriplex Lentiformis* and *Cenopodium Quinoa*[J]. *Ann Bot*, 2015, 115: 481.
- [7] Liu J, Elmore J M, Fuglsang A T, *et al.* Rin4 Functions with Plasma Membrane H⁺-ATPases to Regulate Stomatal Apertures During Pathogen Attack[J]. *PLoS Biol*, 2009, 7: e1000139.
- [8] Kinoshita T, Hayashi Y. New Insights into the Regulation of Stomatal Opening by Blue Light and Plasma Membrane H⁽⁺⁾-ATPase[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2011, 289: 89.
- [9] Portillo F. Regulation of Plasma Membrane H⁽⁺⁾-ATPase in Fungi and Plants[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1469: 31.
- [10] Arango M, Gevaudant F, Oufattole M, *et al.* The Plasma Membrane Proton Pump ATPase: The Significance of Gene Subfamilies[J]. *Planta*, 2003, 216: 355.
- [11] Liu J, Elmore J M, Coaker G. Investigating the Functions of the Rin4 Protein Complex During Plant Innate Immune Responses[J]. *Plant Signal Behav*, 2009, 4: 1107.
- [12] Elmore J M, Coaker G. The Role of the Plasma Membrane H⁺-ATPase in Plant-Microbe Interactions[J]. *Mol Plant*, 2011, 4: 416.
- [13] Jahn T, Dietrich J, Andersen B, *et al.* Large Scale Expression, Purification and 2d Crystallization of Recombinant Plant Plasma Membrane H⁺-ATPase[J]. *J Mol Biol*, 2001, 309: 465.
- [14] Borch J, Bych K, Roepstorff P, *et al.* Phosphorylation-Independent Interaction between 14-3-3 Protein and the Plant Plasma Membrane H⁺-ATPase[J]. *Biochem Soc Trans*, 2002, 30: 411.
- [15] Jahn T, Fuglsang A T, Olsson A, *et al.* The 14-3-3 Protein Interacts Directly with the C-Terminal Region of the Plant Plasma Membrane H⁽⁺⁾-ATPase[J]. *Plant Cell*, 1997, 9: 1805.