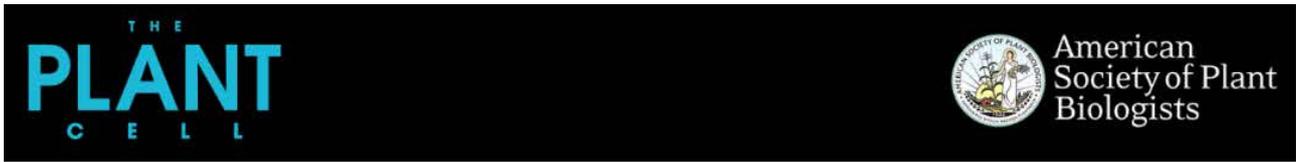


## PC 兰大何凯: $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{K}^+$ 流及膜电位数据为揭示拟南芥 SLAH3 通过调节 N-K 平衡参与维持膜电位稳态提供关键支撑



Article Navigation

JOURNAL ARTICLE ACCEPTED MANUSCRIPT

The anion channel SLAH3 interacts with potassium channels to regulate nitrogen-potassium homeostasis and the membrane potential in Arabidopsis

Beibei Liu, Changxin Feng, Xianming Fang, Zhen Ma, Chengbin Xiao, Shuaishuai Zhang, Zhenzhen Liu, Doudou Sun, Hongyong Shi, Xiaoqin Ding, Chenyang Qiu, Jia Li, Sheng Luan, Legong Li, Kai He ✉

### 一、基本信息

研究使用平台: NMT 植物营养创新平台

期刊: The Plant Cell

主题:  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{K}^+$  流及膜电位数据为揭示拟南芥 SLAH3 通过调节 N-K 平衡参与维持膜电位稳态提供关键支撑

标题: The anion channel SLAH3 interacts with potassium channels to regulate nitrogen-potassium homeostasis and the membrane potential in Arabidopsis

影响因子: 12.085

作者: 兰州大学何凯、刘倍贝; 首都师范大学冯长鑫

获奖情况: 该成果获得 2022-2023 年度“中关村优秀 NMT 成果奖”一等奖

### 二、检测离子 / 分子指标

$\text{NO}_3^-$ 、 $\text{K}^+$ 、膜电位

### 三、样品信息

5 日龄拟南芥根成熟区

### 四、中文摘要

氮-钾平衡在植物生长发育过程中至关重要, 然而其分子机制尚不清楚。本研究发现, 拟南芥中  $\text{NO}_3^-$  外排通道 SLAH3 突变导致对高浓度  $\text{KNO}_3$  的耐受性增强。出乎意料的是, *slah3* 突变体特异地耐受高浓度  $\text{K}^+$ , 而增加  $\text{NO}_3^-$  浓度导致野生型和 *slah3* 之间表型差异减小。*slah3* 中  $\text{NO}_3^-$  外流减少,  $\text{K}^+$  外流增强, 证明 SLAH3 介导的  $\text{NO}_3^-$  转运和 SLAH3 影响的  $\text{K}^+$  流动在调控  $\text{NO}_3^-$ - $\text{K}^+$  平衡的过程中至关重要。进一步研究发现, 钾离子外排通道 GORK/SKOR 与 SLAH3 相互作用。*gork/skor* 突变体在高  $\text{K}^+$  条件下表现出超敏感表型。高  $\text{K}^+$  处理后, 相对

收稿日期: 2023-06-15

编辑作者 E-mail: yanhan@nmtia.org.cn

doi: 10.5281/zenodo.8213372

于野生型，突变体 *slah3* 的去极化减弱，*gork/skor* 的去极化增强，表明  $\text{NO}_3^-/\text{K}^+$  外排介导的膜电位调控参与了高  $\text{K}^+$  响应。电生理结果表明，SLAH3 独立于其通道功能抑制 GORK/SKOR 的活性。该研究首次提出 SLAH3 对  $\text{K}^+$  外排通道的两层调控机制：（1）SLAH3 通过膜电位的变化调控电压依赖性  $\text{K}^+$  通道；（2）SLAH3 与 GORK/SKOR 相互作用，抑制其通道活性。揭示  $\text{NO}_3^-$  通道 SLAH3 与  $\text{K}^+$  通道 GORK 和 SKOR 形成功能单元，通过协调氮-钾平衡来调节膜电位。

## 五、离子 / 分子流实验处理方法

1/2 MS 和添加 120 mM  $\text{K}^+$  的 1/2 MS 水培液预处理 5 h

膜电位实验处理：120 mM KCl 或 120 mM  $\text{KNO}_3$  处理，实时测量

## 六、离子 / 分子流实验结果

（1）在高钾胁迫下 SLAH3 介导  $\text{NO}_3^-$  外排  
为了进一步验证 SLAH3 介导的高钾耐受过程与  $\text{NO}_3^-$  相关，采用 NMT 检测 Col-0 和 *slah3* 根成熟区  $\text{NO}_3^-$  的流速。分别在 1/2 MS 和添加 120 mM  $\text{K}^+$  的 1/2 MS 水培液预处理 5 h。1/2 MS 预处理，*slah3-3* 和 *slah3-4* 的  $\text{NO}_3^-$  外排量明显

低于 Col-0，这一结果与 SLAH3 作为  $\text{NO}_3^-$  外排通道的功能相一致。120 mM  $\text{K}^+$  的 1/2 MS 预处理，Col-0 和 *slah3* 的  $\text{NO}_3^-$  外排量显著升高，说明高  $\text{K}^+$  诱导了  $\text{NO}_3^-$  外排。Col-0 的  $\text{NO}_3^-$  外排通量明显高于 *slah3-3* 和 *slah3-4*，说明高  $\text{K}^+$  诱导的  $\text{NO}_3^-$  外排需要 SLAH3（图 1，A 和 B）。总的来说，在高钾胁迫下 SLAH3 介导  $\text{NO}_3^-$  显著外排。

（2） $\text{K}^+$  诱导的膜电位去极化在 *slah3* 突变体中降低

接下来，探索了 SLAH3 在高  $\text{K}^+$  反应中介导  $\text{NO}_3^-$  外排的具体意义。阳离子和阴离子在植物细胞膜电位的建立和维持中至关重要。因此，采用 NMT 穿刺微电极技术研究 SLAH3 是否通过调节  $\text{NO}_3^-$  和  $\text{K}^+$  平衡来调节膜电位。120 mM KCl 和  $\text{KNO}_3$  处理 Col-0 和 *slah3* 检测根细胞的膜电位的变化。将植株置于 1/2 MS 液体培养基中，加入 120 mM KCl 或  $\text{KNO}_3$  处理。在 Col-0 中，高浓度的 KCl 处理会导致膜电位迅速而显著的去极化，而高浓度的  $\text{KNO}_3$  处理导致较低程度去极化（图 2，A 和 C）。以上结果表明，高浓度  $\text{K}^+$  使膜电位去极化， $\text{NO}_3^-$  使膜电位复极化。相比之下，KCl 对 *slah3* 的膜电位去极化作用较小。有趣的是， $\text{KNO}_3$  导致 *slah3* 的膜电位去极化程度与 KCl 几乎相同，表明  $\text{K}^+$  诱导的去极化

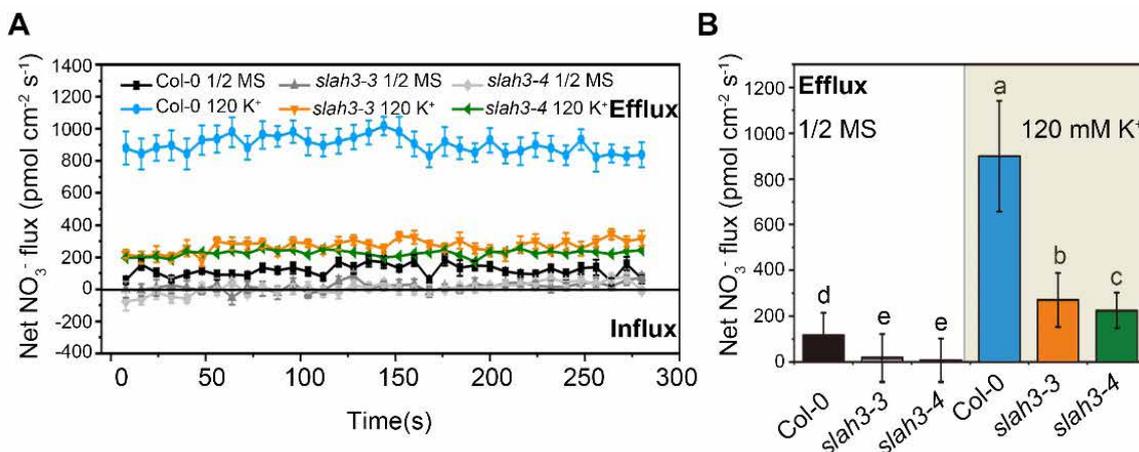


图 1 在高钾胁迫下 SLAH3 介导  $\text{NO}_3^-$  外排

在 *slah3* 中受损 (图 2, B 和 C)。以上结果表明,  $\text{NO}_3^-$  是调节植物膜电位的重要阴离子, 更重要的是, SLAH3 通过介导  $\text{NO}_3^-$  外排在调节膜电位中发挥着重要作用。

(3)  $\text{K}^+$  诱导的膜电位去极化在 *gork*、*skor* 突变体中增强

在高钾条件下, 突变体 *slah3* 膜电势与 WT 相比去极化程度低。接下来探索了钾离子外排通道突变体 *gork* 和 *skor* 是否也参与膜电势调控过程。在  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  MES (pH 5.8) 溶液中使用 NMT 刺穿微电极检测膜电位, 然后在溶液中加入

$120 \text{ mM KNO}_3$  或  $120 \text{ mM KCl}$  处理液记录膜电位的变化。与前期研究结果一致, 与  $\text{KNO}_3$  处理相比 KCl 在 *Col-0* 中引起了更强的去极化 (图 3 A)。突变体 *slah3* 的 KCl 处理与  $\text{KNO}_3$  处理结果相似, 去极化程度较低 (图 3, B、C 和 F)。与 WT 相比, 当高浓度 KCl 处理时, *gork* 和 *skor* 的去极化更强 (图 3, D、E 和 F)。这一结果表明钾离子外排通道 GORK 和 SKOR 参与了  $\text{K}^+$  诱导膜电势调控过程。

(4) SLAH3 在  $\text{K}^+$  诱导的  $\text{NO}_3^-$  和  $\text{K}^+$  流出

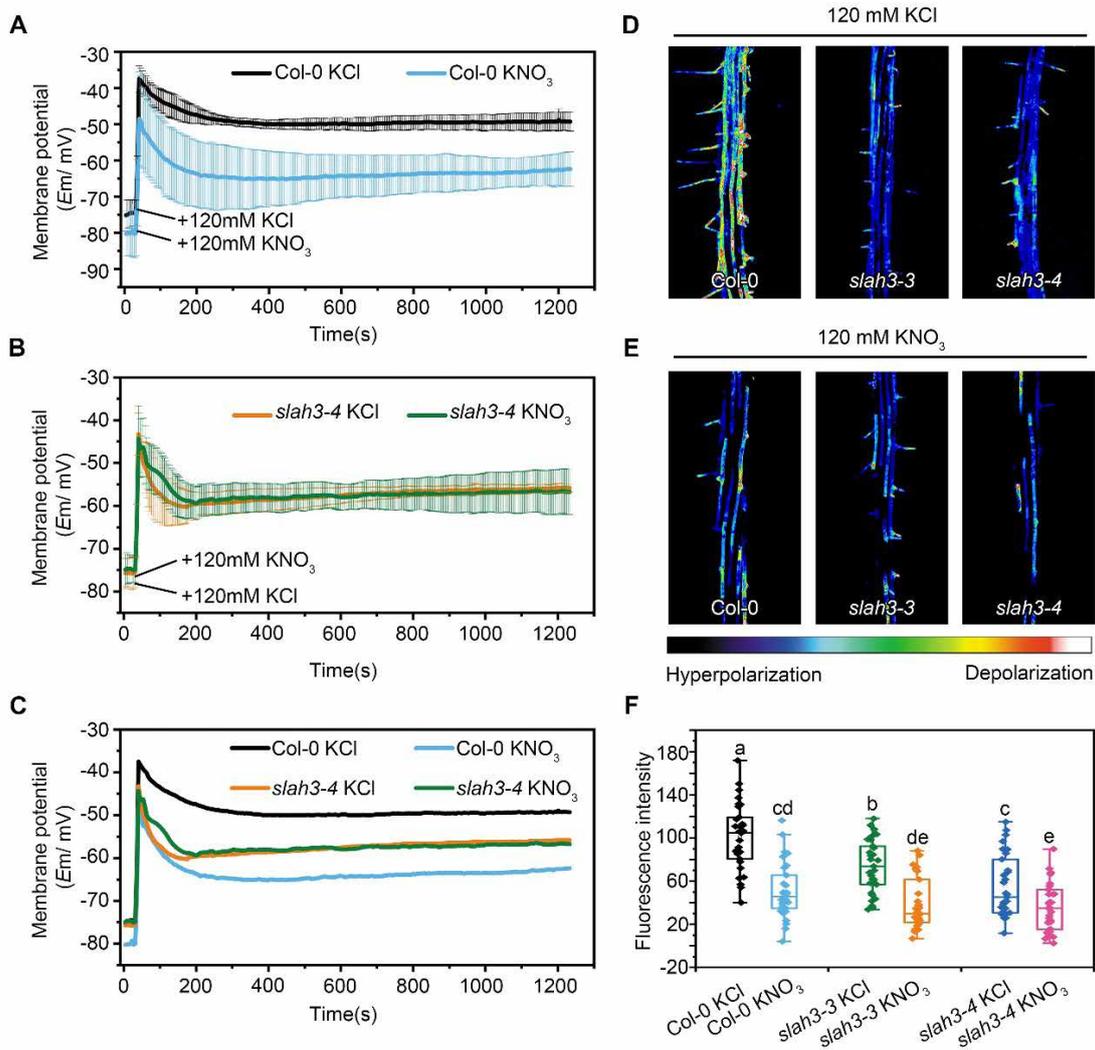


图 2  $\text{K}^+$  诱导的膜电位去极化在 *slah3* 突变体中降低

过程发挥重要功能

使用非损伤微测技术分析突变体中  $\text{NO}_3^-$  和  $\text{K}^+$  的净通量。将 WT、*slah3*、*gork*、*skor*、*gork slah3* 和 *skor slah3* 在添加或不添加 120 mM  $\text{K}^+$  的 1/2 MS 液体培养基中预处理 5 小时后，使用 NMT 测量  $\text{NO}_3^-$  和  $\text{K}^+$  的净通量。高  $\text{K}^+$  预处理的 Col-0 植株  $\text{NO}_3^-$  净流出量显著增加。 $\text{K}^+$  触发的  $\text{NO}_3^-$  外排在 *slah3* 中显著减少。*gork* 和 *skor* 突变体表现出与 WT 相同的  $\text{NO}_3^-$  外排，在植物

体内证明 GORK 和 SKOR 不影响 SLAH3 的活性。而 *gork slah3* 和 *skor slah3* 双突变体表现出与 *slah3* 相似的  $\text{NO}_3^-$  外排量（图 4 A），这一结果证明在植物高钾胁迫应对过程中 SLAH3 位于 GORK/SKOR 的上游。

高  $\text{K}^+$  预处理也引起了野生型和突变体  $\text{K}^+$  外流的升高。在高  $\text{K}^+$  预处理下，*gork* 和 *skor* 突变体的  $\text{K}^+$  外流弱于 Col-0，这与 GORK/SKOR 蛋白功能相一致。值得注意的是，高  $\text{K}^+$  预处理

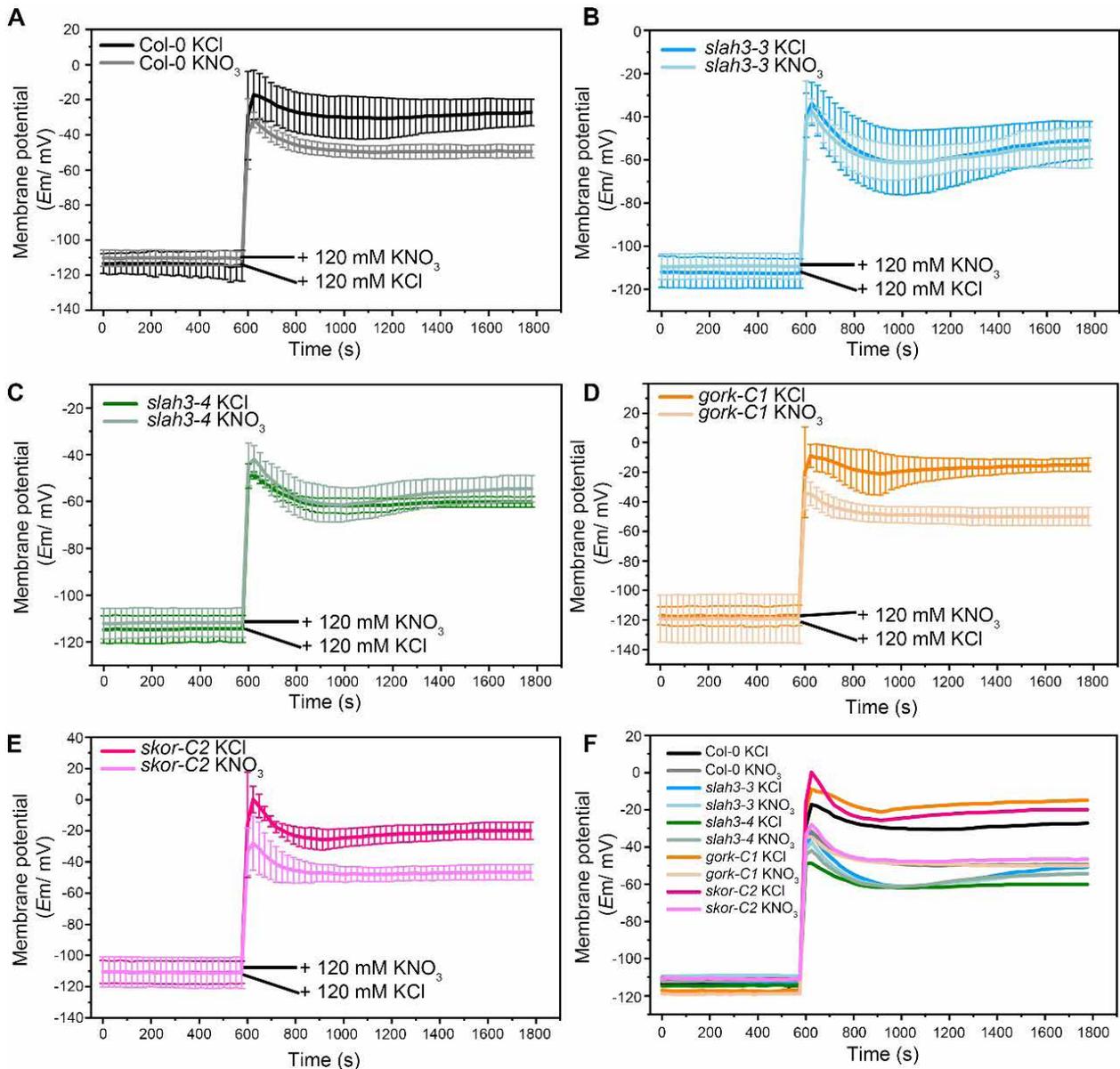


图 3  $\text{K}^+$  诱导的膜电位去极化在 *gork*、*skor* 突变体中增强

引发的  $K^+$  外流在 *slah3* 中显著增强，在植物体内证明 SLAH3 抑制 GORK 和 SKOR 的功能（图 4 B）。

### 七、其它实验结果

- SLAH3 功能缺失突变体特异的耐受高浓度  $K^+$
- SLAH3 通过介导  $NO_3^-$  外排参与拟南芥氮 - 钾平衡过程
- 高  $K^+$  导致植物体内 N-K 失衡
- 钾离子外排通道 GORK/SKOR 参与拟南芥应对高钾胁迫过程
- 钾离子外排通道 GORK、SKOR 与 SLAH3 有相互作用
- SLAH3 抑制钾离子外排通道 GORK 和 SKOR 的活性

### 八、结论

该研究首次提出 SLAH3 对  $K^+$  外排通道的两层调控机制：（1）SLAH3 通过膜电位的变化调控电压依赖性  $K^+$  通道；（2）SLAH3 与 GORK/SKOR 相互作用，抑制其通道活性。揭示  $NO_3^-$  通道 SLAH3 与  $K^+$  通道 GORK 和 SKOR 形成功能单元，通过协调氮 - 钾平衡来调节膜

电位。

### 九、测试液

$NO_3^-$  测试液：1 mM  $KNO_3$ , 0.1 mM  $KCl$ , 0.1 mM  $CaCl_2$ , 0.3 mM MES, pH 6.0

$K^+$  测试液：1 mM  $KCl$ , 0.1 mM  $CaCl_2$ , 0.1 mM  $MgCl_2$ , 0.5 mM  $NaCl$ , 0.3 mM MES, 0.2 mM  $Na_2SO_4$ , pH 6.0

膜电位测试液：1/2 MS 或  $0.5\text{ g L}^{-1}$  MES (pH 5.8) 溶液

关键词： $K^+$ ； $NO_3^-$ ；膜电位；氮 - 钾平衡；盐胁迫；拟南芥；根；植物类

文献信息：Liu B, Feng C, Fang X, Ma Z, Xiao C, Zhang S, Liu Z, Sun D, Shi H, Ding X, Qiu C, Li J, Luan S, Li L, He K. The anion channel SLAH3 interacts with potassium channels to regulate nitrogen-potassium homeostasis and the membrane potential in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2023 Jan 19:koad014. doi: 10.1093/plcell/koad014. Epub ahead of print. PMID: 36653170.

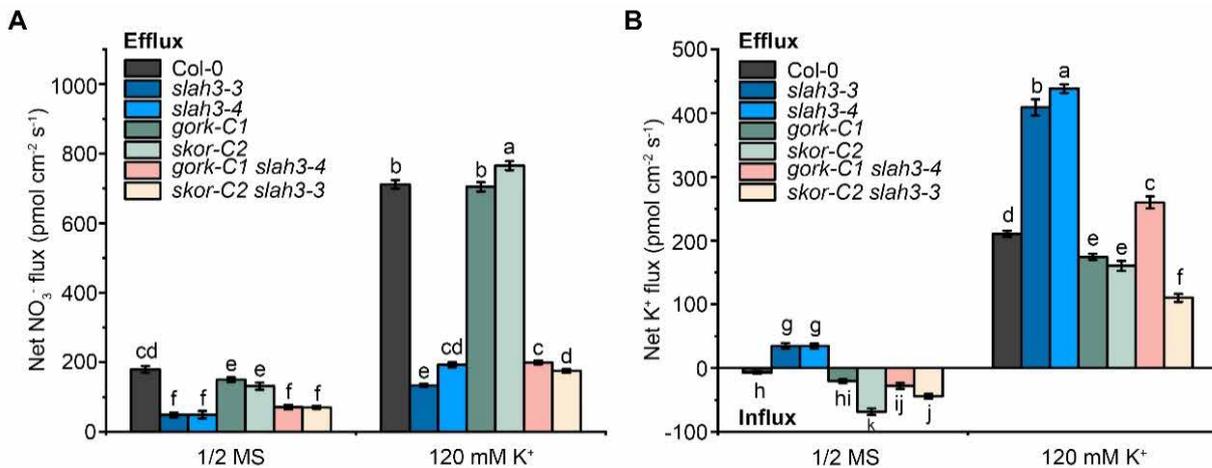


图 4 在野生型和突变体植株中， $NO_3^-$  和  $K^+$  的净通量

(责任编辑：李雪霏)