

文章编号: 1000-8608(2020)01-0015-07

# 植物水孔蛋白PIP2表达量快速无标记检测

徐 铭, 赵子健, 夏秀英\*

(大连理工大学生物工程学院, 辽宁 大连 116024)

**摘要:**相较于传统的抗体检测,适配体更易于大量快速合成,且可和多种检测技术相结合,在蛋白检测方面具有巨大的潜力。水孔蛋白作为生物体内水分跨膜运输的主要途径,了解其表达量的变化在植物水代谢研究中有着重要意义。利用传统的混合列分法构建了8个C端恒定半胱氨酸残基的类肽适配体文库,结合表面等离激元共振成像技术,筛选得到能特异性结合高等植物水孔蛋白PIP2的类肽适配体PPA7,其亲和力 $K_D$ 高达 $2.52 \times 10^{-9}$  mol/L。利用PPA7检测了石竹玻璃化和正常植株的水孔蛋白表达量,结果表明,石竹玻璃化植株的水孔蛋白表达量显著高于正常植株。研究提供了一种新的植物蛋白定量检测策略,也为进一步明确水孔蛋白在组培苗玻璃化发生中的作用奠定了基础。

**关键词:** 水孔蛋白; PIP2; 类肽适配体; 表面等离激元共振成像; 快速无标记检测

中图分类号:TQ464.7

文献标识码:A

doi:10.7511/dllgxb202001003

## 0 引言

水孔蛋白(aquaporin, AQP)是一类膜内在蛋白<sup>[1]</sup>。植物AQP既可运输水分,也可运输CO<sub>2</sub>、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>等,在光合作用、蒸腾作用、气孔运动、种子萌发、受精、果实发育以及环境应答等过程中都起着重要作用<sup>[2-4]</sup>。根据氨基酸序列及结构特征,植物AQP通常被分为5类:质膜内在蛋白(plasma membrane intrinsic proteins, PIPs)、液泡膜内在蛋白(tonoplast intrinsic proteins, TIPs)、类Nod26膜内在蛋白(nodulin 26-like intrinsic proteins, NIPs)、小分子碱性膜内在蛋白(small and basic intrinsic proteins, SIPs)和未表征功能的膜内在蛋白(X intrinsic proteins, XIPs)<sup>[5]</sup>。其中PIPs位于质膜上,分为PIP1、PIP2和PIP33个亚类。PIP2较其他种类的水孔蛋白具有高的水分运输活性及结构保守性<sup>[6-8]</sup>。AQP的快速定量检测对于其功能研究具有重要的意义。

目前,植物水孔蛋白定量检测主要采用传统的Western方法,但该方法精度较低<sup>[9]</sup>,不能完全

反映植物中水孔蛋白的表达情况。另外,Western方法需要特异性抗体,由于抗体的制备周期较长、成本较高,且一些植物的水孔蛋白并没有成熟的市售抗体,限制了植物水孔蛋白的研究。

类肽是一类以N-取代甘氨酸作为结构单元的多肽模拟物,其分子骨架与多肽相同,但侧链连接在N上,不同于多肽<sup>[10]</sup>。类肽的设计与合成较多肽更加简便高效,且具有丰富的化学多样性、良好的稳定性、抗酶解作用和生物活性<sup>[11-14]</sup>,目前已被广泛应用于药理学、生物学、化学、材料学、生物传感器等众多领域<sup>[15]</sup>。最新研究表明,类肽在模拟抗体<sup>[10]</sup>及生物标志物的检测<sup>[16]</sup>上具有独特的优势,其动力学过程充分证明了其作为蛋白识别探针的高亲和力和高特异性,在药物递送<sup>[10]</sup>、诊断试剂<sup>[16-17]</sup>、抗菌剂<sup>[18]</sup>、药物等<sup>[15]</sup>方面显示了其巨大的应用潜力,但类肽用于植物蛋白定量检测还鲜有报道。

表面等离激元共振成像(surface plasmon resonance imaging, SPRi)技术是一种用于测量分子间相互作用及其动力学过程的快速无标记、实时高通量的生物传感技术<sup>[19]</sup>。其原理是p偏振光

收稿日期: 2019-04-05; 修回日期: 2019-11-20。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31872116)。

作者简介: 徐 铭(1993-), 女, 硕士生, E-mail: fox-elaine@foxmail.com; 夏秀英\*(1972-), 女, 副教授, E-mail: xx47@dlut.edu.cn。

经由棱镜入射金属表面后在金属与玻璃界面上发生全反射，并与表面等离子激元发生共振现象，由于光子将能量转移到了表面等离子激元，从而产生强烈的光吸收现象，引起反射光能量大量衰减，进而利用 CCD 成像系统收集反射光信息并转化可以得到分子相互作用的动力学信息。SPRi 作为一种新兴的检测技术，越来越广泛地应用于生物分子相互作用的研究中，被誉为相互作用检测的金标准。最新研究表明，以类肽分子探针在 SPRi 芯片表面构建阵列，作为一种快速有效的高通量文库筛选、无标记生物标志物检测的新方法<sup>[20-21]</sup>，引起了广泛的关注。

玻璃化是植物组织培养过程中经常出现的一种生理失调或生理病变。玻璃化植株水分代谢失调，组织超度含水，叶片呈半透明水浸状，脆弱易碎，成活率低，是植物组织培养中亟待解决的一大难题<sup>[22-23]</sup>。但目前玻璃化发生的机制尚未有统一的认识。明确植物水孔蛋白表达量与玻璃化发生的关系对于深入阐明玻璃化机制具有重要意义。

本研究构建 8 单元的类肽适配体展示肽库，并通过 SPRi 技术筛选出与植物水孔蛋白 PIP2 具有高亲和力、高特异性的适配体，同时用筛选出的适配体检测石竹玻璃化植株水孔蛋白表达的变化，为植物水孔蛋白研究提供新的方法和策略，同时探讨玻璃化发生机制。

## 1 实验部分

### 1.1 类肽库的构建

通过一株一物(OBOC)法进行组合类肽库的合成<sup>[16,24]</sup>，利用 Rink-Amide 树脂作为载体引导固相合成。每个残基采用亚单元法进行合成，即第一步是酰化反应，卤代乙酸经由二异丙基碳二亚胺(DIC)活化后与上一步末尾的胺反应；第二步是取代反应，通过 S<sub>N</sub>2 取代反应，让一个伯胺进攻并取代卤素以形成 N-取代甘氨酸单体。在亚单元法的 S<sub>N</sub>2 取代反应中，树脂被分为 8 等份分置于 8 个合成管中，分别与类肽文库中所包含的 8 种胺反应。反应完成后充分清洗并混匀，进行下一步酰化反应。在所有残基合成结束后，利用甲醇收缩 30 min，干燥后将树脂与标记有 PIP2 保守序列多肽(购自吉尔生化)的磁珠充分混合，在外加磁场下收集吸附有磁珠的树脂，放入 384 孔板，每

孔一个树脂，其后加入裂解液(95%三氟乙酸、2.5%水、2.5%三异丙基硅烷)反应 2 h，将与 PIP2 保守序列多肽有相互作用的类肽分子从树脂上裂解下来(同时亦可移除侧链保护基团)，最后用氮气将其吹干，并封存 384 孔板于 -80 °C 备用。类肽结构由 MALDI-TOF/TOF 质谱确定。

### 1.2 类肽微流控芯片打印

将类肽分子溶于去离子水中配制 2 mmol/L 浓度的类肽溶液，在 40% 的湿度条件下，利用生物芯片点样仪(BioDot，美国)将类肽阵列化地打印在裸金芯片(Plexera Bioscience，美国)表面。每种类肽打印 3 个且每个点包含 20 nL 类肽溶液。打印完成后，芯片在 4 °C、80% 湿度条件下孵育过夜，然后用 10 × PBST、1 × PBST、去离子水(2 次)依次程序清洗芯片，每次 15 min。将清洗完毕的芯片用氮气吹干，之后用 50 g/L 脱脂奶粉封闭过夜，再按照上述步骤程序清洗并干燥，完成后盖上芯片盖片形成完整的流道腔室备用。

### 1.3 表面等离激元共振成像

SPRi 方法参照 Zhao 等的方法<sup>[20]</sup>，将制备完成的裸金芯片装载入 PlexArray HT (Plexera Bioscience，美国)的光路系统中，平行光(660 nm)经由棱镜照射在裸金芯片表面，通过调节入射角使之发生全反射，反射光被 CCD 接收。待测样品用 PBST 溶解，以梯度浓度依次注入流动腔室内，每次测量包括 4 步。基线获得：用 PBST 作为流动相，以恒定速度 2 μL · s<sup>-1</sup> 得到稳定的基线；结合：样品以 2 μL · s<sup>-1</sup> 的速度注入，作用 300 s；洗脱：用 PBST 以 2 μL · s<sup>-1</sup> 的速度洗脱 300 s；重生：体积分数 0.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 以 2 μL · s<sup>-1</sup> 的速度洗脱 300 s。动力学曲线的拟合及平衡解离常数( $K_D$ )的计算由 BIAevaluation 4.1 Software (Biacore, Inc., 美国)完成。

### 1.4 植物材料的获取与准备

实验材料为石竹(*Dianthus chinensis* L.)继代培养过程中出现的玻璃化苗与正常苗，培养条件为 MS+5 g · L<sup>-1</sup> 琼脂+25 g · L<sup>-1</sup> 蔗糖，培养室光照强度为 30~40 μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>，光照时间为 16 h · d<sup>-1</sup>，温度为(25±2) °C。分别取等量玻璃化及正常植株的组织块，1× PBS、ddH<sub>2</sub>O 梯度充分清洗后滤纸吸干。冰盐浴条件下将植株组织剪碎，其后 1 : 4 加入匀浆介质(50 mmol/L

Tris-HCl, pH 7.4). 将变幅杆插入样品液面下, 超声波细胞破碎仪 S-250D(Branson, 美国)超声处理 2 min, 将裂解液配制 10% 匀浆液, 4 °C, 4 000 r/min 离心 15 min, 取上清液备用.

## 2 结果与讨论

### 2.1 类肽适配体展示肽库的构建

分子间作用力是分子间相互作用的决定性因素之一,为了得到与靶标分子具有高亲和力的适配体,展示肽库的构建需包含氢键、输水相互作用、静电力、 $\pi\pi$  堆积等多种分子间相互作用力,因此选取图 1(b)中展示的 8 种伯胺单体. OBOC 法

进行文库合成时通用结构(图 1(a))的 C 端包含两个 1,4-丁二胺(Nlys)单体,用以增加类肽分子的溶解性,而 N 端的 6 个可变残基再合成时随机添加 8 种单体,因此,本研究构建的类肽文库容量为  $8^6$ . 传统的类肽合成有固相合成和液相合成两种方法:液相合成适用于合成相对分子质量较大的类肽,其结构与序列不易控制<sup>[25]</sup>;固相合成适用于相对分子质量较小的类肽,能够更加精确地控制类肽的序列、结构和性质<sup>[26-27]</sup>. 本研究采用固相合成的方法,并在末端加入半胱氨酸,使所合成的类肽能够更好地固定在 SPRi 裸金芯片表面.

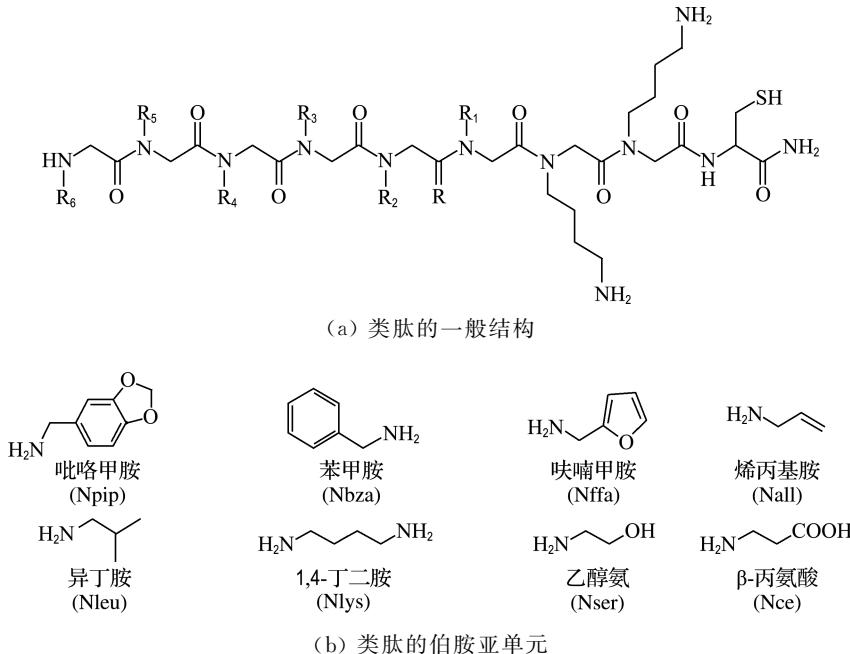


图 1 类肽展示肽库的结构

Fig. 1 Structure of the combinatorial peptoid library

从合成的类肽文库中随机选取 10 个分子,并利用 MALDI-TOF/TOF 确定其序列结构,以验证文库的多样性和合成质量,如图 2 所示,10 条类肽分子序列结构不同,表明所构建的文库可靠.

高等植物 PIP 蛋白具有两段高度保守序列 GGGANSVATGY 和 TGINPARSFGAAVIYN, 分别处于 PIP 蛋白的 N 端和 C 端,其较小的空间位阻决定了其为良好的与适配体相互作用的靶点,因此针对该两段多肽作为靶标筛选得到的适配体,有潜力识别多种高等植物的 PIP 蛋白. 通过 SPRi 高通量筛选,得到与其具有高亲和力的

类肽分子 PPA165、PPA95、PPA2596 和 PPA7, 作为植物水孔蛋白 PIP2 精筛备选分子. 其中 PPA7 与两段保守序列亲和力最高,分别为  $1.13 \times 10^{-9}$  mol/L 和  $2.81 \times 10^{-9}$  mol/L(图 3(b)).

### 2.2 植物水孔蛋白 PIP2 适配体的筛选

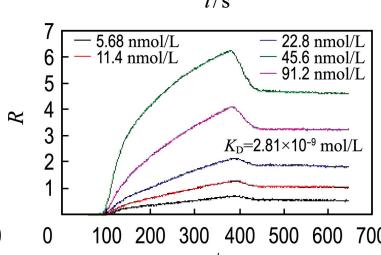
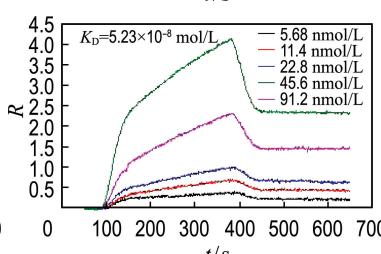
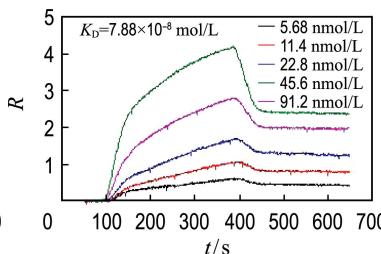
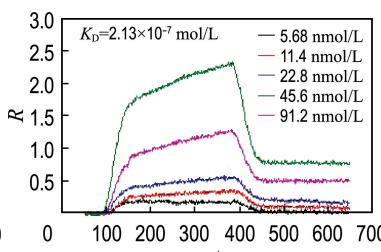
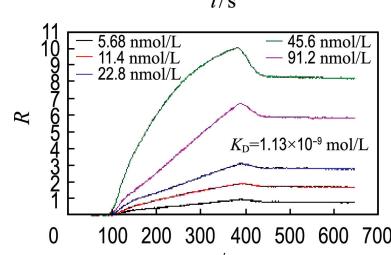
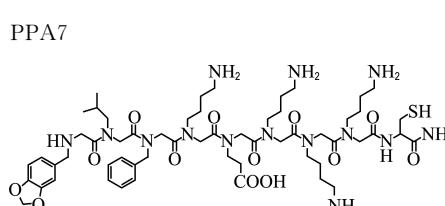
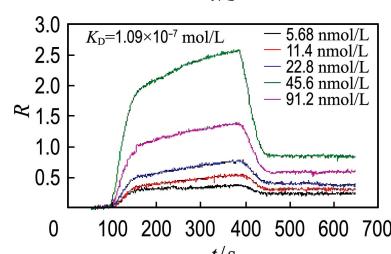
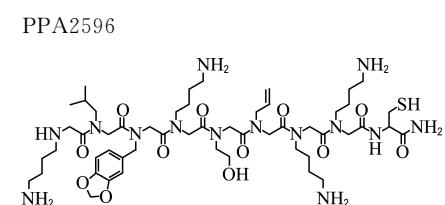
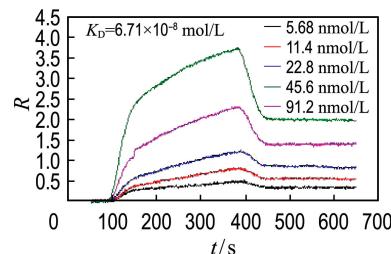
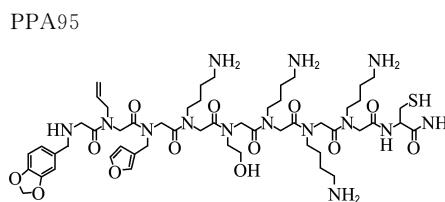
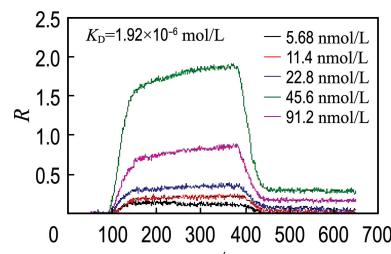
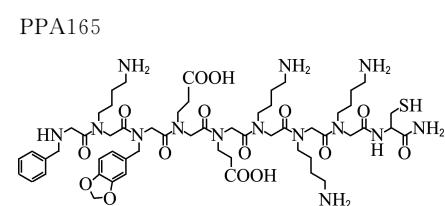
除去保守序列以外,不同高等植物的 PIP2 蛋白具有不同的多肽序列,且较保守序列短肽具有更高级的空间结构,因此适配体与不同高等植物 PIP2 蛋白相互作用有所不同. 利用 SPRi 技术进一步对 PPA7 与拟南芥水孔蛋白相互作用的动力学过程进行了表征,如图 4 所示植物水孔蛋

- (1) Npip-Nlys-Nser-Nlys-Nleu-Nall-Nlys-Nlys-Cys
- (2) Nbza-Nser-Nlys-Nce-Nleu-Npip-Nlys-Nlys-Cys
- (3) Npip-Nall-Nlys-Nffa-Nffa-Nce-Nlys-Nlys-Cys
- (4) Nlys-Nlys-Nleu-Nbza-Nser-Npip-Nlys-Nlys-Cys
- (5) Nleu-Nlys-Nbza-Npip-Nlys-Nall-Nlys-Nlys-Cys
- (6) Nall-Npip-Nffa-Nce-Nlys-Nce-Nlys-Nlys-Cys
- (7) Nffa-Npip-Nall-Nce-Nleu-Nbza-Nlys-Nlys-Cys
- (8) Nlys-Nlys-Nser-Npip-Nser-Nbza-Nlys-Nlys-Cys
- (9) Nser-Nbza-Nbza-Npip-Nce-Nce-Nlys-Nlys-Cys
- (10) Nlys-Npip-Nce-Nbza-Nall-Nleu-Nlys-Nlys-Cys

图 2 随机选取展示肽库中 10 条类肽序列

Fig. 2 Sequences of ten peptoids randomly selected from the combinatorial peptoid library

由 PIP2 与 PPA7 具有极高的亲和力,  $K_D$  高达  $2.52 \times 10^{-9}$  mol/L。除去亲和力, 特异性也是一个评价适配体优劣的重要指标, 对于蛋白的定量检测, 特异性直接影响了检测的灵敏度和信噪比, 因此本研究选取高等植物中常见的脯氨酸转运蛋白(ProT)、 $\gamma$ -氨基丁酸转运蛋白(GAT), 以及 G 蛋白(Protein G)作为对照, 与 PIP2 共同作为流动相分别与 PPA7 进行相互作用(流动相浓度为 91.2 nmol/L), 结果表明, PPA7 与 PIP2 的结合信号远高于 ProT、GAT 以及 G 蛋白, 说明 PPA7 对于 PIP2 具有良好的特异性。从而证明了 PPA7 分子在植物水孔蛋白 PIP2 的检测上具有较大的潜力和应用价值。

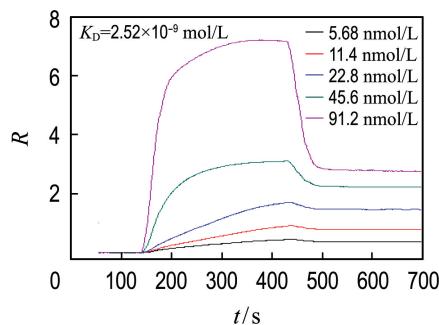


(a) 分子结构

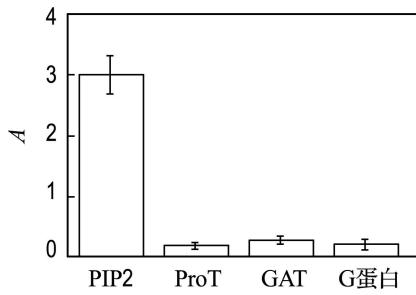
(b) 亲和力

图 3 PIP2 保守序列亲和力较高 4 种分子的结构与亲和力

Fig. 3 Structures of the identified top four PIP2-peptide binding peptoids and their binding affinities



(a) PPA7 与拟南芥 PIP2 蛋白相互作用动力学过程表征



(b) PPA7 检测 PIP2 的特异性表征(n=6)

图 4 PPA7 与 PIP2 的亲和力与特异性

Fig. 4 Affinity and specificity of PPA7 and PIP2

不同种类植物水孔蛋白抗体制备周期长且成本高昂,因此快速低成本地筛选一种能够针对多类高等植物水孔蛋白的适配体具有极其重要的意义。本研究采用的类肽适配体,其结合位点针对 PIP2 的 N 端与 C 端的高度保守结构,使得其不同于抗体,具有识别多种高等植物 PIP2 蛋白的潜力。筛选过程分为两步:第一步,以两段保守序列短肽作为靶标,筛选出亲和力为纳摩尔级别的类肽分子;第二步,利用拟南芥 PIP2 分子对粗筛选得到的类肽分子进行进一步的筛选鉴定,得到不仅和 PIP2 保守序列短肽有高亲和力,同时与具有更高级结构的 PIP2 蛋白依然能够高亲和特异性结合的适配体。

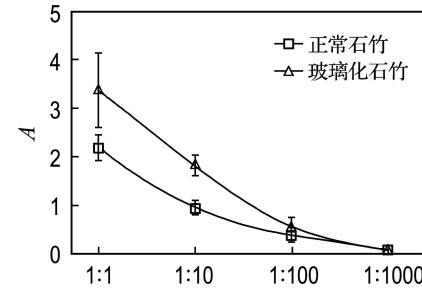
### 2.3 植物水孔蛋白表达量检测

玻璃化植株组织高度含水,但其水分积累的原因尚不明确。近年来研究表明,水孔蛋白参与细胞水分运输,调节渗透势变化,植物含水量、水势和水力导度的变化与水孔蛋白表达变化直接相关,改变水孔蛋白表达可直接影响植株水分吸收。但水孔蛋白表达量的变化与玻璃化的发生是否有关尚未有相关报道。本研究利用适配体 PPA7 通过 SPRi 法对玻璃化与正常石竹植株(图 5)的水

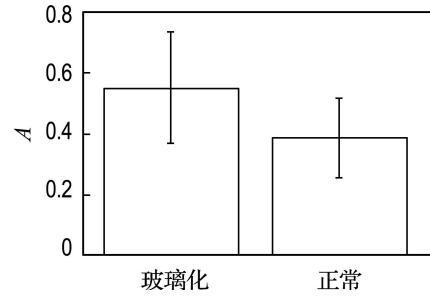
孔蛋白表达量进行了比较,结果发现,玻璃化植株的水孔蛋白含量显著高于正常植株。水孔蛋白表达量的提高,可能增强了植株的水分吸收及运输能力,而密闭的培养容器及较高的湿度使得蒸腾作用减弱,造成水分在组织细胞内/间积累,引起了玻璃化症状的发生。



(a) 玻璃化植株的形态学特征 (b) 正常植株的形态学特征



(c) 不同稀释比例的石竹裂解液与 PPA7 的结合信号



(d) 玻璃化石竹与正常石竹水孔蛋白表达量

图 5 植株形态学特征及结合信号和水孔蛋白表达量

Fig. 5 The morphologies of plants and binding signals, expression quantity of aquaporin

## 3 结语

本文通过 SPRi 高通量筛选类肽文库的方法,得到了一种能够高灵敏识别植物水孔蛋白 PIP2 的适配体 PPA7,与拟南芥 PIP2 的亲和力为  $2.52 \times 10^{-9}$  mol/L,达到了大部分抗体的亲和力

力水平,且具有较高的特异性,可用于检测植物水孔蛋白PIP2表达量。利用适配体PPA7成功检测了石竹玻璃化植株水孔蛋白表达量的变化,为植物蛋白的定量提供了新方法及策略,同时为玻璃化试管苗发生机制的研究提供了参考。

## 参考文献:

- [1] PRESTON G M, CARROLL T P, GUGGINO W B, *et al.* Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein [J]. *Science*, 1992, **256**(555): 385-387.
- [2] LI Guowei, SANTONI V, MAUREL C. Plant aquaporins: roles in plant physiology [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, **1840** (5): 1574-1582.
- [3] KAPILAN R, VAZIRI M, ZWIAZEK J J. Regulation of aquaporins in plants under stress [J]. *Biological Research*, 2018, **51**: 4.
- [4] PAWŁOWICZ I, MASAJADA K. Aquaporins as a link between water relations and photosynthetic pathway in abiotic stress tolerance in plants [J]. *Gene*, 2019, **687**: 166-172.
- [5] MARTINEZ-BALLESTA M d C, CARVAJAL M. New challenges in plant aquaporin biotechnology [J]. *Plant Science*, 2014, **217-218**: 71-77.
- [6] CHAUMONT F, BARRIEU F, JUNG R, *et al.* Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity [J]. *Plant Physiology*, 2000, **122**(4): 1025-1034.
- [7] MA Nan, XUE Jingqi, LI Yunhui, *et al.* Rh-PIP2;1, a rose aquaporin gene, is involved in ethylene-regulated petal expansion [J]. *Plant Physiology*, 2008, **148**(2): 894-907.
- [8] ALLEVA K, MARQUEZ M, VILLARREAL N, *et al.* Cloning, functional characterization, and co-expression studies of a novel aquaporin (FaPIP2;1) of strawberry fruit [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, **61**(14): 3935-3945.
- [9] MAINA E, MATRICOTI I, NOLI C. An assessment of a Western blot method for the investigation of canine cutaneous adverse food reactions [J]. *Veterinary Dermatology*, 2018, **29**(3): e78-217.
- [10] SUN Jing, ZUCKERMANN R N. Peptoid polymers: a highly designable bioinspired material [J]. *ACS Nano*, 2013, **7**(6): 4715-4732.
- [11] SIMON R J, KANIA R S, ZUCKERMANN R N, *et al.* Peptoids: a modular approach to drug discovery [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, **89**(20): 9367-9371.
- [12] ZUCKERMANN R N. The chemical synthesis of peptidomimetic libraries [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 1993, **3**(4): 580-584.
- [13] MURPHY J E, UNO T, HAMER J D, *et al.* A combinatorial approach to the discovery of efficient cationic peptoid reagents for gene delivery [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, **95** (4): 1517-1522.
- [14] LUXENHOFER R, FETSCH C, GROSSMANN A. Polypeptoids: a perfect match for molecular definition and macromolecular engineering? [J]. *Journal of Polymer Science, Part A — Polymer Chemistry*, 2013, **51**(13): 2731-2752.
- [15] ZUCKERMANN R N, KODADEK T. Peptoids as potential therapeutics [J]. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 2009, **11**(3): 299-307.
- [16] REDDY M M, WILSON R, WILSON J, *et al.* Identification of candidate IgG biomarkers for Alzheimer's disease via combinatorial library screening [J]. *Cell*, 2011, **144**(1): 132-142.
- [17] YAM A Y, WANG Xuemei, GAO C M, *et al.* A universal method for detection of amyloidogenic misfolded proteins [J]. *Biochemistry*, 2011, **50**(20): 4322-4329.
- [18] CHONGSIRIWATANA N P, PATCH J A, CZYZEWSKI A M, *et al.* Peptoids that mimic the structure, function, and mechanism of helical antimicrobial peptides [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, **105**(8): 2794-2799.
- [19] LAUSTED C, HU Zhiyuan, HOOD L, *et al.* SPR imaging for high throughput, label-free interaction analysis [J]. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2009, **12**(8): 741-751.
- [20] ZHAO Zijian, ZHU Ling, BU Xiangli, *et al.* Label-free detection of Alzheimer's disease through the ADP3 peptoid recognizing the serum amyloid-beta42 peptide [J]. *Chemical Communications*,

- 2015, **51**(4): 718-721.
- [21] ZHAO Zijian, ZHU Ling, LI Haiyun, et al. Antiamyloidogenic activity of A $\beta$ 42-binding peptoid in modulating amyloid oligomerization [J]. **Small**, 2017, **13**(1): 1602857.
- [22] GAO Hongyang, XIA Xiuying, AN Lijia, et al. Reversion of hyperhydricity in pink (*Dianthus chinensis* L.) plantlets by AgNO<sub>3</sub> and its associated mechanism during in vitro culture [J]. **Plant Science**, 2017, **254**: 1-11.
- [23] GAO Hongyang, LI Jiawei, JI Huining, et al. Hyperhydricity-induced ultrastructural and physiological changes in blueberry (*vaccinium* spp.) [J]. **Plant Cell Tissue & Organ Culture**, 2017, **133**(4): 65-76.
- [24] VENDRELL-NAVARRO G, RÚA F, BUJONS J, et al. Positional scanning synthesis of a peptoid library yields novel inducers of apoptosis targeting karyopherins and tubulin [J]. **ChemBioChem**, 2015, **16**(11): 1580-1587.
- [25] GUO Li, ZHANG Donghui. Cyclic poly(alpha-peptoid)s and their block copolymers from N-heterocyclic carbene-mediated ring-opening polymerizations of N-substituted N-carboxylanhydrides [J]. **Journal of the American Chemical Society**, 2009, **131**(50): 18072-18074.
- [26] ROSALES A M, MURNEN H K, ZUCKERMANN R N. Control of crystallization and melting behavior in sequence specific polypeptides [J]. **Macromolecules**, 2010, **43**(13): 5627-5636.
- [27] ROSALES A M, MURNEN H K, KLINE S R, et al. Determination of the persistence length of helical and non-helical polypeptides in solution [J]. **Soft Matter**, 2012, **8**(13): 3673-3680.

## Rapid label-free detection of expression quantity of plant aquaporin PIP2

XU Ming, ZHAO Zijian, XIA Xiuying\*

(School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

**Abstract:** Compared with traditional antibody detection techniques, aptamers are easier to be rapidly synthesized in large quantities, and are easy to be combined with a variety of detection techniques, which has great potential in protein detection. As the main way of water transport across the membrane in organism, it is of great significance to understand the changes of aquaporin expression in plant water metabolism. An eight-mer peptoid aptamer library with one constant cysteine residue on the C-terminal is synthesized using the conventional split-and-pool method, and the peptoid aptamer PPA7 (PIP2-binding peptoid aptamer 7) with high affinity and specific binding to higher plant aquaporin (PIP2) is screened by surface plasmon resonance imaging (SPRi) technology. Its affinity  $K_D$  is up to  $2.52 \times 10^{-9}$  mol/L. PPA7 is used to detect the expression quantity of aquaporin in hyperhydric pink (*Dianthus chinensis* L.) and normal plants. The results show that the expression quantity of aquaporin in hyperhydric pink (*Dianthus chinensis* L.) is higher than that in normal ones, which provides a new quantitative detection strategy for plant proteins and lays a foundation for further clarifying the role of aquaporin in hyperhydricity.

**Key words:** aquaporin; PIP2; peptoid aptamers; surface plasmon resonance imaging (SPRi); rapid label-free detection