

植物细胞中膜 H^+ -ATPase 的研究进展

王 延 枝

(武汉大学生物系)

提 要

本文介绍了植物细胞中各种膜微囊的制备和分离原理,及其在膜转运分子机制研究中的应用。对质膜、线粒体和液泡膜三种类型膜转运质子 ATP 酶 (H^+ -ATPase) 的性质进行了比较,说明它们的催化特性和泵质子功能。

一、导 言

近十多年来,对植物细胞膜离子转运和电生理的研究,已经初步阐明了溶质分子跨膜转运的机制。这种转运方式不仅发生在细胞与环境(或叫细胞外介质)之间,而且也发生在细胞器与细胞质之间。根据 Mitchell 的化学渗透假说,由 H^+ 跨膜转运形成的质子电化学梯度所引起的质子驱动力 (proton motive force) 与各种溶质分子如: 阴离子、阳离子、氨基酸、糖类和各种生长调节因子等主动转运相偶联^[1]。在植物细胞的膜转运系统中,常常把质子通过原生质膜由细胞质到细胞外的主动转运称为初级主动转运 (Primary active transport), 由质子驱动力引起的各种溶质分子的主动转运称为次级主动转运 (secondary active transport)。有些溶质分子与质子进行同向转运 (symport), 有些溶质分子与质子则是逆向转运 (antiport)^[2]。在植物细胞中,质膜和细胞器膜都可发生由质子电化学梯度驱动的次级主动转运。

在植物细胞的膜系统中有各种 Mg^{2+} -ATPase。有位于细胞质膜的质膜 ATPase, 有位于线粒体内膜和叶绿体类囊体膜的线粒体类型 ATPase。近十多年来膜 ATPase 的研究进展很快。80 年代以来积累了不少关于 ATP 水

解驱动泵质子跨膜转运的直接证据^[2]。目前在这个领域中比较活跃的研究是位于液泡膜上的 Mg^{2+} -ATPase^[3]。在有关的论文中,凡在催化 ATP 水解的同时驱动质子跨膜转运的 ATPase, 都被称为转运质子的 ATPase (H^+ -translocating ATPase), 简称为 H^+ -ATPase, 根据它们的结构和催化特性,植物细胞中至少有三种类型的 H^+ -ATPase。

二、膜微囊在膜转运分子机制研究中的应用

1. 膜微囊 (membrane vesicles) 制剂

70 年代初期由 Hodges 等人创建了植物亚细胞膜分离技术,由此开始了对离子跨膜转运机制的生物化学研究。他们证明:在质膜和其它某些细胞器膜上存在着分别由阴离子和阳离子激活的两种 Mg^{2+} -ATPase, 并且推测这两种 Mg^{2+} -ATPase 都具有质子泵的功能^[4]。1982 年 Tazawa 用纯化的藻类细胞测定质膜依赖 ATP 的 H^+ 跨膜主动转运,即质子泵的作用,取得了相当满意的结果^[5]。但这项技术对高等植物细胞不适用。研究膜转运的过程要求实验体系中的 pH, 缓冲能力以及膜两侧的离子浓度便于控制和测量,膜微囊基本上可以满足这些要求^[3]。所谓膜微囊是指组织匀浆过程中膜碎片自发形成的空心小泡。膜微囊制剂的制备

技术加快了膜转运分子机制的研究进展。

2. 膜微囊制剂的制备 利用膜微囊研究膜的转运功能,必需制备密封的微囊(sealed visicle),因为只有密封才能维持膜内外的离子浓度差。制备膜微囊制剂,首先是进行组织匀浆,研磨缓冲液含有各种保护性试剂和维持一定的pH。由磷脂占主要成分的质膜和细胞器膜碎片在介质中自发形成微囊。在这些微囊中部分是密封的,部分是渗漏的(leaking),两者的比例与植物材料和实验条件有关。在大分子葡聚糖密度梯度介质中,可利用这两种膜微囊的浮力不同用高速离心的方法把它们分开^[6]。因为大分子的葡聚糖不能进入密封的微囊,从整个膜微囊来看细胞内含物所占的比例远远高于膜成分,其密度由细胞内含物即胞浆的密度来决定的,通常为1.03—1.06克/毫升。对于渗漏的膜微囊来说,它的密度则由膜的密度来决定,通常为1.10—1.20克/毫升。分离这两种膜微囊时,用葡聚糖比用蔗糖配制的密度梯度介质效果好,后者常引起膜微囊的收缩使其内含物减少,这样就减少了两种膜微囊之间密度的差异,影响分离效果^[7]。

膜结构具有不对称性,如某些酶或转运蛋白存在于膜的外表面,在膜微囊的形成过程中就有两种可能性:一种是这些酶或转运蛋白仍然在外表面,称之为 Right-side out vesicle,简称为 ROV;另一种是把这些酶或转运蛋白包在内表面,称之为 Inside out vesicle,简称为 IOV。对于不同的膜来说,两种膜微囊的含

义不同。如图1所示,质膜ATPase位于质膜内侧形成A型膜微囊被称为IOV即内翻外微囊,形成B型膜微囊则被称为ROV即未翻转微囊。对于液泡膜来说情况则完全相反,液泡膜ATPase位于液泡膜外侧形成A型膜微囊被称为ROV即未翻转微囊,形成B型膜微囊被称为IOV即内翻外微囊。

3. 利用膜微囊的优越性 从理论上来说,用密封的膜微囊制剂比用完整的植物细胞来研究膜转运机制,有几个优点:(1)排除了细胞内代谢活动对膜转运活性的干扰。(2)可以直接研究溶质主动跨膜转运与质子电化学梯度的关系。(3)由于膜微囊转运溶质的速度,调节因子和专一性与完整细胞相同,因此利用膜微囊制剂可直接检测各种化学与物理因素的作用,如 Ca^{2+} 、光及生长刺激素对溶质分子跨膜转运的调节作用。(4)可以研究溶质转运的方向,以便进一步确定该物质转运蛋白在膜上的位置^[7]。但在膜微囊的制备过程中,膜的渗透性、膜转运的调节及其它特性都会产生不同程度的改变,所以用膜微囊制剂测不出其功能活性,但并不能排除它在植物正常细胞中存在的可能性。对膜转运蛋白或酶动力学性质(K_m 和 V_{max})的测定只能在接近生理的条件下进行,所得结果与正常细胞中的实际情况稍有差异。尽管如此,密封的膜微囊仍是研究植物细胞中膜转运分子机制的简单而有用的工具。

三、 H^+ -ATPase 的质子泵功能

1. 离子载体对 H^+ -ATPase活性的激活作用。 H^+ -ATPase催化ATP水解的同时,建立了跨膜质子电化学梯度。质子电化学梯度一旦形成, H^+ -ATPase的活性就会降低,任何破坏离子电化学梯度的因素都会激活 H^+ -ATPase的活性。离子载体可以促进某些离子的跨膜转运,因而在反应系统中有离子载体时,质子电化学梯度即遭破坏, H^+ -ATPase的活性提高。离子载体的作用具有专一性,短杆菌肽A(Gramicidin A)促进 H^+ 与其它各种阳离子的逆向转运;尼日利亚霉素(Nigericin)促进 H^+ 与 K^+

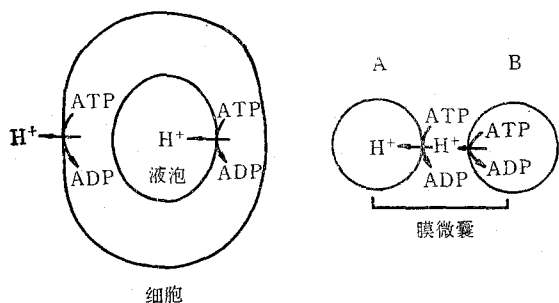


图1 膜微囊 IOV 和 ROV 示意图

对于由质膜形成的微囊: A 为 IOV, B 为 ROV。对于由液泡膜形成的微囊: A 为 ROV, B 为 IOV

的逆向转运, CCCP (Carbonyl Cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone) 是 H^+ 的载体, 缬氨霉素 (Valinomycin) 是 K^+ 的载体。

首先在烟草愈伤组织中, 观察到膜微囊 H^+ -ATPase 的活性受离子载体的影响。若把仅有 KCl 存在时, 烟草愈伤组织的膜 H^+ -ATPase 活性定为 100%, 加入短杆菌肽 A 或尼日利亚霉素或 CCCP 和缬氨霉素可使该酶活性增至 180%, 净增 80%^[8]。用燕麦根、南瓜下胚轴以及甜菜等所作的实验表明, CCCP 和缬氨霉素单独使用, 不如两者一起使用的效果显著, 而尼日利亚霉素和短杆菌肽 A 单独使用可得到同样的效果^[7]。

2. 膜电位与跨膜 pH 梯度 ($\Delta\phi$ 和 ΔpH) 的关系。膜电位可由致电子泵或膜内外各种离子的传导而产生, 由于分离出来的膜微囊体积小不能直接测定膜电位。一般采用与膜电位产生有关的探针间接测定, 根据探针的性质、特点、使用方法和作用机制选择适当的探针^[9]。

脂溶性探针在两种液相中的分布服从 Nernst 方程。在生理 pH 条件下, 带正电荷的放射性探针如三甲苯基磷 (triphenylmethyl phosphonium), 适于测定膜内负外正的膜电位。带负电荷的放射性探针如硫酸盐适于测定膜内正外负的膜电位。带正电荷的光学探针如: Carbocyanine 染料, 带负电荷的光学探针如: Oxonol 都常用来测定膜电位。一般来说, 光学探针比放射性探针敏感。

跨膜 pH 梯度是由于质子泵或人工方法使 H^+ 跨膜转运造成的。常用带放射性标记的弱酸、弱碱或光学探针进行测定。各种探针的性质和使用方法见有关专著^[10]。

pH 梯度测定的光学探针, 已广泛应用于植物细胞的膜 H^+ -ATPase 泵运质子活性的测定。喹吖因是弱碱性, 在膜微囊制剂中沿膜内外的 pH 梯度分布, 质子化导致荧光淬熄。如果膜内与膜外相比显酸性, 喹吖因就会在膜内积累使荧光淬熄。这可能是因为同类分子之间能量转运引起量子的生成减少^[11]。光学探针的优点是在一段时间内连续测量 pH 梯度形

成的过程, 但它的敏感性受实验条件及仪器性能的影响。虽然目前喹吖因测定膜微囊 pH 梯度的技术广泛应用, 但各个实验室之间的结果不能直接进行相互比较, 因为大家没有采用统一的荧光淬熄单位。荧光胺在使用中有局限性, 有些植物或某些组织其生物膜内含胺或伯胺成分多, 荧光胺可通过膜中的胺扩散, 因而不能在膜内积累产生荧光淬熄。例如, 利用喹吖因的荧光淬熄可以测定燕麦根细胞的质膜、液泡膜 H^+ -ATPase 泵运质子的活性, 但甲基胺只能测定燕麦根细胞中液泡膜 H^+ -ATPase 的泵运质子的 ATPase 活性。对于烟草愈伤组织来说, 质膜和液泡膜的泵运质子活性都不能用甲基胺来检测。生物膜成分的测定结果表明: 双子叶植物的质膜和液泡膜中都含有胺, 单子叶植物只有质膜中含有胺^[12]。所以在使用 pH 梯度的荧光探针时, 要慎重选择。

膜电位和 pH 梯度组成的质子电化学梯度, 其中可利用的能量可用下式表示:

$$\Delta\bar{\mu}_{H^+} = F\Delta P = F\Delta\phi - 2.3RT\Delta pH$$

式中的 $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$: 可利用的能量, 以千卡/克分子表示; F : 法拉第常数 96000 库仑; ΔP : 质子驱动力; $\Delta\phi$: 膜电位, 以 mV 表示; R : 克分子气体常数; ΔpH : pH 梯度; T : 绝对温度。25°C 时, $\Delta P = \Delta\bar{\mu}_{H^+}/F = \Delta\phi - 59\Delta pH$ 。在不同的条件下, $\Delta\phi$ 和 ΔpH 可以相互转化, 结果 ΔP 不改变。例如, 当反应液中没有可渗透的阴离子存在时, 酶催化的 ATP 水解可使烟草愈伤组织的膜微囊内外产生膜电位, 产生质子驱动力的主要因素是 $\Delta\phi$ ^[12]。 Cl^- 的致电转运进入膜微囊可部分或全部破坏膜电位, 同时刺激 H^+ -ATPase 的泵运质子作用, 使膜内外的 ΔpH 增加。不可渗透的阴离子存在, 既不破坏膜电位也不刺激 pH 梯度的建立^[13]。也就是说, 在致电扩散离子不存在时, 可以建立膜电位, 而 pH 梯度的建立, 必须有可渗透扩散的离子存在。

四、植物细胞中 H^+ -ATPase 的种类和性质

植物细胞内有三种类型的膜 H^+ -ATPase,

表1 植物细胞中三种类型 H^+ -ATPase 的性质比较

液泡膜类型	质膜类型	线粒体类型
抑制剂		
钒酸盐 无抑制作用	$I_{50} = 3-10 \mu\text{mol/L}$	无抑制作用
硝酸盐 $I_{50} = 5-10 \text{ mmol/L}$	无抑制作用	$I_{50} = 5-10 \text{ mmol/L}$
叠氮钠 无抑制作用	无抑制作用	$I_{50} < 50 \mu\text{mol/L}$
DIDS $I_{50} = 5-10 \mu\text{mol/L}$	轻度抑制	$I_{50} = 8 \mu\text{mol/L}$
DCCD $I_{50} = 3 \mu\text{mol/L}$	有抑制作用,未确定 I_{50}	$I_{50} = 0.035 \mu\text{mol/L}$
NEM $I_{50} < 2 \mu\text{mol/L}$	有抑制作用,未确定 I_{50}	$I_{50} < 50 \mu\text{mol/L}$
阴离子 有激活作用 Cl^- , $\text{Br}^- > \text{I}^- > \text{HCO}_3^- > \text{SO}_4^{2-}$	无明显激活作用	有激活作用 $\text{HCO}_3^- \gg \text{Cl}^-$, $\text{Br}^- > \text{I}^-$, SO_4^{2-}
阳离子 无明显激活作用	有激活作用 $\text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}$	无明显激活作用
底物 特异性 $\text{ATP} > \text{GTP} > \text{NTP}$	$\text{ATP} \gg \text{NTP}$	$\text{ATP} > \text{GTP} > \text{NTP}$
最适 pH 8—8.5	6.5—7	8—9
$K_m(\text{ATP})$ 0.1—0.2 mmol/L	0.3—0.5 mmol/L	0.8 mmol/L
密度区 1.10—1.13 g/ml	1.13—1.17 g/ml	1.18—1.20 g/ml

DCCD: 二环己基碳二甲胺, DIDS: 二异硫氰二苯乙烯二磺酸, NEM: N-乙基顺丁烯二酰亚胺。 I_{50} 抑制最大反应速度一半时的抑制剂浓度。

质膜 H^+ -ATPase 对钒酸钠非常敏感, 线粒体和液泡膜 H^+ -ATPase 对钒酸盐不敏感, 但用叠氮化钠或寡霉素可以把这两种酶区分开来, 因为线粒体 H^+ -ATPase 对叠氮化钠和寡霉素都非常敏感。我们对燕麦根细胞中, 线粒体和液泡膜 H^+ -ATPase 的性质作了系统的比较研究, 证明液泡膜 H^+ -ATPase 是一种既不同于质膜 H^+ -ATPase 也不同于线粒体 H^+ -ATPase 的一种膜 H^+ -ATPase^[6]。对于膜 H^+ -ATPase 的研究, 目前还仅限于少数几种植物组织, 但从研究结果看单子叶和双子叶植物组织的膜 H^+ -ATPase 性质都分别相近似。表1列出了从几种植物组织(燕麦根、玉米根和胚轴、甜菜、菸草愈伤组织和橡胶乳汁)中分离的三种膜 H^+ -ATPase 的主要性质比较^[7]。

五、膜 H^+ -ATPase 的分离、纯化和重组

质膜和液泡膜 H^+ -ATPase 的分离, 纯化和重组工作已经开始, 其目的是为了弄清膜转运离子的活性所需要的最少组成, 以便确定膜

转运系统的成分。用溶血卵磷脂分离, 甘油密度梯度离心纯化, 可使燕麦根的质膜 H^+ -ATPase 纯化5倍^[4]。萝卜苗的质膜 H^+ -ATPase 纯化后, 比活性增加到原来的40倍, 并表现出质膜 H^+ -ATPase 的全部性质^[5]。Randall 等人用 Triton X-100 把液泡膜 H^+ -ATPase 从膜上溶解下来, 纯化后用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 证明该酶有两个分子量分别为72和60千道尔顿的多肽与酶的催化和调节有关。另外还有一个分子量为14—18千道尔顿的多肽, 可与 DCCD 结合, 它的作用可能与线粒体 ATPase (F_0F_1 类型) 分子中的 DCCD 结合蛋白类似, 作为质子穿过脂质双分子层的通道^[16]。

综上所述, 当前在植物细胞中已确定了线粒体外的两种与初级转运有关的 H^+ -ATPase, 一种存在于质膜, 一种存在于液泡膜。最近有人报道, 质子或其它离子(如 Ca^{2+}) 的跨膜电化学梯度与生长素刺激的细胞延长, 高尔基体参与的外排作用、细胞壁的生物合成、蛋白质分泌、

(下转第445页)

病菌的清除作用亦已得到实验证实,许多研究者均认为用之于净化环境水体中较常见的革兰氏阴性细菌和用于防治环境污染给人类带来的危害是极有可能的。目前,我国对蛭弧菌的研究动向,一是努力将蛭弧菌由模拟自然条件的河水中净化致病菌过渡到应用于自然环境水源中净化水体,改善水源,保护环境,控制或减少肠道传染病的发生和流行,保护人群健康。二是专家们呼吁进一步研究蛭弧菌在生物防治中的作用,扩大蛭弧菌研究范围等。我国科研人员也正在沿着这两个方面深入研究。

参 考 文 献

- [1] Stolp H. et al.: *Phytopathol.*, 1962, **45**, 364.
[2] 秦生巨:《消毒与灭菌》,1987,4(2),92。

(上接第441页)

有丝分裂和光反应等有关^[17]。这些研究结果鼓励人们去研究生长素、毒素对质子泵的直接调节作用。初步结果表明:生长素增加质子泵对ATP的亲合力,质子泵的作用直接引起细胞内含物含量的变化^[17,18]。质子或其它离子跨膜电化学梯度的变化可能是一个信号,或者是导致一系列生理生化变化过程的一个步骤。总之在膜H⁺-ATPase的质子泵功能与植物生长、发育的关系中,有许多问题值得深入研究。

参 考 文 献

- [1] Giaquinta, R. T.: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 1983, **34**, 347.
[2] Sze, H.: *Physiol. Plant.*, 1984, **61**, 683.
[3] Blumwald, E.: *Physiol. Plant.*, 1987, **69**, 731.
[4] Hodges, T. K.: *Adv. Agron.*, 1973, **25**, 163.
[5] Tazawa, M. et al.: *Top. Membr. Transp.*, 1982, **16**, 49.
[6] Wang, Y. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1985, **26**, 10434.

- [3] Starr M. et al.: *Adv. in microbiol. physiol.*, 1972, **8**, 215.
[4] 秦生巨:《环境与健康杂志》,1988,5(3),48。
[5] 司稗东、秦生巨:《中华微生物学和免疫学杂志》,1982,2(1),12。
[6] 秦生巨:《微生物学通报》,1987,14(4),184。
[7] 戴华生:《环境微生物学》,江西教育出版社,1985,408。
[8] 罗明典:《应用微生物》,1980,4,29。
[9] Rosson R. et al.: *J. bacteriol.*, 1981, **146**(1), 108.
[10] Rosson R. et al.: *J. bacteriol.*, 1979, **145**(5), 620.
[11] 司稗东、秦生巨:《卫生防疫资料汇编》(腹泻病专辑),江苏省卫生防疫站,1986,143。
[12] 钱伯钦译:《国外医学》,微生物学分册,1980,6,264。
[13] Veçosa D.: *Appl. Microbiol.*, 1975, **29**(5), 702.
[14] Scherff R.: *Phytohology*, 1973, **63**, 400.
[15] 秦生巨等:《消毒与灭菌》,1988,5, (1), 17。
[16] Москвитина: *ЗАИЛ: ЖМЭ* 1979, **5**, 3.
[17] 秦生巨等:《消毒与灭菌》,1988,5(3),135。

[本文于1988年7月8日收到]

- [7] Sze, H.: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 1985, **36**, 175.
[8] Sze, H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, **77**, 5904.
[9] Rosen, B. P.: *Methods Enzymol.*, 1979, **56**, 233.
[10] Rottenberg, H.: *Methods Enzymol.*, 1979, **55**, 547.
[11] Lee, H. C. et al.: *Intracellular pH: Its Measurement, Regulation and Utilization in Cellular Functions*, Alan R. Liss, New York, 1982, 136—158.
[12] Larsson, C. et al.: *FEBS Lett.*, 1984, **171**, 271.
[13] Bennett, A. B. et al.: *J. Membr. Biol.*, 1983, **71**, 95.
[14] Serrano, R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, **121**, 735.
[15] Cocucci, M. C. et al.: *Biochem. Biophys. Acta.*, 1984, **771**, 42.
[16] Randall, S. K. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 7135.
[17] Kimber, A. et al.: *Plant Physiol.*, 1984, **74**, 804.
[18] Zocchi, G. et al.: *Plant Cell Environ.*, 1983, 203.
[19] Alberts, B. et al.: *Molecular Biol. of The Cell*, Garland Publishing, Inc., New York & London, 1983, 288.

[本文于1988年4月22日收到]