

大豆下胚轴质膜 H^+ -ATPase 质子转运的测定

邱全胜¹⁾ 苏雪峰

(中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 以大豆下胚轴为材料, 采用改进的匀浆介质, 通过两相法制得具有质子转运活力的高纯度质膜微囊. 并且发现冻融处理可以促进质膜微囊的翻转而提高荧光猝灭效率. 质子载体和质子转运特性分析表明, 由 Mg^{2+} -ATP 引发的荧光猝灭可以被质子载体 CCCP 恢复, 并被质子通道抑制剂 DCCD 抑制; 并且发现质膜 H^+ -ATPase 专一抑制剂钒酸钠可以完全抑制荧光猝灭, 同时发现荧光猝灭依赖于 Mg^{2+} , 并受 K^+ 刺激, 最适 pH 为 6.5. 以上证明所测荧光猝灭是由质膜 H^+ -ATPase 所进行的质子转运引起的. 结果同时表明, 维持 H^+ -ATPase 合适构象和提高质膜微囊封闭性是制备具有 H^+ 转运活力质膜微囊的两个关键因素.

关键词 大豆下胚轴, 质膜微囊, H^+ -ATPase, 质子转运

学科分类号 Q73

质子转运活力的测定是植物质膜 H^+ -ATPase 研究的一个重要方面, 它是全面了解 H^+ -ATPase 的特性, 深入阐明其分子机制的重要方法.

质子转运的测定可采用同位素示踪, 电子顺磁共振 (EPR) 及荧光探针等方法^[1,2]. 由于荧光探针方法操作方便, 仪器设备简单, 而且可以连续监测, 目前文献中大都采用荧光方法测定质子转运. 通常所用荧光探针为: 喹吖因, 吖啶橙及 9-氨基吖啶等^[1~3]. 测定原理是: 荧光探针未质子化时可自由通过膜微囊, 当其质子化后则不能通过膜微囊. 因此当发生质子转运, 膜微囊内积累质子时, 荧光探针被质子化; 质子化的探针由于不能通过膜微囊而积累于膜微囊中, 从而引起荧光猝灭. 据此可以计算 H^+ -ATPase 的转运活力^[1,2]. 然而, 影响荧光猝灭的因素较多, 而且所得质膜制剂中有其他细胞器的污染, 因此在以荧光探针进行质子转运测定时, 必须同时进行以下两方面的实验, 才能够确认所观察到的荧光猝灭是由质膜 H^+ -ATPase 进行的质子转运引起的^[1~4]. 一是质子载体和质子通道抑制剂实验, 只有荧光猝灭可以被质子载体恢复, 并可以被质子通道抑制剂抑制, 才能确定荧光猝灭是由质子转运引起的, 从而排除其他因素的干扰; 另一是质膜 H^+ -ATPase 专一抑制剂及生化特性实验, 通过分析质子转运的最适 pH 值, K^+ 刺激, 钒酸盐抑制等特性, 才能判定所测质子转运是由质膜 H^+ -ATPase 进行的, 而非其他细胞器膜的污染所致.

植物质膜 H^+ -ATPase 是植物细胞的“主宰酶”

(master enzyme), 它与植物的生长发育极为密切^[5]. 植物质膜 H^+ -ATPase 是由 Hodges 等^[6] 在 70 年代发现的, 80 年代初确定该酶具有质子转运功能, 随后成功地以纯化的质膜微囊进行了膜微囊水平的质子转运实验, 充分肯定了质膜 H^+ -ATPase 是一种质子转运 ATPase, 即质子泵^[1]. 然而, 植物质膜 H^+ -ATPase 质子转运活力的测定并非易事^[2]. 实验发现质膜微囊的封闭性是质子转运活力测定的关键所在, 很多工作由于所得质膜微囊封闭性差, 渗漏质子, 而未测出质子转运^[1,2,7]. 质膜的制备需要经过匀浆和纯化等过程, 因此它们是制备封闭性质膜微囊的重要因素^[2]. 此外, 植物材料也是一个不可忽视的因素^[2]. 研究发现, 植物材料的种类, 生长时期等都与质膜制剂的封闭性相关.

国内在 80 年代后期也开始进行质膜纯化和质膜 H^+ -ATPase 方面的研究工作^[8]. 然而这些工作大都只测定了 ATPase 水解活力^[8], 而没有测定质子转运活力; 近年的一些研究工作中虽然也有质子转运的报道^[9,10], 但其荧光猝灭较低, 而且缺乏相应的抑制剂和质子载体实验, 因而难以排除上述人为因素及其他细胞器膜污染两方面的影响. 鉴于质子转运在研究质膜 H^+ -ATPase 结构功能方面的重要性 and 国内质子转运研究的现状, 在多年进行质膜纯化和质膜 H^+ -ATPase 研究的基础上, 我们进行质膜 H^+ -ATPase 质子转运测定, 摸索出合适的

¹⁾ 现在工作单位: 北京师范大学生物系, 北京 100875.

收稿日期: 1997-10-19, 修回日期: 1998-04-21

实验条件和方法, 能够稳定地测出较高荧光猝灭率, 而且表现出典型的质膜 H^+ -ATPase 特征.

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

实验材料为大豆下胚轴, 购自市场.

ATP 为 Fluka 公司产品; 2- (N-吗啉) -乙磺酸 (Mes) 为 Serva 公司产品, 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 为 ICN 公司产品; 二硫苏糖醇 (DTT) 购自 Promega; Dextran T-500 购自 Pharmacia; 羰基氰-间-氯苯腙 (CCCP), 1, 3-双 [三 (羟甲基) 甲氨基] 丙烷 (BTP), 曙红 B, PEG3350, Leupeptin 等购自 Sigma 公司; 其余为国产分析纯试剂.

1.2 质膜分离与纯化

参照 Sandelius 和 Morre 方法^[11], 略有改进. 将大豆下胚轴剪成 1~2 cm 小段, 迅速投入冰冷的匀浆介质中. 匀浆液组成: 0.25 mol/L 蔗糖, 10% (体积比) 甘油, 2 mmol/L EGTA, 2 mmol/L DTT, 15 mmol/L 巯基乙醇, 2 mmol/L Na_2ATP , 2 mmol/L $MgSO_4$, 0.5% BSA, 1 mmol/L PMSF, 0.5 mg/L Leupeptin, 0.2% 酪蛋白 (煮沸), 25 mmol/L BTP-Mes pH 7.5. 用组织捣碎机高速匀浆 2×10 min, 以四层纱布过滤. 滤液在 13 000 g 离心 15 min, 弃去沉淀. 上清在 80 000 g 离心 30 min, 沉淀即为微粒体膜. 将微粒体膜悬浮. 悬浮液组成: 0.25 mol/L 蔗糖, 0.2% BSA, 1 mmol/L DTT, 2 mmol/L BTP-Mes pH 6.5.

1.2.1 不连续蔗糖密度梯度离心法纯化质膜: 将悬浮的微粒体膜小心地铺在 34%~41% 的蔗糖溶液上, 在 100 000 g 离心 2 h. 吸取 34%~41% 界面处的沉淀物, 以悬浮液稀释 3~5 倍, 80 000 g 离心 30 min, 收集沉淀即得质膜微囊.

1.2.2 两相法纯化质膜: 将悬浮的微粒体膜铺在含有 Dextran-PEG 组成的两相溶液的离心管上. 相溶液组成: 6.2% Dextran T-500, 6.2% PEG 3350, 1 mmol/L DTT, 0.25 mol/L 蔗糖, 5 mmol/L 磷酸缓冲液 pH 7.8. 将相溶液混匀, 1 500 g 离心 5 min 使其分相. 吸取 90% 上相 PEG 溶液加至另一盛有新鲜下相的离心管中, 原离心管中则重新加入新鲜上相. 如此重复三次, 收集 PEG 相. 以悬浮液稀释 3~5 倍, 80 000 g 离心, 得到纯化的质膜微囊.

1.3 ATPase 水解活力的测定

参照 Hodges 和 Leonard 方法^[12]. 测定介质组

成: 3 mmol/L ATP, 3 mmol/L $MgSO_4$, 100 mmol/L KCl, 1 nmol/L 曙红 B, 25 mmol/L BTP-Mes 以及 10 μ g 膜蛋白.

1.4 H^+ -ATPase 质子转运活力的测定

参照 Maria^[13] 的方法. 测定介质组成: 10 μ mol/L 喹吖因, 100 mmol/L KCl, 25 mmol/L BTP-Mes pH 6.5, 100~200 μ g 蛋白. 反应完毕后加入 10 μ mol/L CCCP 以消除质子梯度. 测定在日立 F-4010 荧光分光光度计上进行. $E_x = 430$ nm, $E_m = 500$ nm.

1.5 蛋白质含量测定

按 Bradford^[14]法, 以 BSA 为标准.

2 结果与讨论

2.1 匀浆介质对微粒体膜质子转运的影响

匀浆条件对于制备具有质子转运活力的质膜微囊影响极大^[2]. 匀浆条件一般包括实验材料的预处理, 匀浆介质组成及膜的洗涤等因素^[2]. 质膜分离纯化的匀浆介质主要由以下几个部分组成: 渗透介质; 离子螯合剂; 蛋白酶抑制剂; 一定 pH 值^[11]. 在实际测定中, 由于实验材料不同, 研究的目的是不同, 实验所用介质组成不同. 然而, 就目前发表的论文来看, 匀浆介质组成大致可以分成两类. 一类是以 Briskin 为代表 (称为介质 A)^[15], 其特点是含有 Mg^{2+} -ATP 和 KI, 但仅以 PMSF 为抑制剂, 以 BSA 为蛋白酶底物; 另一大类是以 Larsson 为代表 (称为介质 B)^[16,17], 该介质不含 Mg^{2+} -ATP 和 KI, 但以 PMSF 为抑制剂, 并且同时加入 BSA 和酪蛋白为蛋白酶底物.

我们分别按照 Briskin 和 Larsson 方法配置匀浆介质, 进行了多次实验, 都未取得理想结果. 当以 Briskin 方法配置的介质制备微粒体膜时, 所得微粒体膜不能进行质子转运 (表 1); 当以 Larsson 方法配置的介质匀浆时, 大多情况下, 所得微粒体膜也不能进行质子转运 (表 1); 有时虽然也能测出一点转运, 但荧光猝灭微弱 (结果未列), 难以用于研究工作. 在多次实验的基础上, 我们将 Briskin 和 Larsson 的方法综合起来, 组成一种新的匀浆介质 (称为介质 C): 采用 Briskin 方法, 加入 Mg^{2+} -ATP, 但不加入 KI; 采用 Larsson 方法, 同时加入 BSA 和酪蛋白, 并添加蛋白酶抑制剂 leupeptin. 当以这种新介质匀浆时, 所得微粒体膜能够进行质子转运, 荧光猝灭率高且稳定 (表 1). 本实验表明底物 Mg^{2+} -ATP, 蛋白酶抑制剂 PMSF

和 leupeptin 及蛋白酶底物 BSA 和酪蛋白等是制备具有质子转运活力微粒体膜微囊的几个重要因素. Mg^{2+} -ATP 作为 ATPase 底物, 其作用是维持 ATPase 一定的构象, 蛋白酶抑制剂是通过抑制匀浆过程引起的组织破碎而释放的水解酶活力而起作用的; 保护剂则是作为水解酶底物而起到保护作用的. 以上结果可以得到两点启示: 一是在制备膜微囊过程中维持 ATPase 一定构象对于制备具有质子转运活力的微粒体膜微囊是很重要的; 二是匀浆过程中释放的蛋白水解酶对膜微囊的分解作用可能是导致膜微囊封闭性降低, 渗漏质子的主要原因. 因此根据具体的实验材料, 适当调整匀浆介质中蛋白酶抑制剂和保护剂的组成和浓度, 以有效地抑制水解酶的活力, 将有利于提高膜微囊的封闭性.

总之, 维持 ATPase 一定构象和提高膜微囊的封闭性是质子转运测定的关键因素.

表 1 匀浆介质对微粒体膜质子转运的影响

匀浆介质	质子转运活力
匀浆介质 A	ND
匀浆介质 B	ND
匀浆介质 C	28.1 ± 2.9

注: 表中数据为 3 次实验的平均值. ND: 未测出. 质子转运活力以蛋白相对荧光淬灭率每分钟每毫克表示.

2.2 质膜纯化方法对质子转运的影响

质膜的分离纯化一般有两类方法^[11]. 一类是根据质膜微囊的大小和密度进行纯化, 其中主要以不连续蔗糖密度梯度为主; 另一类是根据质膜微囊的表面特性进行纯化, 其中主要以两相法进行纯化. 从微粒体膜到质膜我们分别采用蔗糖密度梯度离心和 PEG-DEXTRAN 两相法两种方法进行纯化. 结果如表 2 所示. 可以看出, 由蔗糖密度梯度离心纯化的质膜微囊质子转运活力较低, 仅有 4.4, 而以两相法纯化的质膜微囊质子转运活力较高, 高达 31.2 (表 2). 这是由于在用蔗糖法纯化

表 2 两相法与蔗糖法纯化的质膜微囊质子转运的比较

	ATP 水解活力/ $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	H^{+} 转运活力
蔗糖法纯化质膜	21.6 ± 1.3	4.4 ± 0.54
两相法纯化质膜	21.3 ± 1.6	31.2 ± 2.7

注: 表中数据为 3 次实验的平均值, H^{+} 转运活力以蛋白相对荧光淬灭率每分钟每毫克表示.

时, 所用蔗糖浓度高达 41%. 高浓度的蔗糖对膜微囊有很强的收缩作用, 容易造成膜损伤, 影响膜的完整性. 两相法是基于膜表面电荷的差异, 不仅对膜损伤较小, 而且还可除去破损的质膜囊泡, 从而提高质膜制剂的封闭性. 故以两相法制备的质膜微囊质子转运活力较高. 可见, 在质膜纯化过程中, 保持质膜微囊的完整性和封闭性仍然是测定质子转运的关键因素. 在此方面, 两相法比蔗糖密度梯度离心法更有利于制备高封闭性的质膜微囊.

由两相法得到的质膜微囊 Latency 为 83%, 这表明 83% 的微囊是原位膜微囊 (right-side out), 翻转膜 (inside out) 仅为 17%. ATP 结合位点在质膜微囊内侧, 因此只有翻转膜微囊才表现质子转运活力. 为了增加翻转膜微囊比例, 以提高质子转运活力, 我们对膜微囊进行了冻融处理^[18]. 由表 3 可见, 质膜微囊经过一次冻融后, 质子转运活力明显提高, 由 7.4 到 13.3, 提高近一倍; 质膜微囊经过两次冻融以后, 质子转运活力进一步提高, 由 13.3 到 31.2, 提高近三倍. 可见, 冻融处理促使质膜微囊发生了翻转, 从而提高了质子转运活力. 因而, 冻融处理是制备封闭翻转微囊的有效方法.

表 3 冻融处理对质子转运的影响

冻融次数	Latency/ %	质子转运活力
0	83.0 ± 4.2	7.4 ± 1.2
1	45.2 ± 2.6	13.3 ± 1.9
2	15.3 ± 1.8	31.2 ± 2.7

注: 表中数据为 3 次实验的平均值, 质子转运活力以蛋白相对荧光淬灭率每分钟每毫克表示.

2.3 质膜 H^{+} -ATPase 的质子转运特性

首先进行质子载体和质子通道抑制剂实验. 如图 1 所示, 当加入 ATPase 底物 Mg -ATP 后引起喹吖因荧光淬灭. 淬灭的荧光可以被质子载体 CCCP 恢复. 进一步实验发现, 质子通道抑制剂 DCCD 也可以抑制由 Mg -ATP 引发的荧光淬灭. 证明所测荧光淬灭确是由质子转运引起的.

其次进行质膜纯度实验, 如图 1 所示, 质膜 H^{+} -ATPase 专一性抑制剂钼酸钠几乎完全抑制了质子转运, 而液胞膜抑制剂硝酸钠则基本无抑制作用 (图 1). 说明所得质膜制剂纯度很高, 无液胞膜污染; 此外, 实验还发现, 荧光淬灭率随着膜蛋白浓度的增加而加大 (数据未列). 以上可见, 实

验测得的质子转运是由质膜 H^+ -ATPase 进行的。

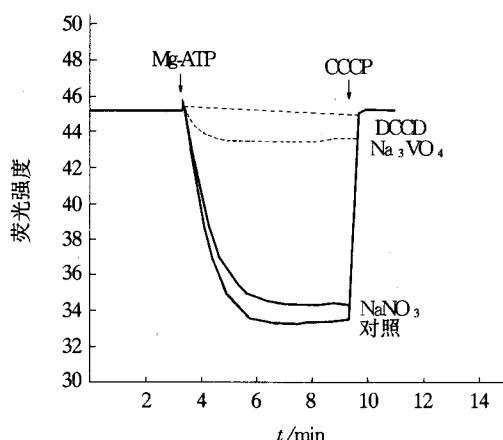


图1 抑制剂和质子载体对大豆下胚轴质膜 H^+ -ATPase 质子转运活力的影响

最后进行特性分析. 由图2可见, 在ATP存在时, 若不加 Mg^{2+} , 则不能测得质子转运. 只有添加 Mg^{2+} 后, 转运才能进行. 表明我们所测ATPase是一种 Mg^{2+} 依赖的ATP酶. 当无 K^+ 存在时, 即使加入 Mg -ATP 仅表现出极微弱的质子转运活力, 加入 K^+ 后转运活力显著提高 (图3), 表明所测ATPase是受 K^+ 刺激的. 最适 pH 值测定表明 (图4), 质子转运的最适 pH 为 6.5, ATP 水解的最适 pH 也为 6.5, 表明质膜 H^+ -ATPase 确实是质子泵.

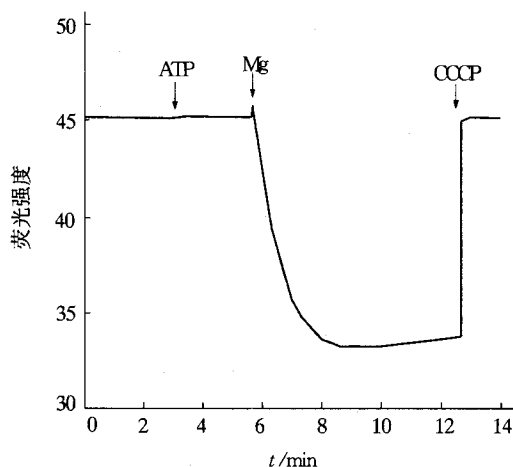


图2 Mg^{2+} 对大豆下胚轴质膜 H^+ -ATPase 质子转运活力的影响

以上可以看出, 大豆下胚轴质膜 H^+ -ATPase 具有典型的植物质膜 H^+ -ATPase 的特征^[19]: 即 Mg^{2+} 依赖性, K^+ 刺激, 最适 pH 6.5. 表明本文所测得的荧光猝灭确实是由质膜 H^+ -ATPase 进行的

质子转运引起的. 换言之, 本文制得的质膜制剂是具有质子转运活力的高封闭性的质膜微囊.

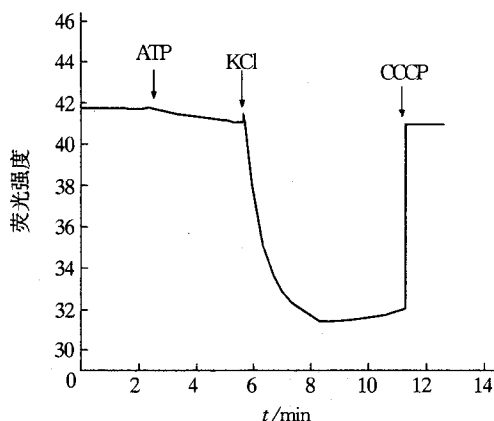


图3 K^+ 对大豆下胚轴质膜 H^+ -ATPase 质子转运活力的影响

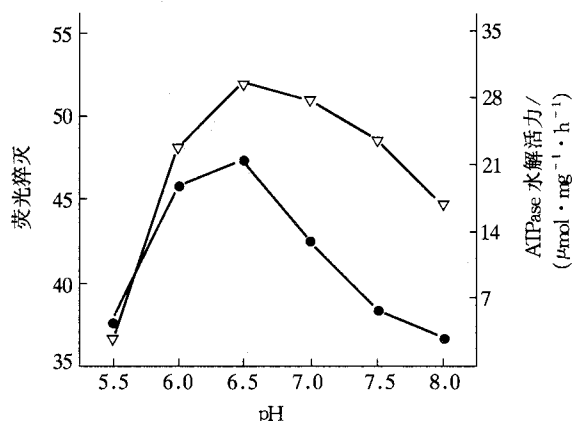


图4 pH 值对大豆下胚轴质膜 H^+ -ATPase 质子转运活力的影响

●—●: 荧光猝灭 (以蛋白相对荧光猝灭率每分钟每毫克表示); △—△: ATPase 水解活力.

致谢 本文在杨福愉教授指导下完成, 特此致谢.

参考文献

- 1 Sze H. H^+ -translocating ATPases: Advances using membrane vesicles. *Ann Rev Plant Physiol*, 1985, **36**: 175~208
- 2 Briskin D P. Transport in plasma membrane vesicles-Approaches and perspective. In: Larsson C eds. *The plant plasma membrane*. Berlin: Springer-verlag. 1990, 154~181
- 3 Palmgren M G. An H^+ -ATP assay: Proton pumping and ATPase activity determined simultaneously in the same sample. *Plant Physiol*, 1990, **94** (3): 882~886
- 4 Ginnini J L, Gildensoph L H, Briskin D P. Selective production of sealed plasma membrane vesicles from red beet storage tissue. *Archives of Biochem and Biophys*, 1987, **254** (2): 621~630
- 5 Serrano R. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1989, **40**: 61~94
- 6 Hodges T K, Leonard R T, Bracker C E, et al. Purification of an ion stimulated ATPase from plant roots: Association with plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, **69** (5): 3307~

- 3311
- 7 Sperlin A S, Apanswick R M. Isolation and assay of corn root membrane vesicles with reduced proton permeability. *Biochim Biophys Acta*, 1982, **690** (2): 178~ 186
 - 8 张 莹, 冯秀香, 倪晋山 (Zhang K, Feng X X, Ni J S). 不连续蔗糖梯度离心和两相分配法纯化的小麦根细胞质膜的特性. *科学通报 (Chinese Science Bulletin)*, 1988, **14**: 1101~ 1104
 - 9 钱 晔, 刘友良 (Qian Y, Liu Y L). 盐胁迫下钙对大麦根系质膜和液胞膜功能的保护效应. *植物生理学通讯 (Plant Physiology Communications)*, 1995, **31** (2): 102~ 104
 - 10 王建华, 吴显荣 (Wang J H, Wu X R). 玉米根细胞中对钒酸盐敏感的 H^+ -ATPase. *生物化学杂志 (Chinese Biochemical Journal)*, 1995, **11** (4): 437~ 441
 - 11 Sandelius A S, Morrie D J. Plasma membrane isolation. In: Larsson C, Møller I M Eds. *The plant plasma Membrane*. Berlin: Springer-Verlag, 1990. 44~ 75
 - 12 Hodges T K, Leonard R T. Purification of a plasma membrane-adenosine triphosphatase from plant roots. *Method in Enzymology*, 1974, **32**: 392~ 396
 - 13 Maria I, Michelis D E, Spanswick R M. H^+ -pumping driven by the vanadate-sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. *Plant Physiol*, 1986, **81** (2): 542~ 547
 - 14 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72** (1): 248~ 254
 - 15 Briskin D P, Leonard R T, Hodges T K. Isolation of the plasma membrane: Membrane markers and general principles. *Methods in Enzymology*, 1987, **148**: 542~ 558
 - 16 Larsson C, Widell S, Kjellbom P. Preparation of high-purity plasma membranes. *Methods in Enzymology*, 1987, **148**: 558~ 568
 - 17 Palmgren M G, Sommarin M, Ulvskov P, *et al.* Effect of detergents on the H^+ -ATPase activity of inside-out and right-side-out plant plasma membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 1990, **1021** (2): 133~ 140
 - 18 Palmgren M G, Askerlund P, Fredrikson K, *et al.* Sealed inside-out and right-side-out plasma membrane vesicles. *Plant Physiol*, 1990, **92** (4): 871~ 880
 - 19 Briskin D P. The plasma membrane H^+ -ATPase of higher plant

cells: biochemistry and transport function. *Biochim Biophys Acta*, 1990, **1019** (2): 95~ 109

The Determination of Proton Transport by the Plasma Membrane ATPase from Soybean Hypocotyls. QIU Quan-Sheng, SU Xue-Feng (National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China).

Abstract The transport-competent plasma membrane vesicles were obtained using a modified homogenization medium by the two-phase partitioning method from soybean hypocotyls. It was noted that freeze-thaw treatment could increase the amount of inside out vesicles. Further experiments showed that the fluorescence quenching caused by adding of Mg^{2+} -ATP could be dissipated by the proton ionophore CCCP, and inhibited by the proton transport inhibitor DCCD; it was also found that the plasma membrane H^+ -ATPase specific inhibitor vanadate could quench the fluorescence completely. The fluorescence quenching was Mg^{2+} -dependent, K^+ -stimulated, with an optimum pH of 6.5. All the above results indicated that the fluorescence quenching was caused by the transport of protons by the plasma membrane H^+ -ATPase. It was also suggested that the maintaining of suitable conformation of the plasma membrane H^+ -ATPase, and the tightness of plasma membrane vesicles are the two key factors for the proton transport determination.

Key words soybean hypocotyl, plasma membrane vesicle, H^+ -ATPase, H^+ transport

《细胞凋亡》出版

主要由军事医学科学院有关研究人员编著的《细胞凋亡》一书已正式出版发行。此书是系统介绍细胞凋亡的专著。第一篇介绍细胞凋亡的概念、生物学特性和基因调控等；第二篇论述细胞凋亡与临床各系统疾病发生的相互联系；第三篇详细介绍细胞凋亡检测的各种方法，包括操作方法、试剂配制及操作注意事项；第四篇是作者近年来从事细胞凋亡研究的一部分结果，也是本书实验方法的实际应用。因而本书是一部兼重理化和实践的专著，重点突出实用性，可供从事医学和生物学领域有关的科研人员及临床医师参考。

本书为精装32开本，24万字，曾荣获省优秀图书二等奖。欲购者请与军事医学科学院二所赵卫红联系，地址：北京太平路27号二所，邮编：100850，售价：26元（包括邮资4元）。

更正

本刊1998年第6期第565页下方有三处（题目及第一行中）“细胞调亡”应为“细胞凋亡”。特此更正。谨向读者及作者致歉。