

胡杨质膜的纯化及其 H^+ -ATPase 活性的研究*

张玲¹⁾ 刘群录²⁾ 黄有国^{1)*}

(¹⁾生物大分子国家重点实验室, 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

(²⁾中国林业大学生物学院, 北京 100083)

摘要 用 Dextran T-500, PEG 3350 两相分配法分离并纯化了悬浮培养的胡杨细胞质膜。不同聚合物浓度 (5.5%、5.7%、5.9%、6.1%、6.3%、6.5%) 和 KCl 浓度 (0、5、10、15 mmol/L) 对分离效果影响的研究结果表明, 采用聚合物浓度为 5.9% 和无盐存在的两相分配体系可获得纯度较高的胡杨细胞质膜。纯化的质膜 H^+ -ATPase 的活力提高 8 倍, 且酶定向程度较高, 这为进一步研究胡杨细胞质膜特性及获得高纯度 H^+ -ATPase 提供了良好基础。

关键词 质膜, 两相分配法, H^+ -ATPase

学科分类号 Q73, Q51

大片土壤的盐碱化是一个备受关注的紧迫而现实的问题, 因而人们致力于研究植物抗盐机理以期提高作物的抗盐性获得高耐盐性植株。植物的盐胁迫主要指生长在高浓度 NaCl 环境中, Na^+ 、 Cl^- 会降低水势, 植物必需经过渗透调节才能维持膨压和正常生长。一方面 Na^+ 、 Cl^- 聚集到液泡里, 另一方面大量 Na^+ 、 Cl^- 外排, 这一过程耗能, 依赖质膜 H^+ -ATPase 功能的发挥。质膜 H^+ -ATPase 利用水解 ATP 产生的能量把质子从细胞内泵到细胞外, 产生跨膜质子梯度和膜电位。 Na^+ / H^+ 反向转运体依靠跨膜质子动力势把 Na^+ 运向细胞外, Cl^- 则顺膜电位通过离子通道外排。植物能在高盐条件下生存, 与质膜 H^+ -ATPase 的功能密切相关。

有关植物细胞质膜或包括质膜 H^+ -ATPase 在内的膜蛋白 (或膜酶) 的结构和功能与植物抗盐性的研究, 迄今仅对禾本科植物开展了研究^[1], 但进展缓慢。而对木本植物细胞膜的研究, 尚未见报道。胡杨是一种高大乔木, 也是迄今世界上少有的且主要分布于我国新疆一带的盐生植物, 对于当地的农林业生态平衡具有巨大的经济价值, 有关它的抗盐机理的研究, 无疑具有重要的理论意义和重大的实用价值。但是, 对胡杨抗盐性与生物膜的相关性的研究尚属空白。为了了解胡杨的抗盐机理, 本文以悬浮培养的胡杨细胞为对象, 分离、纯化细胞质膜, 并对其 H^+ -ATPase 进行了研究, 为进一步从分子水平上研究膜蛋白与抗盐性的相关性提供了前提条件和可行性。

1 材料与方法

1.1 试剂

Dextran T-500, Pharmacia 产品; 聚乙二醇 3350 (polyethylene glycol 3350, PEG 3350) 和 Triton X-100, Sigma 产品; 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT) 和 Tris, Promega 产品; 苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) 和 HEPES, Biomol 产品; ATP, Fluka 产品; 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecylsulfate, SDS), Biotech 产品; 聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinylpyrrolidone, PVP), BASF 进口分装; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 材料

悬浮培养的胡杨细胞由中国林业大学提供^[2]。

1.3 微粒体的制备

用 160 目的尼龙网将悬浮培养的胡杨细胞滤出, 按 1:1 (质量体积比) 加入捣碎液 [0.25 mol/L 蔗糖, 25 mmol/L Hepes, pH 7.5, 3 mmol/L EDTA, 0.1% PVP (质量体积比), 10% 甘油 (质量体积比), 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF], 用捣碎机破碎细胞。四层纱布过滤, 滤液 $10\,000 \times g$, 离心 15 min, 取上清。沉淀用捣碎液悬浮后再匀浆, $10\,000 \times g$, 离心 15 min, 取上清。合并两次上清, $80\,000 \times g$, 离

* 国家自然科学基金重点项目基金支持 (39830320, 39730130)。

** 通讯联系人。

Tel: (010) 64888518, E-mail: huang@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 1999-11-30, 修回日期: 2000-04-07

心 40 min, 取沉淀即得微粒体. 胡杨微粒体沉淀松散呈片状附着于离心管底, 弃去上清时不能倾倒, 而应用吸管小心吸去上清.

1.4 质膜的纯化

基本参照 Larsson^[3,4] 方法. 微粒体用 5 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.8) 悬浮, 取 1 g 悬浮液加到 5 g 两相体系中 [上相为 PEG 3350, 下相为 Dextran T-500, 一定浓度的 KCl, 1 mol/L 蔗糖, 200 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.8) 及双蒸水], 将两相充分混匀 (颠翻 30 ~ 40 次), 1 000 × g 离心 5 min 使其分相. 取上相体积的 90% (不要搅动中间层) 并和新鲜下相混匀, 重复上述操作两次, 得到的上相依次称为 U₁、U₂、U₃. 上相用 5 倍体积缓冲液 A (0.25 mol/L 蔗糖, 25 mmol/L Hepes, pH 7.5, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF) 稀释, 100 000 × g, 离心 45 min, 沉淀用缓冲液 A 再洗一次, 所得沉淀悬浮于缓冲液 B (0.25 mol/L 蔗糖, 25 mmol/L Hepes, pH 7.5, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF), -20 °C 保存. 所有操作均在 4 °C 进行.

1.5 H⁺-ATPase 活力的测定

参照 Briskin^[5] 和 Hsieh^[6] 方法并加以改进. 15 ~ 20 μg 膜蛋白加入反应介质 [0.25 mol/L 蔗糖, 50 mmol/L Tris-Mes, pH 6.5, 0.1 mmol/L EDTA, 0.05% Triton X-100 (视条件加或不加), 4 mmol/L MgSO₄, 50 mmol/L KCl], 在 37 °C 预保温 5 min, 加入 3 mmol/L ATP·Na 启动反应, 再继续保温 30 min, 用 10% TCA 终止反应. 离心, 取上清测定无机磷量. 为检测质膜 H⁺-ATPase 活性和线粒体膜、液泡膜、可溶性磷酸酶等的污染, 分别加入相应的抑制剂 Na₃VO₄ (100 μmol/L)、NaN₃ (1 mmol/L)、KNO₃ (50 mmol/L)、Na₂MoO₄ (80 μmol/L). 抑制剂敏感性指加入抑制剂后被抑制的 H⁺-ATPase 活力占总的 H⁺-ATPase 活力的百分比.

1.6 蛋白质含量的测定

按改进的 Bradford 法^[7], 用牛血清白蛋白 (BSA) 为标准.

2 结果与讨论

2.1 胡杨细胞的破碎

植物细胞不同于动物细胞, 细胞壁的存在对破碎细胞获得纯化质膜带来较大困难. 我们曾试过研

磨、超声、捣碎等方法破碎细胞, 并在显微镜下检测破碎效果. 发现研磨、捣碎只能使部分细胞破碎, 效果同振幅为 25% 的超声破碎相当. 当超声振幅提高到 50%、75% 时, 细胞破碎率明显提高, 但考虑到超声易使酶活力损失, 而研磨费时, 也不利于酶活力保持, 我们选择了捣碎法. 为提高产率, 第一步离心后所得沉淀悬浮并匀浆再离心, 取上清液可得到几乎同等蛋白量的膜微囊.

2.2 胡杨细胞质膜的纯化及其 H⁺-ATPase 活性

2.2.1 低聚合物浓度-无盐两相分配体系: 分离纯化质膜的方法主要有蔗糖密度梯度离心法、两相分配法和自由泳动电泳法, 其中前两种为常用方法. 蔗糖密度梯度离心法是根据膜密度的不同实现分离, 产率虽较高但纯度不高. 两相分配法是 20 世纪 80 年代发展起来的一种分离高纯度质膜的方法. 因两种亲水性多聚物 PEG 3350 和 Dextran T-500 在一定浓度范围等质量比混合后可分为两相而得名. PEG 3350 位于上相, Dextran T-500 位于下相. 不同膜微囊由于表面性质如表面电荷、亲水基团不同使在两相中的分配系数不同而达到分离. 质膜倾向于分配上相, 而其他内膜倾向于分配下相, 经过多次两相分配即可获得高纯度质膜^[3~5]. 近年来此法已广泛应用于各种植物细胞质膜的纯化, 但两相分配体系因材料不同而各异, 主要表现在多聚物浓度和盐浓度上, 一般在纯化植物细胞质膜时都采用高聚合物浓度-低盐两相分配体系或低聚合物浓度-高盐两相分离体系. 我们选择两相分配法分离纯化胡杨细胞质膜的结果如图 1 所示, 可以看出, 随聚合物浓度升高, 上相蛋白质产率迅速下降, 其中的 H⁺-ATPase 对钒酸盐 (vanadate) 敏感

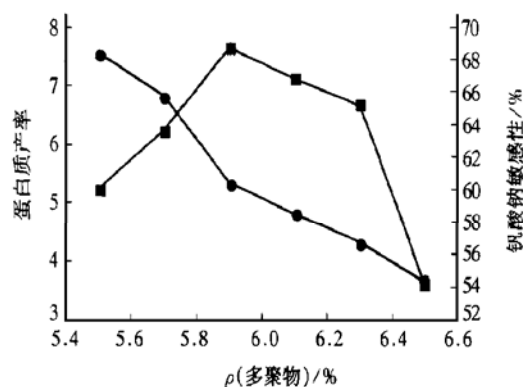


图 1 微粒体中质膜在不同多聚物浓度两相体系中的分配分离

多聚物包括相同浓度的 Dextran T-500 和 PEG 3350. 蛋白质产率指每 100 mg 微粒体所得的上相蛋白质毫克数. ●—●: 蛋白质产率; ■—■: 钒酸钠敏感性.

性先升后降, 且聚合物浓度为 5.9% 时达最大. 已知 vanadate 是质膜 ATPase 的专一性抑制剂, 上相中的 ATPase 对其敏感性越高说明该组分中的质膜微囊越纯. 当选用 5.9% 的聚合物浓度, 进一步试验盐浓度影响质膜 H^+ -ATPase 纯化的结果又表明 (图 2), 蛋白质产率随盐浓度升高迅速下降, 而

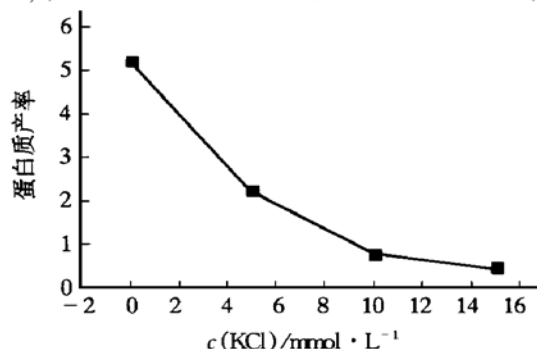


图 2 微粒体中质膜在不同 KCl 浓度两相体系中的分配分离

蛋白质产率指每 100 mg 微粒体所得的上相蛋白质毫克数.

H^+ -ATPase 对 vanadate 的敏感性在 0 mmol/L、5 mmol/L KCl 时分别为 70%、71%, 提示盐浓度主要影响蛋白质产率, 而对质膜 H^+ -ATPase 的纯度提高作用不大. 上述结果说明, 欲分离纯化胡杨细胞质膜 H^+ -ATPase, 利用低聚合物浓度 (如 5.9%) - 无盐条件下的两相体系能达到较好的效果.

已知自然界中分布的 ATPase 基本上可分为 F 型、P 型和 V 型三大类, 这三类 ATPase 的专一性

抑制剂分别是寡霉素 (oligomycin) 或 NaN_3 、 Na_3VO_4 和 Bafilomycin 或 KNO_3 (专一性较 Bafilomycin 稍差). F 型 H^+ -ATPase 分布于线粒体和叶绿体, P 型 H^+ -ATPase 主要分布在质膜上, V 型 H^+ -ATPase 在液泡膜、内质网膜、溶酶体、嗜铬颗粒和高尔基体膜上均有分布, 因此可根据 H^+ -ATPase 对各专一性抑制剂的敏感性来鉴定所纯化的膜微囊或膜蛋白的纯度^[4,8]. 测定经三次两相分配分离后从上相所得膜微囊 H^+ -ATPase 对 Na_3VO_4 、 KNO_3 、 NaN_3 和 Na_2MoO_4 等抑制剂的敏感性分别为 81.1%、7.1%、未检测出和 9.2%, 这进一步说明纯化的质膜基本上无其他内膜污染.

2.2.2 反复两相分配对纯化效果的影响: 第一次两相分配后所得的上相如进行第二次、第三次两相分配, 各种膜组分得到进一步分离, 质膜纯度进一步提高. 如表 1 结果显示, 在上述低聚合物浓度-无盐分配体系条件下经过三次两相分配, 从 100 mg 微粒体蛋白中获得了 3.8 mg 膜蛋白, 质膜 H^+ -ATPase 的比活力由 4.23 $\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{h}$ 增加到 32.63 $\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{h}$, 活力提高 8 倍, 尤其是对 vanadate 的敏感性从 20.7% 升高到 81.1%, 表明所得质膜主要富含 H^+ -ATPase. 而 Larsson 等^[3]报道的从燕麦叶子中提纯的质膜 H^+ -ATPase 对 vanadate 的敏感性仅达 50% 左右. 这说明三次两相分配对纯化具有较高酶活性的胡杨细胞质膜是必需的.

表 1 反复两相体系分配分离所得富含 H^+ -ATPase 的胡杨质膜的蛋白质产率和钒酸钠敏感性

	微粒体	两相分配分离所得上相		
		U_1	U_2	U_3
蛋白质产率/mg	100	5.4 $\pm$ 0.40	4.7 $\pm$ 0.41	3.8 $\pm$ 0.50
钒酸钠敏感性/%	20.7 $\pm$ 2.21	70.1 $\pm$ 2.21	76 $\pm$ 1.90	81.1 $\pm$ 2.69

注: 上述数据代表三次实验的平均值 $\pm$ 标准差.

2.2.3 纯化的胡杨质膜 H^+ -ATPase 的定向: 分离纯化富含某种酶分子的膜制剂. 酶分子在膜上的定向可受其分离方法或介质的影响, 因此, 确定酶在膜上的方向性是必需的. 通常测定在有、无去污剂条件下酶活性及其对专一性抑制剂的敏感性来了解酶在膜上的方向性. 实验结果表明, 在无 Triton X-100 存在下 H^+ -ATPase 的活力为有 Triton X-100 (0.05%) 时的活力的 36%, 这说明, 分离纯化的膜囊泡的封闭性较好, 大部分酶分子定向程度一致, 即基本上为正向封闭囊泡.

2.3 影响纯化的主要因素

我们曾用不连续蔗糖密度梯度离心法纯化质膜, 40% 蔗糖界面富含质膜的部分对 vanadate 的敏感性仅 50%, 且文献报道此法所得质膜对 vanadate 的敏感性最高不超过 75%, 这表明常用的蔗糖密度梯度离心法不适用于胡杨质膜的纯化. 在用两相分配法纯化胡杨质膜 H^+ -ATPase 的过程中, 发现以下主要条件对获得高活力的质膜 H^+ -ATPase 至关重要.

2.3.1 纯化条件因不同材料有较大差别: 两相分配分离的效果取决于聚合物浓度、盐浓度、上下相的体积比、温度、pH 值及上样量等, 而聚合物浓度和盐浓度是主要的影响因素, 但据材料不同又有很大差异^[3]. 为找到适合胡杨的分离体系, 我们选用了不同的聚合物浓度和盐浓度. 实验结果 (图 1 和图 2) 清楚表明, 对于胡杨质膜 H^+ -ATPase 的纯化采用低聚合物浓度-无盐的两相分配体系能达到较满意的效果, 这提示, 象高大乔木的胡杨细胞可能与一般的禾本科植物有其不同的特点, 因此在质膜纯化上的条件有较大差别, 而不是通常所用的高聚合物浓度-低盐或低聚合物浓度-高盐的两相分配体系.

2.3.2 重复两相分配操作对纯化是必需的: 影响两相分配效果的因素是多样和复杂的, 除了正确选择分配体系的组成比例外, 被纯化的蛋白质与分配体系的比例也是重要的. 因此, 如表 1 的结果所示, 重复两相分配操作对于获得较高酶活性的酶制剂是有利的.

2.3.3 PEG 3350 对测酶活的影响: 我们在实验中还发现, PEG 3350 会对定磷法测定 ATPase 活力产生严重干扰, 为确保结果的可信性, 沉淀质膜时上相需稀释 5 倍且需再洗一次, 而不是文献报道的仅稀释 2~5 倍即可.

综上实验结果, 用两相分配法分离植物质膜特别是高大乔木如胡杨质膜 H^+ -ATPase 是一种快速、简便和有效的方法, 所得质膜纯度较高, 膜囊泡封闭性好, 酶的定向程度较高. 胡杨细胞质膜 H^+ -ATPase 纯化的最适的两相分配条件是低聚合物浓度-无盐的多次两相分配体系. 有关耐盐性和非耐盐性胡杨细胞质膜 H^+ -ATPase 的结构与功能的差异是一个值得和正进一步探讨的问题.

参 考 文 献

- 1 Niu X M, Narasimhan M L, Salzman R A, *et al.* NaCl regulation of plasma membrane H^+ -ATPase gene expression in a glycophyte and a halophyte. *Plant Physiol*, 1993, **103** (3): 713 ~ 718
- 2 谷瑞升, 蒋湘宁, 郭仲琛. 胡杨离体器官发生及试管无性系的建立. *植物学报*, 1999, **41** (1): 29~33
Gu R S, Jiang X N, Guo Z C. *Acta Botanica Sinica*, 1999, **41** (1): 29~33
- 3 Larsson C, Widell S, Kjellbom P. Preparation of high-purity plasma membranes. *Methods Enzymol*, 1987, **148**: 558~568
- 4 Larsson C, Møller I M. *The plant membrane*. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg press, 1990. 44~75
- 5 Briskin D P, Leonard R T, Hodges T K. Isolation of the plasma membrane: membrane markers and general principles. *Methods Enzymol*, 1987, **148**: 542~558
- 6 Hsieh W L, Pierce W S, Sze H. Calcium-pumping ATPases in vesicles from carrot cells: stimulation by calmodulin or phosphatidylserine, and formation of a 120 kilodalton phosphoenzyme. *Plant Physiol*, 1991, **97** (4): 1535~1544
- 7 Stoscheck C M. Quantitation of protein. *Methods Enzymol*, 1990, **182**: 50~68
- 8 王延枝, 许献忠. 空泡膜类型 H^+ -ATPase 的研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 1993, **20** (1): 19~23
Wang Y Z, Xu X Z. *Prog Biochem Biophys*, 1993, **20** (1): 19 ~ 23

Study on Purification and Activity of Plasma Membrane H^+ -ATPase of *Populus euphratica*.
ZHANG Ling, LIU Qun-Lu¹⁾, HUANG You-Guo
(*National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; ¹⁾Plant Sciences College, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China*).

Abstract The plasma membrane from suspended-cultured *Populus euphratica* (PE) cells had been isolated and purified by two-phase partition composed of Dextran T-500 and PEG 3350. Effect of different concentrations of the polymer (5.5%, 5.7%, 5.9%, 6.1%, 6.3%, 6.5%) and KCl (0, 5, 10, 15 mmol/L) on the purification were examined. The results indicated that two-phase system composed of 5.9% polymer without salt resulted in plasma membrane of PE with higher H^+ -ATPase activity. The activity of the membrane H^+ -ATPase has been increased 8-fold (from 4.23 to 32.63 $\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{h}$) with better orientation and most of the membrane H^+ -ATPases are right side-out. These results may provide better basis and availability for further studies of the purified H^+ -ATPase from PE plasma membrane.

Key words plasma membrane, two-phase partition, H^+ -ATPase