

欧洲山杨液泡膜 Na^+/H^+ 反向运输体的性质鉴定*

刘晶晶²⁾ 张旭家^{1)**} 卢存福^{2)**}

⁽¹⁾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;

⁽²⁾北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要 植物液泡膜 Na^+/H^+ 反向运输体可将细胞质中的 Na^+ 转运到液泡内储存, 以减少胞内 Na^+ 的毒性. 但木本植物如杨树是否有同样的机制目前还不清楚. 以欧洲山杨的愈伤组织为材料, 捣碎破碎愈伤组织细胞, 经过差速离心和不连续蔗糖梯度离心得到纯化的欧洲山杨液泡微囊. 通过液泡 V-ATPase 建立质子梯度, 该液泡能够利用此梯度调控 Na^+ 的转运, 表明液泡膜上存在 Na^+/H^+ 反向运输体活性 (表观米氏常数 K_m 是 11.4 mmol/L). Na^+/H^+ 反向运输体的抑制剂——氨氯吡啶咪能明显抑制转运体的活性. 该 Na^+/H^+ 反向运输体也可以转运 K^+ , 但亲和能力比 Na^+ 低 30%. 该结果首次证明木本植物的液泡膜上存在 Na^+/H^+ 反向运输体. 初步功能研究表明, 愈伤组织在盐胁迫条件下, Na^+/H^+ 反向运输体活性明显下降, 提示该机制可能与山杨不耐盐有关.

关键词 欧洲山杨, Na^+/H^+ 反向运输体, V-ATPase

学科分类号 Q945.78, Q946.5

为了能够在盐生环境下生存, 植物必需保持细胞质内较低的 Na^+ 浓度, 降低 Na^+ 的毒害. 植物一方面要降低 Na^+ 的吸收, 同时还要将吸收的 Na^+ 外排或使 Na^+ 区隔化到液泡内^[1]. 通常情况下, 植物细胞通过在细胞质膜和 / 或液泡膜 Na^+/H^+ 反向运输体 (antiporter) 将细胞质中的 Na^+ 运送到细胞外或在液泡中储存. 液泡膜 Na^+/H^+ 反向运输体 (Nha) 利用液泡 V-ATPase 和 / 或 H^+ -PPase 产生的电化学势梯度使细胞质中的 Na^+ 与液泡内的 H^+ 交换, 导致 Na^+ 在液泡内聚集, 进而调节细胞内的 pH 值、细胞体积以及胞内 Na^+ 的浓度, 对植物耐盐性起重要作用^[2]. 有研究表明, 将液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白基因 AtNHX1 转化拟南芥^[3]、油菜^[4]、番茄^[5], 该基因超表达, 可以使这些植物的耐盐性明显提高.

无论盐生植物还是甜土植物, 在高盐环境下总是尽力保持胞质内较低的 Na^+ 浓度, 这就需要有质膜和液泡膜上的 Na^+/H^+ 反向运输体 (Nha) 来调节, 所以该蛋白质的功能、与植物耐盐性的关系及分子生物学的研究成为近年来研究的热点问题之一. 植物中 Na^+/H^+ 反向运输体 (Nha) 首先是在大麦质膜发现的^[6], 在众多盐生植物如盐角草^[7]、大洋洲滨藜^[8]、车前属^[9]、冰日午时花^[10]也发现了类似的 Nha, 但是木本植物中是否有 Nha 报道很少. 最近, 从耐盐

木本植物——胡杨中克隆出它的 Nha 基因 (PeNhaD1)^[11], 但其细胞定位及生理功能都不清楚. 本工作以欧洲山杨 (*P. tremula*) 的愈伤组织为材料, 首次发现木本植物愈伤组织液泡膜上存在 Nha (PtNha), 该运输体的活性随培养基盐浓度升高而降低, 提示该机制可能与山杨不耐盐有关.

1 材料与方法

1.1 材料

欧洲山杨愈伤组织为生物大分子国家重点实验室保存, 愈伤组织在固体培养基上继代培养. 固体培养基为 MS 培养基, 附加 1 mg/L 二氯苯氧乙酸 (2,4-D), 0.1 g/L 肌醇、30 g/L 蔗糖和 4.8 g/L 琼脂, pH 5.8. 每 8 天继代一次. NaCl 处理愈伤组织是将愈伤组织接种于含 NaCl 的固体培养基中培养 7 天.

1.2 方法

1.2.1 欧洲山杨愈伤组织液泡微囊的制备. 参照刘

* 国家自然科学基金重点项目 (30430430).

** 通讯联系人.

张旭家. Tel: 010-64888517, E-mail: xjzhang@sun5.ibp.ac.cn

卢存福. Tel: 010-62338346, E-mail: lucunfu@bjfu.edu.cn

收稿日期: 2007-03-14, 接受日期: 2007-04-29

群录等^[12]提取胡杨悬浮细胞液泡微囊的方法, 将愈伤组织置于预冷的组织捣碎机(Blender)中, 按1:2 (组织鲜重/g: 缓冲介质体积/ml)加入缓冲介质(30 mmol/L MES-Tris pH 8.0, 250 mmol/L 蔗糖, 5 mmol/L EDTA, 10%甘油, 500 μ L/L β -巯基乙醇, 200 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L PMSF, 0.1% BSA, 1 g PVP/100 g 组织细胞), 破碎细胞后用4层预冷纱布过滤以除去细胞碎片. 滤液经10 000 g(JA25.5)离心25 min, 以弃去管底线粒体、细胞核和大的细胞碎片. 上清液经80 000 $\times$ g(Beckman 45Ti)离心45 min, 弃去上清, 沉淀中加入重悬液(10 mmol/L MES-Tris, pH 7.5, 250 mmol/L 蔗糖, 5%甘油, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L PMSF), 然后将其铺在25%~50%不连续蔗糖密度梯度上, 经100 000g(Beckman SW40Ti)离心2 h, 收集0%~25%界面上的膜微囊, 用不含EDTA的重悬液稀释5~8倍, 160 000g(Beckman 70Ti)离心45 min. 整个过程在40℃操作. 沉淀(所纯化的液泡膜微囊)重新悬浮于不含EDTA的重悬液, 迅速放入液氮中, -80℃冰箱中保存备用.

1.2.2 蛋白质含量测定. 用Bradford试剂盒测定样品的蛋白质含量. 牛血清白蛋白为标准样品.

1.2.3 Nha活性的测定. Nha活性通过检测液泡内H⁺浓度的变化(吡啶橙荧光猝灭)来测定^[10,13]. 反应体系(500 μ L)含有10 mmol/L Mes-Tris, pH 7.5, 250 mmol/L 山梨醇, 5 μ mol/L 吡啶橙(Acridine orange), 50 mmol/L 氯化胆碱, 3 mmol/L MgSO₄, 膜蛋白40 μ g. 加入3 mmol/L Tris-ATP启动反应. 当荧光下降平稳后, 反应体系中加入Na₂SO₄启动Na⁺的转运. 测定加入Na⁺ 15 s后的初始转运速率($\Delta\%Q \cdot \text{min}^{-1}$), Nha活性大小以 $\Delta\%$ 表示. 抑制剂是在荧光下降平稳后启动Na⁺/H⁺之前加入^[13]. 荧光分光光度计(Hitachi 4500)连续测定吡啶橙的荧光猝灭. 激发和发射波长分别为495 nm和525 nm, 狭缝宽度2.5 nm, 测定温度是25℃.

2 结果与讨论

2.1 欧洲山杨液泡微囊跨膜质子梯度的建立

因为液泡膜Nha需要利用液泡膜两侧的质子梯度才能启动细胞质中的Na⁺与液泡内的H⁺交换, 从而使Na⁺在液泡内区隔化, 因此我们通过液泡V-ATPase转运质子, 建立液泡膜两侧电化学势质子梯度. 如图1所示, 系统中加入ATP后, 荧光明显猝灭, 表明囊泡中H⁺浓度升高. 为证明囊泡中H⁺

浓度的变化是由液泡V-ATPase转运质子所致, 系统中加入V-ATPase的专一性抑制剂(NO₃⁻), 可以看到没有明显的荧光淬灭(图1), 进一步证明我们所观察到的荧光淬灭即为液泡V-ATPase转运质子的结果. 另外, Gramicidin D能够消散生物膜两侧的质子梯度, 可以看到, 荧光下降到最低并平稳后, 系统中加入Gramicidin D, 荧光迅速回到起始状态, 表明液泡内的H⁺通过Gramicidin D扩散到液泡外, 液泡内外H⁺浓度一致, 该结果证明ATP引起的荧光淬灭是由V-ATPase转运质子引起, 而非液泡泄漏, 说明我们纯化的液泡有很好的封闭性.

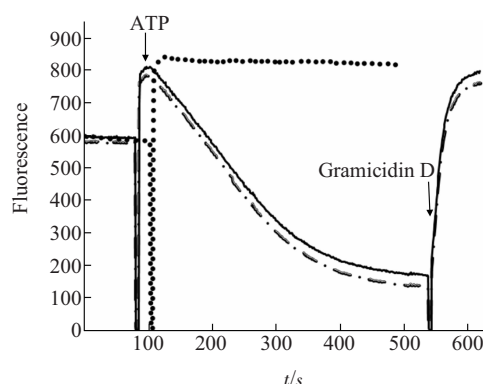


Fig. 1 V-ATPase dependent pH gradient formation in vacuolar membrane vesicles isolated from *P. tremula*

Reactions were performed as described in "Materials and methods". The reaction medium (500 μ L) contained 10 mmol/L Mes-Tris, pH 7.5, 250 mmol/L sorbitol, 5 μ mol/L Acridine orange, 50 mmol/L choline chloride, 3 mmol/L MgSO₄, membrane protein, in the presence (—) or absence (— · —) of 0.4 mM vanadate or 50 mM nitrate(···). The reaction was started by addition of the 3 mmol/L Tris-ATP. — : Na₃VO₄; — · — : CK; ··· : +KNO₃.

2.2 欧洲山杨液泡微囊上Nha活性的测定

在上面实验的基础上, 研究Na⁺对液泡膜两侧质子梯度的影响. 用ATP启动液泡V-ATPase, 导致荧光猝灭, 在荧光猝灭到最大且稳定后, 系统中加入不同浓度的Na⁺, 可以看到荧光得到恢复, 并且恢复程度与Na⁺浓度成正比(图2). 该结果表明液泡内H⁺的外排与液泡外Na⁺相关, 说明我们纯化的液泡有Nha活性. 另外, 酶动力学分析表明, 荧光恢复的初始速率(Na⁺加入后15 s)与Na⁺浓度呈饱和动力学曲线, 符合米氏方程.

利用Hanes-Woolf 方程做图可以得到欧洲山杨液泡膜上Nha的表观米氏常数K_m是11.4 mmol/L, V_{max}为200% Q/(min · mg⁻¹) (图2), 该值与甜菜

($K_m=16.2 \text{ mmol/L}$)^[14]和水稻($K_m=10.0 \text{ mmol/L}$)^[15]液泡膜Nha相一致。

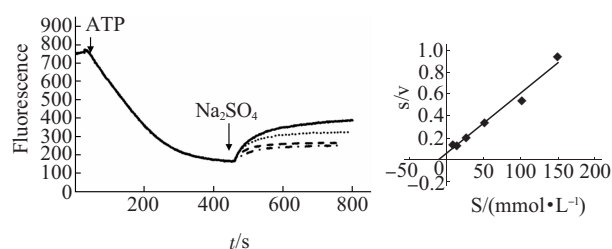


Fig. 2 Dissipation of the ATPase-dependent pH gradient as a function of Na_2SO_4 concentration in vacuolar membrane vesicles isolated from *P. tremula*

ΔpH was formed in vesicles as described in Figure 1. When the ΔpH reached steady, it was dissipated by the addition of a range of Na_2SO_4 concentrations from 8~100 mmol/L. Traces were aligned at the point of addition of Na_2SO_4 . The initial rates of dissipation were determined as described in “Materials and methods”. Inset: The Hanes-Woolf plot of $[S]/V$ vs $[S]$. —: +50 mmol/L Na_2SO_4 ; - - -: +8 mmol/L Na_2SO_4 ; - · - ·: +12.5 mmol/L Na_2SO_4 ; ···: +25 mmol/L Na_2SO_4 .

2.3 氨氯吡啶抑制PtNha活性

为进一步证明欧洲山杨液泡膜存在Nha, 研究了有Nha抑制剂存在下, Na^+ 对液泡膜两侧质子梯度的影响. 已有报道, 由于Nha存在氨氯吡啶的结合位点, 因此, 氨氯吡啶(Amiloride)及其类似物作为Nha的竞争性抑制剂广泛用于该运输体的性

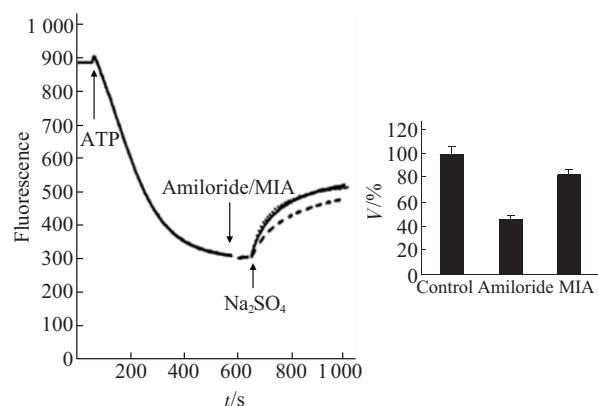


Fig. 3 Effect of PtNha inhibitors on dissipation of the ATPase-dependent pH gradient in vacuolar membrane vesicles isolated from *P. tremula*

ΔpH was formed in vesicles as described in Figure 1. When the ΔpH reached steady, it was dissipated by the addition of 50 mmol/L Na_2SO_4 after addition of 0.5 mmol/L amiloride/50 $\mu\text{mol/L}$ MIA. —: +Amiloride; - - -: +MIA; ···: CK.

质研究^[15]. 研究表明, 氨氯吡啶抑制冰日午时花^[10]、甜菜^[14]等液泡膜Nha活性, 而盐角草液泡膜Nha活性则受到氨氯吡啶类似物——异丁基氨氯吡啶(MIA)的抑制^[7]. 图3为在Nha的抑制剂——氨氯吡啶和异丁基氨氯吡啶存在下, Na^+ 对欧洲山杨液泡膜两侧质子梯度的影响. 结果发现, 0.5 mmol氨氯吡啶抑制约50% Nha的活性(在氨氯吡啶存在下, Na^+ 导致的质子荧光恢复受到明显抑制), 表明欧洲山杨液泡膜存在Nha. 但是异丁基氨氯吡啶对PtNha影响很小, 说明PtNha更有利与Amiloride结合, 这与冰日午时花、大麦等液泡膜Nha相似.

2.4 PtNha 的离子选择性

甜菜液泡Nha以相同的速率转运 Na^+ 和 K^+ ^[16], 表明其Nha对 Na^+ 和 K^+ 没有选择性. 但最近的研究结果显示, 盐角草液泡膜Nha只能特异性运输 Na^+ ^[7], 不能运输 K^+ , 说明Nha对 Na^+ 和 K^+ 的选择性有物种特异性. 为此, 我们研究了PtNha对 Na^+ 和 K^+ 的选择特性(图4). 结果表明, PtNha可以转运 Na^+ 和 K^+ , 初始转运速率分别为 160% $\text{Q}/(\text{min} \cdot \text{mg}^{-1})$ 和 117% $\text{Q}/(\text{min} \cdot \text{mg}^{-1})$. 可以看出欧洲山杨PtNha对 Na^+ 表现出相对较高的亲和力, 转运的初速率比转运 K^+ 快约30%.

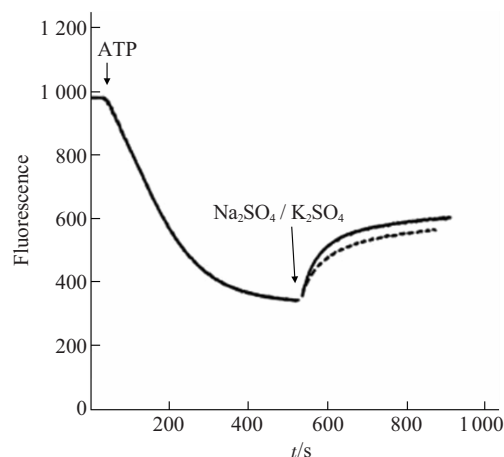


Fig. 4 Different affinity of PtNha for Na^+ and K^+

Experimental conditions were as in Figure 2 except K_2SO_4 (50 mmol/L) or Na_2SO_4 (50 mmol/L) was used. —: + Na_2SO_4 ; - - -: + K_2SO_4 .

2.5 盐胁迫对PtNha活性的影响

Nha表达有组成型和诱导型, 如冰日午时花和甜菜中的Nha是组成型表达^[10, 16], 但在车前属、大麦根部只有在盐诱导后才能检测到Nha的活性, 属

于诱导型^[16, 17]。由于PtNha在正常生长情况下就有活性, 因此其应为组成型表达。

为了研究 PtNha在欧洲山杨受到盐胁迫中的作用, 将欧洲山杨的愈伤组织接种在含 50 mmol/L、100 mmol/L 和 150 mmol/L NaCl 培养基中, 纯化液泡膜后, 研究 PtNha 活性与培养基盐浓度的关系 (表 1)。愈伤组织接种至含 NaCl 的培养基 7 天后, 褐化现象随着盐浓度的增加而逐渐严重, 100 mmol/L、150 mmol/L NaCl 条件下愈伤组织细胞几乎已经停止增殖。NaCl 处理后, PtNha 的 K_m 随着 NaCl 浓度的增加而增大, V_{max} 随着 NaCl 浓度的增加而减小, 说明 NaCl 处理可以降低 PtNha 对 Na^+ 的亲和力, 其原因可能是由于在盐处理下, PtNha 表达量下降或活性受到抑制, 也可能是两者兼有, 这方面的工作需要进一步研究, 相关工作正在进行中。另外, 考虑到欧洲山杨本身耐盐性比较弱, 盐处理后 PtNha 活性下降, 而盐生植物冰日午时花经盐处理后, 液泡膜上 Na^+/H^+ 反向运输体 V_{max} 是对照的 2.1 倍^[10], 盐角草高盐处理后 ($K_m=3.8$ mmol/L) 液泡膜上 Na^+/H^+ 反向运输体对 Na^+ 的亲和力是低盐处理 ($K_m=11.5$ mmol/L) 的 3 倍多^[7], 这可能预示着 Na^+/H^+ 反向运输体在植物耐盐过程中发挥重要作用。

Table 1 K_m and V_{max} of the Na^+/H^+ antiporter of the *P. tremula*

	Control	50 mmol/L NaCl	100 mmol/L NaCl	150 mmol/L NaCl
K_m /mmol/L	11.4	23.0	27.0	30.5
V_{max} /%Q/(min·mg ⁻¹)	200	185	177	169

Na_2SO_4 -induced dissipation of ΔpH in vacuolar membrane vesicles isolated from *P. tremula* grown in 50, 100, 150 mmol/L NaCl. Reactions were performed as described in Figure 2. The initial rates were measured, and were transformed using a Hanes-Woolf plot to determine kinetic parameters.

综合上述实验结果, 欧洲山杨液泡膜上存在 Nha, 它可以使液泡膜外的 Na^+ 和 K^+ 与 H^+ 逆向交换, 但对 Na^+ 的亲和力更高。Amiloride 可以抑制 PtNha 的转运活性, MIA 的抑制作用不明显。由于欧洲山杨的耐盐性不高, 所以, 盐处理会降低 PtNha 的转运活性, 也说明了 PtNha 在植物抗盐性方面有一定的作用。

参 考 文 献

- Pandan E, Venturi M, Gerchan Y, et al. Na^+/H^+ antiporter. Biochim Biophys Acta, 2001, **1505** (1): 144~157
- Hamada A, Hibino T, Nakamura T, et al. Na^+/H^+ antiporter from *Synechocystis species* PCC 6803, homologous to SOS1, contains an aspartic residue and long C-terminal tail important for the carrier activity. Plant Physiology, 2001, **125** (1): 437~446
- Apse M P, Aharon G S, Snedden W A, et al. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in *Arabidopsis*. Science, 1999, **285** (5431): 1256~1258
- Zhang H X, Hodson J N, Williams J P, et al. Engineering salt-tolerant Brassica plants: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, **98** (22): 12832~12836
- Zhang H X, Blumwald E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. Nature Biotechnology, 2001, **19** (8): 765~768.
- Ratner A, Jacoby B. Effect of K^+ its counter anion and pH on sodium efflux from barley roots. J Exp Botany, 1976, **27** (5): 843~852
- Parks G E, Dietrich M A, Schumaker K S. Increased vacuolar Na^+/H^+ exchange activity in *Salicornia bigelovii* Torr. in response to NaCl. Journal of Experimental Botany, 2002, **53** (6): 1055~1065
- Hamada A, Shono M, Xia, et al. Isolation and characterization of a Na^+/H^+ antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelini*. Plant Molecular Biology, 2001, **46** (1): 35~42
- Staal M, Maathuis F J M, Elzenga T M, et al. Na^+/H^+ antiporters activity of the salt-tolerant *Plantago maritima* and the salt-sensitive *Plantago media*. Physiol Plant, 1991, **82** (2): 179~184
- Barkla B J, Zingarelli L, Blumwald E, et al. Tonoplast Na^+/H^+ antiport activity and its energization by the vacuolar H^+ -ATPase in the halophytic plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. Plant Physiol, 1995, **109** (2): 549~556
- Ottow E A, Polle A, Brosche M, et al. Molecular characterization of the NhaD Na^+/H^+ antiporter family of plant origin, PeNhaD1: the first member. Plant Molecular Biology, 2005, **58** (1): 75~88
- Ma T, Liu Q, Li Z, et al. Tonoplast H^+ -ATPase in response to salt stress in *Populus euphratica* cell suspensions. Plant Science, 2002, **163** (3): 499~505
- Qiu Q S, Barkla B J, Vera-Estrella R, et al. Na^+/H^+ exchange activity in the plasma membrane of *Arabidopsis*. Plant Physiology, 2003, **132** (2): 1041~1052
- Blumwald E, Edward J, Cragoe J R, et al. Inhibition of Na^+/H^+ antiport activity in *Sugar Beet* tonoplast by analogs of amiloride. Plant Physiol, 1987, **85** (1): 30~33
- Fukuda A, Yazaki Y, Ishikawa T, et al. Na^+/H^+ antiporter in tonoplast vesicles from rice roots. Plant Cell Physiol, 1998, **39** (2): 196~201
- Blumwald E, Pool R J. Na^+/H^+ antiporter in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris*. Plant Physiology, 1985, **78** (1): 163~167
- Garbaino J, Dupont F M. Rapid induction of Na^+/H^+ exchanger activity in barley root tonoplast. Plant Physiol, 1989, **89** (1): 1~4

Characterization of The Na^+/H^+ Antiporter in Tonoplast Vesicles From *Populus tremula*. calli*

LIU Jing-Jing²⁾, ZHANG Xu-Jia^{1)**}, LU Cun-Fu^{2)**}

⁽¹⁾ National Laboratory of Biomacromolecule, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁽²⁾ College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forest University, Beijing 100083, China)

Abstract The Na^+/H^+ antiporter in vacuolar membranes transports Na^+ from the cytoplasm to vacuoles using a pH gradient generated by proton pumps, which could reduce Na^+ toxicity. It is uncertain that whether the woody plants have the same mechanism. Through differential centrifugation and sucrose density gradient centrifugation, tonoplast vesicles were isolated from *Populus tremula* calli broken by blender. After establishing pH gradient by V-ATPase, Na^+ could dissipate the pH gradient, which indicates that there is Na^+/H^+ antiporter in the tonoplast vesicles from *Populus tremula* calli ($K_m=11.4$ mmol/L). Amiloride could inhibit the Na^+/H^+ antiporter activity. The antiporter could transport Na^+ and K^+ , the affinity for Na^+ is higher. Salt stress decreased K_m and $V_{\max}$.

Key words *Populus tremula* calli, Na^+/H^+ antiporter, V-ATPase

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30130190).

** Corresponding author.

ZHANG Xu-Jia. Tel: 86-10-64888517, E-mail: xjzhang@sun5.ibp.ac.cn

LU Cun-Fu. Tel: 86-10-62338346, E-mail: lucunfu@bjfu.edu.cn

Received: March 14, 2007 Accepted: April 29, 2007