

35-40

第20卷 第1期
1992年2月西北农业大学学报
Acta Univ. Agric. Boreali-occidentalisVol.20 No.1
Feb. 1992

两相分配法纯化受旱小麦 绿色组织质膜的研究¹⁾

李黎明²⁾王韶唐¹⁾

(西北农业大学基础部, 陕西杨陵·712100)

S512.101

摘 要 通过研究氯化钠和多聚物浓度对质膜和各种内膜在 PEG / Dextran 两相系统中分配行为的影响, 根据其影响膜在两相系统中分配系数的试验结果, 应用两相分配纯化法, 纯化生长正常和受旱条件下小麦绿色组织质膜, 对匀浆介质稍加修改, 加入 5 mmol / L ZnCl₂, 结果在较短的时间得到了两种小麦绿色组织细胞质膜的富集组分。

关键词 两相分配纯化法, 质膜纯化, 内膜, 水分胁迫 两相分配法, 小麦
中图分类号 Q242

植物细胞质膜是原生质体最外层的界面膜, 其组成和结构虽已基本清楚, 但对其许多生理生化特性和基本功能, 特别是与抗逆性的关系尚未明确。其中一个重要的原因是, 难以得到污染少、纯度高的质膜组分。以前质膜分离纯化多用差级离心和密度梯度离心等方法, 这些方法不但费时、费工, 且污染率高, 不适用于绿色组织。近年来, 国内外已开始试用两相分配法分离纯化绿色组织细胞质膜^[1-2], 但资料较少; 特别是将该法用于抗旱方面的研究工作还未见到报道。本文试用两相分配法, 分离纯化正常和缺水条件下生长的小麦幼苗绿色组织细胞质膜, 一方面为分离纯化绿色植物组织质膜提供简便有效的方法, 另一方面试图为植物抗旱机理的研究提供新的方法和资料。

1 材料和方法

1.1 材料培养及胁迫处理

将由西北农业大学农学系提供的小麦品种郑引一号, 用 Hoagland 营养液进行室内培养, 光照强度 8000~10000 lx, 光照时间 14 h / d, 温度 15~20℃。待第三叶完全展开后(苗龄 23 d), 用 PEG 配成-0.9 和-1.9 MPa 的培养液, 将幼苗根系进行渗透胁迫处理 3 d, 对照继续用营养液培养。用全部叶片进行各项目的测定。

1.2 原生质膜的分离和纯化

1.2.1 匀浆和离心 将供试叶片洗净, 吸干表面水分, 置于 4℃ 冰箱中预冷 0.5 h, 切成小段, 按鲜样: 匀浆液 = 1: 3 的比例加入预冷的匀浆液, 其组成为: 0.25 mol / L 蔗糖, 10 mmol / L Tris-HCl(pH7.5), 10 mmol / L KOH 中和的乙二醇双乙胺醚-N-N'-四乙酸(EGTA), 2.5 mmol / L 偏亚硫酸钾, 0.01% 牛血清白蛋白,

文稿收到日期: 1991-06-26

1) 国家自然科学基金资助项目; 2) 现在陕西省烟草公司工作。

3% 聚乙烯吡咯烷酮、5 mmol/L 氯化锌。在 ZK 型高速自控组织匀浆器中匀浆 60 s, 然后用 4 层预冷的纱布过滤, 滤液在 4℃ 下依下列次序离心: $1\,400 \times g$ 10, $15\,000 \times g$ 20, $130\,000 \times g$ 20 min, 最后一级离心的沉淀即原微粒体组分, 用 0.5 mmol/L 的山梨糖、15 mmol/L Tris-马来酸(pH7.4)悬浮液小心悬浮, 用于进一步纯化。

1.2.2 质膜纯化 取 6.0 g 两相体系, 加入 0.5 mL 原微粒体组分, 使其最终浓度为: 0.5 mol/L 山梨糖, 15 mmol/L Tris-马来酸(pH7.4), PEG 6000 / Dextran T500 浓度为要求的 5.6%, 6.1%, 6.6%; NaCl 浓度为要求的 10, 20, 30, 40 和 50 mmol/L。将装有上述混合物的试管上下颠倒 20 次, 然后于 4 000 r/min 离心机上离心 4 min, 置于 4℃ 冰箱 30 min, 小心吸取 90% 的上相(PEG 相), 用悬浮液分别稀释上相和下相(Dextran 相和界面部分), 于 $130\,000 \times g$ 离心 30 min, 沉淀悬浮后用于测定, 所得上相悬浮组分即为质膜富集组分。根据研究要求, 上相质膜组分可加入新的下相, 再进行 1~2 次纯化。

1.3 测定项目及方法

1.3.1 K^+-Mg^{2+} -ATP 酶(质膜标记酶) 参照 Sze 的方法^[3], 最终反应体系含 Triton-x-100 0.05%, 加入 μ L 样品后于 30℃ 保温 30 min, 用 12.5% 三氯乙酸溶液终止反应, 3000 r/min 下离心 10 min, 上清液用以测磷, 结果用 nmol Pi · mg⁻¹ · 蛋白 · h⁻¹ 表示。

1.3.2 细胞色素 C 氧化酶(线粒体标记酶) 参照 Simon 的方法^[4], 将样品与反应液混合, 25℃ 保温 5 min, 加入用连二亚硫酸钠还原的细胞色素 C 后, 反应开始, 每 30 s 记录一次光密度值(550nm), 共 6 min, 用每分钟每毫克蛋白使还原型细胞色素 C 减少的量来表示酶活力大小。读数完毕, 加入少量固体高铁氰化铁, 用作空白。最终反应混合液组成为: 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.4), 500 μ mol/L EDTA, 0.1% Triton-x-100, 1.3×10^{-5} mol/L 还原型细胞色素 C。

1.3.3 对抗霉素 A 不敏感, 依赖 NADH 的细胞色素 C 还原酶(内织网标记酶) 参照 Boss 的方法^[5], 将样液加入反应混合液, 使其最终浓度为: 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.4), 2.5 mmol/L NaN₃, 1 μ mol/L 抗霉素 A, 2×10^{-5} mol/L 细胞色素 C。于 25℃ 保温 5 min, 加入 NADH, 使反应浓度为 0.25 mmol/L, 反应即开始, 在 550nm 波长下, 每 30 s 记一次光密度值, 连续 6 min, 酶活力用 nmol · mg⁻¹ 蛋白 · min⁻¹ 来表示。

1.3.4 过氧化氢酶(过氧化物酶体标记) 用瓦氏呼吸计测定。反应瓶中加入 0.6 mL 50 mmol/L 磷酸缓冲液, 中央小管加入 0.1 mL 20% KOH, 侧管加入 0.3 mL 13% H₂O₂, 进样 25 μ L, 用煮沸的酶液作对照。酶活力用 μ L · O₂ · mg⁻¹ 蛋白 · min⁻¹ 表示。

1.3.5 酸性磷酸酶(液泡膜标记) 用 β -甘油磷酸钠作反应底物, 测定酶作用后释放出的无机磷量, 结果用 nmol P_i · mg⁻¹ 蛋白 · h⁻¹ 表示。

1.3.6 叶绿素含量测定(叶绿体标记) 用 80% 丙酮提取叶绿素, 测定 652 nm 波长处的光密度值, 用 mg 叶绿素 · mg⁻¹ 蛋白表示。

1.3.7 膜蛋白测定 用改良 Lowry 法测定^[6]。A 试剂中加入 1% 的十二烷基硫酸钠(SDS), 以溶解膜蛋白和脂蛋白。用牛血清白蛋白作标准曲线。

2 结果

2.1 分相系统中多聚物浓度和盐浓度对膜分配行为的影响

2.1.1 多聚物浓度的影响 两相系统中的多聚物浓度对原微粒体膜分配行为影响较大(图1),随多聚物浓度增加,各种内膜和质膜标记物在上相中的分配率都程度不同

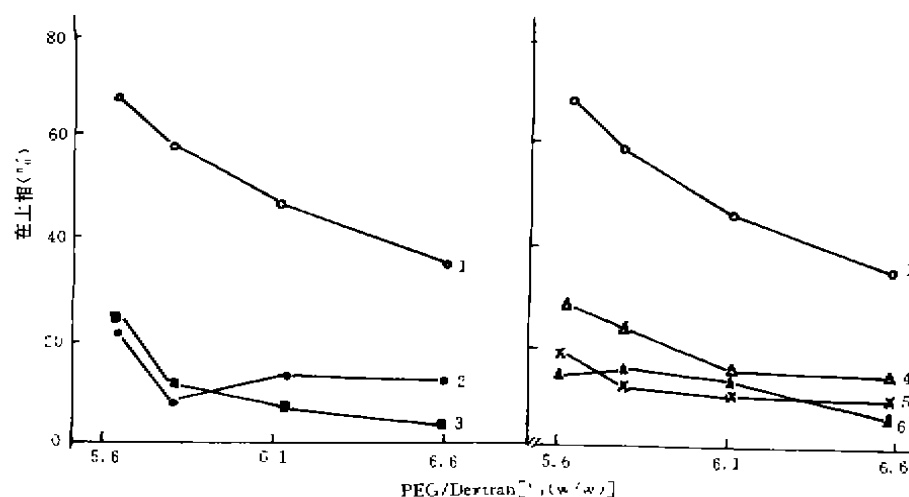


图1 多聚物浓度对膜分相行为的影响

1. K^+-Mg^{2+} -ATP酶, 2. NADH 细胞色素 C 还原酶, 3. 叶绿素; 4. 过氧化氢酶; 5. 酸性磷酸酶; 6. 细胞色素 C 氧化酶
分相系统组成: 0.5 mol/L 山梨糖; 15 mmol/L Tris-马来酸(pH 7.4); NaCl 30 mmol/L

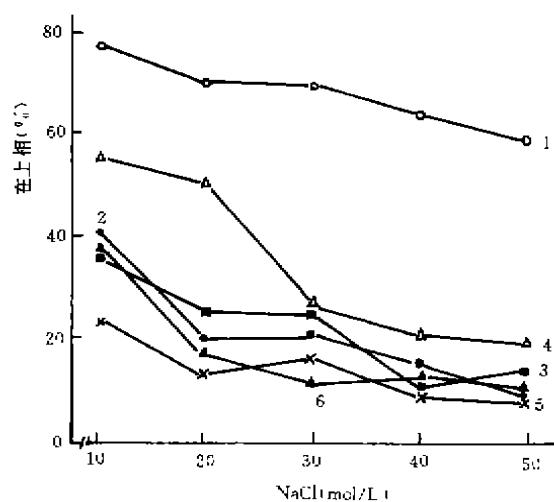


图2 氯化钠对分相的影响

分相系统组成: 0.5 mol/L 山梨糖; 15 mmol/L Tris-马来酸(pH 7.4); PEG / Dextran 5.6% (W/W)

地降低,以质膜和叶绿体标记下降值为最大,分别为 32% 的 20%; 过氧化氢酶下降值为 13%; 液泡及内织网标记略有下降。可见高浓度的多聚物分相系统对质膜的纯化不利,但适当高的浓度对除去叶绿体是有利的。

2.1.2 盐浓度的影响 分相体系中加入 NaCl 可明显改变膜的分配行为(图2)。在多聚物浓度为 5.6% 的分相系统中,当 NaCl 浓度以 10 mmol/L 增加到 50 mmol/L 时,各种膜标记在上相分配率都程度不同地降低。线粒体、叶绿体、内织网及过氧化物酶体等内膜标记上相分配率下降最小的为 25%,最大为 35%; 液泡标记酶与质膜标记酶下降幅度较小,为 18%。可见高浓度的 NaCl 可

以使大部分内膜组分优先进入下相, 减少对上相质膜组分的污染。这一结果和文献〔2〕的报道相一致。

2.2 上相组分 ATP 酶的性质

植物细胞中存在有 3 种类型的 ATP 酶: 质膜 ATP 酶、线粒体 ATP 酶和液泡膜 ATP 酶, 它们都与相应的细胞器相联系, 均可水解 ATP 释放出无机磷。为证实与上相 K^+-Mg^{2+} -ATP 酶联系的膜组分确是质膜富集组分, 必须用各种酶的专一性抑制剂来鉴定。 NO_3^- 是液泡膜 ATP 酶的专一性抑制剂, 只能抑制上相组分 10% 的 ATP 酶活性, 表明上相组分有少量的液泡膜污染; NaN_3 是线粒体 ATP 酶专一性抑制剂, 对上相 ATP 酶抑制很少(14%), 表明有少量线粒体污染(表 1); 己稀雌酚(DES)和 Na_3VO_4 显著抑制质膜 ATP 酶, 40 mmol/L DES 或 50 μ mol/L 的 Na_3VO_4 可使上相 ATP 酶受到半量抑制(50%), 证明上相 ATP 酶确是与质膜联系的。

表 1 抑制剂对上相组分 K^+-Mg^{2+} -ATP 酶活性的影响

抑 制 剂	K^+-Mg^{2+} -ATP 酶活性 (nmol Pi · mg ⁻¹ 蛋白 · h ⁻¹)	占 CK 酶的活性百分比(%)
CK(无抑制剂)	26	100
5 mmol/L NO_3^-	23	90
2.5 mmol/L NaN_3	22	86
50 μ mol/L Na_3VO_4	11	42
40 μ mol/L DES	14	54

2.3 ATP 酶在质膜囊泡上的定位

在匀浆时破裂的植物细胞质膜碎片, 由于内聚力的作用可自发形成小囊泡。质膜 ATP 酶是一种内在膜蛋白, 在完整的细胞中, 定位于质膜内侧, 靠近细胞质。匀浆形成的囊泡可以是外侧向外型, 也可以是内侧向外型, 通过潜在 ATP 酶活性可以确定囊泡类型和 ATP 酶在膜上的定位。给试样中加入去污剂 Triton-x-100, 破坏膜的脂双层而释放出内层蛋白质, ATP 酶活性从不加去污剂的 47 猛增到 269 nmol Pi · mg⁻¹ 蛋白 · h⁻¹, 潜在 ATP 酶活力从 0 增到 83%(表 2), 表明上相质膜囊泡是外侧向外型, ATP 酶定位于囊泡内侧, 和文献〔7〕报道结果一致。不加去污剂时, 仍有少量酶活性表现, 这可能是部分囊泡破损所致。从表 2 还可以看出, 测定质膜 ATP 酶活性时, 必须加入合适浓度的去污剂, 过低, 酶活性表现不完全, 过高, 则对酶活性有抑制。

表 2 Triton-x-100 对 K^+-Mg^{2+} -ATP 酶活性的影响

Triton 浓度(%)	ATP 酶活力 (nmol Pi · mg ⁻¹ 蛋白 · h ⁻¹)	潜在 ATP 酶活力(%)
0	47	0
0.025	73	36
0.05	269	83
0.10	145	68

注: 潜在 ATP 酶活力 = (加 Triton 酶活力 - 无 Triton 酶活力) / 加 Triton 酶活力 × 100%

2.4 两相分配法纯化在小麦绿色组织质膜中的应用

植物受旱时细胞膜透性增强, 细胞内物质向外渗漏, 显然是由于质膜成份或结构受到损坏, 但缺乏足够的实验证据。利用分离提纯的质膜进行研究, 有助于解决这一问题。两相分配系统可否分离纯化受旱植物细胞质膜须用实验来证实。选用经-0.9MPa和-1.9MPa PEG 培养液处理 3 d 的小麦幼苗叶片, 按前述的方法用两相分配法分离纯化质膜并加以鉴定, 结果如表 3 所示。

表 3 渗透胁迫对小麦叶片膜系统上相中分配率的影响

处 理	K ⁺ -Mg ²⁺ -ATP 酶	细胞色素 C		酸性磷酸酶	过氧化氢酶	叶绿素
		氧化酶	还原酶 ¹⁾			
CK(对照)	58.9	17.6	8.7	10.5	23.1	10.0
-0.9MPa · 3 d	55.4	15.3	12.6 ²⁾	9.8	12.7 ²⁾	7.0
-1.9MPa · 3 d	50.5	20.0	19.0 ²⁾	12.9	11.3 ²⁾	5.6 ²⁾

注: 1) 为对抗霉素A不敏感, 依赖NADH的细胞色素C还原酶; 2) 2次重复, 4次测定, $P < 0.05$; 3) 分相系统组成: PEG/Dextran 5.8%, 30 mmol/L NaCl, 0.5 mol/L 山梨糖, 15 mmol/L Tris-马来酸(pH7.4)

从表 3 中可以看出, 受胁迫材料线粒体和液泡膜标记酶在上相分配率变化不显著; 随胁迫程度的增加, 内织网标记酶上相分配率增大, 过氧化物酶体和叶绿体标记则呈相反的变化, 质膜也有下降的趋势, 但差异不显著。尽管各种内膜在两相体系中的分配行为都程度不同地有所变化, 但质膜在上相中仍占绝对优势。

3 讨论和结论

1980年, Widehl 成功地把两相分配纯化法引入植物研究^[8], 得到了低污染的燕麦根质膜组分。用 Widehl 的分相系统纯化绿色植物组织细胞质膜, 却因在上相发现大量的叶绿体、线粒体等内膜, 未能得到质膜富集上相。1983年, Uernura 和 Yoshida 等改进匀浆介质配方和分相系统组成^[2], 从黑麦绿色组织得到了理想的质膜组分。可见匀浆介质配方和分相系统组成对膜分相行为的影响极大。本文用两相分配法纯化受旱条件下小麦绿色组织细胞质膜, 对匀浆介质稍加修改, 加入 5 mmol/L ZnCl₂, 以稳定质膜, 防止膜脂过氧化, 并加速内膜的聚集和沉淀。用修改后的匀浆液匀浆, 可以缩短离心所用的时间, 加快了分离纯化速度。在影响分相体系分配系数的很多因素中, 以多聚物浓度和盐浓度影响最大。NaCl 对 PEG 和 Dextran 具有不同的亲合力, 可使上下两相间产生电势差, 从而对其中带电颗粒产生一定的影响, 使质膜和内膜的分相行为改变。

初步的试验结果表明, 所用的匀浆液配方和分相系统也适合于水分胁迫条件下生长的小麦绿色组织, 并可以得到质膜富集的上相。但随干旱程度的增加, 各种膜在两相中的分配系数都程度不同的有所变化, 这究竟是单纯受水分胁迫影响, 膜组分、结构变化所致, 还是在分离过程中受其它因素影响所致, 尚有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 1 王育东, 阎龙飞. 用两相分配分离法对蚕豆叶和花粉管质膜的分离. 植物学报, 1989; 31 (6): 432~440
- 2 Matsuo Uemura, Shizuo Yoshida. Isolation and identification of plasma membrane from light-grown winter rye seedling. *Plant Physiol*, 1983; 73:586~597
- 3 Sze H. H^+ -translocating ATPase: advances using membrane vesicle. *Ann Rev Plant Physiol*, 1980;247~297
- 4 Simon E W. Phospholipids and plant membrane permeability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1958; 77:5 904~5 908
- 5 Boss W F, Ruesink A W. Isolation and characteristic of concanavalin A-labeled plasma membrane from carrot protoplast. *Plant Physiol*, 1979; 64:1 005~1011
- 6 Mary A K, Markell M H, Bieber L L. A modification of the lower procedure to simplify determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*, 1978, 87; 206~210
- 7 Lean E K, Kjellbom P, Lasson C. Surface properties of rightside plasma membrane vesicles isolated from barley roots and leaves. *Plant Physiol*, 1985; 79:72~79
- 8 Widell S, Lasson C. Separation of presumptive plasma membrane from mitochondria by partition in an aqueous polymer two-phase system. *Physiol Plant*, 1980; 51:68~74

Studies on Purification of Plasma Membrane from Green Leaves of Wheat Under Water Stress by Two-Phase Partition

Li Liming Wang Shaotang

(Department of Basic Course Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi, 712100)

Abstract The effects of sodium and polymer concentration on the partition behaviour of plasma membrane and various inner-membrane in two-phase system of PEG/extran were studied. Based on the experimental results of its distribution coefficient in two-phase system of affected membrane, the purification method of two-phase system was used to purify the green plasma membrane of wheat growing in normal and arid conditions. 5 mmol/L NaCl was added to modify the plasma medium. As a result, rich components of cell membrane of green tissues of wheat were obtained within the shortest possible time.

Key words two-phase partition purification method, plasma membrane, inner-membrane, water stress