

41-45

第25卷 第3期
1997年6月西北农业大学学报
Acta Univ. Agric. Boreali-occidentalisVol. 25 No. 3
Jun. 1997

渗透胁迫下小麦根质膜 Ca^{2+} -ATPase 活性及动力学

吕金印¹ 高俊凤² 曹翠玲²

(1 西北农业大学实验中心, 2 基础科学系, 陕西杨陵 712100)

摘 要 在渗透势为-0.5和-1.0 MPa的PEG溶液胁迫下, 小麦抗旱品种陕合6号根质膜(PM) Ca^{2+} -ATPase活性分别增加59%和25%, 水分敏感品种郑引1号该酶活性是先略降5%而后增加43%。8 mmol/L EGTA能明显抑制PM Ca^{2+} -ATPase活性, 陕合6号抑制率为43%~77%, 郑引1号为46%~56%, 其中两品种在PEG胁迫以后, EGTA的抑制率减小。经对 Ca^{2+} -ATPase的动力学分析表明, 随着胁迫强度的增加, 陕合6号 K_m 值分别下降46%和22%, V_{max} 虽略有增加, 但变化不大。郑引1号 K_m 值分别下降75%和82%, V_{max} 约降低到对照的1/3。

关键词 渗透胁迫, 质膜 Ca^{2+} -ATPase, 冬小麦

中图分类号 Q945.12, Q946.5, S512.101

自从利用蔗糖梯度离心分离技术证明原生质膜制剂存在ATPase活性后, 关于质膜(PM)ATPase的研究一直受到人们的重视^[1,2]。目前对于质膜上研究比较清楚的是以100 kD催化亚基二聚体形式存在的 H^{+} -ATPase和以140 kD多肽存在的 Ca^{2+} -ATPase^[3~5]。但因所用材料的不同, 也有100和120 kD不等的 Ca^{2+} -ATPase报道^[6,7]。存在于质膜和内质网膜上的 Ca^{2+} -ATPase(钙泵)是 Ca^{2+} 的主动转运系统之一^[8,9], 其以水解ATP提供能源将 Ca^{2+} 泵出胞液, 在维持细胞钙稳态和钙信使系统中起着重要的作用。 Ca^{2+} -ATPase受 Ca^{2+} 、CaM等多种因子调节^[5,7,9]。有关外界环境的改变, 尤其在渗透胁迫下 Ca^{2+} -ATPase活性变化的报道所见甚少, 本研究以小麦根为材料, 对渗透胁迫下PM Ca^{2+} -ATPase活性及其动力学变化和钙螯合剂EGTA的抑制作用进行了探讨。旨在为逆境条件下植物细胞中的钙泵及钙调节作用研究提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料及处理

选用冬小麦(*Triticum aestivum* L.)抗旱品种陕合6号和水份敏感品种郑引1号。种子用2 g/L HgCl_2 消毒10 min, 自来水冲洗数次, 吸水培养约20 h, 待露白后播于尼龙网上, $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 温箱中萌发培养5 d, 用渗透势为-0.5和-1.0 MPa的PEG溶液处理根系24 h, 进行下列项目测定。

收稿日期 1996-05-23, 修改稿收到日期: 1996-12-03

课题来源 国家自然科学基金资助项目

作者简介 吕金印, 男, 1960年生, 高级实验师, 硕士

1.2 测定项目及方法

质膜分离与纯化方法同文献[10];质膜 Ca^{2+} -ATPase 活性测定参照文献[11,12]的方法,略加改进:取 0.5 mL 反应介质含 Tris-HCl(pH7.5)200 mmol/L,NaCl 50 mmol/L,EDTA- Na_2 0.005 mmol/L,,DTT 10 mmol/L, CaCl_2 4 mmol/L,ATP 5 mmol/L,0.1 g/L triton x-100,加入适量 PM(含 10~30 μg 膜蛋白制剂)。36℃反应 20 min,加 100 g/L TCA 终止反应,测定释放无机磷含量;反应介质中加与不加 Ca^{2+} 引起的酶活之差即为 Ca^{2+} -ATPase 活性。

2 结果与分析

2.1 渗透胁迫对 PM Ca^{2+} -ATPase 活性的影响

由图 1 可看出,-0.5 MPa 和 -1.0 MPa PEG 胁迫 24 h,抗旱品种陕合 6 号 PM Ca^{2+} -ATPase 活性是先升高(+59%)而后略降(+25%),但始终高于对照水平。对水分敏感的郑引 1 号则是先略降(-5%)而后升高(+43%)。除 -0.5 MPa 处理的郑引 1 号外,两品种在渗透胁迫下 PM Ca^{2+} -ATPase 活性均升高。另外在正常水分和 -1.0 MPa 胁迫处理下,郑引 1 号 PM Ca^{2+} -ATPase 活性高于陕合 6 号。

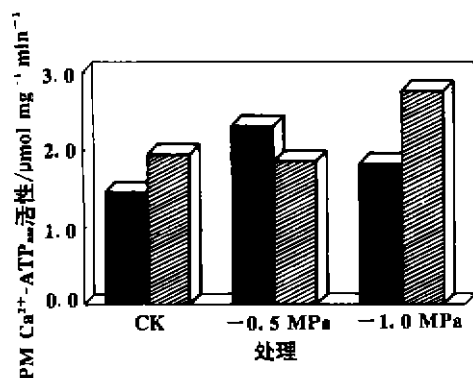


图 1 渗透胁迫对小麦根 PMCa^{2+} -ATPase 活性影响

实柱:陕合 6 号;斜线性:郑引 1 号

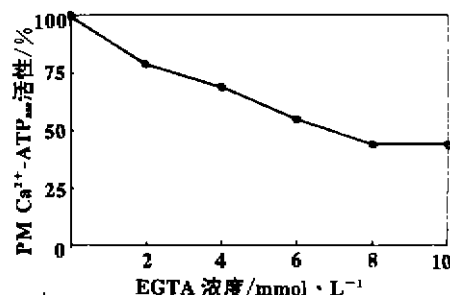


图 2 不同浓度 EGTA 对 PMCa^{2+} -ATPase

活性的抑制

2.2 EGTA 对 PM Ca^{2+} -ATPase 活性的抑制作用

用不同浓度的 EGTA 对小麦根 PM Ca^{2+} -ATPase 活性的抑制实验结果表明,8 mmol/L EGTA 抑制率最大(图 2)。表 1 中结果显示:在正常水分条件下,8 mmol/L EGTA 对两品种 PM Ca^{2+} -ATPase 活性的抑制率大于 PEG 胁迫后的抑制率,随着胁迫的增加,EGTA 的抑制率降低。

表 1 渗透胁迫下 EGTA 对小麦根 PMCa^{2+} -ATPase 活性的抑制作用 $\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$

处 理	陕合 6 号		郑引 1 号	
	-EGTA	+EGTA	-EGTA	+EGTA
CK	1.452(100)	0.334(77)	1.937(100)	0.858(56)
-0.5 MPa	2.313(100)	0.746(68)	1.852(100)	0.985(47)
-1.0 MPa	1.815(100)	1.032(43)	2.762(100)	1.487(46)

注: Ca^{2+} -ATPase 活性是以单位膜蛋白每分钟酶反应释放出的无机磷量表示。

2.3 渗透胁迫下 PM Ca^{2+} -ATPase 的动力学变化

采用 Lineweave-Burk 法,以 $[\text{S}]^{-1}$ 与 V^{-1} 作图(见图3),经回归分析和偏差计算,得出小麦根 PM Ca^{2+} -ATPase 的表观 K_m 及 $V_{\max}$ 值。由表2中可看出:在 -0.5 和 -1.0 MPa PEG 胁迫下,陕合6号 PM Ca^{2+} -ATPase $V_{\max}$ 变化不大,略有增加。而郑引1号 $V_{\max}$ 比对照下降了近 $2/3$ 。陕合6号 K_m 值在 -0.5 和 -1.0 MPa 处理时分别降低了 46% 和 22% 。郑引1号分别下降了 75% 和 82% ,下降幅度大于陕合6号。表明渗透胁迫下 Ca^{2+} -ATPase 与底物 ATP 的亲合力增强。

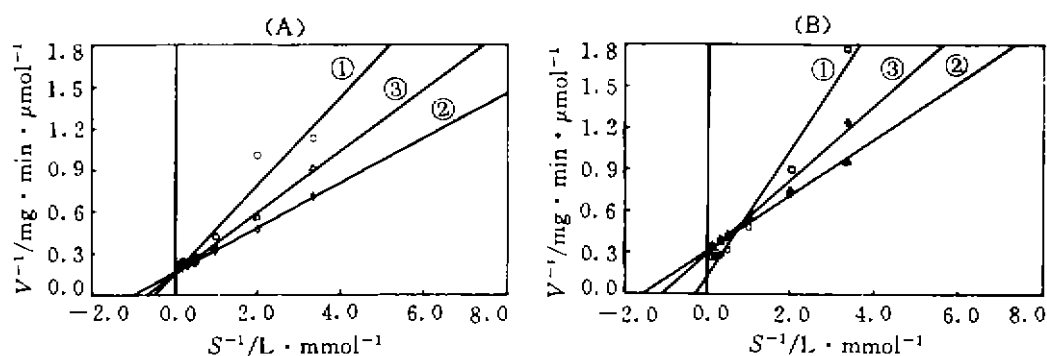


图3 ATP浓度对 PM Ca^{2+} -ATPase 活性的影响

(A)陕合6号;(B)郑引1号;1/V单位为酶活性的倒数,1/S单位是底物ATP浓度的倒数。

①CK,② -0.5 MPa,③ -1.0 MPa

表2 渗透胁迫对小麦根 PM Ca^{2+} -ATPase 表现 K_m 和 $V_{\max}$ 的影响

处 理	陕合6号		郑引1号	
	K_m	$V_{\max}$	K_m	$V_{\max}$
CK	2.723	8.146	5.490	11.544
-0.5 MPa	1.475	8.250	1.347	4.511
-1.0 MPa	2.118	8.928	0.975	4.173

3 讨 论

目前,对钙泵在钙诱导、钙调节信使功能中的作用已被公认。位于质膜上的 Ca^{2+} -ATPase,是 Ca^{2+} 的主动转运系统, Ca^{2+} -ATPase 活性的变化也反映了外界环境对质膜结构与功能的影响^[13,14]。薛刚等利用棉花研究表明: -0.3 MPa 胁迫处理下,随着时间的延长($0\sim 27$ h),PM Ca^{2+} -ATPase 活性呈“V”字形变化;而 -1.1 MPa 处理时,该酶活性下降^[9]。郝鲁宁等用 NaCl 处理大麦幼苗根时, Ca^{2+} -ATPase 活性和 $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ 反向传递系统驱动的 Ca^{2+} 转运活性在幼苗发生伤害时, Ca^{2+} 转运系统 Ca^{2+} -ATPase 对底物 ATP 的 K_m 值增大, $V_{\max}$ 减小^[15]。本研究表明:PEG 溶液渗透胁迫 24 h,两小麦品种 PM Ca^{2+} -ATPase 活性增加(图1)。其中随着胁迫的增加,不抗旱的郑引1号变化与文献[9]棉花(水分敏感品种)的结果一致。由此说明渗透胁迫对 Ca^{2+} -ATPase 活性有促进表达的作用(除郑引1号在 -0.5 MPa 处理时稍有降低)。动力学分析表明:随着胁迫强度的增加,抗旱品种陕

合 6 号 Ca^{2+} -ATPase $V_{\max}$ 略有增加, 不抗旱的郑引 1 号则下降明显, 约为对照的 1/3. 两品种该酶的米氏常数 (K_m) 随胁迫增加均变小, 其中郑引 1 号的下降幅度大于陕合 6 号 (表 2), 由此可以看出, Ca^{2+} -ATPase K_m 值下降, 酶活性增大 (图 1, 表 2). 另外, K_m 值的降低, 表明渗透胁迫下该酶对底物 ATP 亲和力增强, 尤其对水分敏感的郑引 1 号表现更为突出. 这可能是小麦根细胞质膜感受外界胁迫信号刺激, 表现出对干旱的一种响应. 表 1 中 EGTA 与 PM Ca^{2+} -ATPase 活性关系表明: ① EGTA 有调节 Ca^{2+} -ATPase 活性的作用 (使酶活降低); ② 渗透胁迫下, EGTA 对 Ca^{2+} -ATPase 所起的抑制作用降低, 两个品种表现有差异. 随着胁迫的增加, EGTA 的抑制率降低, 可能是胁迫后 PM Ca^{2+} -ATPase 活性表达增强的缘故. 到目前为止, 除了肯定 Ca^{2+} -ATPase (钙泵) 在钙转运中所起的主要作用外, 也有一些实验证据证明质膜上的钙通道和 $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ 反向传递系统在消除胞质过量钙的过程中起着重要作用^[8,13,15]. 关于逆境条件下三者之间对钙转运的协同关系, 以及各自所起的作用, 还有待进一步探讨.

参 考 文 献

- 1 Hodges T K, Leonard R T, Bracker C E et al. Purification of an ion-stimulated ATPase from plant root: association with plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, 69: 3307
- 2 宋松泉, 傅家瑞. 植物质膜 H^+ -ATPase 的研究进展. *植物生理学通讯*, 1993, 29(2): 130~136
- 3 Briars S A, Kessler F, Evans D E. The calmodulin stimulated ATPase of maize coleoptiles is a 140000-Mr polypeptide. *Planta*, 1988, 176: 283~285
- 4 Evans D E, Briars S A, Williams L E. Active calcium transport by plant cell membranes. *J of Exp Bot*, 1991, 42 (236): 285~303
- 5 Rasi-Caldogno F, Carnelli A, De Michelis M I. Controlled proteolysis activates the plasma membrane Ca^{2+} pump of high plants. *Plant Physiol*, 1993, 103: 385~390
- 6 Chen F H, Ratterman D M, Sze H. A plasma membrane-type Ca^{2+} -ATPase of 120 Kilodalton on the endoplasmic reticulum from carrot cells. *Plant Physiol*, 1993, 102: 651~661
- 7 Briskin D P. Ca^{2+} -translocating ATPase of the plant plasma membrane. *Plant Physiol*, 1990, 94: 397~400
- 8 郝鲁宁, 余淑文. 大麦根细胞质膜存在 $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ 反向传递系统. *中国科学(B 辑)*, 1993, 23(8): 827~832
- 9 薛刚, 高俊凤, 刘凤霞. 水分胁迫下钙螯合剂与 CPZ 抑制剂对棉花根和下胚轴两种 ATPase 的效应. *植物生理学通讯*, 1994, 30(6): 417~420
- 10 吕金印, 高俊凤. 水分胁迫对小麦根质膜透性与质膜组分的影响. *干旱地区农业研究*, 1996, 14(1): 96~100
- 11 李扬瑞, 甘蔗叶片细胞器的 Mg^{2+} -ATP 酶和 Ca^{2+} -ATP 酶活性. *植物生理学通讯*, 1987, (6): 20~21
- 12 Klotz M G, Berczi A, Erdei L et al. Picomolar concentration of tentoxin affect Mg^{2+} and Ca^{2+} -ATPase activities of plasma membrane vesicles from roots of winter wheat seedlings. *Physiol Plant*, 1989, 75: 405~410
- 13 Bush D S. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1995, 46: 95~122
- 14 McAinsh M R, Webb A A R, Taylor J E et al. Stimulus-induced oscillations in guard cell cytosolic free calcium. *The Plant Cell*, 1995, 7: 1207~1219
- 15 郝鲁宁, 余淑文. 大麦根细胞质膜 Ca^{2+} 转运系统对盐胁迫的反应. *植物生理学报*, 1993, 19(3): 275~284

The Ca^{2+} -ATPase Activity and Kinetics of Winter Wheat Root Plasma Membrane Under Osmotic Stress

Lu Jinyin¹ Gao Junfeng² Cao Culling²

(1 The Central Lab, 2 Department of Basic Science, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract Under -0.5 and -1.0 MPa of osmotic potential PEG stress, the wheat root plasma membrane (PM) Ca^{2+} -ATPase activity increased by 59% and 25% respectively in drought-resistant Shaanhe No. 6, and the activity dropped by 5% firstly, and then increased by 43% in drought-sensitive Zhengyin No. 1. The PM Ca^{2+} -ATPase was inhibited obviously by 8 mmol/L EGTA. The inhibition rate was between 43~77% in Shaanhe No. 6 and between 46~56% in Zhengyin No. 1, while EGTA inhibition rate reduced in the two cultivars when PEG stressed. The results of PM Ca^{2+} -ATPase with kinetic analysis showed that Shaanhe No. 6 K_m decreased by 46% and 22% respectively and V_{max} increased little or change little with the stress strength increasing. Zhengyin No. 1 K_m dropped by 75% and 82% respectively and the V_{max} approximately reduced 1/3 as much as the control.

Key words osmotic stress, plasma membrane Ca^{2+} -ATPase, winter wheat