

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2014.02.025

高山离子芥磷脂酶 D 活性测定及酶动力学分析

杨 宁¹, 王程亮¹, 陈 霞¹, 丁芳霞¹, 李宜坤¹, 赵聪聪¹, 安黎哲^{2*}
(1. 西北师范大学生命科学学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 兰州大学生命科学学院, 甘肃 兰州 730000)

摘要:高山离子芥(*Chorispora bungeana*)是一种高抗逆的多年生高山草本植物,具有特殊的分子及生理抗逆响应机制。磷脂水解酶磷脂酶 D (PLD)是重要的跨膜信号转导酶。以高山离子芥愈伤组织为试材,利用酶联免疫分光光度计法,优化磷脂酶 D 活性测定体系,建立了在 25℃ 反应温度条件下,200 μL 反应体系中,膜蛋白的含量 35 μg、反应时间 30 min、pH 为 7.0 的缓冲液系统最适合高山离子芥愈伤组织磷脂酶 D 活性测定体系,分析表明不同膜结合态磷脂酶 D 的酶动力学特征存在差异,为进一步探讨磷脂酶 D 在高山离子芥响应逆境胁迫中的作用奠定基础。
关键词:高山离子芥;磷脂酶 D; 活性;测定方法
中图分类号:Q55 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-0435(2014)02-0375-05

Method of Detecting Phospholipase D Activity and Analyses of Kinetic Parameters in *Chorispora bungeana*

YANG Ning¹, WANG Cheng-liang¹, CHEN Xia¹, DING Fang-xia¹,
LI Yi-kun¹, ZHAO Cong-cong¹, An Li-zhe^{2*}
(1. College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou, Gansu Province 730070, China;
2. College of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province 730070, China)

Abstract: *Chorispora bungeana* is a representative alpine-subnival herbaceous plant with special molecular and physiological mechanism response to abiotic stresses. Phospholipase D (PLD) is not only a major kind of phospholipid hydrolases in plant, but also an important signal transduction enzyme. Using enzyme couple colorimetric method, the better reaction system is studied. The proper content of membrane protein is 35 μg in 200 μL reaction system, the reaction time is 30 min at 25℃ and the suitable pH is 7.0. Further analyses of *Chorispora bungeana* callus from different fractions show that the different binding states of PLD have different kinetic parameters. These results establish the research foundation of PLD responding to environmental stress.
Key words: *Chorispora bungeana*; Phospholipase D; Activity; Detection method

高山冰缘植物高山离子芥(*Chorispora bungeana*)属于多年生高山草本,主要分布在新疆海拔 2600~3700 m 处的亚高山草甸、草原、砾石质山坡上^[1],此区域属亚高山草地类型,具有多个群落类型,呈现群落多样性,群落主要成员高山离子芥在改善土壤、气候条件、涵养水源和维持生态平衡等方面有着重要作用。高山离子芥生境气候寒冷,空气稀薄,辐射强,劲风,经常受到干旱、低温、辐射等多种非生物胁迫。有研究报道,该物种不具有适应胁迫环境的特殊形态学特征^[1],因此,在这种极端环境条

件下生存,高山离子芥具备了独特的分子和生理抗胁迫响应机制^[2]。作为一种天然抗性植物,高山离子芥是研究高山冰缘植物独特的抗逆响应机制的理想材料。
磷脂酶 D(phospholipase D, PLD)属催化磷酸二酯键水解和碱基交换反应的一类酶的总称,普遍存在于生物界中,是重要的细胞磷脂代谢酶。磷脂酶 D(PLD)催化磷脂水解生成磷脂酸(PA)和极性氨基化合物,例如胆碱或乙醇胺。PA 是一种第 2 信使,它进一步生成的甘油二酯(DAG)及溶血磷脂

收稿日期:2013-06-11;修回日期:2013-09-17
基金项目:国家自然科学基金(31160087)(31360061),甘肃省财政厅高校基本科研业务费项目;甘肃省教育厅基金(1101-06);西北师范大学学生学术科研资助项目资助
作者简介:杨宁(1973-),女,山东青州人,博士,副教授,主要从事植物分子细胞生物学研究,E-mail: xbsd-yn@163.com; * 通信作者 Author for correspondence, E-mail: lizhean@lzu.edu.cn

酸(LPA),也是重要的信号分子^[3]。除PA外,磷脂酶D水解反应产物中的自由头部基团也具有许多调控功能^[4]。PLD在植物的生长过程中起重要作用,例如种子萌发、植株衰老等。PLD也可增强植物对不良环境胁迫的抵御能力,已在多种环境胁迫刺激,如水分胁迫、冷胁迫、盐胁迫、机械损伤、病原菌侵染、磷酸盐饥饿以及ABA等激素处理中发现PLD基因转录及活性增加,并且PLD逆境蛋白导致胁迫耐受性发生改变,引起植物体产生相关的变化,来减缓受害程度或对胁迫刺激产生适应性^[4]。作为逆境响应蛋白,PLD与天然抗性植物高山离子芥有密切的关系^[5],因此研究此酶对揭示高山离子芥响应胁迫的作用机制有重要作用。

当前,大量用来测定PLD活性的方法都是以PLD催化自然的或人工合成的磷脂水解,通过直接或间接生成的产物为基础而进行的。磷脂酰胆碱生成的胆碱在胆碱氧化酶作用后,可利用分光光度法或化学发光法测定反应中生成的过氧化氢,反应中生成的PA可以通过滴定法或电导率来测定;或者可通过对底物的直接标记法如底物放射标记法和底物荧光标记法来测定。这些方法中有的需要放射性底物,有的费用不菲,有的操作费时^[3]。PLD活性测定方法的选择因材料、目的不同而有所差异,在多种测定方法中酶联免疫分光光度计法因其简单、方便、实用而被广泛采用。

尽管对植物PLD研究已有许多报道,但到目前为止,对高山冰缘植物PLD研究仅见于本课题组的少量报道^[5]。对于高山冰缘植物PLD应激胁迫的作用机制尚处于探究阶段。本研究以具有高抗逆性高山离子芥作为试验材料,通过优化PLD活性测定的酶联免疫分光光度计法,建立适合高山离子芥愈伤组织PLD制备和活性测定的技术体系,分析研究不同膜结合态磷脂酶D的酶动力学特征,为进一步探讨磷脂酶D在高山离子芥细胞响应逆境胁迫中的作用奠定了技术基础,对深入研究和利用高抗逆性植物高山离子芥中逆境响应蛋白PLD,揭示其响应逆境胁迫机理及维持草地生态系统的稳定具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

采用野生高山离子芥成熟种子去皮于70%乙醇中浸泡20 s,取出后放入0.1%升汞溶液中连续

振荡8~10 min,无菌水冲洗4~5次,接种于加入MS+1 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA+30 g·L⁻¹蔗糖+4.7 g·L⁻¹琼脂,pH 5.8的初代培养基中诱导愈伤组织,获得的愈伤组织在MS+0.2 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ KT+30 g·L⁻¹蔗糖+4.7 g·L⁻¹琼脂,pH 5.8的继代培养基中进行愈伤组织增殖,25℃、光周期为16 h条件下培养。获得的愈伤组织经至少6次以上传代后,用于磷脂酶D制备及活性测定。

1.2 方法

1.2.1 高山离子芥磷脂酶D的制备 高山离子芥磷脂酶D的制备依照Mao等^[6]的方法,并加以改进。取0.2 g高山离子芥愈伤组织,加入10 mM HEPES(pH 7.0) 2 mL提取缓冲液(含0.32 M蔗糖,1 mM DTT,1 mM PMSF和EGTA)于液氮中研磨,制成10%的匀浆,转入离心管中以1000×g离心15 min去除细胞碎片,上清液再以15000×g离心30 min获得沉淀即为线粒体膜蛋白。经15000×g离心获得的上清液再经105000×g超速离心1 h,获得沉淀即为微粒体膜蛋白(包括细胞质膜、内质网膜、液泡膜)。将沉淀溶于100 mM,pH 6.5的DMG中,即为PLD酶液。所有蛋白的提取分离步骤于4℃下进行。

1.2.2 磷脂酶D活性测定 磷脂酶D活性用酶联免疫法测定^[3]。于离心管中配制200 μL的磷脂酶D活性反应体系,其中含100 mM DMG(pH 6.5),10 mM MgCl₂,0.1 mM CaCl₂,5 mM 亚油酸,20 μL酶液(空白中加入等体积DMG母液替代酶液),以及12 mM PC(最后加入)。反应体系于30℃反应30 min,沸水浴15 min终止反应,冷却后加入显色液800 μL(含45 mM Tris-HCl pH 8.0,0.8个单位胆碱氧化酶,2.4单位HRP,0.24 mg AAT和0.16 mg重蒸酚)。30℃反应90 min,色泽稳定后加入1 mL Tris-HCl(内含2 g·L⁻¹ Tritonx-100,pH 8.0),用0.22 μL孔径的滤膜滤去杂蛋白,500 nm处比色。空白调零,从胆碱标准曲线查出相应胆碱含量。以Bradford比色法测定可溶性蛋白的含量。

1.2.3 不同蛋白含量对磷脂酶D活性的影响 200 μL反应体系中加入不同含量的蛋白(25~50 μg)测定不同蛋白含量对磷脂酶D活性的影响。

1.2.4 不同反应时间对磷脂酶D活性的影响 选

取不同反应时间点(0~35 min)测定酶活性,以测定不同反应时间对磷脂酶 D 活性的影响。

1.2.5 不同 pH 缓冲液的配置 配置 0.1 M 醋酸缓冲液(pH 5.0, 5.5), 0.1 M 磷酸缓冲液(pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0)

1.2.6 不同浓度 Ca^{2+} 对磷脂酶 D 活性的影响 200 μL 反应体系中加入不同浓度的 CaCl_2 (0~1 mM)测定对磷脂酶 D 活性的影响。

1.2.7 不同底物浓度对酶动力学的影响 不同底物浓度磷脂酰胆碱(PC)(1~5 mM)加入反应体系,研究底物浓度对酶动力学的影响。

1.3 数据处理

每个试验至少重复 3 次,结果以 Means $\pm$ S. E. 表示。采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 蛋白含量对高山离子芥 PLD 活性的影响

通过对高山离子芥线粒体膜及微粒体膜结合态 PLD 活性测定发现,在 25~35 μg 蛋白含量条件下,PLD 活性随反应体系中蛋白含量的增加而呈逐渐增长趋势;当蛋白含量达 35 μg 时,线粒体膜 PLD 及微粒体膜 PLD 的活性均达到峰值,分别为 180 $\text{mM} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 和 145 $\text{mM} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$;当蛋白含量超过 35 μg 时,线粒体膜 PLD 及微粒体膜 PLD 的活性逐渐下降(图 1)。

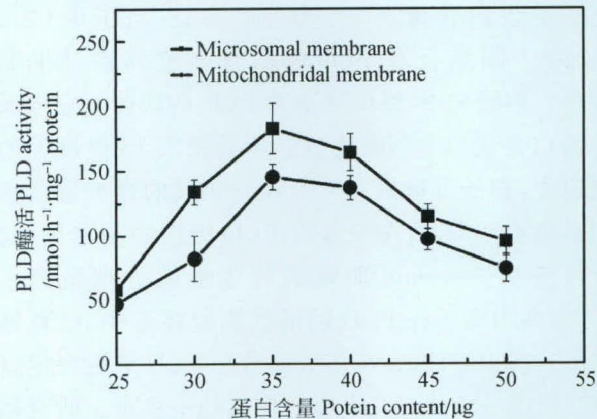


图 1 蛋白含量对高山离子芥线粒体膜和微粒体膜结合态 PLD 活性的影响

Fig. 1 The effects of different protein contents on PLD activities in mitochondrial and microsomal membranes

注:图中数据结果来自于 3 次独立的重复试验,下同
Note: Value is mean $\pm$ SE, the same as below

2.2 反应时间对高山离子芥 PLD 活性的影响

由图 2 可知,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 反应温度下,微粒体膜结合态 PLD 活性高于线粒体膜结合态 PLD 活性,且线粒体膜及微粒体膜结合态 PLD 活性的变化趋势基本一致,在反应起始 0~15 min 内,酶活增长缓慢;当反应时间在 15~30 min 内,酶活开始呈线性增长,并在反应 30 min 时达到最大值,之后随着反应时间的延长,酶活性有所下降。

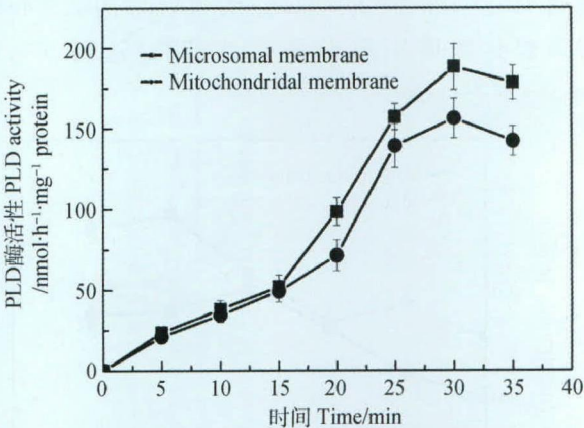


图 2 反应时间对高山离子芥线粒体膜和微粒体膜结合态 PLD 活性的影响

Fig. 2 The effect of reaction time on PLD activities in mitochondrial and microsomal membranes

2.3 pH 条件对高山离子芥 PLD 活性的影响

通过使用不同的缓冲液系统,获得不同 pH 条件对高山离子芥线粒体和微粒体膜结合态 PLD 活性的影响(图 3)。对线粒体和微粒体膜结合态 PLD 而言,pH 条件的影响显而易见,线粒体膜磷脂酶 D 和微粒体膜磷脂酶 D 在 pH 值为 7 时活性均最高,分别达到 232.6 $\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 和 216.9 $\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

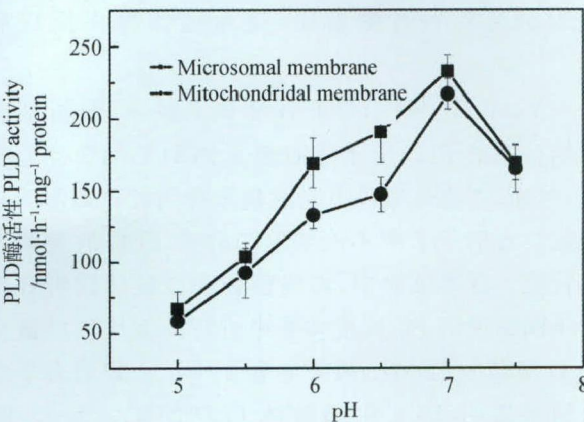


图 3 不同 pH 条件对高山离子芥线粒体膜和微粒体膜结合态 PLD 活性的影响

Fig. 3 The effects of different pH values on PLD activities in mitochondrial and microsomal membranes

2.4 不同浓度 Ca^{2+} 对 PLD 活性的影响

通过在 200 μL 反应体系中加入不同浓度的 CaCl_2 (0~1 mM), 研究不同浓度 Ca^{2+} 对 PLD 活性的影响。如图 4 所示, 当反应体系中 Ca^{2+} 为 0 mM 时依然可以测得酶活性, 说明 Ca^{2+} 的存在并非酶活的必须条件, 但是当有 Ca^{2+} 存在时的酶活性明显提高, 说明 Ca^{2+} 对酶活性提高有促进作用。其中, 当 Ca^{2+} 为 0.6 mM 时线粒体膜磷脂酶 D 酶活性最高, 达到 $414.4 \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$; 当 Ca^{2+} 为 0.8 mM 时微粒体膜磷脂酶 D 酶活性最高, 达到 $555.7 \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

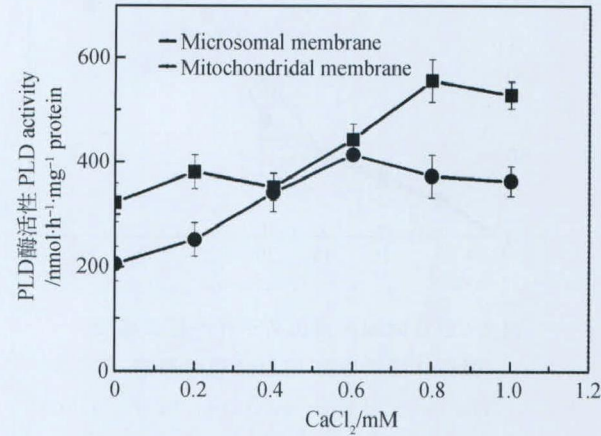


图 4 不同浓度 Ca^{2+} 对高山离子芥线粒体膜和微粒体膜结合态 PLD 活性的影响

Fig. 4 The effects of different Ca^{2+} contents on PLD activities in mitochondrial and microsomal membranes

2.5 不同 PC 底物浓度对 PLD 酶动力学的影响

细胞中存在细胞质 PLD 和膜结合态 PLD, 而只有膜结合态 PLD 具有活性, 并且只有膜结合 PLD 会遇到各种的磷脂, 进而选择酶促反应底物^[12-14]。

Yuan 等^[7]提出只有在活体条件下, 分析细胞膜结合态的 PLD 分子才能获得 PLD 的酶学动力参数; 然而, 在离体条件下对底物浓度与反应速度的研究也会有助于了解不同细胞组分中 PLD 的酶动力学特征。在本试验中, 将线粒体和微粒体膜孵育于含不同浓度的 PC 反应体系中进行酶促反应以研究 PLD 酶动力学特征, 结果如表 1 所示。酶动力学分析结果表明, 25°C 时微粒体 PLD 的 $V_{\max}$ 为 $20.96 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein} \cdot \text{min}^{-1}$, 比线粒体 PLD 的 $V_{\max}$ ($13.44 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein} \cdot \text{min}^{-1}$) 高 1.6 倍。微粒体和线粒体 PLD 的 K_m 值分别为 8.79 nM 和 6.11 nM。微粒体膜结合态 PLD 与线粒体

膜结合态 PLD 相比具有较高的催化活性, 微粒体和线粒体 PLD 存在酶动力学特征的明显差异。

表 1 不同 PC 底物浓度对 PLD 酶动力学的影响

Table 1 The effects of different phosphatidylcholine contents on kinetic parameters of PLD

	微粒体膜结合态 PLD	线粒体膜结合态 PLD
$V_{\max}$ / $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein} \cdot \text{min}^{-1}$	20.96	13.44
K_m/nM	8.79	6.11
$V_{\max}/K_m$	2.38	2.20

3 讨论与结论

本研究利用酶联免疫法测定 PLD 活性, 活性测定体系中以 PC 为反应底物, PLD 催化水解其磷酸二酯键生成磷脂酸和胆碱。利用 PC 在 PLD 催化作用下生成胆碱和 PA, 其中前者在胆碱氧化酶催化下产生甜菜碱和 H_2O_2 。 H_2O_2 的浓度与 PC 线性相关, 因此采用 Trinder 反应进行测定, 即在过氧化物酶 (HRP) 的催化下 4-氨基安替比林 (AAT) 和酚被氧化, 生成红色醌亚胺化合物 (4-(p-benzochinon-monoimion)-phenazone), 该化合物在 500 nm 波长的 OD 值与 H_2O_2 浓度线性相关。因而可用特定 PC 浓度对应的 OD 值来计算胆碱生成量, 继而通过胆碱标准曲线换算出 PLD 的催化速率。

Yuan 等^[7]研究草莓 (*Fragaria ananassa*) 果实 PLD 的活性时利用液体闪烁记数仪测定反应中释放出的 $[^3\text{H}]$ 胆碱, 发现草莓果实 PLD 的活性测定体系中蛋白含量以 5~10 μg 为宜, 与玉米 (*Zea mays*) 中膜结合态 PLD 的活性研究体系结果类似^[8]。 本研究中, 高山离子芥 PLD 的活性测定体系中蛋白含量以 35 μg 为宜。草莓果实 PLD 活性的测定中, 起始反应后 5~10 min 胆碱的释放量就达到最高水平^[7], 而在玉米粒 PLD 活性的测定中, 起始反应后 2.5 min 胆碱的释放量就达到最高水平^[8], 高山离子芥 PLD 的活性测定体系中, 线粒体膜结合态 PLD 和微粒体膜结合态 PLD 活性测定以反应时间 30 min 为宜, 酶的作用趋于稳定。研究结果存在差异, 可能是由于酶联免疫测定法与液体闪烁记数仪测定法的测定精度不同以及 PLD 反应存在种属差异有关。

Ca^{2+} 作为细胞信号分子在许多生命过程中调节植物的生长和发育, 同时它还应答各种环境胁迫。 Ca^{2+} 对植物 PLDs 活性有明显影响。 Ca^{2+} 对 PLD

的激活作用存在多种作用机制:首先, Ca^{2+} 促进 PLD 与细胞膜的结合,从而增加 PLD 与底物相互作用的机会;另外, Ca^{2+} 对 PLD 有激活作用^[7]。 Ca^{2+} 引起了 PLD 的 C2 结构域构象改变从而细胞质中的可溶性 PLD 转移至细胞膜上。PLD α , PLD β 和 PLD γ 的 C2 结构域包含的 2~3 个酸修饰位点可能参与了结合 Ca^{2+} ^[9]。这些结构特征使 PLD 在微摩尔水平 Ca^{2+} 存在时就能被激活。正常生理状态下,PLD 位于细胞质、质膜、内质网膜、线粒体膜以及囊泡上。在果实发育过程中可以看到结合在各种膜上的 PLD 增加,这可能是受到了细胞质中 Ca^{2+} 含量增加的影响。Pinhero 等^[10]报道膜结合态 PLD 与细胞质中 Ca^{2+} 的增加有关,PLD 在信号转导中的作用也与因应答激素和环境信号所引起的细胞质中 Ca^{2+} 的增加有关。本研究中当反应体系中 Ca^{2+} 为 0 mM 时依然可以测得 PLD 酶活性,说明 Ca^{2+} 的存在并非 PLD 酶活的必须条件,但是当有 Ca^{2+} 存在时的酶活性明显提高,说明 Ca^{2+} 对酶活性提高有促进作用,且不同膜结合态 PLD 活性 Ca^{2+} 的反应不同。高山离子芥愈伤组织细胞中 PLD 活性增加与反应体系中 Ca^{2+} 含量二者之间具有相关性。

PLD 是多功能基因,在植物育种方面有很大的前景。转基因技术和常规育种相结合可选育出抗旱、抗寒、抗病或抗盐等单个性状或兼具多个性状的品质,从而大大降低各种生物胁迫和非生物胁迫破坏程度。在多年生高山草本植物高山离子芥中研究逆境响应蛋白 PLD,对揭示其响应逆境胁迫机理及维持草地生态系统的稳定具有潜在的价值。本研究以高山离子芥愈伤组织为试材,利用酶联免疫分光光度计法,筛选出 PLD 活性测定时反应体系中适宜的蛋白用量、反应时间、反应最适 pH 以及最适 Ca^{2+} 浓度,建立了适合 PLD 制备及活性测定的技术体系,分析研究了不同膜结合态磷脂酶 D 的酶动力学特征,为进一步探讨磷脂酶 D 在高山离子芥响应逆境胁迫中的作用奠定了基础。

参考文献

- [1] 阿依吐尔汗,谭敦炎,李志军,等.高山离子芥营养器官的结构与环境的的关系研究[J].新疆农业大学学报,1998,21(4):273-277
- [2] An L Z, Liu Y H, Feng H Y, *et al.* Studies on the characteristics of element contents of altifrigetic subnival vegetation at the source area of Urumqi River [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2000, 20(6): 1063-1069
- [3] 黄勇,吴兴中,陈惠黎.用酶联比色法测定肝脏磷脂酰胆碱专一性磷脂酶 D 及其应用[J].上海医科大学学报,1999,24(5):343-346
- [4] Bargmann B O, Munnik T. The role of phospholipase D in plant stress response[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2006, 9(5): 515-522
- [5] Yang N, Yue X L, Chen X L, *et al.* Molecular cloning and partial characterization of a novel phospholipase D gene from *Chorispora bungeana* [J]. Plant Cell Tissue Organ Cultures, 2011, 108(2): 201-212
- [6] Mao L C, Pang H Q, Wang G Z, *et al.* Phospholipase D and lipoxygenase activity of cucumber fruit in response to chilling stress [J]. Postharvest Biology and Technology, 2007, 44(1): 42-47
- [7] Yuan H, Chen L, Paliyath G, *et al.* Characterization of microsomal and mitochondrial phospholipase D activities and cloning of a phospholipase D alpha cDNA from strawberry fruits [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2005, 43(6): 535-547
- [8] Paliyath G, Pinhero R G, Yada R Y, *et al.* Effect of processing conditions on phospholipase D activity of corn kernel subcellular fractions [J]. Journal of Agricultural and food Chemistry, 1999, 47(7): 2579-2588
- [9] Qin W, Pappan K, Wang X. Molecular heterogeneity of phospholipase D (PLD): Cloning of PLD gamma and regulation of plant PLD alpha, beta and gamma by polyphosphoinositides and calcium[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(45): 28267-28273
- [10] Pinhero R G, Almquist K C, Novotna Z, *et al.* Developmental regulation of phospholipase D in tomato fruits[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2003, 41(3): 223-240

(责任编辑 李美娟)