

技术与方法 Techniques and Methods

植物水孔蛋白介导的水分运输及其分析测定技术

綦翠华^{1, 2} 丁同楼² 王宝山^{2,*}¹ 济南大学食品科学系, 济南 250002; ² 山东师范大学生命科学学院, 济南 250014

Water Transport Mediated by Plant Aquaporins and Its Analytical Techniques

QI Cui-Hua^{1,2}, DING Tong-Lou², WANG Bao-Shan^{2,*}¹ Department of Food Science, Jinan University, Jinan 250002, China; ² College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China

摘要 水孔蛋白介导的水分运输具有选择性强、效率高和调节快等特点, 在植物生长、发育和胁迫适应中起作用, 文章介绍了水孔蛋白介导的水分运输及其分析测定技术。

关键词 植物; 水孔蛋白; 水分运输; 测定技术

植物中一系列分子量为 26~34 kD、选择性强、能高效转运水分子的膜蛋白称为水孔蛋白(aquaporins, AQPs)^[1]。关于植物水孔蛋白及其调节前人已有综述^[2~4]。自从1993年Maurel等^[5]首先用爪蟾卵母细胞异源表达体系分析水孔蛋白介导的水分跨膜运输以后, 水孔蛋白分析测定技术有了很大进展, 促进了植物水分代谢生理的研究。近年来研究表明, 水孔蛋白在植物种子萌发、细胞伸长、气孔运动及逆境应答等过程中调节水分快速跨膜运输。本文就目前国际上常用的植物水孔蛋白介导的水分运输及其分析测定技术进行介绍。

水分通过细胞膜的运输有两种途径: 一是通过脂类双分子层的自由扩散; 二是由水孔蛋白介导的集流运输。两者最主要的区别是: 后者为 Hg²⁺ 抑制, 而 DTT 等巯基试剂可恢复 Hg²⁺ 的抑制; 前者则不为 Hg⁺ 抑制。所以, 测定水孔蛋白介导的水分跨膜运输等一般用 HgCl₂ 处理方法, 根据水分运输是否受抑制和受抑程度来判别。

1 整株水平上的测定

1.1 根部自然伤流法 去除植物地上部分, 用硅氧烷脂把带有一段茎的根密封于锥形玻璃瓶中。2 h后用细的巴氏滴管收集溢出木质部的汁液并转移到离心管中, 称汁液和根重。液流量(J_v)用 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} (\text{FW}) \cdot \text{h}^{-1}$ 表示。取 50 μL 汁液放于离心管中, 用冰点渗透压计测汁液渗透势(ψ_s^{cell})和根生长介质的渗透势(ψ_s^{soil}), 得到木质部汁液和外部溶

液的渗透势差 $\Delta\psi_s = (\psi_s^{\text{cell}} - \psi_s^{\text{soil}})$ 。根导水力(hydraulic conductance, L_o)用公式 $L_o = J_v / \Delta\psi_s$ 计算, 单位为 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} (\text{FW}) \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{MPa}^{-1}$, 这种方法仅适用于少数能发生自然伤流的植物^[6]。

1.2 压力室法 压力室法普遍适用于不能自然收集到木质部汁液的植物, 尤其适合研究干旱、盐碱等逆境条件下的 L_o 值。用压力室对离体根逐渐增加压力, 渗出的木质部汁液收集在离心管中并称重。按上述公式计算 J_v , 以压力为横坐标, J_v 为纵坐标绘图, 斜率即为 L_o 值^[6]。

2 细胞水平上的测定

2.1 原生质体水平上的测定 用酶解法得到原生质体, 然后测定离体原生质体在非等渗溶液中的涨缩速率并结合 HgCl₂ 和 DTT 处理判别水孔蛋白在水分跨膜运输中的作用^[7]。Martínez-Ballesta 等^[6]把分离的原生质体悬浮液置于低渗溶液中并测定其体积膨胀, 通过与显微镜相连接的计算机和摄像机记录原生质体体积的改变, 记录 40~60 s (3 s·次⁻¹), 并计算出原生质体体积。水渗透度(water permeability, P_f)用公式 $P_f = V_o \cdot k / [S_o \cdot V_w (\text{osmol}_{\text{in}} - \text{osmol}_{\text{out}})]$ 计算^[6], V_o 是原生质体起始时的体积, S_o 是原生

收稿 2004-09-30 修定 2005-01-24

资助 国家自然科学基金(30270793)、国家“863”项目(2001AA244081)。

*通讯作者(E-mail: bswang@sndu.edu.cn, Tel: 0531-86180197)。

质体起始时的表面积, V_w 是水的偏摩尔体积, osmol_{in} 和 $\text{osmol}_{\text{out}}$ 分别是原生质体内外溶液渗透摩尔浓度, k 是膨胀起始阶段(2%的体积增加发生前)恒速率的拟合参数。另外, 根据原生质体在低渗溶液中的涨破时间, 也可以了解水孔蛋白的水转运特性。

2.2 质膜和液泡膜水平上的测定 先分离纯化质膜^[8]和液泡膜微囊^[9], 用停流光散射分光光度计(stopped-flow light scattering spectrophotometer)测定微囊在非等渗溶液中的体积改变^[10], 并计算 P_f 值。根据质膜和液泡膜微囊的 P_f 值、涨破时间和在非等渗溶液中体积改变图像, 可以了解质膜和液泡膜上的水孔蛋白的水转运特性。与整株水平上的测定相比, 方法 2.1 和 2.2 两种方法更加精确, 并能获得原生质体涨破全过程的图像, 而且能够分别了解质膜和液泡膜上的水孔蛋白的水转运特性, 但要求提取高纯度并且完整性较高的膜微囊。

2.3 脂质体重组技术 用脂质体重组技术可用于研究单一膜蛋白的功能和特性。分离纯化得到的水孔蛋白可用脂质体重组实验研究水的转运特性。这种方法在动物水孔蛋白研究中应用较多, Zeidel 等^[11]将纯化的CHIP28 重构于人工合成的脂质体中, 脂质体对水表现出极高的通透性(是对照的11倍)和选择性。植物水孔蛋白中用脂质体重组技术较少, 只有NOD26 曾有人作过此类分析^[12]。

3 分子水平上的测定

3.1 异源表达分析 有关水孔蛋白功能的研究大多用非洲爪蟾卵母细胞异源表达体系进行。将编码水孔蛋白的 mRNA 注射到卵母细胞中, 培养 2~3 d, 让其蛋白质得以合成并整合到质膜中。对照用的卵母细胞只注入水, 后放入低渗溶液中, 根据其于对照卵母细胞 P_f 的比较和发生破裂的时间来判别水孔蛋白的水转运特性^[4, 5]。

3.2 基因敲除突变体或反义基因技术 专一的编码水孔蛋白基因的敲除突变体, 可以精确地检测某种水孔蛋白的功能。拟南芥 *PIP2* 敲除突变体根皮层细胞的 L_0 下降^[13]。反义基因技术, 即通过减少某一水孔蛋白中 mRNA 和蛋白质的合成量来研究该水孔蛋白的生理功能, 观察不同发育阶段由于某一特定水孔蛋白的表达受抑而引起表型及水转运

特性的相应变化。Kaldenhoff 等^[14]用反义技术下调 *AtPIP1b* 表达后, 拟南芥突变体根细胞质膜的 P_f 值仅为野生型的1/3, 转基因植物根量却是野生型的5倍, 根系吸水能力与野生型相似。这两种方法的优点在于不需要通过异源表达体系而更加直接地阐明水孔蛋白的运输特性和生理功能。

3.3 Northern blot分析 用RNA杂交技术检测水孔蛋白基因在转录水平上的变化, 间接分析水孔蛋白变化及其与环境之间的关系。如在 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫条件下, 冰叶日中花液泡膜水孔蛋白 MIP-F 表达丰度下调(液泡内的水分流失减少), 而质膜水孔蛋白 MIP-C 的表达则上调(植物体对外界水分的吸收加强), 这种不同水孔蛋白的调控模式可能与植物对逆境的适应性有关^[15]。

3.4 Western blot分析 Western blot分析可以对水孔蛋白进行定位和其表达量检测。Vera-Estrella 等^[16]用不连续的蔗糖密度梯度方法分离到的膜微囊与抗冰叶日中花 MIPs 的几种抗体进行杂交的结果表明, 只有 MIP-F 完全分布在液泡膜上, MIP-C 则主要分布在质膜上, 液泡膜上也有少量分布, MIP-B 在质膜中的免疫信号很弱, 液泡膜中则有几条免疫反应带, 其中有一条被认为是 MIP-B 的二聚体形式; 未发现与 MIP-A 相应大小的免疫反应带。

3.5 融合基因技术 用报告基因与水孔蛋白基因融合也是检测水孔蛋白亚细胞定位的一种有效方法。Cutler 等^[17]用绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP): cDNA融合表达载体检测拟南芥 PIP2a 和 β -TIP 的亚细胞定位。Chaumont 等^[18]用融合基因技术发现拟南芥水孔蛋白 RD28-PIP 可以在真菌如 *Dictyostelium discoideum* 和前孢子(pre-spore) 中起作用, 并影响其正常的生长发育过程。

4 结束语

上述种种水孔蛋白介导水分运输及其分析测定技术在水孔蛋白功能及其调节机制研究中已得到人们的注视, 并已从不同研究问题的角度广泛采用。今后, 用这些方法研究的热点问题可能是: (1)水孔蛋白在植物逆境应答过程中的作用; (2)质膜和液泡膜以外的其它细胞膜水孔蛋白的特性和功能; (3)质膜和液泡膜上的两类水孔蛋白如何协调并共同完成调节细胞水分吸收和平衡的机制。

参考文献

- 1 Tyerman SD, Niemietz CM, Bramley H. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environ*, 2002, 25: 173~194
- 2 侯彩霞, 黄昊, 汤章城. 植物细胞的水孔蛋白. *植物生理学通讯*, 1997, 33(2): 151~156
- 3 朱美君, 康蕴, 陈珈等. 植物水通道蛋白及其活性调节. *植物学通报*, 1999, 16(1): 44~50
- 4 于秋菊, 吴镒, 林忠平等. 植物水孔蛋白研究进展. *北京大学学报*, 2002, 38(6): 855~866
- 5 Maurel C, Reizer J, Schroender JI et al. The vacuolar membrane protein γ -TIP creates water specific channel in *Xenopus* oocytes. *EMBO J*, 1993, 12: 2241~2247
- 6 Martínez-Ballesta MC, Martínez V, Carvajal M. Regulation of water channel activity in whole roots and in protoplasts from roots of melon plants grown under saline conditions. *Aust Plant Physiol*, 2000, 27: 685~691
- 7 Carvajal M, Cook DT, Clarkson DT. Responses of wheat plants to nutrient deprivation may involve the regulation of water-channel function. *Planta*, 1996, 199: 372~381
- 8 Yang HB, Chen M, Wang BS et al. Na⁺ exclusion mechanism of the Na⁺ exclusion sites in wheat seedlings. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2002, 28(3): 181~186
- 9 Wang BS, Lüttge U, Ratajczak R. Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa*. *J Exp Bot*, 2001, 52(365): 2355~2365
- 10 Ohshima Y, Iwasaki I, Suga S et al. Low aquaporin content and low osmotic water permeability of the plasma and vacuolar membranes of a CAM plant *Graptopetalum paraguayense*: comparison with radish. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42(10): 1119~1129
- 11 Zeidel ML, Nielsen S, Smith BL et al. Ultrastructure, pharmacologic inhibition, and transport selectivity of aquaporin channel-forming integral protein in proteoliposomes. *Biochem*, 1994, 33(6): 1606~1615
- 12 Rivers RL, Dean RM, Chandy G et al. Functional analysis of nodulin26, an aquaporin in soybean root nodule symbiosomes. *J Biol Chem*, 1997, 272(26): 16256~16261
- 13 Javot H, Maurel C. The role of aquaporins in root water uptake. *Ann Bot*, 2002, 90: 301~313
- 14 Kaldenhoff R, Grote K, Zhu JJ et al. Significance of plasmalemma aquaporins for water-transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1998, 14: 121~128
- 15 Kirch HH, Vera-Estrella R, Goldack D et al. Expression of water channel proteins in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol*, 2000, 123: 111~124
- 16 Vera-Estrella R, Barkla BJ, Bohnert HJ et al. Salt stress in *Mesembryanthemum crystallinum* L. cell suspensions activates adaptive mechanisms similar to those observed in the whole plant. *Planta*, 1999, 207(3): 426~435
- 17 Cutler SR, Ehrhardt DW, Griffiths JS et al. Random GFP: cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(7): 3718~3723
- 18 Chaumont F, Loomis WF, Chrispeels MJ et al. Expression of an *Arabidopsis* plasma membrane aquaporin in *Dictyostelium* results in hypoosmotic sensitivity and developmental abnormalities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(12): 6202~6209