

文章编号: 0529-6579 (2000) 03-0078-04

甜菜种子中线粒体的纯化研究^{*}

宋松泉¹, Kenneth M. FREDLUND², Ian M. MØLLER³

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;

2. Department of Seed Physiology, Novartis Seeds AB, S-26123 Landskrona, Sweden;

3. Department of Plant Physiology, Lund University, S-22100 Lund, Sweden)

摘 要: 吸胀 24 h 的甜菜 (*Beta vulgaris* L. cv. Loke) 种子线粒体通过差速离心和修改的 Percoll 梯度 (上部为 0.3 mol/L 甘露醇, 下部为 0.3 mol/L 蔗糖) 被纯化. 线粒体位于 Percoll 梯度的上部, 大约 30~35 mL 处. 细胞色素 C 氧化酶 (线粒体的标记酶) 活性、苹果酸脱氢酶活性和蛋白质含量主要分布在此部位.

关键词: 线粒体纯化; 修改的 Percoll 梯度; 细胞色素 C 氧化酶; 苹果酸脱氢酶; 甜菜 (*Beta vulgaris* L. cv. Loke) 种子

中图分类号: Q223.25 文献标识码: A

线粒体是植物细胞的主要细胞器, 是细胞内能量代谢和物质转化的中枢. 线粒体通过呼吸链的单电子载体产生活性氧, 其结构对氧化胁迫 (oxidative stress) 非常敏感^[1]. 氧化胁迫引起脂质过氧化、蛋白质氧化、线粒体 DNA (mtDNA) 突变, 以及细胞程序性死亡 (apoptotic death)^[1]. 在逆境条件下, 植物合成一些特定的蛋白质例如热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 70, Chaperonin (cpn) 60 和一些小相对分子质量的 HSPs. 这些蛋白的合成和积累能够: ①保护细胞和生物不受严重伤害; ②允许正常的细胞和生理恢复; ③导致较高水平的胁迫耐性^[2,3]. 已经在植物线粒体中发现了 HSP 70, cpn 60 和 HSP 22^[4]. 因此, 植物线粒体的提取和纯化涉及植物细胞的代谢、衰老和胁迫耐性等的研究.

因蔗糖能透过线粒体外膜, 在离心过程中可能导致线粒体的体积和密度发生渗透诱导的变化. Percoll, 一种用聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 包裹、直径为 15~20 nm 的胶体硅微粒溶液, 具有低粘性、低渗透性和无毒, 不吸附和透过膜等特性, 因此梯度中的微粒带具有更天然的特征^[5]. Percoll 几乎是一种高等植物线粒体分离的理想梯度材料^[5]. 本文以吸胀的甜菜 (*Beta vulgaris* L. cv. Loke) 种子为材料, 研究了线粒体的纯化及其部分酶的活性.

1 材料和方法

供试材料为甜菜 (*Beta vulgaris* L. cv. Loke) 种子, 由 Novartis AB (Landskrona) 提供.

^{*} 基金项目: 瑞典龙德大学和中山大学交流学资金资助项目

收稿日期: 1999-05-18; 作者简介: 宋松泉 (1957~), 男, 副教授.

1.1 种子吸胀

在一长方形的塑料盒中分别放入一层覆盖滤纸和一层具有 50 褶的折迭滤纸. 沿滤纸的边缘加入 40 mL 无离子水, 盖上盖子. 让水在滤纸中均匀渗透 2 h 后, 在离折迭滤纸边缘的 2~3 cm 处播种种子, 每褶 2 粒, 共 100 粒. 然后将覆盖滤纸的两端盖于折迭滤纸上, 再盖上盖子和用 Parafilm 密封, 置 20 °C 暗中吸胀 24 h.

1.2 线粒体的分离和纯化

所有的步骤都在 0~4 °C 下进行. 400 粒吸胀 24 h 的种子在预冷的提取缓冲液 (0.3 mol/L 蔗糖, 10 mmol/L MOPS, pH 7.2) 中匀浆, 匀浆液用 300 μ m 的尼龙膜过滤. 滤液用 1 000 $\times$ g 离心 10 min, 弃沉淀; 上清液用 41 400 $\times$ g 离心 30 min, 弃上清液, 沉淀悬浮于提取缓冲液中. 重复这 2 次离心步骤, 即得到粗线粒体.

粗线粒体 (含有线粒体, 过氧化物体和质体) 在一个自动产生的 Percoll 梯度中被分离. 先在离心管的底部加入 15 mL 溶液 A (含有 $\varphi = 30\%$ 的 Percoll, 0.3 mol/L 蔗糖, 10 mmol/L MOPS, pH 7.2), 然后泵入 21 mL 溶液 B (含有 $\varphi = 30\%$ Percoll, 0.3 mol/L 甘露醇, 10 mmol/L MOPS, pH 7.2). 2 mL 粗线粒体被铺在离心管的顶部, 41 400 $\times$ g 离心 30 min.

离心后, 用泵从离心管的底部开始收集 Percoll 梯度中的各个组分, 每个组分为 1 mL, 供分析.

1.3 蛋白质含量的测定

按 Lowry 等^[6]的方法, 以牛血清白蛋白为标准.

1.4 细胞色素 C 氧化酶 (cytochrome C oxidase, CCO; EC 1.3.9.1) 活性的测定

按 Rasmussen 和 Møller^[7]的方法.

1.5 苹果酸脱氢酶 (malate dehydrogenase, MDH; EC 1.1.1.37) 活性的测定

按 Møller 等^[8]的方法.

2 结 果

2.1 线粒体在 Percoll 梯度中的位置

粗线粒体在 $\varphi = 30\%$ Percoll 中经密度梯度离心后呈现 2 条明显的带 (图 1, I, II).

2.2 蛋白质含量的分布

400 粒甜菜种子在 20 °C 暗中吸胀 24 h 后, 其粗线粒体蛋白为 19.3 mg. 在 Percoll 中离心后, 蛋白质主要分布在 2 个区域: 1~2 mL 和 26~34 mL (图 2), 它们的蛋白质含量分别为 3.75 mg 和 9.58 mg, 占总粗线粒体蛋白的 20% 和 50%.

2.3 CCO 活性

CCO 是线粒体的标记酶^[5]. CCO 的活性主要分布在 30~35 mL 处, 占总 CCO 活性的 61.7% (图 3); 比活性在 34 mL 处最高, 每 mg 蛋白为 158.7 nmol $\cdot$ min⁻¹, 大约是粗线粒体比活性 (63.0 nmol $\cdot$ min⁻¹) 的 2.5 倍.

2.4 MDH 活性

MDH 活性在 Percoll 梯度中的分布主要在 1~3 mL, 18~21 mL 和 28~35 mL 处; 它们分别占 MDH 总活性的 14%, 9.4% 和 38% (图 4). 比活性在 8 mL 和 36 mL 处最高, 每 mg 蛋白分别为 1 419 和 1 162 nmol $\cdot$ min⁻¹; 但不是处于酶活性分布最多的部位.

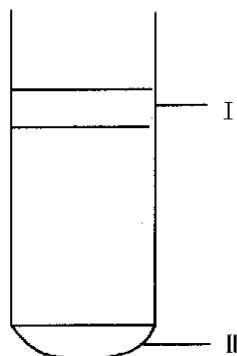


图 1 线粒体在 $\varphi=30\%$ Percoll 中经密度梯度离心 ($41\,000\times g$) 后的分布
Fig 1 Distribution of mitochondria after density-gradient centrifugation ($41\,000\times g$) on Percoll of a crude mitochondria

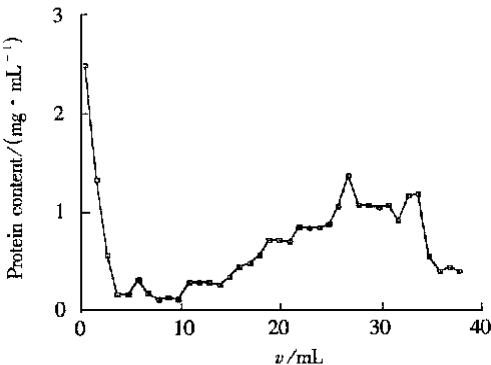


图 2 粗线粒体在 Percoll 中经密度梯度离心后蛋白质的分布
Fig 2 Distribution of protein after density-gradient centrifugation on Percoll of a crude mitochondria

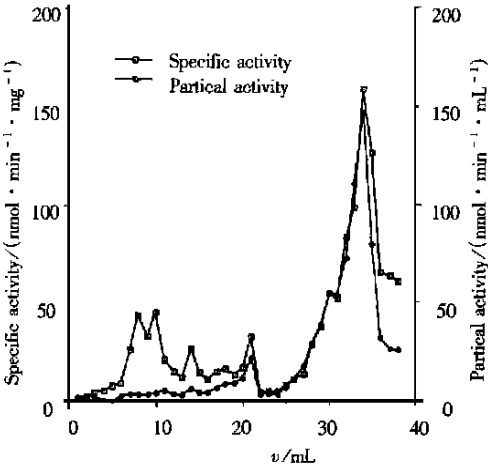


图 3 粗线粒体在 Percoll 中经密度梯度离心后 CCO 活性的分布
Fig 3 Distribution of CCO activity after density-gradient centrifugation on Percoll of a crude mitochondria

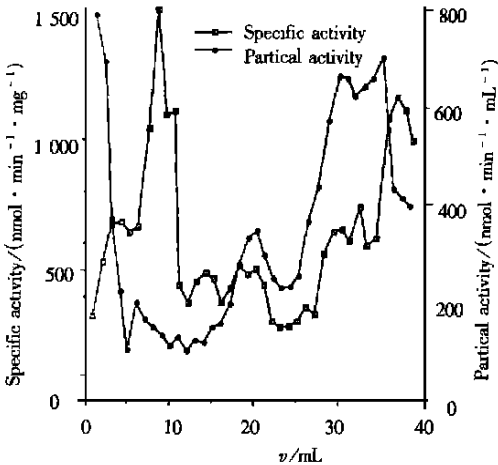


图 4 粗线粒体在 Percoll 中经密度梯度离心后 MDH 活性的分布
Fig 4 Distribution of MDH activity after density-gradient centrifugation on Percoll of a crude mitochondria

3 讨 论

在 Neuburger 等 (1982) 和 Douce 等^[5] 描述的纯化方法中, 为了获得纯的线粒体必须进行 2 个连续的 Percoll 梯度 (第 1 个梯度用 0.3 mol/L 蔗糖, 第 2 个梯度用 0.3 mol/L 甘露醇作为渗压剂) 分离. 由于甜菜种子 (实际上是果实) 非常小, 干粒质量约为 8.75 g; 加上从甜菜果实中分离种子非常困难; 把 2 个 Percoll 梯度合并为 1 个梯度, 即在一层含有 0.3 mol/L 蔗糖的 $\varphi=30\%$ Percoll 上铺上另一层含有 0.3 mol/L 甘露醇的 $\varphi=30\%$ Percoll. 其相对体积和 Percoll 浓度可以根据最适的分离效果进行改变. 这样通过减少一个梯度的操作和洗的步骤可以缩短纯化的时间, 以及提高线粒体的产量 (未显示数据).

线粒体的提取和纯化介质中一般都含有 $\rho=0.1\%\sim 1\%$ 的脱脂牛血清白蛋白 (BSA)^[3], 有的高达 3% ^[9]. BSA 能够与提取过程中由酰基水解酶作用形成的游离脂肪酸

结合, 脂肪酸例如油酸通过释放呼吸控制抑制 ATP 的合成. BSA 也是一种酚和醌的有效清除剂. 试验表明, 在甜菜种子线粒体的提取和纯化介质中可以省去 BSA, 其线粒体的 CCO 和 MDH 活性大致相似 (未显示数据). 但由于省掉了 BSA, 使得随后的线粒体蛋白的测定和电泳分析等变得方便.

粗线粒体在 $\varphi=30\%$ Percoll 梯度中, 其蛋白质主要分布在 26~34 mL (图 2); 线粒体标记酶 CCO 活性主要分布在 30~35 mL, 活性和比活性峰都位于 34 mL (图 3), 这与图 1 中的 I 相吻合; 根据 CCO 活性判断, 图 1 中的 I 是线粒体带.

线粒体、过氧化物体、乙醛酸循环体以及质体都含有 MDH 活性. MDH 活性在 Percoll 梯度中的分布具有 3 个部位 (图 4): 1~3 mL 可以认为是过氧化物体^[5], 28~35 mL 是线粒体 (由相应位置的 CCO 活性判断), 中间 (18~21 mL) 位置的 MDH 活性来源于哪种细胞器则不清楚. Attucci 等^[9]在用向日葵干种子提取线粒体时, 发现在 $\varphi=10\%$ Percoll 梯度中具有 2 层线粒体: 轻线粒体带和重线粒体带; 电镜观察表明, 重线粒体带被过氧化物体和质体污染. 本实验材料为吸胀 24 h 的甜菜种子, 是否也存在类似的重线粒体以及种子在萌发进程中重线粒体与轻线粒体的性质和相互关系值得进一步研究.

参考文献:

- [1] LENA Z G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1366: 53 ~ 57.
- [2] SABEHAT A, WEISS D, LURIE S. Heat-shock proteins and cross-tolerance in plants[J]. Physiol Plant, 1998, 103: 437 ~ 441.
- [3] SCHOFFL F, PRANDL R, REINDL A. Regulation of heat-shock response[J]. Plant Physiol, 1998, 117: 1135 ~ 1141.
- [4] LUND A A, BLUM P H, BHATTARAMAKKI D, et al. Heat stress response of maize mitochondria[J]. Plant Physiol, 1998, 116: 1097 ~ 1110.
- [5] DOUCE R. Mitochondria in higher plants: structure, function and biogenesis[M]. London: Academic Press Inc, 1985, 1 ~ 39.
- [6] LOWRY O H. Protein measurement with the follin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265 ~ 275.
- [7] RASMUSSEN A G, MØLLER I M. NADP-utilizing enzymes in the matrix of plant mitochondria[J]. Plant Physiol, 1991, 94: 1012 ~ 1018.
- [8] MØLLER I M, LIDEN A C, ERICSON L, et al. Isolation of submitochondrial particles with different polarities[J]. Methods Enzymol, 1987, 148: 442 ~ 453.
- [9] ATTUCCI S, CARDE J P, RAYMOND P, et al. Oxidative phosphorylation by mitochondria extracted from dry sunflower seeds[J]. Plant Physiol, 1991, 95: 390 ~ 398.

Mitochondrial Purification from Sugar Beet Seeds

SONG Song-quan^{*}, Kenneth M. FREDLUND, Ian M. MØLLER

Abstract: Mitochondria were purified from sugar beet (*Beta vulgar* L. cv. Loke) seeds which were imbibed for 24 h by differential centrifugation, followed by separation on a modified Percoll gradient containing 0.3 mol/L sucrose in the lower half and 0.3 mol/L mannitol in the upper half. Mitochondria band, the activities of cytochrome C oxidase (CCO, a marker enzyme of mitochondria) and malate dehydrogenase (MDH), and protein content were located at the upper fractions (about 30~35 mL) of this type of gradient.

Keywords: mitochondrial purification; modified Percoll gradient; CCO; MDH; *Beta vulgar* L. seed

^{*} School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China