

## 两相分配法制备南极红酵母质膜

刘均玲<sup>1\*</sup> 黄 勃<sup>1</sup> 方再光<sup>1</sup> 李光友<sup>2</sup> 缪锦来<sup>2</sup>

(1. 海南大学海洋学院 海口 570228)

(2. 国家海洋局第一海洋研究所海洋生物活性物质重点实验室 青岛 266061)

**摘 要:** 用葡聚糖 T-500(Dextran T-500)和聚乙二醇(PEG-3350)两相体系制备南极红酵母(*Rhodotorula* sp.)菌株 NJ298 的质膜。首先在 2 mmol/L KCl 浓度下, 选用 5 种不同的聚合物浓度(5.6%、5.8%、6.0%、6.2%、6.4 %, *W/W*), 研究了 NJ298 质膜在两相体系中的分配情况, 在此基础上进一步研究了 KCl 浓度(2 mmol/L、4 mmol/L、6 mmol/L、8 mmol/L、10 mmol/L)对 NJ298 质膜的纯度及得率的影响。结果表明, 选用 6.0% 聚合物浓度, 4 mmol/L KCl 的两相分配体系, 分离 3 次可得到相对纯度在 78.2% 的南极红酵母质膜组分, 标志酶鉴定及磷钨酸染色电镜检测均表明获得了高纯度密实的正向型的质膜囊泡。这为进一步研究该菌株的南极极端环境适应机制奠定了基础。

**关键词:** 南极红酵母, 质膜, 两相分配系统

## Isolation of Plasma Membrane of Antarctic Yeast by Two-phase Partition

LIU Jun-Ling<sup>1\*</sup> HUANG Bo<sup>1</sup> FANG Zai-Guang<sup>1</sup> LI Guang-You<sup>2</sup> MIAO Jin-Lai<sup>2</sup>

(1. The Ocean College of Hainan University, Haikou 570228)

(2. Key Laboratory of Marine Bio-active Substances, First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061)

**Abstract:** Plasma Membrane of Antarctic yeast *Rhodotorula* sp. NJ298 was purified from microsome in a two-phase aqueous system including Dextran T 500 and PEG 3350. The effects of the polymer and KCl concentration in the system on the plasma membrane partition were studied. The result indicated that the system with 6.0% (*W/W*) Dextran T 500 and PEG 3350, 4 mmol/L KCl was suitable for the plasma membrane isolation in *Rhodotorula* sp. NJ298. The electron micrograph stained with phosphotungstic acid and the purity identification analyzed by marker enzyme activities proved that the above two-phase system could obtain sealed positive plasma membrane vesicles with the purity of up to 78.2%. This paper was a basic about studying adaptation mechanism of *Rhodotorula* sp. NJ298 by isolation the plasma membrane.

**Keywords:** Antarctic yeast, Plasma membrane, Two-phase partition system

水双相分离系统是由 Albertsson<sup>[1,2]</sup>首先建立的, 是根据各种膜微囊表面电荷密度和疏水性的差异,

通过适当的相分配系统, 将一种膜微囊从其它成分中分离出来, 目前在生物膜的研究领域中被广泛应用。在质膜分离过程中, 两相分配体系的选择因分离的材料不同而各不相同, 这主要表现在多聚物浓度和盐浓度的选择。

南极红酵母 *Rhodotorula* sp. NJ298 生长在一个低温、高盐、强辐射、低光照和寡营养的封闭和半封闭的南极海冰环境中。质膜作为特殊的屏障把细胞与外界环境隔离开来, 南极的这些极端环境条件首先作用于细胞质膜。南极红酵母 NJ298 应对此作出适应性应答, 才能得以在这种极端环境中生存。

对南极红酵母 *Rhodotorula* sp. NJ298 质膜进行分离有助于揭示极端环境微生物的适应机制。目前, 关于水双相分离方法用于南极酵母质膜的分离尚未见报道。本研究通过对两相分配体系的多聚物浓度和盐浓度进行选择, 最后得到较高纯度南极红酵母 NJ298 质膜, 为在细胞水平研究南极微生物的极端环境适应机制提供了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种及培养

南极红酵母 NJ298 菌株是 2001 年~2002 年由国家海洋局第一海洋研究所海洋活性物质重点实验室分离自南极海冰(68°30'E, 65°00'S), 鉴定为红酵母(*Rhodotorula* sp.)。海水培养基中(蛋白胨 0.5%, 酵母膏 0.1%, pH 7.5)培养, 对数期接种, 接种量 5%, 在 10℃, 150×g 振荡培养 96 h 达稳定期后, 离心收集菌体。

### 1.2 南极红酵母 NJ298 质膜的制备

参照 Larsson<sup>[3]</sup>、阚光峰<sup>[4]</sup>的方法有所改动。以下操作均在 4℃ 下进行。

以 1 g NJ298 湿菌体, 加入 4 mL 匀浆缓冲液, 细胞破碎仪破碎细胞后, 10000×g 离心 10 min, 取上清液, 60000×g 离心 20 min, 弃上清, 所得沉淀即是含多种膜成分的粗膜制剂(Microsomal fraction, MF)。

粗膜制剂加入 1 mL 悬浮缓冲液, 将悬浮液加入两相系统(8 g 两相系统的配比为: 1.37 g 蔗糖, 2.4 mg DTT, 2 mmol/L~10 mmol/L KCl 0.4 mL, 5.6%~6.0% PEG-3350, Dextran T-500, 200 mmol/L pH 7.8 的 PBS 0.4 mL, 加 H<sub>2</sub>O 水至 8 g), 上下摇匀 50 次, 1500×g 离心 5 min。这时能看到清晰的上、下相界面, 用微量移液器取上相和下相继续进入两相系统, 分离 3 次

后合并上相, 稀释 5 倍, 100000×g 离心 30 min, 收集沉淀, 用悬浮缓冲液 1 mL 悬浮后即得纯化的质膜。

匀浆缓冲液配制: 500 mmol/L Hepes-KOH (pH 7.5), 0.5 mol/L 蔗糖, 3 mmol/L EDTA, 0.6% 聚乙烯吡咯烷酮(PVP), 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟化物(PMSF), 1 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT), 5 mmol/L 抗坏血酸(V<sub>C</sub>), 0.6% 牛血清白蛋白(BSA)。

悬浮缓冲液的配制: 5 mmol/L PBS(pH 7.5), 0.33 mmol/L 蔗糖, 4 mmol/L KCl, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 0.1 mmol/L EDTA。

稀释液的配制: 5 mmol/L PBS (pH 7.5), 0.33 mmol/L 蔗糖, 1 mmol/L DTT。

### 1.3 质膜蛋白质含量的测定

质膜蛋白含量的测定参照 Brandford 方法<sup>[5]</sup>, 测定时加入 0.01% 的 Triton X-100。

### 1.4 质膜纯度的检测

1.4.1 标志酶活性的检测: 质膜纯度的检测可根据 H<sup>+</sup>-ATPase 对各专一性抑制剂的敏感性来鉴定<sup>[6,7]</sup>。

以 pH 6.5 下对钒酸钠(Na<sub>3</sub>VO<sub>3</sub>)敏感的 ATP 酶(VO<sub>3</sub><sup>3-</sup>-ATPase), 作为质膜标志酶; 以 pH 8.0 下对叠氮钠(NaN<sub>3</sub>)敏感的 ATP 酶(NaN<sub>3</sub>-ATPase), 作为线粒体膜标志酶; 以 pH 8.0 下对硝酸钾(KNO<sub>3</sub>)敏感的 ATP 酶(NO<sub>3</sub><sup>3-</sup>-ATPase), 作为液泡膜标志酶。抑制剂 Na<sub>3</sub>VO<sub>3</sub>、NaN<sub>3</sub>、KNO<sub>3</sub> 的浓度, 分别为 0.1 mmol/L、1 mmol/L、100 mmol/L。ATP 酶活性测定参考 Delhez 等<sup>[8]</sup>和 Briskin 等<sup>[9]</sup>的方法检测。反应体系为(120 μL): 50 mmol/L Mes-Tris (pH 6.5 和 pH 8.0), 330 mmol/L 蔗糖, 3 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L 钼酸铵, 及 20 μg 膜蛋白的膜制剂, 0.02% Triton X-100, 以不加 Triton X-100 为对照。抑制剂敏感性指加入抑制剂后被抑制的 H<sup>+</sup>-ATPase 活力占总的 H<sup>+</sup>-ATPase 活力的百分比, 即敏感性(%)=被抑制的 H<sup>+</sup>-ATPase 活力/总 H<sup>+</sup>-ATPase 活力×100%。

1.4.2 磷钨酸染色检测质膜纯度: 制备的质膜首先用 2.5% 的戊二醛(0.1 mmol/L 磷酸缓冲液配制, pH 7.2)固定, 0.1 mmol/L 磷酸缓冲液洗 3 次, 1%(W/V)钨酸(0.1 mmol/L 磷酸缓冲液配制)于 0℃ 固定 3 h, 然后用乙醇以 10% 的递增率逐级脱水, 丙酮浸泡过夜, 环氧树脂包埋, 70℃ 聚合 8 h。70LKB-NOVA 型超薄切片机切片, 染色, 最后用 HITACHI H-7000 型电镜观察并拍照。

以上实验均设 3 个重复。

2 结果

2.1 两相体系中聚合物浓度的确定

不同聚合物浓度分离南极红酵母 NJ298 质膜结果, 如图 1 所示。可以看出, 聚合物浓度不同, 质膜在上相的分配情况有明显差异。在 KCl 浓度为 2 mmol/L 的两相体系中, 随聚合物浓度从 5.6% 逐渐增加到 6.4%, 蛋白质产率下降, 而 H<sup>+</sup>-ATPase 对钒酸钠的敏感性先升后降, 聚合物浓度为 6.0%(W/W) 时抑制敏感性最大, 达 76.3%。已知钒酸盐是质膜 ATPase 的专一性抑制剂, 上相中的 ATPase 对其敏感性越高说明该组分中的质膜微囊越纯。为此, 选用 6.0% (W/W) 的聚合物浓度较为合适。

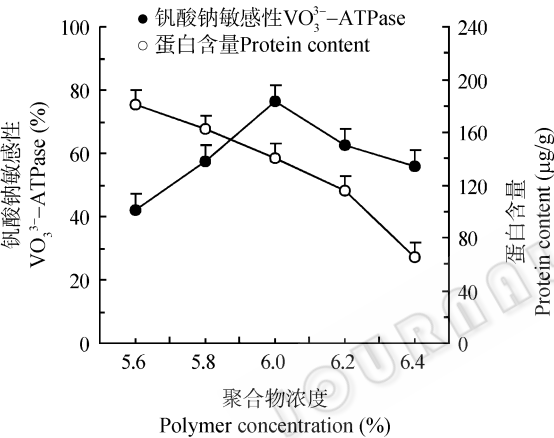


图 1 不同聚合物浓度对质膜组分在两相体系中的分配的影响  
Fig. 1 Effect of polymer concentration on partition of plasma membrane in two-phase system

2.2 两相体系中 KCl 浓度的确定

KCl 浓度对南极红酵母 NJ298 质膜分离的影响, 结果见图 2。可以看出, 蛋白产率随 KCl 浓度升高而下降, 而 H<sup>+</sup>-ATPase 对钒酸钠的敏感性在 KCl 浓度为 4 mmol/L 时达最大 78.3%, 为此选用 4 mmol/L KCl 浓度较适宜。

2.3 质膜纯度的检测结果

粗膜制剂经过 6.0% (W/W) 聚合物和 4 mmol/L KCl 的两相体系 3 次两相分配后, 得到的 U3 组分即为纯化后的质膜, 如表 1。结果显示, 微粒体经过 3 次分相纯化, 膜蛋白只有原来的 12.6%, 但是质膜

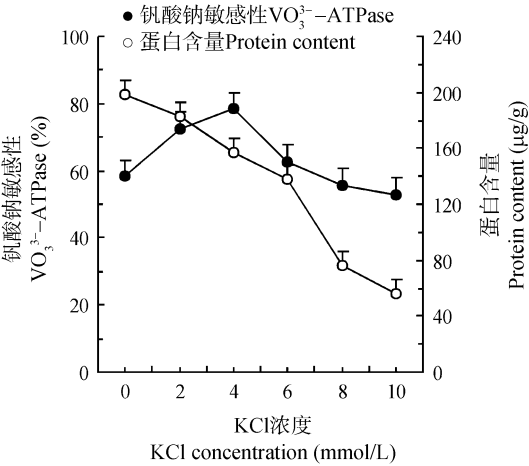


图 2 不同盐浓度对质膜组分在两相体系中的分配的影响  
Fig. 2 Effect of KCl concentration on partition of plasma membrane in two-phase system

的标志酶 VO<sub>3</sub><sup>3-</sup>-ATPase 的活力保留了 76.1%。这说明, 上相收集了绝大部分质膜。

把质膜标志酶对各专一性抑制剂的敏感性, 作为鉴定质膜相对纯度的标准。据 [10, 11] 报道, 当质膜 H<sup>+</sup>-ATPase 对钒酸钠的敏感程度达到 60% 时, 细胞质膜的纯度就达到较高水平。纯度检测结果见表 2。可以看出, U3 组分对不同抑制剂具有不同的反应, 经过 3 次纯化, 两相体系的上相富含质膜组分。分离纯化的质膜组分中仅含少量内膜, 如液泡膜 5.0%, 线粒体膜 2.1%, 而质膜组分的相对纯度在 78.2%, 比微粒体组分提高了 76.9%。因此, 通过两相法分离纯化质膜, 可以得到大部分质膜, 去除绝大部分杂质。

通过测定 VO<sub>3</sub><sup>3-</sup>-ATPase 的潜在活性大小可鉴定所纯化质膜囊泡的类型。实验结果表明, 0.02% 的 Triton X-100 可使 U3 组分的 VO<sub>3</sub><sup>3-</sup>-ATPase 的酶活性提高 67% 左右, 这说明分离纯化的南极红酵母 NJ298 质膜囊泡封闭性较好, 基本上为正向封闭囊泡。

表 1 质膜组分蛋白产率和标记酶活性在两相系统中的分配				
Table 1 Distribution of protein and plasma membrane mark VO <sub>3</sub> <sup>3-</sup> -ATPase in PM fraction obtained by two-phase system				
项目 (%) Item	微粒体 Microsome	上相组分 Upper fractions		
		U1	U2	U3
VO <sub>3</sub> <sup>3-</sup> -ATPase 相对酶活 VO <sub>3</sub> <sup>3-</sup> -ATPase relative activity	100	91.8	83.5	76.1
相对蛋白含量 Relative protein content	100	36.5	25.8	12.6

注：表中数据为 3 次实验的均值。

表 2 两相体系纯化后 U3 质膜和微粒体的纯度			
Table 2 Purity of plasma membrane by two-phase system between microsome fraction and U3			
标志酶敏感性 Mark enzyme sensitivity	特异部位 Specific fraction	微粒体 Microsome	质膜组分 Plasma membrane fraction
VO <sub>3</sub> <sup>3-</sup> -ATPase (pH 6.5)	质膜	44.2	78.2
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -ATPase (pH 8.0)	液泡膜	18.1	5.0
NaN <sub>3</sub> -ATPase (pH 8.0)	线粒体膜	7.2	2.1

注：表中数据为 3 次实验的均值。

磷钨酸染色法检测结果如图 3。图中所示是 6.0 % (W/W) 聚合物和 4 mmol/L KCl 两相系统纯化 3 次后得到的 U3 组分，可以看出磷钨酸使绝大部分 U3 组分着色，证明 U3 为质膜，而且囊泡大小较均匀。

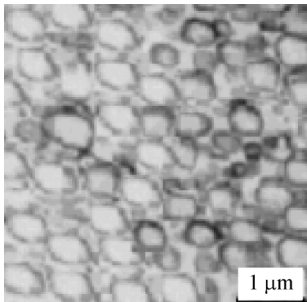


图 3 南极红酵母 NJ298 质膜电镜图  
Fig. 3 Electron micrograph of *Rhodotorula* sp. NJ298 palasma membrane

综合以上实验结果得出，分离南极红酵母 NJ298 质膜，选用 6.0% (W/W) 聚合物和 4 mmol/L KCl 的两相体系，既能保证较高的蛋白产率，又可以得到较高纯度的质膜。

3 讨论

水双相分离系统是利用膜的不同表面特征进行分离。自从 Widell 等<sup>[12]</sup>报道应用水双相分离法成功分离到植物细胞质膜后，该方法已被广泛应用于各种生物膜的分离。并且由于操作简单、灵敏度高，水双相分离系统还可用于分离蛋白、核酸、生物膜以及各种细胞器<sup>[13]</sup>。该项技术现已应用于细菌<sup>[14]</sup>、真菌<sup>[15]</sup>、藻<sup>[16]</sup>以及高等植物<sup>[17, 18]</sup>和动物<sup>[19]</sup>，并且得到了较好的分离效果。另外，一些应用包括密度梯度离心所得质膜中高尔基体残片、内质网或液泡膜等污染物也能去除，还能进行外翻和内翻线粒体膜的

制备<sup>[20]</sup>。  
水双相分离的效果据材料不同有很大差异，这取决于聚合物浓度、盐浓度、上下相的体积比、温度、pH 值及分离量等，而聚合物浓度和盐浓度是最主要的影响因素<sup>[21, 22]</sup>。本研究对聚合物浓度和 KCl 浓度进行了选择，确定采用 6.0% 聚合物浓度和 4 mmol/L 盐的两相分配体系适宜南极红酵母 NJ298 质膜分离，得到纯度为 78.2% 的质膜，但这与 Kopperschlager<sup>[15]</sup>报道的不同，这主要是由于制备材料的来源不同，因而其组织膜微囊表面特性不同而需要选择不同的两相分配体系的缘故。因此，在制备不同生物或相同生物不同部位的质膜时，应首先建立适合的分离体系，以保证制备质膜组分的纯度和产率。

参 考 文 献

[1] Albertsson PA, Andersson B, Larsson C, *et al.* Phase partition-a method for purification and analysis of cell organelles and membrane vesicles. *Methods of Biochemical Analysis*, 1982, **28**: 115-150.

[2] Albertsson PA. Particle fractionation in liquid two-phase systems, composition of some phase systems and the behavior of some model particles in them. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1958, **27**: 378-395.

[3] Larsson C. Cell components: plasma membrane. *Modern Methods Plant Analysis*, New Series, 1985, **1**: 84-104.

[4] 阚光峰. 南极冰藻 *Chlamydomonas* sp. L4 的逆境适应性及其抗逆蛋白质组学的研究. 中国海洋大学博士学位论文, 2005.

[5] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**: 248-254.

[6] Larsson C, Mollér IM. The plant membrane. Germany: Springer-Verlag Berlin Herdelberg press, 1990, pp.44-75.

[7] 王延枝, 许献忠. 空泡膜类型 H<sup>+</sup>-ATPase 的研究进展. 生物化学与生物物理进展, 1993, **20**(1): 19-23.

[8] Delhez J, Dujour JP, Thines D, *et al.* Comparison of the properties of plasma membrane: Bound and mitochondria bound ATPase in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *European Journal of Biochemistry*, 1977, **79**: 319-328.

[9] Briskin DP, Leonard RT, Hodges TK. Isolation of the plasma membrane: membrane markers and general principles. *Methods Enzymol*, 1987, **148**: 542-558.

[10] 邱全胜, 苏雪峰. 小麦根质膜 H<sup>+</sup>-ATPase 的部分纯化. 植物学报, 1999, **41**(6): 629-632.

- [11] Awasthi V, Misra P. Interference in yeast plasma membrane protein estimation by Percoll. *Analytical Biochemistry*, 2001, **294**: 83–87.
- [12] Widell S, Larsson C. Separation of presumptive plasma membranes from mitochondria by partition in an aqueous polymer two-phase system. *Plant Physiology*, 1981, **51**: 368–374.
- [13] Walter H, Johansson G. *Aqueous Two-Phase Systems*, New York: Academic Press, 1994.
- [14] Schütte H, Schustolla D, Hustedt H. Extraction and purification of leucine dehydrogenase from *Bacillus cereus*. *Methods in Enzymology*, 1994, **228**: 608–616.
- [15] Kopperschläger G. Phosphofructokinase from Baker's Yeast. *Methods in Enzymology*, 1994, **228**: 144–153.
- [16] Flynn KJ, Öpik H, Syrett PJ. The isolation of plasma membrane from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* using an aqueous two-polymer phase system. *Journal of General Microbiology*, 1987, **133**: 93–101.
- [17] 朱美君, 陈 珈, 朱庆鸿, 等. 两相分配法制备玉米根质膜及其纯度鉴定. *生物化学杂志*, 1997, **13**(6): 686–690.
- [18] 胡章立, 荆家海. 两相法分离玉米幼苗叶片生长部位质膜. *西北植物学报*, 1998, **18**(1): 83–89.
- [19] Joelsson M, Tjerneld F. Purification of lactate dehydrogenase from pig muscle by affinity partitioning. *Methods in Enzymology*, 1994, **228**: 136–143.
- [20] Morre DJ, Morre DM. Applications of aqueous two-phase partition to isolation of membranes from plants: A periodic NADH oxidase activity as a marker for right side-out plasma membrane vesicles. *Journal of Chromatography B*, 2000, **743**(1): 369–376.
- [21] Larsson C, Widell S, Kjellbom P. Preparation of high-purity plasma membranes. *Methods in Enzymology*, 1987, **148**: 558–568.
- [22] 王细娥, 张丽军, 谢锦云, 等. 蛋白质组研究中细胞质膜的纯化和纯度鉴定研究进展. *生命科学研究*, 2006, **10**(2): 15–20.

## 稿件书写规范

### 高等院校教学栏目简介及撰稿要求

“高等院校教学”是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教學类栏目,也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为高等院校教师开辟,是生物学教学研究、交流和提高的园地。

本栏目的文章有别于其他实验类研究报告,特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线,撰写的稿件内容必须要有新意、要实用,不是泛泛地叙述教学设计与过程,而是确实有感而发,是教学工作中的创新体会,或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性,做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进,注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中,只有这样才能真正起到教与学的互动,促进高校生物学教学的发展,更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时,为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台,本栏目还开辟了“名师讲堂”版块。旨在通过推广名家的教学经验,帮助青年教师尽快成长,进一步提高教学质量。欢迎获得国家级“名师奖”或教育部“精品课程”等奖项的专家教授们积极撰稿,将你们在教学领域获得的经验和成功体会通过这个栏目展示出来。对于入选“名师讲堂”版块的文章,本刊将开辟快速审稿通道,优先发表,并免收审理费和版面费,支付优厚的稿酬。刊发时还将在正文前附作者简介和大幅彩照,以鼓励和褒奖教学名家不吝赐稿,让所有的读者分享他们的经验和心得。

欢迎投稿!欢迎对本栏目多提宝贵意见!