脂肪酸对盐胁迫大麦根系质膜结合多胺含量和膜上 Na^+/H^+ 逆向运输的影响

赵福庚 束怀瑞

(山东农业大学园艺学院, 泰安 271018. E-mail: fgzhao@sdaa.edu.cn)

摘要 用 200 mmol/L NaCl 处理大麦品种“鉴 4”(*Hordeum vulgare* L cv J4)幼苗 6 d, 根系质膜微囊磷脂含量、膜上共价键和非共价键结合多胺含量以及膜结合酶 H^+ -ATPase 活性均显著下降, 并检测到大麦根系质膜上 Na^+/H^+ 逆向运输活性. 1 mmol/L 外源棕榈酸($\text{C}_{16:0}$)和亚油酸($\text{C}_{18:2}$)部分恢复了盐胁迫导致的膜磷脂、膜上非共价键结合多胺含量及膜结合酶活性的下降, $\text{C}_{18:2}$ 的恢复作用大于 $\text{C}_{16:0}$, 而且 $\text{C}_{18:2}$ 还能部分恢复膜蛋白上共价键结合多胺含量. 外源施用 $\text{C}_{16:0}$ 和 $\text{C}_{18:2}$ 可使盐诱导的质膜 Na^+/H^+ 的逆向运输活性加强, $\text{C}_{18:2}$ 的作用大于 $\text{C}_{16:0}$. 相关分析显示, 盐胁迫后外施 $\text{C}_{16:0}$ 和 $\text{C}_{18:2}$, 质膜上磷脂含量、膜上非共价键结合多胺含量、膜结合酶 H^+ -ATPase 活性以及膜上 Na^+/H^+ 逆向运输活性间均呈显著正相关关系, 说明外源脂肪酸缓解盐害效应的机制之一是通过提高膜上磷脂含量, 进一步提高膜结合多胺含量, 增强膜的完整性, 改变膜的带电状态, 从而使膜结合酶活性提高并刺激了 Na^+/H^+ 逆向运输蛋白的合成.

关键词 脂肪酸 质膜微囊 多胺 Na^+/H^+ 逆向运输 大麦

维持细胞内离子动态平衡是植物在盐胁迫下生存的基础. 大麦是一种典型的耐盐作物, 已证明液泡膜上的质子泵及其 Na^+/H^+ 逆向运输活性在盐分的选择吸收、盐分在大麦体内和细胞内区域化分配中起着关键性的作用^[1]. 有关高等植物液泡膜 Na^+/H^+ 逆向运输的研究已有很多^[2,3], 而对于质膜 Na^+/H^+ 逆向转运体的研究明显落后于液泡膜, 目前仅在盐生植物滨藜和海洋单细胞藻类质膜上发现了逆向转运体的存在^[4,5]. 最近, Shi 等人^[6]从拟南芥中克隆了 *SOS1* 基因, 并认为它编码了质膜 Na^+/H^+ 逆向转运体. 本文采用双相分配法分离和纯化质膜微囊, 并用非离子型去污剂 Brij 58(聚氧乙烯 20 十六醚)处理, 获得了高度纯化密封的翻转型质膜微囊(inside-out plasma membrane vesicles), 检测到了耐盐大麦根系质膜微囊上的 Na^+/H^+ 逆向运输活性.

多胺是调控植物生长和发育的重要生理活性物质, 其生物合成能力缺失的突变体不能完成正常的生长发育^[7]. 在盐胁迫下, 外源施用适量浓度的多胺能在一定程度上缓解盐害效应^[8]. 在生理条件下, 多胺主要以带电荷的氨基和亚氨基通过离子键、氢键和疏水作用等非共价键形式与大分子相互作用. 由于生物膜上的磷脂带负电荷, 多胺分子与其静电吸引, 构成膜上非共价结合的多胺. 多胺还可以在转谷氨

胺酶的作用下与蛋白质共价键结合形成蛋白质-Gln-PA(多胺)复合物^[9]. 我们已经直接从大麦幼苗质膜和液泡膜微囊上检测到了共价键和非共价键结合的多胺, 盐胁迫下两种形态多胺的含量有明显变化^[10]. 实验表明, 外施饱和度不同的脂肪酸能够降低大麦幼苗对 Na^+ 的吸收和向地上运输, 以降低根系电解质渗漏率, 缓解盐害效应^[11]. 本研究以耐盐大麦品种“鉴 4”为材料, 检测了饱和度不同的脂肪酸(棕榈酸和亚油酸)处理下质膜上两种形态多胺的含量和质子泵、 Na^+/H^+ 逆向运输活性的变化, 探讨了盐胁迫下多胺与质膜膜脂及膜蛋白的相互作用机制, 为减轻盐害寻找一条有效途径.

1 材料与方法

(i) 材料培养和处理. 将供试大麦品种“鉴 4”种子消毒浸种催芽后, 点播于石英砂中, 培养液为 1/2 Hoagland 液, 昼夜温度分别为 $(20 \pm 3)^\circ\text{C}$ 和 $(12 \pm 2)^\circ\text{C}$, 自然光照. 幼苗长至一叶一心时进行如下培养处理: (1) 对照(1/2 Hoagland 液); (2) 1/2 Hoagland 液 + 200 mmol/L NaCl; (3) 1/2 Hoagland 液 + 200 mmol/L NaCl + 1 mmol/L $\text{C}_{16:0}$; (4) 1/2 Hoagland 液 + 200 mmol/L NaCl + 1 mmol/L $\text{C}_{18:2}$ (在脂肪酸中加少量吐温 80, 经超声破碎后加入培养液中, 调培养液 pH 5.6). 6 d 后取根系测定, 试验

重复 3 次.

(ii) 质膜微囊的分离和纯化. 参照 Sandstrom 等人^[12]的双相分配法, 以大麦幼根为材料, 差速离心得质膜微囊粗提液. 用双相分配法纯化质膜, 双相系统的上相为 6.5% PEG-4000, 下相为 6.5% Dextran T-500, 样品系统含 5 mmol/L KCl, 0.25 mol/L 蔗糖, 5 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 7.8. 其过程为: 在盛有两相体系的试管 A 中加入质膜微囊粗提液后充分混匀, 1000 × g 离心 5 min 分相, 取 90% 上相小心转移到含有同样体积的新鲜下相(试管 B)中, 重复操作 3 次, 收集第 3 次离心后的上相并稀释 5 倍, 100000 × g 离心 30 min, 收集沉淀并悬浮, 所得即为纯化的质膜微囊. 通过检测钒酸钠和硝酸盐敏感的 ATPase 活性来检验所提取质膜微囊的纯度.

(iii) 质膜蛋白的溶解和提取以及膜结合多胺含量测定. 膜蛋白的溶解和提取参照 Zhao 等人^[10]的方法. 在提取的可溶性膜蛋白溶液中加入 PCA(高氯酸)至终浓度为 5%, 27000 × g 离心 40 min, 将沉淀用 5% 的 PCA 悬浮后与 12 mol/L HCL 等体积混合, 110℃ 水解 24 h. 水解液过滤后于 70℃ 干燥, 再用等体积 5% 的 PCA 溶解, 该溶解液中含有膜蛋白共价结合的多胺. 向提取的膜微囊制剂中直接加入 5% PCA, 以沉淀除去蛋白质组分, 27000 × g 离心 40 min, 膜微囊上非共价键结合的多胺位于上清液中. 将上述两种上清液按 Santa-Cruz 等人^[13]的方法进行苯甲酰化衍生, 苯甲酰化多胺用 Spectra-physics 型高效液相色谱仪(Wakopa 反向 C-18 分离柱 250 mm × 4.6 mm, Focus 型紫外检测器, 于 254 nm 下紫外检测)进行分析, 流动相为甲醇: 水(64: 36), 流速 0.7 mL/min, 上样体积 10 μL, 温度 25℃, 灵敏度 0.04. 多胺含量单位以 nmol·mg⁻¹ 蛋白表示.

(iv) Brij 58 处理. Brij 58(Sigma 公司)用前配制. 先用缓冲液(含 10 mmol/L Hepse-NaOH, pH 7.4, 70 mmol/L NaCl)配成 1% 的浓缩液, Brij 58 与膜蛋白含量的比例为(10~12): 1^[14]. 本试验中 Brij 58 的终浓度为 0.05%. 冰浴处理 30 min 后, 100000 × g 离心 1 h, 沉淀用质膜微囊悬浮液悬浮, 所得即为翻转质膜微囊样品.

(v) 质膜微囊 H⁺-ATPase 活性及磷脂含量的测定. 质膜微囊 H⁺-ATPase 活性的测定参照 Wang 等人^[15]的方法. 膜磷脂含量测定参照 Yu 等人^[11]的方法.

(vi) 质子转运活性和 Na⁺/H⁺ 逆向运输活性的测

定. 参照 Garbarino 等人^[16]的喹丫因(quinacrine)猝灭法, 用 Shimadzu TB-85 荧光分光光度计测定, 激发波长为 425 nm, 发射波长为 500 nm. 反应体系含 250 mmol/L 甘露醇, 16 mmol/L Hepes, 50 mmol/L KCl, 1 mmol/L EGTA, 3 μmol/L quinacrine, 2 mmol/L ATP, 1 mmol/L MgCl₂ (Tris 调 pH 7.5), 适量膜微囊(每个分析约 20 μg 蛋白). 质子泵由 1 mmol/L Tris-ATP 启动, 荧光猝熄以 $\Delta F/F \times 100\%$ 表示, 其中 ΔF 为荧光变化量, F 为总荧光量, 质子转运活性则用 $\Delta F/F \times 100\%$ 表示, 单位为 mg⁻¹ · min⁻¹. 当质子梯度变化趋于平衡(即达到最大质子梯度)时, 加入 2 mmol/L EDTA-Tris 以整合 Mg²⁺. 当荧光猝灭值稳定后加入葡萄糖酸钠至终浓度为 25 mmol/L, 待加入 Na⁺ 以后荧光恢复值计为 $\Delta F'$, 则 Na⁺/H⁺ 逆向运输活性以 $\Delta F'/\Delta F \times 100\%$ 表示, 单位为 mg⁻¹ · min⁻¹.

2 结果

2.1 质膜微囊纯度检验及 Brij 58 处理对质膜微囊翻转比例的影响

对钒酸钠敏感的 ATPase 和对硝酸盐敏感的 ATPase 分别是质膜和液泡膜上的标记酶. 实验结果证明, 双相分配法提取的质膜微囊上 ATPase 活性能被钒酸钠抑制 92%, 而仅被 NaNO₃ 抑制 3%(表 1), 可见所提取的质膜微囊纯度很高, 基本排除了液泡膜微囊的干扰.

由于质膜微囊 H⁺-ATPase 的结合位点位于内侧, 即靠近细胞质一侧, 密闭的原位质膜微囊上的 H⁺-ATPase 因不能与外源底物 ATP 结合而不表现水解 ATP 活性, 而翻转的质膜微囊则正好相反. Triton X-100 是一种非离子型去污剂, 加入到酶反应体系中可把膜蛋白从膜脂上溶解下来, 从而破坏质膜微囊结构, 使其产生泄漏, 这样外源 ATP 可进入微囊内部, 膜上 H⁺-ATPase 即表现水解活性. 加入 Triton X-100 之后, H⁺-ATPase 活性提高部分占含 Triton X-100 时该酶活性的百分数称作潜在酶活性(latency), 它代表质膜微囊中原位膜微囊所占的比例. Brij 58 也是一种非离子型去污剂, 与 Triton X-100 不同的是, 它可以使原位质膜微囊转变成翻转膜微囊而又不破坏其密闭性^[14]. 我们以未进行盐处理的大麦根系为材料, 检测了质膜微囊经 0.05% Brij 58 处理后 H⁺-ATPase 的潜在酶活, 结果表明, 双相分配法制备的质膜微囊潜在酶活在 84% 以上, 即翻转膜微囊所占的比例

(翻转比例)仅为 16%, 这与前人研究结果一致^[17]. 然而, Brij 58 处理后质膜微囊的翻转比例则上升了 6 ~ 7 倍, 有 95% 以上的膜微囊为翻转膜微囊(表 1). 可见, Brij 58 是用来进行质膜翻转研究的理想材料.

表 1 质膜微囊纯度检验及 Brij 58 处理对质膜微囊翻转比例的影响

处 理	H ⁺ -ATPase 活性 ^{a)} /mol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹
对照	6.21 ± 1.02
Triton X-100	40.31 ± 5.79
钒酸钠(0.1 mmol/L) + Triton X-100	3.32 ± 1.21 (92%)
NaNO ₃ (50 mmol/L) + Triton X-100	38.94 ± 6.42(3%)
对照的潜在酶活(%)	84.59
对照的膜翻转比例(%)	15.41
Brij 58 处理	38.67 ± 6.34
Brij 58 处理潜在酶活(%)	4.06
Brij 58 处理膜翻转比例(%)	95.94

a) 平均值 ± 标准差, 下同

2.2 不同饱和度脂肪酸对盐胁迫大麦根系质膜上两种形态多胺含量的影响

200 mmol/L NaCl 处理大麦幼苗 6 d, 以非共价键形式与根系质膜微囊结合的多胺含量下降 27%, 其中亚精胺(Spd)含量下降 38%($P < 0.05$). NaCl 处理的同时添加 1 mmol/L C_{16:0}, 非共价键结合多胺含量比用 NaCl 单独处理高 14%, 其中 Spd 含量上升 29%, 如果 NaCl 处理的同时添加 1 mmol/L C_{18:2}, 则比用 NaCl 单独处理时上升 27%, 但仍低于对照(表 2).

NaCl 处理后与大麦根系质膜蛋白共价键结合的多胺含量下降 33%, 其中腐胺(Put)含量下降 39% ($P < 0.05$). 添加 1 mmol/L C_{16:0}, 膜蛋白上共价键结合多胺含量没有明显变化. 添加 1 mmol/L C_{18:2}, 则共价键结合多胺含量比 NaCl 单独处理时上升 29%(表 2).

2.3 不同饱和度脂肪酸对盐胁迫大麦根系质膜磷脂含量的影响

NaCl 处理后, 根系质膜磷脂含量下降 33% ($P < 0.05$), 添加 1 mmol/L C_{16:0}后, 比用 NaCl 单独处理上升 27%; 添加 1 mmol/L C_{18:2}, 则比单独 NaCl 处理上升 53% ($P < 0.01$), 几乎与对照持平(图 1).

相关分析显示, 脂肪酸处理后质膜上磷脂含量与膜上非共价键结合多胺含量间呈极显著正相关关系, 相关系数为 0.970 ($r_{0.01} = 0.959, n = 4$).

2.4 不同饱和度脂肪酸对盐胁迫大麦根系质膜 H⁺-ATPase 活性的影响

质膜 H⁺-ATPase 是形成跨膜质子电化学梯度的关键酶, NaCl 处理后, 质膜 H⁺-ATPase 活性下降 19%. 添加 1 mmol/L C_{16:0}, H⁺-ATPase 活性比用 NaCl 单独处理略有上升, 但不明显; 添加 1 mmol/L C_{18:2} 后, 则 H⁺-ATPase 活性比用 NaCl 单独处理上升 17%(图 2).

相关分析显示, 脂肪酸处理后质膜上 H⁺-ATPase 活性与膜上非共价键结合多胺含量间呈极显著正相关关系, 相关系数为 0.967 ($r_{0.05} = 0.878, r_{0.01} = 0.959, n = 4$), 与共价键结合多胺含量间呈显著正相关关系, 相关系数为 0.940.

2.5 不同饱和度脂肪酸对盐胁迫大麦根系质膜质子转运活性和 Na⁺/H⁺逆向运输活性的影响

质膜上的质子泵 H⁺-ATPase 具有水解 ATP 和向微囊内泵运质子的功能. 泵入膜微囊内的质子与碱性的 quinacrine 结合, 荧光猝灭. 猝灭值越大, 表明进入微囊内的质子越多, 质子转运活性越高. 若膜微囊泄漏, 则荧光猝灭值变小. 本研究中经不同饱和度和脂肪酸处理后, 质膜质子转运活性变化程度与 H⁺-ATPase 活性的变化基本一致, 说明双相分配法制

表 2 不同饱和度脂肪酸对盐胁迫大麦根系质膜微囊两种形态多胺含量的影响

多胺/nmol·mg ⁻¹	处 理			
	对照	NaCl	NaCl + C _{16:0}	NaCl + C _{18:2}
非共价键结合多胺				
Put ^{a)}	0.406 ± 0.107	0.345 ± 0.055	0.346 ± 0.092	0.386 ± 0.114
Spd ^{b)}	0.536 ± 0.153	0.334 ± 0.086	0.433 ± 0.121	0.487 ± 0.105
Spm ^{c)}	0.028 ± 0.008	0.022 ± 0.008	0.020 ± 0.006	0.022 ± 0.008
总和	0.970 ± 0.268	0.701 ± 0.149	0.799 ± 0.219	0.895 ± 0.227
共价键结合多胺				
Put	0.067 ± 0.018	0.041 ± 0.011	0.049 ± 0.012	0.059 ± 0.012
Spd	0.029 ± 0.005	0.023 ± 0.004	0.016 ± 0.007	0.024 ± 0.006
总和	0.096 ± 0.023	0.064 ± 0.015	0.065 ± 0.019	0.083 ± 0.018

a) 腐胺, b) 亚精胺, c) 精胺

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2002-47-8-608>

备的质膜微囊经 Brij 58 处理后膜微囊的完整性很高(表 3).

当荧光猝灭值稳定后, 加入葡萄糖酸钠, 200 mmol/L NaCl 处理的大麦根系质膜尽管荧光猝灭值明显变小, 但与对照相比, 荧光值仍有明显的恢复, 说明盐处理后大麦根系质膜上存在 Na^+/H^+ 逆向运输活性. NaCl 处理同时添加 1 mmol/L $\text{C}_{16:0}$, Na^+/H^+ 逆向运输活性比单独 NaCl 处理上升 13%, 添加 1 mmol/L

$\text{C}_{18:2}$, 则 Na^+/H^+ 逆向运输活性上升 22% (表 3).
除对照外, 膜上 Na^+/H^+ 逆向运输活性与膜上共价键和非共价键结合多胺含量间均显著正相关, 相关系数分别为 0.932 和 0.956.

3 讨论

膜系统是植物盐害的主要敏感部位^[1]. 盐胁迫后根系电解质渗漏率明显上升, 磷脂含量下降, 膜的完整性降低^[11], 因此盐胁迫下维持膜的完整性是提高植物耐盐性的基础. 在本研究中, 经 NaCl 处理后大麦根系的质膜磷脂含量明显下降, 而外施不同饱和度和脂肪酸能部分恢复膜磷脂的含量, 且不饱和脂肪酸作用大于饱和脂肪酸(图 1), 这种外源脂肪酸对质膜磷脂含量的恢复作用比液泡膜的明显^[11].

生理条件下带正电荷的多胺可以与膜上磷脂静电吸附, 因此膜上磷脂含量的改变必然引起膜结合多胺含量的变化, 本研究结果证实了上述观点. NaCl 处理后根系质膜上共价键和非共价键结合多胺含量均明显下降, 外施脂肪酸后能部分恢复膜上非共价键结合多胺含量, 不饱和脂肪酸的作用大于饱和脂肪酸, 只有不饱和脂肪酸才能部分恢复膜上共价键结合多胺含量, 但作用低于对非共价键结合多胺含量的影响(表 1). 研究证明, 盐胁迫后大麦液泡膜微囊膜脂不饱和度的上升并不随外源脂肪酸饱和度的改变而改变^[11]. 本研究结果表明, 脂肪酸处理后膜上磷脂含量与膜上非共价键结合多胺含量间呈极显著正相关关系, 推测外施脂肪酸后膜上非共价键结合多胺含量的上升主要是磷脂含量上升所致, 多胺的静电结合使质膜的带电状态发生改变. 一般认为, 多胺与蛋白质的共价键结合是与翻译过程同时进行的^[18], 因此共价键结合多胺含量上升的同时必然伴随某些蛋白质的合成, 本研究中不饱和脂肪酸对膜蛋白上共价键结合多胺含量的恢复, 可能是激活了某些膜蛋白的合成.

质膜 H^+/ATPase 是形成跨膜质子电化学梯度、产生质子驱动力的主要酶类, 依赖质子梯度为 Na^+/H^+ 逆向运输提供动力. 实验结果表明, 经不同饱和度脂肪酸处理后, H^+/ATPase 与膜上非共价键结合多胺含量呈极显著正相关关系(图 2). 可见, 脂肪酸处理后膜微囊上静电吸附多胺的改变影响了质膜的物理状

图 1 不同饱和度脂肪酸对盐胁迫大麦根系质膜磷脂含量的影响

图 2 不同饱和度脂肪酸对盐胁迫大麦根系质膜 H^+/ATPase 活性的影响

表 3 不同饱和度脂肪酸对盐胁迫大麦根系质膜微囊质子转运活性和 Na^+/H^+ 逆向运输活性的影响

测定项目	处理			
	对照	NaCl	NaCl + C _{16:0}	NaCl + C _{18:2}
质子转运活性				
/mg ⁻¹ · min ⁻¹	14.51±2.42	12.41±2.53	12.37 ± 3.12	14.42 ± 2.14
Na ⁺ /H ⁺ 逆向运输活性				
/mg ⁻¹ · min ⁻¹	4.27 ± 1.12	36.32 ± 6.87	41.09 ± 7.64	45.01 ± 8.11

态,从而维持了膜结合酶 H^+ -ATPase 的构象和酶活性,而且膜结合酶活性的恢复也可能与脂肪酸提高膜的完整性有关.盐胁迫下不饱和脂肪酸对膜结合酶活性的恢复作用明显大于饱和脂肪酸,这与膜上磷脂含量变化成正相关关系,说明膜结合酶活性受到膜上磷脂含量的影响.

经 NaCl 处理后,尽管质膜结合酶活性、膜上磷脂含量以及膜上两种形态多胺的含量均明显下降,但 Na^+/H^+ 逆向运输活性却明显上升,这与 Shi 等人^[6]在拟南芥中的研究结果一致,说明通过质膜上的 Na^+/H^+ 逆向运输系统将 Na^+ 运到细胞外,对于植物的耐盐性来说是必不可少的.外施脂肪酸能不同程度提高盐胁迫下质膜 Na^+/H^+ 逆向运输活性,且不饱和脂肪酸的作用大于饱和脂肪酸(表 3).除对照外, Na^+/H^+ 逆向运输活性与膜上两种形态多胺的含量和磷脂含量的变化均成显著正相关关系,其中膜蛋白上共价键结合多胺含量与 Na^+/H^+ 逆向运输活性的关系更显著.可见,经脂肪酸(特别是不饱和脂肪酸)处理后,质膜 Na^+/H^+ 逆向运输蛋白的合成受到激活,而且通过提高膜上磷脂含量,进一步提高膜结合多胺含量,改变了膜的带电状态,使盐诱导的 Na^+/H^+ 逆向运输活性得到提高.

致谢 感谢山东农业大学基础学院黄化诚教授对本文实验方法的指导.

参 考 文 献

- 1 刘友良,汪良驹.植物对盐胁迫的反应和耐盐性.见:余叔文,汤章城,主编.植物生理与分子生物学.北京:科学出版社,1998.752~769
- 2 Ballesteros E, Blumwalt E, Donaire J P. Na^+/H^+ antiport activity in tonoplast vesicles isolated from sunflower roots induced by NaCl stress. *Physiol Plant*, 1997, 99: 328~334
- 3 Apse M P, Aharon G S, Snedden A. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter in *Arabidopsis*. *Science*, 1999, 285: 1256~1258
- 4 Braun Y, Hassidim M. Evidence for a Na^+/H^+ antiporter in membrane vesicles isolated from roots of the halophyte *Atriplex nummularia*. *Plant Physiol*, 1988, 87: 104~108
- 5 Katz A, Pick U, Avron M. Characterization and reconstitution of the Na^+/H^+ antiporter from the plasma membrane of the

- halotolerant alga *Dunaliella*. *Biochem Biophys Acta*, 1989, 983: 9~14
- 6 Shi H, Ishitani M, Kim C. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na^+/H^+ antiporter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 6896~6901
- 7 Galston A W, Kaur-Sawhney R. Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol*, 1990, 94: 406~410
- 8 Prakash L, Prathapasanen G. Putrescine reduces NaCl-induced inhibition of germination and early seedling growth rice. *Aust J Plant Physiol*, 1988, 15: 761~767
- 9 Serafini-Fracassini D, del Duca S. Plant transglutaminase. *Phytochem*, 1995, 40(2): 355~365
- 10 Zhao F G, Sun C, Liu Y L, et al. Effects of salinity stress on the levels of covalently and noncovalently bound polyamines in plasma membrane and tonoplast isolated from leaves and roots of barley seedlings. *Acta Botanica Sinica*, 2000, 42(9): 920~926
- 11 Yu B, Gong H, Liu Y. Effects of exogenous fatty acids on H^+ -ATPase activities and lipid composition of plasma membrane vesicles isolated from roots of barley seedlings under salt stress. *J Plant Physiol*, 1999, 155: 646~651
- 12 Sandstrom R P, Deboer A H, Lomax T L, et al. Latency of plasma membrane H^+ -ATPase in vesicles isolated by two-phase partitioning. Increased substrate accessibility or enzyme activation. *Plant Physiol*, 1987, 85: 693~698
- 13 Santa-Cruz A, Acosta M, Peres-Alfocea F, et al. Changes in free polyamine levels induced by salt stress in leaves of cultivated and wild tomato species. *Physiol Plant*, 1997, 101: 341~346
- 14 Johansson F, Olbe M, Sommarin M, et al. Brij58, a polyoxyethylene acyl ether, creates membrane vesicles of uniform sidedness. A new tool to obtain inside-out plasma membrane vesicles. *Plant J*, 1995, 7: 165~173
- 15 Wang Y, Sze H. Similarities and differences between the tonoplast-type and the mitochondrial H^+ -ATPase of oat roots. *J Biol Chem*, 1985, 260: 10434~10443
- 16 Garbarino J, Dupont F M. NaCl induces a Na^+/H^+ antiport in tonoplast vesicles from barley root. *Plant Physiol*, 1988, 86: 231~236
- 17 邱全胜,苏雪峰.大豆下胚轴质膜 H^+ -ATPase 质子转运的测定.生物化学与生物物理进展,1999,26:79~83
- 18 Votyakova T V, Wallace H M, Dungar B, et al. The covalent attachment of polyamines to proteins in plant mitochondria. *Eur J Biochem*, 1999, 260(1): 250~257

(2001-12-14 收稿, 2002-01-21 收修改稿)
<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2002-47-8-608>