

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201604010

引文格式: 王帆, 仇键, 魏芳, 等. 两相法分离纯化橡胶树树皮质膜 [J]. 广西植物, 2017, 37(3):388-393

WANG F, QIU J, WEI F, et al. Separation and purification of plasma membrane from bark of *Hevea brasiliensis* by aqueous two-phase partition [J]. *Guihaia*, 2017, 37(3):388-393

两相法分离纯化橡胶树树皮质膜

王帆¹, 仇键², 魏芳², 校现周², 杨文凤²,
吴明², 高宏华², 罗世巧^{2*}

(1. 海南大学农学院, 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院橡胶研究所, 海南 儋州 571737)

摘要: 橡胶树树皮质膜 H^+ -ATPase 在橡胶树产排胶过程中扮演着重要角色, 制备高纯度及高活性的质膜是研究质膜 H^+ -ATPase 特性和功能的必要条件。该研究以一年生巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 树皮为材料, 利用差速离心法获得粗膜微粒体, 通过两相分配法分离纯化质膜, 并研究两相体系中不同浓度聚合物 (5.9%、6.1%、6.3%、6.5%、6.7%, W/W) 和 KCl (2、5、8、11、14 mmol · L⁻¹) 对质膜蛋白得率和纯化效率的影响。通过 Bradford 法对质膜蛋白得率进行检测, 同时采用酶活性检测法对质膜纯度进行检测, 分析结果表明选用 6.4% (W/W) 聚合物浓度和 5 mmol · L⁻¹ KCl 组成的两相体系可获得较高纯度和得率的橡胶树树皮质膜。通过电镜观察法在形态学上对质膜纯度进一步评价, 利用铅钡能侵染全部膜组分使其染色, 而磷钨酸只能专一性地侵染质膜并使其染色这一特性, 分别使用铅钡和磷钨酸对切片进行染色, 并通过透射电镜对切片染色程度进行直接观察, 结果表明提取的粗膜微粒体中质膜组分较少, 存在大量的细胞器膜污染, 而纯化后的质膜膜组分较单一, 其他膜组分污染较少, 而且质膜大小较均一, 可以用于进行后续橡胶树树皮质膜 H^+ -ATPase 特性和功能的研究。

关键词: 两相分配法, 质膜, 橡胶树, 酶活性检测法

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)03-0388-06

Separation and purification of plasma membrane from bark of *Hevea brasiliensis* by aqueous two-phase partition

WANG Fan¹, QIU Jian², WEI Fang², XIAO Xian-Zhou², YANG Wen-Feng²,
WU Ming², GAO Hong-Hua², LUO Shi-Qiao^{2*}

(1. College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, Hainan, China)

Abstract: The plasma membrane H^+ -ATPase of rubber tree bark involved in various important physiological processes, such as ion transportation, stress responses, production and release of natural rubber latex, the preparation of a high purity and activity plasma membrane is the first and essential step to understand the functions of H^+ -ATPase in some *in situ* situations. In the present study, the separation of crude microsomes was isolated by differential and gradient centrifugations, the aqueous two-phase partition system was employed to separate the organelles membrane constitutions and re-

收稿日期: 2016-07-27 修回日期: 2016-08-12

基金项目: 国家自然科学基金(31400579); 海南省研究生创新科研课题(Hys2016-41)[Supported by the National Natural Science Foundation of China (31400579); Graduate Student Innovation Scientific Research Program of Hainan Province(Hys2016-41)]。

作者简介: 王帆(1990-), 女, 河北廊坊人, 硕士, 主要从事植物生理与生化的研究, (E-mail)funwanghn@163.com。

*通信作者: 罗世巧, 研究员, 主要从事橡胶树采胶生理的研究, (E-mail)Abc6712@163.com。

ceive highly pure plasma membrane, and the effect on the extraction efficiency of polymer and KCl concentration in partition was studied as considered the characteristic of bark of rubber tree. The total concentration of plasma membrane proteins was measured by Bradford method. The purity of different membrane was determined by the sensitivity of representative enzyme activity measured by Molybdenum blue method. H^+ -ATPase of plasma membrane was specifically inhibited by $NaVO_3$ under pH 6.5, due to different types of H^+ -ATPase in different organelle membranes, while H^+ -ATPase of tonoplast or plastid membrane was suppressed by KNO_3 or NaN_3 under pH 8.5, respectively. Our results indicated that the combination of 6.4%(W/W) polymer and $5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ KCl applied in two-phase partition system achieved the relatively high purity and yield ratio of plasma membrane whereas high polymer concentration of or KCl could increase the purity but with poor productivity. In order to further verify that morphological diversity between purified plasma membrane and crude microsomes, transmission electron microscopy (TEM) was performed. Paraffin embedded thin sections was made and stained separately with lead uranium and phosphotungstic acid. The morphological analysis showed that in crude microsomes there was little plasma membrane and full of cross-contaminant membrane substitutions, while after purified, the constitution of plasma membrane was relatively pure with less contaminant. In summary, highly purified plasma membrane was yielded by the aqueous two-phase partition system with 6.4% (W/W) polymer and $5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ KCl and perform a comparatively singular morphology, which could be further used to reveal the function of H^+ -ATPase of bark of rubber tree in production and release of rubber and other physiological processes.

Key words: aqueous two-phase partition, plasma membrane, *Hevea brasiliensis*, mark enzyme activity detection

植物质膜 H^+ -ATPase, 是一种典型的 P 型离子泵, 可通过调节细胞内的 pH 值, 驱动物质的次级跨膜运输, 在植物对逆境胁迫的响应、种子萌发、气孔的开闭、细胞的伸长生长、细胞极性生长等多种生理过程中发挥着重要作用 (Serrano, 1989)。同时, 质膜 H^+ -ATPase 还能通过多种调节系统, 调控基因表达水平以及自身活性, 从而适应外部环境以及自身生长发育周期的变化 (Serrano et al, 1985)。橡胶树作为一种仅在热带地区 (如海南、广东、云南等) 能够种植, 且与国民生产生活及军用物资储备密切相关的经济林木, 其天然橡胶的产量一直备受关注。在橡胶树产排胶过程中, 往往需要树皮质膜 H^+ -ATPase 的参与, 质膜 H^+ -ATPase 通过运输质子, 使细胞膜内外产生电化学梯度, 改变胞内 pH, 进而驱动离子、ATP 及糖类物质向细胞内运输, 满足橡胶树乳管细胞在胶乳合成过程中对各类营养物质的需求 (Sondergaard et al, 2004)。

制备高纯度橡胶树树皮质膜, 是进行橡胶树树皮质膜 H^+ -ATPase 深入研究的必要条件。现阶段, 已知的质膜提取方法有自由电流法、蔗糖密度梯度离心法和两相分配法。由于前两种方法都存在显著的缺陷, 而不能被广泛应用。两相分配法由于获得的质膜纯度较高, 操作步骤简单, 易受科研工作者的青睐, 且已从烟草 (Jin et al, 2013; Mongrand et al, 2004)、拟南芥 (Santoni et al, 1999)、水稻 (Chen et al, 2007; Komatsu, 2008; Tanaka et al, 2004) 等数十

种植物组织中, 分离得到较高纯度的质膜, 但不同植物材料之间存在很大差异性, 造成质膜提取方法也有很大不同, 两相体系的聚合物浓度、KCl 浓度、pH 值等因素均会影响质膜的纯化效率, 其中聚合物和 KCl 浓度的对质膜纯化效率的影响最为显著。 (Hatti-Kaul, 2001)。本研究基于国内外提取植物质膜的方法, 根据橡胶树树皮材料的特点, 以质膜蛋白产率和标志酶纯度为标准, 筛选得到两相体系中橡胶树树皮质膜提取的最适聚合物浓度和离子浓度, 并通过透射电镜观察, 进一步对质膜纯化前后在形态学的差异进行比较, 证明橡胶树树皮质膜提取方法确实得到了优化, 为接下来对橡胶树树皮质膜 H^+ -ATPase 深入研究打下基础。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

葡聚糖 T-500 (Dextran T-500); 聚乙二醇 3350 (polyethylene glycol 3350, PEG 3350); 二硫苏糖醇 (DL-Dithiothreitol, DTT); 苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF); 二硫苏糖醇 (DL-Dithiothreitol, DTT); ATP- Na_2 等。

1.2 材料

于中国热带农业科学院苗圃中心, 选取生长情况基本相同的一年生芽接无性系 ‘热研 7-33-97’ 橡胶树, 快速剥取其芽接处至以上 30 cm 距离的褐化

树皮,放入液氮中速冻留用。

1.3 方法

1.3.1 粗膜微粒体制备 称取一定质量的材料,以 1:5(W/V) 比例加入提取液:50 mmol · L⁻¹ MOPS-BTP(pH 7.5); 0.3 mol · L⁻¹ 蔗糖; 2 mmol · L⁻¹ EGTA; 2 mmol · L⁻¹ EDTA; 0.2%(W/V) BSA; 0.5%(W/V) PVPP; 5 mmol · L⁻¹ DTT; 5 mmol · L⁻¹ L-抗坏血酸; 0.5 mmol · L⁻¹ PMSF。低温快速研磨,取匀浆液,过滤,分装,10 000×g, 10 min, 4 °C 离心。收集上清液,补加 1 mL PMSF,分装至离心管离心,100 000×g, 30 min, 4 °C。收集沉淀,重悬于少量重悬液:0.3 mol · L⁻¹ 蔗糖; 5 mmol · L⁻¹ 磷酸钾缓冲液; 2 mmol · L⁻¹ DTT; 0.5 mmol · L⁻¹ PMSF。液氮速冻,保存于-80 °C 备用。

1.3.2 质膜的纯化 质膜纯化过程皆在 4 °C 中进行。如图 1 所示,取 3 g 微粒体加入到 9 g 两相系统;不

同浓度梯度(5.9%、6.1%、6.3%、6.5%、6.7%, W/W) 且等浓度的 Dextran T-500 和 PEG 3350; 0.3 mol · L⁻¹ 蔗糖; 5 mmol · L⁻¹ 磷酸钾缓冲液; 不同浓度梯度(2.5、8、11、14 mmol · L⁻¹) 的 KCl; 无菌超纯水。上下颠倒,使其充分混匀,1 500×g, 5 min, 4 °C 离心。取上相 U1-1,加入未使用下相 L2-1 中,在剩余下相 L1-1 中加入未使用上相 U2-1,颠倒混匀,1 500×g, 5 min, 4 °C 离心。取上相 U1-2,加入未使用下相 L3-1 中,颠倒混匀,1 500×g, 5 min, 4 °C 离心。取上相 U2-2,加入下相 L3-2 中,颠倒混匀,1 500×g, 5 min, 4 °C 离心。收集上相 U1-3 和 U2-3,添加重悬液,100 000×g, 1 h, 4 °C 超高速离心。收集沉淀,悬浮于少量悬浮液: 50 mmol · L⁻¹ MOPS - BTP(pH7.5); 0.3 mol · L⁻¹ 蔗糖; 2 mmol · L⁻¹ DTT; 1 mmol · L⁻¹ PMSF; 0.1 mmol · L⁻¹ EDTA。将富含质膜的悬浮液放入液氮中速冻后,放入-80 °C 冰箱冻存。

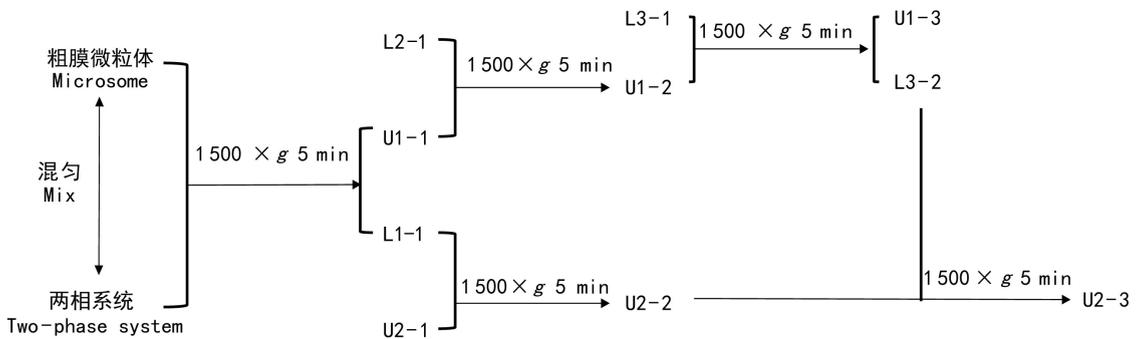


图 1 两相分配法纯化质膜

Fig. 1 Purification of plasma membrane by aqueous two-phase partition

1.3.3 蛋白含量测定 参照 Bradford(1976)的方法。

1.3.4 标志酶活性检测 取质膜蛋白 15~45 μg, 加入到酶反应液(pH 值分别为 6.5、8.5、8.5): 50 mmol · L⁻¹ BTP-MES, 5 mmol · L⁻¹ MgSO₄, 50 mmol · L⁻¹ KCl, 0.02% Brij 58(W/V), 1 mmol · L⁻¹ (NH₄)₂MoO₄ 分别加入 0.1 mmol · L⁻¹ Na₃VO₄, 1 mmol · L⁻¹ NaN₃, 50 mmol · L⁻¹ KNO₃, 加入 4 mmol · L⁻¹ ATP-Na₂启动反应, 37 °C 下水浴 30 min; 然后加入 0.2 mL 终止液: 10% SDS 混匀, 2 min 后再加入 1 mL 显色液: 2% 浓 H₂SO₄(V/V), 0.7% (NH₄)₂MoO₄(W/V), 1 mL 双蒸水, 50 μL 10% L-抗坏血酸(W/V)。30 °C, 水浴 30 min 后在波长 700 nm 处比色。同等条件下, 将失活膜蛋白作为空白对照, 制作无机磷标准曲线, 对膜蛋白酶活性进行测定。

1.3.5 磷钨酸染色 参考 Roland et al(1972)的方

法, 稍作修改。粗膜微粒体和质膜提取液 100 000×g, 1 h, 4 °C 离心, 除去上清, 4% 的戊二醛溶液中 0 °C 固定 12 h, 磷酸钾缓冲液(pH7.8)冲洗, 1%(W/V) 锇酸固定 2 h, 磷酸钾缓冲液(pH7.8)再次冲洗。使用不同浓度梯度的酒精对样品进行脱水处理, 丙酮浸泡 12 h。环氧树脂包埋, 45 °C 聚合 24 h, 60 °C 聚合 24 h, 70 °C 聚合 8 h。Leica UC6 型超薄切片切片机切片, 使用铅铀与磷钨酸对切片进行染色, 并使用 HT7700 型透射电镜观察并拍照, 鉴定质膜纯度。

2 结果与分析

2.1 筛选聚合物浓度与 KCl 浓度的最佳配比

2.1.1 聚合物浓度的筛选 两相体系在 5 mmol · L⁻¹ KCl 浓度下, 以不同浓度聚合物(5.9%、6.1%、6.3%、

6.5%、6.7%, W/W) 纯化橡胶树树皮粗膜微粒体, 通过获得质膜的蛋白产率及 P 型 H^+ -ATPase 对特异性抑制剂 Na_3VO_4 的敏感性, 筛选出两相体系的最适聚合物浓度。如图 2 所示, 当聚合物浓度由 5.9% 上升至 6.7% 时, 质膜蛋白产率降低, 而对抑制剂的敏感性升高, 综合分析表明, 两相体系纯化橡胶树树皮质膜的最适聚合物浓度为 6.4%。

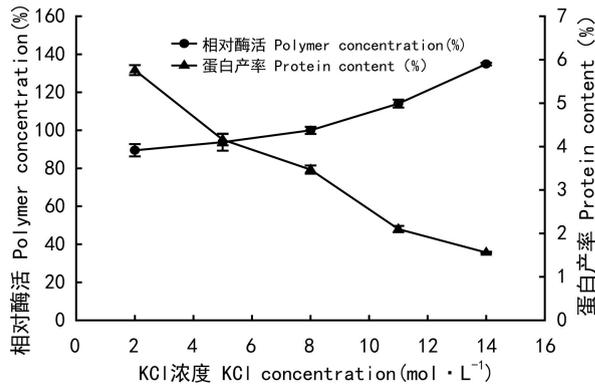


图 2 不同聚合物浓度对质膜纯化效率的影响 9 g 两相体系的 KCl 浓度为 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。聚合物浓度为 6.7% (W/W) 的两相体系纯化质膜, 设其对 VO_3^{3-} -ATP 酶特异性酶活为 100% 求得相对酶活。

Fig. 2 Effects of different polymer concentration on purification efficiency of plasma membrane 9 g two-phase system contained $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl. VO_3^{3-} -ATPase specific activity of U3 in 6.7% (W/W) two-phase system as 100%.

2.1.2 KCl 浓度的筛选 选择 6.4% 聚合物浓度, 以不同浓度 KCl ($2, 5, 8, 11, 14 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对橡胶树树皮微粒体进行分离纯化, 通过获得质膜的蛋白产率及 P 型 H^+ -ATPase 对特异性抑制剂 Na_3VO_4 的敏感性, 筛选出两相体系的最适 KCl 浓度。如图 3 所示, 当 KCl 浓度由 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上升到 $14 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 质膜蛋白产率逐渐下降, 对抑制剂的敏感度逐渐升高。综合分析表明, 两相体系纯化橡胶树树皮质膜的最适 KCl 浓度为 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。选用 6.4% (W/W) 聚合物和 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 的两相体系纯化质膜后, 可以得到较高产率的橡胶树树皮质膜。

2.2 质膜纯度的鉴定

6.4% (W/W) 聚合物浓度和 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 浓度的两相体系 3 次纯化粗膜微粒体提取物, 对纯化前后的质膜 H^+ -ATP 酶活力检测, 如表 1 所示, 通过差速离心获得的粗膜微粒体提取液中质膜的纯度仅为 44.16%, 而线粒体膜和叶绿体膜的污染达到了 6.10%,

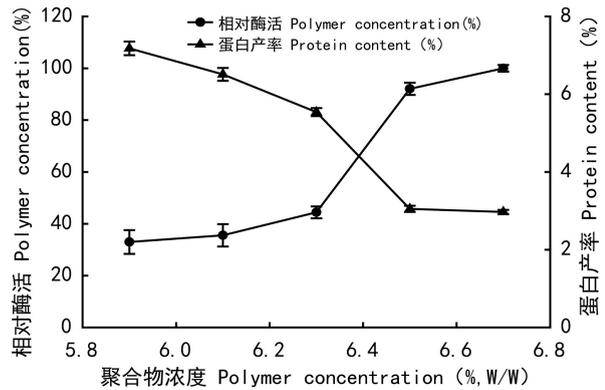


图 3 不同 KCl 浓度对质膜纯化效率的影响 9 g 两相体系的聚合物浓度为 6.4% (W/W)。KCl 浓度为 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的两相体系纯化质膜, 设其对 VO_3^{3-} -ATP 酶特异性酶活为 100% 求得相对酶活。

Fig. 3 Effects of different KCl concentrations on purification efficiency of plasma membrane 9 g two-phase system contained 6.4% (W/W) Dextran T-500 and PEG 3350. VO_3^{3-} -ATPase specific activity in $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl two-phase system as 100%.

表 1 粗膜微粒体和纯化后质膜的纯度比较

Table 1 Comparison on microsome fraction between purity of plasma membrane

标志酶敏感性 * Mark enzyme sensitivity	特异部位 Specific fraction	粗膜微粒体 Microsome	质膜组分 Plasma membrane fraction
VO_3^{3-} -ATPase (pH6.5)	质膜 Plasma membrane	44.16 ± 2.68	78.05 ± 2.17
NO_3^{-} -ATPase (pH8.5)	液泡膜 Tonoplast	19.37 ± 2.26	7.18 ± 1.24
NaN_3^{-} -ATPase (pH8.5)	线粒体 叶绿体膜 Mitochondria and chloroplast membrane	6.10 ± 1.58	1.08 ± 0.87

注: 表中数据为 3 次实验的平均值 \pm 标准差表示。两相体系由 6.4% (w/w) 聚合物和 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 构成。* 敏感性 (%) = 被抑制的 H^+ -ATPase 活力 / 总 H^+ -ATPase 活力 $\times 100\%$ 。

Note: The data stand for $\bar{x} \pm s$, $n=3$. Two-phase system contained 6.4% (w/w) Dextran T-500/PEG 3350 and $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl. * Sensitivity (%) = H^+ -ATPase specific activity inhibited / total ATPase activity $\times 100\%$.

液泡膜的污染更是达到了 19.37%。通过两相法 3 次纯化后的质膜悬浮液质膜纯度达到了 78.05%, 线粒体膜和叶绿体膜的污染减少到 7.18%, 液泡膜的污染也减至 1.08%, 得到了纯度较高的质膜。

铅铈能侵染所有膜组分 (质膜、细胞器膜等) 使其染色, 而磷钨酸只能特异性地侵染质膜囊泡并使

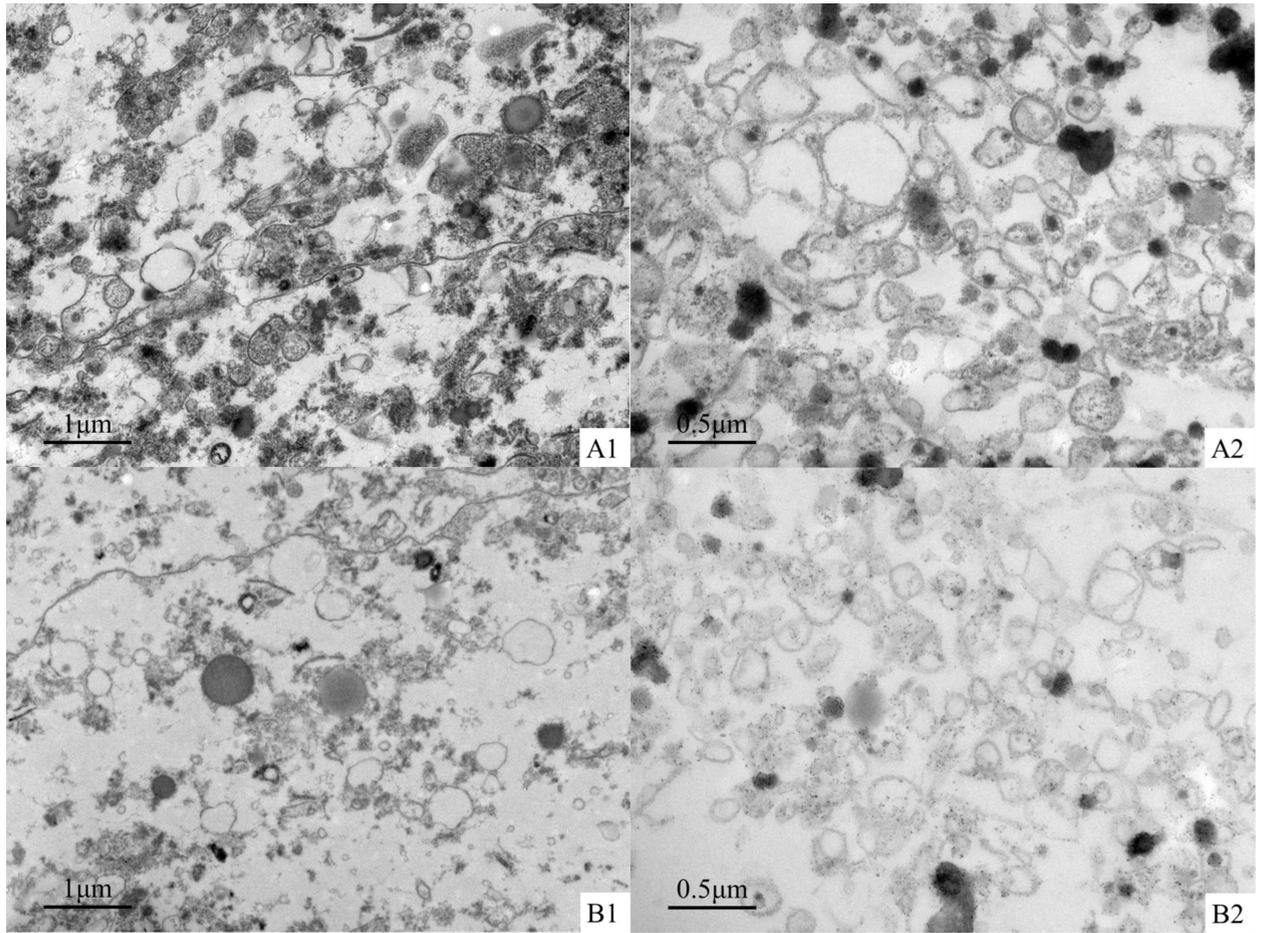


图4 橡胶树树皮膜组分的电镜图 A. 铅铀染色; A1. 微粒体; A2. 质膜; B. 磷钨酸染色; B1. 微粒体; B2. 质膜。

Fig. 4 Electron micrographs of membrane fractions from rubber tree bark A. Section stained with conventional uranyl acetate-lead citrate; A1. Microsome; A2. PM fraction; B. Section stained with phosphotungstic acid; B1. Microsome; B2. PM fraction.

其染色,通过透射电镜直观地观察切片的染色程度,根据不同切片中染色膜组分的复杂程度,可以判断出质膜纯度。本研究为进一步评价提取质膜的纯度,对橡胶树树皮粗膜微粒体和纯化后的质膜分别进行染色及电镜观察,磷钨酸染色检测质膜纯度结果如图4所示,A1、B1为粗膜微粒体提取物,由铅铀染色可以看出其组分比较复杂,存在着大量的细胞器膜污染,磷钨酸染色能够观察到,只有少量着色质膜囊泡,说明粗膜微粒体提取物中的质膜囊泡含量较少,A2、B2为质膜提取物,其膜组分比较单一,大部分囊泡能被磷钨酸侵染并染色,且囊泡分布较均一,大小较一致,表明此方法提取的质膜纯度较高。

3 讨论

目前对橡胶树树皮质膜的提取方法鲜有报道,

本研究取一年生芽接无性系橡胶树‘热研7-33-97’树皮,通过聚合物浓度为6.4%(W/W),KCl浓度为 $5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的两相体系的纯化,能提取得到纯度及产率均较高的质膜。同为落叶乔木的桑树,选用聚合物浓度为5.6%(W/W),KCl浓度为 $30\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的两相体系对树皮质膜纯化,可获得纯度和产率都较高的质膜(Yoshida,1984),即不同植物的相同部位,其质膜提取的条件可能存在较大差异。而同一植物的不同部位,由于质膜类型不同,其分离纯化质膜的所适宜的两相体系也有所不同(王建华等,1994),如玉米幼苗叶片生长部位(胡章立和荆家海,1998)、玉米精细胞(徐恒平和曹宗巽,1997;张一洪等,1995)等的提取方法,因此针对不同植物,或者相同植物的不同部位,需要针对性地建立合适的分离纯化体系,从而获得较高纯度和产率的质膜。

常用的质膜纯度检测方法有酶活性测定法,电

镜观察法, 免疫印迹法等, 由于质膜提取过程容易被其他内膜系统(如液泡膜、内质网膜和高尔基体膜等)污染。通常采用 2 种或 2 种以上的检测方法评价质膜的纯度。酶活性测定法结合电镜观察法是一种较为常用的质膜纯度检测方法, 该方法已被用于南极红酵母(刘均玲等, 2008)、水稻叶片(何磊等, 2012)、地被菊叶片(沈漫, 2004)等质膜纯度的检测。酶活性检测法利用不同抑制剂能够专一性地抑制不同囊泡上的标志酶这一特性, 对不同囊泡上的标志酶活性进行检测, 并计算出提取的质膜纯度和其他细胞器囊膜的污染程度。电镜观察法是形态学上检测质膜纯度的强有力手段, 可直接观察膜结构, 检测膜组分的复杂程度。本研究结果表明两相体系纯化 3 次的质膜, 其质膜标准酶 H^+ -ATPase 对 Na_3VO_4 敏感性很高, 而对 KNO_3 、 NaN_3 的敏感性很低, 说明该提取物中的质膜纯度较高, 其他细胞器囊膜较少。同时电镜观察法表明质膜膜组分较均一, 其他膜组分污染较少, 质膜纯度较高。

橡胶树树皮质膜 H^+ -ATPase 在橡胶树的生命过程中发挥着重要的调节作用, 本研究通过对两相体系中聚合物浓度和 KCl 浓度进行筛选, 确立了橡胶树树皮质膜分离纯化的方法, 为橡胶树树皮质膜特性及质膜 H^+ -ATPase 功能的后续研究奠定了基础。

参考文献:

BRADFORD MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 72(1-2):248-254.

ROLAND JC, LEMBI CA, MORRE DJ, et al, 1972. Phosphotungstic acid-chromic acid as a selective electron dense stain for plasma membranes of plant cells [J]. *Stain Technol*, 47(4):195-200

CHEN F, YUAN Y, LI Q, et al, 2007. Proteomic analysis of rice plasma membrane reveals proteins involved in early defense response to bacterial blight [J]. *Proteomics*, 7(9):1529-1539.

HATTI-KAUL R, 2001. Aqueous two-phase systems. A general overview [J]. *Mol Biotechnol*, 19(3):269-277

JIN Y, ZHANG C, YANG H, et al, 2013. Proteomic analysis of cold stress responses in tobacco seedlings [J]. *Afr J Biotechnol*, 10(82):18991-19004.

KOMATSU S, 2008. Plasma membrane proteome in *Arabidopsis* and rice [J]. *Proteomics*, 8(19):4137-4145.

LARSSON C, WIDELL S, KJELLBOM P, 1987. Preparation of high-purity plasma membranes [J]. *Meth Enzymol*, 148:558-568.

MONGRAND S, MOREL J, LAROCHE J, et al, 2004. Lipid rafts in higher plant cells purification and characterization of triton

X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane [J]. *J Biol Chem*, 279(35):36 277-36 286.

SANTONI V, DOUMAS P, ROUQUIÉ D, et al, 1999. Large scale characterization of plant plasma membrane proteins [J]. *Biochimie*, 81(6):655-661.

SERRANO R, 1989. Structure and function of plasma membrane ATPase [J]. *Ann Rev Plant Biol*, 40(1):61-94.

SERRANO R, KIELLAND-BRANDT MC, FINK GR, 1985. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with $(Na^{++} K^+)$, K^+ -and Ca^{2+} -ATPases. [J]. *Nature*, 319(6055):689-693.

TANAKA N, FUJITA M, HANDA H, et al, 2004. Proteomics of the rice cell: systematic identification of the protein populations in subcellular compartments [J]. *Mol Genet Genom*, 271(5):566-576.

YOSHIDA S, 1984. Chemical and biophysical changes in the plasma membrane during cold acclimation of mulberry bark cells (*Morus bombycis* Koidz. cv Goroji) [J]. *Plant Physiol*, 76(1):257-265.

HU ZL, JING JH, 1998. Isolation of the plasma membrane (PM) in the maize young leaves growth zone by two phase partition [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 18(1):83-89. [胡章立, 荆家海, 1998. 两相法分离玉米幼苗叶片生长部位质膜 [J]. *西北植物学报*, 18(1):83-89.]

WANG JH, CHEN KA, WU XR, 1994. Preparation and identification of two kinds of plasma membrane vesicles in maize cells [J]. *Plant Physiol Comm*, 30(5):443-445. [王建华, 陈珈, 吴显荣, 1994. 玉米细胞两种质膜囊泡的制备和鉴别 [J]. *植物生理学通讯*, 30(5):443-445.]

XU HP, CAO ZX, 1997. Purification of plasma membrane of maize sperm cells by aqueous polymer two-phase partitioning [J]. *Bull Bot*, 39(3):218-221. [徐恒平, 曹宗巽, 1997. 用两相法纯化玉米精细胞质膜 [J]. *植物学报*, 39(3):218-221.]

ZHANG YH, YANG ZH, CAO ZX, 1995. Preparation of maize sperm cell plasma membrane and preliminary analysis of membrane proteins [J]. *Chin Sci Bull*, 40(2):179-181. [张一洪, 杨中汉, 曹宗巽, 1995. 玉米精细胞质膜的制备及膜蛋白的初步分析 [J]. *科学通报*, 40(2):179-181.]

LIU JL, HUANG B, FANG ZG, et al, 2008. Isolation of plasma membrane of antarctic yeast by two-phase partition [J]. *Microbiology*, 35(4):502-506. [刘均玲, 黄勃, 方再光, 等, 2008. 两相分配法制备南极红酵母质膜 [J]. *微生物学通报*, 35(4):502-506.]

HE L, NIE YF, GAO YY, et al, 2012. Purification of plasma membrane from rice leaves and analysis of the proteins by two-dimensional electrophoresis [J]. *J S Chin Agric Univ*, 33(1):11-17. [何磊, 聂燕芳, 高元媛, 等, 2012. 水稻叶片质膜的纯化及质膜蛋白质双向电泳分析 [J]. *华南农业大学学报*, 33(1):11-17.]

SHEN M, 2004. Preparation of plasma membrane from leaves of grand-cover chrysanthemum by aqueous polymer two-phase partition [J]. *Chin Bull Bot*, 21(1):66-73 [沈漫, 2004. 两相法分离地被菊叶片质膜的研究 [J]. *植物学通报*, 21(1):66-73.]