

Quinacrine 형광을 이용한 토마토 뿌리조직 마이크로솜의 수소이온이동 활성측정

신대섭 · 조광현 · 김영기*

충북대학교 농과대학 농화학과

(2002년 3월 18일 접수, 2002년 4월 11일 수리)

Quinacrine은 수소이온 농도변화에 민감한 형광 probe로서 양성자와 결합하지 않은 형광형이나, 양성자와 결합한 비형광형으로 존재한다. 따라서, quinacrine은 H⁺-ATPase에 의한 수소이온이동 활성 측정에 이용된다. 본 연구에서는 토마토 뿌리조직에서 분리한 마이크로솜에서 quinacrine의 형광성을 이용한 H⁺-ATPase 활성측정의 최적 조건을 조사하였다. Quinacrine의 형광변화는 반응용액 중의 단백질 함량이 0.43 µg/µ에서 25-26% 감소하여 10%의 quinacrine 형광을 감소시키는 데 약 100 nmol/min의 H⁺-ATPase 활성이 필요함을 알 수 있었다. Quinacrine의 최대 형광변화는 pH 7.0-7.2 범위와 2 mM Mg²⁺ 조건에서 일어났다. 이것은 기존에 보고한 H⁺-ATPase의 특성과 일치하여, quinacrine의 형광변화가 H⁺-ATPase의 활성을 잘 반영하고 있음을 보인다. 원형질막 및 액포막 H⁺-ATPase들의 선택적 저해제인 vanadate와 NO₃⁻는 각각의 효소에 의한 수소이온이동 활성을 저해하는데 성공적임을 확인하였다. 이상의 결과로 quinacrine이 토마토 뿌리조직에서 분리한 마이크로솜의 수소이온이동 활성측정에 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였다.

Key words: quinacrine, 수소이온이동, H⁺-ATPase, 토마토 뿌리

서 론

식물체에서 일어나는 양분의 흡수, 이온이동, 세포질의 삼투압 조절, 막전위 유지 등 다양하고 필수적인 생리적 기능들은 생체막에 위치하는 여러 종류의 ion transporter들에 의해 일어난다.^{1,6)} 생체막에는 능동적으로 용질을 이동시키는 ATPase와 확산에 의한 수동적 물질이동을 매개하는 carrier 및 이온통로 단백질이 있으며, 세포는 이들의 상호 연관된 활성조절을 통하여 세포질을 생리적으로 적정상태가 되도록 유지한다. 특히, 원형질막과 액포막에 존재하는 H⁺-ATPase는 생체막을 경계로 수소이온 농도구배를 형성하며, 이것은 각종 양이온이나 음이온, 당, 유기산, 아미노산 등 다양한 용질의 2차 능동수송과 관련된 기본적인 에너지원으로 이용된다.^{2,7,9)} 따라서, H⁺-ATPase는 세포의 생리활성 유지에 중심적인 역할을 수행함이 잘 알려져 있다.¹⁰⁾

본 연구실에서는 시설재배지의 염류집적 토양에서 빈발하는 작물의 염류장해 현상에 대한 생리학적 기작을 밝혀내기 위해서 토마토 뿌리조직에서 액포막 및 원형질막 H⁺-ATPase의 다양한 특성을 조사한 바 있다.^{11,12)} 세포막 proton pump 활성 측정에는 일반적으로 enzyme-coupled assay법¹¹⁾을 이용하는데, 이 방법은 pump의 ATP 분해활성을 측정하는 것으로 효소의 여러 가지 특성을 밝히는 데는 적당하지만, pump 활성의 결과로 생성되는 생체막을 경계로한 수소이온 농도구배를 측정할 수는 없다. 따라서, 본 연구에서는 원형질막이나 액포막의 pump 활

성에 의한 수소이온 농도구배를 측정하기 위하여 quinacrine의 형광변화를 측정하는 방법을 이용하였다.¹³⁾ Quinacrine은 amine계 화합물로서 acridine orange^{14,15)}와 더불어 H⁺-ATPase에 의한 수소이온이동 활성측정을 위해 많이 사용되는 수소이온-민감성 형광 probe이다.^{16,17)} 생체막에서 H⁺-ATPase의 활성에 따라 pH 기울기가 형성되면, pH가 낮아진 곳에서는 양성자와 결합한 quinacrine이 증가하고, 양이온형 quinacrine은 비형광성이기 때문에 형광강도가 감소하게 된다. 따라서, quinacrine 형광의 감소 특성을 측정함으로써 효소활성에 따른 수소이온 이동의 특성을 밝혀낼 수 있다.

본 연구에서는 토마토 뿌리조직에서 H⁺-ATPase에 의한 수소이온이동 활성을 측정하기 위하여 quinacrine의 형광특성을 다양한 조건에서 조사하여 최적 실험조건을 확립하였으며, 특히 선택적 저해제를 사용할 경우 액포막 및 원형질막의 수소이온이동 활성을 측정하는 것이 가능함을 확인하였다. 따라서, quinacrine을 이용한 형광측정법은 토마토 뿌리조직에서 염류장해에 따른 염류이동의 변화를 구명하는 데 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

재료 및 방법

재료. 홍농종묘의 서광토마토(*Lycopersicon esculentum* L.; Pink Forcer) 종자를 발아용 스피너를 이용하여 25°C의 암상태에서 약 3-5일간 발아시켰다. 발아 후 양액이 담긴 플라스틱 용기에 이식하였으며, 양액의 조성은 Cho 등¹¹⁾의 방법에 따라 제조하였다. 이식된 토마토는 온도를 28-32°C로 유지하며 약 5주간 온실에서 재배한 후, 뿌리조직을 채취하여 본 실험의 재료로 사용하였다.

*연락처

Phone: 82-43-261-2560; Fax: 82-43-271-5921

E-mail: ykkim10@cubuc.chungbuk.ac.kr

양액 제조에 사용한 시약은 모두 1급 이상의 국산 및 일본산 시약이었고, 완충액용 자당은 Fluka Biochemical사 (Switzerland)의 제품을 사용하였다. 생리활성 측정에 사용한 모든 시약들과 quinacrine, nigericin 등은 Sigma사(St. Louis, USA)에서 구입하였다.

토마토 뿌리조직에서 마이크로솜 분리. 뿌리조직으로부터 마이크로솜의 분리는 이미 보고한 Cho 등¹¹⁾의 방법을 따랐으며, 마이크로솜 추출에는 250 mM sucrose, 2.5 mM DTT(1,4-dithiothreitol), 10 mM EGTA{ethylene glycol-bis(β -aminoethylether)- N,N,N',N' -tetraacetic acid}, 10 mM $MgSO_4$, 10% glycerol, 1% BSA(bovine serum albumin), 25 mM MES{2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid}-KOH(pH 7.0)으로 구성된 완충액을 이용하였고, 초고속 원심분리 후에 얻어진 마이크로솜 분획의 현탁액은 250 mM sucrose, 2.5 mM DTT, 10% glycerol, 2.5 mM MES-BTP[1,3-bis{tris(hydroxymethyl)methylamino}propane](pH 7.0)의 조성¹³⁾을 갖는 완충액을 사용하였다. 초고속 원심분리 후 얻어진 마이크로솜 분획은 enzyme-coupled assay에 사용하기 위해 분리한 마이크로솜보다 단백질의 농도가 약간 높은 10 μ g/ μ l가 되도록 완충액을 가한 후, glass-Teflon homogenizer로 균질화하였다. 분리한 마이크로솜 분획은 액체질소에서 순간냉동시켜 사용 전까지 -80°C 의 초저온냉동고에 보관하였다. 마이크로솜 분리의 전 과정은 4°C 에서 수행하였으며, 단백질 농도는 Lowry방법¹⁸⁾으로 결정하였다.

수소이온이동 활성측정. H^+ -ATPase에 의한 수소이온이동 활성은 quinacrine의 형광 변화로 측정하였다.¹³⁾ 수소이온이동 활성은 반응시작 후 직선을 이루는 초기 형광감소 변화율과 시간 경과 후 최대로 변화한 형광값의 반응전 초기 형광값에 대한 비율로 나타내었다. 마이크로솜 H^+ -ATPase에 의한 수소이온이동 활성을 반영하는 502 nm에서의 형광감소는 형광분광분석계(Hitachi F-2000 spectrophotometer, Japan)를 이용하여 측정하였으며, 효소반응은 완충액(140 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 0.1% BSA, 2 mM ATP, 10 μ M quinacrine, 10 mM MOPS(4-morpholinopropanesulfonic acid)-BTP, pH 7.0)¹⁹⁾에 마이크로솜을 가하고, 25°C 에서 5분간 배양한 후, 2 mM $MgCl_2$ 를 가함으로써 시작되었다. 시료의 양은 반응용액 700 μ l에 300 μ g의 단백질을 포함하도록 마이크로솜을 가하였다. 반응은 25°C 에서 교반을 일정하게 유지하며 지속시켰고, 약 8분 후 마이크로솜 내부와 외부의 pH 기울기가 평형을 이룬 후, protonophore인 nigericin을 10 μ M 농도로 첨가하여 형광의 회복을 확인함으로써 형성된 pH 기울기가 효소에 의함을 확인하였다.

H^+ -ATPase에 의한 수소이온이동 활성은 두 가지 방법으로 분석하였다. 수소이온이동의 초기형광감소율은 Mg^{2+} 의 첨가 직후 약 1-2분 이내에 나타나는 형광감소의 최대 기울기를 측정함으로써 이루어졌다. 두 번째로 시간의 경과 후 quinacrine의 형광감소가 최대에 이르러 더 이상 변화하지 않을 때 관측한 형광감소의 최대치를 반응전 quinacrine 형광강도에 대한 감소비율로 측정함으로써 최대형광감소치를 구하였고, 이것으로 H^+ -ATPase의 활성에 의해 형성된 마이크로솜 내부와 외부간의 수소이온농도 차이의 정도를 평가하였다.

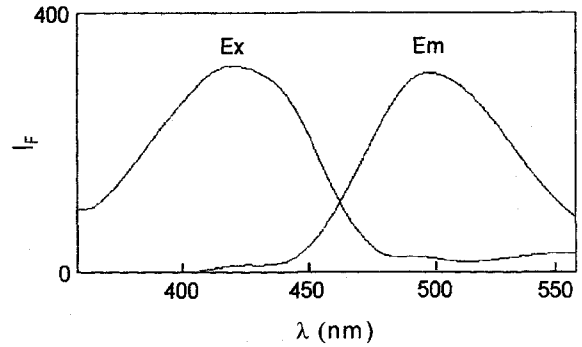


Fig. 1. Excitation and emission spectra of quinacrine.

결과 및 고찰

Quinacrine을 이용한 수소이온이동 활성측정. H^+ -ATPase에 의한 수소이온이동 활성을 측정하기 위하여 수소이온 농도에 따라 형광특성이 민감하게 변하는 quinacrine을 이용하였다. 먼저, quinacrine의 형광특성을 확인하기 위하여 완충액에서 형광스펙트럼을 얻었을 때, 최대 excitation과 emission은 각각 419 nm와 502 nm에서 나타났다(Fig. 1). 수소이온 농도변화에 따른 quinacrine의 형광특성을 확인하기 위하여 용액의 pH를 변화시켰을 때, emission 스펙트럼의 강도는 용액의 pH가 감소할수록 점차 감소하였으나, 최대 excitation이나 emission을 보이는 파장은 변화하지 않았다(자료 미제시). 또한, 완충액에 마이크로솜 분획을 첨가하였을 때에도 산란에 의한 emission의 감소를 확인하였으나, 최대치를 보이는 파장은 502 nm로서 변화하지 않았다. 이것은 수소이온이동 활성측정을 위한 quinacrine의 형광 emission 측정이 502 nm에서 가장 효율적임을 보인다.

마이크로솜 단백질 농도에 따른 활성변화. 여러 가지 저해제 및 생리적 조건의 변화에 따른 수소이온이동 활성의 효율적인 측정을 위하여 반응용액 중에 첨가하여야 하는 H^+ -ATPase의 양을 결정하였다. 시간에 따른 H^+ -ATPase의 수소이온이동 활성은 반응용액에 단백질의 농도를 결정한 마이크로솜 시료의 양을 조절하여 첨가하고 25°C 에서 5분간 배양한 후, Mg^{2+} 을 최종으로 첨가함으로써 반응을 시작하였다. Mg^{2+} 을 첨가하지 않은 상태에서는 H^+ -ATPase의 활성이 없으므로 quinacrine의 형광감소는 나타나지 않았고, 마이크로솜이 없는 조건에서 Mg^{2+} 의 첨가는 quinacrine의 형광을 감소시키지 않았다. Fig. 2A는 마이크로솜을 포함하는 반응용액에 Mg^{2+} 을 첨가하면 효소반응이 시작되어 quinacrine의 형광이 감소하며, 형광감소가 최대치에 도달한 후 수소이온의 ionophore인 nigericin을 처리하였을 때, 수소이온의 확산에 의해 quinacrine의 형광이 가역적으로 회복됨을 보여준다. 따라서, Mg^{2+} 의 첨가 후 나타난 quinacrine의 형광감소는 H^+ -ATPase의 활성에 의해 마이크로솜 내부로의 수소이온 유입에 의한 것임을 확인하였다.

반응용액에 마이크로솜 단백질의 농도를 0.1-0.5 μ g/ μ l의 범위에서 다양하게 첨가하였을 때, Mg^{2+} 의 첨가 직후 약 1-2분 이내에 나타나는 형광감소의 최대 기울기를 측정하는 초기형광감소율과 quinacrine의 형광감소가 최대에 이르렀을 때 얻어진 최대형광감소치는 반응용액 중의 단백질량이 증가함에 따라 비례

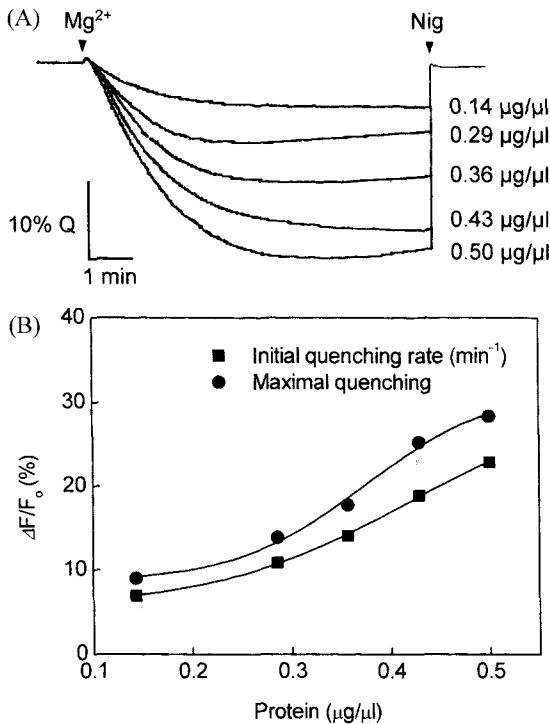


Fig. 2. Effect of microsomal protein concentration on quinacrine fluorescence quenching. (A) Changes in fluorescence emission obtained by increasing the concentration of microsomal protein. The amount of microsome was increased while the concentration of quinacrine was maintained same level, 10 µM. Nigericin was added at the indicated time (Nig). (B) Dose response of quinacrine fluorescence quenching calculated from the data shown in Fig. 2A.

적으로 증가하였다(Fig. 2B). 이것은 반응용액에 마이크로솜 시료의 양을 증가시켜 H⁺-ATPase의 양을 증가시키기에 따라 마이크로솜 내부로의 수소이온 유입이 증가하여 형광이 감소하였음을 의미한다. 따라서, 시료에 의한 quinacrine 형광의 산란효과 및 반응용액의 양, 저해제에 의한 활성변화 측정의 용이성 등을 고려하여, 이후의 실험에서는 반응용액 중의 단백질 함량을 0.43 µg/µl가 되도록 마이크로솜 시료를 첨가하였다. 이때, 최대 형광감소치는 반응전 quinacrine 형광값의 25-26%로 나타났다. 이러한 조건에서 마이크로솜 시료의 H⁺-ATPase 활성이 약 850 nmol/min/mg protein이라는 것과 형광측정에 사용한 마이크로솜 단백질의 양이 300 µg임을 고려하여 계산하면 quinacrine 형광이 10% 감소하는 데는 약 100 nmol/min의 효소활성이 필요함을 의미한다.

pH 변화에 따른 활성변화. H⁺-ATPase의 활성은 pH의 변화에 따라 영향을 받으며, 토마토 뿌리조직으로부터 분리한 마이크로솜 ATPase의 총활성은 pH 7.0-8.0 사이에서 최대치를 보임을 보고하였다.¹²⁾ H⁺-ATPase의 활성변화에 따른 수소이온이동 활성의 변화여부를 확인하기 위하여 반응용액의 pH를 6.0에서 8.0까지 변화시키면서 수소이온이동 활성을 측정하였을 때, 초기형광감소율과 최대형광감소치는 모두 pH 7.0에서 최대로 얻어졌다(Fig. 3). 즉, 반응용액의 pH를 6.0, 6.2, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0으로 조정하였을 때, 초기형광감소율은 각각 2.5, 5, 12, 17, 14, 10%/min으로 얻어졌으며, 최대형광감소치도 각각 6, 13,

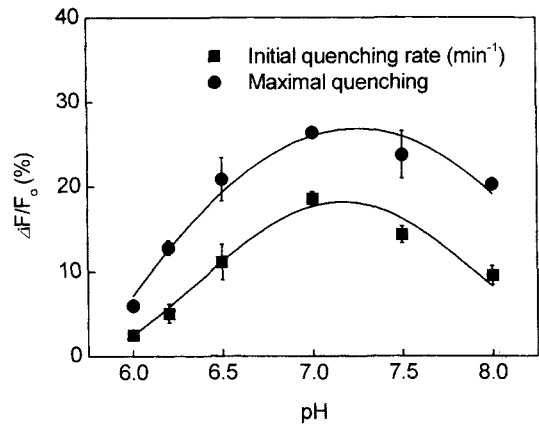


Fig. 3. Effect of pH on quinacrine fluorescence quenching. The pH of reaction buffer was adjusted from 6 to 8 and the quenching of quinacrine fluorescence was measured. The data represent the average value of three experiments. Values are mean ± SD.

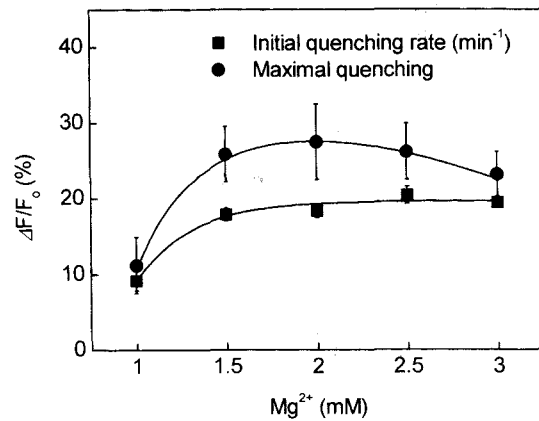


Fig. 4. Effect of Mg²⁺ on quinacrine fluorescence quenching. Concentration of Mg²⁺ was increased from 1 mM to 3 mM and the quenching of quinacrine fluorescence was measured. The rate of initial quenching was measured right after the initiation of H⁺-ATPase activity and the maximal quenching was measured at maximum level of quenching.

21, 26, 24, 20%로 나타나, 초기형광감소율과 최대형광감소치는 유사한 pH 의존성을 보였다.

Quinacrine의 형광을 이용하여 측정된 결과로부터 수소이온이동 활성은 H⁺-ATPase의 효소활성과 유사하게 pH에 따라 변화하여 bell-shape을 이루며, 수소이온이동의 최대 활성은 pH 7.0-7.2에서 얻어짐을 확인하였다. 이것은 토마토 뿌리조직으로부터 분리한 마이크로솜 ATPase의 최적 활성이 pH 7.0-8.0에서 얻어진다는 이전의 결과¹²⁾와도 부합한다. 이상의 결과로부터 quinacrine의 형광변화를 이용하여 측정된 수소이온이동 활성은 액포막이나 원형질막 H⁺-ATPase들에 의해 주로 좌우되며, 다른 이온채널이나 transporter 단백질들의 영향을 거의 받지 않음을 알 수 있었다.

Mg²⁺의 농도에 따른 활성변화. H⁺-ATPase는 활성을 위해서 Mg²⁺을 보조인자로 요구하며, 일반적으로 Mg²⁺ 농도가 1 mM 이하로 낮아지면 ATPase의 활성은 급격히 저해된다.²⁰⁾ H⁺-ATPase에 의한 수소이온이동 활성에 미치는 Mg²⁺의 효과를

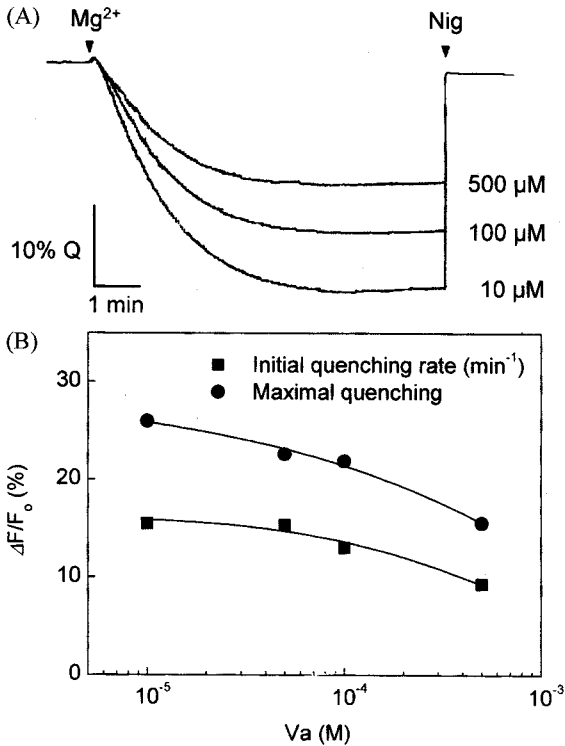


Fig. 5. Vanadate-dependent quenching of quinacrine fluorescence. Vanadate was added to the reaction buffer at the concentration from 10 μM to 500 μM. (A) Fluorescence quenching spectra of quinacrine at various concentration of vanadate. (B) Amounts of quenching obtained at various concentration of vanadate.

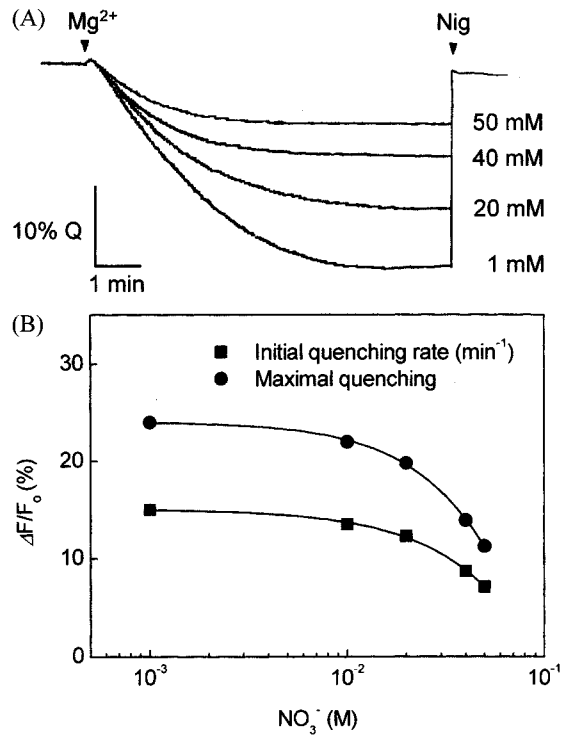


Fig. 6. Nitrate-dependent quenching of quinacrine fluorescence. Nitrate was added to the reaction buffer at the concentration from 1 mM to 50 mM. (A) Quenching of emission spectra at various concentration of nitrate. (B) Amounts of quenching obtained at various nitrate concentration.

Mg²⁺의 농도를 달리하여 1-3 mM 범위에서 조사하면, 마이크로솜 내부로의 수소이온 유입에 의한 quinacrine의 최대형광감소치는 2 mM의 Mg²⁺에서 반응전 quinacrine 형광의 26%로 가장 크게 나타났다(Fig. 4). 그러나 각각의 Mg²⁺ 첨가시 나타난 초기형광감소율은 1.5 mM의 Mg²⁺을 첨가하였을 때 17%/min으로 급격히 증가하였고, 1.5 mM 이상에서는 큰 변화 없이 거의 일정하였다. 따라서, H⁺-ATPase의 활성화에 의한 수소이온이동 활성측정을 위해서는 2 mM의 Mg²⁺이 적절함을 확인하였다.

원형질막 H⁺-ATPase의 활성측정. 원형질막 및 액포막 H⁺-ATPase들에 의한 마이크로솜 내부로의 수소이온이동 활성을 측정하기 위하여 각각의 선택적 저해제인 vanadate와 NO₃⁻에 의한 quinacrine 형광변화 특성을 조사하였다. 먼저 quinacrine의 형광을 이용한 원형질막 H⁺-ATPase의 활성측정을 위하여 vanadate를 10 μM에서 500 μM까지 증가시켰을 때, vanadate의 농도를 증가시킬수록 초기형광감소율과 최대형광감소치는 점차 줄어들었다(Fig. 5).

Vanadate를 10 μM의 농도로 처리하였을 때, 초기형광감소율과 최대형광감소치는 각각 15.5%/min과 26%로 측정되어 대조 실험치와 거의 같은 결과를 보였고, 이것으로 10 μM vanadate에 의한 저해효과는 거의 관측되지 않았다. 그러나, vanadate의 농도를 100 μM로 증가시켰을 때, 초기형광감소율과 최대형광감소치는 위의 대조실험에서의 측정치에 비하여 각각 16%와 25% 정도 감소하여 원형질막 H⁺-ATPase의 저해를 확인하였다. Vanadate를 100 μM 이상의 농도로 첨가시켰을 때는 원형질막

H⁺-ATPase의 저해는 증가하였으며, 500 μM vanadate를 첨가하였을 때에는 초기형광감소율과 최대형광감소치가 각각의 대조 실험치에 비하여 40.2%와 39.8% 감소하였다. 한편, vanadate의 농도를 증가시키에 따라 최대형광감소치가 초기형광감소율보다 더 크게 감소하였다.

액포막 H⁺-ATPase의 활성측정. 액포막 H⁺-ATPase의 선택적 저해제인 NO₃⁻를 사용하여 quinacrine의 형광감소 저해를 측정함으로써 액포막 H⁺-ATPase에 의한 수소이온이동 활성을 측정하였다. 반응용액 중의 NO₃⁻ 농도를 1, 10, 20, 40, 50 mM로 높였을 때, 수소이온이동 활성화에 의한 quinacrine의 형광감소는 효소반응 전 형광에 비하여 각각 24, 22, 20, 14, 11%로 측정되어 NO₃⁻의 농도가 증가할수록 최대형광감소치는 작아졌다(Fig. 6). 또한, 초기 형광감소율도 각각의 농도에서 15, 14, 12, 9, 7 %/min으로 나타나, NO₃⁻ 농도 증가에 따라 H⁺-ATPase 활성화에 의한 수소이온이동 활성이 감소하는 것으로 나타났다. 두 가지 방법에 의해 얻어진 수소이온이동 활성 측정값은 20 mM 이상의 NO₃⁻를 첨가하였을 때, 액포막 H⁺-ATPase에 의한 수소이온이동이 효과적으로 저해됨을 확인하였다. 한편, vanadate와 NO₃⁻를 동시에 처리하였을 경우 각각의 저해효과는 어느 정도 부가적으로 나타났다(자료 미제시).

이상의 결과에서 H⁺-ATPase의 활성화에 따른 quinacrine의 형광감소 측정으로 생체막을 경계로 형성된 pH의 기울기를 측정하는 것이 가능하며, 이를 위한 최적조건으로 효소 반응용액 중 마이크로솜 단백질은 0.43 μg/μl, pH는 7.0-7.2, Mg²⁺의 농

도는 2 mM이 필요함을 확인하였다. 또한, vanadate와 NO_3^- 에 의한 수소이온이동 활성저해도 선택적으로 이루어짐으로써, quinacrine의 형광을 이용한 수소이온이동 활성측정법이 원형질막 및 액포막 H^+ -ATPase의 활성특성 연구에도 적용할 수 있음을 보였다. 따라서, quinacrine의 형광변화를 이용한 수소이온이동 활성측정법은 H^+ -ATPase 활성연구를 위한 효과적인 방법이 될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 논문은 한국과학재단지정 충북대학교 첨단원예기술개발연구센터의 지원에 의한 것입니다.

참고문헌

- Morsomme, P. and Boutry, M. (2000) The plant plasma membrane H^+ -ATPase: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1465**, 1-16.
- Marchesini, N. and Docampo, R. (2002) A plasma membrane P-type H^+ -ATPase regulates intracellular pH in *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **119**, 225-236.
- Bruan, Y., Hassidim, M., Lerner, H. R. and Reinhold, L. (1988) Evidence for a Na^+/H^+ antiporter in membrane vesicles isolated from roots of the halophyte *Atriples nummularia*. *Plant Physiol.* **87**, 104-108.
- Garbarino, J. and DuPont, F. M. (1988) NaCl induces a Na^+/H^+ antiport in tonoplast vesicles from barley roots. *Plant Physiol.* **86**, 231-236.
- McClure, P. R., Kochian, L. V., Spanswick, R. M. and Shaff, J. E. (1990) Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots I. Effects of nitrate on the membrane potential. *Plant Physiol.* **93**, 281-289.
- McClure, P. R., Kochian, L. V., Spanswick, R. M. and Shaff, J. E. (1990) Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots II. Measurement of NO_3^- and H^+ fluxes with ion-selective microelectrodes. *Plant Physiol.* **93**, 290-294.
- Buckhout, T. J. (1994) Kinetics analysis of the plasma membrane sucrose- H^+ symporter from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Plant Physiol.* **106**, 991-998.
- Brune, A., Gonzalez, P., Goren, R., Zehavi, U. and Echeverria, E. (1998) Citrate uptake into tonoplast vesicles from acid lime (*Citrus aurantifolia*) juice cells. *J. Memb. Biol.* **166**, 197-203.
- Rentsch, D., Görlach, J., Vogt, E., Amrhein, N. and Martinoia, E. (1995) The tonoplast-associated citrate binding protein (CBP) of *Hevea brasiliensis*. *J. Biol. Chem.* **270**, 30525-30531.
- Sze, H. (1985) H^+ -translocating ATPases: advances using membrane vesicles. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**, 175-208.
- Cho, K. H., Sakong, J. and Kim, Y. K. (1998) Characterization of microsomal ATPases prepared from tomato roots. *Agric. Chem. Biotechnol.* **41**, 130-136.
- Cho, K. H. (1997) Characterization of microsomal ATPases prepared from soybean roots and tomato roots. M. S. Thesis. Chungbuk National University.
- Lew, R. R. and Spanswick, R. M. (1984) Proton-pumping activities of soybean (*Glycine max* L.) root microsomes: localization and sensitivity to nitrate and vanadate. *Plant Sci. Lett.* **36**, 187-193.
- Clerc, S. and Barenholz, Y. (1998) A quantitative model for using acridine orange as a transmembrane pH gradient probe. *Anal. Biochem.* **259**, 104-111.
- Palmgren, M. G. (1991) Acridine orange as a probe for measuring pH gradients across membranes: mechanism and limitations. *Anal. Biochem.* **192**, 316-321.
- Tavakoli, N., Kluge, C., Golladack, K., Minira, T. and Dietz, K. J. (2001) Reversible redox control of plant vacuolar H^+ -ATPase activity is related to disulfide bridge formation in subunit E as well as subunit A. *Plant J.* **28**, 51-59.
- Lee, H. C. and Forte, J. G. (1978) A study of H^+ transport in gastric microsomal vesicles using fluorescent probes. *Biochim. Biophys. Acta* **508**, 339-356.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Palmgren, M. G., Askerlund, P., Fredrikson, K., Widell, S., Sommarin, M. and Larsson, C. (1990) Sealed inside-out and right-side-out plasma membrane vesicles. *Plant Physiol.* **92**, 871-880.
- Cho, K. H., Sakong, J. and Kim, Y. K. (2001) Inhibition of microsomal ATPases by high concentration of Mg^{2+} in tracheal epithelial cells. *Life Sci.* **69**, 2875-2886.

Microsomal Proton Transport Activity Measured by Quinacrine Fluorescence from Tomato Roots

Dae-Seop Shin, Kwang-Hyun Cho and Young-Kee Kim* (*Department of Agricultural Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea*)

Abstract: Quinacrine, a pH-sensitive fluorescence probe, which exists either as an unprotonated fluorescence form or a protonated nonfluorescence form, can be used to measure the proton transport activity of H⁺-ATPase. Quinacrine was used to determine the optimal conditions for measuring the activity of microsomal H⁺-ATPases prepared from the roots of tomato plants. The amount of quinacrine fluorescence quenching obtained at 0.43 μg/μl of microsomal protein concentration was 25-26%, which shows that the enzyme activity of 100 nmol/min decreases 10% of quinacrine fluorescence. Maximal fluorescence quenching was obtained at pH 7.0-7.2 and 2 mM Mg²⁺. Because the activity of microsomal H⁺-ATPase is also maximal at these conditions, the quinacrine fluorescence well represents the activity of H⁺-ATPase. Vanadate and NO₃⁻, specific inhibitors of plasma and vacuolar H⁺-ATPases, respectively, were successfully applied to inhibit the quinacrine fluorescence quenching mediated by the corresponding H⁺-ATPases. These results imply that quinacrine is a useful tool for measuring the proton transport activities of microsomes obtained from the root tissue of tomato plants.

Key words: quinacrine, proton transport, H⁺-ATPase, tomato roots

*Corresponding author