

植物生物化学

[美] J. 邦纳 J. E. 瓦纳 主编

科学出版社

植物生物化学

〔美〕J. 邦纳 J.E. 瓦纳 主编

《植物生物化学》翻译组

科学出版社

1984

内 容 简 介

本书共分三部分。第一部分是植物细胞，着重阐述植物细胞的亚显微结构和亚显微功能；第二部分是基础代谢，这是全书的重点，对植物体内各种物质代谢作了全面而详细的叙述；第三部分是对于自养植物的光合途径，包括碳代谢途径和能量代谢途径，此外对固氮问题亦有专论。本书每一部分又分若干不同的专题，每个专题为一独立的专论，但综合全书，又是一部完整而系统的综述现代植物生物化学的论著。

本书可供生物学、植物学、植物生理学和植物生物化学的科技人员以及综合性大学生物系和农林院校师生参考。

J. Bonner and J. E. Varner
PLANT BIOCHEMISTRY
Third Edition
Academic Press, 1976

植 物 生 物 化 学

〔美〕J. 邦纳 J.E. 瓦纳 主编

《植物生物化学》翻译组

责任编辑 梁淑文

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1984年1月第一版 开本：787×1092 1/16
1984年1月第一次印刷 印张：41 1/4 插页：2
印数：0001—5,950 字数：959,000

统一书号：13031·2395

本社书号：3273·13-10

定价：7.30元

译者的话

植物生物化学无论在植物学或是在生物化学的分支中都是比较年青的学科。如果以1921年 Thatcher 的《植物生命的化学》(Chemistry of plant Life) 算是这个领域的第一部专著, 1922年 Czapek《植物的生物化学》(Biochemie der pflanzen) 的出版, 作为这个学科的命名的话, 至今也只有60年左右的历史。然而由于工农业生产的需要和物理、化学新理论、新技术的渗入, 使它在近30年来有了蓬勃的发展, 已成为分子生物学的重要内容。

Bonner 教授的《植物生物化学》第一版于1950年问世, 它总结了以前30年的研究成果, 也推动了以后30年这门科学的发展。1965年它出版了第二版, 它从由一位作者撰写的专著变成了由28位各方面专家协同写作的综述。由于它全面地阐述了植物生物化学各方面的成就, 在国际上影响较大、声誉较高, 成为各国大学有关专业的高年级学生、研究生、教师和科学工作者的重要参考文献。现在展示在读者面前的是它的第三版, 它基本上保持了第二版的特点, 但在内容上作了重大的修改和增订, 反映了植物生物化学的现代进展。

Bonner 教授是美国科学院院士, 还是美国植物学学会、美国化学学会、美国植物生理学学会、美国生物化学学会的成员。现在正从事染色体分子生物学和遗传性控制的研究。1979年曾来我国讲学。

Varner 教授现正从事衰老细胞的生物化学和植物激素作用机理的研究。

我国植物生物化学的研究在解放前已有少数前辈科学家作了一些先驱性工作。中华人民共和国成立以后, 中国科学院和有关产业部门的许多研究所逐步开展了这方面的研究, 取得了一定的成绩; 一些高等院校结合开设植物生理学也讲授了这方面的内容, 培养了一些人材。这样使这门学科在中国初步扎下了根。但是这些进展与我国工农业生产发展的需要相比、与国际上科学技术日新月异的变化相比, 差距是相当大的。30年来我国尚未正式出版过自己论著的“植物生物化学”, 翻译的也十分少。为了促进这门学科在我国的发展、为了弥补国内这方面著作的暂缺, 我们一些同志翻译了这本书。参加的有(按姓氏笔划为序): 华瑾、朱至清、陆怀南、吴石君、邹喻苹、李复生、林忠平、施定基、荆玉祥、郭秀芳、梁峥、梁继健、崔激、童哲、蔡耀垣、薛德榕、戴云玲。

由于译者的水平有限, 限于时间未对全书作统一的校对, 因此一定有不少错误, 恳求批评指正。

施定基

1981.4.

前 言

这部专著是供植物学的高年级学生或专业研究者用的。它也是面向希望了解植物独有的生物化学领域如细胞壁物质、光合作用或固氮作用的知识生物化学家的，或者对于植物在什么程度上具有在其他生物中发现的那些生化过程有兴趣的生物化学家的。这部著作对一般植物生物学家也是有用的。生物化学可能用于理解和解决包括在植物生物学中更专门方面的许多问题，这些专门方面包括分类学、形态学、生态学、园艺学、作物学、病理学等。本书为各个领域的学生和研究工作者提供了直接运用于植物的生物化学知识，我们相信这对他们是有帮助的。最后，我们感到它作为植物生物化学的一本教科书，可能是成功的。进行这样学习的学生需要某些有机化学的基础，但是不需要预先学习生物化学。

我们试图在这种意义上完整地提出每一个论题，即我们从一般原理开始，以这个课题的目前状况作结束。我们希望读者在学习本书中的一个论题以后，会感到自己掌握着这个领域中可用的最新知识，有资格进入自己的实验室，开始进行研究。为了帮助研究工作者，我们在参考文献中列出了原始文献；而为了帮助学生，我们列出了每个课题更一般的读物。不具备生物化学知识的学生将会发现，这些读物是有价值的，也许还是必需的。

从前一版《植物生物化学》出版以来的十一年中，这个学科的所有领域都有了进展。某些原因是由于植物生理学日益强调了植物生物化学，以更深入地理解各个生理过程；另一些原因是由于对十一年以前尚不详知的问题有了认识。后一方面的例子可以在全书中找到。

我们相信本书这一版将对读者是有用的。我们感谢同事们对本书的贡献和支持。我们还感激科学出版社（Academic Press）的编辑，他们为准备本书出版作了连续不断和精巧的努力。

James Bonner

Joseph Varner

（施定基译）

目 录

第一篇 植物细胞：亚显微结构和亚显微功能	1
第一章 细胞和亚细胞 (J. Bonner)	1
一、引言	1
二、植物细胞的亚细胞组分	1
三、细胞生命的逻辑学	2
四、细胞分级分离的方法	4
五、高尔基体的分离	7
六、作为一个整体的细胞	7
第二章 核蛋白体 (E. Stutz)	8
一、引言	8
二、核蛋白体的结构	9
三、核蛋白体循环	17
四、核蛋白体杂种	17
五、叶绿体和线粒体核蛋白体	18
第三章 细胞核 (J. Bonner)	22
一、引言	22
二、制备程序	22
三、研究结果	25
四、结论	38
第四章 细胞膜 (A. A. Benson 和 A. T. Jokela)	41
一、引言	41
二、细胞膜的组成	42
三、细胞膜的结构	46
四、特殊细胞膜的特性	49
第五章 微体 (R. W. Breidenbach)	58
一、引言	58
二、一般描述和命名	58
三、植物微体的分离	61
四、微体的分布	61
五、功能作用	63
六、微体的生物发生	68
第六章 叶绿体 (R. B. Park)	75
一、引言	75
二、光合作用过程的生理学研究	75
三、光反应和暗反应在叶绿体上的定位，与专一化的叶绿体结构的关系	77
四、光合单位，它的生理学和形态学表达	88

五、叶绿体的普通生物学	90
第七章 植物的微管 (P. K. Hepler)	95
一、引言	95
二、微管的结构	95
三、微管的组成及其装配	97
四、纺锤器：有丝分裂和胞质分裂	99
五、纺锤极：分裂面	106
六、有丝分裂的机理	108
七、外周的微管	112
八、结论和展望	117
第八章 液泡 (Ph. Matile)	123
一、引言	123
二、液泡的生物化学	124
三、液泡的功能	133
四、液泡的个体发生	142
第九章 初生细胞壁 (P. Albersheim)	147
一、引言	147
二、初生细胞壁的非纤维素结构成分	148
三、初生细胞壁结构成分间的连接	160
四、悬浮培养的械细胞壁的暂定的分子结构	165
五、初生细胞壁的非结构成分	171
六、所有这些关于细胞壁伸长生长的机理告诉了我们些什么?	172
第二篇 基础代谢	179
第十章 代谢途径中酶活性的调节 (J. Preiss 和 T. Kosuge)	179
一、引言	179
二、小分子代谢物对酶活性的调节	180
三、化学修饰对酶活性的调节	184
四、在糖原异生作用和糖酵解过程中的酶之间“无效循环”的调节	186
五、腺苷酸能荷对代谢的控制	187
六、变构酶类的动力学性质	189
七、光合碳代谢中酶类的调节	194
八、光合组织中淀粉生物合成的调节	196
九、高等植物非绿色组织中的调节	201
十、氮代谢的调节	206
十一、摘要	211
第十一章 单糖类和低聚糖类 (J. E. Gander)	221
一、引言	221
二、糖磷酸酯的转化	223
三、1-L-肌醇的代谢	232
四、L-抗坏血酸的生物合成	236
五、低聚糖的生物合成	237
六、地衣体内的多元醇、单糖和低聚糖	244
七、结束语	245

第十二章 多糖类 (T. Akazawa)	253
一、淀粉	253
二、菊粉、甘露聚糖和其他储备的多糖类	263
第十三章 细胞壁的生源说 (A. L. Karr)	268
一、引言	268
二、细胞壁术语	269
三、用作形成细胞壁聚合物的底物化合物合成过程	271
四、催化细胞壁多糖合成的酶系统	274
五、多糖合成的中间产物	278
六、多糖合成的细胞内定位	278
七、细胞壁糖蛋白(伸展蛋白)的合成	279
八、质膜以外发生的细胞壁聚合物的互变	280
九、结论	280
第十四章 脂类代谢 (P. K. Stumpf)	284
一、脂类的化学组成	284
二、脂肪酸的降解	291
三、丙二酸单酰-CoA 的生物合成	297
四、长链饱和脂肪酸的生物合成	298
五、不饱和脂肪酸的生物合成	303
六、结论: 脂酰-ACP 和脂酰-CoA 相互关系的讨论	305
第十五章 核酸代谢 (J. L. Key)	309
一、引言	309
二、DNA 复制的酶学	309
三、RNA 生物合成的酶学	312
四、DNA 的特征和性质	318
五、RNA 代谢	324
第十六章 蛋白质的生物合成 (A. Marcus)	339
一、引言	339
二、转录	339
三、翻译	339
四、遗传密码和信使 RNA	340
五、氨基酰-tRNA 的合成	342
六、氨基酸的聚合	344
七、链的终止	347
八、完整蛋白质的形成	347
九、调节作用	348
第十七章 氨基酸的生物合成及其调节 (J. K. Bryan)	351
一、引言	351
二、氨基酸前体的来源和动用	351
三、个别氨基酸的合成	355
四、结论	369
第十八章 矿物质代谢 (D. W. Rains)	374
一、引言	374

二、必需性	374
三、必需营养元素的特异性功能	375
四、其他营养元素	393
第十九章 硫酸盐还原 (L. G. Wilson 和 Z. Reuveny)	400
一、引言	400
二、硫酸盐的活化作用	401
三、真菌和细菌的同化性硫酸盐还原	405
四、藻类和高等植物的硫酸盐还原	409
五、半胱氨酸的生物合成	414
六、蛋氨酸的生物合成	416
第二十章 硝酸盐代谢 (E. J. Hewitt, D. P. Hucklesby 和 B. A. Notton)	425
一、引言	425
二、硝酸盐还原	426
三、亚硝酸盐还原	446
第二十一章 植物光敏色素 (P. H. Quail)	462
一、引言	462
二、时间顺序	463
三、植物光敏色素分子	463
四、生物学表现	471
五、结论	479
第二十二章 激素 (J. E. Varner 和 David Tuan-Hua Ho)	483
一、乙烯	483
二、细胞分裂素类	490
三、植物生长素	496
四、脱落酸和有关的化合物	501
五、赤霉素	508
第二十三章 衰老 (L. Beevers)	524
一、引言	524
二、衰老的调节	525
三、衰老期间的生物化学变化	526
四、衰老的逆转	536
五、结论	537
第三篇 自养	540
第二十四章 光合作用：碳的途径 (M. D. Hatch)	540
一、引言	540
二、固定 CO ₂ 的途径	541
三、光合作用的调节	562
四、光呼吸作用和乙醇酸途径	563
五、光合作用途径和其他特征	566
第二十五章 光合作用：能量的历程 (B. Kok)	574
一、引言	574
二、早期的反应	577
三、光量子的捕获和分配	579

四、光系统	585
五、光合磷酸化作用	591
六、力能学和动力学	596
第二十六章 固氮作用 (R. H. Burris)	602
一、历史	602
二、氮循环	602
三、固氮生物	603
四、固氮生物化学	607
索引	616
英汉名词对照	630

第一篇 植物细胞: 亚显微结构和亚显微功能

第一章 细胞和亚细胞

J. Bonner

一、引言

二、植物细胞的亚细胞组分

三、细胞生命的逻辑学

四、细胞分级分离的方法

五、高尔基体的分离

六、作为一个整体的细胞

一、引言

生物化学中最重要的结论之一是: 所有各种生物的细胞都具有同样比较小的几种亚细胞组分。对于不同种细胞来说, 这些亚细胞体都很相似。不仅在形态和亚显微结构方面相似, 而且在化学组成尤其在化学功能方面也相似。每一种亚细胞体对整个细胞的活动都是不可缺少的。我们对细胞代谢生化途径的剖析和对其生命活动规律的认识, 很大程度上是由于1950年以来技术的发展, 使得我们能把各种亚细胞组分彼此分开, 并确定了和每一种亚细胞组分相联系的酶系统。因此, 我们的注意力首先是植物细胞的亚细胞组分。

二、植物细胞的亚细胞组分

植物细胞的主要亚细胞组分及其生物化学, 主要指的是细胞核、叶绿体、线粒体、溶酶体、液泡、核糖核蛋白体, 信使 RNA 和各种可溶性酶。表 1.1 列出了在一典型或正常细胞中所发现的这些亚细胞组分的数目。绝大多数植物的细胞只有一个核。但我们也知道, 即使在高等植物中, 也有许多多核细胞的例子。例如, 溶解掉有节乳汁管或筛管的横隔细胞壁后, 看到它们的细胞是多核的。一般来说, 进行光合作用的每个植物细胞中有几十个叶绿体, 平均约为50个。另外还有前质体, 因为成熟叶绿体是从它发育来的。但是我们现在还不明确一个典型细胞中究竟有多少个前质体, 所以我们不进一步讨论它。前质体不仅存在于植物的光合部分, 而且也存在于植物的非光合部分, 例如根中。

植物细胞中线粒体数为100—500, 有些到1000。这是典型数目。溶酶体数和液泡数大致相等。核糖核蛋白体属于更小的颗粒范畴, 它的数目比叶绿体或线粒体数多得多。一个正生长的活跃植物细胞可能含几十万个核糖核蛋白体, 然而这个数目随细胞年龄、活动状态等的不同而有很大变化。细胞质中蛋白质的大部分, 我们通常所说的非颗粒细胞质, 是由大量各种酶分子组成的。一典型细胞的酶分子总数可能是1000, 000, 000。这个数可能包

含1000—10,000种不同的酶。每一种酶专一地催化一种化学反应。如果一典型植物细胞包含10,000种不同的酶分子1,000,000,000个,那么每一种酶含100,000个酶分子。从上述计算,我们看到,总可溶胞质蛋白的任何一种酶分子的比例平均为0.001%。但是实际比例与这个数字往往相差很大。我们知道,某种细胞中的某种酶分子,占总可溶性蛋白的几十分之一到几分之一。那么多种酶分子,每一种酶分子又占总酶分子数的很小比例。按照这个一般规律,当我们提纯酶的时候,就应富集酶的10000倍甚至更大的倍数。

上面我们已经谈到信使RNA,是植物细胞的一种典型组分。信使RNA可以利用下章叙述的方法分离并鉴定出来。今后或许能利用它与核糖核蛋白体之间的相互作用而极容易地把它检测出来。核糖核蛋白体与信使RNA相互作用,并附着在信使RNA上。因为一股信使RNA可能同时束缚许多核糖核蛋白体,所以植物细胞的大量的核糖核蛋白体往往以多核糖核蛋白体大块集合体的形式被检测出来。转移RNA分子一般很小,象可溶性酶。转移RNA还是非颗粒细胞质的一个组分。由于这个原因,因此,在细胞这个范畴里,转移RNA往往叫作可溶性RNA,但把它正式命名为tRNA。

上面概述的亚细胞结构包含在膜系统内。所以,我们也应该把膜系统作为细胞的最有特征的组分之一。这个膜系统不仅包括原生质膜,而且还包括细胞核、叶绿体和液泡外面的膜,以及线粒体的膜、内质网膜和下面谈到的其它结构的膜。植物细胞的原生质膜外面还有细胞壁。因此,从这个意义上讲,细胞壁也可以认为是植物细胞所特有的亚细胞组分。

植物细胞包含更小的亚细胞系统。这些实体是重要的亚细胞组分,但是它们不如表1.1所列的那些亚细胞组分那么普遍和认识得那么清楚。例如溶酶体,它含有水解酶,并导致受损害或衰老细胞的自溶作用。又例如高尔基体,它与酶的浓度、化学修饰和分泌有关,它还和要分泌到细胞外的底物有关(例如形成细胞壁的物质)。人们已经知道,萌发的含油种子中有乙醛酸循环体,它们的作用是使脂肪酸转化为糖的前体。过氧化物酶体是光呼吸所不可缺少的。在这个亚细胞范畴里,还应该包括形成光合原生质环流的微管和其它一些有关的结构物质。纺锤丝使染色体在有丝分裂和减数分裂过程中运动。纺锤丝还产生细胞器。纺锤丝在动物细胞中很明显(中心粒),但在植物细胞中不明显。纺锤丝可能是核染色体组的遗传物质产生的。在许多细胞中,具有较明显功能的更细小的亚细胞组分是淀粉粒、脂肪珠滴、草酸钙晶体。糊粉粒是致密的蛋白体,是种子储存蛋白的地方。

三、细胞生命的逻辑学

在我们详细讨论各种亚细胞系统的运转之前,我们首先考虑细胞生命的总逻辑或总体将是很有帮助的。酶分子使可利用底物转化成为各种分子——建筑元件,细胞的各种组分就是由它们构成的。细胞内进行的每一种化学反应都是由一种酶分子催化的。这是生物学的一条基本规律。活的生物通过酶的作用,从所有热动力学上可能的化学反应选择出那些可利用于细胞代谢的反应。因而,各种酶分子是细胞内各种变化的基本因素,它们是细胞具有生命并能生长所必需的。细胞内除酶以外的所有亚系统都和酶分子的产生有直接或间接关系。酶分子本身没有生命,不能繁殖,因此它们是合成的,由各种氨基酸成分合成。

酶的合成由核糖核蛋白体、信使 RNA 和与这种酶有关的其它各种酶共同承担（第 16 章概述了这部分内容）。可以把信使 RNA 的长链分子比作打孔带，上面有氨基酸组合成某种酶分子排列顺序的信息。核糖核蛋白体译出这一信息，并在转移 RNA 和适当的专一酶分子的协助下，进一步聚合成酶分子。因此，核糖核蛋白体的产生是很重要的。细胞核的一个功能就是产生核糖核蛋白体。核中染色体的功能是产生信息 RNA。植物细胞和一切细胞一样，每一种酶的形成都是受遗传物质的一个或几个基因控制的。由 DNA 构成的遗传物质具有本身复制能力。这些复制品中每一件都包含信使 RNA 分子的一个或几个基因的信息。信使 RNA 分子通过核糖核蛋白体和转移 RNA 译出密码。

总之，核的功能是不仅产生核糖核蛋白体和信使 RNA，而且还复制 DNA，这是细胞分裂所必需的。因为它保证了每一个子细胞得到一套完整的遗传信息复制品。这套遗传信息

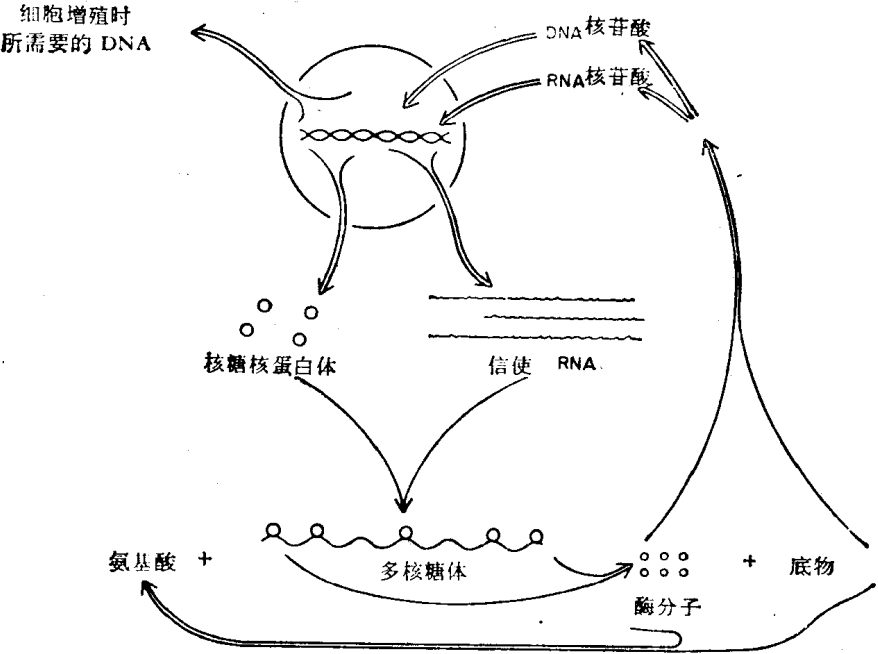


图 1.1 细胞生命的逻辑

为使 DNA 本身增殖，需要三磷酸脱氧核苷。而它们是通过可利用底物进行的酶反应得来的。为了制造酶，DNA 制造了核糖核蛋白体和信使 RNA。它们在一起共同把氨基酸变成酶分子。然后酶又制造了脱氧核糖核苷酸。为了保持这一系统的运转，酶还制造了氨基酸和 RNA 核糖核苷酸。

表 1.1 一典型植物细胞内各种亚细胞颗粒的数量和大小

亚 细 胞 颗 粒	直 径	每一细胞内存在的数
核	5—20 μ m	1
叶绿体	5—20 μ m	50—200
线粒体	1—5 μ m	500—2000
核糖核蛋白体	250 Å	5—50 $\times 10^5$
酶分子	20—100 Å	5—50 $\times 10^8$

是关于在一细胞组织中，如何合成它所需要的各种酶分子的信息（图1.1）。

在细胞的整个生命活动中，叶绿体和线粒体处于什么位置呢？叶绿体和线粒体都是比较大的实体，它们被一层膜包着，象细胞本身一样。叶绿体（我们在下一章将要谈到），在今天看起来，基本上由它们自己的遗传物质和核糖核蛋白体所组成的完整小细胞。它们具有产生叶绿体所特有的酶——适于进行光合作用的酶的能力。线粒体也是不仅含有它们自己的核糖核蛋白体，而且还含有它们自己的DNA。DNA为生产线粒体的核糖核蛋白体编码，显然也为生产线粒体膜结构的蛋白质编码，这种蛋白质是线粒体酶的宿主和受体。而线粒体酶是由核内DNA编码，并由核内转录出的信使RNA产生。这些线粒体酶都聚集在线粒体膜上。另外还有较强有力的证据（我们在下面将要看到）表明，线粒体和叶绿体一样，都是细胞内半独立的有生命的实体，它们具有自我复制的能力。完整线粒体的功能还有氧化可利用的底物和提供ATP形式的能量以满足细胞内耗能反应的需要。

四、细胞分级分离的方法

分离亚细胞组分的第一步是用捣碎器破碎细胞壁和原生质膜。把植物组织浸在与它等重量的研磨介质中，放在捣碎器里以全速研磨30—120秒。这时至少破坏了非纤维组织，破坏了它的大部分细胞并释放出细胞内含物，研磨必须在低温下进行，这样才能最大限度地减少匀浆中的酶发生变化。在匀浆中，底物和酶混合在一起；而在完整细胞中，底物和酶是分隔开和互相不受影响的。（例如，破碎了溶酶体后，就释放出溶酶体水解酶）。一般是在2—4℃的低温室或冰桶中研磨。捣碎器虽然是一种快速而方便的工具，但是它不仅完全破坏了植物组织的细胞壁，而且还大大破坏了亚细胞组分。如常常破坏了核膜和核，造成大量溶酶体溶解，并使乙醛酸循环体和过氧化物酶体几乎全部被破坏。为了分离出完整的核、完整的溶酶体、完整的乙醛酸循环体或过氧化物酶体，就需要用较温和的研磨方法来破碎细胞。一种方法是在装有较松研研的玻璃匀浆器中研磨。研研以每分钟一百—几百转的速度旋转，匀浆一至数分钟。另一方法是用手拿研研在研钵中研磨。以前我们曾提到用Rho和Chipchase（1962）说的去核反应器在近0℃下研磨。植物组织从相对旋转的两个滚筒轴之间通过。由于组织的一端受到挤压，因此每个细胞都受到越来越大的细胞内含物的流体静力学压力。这种去核反应器虽然产量极低，但是对于从植物组织中分离出完整的核来说还是很好用的。

无论用什么提取方法，都必须使用合适的研磨介质。在选择研磨介质时应该考虑以下几点：（1）研磨介质必须和细胞内含物等渗，这样才能最大限度地减少半透膜包着的细胞成分结构，如叶绿体、线粒体、溶酶体等发生变化。一般用0.25—0.45M的蔗糖或甘露醇作研磨介质的渗透反应剂。（2）研磨介质必须具有缓冲能力，以便最大限度地减少胞质pH发生变化。因为胞质pH当细胞的液泡中释放出有机酸时会变化。胞质本身pH值是7—8，所以常常用Tris（羟甲基）-氨基甲烷缓冲液。0.05M的这种缓冲液就足以调整植物组织中绝大多数酸的pH。（3）为了分离出完整的核糖核蛋白体，研磨介质的镁离子浓度至少应是0.001M。如果镁离子浓度太低，核糖核蛋白体就解体成其亚组分。（4）为了把核完整地分离出来，并且不使它们聚集在一起，关键是研磨介质中要有钙离子，而且这

种离子的最适浓度是约 $0.001M$ 。(5)许多酶的活性部位的一关键成分是含一个巯基的氨基酸。因此,为了保持这些酶的活性,就需要在研磨介质中加入含巯基的化合物。这样就保证了酶的巯基处于还原态。一般用 $0.01M$ 的 β -巯基乙醇、半胱氨酸和谷胱甘肽来保持酶活性。当分离特殊和专化酶时,对研磨介质还会有其它的专门要求。但是以上所述是在选择研磨介质时所应该考虑的几个基本条件。

组织经研磨后,才能进行分离亚细胞组分这一步。先要去掉细胞壁碎片。一个简单常用的方法是让匀浆通过硅酮处理过的纸进行过滤(Miracloth)。细胞壁碎片留在纸上,核和叶绿体等更小的亚细胞组分则顺利地通过滤纸。也用篮形离心机及鲨鱼皮滤纸为了进一步研究细胞壁物质,细胞壁碎片可按下述处理获得。

把无细胞壁匀浆进行差速离心。先分离出最重最大的组分——核。要从匀浆分离出完整的核,离心需一百g—几百g(重力)。提纯核可用下章叙述的方法进行。这里要说明一点,因为植物组织在捣碎器里匀浆时破坏了大部分核,所以从植物组织中分离出完整的核往往很困难。相对来说,非常容易作的工作是制备植物组织内处于分裂间期的染色体。而染色体是核中最重要的成分,所以把它们分离出来是很有意义的。植物组织在捣碎器中研磨,经Miracloth过滤,然后以 $4000g$ 离心15分钟。这时,淀粉和分裂间期的染色体形成小丸,而线粒体和溶酶体等保留在上清液里(叶绿体也形成小丸,所以上述方法只适用于无叶绿体器官)。离心后,把松弛成团的染色体从沉淀的淀粉层中分离出来,在 $0.01M$ 、 $pH8$ 的Tris缓冲液里离心,洗几次。再用蔗糖密度梯度离心进行提纯,下章将详谈。

现在我们回过头来谈分离植物细胞器的差速离心这一主要问题。先以 $100-400g$ 离心,分离出完整的叶绿体,然后,叶绿体在以 $500-2000g$ 离心下成丸。虽然上述差速离心足以分离出叶绿体,但一般得到的核组分掺杂有叶绿体,而叶绿体组分也掺杂有核。所以还需要再离心。可以用蔗糖密度梯度离心的方法。例如,在往一个离心管里倒蔗糖溶液的过程中,不断改变它的浓度。如管底的浓度为 $1.7M$,管口的浓度为 $0.25M$ 。然后把匀浆倒在蔗糖梯度的上面,在 $150,000-250,000g$ 的转头上超速离心。核以至核物质碎片,如染色体就沉降到梯度底部。这就是说,它们的体积和密度足够大得可以通过 $1.7M$ 蔗糖梯度并成丸。叶绿体没有沉降到梯度底部,而是悬浮在约 $1.3M$ 蔗糖的区域里。虽然各种植物叶绿体离心的密度和速度都不相同,但是这种方法对于大部分植物来说,都能把核和叶绿体分离得很好(图1.3)。

现在,再从无核和叶绿体的匀浆中分离出线粒体和溶酶体。以 $10,000g$ 离心约10—20分钟后,线粒体形成丸。它掺杂有前质体及溶酶体,用蔗糖密度梯度离心的方法可以把它们分离。这个梯度较小,约 $1.35-1.25M$ 。溶酶体带比线粒体带的密度低。将溶酶体组分溶解在 $pH8$, $0.01M$ Tris中,这时溶酶体破裂,释放出专一水解酶,如磷酸酶。经测定酶活性增加了,于是就鉴定出溶酶体组分。

核糖核蛋白体是从无线粒体的匀浆沉降下来的。匀浆以 $105,000g$ 离心2小时后,就沉降出核糖核蛋白体。球状的核糖核蛋白体可以利用下一章叙述的方法提纯。多核糖核蛋白体的分离需要通过蔗糖密度离心。

现在细胞匀浆中没有较大的或颗粒状的亚细胞酶,而只含可溶性酶、转移RNA和小分子代谢物。其中可溶性酶主要是乙醛酸循环体和过氧化物酶体中所含的酶。把各种可溶性

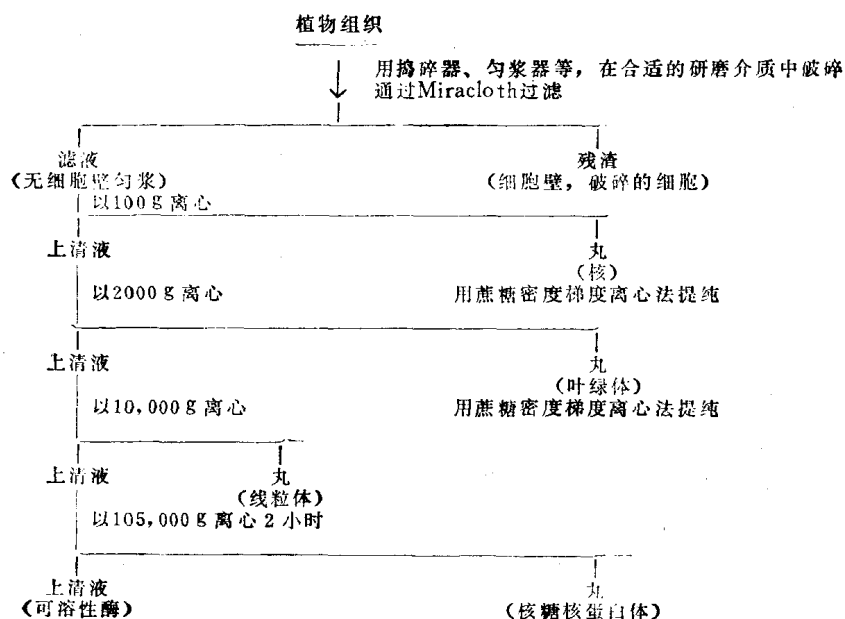


图1.2 植物亚细胞组分分离的流程图，如果在研磨过程中核被破碎，那么核碎片就和叶绿体一起形成丸，这时用蔗糖密度梯度离心的方法分离核碎片和叶绿体。

酶彼此分离是酶学的一个普遍问题。完整的乙醛酸循环体和过氧化物酶体的分离是其中的一个特例。在含乙醛酸循环体的组织中，乙醛酸循环体的数量比线粒体数多得多。在含过氧化物酶体的组织中，如叶子，特别是那些利用 Calvin-Benson 循环进行光合作用的植物叶子中，过氧化物酶体的数量约为线粒体的三分之一。过氧化物酶体和乙醛酸循环体在研磨中都易被破坏，因此分离它们得小心地研磨。如把它们放在等渗溶液中用捣碎器研磨几秒钟，或用研钵和研杆手磨。这样，就可以将它们分离开。当然所得量极少，因为在1.5—2.2M蔗糖梯度下进行适度的研磨，只能破碎很少的细胞。这些实体带在1.24—1.26gm/cm³(密度)。乙醛酸循环体和过氧化物酶体的带紧挨线粒体带的上面，而溶酶体带紧挨线粒体带的下面。

其它亚细胞组分，如微管和纺锤丝，将在以后几章专门讨论。这里我们只指出，亚细胞组分的分离有两个主要问题。第一个问题是在分离过程中，可能产生一些人为的结果，可能形成原细胞没有的实体。如某些亚细胞组分解离为更小的单位。由于在分离过程中，酶降解或其他物质降解而使亚细胞组分的生物活性丧失，并形成蛋白质与核酸的非专一混合物。现在虽然没有统一的方法来避免人为造成的结果，但是一般地我们可以通过迅速分离组分，整个过程在低温下进行，并尽可能利用温和的方法等措施来最大限度地减小人为结果的产生。温和方法如以不大于实际需要的切变力进行研磨。

亚细胞组分分离的第二个问题是各组分的相互掺杂。人们对这种掺杂进行了大量研究，并发明了许多精巧技术来测定它。例如，细胞色素c存在于线粒体而不存在于叶绿体中。因此，当分离叶绿体时发现其中有细胞色素c时，就说明叶绿体组分中混杂了线粒体。核不含叶绿素，叶绿体中含叶绿素。当核制备物中有叶绿素时，就说明核中掺杂了叶绿体。对某些组分进行显微镜观察，也可以鉴定一种组分和另一种组分是否掺杂。许多学生喜欢用

的另一种普通细胞分离的方法是有选择地往匀浆中加一点放射性标记的污染物组分。例如，往要提取核的匀浆中加标记核糖核蛋白体。分离核并可以鉴定其中是否掺杂标记的核糖核蛋白体。以为亚细胞组分很纯而实际不纯的情况，一直是植物生物化学家感到难办的问题。

五、高尔基体的分离

高尔基体特别易损坏，因而很难用差速离心法把它与别的具膜的亚细胞颗粒分离。一个措施是用戊二醛慢慢地均化匀浆。这种双用试剂把蛋白质分子彼此连接起来，使含蛋白质的具膜组分更加稳定。高尔基体比其他没被研磨到的具膜组分的体积大，因此可以从其它具膜组分中分离出来。

六、作为一个整体的细胞

植物细胞，正如一切生物细胞一样，是一个高度组织化的实体。它包含大量各种亚细胞实体：膜、核、核糖核蛋白体、酶、高尔基体、溶酶体、乙醛酸循环体和过氧化物酶体。它们使细胞成为一个有组织的系统。植物细胞是比较复杂的一个整体。我们认为，它是几种不同的、彼此分开而又共生的有组织系统所构成的整体。叶绿体及其它自己的 DNA，核糖核蛋白体和自生酶的能力，构成植物细胞内一个有组织的亚系统。同样，线粒体及其它自己的 DNA，核糖核蛋白体和通过分裂而繁殖的能力，也构成细胞内的一个亚系统。植物细胞内其它所有亚细胞实体可能是在核形成的控制下直接生成的。我们认为，把植物细胞看成是一个具彼此分开的、半独立而又互相依赖的亚系统的整体，对我们认识植物进化是十分重要的。在植物进化过程中，细胞什么时候受到我们现在叫作叶绿体的这些细胞的影响呢？在进化过程中的哪一阶段，植物细胞受到了我们现在称为线粒体的那些生物的影响呢？而又到了哪一步，叶绿体和线粒体进化成为一种微体，并完全依靠它们的寄主细胞供给它们氨基酸、核苷酸，以至一些酶分子呢？这些十分吸引人的问题将在研究植物进化过程中得以解决。

(陆怀南译 童哲校)

参 考 文 献

- Beevers, H. (1969). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **168**, 313.
de Duve, C. (1969). *Proc. Roy. Soc., Ser. B* **173**, 71.
Frederic, S., and Newcomb, E. (1969). *Science* **163**, 1353.
Granik, S. (1964). In "The Cell" (J. Brachet and A. E. Mirsky, eds.), Vol. 6, p. 245. Academic Press, New York.
Miller, A. (1956). In "Handbuch der Pflanzenphysiologie" (W. Ruhland, ed.), Vol. 2, p. 573. Springer-Verlag, Berlin and New York.
Mollenhauer, H. H., and Morre, D. J. (1966). *Annu. Rev. Plant Physiol.* **17**, 27.
Muhlenthaler, K. (1961). In "The Cell" (J. Brachet and A. E. Mirsky, eds.), Vol. 2, p. 85. Academic Press, New York.
Rho, J. H., and Chipcase, M. (1962). *J. Cell Biol.* **14**, 183.
Stumpf, P. J. (1969). *Annu. Rev. Biochem.* **38**, 159.
Tewari, K. K. (1971). *Annu. Rev. Plant Physiol.* **22**, 141.
Tolbert, N. E. (1963). *Nat. Acad. Sci.—Nat. Res. Council. Publ.* **1145**, 648.
Tolbert, N. E. (1971). *Annu. Rev. Plant Physiol.* **22**, 45.
Voeller, B. R. (1964). In "The Cell" (J. Brachet and A. E. Mirsky, eds.), Vol. 6, p. 245. Academic Press, New York.
Zelitch, I. (1964). *Annu. Rev. Plant Physiol.* **15**, 121.