

中国生物化学会专题讨论会文集 (3)

# 农业生物化学

阎隆飞 吴显荣 主编

科学出版社

中国生物化学会专题讨论会文集(3)

# 农业生物化学

阎隆飞 吴显荣 主编

科学出版社

1986

## 内 容 简 介

本文集是由“农业生物化学学术会议”的综述性文章组成,共 11 篇。主要内容有植物抗性与生物膜的流动性、植物的基因工程、鱼类生化、苯丙氨酸解氨酶在植物抗病中的作用、固氮、糖蛋白与农业、DNA 重组与叶绿体遗传工程、体液中酶活性的测定与兽医临床诊断、氨基酸分解代谢等。本书可供农业生物化学的科研工作者和有关的农业院校师生参考。

中国生物化学会专题讨论会文集(3)

## 农 业 生 物 化 学

阎隆飞 吴显荣 主编

责任编辑 赵甘泉

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

\*

1986 年 4 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

1986 年 4 月第一次印刷 印张:7 1/4

印数:0001—1,900 字数:166,000

统一书号:13031·3149

本社书号:4632·13—10

定 价: 1.75 元

## 编 者 的 话

农业生物化学起源很早, Liebig 在 1840 年发表《应用于农业及生理学的有机化学》(Organic Chemistry in Application to Agriculture and Physiology) 一书就涉及到农业生物化学的问题。但是, 农业生物化学后来发展缓慢, 远较医学生物化学为落后。不过, 近年来由于农业现代化的进展, 农业科学各个领域都开展了生物化学的研究, 使得许多农业理论问题得到进一步阐明, 有的逐渐达到分子水平, 有些则在应用方面取得很大效果。

中国生物化学会十分重视农业生物化学在我国的发展, 于 1984 年 5 月 7 日至 11 日在江苏扬州召开了“农业生物化学学术会议”。在会上有关同志作了 8 篇综述性的学术报告, 并在会上交流了 140 篇研究论文。这对我国农业生化的进展起了积极的推动作用。

本专集选编了在农业生化学术会议上发表的大部分综述报告, 其中有“植物抗性与生物膜的流动性”、“植物基因工程在农业上的应用”、“鱼类生化研究的动态和展望”、“苯丙氨酸解氨酶在植物抗病中的作用”、“固氮生物化学的进展”、“糖蛋白与农业”、“DNA 重组与叶绿体遗传工程”、“体液中酶活性的测定与兽医临床诊断”、“氨基酸分解代谢的研究进展”等 9 篇。遗憾的是有 2 篇综述报告由于作者工作繁忙未能将全文写出。另外 2 篇是在分组会议上所宣读的论文的综合介绍, 以便读者能概括了解我国当前农业生化的情况。

我们希望本专集能对我国农业生物化学的发展起一些促进作用, 相信今后农业生化在我国农业社会主义现代化建设中将会作出应有的贡献。

阎隆飞 吴显荣

1984 年 9 月

## 目 录

|                             |              |
|-----------------------------|--------------|
| 植物抗性与生物膜的流动性·····           | 杨福愉( 1 )     |
| 植物基因工程在农业上的应用·····          | 周光宇( 15 )    |
| 鱼类生化研究的动态和展望·····           | 王祖熊( 22 )    |
| 苯丙氨酸解氨酶在植物抗病中的作用·····       | 薛应龙( 34 )    |
| 固氮生物化学的进展·····              | 尤崇杓、宋未( 51 ) |
| 糖蛋白与农业·····                 | 阎隆飞( 70 )    |
| DNA 重组与叶绿体遗传工程 ·····        | 李继耕( 81 )    |
| 体液中酶活性的测定与兽医临床诊断·····       | 齐顺章( 90 )    |
| 氨基酸分解代谢研究的进展·····           | 吴显荣( 101 )   |
| 我国植物抗性、昆虫、固氮和病毒生化的研究进展····· | 严家骥等( 107 )  |
| 我国植物生化研究的进展·····            | 李明启等( 111 )  |

# 植物抗性与生物膜的流动性

杨 福 愉

(中国科学院生物物理研究所)

## 一、什么是生物膜的流动性

生物膜是细胞结构的基本形式,细胞外周膜(质膜)和细胞内的膜系(如核膜,线粒体膜,叶绿体膜,内质网膜,溶酶体膜,高尔基体膜等等)统称为生物膜。生物膜由蛋白质、脂质以及多糖等成分组成,是一个多分子(或称超分子)的复杂体系。要研究并阐明生物膜的结构必须探讨这些组分之间的相互关系,长期以来对膜的结构种种假说都是围绕这一中心议题提出的。有关生物膜分子结构的模型很多,目前比较流行的仍然是 1972 年美国 Singer 与 Nicolson 提出的‘流体镶嵌’模型(图 1)。这个模型与过去提出的种种模型的重要区别在于:一是突出了膜的动态结构,流态的脂质双分子层组成膜的连续体。二是显示了膜蛋白分布的不对称性,有的分布在双分子脂质层两侧表面,有的部分或全部嵌入其内部,有的则横跨膜层。1972 年以来,通过很多新技术的广泛应用,对生物膜的结构继续进行了很多研究,大量的实验结果都表明‘流体镶嵌’模型基本上是正确的。在此期间,对膜的流动性(fluidity)尤其作了大量而又深入的研究。

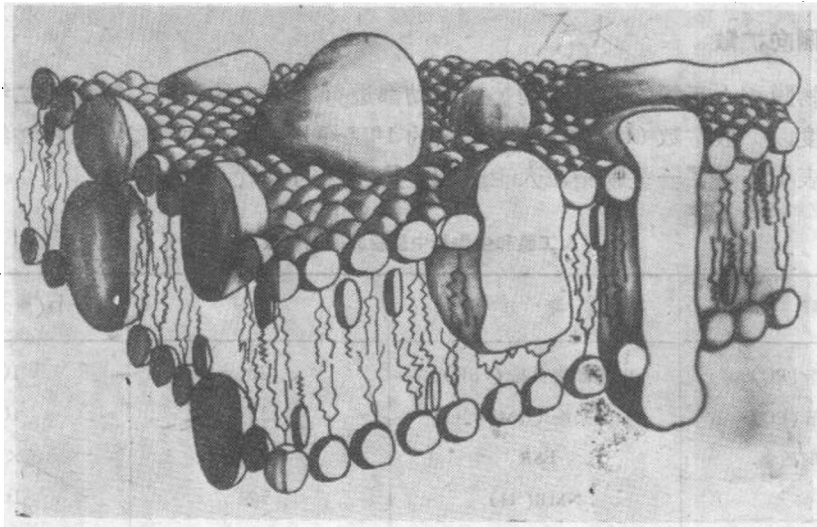


图 1 生物膜的流体镶嵌模型

膜的流动性原来主要指膜脂脂肪酸烃链部分的运动状态。脂质分子的物理状态依赖于温度,在正常生理条件下,它们大多呈液晶态,不断处于热运动之中,当温度降低至某一点时,它们可以从液晶态转为晶态(或凝胶态,见图 2)。这个温度称为膜的相变温度。据报道<sup>[18]</sup>凝胶态膜脂的扩散比液晶态至少要慢 100 倍。研究膜脂的流动性一般都是在膜脂

处于液晶态的条件下进行的。除膜脂外,大部分膜蛋白也不断处于运动状态,称为运动性(Mobility)。因此广义的流动性既包括膜脂的流动性,也包括膜蛋白等组分的运动状态。

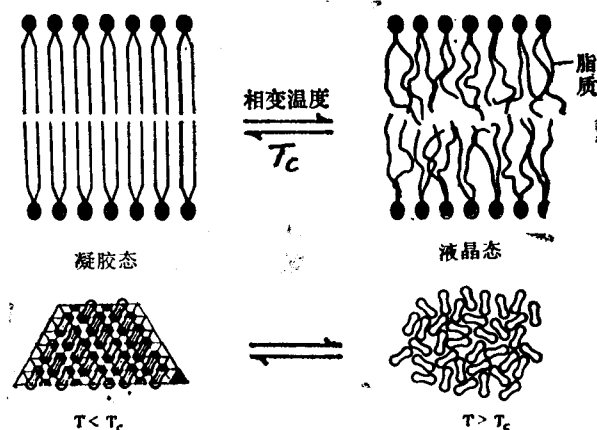


图2 脂膜的相变

## 二、膜脂的流动性

通过电子顺磁共振、核磁共振、X线衍射、荧光漂白、电镜冰冻蚀刻、荧光探针等技术和方法的应用,对膜脂的流动性研究获得了更多的信息。研究的结果表明,膜脂的运动可归纳为下列几种方式:

### 1. 膜脂的侧向扩散

对生物膜和人工膜的膜脂侧向扩散运动都进行了不少的研究。膜脂在二维流体侧向移动的速度以扩散常数(D)来表示,一般为 $10^{-8}$ 厘米<sup>2</sup>/秒。换言之,1秒钟约扩散1微米左右。表1列举了一些膜脂在人工膜和生物膜中的扩散系数。

表1 人工膜和生物膜中膜脂的侧向扩散系数(D)

| 膜             | 监测方法                      | T℃ | D(厘米 <sup>2</sup> 秒 <sup>-1</sup> ) |
|---------------|---------------------------|----|-------------------------------------|
| 卵磷脂(PC)       | 电子顺磁共振(ESR)               | 20 | $10^{-9}$                           |
| 卵磷脂(PC)       | 核磁共振(NMR, <sup>1</sup> H) | 20 | $10^{-8}$                           |
| 肌质网微囊         | ESR                       | 40 | $6 \times 10^{-8}$                  |
|               | NMR( <sup>1</sup> H)      | 50 | $10^{-8}$                           |
| 大鼠肝微粒体        | ESR                       | 40 | $10^{-7}$                           |
| 淋巴细胞质膜        | 荧光                        | 20 | $10^{-8}$                           |
| Torpedo 的电器官  | NMR( <sup>1</sup> H)      | 33 | $10^{-9}$                           |
| 大肠杆菌(E. Coli) | NMR( <sup>1</sup> H)      | 31 | $10^{-8}$                           |
|               | ESR                       | 40 | $10^{-8}$                           |

## 2. 膜脂分子的旋转运动

膜脂分子可围绕与膜平面相垂直的轴进行旋转(图3)。运动的平均相关时间约为  $10^{-6}$ — $10^{-9}$  秒。

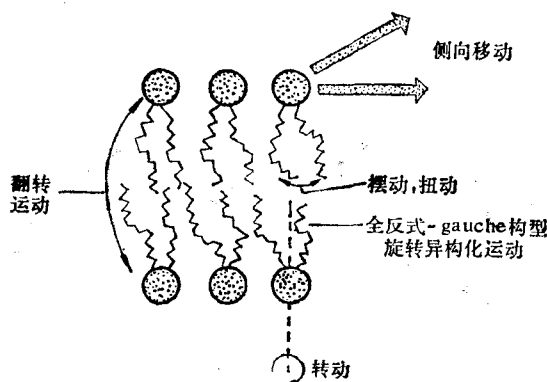


图3 膜脂运动的几种方式

## 3. 膜脂脂肪酸链的摆动与伸缩运动

膜脂脂肪酸侧链可沿双分子层平面相垂直的轴进行伸缩或在轴的附近进行摆动(图3)。这种运动的频率为  $10^9$ /秒。值得指出的是这种运动还表现出梯度差异, 极性基团部分的运动较快, 甘油骨架较慢, 脂肪酸烃部分的运动速度又较快, 尤以‘尾部’最快。

## 4. 膜脂分子的翻转运动

膜脂分子从双分子的一层翻至另一层的运动称为翻转运动(Flip-Flop)。由于膜脂分子具有水、脂兼容的性质, 因此与其它运动方式相比这种运动的速度要慢得多。表2列举了磷脂酰胆碱(PC)在一些生物膜中翻转运动的速率。从中可以看出, 它们之间也有较大的变动范围。值得指出的是, 人工膜中膜脂分子的翻转运动速率就更慢, 其半存期一般为6.5小时—几天。有人猜想, 生物膜与人工膜这方面的差异是否与前者可能含有一种‘翻转酶’有关, 但迄今未见证实。

表2 磷脂酰胆碱(PC)或顺磁标记的PC类似物在生物膜内的翻转运动速率

| 膜                                     | 温 度 | 半 存 期  |
|---------------------------------------|-----|--------|
| 大鼠红细胞                                 | 37  | 4.5 小时 |
| 红细胞膜囊泡                                | 37  | 2.3 小时 |
| 内翻外的红细胞膜囊泡                            | 37  | 5.3 小时 |
| 支原体( <i>Acholeplasma laidlawii</i> )膜 | 0   | ≤ 15 秒 |
| 肝微粒体                                  | 25  | <1 小时  |
| 线粒体内膜                                 | 22  | >24 小时 |

### 5. 膜脂脂肪酸链的全反式-*gauche* 构型的旋转异构化运动

膜脂分子脂肪酸的 C—C 链具有全反式 (All trans) 和 *gauche* 两种构型 (见图 4)。这两种构型可以进行旋转异构运动。这种运动的速率也很快, 其跳动频率为  $10^9$ — $10^{10}$ /秒。在低温条件下主要以‘全反式’构型存在, 随着温度上升 *gauche* 构型增加, 流动性也加大。

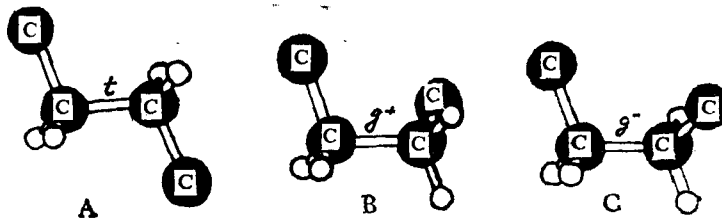


图 4 全反式 (trans)、*gauche* 构型示意图

A: 全反式 (trans), B 与 C: A 旋转  $120^\circ$  后形成的 *gauche* 构型—— $g^+$  (顺时针方向旋转),  $g^-$  (逆时针方向旋转)

## 三、膜蛋白的运动性

生物膜的动态结构不仅表现在膜脂的流动性, 而且, 主要体现膜功能的蛋白质也经常处于运动之中。通过饱和跃迁电子顺磁共振 (saturation transfer electron paramagnetic resonance), 光致漂白荧光恢复法 (fluorescence photobleaching recovery, FPR), 闪光光解法 (flash photolysis) 等新技术的应用, 对膜蛋白的运动也增加了不少新的认识。膜蛋白的运动可分为两种: (1) 侧向扩散, (2) 旋转扩散 (图 5)。

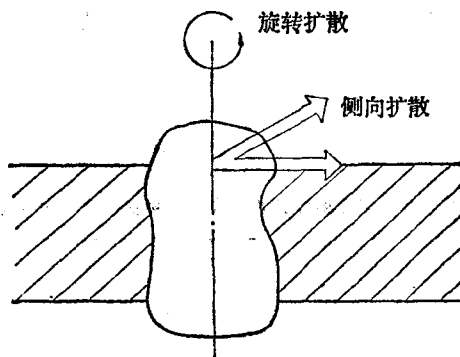


图 5 膜蛋白侧向扩散、旋转扩散示意图

### 1. 侧向扩散

有几种方法可以测定膜蛋白的侧向扩散, 其中光致漂白荧光恢复法较为常用。这个方法利用激光微束使膜上半径为 1 微米的区域的标有发绿光的荧光素 (fluorescein) 或发

红光的碱性苾香红 (rhodamine) 的膜蛋白不可逆地漂白, 然后邻近部位未被漂白、具有荧光标记的膜蛋白由于侧向扩散而进入这个微区时, 荧光又重新呈现, 因此通过光致漂白荧光恢复的监测可以测定膜蛋白的侧向扩散, 表 3 列举了一些膜蛋白的侧向扩散系数, 从中也可以看出各种膜蛋白的侧向扩散也有很大的差异。

此外, 膜蛋白的侧向扩散也受到细胞骨架的很大制约, 据报道红细胞如果由收缩蛋白 (spectrin), 肌动蛋白 (actin) 等组成的细胞骨架发生缺陷 (如球形红细胞), 那末内在的膜蛋白的侧向扩散速率就会增加 50 倍左右<sup>[18]</sup>。

表 3 一些内在的膜蛋白的侧向扩散系数 ( $D_L$ )

| 蛋 白 质                      | 组 织                          | T°C    | $D_L$ (厘米 <sup>2</sup> /秒) |
|----------------------------|------------------------------|--------|----------------------------|
| 视紫红质                       | 视杆细胞外段                       | 20     | $2-6 \times 10^{-9}$       |
| 胰岛素受体                      | 成纤维细胞                        | 23     | $3-5 \times 10^{-10}$      |
| 刀豆球蛋白 A 受体                 | 成纤维细胞                        | 22     | $10^{-11}$                 |
| 血型糖蛋白 A<br>(glycophorin A) | 重组于双肉豆蔻酰磷脂酰<br>胆碱 (DMPC) 脂质体 | > 相变温度 | $10^{-8}$                  |
| 乙酰胆碱受体                     | myotubes                     | 35     | $10^{-12}$                 |
| 菌紫质                        | 嗜盐菌紫色膜                       |        | $< 10^{-12}$               |

## 2. 膜蛋白的旋转扩散

除侧向扩散外, 膜蛋白还可围绕与膜平面相垂直的轴进行旋转运动。需要指出的是迄今为止的实验表明膜蛋白似乎只能旋转而不能改变相对定位进行滚转运动。旋转扩散的快慢以旋转弛豫时间来表示, 与侧向扩散相似, 不同的内在膜蛋白由于本身及微环境的差别, 它们的旋转扩散也有很大的差异, 例如, 从表 4 可以看出, 视紫红质与菌紫质的旋转弛豫时间至少相差 1000 倍。

表 4 一些内在的膜蛋白的旋转弛豫时间

| 膜 蛋 白            | 膜                  | 旋转弛豫时间(微秒) |
|------------------|--------------------|------------|
| 视紫红质             | 视杆外段盘状膜            | 20         |
| 细胞色素 $a_3$       | 线粒体内膜              | 100—300    |
| 带 3 蛋白质          | 红细胞膜               | 500        |
| $Ca^{2+}$ -ATP 酶 | 肌质网膜               | 60—100     |
| 乙酰胆碱受体           | <i>Torpedo</i> 电器官 | > 0.7      |
| 菌 紫 质            | 嗜盐菌紫色膜             | > 20,000   |

内在的膜蛋白的旋转扩散与周围脂质有密切关系, 以视紫红质为例, 如果视杆外段盘状膜经磷脂酶处理以去除磷脂则其旋转扩散将逐步减少, 当 70% 脂质被去除时, 旋转扩散就不再能进行<sup>[1]</sup>。此外, 内在膜蛋白的旋转扩散也受到微环境脂的流动性的影响。

从已有测定的结果来看, 膜蛋白的旋转扩散一般慢于侧向扩散, 而膜蛋白的侧向扩散

又比膜脂要慢得多。

## 四、膜脂流动性的不均匀性

生物膜的结构不是静态的而是动态的。这可以说是人们对膜结构认识的一个飞跃，但是膜的各部分的流动性是否都一致呢？现在看来膜各部分的流动性是不均匀的。

### 1. 界面脂

Jost 等<sup>[9]</sup>于 1973 年报道，应用顺磁标记化合物对细胞色素氧化酶-磷脂复合体的脂质流动性进行研究，实验结果表明，与细胞色素氧化酶紧密结合的单层脂质分子的流动性远较整体 (bulk lipid) 脂质分子的流动性要小，这一层脂质分子称为‘界面脂’，除细胞色素氧化酶外，很多膜蛋白(如， $\beta$ -羟丁酸脱氢酶、肌质网膜的  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶、视紫红质、内质网膜的细胞色素  $\text{P}_{450}$  还原酶系)的周围都证明有一层数量不等 (24~55) 脂质分子组成的界面脂<sup>[5,9,25]</sup>。但是，后来有些实验室用核磁共振进行测试的结果却表明膜脂流动性是均一的，并没有‘界面脂’的存在<sup>[24]</sup>。实际上两种磁共振方法研究结果的这种矛盾可以用顺磁共振 (ESR)，核磁共振 (NMR) 具有不同的动力学时间范围 (dynamic time scale) 来统一。ESR 测量的时间范围为  $10^{-8}\text{s}$ ，NMR 测量出现两个分开信号的时间范围为  $10^{-4}\text{s}$ 。通常膜脂分子交换速率为  $10^{-6}\text{s}$ 。如果假设界面脂与整体脂交换速率为  $10^{-5}\text{s}$ ，比整体脂之间的交换慢一个数量级以上，这样 ESR、NMR 测试结果的差异也就容易加以解释。当然，这也说明，并不存在长寿命的‘界面脂’。

### 2. ‘区块’结构

生物膜含有的脂质有很多种，它们无论在极性‘头部’还是脂肪酸侧链的组分都有一定的差异。在一定温度下，有的膜脂处于凝胶态，有的则呈流动的液晶态。流动与不流动的膜脂分别汇集的现象称为‘分相’。即使都处于液晶态，在一定温度下生物膜各部分(或微区)的流动性也不尽相同。此外，生物膜中蛋白质-蛋白质，蛋白质-脂质、脂质-脂质的相互作用以及外界环境如温度、pH、金属离子和其它因素等等都会不同程度地影响生物膜中具有不同组分的各个微区呈现不同的流动性。

## 五、影响膜脂流动性的因素

很多因素都能影响膜脂的流动性，大致可归纳为下列几种：

### 1. 膜脂脂肪酸的不饱和程度和链长

在相同烃链链长的情况下，膜脂脂肪酸内含的不饱和键能增加膜脂的流动性，但是不饱和键数量的增加与流动性的加大并不呈线性关系。例如，以油酸 ( $\text{C}_{18:1}$ ) 替代硬脂酸 ( $\text{C}_{18:0}$ ) 可明显地增加膜脂的流动性，但用亚油酸 ( $\text{C}_{18:2}$ ) 替代油酸，其流动性的进一步增加就不甚明显。

增加膜脂脂肪酸链长可使流动性降低。

## 2. 不同分子种类的磷脂的含量

磷脂分子以甘油为骨架,甘油的第1与第2位C原子上的羟基分别与脂肪酸生成酯。甘油的第3位C原子上羟基与磷酸结合,并通过磷酸基团与醇生成磷脂,由于醇的不同而形成诸如磷脂酰胆碱(PC),磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰丝氨酸(PS)等等,如果磷脂分子的极性部分相同(如磷脂酰胆碱,PC),但与第1位或与第2位C原子上羟基结合的脂肪酸的组分差异(包括烃链长短、饱和键含量等),及其“配对”的彼此不同,因而形成不同的磷脂酰胆碱PC(如 $C_{18:1}/C_{18:1}$ ,  $C_{16:0}/C_{18:2}$ 。前者PC的第1位和第2位C连接的脂肪酸都为含有一个不饱和键的18C脂肪酸,而后者的第1位C连接含有16C的饱和脂肪酸,第2位C为含有两个不饱和键的18C脂肪酸)。这些就称为不同分子种类的PC。生物膜中由于某一分子种类磷脂的含量或/和不同分子种类磷脂含量的比例不同都可能影响膜脂流动性的大小<sup>[4,11-12]</sup>。

## 3. 胆固醇/磷脂比值

胆固醇一般都集中分布于细胞外周膜。在相变温度以上如果在胆固醇含量较高(>20 mol%)的情况下,当胆固醇浓度继续增高,会引起流动性明显下降;如果胆固醇含量较低(<10 mol%),增加胆固醇却能使流动性升高<sup>[10]</sup>。在低于相变温度情况下,胆固醇能扰乱膜脂有序性的出现,阻止凝胶态的形成,从而具有‘流动剂’的作用。

## 4. 卵磷脂/鞘磷脂比值

在哺乳动物细胞膜系中卵磷脂和鞘磷脂含量约占整个膜脂的50%,由于分子结构上的差异,两者流动性有较大差别,卵磷脂所含脂肪酸不饱和程度高,相变温度较低,而鞘磷脂则相反,它含的脂肪酸的饱和程度高。因此,卵磷脂/鞘磷脂比值大小能影响膜脂流动性。

## 5. 膜蛋白的影响

当内在的膜蛋白嵌入膜脂的疏水区后,会使膜脂流动性降低,膜蛋白的影响随着距离的增加而减少。膜脂与膜蛋白的影响是相互的,当膜脂流动性降低时,也会影响嵌入膜蛋白的扩散运动(包括侧向扩散和旋转扩散)。

# 六、生物膜流动性的调节

流动性是生物膜结构的基本特征,也是体现其功能的一个重要条件。Jackson等<sup>[8]</sup>曾研究大肠杆菌 *E. Coli* 维持生长所需的流动膜脂的最低含量。结果表明,假如只有20%膜脂处于有序态,细菌仍能正常生长,待膜脂凝胶态增至55%时,生长即停止进行。很多的研究结果的综合逐渐形成一个概念:要呈现膜蛋白最适功能,合适的膜脂流动性是重要条件之一。为了适应周围环境的变化,机体具有调节生物膜流动性的机制。膜流动性的适应调节可以通过膜脂或非脂组分的修饰或含量比例的改变来实现。从植物细胞来看,去饱和酶(desaturase)能使一些膜脂的脂肪酸侧链增加不饱和键以增加流动性,Quinn

等报道<sup>[19]</sup>,叶绿体能使棕榈酸去饱和而增加双键。最近有报道<sup>[44]</sup>,磷脂甘油骨架第1或第2位C连接的脂肪酸通过去酰化(deacylation)和重酰化(reacylation)可使它们所含的脂肪酰组分进行重排。这也是调节膜脂流动性的一个途径。此外象pH、金属离子<sup>[30-32]</sup>等因素可能也会对调节膜脂流动性起着一定的作用。

## 七、植物的抗冷性与生物膜的流动性

细胞受冷害后会引引起细胞通透性异常从而导致诸如 $K^+$ 离子等电解质从细胞中外漏。这一现象比较早即已被观察到,因而认为细胞质膜很可能是细胞受冷害后较早被影响的部位。在低温处理过程中,线粒体和叶绿体这两个细胞器对低温的敏感性也逐渐引起人们的注意。为了适应不利的环境影响,需要‘动员’更多的能量,因此研究细胞中两个重要“能量转换器”:线粒体、叶绿体对低温的敏感性也是很容易理解的。最近几年,又发现微粒体膜对低温也是比较敏感的,这方面的研究有增长的趋势。

澳大利亚 Raison 等<sup>[22]</sup>曾系统地比较了抗冷与不抗冷植物在低温处理过程中线粒体呼吸活性与酵解以及与之紧密联系的其它代谢反应的平衡。他们发现在温度低于 $10^{\circ}\text{C}$ 情况下,与抗冷植物细胞不同,不抗冷的上述二项活性的降低是不成比例的,从而推测这可能是不抗冷植物线粒体膜在低温条件下受冷害所导致的结果<sup>[43]</sup>。他们在不同温度下测定线粒体氧化活性并以其对数与反应温度倒数作图(Arrhenius图),结果,抗冷植物线粒体氧化活性的Arrhenius图在 $0-30^{\circ}\text{C}$ 范围呈一直线,而不抗冷植物线粒体则在 $10^{\circ}\text{C}$ 左右有一典型的折点。对于这一折点的含义有不同的解释。有的认为,这一点标志膜脂的相变温度,但是膜脂是含有很多脂质的混合物,不可能象单一的纯脂质那样具有很明确的相变温度。因此,笼统、简单地认为这一折点即是膜脂的相变温度是不确切的,但是,它也许可以反映在这个温度膜脂分子排列的有序性有一定的改变。换言之,不抗冷植物受到一定低温处理过程中线粒体的膜脂物理状态可能会发生明显变化,而抗冷植物却没有这种改变。叶绿体 $\text{NADP}^+$ 光还原的Arrhenius图也呈现相似的现象,即从不抗冷的植物(番茄)分得叶绿体的 $\text{NADP}^+$ 光还原的Arrhenius图,在 $12^{\circ}\text{C}$ 处可以观察到一个很明显的折点,而在同样条件下,豌豆叶绿体在 $0-25^{\circ}\text{C}$ 范围内 $\text{NADP}^+$ 光还原反应的Arrhenius图始终呈一直线<sup>[26]</sup>。

在上述实验结果基础上,Raison等<sup>[20]</sup>利用电子顺磁共振方法来比较甘薯块茎(抗冷)与马铃薯(不抗冷)线粒体膜的流动性。用自旋标记物12-NS(12-氧氮基硬脂酸)标记后测得的序参数作Arrhenius图,结果不抗冷的马铃薯块茎线粒体在 $10^{\circ}\text{C}$ 有一折点,而抗冷的甘薯块茎线粒体却没有这一现象。鉴于膜脂流动性的大小与其组份有一定的相关性,因而,他们认为,抗冷植物线粒体膜具有较大的流动性很可能与其膜脂内含的脂肪酸组份有关。一般从抗冷植物的块茎或果实分离线粒体,其膜脂内含脂肪酸侧链的不饱和程度较不抗冷的为高。很多报道都提出类似的观点<sup>[14,48]</sup>,认为植物抗冷性与细胞膜、线粒体膜、叶绿体膜内含膜脂的脂肪酸不饱和度(或以不饱和指数表示)有一定的相关性。脂肪酸不饱和指数的增加会使膜流动性增大,很多实验室<sup>[14,18,29,33]</sup>从抗冷与不抗冷植物线粒体或叶绿体膜抽提膜脂,然后分析比较它们内含脂肪酸的不饱和指数并用差示量热扫描(differential scanning calorimetry, DSC)来测试相变温度。实验结果表明,很多抗冷植物在

低温影响下膜脂脂肪酸的不饱和度有明显增加,而且抗冷性与其膜系内含膜脂的脂肪酸不饱和度呈正相关,例如,Peoples 等<sup>[17]</sup>比较两种抗冷与两种不抗冷苜蓿从 20℃ 下降到 10℃ 时光合 CO<sub>2</sub> 交换值降低的大小并研究它们与叶绿体膜脂脂肪酸不饱和指数高低的相关性,结果表明,抗冷品种苜蓿脂肪酸不饱和指数高,降温时光合 CO<sub>2</sub> 交换值降低不明显,而不抗冷品种苜蓿叶绿体膜脂不饱和度低,降温时光合 CO<sub>2</sub> 交换值有明显下降。但是,也有不少报道,提出与上述结果相矛盾的现象<sup>[2]</sup>,如 Bishop 对抗冷的豌豆与不抗冷番茄或玉米叶绿体膜脂脂肪酸的组分进行比较的结果显示,前者叶绿体膜脂脂肪酸的不饱和指数反比后者还低。Vigh<sup>[28]</sup> 的实验表明,抗冷与不抗冷小麦在低温锻炼过程中叶绿体的类囊体膜内含的磷脂组分变化(而不是不饱和度)有明显差异。此外,有些植物膜脂流动性的大小也并不与膜脂脂肪酸侧链的不饱和度完全相关<sup>[21,16]</sup>。

影响膜脂流动性的因素很多(见本文上半部分),膜脂内含脂肪酸不饱和键的含量仅是其中一个因素。其它如膜蛋白、固醇含量、磷脂的分子种类等等都能影响膜的流动性。如果将膜脂分离出来,而且仅从测得的不饱和指数来简单地说明膜脂在生物膜内的流动性大小显然是不够全面的。1983 年 Chapman<sup>[3]</sup> 等就报道,在常温(14°/17℃)与低温(4°/7℃)条件下生长的豌豆,它们的类囊体膜脂脂肪酸的不饱和指数差异不大,但脂质/蛋白质比值在低温条件下生长却有明显的增长,他们认为这可能是增加膜脂流动性的一个原因。Dickens 等<sup>[4]</sup>研究原生动物四膜虫(*Tetrahymena pyriformis*),在低温适应(从 39°移至 15℃)过程中,第一个小时微粒体膜脂不饱和指数变化不大,但膜的流动性却已有明显的增大,他们利用气相色谱-质谱联用的技术比较微粒体膜磷脂的分子种类,发现在移至低温后的第一个小时也已有明显的变化。这说明,在冷适应过程中为了调节膜脂流动性,膜脂脂肪酸通过去酰化和再酰化进行酰基重排比脂肪酸的去饱和反应更早发生。1984 年 Lynne 等<sup>[11]</sup>研究盐生杜氏藻 *Dunaliella salina* 在冷适应过程中微粒体膜、叶绿体膜脂分子种类的变化。他们报道,当盐生杜氏藻从 30℃ 移至 12℃ 生长时,在 12 小时之内,首先引起微粒体膜磷脂酰乙醇胺(PE)和磷脂酰甘油(PG)的分子种类发生明显的变化,前者含有 C<sub>30</sub> 的脂肪酸侧链减少,而 C<sub>34</sub> 和 C<sub>36</sub> 的含量增加,后者出现一种在 30℃ 时没有监测到的分子种类(18:1/18:1),与此同时,流动性较低的 PG 分子种类(16:0/18:2, 16:0/18:3)的含量则有所降低。叶绿体膜在冷适应过程中,除膜脂脂肪酸的去饱和以外,也发现有磷脂分子种类的变化。如磷脂酰胆碱(PC)的 16:0/18:0 减少,而 18:2/18:2 的含量增加<sup>[12]</sup>。

综上所述,从大多数实验报道来看,抗冷植物在低温影响下膜脂流动性有增加趋势,对同一种植物的抗冷与不抗冷品种比较,前者膜脂的流动性一般较后者为大。但是抗冷品种膜脂脂肪酸不饱和指数并不一定与流动性和抗冷性呈正相关。在抗冷植物在冷适应过程中,膜脂流动性与不饱和脂肪酸含量变化也不一定具有简单的相关性。

我们实验室近年来曾对植物的抗冷性与线粒体对低温的敏感性以及抗冷性与线粒体膜的流动性之间的相关性进行一些研究。

首先,我们比较了抗冷(HD<sub>103</sub> × 弗罗马斯)与不抗冷(张单九号)玉米的黄化幼苗经低温(0—4℃, 24 小时)处理后线粒体结构与功能的变化。实验结果表明<sup>[34,35,37]</sup>,张单九号经低温处理后,通过电镜观察可以清晰地看到,黄化幼苗线粒体的超微结构有明显变化,线粒体呈明显膨胀,嵴变短、基质致密度减少。在功能方面,经低温处理后,从黄化幼苗分

离得到的线粒体,具有耗氧量增加,呼吸控制率和氧化磷酸化效率都明显下降的变化(表5)。在相同条件下,抗冷玉米 HD<sub>103</sub> × 弗罗马斯的黄化幼苗经低温处理后线粒体无论在超细微结构还是氧化磷酸化功能方面都没有发生明显的改变(表5)。除玉米外我们还对两个抗冷水稻品种(吉梗<sub>44</sub>、吉梗<sub>60</sub>)和两个不抗冷水稻品种(秋光、早锦)的黄化幼苗经低温处理(4℃ 48 小时)后进行测试比较,也获得相似结果<sup>[37]</sup>。

表 5 抗冷与不抗冷玉米黄化幼苗低温处理后线粒体氧化磷酸化的变化(4℃, 24 小时)

底物:  $\alpha$ -酮戊二酸

|                                 | 条 件 | 耗 氧                   | 呼 吸 控 制              | ADP/O                |
|---------------------------------|-----|-----------------------|----------------------|----------------------|
| 张单九号(不抗冷)                       | 对 照 | 11.60±0.80            | 3.30±0.16            | 2.60±0.12            |
|                                 | 低 温 | 17.10±1.02<br>P<0.001 | 2.00±0.23<br>P<0.001 | 1.10±0.13<br>P<0.001 |
| HD <sub>103</sub> ×弗罗马斯<br>(抗冷) | 对 照 | 9.20±0.39             | 1.81±0.06            | 2.40±0.27            |
|                                 | 低 温 | 8.60±0.48<br>NS       | 2.20±0.08<br>P<0.05  | 2.37±0.10<br>NS      |

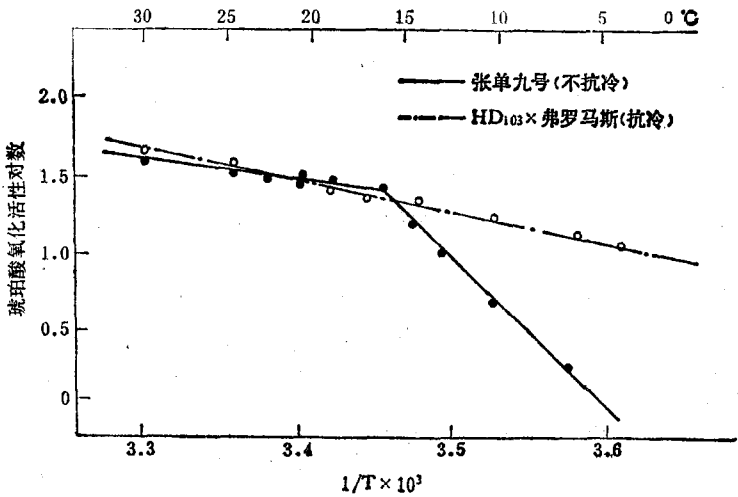


图 6 抗冷与不抗冷玉米品种线粒体琥珀酸氧化酶活性 Arrhenius 图的比较

我们也比较了抗冷与不抗冷玉米幼苗线粒体琥珀酸氧化活性的 Arrhenius 图。实验结果见图 6,从图中可以看出,张单九号玉米幼苗线粒体琥珀酸氧化活性在 16℃ 有一折点,与此同时,抗冷品种 HD<sub>103</sub> × 弗罗马斯以琥珀酸氧化活性对数对反应温度倒数作图在 5—30℃ 范围内呈线性关系。抗冷水稻(吉梗<sub>44</sub>、吉梗<sub>60</sub>)与不抗冷水稻(秋光、早锦)黄化幼苗线粒体的琥珀酸氧化活性 Arrhenius 图的比较也获相似结果,即不抗冷水稻黄化幼苗琥珀酸氧化活性在 18℃ 有一折点,而抗冷水稻线粒体琥珀酸氧化活性的 Arrhenius 图在 5—30℃ 范围内并无折点出现<sup>[37]</sup>。这反映出无论玉米还是水稻不抗冷品种黄化幼苗线粒体膜脂分子的物理状态低于一定温度时会发生变化,而抗冷品种线粒体则没有类似变化发生。

上述结果表明,玉米或水稻品种的抗冷性似乎与其黄化幼苗线粒体对冷的敏感性有一定相关性,那末线粒体对冷的敏感性是否与其膜的流动性有一定的内在联系呢?为此,我们分别用荧光探针(ANS, 1 苯胺-8-萘磺酸; DPH, 1, 6-二苯基己三烯)或自旋标记化合物 (5NS, 12NS, 16NS, 5、12、16-氮氧基硬脂酸)来测试比较抗冷与不抗冷玉米或水稻黄化幼苗线粒体膜的流动性。

首先,我们用荧光探针 ANS 比较抗冷与不抗冷水稻线粒体膜的流动性,荧光探针 ANS 与膜结合后主要有两种因素可能引起 ANS 荧光的变化,一是它所处的环境的极性变化,二是与 ANS 结合的膜脂流动性的改变。如果前者不变,则与膜结合的 ANS 荧光强度即能反映膜脂的流动性。荧光强度越大,流动性越小。图 7 系不抗冷水稻品种秋光与抗冷水稻品种吉梗<sub>44</sub>线粒体膜经 ANS 分子参入后的荧光强度比较,ANS 荧光发射峰的波长为 465 nm。从图中可以看出,不抗冷水稻品种秋光线粒体的荧光强度明显大于抗冷水稻品种吉梗<sub>44</sub>线粒体。这说明后者线粒体膜的流动性较前者为大。另外一组不抗冷水稻品种早锦与抗冷水稻品种吉梗<sub>60</sub>的线粒体参入 ANS 后测试比较荧光强度也得到相似的结果。而且吉梗<sub>44</sub>与吉梗<sub>60</sub>、秋光与早锦之间的荧光强度差异很小,换言之,从四个品种的测试结果来看,抗冷水稻线粒体膜的流动性均明显大于不抗冷水稻线粒体膜的流动性<sup>[37]</sup>。用 ANS 荧光探针比较抗冷 (HD<sub>103</sub> × 弗罗马斯) 与不抗冷 (张单九号) 玉米品种黄化幼苗线粒体膜的流动性的结果也表明,前者线粒体膜的流动性大于后者<sup>[37]</sup>。

自旋标记硬脂酸也可用于测试膜的流动性,当它们被引入生物膜后与膜脂的脂肪酸链紧密结合,通过其所带的自由基给出的信号可反映膜脂的流动性。我们先用 5-NS 作为自旋标记物比较了抗冷与不抗冷水稻线粒体膜脂的流动性。从得到的电子顺磁共振波谱中可测量内外端超精细劈裂的距离 (用  $2T_{\parallel}$  及  $2T_{\perp}$  表示),并计算出序参数  $S$ ,

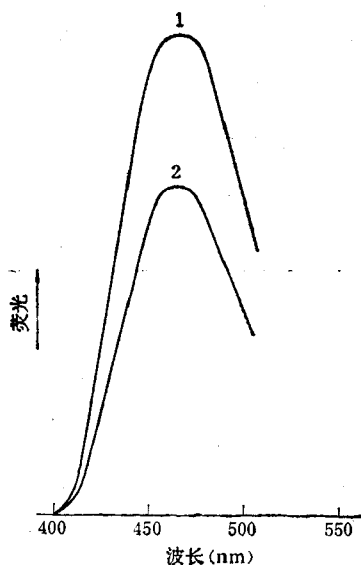


图 7 抗冷与不抗冷水稻线粒体 ANS 荧光比较  
1. 不抗冷水稻“秋光”; 2. 抗冷水稻“吉梗<sub>44</sub>”。  
激发波长: 390 nm

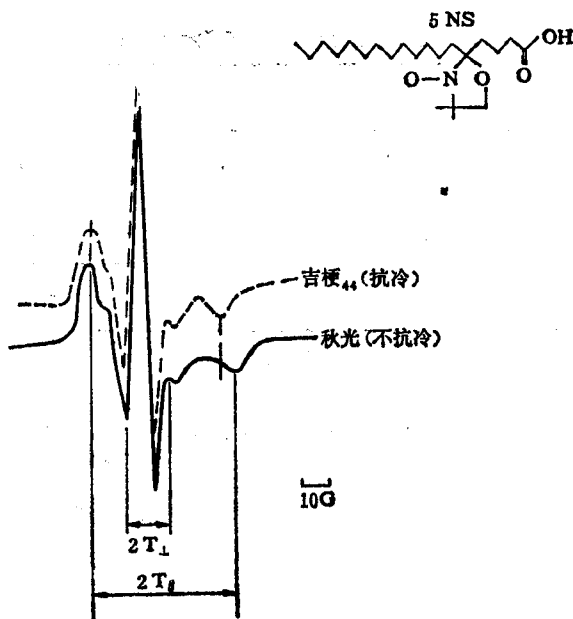


图 8 抗冷与不抗冷水稻黄化幼苗线粒体 5NS 标记后 ESR 波谱比较

$$S = 0.568 \frac{T_{\parallel} - T_{\perp}}{a'}, \quad a' = \frac{1}{3} (T_{\parallel} + 2T_{\perp})。$$

序参数是一结构参数,反映的是脂质分子取向的平均变化。图 8 和表 6 显示,不抗冷水稻品种秋光线粒体的 $2T_{\parallel}$ (56.4)大于抗冷水稻品种吉梗<sub>44</sub>的 $2T_{\parallel}$ (53.7),因而前者的 $S$ (0.749)大于后者的 $S$ (0.711)。这提示,抗冷水稻品种吉梗<sub>44</sub>线粒体膜的流动性大于不抗冷水稻品种秋光线粒体膜的流动性。另外一组不抗冷水稻品种早锦与抗冷水稻品种吉梗<sub>60</sub>所得的结果也很相似(表 6)。从表内还可以看出,抗冷水稻品种吉梗<sub>44</sub>与吉梗<sub>60</sub>线粒体间的 $S$ 值差异不大,它们都明显小于不抗冷品种水稻秋光或早锦线粒体的相应值。对于抗冷玉米品种(HD<sub>103</sub> × 弗罗马斯)与不抗冷玉米品种(张单九号)线粒体膜用 5-NS 进行测试比较它们的流动性也获得相似的结果(见表 7)<sup>[37]</sup>。

表 6 抗冷与不抗冷水稻黄化幼苗线粒体 5NS 标记后电子顺磁共振  $S$  值比较

| 参 数<br>样 品            | $2T_{\parallel}(\text{G})$ | $2T_{\perp}(\text{G})$ | $S$                              |
|-----------------------|----------------------------|------------------------|----------------------------------|
| 秋光(不抗冷)               | 56.4                       | 16.8                   | $0.749 \pm 0.005$                |
| 吉梗 <sub>44</sub> (抗冷) | 53.7                       | 17.1                   | $0.711 \pm 0.006$<br>$p < 0.001$ |
| 早锦(不抗冷)               | 56.4                       | 17.2                   | $0.734 \pm 0.005$                |
| 吉梗 <sub>60</sub> (抗冷) | 54.7                       | 17.2                   | $0.717 \pm 0.004$<br>$p < 0.001$ |

注:表中所列数据为五次的平均值

表 7 抗冷与不抗冷玉米黄化幼苗线粒体 5NS 标记后电子顺磁共振  $S$  值比较

|                            | 张单九号(不抗冷)         | HD <sub>103</sub> × 弗罗马斯(抗冷)     |
|----------------------------|-------------------|----------------------------------|
| $2T_{\parallel}(\text{G})$ | 4.896             | 4.757                            |
| $2T_{\perp}(\text{G})$     | 1.54              | 1.56                             |
| $S$                        | $0.720 \pm 0.009$ | $0.693 \pm 0.007$<br>$p < 0.001$ |

注:表中所列数据为九次实验的平均值

对于抗冷水稻品种吉梗<sub>44</sub>、吉梗<sub>60</sub>与不抗冷水稻品种秋光、早锦线粒体膜的流动性还用自旋标记物 12NS、16NS 进行测试比较,实验结果与用 5-NS 的很相似,即抗冷水稻品种线粒体膜的流动性明显大于不抗冷水稻品种<sup>[37]</sup>。

除了自旋标记物外,我们还用荧光偏振探针 DPH 比较抗冷与不抗冷水稻品种线粒体膜的流动性。DPH 是研究膜脂流动性比较敏感的一种常用探针。稳定态荧光偏振度( $P$ )反映膜脂双分子层整个脂肪酸链上各个层次流动性的平均值。实验结果与上述三种自旋标记物测得的结果非常吻合:不论抗冷水稻品种,还是不抗冷水稻品种线粒体膜的流动性彼此间差异都不大,但前者都明显大于后者<sup>[37]</sup>。