

抗冷与不抗冷水稻线粒体膜流动性的比较

杨福榆 蔡同茂 邢青如 陈文受*

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

线粒体是较敏感的细胞器, 很多环境因素都能迅速引起线粒体发生变化^[1]。Lyons 等^[2]认为植物对冷的敏感性与受低温影响后线粒体膜的变化有联系。我们曾报道^[3]不抗冷玉米黄化幼苗经低温处理(4℃, 24 小时)后线粒体的超微结构与氧化磷酸化功能都有明显的变化, 而抗冷玉米的黄化幼苗经同样低温处理后, 其线粒体的结构与功能都没有发现明显的改变。此外, 不抗冷与抗冷玉米黄化幼苗线粒体琥珀酸氧化酶活性的 Arrhenius 图的比较表明, 前者在 16℃ 有一折点, 而后者琥珀酸氧化酶活性在 5—30℃ 范围内呈线性关系^[4]。很多报道^[5,6]膜脂脂肪酸的不饱和程度与植物品种的抗冷性呈正相关。但也有些与此相矛盾的现象^[7]。为了进一步研究植物抗冷性与线粒体对冷敏感性的相关性以及后者与线粒体膜流动性的内在联系, 本文用荧光探针 ANS** 和自旋标记物 5-NS 对抗冷与不抗冷水稻线粒体膜的流动性进行了比较。

实验材料和方法

水稻抗冷品种吉梗4、吉梗60, 不抗冷品种秋光、早锦均经田间比较鉴定, 由吉林省农业科学院提供。

水稻线粒体的分离 干净的水稻种子用清水浸泡 12—15 小时, 在 30℃ 恒温箱中放置 3 天左右, 待幼苗长达 1 厘米时从中分离线粒体^[8]。

荧光测定 2.0 毫升测定液内含 0.3M 甘露醇 (pH7.2) 1.88 毫升, 100 微升线粒体悬液 (约含线粒体蛋白质 1 毫克), 5mM ANS 20 微升, 加入 ANS 后搅匀, 一分钟后用日立 650-60 型荧光分光光度计测试, 温度为 20℃, 激发波长为 390nm。

电子顺磁共振波谱的测定 在一个小玻管中加入 4—6 微升 0.25mM 5-NS (Syva 产品) 的氯仿溶液, 100 微升重蒸乙醚, 真空抽干后迅速加入 10 微升 50mM K₃Fe(CN)₆, 30 微升线粒体悬液 (约含线粒体蛋白质 300 微克), 稍稍搅拌后再加入 0.3M 甘露醇 (pH7.2) 溶液, 使总体积达 0.1 毫升。快速搅拌 5 分钟后装入样品管, 在室温条件 (16℃ 左右) 下立即用 404 型电子顺磁共振波谱仪 (中国科学院生物物理所研制) 进行测试。

结果与讨论

1. 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引起 ANS 荧光的变化, 一是它所处的环境的极性改变, 二是与 ANS

* 本文 1982 年 6 月 14 日收到。

** 吉林省农业科学院肖永明同志参加部份实验工作。

*** 本文所用缩写如下: ANS——1-萘胺-8-磺酸钠; 5-NS——5-氮氧基硬脂酸 (5-nitroxide stearate)。

结合的膜脂流动性的变化。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^[7]。荧光强度愈大,流动性愈小。图 1 系不抗冷水稻品种秋光与抗冷水稻品种吉梗₄₄线粒体膜经 ANS 分子参入后的荧光强度比较。ANS 荧光的发射峰的波长为 465nm,从图中可

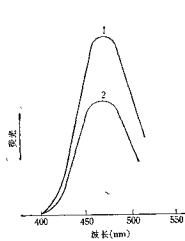


图 1 抗冷与不抗冷水稻线粒体 ANS 荧光比较
1. 不抗冷水稻“秋光”; 2. 抗冷水稻“吉梗₄₄”
激发波长: 390nm

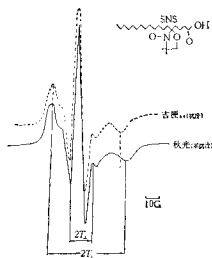


图 2 抗冷与不抗冷水稻黄化幼苗线粒体
5-NS 标记后 ESR 波谱的比较

以看出,不抗冷水稻秋光线粒体的荧光强度明显大于抗冷水稻吉梗₄₄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早粳与抗冷水稻吉梗₄₄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₄₄与吉梗₄₀、秋光与早粳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。

2. 用自旋标记物 5-NS 比较抗冷与不抗冷水稻线粒体膜的流动性 自旋标记硬脂酸可用于测试膜的流动性,当它们被引入生物膜后与膜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的流动性。我们用 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 $S^{(0)}$: $S = 0.568 \frac{T_{\parallel} - T_{\perp}}{a'}$, $a' = \frac{1}{3} (T_{\parallel} + 2T_{\perp})$, 序参数是一结构参数,反映的是脂质分子取向的平均变化。与此同时我们还测算了旋转相关时间 τ_c : $\tau_c = 6.5 \times 10^{-10} \times W_0 \left[\left(\frac{h_0}{h_{-1}} \right)^{\frac{1}{2}} - 1 \right]$, W_0 为中场线峰宽度, h_0 为中场线高度, h_{-1} 为高场线高度,旋转相关时间 τ_c 表示分子从一取向转变为另一取向所需的时间,反映的是分子运动的快慢,从 $2T_{\parallel}$ 的测定, S 值和 τ_c 值的计算结果可以反映流动性的大小。图 2 和表 1 显示,不抗冷水稻秋光线粒体的 $2T_{\parallel}$ (56.4) 大于抗冷水稻吉梗₄₄的 $2T_{\parallel}$ (53.7),因而前者的 S (0.749) 大于后者的 S (0.711)。从 τ_c 值来看,不抗冷水稻秋光线粒体 (17.2×10^{-9} 秒) 也大于抗冷水稻吉梗₄₄ (1.26×10^{-9} 秒)。上述结果都提示,抗冷水稻吉梗₄₄线粒体膜的流动性大于不抗冷水稻秋光线粒体膜的流动性。另外一组不抗冷水稻早粳与抗冷水稻吉梗₄₄用 5-NS 自旋标记物测试两者线粒体膜的流动性也得到相似的结果(表 1)。从表内可以看出,抗冷水稻吉梗₄₄与

表1 抗冷与不抗冷水稻黄化幼苗线粒体 5-NS 标记后电子顺磁共振波谱 S 值和 τ_c 值的比较

样 品	参 数	$2T_1$ (G)	$2T_2$ (G)	S	τ_c (10^{-10} 秒)
秋 光 (不抗冷)		56.4	16.8	0.749 ± 0.005	17.2 ± 0.61
吉 梗 (抗冷)		53.7	17.1	0.711 ± 0.006 $p < 0.001$	12.6 ± 0.86 $p < 0.001$
早 锦 (不抗冷)		56.4	17.2	0.734 ± 0.005	15.9 ± 1.24
吉 梗 (抗冷)		54.7	17.2	0.717 ± 0.004 $p < 0.001$	12.9 ± 0.90 $p < 0.02$

注: 表中所列数据为五次的平均值。

吉梗₆₀线粒体间的 S 或 τ_c 值的差异不大, 它们都明显小于不抗冷水稻秋光或早锦线粒体的相应值。

综上所述, 无论用荧光探针 ANS, 还是自旋标记物 5-NS 进行测定, 其结果都显示抗冷水稻黄化幼苗线粒体膜的流动性比不抗冷的大。同样的方法对抗冷与不抗冷玉米黄化幼苗线粒体进行的测定也得到相似的结果^[1]。此外, 不抗冷水稻黄化幼苗经低温 ($4-6^{\circ}\text{C}$, 48 小时) 处理后, 线粒体的氧化磷酸化也有显著的变化, 而抗冷水稻黄化幼苗的线粒体经同样处理并没有发生明显的改变。这样, 黄化幼苗线粒体对低温的敏感性与植物的不抗冷性似乎具有一定的相关性, 而线粒体膜的流动性又与它们对低温的敏感性具有一定的内在联系。这提示, 测定黄化幼苗线粒体膜的流动性可能为鉴定农作物的抗冷性提供一些生物物理或生物化学的指标, 有关研究正继续进行中。

敬谢: 承吉林省农业科学院提供抗冷与不抗冷水稻种籽; 东北师范大学生物系段维生同志对本研究工作的关心与支持; 中国科学院生物物理研究所电子顺磁共振研究小组的大力协助, 在此一并表示谢意。

参 考 文 献

- [1] 杨福愉等, 实验生物学报, 9(1964), 261.
- [2] Lyons, J. M. et al., *Low Temperature Stress in Crop Plants* (Eds. Lyons, J. M. et al.), 1978, 1.
- [3] 杨福愉等, 生物化学与生物物理学报, 14 (1982), 5: 521.
- [4] 王育卓, 王洪春, 植物生理学报, 7(1981), 2: 185.
- [5] Bishop, D. G. et al., *Low Temperature Stress in Crop Plants* (Eds. Lyons, J. M. et al.), 1979, 375.
- [6] 中国科学院生物物理研究所三室二组, 生物化学与生物物理进展, 1978, 1: 1.
- [7] Lenaz, G. et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 172 (1976), 278.
- [8] Lenaz, G., *Membrane Proteins & Their Interactions with Lipid* (Ed. Roderick, A. C.), 1977, 47.