

# PEG 和表面活性剂对棉纤维细胞合成葡聚糖的影响

邵邻相\* 沈曾佑 张志良 颜季琼

(华东师范大学生物系 上海 200062)

关于分离 $\beta$ -葡聚糖合成酶在溶液系统中合成纤维素和 $\beta$ -1,3-葡聚糖,迄今尚未见有成功的报道。但不少研究者分离质膜囊泡,对 $\beta$ -葡聚糖合成酶的性质开展了广泛的研究,发现纤维素和 $\beta$ -1,3-葡聚糖是在质膜上合成的,以UDPG为底物, $\text{Ca}^{2+}$ 和纤维二糖为 $\beta$ -葡聚糖合成酶的激活剂,纤维素的合成还必须有 $\text{Mg}^{2+}$ 的存在<sup>[1-3]</sup>。纤维素合成酶和 $\beta$ -1,3-葡聚糖合成酶可能是同一种酶,质膜的状态影响酶的构象,决定产物的类型,完整的质膜以 $\beta$ -1,4-键的形成占优势,质膜损伤后则以 $\beta$ -1,3-键的形成占优势<sup>[4,5]</sup>。本文用PEG4000和表面活性剂改变质膜的结构和理化性质,进一步探讨质膜与纤维素合成的关系,以有助于阐明棉纤维生长的调节机理。

## 材料与方 法

### 1. 植物材料

陆地棉岱字-15号原种(*Gossypium hirsutum* L. cv. Daizi-15)经浓硫酸脱绒后,播种于大田,于开花当天挂牌,然后在一定部位,按不同日龄采样,供各项分析之用。

### 2. 完整棉纤维细胞<sup>3</sup>H-葡聚糖的喂饲

参照 Pillonel 等的方法<sup>[6]</sup>。10mol/L Tris-Mes 缓冲液(pH5.6),内含1mol/L葡聚糖(1 $\mu$ ci/ml<sup>3</sup>H-葡聚糖),置于大试管中。取日龄为26天的棉铃,用刀切开,取出一瓢(约7-8个胚珠),放入大试管内(日龄小于20天的棉铃增加瓢数),用铜丝网使一瓢的胚珠全部地浸入溶液中,并用真空泵抽真空5min,使整个胚珠湿透,然后置于水浴锅中在25 $^{\circ}$ C保温2h,取出胚珠用80%甲醇灭活,把棉纤维从胚珠上分离下来待用。以抽真空5min后即用80%甲醇灭活的棉纤维细胞作为空白对照。

### 3. 离体棉纤维细胞<sup>3</sup>H-葡聚糖的喂饲

参照 Carpita 等的方法<sup>[7]</sup>。取30天日龄的胚珠,浸没在BT培养液(内含5mmol/L葡萄糖)中,把绵纤维细胞从胚珠上分离下来(大约取100mg干重),加入2 $\mu$ ci/ml<sup>3</sup>H-葡聚糖,抽真空5min,25 $^{\circ}$ C保温2h,用80%甲醇灭活。以抽真空5min后即用80%甲醇灭活的棉纤维细胞作为空白对照。

### 4. 棉纤维细胞壁成分中放射性物质的提取和分离

参照 Carpita 等的方法<sup>[7]</sup>。棉纤维(约100mg干重)加2ml甲醇-氯仿(V:V=1:1)和1ml水,搅拌,加甲醇直至匀相,于37 $^{\circ}$ C保温1.5h,其间搅拌多次,加1ml0.9%NaCl-10mol/L HCl和1ml甲醇,摇匀,离心,随后用甲醇和重蒸水各洗三次。80 $^{\circ}$ C烘48h, $\text{P}_2\text{O}_5$ 真空干燥24h,称纤维重量。加3ml醋酸/硝酸试剂密封,于95 $^{\circ}$ C水解1.5h,离心(3600 $\times$ g,15min),用80%甲醇洗两次(离心,3600 $\times$ g,15min),三次上清液合并,在70 $^{\circ}$ C蒸发至水相,加氨水中和,用少量活性炭脱色,定容,即为 $\beta$ -1,3-葡聚糖部分。沉淀物于80 $^{\circ}$ C干燥24h后,加70%硫酸水解完全,氨水中和,加少量活性炭脱色,定容,即为纤维素部分。

### 5. 放射性的测量

采用乳状液测量。二甲苯溶液(内含0.5%PPO,0.05%POPOP)与Triton X-100为7:3(V:V),加水溶液样品,摇匀呈透明状,在FJ-2100液体闪烁计数器上测量,内标准源法进行淬灭校正。

## 结 果

### 1. 棉纤维发育过程中细胞壁葡聚糖合成速率的变化

棉纤维细胞发育过程中,细胞壁葡聚糖合成速率如图1所示。16天日龄之前的棉纤维细

本文1998年9月15日收到,1999年3月4日接受。

\*联系人,现在工作单位:浙江师范大学生物系,浙江金华,321004。

胞,以 $\beta$ -1,3-葡聚糖合成为主;16天日龄以后, $\beta$ -1,3-葡聚糖和纤维素( $\beta$ -1,4-葡聚糖)的合成速率不断增加,它们分别在26天和36天左右达到高峰。根据这个结果,取26—30天日龄棉纤维细胞作为研究材料。

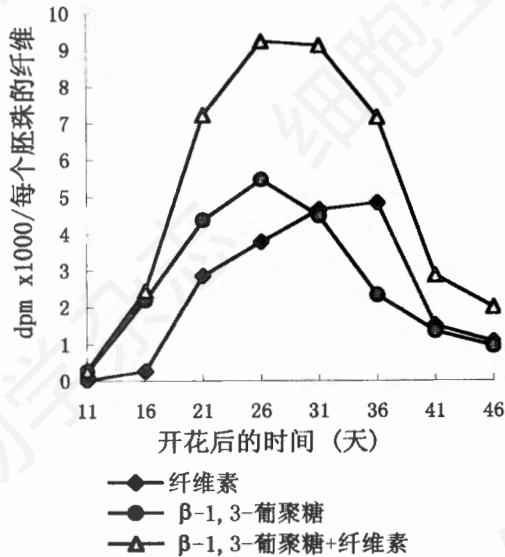


图1 棉纤维发育过程中葡聚糖合成速率的变化

## 2. Triton X-100 对棉纤维细胞合成葡聚糖的影响

表面活性剂是一种膜脂去垢剂,当达到一定浓度时,膜上类脂被洗脱而造成膜破损。Triton X-100 是一种非离子型表面活性剂。如图2所示,随着 Triton X-100 浓度的增高,抑制棉纤维细胞合成 $\beta$ -1,3-葡聚糖和纤维素的程度也随着增加;Triton X-100 在低浓度下,抑制纤维的合成比抑制 $\beta$ -1,3-葡聚糖的合成更为强烈,如 Triton X-100 在0.1mmol/L和0.5mmol/L时, $\beta$ -1,3-葡聚糖的合成分别被抑制19%和22%,而纤维素的合成则分别被抑制49%和60%。

## 3. Tween 20 对棉纤维细胞合成葡聚糖的影响

Tween 20 是一种非离子型表面活性剂。如

图3所示,随着 Tween 20 浓度的升高,抑制棉纤维细胞合成 $\beta$ -1,3-葡聚糖和纤维素的程度都明显增加;Tween 20 在较高浓度下,抑制纤维素的合成比抑制 $\beta$ -1,3-葡聚糖的合成更为强烈,如 Tween 20 在5mmol/L和25mmol/L时, $\beta$ -1,3-葡聚糖的合成分别被抑制75%和86%,而纤维素的合成则分别被抑制84%和95%。

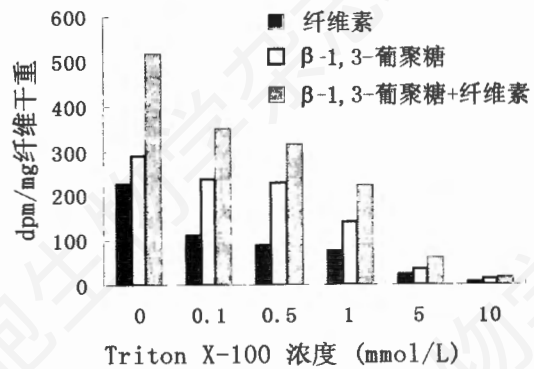


图2 Triton X-100 对棉纤维细胞合成葡聚糖的影响

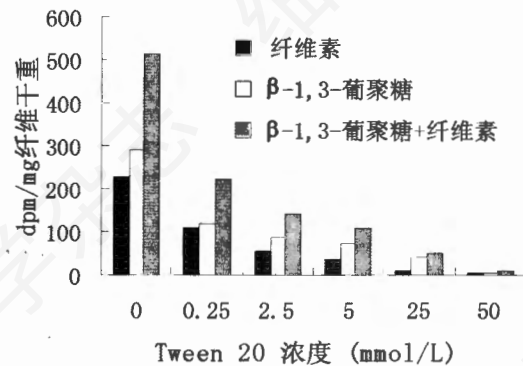


图3 Tween 20 对棉纤维细胞合成葡聚糖的影响

## 4. SDS 对棉纤维细胞合成葡聚糖的影响

SDS 是一种阴离子型表面活性剂。如图4所示,随着 SDS 浓度(0.1、0.5、1mmol/L)的提高,抑制棉纤维细胞合成 $\beta$ -1,3-葡聚糖和纤维素

的程度也增加;但 SDS 在浓度 5mmol/L 和 10mmol/L 时,抑制纤维素的合成反而稍有减弱,而对  $\beta$ -1,3-葡聚糖的合成的抑制程度的减弱更加明显。

### 5. PEG4000 对棉纤维细胞合成葡聚糖的影响

从表 1 可见,棉纤维细胞从 30 天日龄胚珠上分离下来后,其合成纤维素和  $\beta$ -1,3-葡聚糖的能力急剧下降,对纤维素合成的能力下降特别明显;在离体棉纤维细胞的培养液中加入 PEG4000,对促进离体棉纤维细胞合成葡聚糖的作用非常显著,对恢复合成纤维素的能力尤其明显。PEG4000 也促进完整棉纤维细胞合成纤维素和  $\beta$ -1,3-葡聚糖。

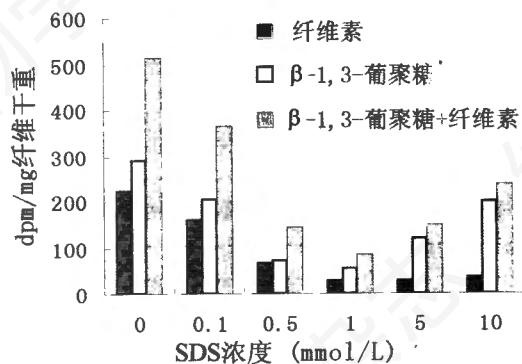


图 4 SDS 对棉纤维细胞合成葡聚糖的影响

表 1 PEG4000 对棉纤维细胞葡聚糖合成的影响

纤维类型	培养液(内含 $2\mu\text{Ci/ml}$ $^3\text{H}$ -葡聚糖)	纤维素 (dpm/mg 纤维干重)	$\beta$ -1,3-葡聚糖 (dpm/mg 纤维干重)
完整	BT	288	275
完整	BT+PEG	388	313
离体	BT	20	101
离体	BT+PEG	109	238

## 讨 论

表面活性剂是具有亲脂、亲水两极性的特殊脂类化合物,与细胞膜结合并插入或透过膜,较多的单分子在膜内形成胶囊,浓度进一步增加,造成膜蛋白和膜脂分离,使膜解体,由此而

改变膜的结构,影响膜的生物功能及膜结合酶的活性<sup>[8]</sup>。

非离子型表面活性剂 Triton X-100 和 Tween 20 对棉纤维细胞合成葡聚糖的抑制作用相似(图 2 和图 3)。随着两者表面活性剂浓度的提高,抑制棉纤维细胞合成  $\beta$ -1,3-葡聚糖和纤维素的程度都明显地增加,但对  $\beta$ -1,3-葡聚糖合成比纤维素合成的抑制作用更明显。这现象提示,质膜在表面活性剂的作用下而受到损伤,影响葡聚糖合成酶的活性,降低了纤维素( $\beta$ -1,4-葡萄糖)合成的比例,这与 Jacob 等<sup>[5]</sup>给质膜囊泡以冰冻伤害从而改变  $\beta$ -1,3-和  $\beta$ -1,4-葡聚糖合成的比例结果相符合,即完整的质膜有利于纤维素的合成,损伤的质膜则利于  $\beta$ -1,3-葡聚糖的合成。PEG4000 对离体棉纤维细胞质膜的损伤处有愈合作用<sup>[7]</sup>,因此,PEG4000 促进棉纤维细胞合成纤维素和  $\beta$ -1,3-葡聚糖,但对促进离体棉纤维细胞合成纤维素的作用更有效。

阴离子表面活性剂 SDS 则与非离子型表面活性剂(Triton X-100 和 Tween 20)有所不同。SDS 在 5mmol/L 和 10mmol/L 浓度下比 1mmol/L 浓度下,对  $\beta$ -1,3-葡聚糖和纤维素合成的抑制程度反而降低,对  $\beta$ -1,3-葡聚糖合成抑制程度的降低特别明显(图 4),这可能与 SDS 载负电荷的缘故有关。Bacic 等<sup>[4]</sup>报道,质膜电位影响质膜上  $\beta$ -葡聚糖的合成,质膜囊泡外侧为负电位,能显著地刺激  $\beta$ -1,3-葡聚糖的合成,也刺激纤维素的合成,反之亦然。SDS 载负电荷,由于一定浓度的 SDS 束缚到整个棉纤维细胞质膜外侧表面时,在质膜外侧形成 SDS 负电荷层,相当于加强了质膜外侧的负电荷的数量,从而产生与质膜电位影响  $\beta$ -葡聚糖合成效应相似的结果。

棉纤维细胞为胚珠最外层表皮细胞的突起和伸长而成的单细胞,细胞发育同步性好,次生壁几乎为纤维素所组成。开展对棉纤维生物合成的研究,不仅是细胞壁生物合成的基础理论问题,而且为提高棉纤维的品质和产量提供理

论依据。

### 摘 要

以陆地棉岱字-15号棉纤维细胞为材料,用<sup>3</sup>H-葡聚糖示踪方法测定 $\beta$ -1,3-葡聚糖和纤维素的合成。PEG4000促进 $\beta$ -1,3-葡聚糖和纤维素的合成,对刺激纤维素的合成更有效;随着非离子型表面活性剂Trion X-100和Tween 20浓度的升高,抑制 $\beta$ -1,3-葡聚糖和纤维素的合成程度也增加,但抑制纤维素的合成更为强烈;而阴离子表面活性剂SDS则有所不同,在较高浓度下,又出现对 $\beta$ -1,3-葡聚糖合成抑制的减弱,这可能与SDS载负电荷的缘故有关。结果提示,完整的细胞膜有利于纤维素的合成,细胞膜损伤则利于 $\beta$ -1,3-葡聚糖的合成。

关键词:棉纤维 PEG4000 表面活性剂  $\beta$ -1,3-

葡聚糖 纤维素

### 参 考 文 献

- [1] Okuda K. et al., 1993, *Plant Physiol*, **101**: 1131-1142.
- [2] Delmer DP. et al., 1991, *Plant Physiol*, **95**: 556-563.
- [3] Fink JW. et al., 1987, *Planta*, **171**: 130-135.
- [4] Bacic A. et al., 1981, *Planta*, **152**: 346-351.
- [5] Jacob SR. et al., 1985, *J Cell Sci suppl*, **2**: 1-11.
- [6] Pillonel C. et al., 1980, *Planta*, **149**: 306-321.
- [7] Carpita NC. et al., 1980, *Plant Physiol*, **66**: 911-916.
- [8] 焦新之等, 1979, 植物生理学报, **5**(3): 261-269.

## EFFECTS OF POLYETHYLENE GLYCOL AND SURFACTANTS ON GLUCAN SYNTHESIS OF COTTON FIBER

SHAO Lin Xiang SHEN Cen You ZHANG Zhi Liang YAN Ji Qiong  
(Department of Biology, East China Normal University, Shanghai, 200062)

### ABSTRACT

Callose and cellulose synthesis during incubation in vitro of cotton fiber (*Gossypium hirsutum* L. vc. Daizi-15) with <sup>3</sup>H-glucose has been studied. Polyethylene glycol 4000 expedited callose and cellulose synthesis, however it stimulated cellulose synthesis even more. Non-ionic surfactants such as Triton X-100 and Tween 20 inhibited callose and cellulose synthesis. While anionic surfactant SDS was same as Triton X-100 and Tween 20 except that SDS at higher concentration was weak to inhibit callose and cellulose synthesis. It might be due to that SDS carried negative charge. The results indicated that intact cell membrane availed cellulose synthesis and detact cell membrane availed callose synthesis.

Key words: Cotton fiber Polyethylene glycol Surfactant Callose Cellulose

欢迎订阅《细胞生物学杂志》, 邮发代号 4-296。