

应用植物原生质体研究质膜的概况

陈 季 楚

(中国科学院上海植物生理研究所细胞生理研究室)

细胞膜(也称质膜)不仅是区分细胞与外环境的一个界面,还是物质运转、能量转换、信息传递的重要场所;很多重要的生命现象,诸如细胞识别、激素作用、发育、分化等均与之有关。当前,生物膜的研究几乎综合利用了现代所有先进的生化及生物物理技术,涉及的面越来越广,很多问题已在分子生物学水平上进行探讨。但与动物细胞膜的研究相比植物细胞膜的研究显得较落后,原因之一是植物细胞膜外还有细胞壁,阻碍了人们对植物细胞膜的研究。

自从 Cocking(1960)^[4]首次用酶法分解番茄幼苗根细胞的细胞壁成功地获得植物原生质体以来,至今已能较顺利地由各种类型的植物组织分离得到大量的原生质体。原生质体是去掉细胞壁的细胞,它提供了一个研究植物细胞质膜的新体系。现把这方面研究的情况作一简单介绍。

原生质体质膜外表面电荷特性的研究

原生质体质膜表面的电荷特性反映质膜上离子化基团的状况,涉及质膜的成分。Grout等人(1972)^[6]已观察到原生质体表面带净负电荷。Ruesink(1971)^[10]观察到一些碱性蛋白质,例如RNA酶能使原生质体发生溶胞作用,但酶促失活的羧甲基化的RNA酶也能起这种作用。说明这种溶胞作用的产生并非由于膜中含有RNA,他们注意到二价阳离子如 Mg^{2+} 、

Ca^{2+} 均抑制这一作用,认为在原生质体表面存在相当强的负电荷。而当以一些去垢剂或一些碱性多肽处理时,有部分原生质体继续存活,但也有部分原生质体内含物流出,表现出在试验条件下膜功能的完整性受到影响;他们进一步认为,净负电荷的存在对维持完整的膜功能是很有意义的,是保持细胞膜完整功能的一个“临界”因素。Burgess(1973)^[8]的工作支持这个想法。

Nagata及Melchers(1978)^[13]、Melchers(1978)^[11]等人的工作进一步确定了质膜的表面电势值为负值。他们用细胞电泳法测定了烟草、矮牵牛、芜菁及豇豆等植物的叶肉原生质体的表面电势值(δ),其数值大致稳定在-10—-35毫伏范围内。他们还研究了钙离子及多聚L-赖氨酸、多聚L-鸟氨酸、鱼精蛋白硫酸盐等对烟草叶原生质体表面电势值的影响。注意到 $CaCl_2$ 可消除原生质体表面的负电荷而对原生质体无害;随着 $CaCl_2$ 浓度增高,表面电势值逐渐升高;到 Ca^{++} 的浓度为100mM时,表面电势值可达零。多聚物的加入能使表面电势值改变为正值,并有可能损伤原生质体。为了进一步研究质膜表面电性的化学成份的性质,他们以一些酶如酸性磷酸酶、 α -唾液酸苷酶、链霉蛋白酶处理原生质体表面,发现酸性磷酸酶去除表面净负电荷的效果显著,而另外两种酶则无效。然而唾液酸苷酶能有效改变动物

[10] Herberman, R. B., et al., 1979. *Immunological Rev.*, 44: 43-70.

[11] Riesenfeld, I., et al., 1980. *Int. J. Cancer*, 25: 399-403.

[12] Hersey, P., et al., 1980. *Int. J. Cancer*, 25: 187-194.

[13] Cudkowicz, G., 1979. *Immunological Rev.*, 44: 13-41.

[14] Hostetter, R. K., et al. 1972. *Immu-*

logical Communications, 1: 155-183.

[15] Boiledieu, D., et al., 1977. *Develop. Comp. Immunol* 1: 207-216.

[16] Hersey, P., et al., 1979. *Br. J. Cancer*, 39: 234-240.

[17] Carlson, G. A., et al., 1980. *Int. J. Cancer*, 25: 111-122.

[18] Moore, M., et al., 1980. *Br. J. Cancer*, 41: 378-387.

细胞表面的负电性。这表明,唾液酸是决定动物细胞膜负电性的一个重要组分。由此可见,植物细胞原生质体表面的负电性与动物细胞不同主要是质膜上的磷酸基团引起的。我们的工作(碱性磷酸酶对元麦叶原生质体电泳率影响,待发表)也表明,膜上对碱性磷酸酶敏感的磷酸基团也是决定质膜负电性的成分之一。

Fisher(1979)^[6]及我们实验室用细胞电泳方法研究多种植物叶原生质体的电泳率与pH的关系,都观察到在低pH(<2.5~4.0)范围内原生质体表面显正电性,并在上述pH范围内依材料不同,大多数都有一由具负电性到具正电性的不同的pK值。从以上工作看来,决定质膜电性的化学基团是复杂的,膜上蛋白质显然也是其因素之一。

有关膜融合时的膜现象是一个有意义的课题。但对此现象仍谈不上有根本的了解。就植物原生质体融合来讲,目前也仅认为在融合诱导剂的作用下改变了原生质体表面的电性,于是原生质体在van der Waals力的作用下彼此粘连,当两者表面分子之间的距离达到一相对位置,即不大于10Å后,膜与膜之间发生膜流——这主要是指膜上的蛋白质横向移开,而双层脂类分子进行重排,于是发生融合。

目前植物体细胞融合时常用到三种融合诱导剂:硝酸钠、高pH(9.5—10.5)条件下的高浓度钙离子及聚乙二醇(PEG)。其中硝酸钠可消除表面的负电荷、高pH高钙显示出能改变膜的电性,PEG则因具很多醚链故在液相介质中稍带负电,而将膜上带正电荷的表面蛋白或带负电荷的糖蛋白通过Ca⁺⁺桥形成离子键而连在一起;它们之诱导融合也因此而与原生质体表面的电性相关。

此外,Melchers^[12]找到一种新合成的磷脂[1,2-0-dipentadecyl-Methylidene-glycerol-3-phosphoryl-(N-ethylamino)-ethanolamine],它不仅可以使膜的净负电荷减至零,而且可促使原生质体融合。Senda等(1979)^[17]用物理的方法,利用毛细管微电极对原生质体

进行电刺激,观察到刺激后,蛇根木培养细胞的原生质体很快融合,认为这可能是由于电刺激使质膜产生了暂时的去极化作用之故。

膜活性特异性的研究

膜上特异的活性部位一般指受体。它们是细胞膜上的一类特殊分子,能有选择地与细胞外环境中的一定的活性物质或其化学结构上的类似物相结合并产生效应,使细胞的功能或物质代谢起定向变化。对这些活性物质研究得较多的有激素、抗原、药物等等。受体都是膜上镶嵌的蛋白。

Raff等人(1980)^[15]最近利用荧光抗体标志法(用异硫氰酸荧光素标记Ig抗体)以及A蛋白(Protein A)或羊抗兔红细胞与原生质体的花环形成试验等技术测定了欧洲甜樱桃的愈伤组织细胞及原生质体表面与抗体连系的能力,表明抗体只与原生质体表面相连而不与细胞表面相连。该工作提供了有可能在质膜上进行抗体活性的定位测定。显然,免疫学技术对膜活性特异性的研究是很有意义的。

关于膜上药物毒性活性部位的工作,已经证实由长蠕孢菌(*Helminthosporium sacchari*)产生的一种对寄主特异的毒素——长蠕孢醇苷,在某些甘蔗品系中是与膜蛋白相连的,并已证明该蛋白至少有两个亚单位与膜上的连接位点相连。Strobel^[18]等人又以甘蔗的原生质体为材料,用与蛋白相连的毒物抗血清处理后,观察到原生质体凝集,而对照血清处理的则未能引起凝集。他们认为与毒素相连的是质膜上的蛋白。

将玉米的原生质体放在*H. maydis*产生的毒素中^[14],可见到对此毒素敏感的玉米原生质体难于继续培养下去,甚至发生原生质体“崩溃”。而来自抗性品系的原生质体即使毒素含量高于对照100倍也不受影响。这似乎表明质膜上具有毒性活性部位。有趣的是,由抗性品系分离出的相应膜蛋白并不与毒素相连,其泳动及率氨基酸残基均与易感染的蛋白质不同。

Ruesink(1971)^[16]研究了燕麦原生质体对多烯抗菌素,例如制霉菌素和两性霉素B的抗性。工作表明,这两种多烯抗菌素能使含甾醇的膜不稳定。此外,其原生质体的溶胞作用对阳离子去垢剂和阴离子去垢剂的反应也与含甾醇的膜对它们的反应类似,即对阴离子去垢剂比对阳离子去垢剂更为敏感。这些结果表明,至少对燕麦芽鞘细胞来讲,其质膜成分含甾醇。这一点类似于细菌膜而不同于红细胞膜;虽然一般认为植物细胞膜总的来看类似于红细胞膜。

有关生长素与细胞膜的关系的工作较多。膜上存在生长素受体目前已为大家所接受,并已从质膜上分离出生长素的受体蛋白;生长素在膜上作用的机制也有初步的假说,认为生长素作用于膜后产生一转录因子,它是一溶于水及醇的小分子物质,此因子作用于转录酶从而改变基因组的转录。但这方面的工作也只是开始,生长素受体蛋白究竟是什么?不同生长素的受体蛋白的特异性程度如何?等等问题都不很清楚。而以原生质体为材料的有关工作更是尚处于粗浅阶段。可以例举的如生长素对膜的渗透稳定性影响的工作, Cocking(1977)^[6]用蕃茄根的原生质体为材料,在外源吲哚乙酸浓度分别为 10^{-5} 、 10^{-7} 、 10^{-9} 及 10^{-11} 克/毫升条件下,观察到在 10^{-5} 克/毫升时,不仅原生质体内的液泡迅速增大,同时形成新液泡。吲哚乙酸为 10^{-11} 克/毫升时,该效应迅速发生,并在一分钟之内原生质体破裂。在洋葱的根原生质体中也观察到类似反应,研究其他部位分离的原生质体也观察到类似生长素引起原生质体迅速扩张并破裂的现象。吲哚乙酸这种迅速影响原生质体的效应肯定涉及到质膜,由于抗吲哚乙酸的4-氯-苯氧基异丁酸显著地抑制吲哚乙酸所引起的燕麦芽鞘原生质体的破裂,看来吲哚乙酸的上述效应是生长素所诱导的一种特殊的生长反应。

虽然原生质体亦可能是研究生长素与质膜关系的合适体系,但由于去壁后的原生质体易

破裂,内源生长素易外泄;另一方面,在原生质体培养过程中培养基内常含有生长素,类似于经过生长素预处理的材料;加上目前生长素分析技术水平有限;以上三者均影响生长素与质膜关系的研究。

关于质膜研究中外源植物凝集素的应用

在研究质膜时,常常用到外源植物凝集素。Gamborg等人(1973)^[7]曾首先提出植物凝集素可以应用于植物原生质体的凝集,并因而可能有助于原生质体融合。随后Glimelins(1974)^[8]等人报道,刀豆球蛋白A(ConA)可使培养的胡萝卜细胞的原生质体凝集,其凝集情况与对动物细胞的凝集一样。他们还观察到 α -D-甲基葡萄糖苷抑制ConA引起的凝集作用;在动物细胞中,ConA是通过表面碳水化合物基团与质膜中特异的位点相连,因此他们推测动、植物细胞两者的膜表面有类似的碳水化合物成分。此外,低温或预先用戊二醛固定原生质体以后再以ConA处理,其凝集效果下降,他们因而认为凝集效应与膜的流动性有关。

Larkin(1978)^[10]等研究了包括ConA在内的大豆凝集素、蓖麻凝集素及落花生凝集素等多种植物凝集素对烟草等11种植物材料的原生质体的凝集效应,观察到有些凝集素并不起凝集作用,而具凝集作用的对不同植物并无特异性,故他们认为有可能采用凝集素来促进不同种原生质体的凝集乃至融合。

Burgess等人(1976)^[2]认为ConA与质膜表面相连。他们的工作指出,ConA在膜上的标记分布是成簇的,认为这一现象是膜的流动性所使然。Williamson等人提出ConA可作为原生质体质膜的标记;在这方面Boss及Ruesink(1979)^[11]应用了 $[^{14}\text{C}]$ 标记的乙酰-ConA标记悬浮培养的胡萝卜细胞的原生质体质膜来分离质膜,结果表明,乙酰-ConA可以作为在分离质膜的过程中一直不与膜分开的标记,并且不影响膜的活性。标记的基础是对糖特异的凝集素,如ConA与吡喃葡萄糖苷(例如

α -D-吡喃葡萄糖苷及 α -D-吡喃甘露糖苷)相
连。

外源植物凝集素还广泛用于研究膜蛋白的特性。这在植物原生质体膜研究中也得到了重视。Williamson等人(1979)^[20]以韭葱茎分离得到的原生质体为实验材料,研究了ConA、ConA-血蓝蛋白及ConA-铁蛋白等对膜的标记。他们提出,与动物细胞中的情况一样,ConA与质膜上位点相连接的方式也是横向连接,连接的位点在流动的膜中是可以移动的,并指出这种连接看来为原生质体再生细胞壁时初生壁物质的出现而竞争性地降低。

以上工作说明,外源植物凝集素与细胞膜受体的相互作用涉及到质膜活性部位的特性,对了解质膜成分、膜结构动力学的变化等方面均有意义。

质膜的分离纯化及其他

植物细胞由于具细胞壁影响了质膜的分离,因而人们认为原生质体应是分离质膜的好系统。这方面已有一些工作,其中关于细胞分部的技术广泛采用了密度梯度超离心法,并结合质膜染色作电镜观察,但至今尚未找到质膜的特异性标记的好方法。最近发展的镧标记法^[19],即以标记的镧的化合物结合超离心来标记质膜取得了一些成果。这些分离的质膜部分已初步能应用于生化研究。

此外,关于物质运转、膜的潜势以及离子吸收等许多与膜有关的研究都有应用原生质体作为实验系统的零星报道。

从以上所述可以看到,原生质体作为研究质膜的实验系统确有其有利之处;但目前这些研究所涉及的任何一方面都仅仅是开始,很多工作明显地借鉴了动物细胞等的有关研究,这在目前当然也是必要的。但也应看到植物细胞有其本身特殊的与膜有关的问题,故对植物细胞质膜的深入了解必将加深对整个生物膜本质的了解。

参 考 文 献

- [1] Boss, W. F. and W. R. Albert, 1979 *Plant Physiol.* 64: 1005—1011.
- [2] Burgess, J., P. J. Linstead, 1976 *Planta* 130: 73—79.
- [3] Burgess, J., P. J. Linstead, 1977 *Planta* 136: 253—259.
- [4] Cocking, E. C., 1960 *Nature* 187: 962—963.
- [5] Cocking, E. C., 1977 In "Plant Growth Regulation" Ed. by Pilet P. E., Springer-Verlag p. 281—285.
- [6] Fisher, D. J., 1979 *Plant Sci. Letters* 15: 127—133.
- [7] Gamburg, O. L. and R. A. Miller, 1973 *Can. J. Bot.* 51: 1795—1799.
- [8] Glimelins, K. A., W. T. Eriksson, 1974 *Planta* 31: 225—230.
- [9] Grout, B. W. W., J. H. M. Willson., E. C. Cocking, 1972 *J. Bioenergetics* 4: 311.
- [10] Larkin, P. J., 1978 *Plant Physiol.* 61: 626—629.
- [11] Melchers, G., 1978 In "Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture" 中国科学出版社 p. 279—283.
- [12] Melchers G., 1979 In "Fifth International Protoplast Symposium Programme and Abstracts" p. 82.
- [13] Nagata, T. and G. Melcher 1978 *Planta* 142: 235—238.
- [14] Philcher, L. E., K. N. Kao, O. L. Gamburg, O. C. Yoder and V. E. Gracen, 1975 *Can. J. Bot.* 53: 427—431.
- [15] Raff, J., I. F. McKenzie and A. E. Clarke, 1980 *Z. Pflanzenphysiol* 98: 225—234.
- [16] Ruesink, A. W., 1971 *Plant Physiol.* 47: 192—195.
- [17] Senda, M., J. Takeda, S. Abe and T. Takamura, 1979 *Plant and Physiol.* 20: 1441—1444.
- [18] Strobel, G. A. and W. M. Hess, 1974 *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 71: 1413—1417.
- [19] Taylor, A. R. D. and J. L. Hall, 1979 In "Fifth International Protoplast Symposium Programme and Abstract" p. 144.
- [20] Williamson, F. A., 1979 *Planta* 144: 209—216.