

分子活化分析研究植物原生质体中的稀土元素

张智勇^① 王玉琦^① 孙景信^① 李福亮^① 柴之芳^①

许雷^② 李信^② 曹国印^②

①中国科学院高能物理研究所, 中国科学院核分析技术开放实验室, 北京 100080;

②中国农业科学院研究生院, 北京 100081. Email: zhangzhy@lnat.ihepa.ac.cn

摘要 利用分子活化分析方法, 将植物原生质体分离技术与中子活化分析相结合, 从细胞水平初步研究了植物体中稀土元素的赋存状态. 油菜叶片经酶法溶去细胞壁游离出原生质体, EDTA络合除去膜外的稀土, 再经不连续密度梯度离心纯化获得纯净原生质体. 用仪器中子活化分析测定了原生质体中稀土元素的含量. 结果表明稀土元素进入了细胞内部.

关键词 原生质体 分子活化分析 稀土元素

稀土微肥在我国得到广泛应用, 年施用面积 $33 \times 10^5 \text{ hm}^2$, 年增产粮食达 $10 \times 10^8 \text{ kg}$, 取得了巨大的经济效益^[1], 但其机理尚不清楚. 要从根本上解释稀土生物效应, 首先必须了解生物体内稀土元素在分子水平及细胞水平的赋存状态. 由于稀土元素在生物体内的含量很低, 其质量分数一般在 $10^{-10} \sim 10^{-8}$, 迫切需要灵敏度高、准确度和精密度好的稀土元素分析方法.

近年来, 分子活化分析(molecular activation analysis)得到迅速发展, 该方法是将某些特效的元素种态分离技术, 如化学分离或生化分离等, 与具有高灵敏度的中子活化分析等传统核分析方法相结合, 从分子水平或细胞水平实现元素的种态分析^[2]. 本实验室曾利用分子活化分析方法研究了从天然植物中提取的稀土结合蛋白、多糖和核酸^[3~5], 表明植物体内稀土元素与构成生物体的几种主要生物大分子紧密结合.

对于稀土元素在植物细胞水平的定位一直存在争议. 有人认为稀土元素不能进入细胞内部, 只存在于细胞壁-细胞间隙-中柱导管所组成的质外体系统中; 也有研究者认为稀土进入细胞并与细胞器结合^[6]. 这些工作一般是用稀土盐溶液处理植物组织再利用电子显微镜观察, 由于受研究方法本身检测稀土的灵敏度所限^[7], 而且各研究者所采用的实验条件也不尽相同, 至今不能给出一个确切结论.

本工作利用分子活化分析方法, 以稀土含量较高的生长在稀土矿区的植物为材料, 测定了植物原生质体中稀土元素的含量, 以确定稀土元素是否进入细胞内部.

1 实验方法

(i) 材料与试剂. 植物材料选用生长在华南某离子吸附型重稀土矿附近农田中的油菜(*Brassica napus*). 我们^[8]发现油菜叶具有较强的积累稀土的能力, 在已测定过的当地显花植物中稀土元素含量最高. 纤维素酶购自上海丽珠东风生物技术有限公司; 荧光增白剂(Fluorescent Brightener 28)为 Sigma 公司的产品. 配制试剂用水为超纯去离子水. 所用器皿用 8 mol/L 硝酸浸泡 48 h, 再分别用自来水、去离子水洗涤.

(ii) 油菜叶肉原生质体的游离与纯化. 原生质体的游离按照文献[9]的方法并根据本实验目的做了适当改进. 取叶龄一个月左右, 已完全展开的油菜叶片, 洗净, 撕去下表皮. 先在 0.5 mol/L 甘露醇溶液中浸约 1 h, 使之产生质壁分离. 再浸入含有 0.7% 纤维素酶, 3 mmol/L

MES 的 0.5 mol/L 甘露醇溶液中(pH = 5.6, 用稀氨水调), 1 g 鲜叶对应 5 mL 酶液, 于 25℃ 黑暗条件下酶解 12 h.

将酶解液通过孔径为 50 μm 的尼龙网, 除去未消化的组织残片, 滤液收集在离心管中. 低速离心沉淀原生质体, 吸去已失去活性的酶液, 加入新鲜酶液再酶解 4 h. 再次离心沉淀原生质体, 洗净酶液. 用含有 1 mmol/L EDTA 的 0.5 mol/L 甘露醇溶液洗涤 4 次, 每次 5 min, 去除膜外的稀土. 蔗糖不连续密度梯度离心获得纯净原生质体. 取一部分原生质体用 0.1% 荧光增白剂染色, 荧光显微镜检验(波长 360 ~ 440 nm)去壁效果.

(iii) 稀土元素分析方法. 样品中稀土含量用中子活化分析(NAA)测定. 将纯化的原生质体冷冻干燥, 准确称重后连同分离过程中得到的各组分在红外灯下烤至完全炭化, 用高纯铝箔包好, 用于中子活化分析. 油菜叶和根部土壤的制样方法见文献[8]. 将人工配制的稀土元素混合标准作为分析质量控制的标准参考物质, 我国的 GBW07605(茶叶)与美国的 NIST SRM-1575(松叶)和 NIST SRM-1632a(煤粉)与制备好的样品一起送入中国原子能科学研究院的游泳池反应堆中照射, 照射时间为 24 h, 热中子注量率为 $2 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. 经分别冷却 7 和 20 d 后, 在相同几何条件下, 用 HPGe 探测器测量样品和标准的 γ 放射性, 用相对法求得样品中 8 个稀土元素(La, Ce, Nd, Sm, Eu, Tb, Yb 和 Lu)的含量. 探测器的分辨率为 1.80 keV (对于 ^{60}Co 的 1 332 keV 能峰). 本分析方法的精密度及准确度对大多数稀土元素好于 $\pm 10\%$.

2 结果与讨论

2.1 细胞壁酶解及细胞膜外稀土的去除效果

测定植物原生质体中的稀土元素, 确定稀土是否进入细胞, 在保证完整原生质体有较高收率的同时还要做到: (1) 细胞壁必须酶解完全; (2) 确保洗净细胞膜外的稀土.

由上述方法得到的原生质体用荧光增白剂染色后置荧光显微镜下观察, 未发现细胞壁产生的绿色荧光, 表明细胞壁去除完全.

细胞膜主要由膜蛋白和膜脂两部分组成. 膜蛋白及膜脂的主要成分——磷脂均可与稀土元素形成配合物, 其稳定常数多在 2~6 之间^[10~12]. 为了除去细胞膜外表面的稀土, 一般采用等渗的 EDTA 溶液洗涤的方法^[13]. 我们用含有 1 mmol/L EDTA 的 0.5 mol/L 甘露醇溶液多次洗涤原生质体, 中子活化分析测定洗液中的稀土含量. 洗涤到第 3 次时洗液中稀土含量降至原生质体中稀土总含量的 1%, 第 4 次与第 3 次基本平行. 增加洗涤次数不再使洗液中的稀土含量明显降低. 由于洗涤过程中失去细胞壁保护的原生质体会有一部分破裂并释放出其中的稀土, 此时洗液中的稀土可能主要来源于细胞内. 所以有理由认为, 洗涤 4 次基本可以达到除去细胞膜外稀土的目的.

2.2 原生质体中稀土元素的含量及分布特征

3 次平行实验获得的原生质体及油菜叶(干)和母土中 8 个稀土元素(La, Ce, Nd, Sm, Eu, Tb, Yb 和 Lu)含量的测定结果列于表 1. 根据球粒陨石归一化曲线(见图 1)内插法^[15]估算出未测元素(Pr, Gd, Dy, Ho, Er 和 Tm)含量, 并得到样品中的总稀土(La ~ Lu)含量. 结果表明, 油菜叶肉原生质体中稀土元素含量为每克蛋白质中(68.3 ± 4.3) μg .

植物中的稀土主要来自土壤. 由图 1 可见, 原生质体和原叶的稀土分布模式曲线反映了母土的特征, 即呈轻稀土相对富集的负斜率分布. 但在稀土元素从土壤进入植物根系并向各器

表 1 原生质体、原叶及母土中的稀土含量

(单位: $\mu\text{g/g}$)

样品	La	Ce	Nd	Sm	Eu	Tb	Yb	Lu	总稀土含量 ^{a)}	轻稀土/重稀土 ^{b)}
原生质体 1 ^{c)}	21.0	20.5	13.0	2.33	0.294	0.27	0.46	0.07	64.8	11.5
原生质体 2 ^{c)}	24.6	24.0	13.7	2.03	0.238	0.28	0.64	0.1	73.1	11.7
原生质体 3 ^{c)}	22.6	20.4	13.6	2.05	0.258	0.27	0.61	0.09	67.0	11.0
油菜叶(干)	15.1	18.6	10.8	1.65	0.206	0.24	0.56	0.08	53.4	9.95
母土	44.7	85.7	38.9	9.06	1.33	1.39	8.14	1.12	228.4	4.73

a) 14 个稀土元素含量之和; b) 无量纲; c) 蛋白质用定氮法测定(预先用 5%三氯乙酸除去非蛋白氮)

官输送过程中, 也会发生分异现象^[8]. 从表 1 和图 1 可以看出, 叶片对轻稀土的富集比土壤更显著(叶片中轻重稀土比= 9.95 , 土壤中轻重稀土比= 4.73), 说明植物更易吸收和输送轻稀土. 我们发现原生质体中的稀土元素模式表现与原叶基本一致.

3 结论

利用分子活化分析方法, 测定了植物原生质体中的稀土元素, 结果表明稀土进入细胞内部. 原生质体中的稀土分布模式与原叶相似. 稀土元素进入细胞后究竟与何种细胞器结合正在研究中.

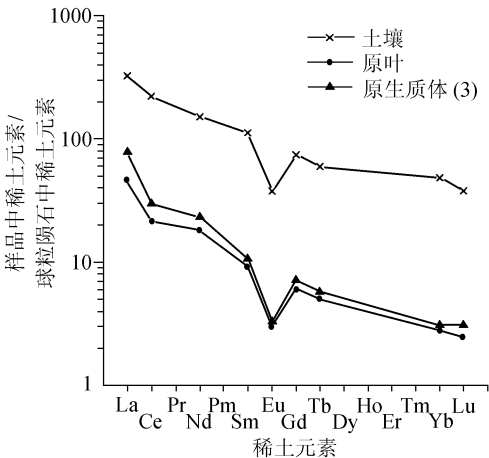


图 1 原生质体、原片和母土中的稀土分布模式

致谢 本工作作为国家自然科学基金(批准号: 29871030)、中国科学院“九五”重大项目及中国科学院核分析开放实验室基金资助项目.

参 考 文 献

1 郭伯生. 稀土在生物领域中应用研究进展. 稀土, 1999, 20(1): 64 ~ 68

2 Chai C F, Mao X Y, Wang Y Q, et al. Molecular activation for chemical species studies. Fresenius J Anal Chem, 1999, 363: 477~480

3 Guo F Q, Wang Y Q, Sun J X, et al. Study on REE bound proteins in natural plant fern *Dicranopteris dichotoma* by MAA. J Radioanal Nucl Chem, 1996, 209(1): 91 ~ 99

4 王玉琦, 许 雷, 孙景信, 等. 分子活化分析研究铁芒萁叶中稀土结合多糖. 中国科学, B 辑, 1997, 27(6): 517 ~ 521

5 王玉琦, 江 平, 郭繁清, 等. 天然植物体内与稀土元素结合的 DNA. 中国科学, B 辑, 1999, 29(4): 373 ~ 378

6 Gschneider Jr K A, Eyring L. Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths, Vol 13. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B V, 1990. 434 ~ 436

7 杨 频, 韦天新, 魏春英, 等. 利用荧光浓度指示剂 fura-2 研究稀土离子的跨膜行为. 化学学报, 1997, 55: 901 ~ 906

8 王玉琦, 孙景信, 陈红民, 等. 中子活化法研究稀土矿区植物体中稀土元素的分布特征. 中国稀土学报, 1997, 15(2): 160 ~ 164

9 薛应龙主编. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1985. 3 ~ 5

10 刘元方, 宿明明, 胡建信. 放射性示踪法研究结合稀土的四膜虫膜蛋白. 同位素, 1989, 2(4): 193 ~ 199

11 王 夔主编. 生命科学中的微量元素(下卷). 北京: 中国计量出版社, 1992. 278 ~ 304

12 倪嘉缙主编. 稀土生物无机化学. 北京: 科学出版社, 1995. 235 ~ 240

13 孟 路, 杜秀莲, 丁 兰, 等. 稀土离子跨红细胞膜作用. 科学通报, 1999, 44(10): 1047 ~ 1051

14 Haskin L A, Haskin M A, Frey F A, et al. Origin and distribution abundance of elements. In: Ahrens L H, ed. Oxford: Pergamon Press, 1968

(1999-09-19 收稿, 1999-12-03 收修改稿)