

除了上述的将原生质体用于实用目的, 它们还将逐步用于瞬间表达的检测以研究启动子的功能、内含子效应, 以及谷类植物基因的结构、功能和调节。

花椰菜花叶病毒(CaMV)的35S启动子是一种高效启动子, 已被广泛而有效地用于植物转化。然而在禾本科植物中, 利用35S启动子获得的基因表达水平比在双子叶植物中要低10至100倍(Hauptmann et al. 1987)。低于最佳的基因表达水平可能是造成在禾谷类植物转化中经常遇到的转化子难以检出以及转化率低的原因。这促使我们利用谷类植物原生质体的瞬间表达检测来寻找其他能增强基因表达的启动子(Callis et al. 1987, McElroy et al. 1990)。利用内含子也能使基因表达得到明显提高。单子叶和双子叶植物的内含子都能极大地提高基因表达水平, 这不仅在转化子的有效选择中, 而且可用于在转基因植物中获得

农业上有用基因的高水平表达。已经证明, 玉米原生质体中的瞬间表达的检测对确定控制甘露碱合成酶基因(mas, TR 2')的转录的调节因子有用。

McCarty et al. (1991)已利用原生质体中的瞬间表达来阐明许多单子叶植物基因的结构和调节, 例如玉米中编码一种与调节种子成熟及花色素苷生物合成途径有关的新蛋白的Viviparous-1(在母株上萌发的)基因的结构。这些研究结果表明, vp 1是一种可能与增强种子特异性激素反应有关的新转录因子。

上面列举的少数几例, 加上表1至3上所列举的资料, 记录了过去10年里在谷类植物原生质体研究方面所取得的突出进展, 并强调了它在植物品种改良以及了解植物生长和发育的分子基础方面所起的重要作用。

(黄健秋译 卫志明、周荣仁审校)

## 研究工作

# 溶酶体膜 $H^+$ -ATP 酶的细胞化学观察

姜淑翠\* 钟慈声 刘海群

(上海医科大学生物物理学教研室 200032)

溶酶体是细胞内 pH 值为 4.5~5.0 的酸性细胞器, 已有大量工作证明, 溶酶体内部的酸环境是依靠其膜上的质子泵维持的<sup>[1,2]</sup>, 后者是一种提供能量推动质子逆浓度梯度向溶酶体内部移动的质子转运三磷酸腺苷酶(proton-translocating ATPase 简称  $H^+$ -ATPase)。有关溶酶体膜上  $H^+$ -ATP 酶活性分布的细胞化学工作的报道较少。1989年Luo等<sup>[3]</sup>以对硝基苯酚磷酸盐(p-nitrophenylphosphate 简称 p-NPP)为底物, 以铅为捕捉剂, 用细胞化学方法成功地显示了大鼠肝细胞溶酶体膜上的  $H^+$ -ATP 酶分布。由于用铅作捕捉剂存在非特异染色沉淀等缺点, 近年来有用铈为捕捉剂进行细胞化学工作的报道, 但尚未见以铈为捕捉剂研究  $H^+$ -ATP 酶的报道。本实验室用铈为捕捉剂观察了大鼠肝细胞、血窦内皮细胞和枯否氏细胞内溶酶体膜上  $H^+$ -ATP 酶的分布, 现

报告其结果如下。

## 材 料 和 方 法

实验用成年 Sprague Dawley 大鼠, 体重 200—250 克, 戊巴比妥钠 40 mg/kg 体重腹腔注射进行麻醉, 用含肝素的 0.9% 生理盐水通过左心室进行灌注 5—10 分钟, 然后用含 2% 多聚甲醛和 0.25% 戊二醛的 0.1 mol/L 二甲胍酸钠缓冲液(pH 7.4)进行灌注固定。取肝组织切成 1 mm<sup>3</sup> 的组织块数个, 于 0.1 mol/L 二甲胍酸钠缓冲液(含 5% 蔗糖, pH 7.4, 4 °C)中漂洗过夜。用微切片器(Microslicer)切成 40 μm 厚的薄片, 采用改良的 Kobayashi's<sup>[4]</sup> 以铈为捕捉剂的细胞化学反应液, 来显示铈-依赖、哇巴因-不敏感的对硝基苯酚磷酸酶(p-NPP 酶)。组织薄片在含 5% 蔗糖的 50 mmol/L Tricine-KOH 缓冲液(pH 7.4)中室温下预温育 30 分钟。然后, 再移至 37 °C 标准温育液中温育 20 分钟。标准温育液用 50 mmol/L Tricine-

\* 现在青岛医学院工作。

KOH缓冲液(pH 7.4)配制,其中含50 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L 左旋咪唑(levamisole), 10 mmol/L  $MgCl_2$ , 4 mmol/L 对硝基苯酚磷酸盐(p-NPP, Mg盐), 2 mmol/L  $CeCl_3$ , 25%二甲亚砜(DMSO)和5%蔗糖。有些组织薄片的预温育液中含有10 mmol/L NaF或10 mmol/L 哇巴因。

为检查酶的细胞化学特性,进行以下4组对照实验:1,标准温育液中含10 mmol/L 哇巴因,预温育液中也加入相同量的哇巴因;2,标准温育液中含10 mmol/L NaF,预温育液中加入相同量的NaF;3,标准温育液中含10 mmol/L N-乙基顺丁烯二酰亚胺N-ethylmaleimide简称NEM;4,标准温育液含10 mmol/L NaF和10 mmol/L NEM。

温育后的薄片,用0.1 mol/L 二甲胂酸钠(含5%蔗糖, pH 7.4)缓冲液充分漂洗,用二甲胂酸钠缓冲液配制的1%OsO<sub>4</sub>后固定15分钟,再经梯度乙醇脱水后,用Spurr's树脂浸透和包埋,用LKB超薄切片机切成80 nm厚的切片,不经染色或用醋酸铀单染后,用JEM-1200 EX透射电镜进行观察。

### 实验结果

经标准温育液37℃温育20分钟未染色的切片,在电镜下观察,可见肝细胞结构的反差较淡,线条清晰,同时见有着色极深的溶酶体,较多地聚集于肝毛细胆管周围。溶酶体充满着色很深的细颗粒,界膜及内容物无法分辨。其它细胞器上的非特异性反应产物极少。经醋酸铀染色后,一般结构的反差增强,着色深的溶酶体仍很明显。在预温育液和温育液中各加入10 mmol/L 哇巴因,溶酶体着色仍很深(图版图1)。切片在不加底物(p-NPP)的温育液中温育后在电镜下观察,肝细胞结构清晰,线粒体、内质网、糖元等均可辨认,单层膜包裹的内容着色灰淡的溶酶体分布于线粒体间,但不见着色深的溶酶体。

在预温育液和温育液中各加入10 mmol/L 氟化钠时,肝细胞溶酶体的着色仍较一般结构深,但比用标准温育液温育的着色淡,尤其是溶酶体内部深染沉着物明显减少,而溶酶体膜附近的深染沉着物仍较多(图版图2)。当温育液中加入10 mmol/L NEM时,溶酶体包膜

上深染沉着物明显减少,而溶酶体内部的深染沉着物减少不多,致使溶酶体包膜能清楚显示(图版图3)。如果在温育液中加入10 mmol/L NaF和10 mmol/L NEM,在经过温育的切片上不易看到深染的溶酶体,只见一些溶酶体有单层膜包裹,其内容物染色中等,或有少量深染物存在(图版图4)。

肝组织血窦的枯否氏细胞和内皮细胞中亦可见大量的溶酶体。在标准温育液中温育的切片上,溶酶体着色极深,哇巴因作用不能减少其深染程度。当加入10 mmol/L NaF后,溶酶体内部的着色程度减轻,包膜上的电子致密物仍存在(图版图5)。当标准温育液中加入10 mmol/L NEM后,溶酶体内部仍有很多染色深的电子致密物,但包膜可清晰分辨(图版图6)。

### 讨论

以往关于磷酸酶类的细胞化学定位研究,皆用其生理底物ATP进行温育反应。这样做在实际工作中遇到很多困难,使实验难以顺利进行。主要因为:1.以ATP为底物的磷酸酶种类较多,故反应的特异性较差;2.反应产物中经常可见有核苷存在<sup>[5,6]</sup>。近年来人们注意到p-NPP酶是在磷酸酶水解催化过程中脱磷酸的酶,故以p-NPP为底物对p-NPP酶的检测可用作检测磷酸酶的活性。因此以人工底物p-NPP代替ATP为底物的细胞化学定位方法,近年来被广泛地接受。由于能分解p-NPP的水解酶除H<sup>+</sup>-ATP酶外,尚有多种,在实验中须采用对不同磷酸水解酶具有特殊抑制作用的抑制剂,如对Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶有特抑作用的哇巴因,对酸性磷酸酶有特抑作用的NaF,对碱性磷酸酶有特抑作用的左旋咪唑。当这些抑制剂存在时所显示的酶反应产物,可用以反映H<sup>+</sup>-ATP酶的活性。这些反应产物在NEM加入后大部分不再出现。

钼作为捕捉剂最早用于氧化酶的细胞化学定位<sup>[7]</sup>,近几年才刚刚开始用于水解酶的研究

究<sup>[6]</sup>。但是截至目前尚无人尝试将其用于H<sup>+</sup>-ATP酶的细胞化学检测。尽管如此,它在酶细胞化学反应中的优越性,预示铈是一种重要的值得推广的捕捉剂。本实验室参考 Kobayashi 等 1987 年<sup>[4]</sup>报道的以铈为捕捉剂检测 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶的细胞化学方法,采用 Noda 等<sup>[9]</sup>介绍的 Tricine-KOH 为缓冲液,由于 Tricine 与多种氨基酸相似,可能与金属离子相螯合,减少了金属离子对底物的分解和对酶的抑制<sup>[10]</sup>,结果显示反应颗粒细而均匀,反应稳定,重复性好,非特异反应产物亦明显减少。

### 摘 要

本实验在以 p-NPP 为底物、氯化铈为捕捉剂、Tricine-KOH 为缓冲液的中性最适环境中温育大鼠肝组织,进行肝细胞、血管内皮细胞和枯否氏细胞内溶酶体膜上 H<sup>+</sup>-ATP 酶定位的细胞化学研究。温育反应形成的磷酸铈反应产物电子密度高、颗粒细、分布均匀、非特异性反应产物少、重复性好。对照实验证实,溶酶体膜上的 H<sup>+</sup>-ATP 酶是对哇巴因耐受的,对 NEM 敏感的囊泡膜 H<sup>+</sup>-ATP 酶。

### 图 版 说 明

各图所用切片均经醋酸铀单染,放大倍数见标尺。  
1. 大鼠肝细胞溶酶体 NPP 酶阳性,具有电子致

密反应产物的多个溶酶体分布于毛细胆管(B)周围。温育液中加入哇巴因,反应产物仍很致密。

2, 5. 标准温育液中加入 NaF, 图 2 显示肝细胞内有两个电子密度深的溶酶体。图 5 可见肝血管内皮细胞中有一个溶酶体。两图溶酶体内部的反应产物已明显减少,但溶酶体膜上的反应产物仍很密集。

3, 6. 标准温育液中加入 NEM。图 3 显示肝细胞,图 6 显示肝血管枯否氏细胞,其溶酶体内的反应产物密集,而包膜(→)清楚可见,无反应产物沉积。

4. 标准温育液中加入 NaF 和 NEM, 肝细胞溶酶体内及其包膜上的反应产物几乎完全消失(→)。

### 参 考 文 献

- [1] Ohkuma, S., 1987, In: "lysosomes; Their Role in Protein Breakdown", ed. by Glaumann H, and E. J. Ballard, pp 115-144, Academic Press Inc., London.
- [2] Mellman, I. et al., 1986, *Ann. Rev. Biochem.*, 55: 663-700.
- [3] Luo, S. et al., 1989, *Acta Histochem. Cytochem.*, 22: 187-197
- [4] Kobayashi T. et al., 1987, *J. Histochem. Cytochem.*, 35: 601-611.
- [5] Rosenthal, A. S. et al., 1969, *J. Histochem. Cytochem.*, 17: 839-847.
- [6] Firth, J. A., 1974, *J. Histochem. Cytochem.*, 22: 1163-1168.
- [7] Briggs, R. T. et al., 1974, *J. Cell Biol.* 67: 566-586.
- [8] Angermuller, S. and H. Fahimi, 1984, *Histochemistry*, 80: 107-111.
- [9] Noda T. et al., 1988, *Acta Histochem. Cytochem.*, 21: 423-433.
- [10] Spechet S. C. and J. D. Robinson, 1973, *Arch. Biochem. Biophys.*, 154: 314-323.

(上接 140 页)

- [10] Zimmermann, U., 1978, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 29: 121.
- [11] Arnold, M. W., et al., 1989, *Biochim.*

*Biophys. Acta*, 905: 142.

- [12] Hu Xun, et al., 1990, *Biochim. Biophys. Acta*, 1021: 191.

(上接封三)

状,就像核小体结构一样,然而这种颗粒与核小体不同,它对\_\_\_\_\_酶敏感。

2. 信号识别颗粒(SPR)可以分为\_\_\_\_\_和\_\_\_\_\_两个结构域,其主要作用为\_\_\_\_\_。
3. 在酵母 MAT 序列转换中,HO 内切酶在\_\_\_\_\_交界处有一识别位点,其序列为\_\_\_\_\_。
4. DNA 是由\_\_\_\_\_通过\_\_\_\_\_连接起来的\_\_\_\_\_。DNA 与 RNA 分子的最大区别是在\_\_\_\_\_。
5. 噬菌体 λ 的复制原点结构含\_\_\_\_\_,\_\_\_\_\_和\_\_\_\_\_三种独特序列。
6. 典型锌指蛋白为\_\_\_\_\_型,即 Zn 离子与两个\_\_\_\_\_残基和两个\_\_\_\_\_残基形成配位键。另一类锌指蛋白为\_\_\_\_\_型,其中 Zn 离子与四个\_\_\_\_\_残基形成配位键。

(下转 123 页)