大鼠精子细胞内刀豆球蛋白 A 结合位点的超微结构观察

唐欣 汤雪明

(上海第二医科大学生物物理教研室)

细胞内的糖蛋白广泛地分布于细胞膜、细胞器和分泌物中,糖蛋白的多糖成分对细胞的各种功能活动有着极其重要的作用。研究多糖结构的方法有多种,我们曾用电镜放射自显影的方法研究细胞内糖蛋白的合成、转移途径,获得很多有意义的结果^[1]。应用凝集素作为探针也是一种研究多糖结构的方法,这种方法与放射自显影技术相比较,具有实验方法简便、时间短、价格较低等优点,因而近年来在细胞化学领域的应用日益增多。本实验应用刀豆球蛋白 A(Concanavalin A,简称 Con-A)对甘露糖在大鼠早期精子细胞内的定位作了初步观察。

材料与 方法

一、固定取材

1. 实验动物为成年雄性 Wistar 大鼠,体重约 300~350 克,在戊巴比妥钠麻醉下(2.5 mg/100 克体重)打开腹腔,分离出腹主动脉,在左右髂总动脉分叉处上方用 8 号头皮输液针逆向刺入腹主动脉,同时于左右肾动脉之间阻断血流,剪开左肾静脉回流泄出口,先以生理盐水通过针头冲净睾丸组织内的血液,时间约 2 分钟,然后用 4%多聚甲醛和 0.5%戊二醛混合固定剂灌注固定睾丸组织,灌注压力为 180—200 mmHg,灌注 10 分钟后,取出已变硬的睾丸,剥去外层包膜,切成 1 立方毫米左右的小块,浸泡于同样固定剂中继续固定 50 分钟,随后以磷酸缓冲液(PBS, pH 7.4, 0.01 mol/L)在 4℃下浸泡 48—72 小时,漂洗去组织内未结合的戊二醛等,其间换 PBS 4—5 次。

2. 在 25%甘油-PBS 浸透保护下将组织块快速置于液氮中冷冻,以减少冰晶损伤,然后在冰冻切片机上将组织切成 10—20 μm 的薄片, PBS 洗涤数次。

二、细胞化学反应

1. 将睾丸组织薄片以 Con-A(250 μg/ml, PBS

配,内含 1 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L CaCl₂, 0.1 mmol/L MnCl₂) 在 37℃下振荡孵育 1 小时, PBS 洗 4—5 次,每次 5—6 分钟。

2. 以辣根过氧化物酶(HRP, 100 μg/ml, PBS 配制,内含 MgCl₂, CaCl₂, MnCl₂, 量同前) 在 37℃下振荡孵育 1 小时,尔后洗 4—5 次,每次 5—6 分钟。

3. 应用过氧化物酶的 3',4'-二氨基联苯胺(DAB, 1 mg/ml, pH 7.6 Tris-HCl 缓冲液配制,内含 0.02~0.03% H₂O₂) 显色法反应 30 分钟,换 PBS 洗 2—3 次,每次 5—6 分钟。

4. 1%亚铁氰化钾还原铁酸作电子染色并后固定 30 分钟。

对照组一:

中途省却 Con-A 孵育步骤,其它实验方法及步骤均与实验组一样。

对照组二:

标本在进行 Con-A 孵育前先以 3% H₂O₂ 处理 20—30 分钟,以消除内源性过氧化物酶存在干扰的可能,然后按正常实验步骤进行。

三、电镜标本制备、观察

按常规方法自 30%—100% 逐级酒精脱水,环氧丙烷置换、浸透,环氧树脂 618 包埋;

Sorvall-II 型切片机制超薄切片;

未经染色直接于日立 H-500 型电子显微镜下观察。

结 果

在形态上,哺乳动物早期精子细胞(高尔基期、顶帽期)呈球形,细胞核位于细胞中央,高尔基体呈半球形紧靠细胞一侧,其外周部分(又称皮质)由几个扁平膜囊堆组成,面向细胞核弯曲成弓形,中央部分(又称髓质)有很多大小不同的泡状结构,在顶帽期,高尔基体产生的顶体泡发育成顶体系统覆盖于细胞核头侧;细胞内一部分内质网位于高尔基体生成面外侧,称伴随内质网,其余内质网分散于细胞质中;

线粒体多位于细胞质边缘靠近细胞膜处(图1)。**Sertoli**细胞(支持细胞)呈多形性,其细胞核位于细胞基底部,细胞核周围散布有内质网和线粒体。

电镜下可见过氧化物酶产生的高电子密度的反应产物主要出现于精子细胞的内质网膜囊上,高尔基体生成面的伴随内质网处反应尤为明显(图2);在精子细胞的高尔基期时,整个核膜上都有清晰的阳性反应,至顶帽期以后,顶体覆盖处的核膜上无反应出现,其余核膜则仍为阳性;在高尔基体上,反应仅出现于最外层的生成面膜囊处,皮质其它膜囊的边缘部位有时也可见到少量反应(图3、图4),中间层膜囊、成熟面膜囊和高尔基体泡状结构的髓质部分以及精子细胞的顶体内均无反应。有些细胞的高尔基体上全无反应出现。整个细胞内非特异性反应很少,细胞核内和线粒体等细胞器上都为阴性。在**Sertoli**细胞内,内质网与核膜上同样有明显的阳性反应。对照组一,标本的精子细胞和**Sertoli**细胞内均无反应出现;对照组二,细胞内反应出现的部位及反应强度同实验组细胞无差异。

讨 论

凝集素(lectin)是一类存在于许多动物、植物组分中的糖蛋白,其特性是能与糖蛋白上的糖基相结合^[2]。一种凝集素只能特异地结合1—2种糖基,如Con-A特异结合于甘露糖,麦胚凝集素(WGA)特异结合于N-乙酰半乳糖胺等^[3]。凝集素的这种特性对检测多糖结构提供了极为便利有效的手段,近年已被作为分子探针来研究细胞表面结构和细胞内合成代谢情况以及各种成分的变化^[4~7]。

糖蛋白由蛋白质和结合于其上的多糖链两部分所组成。组成多糖链的糖基有多种,按其在多糖链上的位置不同可分为核心部位的糖基和外周部分的糖基。核心部位的直接与蛋白多肽链相连或相距很近,富有甘露糖及N-乙酰葡萄糖;外周部分的则有岩藻糖和涎酸等。目

前,利用放射显影和生化研究已对糖蛋白的合成过程了解得比较清楚,其中核心部位的糖基是在蛋白质合成的同时由内质网中的某些糖基转移酶的作用下结合到多肽链上的,外层核膜也具有内质网相同的功能。我们应用Con-A在大鼠精子细胞内检测的是多糖链核心部位的甘露糖基,实验结果表明其主要定位于内质网与核膜,这与生化等研究的结果是相一致的。至顶帽期后,顶体覆盖处的核膜无反应的现象提示这部分核膜的性质可能已改变,不再具有合成蛋白质和糖基的功能。按以往的细胞生物学观点来说,自内质网转运出来的初级蛋白产物总是先到达高尔基体的生成面,继而在一系列加工过程中逐层向成熟面推进,最后在成熟面完成蛋白质合成的全过程分泌出来。我们在实验中看见在高尔基体的生成面有少许阳性反应,这说明内质网合成的未成熟糖蛋白确实是运送到高尔基体的生成面,但是在高尔基体其它层膜囊的边缘处也出现了阳性反应,这与以往的理论似乎不相符。我们实验室曾提出,在高尔基体内不仅仅存在一个自生成面向成熟面移动的形式,高尔基体的各层膜囊可能都有其独特的功能,而自内质网转运来的未成熟蛋白质不仅仅送到高尔基体的生成面,也可能送到其它层膜囊进行加工^[8-9]。我们在精子细胞内的高尔基体皮质膜囊边缘部分也看见有Con-A反应出现,表明确实有一些内质网的初级产物送到这些部位,此现象与我们实验室提出的对高尔基体功能模式的新看法是相符合的。至于为何在中间层膜囊和成熟面膜囊等处没有反应出现,我们认为这是由于初步形成的糖多肽运送至高尔基体后,经过对甘露糖基的加工修饰并在高尔基体内的另一些糖基转移酶的作用下逐步加上了外围部分的糖基,如N-乙酰半乳糖胺、半乳糖和涎酸等,这一系列加工过程及随后加上的糖基引起了甘露糖的空间构型变化或占据、遮盖了甘露糖与Con-A结合的位点,使Con-A不能与甘露糖结合或者结合能力降低。这种解释与Jacques等应用生化

分析的结果是相符合的^[10]。

从初步应用 Con-A 作精子细胞内甘露糖定位的结果来看,凝集素技术是一种研究细胞多糖结构极为有用的方法,具有步骤简单、定位准确、非特异反应少等优点。我们首先选择 Con-A 作尝试的原因是 Con-A 相对其它种类的凝集素来说不需要预先用化学方法将 HRP 标记在其上。一个 Con-A 分子上有四个特异结合位点,能同时结合多个糖基,故在与细胞内甘露糖基结合后,还能直接与 HRP 相合(因 HRP 也是一种富含甘露糖的蛋白质),因此活性丧失小,价格低,使用方便。但是,包括 Con-A 在内的所有凝集素都是蛋白质大分子,本身分子量较大,在应用中还存在如何更有效地透过细胞膜使细胞内反应均一的难题,有待于今后在实践中进一步解决。

摘 要

本实验应用凝集素 Con-A 对大鼠早期精子细胞内的甘露糖基作超微结构的定位。在电镜下可见阳性反应主要出现于内质网、核膜及高尔基体生成面的膜囊上,高尔基体其它层膜囊的边缘部位也有少量反应。说明在大鼠早期精子细胞内,内质网合成的初级产物主要运送至高尔基体的生成面,少量的也运送至高尔基体其它层膜囊。

图 版 说 明

图 1:
大鼠早期精子细胞局部。(N)细胞核,核膜表面

覆盖有顶体;(M)线粒体;(ER)内质网;(G)高尔基体。

×10000 倍

图 2:

大鼠精子细胞内刀豆球蛋白 A 结合反应后所示甘露糖的定位,可见致密阳性反应产物位于内质网和核膜上,高尔基体生成面膜囊上也有少量反应。(N)细胞核;(ER)内质网;(G)高尔基体。

×24,000 倍

图 3、图 4:

大鼠早期精子细胞内刀豆球蛋白 A 结合反应后所示甘露糖的定位,除了在内质网和高尔基体生成面膜囊上有明显的反应外,高尔基体其它膜囊边缘部也可见少量反应(箭头所指),高尔基体的髓质部分、顶体及顶体覆盖处的核膜上均无反应。(N)细胞核;(G)高尔基体。

×30,000 倍

参 考 文 献

- [1] 汤雪明, 1985, 实验生物学报, 18: №. 2.
- [2] Mare. Horisberger, 1984, Immunolabelling for Electron Microscopy, 249.
- [3] Debray. H, et al, 1981, Eur. J. Biochem., 117: 41—55.
- [4] Roth. J, 1978, Exp. Pathol. Suppl., 3: 5—186.
- [5] Mare. Horisberg, et al, 1978, Experientia, 34: 274.
- [6] Nicolson. G. L, 1978, Advanced Techniques in Biological Electron Microscopy., 2: 1—38.
- [7] Schrevel. J, et al, 1979, Cell Biol. 36: 259—266.
- [8] 汤雪明, 1983, 电子显微镜学报, 28: 28—31.
- [9] 汤雪明, 1984, 细胞生物学杂志, 7: 1—4.
- [10] Jacques. U. S, et al, 1979, J. Biochem., 254: 2400—2407.