



冰冻断裂方法在豌豆叶光合膜 亚分子结

构观察中的初步应用*

左 宝 玉

(中国科学院植物研究所)

鲁 崎 喆

(中国科学院生物物理研究所)

当前在光合作用研究领域内, 光合膜结构与功能的研究极为活跃; 而电子显微镜冰冻断裂和冰冻蚀刻方法则是揭示生物膜(包括光合膜)亚分子结构的一种有效手段。

冰冻断裂就是将生物材料迅速冷却固定后施以外力, 使之断裂, 再利用低温真空复型技术将材料的断裂面制成复型后于电镜下观察。如果材料断裂后, 使其温度适当上升, 让断裂面上的冰冻部分升华(即蚀刻)后再制成复型作电镜观察就叫做冰冻蚀刻。所谓冰冻复型技术则是冰冻断裂和冰冻蚀刻的总称。

根据 D. Branton(1966)^[1] 等人的观点, 当生物材料受力发生断裂时, 在生物膜结构处, 断裂面通常沿着单位膜双分子层之间的疏水相而产生, 即冰冻断裂暴露了生物膜的内部膜面结构; 蚀刻则可揭示生物膜自然表面(即亲水相)的形态。冰冻复型技术可以使人们直观地观察到单位膜两叶的内侧面上具有不同生

理功能的各类型蛋白复合体的形态和分布。这一特点是目前其它技术方法所不具备的。因此, 这一技术方法使光合膜结构与功能研究产生了新的深邃观点。

近年来, 国外结合生化分析手段, 用冰冻复型技术对拆离、重组的类囊体(thylakoid)膜进行观察, 有力地推动了光合膜结构与功能的研究。然而, 在国内由于冰冻复型技术尚未普遍建立, 加之植物材料的处理比动物或单细胞材料的难度大, 至今尚未见有报道。为此, 我们将采用冰冻断裂方法对豌豆光合膜等所作的一些观察作一简述, 以期交流而推动该技术在植物材料中的应用。

实验装置及步骤

本实验采用生物物理所电镜组一套自制的 Bullivant I 型简易冰冻断裂装置及一台略作改装的 HUS-5 型真空镀膜机。实验步骤也与 Bullivant 方法大体

图版说明

大鼠膈肌终板的形态结构及胆硷酯酶活力(Gerebtzoff 氏染色法)

图 1 正常终板, $\times 500$

2. 在体去神经第 7 天的终板, $\times 500$

3. 体外培养第 7 天的去神经终板, $\times 500$

4. 体外培养第 10 天的去神经终板, $\times 500$

5. 去神经膈肌培养 7 天时的终板酶活力强度, $\times 120$

6. 在体去神经后第 7 天时的膈肌终板酶活力下降, $\times 120$

[7] Gerebtzoff, 1965. IN "Functional structure of the postsynaptic membrane in the myoneural", B. Csillik Ed., P. 130. Publishing House of the Hungarian Academy of Science Budapest.

[8] 范世藩, 1963. 生理学报, 26: 240—250.

[9] 陈汉源、朱季美, 1965. 实验生物学报, 10: 205—214.

[10] 冯德培、陆大苻, 1966. 生理学报, 29: 195—204.

[11] Bekoff, A. and W. Betz, 1977. *J. Physiol.*, 271: 537—547.

[12] 向近敏、朱宝莲, 1965. "细胞与组织培养" 第 45 页. 上海科学技术出版社.

相同(详见《进展》1979年第一期46页)^[2]。下面仅着重简述与动物、单细胞材料在制备或处理上的不同之处及其应注意之点:

(一) 实验材料及其制备

本实验采用豌豆叶肉细胞及其叶绿体的匀浆。方法:将豌豆叶剪成0.5—1cm的碎片,放入研磨器中,加入悬浮液[0.4M山梨醇,20mM Tricine(pH 7.8)和10mMKCl]使之淹没豌豆叶碎片后,适当用力研磨,再用四层纱布过滤,经3,000g离心15分钟,倾去上清液。然后用磷酸缓冲液(pH7.6)配成的5%戊二醛固定2小时(0~4℃),再用冷的磷酸缓冲液洗3次,每次15分钟,再离心,去尽磷酸缓冲液。最后倒入30%的甘油磷酸缓冲液浸泡着材料。于冰箱中保存2—3天(动物材料通常浸泡两小时即可)。主要由于植物材料具有厚而坚硬的细胞壁,时间短了,该甘油防冻剂不能完全均匀地透入到细胞的各个部分。使用时为保证叶绿体悬浮液有足够的浓度,可用滤纸将甘油缓冲液适当的吸干。

(二) 材料处理

将上述制备好的实验材料滴入冷冻台上的样品孔内(由于表面张力作用,滴入样品池内的悬浮液将形成一半球状液滴突出于冷冻台表面),迅速投入液氮中冰冻,即叶片细胞的结构再次用物理的方法予以固定。注意投放材料到液氮中时,一定要迅速而果断,否则样品中的束缚水和游离水将生成大块冰晶而掩盖样品的真实结构。这对植物细胞中充满着细胞液的大液泡更是如此。

(三) 剥离和清洗

将冰冻处理后的材料,经冰冻断裂和复型两步之后,接下来就是剥离和清洗。

在一般情况下,剥离就是将实验标本的复型连同材料切割下来一齐放到10%的次氯酸钠(上海化学试剂二厂,商品名称,“安体福民”)等剥离剂中,约2小时后,复型即被剥离下来而漂浮于剥离液的表面。然后,将标本的复型膜小心地移入盛有蒸馏水(最好是重蒸水或三重蒸水)的器皿中清洗2—3次,最后用载网(上面覆盖有支持膜的铜网或镍网)将洗净的复型膜打捞起来放在干净的滤纸上,待水吸干后即可进行电镜观察。然而,由于植物细胞富含纤维质,往往因此而难于剥离下来或剥离不干净以致影响成功或妨碍观察,因此若遇这类情况时,尚可采用纤维素酶、硫酸、铬酸等氧化剂进行剥离。

观察结果和讨论

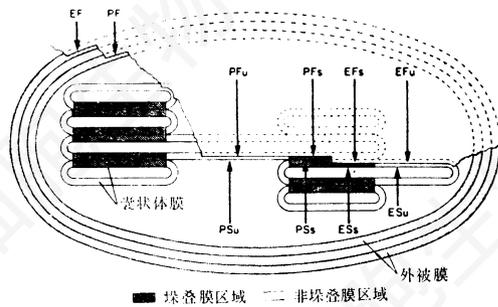
光合细胞(包括原核和真核细胞)的基本光合膜系统是类囊体。类囊体包含捕获光能并转变为化学能的色素和酶^[3],是脂质双层膜。膜上除附着有偶联因子,二磷酸核酮糖羧化酶等外在蛋白质膜的表面以外,在其双层脂膜中尚镶嵌有内在蛋白如色素蛋白复合体及电子载体等。它们以颗粒的不同大小,分布和排列呈现于劈裂膜面上构成不同特征的各种图相。据报道,目前光合膜已由生物膜泛指的四面发展到了八个面。这就是1975年Branton等^[4]14位科学家,在欧洲召开的一次会上正式将叶绿体中类囊体膜被撕裂后的各个面,根据所有生物膜都是由两个小面组成,即一个原生质小面(P)和一个外质小面(E),而每一个小面又有一个撕裂面(F)和一个自然表面(S),从而把PF和EF命名撕裂面,把PS和ES命名为表面,进而再将这些专门术语结合到叶绿体类囊体膜的垛叠(stack)和非垛叠(untack)膜区的撕裂面和自然表面上,共同提出了目前国际上所采用的新的专门术语。它与早先采用的叶绿体的专门术语(A.B.C.D)是相关的^[1,5]。二者对应如下:

$B_s \rightarrow EF_s$, $B_u \rightarrow EF_u$, $C_s \rightarrow PF_s$, $C_u \rightarrow PF_u$, $A_u \rightarrow PS_u$, $A_s \rightarrow PS_s$, $D_u \rightarrow ES_u$, $D_s \rightarrow ES_s$. 具体见下图。

图式中标定的各个膜表面和膜撕裂面上所呈现出的亚分子颗粒,其大小、数量、分布和构型等特点均各有区别,且各自有其相对应的生化反应。本文着重报道在电镜下初步观察到豌豆叶在垛叠膜和非垛叠膜撕裂面和自然表面上的亚分子颗粒构型等。

一、EFS面,它来自垛叠膜区的类囊体膜(基粒片层)的劈裂图(图版图3)。从图中,我们可以清楚地看到这一撕裂面最富有特色。即

* 研究材料由郝乃斌和李世仪同志供给;本文经匡廷云同志审阅,特此一并致谢。



叶绿体冰冻断裂及冰冻蚀刻术语的图解

图解说明： P代表原生质(细胞质、基质)小面；E代表生物膜的外质(外表面、腔)小面；F代表膜的内部断裂面；S代表膜的表面；s代表垛叠膜区；u代表非垛叠膜区。

该断裂面上的色素蛋白质颗粒大而密集，其颗粒直径大小一般约为 140 \AA ，通常排列有序。EFs 面与 PFs 为互补面。

二、EFu 面，该面来自非垛叠膜区(基质片层)的类囊体膜断裂面(图版图 1)。它主要的特征是只呈现出稀疏的颗粒，且多数颗粒平均大小相似于 EFs 面上的小颗粒。同时其间偶尔也分布有较大的颗粒(箭头)。其细胞间质(背景)上有许多坑洼，以示已撕去的 PFu 面上的颗粒痕迹。

三、PFs 面即叶绿体中垛叠类囊体膜区的原生质面的断裂面(图版图 1)。该劈裂面上主要显示出大凹窝和小颗粒混杂在一起的图像，看去非常凹凸不平，其小颗粒比类囊体膜其它任何断裂面上的都小。其颗粒直径均匀，平均约为 80 \AA 。PFs 面与 Efs 面相应，在 Efs 面上的颗粒大，而 PFs 面上的颗粒小。

四、PFu 面，它来自叶绿体的非垛叠膜区的原生质面的断裂面(图版图 3)。它与 EFu 面互补(相对应)。该劈裂面上呈现出大小不同的两种颗粒类型，其大颗粒的直径大小 100 \AA 。而且看出，其颗粒排列比其它任何劈裂面上的都显得致密而集中。

五、PF 面，该面为原生质即细胞质或基质的断裂面。该面上主要分布大颗粒，其间也有些小颗粒，但不十分明显。

此外，该方法对显示细胞核(图版图 4)液泡和线粒体(图版图 5)等细胞器，效果也比较好。

近代采用超薄切片电镜技术，使我们看清了光合类囊体膜在叶绿体中的分布和排列，从而证实了整个叶绿体的基质和基粒类囊体膜是以一定的方式，使所有分化出来的小腔相互贯穿而连接成一个内室网系。负染色电镜技术给人们看到了膜表面的真实结构。唯独冰冻断裂(或撕裂)和冰冻蚀刻技术能够揭示膜内部的各个小面上亚分子颗粒的大小、构型、分布和状态。据研究，不同状态的颗粒类型和生化反应也各异。就光合类囊体膜而论，其中尤以 EFs 面上的颗粒在结构上最具有特色；在功能上也富有意义。因为，根据目前比较一致的观点：植物的光合作用中涉及到两个光化学反应，一个与放氧有关，叫做光系统 II (PS II)；一个与具有高还原能力的物质有关，称作光系统 I (PS I)。EF 颗粒是由 PS II 核心复合物和其周围不等数量的捕获光能的色素蛋白复合体集聚而成。通过冰冻断裂和冰冻蚀刻揭示的图谱统计，大约有 80% 的 EF 颗粒分布在基粒片层膜区，即垛叠的类囊体膜断裂面上。而在间质片层膜区(非垛叠类囊体膜区)仅分布有约 20% 的 EF 颗粒。此与用酶促碘化及免疫方法^[6]所得的结果相呼应。概而言之，无论从结构(证实约有 80% 的 EF 颗粒)和从功能(证实约 20—25% 的 PS II 光化学活性)都有力地说明了间质膜上存在有光系统 II 的光化学活性。从而结束了过去认为光系统 II 只存在于基粒片层，光系统 I 仅分布于基质片层的混乱说法，也显示出冰冻断裂和冰冻蚀刻技术在光合膜结构和功能的研究中之重要性，并有助于对光合作用中光能转化和物质转化的本质问题的了解。

此外，在上述结果中提及的 Efs 和 Pfs 两个相对应的面上，Efs 面上的颗粒大，而 Pfs 面上的颗粒小是值得注意进一步追究的，因为据文献报道，这大概与 PS II 和 PS I 的大分子复合体相关，且有助于阐明光合膜是怎样聚在一起和膜垛叠的功能意义可能是什么。

参 考 文 献

- [1] Branton, D., 1966: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 55: 1048.
- [2] 吴玉徽、鲁崎唔、傅广礼, 1979: 生物化学与生物物理进展, 第1期 第46页.
- [3] Stachelin, L.A., 1977: *Brookhaven Symposium in Biology* № 28, 278—315.
- [4] Branton, D., et al. 1975: *Science* 190: 54.
- [5] Arntzen, C. J. and Briantais, J. M., 1975: *Bioenergetics of Photosynthesis* 51—113.
- [6] Armond, P. A. and Arntzen, C. J., 1977: *Plant Physiol.* 59: 398—404.

图版说明

- 图 1 示豌豆叶离体叶绿体经冰冻断裂后的EFu和PFs面 ×75,000
- 图 2 示豌豆叶肉细胞的原生质膜断裂面 PS面 ×99,000
- 图 3 示豌豆叶离体叶绿体经冰冻断裂后的 EFs EFu和PFs面 ×75,000
- 图 4 示豌豆叶肉细胞中的细胞核(N)核膜上分布有大小不等的核孔(箭头) ×24,000
- 图 5 示豌豆叶细胞质的冰冻断裂面, 从图中清晰可见液泡(V)和线粒体(M)等细胞器 ×15,000

制作小鼠嵌合体的简易方法

李幼兰 李光三 冯燕玲 陆德裕

(中国科学院发育生物学研究所)

自从 Tarkowski (1961, 1963), Mintz (1964), 用胚胎聚合的方法得到了小鼠嵌合体之后, 这一工作在国外受到了普遍的重视。但因哺乳动物的卵子小而脆弱, 要使它在外经受各种实验性处理后, 又回到母体内继续正常发育, 在实验条件上, 要求十分严格, 在技术上要求十分精细。Mintz (1971), 介绍他们用 37°C 使胚胎达到聚合, 用 5% CO₂ 调节培养液的 pH 值。所以实验是在恒温罩内进行, 或在解剖镜上装置恒温台, 并同时备有混合气相装置。该作者 (1973) 又提出用 PHA P (Phytohemagglutinin P) 试剂, 可使胚胎在室温下达到聚合。我们根据国外的经验, 进行了改变和简化, 结果证明, 效果良好, 简便易行, 现将此法具体步骤及结果作一介绍。

材 料 和 方 法

卵子的获取:

白色毛小鼠的受精卵取自昆明白♀×昆明白♂, 黑色毛小鼠的受精卵取自 C₅₇♂×昆明白♀或 C₅₇♀×C₅₇♂。实验用小鼠年龄为 5—6 周。超排卵者于

午后 4:00 注射孕马血清 5 i.u., 48 小时后注射绒毛膜促性腺激素 5 i.u., 随即放入雄鼠罐内待配, 一雄配一雌。自发排卵者, 经检查阴道涂片后, 取动情期小鼠放入雄鼠罐待配。次日清晨检查阴栓。

第三天(以见阴栓为胚胎发育的第一天), 取出两侧输卵管冲洗, 即可得 8 细胞期胚胎, 超排卵者卵子数量要比自发排卵者多 1—2 倍, 而其发育阶段远不如自发排卵者整齐。

冲洗、培养和移植用溶液为哈培氏液 (Hoppe 1973), 去透明带溶液为酸性泰洛氏液 (Tyrode's solution) pH 2.0—2.5 (Nicholson 1975)。冲洗卵子前, 将备用之溶液分置于小培养皿或小玻璃方杯中, 加盖, 但不要密闭, 置 37°C 含 5% CO₂ 和 95% 空气的温箱中预热, 使其 pH 调到中性(以培养液中酚红颜色决定)。

胚胎的聚集:

将预先配制的 1% 琼脂(1克琼脂粉溶于 100 毫升蒸馏水)加热溶化, 在已消毒的小玻璃方杯(或小培养皿)的底上, 均匀地倾倒一层, 约厚 1—2 毫米, 待凝后, 用细白金丝在微焰灯上烧热, 在冷却的琼脂面上烫成一排排的小凹陷, 其直径略大于 2 个胚胎,

* 文中照片由李建荣同志拍摄。