

一次可以同时放入八只胶囊，约3—5分钟后迅速将固化的胶囊从小圆孔中夹出，横放在样品台中间小槽内，立即用冷却过的手术刀，对准胶囊中央位置，以小铁锤轻轻敲打手术刀背面(见图6)，胶囊即刻断裂成两块，把断裂的

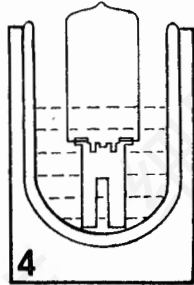


图4 预冷样品台

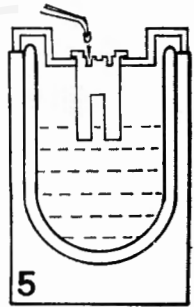


图5 冷冻样品

胶囊放回到100%乙醇中，快速退到磷酸缓冲液。正确掌握、控制样品冷冻的速度，是确定电镜观察效果好坏的关键，若冷冻时间不足，则样品断裂不好；冷冻过度，样品就容易破碎，一般情况下，待胶囊中的乙醇凝固变成灰白色

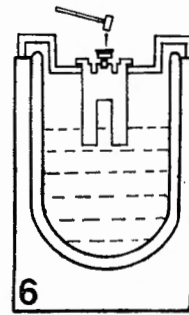


图6 割断样品

2—3分钟之后，割断比较合适，操作时动作越快越好，为了保持样品台的温度，做完一批样品后，只要把样品台重新浸入液氮中冷却即可继续使用，直到液氮用完为止。若能适当添加液氮，使样品台绝大部分始终浸在液氮中，冷却速度更快。

3. 2%丹宁酸组织导电法处理样品，再以液氮冷冻干燥后真空喷金^[3,4]。

参 考 文 献

- [1] 张铁锋等,1981,细胞生物学杂志,3(2):23—24。
- [2] 田中敬一,1979,讲演会参考文献集。石家庄。南京,481,日本产业株式会社精机输出部。
- [3] 庄元忠,1982,中华物理医学杂志,4(3):156—157。
- [4] 潘祥林等,1982,中华物理医学杂志,4(3):158—159。

车床加工本院仪药科维修组王裴珍,本院计划生育研究所张寅恭同志提供实验动物,特此致谢。

基础知识

浅谈植物液泡

向定蜀

(河南农学院)

植物细胞的一个显著特点，就是在它们分化成熟时，大都含有一或几个大型的液泡(vacuole)。众所周知，它是由液泡膜及其所包裹的细胞液组成的。液泡膜是典型的单位膜，90%以上的细胞液是水分，其中

溶有一些无机盐和有机分子。植物生理学家早就注意到液泡在植物生命活动中的重要作用。近十多年来，在亚显微与分子水平上的研究，特别是关于液泡动态的研究，使我们对它的认识更加深入了。这里仅就液

泡的形成、溶酶体性质及多功能特点作一简要评价。

关于液泡的形成

人们早就注意到分生细胞中通常没有大液泡。大液泡是在组织分化过程中逐渐产生的，而根尖则是观察液泡形成过程的理想材料。将经果胶酶处理的洋葱根尖置于两张载片之间压散，经中性红染色，在普通光学显微镜下便可以看见，随着细胞的体积增大，起初出现许多小液泡，随后体积增大而数目减少，以至最终形成一个中央大液泡。显然，中央大液泡是小液泡合并与体积增大的产物，而小液泡的产生这个问题，则只有靠亚显微水平的研究，才能获得圆满地解决。Buvat^[1]基于对超薄切片的电镜观察，发现内质网池局部膨大，以及有的小泡与一段内质网池连通的现象，提出所谓的内质网膨大假说，认为光滑内质网局部膨大就形成了液泡的前身，即光镜所不能分辨的前液泡(Provacuole)。后者吸水增大体积，并互相合并，就产生了大型的液泡。这是液泡发生的一种有代表性的看法。

Marty 基于对转向分化的根尖细胞的电镜酶化学定位与对厚切片(1 μm)的高压电镜观察，提出了关于液泡形成的另一个假说，即自噬形成说。根据他 1980 年的一篇综述^[2]，可以将液泡的形成过程表述为：(1)最初在 GERL 区(靠近高尔基体形成面的产生溶酶体的光滑内质网池区)的侧生泡状突起，形成前液泡。随后它或者脱落下来，成为小泡状的前液泡，或者进一

步延伸成分枝状的前液泡。它们都有很强的酸性磷酸酶(鉴定溶酶体的标准酶)活性，相当于动物细胞中的初级溶酶体；(2)分枝状前液泡包围一部分细胞质联结成鸟笼状，进而侧向合并成球壳状的前液泡，连同被它分割包围的那一部分细胞质一起组成自噬泡(autophagic vacuole)；(3)前液泡释放水解酶将分隔在自噬泡中的细胞质，连同球壳状前液泡的内膜一起加以分解，水解产生的小有机分子可被转运到胞基质中，不能水解的残渣保留在自噬泡中，于是形成具有单层被膜的液泡。显然，液泡膜来源于球壳状前液泡的外膜；(4)小液泡吸水膨大，并互相合并而成为大液泡(图 1)。Marty 认为液泡是自噬过程的产物，它相当于动物细胞中溶酶体的残体。

关于液泡的溶酶体性质

液泡具有溶酶体性质，这已确定无疑^[2,3,4]，一方面无论在前液泡、自噬泡还是大液泡中均检测到有酸性磷酸酶的存在。对组织匀浆或胞溶分离所获得的液泡的酶化学和免疫酶化学研究，都证明高等植物液泡含有类似于动物溶酶体中的水解酶类，如：磷酸(脂)酶、磷酸二酯酶、核酸酶、蛋白酶、肌醇-6-磷酸脂酶，以及 α-甘露糖苷酶、β-N-乙酰葡萄糖胺酶、β-半乳糖苷酶等多种糖苷酶。此外液泡的酸碱度(通常为 pH5 左右)也适合于这些酶活性的需要，使它们几乎能水解各种生物大分子。另一方面，许多研究都肯定了植物液泡具有与动物溶酶体相似的细胞内消化功能，主要有自噬与自溶两种方式。

所谓自噬(autophagy)就是细胞将自身的一部分细胞质(包括一些细胞器)分割出来或吞入液泡，并释放水解酶类在液泡中将其生物大分子分解，然后再加以利用的过程。自噬是植物细胞常见的内消化现象，在液泡形成时就有自噬作用，已如前述。液泡形成以后也能进行自噬，这就是液泡膜向内凹陷，将一部分细胞质及细胞器吞入液泡，并加以分解的现象。在植物细胞的超薄切片与冰冻蚀刻制片上，经常可以见到此过程各阶段的情形，即部分细胞质陷入液泡，液泡中含有被液泡膜包裹着的细胞质颗粒，以及内消化剩下的絮状残渣。前液泡还可与液泡合并，往其中补充水解酶类，以增强内消化功能。自噬作用对于植物细胞器的更新与组织分化都有重要作用，它可以将一些老化的或已失去作用的细胞器消化掉，但水解所产生

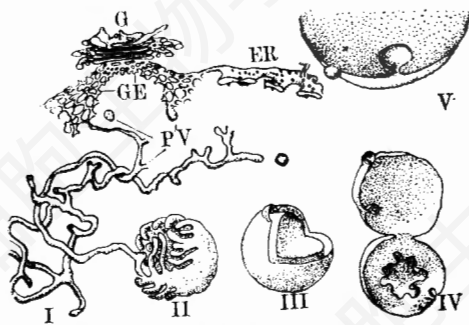


图 1 液泡的自噬形成过程图解

I—V 表示液泡形成过程的几个阶段：I. 分枝状前液泡；II. 鸟笼状前液泡；III. 自噬泡；IV. 小液泡合并；V. 大液泡；ER, 内质网；G, 高尔基体；GE, GERL；PV, 前液泡。(依 Marty, 改绘)

的小有机分子可被转运出去加以再利用。

所谓自溶(autoolysis)就是液泡膜破裂,释放其中水解酶类,将整个原生质体分解掉的过程。自溶在植物组织分化过程中有更显著的作用。例如,在导管形成时就观察到液泡膜碎裂,以及整个原生质体逐渐被消化掉的现象。纤维和木栓组织的形成也应与此类似。但在筛管的形成过程中,液泡膜破裂以后,显然只进行了选择性的内消化,细胞核、高尔基体、核糖体以及部分质体被分解掉了,而将质膜与大部分细胞质(包括一些质体与线粒体)保存下来。在衰老细胞中也多次见到自溶现象,例如:在朝开暮谢的牵牛花花冠细胞中,就曾见到液泡膜的破裂和原生质体随即解体的过程。经除草剂处理以后,亚麻的子叶细胞在几小时之后便发生自溶。在1—2年生植物结实器官成熟时,其茎、叶枯死,并将其中的养分转运至结实器官,想必也是通过自溶而实现的。

关于液泡的多功能特点

植物液泡除内消化功能外,还具有为动物溶酶体所没有的其它重要功能,诸如增大细胞体积、渗透吸水、维持细胞的紧张度、贮藏代谢产物等。

植物的营养方式是吸收和自养,为了增强吸收水分、无机盐、二氧化碳与日光能的能力,势必需要扩大植物的表面积。单靠分生更多的细胞与合成大量原生质的途径来扩充细胞体积与增大表面积,是很有限的。于是植物便利用形成大液泡来扩充细胞的体积,所以植物细胞体积的增大总是伴随着液泡化的过程。液泡腔所占据的实际上是细胞中的质外空间(exoplasmic space),细胞液绝大部分是水分,其体积的增大,显然主要是靠吸水来实现的。由于大液泡的形成,可使一个成熟根毛细胞的体积比分生细胞体积增大近百倍,而无需增加很多原生质。用扩大质外空间的办法来增大细胞体积与吸收面积实在是多、快、好、省的。这也是植物在进化过程中的一项最优的选择。

液泡还有渗透吸水的功能,这是植物细胞吸水的主要动力之一。因为液泡膜是半透膜,细胞液又含有较多的无机离子与有机分子,而有较低的水势。据测定,叶肉细胞中液泡的水势为-10—20巴。一些研究表明,各种离子和分子对液泡水势所起的作用是不一样的,而且同种离子在不同的液泡中的浓度也不尽相同。例如:在含0.1 mM K^+ , 1.0 mM Na^+ 和 1.3 mM Cl^- 的溶液中生长的丽藻(Nitella),其液泡中分别含有75 mM K^+ , 0.5 mM Na^+ 与 150—170 mM Cl^- , 同周

围的细胞质(119 mM K^+ , 14 mM Na^+ , 65 mM Cl^-)相比,细胞液中的 K^+ 浓度低而 Na^+ 与 Cl^- 浓度高,后两者显然是通过液泡膜主动转运入液泡的。自郁金香(Tulipa)花瓣分离获得的液泡则含有 148 mM K^+ 、50 mM Na^+ 、33 mM Mg^{2+} 、8 mM Ca^{2+} 和 32 mM Cl^- , 在这里 K^+ 浓度高而 Cl^- 浓度低。这些差异自然与液泡膜上的转运蛋白的种类、数量与活动有关,受 DNA 上一定基因的控制。迄今这方面的研究还较少。

由液泡吸水所产生的膨压,又用来维持植物细胞与柔软器官的紧张度,以保持植物体的正常形态,并使其中的生理活动得以正常进行。众所周知,液泡失水将引起叶子萎蔫与生理活动紊乱。过度萎蔫甚至导致死亡。

液泡还是植物细胞贮藏多种代谢产物的场所。液泡中的贮藏物质在不同的物种,不同的器官与不同的细胞中又有很大差异。其中有的是营养物质,例如:甘蔗茎、甜菜根中的蔗糖,葱属植物叶中的多糖性质的粘液,菊芋块茎中由果糖聚合而成的菊糖,以及豆类种子中的贮藏蛋白质。有的是代谢活动生产过剩的中间产物,如:苹果酸、柠檬酸、草酸及几种碱性氨基酸,它们被转运到液泡中贮藏起来,能减轻对有关代谢过程的抑制作用。许多肉质植物(如,仙人掌,景天)还能在夜间通过张开的气孔吸收大量二氧化碳,通过景天科酸代谢生成苹果酸贮藏在液泡中,到了白天,又将苹果酸转运到细胞质中,释放 CO_2 供给光合作用。在这里液泡成了被固定了的 CO_2 的贮存库。代谢活动或自噬过程所产生的一些废物(如:草酸钙,碳酸钙结晶,单宁,多酚类及多种多样的生物碱等)也往往被贮存在茎、叶细胞的液泡之中,这对于细胞质显然有解毒的作用。因此有人把液泡当作植物细胞中的“垃圾箱”。一些液泡中存在的花色苷,则使一些花、茎或叶显兰、紫或紫红的颜色,其颜色还会随细胞液 pH 值的变化而改变。这显然有一定的生态学意义。

特别值得一提的是,近年来的许多研究^[5]发现,在豆类和谷物种子形成时,其子叶与糊粉层细胞中的大液泡分隔成许多小液泡,并在其中累积蛋白质而转变成蛋白体(protein body,过去叫做糊粉粒 aleurone grain)。蛋白体外有单层被膜(来源于液泡膜),有些蛋白体内含无定形与结晶状的蛋白质,其中大部分是无生理活性的贮藏蛋白质(如豆球蛋白),它们与一些非丁肌醇和各种已糖六磷酸盐形成不溶性的复合体。后者又是种子中 P、K、Na、Ca、Mn、Zn、Mo 等矿质元素库。而且蛋白体中仍含有少量水解酶,如:肽链内切

酶、肽链端解酶与肌醇六磷酸酶。当种子萌发时,蛋白体吸水并可能创造了适合水解酶活性的内部环境,使水解酶从四周与内部同时进行水解作用,所产生的氨基酸与短肽链被迅速地转运出去,供胚的旺盛生长的组织利用。贮藏蛋白体逐渐被耗尽,蛋白体也逐渐吸水并终于又转变成液泡。由此看来,蛋白体乃是一种既能贮藏蛋白质又能在需要时迅速消化贮藏蛋白的特殊溶酶体。

综上所述,可以得出这样一个结论:植物液泡乃是一种多功能的溶酶体,其发生和内消化功能都与动物溶酶体相似。大液泡基本上相当于动物溶酶体的残体。不过在动物细胞中,残体是经过浓缩而缩小了体积的‘垃圾箱’;植物液泡则正好相反,通过吸水而增大了体积,仍保有内消化功能,还被赋予其它的重要功能。也就是说,在进化过程中,植物选择了扩大并充分利用液泡腔这个质外空间的途径。最后还应指出,液泡不含DNA与核糖体,属于非自主的细胞器。它是内质网或还有高尔基体小泡加入的衍生物,是内膜系的一部分,即由内膜分隔出来的水解酶活动空间。与动物溶酶体一样,它具有多态性(有前液泡、自噬泡与大

液泡等形态),也是一种动态体系,能在细胞遗传信息的调控下发生、发展,并进行结构与功能转变,以至解体、消失。可惜我们现在对其活动的调控细节几乎一无所知。

参 考 文 献

- [1] Buvat, R. 1958. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.* 19, 121—161.
- [2] Marty, F. et al. 1980. "The Biochemistry of Plants", Vol. 1 (N. E. Tolbert ed.). pp. 625—658. Academic Press, New York.
- [3] Matile, Ph. 1975. "The Lytic Compartment of Plant Cells." *Cell Biol. Monogr.*, Vol. 1. Springer-Verlag, Berlin and New York.
- [4] Matile, Ph., and Wiemken, A. 1976. "Encyclopedia of Plant Physiology, (n. s.), Transport in Plants" (C. R. Stocking and U. Heker, eds.), Vol. 3, pp. 255—287. Springer-Verlag, Berlin and New York.
- [5] Lott, J. N. A.. 1980. "The Biochemistry of Plants", Vol. 1 (N. E. Tolbert ed.). pp. 589—623. Academic Press, New York.

国外动态

细胞和分子生物学家 Pierre Chambon

实验室的研究工作简介

孙 毓 麟

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

P. Chambon 教授在法国东部边境的一个美丽的古城——Strasbourg 市致力于分子生物学研究已经 26 年了。1979 年法国国家科学研究中心把国家最高的科学奖——金质奖章颁发给了这位杰出的生物学家。回顾一下他的真核细胞分子遗传学研究室近年来所从事的工作,我们就会明了他取得这样的荣誉是当之无愧的。

1963 年, P. Chambon 教授所领导的实验室,首次发现了一种新的多聚核苷酸:多聚腺苷二磷酸核糖 (polyadenosine diphosphate ribose—poly ADRR), 并且阐明了它的分子结构和生物合成。嗣后,许多实验室证实了这个发现,并且证明 poly ADRR 在 DNA 修复中起着重要作用。1967 年以来, poly ADRR 成为许多会议和综述论文的议题。

1966—1967 年, P. Chambon 教授在美国斯坦福大学医学院生物化学系与 A. Kornberg 教授一起,研究

了细菌孢子形成时期基因表达的控制方式。1967 年,他返回 Strasbourg 市开创了直接隶属法国国家科学研究中心的真核生物分子生物学和遗传学实验室。

实验室建立的初期,年仅三十几岁的 P. Chambon 教授就以其敏锐的科学眼光,带领着为数不多的学生,致力于对真核细胞 RNA 聚合酶的研究。他们发现,在动物细胞中存在着复合的依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶。这一发现来自研究 α -鹅膏蕈碱对 RNA 聚合酶 A、B、C 的活力有不同程度的抑制作用,他们详细地研究了这种抑制剂的作用机制。此外,他们纯化了这几种酶,测定了各种酶的亚单位结构,分析了各种亚单位的免疫学性质和它们在基因转录中的作用。此后,这一领域的研究就极为活跃地发展起来。

作为研究在染色质水平上基因表达如何调节和控制的的第一步,他们同时也进行着染色质结构的研究。