

# 蚕豆叶肉原生质体表面性质的初步研究

方世国 杨万年 钟敏

(武汉大学病毒学系生物物理教研室)

## 前言

植物原生质体在组织培养及体细胞杂交中应用已十分广泛。其表面性质的探讨对于植物细胞融合、识别及其膜结构认识的深化有着深刻的意义。植物原生质体膜的研究工作虽然已有一些<sup>[1]</sup>，但其许多物理及化学特性和结构仍不很清楚，膜融合机理的解释亦众说纷纭<sup>[2-5]</sup>，存在着许多不同的看法。因此，进一步探讨植物原生质体表面性质是十分必要的。

## 材料与方法

一、材料：蚕豆(*Vicia faba*)，品种大白蚕。种子浸水发芽后花盆栽培。

### 二、原生质体的分离

取栽培二十天左右植株的全展嫩叶，称重后用小镊子将下表皮撕去，放入纤维素酶液(1%纤维素酶，0.4%离析酶，10%或13%甘露醇，0.02 MPBS, pH 5.8)中，叶片量与酶液量之比为1:10(克:毫升)。减压渗透十分钟后放入 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温箱内酶解4-5小



图1 蚕豆叶肉原生质体( $\times 1360$ )

时。除去酶解液中残物。用吸管将酶解液吸入离心管低速离心3分钟，去上清液，用洗涤液(10%或13%甘露醇，0.02 MPBS, pH 5.8)悬浮定容至所需毫升数。在血球计数板上计数。原生质体密度为 $1 \sim 2 \times 10^5$ 个/毫升。所分离原生质体如图1。

### 三、样品处理方法

1. pH梯度样品 取上述原生质体悬浮液分装于8支小离心管内，每管1毫升。低速离心3分钟沉淀原生质体，去上清液后用相应各管pH值的洗涤液悬浮，离心沉淀，去上清液，再用相应各管pH值的电泳悬浮液悬浮(12%蔗糖，6%甘露醇，0.01 M Tris-HCl缓冲液)。在此悬浮液中原生质体形态良好。电泳样品的原生质体密度为 $2 \sim 3 \times 10^5$ 个/毫升。

2.  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{CaCl}_2$ 处理样品 取原生质体悬浮液，分装于小离心管中，每管1毫升。低速离心洗涤两次，每次3分钟，最后悬浮在含有不同浓度 $\text{NaNO}_3$ 或 $\text{CaCl}_2$ 的电泳悬浮液中(12%蔗糖，6%甘露醇，0.02 MPBS, pH 5.8)。 $\text{NaNO}_3$ 和 $\text{CaCl}_2$ 的浓度设置见表2。

3. 各种酶处理样品 取原生质体悬浮液分装于小离心管内，每管1毫升。离心3分钟，去上清液，用1毫克/毫升浓度的酶液1毫升悬浮(酶的种类见表3)，于 $37^\circ\text{C}$ 下处理半小时，取出离心去上清液，洗涤液离心洗涤一次后用电泳悬浮液(pH 5.8)悬浮。另设空白对照。

以上处理重复两次以上。

### 四、原生质体电泳率的测定及计算

1. 测定条件 显微镜放大倍数 $10 \times 16$ ；目镜网格每格距离为51微米；方形毛细管内径为 $880 \times 880$ 微米，长度6厘米；盐桥为2%琼脂内含10%NaCl；

本文承蒙郑正炯副教授、丘冠英副教授审阅并指正，特此致谢。

周木艳同志参加部分工作。

电极为银电极，端直流电压 40 伏，电泳温度为 25±1℃。

2. 测定方法 每一样品往返测定 20 个原生质体。取管径的 1/4 深度作测量层。电泳时，取悬浮状态好的原生质体进行测定。

3. 电泳率的计算 设  $EPM_{1/4}$  为 1/4 深度的电泳率，平均电泳速率为  $V_{1/4}$ ，电泳管内电势梯度为  $E$ ，则  $EPM_{1/4} = \frac{V_{1/4}}{E}$ 。已知端电压 40 伏，电泳管长 6 厘米，目镜网格格距为 51 微米，则： $EPM_{1/4} = \frac{51/t}{40/6} = 7.65 \times \frac{1}{t}$ 。其中  $t$  为原生质体电泳时在 1/4 深度所移动 51 微米的时间平均值。电泳率的单位为：微米/秒·伏·厘米。

实验结果

一、pH 性质 详见表 1、图 2。蚕豆叶肉原生质体表面等电点约为 pH 4.6。在 pH 4.6

以下，其表面净电荷为正，在 pH 4.6 以上则净电荷为负。在等电点附近存在一电泳率的突变区，突变值  $\frac{|\Delta EPM_{1/4}|}{\Delta pH} = 3.76$  [微米/秒·伏·厘米]·pH。

二、 $NaNO_3$ 、 $CaCl_2$  处理样品电泳结果 详见表 2。 $NaNO_3$  及  $CaCl_2$  均使蚕豆叶肉原生质体表面净负电荷大大受到掩盖。 $NaNO_3$  在 25 毫克/毫升浓度下可使原生质体表面净电荷量为 0； $CaCl_2$  在 2 毫克/毫升浓度下可使其表面净电荷量为 0。

三、各种酶处理样品的电泳结果 详见表 3。经牛胰核糖核酸酶、透明质酸酶、碱性磷酸酶、胰蛋白酶、神经氨酸酶、木瓜酶、无花果酶七种水解酶处理过的原生质体，在 pH 5.8 电泳介质中，其负电泳率均较对照组低。下降最大者为牛胰核糖核酸酶处理组，下降百分率

表 1 蚕豆叶肉原生质体 pH 电泳率值表

pH 值	2	3	4	5	6	7	8	9
$EPM_{1/4}$ (微米/秒·伏·厘米)	+2.40	+2.32	+2.03	-1.73	-2.03	-2.42	-2.55	-3.47

表 2  $Na^+$ 、 $Ca^{++}$  对蚕豆叶肉原生质体电泳率的影响

$NaNO_3$ 浓度 ( $\times 10^3 \mu g/ml$ )	0	0.5	5	25		
$EPM_{1/4}$ (微米/秒·伏·厘米)	-1.78	-1.43	-1.03	0		
$CaCl_2$ 浓度 ( $\times 10^3 \mu g/ml$ )	0	$10^{-2}$	0.1	0.2	2	200
$EPM_{1/4}$ (微米/秒·伏·厘米)	-1.84	-1.45	-1.24	-0.95	0	0

表 3 各种水解酶对蚕豆叶肉原生质体电泳率的影响

电泳率	空白对照	牛胰核糖核酸酶	胰蛋白酶	无花果蛋白酶	木瓜蛋白酶	透明质酸酶	碱性磷酸酶	神经氨酸酶
$EPM_{1/4}$ (微米/秒·伏·厘米)	-1.83	-1.19	-1.33	-1.56	-1.64			
$EPM_{1/4}$ (微米/秒·伏·厘米)	-1.74					-1.33		
$EPM_{1/4}$ (微米/秒·伏·厘米)	-1.85						-1.48	
$EPM_{1/4}$ (微米/秒·伏·厘米)	-1.83							-1.56
下降百分比 (%)	0	35.0	27.3	14.8	10.4	23.5	20.0	15.2

注：上表内数值分四批完成。每处理重复两次以上。表中数值取重复中的一次。各水解酶浓度均为 1 毫克/毫升。

为35%，最小者为木瓜酶处理组，下降百分率为10.4%。

### 讨 论

我们测得蚕豆叶肉原生质体在生理 pH (pH 5.8) 下，其表面净电荷为负，这与陈季楚等人<sup>[6]</sup>、Grout 等人<sup>[7]</sup>所得到的结果一致。蚕豆叶肉原生质体等电点为 pH 4.6，比元麦叶肉原生质体等电点 pH 2.8 要高得多，这暗示了两者膜表面组分存在差异。

蚕豆叶肉原生质体的 pH 电泳曲线中，其电泳率在等电点附近有一突变区，突变区两侧电泳率较为平稳，这也与陈季楚等人所做元麦叶肉原生质体的 pH 电泳曲线相同，只是蚕豆的突变值较小。这一突变区的存在，使得蚕豆叶肉原生质体表面电荷的不稳定状态限制在一个狭窄的 pH 范围内，保证了其在生理 pH 下的电荷状态较为稳定。另外，蚕豆叶肉原生质体表面在等电点附近狭窄的 pH 范围内电荷量发生突变的性质不象是典型蛋白质的性质，而象是核苷酸上磷酸基团的行为。这一点与核糖核酸酶对原生质体表面电荷量改变最明显的结果也相吻合。

我们在实验中发现，蚕豆叶肉原生质体的完整性与环境 pH 值有关。在极酸性环境中，如 pH 2~3，原生质体膜会发生渗漏，大量叶绿体外逸，并环聚于膜外侧成圆环状；在 pH 4~9 下，原生质体均能保持良好的完整性。可见，环境中大量的 H<sup>+</sup>，会导致原生质体膜的破坏。

NaNO<sub>3</sub>、CaCl<sub>2</sub> 在 pH 5.8 下对蚕豆叶肉原生质体表面负电荷的掩盖作用颇为强烈，这与 Grout 等人<sup>[7]</sup>、陈季楚等人<sup>[8]</sup>所做的结果一致。但我们将很高浓度的 CaCl<sub>2</sub> (200 毫克/毫升) 加到电泳介质中时，仍未观察到原生质体表面净电荷为正(向负极泳动)的现象，这与 Grout 等人的结果又稍有不同。对 Na<sup>+</sup>、Ca<sup>++</sup> 降低原生质体电泳率的原因，我们认为符合离子吸附理论<sup>[6]</sup>，即正离子吸附在原生质体表面

从而降低了其净负电荷量。不过，当原生质体表面净电荷为 0 时，表面正负电荷处于相对平衡状态，正离子再难吸附上去。故正离子不能使原生质体表面净电荷为正。

从各种水解酶对蚕豆叶肉原生质体电泳率的影响结果可初步认为，在蚕豆叶肉原生质体外表面负电荷的主要贡献基团为磷酸基团。但磷酸基团在膜上是否仅以磷脂形式存在呢？虽然 Ruesink 认为膜中不含有 RNA<sup>[1]</sup>，但是，牛胰核糖核酸酶是专一性相当强的酶，且 pH 电泳曲线上的突变现象又很象是核苷酸上的磷酸基团质子的解离行为。因此，我们认为，即使膜上不存在 RNA，也很可能有多核苷酸的片段结合在膜蛋白上，形成糖蛋白。

对于植物原生质体表面是否存在神经氨酸组分，有些研究者意见不一致<sup>[1,6]</sup>。我们用 1 毫克/毫升浓度的神经氨酸酶处理蚕豆叶肉原生质体后，在 pH 5.8 时，其负电泳率下降了 15.2%，这表明蚕豆叶肉原生质体表面存在神经氨酸成分，但量较少。电泳结果还表明蚕豆叶肉原生质体表面存在相当多的透明质酸。透明质酸在动物组织中主要起吸着水分，保护及粘合细胞使之不至分散的作用。其在植物组织中的作用还不清楚。

各种蛋白水解酶对蚕豆叶肉原生质体的电泳率的效应很不一致。这意味着质膜外表面蛋白的结构顺序具有一定的特异性，因而对各种蛋白酶的敏感程度存有差异。

### 参 考 文 献

- [1] 陈季楚, 1981, 生物科学参考资料(13):247 科学出版社。
- [2] 内宫博文(梁连登译), 1981, 微生物通讯 (1):19-28。
- [3] 王辅德、夏镇澳、宛新杉、宋永根, 1982, 细胞生物学杂志 4(4):22-24。
- [4] Zimmermann U., J. Vienken, 1982, *J. of Membrane Biology* 67(3):165。
- [5] 龟谷寿昭(赵庆华译), 1981, 国外作物组织培养 (9): 1-8。
- [6] 陈季楚、付婉华, 1980, 实验生物学报 13 (3):281-285。

[7] B. W. W. Grout., R. H. A. Coutts, 1974  
*Plant Science Letters* (2): 397—403.

[8] 陈季楚、付婉华, 1981, 实验生物学报 14  
(4): 403—406.

## 人胚心肌细胞超微结构

王治荣 王孝铭 吴振铎 李富华  
(哈尔滨医科大学)

自第一次报告鸡胚心肌发育的电子显微镜研究<sup>[1]</sup>以来, 其他学者陆续报告了小鼠等动物胚胎心肌的电镜研究<sup>[2]</sup>, 人胚心肌细胞间连接<sup>[3]</sup>、人胚心的刺激传导系发生学的研究和人胚心肌发生的电镜研究<sup>[4,5]</sup>等一系列工作。

国内对人胚心肌细胞的研究不多, 本文报告 5 例 4 个月左右人胚心肌细胞的超微结构。

### 材料和方法

从我校附属二院妇产科获得胎儿 5 例(因手术指征而子宫切开娩出), 取材时胎心仍在跳动。胎龄均为 4 个月左右(从末次月经第 1 日计算, 实际受孕日数比 4 个月少 12—14 日, 从冠臀长度计算也只有 3 个月多一点)。

从人胚的心房和心室分别取材, 用 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双重固定, 逐级丙酮脱水, 用国产环氧树脂 618 包埋。在 LKB 超薄切片机上超薄切片, 经醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重电子染色后, 用 JEM-7 型电子显微镜, 在 50 kV 下观察和拍照。

对一部分心肌组织块, 按 Ogawa<sup>[6]</sup>方法做了电镜酶学处理, 以观察人胚心肌细胞线粒体上琥珀酸脱氢酶的分布。

### 观 察

4 个月胎儿心脏的细胞主要是心肌细胞, 心肌细胞含有肌原纤维, 但数量远少于成人心肌细胞。其突出特点是胞浆疏松, 肌原纤维数量少, 主要分布在肌膜下和核周围。线粒体数目较少, 主要分布在肌原纤维邻近。胞浆中央

有一较大的核, 其余主要被糖元和核糖核蛋白体所占据(图 1)。有时可见到粗面内质网和高尔基器(图 4)。肌浆网很少见。细胞间连接可见到桥粒(desmosome)、中间连接(fascia adherens)和缝隙连接(nexus, gap-junction)(图 3)。

核糖核蛋白体有四种存在形式: 游离、成堆、线样分布和附着于粗面内质网(图 1—2)。成堆和线样分布的核糖核蛋白体又称聚集体(polysome), 多分布在肌原纤维或肌丝附近(图 2)。

肌原纤维主要分布在肌膜下, 有时在细胞核附近也有少量肌丝或肌原纤维(图 1—4)。肌原纤维沿细胞核长轴排列(图 2), 同时由于 Z 线、A 带而呈横纹(图 2)。本文所观察的 5 例人胚心肌细胞的肌原纤维中很少见到 I 带, 更未见到 H 区和 M 线。在横切面上, 肌原纤维中粗细肌丝的排列呈典型的六角形(图 7), 和成人肌原纤维的构造相同。

线粒体数量较少, 为圆形或椭圆形, 嵴的发育差。在分布上和肌原纤维的关系虽不如成人那样密切, 但也主要出现于肌原纤维附近(图 1, 3, 5)。用电镜酶学方法证实, 此期线粒体的膜和嵴上已有琥珀酸脱氢酶出现(图 6)。

心肌细胞中存在大量糖元, 主要为散在分布( $\beta$  颗粒)(图 1—4)。

心房细胞和心室细胞结构相似, 特点是在