

低温电镜技术制备的树脂道细胞的超微结构^{*}

吴 鸿¹, 陈月琴², 杨秉耀³, Martin Müller⁴

(1. 华南农业大学生物技术学院, 广东 广州510642;

2. 中山大学生命科学学院, 广州510275;

3. 瑞士联邦苏黎士高等理工学院细胞研究所, 苏黎士 8092)

摘 要: 应用高压冷冻-冷冻替代技术研究欧洲赤松(*Pinus sylvestris*)树脂道细胞的超微结构并与传统方法进行比较, 结果证明高压冷冻-冷冻替代技术不仅可提高树脂道细胞超微结构的保存, 同时可减少树脂成分的损失. 具体表现为, 细胞膜光滑平直, 紧贴细胞壁, 细胞器饱满, 细胞质和细胞器基质更加浓厚均匀, 高尔基体具有明显极性分化, 潴泡间膜清晰. 树脂道细胞中树脂未形成浓密的黑色嗜锇滴, 而是以浅灰色绒毛状结构存在. 上述特征表明经高压冷冻-冷冻替代制备的样品, 其超微结构和组成成分的保存更接近于细胞的自然状态.

关键词: 高压冷冻, 冷冻替代, 树脂道, 超微结构

中图分类号: Q-336 文献标识码: A

生物样品在进行超微结构的研究时首先需要进行固定, 固定的目的方面为保持细胞在其自然状态下的结构及其组成成分, 另一方面使高度动态的生物结构成为固定状态, 从而具有高度的时空分辨率以适应电镜的要求. 传统的化学固定方法具有明显的缺陷. 由于化学固定剂作用时间相当慢(几秒到几分钟), 加之化学固定剂与生物样品的交联具有一定的选择性, 因此, 不但不能使细胞内所有结构得以充分固定, 而且还会引起细胞成分的转移和损失, 从而使样品形成各种假象^[1], 同时, 还会导致样品体积明显收缩^[2]. 建立在物理过程基础上的冷冻固定则具有明显的优势, 其最大的特点是快速将细胞内所有结构和成分同时固定(微秒到毫秒), 从而获得最接近于自然状态的细胞超微结构^[3]. 然而, 在常压下冷冻固定通常仅能使样品表面10~30 μm 厚的细胞层得以充分固定, 从而在较大程度上限制了冷冻固定技术的应用. 高压冷冻技术的应用克服了冷冻厚度的问题. 它可以在2100巴压力下对生物样品进行充分冷冻固定, 并使冷冻样品的厚度增加至600 μm ^[4]. 高压冷冻技术在植物样品中的应用, 揭示出许多传统化学固定方法无法捕获的结构^[2,3,4]. 从而为植物细胞学家解释细胞结构与功能的关系提供了更为充分而准确的超微结构资料.

Vassilyev(1970)利用传统的化学固定方法对欧洲赤松(*Pinus sylvestris*)树脂道细胞超微结构进行了详细报道^[4]. 本文在此基础上, 通过比较高压冷冻固定和传统化学固定方法对其树脂道细胞超微结构保存效果, 揭示出一些先前未曾报道的结构和现象, 并进一步显示高压冷冻固定技术在植物电镜样品制备中的特殊作用.

^{*} 基金项目: 国家教育部优秀年轻教师基金资助项目(9928)

收稿日期: 1999-08-30; 作者简介: 吴鸿(1963~), 男, 博士, 教授.

1 材料和方法

1.1 植物组织

实验材料于 1997 年 4~6 月采自生长于瑞士联邦苏黎士高等理工院校园的欧洲赤松栽培植物幼茎。

1.2 高压冷冻和冷冻替代

利用手动切片刀割取 200 μm 厚度的幼茎组织片, 再用直径为 2mm 的打孔器制备样品圆片, 将圆片投入盛有 1-hexadecene 溶剂的 Eppendorf 试管中, 在缓和的真空条件下抽气, 然后将样品转移至内径为 2mm, 深度为 200 μm 的圆形铝盘中, 并用 1-hexadecene 填充其内的剩余空间, 再用一平底的圆形铝盘盖严, 最后将铝盘连同样品一起放入样品夹中, 插入高压冷冻仪 (Balzer HPM010) 进行冷冻固定。经冷冻的材料可置液氮中保存或立即进行冷冻替代。冷冻替代在冷冻替代仪 (Balzer FSU010) 中进行, 替代溶液由 2% 锇酸的无水丙酮配制而成, 将盛有样品和替代液的 Eppendorf 试管分别保存于 -90, -60, -30 $^{\circ}\text{C}$, 每级 10h, 最后升温至 0 $^{\circ}\text{C}$ 保持 1h, 接着在 0 $^{\circ}\text{C}$ 用无水丙酮清洗 3 次, 每次 30min, 利用 Epon812 树脂渗透和包埋。最后在 60 $^{\circ}\text{C}$ 聚合 36h。

1.3 化学固定

利用锋利刀片将幼茎分割为 1mm $\times$ 1mm $\times$ 1mm 的小块, 迅速固定于 0.2mol/L 二甲胂酸盐缓冲液 (pH7.0) 配制的 $\varphi=3\%$ 戊二醛中, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 2h, 经缓冲液冲洗, 再用 $\rho=1\%$ 锇酸固定 2h, 蒸馏水冲洗后丙酮系列脱水, Epon812 树脂渗透和包埋。同样在 60 $^{\circ}\text{C}$ 聚合 36h。

1.4 电子显微镜

利用 Leica Reichert Ultracut E 超薄切片机切片, 醋酸铀和柠檬酸铅染色, 日本产 H-600 透射电镜观察 (电压 100kV) 并照相。

2 观察结果

在电镜下观察, 成熟树脂道上皮细胞的基本结构与其邻近的薄壁组织细胞具有一定的差异。其最明显的特征是具有大量由内质网鞘包裹的质体。质体多为球形, 结构简单, 缺乏类囊体系统, 仅具少数退化的短膜片段, 有的质体含有 1~2 个淀粉粒。另外, 在上皮细胞的细胞质和各个细胞器中, 质膜与细胞壁间以及细胞壁外的腔道中均有丰富的树脂物质存在。

通过比较高压冷冻固定和传统化学固定的树脂道上皮细胞, 发现两种固定方法在细胞超微结构的保存方面具有显著差异, 分述如下。

2.1 高压冷冻-冷冻替代

经高压冷冻固定和冷冻替代脱水的树脂道上皮细胞, 其内膜系统光滑, 平直。细胞器饱满, 细胞质和细胞器基质浓厚均匀, 细胞质中具浓密的核糖核蛋白体。质膜平直, 光滑, 紧贴于细胞壁上, 两者间无间隙 (图 1: 1, 3, 5, 7)。

质体膜和线粒体膜结构不很清楚, 内外膜紧密相连, 难以分辨, 但基质中核糖核蛋白体清晰可见 (图 1: 3, 5)。质体周围内质网鞘饱满, 与质体间具有一定的间隙。质体内淀粉粒与质体基质紧密相连, 淀粉粒周围膜片段清楚 (图 1: 3); 线粒体基粒结构可见 (图 1: 5)。高尔

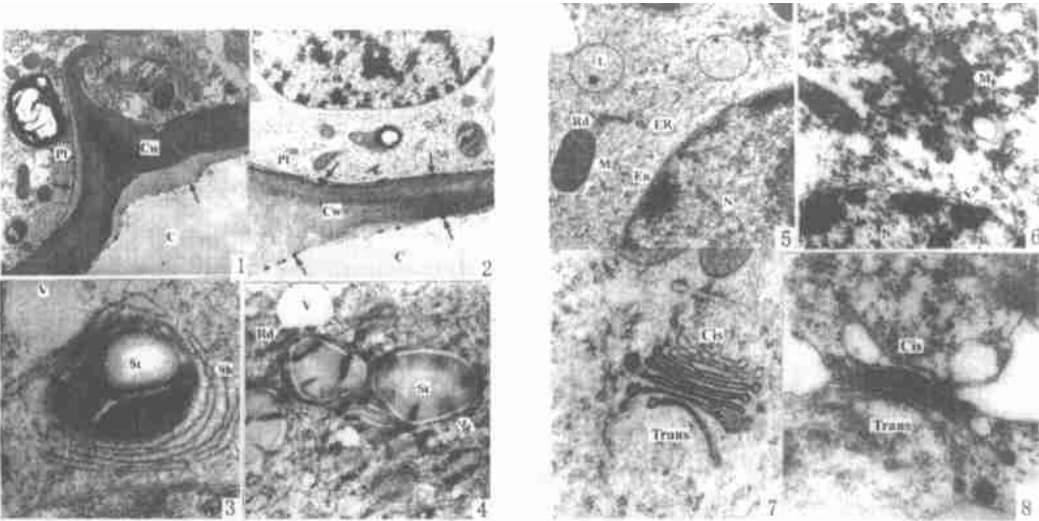


图 1 高压冷冻-冷冻替代（1、3、5、7）与常规化学固定脱水（2、4、6、8）制备的样品的超微结构

Fig. 1 Ultrastructure prepared with high-pressure freezing and freeze substitution (1, 3, 5, 7) and conventional chemical fixation methods (2, 4, 6, 8)

- 1 树脂呈灰色绒毛状（箭头所示）， $\times 4\,000$ ；2 树脂呈黑色小滴状（箭头所示）， $\times 4\,000$ ；
- 3 质体结构，示核糖核蛋白体（箭头所示）， $\times 20\,000$ ；
- 4 质体结构，示质体基质和淀粉粒间具明显的间隙， $\times 6\,000$ ；
- 5、6 线粒体和细胞核结构比较， $5\times 1\,000$ ； $6\times 1\,480$ ；
- 7 高尔基体，示潴泡间膜（箭头所示）， $\times 20\,000$ ；8 高尔基体，无极性分化， $\times 24\,000$
- 1、3、5、7 为高压冷冻-冷冻替代制备的样品；2、4、6、8 为常规化学固定脱水制备的样品
- C 树脂道腔；Gw 细胞壁；En 核膜；L 脂质体；M 线粒体；N 细胞核；
- Pl 质膜；Rd 树脂滴；ER 内质网；Sh 内质网鞘；St 淀粉粒；V 液泡

基体潴泡饱满，小泡丰富，两者均充满电子浓密物质。从形成面（*Cis*）到分泌面（*Trans*），潴泡的宽度逐渐增加，着色程度加深，形成面潴泡具较大的腔，而分泌面潴泡的两层膜相距较近，形成窄小的腔。另外，在分泌面潴泡间具有明显的颗粒物质存在（潴泡间膜）（图 1：7）。液泡呈圆球状，饱满，细胞液丰富，均匀分布（图 1：3）。核膜结构清晰，光滑，平直，周核空间具浓密物质，核质均匀细致（图 1：5）。

经高压冷冻固定的树脂道上皮细胞，其树脂密度低，着色浅，呈灰色绒毛状。由于树脂密度与细胞器基质密度近似，因此其在各个细胞器上的分布场所较难分辨（图 1：5），但在质膜和细胞壁间，以及腔道中的树脂清楚可见，成片均匀分布（图 1：1）。

2. 2 化学固定

经化学固定和常规脱水处理的树脂道上皮细胞，质膜通常发生皱褶，与细胞壁间形成明显的间隙。细胞器多呈收缩状，细胞质和细胞器基质淡薄（图 1：2、4、6、8）。

质体和线粒体收缩明显（图 1：4、6）。其中，质体膜十分模糊，其周围内质网鞘扁平，质体基质与淀粉粒间出现明显的空隙，质体基质中的膜片段结构不清（图 1：4）。线粒体内外膜结构可见（图 1：6），与高压冷冻固定的材料比较，其内外膜间距离增大。高尔基体潴泡收缩明显，各潴泡在形态结构，着色程度上无明显极性分化（图 1：8）。液泡略有收缩，呈空腔状（图 1：4）。核膜结构清晰，但明显收缩，呈皱褶状，周核空间无明

显结构存在, 但可有树脂滴分布(未显示), 核质粗糙, 不均匀(图1: 6)。

经化学固定的树脂道上皮细胞, 其树脂形成浓密的黑色小滴, 在电镜下容易分辨(图1: 2, 4)。

3 讨 论

3.1 高压冷冻-冷冻替代和化学固定-常规脱水对细胞超微结构的影响

生物的结构通常向着节省, 高效方向演化发展。平直、光滑紧贴于细胞壁上的质膜对于细胞内外物质的转移和运输必定较皱褶并与细胞壁分离具间隙的膜结构更为直接有效。同样, 质体中淀粉粒与质体基质间紧密的连接, 对于淀粉的积累和分解利用提供了基本保证, 相反, 淀粉粒与质体基质间具有空气层必定会影响相关的生理生化反应, 甚至很难解释相关的酶和淀粉是如何通过空气层来转运的。因此, 上述间隙的出现应该是化学固定及脱水过程中化学试剂将细胞质, 质体基质抽提和改变细胞渗透性所致。同样淡薄的细胞质, 细胞器基质, 空腔的液泡以及收缩的细胞器也是由此引起。至于经高压冷冻固定样品的质体和线粒体膜结构分辨率低的现象先前已有报道^[7], 解决问题的关键是改进冷冻替代和后固定程序以提高膜的着色程度。经高压冷冻固定的高尔基体, 表现出明显的极性。从其发生上看, 高尔基体来源于内质网, 因此, 形成面结构应相同于内质网的结构, 经过中央过渡区演变为分泌面结构, 由于分泌面所生产的小泡最终均与质膜结合, 其结构应相同于质膜。从其功能上分析, 高尔基体的形成面可能较少参与多糖的合成, 中央过渡区和分泌面为多糖的主要合成场所。因此, 高尔基体结构的极性是由其发生方式和功能分化决定的。高尔基体为活跃而动态的细胞器, 正是高压冷冻具有迅速将细胞内所有结构和成分同时固定的特点, 才使得这种极不稳定而瞬时即变的膜结构得以捕获^[3]。而化学固定所获得的无明显差异的高尔基体结构是其缓慢的固定速度所引起的假象。研究结果支持 Kaneko 和 Walther (1995) 指出的应用高压冷冻-冷冻替代技术所捕获的结构较化学固定更接近于细胞生活状态的结论^[7]。

3.2 高压冷冻-冷冻替代和化学固定对树脂的影响

树脂道产生的树脂属于脂类物质, 可以被钨酸固定形成嗜钨滴^[8]。化学固定的树脂道上皮细胞, 其树脂通常浓缩为小滴状, 经1%钨酸固定形成明显的黑色嗜钨滴, 在电镜下非常容易观察。因此, 有利于树脂合成场所的分析研究。高压冷冻固定的材料, 即使使用2%钨酸后固定, 树脂仍表现为浅灰色绒毛状结构, 尽管它们大量分布于质膜外及腔道中, 但其在细胞器中的分布较难观察。

由于化学固定剂与生物结构的交联具有一定的选择性, 不但不能使细胞内所有结构得以充分固定, 而且还会引起细胞成分的转移和损失^[1]。当戊二醛与蛋白质交联期间, 树脂并未受到固定, 此间树脂在形态上甚至组成成分上都会发生变化, 同时, 部分树脂成分可能被抽提。最后钨酸固定的树脂形态只是经过变化了的保留的部分, 以至形成具有较高电子密度的黑色嗜钨滴。尽管其形态特殊易于观察, 但却不能反映树脂的真实形态。而高压冷冻固定可以迅速将树脂道细胞内所有结构和成分同时固定, 因此树脂的形态和组成成分几乎没有发生任何变化。由此可见, 高压冷冻固定所捕获的树脂形态最接近于其在细胞内的自然状态。高压冷冻-冷冻替代过程中所捕获的树脂为何形成电子密度较低的形态? 我们认为过度的低温可能影响了树脂与钨酸的亲合力。在此情况下, 提高树脂与钨酸的亲合

力是解决问题的关键。当然选择免疫细胞化学标记显示树脂的分布则更为科学合理。

综上所述, 高压冷冻-冷冻替代技术在保存细胞的结构细节和组成成分方面具有化学固定所无法替代的优势。但化学定固简单, 廉价的特点使其依然实用。而且两种技术的结合使用, 将更有利于对细胞结构和特殊成分进行精细分析和合理解释。

参考文献:

- [1] GILKEY J E, STAEHELIN L A. Ultrarapid freezing for the preservation of cellular ultrastructure [J]. J Electron Microsc Techn, 1986 (3): 177~210.
- [2] ZHU J, WANG J, HUA Z J, et al. Ultrastructure of vegetative cell of *Nostoc flagelliforme* prepared by high pressure freezing and freeze substitution [J]. 植物学报, 1998, 40: 901~906.
- [3] STAEJELIN L A, GIDDINGS T H, HEPLER P K, et al. Macromolecular differentiation of Golgi stacks in root tips of *Arabidopsis* and *Nicotiana* seedlings as visualized in high pressure frozen and freeze-substituted samples [J]. Protoplasm, 1990, 157: 75~91.
- [4] MÜLLER M, MOOR H. Cryofixation of thick specimens by high pressure freezing [A]. In: REVEL J P, BARNARD T, HAGGIS G. The science of biological specimen preparation [M]. Chicago: SEM, AMF O' Hare, 1984. 131~138.
- [5] WU H, MÜLLER M. An alternative mode of elimination of resin from epithelial cells of resin ducts in *Pinus tabulaeformis* [J]. 植物学报, 1994, 41: 133~135.
- [6] VASSILYEV A E. On the localization of the synthesis of terpenoids in the plant cell [J]. Rustitelni Resursi, 1970, 60: 29~45.
- [7] KANEKO Y, WALTHER P. Comparison of ultrastructure of germinating pea leaves prepared by high-pressure freezing freeze substitution and conventional chemical fixation [J]. J Electron Microsc, 1995, 44: 104~109.
- [8] FAHN A, BENAYOUN J. Ultrastructure of resin ducts in *Pinus halepensis* development, possible sites of resin synthesis, and mode of its elimination from the protoplast [J]. Ann Bot, 1976, 40: 857~863.

Ultrastructure of Resin Duct Cells of *Pinus sylvestris* Prepared with High Pressure Freezing and Freeze Substitution Technique

WU Hong^{*}, CHEN Yue-qin, YANG Bing-yao, Martin Müller

Abstract: Ultrastructure of resin duct cells of *Pinus sylvestris* was investigated with high-pressure freezing (HPF) and freeze substitution (FS) and compared with the results of conventional chemical fixation methods (CF). With HPF-FS method, plasma membranes were very smooth and appeared as straight lines closely appressed to the cell wall. On the contrary, plasma membranes were often undulated and there was some space between the cell wall and the plasma membrane in CF samples. The organelles appeared turgid, matrices of cytoplasm and organelles were denser and more homogeneous distributed in HPF-FS samples. The Golgi apparatus exhibited prominent differences in morphology and stainability from Cis to Trans face in HPF-FS compared to CF, intercisternal elements were visualized in HPF-FS specimens. Resin was often found to concentrate into small dark osmiophilic droplets with high electron density with CF, but with HPF-FS, resin appeared as greyish osmiophilic material of lower electron density in floccule shape. These features implied that HPF-FS samples retained more substances and improved preservation of ultrastructure closer to native state.

Keywords: high-pressure freezing; freezing substitution; resin duct; ultrastructure

^{*} College of Biotechnology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China