

酵母线粒体生物发生的一些电镜观察

中国科学院生物物理研究所线粒体研究小组

一般认为,一个细胞内线粒体的来源,可以有多种途径。在细胞分裂时,线粒体同时大致相等地分摊到每个子细胞中去;在细胞不进行分裂的时候,线粒体本身可以一分为二进行增殖。线粒体生物发生还可以通过新生合成(*de novo*)或由前线粒体逐步发育形成结构完整的线粒体;或由细胞内其它膜结构来形成。我们通过对酵母细胞的电镜观察,发现一种以前未被描述过的由核膜与线粒体膜向外延伸出的膜状结构,它们可能标志线粒体生物发生两种可能途径的某些阶段。

材料与方 法

所用材料系由中国科学院微生物所提供的二倍体酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 2982 菌株。培养和形成酵母球形体的条件如下:无机盐培养基加入 1% 葡萄糖作碳源,28℃ 温箱内静置培养 18 小时,3000 转/分离心 10 分钟收集酵母,并用蒸馏水洗涤两次。称取 200 毫克湿重的酵母,加入 2 毫升 0.5M 巯基乙酸钠-0.1M Tris-HCl 缓冲液(pH9.3)于 30℃ 保温 15 分钟;离心后的酵母用 1.2M 山梨醇洗两次。然后用蜗牛酶消化细胞壁(0.8 毫升的 0.9M 山梨醇,加入 8 毫克蛋白的蜗牛酶,30℃ 保温 30—40 分钟),俟 80% 以上酵母变成球形体后,3000 转/分离心 10 分钟,倾去上清液,沉淀用 1.35M 山梨醇、1.0mM EDTA、10mM 柠檬酸磷酸缓冲液(pH5.8)洗两次。固定于 2.5% 戊二醛-过氧化氢(pH5.8 磷酸缓冲液)1.5—2 小时,经含 10% 蔗糖的 0.1M 磷酸缓冲液洗涤后,再固定于 1% 锇酸(0.1M 磷酸缓冲液,pH7.2)1.5—2 小时,用含 10% 蔗糖的 0.1M 磷酸缓冲液洗涤,上行逐级酒精脱水,然后经环氧丙烷丁

基醚(即环氧树脂 501)处理 15 分钟,最后包埋于环氧树脂 6101。包埋块用玻璃刀切片,用 50% 酒精的饱和醋酸双氧铀和 Reynolds 柠檬酸铅染色,JEM-7 电子显微镜观察。

有时样品经锇酸固定后,用 2% 醋酸双氧铀(巴比妥-醋酸盐-盐酸缓冲液,pH7.2)整体染色过夜再脱水包埋。

结 果

固定效果概述

经戊二醛、锇酸固定的酵母球形体,一般可以看到有两种类型的线粒体:一种是内部结构发育较差,缺乏嵴;另一种是结构较完整。线粒体膜、核膜一般呈现阴性反差。细胞质核蛋白体颗粒保存较好,呈现出大小为 160—200 埃的电子不透明颗粒。经醋酸双氧铀作整体染色的细胞,核膜、线粒体膜则为阳性反差。

线粒体膜向外延伸的表征

正如图 1、图 2(见铜版 I, 1—2)中所看到的,线粒体膜向细胞质延伸出一种膜状结构,它们经戊二醛和锇酸固定后呈现出阴性反差的图型。中间为一条电子密度较大的黑线(约 270 埃大小),而其两侧则为两条电子透明的白线(约 270 埃大小)。在某些部位,可以辨别出延伸结构,每条白线系由中间为黑颗粒排列的三层膜结构,每一层膜的结构为 60—80 埃(见图 2 箭头),这与线粒体嵴的三层膜(每层约 60—80 埃)是相一致的。在线粒体延伸结构的基部,两条白线分开较远,然后逐渐靠拢并成为总厚度约 270 埃的膜状结构。从延伸结构的基部可以看出,它是由线粒体内外膜同时平行向外延伸;而不是象 Bracker 等人(1971)所描述的那种仅仅为外膜与内质网连接,其内膜呈封闭状

态的图型。在延伸结构的远端,连接着一个比较小的线粒体,它的内外膜跟延伸出的膜结构在结构上也是连续的。换言之,延伸结构与两端的线粒体的基质是沟通的。图2中所看到的延伸结构远端的线粒体具有明显的嵴,图1中所看到的这种结构模糊一些,但内部也可以看到具有一定的结构。

图3(见铜版I,3)所看到的是另一种类型的线粒体向外延伸出膜状结构的情形,它的厚度也与上述的相当,但上述的黑线状的空间则代之以尺寸较大的具有较多结构的空间,其内容物与线粒体内部是沟通的。其基部有许多象“根系”一般的微丝长入线粒体内部,而延伸结构远端则未见有膨胀成线粒体那样的结构,末端也没有明显的膜所包被,而是好象一束并排的微管一样的结构,看来在一定程度上,它的末端是开放的。

细胞核膜向外延伸的表征

正如图4(铜版II)所看到的,细胞核膜也可以看到上述那种延伸结构。它是由一条黑线(约200埃)所分开的两条白线(约250埃)共同组成的。在某些部位也可看到每条白线是由亮、暗、亮的三层膜所构成,其厚度分别是90埃、60埃和90埃。这些膜结构与核膜也具有连续性(见图5(铜版II)箭头)。在核膜延伸结构末端也有一个膨胀部分,其内部也具有线粒体嵴样的结构,这种轮廓可能是线粒体生物发生某一阶段所具有的结构形态。核膜延伸结构的长度达0.3微米。

讨 论

这里描述的延伸结构,如果从静止的观点去看,其意义可能是微不足道的;若从发展的、动态的观点去考虑,则它可能蕴藏着一定的生物学意义。这些延伸结构可能反映了具有不同功能的细胞结构间的相互关系,暗示着线粒体、细胞质、细胞核之间有着一种结构与功能上的复杂关系。这些延伸结构可能代表着以不同方式形成的新生线粒体的一定阶段。

核膜与线粒体膜在结构、功能上具有很大

的差异,这是公认的事实。但最近也有证据表明,大鼠脑细胞的核膜也具有对氰化物敏感的氧化磷酸化作用和腺三磷酶的活性。如果酵母细胞也是如此,那么其线粒体膜来源于核膜也并不是不可能的。Stang-Voss等人(1970)根据他们的电镜观察也认为线粒体膜可以由细胞核外膜形成。

许多研究者都指出,线粒体不可能合成它自己的全部组分。线粒体合成蛋白质和磷脂的能力都是很有限的。据估计,它们只合成线粒体全部蛋白的5%左右或线粒体膜蛋白的10—15%(Sager 1972),某些磷脂系在内质网合成,然后运到线粒体中(Jungalwala & Dawson 1970)。线粒体合成它的组分时既依赖于线粒体本身的合成系统,也依靠着细胞核-细胞质。有些研究者指出,线粒体发生具有两个时相,首先是合成细胞质蛋白质,在此过程中,同时合成线粒体内膜的可溶性蛋白和线粒体复制机构的酶系;然后再合成线粒体内膜的其余蛋白质,在此过程中,由线粒体本身合成的结构蛋白去构合其余所有的膜蛋白。在第一阶段中,线粒体的呼吸能力,以及细胞色素氧化酶、细胞色素b、c迅速增加,形态上也开始发生一些变化。然后线粒体蛋白质合成才旺盛起来,形态上渐趋完善,形成嵴。Henson(1968)推断酵母线粒体基质的各种可溶性酶以及某些内膜蛋白是由细胞核编码,而细胞质合成;当酵母细胞去葡萄糖阻遏时,这些蛋白质才逐个地从内质网输送到线粒体中。

综上所述,可以归纳两点:第一,线粒体的生物发生是细胞核-细胞质-线粒体系统相互作用的复杂过程;第二,线粒体的装配、组合是分阶段的,是一个结构上从简单到复杂、物质上由少到多的累积和组合的过程。我们的电镜观察结果可能在一定程度上反映了线粒体生物发生的这两个侧面,说明细胞核-细胞质-线粒体系统间的复杂关系,表明线粒体可能通过细胞核膜或原有的线粒体膜向外凸起延伸而逐步形成。延伸结构的远端开始有一阶段可能是开放的或半开放的,这样可以使线粒体合成的组分

(下转第62页)

外,尚广泛地用来探讨在止血和血栓形成中起着重大作用的血小板的表面电荷和表面分子结构与血小板的粘附和凝集的关系;了解各种物理因素、各种化学物质和药物、代谢抑制剂和代谢产物等对血小板的表面电荷和表面分子结构的影响,以及阐明存在于血小板表面上的各种活性化学基团,其中主要是巯基($-SH$)和磷酸基($-OPO_3H^-$)在血小板的粘附和凝集中的作用。

结 束 语

综上所述,近十余年来,由于深入研究细胞表面的结构和功能的需要,细胞电泳不论在测量装置和测定方法的改进及其应用范围的扩大方面,均取得了较快的进展。目前,它已开始深入到生物学和医学研究的更多领域中,成为从分子水平上探讨细胞表面在各种生命活动中的作用的有力武器。

由于细胞电泳技术能够使细胞处于完整无损的自然状态下进行研究,而且可在正常状态和病理状态以及机体的免疫状态下对细胞作出鉴定,从而来诊断疾病和判断药物的疗效,这就

为细胞电泳技术在医学临床中的应用开辟了广阔的前景。但是,直到目前为止,细胞电泳技术在应用上,尚局限于一般生物学的实验研究上,在医学临床中的应用尚不够广泛,仅处于开始的阶段。这主要是由于细胞电泳的测量装置比较复杂、制作比较困难、样品用量大、影响因素比较多、操作比较烦、不易掌握以及数据分析复杂费时的缘故。由此可见,进一步改进细胞电泳技术的测量装置和测定方法,使它成为诊断和防治疾病以及病因学研究的有力工具,也是促使生物物理学密切结合医学临床实践的一个重要方面,同时也是摆在生物物理工作者以及临床工作者面前的一项重要任务。

参 考 资 料

- [1] Тарусов, В. Н.: *Практикум по общ. биофизике*, 1, 1959.
- [2] Piper, W.: *Acta Haemat.*, 18, 414, 1957.
- [3] Eylar, E. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 237, 1962, 1962.
- [4] Seaman, G. V. F.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 493, 1963.

[本文于 1974 年 11 月 1 日收到]

(上接第 28 页)

能做进一步的分析。本文用 HA 柱层析直接分离大肠杆菌溶菌物,不但能获得较纯的 DNA,而且分离开来的 RNA 及蛋白质还可以进行测定及进一步的分析。例如不同浓度 KPB 洗脱峰的蛋白质经透析浓缩后可以进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,便于研究各种蛋白质与 DNA 的亲合程度,与 DNA 复制的关系等。此外,从放射性同位素标记前体培养的细菌中可以分离获得放射性标记的 DNA。如用放射性同位素标记的 RNA 或蛋白质前体培养细菌,亦能分

离出放射性标记的 RNA 或蛋白质。对于进行 DNA 复制的调节控制研究提供了有利条件。有关这方面的工作正在进行中。

参 考 资 料

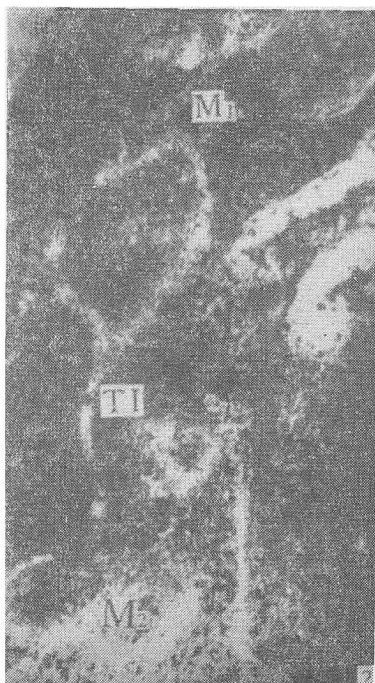
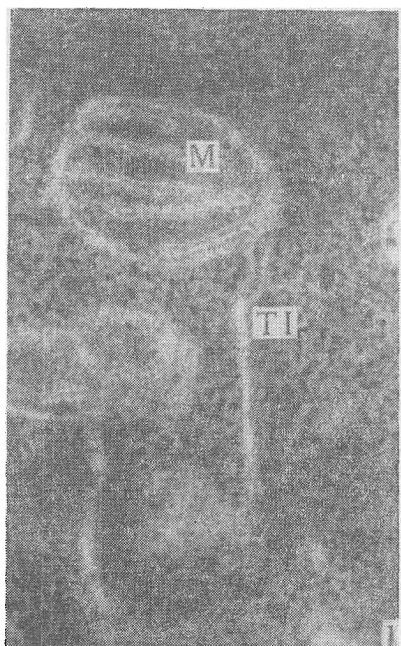
- [1] Richards, G. M.: *Anal. Biochem.*, 57, 369—376, 1974.
- [2] Schneider, W. C.: *Methods in Enzymology*, 3, 680—681, 1957.
- [3] Meibaum, M.: *Z. Physiol. Chem.*, 258, 117, 1939.
- [4] Lowry, O. H., et al.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265—275, 1951.

[本文于 1975 年 3 月 29 日收到]

(上接第 30 页)

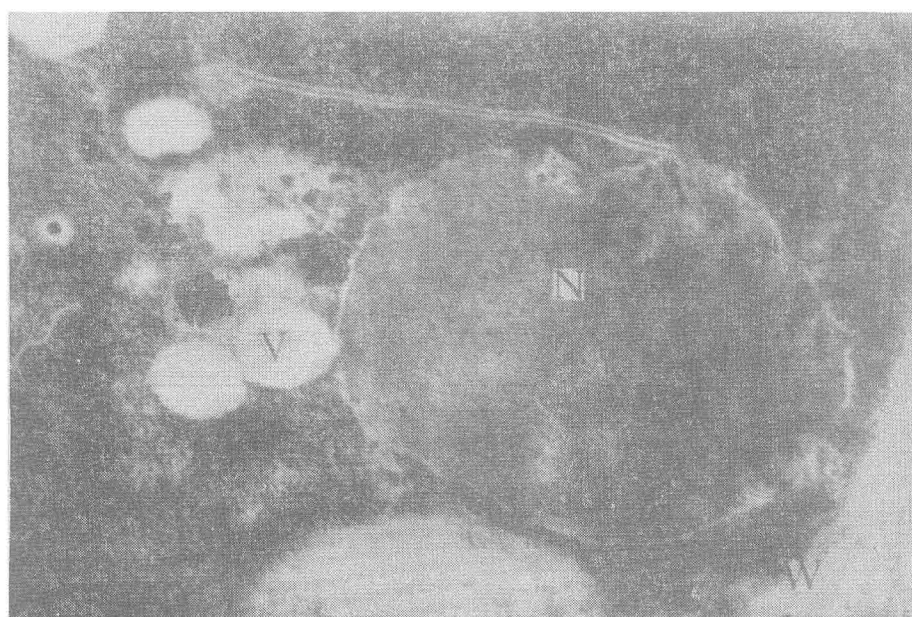
(如结构蛋白等)与细胞核、细胞质的合成产物得以迅速起作用。换言之,延伸结构的末端可能象是一个“船坞”,在这里通过核-质-线粒体

系统的协同作用,逐步装配成一个新的线粒体。这种假说还需通过生物化学、细胞化学等方面的研究加以验证。



铜 版 I

图 1 和图 2 酵母细胞线粒体(M_1)凸出的小管,其末端扩大形成一个较小的线粒体(M_2)。图 2 中所连接的线粒体(M_2)明显地存在着嵴。图 1 放大 $\times 45,000$,图 2 放大 $\times 74,000$
图 3 同图 1 和图 2。从照片可以看到线粒体延伸出的膜状结构与线粒体内、外膜连续的情形,但末端没有看到膨大的部分。放大倍数为 $\times 70,000$,嵌在右下方的为 $\times 35,000$



铜版 II

图 4 酵母另一种类型线粒体(M)凸出的小管,它的管腔较大,管中的内容物与线粒体的内容物是沟通的。其末端稍稍开始有一点扩大。 $\times 84,000$

图 5 从酵母细胞核引出一个细长的管子,末端具有一个线粒体样结构,内部具有嵴样结构。 $\times 35,000$ N—细胞核; W—细胞壁; V—空泡