

# 绿色杜氏藻被膜泡囊的超微结构研究\*

黄晓航 张小庆 吴超元

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

Alfsen Annette

(Laboratoire d'Etat's Iles Moleculaires. C. N. R. S. France, Paris, 75006)

**提要** 于1990年5月—1991年5月,运用透射电镜观察绿色杜氏藻,对该藻被膜泡囊的形态结构及其在细胞内的分布和形成过程进行研究。观察表明,绿色杜氏藻细胞的高尔基体和细胞膜附近有许多大小不等的被膜泡囊;这些被膜泡囊由泡囊及其表面的网状结构构成,其直径在45—120nm之间;在细胞膜附近的被膜泡囊直径较大;在高尔基体和细胞膜上还观察到被膜泡囊的形成过程。结果提示:在处于指数生长期的绿色杜氏藻细胞中,被膜泡囊起着细胞内大分子物质运输的作用。

**关键词** 绿色杜氏藻 被膜泡囊 藻类 电镜

**学科分类号** Q336

被膜泡囊 (coated vesicle), 又称被膜小泡、内吞小泡, 是从真菌类、藻类到哺乳动物类的各种真核细胞中的一种亚细胞结构。20多年来, 有关被膜泡囊的形态结构、生化组成、生理功能, 特别是与其有关的受体介导的内吞作用 (receptor mediated endocytosis) 的研究, 一直是国际上细胞与分子生物学十分活跃的研究领域。目前的研究结果表明, 被膜泡囊参与了动物细胞内物质运转、质膜循环、大分子物质 (包括病毒、激素和抗体等) 出入细胞等过程。但是被膜泡囊在植物细胞, 特别是在藻类细胞中的作用仍不甚明了。目前, 国内对动植物细胞的研究中仅有少数报道涉及到被膜泡囊 (国风利等, 1991; 吴谷盛等, 1987; 曾弥白等, 1987)。在以藻类为材料的研究方面, 尚无有关这一细胞器的形态结构或是生理功能方面的研究报道。本文报道绿色杜氏藻被膜泡囊的超微结构及其在细胞内的分布与形成过程, 探讨被膜泡囊在藻类细胞内可能的生理功能, 以期在亚细胞水平上加深对藻类细胞的结构及其生理功能的认识, 为藻类养殖和藻类资源综合利用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

试验于1990年5月—1991年5月进行。绿色杜氏藻 (*Dunaliella viridis* Teod) 由本所微藻培养实验室提供。藻细胞在500ml三角瓶中培养。培养液采用微孔过滤膜过滤海水加入陈椒芬等 (1987) 培养基加富而成。培养条件: 光照度为5 000lx, 每日照光12h; 培养温

\* 国家自然科学基金资助项目, 39070448号; 中法合作研究项目。黄晓航, 男, 出生于1949年5月, 博士, 副研究员, 现在Department of Physiology, University of Toronto, Canada, E-mail: xiaohang.huang@utoronto.ca

收稿日期: 1997-02-07, 收修改稿日期: 1998-04-05

度为  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , 使藻细胞数量达到  $2.5 \times 10^6 \text{ cell / ml}$ 。

## 1.2 电镜观察

取上述处于指数生长期的藻细胞, 以  $1\ 000\text{r / min}$  转速离心 10min 后收集, 用消毒海水洗干净, 用 3% 戊二醛固定 12h; 经  $0.2\text{mol / L}$  磷酸缓冲液 ( $\text{pH} = 7.4$ ) 冲洗后用 1% 锇酸固定 2h。固定后的藻细胞经逐级乙醇脱水后, 用 Epon 树脂包埋, 待充分聚合后切片。用双重染色法对样品切片染色。即用醋酸铀染色 30min 后, 再用柠檬酸铅复染 10min。用日立 H500 透射电子显微镜对样品进行观察。工作电压为 80kV。

## 2 结果

透射电镜观察结果显示, 绿色杜氏藻细胞表面缺乏细胞壁, 为细胞膜结构。细胞内可以清楚地观察到细胞核、线粒体、质体、高尔基体、内质网和液泡等亚细胞结构。所观察的细胞内都有多个由层叠潴泡构成的高尔基复合体 (G) 和一些散在分布的分散型高尔基体 (D)。在高尔基复合体层叠状潴泡末端 (图版 I: 1) 和分散型高尔基体 (图版 I: 2) 附近, 可以观察到许多被膜泡囊。泡囊为球形, 呈单位膜结构, 泡囊表面有电子密度大的颗粒状突起形成被膜。泡囊的大小不等, 其直径连同被膜在内大约在  $45\text{—}72\text{nm}$  之间。有的被膜泡囊正由高尔基复合体层叠状潴泡末端形成, 有的已经脱离潴泡末端, 成为独立的被膜泡囊 (图版 I: 1)。有的分散型高尔基体潴泡末端具有与被膜泡囊相似的电子密度大的颗粒状突起, 提示高尔基体和被膜泡囊二者之间有着结构上的内在联系 (图版 I: 2)。

在细胞膜附近, 也可以观察到被膜泡囊。这些被膜泡囊在体积上大于在高尔基体附近的被膜泡囊, 泡囊外缘包被明显, 泡囊及其包被直径大约在  $65\text{—}120\text{nm}$  之间。在许多细胞内, 还可以清楚地观察到被膜泡囊在细胞膜上的形成过程。由图版 I: 3—5 可见, 这一过程始于细胞膜向内凹陷形成陷窝, 在陷窝的细胞质一侧由电子密度大的颗粒状突起形成包被, 由包被和陷窝形成所谓被囊窝 (coated pits) 结构 (图版 I: 3)。而后被囊窝的内陷程度逐渐加深, 被囊窝细胞质一侧的颗粒状包被也更加明显, 被囊窝已几近形成泡囊结构 (图版 I: 4), 最后内陷的被囊窝合拢, 脱离细胞膜。表面完全被颗粒状突起包被, 形成游离于细胞质内的被膜泡囊 (图版 I: 5)。

绿色杜氏藻细胞内被膜泡囊主要集中在高尔基体和细胞膜附近, 其他亚细胞结构附近没有明显观察到被膜泡囊的存在。

## 3 讨论与结语

绿色杜氏藻被膜泡囊具有典型的球形泡囊及其颗粒状包被, 其形状一致, 大小在  $45\text{—}120\text{nm}$  之间, 主要分布在高尔基体和细胞膜附近。这些特点与 Ockleford 等 (1980) 报道的其他一些藻类的被膜泡囊的特点是相同的。这些藻类包括绿藻中的黄群藻 (*Synura*)、鼓藻 (*Micrasterias*)、轮藻 (*Chara*), 黄藻中的气球藻 (*Botrydium*), 金藻中的定鞭金藻 (*Prymnesium*) 等。此外, 绿色杜氏藻被膜泡囊的形态结构特点与已报道的高等植物细胞被膜泡囊 (van der Valk *et al*, 1981; Hawes *et al*, 1989) 的特点也是相似的。Ockleford 等 (1980) 指出, 藻类中还有另一类被膜泡囊。这种被膜泡囊多数呈椭圆形, 胞囊外也有颗粒状包被, 但其体积较大, 而且形状变化也较大。这一类被膜泡囊主要分布在某些种类的单胞藻的收缩泡附近, 如毛枝藻 (*Stigeoclonium*) 游孢子的大收缩泡附近。绿色杜氏藻的被膜泡囊与这一类被膜泡囊的形态结构有着显著的不同。

动植物细胞的高尔基体周围是经常观察到被膜泡囊的区域。高尔基体是细胞多糖合成和对蛋白质进行修饰与分泌的场所。近年来的研究认为,被膜泡囊应是高尔基复合体的一部分。Mollenhauer 等(1994)指出,被膜泡囊的功能之一是在高尔基体的不同部位之间进行物质传递与膜循环,并在高尔基体分泌过程中输送大分子物质的。

van der Valk 等(1981)认为,高等植物细胞的被膜泡囊,可能参与了细胞壁的形成过程。这不仅因为被膜泡囊存在于分泌作用的高尔基体附近,而且还因为当细胞分裂形成细胞板或是由原生质体形成细胞壁的过程中,常常可以观察到大量的被膜泡囊出现在细胞板或是新生细胞壁附近。运用组织化学等手段所作的研究表明,被膜泡囊有可能携带细胞壁多糖及其前体,以及携带同细胞壁形成有关的葡聚糖合成酶等酶类(Hawes *et al.*, 1989)。这些结果提示:在高等植物细胞内,被膜泡囊在将物质由高尔基体到细胞壁的运送过程中,即细胞的外排作用(exocytosis)中起作用。在以藻类为材料的研究中,Ockleford 等(1980)列举了多种藻类,其高尔基体附近都可以观察到被膜泡囊。作者认为,这些被膜泡囊可能参与了细胞多糖与蛋白类物质的分泌与输送过程,即将物质由高尔基体输送到藻细胞表面,以形成细胞壁或是细胞表面鳞片状结构。这表明,被膜泡囊在藻类细胞中的作用可能与其在高等植物细胞中的作用是相同的。据此推测,被膜泡囊在绿色杜氏藻细胞中可能与输送高尔基体分泌的多糖和蛋白质等大分子物质到细胞膜有关。应用高等植物细胞和原生质体为研究材料,Griffing 等(1985)和 Tanchak 等(1984)发现了植物细胞可以象动物细胞一样,通过内吞作用(endocytosis)使铁蛋白和过氧化物酶等标记物质进入细胞。这些研究证实,高等植物中存在内吞作用并同时证实被膜泡囊参与了这一过程。Hubner 等(1985)也发现,在高等植物细胞的内吞过程中,不仅大分子物质可以通过细胞膜上由被囊窝内陷形成的被膜泡囊进入细胞,而且小分子物质也可以吸附在细胞表面,进而通过这一途径进入细胞。在本试验中,绿色杜氏藻细胞膜附近观察到许多处于不同形成阶段的被囊窝和脱离了细胞膜而游离于细胞质中的被膜泡囊。由于受研究手段的限制,目前尚无法确定这些被膜泡囊是参与了外排作用还是参与了内吞作用。但比较肯定的是,细胞膜附近的被膜泡囊可能参与了细胞内外的物质交换过程。

对绿色杜氏藻被膜泡囊的研究还发现,细胞膜附近的被膜泡囊与高尔基体周围的被膜泡囊大小不同。这表明,这两类被膜泡囊可能有着结构组成上的差异。Griffing 等(1985)和 Tanchak 等(1984)对大豆细胞和原生质体被膜泡囊的研究中也注意到这一现象。Rothman 等(1996)对动物细胞被膜泡囊所作的研究发现,高尔基体周围的被膜泡囊和细胞膜附近的被膜泡囊有着不同的生化组成。前者具有非笼蛋白包被(non-clathrin),而后者具有笼蛋白包被(clathrin)。至于绿色杜氏藻细胞内不同部位的被膜泡囊是否有这种生化组成上的差异,还需要作进一步的研究。

**致谢** 王军、谢家琳同志参加了电镜样品的制备和电镜操作工作,谨志谢忱。

## 参 考 文 献

- 吴谷盛 鲍璇, 1987. GMI 介导的体外培养神经元对 CT-HRP 的内吞. 实验生物学报, 20(1): 89—99
- 陈椒芬 潘永尧, 1987. 等鞭藻的生长及其主要营养成分的研究. 海洋与湖沼, 18(1): 89—99
- 国风利 邵宗泽, 1991. 矮生菜豆胚乳细胞形成时的超微结构研究. 实验生物学报, 24(1): 1—7
- 曾弥白 周美云, 1987. 内吞作用与胚胎诱导. 实验生物学报, 20(1): 101—107
- Griffing L R, Fawke L C, 1985. Cytochemical localization of peroxidase in soybean suspension culture cells and protoplasts: Intracellular vacuole differentiation and presence of peroxidase in coated vesicles and multivesicular bodies. *Protoplasma*, 128: 22—30
- Hawes C, Coleman J, Evans D *et al.* 1989, Recent advances in the study of plant coated vesicles. *Cell Biol Internal Reports*, 13: 119—128
- Hubner R, Depta H, Robinson D G, 1985. Endocytosis in maize root cap cells: Evidence obtained using heavy metal salt solutions. *Protoplasma*, 129: 214—222
- Mollenhauer H H, Morre D J, 1994. Structure of Golgi apparatus. *Protoplasma*, 180: 14—28
- Ockleford C D, Whyte A, 1980. Coated Vesicles. Cambridge: Cambridge University Press. 55—68
- Rothman J E, Wieland F T, 1996. Protein sorting by transport vesicles. *Science*, 272: 227—234
- Tanchak M, Griffing L, Mersey B *et al.*, 1984. Endocytosis of cationised ferritin by coated vesicles of soybean protoplasts. *Planta*, 162: 481—486
- van der Valk P, Fawke L C, 1981. Ultrastructural aspects of coated vesicles in tobacco protoplasts. *Can J Bot*, 59: 1 307—1 313

## ULTRASTRUCTURAL STUDY OF COATED VESICLES IN *DUNALIELLA VIRIDIS* TEOD

HUANG Xiao-hang, ZHANG Xiao-qing, WU Chao-yuan

(*Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

Alfsen Annette

(*Laboratoire d'Etat's lies Moleculaires, C. N. R. S. France, Paris, 75006*)

**Abstract** Ultrastructural study was conducted on coated vesicles, their distribution and formation in *Dunaliella viridis* Teod in the algal physiology laboratory of the Institute of Oceanology from May 1990 to May 1991. Cells were cultivated under the light of 5000lx(12h:12h) and at the temperature of  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  until an exponential growth phase was reached. They were collected and fixed with 3% glutaraldehyde and 1%  $\text{O}_3\text{O}_4$  in 0.2mol/L phosphate buffer (pH = 7.4), dehydrated through ethanol series and embedded in Epon resin afterwards. Sample sections were poststained with uranyl acetate and lead citrate and observed in a Hitachi 500 transmission electron microscope at 80kV. The result shows that coated vesicles were spherical and covered with electron dense granules. They were present in large numbers and closely associated with golgi cisternae and dictyosome (Plate I:1-2). Their sizes ranged between 45-72nm in diameter. Some coated vesicles were budding from or laying near these structures. The similar electron dense granules at the end of the cisternal margins strongly suggest an intrinsic relation between Golgi apparatus and coated vesicles. At the vicinity of plasma membrane, coated vesicles were also observed. They were larger than those associated with Golgi apparatus and their sizes were 65-120nm in diameter. On the plasma membrane, parts of the membrane invaginated towards the inside of the cell and formed coated pits (Plate I:3). These pits were also surrounded by electron dense granules at the cytosolic side of the membrane (Plate I:4). With the deepening of the invagination, the coated pits were gradually dissociated with plasma membrane and electron dense granules completely covered the surface of the membrane vesicles. In this way, a coated vesicle was formed into the cytoplasm (Plate I:5). Preliminary results indicate that the coated vesicles may play a role in intracellular traffic of macro molecules and exchange of material across the plasma membrane in these cells.

**Key words** *Dunaliella viridis* Teod Coated vesicle Algae Electron microscope

**Subject classification number** Q336