

# 番木瓜乳管结构及木瓜蛋白酶的免疫电镜研究\*

曾 英 季本仁 余 兵

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

## 摘 要

采用免疫细胞化学方法, 以透射电镜观察, 对番木瓜(*Carica papaya* L.) 乳管分化及木瓜蛋白酶生成的超微结构环境进行了研究。实验结果表明: 1. 正在分化的乳管细胞内质网分泌旺盛, 线粒体和聚核糖体非常丰富; 之后细胞器逐渐解体, 内质网断裂、膨胀, 细胞壁多处穿孔; 经过内膜系统的重新组合, 成熟乳管被小泡充满, 小泡内有无定形物质凝聚, 已经没有任何细胞器残留, 但原生质膜一直存在。2. 经过纯化的兔抗 chymopapain IgG 为第一抗体, 羊抗兔 IgG-金复合物(10 nm 直径)为间接抗体, 进行适当的免疫标记反应, 发现金颗粒主要在乳管细胞内, 附近的薄壁细胞及导管只是偶尔出现金标, 说明免疫标记的特异性较强, 通过各种对照试验, 证明了非特异性吸附相当微弱。显示木瓜蛋白酶的原初生成部位是正在分化的乳管细胞的内质网, 它暂时贮存于分泌泡, 随乳管的发育和乳汁其它成分一起被“组装”为乳汁小泡而充满成熟乳管。

关键词 乳管; 番木瓜; 木瓜蛋白酶; 免疫金标记

## LATICIFER ULTRASTRUCTURAL AND IMMUNOCYTO-CHEMICAL STUDIES OF PAPAIN IN *CARICA PAPAYA*

Zeng Ying, Ji Ben-ren and Yu Bing

(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming 650204*)

## Abstract

Cotyledons of germinating papaya (*Carica papaya* L.) seeds and exocarp of young

收稿日期: 1993-06-24 接受日期: 1993-10-05

免疫电镜工作得到中国科学院上海植物生理研究所王美琪先生的具体指导和电镜室高小彦老师的通力协助, 谨表谢意。

\* 国家自然科学基金资助课题。

fruits were used as materials for study. The ultrastructural changes occurring during differentiation of laticifer and the ultrastructural environment of papain synthesis were studied by means of TEM and immunocytochemistry. Electron microscopic observations showed that the differentiating laticiferous cells were rich in ribosomes and mitochondria. Endoplasmic reticulum (ER) was well developed and apparently active, forming secretory vesicles of various sizes. With further development, organelles were gradually degenerated and autophagy of cytoplasm within vacuole was evident. ER was dilated and split into fragments. Cell wall perforations occurred at several sites of adjacent laticifer elements. Towards maturity, laticifer was fully filled with vesicles containing electron-dense materials. Organelles disappeared thoroughly but plasmalemma remained. Sections were incubated with anti-chymopapain antibodies followed by goat-anti-rabbit IgG-gold. Labeled gold was found predominantly in ER and the associated vesicles of differentiating laticifer. Several controls were used to establish the specificity of the immunolabeling pattern. Investigations led to the conclusions that ER and polyribosomes were involved in papain synthesis. Papain was stored in the vesicles of ER origin temporally before reorganized into laticiferous vesicles with other components of latex.

**Key words** Laticifer; *Carica papaya*; Papain; Immunogold labeling

番木瓜(*Carica papaya* L.)乳管属于有节联结的类型<sup>[1]</sup>,其分化发育的超微结构的研究至今未见报道。番木瓜乳汁富含木瓜蛋白酶,该酶广泛应用于食品加工、医药、轻化工业。对木瓜蛋白酶分离纯化的研究已相当详尽<sup>[2]</sup>。但是,在乳管的发育进程中,蛋白酶的产生及其在细胞内的分布动态却鲜为人知。本文报道了番木瓜乳管发育的超微结构,以及在此基础上应用免疫金细胞化学定位技术的研究结果。

## 材 料 和 方 法

### (一) 植物材料

番木瓜(*Carica papaya* L.)(‘穗中红’品种)干种子经预处理后于37℃恒温箱内保湿黑暗萌发,取不同发育时间的子叶固定,切取长约5 cm的幼果外果皮1—2 mm厚的组织固定。

### (二) 石蜡切片

材料经FAA固定液固定24小时以上,乙醇逐级脱水,常规石蜡包埋,切片厚8—10 μm,苏木精-桔红复染<sup>[3]</sup>,光学显微镜观察并拍照。

### (三) 普通透射电镜制片

材料用2.5%戊二醛(0.1 mol/L磷酸钠缓冲液PBS, pH 7.2配制)固定3小时,充分漂洗后,经同样缓冲液的1%锇酸固定2小时,漂洗,乙醇逐级脱水,环氧丙烷过渡。Epon618树脂包埋,固化。包埋块首先用LKB半薄切片机定位修块,然后用KCQ-2型超薄切片机制片,经醋酸铀-柠檬酸铅染色后,在JEM-100 CX型透射电镜下观察,照相。

#### (四) 免疫电镜制片

1. 固定和包埋<sup>[4]</sup> 材料浸没于 2% 多聚甲醛和 0.1% 戊二醛 0.1 mol/L PBS(pH 7.2) 中, 冰浴固定 2—4 小时, 经冷乙醇逐级脱水, 用 Lowicryl K4M 树脂进行低温浸透和包埋, 紫外光照射固定。

2. 免疫标记切片 兔抗木瓜凝乳蛋白酶(chymopapain) 抗体同前<sup>[5]</sup>, 经蛋白 A-琼脂糖 CL-4B(pA-Sepharose CL-4B) 纯化 IgG, 使用时稀释 20 倍, 胶体金标记的羊抗兔 IgG 购自北京军事医学科学院。金颗粒直径为 10 nm, 使用时稀释 10 倍。处理切片的程序如下<sup>[6]</sup>:

(1) 将切片浸没于含人血清白蛋白(HSA) 20 mg/ml 的 TBS 内, 37 °C 保温 1 小时。TBS 的成分是: Tris-HCl(pH 7.4) 10 mmol/L, NaCl 9 mg/ml, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.02 mg/ml, 聚乙二醇 0.5 mg/ml。(2) 切片浸没于含 2 mg/ml HSA 的 TBS 稀释的 chymopapain 抗体中, 37 °C 保温 1 小时, 再用含 2 mg/ml HSA 的 TBS 在室温下漂洗。(3) 将切片浸没于用含 2 mg/ml HSA 的 TBS 稀释的羊抗兔 IgG-胶体金复合物内, 37 °C 保温 1 小时。(4) 室温下用含 2 mg/ml HSA 的 TBS 漂洗 5 次, 再用同样的溶液含 0.1% Triton X-100 清洗切片, 最后用重蒸水洗 5 次。

对照试验用非特异抗体或含 2 mg/ml HSA 的 TBS 代替兔抗 chymopapain 抗体, 其它处理同上。经免疫标记的切片用 2% 醋酸铀和柠檬酸铅进行复染, 透射电镜观察并照相。

## 实 验 结 果

#### (一) 乳管的发育及超微结构

通过石蜡切片, 观察到番木瓜种子萌发初期, 当胚根刚露出种皮 1—2 mm 长时, 子叶内乳管细胞与周围长柱形的维管束薄壁细胞在光镜下不能区分; 当胚根胚轴进一步生长, 胚乳消耗殆尽, 子叶将要撑开种皮, 此时的乳管细胞形态发生了明显变化, 相邻的乳管细胞的侧壁、端壁在逐渐融合, 因胞壁物质溶解, 细胞壁形成穿孔以及各种形状的残迹(图版 1—4), 通过乳管细胞间的融合及联结, 形成植物体内连续贯通的网状乳管系统。

除细胞壁的变化外, 乳管分化发育进程中, 细胞的超微结构改变尤其显著。发育早期的乳管细胞有细胞核及常见的细胞器, 如内质网、线粒体、质体及丰富的核糖体, 液泡较小, 高尔基体并不常见。随后细胞核增大变长, 内质网上聚集了许多核糖体, 分泌活动旺盛, 产生各种大小的分泌泡, 线粒体数量多但内部结构渐渐模糊, 质体趋于解体并形成空泡(图版 1, 5, 6), 细胞壁变薄, 由细胞质生成的小泡正跨过内陷的质膜以接近越来越薄的细胞壁, 而且有小泡积聚的胞壁比其附近的胞壁要薄(图版 7), 液泡功能活跃, 内质网上的核糖体明显减少直至消失, 内质网断裂、膨胀, 小泡增多, 相邻乳管细胞的侧壁多处穿孔(图版 8; 图版 11), 此时细胞核仍然存在但核质相当分散, 趋于解体。完全成熟的乳管内挤满由膜包围的不规则小泡, 小泡内有无定形物质凝聚, 没有观察到任何残留细胞器, 但原生质膜是一直存在的(图版 9)。

## (二) 免疫电镜定位

正在分化的乳管细胞内, 金颗粒主要位于粗面型内质网及其附近的分泌泡, 细胞质的聚核糖体上亦发现金标(图版 , 10—12), 但细胞核、线粒体及细胞壁上很少发现金颗粒; 乳管细胞附近的导管及薄壁细胞内金颗粒非常少见(图版 , 14); 当乳管发育成熟, 金颗粒主要位于无定形凝聚物及小泡膜上(图版 , 13)。

用非特异兔 IgG 或含 2 mg/ml HSA 的 TBS 代替兔抗 chymopapain 抗体, 乳管细胞内很少有金颗粒(图版 , 15、16), 说明内质网分泌泡及多聚核糖体对胶体金或 IgG 的非特异性吸附相当微弱, 所以金标显示了与特异抗体结合的抗原的最初生成部位, 即木瓜蛋白酶是在乳管分化早期由内质网合成进入分泌泡, 并随着乳管的发育成熟, 同乳汁其他成分一起“组装”进入小泡结构。

## 讨 论

本文应用透射电镜及免疫细胞化学方法展示了细胞器参与乳管分化及木瓜蛋白酶生成的超微环境, 这有助于了解乳管特有物质的形成, 因为乳管的发生和发育研究在以前大多注重于分化过程中细胞结构的变化, 至于乳管特有物质, 如酶(番木瓜)、萜类(巴西橡胶)、生物碱(罂粟)等的生成和分布动态, 似乎缺乏直接的证据, 而以电子致密物推测。

乳管是原生质结构局部退化而又局部保持的高度分化的细胞<sup>[7]</sup>。番木瓜乳管的形成同其他植物有节乳管的形成有许多相似之处, 内质网频繁活动之后, 同线粒体、质体一样逐渐解体, 但是小泡结构却大量出现, 这是细胞器解体以后, 内膜系统重新组合的结果。

对乳管特有物质的生成知之甚少。根据文献, 最初可辨认的橡胶粒子在细胞质中发现, 但不能确定橡胶粒子的形成与其他细胞器之间有形态上的关系<sup>[8]</sup>, 也就是说, 当特有物质积累到一定程度并形成可辨认的结构成分, 方可在电镜下观察到。毫无疑问, 免疫细胞化学的方法让我们了解到细胞特有成分的原初生成及其超微结构环境, 在它被包装为特殊的结构成分之前认识到它的存在。Mauch 在研究几丁酶和  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶亚细胞分布的功能涵义时, 成功地应用这一方法证明, 金标分布是抗体与相应抗原发生特异性反应的结果, 而他设立的各种对照试验值得我们参考<sup>[9]</sup>。相信经过不断的探索和改进, 胶体金免疫电镜技术将越来越多地应用于生物大分子定位研究。

## 参 考 文 献

- 1 Esau K. Plant Anatomy. New York: Wiley J & Sons, 1958. 304—323
- 2 Dalling M J. Plant Proteolytic Enzymes (Vol. I), Boca Raton, Florida: CRC Press, 1986. 68—96
- 3 李正理. 植物制片技术. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1987. 75—77
- 4 Wang T L. Immunology in Plant Science. London: Cambridge University Press, 1986. 167—168
- 5 曾英, 季本仁. 番木瓜蛋白酶的免疫荧光定位. 植物生理学报, 1992. 18: 309—312
- 6 王美琪. 大豆根瘤内谷氨酸脱氢酶(GDH)的免疫细胞化学研究. 实验生物学报, 1987. 20: 393—399
- 7 张伟成, 严文梅, 娄成后. 蒜苔乳管发育中细胞内与细胞间在结构上的变化. 植物学报, 1982. 25: 8—15
- 8 吴继林, 郝秉中. 巴西橡胶树乳管分化的超微结构研究. 植物学报, 1990. 32: 350—354
- 9 Mauch F, Staehelin L A. Functional Implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase in bean leaves. Plant Cell, 1989. 1: 447—457

## 图 版 说 明

CW. 细胞壁 ER. 内质网 L. 乳管 M. 线粒体 N. 细胞核 P. 质体 Pa. 薄壁细胞 Pl. 原生质膜  
T. 导管 V. 液泡 Ve. 囊泡

## 图 版

1—4. 石蜡切片。× 420 1. 萌发初期子叶维管束, 乳管细胞难以辨认。 2—4. 相邻乳管细胞融合并在剖面留下不规则线状、圈形的胞壁遗迹(箭头)。 5—9. Epon 618 树脂包埋。 5. 发育早期的乳管细胞, 示细胞核及丰富的内质网、核糖体。× 10000 6. 乳管细胞分化早期, 线粒体较多, 质体趋于解体(箭头)。注意质膜外吐小泡(粗箭头)。× 10000 7. 发育中的乳管细胞内质网及其分泌泡 Ve. 明显变薄的细胞壁(箭头), 正在解体的线粒体。× 10000 8. 膨胀的内质网, 注意胞壁穿孔(箭头)。× 14000 9. 成熟乳管内的乳汁小泡。× 10000

## 图 版

10—14. LK4M 包埋, 免疫标记处理。 10. 金颗粒主要位于内质网及附近分泌泡(箭头)。× 14000 11. 内质网及分泌泡内有金颗粒(箭头), 而线粒体、细胞壁上没有。× 20000 12. 示内质网金标。× 40000 13. 成熟乳管的金标分布。× 20000 14. 正在分化的导管细胞, 可见加厚的细胞壁, 偶尔发现金标(箭头)。× 14000 15. 对照, 用非特异兔血清代替一抗, 乳管细胞的内质网及分泌泡没有发现金标。× 10000 16. 对照, 用 TBS 代替兔抗 chymopapain 抗体, 发育晚期的乳管细胞内很少有金颗粒。× 10000

## Explanation of Plates

CW· Cell wall ER· Endoplasmic reticulum L· Laticifer M· Mitochondrion N· Nucleus P· Plastid  
Pa· Parenchyma cell Pl· Plasmalemma T· Trachea V· Vacuole Ve· Vesicle

## Plate

Figs. 1—4. Light microscopic photographs. × 420 Fig. 1. Portion of longitudinal section of cotyledon in seeds soon after germination, it is difficult to identify the laticifer initials. Figs. 2—4. Fusion of adjacent laticifers showing the irregular elongated or round cell wall residues ( ). Figs. 5—9. Micrograph of Epon 618 sections. Figs. 5, 6. Laticiferous cells of early developmental stage, showing nucleus and dense cytoplasm rich in ribosomes, mitochondria, and apparently active ER. Note the partially degenerated plastid ( ). × 10000 Fig. 7. Section showing ER and its secretory vesicles, gradual thinning of walls ( ) and degenerating of mitochondria ( ). × 10000 Fig. 8. Section showing cytoplasm containing dilated ER elements. Note the perforation of cell wall ( ). × 14000 Fig. 9. Section taken from a mature laticifer showing vesicular structures containing electron-dense materials. × 10000

## Plate

Figs. 10—14. Sections after immunolabeling Figs. 10—12. Gold labeling ( ) is mainly present over ER and associated vesicles of differentiating laticifer, no gold labeling is found over nucleus, mitochondria, plastids and cell walls. Fig. 10. × 14000 Fig. 11. × 20000 Fig. 12. × 40000 Fig. 13. Labeling pattern of mature laticifer. × 20000 Fig. 14. Showing gold labeling is occasionally present in the vacuole of a differentiating trachea. × 14000 Figs. 15, 16. Controls, section incubated with TBS (Fig. 16) or with nonspecific sera (Fig. 15) followed by IgG-gold, few gold labeling is visualized. × 10000



