

发育大豆子叶细胞中酸性磷酸酶的亚细胞学定位*

郑易之 赵耕春 高扬^① 佟德娟 张晓萍 张忠恒^②

(东北师范大学生命科学学院, 细胞生物学教研室, 长春 130024)

摘 要

本实验采用电镜细胞化学技术, 观察了酸性磷酸酶在发育中大豆子叶细胞内的亚细胞学分布。酸性磷酸酶除分布在细胞核内的部分染色质上, 内质网膜上, 质体胞质小泡和胞质中, 主要积累于蛋白体内。酸性磷酸酶在不同蛋白体内分布有所不同: 1) 在一部分蛋白体中, 酸性磷酸酶均匀散布于蛋白质基质上; 2) 在另一部分蛋白体内, 酸性磷酸酶成簇沉积于其中; 3) 还有一部分蛋白体, 其中央为致密区, 边缘为疏松区, 酶在边缘疏松区的含量明显高于中央致密区中酶的量。

关键词 大豆; 子叶发育; 酶性磷酸酶; 蛋白体; 超微结构定位

植物种子蛋白体内积累大量储藏蛋白质。在种子萌发时, 蛋白体内的储藏蛋白质逐渐降解, 为种子萌发提供必需的营养物质。在种子内还储藏一些酶类, 酸性磷酸酶是其中的一种。一般认为, 它参与种子萌发过程中的磷代谢^[1-2]。近年来, 人们采用酶分析和生化技术等方法研究了豆科植物种子内酸性磷酸酶的活性和结构特点^[3-9], 但对酶的细胞学定位只有为数不多的报道^[9, 10]。由于酸性磷酸酶的生理功能与它的细胞学定位密切相关。因此, 研究酸性磷酸酶的超微结构定位有助于我们了解此酶的生理功能。本文采用酶细胞化学方法, 分析酸性磷酸酶在发育中大豆种子中的亚细胞学定位。

材料与方法

大豆 (*Glycine max* L.) “吉林 13 号”种植在东北师范大学校园内。自开花时挂牌标记。将开花后 35—50 天的种子取下, 去除种皮和胚根、胚轴及胚芽部分, 保留子叶做为实验材

* 国家自然科学基金资助项目

本文于 1995 年 7 月 26 日收到。This paper was received on July 26, 1995.

① 长春师范学院进修教师

② 黑龙江克山师范专科学校进修教师

料。

酸性磷酸酶的组织化学染色:将子叶中部切成厚度为 0.5mm 的小块,立即投于 4% 甲醛和 2.5% 戊二醛的混合液(用 0.1mol/L 二甲胂酸钠缓冲液配制,pH7.0)中固定 0.5 小时。经二甲胂酸钠缓冲液(pH7.0)及醋酸—醋酸钠缓冲液(pH4.6)冲洗后,将材料转移至预培养液中(4℃,30 分钟);然后转入含底物(β -甘油磷酸钠)的反应液中(pH4.6)(对照反应中材料放入不含 β -甘油磷酸钠的反应液中)温育 2 小时(26℃)。后固定于 1% 锇酸溶液中 2 小时。经乙醇及丙酮系列脱水;Epon 812 环氧树脂渗透包埋。超薄切片不经染色直接置于 Hitachi—600B 透射电镜下观察、照相。

结 果

我们曾观察了大豆开花后 25—50 天期间,子叶细胞中的液泡积累贮藏蛋白质,发育为蛋白体的过程^[11,12]。还通过聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,检测出此时的子叶积累酸性磷酸酶^[8]。

本文观察了大豆开花后 35—50 天期间,酸性磷酸酶在亚细胞水平上的分布。此时,酸性磷酸酶主要分布在蛋白体内高电子密度的蛋白质上;在一部分蛋白体中,酸性磷酸酶均匀弥散于蛋白质基质中(图 1);在另一部分蛋白体内,反映酸性磷酸酶活性的磷酸铅颗粒成簇分布于蛋白体中(图 2);还有一类蛋白体,其中央为一高电子密度的致密区,边缘为疏松区。在这两个区域中,酶颗粒的分布明显不同:即在中央致密区中酸性磷酸酶活性明显比周围疏松区要少得多(图 3)。

在细胞核内的染色质中,也有酸性磷酸酶活性(图 4)。在粗面内质网膜上和质体中,散布着反映酸性磷酸酶活性的磷酸铅颗粒(图 3,5)。在胞质中,可见少量的磷酸铅沉淀(图 2)。此外,还可见到一些富含酸性磷酸酶活性的胞质小泡,有的小泡似呈与蛋白体融合的趋向(图 5)。

在质膜外侧附着少量磷酸铅颗粒,而在胞壁基质中未见酶的存在(图 3)。

对照反应的切片中,未见酸性磷酸活性(图 6)。

讨 论

一些作者指出:随着豆科种子萌发,种子内酸性磷酸酶活性显著升高^[3,5-10]。Barker 等(1974)认为这是由于豌豆种子萌发时新合成的酶的结果^[3]。而 Murray 等(1977)和 Flinn 和 Smith(1967)指出,在豌豆种子发育时,酸性磷酸酶就积累于子叶细胞中的胞质内和胞间隙中,并认为此时的酶可能处于非活化状态^[4,9]。Asghar 和 DeMason(1992)也认为发育中的羽扇豆种子子叶蛋白体和细胞壁内贮存酸性磷酸酶^[10]。我们曾用凝胶电泳方法检测到发育中大豆子叶中含酸性磷酸酶^[8];本文我们用细胞化学技术将此酶主要定位于形成中的子叶蛋白体内。由此可知,子叶蛋白体在大量积累贮藏蛋白质的同时,也在积累酸性磷酸酶,为种子萌发时参与磷代谢做贮备。关于大豆种子萌发时酸性磷酸酶的定位,目前

正在研究之中。

植物细胞的很多细胞器内也存在酸性磷酸酶^[3]。一般认为细胞核中的酸性磷酸酶是非溶酶体酸性磷酸酶^[13,14]。Joshi 等(1985)认为正在分化的棉纤维细胞的细胞核中的酸性磷酸酶可能参与细胞核中的核蛋白的脱磷酸化过程,进而影响基因转录的种类和数量^[14]。本实验中,大豆子叶细胞核中部分染色质上的酸性磷酸酶可能具同样功能。在大豆子叶细胞大量合成贮藏蛋白质时期,核内部分染色质上酸性磷酸酶的存在可能与贮藏蛋白质基因表达的种类和数目有关,使子叶细胞迅速合成贮藏蛋白质。

本实验结果显示,蛋白体内分布着许多酸性磷酸酶。种子发育时期子叶蛋白体内酸性磷酸酶的作用显然不同于种子萌发时此酶消化含磷物质(非丁)的功能。种子发育时期子叶中的酸性磷酸酶可能只作为一种蛋白质的组分积累于蛋白体内^[15],它可能处于一种非活化状态^[4]。我们还注意到,酸性磷酸酶在蛋白体内的分布是有区别的。这种差异可能与蛋白体内含磷物质(非丁)的分布有关。尽管蛋白体的超微结构无显著差异,但它们之间存在着组分和酶活性及分布的差异。但不同蛋白体的功能差异及在代谢上的作用,尚有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Lott J N A, Buttrase. 1978, Globoids in protein bodies of legume seed cotyledons. *Aust J Plant Physiol*, 5, 89-111
- [2] Bewley J D, Black M. 1983, *Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination*. Springer-Verlag, Berlin, New York.
- [3] Barker G R, Bray C M, Walter T J. 1974. The development of ribonuclease and acid phosphatase during germination of *Pisum Arvense*. *Biochem J*, 142, 211-219
- [4] Murray D R, Collier M D. 1977. Acid phosphatase activities in developing seeds of *Pisum sativum* L. *Aust J Plant Physiol*, 4, 843-848
- [5] Ullah A H J, Gibson D M. 1988. Purification and characterization of acid phosphatase from cotyledons of germinating soybean seeds. *Arch Bioche Biophys*, 260, 514-520
- [6] Devi T K, Madhusudan K N. 1989. Acid phosphatase activity in winged bean seeds during germination and early seedling development. *Indian J Plant Physiol*, 32, 160-163
- [7] Kaneko J, Kuroiwa M, Aoki K, et al., 1990. Purification and properties of acid phosphatase from axes and cotyledons of germinating soybean cotyledons. *Agric Biol Chem*, 54, 745-751
- [8] 郑易之、赵耕春、王永新等., 1993 大豆种子发育过程中子叶内几种同工酶活性变化, *东北师范大学学报*, (2), 100-103
- [9] Flinn A M, Smith D L. 1967. The localization of enzymes in the cotyledons of *Pisum arvense* L. during germination. *Planta*, 75, 10-22
- [10] Asghar R, DeMason D A. 1992. Differential activities of acid phosphatase from adaxial and abaxial regions of *lupinus luteus* (Fabaceae) cotyledons. *Amer J Bot*, 79, 1134-1144
- [11] 郑易之、何孟元、胡阿林等, 1990, 大豆子叶细胞中由液泡发育为蛋白体的不同方式, *植物学报*, 31, 590-595
- [12] 郑易之、何孟元、郝水, 1992, 大豆子叶中蛋白体的形成与储藏蛋白质积累的关系, *植物学报*, 34, 641-644
- [13] 田国伟、申家恒, 1994, 小麦受精过程中酸性磷酸酶的超微细胞化学定位, *植物学报*, 36, 251-256
- [14] Joshi P A, Stewart J M, Graham E T. 1985. Localization of glycerophosphatase activity in cotton fiber during differentiation. *Protoplasma*, 1985, 125, 75-85

- [15] DeMason D A, Stillman J I. 1989. Acid phosphatase localization in seedling tissue of the palms *Phoenix dactylifera* and *Washingtonia filifera* and its relevance to controls of germination. *Can J Bot*, 67, 1103-1110

图 版 说 明

图 1, 酸性磷酸酶均匀散布于蛋白体(PB)内的蛋白质基质中。 $\times 10000$ 图 2, 酸性磷酸酶或均匀散布或成簇沉积于不同蛋白体中。胞质中(Cyt)也分布着少量酶。 $\times 10000$ 图 3, 蛋白体(PB)内中央有致密区, 其边缘为疏松区。疏松区中酸性磷酸酶活性明显高于中央致密区中的酶活性。内质网膜上(ER), 质膜上也分布着酶活性。 $\times 12000$ 图 4, 细胞核(N)中部分染色质上沉积着酸性磷酸酶活性。 $\times 8000$ 图 5, 胞质内富含酸性磷酸酶活性的胞质小泡(Ve), 有的小泡似呈与蛋白体融合的趋势(箭头示)。P, 质体。 $\times 18000$ 图 6, 为对照反应的照片, 为酸性磷酸酶负反应。 $\times 6000$

Explanation of plate

- Fig. 1. Acid phosphatase activity was distributed uniformly in the proteinaceous materials of the protein bodies(PB). $\times 10000$
- Fig. 2. Acid phosphatase activity was deposited in the other protein bodies in the dotted pattern. A little enzyme activity was scattered in cytoplasm (Cyt). $\times 10000$
- Fig. 3. Electron micrograph showing a protein bodies with a compact center and sparse periphery. Note, dense enzyme reaction product was far more in the sparse periphery than that in the compact center. $\times 12000$
- Fig. 4. Part of chromatin in the nucleus with the dense enzyme activity. $\times 8000$
- Fig. 5. Electron micrograph showed that some vesicles containing high density of enzyme reaction product seemed to be fusing with membrane of the protein body (arrowhead). P, plastid. $\times 18000$
- Fig. 6. Control experiment section, showing negative reaction with acid phosphatase. $\times 6000$

ACID PHOSPHATASE LOCALIZATION IN COTYLEDENARY CELLS OF DEVELOPING SOYBEAN SEEDS

Zheng Yizhi Zhao Gengchun Gao yang
Tong Dejuan Zhang Xiaoping Zhang Zhongheng

(School of Life Science, Northeast Normal University, Changchun, 130024)

Abstract

The cytochemical localization of acid phosphatase was studied in the cotyledanary cells of developing soybean seeds. Acid phosphatase activity was observed in the following loci: part of chromatin in the nucleus, membrane of endoplasmic reticulum, plastids, vesicles, cytoplasm and mainly in protein bodies. Dense enzyme reaction product was located in proteinaceous materials of the different protein bodies in either uniform or dotted patterns. There were some kinds of protein bodies with the compact center and the sparse periphery. Dense enzyme reaction product was far more in the sparse periphery than that in the compact center.

Key words Soybean; Developing cotyledon; Acid phosphatase; Protein body; Ultrastructural localization

郑易之等:发育大豆子叶细胞中酸性磷酸酶的亚细胞学定位

Zheng Yizhi et al. : Acid phosphatase localization in cotyledenary cells of developing soybean seeds

