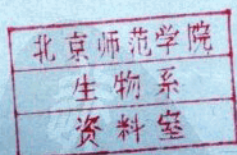


植物细胞的超微结构

北京大学 高信增



中国植物生理学会全国学术讨论会

一九七九年八月 河北保定

PDG

植物细胞的超微结构

自1665年英国人虎克第一次用他改进的光学显微镜观察了软木细胞以来，至今已有三百多年。在这期间科学发展很快，对细胞结构的认识逐渐深入和丰富。这一方面由于光学显微镜的不断改进和完善；另一方面是新的观察仪器的作用——即电子显微镜的应用。可以说17世纪60年代由于光学显微镜的应用，使对细胞的观察进入了微观世界的认识，而20世纪50年代由于电子显微镜的使用则进入了超微观世界的认识。以后由于一些新技术（如，冰冻蚀刻，放射自显形，高速离心等）的应用和新仪器（扫描电子显微镜）的使用，进一步促进了细胞学的发展。

下面分两部分讲：第一部分简单讲。电子显微镜的工作原理和电子显微镜技术；第二部分具体讲透射电镜和扫描电镜在植物学科中的应用。

一、电子显微镜和电子显微镜技术

(一) 电子显微镜的工作原理

我们常说电子显微镜的特点是放大倍数高，可以放大几千倍、几万倍以至几十万倍。因此光学显微镜下所不能看到的结构（如内质网）或生物（如病毒）在电子显微镜下就能看到。但不能只看到它的放大倍数高，还有一个特点——分辨率。

高也是非常重要的，即使是同样的放大倍数，光学显微镜所不能看到或看不清的结构，在电子显微镜下却能看清。

分辨率也叫做分辨本领，简单的说就是能够分辨得出尽可能近的两点的能力；用两点间最短的极限距离表示分辨率。例如普通光学显微镜的分辨率为0.2微米。也就是0.2微米为普通光学显微镜的分辨极限。两点或两层膜如果它们之间的距离小于0.2微米（也就是2000埃）就是放大多少倍也是看不出的。

光学显微镜的工作原理是利用光线穿过被观察的样品经过物镜和目镜的作用把样品放大到几十倍、几百倍以至千倍；电子显微镜则是利用电子束经过电磁镜作用把电子束聚集一起，穿过样品再经电磁透镜的作用把样品放大几百倍、几千倍以至几十万倍。

光线或电子束的波长与分辨率有着直接关系，波长越短分辨率越高。可见光（一般光学显微镜所用光线）波长为7.600——3.900埃，因此光学显微镜的分辨率为0.2微米；如果用波长短的紫外光（3.900——130埃）则可提高分辨本领一倍，所以紫外光显微镜的分辨率为0.1微米。而应用电子束的电子显微镜，由于电子束的波长要比光线的波长短的多（见表一），所以它的分辨率要高的多。我国去年新设计出的JX32-12型电子显微镜分辨率为2.04埃，放大80万倍。

表一 不同光及电子束的波长

名 称	波长 (埃)
可 见 光	3600 — 3.900
紫 外 光	3.900 — 130
电 子 束	
100伏	1.23
10,000伏	0.123
100,000伏	0.039

电子显微镜的工作原理与光学显微镜相类似，只不过电子束代替光线，电磁透镜代替光学透镜。但因空气对于电子束起着阻碍作用，因此在电子显微镜内部要保持真空状态。另外电子束的穿透能力很差，过厚的样品电子不能穿透而不能进行观察，因此必须要把样品切成超薄切片（厚500—600埃）才行。由于上述原因，电子显微镜的构造和使用条件要比光学显微镜的要求高的多。

(二) 超薄切片的制备

超薄切片的制做过程与光学显微镜所用的石蜡切片相似，也要经过固定、脱水、包埋、切片和染色几个步骤。不过所用的药剂，包埋剂，染料和切片机，切片刀有所不同而已。

固定 电子显微镜观察的样品最常用的固定液是戊酸(OsO_4)、戊二醛($\text{CH}(\text{CH}_2)_3(\text{CHO})$)和高锰酸钾(KMnO_4)。

— 4 —

这些固定液要用缓冲液($\text{PH} 7.0 \sim 7.3$)配制(高锰酸钾配成水溶液)。固定时还要注意环境条件,一般固定(KMnO_4 除外)都要在低温 4°C 下进行。最常采用的固定方法是双重固定,也就是先用戊二醛固定,经过冲洗后再用铬酸固定。有时固定液中加入一定量的蔗糖以维持固定液的渗透压。

脱水 与石蜡制片一样,常用的有各级乙醇或丙酮。

包埋 在50-60年代,多采用半乳糖为包埋剂,因其在聚合过程中可能引起组织的损伤,现已广泛应用环氧树脂为包埋剂,常用的有环氧树脂812,环氧树脂618和环氧树脂600等。

切片 要用特殊的——超薄切片机切片,这类切片机多利用金属的冷缩热胀原理控制切片的厚度。切片所用的刀有两类:一种是玻璃刀;另一种为钻石刀,由于钻石刀价格昂贵一般多用玻璃刀,但钻石刀对切坚韧的组织(如木材)还是需要的。切片的厚度一般要求 $500-600$ 埃,切片的厚度不易测量,常用观察浮在水面切片的干涉颜色来判断厚度(见表二)。一般文献中常提到银灰色的切片其厚度大约为 $600-900$ 埃。

表二 干涉色和切片厚度

颜 色	厚 度(埃)
灰	< 600

银	600-900
金	900-1500
紫	1500-1900
蓝	1900-2400
绿	2400-2800
黄	2800-3200

染色 为了提高低切片的反差，在用电子显微镜观察前，对超薄切片还需要染色。常用的染料是醋酸铀和柠檬酸铀，而且常在同一切片中用这两种染料进行双重染色效果最为理想。

所要观察的样品经过上述各步骤，得到经过双重染色的超薄切片，就可以在电子显微镜下进行观察和拍摄照片。

(三) 冰冻切片与冰冻蚀刻

上述超薄切片的制备方法，样品要经过固定，脱水等化学试剂的处理，往往会使细胞的超微结构发生改变，而不能真实地反应生活状态因而采取用液态氮快速把样品冰冻然后在低温下进行切片（也要用载薄片），经过染色后可置于电子显微镜下观察。冰冻切片可以与普通超薄切片进行对照观察，同时也可以进行细胞酶酶的定位以及可溶性物质放射自显影等观察。

此外用超薄切片进行电子显微镜观察时，只能看到膜或细

胞器的切面结构，而不能观察到结构的表面情况，因此采取了另一冷冻技术——冰冻触刻的方法；以解决上述问题。

这一方法是先把生物材料（或用戊二醛固定的材料）用液态氮把样品迅速冷冻至 -150°C ，并且在冰冻时处于真空状态，然后用切片刀（切片前刀也要进行冷冻）对冰冻样品进行切割，切好后在真空状态下使所切的剖面组织的冰升华（厚度约 $1000\text{\AA}$ ），使细胞剖面呈凸凹不平的触刻。然后用铂粘膜从一定方向对凸凹不平的表面进行喷镀，使不平的表面显得更为明显清晰。最后利用纤维素酯或硫酸把样品自复型的碳铂膜除去。在电子显微镜下观察复型的碳铂膜即可看到细胞器或膜的表面结构。

（四）扫描电子显微镜

在十几年前（1965年）就设计出另一类型的电子显微镜——扫描电子显微镜（与此相区别，前面所讲到的电子显微镜叫做透射电子显微镜）。扫描电子显微镜也是利用经过电磁透镜聚焦成很小的电子束，并使电子束在样品上进行扫描，收集样品上所产生的次生电子，经过放大，在显像管的荧光屏上出现样品形像。因为电子束在样品上扫描成像，所以叫做扫描电子显微镜。

扫描电子显微镜与光学显微镜和透射电子显微镜相比有着一些独特的优点，这些优点是：

①由于它具有较大的景深，因而能得到有真实感的立体图

像：②放大范围广，可由十倍放大到几十万倍；③观察时样品可在样品室中做各方向转动，因而便于从不同角度观察样品的各个区域；④样品的制备方法简单；⑤可利用样品在入射电子作用下产生的不同信号，对样品进行成分和元素分布的分析。

由于上述的独特的优点，近些年来扫描电子显微镜已广泛地应用到生物学各个学科领域。

电子显微镜应用以后，虽然对生物学的发展起着重要的作用，但我们不能忽略光学显微镜下研究的作用。现在不少科研工作，用同一材料，分别用光学显微镜、透射和扫描电子显微镜进行观察，把观察结果相互对照比较。

二、透射电镜和扫描电镜在植物学科中的应用

(一) 利用透射电镜对植物细胞超微结构的了解

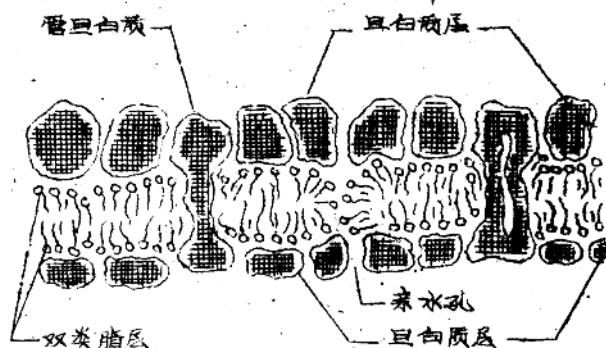
透射电镜的应用已有卅年的历史，在卅年间以动、植物为对象进行了大量的工作，随着电子显微技术的应用与发展，对细胞超微结构有着较为全面而深入的了解。与此同时由于生物化学的发展，使我们对细胞的代谢机能也有了比较详细的认识。而且逐渐发展到分子水平。

下面谈植物细胞的超微结构

1. 膜和膜系统

在光学显微镜下可以看到包在原生质体外面的质膜，由于光学显微镜的分辨率的限制，实际上看到的这层膜还包括了膜以内的一薄层细胞质。在透射电镜下高倍

放大后可以清楚地看出这是由三层组成，内外两层电子密度大（稠密），中间一层电子密度低（透明）在照片可看出暗带——明带——暗带三层。三层组成一单位膜。一个比较公认的单位膜基本结构是由脂质的分子层及其两侧两层蛋白质层所组成。中间脂质的双分子层，其亲水基团朝向膜的两侧（图一）。

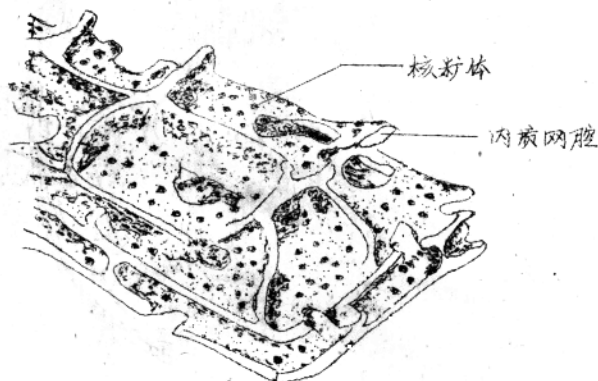


图一、单位膜结构示意图

这层厚度约为25埃，而两侧每一层蛋白质的单分子层，每层厚度共为75埃。这一假说虽然目前较为流行，但还不能算是公认的学说。

各类膜虽然在结构上（电镜观察下）相似但不同细胞以及同一细胞中不同类型的细胞器，它们的功能不同、膜的化学成分也不同。例如细胞膜也同样是由一层单位膜所组成，在电镜

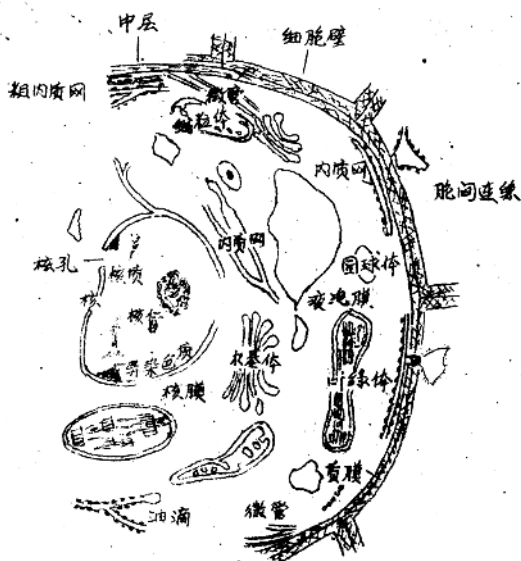
下的结构与质膜相似，但它们的透性和物理性质不同。在细胞核、线粒体、核外面则是由双层膜（即两层单位膜）所包围。在细胞质中可以看到由双层膜组成的内质网。在切片上为两条平行的线，而其立体结构是多孔层组成的网状结构（图二）。



图二、内质网的立体模型图

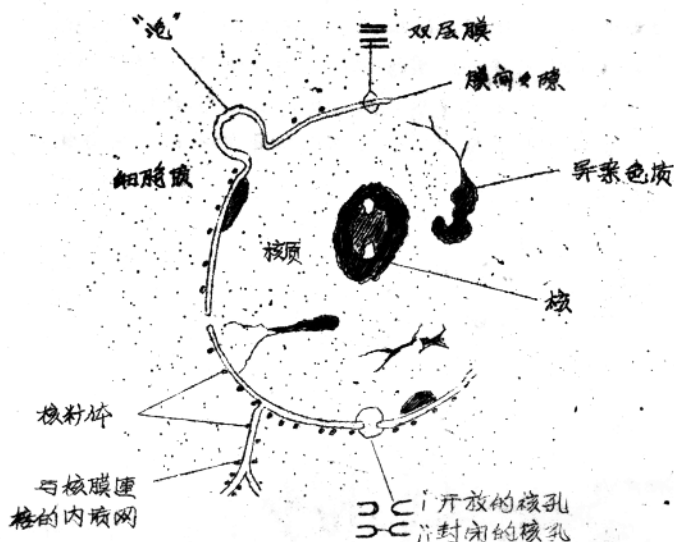
在分生组织的细胞中，内质网贯穿在整个细胞内，向内与核膜的外膜相连，向外与质膜相通，而且有的内质网可穿过胞间连丝与相邻的细胞相沟通（图三）。

有的内质网表面分布着许多核糖体，在电子显微镜下呈粗糙状，因而称之为粗糙内质网，相对的把没有核糖体的质网叫做平滑内质网。内质网的作用可能与蛋白质的合成和细胞内物质运输有关。也可能对细胞壁的形成起作用。



图三、植物细胞的超微结构

(二) 细胞核 有些植物学者认为细胞核属于细胞口的一类结构，但它在整个细胞中所起的作用与真核细胞中不同，例如质体线粒体直接参与能量转换，而细胞核则控制着蛋白质合成，控制着细胞的生长和发育。细胞核^{由核}膜，核质和核仁三部分所组成。在电镜下不但可以看出核膜由两层单位膜组成，而且可以清楚地看出膜上有排列规则的孔，这些孔大多开放，但有的在一定情况下（如某些抗寒品种的小麦在其越冬时）核孔可被一层膜所封闭（图四）。



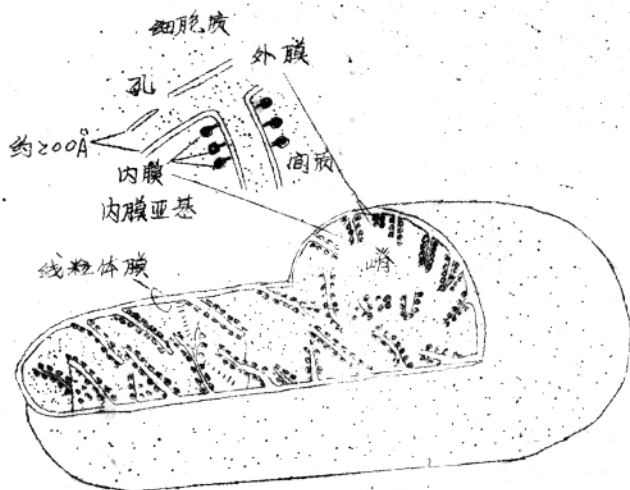
图四、间期核结构的图解

核膜可以向细胞质内形成一些“泡”状突起，这些突起形成后离开并进入到细胞质中可能为质体或线粒体的前身。

在核膜以内主要由核质（也有的称为核液）所充满，核质中的主要部分是染色质，在分裂间期或成熟的细胞中，很难看到染色体。在电镜下可以看到染色体的异染色质和染色浅的常染色质。在这一时期中在核内还可以看到一个或几个核仁，在核仁与核质之间并没有被膜所分开。在电镜下在核仁内可以看到有两个区域，一为纤维区域，一为颗粒状区域。

文献中曾报导，相差显微镜观察，以无培养下的烟草细胞，在生长细胞内看到有核仁衰老周期性的出现，大约每过一小时出现一次。

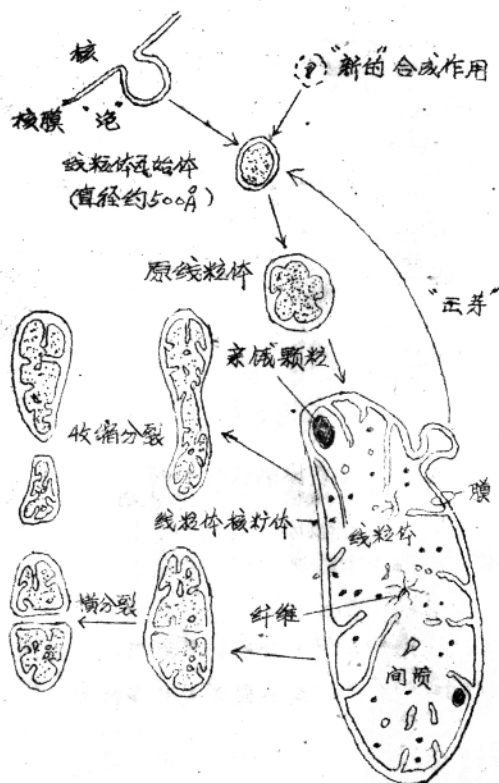
(三) 线粒体 它普遍存在于动植物细胞中，在光学显微镜下则只能看到它们是圆形或椭圆形小体，但其内部结构很难看清。在电镜下则可清楚地看清其内部结构，是由内外两层膜组成，内层膜向腔内折叠成嵴，在植物细胞的线粒体中嵴多呈管状（图五）。



图五 线粒体，超微结构图解

在外膜上可看到有孔，内膜上分布着带柄颗粒（内膜亚基），这些颗粒可能由电子传递的几种酶组成。嵴的周围充满着含有可溶性蛋白质的间质，在间质中分佈着核糖体、DNA纤维和颗粒。在不同组织或不同生理状态的细胞中线粒体的结构可能有很大差异。在幻灯片上可以看到蚕豆根、莖、子叶木质部传递细胞中的线粒体有着发达的嵴系统而在胡江红（*Asorla*）根内皮层细胞中（其呼吸作用低）的线粒体嵴系统非常退化。

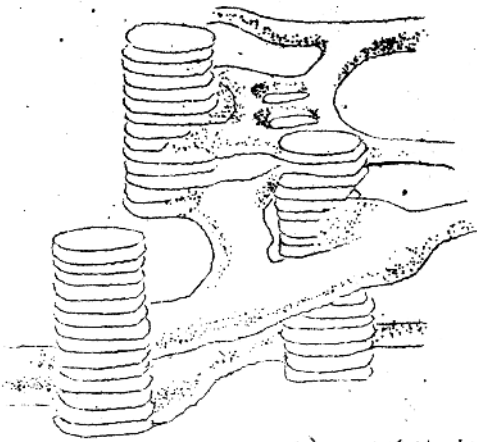
线粒体的起源还不能肯定，从图六中可以看出线粒体可能来自核膜向外突起形成的泡状结构，同时其本身可以通过“出芽”或分裂的方式增加线粒体的数目。



图六、线粒体的个体发育

(四) 质体 质体为绿色植物所特有，由于它们具有或不具有色素而分为叶绿体，有色体和白色体。

在这里重点讲一下叶绿体的超微结构，它与线粒体一样全由两层膜所包围，但其内部结构不同。在叶绿体的基质中有着几个基粒，基粒是由一叠由双层膜组成的类囊体所组成，在基粒间有基粒间膜相连（图七）。



图七、叶绿体的基粒图解

在茎质中也分布着叶绿体、淀粉粒和蛋白质颗粒。有的还含有淀粉粒，上述情况是叶绿体在见光下发育正常的结构，如果发育过程中是在黑暗中进行的则成为黄化质体，不出现上述结构而出现原片层结构，并发育成晶格状结构。

叶绿体的来源也还没有完全肯定，它可能来自核膜形成的泡状结构，但其本身也能以“出芽”或分裂方式增多数目（图八）。

淀粉体和有色体的结构见图八。

过程中在纺锤体中也可以看到微管。

微管可能与细胞壁纤维素的微丝沉积和排列方向有关，从一些电镜现象中看到细胞壁的微丝排列方向与其附近细胞质中的微管方向相一致。另外也看到在微管集中的地区细胞壁常发生特别加厚的现象。

微管的直径约 $210-250$ 埃，长约几个微米，它的电子密度大的外围是由直径约 40 埃的球状亚基组成，每一外圈大约由 11 或 13 套这种亚基排成一串而组成微管，这些微管在细胞质中是变化的，可能发生聚合和解聚作用。

在低等植物（如衣藻）的鞭毛中也看到有微管的结构。

微丝也是一种丝状的结构，但它比微管还要细，直径约 $50-60$ 埃，常成束地存在于细胞质的某些部位，这些部位常是发生细胞质流动的地方（或在其附近）。有人认为微丝是细胞质中具有收缩功能的机构。微丝的收缩与舒张也可能就是原生质流动的原因。

（七）、液泡 也是植物细胞特征之一，它是由一层单位膜

将泡膜所包围，在其中有着各种成分的细胞液。通过电子显微镜的观察，液泡很可能起源于内质网小泡或由碎片局部膨大而形成液泡的原始体，它们在发育过程中相互併合而成为大的液泡。

（八）、微体 微体（Microbody）常与微粒体（Microsome）

一名词相混淆。微粒体是指细胞经过破碎处理后并用超离心机分离出其内含物时，在其最终部分中所得到的物质的类型，它并非细胞本身的结构，而常常是内质网破裂后形成的球状体或是核碎片。我们这里所讲的微体是某些植物细胞内的结构，它们外面由一层单位膜所包围，依其内部所含酶系统的不同，可分为过氧化体和乙醛酸体。

过氧化物普遍存在于高等植物的绿色细胞中，常与叶绿体相伴存在，它与光呼吸有密切关系。乙醛酸体与脂肪代谢有密切关系，在正萌发的蓖麻胚乳和向日葵子叶中大量存在，而且随着萌发过程的进行，乙醛酸体的数目逐渐减少。

有些学者把圆球体和卷酶体也属于微体一类，它们也是由单层膜所包围的球体，圆球体内含有合成脂肪的酶，是积累或合成脂肪的细胞器。卷酶体内含有能分解核酸，蛋白质和多种碳水化合物化合物的酶。这些酶为膜所包围，当膜破裂后，酶即被释放。能破坏细胞的某些部分结构（如导管分子的穿孔形成）。

上面把植物细胞的超微结构做了简略的介绍，下面再谈。细胞中的基质（也叫做衬质）。基质在电镜下是“透明”的，看不出有什么结构。当然它有没有结构现在还不清楚，但是从原生质的一些物理特性和生理特性（粘度、弹性和原生质流动）来看，基质可能还是有结构的不过现有工具还不能显示出这些结构。

下页两表分别说明典型细胞中细胞器的类型，数量和大小。

表三、植物细胞（绿色细胞）所含细胞器的数目

细胞核	1
质体	50
线粒体	500
高尔基体	400
核糖体	5万
酶分子 (10000种)	5亿以上

表四、各种细胞器的大小

细胞核	5-30微米
-----	--------