

Р. К. САЛЯЕВ, В. И. ЧЕРНЫШОВ

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОВЕРХНОСТИ КАПЕЛЬ ИЗОЛИРОВАННОЙ ПРОТОПЛАЗМЫ

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 17 V 1973)

В ряде работ показано, что при перерезании клеток междуузлий нителлы или хары в условиях, обеспечивающих компенсацию тургорного давления, вытекающая эндоплазма формирует капли с довольно прочной и эластичной поверхностью раздела (¹⁻⁴). Необходимым условием формирования таких капель являлось присутствие в среде двухвалентных катионов, особенно кальция и магния. Было высказано предположение, что в данном случае на границе между протоплазмой и средой формируется поверхностная мембрана. Однако в то время мы не располагали прямыми данными о мембранной природе пограничного слоя изолированных капель. Исследование осмотических свойств капель протоплазмы (⁵) может служить лишь косвенным указанием на мембранную природу поверхности изолированной протоплазмы.

Наиболее прямым методом изучения могла быть электронная микроскопия, но вследствие малых размеров капель и легкой их повреждаемости обычные методы подготовки объектов для электронной микроскопии оказались непригодными.

В 1968 г. был разработан метод фиксации и заливки препаратов в агар-агаровые микрокапсулы (⁶), после чего появилась реальная возможность прямого изучения капель в электронном микроскопе.

Методика работы была следующей. Капли протоплазмы получали из клеток нителлы, перерезаемых для компенсации тургорного давления в миниатюрной декомпрессионной камере. За основу созданной установки был взят принцип, изложенный в статье (⁷). Описание установки дано в нашей работе (⁸).

Сформированные капли протоплазмы улавливали в агар-агаровые микрокапсулы, в которых проводили фиксацию, обезвоживание и заливку в эпоксидные смолы. Оперировать каплей, заключенной в агар-агаровую микрокапсулу, очень легко: ее не уносит конвекционными потоками жидкости, она надежно защищена от механических повреждений. Вместе с тем в силу высокой проницаемости тонкого слоя агар-агарового геля объект хорошо фиксируется, обезвоживается и пропитывается заливочными средами. Стенки капсулы прозрачны и не мешают наблюдать за каплей в оптический микроскоп при разных увеличениях. На рис. 1а показан процесс истечения протоплазмы из перерезанной клеточки. В нижней части микрокапсулы видна сформированная капля изолированной протоплазмы. При большом увеличении видно, что капля имеет четкую поверхность раздела и зернистое содержимое (рис. 1б).

Фиксация изолированных капель проводилась в течение 1 часа в 1,5% глutarовом альдегиде, забуференном 0,1 М фосфатным буфером до pH 7,2—7,4. После альдегидной фиксации материал дополнительно фиксировался 1 час в 1% четырехокси осмия, приготовленной на том же буфере.

Заливка выполнялась по обычной методике в ЭПОН-812, и в отдельных случаях в бутилметакрилат. Ультратонкие срезы контрастировали по Рейнольдсу и изучали в электронных микроскопах УЭВМ-100 и JEM-7A.

В итоге было установлено, что в капле изолированной протоплазмы сохраняются все элементы обычной структуры: эндоплазматическая сеть, рибосомы, ядра, митохондрии, пероксисомы, осмнотфильные тела, но гиалоплазма выглядит несколько более разжиженной, очевидно вследствие гипотоничности окружающей среды. Общий вид ультратонкого строения внутренней части капли виден на рис. 1в.

Изучение поверхности изолированной протоплазмы показало, что она сформирована сплошной мембраной, толщиной 80—100 Å, морфологически близкой с мембранами внутренних структур (рис. 1г, д). Таким образом, можно сделать вывод о том, что на поверхности изолированной протоплазмы в присутствии двухвалентных катионов формируется пограничная мембрана.

Обработка мембраны детергентами, в частности 2% твином-20, приводила к ее деструкции; следовательно, основу структурной организации вновь сформированной мембраны составляют гидрофобные взаимодействия, характерные для многих биологических мембран. Поэтому вероятнее всего мембрана имеет липопротеидную природу.

Быстрота возникновения мембраны и зависимость от присутствия в среде катионов свидетельствуют о спонтанном характере ее формирования. Поэтому можно высказать предположение о том, что генетическое детерминирование в формировании мембраны осуществляется на уровне синтеза липидных и белковых предшественников. Сама же мембрана возникает путем самосборки, основным регулирующим фактором которой являются физико-химические условия среды.

Сборка мембраны, очевидно, протекает в несколько этапов, подобно тому как это описано для мембран митохондрии⁽⁹⁾. О том, что такой путь является наиболее вероятным, свидетельствуют результаты электрофизиологических исследований капель протоплазмы. Показано, что потенциал действия возникает не сразу, а лишь через некоторое время после формирования капли^(10, 11).

Реконструированный подобным способом протопласт, лишенный клеточных оболочек, может быть удобной моделью для изучения формирования мембран и поведения клеточных структур.

Сибирский институт физиологии и
биохимии растений
Сибирского отделения Академии наук СССР
Иркутск

Поступило
9 IV 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ N. Kamiya, K. Kuroda, Proc. Japan Acad., 33, 149 (1957). ² A. Shimizu, Sci. Rep., 14, № 2, 21 (1965). ³ Р. К. Салаяев, Поглощение веществ растительной клеткой, «Наука», 1969. ⁴ Р. К. Салаяев, А. С. Серявин, Информ. бюлл. Сибирск. инст. физиологии и биохимии растений, в. 6, 56, Иркутск (1970). ⁵ M. Yoneda, N. Kamiya, Plant and Cell Physiol., 10, 821 (1969). ⁶ R. K. Salyaev, In: IV European Regional Conference on Electron Microscopy, 2, Roma, 1968, p. 37. ⁷ K. Kuroda, In: Primitive Motile Systems in Cell Biology, 1963. ⁸ В. И. Чернышов, Информ. бюлл. Сибирск. инст. физиологии и биохимии растений, в. 11, Иркутск (1973). ⁹ Б. Ф. Поглазов, Сборка биологических структур, «Наука», 1971. ¹⁰ T. Toshifumi, I. Isao et al., Proc. Japan Acad., 47, 6, 554 (1971). ¹¹ I. Isao, I. Yoshio et al., Proc. Japan Acad., 47, 6, 549 (1971).

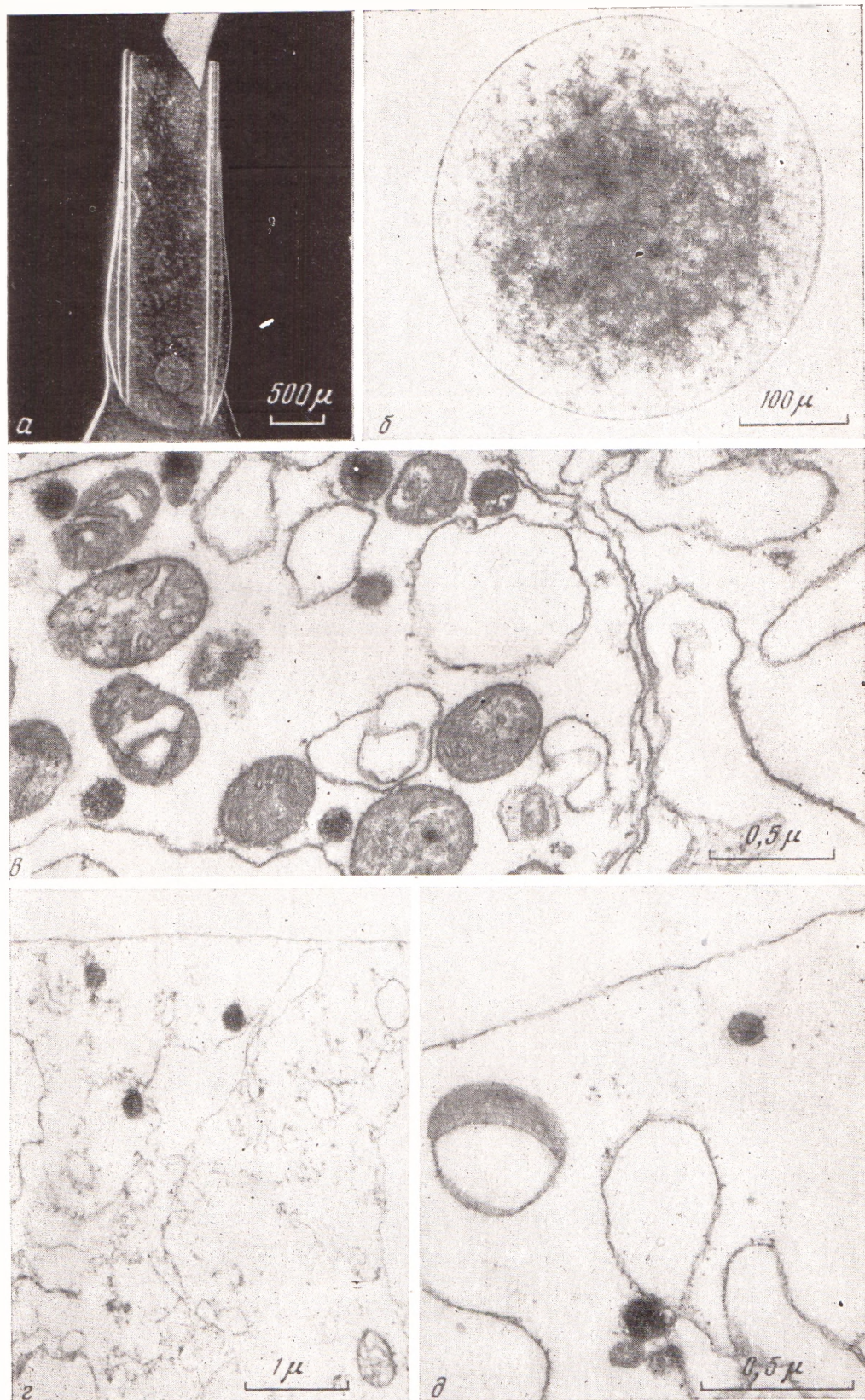


Рис. 1

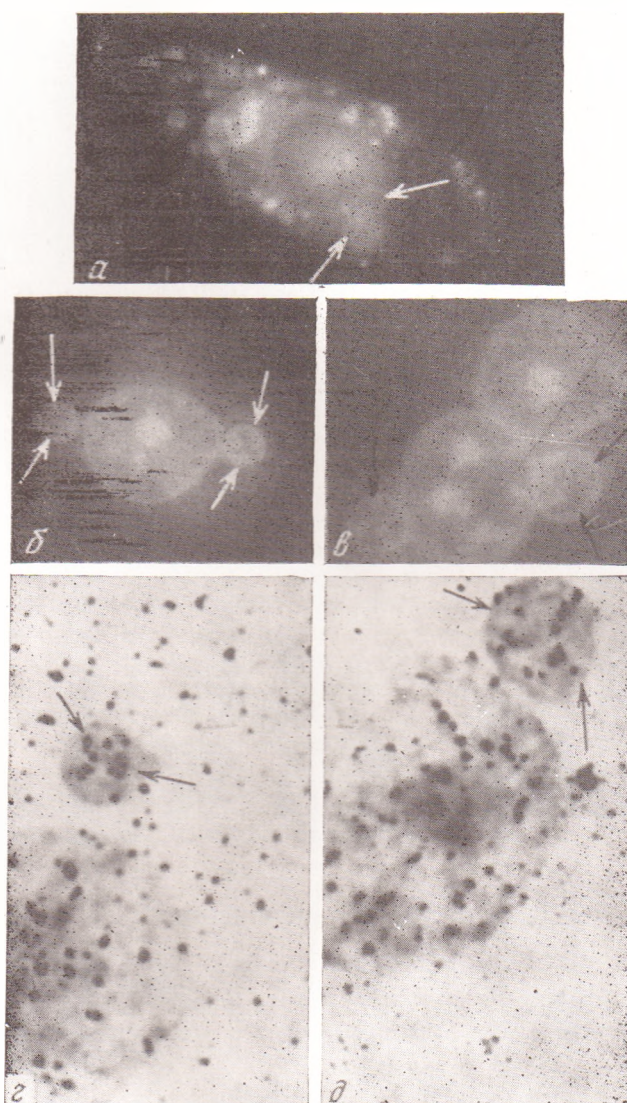


Рис. 1. Гетерокарноны куриный эритроцит — клетка HeLa.
 а — прижизненное окрашивание АО через 24 часа после
 гибридизации (270×). б, в — окрашивание АО с фикса-
 цией 70° этанолом через 5 час. (б) и через 24 часа (в)
 после гибридизации. г, д — радиоавтограф гетерокарнона,
 меченного H^3 -триптофаном через 5 час. (г) и через
 24 часа (д) после гибридизации. Стрелками указаны ядра
 эритроцитов