

的植株再生体系;而日益丰富多样的香蕉(*Musa spp.*)植株再生体系只有和基因工程技术配合才具有广泛的实用价值。二者的结合,将彻底改变香蕉栽培的历史。虽然目前的研究尚局限于为数不多的几个栽培品种,而且转入的基因也仅限于各类报道基因,但是其包括的基因类型及报道基因的成功表达已经为人们展现了两者的广阔前景。香蕉(*Musa spp.*)的基因改造,包括各种抗病虫害和影响果质、风味的目的基因的导入,将会简化育种手段,极大地缩短育种时间,从而促使香蕉(*Musa spp.*)品质的日益优化和多样化。1996年4月7日法新社报道的以色列培育成功苹果风味的香蕉就是一个很好的例子。

摘 要

本文综述了香蕉(*Musa spp.*)体外植株再生的各种方式,着重讨论了近几年发展起来的用于食用(果用及煮食)香蕉的几种适用于基因转化的高效植株再生系统。

参 考 文 献

- [1] 何佳幸等,1991, *Chinese Biochem. Society*, 20(1):9-20.
 [2] 凌定厚等,1990, *植物学报*, 32(12):966-968.
 [3] Samson J. A. 著,林伯达等译,1984,热带果树,福建科学技术出版社.
 [4] 许林兵,1992,香蕉生产技术,中山大学出版

社.

- [5] Bakry F. and Rossignol L., 1985, *Fruits*, 40:697-708.
 [6] Banerjee N., Schoofs J., Hollevoet S., Dumortier F. and Langhe De E., 1987, *Acta Hort.*, 212:727-729.
 [7] Dhed'a D., Dumortier F., Panis B., Vuylsteke D. and Langhe De E., 1991, *Fruits*, 46:125-135.
 [8] Escalant J. V. and Teisson C., 1989, *Plant Cell Report*, 7:665-668.
 [9] Harran S., 1991, Thesis Doc. Sci., Univ. Paris Sud., pp. 119.
 [10] Jarret R. L. Fisher J. B. and Litz R. E., 1985, *J. Plant Physiol.*, 121:123-130.
 [11] May G. D., Afza R., Mason H. S., Wiecko A., Novak F. J. and Arntzen C. J., 1995, *Bio Technology*, 13:486-492.
 [12] Megia R., Haicour R., Rossignol L. and Si-hachakr D., 1992, *Plant Science*, 85:91-98.
 [13] Novak F. J., Afza R., Duren Van M., Perea-Dallos M., Conger B. V. and Tang Xiaolang, 1989, *Bio Technology*, 7:154-159.
 [14] Okole B. N. and Schulz F. A., 1996, *Plant Science*, 116:185-195.
 [15] Panis B., Warwe Van A. and Swennen R., 1993, *Plant Cell Reports*, 12:403-407.
 [16] Reinert J., 1959, *Planta*, 53:318-333.
 [17] Sagi L., Panis B., Remy S., Schoofs H., Smet De K., Swennen R. and Cammue B. P. A., 1995, *Bio Technology*, 13:481-485.
 [18] Sagi L., Remy S., Panis B., Swennen R. and Velekaert G., 1994, *Plant Cell Reports*, 13:262-266.
 [19] Steward F. C., 1958, *Am. J. Bot.*, 45:705-708.

研究工作

凋亡而不出现 DNA 梯形带一例*

胡庆柳 丁振华 谭小华

(第一军医大学基础部放射医学教研室 南方医院消化科 广州 510515)

凋亡在形态上和分子机制上与坏死有明显的区别^[1]。凋亡是一个主动的、内在的、可控的现象,可以在生理和某些病理条件下发生。相反,坏死是一种自然的退变,总是在严重损伤的

情况下发生。两种细胞死亡在 DNA 断裂的方式上也表现出不同;许多报道认为细胞凋亡时

*国家自然科学基金资助项目(No. 39670192)。

DNA 选择性地核小体之间断裂^[2,3],而坏死细胞的 DNA 在任意位置上发生断裂^[4]。用琼脂糖凝胶电泳探测核小体之间 DNA 的断裂被广泛地用于证明凋亡的发生^[5-7]。但有许多人^[8,10,11,13]在研究中发现,细胞在发生凋亡时并不一定出现 DNA 梯形带。我们在研究 UVB 所致 NIH3T3 细胞凋亡时,也发现这一现象。

材料与方 法

一、细胞

NIH3T3 细胞株(南方医院血液科馈赠),昆明成年小鼠(本校动物所)胸腺原代培养细胞。

二、试剂及仪器

RPMI1640 由美国 GIBCO 公司生产。新生小牛血清由广州畜牧场生产。胰蛋白酶由德国 Serva 公司生产。紫外线灯管(单色光)为上海顾村光电仪器厂产品(功率为 15W,UVB 波长为 320nm)。CO₂ 培养箱为美国 Harris 产品。普通凝胶电泳仪为北京六一仪器厂生产。琼脂糖为杭州微生物试剂厂生产。

三、细胞培养

取昆明小鼠胸腺,在 Hank's 液中漂洗干净,去除其他组织,放入消毒后的培养皿中,用眼科剪反复剪成碎块,加入少量完全培养基(RPMI1640,15%小牛血清),用吸管反复吹打后均匀点于六孔培养板。吸掉多余的培养基,以保证组织块不被悬浮起来。放入 37℃、5%CO₂ 的温箱中培养 12 小时后,大部分组织块已紧密贴壁,周围长出少量细胞,加入适当的完全培养基继续培养,直至细胞长满。NIH3T3 细胞的培养按常规方法进行。

四、紫外线照射细胞及细胞的后处理

细胞长满后吸去培养基,每孔加入 1ml 无酚红 Hank's 液后分别进行紫外辐射(光源距样品垂直距离为 40cm)。吸去 Hank's 液,加入完全培养基。培养相应的时间后收集细胞,细胞涂片用苏木精-伊红染色,按常规方法提取 DNA。

五、DNA 提取

细胞经收集后加入 Eppendorf 管。加 500μl 蛋白酶 K 消化液(蛋白酶 K 50μg/ml,Tris 0.01mol/L,EDTA 0.005mol/L,SDS 0.5%),54℃ 消化 3 小时。加入 500μl 饱和酚,温和倒转 2-3min,离心(5000rpm,8min)。取上清 500μl,加入 500μl 氯仿+异戊醇(24:1)处理同上。取上清 400μl,加两倍体积预冷无水乙醇反复倒转,

置-20℃、30min 沉淀 DNA,离心(10000-12000rpm,15min)弃上清。用 70%乙醇涮一次。室温下晾干(3 小时)。加入 100μl TE 缓冲液(0.01mol/L Tris,0.005mol/L EDTA)溶解 DNA,同时加入 50μl RNA 酶(RNA 酶 1mg/ml,Tris·Cl 10mol/L,NaCl 15mol/L)。NIH3T3 和胸腺细胞 DNA 的提取方法一样。

六、普通琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖凝胶浓度为 0.7%,以 5v/cm 的电压电泳 1 小时,在紫外线反射透射仪下观察、照相。

结 果 与 讨 论

对 UVB 照射 10 分钟后培养 24 小时、36 小时的 NIH3T3 细胞 DNA 和 UVB 照射 10 分钟后培养 24 小时的昆明小鼠胸腺细胞 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳时,两个样本的 NIH3T3 细胞 DNA 均未出现凋亡梯形带,而胸腺细胞 DNA 出现典型的凋亡梯形带(图版图 1)。UVB 照射 10 分钟后培养 24 小时的 NIH3T3 细胞大部分发生凋亡(图 2,单箭头所示),还可看到凋亡小体(图版图 2,双箭头所示)。

NIH3T3 细胞经 UVB 照射 10 分钟后培养 24 小时,经 HE 染色镜下计数,发现 32% 的细胞发生凋亡,并出现凋亡小体,从普通电泳结果来看 DNA 已发生断裂,但并不都是从核小体间断裂(没出现 DNA 梯形带),说明 NIH3T3 细胞在发生凋亡时 DNA 并不总是从核小体之间断裂的。而以相同的条件处理昆明小鼠胸腺细胞,电泳出了典型的凋亡 DNA 梯形带。

Roy Walker, P.^[8]等在研究中发现,细胞凋亡过程中,DNA 的断裂分两个阶段进行。第一阶段由一种内源性核酸酶把 DNA 切成大分子片段,这一阶段足以引起染色质固缩。第二阶段由依赖于 Ca²⁺、Mg²⁺ 的内源性核酸酶将 DNA 进一步降解成小分子量的核小体片段。因此,凋亡细胞的 DNA 不一定断裂成核小体片段,DNA 电泳不一定出现梯形带。Tomei, L. D.^[9]等在研究 C3H/10T1/2 小鼠胚胎细胞的凋亡时也发现,凋亡不依赖于 DNA 核小体间的断裂。Zaker, Z. F.^[10]等人认为,内源性核酸酶的激活既不是凋亡早期阶段的触发步骤,也

不是必要的和必需的步骤。Schwartz, L. M.^[11]等在研究烟草腺节间肌细胞 (ISMs) 的死亡时发现, 其细胞膜皱缩但不形成凋亡小体。核固缩但并不沿核膜内表面形成电子致密层, 按 Kerr^[1]等的标准不能分类为凋亡。DNA 仍是大分子片段, 不断裂成核小体间片段, 不出现凋亡梯形带。但与小鼠 T 细胞的程序性死亡相比有共同的两个特性: 二者均有特别的生理信号启动; 二者均需基因的表达。因此, ISMs 细胞的死亡不是坏死, 作者倾向于认为 ISMs 也没有发生凋亡, 而是通过一种与坏死和凋亡不同的分子机制死亡。也有人认为, 凋亡包括一系列不同的步骤, T 细胞和 ISMs 分别代表这一过程的两个不同极端。

总之, 细胞凋亡的诱发存在多条途径, 是一个多步骤的过程^[12], 不能把 DNA 梯形带作为细胞凋亡的唯一标志, 而应与细胞凋亡的其他特征指标结合起来, 准确地判断细胞是否发生了凋亡。

摘 要

用普通琼脂糖凝胶电泳 UVB 照射后分别培养 24、36 小时的 NIH3T3 细胞 DNA, 均未出现梯形带, 但从细胞形态上看, 大部分细胞发生凋亡并出现凋亡小体。电泳 UVB 照射后培养 24 小时的昆明小鼠胸腺细胞 DNA, 出现典型的凋亡梯形带。说明细胞在发生凋亡时 DNA 并不总是从核小体之间断裂的, 不能把 DNA

梯形带作为判断细胞凋亡的唯一标准。

关键词: DNA 梯形带 UVB 凋亡

参 考 文 献

- [1] Kerr, J. F. R. et al., 1972, *Br. J. of cancer*, **26**:239-357.
- [2] Wyllie, A. H. et al., 1980, *Nature*, **284**:555-556.
- [3] Arends, M. J. et al., 1990, *Am. J. of Pathology*, **136**:583-608.
- [4] Kerr, J. F. R. et al., 1991, Definition and incidence of apoptosis: an histological perspective. In *Apoptosis: the Molecular Basis of Cell Death*, edited by L. D. Tomei and F. O. Cope. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 5-29.
- [5] Alnemri, E. S. et al., 1990, *J. of Biochem.*, **265**:17323-17333.
- [6] Newell, M. K. et al., 1990, *Nature*, **347**:286-288.
- [7] Mc Conkey, D. J. et al., 1991, *J. of Immunol.*, **146**:1072-1076.
- [8] Roy Warker, P. et al., 1994, *Exp. cell Res.*, **213**:100-106.
- [9] Tomei, L. D. et al., 1993, *PNAS*, **90**:853-857.
- [10] Zakeri, Z. F. et al., 1993, *FASEB*, **7**:470-478.
- [11] Schwartz, L. M. et al., 1993, *PNAS*, **90**:980-984.
- [12] Eileen White, 1993, *Genes & Dev.*, **7**:2277-2284.
- [13] Cohen, G. M. et al., 1992, *Biochem. J.*, **286**:331-334.

AN EXAMPLE OF APOPTOSIS WITHOUT DNA LADDERS

HU Qing Liu DING Zhen Hua TAN Xiao Hua
(Department of Radiation Medicine, The First Military
Medical University, Nanfang Hospital Guangzhou, 510515)

ABSTRACT

When conventional gel electrophoresis was used, it was found that DNA of NIH3T3 cells cultured for 24, 36 hours after UVB irradiation had no DNA ladders, but morphologically, the majority were apoptotic and had apoptotic bodies emerged. Thymocytes of Kunming mouse processed by the same method had DNA ladders. It is suggested that DNA cleavage of apoptotic cell is not always initiate at internucleosome. DNA ladders should not be the sole criterion for identifying apoptosis.

Key words: DNA ladder UVB apoptosis