

后细胞数目的匹配起着重要的作用。

这种简单和有效的控制细胞数的机制似乎不可能只局限于神经元。另外，除了提供组织和器官中不同细胞类型间有适当的匹配的机制外，这种对信号的竞争也可保证成体组织中细胞更新后的平衡，这样使得分裂所产生的细胞与死亡的细胞必然相等。如果说一定水平的生存因子只支持一定数目细胞的生存，那么任何细胞数目的增加都会加剧它们之间的竞争。如此迫使过多的细胞趋于死亡而回到正常的水平。当然，相反地，若细胞数目下降也可发生相反的过程。这一机制能够解释已在许多哺乳类器官中观察到的实验性诱导增生为什么会很快消退，如肾上腺皮质、肝、肾和胰。其消退之快是不能以细胞增殖减缓来解释的，不少情况是由于 apoptosis 使细胞死亡的大量增加。虽然细胞数目的调节通常认为主要是通过细胞增殖来调控的，但这些观察表明，即使在成年动物中细胞存活的控制也起着重要的作用。很可能生长激素和胰岛素样生长因子至少部分地以这种方式刺激脊椎动物生长，对有些培养的动物，胰岛素样生长因子不是促进细胞的增殖，而是促进细胞的生存。

除了控制组织和器官中细胞数目之外，对有限生

存因子的竞争还另有益处，即可不断地选出最具竞争力的细胞——适者生存的一种形式。竞争力最强的细胞可能是那些具有可获取生存信号受体的细胞，以及那些具有最有效的信号传递途径的细胞等。同样的选择过程也可能在细胞增殖水平起着作用，细胞间为有限数量的生长因子而竞争着，但仅仅籍此还不能如竞争生存因子那样有效地消除较少竞争力的细胞。然而，细胞间的竞争也付出了代价，它会有助于肿瘤的演进，从而也就是部分地解释了为什么五分之一的人会死于恶性肿瘤。

#### 今后的路

如果说许多类型的动物细胞为了生存需要，从其他细胞获得信号，有许多工作仍待探索；与注意细胞增殖相比，人们对细胞生存控制注意得较少。除了要确定正常细胞死亡的分子机制之外，人们还须确定：(1) 每种细胞的生存因子是什么？(2) 这些因子的受体是什么？(3) 由这些受体所激活的细胞间信号途径是什么？(4) 这些途径如何抑制细胞死亡的？(5) 每种生存因子的数量是如何调控的？总之，我们要像对细胞增殖一样地重视细胞的生存控制。

(李茂国译 章静波 姚曾序审校)

## 谷类植物原生质体研究的重要进展

Indra K. Vasil & Vimla Vasil

自1986年以来，已从所有重要的谷类植物，包括小麦、水稻、玉米和大麦，以及多种禾本科植物例如甘蔗的原生质体再生得到了完整的再生植株。此外，在一些实验室中已得到了谷类植物的体细胞杂种或胞质杂种以及一些带有引入的有用农艺性状的转基因植株。在过去的十年期间，由于两种关键性的技术进步：即建立胚性悬浮培养物作为分离全能性的原生质体的材料以及将外源DNA直接导入原生质体的技术用于遗传转化，才有可能使得在谷类植物的遗传操作方面有了迅速及深刻的进步。

### 引言

谷类植物的原生质体研究是一个重要却相当困难且颇有争议的研究领域。其所以重要，是因为从谷类植物的原生质体再生植株是获得体细胞杂种或胞质杂

种以及转基因植物的关键。而进行谷类植物原生质体培养所遇到的困难在于这样一个事实，即迄今只有从胚性悬浮系分离的原生质体已被证明具有全能性，而这种悬浮培养物很难建立并保持。最后，这一研究课题颇有争议，因为最初有一些人认为从胚性原生质体再生的植株是来自未经酶解消化的细胞或分生组织而不是来自原生质体。

这篇评述简短地回顾了谷类植物原生质体研究的早期工作，并记叙了在过去10年期间所取得的进展，使所有重要的谷类及禾本科植物的原生质体得以产生再生植株，以及获得水稻的体细胞杂种或胞质杂种，转基因水稻、玉米和一些果园内的禾本科植物成为可能。

注：本文译自 *Physiol Plant.*, 1992, 85: 279—283.

### 胚性悬浮系和胚性原生质体的概念

在早期利用一些双子叶植物叶肉原生质体所取得成功的基础上, 70年代科学家们利用数万种营养培养基、植物生长调节剂、酶混合物以及供体植物和原生质体的生长条件之不同组合进行了不懈的努力, 来诱导许多禾本科植物的叶片或幼苗分离的原生质体持续分裂(Potrykus, 1980)。可是这一切努力都属徒劳, 即使现在, 也没有任何令人信服的证据表明从任何谷类植物或禾本科植物的叶片或幼苗分离的原生质体被诱导持续分裂。然而, 就在同一时期, 许多研究人员证实从悬浮培养物中分离的原生质体在培养过程中很容易诱导分裂(I. K. Vasil, 1983), 但在这些实验中均没有再生植株, 因为这些供试的悬浮系本身是不能再生的。

基于这些从悬浮培养基分离的原生质体研究得到的令人鼓舞的结果, 以及下面的假设: 即从可再生的悬浮培养物中分离的原生质体再生植株, 在1979年于匈牙利塞格德市召开的第五届国际原生质体专题讨论会上, 首次提出了一种可选用的获得禾本科植物具全能性的原生质体的实验体系。它涉及到胚性悬浮培养系的建立。已证明从这种悬浮系分离的原生质体最终形成植株(I. K. Vasil & Vasil, 1980, V. Vasil & Vasil, 1980)。在这些早期研究中, 原生质体的植板率相当低, 并且不可能将由此得到的小植株移植到土壤中或者使它们生长成熟。在这些培养物中

含有少数较大的液泡化和未被消化的细胞, 发现它们并不能分裂。尽管如此, 仍有一些人提出, 在胚性原生质体培养中形成的原愈伤组织(protoctallus), 体细胞胚以及植株都来自这些极少数未消化细胞或“分生组织”, 而不是来自原生质体。这些批评纯粹出于假设, 因为从来没有证据表明, 在这些原生质体制样中存在任何“分生组织”或这些极少数的未消化细胞能够分裂。

自1986年以来, 许多研究人员提供了无可辩驳的证据, 表明从多种谷类植物和禾本科植物的胚性悬浮培养物中分离的原生质体具有全能性(表1-3)。这些研究突出了胚性悬浮培养物的重要性, 证实了那些极少数的未消化细胞, 如果确实于原生质体培养物中存在也是不能分裂的, 并且证明了这些再生植株确实来自原生质体。用来建立胚性悬浮培养基以及用来分离并培养原生质体的方法, 基本上与以前提出的方法相同(I. K. Vasil & Vasil 1980, V. Vasil et al. 1983)。更加均一的悬浮培养物, 更好的细胞壁水解酶以及原生质体的夹层饲养或琼脂糖包埋方法的利用, 极大地提高了原生质体的得率和植板率。

在谷类原生质体培养所取得的进展中, 得到快速生长及高度胚性的悬浮培养物可能是专一的最重要的因素。然而要想稳定保持这种可再生的培养物仍然极其困难, 进一步的发展即受到这种悬浮培养系有效性的限制。因此, 除了玉米和小麦这两种植物只有一种

表1 谷类植物和禾本科植物的胚性悬浮培养物原生质体的植株再生

植物名称	作者及年份
美国狼尾草	<i>Pennisctum americanum</i> I. K. Vasil & Vasil 1980 V. Vasil and Vasil 1980
羊草	<i>Panicum maximum</i> Lu et al. 1981
紫狼尾草	<i>Pennisctum purpureum</i> V. Vasil et al. 1983
甘蔗属一种	<i>Saccharum sp.</i> Srinivasan & Vasil 1986 Chen et al. 1988
稻	<i>Oryza sativa</i> Yamada et al. 1986 Kyozuka et al. 1987, 1988
棒头草	<i>Polypogon fugax</i> Chen & Xia 1987
野茅	<i>Dactylis glomerata</i> Horn et al. 1988 a
苇状羊茅	<i>Festuca arundinacea</i> Dalton 1988
黑麦草	<i>Lolium perenne</i> Dalton 1988 Creemers-Molenaar et al. 1989
多花黑麦草	<i>Lolium multiflorum</i> Dalton 1988
玉米	<i>Zea mays</i> Rhodes et al. 1988 a, Prioli & Sondahl 1989 Shillito et al. 1989 Morocz et al. 1990
小麦	<i>Triticum aestivum</i> V Vasil et al. 1990 Chang et al. 1991
小米	<i>Setaria italica</i> Dong & Xia 1990
小糠草	<i>Agrostis alba</i> Asano & Sugiura 1990
高粱	<i>Sorghum vulgare</i> Wei & Xu 1990
大麦	<i>Hordeum vulgare</i> Jahne et al. 1991

表2 谷类和禾本科植物的体细胞杂种和胞质杂种

体细胞杂种或胞质杂种组合	作者及年份
美国狼尾草 + 羊草	<i>Pennisetum americanum</i> + <i>Panicum maximum</i> Ozias-Akins et al. 1986
美国狼尾草 + 甘蔗	<i>Pennisetum americanum</i> + <i>Saccharum officinarum</i> Tabaeizadeh et al. 1986
美国狼尾草 + 单果片小麦	<i>Pennisetum americanum</i> + <i>Triticum monococcum</i> V. Vasil et al. 1988 a
水稻 + 稻种	<i>Oryza sativa</i> + <i>Echinochloa oryzicola</i> Terada et al. 1987
水稻 + 野生稻	<i>Oryza sativa</i> + <i>Oryza</i> (wild sp.) Hayashi et al. 1988
水稻(细胞质雄性不育 + 可育)	<i>Oryza sativa</i> (cytoplasmic male sterile + fertile) Yang et al. 1989
水稻(细胞质雄性不育)	<i>Oryza sativa</i> (CMS) Kyozuka et al. 1989

表3 谷类植物和禾本科植物原生质体的转基因植株

植物名称	作者及年份
玉米 <i>Zea mays</i>	Rhodes et al. 1988b; G. Donn, M Nilges and S. Morocz, personal communication
水稻 <i>Oryza sativa</i>	Shimamoto et al. 1989, Datta et al. 1990
野茅 <i>Dactylis glomerata</i>	Horn et al. 1988b

以极低频率形成的特殊类型的愈伤组织可以形成可再生的悬浮系(Armstrong & Green, 1985; Redway et al., 1990)以外, 在大多数情况下, 都是利用结构致密的且组织化的胚性愈伤组织来起始悬浮培养。禾本科植物的胚性悬浮系不但难以建立, 而且在培养过程中也很难保持。幸运的是, 由于它们具有体积小、高度细胞质化的性质, 并且没有任何大的液泡, 使得这种胚性细胞很适于冷冻保存(Shillito et al., 1989; Gnanapragasam & Vasil, 1990)。这种冷冻保存的悬浮系可提供长期并且可靠的全能性细胞之来源, 同时也节省了大量时间和精力, 否则就必须花费许多精力来建立新的悬浮培养系。

#### 体细胞杂种和胞质杂种

在谷类植物原生质体培养中所取得的进展促进了它们在体细胞杂交中的应用。这样, 利用抗药性细胞系以及原生质体的碘乙酸失活得到了首批禾本科植物的体细胞杂种的愈伤组织(Ozias-Akins et al. 1986, V. Vasil et al. 1988等)。随后, 在水稻中得到了体细胞杂种及胞质杂种植株, 其中包括胞质雄性不育水稻的杂种(表2)。这方面的工作极其有限, 可能是因为总的说来, 迄今尚未证实体细胞杂种对创造出新的基因型非常有用。

目前有人利用玉米卵和精子的原生质体的电融合来进行体外受精研究(Kranz et al., 1991 a, b)。这些融合产物可以存活并发展为多细胞群体。这类研究对于了解与控制受精作用有关的因素, 以及开发能

克服某些类型性不亲和性的方法可能非常有用。

#### 转基因谷类植物和禾本科植物

谷类植物原生质体的最有价值的应用是在遗传转化方面。聚乙二醇(PEG)法和电穿孔法都已被用来将DNA直接导入从悬浮培养物分离的原生质体中。尽管PEG处理过的原生质体的植板率比电穿孔处理要好些, 大多数研究人员仍普遍采用电穿孔法, 这是由于后者易于操作并且十分方便(V. Vasil et al., 1988 b)。迄今在许多禾本科植物中都证实了报道基因如氯霉素乙酰转移酶基因(CAT),  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因(GUS)以及荧光素酶基因的瞬时表达(Fromm et al. 1985, McCarty et al. 1991等)。通过利用选择性的抗药性基因, 目前已得到了一些稳定表达的转化型愈伤组织系(Potrykus et al. 1985, Hauptmann et al. 1988 a)。由于许多禾本科植物的细胞对卡那霉素具有很高的天然抗性, 所以更常采用其他一些选择性标记物如潮霉素、氨基嘌呤以及某些除草剂, 它们能提供更严格的选择作用。

利用上述方法, 已得到水稻、玉米以及一些果园禾本科植物的转基因植株(表3)。在玉米和水稻中, 已经证实被导入的基因能按照孟德尔遗传方式传递到子代。最近, 在利用病毒的外壳蛋白基因对水稻原生质体进行转化后, 得到了能抗水稻条斑病毒的可育的水稻植株。预计在本世纪最后十年结束之前, 具有农业上用有基因的转基因谷类植物将会商品化生产。

#### 瞬时表达检测在分子生物学中的应用

除了上述的将原生质体用于实用目的, 它们还将逐步用于瞬间表达的检测以研究启动子的功能、内含子效应, 以及谷类植物基因的结构、功能和调节。

花椰菜花叶病毒(CaMV)的35S启动子是一种高效启动子, 已被广泛而有效地用于植物转化。然而在禾本科植物中, 利用35S启动子获得的基因表达水平比在双子叶植物中要低10至100倍(Hauptmann et al. 1987)。低于最佳的基因表达水平可能是造成在禾谷类植物转化中经常遇到的转化子难以检出以及转化率低的原因。这促使我们利用谷类植物原生质体的瞬间表达检测来寻找其他能增强基因表达的启动子(Callis et al. 1987, McElroy et al. 1990)。利用内含子也能使基因表达得到明显提高。单子叶和双子叶植物的内含子都能极大地提高基因表达水平, 这不仅在转化子的有效选择中, 而且可用于在转基因植物中获得

农业上有用基因的高水平表达。已经证明, 玉米原生质体中的瞬间表达的检测对确定控制甘露碱合成酶基因(mas, TR 2')的转录的调节因子有用。

McCarty et al. (1991)已利用原生质体中的瞬间表达来阐明许多单子叶植物基因的结构和调节, 例如玉米中编码一种与调节种子成熟及花色素苷生物合成途径有关的新蛋白的Viviparous-1(在母株上萌发的)基因的结构。这些研究结果表明, vp 1是一种可能与增强种子特异性激素反应有关的新转录因子。

上面列举的少数几例, 加上表1至3上所列举的资料, 记录了过去10年里在谷类植物原生质体研究方面所取得的突出进展, 并强调了它在植物品种改良以及了解植物生长和发育的分子基础方面所起的重要作用。

(黄健秋译 卫志明、周荣仁审校)

## 研究工作

# 溶酶体膜 $H^+$ -ATP 酶的细胞化学观察

姜淑翠\* 钟慈声 刘海群

(上海医科大学生物物理学教研室 200032)

溶酶体是细胞内 pH 值为 4.5~5.0 的酸性细胞器, 已有大量工作证明, 溶酶体内部的酸环境是依靠其膜上的质子泵维持的<sup>[1,2]</sup>, 后者是一种提供能量推动质子逆浓度梯度向溶酶体内部移动的质子转运三磷酸腺苷酶(proton-translocating ATPase 简称  $H^+$ -ATPase)。有关溶酶体膜上  $H^+$ -ATP 酶活性分布的细胞化学工作的报道较少。1989年Luo等<sup>[3]</sup>以对硝基苯酚磷酸盐(p-nitrophenylphosphate 简称 p-NPP)为底物, 以铅为捕捉剂, 用细胞化学方法成功地显示了大鼠肝细胞溶酶体膜上的  $H^+$ -ATP 酶分布。由于用铅作捕捉剂存在非特异染色沉淀等缺点, 近年来有用铈为捕捉剂进行细胞化学工作的报道, 但尚未见以铈为捕捉剂研究  $H^+$ -ATP 酶的报道。本实验室用铈为捕捉剂观察了大鼠肝细胞、血窦内皮细胞和枯否氏细胞内溶酶体膜上  $H^+$ -ATP 酶的分布, 现

报告其结果如下。

## 材 料 和 方 法

实验用成年 Sprague Dawley 大鼠, 体重 200—250 克, 戊巴比妥钠 40 mg/kg 体重腹腔注射进行麻醉, 用含肝素的 0.9% 生理盐水通过左心室进行灌注 5—10 分钟, 然后用含 2% 多聚甲醛和 0.25% 戊二醛的 0.1 mol/L 二甲胍酸钠缓冲液(pH 7.4)进行灌注固定。取肝组织切成 1 mm<sup>3</sup> 的组织块数个, 于 0.1 mol/L 二甲胍酸钠缓冲液(含 5% 蔗糖, pH 7.4, 4 °C)中漂洗过夜。用微切片器(Microslicer)切成 40 μm 厚的薄片, 采用改良的 Kobayashi's<sup>[4]</sup> 以铈为捕捉剂的细胞化学反应液, 来显示铈-依赖、哇巴因-不敏感的对硝基苯酚磷酸酶(p-NPP 酶)。组织薄片在含 5% 蔗糖的 50 mmol/L Tricine-KOH 缓冲液(pH 7.4)中室温下预温育 30 分钟。然后, 再移至 37 °C 标准温育液中温育 20 分钟。标准温育液用 50 mmol/L Tricine-

\* 现在青岛医学院工作。