

- and non-dividing mammalian cells using antibody to 6S bovine brain tubulin. In: Borger SM, De Brabander M(eds) Microtubule and microtubule inhibitors. North-Holland publishing Company, Amsterdam
- [4] Yama Saki S, Maeda T, Miki-Nomura T 1982, Flexural rigidity of singlet microtubules estimated from statistical analysis of fluctuating images. In: Sakai H, Mohri H, Borisy GG (eds) Biological functions of microtubules and related structures. Academic, New York, pp 41-48
- [5] Weiss P A, Mayr R 1971, *Acta Neuropathol Suppl* 5:187-197. 198-206
- [6] Osborn P R, Weber 1976, *Exp Cell Res*. 103:331-340
- [7] Burton P R, Hinkley RE, Himes RH 1974, *J Submicroscopic Cyto.* 16:311-326
- [8] Pierson GB, Burton PR, Himes RH 1978, *J Cell Biol.* 76:223-228
- [9] Macgregor HC, Stebbings H 1970, *J Cell Sci.* 6:431-449
- [10] Ponstingl H 1981, *Proc Natl Acad Sci. USA* 78:2757-2761
- [11] Cleveland DW 1980, *Cell* 20:95-105
- [12] Coughlin BA, White HD, Purish DL 1980, *Biochem Biophys Comm* 92:89-94
- [13] Vallee J, Burn R, Sternlicht H 1982, *J Cell Biol.* 92:435-442
- [14] Szasz J, Burn R, Sternlicht H 1982, *J Biol Chem.* 257:3697-3704
- [15] Bright GR, Fisher GW, Rogowska J, Taylor DL 1987, *J Cell Biol.* 104:1035-1046
- [16] Schleicher M, Iverson DB, Van Eldick IJ, Watterson DM 1982, Calmodulin. In: Lloyson(ed) The cytoskeleton in plant growth and development. Academic. London. pp:85-108
- [17] Tilney LG, Porter KR 1967, *J Cell Biol* 134:327-343
- [18] Rungger-Brandle E 1977, *Exp Cell Res* 1:359-375
- [19] Borgers M, De Brabander M, Van Reempts S, Wouters AF, Jacob WA 1977, Intranuclear microtubules in lung mast cells of guinea-pigs in anaphylactic shock. *Lab Invest* 37:1-8
- [20] Menko AS, Tan KB, 1980, *Biochim Biophys Acta* 629:359-370
- [21] Dustin P, Flament-Durand J, Couck AM, Depierreux M 1980 *J Submicrosc Cytol* 12:611-616
- [22] Brown DL, Stearns ME, Macrae TH 1982, Microtubule organizing centre. In: Lloyd CW(ed) The cytoskeleton in plant growth and development. Academic London, pp:55-84
- [23] Kurz-Isler G, Wilberg H 1978, *Cell Tissue Res* 191:15-26
- [24] Marcia M. Falcouer, G. Donaldson, and R. W. Seagull 1988 *Protoplasma* 144:46-55
- [25] Harvey C. Hoch, Bruce E. Tucker, Richard C. Staples 1987, *European Journal of Cell Biology* 45:209-218

## 蛋白质合成活动与卵母细胞成熟

王亦文 左嘉客

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

两栖类动物长足卵母细胞的发育停滞在第一次减数分裂的前期阶段。在孕酮(progesterone)的诱发下,卵母细胞恢复减数分裂,然后再度停滞在第二次减数分裂的中期阶段,届时作为成熟的卵球等待受精。

卵母细胞趋于成熟的形态学标志是核膜破

裂(germinal vesicle breakdown,缩写GVBD)、染色体凝聚、纺锤体形成,并有第一极体排出。在分子水平上,经孕酮处理后相继发生的重要变化是:卵母细胞内cAMP浓度下降,Ca<sup>2+</sup>浓度上升,蛋白质磷酸化增强,蛋白质合成增加以及促成熟因子(MPF)之类的生物活

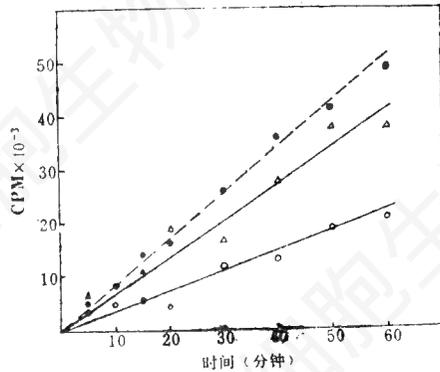


图 1 卵母细胞蛋白质合成率<sup>[3]</sup>

- MPF 诱导成熟的卵母细胞
  - ▲ 孕酮诱导成熟的卵母细胞
  - 未经处理的卵母细胞
- 纵坐标表示同位素标记的氨基酸的参入量

性物质出现<sup>[1]</sup>。

在卵母细胞成熟过程中，蛋白质合成率增加了 1 倍(图 1)<sup>[3]</sup>。Woodland 等人<sup>[2]</sup>证明，多聚体中的核糖体量增加约 1 倍；按细胞氨基酸参入率推算，蛋白质的绝对合成率由成熟前的约  $17.5 \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1}$  增加到成熟后的约  $35.4 \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1}$ <sup>[3]</sup>；增加的蛋白质中主要是一些原有蛋白质(如组蛋白)，同时也有些新蛋白质的出现<sup>[4]</sup>。有些新蛋白质可能参与成熟的调控机制。

本文围绕两个主要问题来讨论卵母细胞成熟中蛋白质的合成活动：第一，蛋白质合成率增加的机理；第二，蛋白质合成活动与成熟的关系。

在成熟前，长足卵母细胞中始终保持低水平的转录活动，而在成熟过程中略有提高。转录抑制剂放线菌素 D 不能阻断由孕酮诱发的卵母细胞成熟过程；人工去核的卵母细胞仍能对孕酮作出应答反应，细胞质中蛋白质合成增加，MPF 照常出现。由此说明，成熟过程中的转录活动对蛋白质合成没有产生明显的影响，与卵母细胞成熟也没有关系<sup>[5]</sup>。

### 一、蛋白质合成率增加的机理

在卵母细胞的发生过程中，由 I 期生长到 VI 期的卵母细胞，其蛋白质的合成率增加 127

倍(图 2)<sup>[6]</sup>，这是卵体贮存的 mRNA 逐渐动员到多聚体上的结果。Laskey 等人<sup>[7]</sup>发现，注射到 VI 期(长足)卵母细胞中的外源 mRNA，必须在牺牲内源蛋白质合成的条件下才能被翻译，因此认为长足卵母细胞中翻译机构某些成分的含量或活动有限，这些组份的补充或活性提高是增加蛋白质合成水平的前提。将外源 mRNA 注入 IV 期以前的卵母细胞中，却可提高蛋白质的合成水平，说明至少在 IV 期以前，蛋白质合成的限制因素是 mRNA<sup>[8]</sup>。

另一方面，Richter 等人<sup>[9]</sup>发现，成熟时多聚体中的核糖体虽然增加了一倍，mRNA 的核糖体聚合密度却与对照组的一致，每个 mRNA 分子保持在平均聚合大约 10 个核糖体的水平上，成熟前后核糖体翻译起始速度和 mRNA 的周转过渡时间并没有改变。这似乎表明，蛋白质合成的增加是由于投入到翻译系统中的 mRNA 数量增多，核糖体只是被动地从事翻译工作。

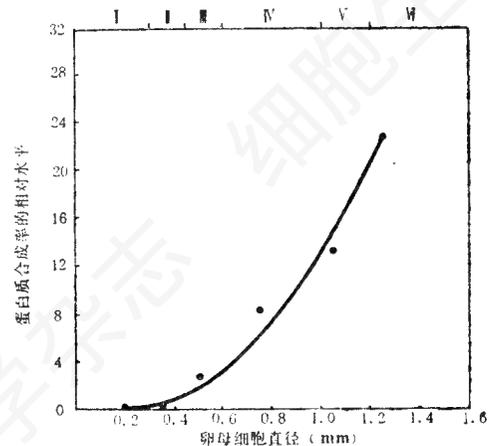


图 2 卵子发生过程中不同阶段的卵母细胞中蛋白质合成率<sup>[6]</sup>

(发育阶段根据 Punlont 方法确定。各点代表不同阶段的平均合成率)

在卵母细胞成熟过程中，可能出现某些因素，既动员了贮存中的 mRNA，又增强了翻译机构的合成能力。成熟过程中蛋白质合成的增加是 mRNA 与核糖体机构两者协调活动的

结果。

### 1. mRNA的动员

两栖类卵母细胞贮存的75% Poly(A) RNA, 其一维结构中含散在插入顺序, 处于加工前状态。体外和体内实验都表明, 含有插入顺序的mRNA不能被翻译, 除非经过剪切加工, 去除插入顺序。

真核细胞中的mRNA大部分是以核糖核蛋白体(RNP)的形式存在。mRNP中含有mRNA(加工前或加工后的)及蛋白质成分。mRNA的加工活动发生在mRNP中。必须去除mRNP上的某些蛋白质(称作掩盖蛋白, masking protein), 加工后的mRNA才能被翻译表达。两栖类卵母细胞中也具备这种掩盖蛋白。在体外, 将分离到的掩盖蛋白与mRNA结合, 然后注入卵母细胞中, 可阻止mRNA的翻译<sup>[10]</sup>。迄今尚无有关掩盖蛋白在卵内阻断翻译的直接证据。这种掩盖蛋白大量存在于小卵中, 随着卵母细胞的发育成长, 其含量逐渐减少, 似乎表明Poly(A)RNA自贮存库中逐渐释放; 与此同时, 蛋白质合成大幅度增加。这些现象间接证明掩盖蛋白与蛋白质合成的调控有关。

细胞游离的mRNP和多聚体的mRNP中, 某些蛋白质的磷酸化状态可能与翻译调节有关<sup>[11]</sup>。在mRNP中, 有些蛋白质具有蛋白激酶活性<sup>[11]</sup>。在卵母细胞的成熟过程中, 有关这些蛋白磷酸化与蛋白质合成增加之间的关系, 还有待进一步研究。

Richter和Smith<sup>[12]</sup>曾分析外源mRNA, 以及外源mRNA与内源mRNA竞争结合卵母细胞翻译机构进行表达的情况。他们选用了四种外源mRNA: 兔珠蛋白mRNA, 腺病毒蛋白mRNA(IX)、玉蜀黍玉米醇溶蛋白mRNA和鸡卵清蛋白mRNA, 前两种外源mRNA是由胞质中游离的核糖体翻译, 后两种mRNA是由粗糙内质网(RER)上的核糖体翻译。前两种外源mRNA不仅与内源mRNA发生竞争, 相互间也有竞争, 而后两种外源mRNA与内

源mRNA的竞争能力很小, 被翻译的量也很少。倘将粗糙内质网上抽提到的某些蛋白质成份与后两种外源mRNA一起注入卵母细胞, 则翻译水平大大提高。因此认为, 卵母细胞内可能存在一种动员因子(recruitment factor), 这种蛋白质负责动员贮存的mRNA投入到翻译机构中去。

### 2. 翻译机构的活动

#### 核糖体

有关翻译机构方面的研究工作, 大部分集中在核糖体蛋白质磷酸化的问题上。在卵内, 核糖体小亚基的S6蛋白丝氨酸残基可以被磷酸化, 每分子S6蛋白可接受多达5个磷酸基团。S6蛋白磷酸化是多种细胞中广泛存在的现象, 与细胞的生长、分化以及其他功能状态密切相关。S6蛋白位于核糖体小亚基的mRNA结合点和eIF-2(eukaryotic initiation factor 2)作用位点的附近, 推测与核糖体的功能状态有关。S6蛋白磷酸化的核糖体优先参加多聚体中。多聚体中S6蛋白磷酸化程度比游离核糖体中的高<sup>[13]</sup>。但是, 在有些情况下, 则并非如此<sup>[14]</sup>。在两栖类卵母细胞的成熟过程中, S6蛋白磷酸化的增加程度与蛋白质合成的增加相一致, 但在另一些报道中, 两者并没有呈正的相关性<sup>[15]</sup>, 蛋白质合成增加, 但S6蛋白磷酸化未增加, 或S6蛋白磷酸化程度增加, 而蛋白质合成量未增加。看来, S6蛋白磷酸化对蛋白质合成, 既不是必要条件更不是充分条件。据推测, 核糖体小亚基S6蛋白的磷酸化, 可能是细胞在较高离子强度或较高pHi条件下维持其核糖体正常功能状态的一种保护机制<sup>[16]</sup>。

在多种不同的生物材料(包括两栖类卵母细胞)中, S6蛋白磷酸化、蛋白质合成增加与细胞内pHi上升似乎有关。成熟过程中, 卵母细胞内pHi上升0.3—0.4个单位。有报道认为提高细胞内pHi可引起S6蛋白磷酸化, 并促使蛋白质合成的增加。但后来的一系列工作又否定了pHi上升与蛋白质合成增加的必然联

系, 虽然蛋白质合成活动要求  $pHi$  值不低于某一阈值。在卵母细胞成熟过程中, S6 蛋白质磷酸化、 $pHi$  上升与蛋白质合成增加之间的联系可能只是一种表面现象, 非必然的<sup>[15]</sup>。

#### 翻译机构中的蛋白质因子

卵母细胞成熟过程中, 卵内 cAMP 浓度下降, 蛋白质合成增加。在网织红细胞中, 使 eIF-2 的小亚基磷酸化, 可抑制其翻译起始活动。已发现三类 eIF-2 激酶, 其中一类的活动由依赖于 cAMP 的蛋白激酶的激活, cAMP 浓度与蛋白质合成之间呈反向关系。在两栖类卵母细胞中, 注入依赖于 cAMP 蛋白激酶的催化亚基, 或者注入磷酸二酯酶的抑制剂时, 均可阻止蛋白质合成, 并抑制卵母细胞成熟。因此, 由 eIF-2 磷酸化来调控蛋白质的合成是具有普遍意义的。

最近, Audet 等人<sup>[17]</sup>试图分离出由 Laskey 等人提出的结合多聚体的蛋白质合成限速因子, 但未能从兔网织红细胞和爪蟾肝脏的多聚体中获得。然而, 将从真核生物中分离到的一些起始因子分别注射到卵母细胞中, 发现 eIF-4 A 能使蛋白质的合成量增加一倍, 与孕酮处理时所得到的结果相似。以 eIF-4 A 与孕酮同时处理, 没有获得加合结果, 这似乎说明 eIF-4 A 的确主宰着蛋白质的合成。不同的是, eIF-4 A 并不能诱导新蛋白质的出现, 致使卵母细胞不能成熟。eIF-4 A 可能是 mRNA 帽结合蛋白 (cap binding protein) 的一个亚单位, 具有 ATPase 活性。另有人提出, eIF-4 A 能使 mRNA 二级结构解旋, 使之与核糖体 40 S 亚单位结合。在正常情况下, 如果 eIF-4 A 确定促进蛋白质合成, 则在卵母细胞成熟过程中, 蛋白质合成增加是否与 eIF-4 A 量的增加或者活性增加有关, 还有待分晓。

## 二、蛋白质合成活动与卵母细胞成熟的关系

### 1. 蛋白质合成的总体变化特点

从卵子发生开始直到卵母细胞成熟, 各个

主要发育阶段上的蛋白质合成水平都是限定了的。蛋白质的合成水平是卵母细胞不同发育阶段的生化标志之一。随着卵母细胞的成长, mRNA 自贮存库中逐渐释放, 蛋白质合成水平不断增加。IV 期以前的小卵中注入外源 mRNA, 可提高蛋白质的合成水平, 但这种增加是有限度的, 绝不可能超越 VI 期卵母细胞的合成水平<sup>[8]</sup>。对已经长足的卵母细胞, 采用某些方法提高蛋白质合成水平, 至多只能增加一倍, 达到卵母细胞正常成熟的极限水平<sup>[8]</sup>, 表明卵母细胞中又出现了新的限制蛋白质合成的因素。

蛋白质合成水平也不是由某单个因素控制的, 在不同时相上, 出现不同的限制因素。卵母细胞蛋白质合成的增加是翻译系统中各方面因素协同作用的结果。影响蛋白质合成的外因也不只一种。

在人为条件下, 小卵的蛋白质合成活动虽可提前达到相当于长足卵母细胞的水平, 但这类卵母细胞仍不能在孕酮的诱发下成熟。同样, 长足卵母细胞的蛋白质合成水平可人为地提高到相当于成熟卵球的水平, 但这样的卵母细胞并没有成熟。因此, 对卵母细胞成熟而言, 蛋白质合成是一种相对独立的活动。在卵母细胞成熟过程中, 蛋白质合成量方面的变化, 与成熟现象似乎没有必然的联系; 可是从蛋白质合成的质方面来看, 似乎某些蛋白质的出现与卵母细胞成熟有着内在联系<sup>[17]</sup>。

### 2. 蛋白质合成、磷酸化与 MPF<sup>[18]</sup>的形成

在两栖类成熟的卵母细胞中发现 MPF 之后, 很快又在成熟的海星卵、体外培养的动物躯体细胞以及酵母细胞中得到证实。处于分裂期的细胞质中含有 MPF, 而处于间期和早 G 1 期的细胞质中不含有 MPF。MPF 是一种具有生物活性的蛋白质, 注入未经任何处理的长足卵母细胞质中, 能使之成熟; 将间期的躯体细胞核移植入含有 MPF 的细胞质中, 会导致躯体细胞核发生类同于寄主细胞核的变化。显然, MPF 是一种广泛存在的调节细胞周期的

因子,故又称为促分裂因子(M-phase promoting factor)<sup>[19]</sup>。

非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)的卵母细胞经孕酮刺激趋向成熟。在孕酮作用后的第3小时左右,细胞质内才开始出现MPF,再经2小时,卵母细胞开始发生GVBD。向未经孕酮处理的长足卵母细胞中注入MPF,不仅能在2小时内使受体卵发生GVBD,而且使受体卵母细胞蛋白质磷酸化增加,蛋白质合成增加,合成增加量甚至比孕酮诱导的还要高一些(图1)<sup>[3]</sup>。

在孕酮处理卵母细胞后的早期阶段,倘以蛋白质合成抑制剂放线菌酮追加处理,可阻止该卵母细胞成熟,这段时间称作放线菌酮敏感期。在敏感期之后,加入放线菌酮不会影响卵母细胞成熟过程的继续推进。MPF是在放线菌酮敏感期结束时出现的,提示卵母细胞成熟过程早期的蛋白质合成活动可能是产生MPF的必要条件。一旦卵母细胞中MPF出现,届时抑制蛋白质合成不会对成熟的进展产生影响<sup>[20]</sup>。但是,有些因素虽能一般性地提高卵母细胞蛋白质合成的水平,却并不能使之成熟,很可能是因为这些因素没有能够诱发新蛋白产生的缘故<sup>[17]</sup>。例如,给非洲爪蟾成体注射适当低剂量的绒毛膜促性腺激素,以适当刺激卵母细胞,其蛋白质合成活动可达到成熟的水平,卵母细胞并没有成熟,但对孕酮的作用较对照组的敏感。这些卵母细胞经孕酮作用后不仅成熟,蛋白质合成量还额外地增加近30%。显然,研究这部分额外合成的蛋白质成分是很有意义的。

在海星卵母细胞中注入较低剂量的放线菌酮,可完全抑制它的蛋白质合成活动,但对MPF的出现和GVBD都没有影响<sup>[21]</sup>。不禁要问,为什么在两栖类卵中MPF的出现似乎依赖于蛋白质合成活动,而在海星卵中MPF却与蛋白质合成无关呢?

Maller等<sup>[22]</sup>分析卵母细胞成熟过程中蛋白质磷酸化变化情况时发现,在接近GVBD的

时候,卵母细胞内蛋白质的<sup>32</sup>P参入量增加了约2.5倍(图3)。蛋白质磷酸化的增加与MPF的出现在时相上是一致的。实验还表明,蛋白质磷酸化的增加与卵母细胞成熟总是相伴发生。当卵母细胞成熟受抑制时,蛋白质磷酸化也不会增加。因此认为,蛋白质磷酸化是与成熟过程密切相关的重要活动。能提高蛋白质磷酸化的某些因素对成熟有促进作用<sup>[23]</sup>。但迄今尚未发现能直接提高蛋白质磷酸化反应而引起卵母细胞成熟的因素。Carmen等<sup>[24]</sup>发现,向非洲爪蟾卵母细胞注射Ha-ras蛋白可诱导成熟,cAMP浓度却无变化;霍乱毒素也只能部分地抑制由Ha-ras蛋白诱导的成熟作用。上述结果无疑说明,在Ha-ras蛋白诱导成熟的机理中,cAMP未起调控作用。在霍乱毒素促进cAMP含量增加的情况下,由孕酮诱导的卵母细胞成熟受到抑制,pHi上升和S6蛋白磷酸化相应地也受到抑制,由胰岛素诱导的成熟虽也受霍乱毒素抑制,但pHi上升和S6蛋白磷酸化仍照常发生<sup>[25]</sup>。这些提示,上述的效应物可能是通过不同的途径启动卵母细胞的成熟活动。

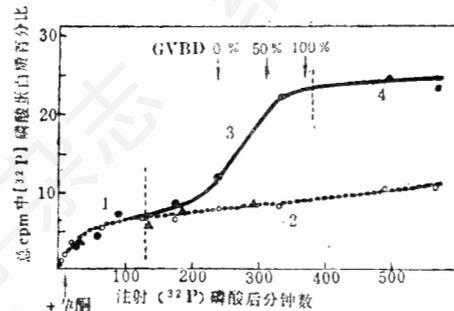


图3 卵母细胞成熟过程中蛋白质磷酸化的变化<sup>[22]</sup>

- 孕酮诱导成熟的卵母细胞
  - 未经处理的卵母细胞
  - △ 由放线菌酮抑制了孕酮诱导成熟的卵母细胞
- 1、3、4 分别表示不同的阶段

如前所述,MPF注射到未经任何处理的长足卵母细胞中,可使该受体卵成熟。MPF诱发受体卵成熟的作用,不受放线菌酮的影

响<sup>[20]</sup>；蛋白质合成虽受抑制，蛋白质磷酸化反应和 GVBD 均照常进行。细胞质系列转移实验表明，MPF 可在受体卵中扩增 (Amplification)，去除细胞核也不影响 MPF 扩增<sup>[26]</sup>。卵母细胞成熟过程中 MPF 的出现和扩增可能分作两步：第一步是少量 MPF 的激活，此过程依赖于蛋白质合成，第二步是 MPF 的自我激活。Gerhart 等<sup>[27,28]</sup>研究了 MPF 扩增与蛋白质合成的关系。MPF 诱导卵母细胞成熟时，受体卵中可积累很高的 MPF 活性，但在完成第一次减数分裂时 MPF 活性迅速消失。当卵母细胞抵达第二次减数分裂中期前，MPF 又重新出现 (图 4)。在放线菌酮存在时，受体卵中仍可发生 MPF 的扩增，但与正常情况 (蛋白质合成不受抑制) 相比，扩增的水平较低。此外，放线菌酮还阻止了 MPF 活性的第二次回升，注射更多的 MPF 也无济于事。

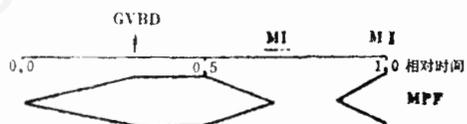


图 4 注射 MPF 后卵母细胞中 MPF 活性变化示意图<sup>[27]</sup>

(根据文献 [30] 中的示意图改制)

MI, 第一次减数分裂中期。MII, 第二次减数分裂中期。相对于 MPF 注射的时间: MPF 注射 (0.0) 和 MII (1.0)。

MPF, < = 活性增加 > = 活性降低。

Cyert 等制备了抗 MPF 活性的单克隆抗体。这种单抗可使 MPF 失活。免疫反应表明 MPF 是以磷酸化状态出现的。最近, Lohka 等人已将卵质中的 MPF 纯化 3000 倍, MPF 活性部分与分离得到的分子量分别为 45000 和 32000 的两种蛋白质有关。在受体卵和在无细胞系统中, MPF 的作用情形有所不同: 在无细胞系统中, MPF 诱导 GVBD 不需要分子量 32000 蛋白的参与, 也不依赖于蛋白质磷酸化反应; 在诱导受体卵 GVBD 时, 这些都是必需的。显然, 对 MPF 理化特性及其作用机理的进一步研究, 会有助于阐明成熟过程中蛋白质

合成活动、蛋白质磷酸化与 GVBD 之间的关系。

### 摘 要

蛋白质合成率的增加是卵母细胞成熟过程中的重要现象之一; 合成率的增加是 mRNA 与核糖体机构两者协调活动的结果。S6 蛋白磷酸化和 pHi 上升似乎与蛋白质合成增加有关, 但有证据表明这种联系是表面现象, 非必然的。翻译机构中的蛋白质因子 eIF-4A 可能参与成熟中蛋白质合成活动的调控。本文还分析了蛋白质合成的总体变化特点, 蛋白质合成、磷酸化活动与 MPF 活性和 GVBD 现象之间的关系, 这是研究 MPF 活性以及卵母细胞成熟机理的一个重要方面。

### 参 考 文 献

- [1] Maller, J. L., 1983, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 15:295-336.
- [2] Woodland, H. R., 1974, *Dev. Biol.*, 40: 90-101.
- [3] Wasserman, W. J., et al., 1982, *Dev. Biol.*, 89:152-158.
- [4] Younglai, E. V., 1982, *Dev. Biol.*, 91: 36-42.
- [5] Smith, L. D., 1975, *Molecular events during oocyte maturation, in The Biochemistry of animal Development, Vol. 3*, ed. R. Weber, New York San Francisco London.
- [6] Taylor, M. A. and Smith, L. D., 1985, *Dev. Biol.*, 110:230-237.
- [7] Laskey, R. A. et al., 1977, *Cell*, 11:345-351.
- [8] Taylor, M. A., et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:6586-6589.
- [9] Richter, J. D., et al., 1982, *Dev. Biol.*, 89:159-167.
- [10] Richter, J. D. and Smith, L. D., 1984, *Nature*, 309:378-380.
- [11] Herdt, E. D., et al., 1984, *FEBS*, 139: 155-162.
- [12] Richter, J. D., et al., 1981, *Cell*, 27: 183-191.
- [13] Thomas, G., et al., 1982, *Cell*, 30:235-242.

- [14] Tas, P. W. L. and O. H. W. Martini., 1987, *FEBS*, 163:561-567.
- [15] Mart, A. T., et al., 1985, *J. Embryol. Exp. Morph.*, 89(Suppl.):35-51.
- [16] Sripat, C. E. and M. Cuny., 1987, *FEBS*, 162:669-674.
- [17] Audent, R. G., et al., 1987, *Dev. Biol.*, 121:58-68.
- [18] Masui, Y. and C. Markert., 1971, *J. Exp. Zool.*, 177:129-145.
- [19] Gerhart, J., et al., 1984, *J. Cell Biol.*, 98:1247-1255.
- [20] Wasserman, W. J. and Y. Masui., 1975, *Exp. Cell Res.*, 91:381-388.
- [21] Marcel Doree, 1982, *Exp. Cell Res.*, 139:127-133.
- [22] Maller, J. L., et al., 1977, *Dev. Biol.*, 58:295-312.
- [23] Spirack, J., et al., 1984, *Mol. Cell Biol.*, 4:1631-1643.
- [24] Carmen, B., et al., 1985, *Cell*, 43:615-620.
- [25] Smith, B., et al., 1984, *Dev. Biol.*, 102:79-89.
- [26] Reynhot, J. K. and L. D. Smith., 1974, *Cell Differ.*, 2:247-254.
- [27] Gerhart, M., et al., 1984, *J. Cell Biol.*, 98:1247-1255.
- [28] Cyert, M., et al., 1985, *Cell Differ.*, 16 (Suppl.):442.
- [29] Ford, c. c., 1985, *J. Embryol. exp. Morph.*, C 89, Suppl.:271-284

## 薄层细胞培养在细胞分化研究中的应用

陈永宁 李文安

(中国科学院上海植物生理研究所)

植物细胞分化是一个在时间上、空间上有序进行的过程,不但与自身的生理生化活动有关,也与外界环境因子的变化有关。如果从整株植物水平上来研究其分化发育的机理,由于变化的因素很多,研究起来难度较大。而植物细胞培养技术,采用植物的一部分做外植体,培养在可调节光强、温度,以及可加入不同化学物质的半封闭容器中,是用来研究细胞分化的好方法<sup>[1]</sup>。在器官分化的研究工作中,尤其是花芽的分化,利用薄层细胞培养技术的研究比较有特色,作者将已知文献作一介绍。

### 一、薄层细胞培养的历史

1970年,Tran Thanh Van和Drira<sup>[2]</sup>用*Nautilocalyx lynchei* L.作材料成功地进行了薄层细胞培养。在此之前,曾用毛叶秋海棠(*Begonia rex*)作材料尝试薄层细胞培养,但未获得器官分化<sup>[3]</sup>。薄层细胞培养采用的外植体

可取自叶脉、叶柄和茎,用镊子从这些部位撕下由表皮层细胞和数层薄壁细胞组成的组织块,因此其组织成分比较简单,这是薄层培养优于其他组织培养的地方。在适宜的培养条件下,芽和根可以直接从外植体上分化出来。据报道,已有十几个属的植物进行过薄层培养<sup>[4,5]</sup>。如*Nicotiana*(烟草属),*Begonia*(秋海棠属),*Nautilocalyx*,*Saintparlia*,*Brassica*(芸苔属),*Catharanthus*(长春花属),*Solanum*(茄属),*Torenia*(蓝猪耳属),*Lens radicularis*(兵豆属),*Cichorium*(菊苣属),*Psophocarpus*(四稜豆属),*Vicia*(蚕豆属),*Douglas fir*(黄杉属),*Ochrosia elliptica*(椭圆玫瑰树)等等。其中,在烟草属、菊苣属、蓝猪耳属植物的薄层培养中,除了分化营养芽、根及形成愈伤组织外,还能直接分化出花芽。另外,用菊花花瓣的表皮、落地生根叶片的下表皮进行的薄层培养也有过报道<sup>[6,7]</sup>。