

一个外显子 DNA 片段和 PDGF-A cDNA 反向克隆到 pSV₂neo 中, 构建成两种 PDGF-A 反义 RNA 表达克隆。该两种 PDGF-A 反义 RNA 表达克隆可用于 PDGF-A 功能的研究以及肿瘤细胞生长阻断的探索。

参 考 文 献

- [1] Ross, R. et al., 1986, *Cell.*, 46: 155-169.
 [2] Favera, R. D. et al., 1982, *Science.*, 218: 686-687.
 [3] Betsholtz, C. et al., 1986, *Nature.*, 320: 695-699.
 [4] Green, P. J. et al., 1986, *Annu. Rev.*

- Biochem.*, 55: 569-597.
 [5] Anne E. Griep and Heiner Westphal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988 85: 6806-6810.
 [6] Kazuko Nishikura and John M. Murray. *Molecular and cellular Biology*, 1987, 7 (2): 639-649.
 [7] Maniatis, T. et al., In *Molecular cloning: A laboratory Manual* CSH Lab, p. 88, 164, 365, 390, 1982.
 [8] Guo Li-He. In *Methods in Enzymology: Recombinant DNA*. Vol. 100 Part B. P. 174.
 [9] Southern, P. J. and Berg, P.: *Journal of Molecular and Applied Genetics*, 1982, 1: 327-341.

芥菜原生质体培养和植株再生

赵军良* 陈柔和 张江涛

(山西大学生物系)

李文彬 陈正华

(中国科学院遗传研究所)

70年代以来, 芸苔属植物的原生质体培养进展尤为迅速, 现已从大部分芸苔属植物原生质体得到再生植株^[1-6], 使之成为植物体细胞杂交和进行遗传操作极好的实验材料。李文彬等^[7]和 Chatterjee 等^[4]曾分别从芥菜型油菜子叶和叶肉原生质体再生成植株, 在原来的基础上, 通过改变培养条件, 又成功地将芥菜下胚轴原生质体培养成完整植株。

材 料 和 方 法

一、无菌苗的获得 供试材料为 *Brassica juncea* 的栽培品种定兴芥。种子经表面灭菌后, 在含 MS 大量元素、1%蔗糖和 0.7%琼脂的培养基上生长获得无菌苗。酶解前将生长有无菌苗的玻璃瓶放在 13℃的冰箱里进行低温预处理, 直至所需时间为止。

二、原生质体的游离 用如下两种来源获得原生质体: I: 子叶和胚轴分别游离, 分别培养, 以比较

两者的培养效果。II: 子叶和胚轴一起酶解, 以保证原生质体培养初期具有一定的培养密度。酶液组成为 1% Cellulase "Onozuk" R-10, 0.5% Macerzyme R-10, 10% 甘露醇, 由 CPW 液^[8]配成, 酶液抽滤灭菌, 酶解在 24~26℃条件下进行。

三、原生质体培养 原生质体培养基为含 1.5 毫克/升 NAA、0.6 毫克/升 BA 和 0.5 毫克/升 2,4-D 的 *DPD*^[9]培养基, 渗透稳定剂组成为 2% 蔗糖、2% 葡萄糖和 8% 甘露醇。以该培养基为对照, 设计了分别以甘露醇、葡萄糖、山梨醇和木糖为渗透稳定剂的原生质体培养基。原生质体的培养密度为 10^4 — 10^5 个/毫升。

四、愈伤组织的形成 来源于下胚轴的原生质体培养约 4 周, 发育成大量大细胞团, 再过 10 几天后, 长成大量肉眼可见的小愈伤组织, 此时转入含 1.0 毫克/升 2,4-D, 0.6 毫克/升 NAA, 和 1.0 毫克/升 BA 的 MS 固体培养基中, 进行愈伤组织的增殖。

* 现在山西省农科院蔬菜所。

表 1 分化培养基的组成及其浓度

培养基号 浓度 成分	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆
BA(mg/l)	3	3	3	3	0	0
NAA(mg/l)	0.05	0	0	0	0	0
KIN(mg/l)	0	0	0	0	2	0
ZT(mg/l)	0	0	0	0	0	2
GA ₃ (mg/l)	0	0	0.1	0.1	0	0
蔗糖(%)	3	3	3	2	3	3
甘露醇(%)	0	0	0	3	0	0

五、芽的分化 将约3—5毫米大小的愈伤组织转入表1所示的MS培养基中进行芽的诱导。其中均附加80毫克/升谷氨酰胺、40毫克/升硫酸腺嘌呤。

六、根的分化 当芽长到2—3厘米左右时，从愈伤组织上切下，转入含0.05毫克/升IBA的MS培养基上诱导生根。

七、试验中酶液和培养基的pH值均为5.8。

结果与讨论

一、原生质体游离

经14小时酶解，芥菜子叶和下胚轴均可释放大量有活力的原生质体(图版图1)，但后者所收集到的量低于前者，这可能是由于下胚轴生长快，液泡化程度高，离心收集时易于丢失之故。

酶解前经13℃低温预处理的比未经预处理的效果更好。这可归结为低温预处理改善了材料的生理状态。

二、原生质体培养

1. 原生质体分裂 在24—26℃条件下，暗培养约48小时，原生质体发生第一次分裂(图版图2)，约六天，出现第二次分裂(图版图3)。观察发现，不仅下胚轴原生质体的分裂时间早于子叶原生质体，而且前者的分裂频率也明显地高于后者。经统计，培养到第四天，下胚轴原生质体的分裂频率高达12%，子叶的

仅为5%。由此可见，取材部位不同，培养效果也有明显的差异。这在芸苔属的其他植物种中也可得到证明^[8,10]。

原生质体培养初期，保持一定的起始密度，对于提高原生质体的分裂频率有巨大的作用。我们用第一种来源所得到的下胚轴原生质体的量较少，培养密度较低，导致了以后原生质体的分裂频率降低；第二种来源弥补了起始密度低的缺点，从而提高了原生质体的分裂频率。我们还进一步观察到，无论是单独培养还是混合培养，子叶原生质体均不能持续分裂，最多达到两次分裂，因此当进行混合培养时，它无碍于下胚轴原生质体的进一步发育。只起到维持一定的起始密度的作用。

Batt等^[11]证明，茄子叶肉原生质体培养的最适起始密度为 $5 \cdot 10^3$ 个/毫升，高于或低于这个培养密度都会造成原生质体分裂频率的降低。培养密度对原生质体的影响一般认为由以下两个原因所致：①培养细胞间的营养竞争。②原生质体培养期间可能释放一种或几种因子，只有这些因子间相互作用，并在一定密度下达成平衡时，才能最大限度地促进细胞分裂。

培养约4周，下胚轴原生质体形成大量的大细胞团(图版图4)，再培养10几天，长成肉眼可见的小愈伤组织后，转入MS培养基中进

表2 低温预处理对原生质体培养的影响

处理时间(小时)	1	2	3	4	5
分裂频率(%)	11	15.8	13.7	12.5	12

表3 不同组合渗透稳定剂对原生质体培养的影响

组 合	A	B	C	D	E	F
渗透剂 (0.6 M)	2%蔗糖 2%葡萄糖 8%甘露醇	2%蔗糖 10%甘露醇	2%蔗糖 9.7%葡萄糖	10.8% 葡萄糖	2%蔗糖 10%山梨醇	2%蔗糖 8.1%木糖
分裂频率(%)	12.5	13.7	12.5	11	11	很低

行愈伤组织的增殖。

2. 低温预处理的影响 我们对定兴芥无菌苗进行了短时间的低温预处理, 旨在比较其原生质体对低温的敏感性。表2所示的是原生质体培养到第四天时的结果(表中的分裂频率是3次冷处理实验的平均值)。

从表中看出, 适当时间的低温预处理, 可以提高原生质体的分裂频率。而且发现, 经过预处理的原生质体培养到第四天即可见到两次分裂, 对照则在第六天才出现。

在原生质体培养中, 通过低温预处理来改善材料的生理状态已成为一种有效手段。Qian等^[12]在龙胆试管苗叶肉原生质体培养中发现, 材料只有经4℃低温预处理, 分离的原生质体才能分裂。低温预处理的正效应在我们的试验中又一次得到证实。

3. 渗透稳定剂的影响 原生质体在各种不同渗透稳定剂的培养基中, 第六天时的培养结果见表3。

表3表明, 原生质体在A、B、C、D、E 5种组合中分裂频率相差不大, F组合中只有极小数分裂出现, 而且前5种组合中, 原生质体培养到第六天, 均出现了第二次分裂, 因此认为, 除木糖外, 葡萄糖、甘露醇、山梨醇均可作为定兴芥原生质体培养初期的渗透稳定剂。

4. 胚性愈伤组织的产生 在芸苔属植物中, 由原生质体直接通过胚状体途径再生植株的仅有*B. napus*^[13]一例, *B. juncea*和其他种

的植物尚属空白。我们在试验过程中发现, 定兴芥下胚轴原生质体直接产生了大量胚性细胞团, 进而发育成胚性愈伤组织(图版图5), 其数量达到总愈伤组织的50%以上。尽管还未分化出植株, 但无疑为*B. juncea*原生质体的直接胚胎发生打开了缺口。

三、芽的诱导

将来源于下胚轴的非胚性愈伤组织(图版6)转入表1的分化培养基中, 所得结果如下:

M_2 培养基中分化出了芽, 随即夭折; M_3 中分化出了叶状体, 以后随着叶状体的逐渐死去, 正常的芽分化出来; M_4 可直接产生正常的芽(图版图7), M_1 、 M_5 和 M_6 中, 尽管有的愈伤组织出现了绿点, 但未出现分化, 而且以 M_1 中愈伤组织生长最快。李文彬等^[7]在芥菜型油菜原生质体培养中发现, 即使低水平的NAA也不利于分化, 这个结论再次被得到证明。

四、根的诱导

将2—3厘米长的芽从愈伤组织上切下, 转至含0.05毫克/升IBA的MS培养基中即可生根, 从而获得了芥菜型油菜下胚轴原生质体的再生植株(图版图8)。

摘 要

从芥菜无菌苗的下胚轴和子叶游离获得原生质体, 在含1.5毫克/升NAA、0.6毫克/升BA和0.5毫克/升2,4-D的DPD液体培养基中静置培养。试验表明, 经13℃低温预处理不

仅能够提高原生质体的分裂频率,而且能够加速原生质体的发育进程;除木糖外,葡萄糖、甘露醇和山梨醇均可作为原生质体培养初期的渗透稳定剂。

来源于下胚轴原生质体的愈伤组织在含13毫克/升BA、0.1毫克/升GA₃或3毫克/升BA的MS培养基上诱导出了芽,含0.05毫克/升IBA的MS培养基上诱导出根,从而获得了完整植株。

图版说明

1. 刚游离的下胚轴原生质体 400×
2. 原生质体发生第一次分裂 400×
3. 原生质体发生第二次分裂 400×
4. 原生质体再生的大细胞团 400×
- 5、6. 原生质体发育成的胚性和非胚性愈伤组织
7. 愈伤组织出现芽的分化
8. 原生质体培养再生成完整植株

参考文献

- [1] Karatha, K. K., M. R. Michayluk, K. N. Kao, O. L. Gamborg, and F. Constabel, 1974, *Plant Sci. Lett.* 3 (4): 265-271.
- [2] Bidney, D. L., J. F. Shepard, and E.

- Kaleikau, 1983, *Protoplasms*, 117: 89-92.
- [3] Glimelius, K., 1984, *Physiol. Plant*, 61: 38-44.
- [4] Chatterjee, G. and S. R. Sikdar, 1985, *Plant Cell Reports*, 4 (5): 245-247.
- [5] Chuong, P. V., K. P. Pauls, and W. D. Bebersdorf, 1987, *In vitro Cellular developmental biology*, 23 (6): 449-452.
- [6] Chuog, P. V., K. P. Pauls, and W. D. Bebersdorf 1987, *Plant Cell Reports*, 6: 67-69.
- [7] 李文彬, 陈正华, 宋玉华, 张大卫, 1986, *遗传学报*, 13(3): 184-187.
- [8] Xu, Z. H., M. R. Davey, and E. C. Cocking, 1981, *Z. Pflanzphysiol.*, 104: 289-298.
- [9] Durand, J., I. Potrykus, and G. Donn, 1973, *Z. Pflanzenphysiol.*, 69: 26-34.
- [10] 杨美珠, 贾士荣, 1989, *植物学报*, 31 (2): 89-94.
- [11] Bhatt, D. P. and G. Fassuliotis, 1981, *Z. Pflanzenphysiol.* 104: 81-89.
- [12] Qian, Y. Q., Y. L. Zhou, Q. G. Cai, Z. G. Zhang, and X. Yan, 1984, the Abstracts of Internat. Sym. Genetic Manipulation in Crops, Beijing, China, pp, 100.
- [13] Li, L. C. and H. W. Kohlenbach, 1982, *Plant Cell Reports*, 1: 209-211.

cAMP 对癌细胞增殖周期的影响和膜表面 ConA 受体分布相关性

陈莉* 梁云萍 牛敏英 石永进 王代树
(北京市肿瘤防治研究所细胞生物学室)

癌细胞和正常细胞的增殖都是通过细胞周期运转而实现的。而细胞周期可直接受到环核苷酸(cAMP)的调节控制,用外源性cAMP及其衍生物对细胞周期的影响有不同结果^[1-3]。伴随周期的改变,一些重要的细胞膜性质如膜表面受体分子的表达与运动^[4-6]、膜抗原^[7]、膜结合酶^[8]以及膜电荷等等也随之发生变化。但是在癌细胞周期变化中,特别是一些已知的

细胞膜表面转化标志^[9,10]与周期及各种表型之间的相关性等尚不完全清楚。

本文研究了在艾氏腹水瘤细胞(EAC)生长增殖过程中cAMP对其周期影响和细胞膜表面

本工作系自然科学基金资助项目。

* 内蒙医学院组织胚胎教研室。

FCM分析由北京医科大学细胞室流式光度术组测试处理,特此致谢。