

近年来,已广泛应用植物凝集素的固相亲和层析分离和纯化各类含糖化合物、抗原、激素、细胞膜上的糖蛋白或糖脂,也用于分离酶和其他生物物质。例如:从人血清中纯化血凝乳酶(haemopexin)^[3],从甲基胆蒽诱发的小鼠肉瘤中获得部分纯化的TSTA^[4]等。又如:Lando等(1980)^[5]用ConA-Sepharose柱成功地从大鼠D₂₃肝癌3MKCl抽提物中分离出有活力的抗原,这个抗原对带D₂₃肝癌的大鼠血清细胞毒活力有强的抑制作用。与此相仿,我们所提取的人胎肝细胞表面膜抗原通过凝集素的亲和而获得进一步的纯化也说明了这一点。

为了比较不同的凝集素对胚胎抗原的亲合作用,在WGL-Sepharose 6MB分离的同时,我们还做了ConA柱分离试验,用专一性的 α -methyl-D-glucoside去取代时未见有

蛋白峰洗脱下来,似乎提示这种胚胎抗原可能缺乏ConA所能识别的糖分子。这个现象与Sikora等人(1979)^[4]工作的结果是相类似的。我们的实验结果证实:凝集素的特异亲和作用为膜抗原的纯化提供了一个相当简便有效的方法。虽然至今我们尚不清楚这种与肝癌相关的胚胎抗原分子的蛋白组成,但至少也表明了它们是含某些糖的蛋白。

参 考 文 献

- [1] 施渭康、卢延龄、叶敏、姚鑫, 1977, 动物学报, 23:337—344。
- [2] 施渭康、陈振国, 1979, 实验生物学报, 12:170—172。
- [3] Vretblad, P. and Hjorth, R., 1977, Biochem. J. 167: 759—764.
- [4] Sikora, K. et al., 1979, Br. J. Cancer. 40: 831.
- [5] Lando, P. et al., 1980, Scand. J. Immunol. 11: 253—260.

不同离子对原生质体表面电荷和融合的影响*

王辅德 夏镇澳 宛新杉 宋永根

(中国科学院上海植物生理研究所)

原生质体融合的一个先决条件是不同亲本的原生质体首先发生粘连。有些工作证明原生质体的表面带有负电荷,其电位从负十几毫伏到负五十几毫伏不等^[8-9]。这一特性无疑地会影响原生质体的粘连和融合。此外也有一些结果表明, CaCl₂、NaNO₃、多聚氨基酸、某些蛋白质或磷脂可以降低原生质体的表面负电位;甚至还能将负电荷转变为正电荷。如果这些物质对原生质体的正常功能没有损害,则将有助于提高原生质体的融合率。

材 料 和 方 法

一、材料 芹菜、烟草都是温室栽培、自然光照,取用平展幼嫩的叶片为试验材料。胡萝卜是大田栽培,收获后取肉质根的皮层部分为试验材料。

二、原生质体制备 各种材料均用酶法脱壁,以0.5—0.7 M甘露醇或cpw溶液**做渗透压稳定剂(cpw溶液的组分为:KH₂PO₄ 27.2, KNO₃ 101.0, CaCl₂·2H₂O 1480.0, MgSO₄·7H₂O 246.0, KI 0.16, CuSO₄·5H₂O 0.025, 毫克/升;甘露醇0.7 M, pH5.8)。胡萝卜根和芹菜叶用含有1%纤维素酶(EA₃-867)和0.2%果胶酶(Macerozyme R-10)的酶液(pH5.8),在25℃保温15—20小时。烟草叶片用含有0.7%纤维素酶和0.3%葡聚糖硫酸钾的酶

* 本工作得到陈季楚、傅婉华同志热情协助,谨致谢意。

** cpw溶液为英 Nottingham 大学用于分离原生质体的常规溶液。

*** 原生质体的活力系指用FDA染色后能产生绿色荧光反应,失去生活力的和破碎了的原生质体都无此反应。

液, pH5.8, 置 28℃ 保温 3—4 小时。脱壁后原生质体经过滤、洗涤(进行纯化), 并用荧光增白剂和荧光素双醋酸酯(FDA)染色检查, 以所分离的原生质体脱壁完全、活力***大于 80% 作为试验材料。

三、原生质体电泳及 ζ 电位计算: 原生质体电泳所用的仪器装置及测定方法均按我室常用的方法进行。电泳介质为 1/150M 磷酸钠缓冲液 (pH5.8) 加入 0.3 M 蔗糖和 0.3 M 甘露醇。电泳条件是 $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 电位梯度为 5—6 伏/厘米, 测量层选择 1/4 深度层^[1]。为了测定有不同离子存在下的电泳率, 在上述电泳介质中再加入不同浓度的 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 或加入 10mM 的 MgCl_2 或 KCl 或 NaCl 。

原生质体表面 ζ 电位系按 Smoluchowski^[5] 公式 $\zeta = \frac{4\pi\eta u}{\epsilon}$ 进行计算。式中: ζ 为原生质体表面电位 (mV), u 为原生质体的电泳迁移率 (微米/秒/伏/厘米), η 为粘度(泊), ϵ 为介电常数。

四、原生质体的融合 融合操作基本按照 Schieder 的方法^[6], 略加修改。亲本为胡萝卜根原生质体和芹菜或烟草叶肉原生质体。融合诱导剂用 20% 的 PEG—6000, 原生质体的浓度以两种亲本原生质体 (1×10^6 — 1×10^5) 作等量混合, 因为胡萝卜根原生质体含有桔红色色素, 芹菜叶肉原生质体含有叶绿体, 所以在原生质体内既有桔红色色素又有叶绿体就是异体融合体。融合率的计算是以观察到的原生质体总数为基数(包括受伤的原生质体在内)。异种融合率(%)

$$= \frac{\text{融合体数}}{\text{亲本原生质体总数}} \times 100$$

结果和讨论

一、不同植物来源的原生质体其表面都带有负电荷, 但彼此电位值相差颇大。胡萝卜根表面 ζ 电位在 -58 — -59mV , 芹菜、烟草叶肉原生质体分别在 -41 — -52mV 和 -23 — -39mV 。

二、不同 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 浓度对原生质体表面 ζ 电位的影响十分明显(表 1)。当 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 浓度增加到 10mM 时胡萝卜根原生质体表面 ζ 电位值 ($-\text{mV}$) 下降了 63.2%, 芹菜叶肉原生质体表面 ζ 电位也下降了 64.1%。当 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 浓度增加到 100mM 时, 二者分别下降了 94.7% 和 100%, 同时有集聚现象

伴生。这一结果与 T. Nagata & G. Melchers 对烟草叶肉原生质体的研究结果是一致的^[5]。

三、不同阳离子对原生质体表面 ζ 电位的影响如表 2 所示: 无论是一价的 K^+ 、 Na^+ 或二价的 Ca^{++} 、 Mg^{++} 都有降低原生质体表面 ζ 电位的趋势, 但二价的阳离子大于一价的阳离子。

表 1 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 浓度对原生质体表面 ζ 电位的影响

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的 浓度 (mM)	原生质体表面 ζ 电位 ($-\text{mV}$)	
	胡萝卜根	芹菜叶肉
0	57	39
1	44	37
10	21	14
100	3	0

表 2 不同阳离子对原生质体表面 ζ 电位的影响*

处 理	原生质体表面 ζ 电位 ($-\text{mV}$)		
	胡萝卜根	芹菜叶肉	烟草叶肉
对 照	58	46	31
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	20	20	14
MgCl_2	23	13	14
KCl	42	35	24
NaCl	51	33	36

* $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgCl}_2 \cdot \text{KCl}$ 、 NaCl 浓度均为 10mM。

四、在原生质体制备中不同脱壁条件对其表面 ζ 电位也有影响。结果如表 3, 用复合溶液 (cpw) 配制酶液所分离的原生质体其表面电位值比用单一的 0.7M 甘露醇溶液配制酶液脱壁的为低。胡萝卜根原生质体和芹菜叶肉原生质体表面 ζ 电位都分别下降了 34.5% 和 30.3%。这可能是由于在复合溶液中含有 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 KNO_3 等物质所致。

五、不同阳离子对原生质体表面 ζ 电位的

表 3 不同脱壁条件对原生质体表面
 ζ 电位的影响

处 理	材 料	原生质体表面 ζ 电位 (-mV)	
		胡萝卜根	芹菜叶肉
用 cpw 溶液配制酶液脱壁		38	32
用 0.7 M 甘露醇溶液配制酶液脱壁		58	46

影响是明显的。然而,它们是否也相应地影响原生质体的融合呢?试验结果表明有 Ca^{++} 存在时融合率最高,其他几种离子存在时融合率则较低,尤以一价阳离子更为明显(表 4)。

表 4 不同阳离子对原生质体融合的影响

项 目	胡萝卜根原生质体 + 芹菜叶肉原生质体			胡萝卜根原生质体 + 烟草叶肉原生质体		
	观察总数	融合数	融合%	观察总数	融合数	融合%
CaCl_2	2238	79	3.4	2259	78	3.0
MgCl_2	2004	27	1.3	2021	26	1.3
KCl	2429	14	0.6	2193	9	0.4
NaCl	2353	9	0.4	2055	6	0.3

CaCl_2 、 MgCl_2 、KCl、NaCl 浓度均为 10mM, 脱壁均用 cpw 溶液作渗透压稳定剂。

六、由上面的一些试验结果不难看出不同植物来源的原生质体其表面都带负电荷,但彼此电位大小相差颇大。这与 Nagata 等人和 Grout 发表的资料相似^[3,5]。原生质体的表面电荷易受一些阳离子的影响。根据文献记载,

一些带正电荷的多聚物(如多聚鸟氨酸、多聚赖氨酸);某些蛋白质(如组蛋白、精蛋白);酶(如神经胺酶);磷脂等等都可以降低原生质体表面的电位。但其中大多对原生质体有毒害,例如多聚鸟氨酸和组蛋白毒性就相当大^[4]。至于这些物质对原生质体融合的影响成功的报道甚少。从我们的试验资料来看,降低原生质体表面负电位的能力与融合率的高低不一定是正相关。例如在有 10mM 的 MgCl_2 存在时能将胡萝卜根、芹菜叶肉原生质体表面负电位分别降低 60% 和 71%,而融合率却甚低,可见原生质体表面电荷特性只是影响融合的因素之一,而导致整个融合过程的因素是远为复杂的。

参 考 文 献

- [1] 陈季楚,傅婉华,1980,实验生物学报,13: 281—286.
- [2] Benz, R. & U. Zimmermann, 1981, *Planta*, 152: 314—318.
- [3] Grout, B. W. W., Willison, J. H. M. & E. C. Cocking, 1973, *J. Bioenergetics*, 4: 311—328.
- [4] Melchers, O., 1980, In "Advances in protoplast research", 283—286.
- [5] Nagata, T. & G. Melchers, 1978, *Planta*, 142: 235—238.
- [6] Schieder O., 1978, *MGG*, 162: 113—120.
- [7] Senda, M., Takeda, J., Abe S., & Nakamura, T., 1979, *Plant and Cell Physiol.*, 20: 1441—1443.
- [8] Serm, A. & P. E. Pilet, 1981, *Z. Pflanzenphysiol.*, 102: 19—32.
- [9] Zimmermann, U. & P. Scheurich, 1981, *Planta*, 151: 26—32.