



## 几种植物原生质体的活力研究

王辅德, 宛新杉, 宋永根, 夏镇澳

(中国科学院上海植物生理研究所)

酶法脱壁的成功为取得大量植物原生质体提供了一个很好的方法, 从而为研究原生质体培养、细胞杂交及植物原生质膜等创造了有利的条件。然而, 所制备的原生质体的活力与上述研究的成败至关重要。测定原生质体活力的方法有很多, 其中以荧光素双醋酸酯染色法较好, 既能反映个体活力, 又能反映群体状态。本文系介绍用自制的荧光素双醋酸酯 (fluorescein diacetate—FDA) 进行染色, 测定几种植物原生质体的活力, 研究温度对原生质体活力的影响及原生质体的活力与培养过程中一些特性的关系。

### 材 料 和 方 法

#### FDA 染色法的原理

本方法所用荧光素双醋酸酯的特点是本身不产生荧光、无极性并可自由透过完整的原生质膜, 但一经进入原生质体后, 由于受到酯酶的分解而形成能产生荧光的、有极性的物质——荧光素, 于是便不能自由出入原生质膜。因而使有活力的原生质体能产生荧光, 无活力的就无荧光产生<sup>[1]</sup>。

#### FDA 的合成

因为 FDA 无现成的试剂供应, 我们按 Orndorff & Hemmer 所报道的方法进行合成<sup>[2]</sup>。产品为无色针状结晶, 熔点为 200—201℃, 红外光谱与标准光谱完

全一致。自己合成的 FDA 经试用能明显区分原生质体有无活力。

#### 原生质体的分离

烟草、蚕豆、美洲防风、马兰都是温室栽培, 自然光照, 用平展的幼嫩叶片作试验材料; 胡萝卜是大田栽培收获后取肉质根的皮层部为试验材料; 元麦是在 25—28℃ 培养, 用第一片真叶为试验材料。全部材料都按一般的酶法进行脱壁, 各种试验都在无菌条件下操作。

#### 活力的测定

将 FDA 配成 2 毫克/毫升的丙酮溶液贮存在冰箱中。用时加到洗涤过的原生质体悬浮液中, 使 FDA 的最终浓度为 0.01%, 置室温 5 分钟后用荧光显微镜进行观察, 激发光滤片用 QB<sub>24</sub>, 吸收光滤片用 JB<sub>8</sub>。发绿色荧光的原生质体是有活力的, 不产生荧光的原生质体则表示无活力。如是叶肉原生质体则发黄—绿色荧光的为有活力, 发红色荧光的(由于有叶绿素的关系)则是无活力。

原生质体的呼吸强度是用铂银氧电极测定其耗氧量<sup>[3]</sup>。

### 结 果 和 讨 论

1. 用我室自制的纤维素酶(EA<sub>3</sub>—867)将胡萝卜根、元麦、蚕豆、烟草、马兰、美洲防风等叶肉组织脱壁后, 新鲜制备的原生质体其活力百分率结果如表 1。

- Med.*, 150:909-918.
- [15] Sy, M. -S. et al., 1979, *J. Exp. Med.*, 150:1229-1240.
- [16] Bach, B. A. et al., 1978, *J. Immunol.*, 121:1460-1468.
- [17] Owen, F. L. et al., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74:2084-2088.
- [18] Owen, F. L. and Nisonoff, A., 1978, *J. Exp. Med.*, 148:182-194.
- [19] Sy, M. -S. et al., 1980, *J. Exp. Med.*, 152:1226-1235.
- [20] Dietz, M. H. et al., 1980, *J. Immunol.*, 125:2374-2379.
- [21] Bach, B. A. et al., 1979, *J. Exp. Med.*, 149:1084-1098.
- [22] Hirai, Y. and Nisonoff, A., 1980, *J. Exp. Med.*, 151:1213-1231.
- [23] Mckearn, T.J. et al., 1974, *J. Immunol.*, 113:1876-1882.
- [24] Roitt, I. M., et al., 1981, *The Lancet*, 1: 1041-1043.

表1 不同植物原生质体的活力

原生质体来源	元麦叶肉	胡萝卜根	烟草叶肉	蚕豆叶肉	美洲防风叶肉	马兰叶肉
原生质体活力%	80.6   92.7	91.4   94.9	80.3   82.1	77.9   85.2	79.8   90.3	87.5

由表1可见，不同植物的原生质体虽然制备分离的方法一样，但活力不尽一致，即使同一种材料也有差异。这与不同的植物材料及其各自的稳定性密切相关。在我们试验的几种材料中以胡萝卜根原生质体最稳定，重复试验均可达到90%以上，而蚕豆、元麦、烟草的叶肉原生质体都不及胡萝卜根原生质体稳定。

2. 温度对原生质体活力的影响：将新鲜制备的原生质体悬浮在等渗溶液中，置于不同的温度条件下保温培养，于不同时间取样测定活力。结果见图1。温度对原生质体活力的影响

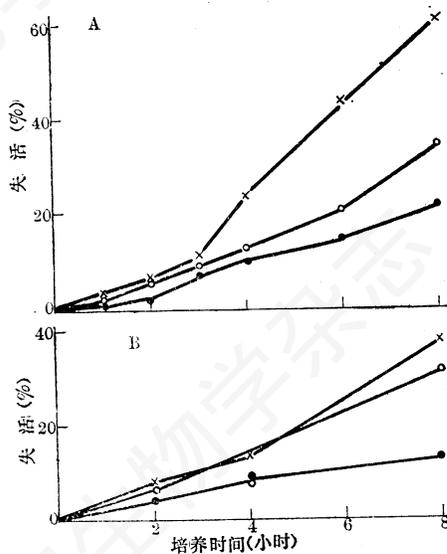


图1 温度对原生质体活力(失活%)的影响

A: 元麦叶肉原生质体  
B: 胡萝卜根原生质体  
×—× 37°C ○—○ 28°C ●—● 18°C

是明显的，特别是保温培养3小时以后。元麦叶肉原生质体在37°C条件下其失活速率比在28°C时增快近一倍。例如在28°C和37°C条件下培养，分别于4、6、8小时后取样测定，

原生质体的活力下降百分率28°C依次为12.9, 20.3, 34.4; 37°C为23.5, 43.1, 60.6。胡萝卜根原生质体在上述温度条件下其活力下降的速率比元麦叶肉原生质体大为减慢，这可能与试验材料的稳定性有关。看来温度稍低对防止原生质体失活是有益的。当然，温度过低也会妨碍正常生理生化功能的进程。例如将胡萝卜根原生质体置于8—10°C、18小时，其活力只下降了2.4%，但细胞壁也没有再产生。而在25°C条件下培养12小时，就有40—50%的原生质体形成了再生壁<sup>[4]</sup>。

3. 原生质体的活力与原生质体生长的关系：将胡萝卜根原生质体在36°C预处理9小时以降低其活力，然后转入28°C条件下继续培养，分别于二周、三周取样与对照比较(表2)。

表2 原生质体的活力与原生质体生长的关系

项目	开始时的活力%	培养二周		培养三周	
		分裂%	长大%	分裂%	长大%
36°C预处理	27.6	0.7	10.1	0.5	6.4
对照	92.4	2.1	96.7	6.8	12.6

从表2可见，开始培养时原生质体的活力对以后的生长、分裂都有明显的影响，尤以长大更为显著。至于对照组在第三周长大的原生质体百分率比第二周明显下降，而分裂百分率并没有相应增加的原因，可能是在培养条件下由于一部分长大的原生质体已转向分裂，另一部分原生质体不能继续生长或分裂，甚至收缩解体了。

4. 原生质体的活力与呼吸强度间的关系：将胡萝卜根原生质体悬浮液分别置于28°C和37°C条件下培养，在不同时间取样测定活力和呼吸强度，结果如表3。无论在28°C或37°C培养，原生质体的活力均逐步下降，不过37°C培养时下降速度明显增快。在28°C培养的原生质体其呼吸强度有继续上升的趋势，这与Morris<sup>[5]</sup>对烟草叶肉原生质体的研究结果是

表3 胡萝卜根原生质体的活力(存活%)  
和呼吸强度的关系

处理	活力 %		O <sub>2</sub> 吸收 (μM/万原生质体/小时)	
	28℃	37℃	28℃	37℃
0	94.9	94.9	0.07	0.07
7小时	87.6	84.3	0.09	0.07
24小时	73.5	个别	0.16	0.05

一致的。37℃培养的呼吸强度虽不断下降，到24小时原生质体的活力几乎全部丧失，但观察到呼吸过程并未全部衰竭。这种活力与呼吸之间的不一致，可能由于原生质体脂酶活性和呼吸是彼此独立的体系；也可能是FDA染色法反映原生质体的活力比用呼吸强度来反映原生质体的活力更为灵敏。据报道FDA染色法已被广泛地用于观察花粉、悬浮培养的细胞和原生质体等的活力<sup>[6]</sup>。Widholm将此法与胞质环流、质壁分离和生长等方法进行了核对，结

果表明凡是FDA染色为正反应的细胞都有胞质环流和质壁分离，并能在洋菜培养基上进一步生长。用物理或化学的方法杀死细胞，无论是FDA染色或上述其它反应都是负的<sup>[7]</sup>。因此从上述的实验结果可以认为，用FDA染色来反映原生质体的活力是一个简单易行的方法。

### 参 考 文 献

- [1] Larkin, P. J., 1976. *Planta*, 213-216.
- [2] Orndorff, W.R. & Hemmer, A.J., 1927. *J. Am. Chem. Soc.*, 49:1272-1280.
- [3] 李德耀、叶济宇, 1980, 植物生理学通讯 1:35-40.
- [4] 王辅德、宛新杉、夏镇澳, 1981, 植物生理学通讯 1:59-60.
- [5] P. Morris, J. F. Thain, 1980. *J. Exp. Bot.* 31:83-95.
- [6] Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y., 1970. *Stain Technol.*, 45:115-120.
- [7] Widholm, J. M., 1972. *Stain Technol.*, 47:189-194.

## 用羟基磷灰石柱分级洗脱法纯化小牛胸腺 末端脱氧核苷酸转移酶和DNA聚合酶\*

朱心良 陈乐容 冯锦明  
(中国科学院上海细胞生物学研究所)  
苏国富  
(军事医学科学院)

DNA分子体外重组一般有两种方法。一种是限制性核酸内切酶—DNA连接酶方法<sup>[1,2]</sup>，此法缺点是要求克隆的DNA和载体DNA都必须具有粘性末端，如无粘性末端，必须加大DNA连接酶的酶量才能重组；另一种方法为末端转移酶法，其优点是任意的两种DNA分子在末端转移酶存在下，分别加单链互补“尾巴”后，经过退火都可以送进受体细胞中连接起来。此法经过多次改进，提高了“加尾”

效率<sup>[3,4]</sup>，解决了克隆DNA片段的回收<sup>[5,6]</sup>，因而在DNA分子重组方面也是重要手段之一。末端转移酶法的关键是末端转移酶。Yoneda和Bollum<sup>[7]</sup>从小牛胸腺中纯化小牛胸腺末端脱氧核苷酸转移酶(TDT)虽然已有近二

\* 申晓珠同志、刘金富同志和复旦大学邵清同志曾参加部分工作；λDNA由居其达同志提供；钱若兰同志参加了pBR322制备；何俊坤同志也提供了部分pBR322，均在此致谢。