



植物原生质体研究中的几个问题*

夏 镇 澳

(中国科学院上海植物生理研究所)

原生质体研究是近二十多年来在细胞生物学中进展较快的一个分支。由于它在基础理论的探讨上有重要意义,在应用上有较大潜力;因此引起了多方面的注意。原生质体研究目前已不局限于高等植物,藻类、真菌以及细菌等都有不少工作。常用的有关名词含意如下:

1. 原生质体(Protoplast) 这是指除去全部细胞壁的“细胞”,或是一个为质膜所包围的“裸露细胞”(Cocking, 1960)。应当指出,从生理角度来看就不能仅仅理解为有壁或无壁;因为分离技术和环境因子无疑地影响了它的生理特性、代谢和微细的结构变化,例如质膜的透性等。

2. 亚原生质体(Sub-protoplast) 在质壁分离时,有时会引起细胞内含物的断裂而形成一些较小的原生质体就叫亚原生质体。它们可以有细胞核或没有细胞核(Binding等人, 1976)。

3. 微小原生质体(Miniprotoplast) 近年来利用细胞松弛素 B 能制备分离的微小原生质体。它是由原生质膜和薄层细胞质所包围的细胞核。如果制备时细胞核正在分裂,则可能形成仅带有某些或某一个染色体的微小原生质体(Wallin 等人, 1978; Lörz, 1980)。

4. 原生质球(Spheroplast) 制备微生物原生质体时,如果有残存的细胞壁但仍是圆球形常称为原生质球。高等植物胚乳细胞原生质体研究中曾用此词(Taiz 等人, 1971)。

利用原生质体可以研究细胞和各种细胞器的结构与功能,可以离体培养、诱导融合并再生完整植株。可以进行细胞器移植和摄取(病毒、细胞器、微生物、其他外源遗传物质)。它也是植物基因工程中的一个理想受体系统。对此已有不少评述可以参阅⁽¹⁻⁷⁾。本文仅就几个

问题进行简介和讨论。

一、原生质体的特性

从不同来源的组织或离体培养细胞都能分离出原生质体。它们的结构和起源细胞基本相似,但有以下一些特点:

(1) 分离的原生质体没有细胞壁、处于质壁分离状态,质膜裸露直接和介质接触。由于表面张力,它们一般是球形。细胞内的质体常常是原生质体的形态标记。叶肉原生质体中央有一个大液泡,叶绿体分布在一薄层细胞质中,紧贴着质膜。但是从培养细胞来的原生质体则具有较多而分散的液泡;通常含有带淀粉粒的白色体、原质体或少量内片层。

(2) 正常情况下原生质体只有一个细胞核;如果起源细胞是多核,则分离的原生质体也是多核。有些多核原生质体是由于在制备时经自发融合而产生,或者是在以后培养时细胞核分裂而胞质未分裂所形成的。愈伤组织的细胞核常有不规则的裂片,则分离的原生质体也有类似的情况。

(3) 有一些结果表明叶肉原生质体和培养细胞的原生质体不仅在结构上有差异,而且对酶处理的反应也有不同。叶肉原生质体容易受酶液影响发生不良反应而受损伤;而培养细胞原生质体的耐受性较好。对原生质体表面有不少超微结构的观察;但对结果的解释尚有争论。例如用透射电镜(TEM)和扫描电镜(SEM)都看到原生质体表面有球状突起,大小为 100—1000nm(大多数约为 200nm)。对于这些突起,有的认为是由于质膜有弱区,质膜从弱区外折

* 本文是在 1981 年 9 月全国植物细胞生理学术讨论会上所做的专题报告。

而形成小泡；另一种说法它们可能是质膜体。看来 TEM 与 SEM 各有其局限性；前者常用、但灵敏度较差，而后者在制片时会使原生质体表面的若干微细结构看不清楚。因此最好将两种方法同时比较观察。冰冻蚀刻和冰冻复型对研究质膜表面也很有用；冰冻复型还可以观察较大的表面积。用这两个技术证明了刚分离原生质体表面没有微纤丝。此外，负染对研究细胞壁再生时微纤丝的大小与结构也很有用。

(4) 原生质体生理特性的研究少而零散；因为注意力多集中于诱导愈伤组织和再生植株。分离的原生质体可以看做是渗透计；培养基的渗透压持续增加引起原生质体脱水、收缩以至降解，持续降低使原生质体吸水膨胀然后破裂。这些表现的时间进程视稳压剂的分子量和浓度而定。对于原生质体的渗透特性以及不同的稳压剂、激素因子、离子条件对稳定性影响的研究正在开始。分离的原生质体是研究植物细胞水分代谢的适宜系统。

原生质体在制备时经过渗透冲击，引起了液泡化加强、核糖体增加、核及叶绿体浓缩。此外， ^{14}C 同位素示踪的结果证明，15 分钟之内光合作用的标记产物转入叶绿体淀粉。这些都是过渡时期的表现，可能为细胞壁再生和进一步生长做了准备。在适宜的培养条件下，一方面起始的细胞结构降解；另一方面内质网、线粒体、核糖体增生，准备分裂和脱分化。深入研究经过渗透冲击而尚未开始脱分化的原生质体的生理功能无疑是很有兴趣。原生质体能从外界溶液中吸收氨基酸、糖、核酸前体及萜烯等。比较燕麦芽鞘和其原生质体中标记氨基酸参入总蛋白质的量，未发现差异。豌豆叶原生质体与起源材料的蛋白质代谢也相似。用 ^3H 标记的亮氨酸、尿核苷或胸腺嘧啶参入燕麦叶肉原生质体，在分离后立即开始进入酸不溶部分；亮氨酸与尿核苷持续 6 小时，胸腺嘧啶为 21 小时。根据放射自显影，烟草叶肉原生质体在分离后 24 小时 ^3H 标记的胸腺嘧啶参入了细胞核 DNA，于 48—72 小时到最高值。原生质

体对这些前体的吸收无疑地会因稳压剂的类型、pH、植物种类和所用的材料及原生质体密度而异。如有人证明原生质体密度下降二个数量级时，每个原生质体对 ^3H 标记的亮氨酸和尿核苷的参入量可增加 125 倍。

原生质体在制备和受渗透冲击时呼吸强度常下降。但经培养 3 小时的矮牵牛原生质体则增加；有玉米素存在时原生质体的呼吸强度开始增加，以后又下降。原生质体对呼吸抑制剂敏感；用 $1 \times 10^{-4}\text{M}$ 2,4-DNP(二硝基酚)诱导了非偶联效应。

原生质体特别适宜于研究光合作用和光呼吸，因为它代表了一个介于叶绿体和组织之间的研究系统。它比叶绿体的好处是可以考虑到胞质因素的影响，这方面的工作较多。叶肉原生质体一般保持了光合能力；如菠菜的就与原来的叶组织相同。但放在悬浮培养液中时间长了，光合作用强度会下降；可能由于叶绿体中淀粉过饱和以及与进一步分裂相伴的叶绿体降解有关。比较 C_3 和 C_4 植物叶肉原生质体和起源组织光合碳代谢的参数，两者基本相似。 C_4 植物的叶肉原生质体有高的 PEP 羧化酶的活力而 RuDP 羧化酶的活力低。 C_3 植物的叶肉原生质体有全套经 Calvin-Benson 循环积累碳的酶系。 C_3 植物叶肉原生质体有明显的光呼吸，而 C_4 植物的很低。对于原生质体的过氧化物酶、酸性磷酸酶、核酸酶等的特性也有一些工作。应当说，用豆科根瘤原生质体来研究固氮酶的特性无疑是有意义的。尽管关于原生质体生理的研究刚刚开始，但积累这方面的资料十分必要，相信在不久必然会吸引更多的科学工作者。

二、原生质膜

原生质体是研究植物细胞表面膜——原生质膜的好材料。既可以在原位研究它的性质，也便于分离提纯、或将质膜进行表面标记。如果比较分离的完整细胞和分离的原生质体对同一作用因素的反应，则对探讨质膜和细胞壁的相互关系也是十分有利的。质膜的厚度一般是

75—100 Å, 它对脂溶物质的透性是有选择性的, 具有高的电阻和低的表面张力。质膜的特性也是由于遗传因子、起源细胞的生理状况以及它所生存的环境条件(如培养基的稳压剂、pH、离子组分等)所决定的。对于质膜的结构可用生物膜研究中常用的方法如超薄切片等来进行, 而应用生理的方法可以探讨质膜的各种功能、代谢物质的穿膜运输、离子运转、激素、药剂和抑制剂等作用于膜的反应。

同一种原生质体制备中, 质膜的性质并不是均一的。叶肉原生质体相互之间的差异较小, 而从培养细胞来的原生质体之间的异质性就较大, 例如质膜的折叠程度。又如在制备原生质体时, 即使处于最合适的渗透压条件下总会有些原生质体溶胞, 而在最合适的培养条件下初期也至少有 5—20% 原生质体降解; 这些都反映了它们个体间的差异。原生质膜有弹性、能伸展, 最大可以增加到四倍左右; 如从膜的折叠部分展开来计算, 表面积大不了这么多, 这个问题尚未弄清楚。用对糖类有专一性的染料(PTA-CrO₃, STA-CrO₃)或修改的 PAS 程序证明原生质膜上是有糖类存在, 但尚未能区分这些确是质膜的一部分或者只是老壁的残存物或新壁的前体。

原生质膜类似于细菌的膜, 没有或只有很少的甾醇; 多烯类抗菌素易使富含甾醇的膜不稳定, 从有些原生质体的质膜对此类抗菌素有抗性就可以说明这个问题。利用原生质体可以研究与质膜内膜相连的微管分布情况。首次报道是 Marchant(1978)用转板藻(Mougeotia)原生质体做的; 此技术近年来已用于高等植物。方法是先用多聚赖氨酸将原生质体贴在盖玻片上, 调节渗透压使之慢慢破裂, 将质膜洗涤固定后用抗体处理(带有 FTTC-异硫氰酸荧光素标记); 这样就可以清楚地看到质膜内表面的微管。还有其他荧光免疫法或负染法都可提供关于微管的大小、结构和分布的资料(Lloyd 等人, 1980; Volk 等人, 1980)。

关于原生质体质膜外表面电荷的研究工作

较多, 这些电荷特性反映了质膜上离子化基团的状况, 与质膜的组分有关而且也影响质膜的融合。文献中的结果不大一致, 大多数确定了质膜的表面电势值为负值; 如烟草、矮牵牛、豇豆等植物的叶肉原生质体, 其数值大致在 -10—-35 毫伏范围内^[8]。但有些工作表明烟草、燕麦、玉米等植物叶肉细胞的质膜表面电荷原来是负值, 一经分离成原生质体则由负值转为正值。玉米和燕麦原生质体质膜在形成细胞壁的整个过程一直保持微弱的正值, 而烟草在此过程又变成负值。不同植物的质膜表面电荷变化有可能和细胞壁形成以及能否进行持续的细胞分裂有关。为了进一步研究质膜表面的电性变化, 有人进行了各种离子、多聚-L-赖氨酸、多聚-L-鸟氨酸、酸性磷酸酶、唾液酸苷酶等对质膜表面电势值的影响; 试验表明膜上对碱性磷酸酶敏感的磷酸基团是决定质膜负电势值的成分之一, 其他如膜上的蛋白质也有一定的影响。

外源植物凝集素应用于质膜的研究引起了注意。植物凝集素(lectins)是一类专与糖类的残基相结合的球蛋白。目前最常用的是从刀豆种子来的伴刀豆球蛋白 A(Con A)。它特别容易和 α-D-葡萄糖及 α-D-甘露糖相结合, pH 近中性。它以四聚体的状态存在。有四个与糖相结合的位点, 因此可以引起原生质体集聚。¹⁴C 标记的乙酰-Con A 在分离的胡萝卜质膜表面不会分开又不影响生理活性; 因此是一个良好的标记。如用血清蛋白、胶态金和铁脲等将刚制备的原生质体以 ConA 连接做为超微结构研究的探针都证明 ConA 在质膜上有高度结合的位点。不仅是 ConA, 至少还有其他五种对糖类专一的凝集素可用类似的方法进行研究; 这对进一步了解质膜的结构与生理十分有用。

关于生长素与质膜的关系, 工作较多。膜上存在着生长素受体, 现已能从质膜上分离出生长素的受体蛋白; 对生长素在膜上的作用机理也有初步的假说。利用原生质体进行有关生长素的试验正在开始。许多人观察了不同来源

的原生质体对生长素的反应, 一经处理很快地影响了质膜的渗透性。例如用烟草叶肉原生质体的试验; 吲哚乙酸($1 \times 10^{-4}M$)加到与培养基处于渗透平衡的原生质体悬浮液会引起原生质体吸水、膨胀和溶胞。此速度因所用稳压剂的种类而异; 低分子量的稳压剂快、而高分子量的慢。在所有培养基中渗透势都是 8.7 大气压的情况下, 膨胀与溶胞的反应程度是蔗糖 > 甘露醇 > 聚乙二醇 (MW 400) > 聚乙二醇 (MW 3000)。这个作用过程可能涉及到要有一个与稳压剂分子相适应的通道, 通道增大有些稳压剂才可能进入原生质体。关于生长素对叶肉原生质体膜作用的原初机理有一些研究; 例如加 $1 \times 10^{-4}M$ 生长素到巢菜属原生质体悬浮液中, 一秒钟之内 pH 就下降了 0.2。用 $10^{-4}M$ DNP 可以降低生长素诱导的 pH 效应, 在 50—60 分钟后由于培养基酸化, 原生质体失去对生长素作用的反应能力; 但如果加入 KCl 则又可恢复, 此现象可能与 H^+ 流入有关。质膜与代谢和原生质体生长之间的关系还不十分清楚, 有待深入研究。

三、细胞壁的再生

细胞壁是植物细胞的特有结构之一。近年来已经知道它是处于不断变化和发展中而且参与细胞的生长分化等活动, 是有生命的^[9]。原生质体没有细胞壁, 但在一定培养条件下可以再生细胞壁; 这就提供了唯一的活系统以探讨细胞壁在质膜表面的组装。它吸引了许多形态、生理、生化的科学工作者。用原生质体为材料对于研究质膜和初生壁的关系, 特别是纤维素微纤丝的沉积; 对于再生壁的生物化学以及再生壁的培养条件和控制等都是很有用的。但应当看到分离的原生质体究竟是一个离体培养系统; 用于再生壁的多聚物等原材料的合成、运输和装配是否会和整体条件下受到的影响不同, 因而有些差异, 这是值得注意的问题。原生质体的形状变化、出芽、有重复质壁分离的能力等都可用来表示有新壁形成。如果用荧光

增白剂、对糖类专一的染料以及各种电镜技术还可以在较早的时期检查和深入研究细胞壁的再生。

大多数分离的原生质体在适宜的培养条件下 24 小时内就能开始再生细胞壁。细胞壁的再生显然由于植物种类和起源细胞的分化程度与生理状态而异; 有的需要 3—4 天, 有的至今仍难以再生壁。不能再生壁的原因可能是原生质体的活力差或者缺少适当的培养条件; 有人认为可以排除遗传因素的作用, 但没有试验证明。从分生组织细胞来的原生质体要比从已分化细胞来的原生质体能够较快开始壁的再生。例如从快速生长悬浮培养制备的原生质体 (如大豆、巢菜) 几乎都在分离后立即开始, 到培养 24 小时内就产生微纤丝的网状结构。胡萝卜悬浮培养细胞的原生质体在合适条件下也是没有迟滞期; 开始时纤维素微纤丝在质膜表面沉积较慢、先合成低分子量的, 以后合成加快、分子量也加大。同样, 纤维素多聚化程度也是由低到高, 到细胞分裂时渐趋正常。但是叶肉原生质体就不同了; 开始得慢。不同材料也有不同, 如葱的幼叶原生质体于培养 1.5 小时开始再生壁而成熟的叶肉原生质体要 4 小时才开始。对烟草叶肉原生质体研究得最多, 迟滞期从 3—24 小时不等; 这大概是由于取样时叶片状态的影响。从已分化的叶肉细胞来的原生质体在开始再生壁之前需要一定时间以调节其代谢、不同分化程度需要的时间不同, 是这些现象的可能解释。

不少人认为在原生质体培养开始时毫无老壁的残存物; 但 Prat 和 Roland (1971) 认为微纤丝在开始时是随机沉积, 而到了后期如此均匀, 似乎需要有一个自装配的模板。近年来有一个较为流行的模式用以说明植物细胞纤维素微纤丝的合成与沉积。Robenek 和 Peveling (1975—1977) 研究了香茵芋 (*Skimmia japonica*) 茎的培养细胞和叶原生质体的细胞壁再生; 认为原生质体转入培养基首先诱导了细胞核的转录活力。随之而来的是蛋白质的合成机构——多核糖体形成、纤维素前体合成的地方内质网剖面

数、线粒体数都增加。在内质网形成的纤维素合成酶移到了质膜上。多聚分子也经过通道穿过质膜外表再进行微纤丝的组装^[10]。在高等植物和藻类细胞质膜上的微纤丝末端已找到了这种酶的复合体；但还没有用原生质体来证实(Muller 等人, 1976; Gidding 等人, 1980)^[11]。

对于再生壁的性质, 超微结构的资料很多, 但生理生化的研究较少; 如培养的原生质体在表面所形成的微纤丝过去只从形态、染色反应、酶解情况来肯定是由纤维素所组成; 而 Klein 和 Delmer (1979) 用烟草叶肉和大豆悬浮细胞原生质体证明了微纤丝确含有结晶的纤维素。微纤丝的粗细由于所用的超微技术不一结果也不同。如用透射电镜和负染所报道的半径是 12—60 Å, 用复型和冰冻蚀刻的是 80—150 Å, 而用扫描电镜的大致在 400 Å。这种差异无疑是技术问题。用荧光抗体和负染技术研究培养的转板藻证明质膜内表的微管对控制微纤丝的方位是起作用的。在细胞壁再生的初期由于微纤丝的数量不够, 大部分基质的多糖都丢失到培养基中, 对于它们的性质了解得很少。已知高尔基体与初生壁生长、基质组分的合成与沉积有关, 但有相反的意见; 对内质网的作用也有争论。可以说有哪些细胞器参与合成再生壁的何种物质, 结果比较分歧甚至矛盾; 看来, 不同植物有其共同之处也可能有不同的程序。已经有不少事实证明原生质体再生壁时会出现不正常现象; 如出芽、中胶层细胞板位置不正常、或细胞板未完全形成等。果胶质的缺少也可能是细胞壁再生不正常的原因之一。原生质体一般在形成细胞壁以后才能进行分裂, 有时有“假壁”形成。对于再生壁形成与细胞核分裂的关系, 有的认为是两个独立过程, 也有认为两者有直接的关系。再生壁的形成是原生质体能否进一步发育的决定点。对于杂种细胞再生壁的化学组分、结构与特性的研究有待进行。

四、细胞分裂

文献上大量关于有丝分裂时纺锤体的结构

和功能、成膜体和细胞板形成的资料, 常用绣球百合(*Haemanthus katherinae*)胚乳细胞自然存在的原生质体进行试验。原生质体由于无壁有利于研究细胞分裂, 对于原生质体离体培养的条件和影响因素已有大量资料和评论, 不拟详述^[12]。但对原生质体培养时的诱导分裂特别是持续分裂目前仍存在很多问题。有的材料成功地制备了原生质体, 但离体培养时分裂频率很低因而给深入研究带来困难。

培养的原生质体在 2—3 天内常为薄而疏松的细胞壁所包。无疑的, 从原生质体形成的细胞能否开始分裂与起源细胞的分化程度和生理状态关系很大。例如用活跃分裂或分生能力强的细胞所制备的原生质体显然会比从未分裂或分生能力差的细胞所制备的原生质体开始分裂早、继续分裂的潜势大。这个现象十分重要。第一个禾谷类植物(珍珠粟)从原生质体能再生植株就是由于注意了这一点, 采用了胚性细胞系。但是仅仅从组织或细胞的分化状态来考虑有时也难以解释。例如同样是处于成熟状态能进行光合作用的叶肉原生质体, 由于来自不同植物表现就不一样。茄科的烟草属、矮牵牛属、曼陀属等叶肉原生质体易于细胞分裂, 而禾谷类的叶肉原生质体很难分裂, 禾谷类同一植物的悬浮细胞原生质体又比叶肉原生质体容易分裂; 其中的原因值得深思。分离的原生质体能否持续分裂看来既受了起源材料的遗传和生理特性的影响, 也受培养条件等外界的因素所制约。例如核的异染色质状态、原生质膜是否处于某特殊情况不能接受植物激素因此细胞核不能活化而难以持续分裂, 或者是由于原生质体不能形成完整而有正常功能的细胞壁等。能仅仅用改变外界条件来解决这些障碍吗? 看来还有困难、尚需努力。典型的例子就是 Potrykus 等人(1976)研究小麦、大麦、燕麦和玉米等 75 个种和品种的叶肉原生质体, 用了 144 种植物生长激素与活性物质共 40000 个组合企图寻找使之持续分裂的条件; 全未成功。但是这个障碍是否没有办法解决呢? 除了采用类似于胚性细

胞系这条途径外,有些试验给了一些启示;例如将大麦叶肉原生质体和活跃生长分裂能力很强的胡萝卜悬浮细胞原生质体融合可以得到分裂的异核体。这是一个很好的例子,即可能用分裂核以促进间期核的分裂。此外还有人比较了禾谷类和烟草叶肉原生质体,发现在分离和培养时两者的膜电位不同;是否和禾谷类原生质膜处于特殊状态有关还不清楚。

培养条件影响了原生质体能否脱分化和分裂的诱导,从而影响细胞团的形成速度与频率。植板密度十分重要,适宜密度是每毫升 1×10^4 到 5×10^5 个原生质体。低密度条件下原生质体或细胞难以生长的原因是什么,有何特殊需要,能否给以满足都引起多方面的探索。例如用饲喂层法、看护培养、条件培养和加富培养基等都获得良好效果。可以在每毫升3—5个或10个的密度下,甚至单个原生质体也能培养。但是其作用机理又是什么呢?还只有一些初步解释。

培养的原生质体如能分裂一般在48—72小时,第二次及以后的分裂大约以48小时间隔进行。植板率差异很大可以从1—2%到50—60%,同样材料结果也可有不同。有的试验证明烟草原生质体在开始培养时需要生长素,而细胞动素在以后生长才需要;激素与有丝分裂的关系可能由于核酸代谢的改变(Cooke和Meyer, 1981)^[13]。总之,原生质体的分裂、生长与分化是受了遗传、生理、培养条件和技术等因素的综合影响,有许多规律尚未掌握。

五、原生质体融合

关于原生质体的诱导融合方法、融合细胞的培养和选择以及再生植株、杂种后代的观察与分析等已有相当多的论述可以参考^[12,15]。从细胞学的角度来说,原生质体融合有两个值得注意的方面即:(一)提供独特的机会了解融合过程中膜的相互作用,(二)通过融合产物的培养提供良好系统探讨在混合胞质中各种细胞器,特别是细胞核的命运。这里补充一些有关情况。电镜观察表明,原生质体表面必须没

有纤维素微纤丝才能融合得好;而二膜之间的接触可以是连续的(如胡萝卜)也可以局部接触是不连续的(如豌豆和大豆)、或者是兼而有之。有的报道原生质体分泌的类脂小滴会参与集聚或发现在融合时膜的颗粒有移动,但均缺少足够证据。目前尚无关于融合膜是嵌合性结构的直接证据;如用胶态金或荧光探针将质膜标记有利于研究融合膜的命运。Fowke等人(1979)用衣藻没有细胞壁的突变体细胞与胡萝卜原生质体融合,使衣藻的细胞器释入胡萝卜的胞质。这个研究系统的好处是此衣藻突变体容易培养、来源多;与衣藻质膜相联的基部在电镜下是质膜融合的有用标记。如用荧光技术在光学显微镜下也可以是有用的标记;此外衣藻还有不少有价值的突变体可用于研究膜融合^[14]。

原生质膜融合以后,胞质融合较慢,一般要3—12小时;而核融合是原生质体融合的关键。在胡萝卜和大麦等融合试验中都观察到间期核的融合,融合后在继续培养条件下如何发展尚无完整资料;看来此类现象并非常见也不重要。有丝分裂核的融合是关键。这类现象常在胞质活化而二核靠近的条件下观察到。融合处理后如果形成多核细胞,当DNA合成不同步不协调时会发生分裂紊乱形成多极,或核分裂而胞质不分裂等异常现象。同种的多核融合体有可能同步分裂如大豆,异种的则不正常。如果二亲本的核进行同步分裂形成融合核则有可能继续分裂下去,例如大豆和玉米的融合细胞第1次分裂约有50%同步而第2次分裂约有30%同步。由于亲本不同表现也不一致,如大豆和蚕豆的融合体中未见到二亲本细胞核的同步分裂。异源核在混合的胞质中能否同步分裂,涉及了亲缘关系、细胞周期的调控等一系列的问题需要深入研究。已有一些报道,处于不同分裂时期的二亲本细胞核可以相互影响;例如快速生长的胡萝卜悬浮细胞原生质体与大麦叶肉原生质体,大豆悬浮细胞原生质体与大豆、玉米叶肉原生质体,同步有丝分裂的小麦

原生质体与未分裂的水稻原生质体的融合试验中都观察到期前染色体凝聚(PCC)现象。

至于双亲的染色体亲和性问题,一般说来亲缘越远特别是有性杂交不亲和的植物间,有1个亲本的染色体被排除或消失的情况严重;但这在不同亲本组合中是有不同的。Kao(1977—1980)观察大豆和烟草的体细胞杂种时发现在开始几个细胞世代中有丝分裂不同步,杂种细胞团在后代繁殖中不断失去烟草的染色体,但近来用杂种细胞原生质体再与烟草原生质体回融两次,观察到烟草染色体的稳定性有所增加。Gleba等人(1978—1980)对拟南芥菜和油菜体细胞杂种所观察到的情况就不同;融合细胞培养7个月以后,细胞内仍然保存着2个亲本的染色体。但是继续观察发现有一个系的油菜染色体消失了。从染色质和RuDP羧化酶的测定仍然有油菜的叶绿体小亚基。在原生质体融合后28—30个月又有两个系得到植株。从生化和形态分析证明有一个杂种细胞系并不象一般所看到的只有一个亲本的染色体被迅速排斥;此系的染色体消失甚慢,而且既可以失去油菜的染色体也可以失去拟南芥菜的染色体。由于核融合和染色体形为的不同,加上经过诱导愈伤组织和分化阶段,最后形成的再生植株就可能是亲和的细胞杂种(双二倍体、多倍体)、部分亲和的细胞杂种(非正倍体、带有一亲本少量重组或重建而另一亲本全套染色体的植株)、胞质杂种或嵌合体。对于融合细胞在生长分裂过程中其他细胞器的变化也有一些零星的观察,如核周围出现许多意义不明的小泡、叶绿体中基粒和类囊体膨大、贮藏淀粉粒消失,每个细胞的叶绿体数减少等。

原生质体不仅可以进行诱导融合,还可以用以进行其他遗传操作,如摄取试验。通过内吞作用摄入细胞、原生质体、亚原生质体、细胞核、叶绿体、蓝绿藻、细菌、病毒、各种大分子以及聚苯乙烯小球等。近来Malmberg等人(1980)成功地从烟草与番茄的悬浮培养细胞和

百合科的花粉母细胞分离出有丝分裂或减数分裂的染色体。Szabados等人(1981)从小麦及欧芹培养细胞分离出中期的染色体再用玉米、小麦及欧芹的原生质体进行摄取试验;染色体的摄取率是 10^{-4} — 10^{-5} ,至少在以后3小时染色体的形态结构完整^[18]。其他如用脂质体进行摄取试验等企图将外源遗传物质引入植物细胞都是有意义的尝试。当然如果能将目的基因通过特定的载体引入原生质体使之发生遗传转化和再生植株格外使人感到兴趣,很有发展前途。

六、结 束 语

原生质体研究是植物细胞生物学中一个分支;历史较短、涉及面广、但问题较多。分离和培养的原生质体是进行有关研究的重要基础。分离的原生质体经历了从有细胞壁到没有细胞壁和在合适条件下从没有细胞壁到又有细胞壁的过程。它在这个时期实际上处于短暂的过渡状态;一旦有了新的细胞壁就形成了新的完整细胞,开始新的生活。也正是这个短暂的过渡状态提供了良好的机会去探讨诸如细胞全能性、生物膜、大分子合成、细胞器的结构与功能、细胞融合、基因工程等重要问题。但是原生质体研究必需建立在对细胞、组织(以至个体)的生存条件以及其生理、遗传和形态特性有深入了解的基础上;所占有的资料越可靠详尽则原生质体研究越容易发展。掌握从各种植物制备大量有活力的原生质体,以及促使它们有高的分裂频率又能形态发生的规律是重要的。但过去比较忽视了原生质体基本特性的研究;例如原生质膜、内吞作用和摄取时的反应、细胞壁的降解与再生、激素和各种外界条件的作用机理、细胞分裂的调控、融合的机理、核质关系、细胞分化的规律等等。这是应当引起注意的。

近二十多年来原生质体研究已积累了相当资料,有不少设想;存在问题不少但前景广阔。更需要尽量吸取其他学科分支之长处、深入而细致地开展工作。

参 考 文 献

- [1] 夏镇澳, 1980, 生物科学动态 2: 13—18.
- [2] Butenko, R. G., 1979. *Int. Rev. Cytol.*, 59: 323—373.
- [3] Cocking, E. C., 1977. In "Plant growth regulation", 281—285.
- [4] Fowke, L. C. and O. L. Gamborg, 1980. *Int. Rev. Cytol.*, 68: 9—51.
- [5] Power, J. B., 1977. In "The molecular biology of plant cell", 418—428.
- [6] Schieder, O. and I. K. Vasil 1980. *Int. Rev. Cytol.*, suppl. 11B, 21—46.
- [7] Vasil, I. K. and V. Vasil, 1980. *Int. Rev. Cytol.*, suppl. 11B, 1—20.
- [8] 陈季楚, 1981, 细胞生物学杂志 3, 11—140.
- [9] 黄祥辉, 1981, 植物生理学通讯, 1, 22—30.
- [10] Robenek, H. and Peveling, E., 1977, *Planta*, 136: 135—145.
- [11] Gidding, T. H. et al, 1980, *J. Cell Biol.*, 84: 327—339.
- [12] 中国科学院上海植物生理研究所, 1978, 植物组织和细胞培养, 第十四章 209—303.
- [13] Cooke, R. and Meyer, Y., 1981, *Planta*, 152: 1—7.
- [14] Fowke, L. C. et al., 1979, *Planta*, 144: 341—347.
- [15] 夏镇澳, 1979, 植物生理学通讯 3, 58—65.
- [16] Szabados, L. et al., 1981, *Planta*, 151: 141—145.

天 然 杀 伤 (NK) 细 胞

R. B. Herberman, MD

导 言

除免疫细胞毒 T 细胞、巨噬细胞和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) K 细胞以外, NK 细胞最近也被认为是细胞毒效应细胞家族中的成员。它们能对肿瘤细胞和其它一些类型的靶细胞起反应, 象是淋巴细胞的一个小的亚群, 具有一套特殊的细胞表面标志和形态学特征。

正常个体淋巴细胞对肿瘤细胞和培养的肿瘤细胞株的细胞毒效应, 最初是在寻找带瘤个体淋巴细胞对自身肿瘤的或相同组织和病因类型肿瘤的特异细胞毒活性研究过程中认识到的。在那些研究中, 人们设想正常个体淋巴样细胞将会是无反应的, 可以起基线对照的作用, 可是一些正常对照淋巴细胞对某些靶细胞的细胞毒, 实际上都超过了带瘤个体的淋巴细胞。这些异常的对照反应最初被认为是由于体外的人为现象, 不过后来证明大部分或所有这种反应性都是由 NK 细胞引起的。这些发现使得有必要重新评价癌瘤病人细胞的细胞毒反应, 以便从更特异的免疫效应细胞中区别出 NK 细胞的活性。

近几年, 一些实验室对人类和啮齿类的 NK 细胞已作了广泛的研究, 其中一些结果将概括在这里。有关天然细胞介导的细胞毒性和 NK 细胞更详细的情况, 读者应查阅最近的一些综述和这一课题的书。

方 法

对 NK 细胞活性的一些早期观察, 特别在人体中, 是用长期细胞毒性试验 ($^{125}\text{IudR}$ 释放试验或目测微量细胞毒性试验) 做的。为了详细地弄清 NK 细胞的特性和迅速得到定量的资料, 许多研究者已经改用短期 (通常 4 小时) ^{51}Cr 释放试验。靶细胞悬液用 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 标记, ^{51}Cr 很容易进入细胞并与细胞内蛋白质共价结合。在 37°C 4 小时试验过程中, 大多数或所有的标记物都留在存活的、未受损细胞的内部, 而在细胞溶解或细胞表面膜遭受较大损害时, ^{51}Cr 则释放到介质中。因此, 介质中 ^{51}Cr 的量就表示所溶解的细胞数量。这种短期试验的主要条件是要求不断提供对迅速溶解相当敏感的一种靶细胞。就临床研究而言, 许多研究者现在使用的是来自慢性骨髓样白血病 (CML) 病人胸膜