

分子之间的部分交联。有关辐射对染色质 DNA 和核内蛋白质,尤其是组蛋白和某些起结构作用的非组蛋白的交联作用,已经引起人们的注意^[1]。

上述实验表明:造血组织—脾脏 RNA 合成对 γ -射线的辐射是敏感的,照后早期即可观察到明显抑制。其抑制机理:一方面是由于 DNA 指导的 RNA 聚合酶受到抑制或钝化,另一方面则是由于 DNA 模板的转录功能受到损伤,导致模板转录活性的降低。因此,辐射对核内 DNA 转录活性的损伤是同 DNA 模板效率和 DNA 指导的 RNA 聚合酶活力改变密切相关。所以,深入地从整个基因组,从基因组 DNA 与非 DNA 成分(组蛋白、非组蛋白、核内 RNA)及细胞内其他因素的相互作用中,研究辐射对真核细胞损伤与修复规律无疑是重要的。

参 考 文 献

[1] 孙志贤, 1980, 国外军事医学资料(放射医学

分册), 3:15—29。

- [2] Widnel, C. C. and Tata, J. R. 1964. *Biochem. J.* 3: 313—317.
- [3] Chauveau, J. et al. 1956. *Exp. cell. Res.* 11: 317—321.
- [4] Babcock, D. F. et al. 1973. *Biochem. J.* 133: 797—804.
- [5] Roeder, R. G. and Rutter, W. J. 1970. *Proc. Natl. Acad. sci. USA*, 65: 675—682.
- [6] Marushige, K. and Bonner, J. 1966. *J. Mol. Biol.* 15: 160—174.
- [7] Kay, E. R. M. et al. 1952. *Amer. chem. Soc.* 74: 1724—1726.
- [8] Marmur, J. 1961. *J. Mol. Biol.* 3: 208—218
- [9] Jacob, S. T. et al. 1975. *J. Biochemistry*, 14: 3589—3597
- [10] Spelsberg, T. C. et al. 1971. *Biochem. Biophys. Acta*, 228: 202—211.
- [11] Burton, K. 1956. *Biochem. J.* 62: 315—323.
- [12] Schacterle, G. R. 1973. *Anal. Biochem.* 51: 654—657.
- [13] Subba, Rao M. N. 1971. *FEBS. lett.* 48: 161—169.

叶片细胞的膜束缚 ATP 酶活性的测定

陈季楚 傅婉华

(中国科学院上海植物生理研究所)

目前已在不同植物的一些器官及组织中发现细胞膜上存在离子激活的 ATP 酶活性。研究得较多的有根——涉及的植物如燕麦、大麦及玉米等; 胚轴——如大豆、蚕豆、笋瓜等; 此外尚有叶片表皮、子叶、芽鞘及种子等不同组织。这些工作均以植物组织为材料来直接分离膜分部。不少作者认为, 这种束缚于细胞膜上能为离子激活的 ATP 酶与离子吸收、气孔关闭及激素诱导的生长等生理过程有关。叶片为具有重要生理功能的器官, 但有关束缚于叶肉细胞质膜上 ATP 酶的特性及作用的研究不及根的有关研究深入, 而且以叶片原生质体为材料来分离质膜分部进行 ATP 酶的研究尚未见报道。考

虑到原生质体可能成为分离质膜的理想材料, 我们以单子叶植物元麦及双子叶植物蚕豆幼叶的叶肉原生质体为材料, 测定分析与膜系相连的 ATP 酶的活性, 作为以后进一步探讨叶片中束缚于膜上 ATP 酶的特性及功能的基楚。

材 料 和 方 法

植物材料 元麦(*Hordeum vulgare var nudum*) 品种 114, 取在室温中水培 5—6 天幼苗的第一叶。蚕豆(*Vicia faba* L.) 上海栽培品种, 用十月下旬播种后 2—4 个月的植株, 取由上至下第二节上舒展的幼叶供试验用。

元麦及蚕豆叶肉原生质体的制备 以酶解脱壁法制备原生质体。用于元麦的酶液为 0.7% 纤维素酶, 以

含 0.7M 甘露醇的 20mM Tris-HCl (pH5.8) 缓冲液配制; 用于蚕豆的酶液为 0.7% 纤维素酶加 0.3—0.5% 果胶酶, 以含 0.7M 甘露醇的重蒸水 (pH5.6—5.8) 配制。详细步骤见以前报告^[1]。如此制得的新鲜原生质体用作试验材料。

膜分部的制备 参照 Kasamo^[2] 的方法, 但根据原生质体的特点改进详述如下: 将原生质体以配制酶液的溶液洗涤后, 于冰浴条件下加预冷的研磨试剂研磨, 研磨试剂内含蔗糖 0.25M、 β -巯基乙醇 20mM、EDTA 3.0mM 及 pH7.5 的 Tris-HCl Tris 20mM。研磨至镜检原生质体破碎, 此时可见介质中游离有大量的叶绿粒。研磨后的匀浆于 0℃、1,500g 离心 15 分钟, 取上清液再于 0℃、10,000g 离心 45 分钟, 将沉淀悬浮于 1.5 毫升研磨试剂中, 铺层于一不连续蔗糖密度梯度上。蔗糖密度梯度离心法参照 Nigam^[3] 的方法。具体步骤如下 (并参见图 1): 每一离心管由下至上共铺五层蔗糖溶液, 每层 0.7 毫升, 其浓度从上至下依次为 35.0% (W/V) (蔗糖密度 $d = 1.14$)、42.9% ($d = 1.16$)、48.45% ($d = 1.18$)、54.1% ($d = 1.20$) 及 59.9% ($d = 1.22$), 样品 0.5 毫升, 样品的蔗糖浓度为 8.56% ($d = 1.03$)。所有蔗糖溶液中均含 20mM Tris-HCl (pH7.5) 及 20mM β -巯基乙醇。铺样后于 MSE-50 离心机用 Swing 3×5 ml 转头以 30,000 转/分 (80,000g) 离心 90 分钟。离心后得 5 条界面及一沉淀。各界面由上至下分别为 L-0、L-1、L-2、L-3 及 L-4, 沉淀为 L-5。用磨平针尖的 6 号注射针由上至下分别收集各界面物质, 并加 20mM Tris-maleate (pH6.5) 缓冲液到一定体积。如此所得 L-0—L-5 各膜分部即用作测定 ATP 酶活性及电镜检查的膜酶样品。

ATP 酶活性及蛋白质质量的测定 ATP 酶活性的测定是根据反应体系于 38℃ 保温 30 分钟所释放的无机磷 (Pi) 量进行的。2 毫升反应体系包括样品 (200—400 微克蛋白质), Tris-maleate 20mM (pH6.5)、ATP

3.0mM、 $MgCl_2$ 5.0mM。反应以加入 0.5 毫升样品开始, 加 0.2 毫升预冷的 20% 三氯醋酸终止。以先加冷三氯醋酸使酶失活的样品作为对照, 镁离子激活的 ATP 酶 (Mg^{++} -ATP 酶) 活性以反应体系中有 Mg^{++} 及无 Mg^{++} 时两者 ATP 酶活性的差异来表示。Pi 的测定依照 Ames^[4] 的方法。蛋白质质量的测定依照 Lowry^[5] 等人的方法。

电镜观察 将 L-0—L-5 各样品加 Tris-maleate (pH6.5) 缓冲液后离心 (0℃、30,000g) 30 分钟两次以洗涤沉淀。收集沉淀悬浮于少量 Tris-maleate (pH6.5) 缓冲液中, 以 2% 磷钨酸钠 (PTA) 进行负染后在 3 万倍下观察, 方法依照 Lucy^[6] 等人的报告。

结果和讨论

由元麦及蚕豆叶肉原生质体所得的 10,000g 沉淀悬浮物经 5 层不连续蔗糖密度梯度离心后, 在每两层之间的界面上得到清晰的, 厚度不一的五条带 L-0—L-4 及沉淀 L-5 共 6 个分部 (见图 2), 此即本试验所制得的各膜分部。5 条带的蔗糖密度 (d) 为: L-0: $1.03 \leq d \leq 1.14$, L-1: $1.14 \leq d \leq 1.16$, L-2: $1.16 \leq d \leq 1.18$, L-3: $1.18 \leq d \leq 1.20$ 及 L-4: $1.20 \leq d \leq 1.22$ 。各带呈近于无色到深浅不同的黄、绿色。蚕豆的带色较元麦的深。两者各膜分部颜色的深浅顺序不同, 元麦为 L-3 > L-2 > L-4 > L-1 > L-0, 蚕豆为 L-2 > L-3 > L-4 > L-1 > L-0。

Kasamo^[7] 等人的工作指出, 叶片细胞的亚细胞分部中, Mg^{++} -ATP 酶活性较高的分部为 10,000g 的沉淀部分。我们的试验分析了元麦与蚕豆 10,000g 沉淀进一步超离心分离所得的

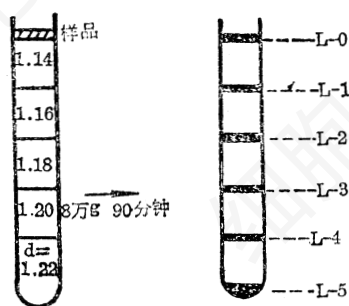


图 1 蔗糖密度梯度离心分离膜分部示意图



图 2 超离心后的膜分部 (左: 元麦, 右: 蚕豆)

L-0—L-5 各膜分部的 ATP 酶活性, 此外还分析了蚕豆 1,500g 沉淀的酶活。

由表 1 及表 2 可见, 元麦及蚕豆叶原生质体的 L-0—L-5 各膜分部均表现出 ATP 酶活性及 Mg^{++} -ATP 酶活性。镁离子诱导的对 ATP 酶活性刺激的百分率表明, 元麦中较高的刺激作用在 L-0—L-3, 即在 d 为 1.14—1.20 的部分, 而蚕豆的则在 L-3, 即 d 为 1.18—1.20 之间。此较高值均达无镁时的一倍以上。蚕豆 1,500g 沉淀的 ATP 酶活性与膜分部不同, 不表现出为 Mg^{++} 激活。电镜观察表明, 质膜膜泡在元麦与蚕豆 L-0—L-5 各膜分部中的分布并不集中, 而是较分散 1 于 L-2 较多, L-1、L-0 及 L-3 中较少。即在 d 为 1.14—1.18 之间均有分布。

由表 1 及表 2 可见, 元麦各膜分部的 ATP 酶活性及 Mg^{++} -ATP 酶活性一般都较蚕豆的酶活水平高, 元麦中 Mg^{++} 诱导 ATP 酶活性的激活多在一倍左右, 而蚕豆一般低于一倍。

表 1 元麦叶肉原生质体各膜分部的 ATP 酶活性

| 分部 | 各分部含蛋白质质量(毫克) | ATP 酶活性 (nmoles Pi/毫克蛋白质/分) | | | Mg^{++} 刺激 ATP 酶活性 (%) |
|------------|---------------|--------------------------------|-------------|------------------|--------------------------|
| | | - Mg^{++} | + Mg^{++} | Mg^{++} -ATP 酶 | |
| 10,000g 沉淀 | | | | | |
| L-0 | 0.58 | 358 | 800 | 442 | 124 |
| L-1 | 0.45 | 294 | 621 | 325 | 111 |
| L-2 | 0.73 | 445 | 932 | 487 | 109 |
| L-3 | 1.15 | 272 | 698 | 426 | 157 |
| L-4 | 0.47 | 182 | 322 | 140 | 77 |
| L-5 | 0.42 | 218 | 340 | 122 | 56 |

以原生质体为材料研究质膜的报道虽不少, 但尚未见以本文所用材料分离膜来进行叶细胞质膜上的 ATP 酶活性的报道。我们的工作表明, 从叶肉原生质体能分离制备具生化活性的膜分部。

关于叶肉细胞中膜束缚的 Mg^{++} -ATP 酶

表 2 蚕豆叶肉原生质体各膜分部的 ATP 酶活性

| 分部 | 各分部含蛋白质质量(毫克) | ATP 酶活性 (nmoles Pi/毫克蛋白质/分) | | | Mg^{++} 刺激 ATP 酶活性 (%) |
|------------|---------------|--------------------------------|-------------|------------------|--------------------------|
| | | - Mg^{++} | + Mg^{++} | Mg^{++} -ATP 酶 | |
| 10,000g 沉淀 | | | | | |
| L-0 | 24.1 | 98 | 124 | 26 | 27 |
| L-1 | 12.5 | 182 | 215 | 33 | 18 |
| L-2 | 21.9 | 176 | 227 | 51 | 29 |
| L-3 | 17.8 | 128 | 275 | 147 | 115 |
| L-4 | 8.6 | 183 | 292 | 109 | 60 |
| L-5 | 10.0 | 198 | 325 | 127 | 64 |
| 1,500g 沉淀 | 122.2 | 56 | 56 | 0 | 0 |

的工作, Kasamo^[8] 在研究病毒感染烟草叶片时分析了叶肉细胞及表皮细胞该酶的状况, 指出叶肉细胞的细胞膜也具 Mg^{++} -ATP 酶活性。我们的工作表明, 元麦及蚕豆叶肉细胞膜分部中存在的 ATP 酶活性亦能不同程度地为 Mg^{++} 激活, 但激活的水平低于已经报道的根, 表皮等组织中细胞质膜上 Mg^{++} 激活的水平。从各分部不同程度地存在 Mg^{++} -ATP 酶活性, 以及电镜观察结果所表明的膜泡并不集中分布于某一界面的结果来看, 离子激活的 ATP 酶尚不能成为植物细胞质膜的一种标记酶, 这是与所见报道的结果一致的。离子激活的 ATP 酶在细胞膜上表现出也仅是一定的特异性; 不同组织的细胞可以观察到有不同程度的特异化作用, 在我们的结果中可以看到不同植物的同一组织的细胞, Mg^{++} -ATP 酶活性在质膜上所表现的特异化程度也不相同, 例如蚕豆中这种特异化程度就不显著, 这可能与酶活性水平较低有关。

叶肉细胞膜的作用涉及到离子及光合产物的运转等多种生理过程, 膜束缚的离子激活的 ATP 酶的特性以及与这些需能过程的关系均有待进一步的研究。

我所技术室张正福同志、纪来升同志参加超离心部分的工作, 郭一松同志参加电镜观察的工作, 特此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 陈季楚、傅婉华, 1980, 实验生物学报 13: 281—286
- [2] Kasamo, K. and T. Yamaki., 1976. *Plant and Cell Physiol.*, 17: 149—164.
- [3] Nigam, V. N., R. Morais and S. Kareasaki., 1971. *Biochim. Biophys. Acta*, 249: 34—40.
- [4] Ames, B. N., 1966. *Methods enzymol.*, 8: 115—118.
- [5] Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall., 1951. *J. Biol. Chem.*, 193: 265—275.
- [6] Lucy, J. A. and Glauert, A. M., 1954. *J. Mol. Biol.*, 8: 727—748.
- [7] Kasamo, K. 1979. *Plant and Cell Physiol.*, 20: 281—292.
- [8] Kasamo, K. and T. Shimomura., 1978. *Plant Physiol.*, 62: 731—734.

人 参 细 胞 悬 浮 培 养 的 研 究

Ⅰ. 悬浮培养细胞的生长

丁葆祖 柏淑华 吴 逸 杨静仪

(山西生物研究所)

人参细胞的悬浮培养,是在其他植物悬浮培养的基础上发展起来的。首先用于悬浮培养并获得成功的植物是烟草和万寿菊(Muir, 1953)。此后有胡萝卜、白云杉,金鱼草等。Nickell(1956)第一次证明了植物细胞可以象微生物一样进行培养,并不断生长。后来,他又用微生物发酵技术研究了悬浮培养细胞生长的动力学,生化组成和特殊的代谢产物的产生^[3]。Rose等(1972)研究了甘薯培养细胞代谢活力的变化动态,氮和蔗糖的利用速度以及细胞中氮和碳水化合物的累积^[9]。Street等从1966年开始连续数年对假挪威槭悬浮培养细胞进行了多方面的研究^[7,8,6,5]。但是有关人参细胞悬浮培养的系统资料却很少。我国进行人参细胞悬浮培养研究的有Chang(张唯勤)等(1979)(台湾省)^[4]、丁家宜等(1981)^[1]和丁葆祖等(1981)^[2]。我们的前一个报告,观察了悬浮培养细胞的形态结构和繁殖。本文报道悬浮培养细胞的生长和代谢活动的初步结果。

材 料 和 方 法

材料来源与培养条件同前文^[2]。人参根、茎诱导的愈伤组织细胞,经二年继代培养,愈伤组织淡黄色。采

用MS培养基,附加2,4-D 0.5毫克/升。每批培养30—35天。每五天取样一次。

方法:

(1) 培养细胞生长量的计算,以细胞鲜重的增长倍数表示。即接种时细胞鲜重与生长若干天后细胞鲜重之比。

(2) 糖的测定,蔗糖水解后生成葡萄糖,用弗林试剂进行定量测定。用公式

$$\frac{(\text{空白毫升数} - \text{样液耗糖数}) \times \text{稀释倍数} \times 0.1}{\text{取样毫升数}}$$

计算,即可得到培养基内的含糖量。

$$\text{蔗糖利用率} = 1 - \frac{\text{样品液蔗糖含量}}{\text{原液蔗糖含量}}$$

(3) 二氧化碳的测定,利用FQW-CO₂红外线气体分析仪,定期测量整瓶培养细胞生长过程中CO₂释放量。测定时,气体流量0.3升/分,打开记录仪约20分钟后,当指针达到基本恒定时,记取其数值,每个样品重复4—6次。计算公式:

$$\text{CO}_2 \text{ PPM/小时} \cdot \text{克鲜重} = \frac{\text{CO}_2 \text{ PPM数} \times \text{流量} \times 60 \text{分钟}}{\text{细胞鲜重(克)}}$$

结 果 与 讨 论

一、悬浮培养细胞的生长动态

在人参细胞悬浮培养过程中,随着培养时间的进展,细胞数量在不断改变。这种改变有一定的规律性。正如Wilson等^[10]1971年描述