

某些种类的 mRNA 不会减少,只是,增加是净结果。事实上,正常肝的某些 mRNA 在肝癌 pRNA 中不存在。表明癌不是无规律的增加,而是有增有减,是有规律的,符合癌细胞表型变化的规律。这种现象不仅在肝癌中存在,而且在胚肝(1)、再生肝(12)中程度不同的存在。为什么肝癌正在翻译蛋白的 mRNA 与正常肝有不同呢?可归之于它们的基因的表达在转录或翻译的调节上发生了变化所引起。

### 参 考 文 献

- [1] 徐永华,彭素芬,张玉砚. 1979. 实验生物学报, 12:237-245.
- [2] Tse T. P. H., H. P. Morris, and J. M. Taylor, 1978, *Biochemistry*, 17(15):3121-3128.
- [3] Atryzek V., Tamaoki, and N. Tausto, 1980, *Cancer Research*, 40:3713-3718.
- [4] 强家模,季闻行,孙兰英,徐永华. 1978. 实验生物学报, 11:87-93.
- [5] Bernardi G., 1971, *Chromatography of Nucleic Acids on Hydroxyapatite Columns*, in "Methods in Enzymology", 21(Part D): 95-139.
- [6] Marmur J., 1961, *J. Mol. Biol.*, 3:208-218.
- [7] Britten R. J. D. E. Graham, and B. R. Neufeld, 1974, *Analysis of Repeating DNA Sequences by Reassociation*, in "Methods in Enzymology", 29(Part E):363-418.
- [8] Grady L. J., A. B. North, and W. P. Campbell, 1978, *Nucl. Acids Res.*, 5(3): 697-712.
- [9] Gets M. J. L. C. Altenburg and G. F. Saunders, 1972, *Biochim. Biophys. Acta*, 287:485-494.
- [10] Taylor J. M. and R. T. Schimke, 1973, *J. Biol. Chem.*, 248(22):7661-7668.
- [11] Deeley R. G., J. I. Gordon, A. T. H. Burns, K. P. Mullinix, M. Binastein, and R. F. Goldberger, 1977, *J. Biol. Chem.*, 252(22):8310-8319.
- [12] Colbert D. A., M. V. T. V. Atryzek, and N. Fausto, 1977, *Develp. Biol.*, 59:111-123.
- [13] 徐幼海. 1982. 实验生物学报, 15:331-340.

## 用未标记免疫酶技术在甘蔗大豆叶片内定位 RuBP 羧化酶\*

王 美 琪

(中国科学院上海植物生理研究所)

RuBP 羧化酶是绿色植物同化 CO<sub>2</sub> 的关键酶。研究 RuBP 羧化酶在 C<sub>4</sub> 植物叶片内的分布,有助于阐明 C<sub>4</sub> 植物的光合作用结构和功能的特点,以及 RuBP 羧化酶对光合作用的调控功能。这种工作具有明显的理论意义和实用价值。

近年来对利用免疫荧光法在 C<sub>4</sub> 和 C<sub>3</sub> 植物叶切片内定位 RuBP 羧化酶已有所研究<sup>[1,2]</sup>,但尚未见到用未标记免疫酶染色技术在植物叶片内定位 RuBP 羧化酶的报道。

本文应用未标记免疫酶技术在叶片内定位 RuBP 羧化酶,它比免疫荧光技术、免疫酶标技术更加灵敏和专一。

以特异性兔抗 RuBP 羧化酶抗血清为第一抗体,用未标记免疫过氧化物酶技术在大豆 (*Glycine max.*), 甘蔗 (*Saccharum sinensis*) 叶冰冻切片内定位 RuBP 羧化酶,借助光学显微镜观察实验结果。

### 材 料 与 方 法

#### 一、抗血清的制备

1. 特异性抗 RuBP 羧化酶抗血清 从菠菜叶片中提取和纯化的 RuBP 羧化酶,酶纯度较高,在聚丙烯酰胺凝胶电泳上呈现一条带。用纯化的 RuBP 羧化酶作为抗原,制备兔抗 RuBP 羧化酶抗血清,方法同前

\*双磷酸核酮糖羧化酶简称 RuBP 羧化酶。

文<sup>[2,3]</sup>,并测抗血清的效价。在琼脂扩散中免抗 RuBP 羧化酶抗血清对浓度为 31—32 微克/毫升 RuBP 羧化酶仍能产生沉淀线。

由于我们从菠菜提取的 RuBP 羧化酶专一抗体与甘蔗、大豆等植物提取的 RuBP 羧化酶之间存在较明显的交叉反应。因此,这一抗体也可作为第一抗体用来检测甘蔗、大豆叶片内该酶分布的情况。

2. 羊抗兔  $\gamma$  球蛋白抗血清\* 作为第二抗体。

3. 兔抗辣根过氧化物酶抗血清 用中国科学院东风生化试剂厂生产的辣根过氧化物酶(HPO)(RZ = 3.0, type I)作为抗原,免疫雄性家兔,每次注射 1 毫升抗原乳剂(内含 HPO 1 毫克,生理盐水 0.5 毫升, Freund 氏完全佐剂 0.5 毫升),每隔 10 天左右注射 1 次,共注射 5 次,在第 5 次注射后 20 天放血,分离抗血清,测效价。在琼脂扩散法中该抗血清对浓度为 15—16 微克/毫升 HPO,仍能产生沉淀线。

## 二、过氧化物酶-抗过氧化物酶可溶性复合物(简称 PAP)的制备

PAP 的制备参照 Sternberger 等<sup>[14]</sup>和 Konrad C. Hsu<sup>[5]</sup> 的方法。

本实验所用的 HPO 其 O.D.<sub>403</sub> 为 2,164, PAP O. D.<sub>403</sub> 为 0,418, PAPO. D.<sub>280</sub> 为 0,735; 计算得出<sup>[6]</sup> HPO 与抗 HPO 抗体结合的克分子比值为 1.6, 即 3.2 克分子 HPO 和 2 克分子抗 HPO 抗体相结合。

## 三、制作叶冰冻切片和切片染色过程

1. 制作大豆和甘蔗的叶冰冻切片 方法同前文<sup>[2]</sup>,制作 10 微米厚的叶冰冻切片。

2. 染色过程 酶作用底物为 3,3'-二氨基联苯胺盐酸盐(简称 DAB),实验需当天配制。以 0.05 M TrisrPH 7.6 作溶剂,配成 1 毫克/1 毫升。

为了防止非特异性染色背景的干扰和获得较好的染色效果,需预先选定用第一抗体,第二抗体和 PAP 三者染色叶切片过程的最适浓度。经用各种稀释度和试剂染色叶切片后,分别确定为 1:20—1:25; 1:20 和 1:20。

为了排除内源过氧化物酶对染色结果的干扰,先将上述两种叶冰冻切片在 1% NaN<sub>3</sub> 溶液中浸泡 5 分钟,然后用 0.01 M PH 7.2 PBS 液洗 3 分钟,经冷风吹干后按以下程序染色:

(1) 用专一性免抗 RuBP 羧化酶抗血清(1:20)滴在两种叶切片上,放置在潮湿盖盖的糖瓷盘内,温育 37℃, 1 小时,用 0.01 M PH 7.2 PBS 冲洗切片,将多余的抗血清去除,用冷风吹干。

(2) 用第二抗血清(即羊抗兔  $\gamma$  球蛋白抗血清)(1:20)滴在两种叶切片上,处理同前。

(3) 再用可溶性 PAP 复合物(1:20)滴在叶切片上,处理同前。

最后滴加新配制的 DAB 0.5 毫升在每张经处理过的叶切片上,并在室温、暗处,缓慢振荡 30 分钟,然后分别滴加 10 微升 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 显色 1 分钟,立即用蒸馏水冲洗叶切片。经冷风吹干用甘油胶封片<sup>[7]</sup>。

对照组:用正常兔血清(1:20)代替第一抗血清处理叶切片,操作程序同实验组。

## 结果和讨论

按上述方法经三种抗血清分别处理过的叶切片在加 DAB 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 以后,因为可溶性 PAP 复合物中的 HPO 能在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在时使 DAB 进行氧化性聚合,并进一步发生氧化性环化,所生成深棕色的含氮杂环聚合体吩嗪(Phenazine)沉淀之处就是叶切片内 RuBP 羧化酶存在的部位。

我们在显微镜下观察的结果表明,大豆叶切片中 RuBP 羧化酶集中分布在叶肉细胞的叶绿体内,见图 1a,在甘蔗叶切片中则集中分布在维管束鞘细胞的叶绿体内,见图 2a。根据羧化酶在 C<sub>3</sub> 和 C<sub>4</sub> 植物叶片内不同部位分布规律,本实验从叶解剖结构和酶分布的角度,阐明大豆(*Glycine max.*)属 C<sub>3</sub> 型植物,甘蔗(*Saccharum sinensis.*)属 C<sub>4</sub> 型植物。

我们先用 1% NaN<sub>3</sub> 溶液浸泡叶切片,然后再用三种抗血清依次处理叶切片,随后显色,基本上可去除叶片内源过氧化物酶对染色效果的干扰,对照组叶切片内基本上没有深棕色沉淀见图(1b, 2b.)。但因叶切片未经脱水,还有一些叶绿素在细胞内,因此在对照组叶切片的黑白照片中,还有部分感光,而在彩色照片中是完全可以区分的。

用免疫荧光法在 C<sub>3</sub> 和 C<sub>4</sub> 植物叶片内定位 RuBP 羧化酶,虽是一种有效的方法,但它需用价格昂贵的荧光显微镜进行观察,对广泛应用有局限性。我国丰富的植物资源,有待于开发。为了鉴定众多的具有经济价值的 C<sub>3</sub> 和 C<sub>4</sub> 植

物属性,我们认为PAP法是有高度专一性和灵敏性,同时染色的切片标本能长期保存,但用免疫荧光技术定位酶,已染色的叶切片标本只能作短期保存;PAP法所用的三种抗体均不需纯化,还可稀释后使用,可节省抗体;免疫荧光技术只能在细胞水平上定位酶,免疫铁蛋白方法仅能在分子水平定位酶。而PAP法,HPO经DAB和 $H_2O_2$ 染色后形成稳定的沉淀物,它能与钼酸形成螯合物,可在电镜下进行观测,因此PAP法不仅可借助光学显微镜观察,在细胞水平上定位酶,还可通过超薄切片在电镜下观察,在细胞亚显微结构水平上作酶的定位。

PAP法在叶片内定位酶有广阔的应用前景,也是深入研究叶绿体类囊体膜上及膜内酶系分布的有效手段。

### 参 考 文 献

[1] Hattersley, P. W., 1977. *Australian Jour-*

*nal of Plant Physiology*; 4(4):523-539.

[2] 王美琪, 1980. *实验生物学报*, 13(3):249-255.

[3] 王维光, 李立人, 1980. *植物生理学报*, 6: 257-261.

[4] Sternberger, L. A. & Petrali, J. P., 1977. *J. H. Cytochem*; 25(9):1036-1042.

[5] Vacca, L. L., Rosario, S. L., Hsu, K. C. et al, 1975. *J. H. Cytochem.*, 23(3):208-214.

[6] Johnson, G. D., Holborow & Dorling, J. 1978. in "Handbook of Experimental Immunology" ed. Weir, D. M., Blackwell Scientific publications. (15):22-28.

[7] 陈佛痴, 朱秀雄. 1964. "组织学方法", 吉林人民出版社, 88-89.

\*承中国科学院上海细胞生物所肿瘤室许河生同志提供羊抗兔 $\gamma$ 球蛋白抗血清;中国科学院生理所五室神经化学组提供显微镜观察和拍照设备;本所陈乃先、谢勤东两位同志冲印和放大照片,特此致谢。

## 脱落酸和二硫苏糖醇对水稻花药培养的影响(简报)

梁海曼 方国伟\*

(杭州大学生物系植物生理教研室)

Imamura & Harada(1980)<sup>[1]</sup>报告,脱落酸(ABA)能促进烟草花药培养效率。Johansson et al.(1982)<sup>[2]</sup>的报告则指出,降低内源ABA水平有利于提高加拿大银莲花(*Anemone canadensis*)花药培养效率。两者不一致。为此我们进行外源ABA的添加试验。

Pannbacker & Bravard(1972)<sup>[3]</sup>报告,二硫苏糖醇(DTT)为cAMP(环腺苷酸)磷酸二酯酶的抑制剂。Hamada et al.(1982)<sup>[4]</sup>报告,DTT能防止膜ATP酶的失活等等。看来,DTT有可能抑制分裂而促进分化。考虑到ABA和cAMP之间也存在一定的联系<sup>[1]</sup>同时进行ABA和DTT的添加试验可能是有益的。因此,本文中合并报告了ABA和DTT的添加试验。

### 材 料 和 方 法

材料为糯稻测<sup>24</sup>含单核后期花粉的花药。接种时取第1—4个一次枝梗上第2—4朵花。

灭菌按常规,用0.1%升汞灭菌8分钟。基本培养基为N<sub>6</sub>。蔗糖3%。诱导培养时,激素为2,4-D 2毫克/升和NAA 2毫克/升。诱导培养8周。愈伤组织转入分化培养时,激素为NAA 0.1毫克/升和激动素(KT)或6-苄基腺嘌呤(BA) 1毫升/升。

ABA和DTT均只在诱导愈伤组织的培养基中添加。添加量,ABA为2毫克/升,DTT为0.5毫克/分子/升。

培养温度 $25 \pm 1^\circ C$ 。诱导培养在暗中进行。分化培养在荧光灯连续光照下进行,照度800米烛光左右。

\*81级研究生。