

## 植物组织和细胞的超低温保存及种质库建立的研究现状

罗士韦 唐 惕

(中国科学院上海植物生理研究所)

在动、植物组织和细胞培养过程中,常常发生染色体、基因组和基因水平上的变异,故培养细胞的遗传性状不易稳定,形态建成能力逐渐丧失,产生特殊产物的细胞难以长期保存。为解决这些问题,多年来,人们探索了许多降低动、植物培养细胞代谢水平的保存方法,如减少含水量、降低氧分压和冷冻等。仅在具有冷冻防护性质的一类化学物质发现后,冷冻保存法才在动物细胞中获得成功。1949年Polge等首先发现,甘油可减轻鸟类精子的冷冻伤害,此后人们将低温与冷冻防护剂结合使用,冷冻保存法才广泛应用于医学和畜牧业,如动物精子、红细胞细胞、骨髓、胚胎和培养细胞等的保存<sup>(19,23)</sup>。植物细胞的冷冻保存工作近年才开展,植物细胞体积大,液胞化程度高,对冷冻极敏感,需要建立合理的、周密的冷冻措施。七十年代,Nag and Street将胡萝卜悬浮培养细胞保藏在液氮后,观察到细胞的生长<sup>(21)</sup>。近十年来,英国、印度、加拿大、美国、意大利、苏联和日本等国的有关实验室开展了植物组织和细胞保存以及种质库建立的研究,并取得了较好的结果<sup>(1,5,9,18,37,38,40)</sup>。

在超低温(指液氮低温,  $-196^{\circ}\text{C}$ )条件下,几乎所有的细胞代谢活动、生长过程等都停止了,因而排除遗传性状的变异,同时保存细胞的活力和形态发生的潜能。超低温冷冻保存法(以下简称冷冻保存法)还有许多优点,如长期保存无病原的茎尖分生组织或者罕见的珍贵的植物组织,这样的植物种质库便于国际间进行交流;如冷冻保存花粉,则可延长花粉寿命,便于进行远缘杂交;冷冻保存细胞系、花粉胚(pollen-embryos),可节省人力、物力,为

遗传育种工作提供遗传性状稳定的材料。

冷冻保存法的主要环节可用图1简单概括。这些环节虽因植物种类和细胞类型而异,但它们依据的基本原则是完全相同的。

### 1. 植物材料的预培养

已知处于分裂状态的细胞具有体积小和原生质稠密等特点,因此它们耐受低温的能力强<sup>(21,22)</sup>。预处理的目的在于,提高分裂细胞的比例,减少细胞内的自由水含量,为此可加快愈伤组织或细胞的传代频率<sup>(25,29)</sup>;诱导花药内的雄核发育,形成多细胞的胚<sup>(4,8)</sup>,提高培养基内的糖浓度或用含有二甲基亚砜(DMSO)\*脯氨酸等溶液短期处理细胞,以提高抗寒力<sup>(13,14,25,38)</sup>;或将细胞在接近零度的低温下培养数日<sup>(25,28,31)</sup>。

### 2. 冷冻防护剂的利用

选择合适的冷冻防护剂是重要的环节,常用的有DMSO、甘油、糖类,它们属低分子量的中性溶质,在溶液中能强烈地结合水分子,发生水合作用,使溶液的粘性增加。温度下降时,它们溶液内冰的结晶中心的生长速度也下降,使水的固化过程减弱。DMSO又易渗透到细胞内部,不致使细胞在冷冻和融冰时因脱水过头,受渗透冲击(osmotic stress)的损伤。DMSO处理时间不宜过久,它本身对细胞有

\* 文内缩写

(1) DMSO—二甲基亚砜(dimethyl sulphoxide)

(2) TTC法—用三苯四唑氯化物(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride)测定线粒体的活力。

(3) FDA法—二醋酸荧光素(fluorescein diacetate)染活细胞的方法。

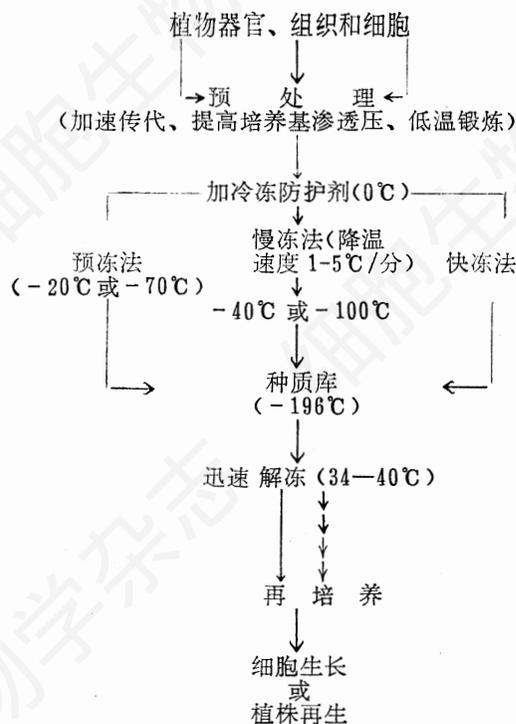


图1 植物组织和细胞冷冻保存的主要步骤

药害<sup>(20)</sup>。最近许多人发现, 2、3种冷冻防护剂混合使用, 可减低药剂的毒性, 同时提高了细胞的存活率<sup>(7,10,18,34,35)</sup>。有人发现甘油对细胞有不良的影响<sup>(13)</sup>。各种冷冻防护剂的合适浓度均在5—10%左右, 它们在冰浴上与细胞培养物等体积混合, 需缓慢加入。但最近Withers认为, 冷冻防护剂加到培养物内的速度不是关键, 主要是两者混合均匀, 然后再在冰浴上平衡1小时即可<sup>(38)</sup>。

### 3. 冷冻的方法

在介绍具体方法之前, 需简要说明冷冻时细胞内、外发生的主要物理化学变化。冷冻时, 细胞外的溶液水分子首先形成冰结晶中心, 后者的增长速度与溶液成分、降温速度有关, 一般在-20到-60℃范围内晶体中心增长最快, 形成大的冰晶体, 以后减慢速度, 到-140℃时完全停止增长。快速冷冻时, 细胞内的自由水来不及扩散到周围溶液内, 在细胞内形成冰的晶体, 对细胞损伤最严重。如缓慢冷冻, 细胞内外的水汽压可以平衡, 外部水因先结了冰,

水汽压变化, 细胞内的自由水可扩散到外界的冰晶体表面, 并变成冰, 细胞发生保护性的脱水, 因而可避免在细胞内部形成冰。然而如温度下降太慢, 细胞脱水过头, 又会发生盐析(salting-out)效应, 不利细胞的存活<sup>(9,24)</sup>。当然, 在加有冷冻防护剂后, 许多情况有所改善, 细胞的存活率明显提高。目前建立了三种冷冻法: 快冻、预冻和慢冻法, 后一种应用较为普遍, 但要求严格控制降温速度, 不及前两个方法简便。

a. 快冻法 是将盛有样品的玻瓶(内装2ml样品)或箔金袋(导热性能好)直接放入液氮罐。该法适用康乃馨茎尖和四季樱花粉胚的保存。解冻后这些材料都能恢复生长, 并分化形成了植株。

b. 预冻法 植物组织放入液氮前, 经过一个时期的低温锻炼, 如Sakai等将草莓茎尖放在-20—-30℃下预冷<sup>(15)</sup>, Sala等将水稻悬浮培养细胞放入-70℃条件18小时<sup>(20)</sup>。融冰后细胞能恢复生长, 草莓茎尖还形成了小植株。

c. 慢冻法 分两个阶段进行, 先以1—5℃/分速度降温, 降至-30—-40℃或-100℃, 平衡约1小时, 再将样品放入液氮进一步冷却, 并保藏。原生质体、悬浮培养细胞、愈伤组织和某些植物的茎尖均用该法冷冻保藏, 效果较好。Kartha发现, 豌豆和草莓生长点的降温速度需严格控制在0.5—1.0℃/分范围, 否则存活率明显下降<sup>(18)</sup>。

### 4. 解冻和再培养的方法

试验证明, 解冻缓慢时, 细胞内容易发生剧烈的再结晶, 冰晶体增大, 使细胞死亡。而快速解冻, 再结晶过程来不及发生, 细胞的存活率也最高。快速解冻方法: 将样品瓶放入36—40℃的温水浴内, 小心摇动, 数分钟内使样品完全融解, 这时操作需特别注意, 因冷冻后的组织脆弱, 易受损伤。此外, 样品的容量和大小都需按标准制备, 否则温度升降不易精确控制。解冻后的组织和细胞用培养液逐渐稀释, 以免发生去质壁分离的冲击, 冷冻防护剂完全除尽后, 即

可将细胞或组织培养到适合于生长的固体或液体培养基内。在图2内我们例举了植物细胞冷冻保存的几个步骤。Withers<sup>(37,38)</sup>等人发现,玉米等的冷冻细胞不宜洗涤和立即进行液体培养,融解后,将样品直接加到琼脂培养基上培养,这样操作简单,细胞不易受伤,数天后就开始恢复生长,1、2周后培养物生长正常并可用于研究工作。他们推断,再培养初期,冷冻防护剂的存在更有利于细胞内、外溶质的平衡。一般冷冻细胞恢复生长前均有一个生长停滞期,长达一至数月,除玉米外,水稻细胞在解冻后一周就恢复生长,形成生长良好的悬浮细胞,这大概与细胞类型有关。在生长恢复前常用双醋酸荧光素 (fluorescein diacetate)、Evan 氏蓝等染色法测定细胞的活力,也有人用 TTC 法<sup>\*</sup>测定线粒体的活力。

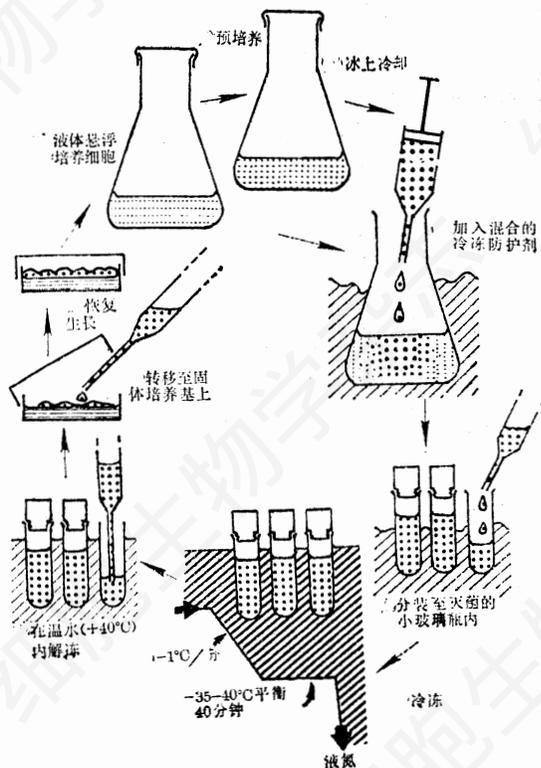


图2 植物细胞冷冻保存法的几个步骤

关于保存期的长短对细胞活力影响的资料不多,到目前为止,在液氮内储藏时间最长的

要算豌豆和苹果茎尖,长达1—2年,解冻后不仅存活率高,而有60%以上的培养物分化形成小植株<sup>(16)</sup>。

关于冷冻保存成功的植物种类已有数十种,其中能分化产生小植株的有十余种。现根据组织类型分别介绍于下:

### 1. 悬浮培养细胞和愈伤组织的冷冻保存

Quatrano<sup>(26)</sup>首先研究了细胞的抗寒性,发现亚麻细胞仅能耐受 $-50^{\circ}\text{C}$ 低温。后来Withers and Street<sup>(39)</sup>发现对数生长期的细胞最能耐受冻害,而延滞期和静止期的细胞对冷冻最为敏感。悬浮培养细胞冷冻保存前要加速传代,在培养基内加入适量渗透剂(甘露醇、脯氨酸等),也可提高细胞的抗寒能力。此外,冷冻后再培养的细胞群中或愈伤组织块中,单个的细胞、松散的细胞团均因冻害而死亡,仅结构紧密的,小的细胞团能恢复生长,经过数次传代,细胞群的组分又可恢复正常。经冷冻和解冻后能生长的悬浮培养细胞种类有:胡萝卜、单倍体烟草、假挪威槭、蔷薇、颠茄、玉米、水稻、甘蔗、木薯、人参,其中仅胡萝卜和烟草细胞还保存有分化能力。愈伤组织保存成功的植物有:杨树、甘蔗、枣椰树、木薯等,后三者均保持原培养物的形态建成能力<sup>(2,17,22,27-29,34,35)</sup>。

### 2. 生长点的冷冻保存

在植物的茎尖为一顶端分生组织,其直径约为0.1毫米,长0.25—0.30毫米,胚胎发育时首先形成,整个营养生长期(休眠期除外),都处于积极分裂状态,遗传性状稳定。近20多年来,园艺工作者广泛利用茎尖培养技术,无性繁殖有经济价值或珍贵的濒临绝迹危险的植物种。通过生长点培养,还可使长期营养繁殖的植物除去若干病毒病源,为此目的,切取生长点不可太大,一般为0.3—0.5毫米长,带一对叶原基。从培养角度来说,样品愈小,操作难度愈大,故冷冻保存生长点的成败还与常规的茎尖培养技术密切相关。下面我们列举的植物种类不仅能耐冷藏,冷冻后仍有50%以

上的茎尖培养物能分化形成小植株,有的分化频率接近100%。冷冻时将生长点在含有5% DMSO的培养基内预培养数天,然后每分钟下降1℃左右的速度冷却到-40℃,再放入液氮。保存效果好的植物种类:苹果、胡萝卜、豌豆、草莓、鹰嘴豆、花生、土豆、番茄、康乃馨和木薯等<sup>(3,6,7,11-14,26,29-31)</sup>。

### 3. 体细胞胚和花粉胚的冷冻保存

前面已提及, Nag 等首先将胡萝卜的胚状体冷冻保存成功。Bajaj 又将冷冻保存法成功地应用于花粉胚方面<sup>(3,4,8)</sup>,他将烟草、颠茄、四季樱草等的花药培养3—4周,诱导花粉雄核发育,然后比较不同胚胎期花粉的抗寒能力。结果表明,球形期的花粉胚较为耐寒,存活率达30%左右,在解冻后它们经过2—4周的停滞期,就恢复生长,通过各个发育时期,最后形成单倍体植株。而心形期和子叶期的胚在冷冻后仅有少量能存活,并增殖形成愈伤组织。矮牵牛的花药冷冻后也仅有少数能分裂形成愈伤组织。

### 4. 植物原生质体的冷冻保存

由于操作复杂和技术难度大,故成功的例子很少<sup>(20,32)</sup>。日本学者在冷冻保存胡萝卜和地钱原生质体方面取得成功,他们观察到了二种原生质体在解冻后不久开始分裂过程,胡萝卜原生质体可形成愈伤组织,地钱的原生质体经分裂、分化形成了原丝体<sup>(33)</sup>。

我们将收集到的较完整的资料列成一表,便于大家查阅和比较,但其中活力一栏只能表示细胞活力的相对值,因为各实验室利用了不同的测定方法,故数值之间无法进行比较。

综上所述,近十年来国外学者在植物组织和细胞的冷冻保存和种质库建立方面取得了许多成就,如建立了冷冻技术,研究了各种类型的组织和细胞的抗寒能力等,为进一步开展冷冻生物学(cryobiology)研究奠定了基础,但还有许多问题需进一步加以研究,如原生质膜与细胞器的超微结构等与细胞抗寒力的关系,较长时期的冷冻保存对细胞活力和形态建成过程的影响,冷冻保护剂(特别是易渗透类型的,

表: 冷冻保存的植物种类和方法

植物种名及材料类型	预处理及冷冻保护剂的种类和浓度	冷冻方法(降温速度,放入LN*前温度)	细胞存活率及生长情况	LN 内保存时间	文献
(1) <i>Acer pseudoplatanus</i> L. 假挪威槭 悬浮培养细胞	甘油 10%, DMSO 5%	慢冻法(2℃/分, -100℃)	22—25%	5—10分钟	[22]
	甘油 0.5M, DMSO 0.5M, 蔗糖 1.0M	慢冻法(1℃/分, -35℃)	70—90%	1分钟	[37]
(2) <i>Arachis hypogaea</i> L. 花生, 生长点	预培养 3 天, 选取开始生长的材料, 甘油 5%, 蔗糖 5%, DMSO 5%	快冻法	23-30%, 分化形成植株	27天	[6]
(3) <i>Atropa belladonna</i> L. 颠茄 悬浮培养细胞	甘油 10%, DMSO 5%	慢冻法(2℃/分, -100℃)	15%	5—10分钟	[22]
	DMSO 5%	"	40%	/	[39]
花 药	预培养 3—4 周, 加 DMSO 5—10% 后在 0℃ 下放置 20—60 分钟	"	31%	3 个月	[4]
(4) <i>Cicer arietinum</i> 埃及豆, 生长点	预培养 3—5 天, 选取开始生长的材料, 甘油、蔗糖和 DMSO 各 5%	快冻法	27—36%, 植株再生	27天	[6]
	加 DMSO 4% 后培养 1 天	慢冻法(0.6℃/分, -40℃)	40%, 植株再生	/	[16]

(续表)

植物种名及材料类型	预处理及冷冻防护剂的种类和浓度	冷冻方法(降温速度, 放入LN*前温度)	细胞存活率及生长情况	LN内保存时间	文献
(5) <i>Daucus carota</i> L. 胡萝卜 悬浮培养细胞	DMSO 5—7%	慢冻法(2℃/分, -100℃)	50—70%, 分化形成植株	3个月	[1]
	DMSO 5%	慢冻法(1—2℃/分, -70℃或-100℃)	65%, 形成胚状体和植株	7天	[21, 22]
胚状体	DMSO 5%	慢冻法(1—2℃/分, -100℃)	在原胚状体表面产生次级胚	24小时	[36]
原生质体	DMSO 5%, 甘油 10%	慢冻法(1.1℃/分, -30℃)	40—50%, 形成愈伤组织	4—6个月	[33]
	DMSO 5%	慢冻法(2℃/分, -100℃)	90%, 形成胚状体	/	[39]
(6) <i>Dianthus caryophyllus</i> L. 麝香石竹, 生长点	DMSO 5%	快冻法	15—33%, 产生愈伤组织	2个月	[30]
	植株先在4℃下培养3天, DMSO 5%	快冻法	60%, 植株再生	1周—6个月	[31]
(7) <i>Fragaria ananassa</i> Duch. c. v. Redcoat 松草莓, 匍伏枝茎尖	在含有 DMSO 5% 的培养基上培养二天	慢冻法(0.84℃/分, -40℃分)	分化频率 55—95%	1—8周	[14]
(8) <i>Ipomoea</i> sp. 番薯属的一种, 悬浮培养细胞	在含 6% 的蔗糖培养基上预培养数日, 甘油、DMSO 各 2.5%	2—4℃/分速度降至 -40℃, 未放入LN 保存	恢复生长	/	[17]
(9) <i>Malus domestica</i> Borkh 苹果冬眠芽	在 -3℃ 条件下锻炼 14 天, -5℃ -3 天, -10℃ -1 天	缓慢降温至 -30℃ 和 -40℃	100% 生长, 77% 分化	23个月	[27]
(10) <i>Manihot esculentum</i> 木薯, 生长点	甘油 10%, 蔗糖 5%	快冻法	21% 生长, 形成愈伤组织, 其中 13% 再生植株	/	[2]
	预培养 4—6 天, DMSO 5%	快冻法	60% 分化	/	[15]
(11) <i>Marchantia polymorpha</i> L. 地钱, 原生质体	甘油 10% DMSO 5%	慢冻法(1.1℃/分, -30℃)	40—50% 存活, 分化形成原丝体	4—6个月	[33]
(12) <i>Nicotiana tabacum</i> L. 烟草 悬浮培养细胞	DMSO 5%	预冻法(-20℃, -70℃)	30—50%, 再生植株	24小时	[1]
	预培养 3—4 周, DMSO 5—7%	慢冻法(2℃/分, -100℃)	1.5%, 再生植株	3个月	[4]
	DMSO 5—7%	慢冻法(1—3℃/分, -100℃)	31—36%,	3个月	[4]
(13) <i>Oryza sativa</i> L. 水稻, 悬浮培养细胞	加速细胞传代, DMSO 5%	预冻法, -70℃下冷却 18 小时	为对照的 60% [TTC 法]	/	[29]
(14) <i>Panax ginseng</i> C.A.Mey 人参, 悬浮培养细胞	加蔗糖 20%, 冷至 2℃, DMSO 10%, 蔗糖 10%	慢冻法(0.5℃/分, -30℃后以 9℃/分降至 -70℃)	28%	1—6周	[25]

(续表)

植物种名及材料类型	预处理及冷冻防护剂的种类和浓度	冷冻方法(降温速度, 放入 LN* 前温度)	细胞存活率及生长情况	LN 内保存时间	文献
(15) <i>Phoenix dactylifera</i> L. 枣椰树, 愈伤组织	蔗糖 8%, DMSO 10%, PEG** 10%	慢冻法(-3℃/分→ -4℃, -1℃/分→ -15℃, -23℃, -30℃)	100% 的培 养物恢复生 长	3 个月	[35]
(16) <i>Pisum sativum</i> L. 豌豆, 生长点	加 DMSO 5% 后培 养二天	慢冻法(0.6℃/分, -40℃)	分化频率 为60%以上	26周	[12, 13]
(17) <i>Populus euramericana</i> 杨树, 愈伤组织	/	预冻法(-30℃, - 70℃, -120℃)	恢复生长	/	[28]
(18) <i>Primula obconica</i> L. 四季樱草, 花药预	预培养 3 周, 然后加蔗 糖 7% 和 DMSO 7% 处 理 2 小时, 冷冻时除尽	快冻法	形成愈伤 组织, 胚和 植株	/	[8]
(19) <i>Saccharum officinarum</i> L. 甘蔗, 愈伤组织	葡萄糖 8%, DMSO 10%, PEG 10%	慢冻法(3℃/分, -23℃)	植株再生	5 周	[34]
(20) <i>Solanum goniocalyx</i> 茄属一种, 生长点	预培养 3 天, DMSO 10%	快冻法	20% 形成愈 伤组织和芽	4 周	[11]
(21) <i>S. tuberosum</i> L. 土豆, 茎尖	蔗糖, DMSO 和甘 油各 5%	快冻法	26%, 植株再生	31天	[3, 7]
(22) <i>Zea mays</i> L. 玉米悬浮培养细胞	DMSO 0.5 M, 甘油 0.5 M, 脯氨酸或蔗糖 1.0M	慢冻法(1℃/分, -35℃)	75%	/	[37]

\*LN—液氮。 \*\*PEG—聚乙二醇。

如 DMSO) 如何能洗除干净, 它们对细胞的影响如何, 冷冻和解冻的过程是否会诱导产生突变细胞株等。

最后, 本文作者之一已在第五届国际组织培养会议的专题报告<sup>(18)</sup>中指出, 在植物组织和细胞培养研究这一广泛范畴中, 只有低温保存和种质库这一项在我国还是一个空白点。但是, 我国组织和细胞培养的研究工作已有坚实的基础, 又有丰富的植物资源, 完全有条件开展冷冻保存植物种质库的工作。所以, 我们在一些国际友人提供资料的基础上, 撰写了这一篇通俗短文, 目的在于引起国内同行们的注意和重视。

## 参 考 文 献

- [1] Bajaj, Y. P. S., 1976, *Physiol. Plant.*, 37:263-268.  
 [2] Bajaj, Y. P. S., 1977, *Crop Improv.*, 4 (2):198-204.  
 [3] Bajaj, Y. P. S., 1978, *Phytomorphology*, 28(2):171-176.  
 [4] Bajaj, Y. P. S., 1978, *Crop Improv.*, 5 (2):137-141.  
 [5] Bajaj, Y. P. S., 1979, *Euphytica*, 28: 267-285.  
 [6] Bajaj, Y. P. S., 1979, *India J. Exper. Biology*, 17(12):1405-1407.  
 [7] Bajaj, Y. P. S., 1981, *Euphytica*, 30: 141-145.  
 [8] Bajaj, Y. P. S., 1981, *Scientia Horticulturae*, 14:93-95.  
 [9] Finkle, B. J., 1971, In "The Biochem. of Fruits and Their Products, vol. 2", Ed. A. C. Hulme, Academic Press, N. Y. p. 653-682.  
 [10] Finkle, B. J. & J. M. Ulrich, 1979, *Plant Physiol.*, 63:598-604.  
 [11] Grout, B. W. W. & Henshaw, G. G., 1978, *Ann. Bot.*, 42:1227-1229.  
 [12] Haskins, R. H. & K. K. Kartha, 1980, *Can. J. Bot.*, 58:833-840.  
 [13] Kartha, K. K. et al., 1979, *Plant Science Lett.*, 15:7-15.  
 [14] Kartha, K. K. et al., 1980, *J. Amer.*

- Soc. Hort. Sci.*, 105(4):481-484.
- [15] Kartha, K. K., 1981, In "Plant Tissue Culture", Ed. T. A. Thorpe p. 181-211.
- [16] Kartha, K. K., 1982, In "Application of Plant cell and Tissue Culture to Agriculture and Industry." Eds. D. T. Tomed et al., Guelph, Ontario, p. 139-161.
- [17] Latta, R., 1971, *Canad. J. Bot.*, 49: 1253.
- [18] Loo Shih-wei, 1982, In "Proceeding of 5th IAPTC congress, Tokyo, Japan, p. 14-26.
- [19] Lovelock, J. E. & M. H. W. Bishop, 1959, *Nature*, 183:1394.
- [20] Mazur, R. A. & J. X. Hartman, 1978, In "Plant Cell and Tissue Culture, Principles and Applications," Eds. W. R. Sharp, et al., Ohio State Univ. Press, Columbus. p. 876.
- [21] Nag K. K. & H. E. Street, 1973, *Nature*, 245:270-272.
- [22] Nag, K. K. & H. E. Street, 1975, *Physiol. Plant*, 34:254-260.
- [23] Polge, C. et al., 1949, *Nature*, 164:666.
- [24] Попов, А. С., 1981, "Култура Клеток Растений", Р. Г. Бутенко, издательство Наука, стр. 150-162.
- [25] Попов, А. С., et al., 1982, *DAH CCCP*, 262(3):765-768.
- [26] Quatrano, R., 1968, *Plant Physiol.*, 43: 2057-2061.
- [27] Sakai, A. & Y. Nishiyama, 1978, *HortScience*, 13:225-227.
- [28] Sakai, A. & Y. Sugawara, 1973, *Plant & Cell Physiol.*, 14:1201-1204.
- [29] Sala, F., et al., 1979, *Physiol. Plantarum*, 45:170-176.
- [30] Seibert, M., 1976, *Science*, 191:1178-1179.
- [31] Seibert, M. & P. J. Wetherbee, 1977, *Plant Physiol.*, 59:1043-1046.
- [32] Singh, J., 1979, *Plant Sci. Lett.*, 16:195-201.
- [33] Takeuchi, M. et al., 1980, *Cryo-Letters*, 1:519-524.
- [34] Ulrich, J. M. et al., 1979, *Cryobiology*, 16:550-556.
- [35] Ulrich, J. M. & B. J. Finkle, 1981, *HortScience*, 16(1):47-48.
- [36] Withers, L. A. 1979, *Plant Physiology*, 63: 460-467.
- [37] Withers, L. A., 1982, SEB Seminar Series on Plant Biotechnology, Univ. of Leicester, p. 1-32.
- [38] Withers, L. A. & J. King, 1980, *Cryo-Letters*, 1:213-220.
- [39] Withers, L. A. & H. E. Street, 1977, In "Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application," Eds. W. Barz, p. 226-244.
- [40] Withers, L. A., 1980, "Tissue culture Storage for Genetic Conservation", IBPGR secretariat, Rome, 1980.

## (上接第48页)

有较多碱性基团, 等电点偏碱, 而白蛋白等是球形蛋白, 碱性氨基酸不如组蛋白多, 等电点偏酸等缘故。

还初步做了免疫反应, 以抗原经过凝胶电泳分离, 电泳转移, 把抗原转移到硝酸纤维素滤纸之后, 依次同第一抗体和第二抗体(<sup>125</sup>碘标记)温育, 做放射自显影, 结果可以观察到抗原抗体专一结合反应。

## 参 考 文 献

- [1] Southern, E. M., 1975, *J. Mol Biol.*, 98: 503-517.
- [2] Renari, J., et al., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3116-3120.
- [3] Bittner, B., et al., 1980, *Anal. Biochem.*, 102:459-471.
- [4] Bowen, B., et al., 1980, *Nucleic Acids Research*, 8:1-20.
- [5] 山岸秀夫等, 1975, 核酸の化学 I. 分离精制, 东京大学同人発行株式会社, p. 78-80.
- [6] 何全品等, 1981, 细胞生物学杂志, 3(3): 35-37.
- [7] 林斯骏等, 1981, 细胞生物学杂志, 3(2): 33-35.
- [8] Towbin, H., et al., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:4350-4354.
- [9] Greenwood, F. C. et al., 1963, *Biochem. J.*, 89:114-123.
- [10] Gets, M. J. et al., 1972, *Biochem Biophys. Acta.*, 287:485-494.
- [11] 落合 广, 1982, 生化学, 54(2):107-109.