

用荧光葡聚糖研究大麦细胞电融合

王明艳^{**}, 龚叶芳^{***}, 江志裕^{*}

(复旦大学化学系, 上海 200433)

摘要: 利用阴离子表面活性物质荧光葡聚糖(F-DX)研究了表面活性物质对大麦细胞电融合的影响. 结果表明, F-DX可抑制电融合过程. 对放置过大麦细胞原生质体的F-DX溶液, 在荧光显微镜下可观察到其膜表面的荧光圈, 证明F-DX在膜上的吸附. 添加F-DX可增加原生质体的电泳速度, 说明吸附后原生质体表面负电荷增多. 由于相互间静电斥力的增强, 使细胞的电融合率下降. 此外, 还利用荧光显微技术研究了细胞电生孔现象. 观察到经电脉冲后溶液中的F-DX可进入原生质体内部, 间接证明了细胞电生孔的存在.

关键词: 大麦原生质体; 细胞电融合; 电生孔; 膜吸附; 荧光葡聚糖

中图分类号: O646; Q67

文献标识码: A

细胞电融合是利用电场作用促进细胞融合的过程. 与通常用化学物质引起的细胞融合相比, 它具有更高的效率. 电融合可使两个细胞融合为一, 乃生物工程中的有效方法之一^[1,2]. 前文曾报导添加剂对大麦细胞电融合的影响^[3,4], 结果表明阳离子表面活性物质能促进细胞电融合, 而阴离子则相反. 作者认为这是由于表面活性物质在大麦细胞原生质体膜上的吸附所引起的. 为了证明表面活性物质在细胞原生质膜表面的吸附, 本文以荧光葡聚糖作为添加剂, 并由共聚焦荧光显微镜进行观察和研究.

电生孔是细胞在脉冲电场下的一种特殊现象. 直流脉冲电场的作用可使细胞膜上产生瞬间的小孔. 这种现象可用于将周围介质中的物质引入细胞内部, 如DNA的引进, 以改变细胞的性质. 在脉冲电场下, 如若相邻两细胞的电生孔互相贯通, 则将引起两细胞的融合. 由于脉冲时间很短, 难于直接捕捉电生孔的图象, 本文利用添加荧光葡聚糖, 在共聚焦荧光显微镜下观察经电脉冲处理过的大麦细胞原生质体内部的变化, 间接研究这一现象.

1 实验

从大麦叶中取得细胞原生质体的方法和细胞电融合的步骤同前文^[3]所述. 大麦细胞原生质体保留在0.5 mol/L甘露醇溶液中待用. 实验采用微金栅电极电融合池. 其制作工艺是先在玻璃片上真空蒸镀铬膜, 其上再镀金膜, 然后用光刻工艺制成间隔为0.2 mm的微栅型电极. 实验仪器为XFD-8型低频信号发生器, DF-1645型高频信号发生器和Leica TCS NT型共聚焦激光扫描荧光显微镜等. 实验所用试剂为分析纯, 荧光葡聚糖(F-DX)的分子量为133 000. 用重蒸馏水配制溶液. 于室温下进行实验.

收稿日期: 2000-08-26; 修订日期: 2000-11-06

* 通讯联系人; ** 目前工作单位: 连云港市化工高等专科学校化工系; *** 复旦大学生命科学院
基金项目: 国家自然科学基金(29773009)资助项目

大麦细胞原生质体的电融合率用 $F = (N_b - N_a) / N_b$ 表示, 式中 N_b 为原先相邻的原生质体数目, N_a 为发生电融合后的原生质体的数目. 添加荧光葡聚糖后的相对电融合率为 $F_r = F / F_0$, 式中 F_0 为未加添加剂时的电融合率, F 则为添加后的电融合率.

在大麦细胞原生质体电泳实验中用的细胞电泳池是由玻璃片上间距 2 mm 的二平行电极组成. 电极为蒸镀的金电极, 厚度约为 0.1 mm. 实验时将一滴含大麦原生质体的溶液置于电泳池两电极间, 其上盖一片盖玻片. 加直流电场后, 通过显微观察, 以毫秒计计时, 测量在电场下原生质体的是迁移率. 实验研究了 F-DX 对原生质体电迁移率的影响.

2 结果和讨论

2.1 荧光葡聚糖对细胞电融合的影响

把含有大麦原生质体的 0.5 mol/L 甘露醇溶液滴加在微金栅电融合池上. 当施加强度为 360 V/cm 的 1 MHz 交流电后, 大部分原生质体可相互连成链状. 图 1a 为二个相连原生质体的显微照片, 其中一个与电极相接触. 再施加强度为 1 500 V/cm 宽度为 50 μ s 的直流脉冲电场后, 部分细胞原生质体将发生融合. 图 1b 为上述两原生质体融合后的情况.

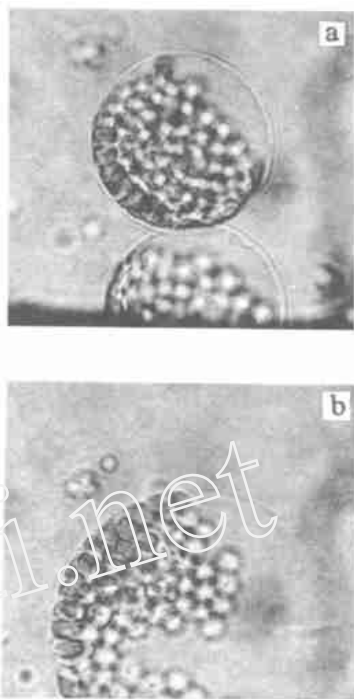


图 1 大麦原生质体的电融合

Fig. 1 The electrofusion of barley protoplasts
a. Before electronic pulse,
b. After pulse

图 2 为添加荧光葡聚糖后大麦原生质体相对融合率的变化. 由图可知添加后相对电融合率 F_r 均小于 1, 且随添加浓度的增加而下降. 当添加剂浓度

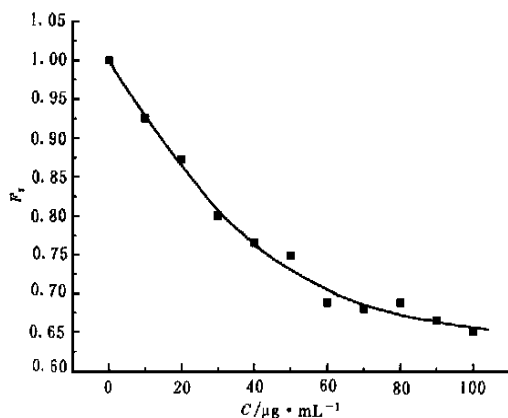


图 2 荧光葡聚糖对大麦细胞原生质体电融合率的影响

Fig. 2 The influence of F-DX on the electrofusion of barley protoplasts

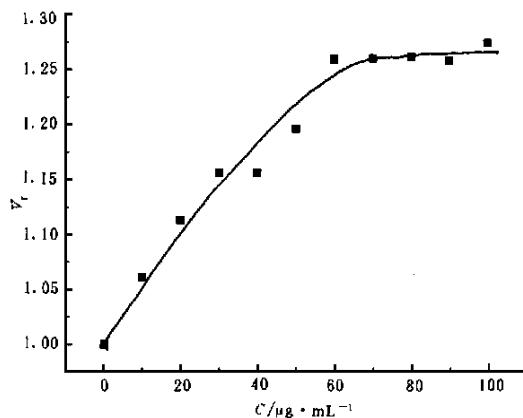


图 3 荧光葡聚糖对大麦细胞原生质体相对电泳速度的影响

Fig. 3 The influence of F-DX on the relative electrophoresis speed of barley protoplasts

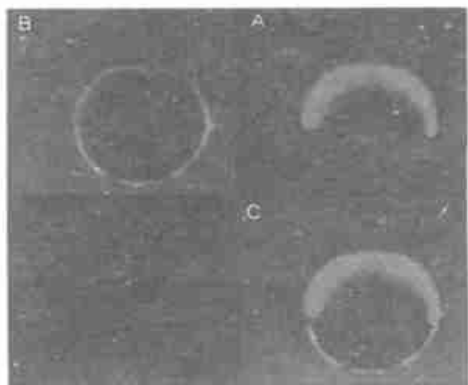


图 4 添加荧光葡聚糖后大麦原生质体的荧光显微照片

照片的荧光波长: A-665 nm, B-525 nm, C-665 nm + 525 nm

Fig. 4 Fluorescent microphotographs of barley protoplast after adsorbing F-DX.

Fluorescent images taken at wavelength of : A-665 nm ,B-525 nm ,C-665 nm + 525 nm

大于 $60 \mu\text{g/ml}$ 时, F_r 的变化缓慢. 荧光葡聚糖是一种阴离子型的表面活性剂, 它在大麦原生质体膜表面的吸附可增强膜上所带的负电荷. 使相邻原生质体之间静电斥力增加, 从而引起融合率的下降.

2.2 荧光葡聚糖对细胞电泳速度的影响

电泳实验表明大麦细胞原生质体表面带负电荷. 图 3 为加入荧光葡聚糖后大麦细胞原生质体相对电泳速度 r 的变化. $r = \frac{r_1}{r_0}$, 式中 r_0 和 r_1 分别为空白和添加荧光葡聚糖后原生质体的电迁移率. 由图可见, 随着荧光葡聚糖浓度的增加, 相对电泳速度增加. 这是由于荧光葡聚糖在大麦原生质体膜表面的吸附增强了膜上所带的负电荷, 使电泳速度增加. 当添加剂浓度大于 $6 \mu\text{g/ml}$ 时, r 变化较小, 说明已接近饱和吸附.

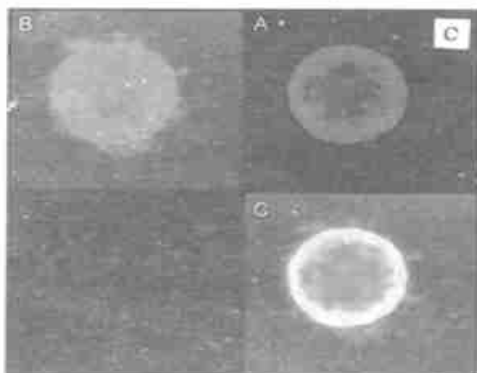
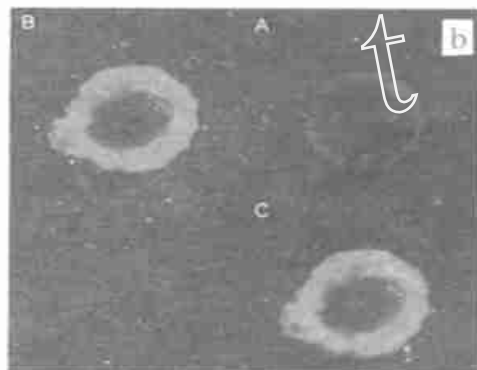


图 5 在电脉冲后荧光物质 F-DX 在大麦原生质体内的分布.

照片的荧光波长: a)-665 nm, b)-525 nm, c)-665 nm + 525 nm. F-DX 进入量: a < b < c

Fig. 5 The distribution of F-DX in the barley protoplasts after electronic pulse.

Fluorescent images taken at wavelength of : A-665 nm ,B-525 nm ,C-665 nm + 525 nm.

The amount of F-DX in the protoplasts :a < b < c

2.3 荧光葡聚糖在原生质体膜上的吸附

在含有大麦原生质体的 0.5 mol/L 甘露醇溶液中添加等体积的含 0.007 4 mol/L 荧光葡聚糖的 0.5 mol/L 甘露醇溶液. 静置 2 h, 让荧光葡聚糖吸附在原生质体膜上. 离心后弃去上层清液. 再加 0.5 mol/L 甘露醇溶液, 离心后再弃去上层清液. 反复多次, 直至在荧光显微镜下溶液不显示荧光为止. 把最终的含原生质体的溶液滴在玻片上, 盖上盖玻片, 在 Leica TCS NT 共聚焦激光扫描荧光显微镜下进行观察. 选择激发光波长为 480 ~ 568 nm, 分别观察波长为 525 nm 和 665 nm 的荧光显微图象. 前者是荧光葡聚糖所产生绿色荧光的波长, 后者则是原生质体中叶绿体所含叶绿素的红色荧光波长. 图 4 中的 A 为选择荧光波长为 665 nm 时的图象. 可见原生质体内叶绿体的存在. B 则为选择荧光波长为 525 nm 时的图象. 图中清晰地表明在原生质体膜的表面存在一荧光圈, 证明了表面活性物质在细胞原生质体膜表面的吸附. C 是波长为 665 nm 和 525 nm 的荧光同时被选用时观察到的图象, 显然它是由 A, B 二图象的复合.

2.4 电生孔的间接证明

把含大麦细胞原生质体和 0.003 7 mol/L 荧光葡聚糖的 0.5 mol/L 甘露醇溶液加在微金栅电融合池上. 不加交流电场, 仅施以强度为 1 500 V/cm, 宽度 50 μ s 的电脉冲一次. 利用上述方法进行离心, 弃去上层清液, 并反复用 0.5 mol/L 甘露醇溶液离心清洗多次. 图 5 为用共聚焦激光扫描荧光显微镜观察到的经过这种处理后原生质体的图象. 图的拍摄条件同前. 实验表明, 经电脉冲生孔后荧光葡聚糖可进入原生质体的内部. 但对于各个细胞原生质体而言进入量有差异. 可以选择不同的原生质体进行观察. 图 5a 为荧光葡萄糖进入量较少的情况, 可见少量荧光 F-DX 首先吸附在原生质体内的叶绿体微粒上, 发出荧光. 由于原生质体在含荧光葡聚糖溶液中浸的时间较短, 以及洗的次数较多, 图上附在原生质体膜上的光圈不明显. b 为荧光葡聚糖进入量稍多的情况. 可以看出每个叶绿体微粒上吸附的荧光葡聚糖的量增加, 光亮明显. 也可看出细胞原生质体中的叶绿体处在靠近膜的内侧, 在光聚焦平面出现一个由很多小圈组成的大环. c 为进入量更多的情况, 荧光葡聚糖的荧光充满了整个原生质体. 应该指出, 荧光葡聚糖的分子量 (133 000) 是相当大的. 该组图象间接证明了细胞电生孔的存在, 而且所产生孔的孔径能让较大的分子通过.

Study on Electrofusion of Barley Protoplasts using Fluorescent Dextra

WANG Min-yan **, GONG Ye-fang ***, J IANG Zhi-yu *

(Dept. of Chem., Fudan Univ., Shanghai 200433, China)

Abstract: The influence of interfacial active substance on the electrofusion of barley protoplasts was investigated using fluorescent dextra (F-DX) as an anion additive. It was found that

fluorescent dextra could inhibit the electrofusion process. The adsorption of fluorescent dextra on the membrane of protoplasts was detected by fluorescent microscopy technique. It was observed that after being stored in a solution containing fluorescent dextra a fluorescent ring appeared on the membrane of the protoplast, reflecting the adsorption of fluorescent dextra. The results of electrophoresis experiment also proved the adsorption of F-DX on the surface of protoplasts, because the relative mobility of protoplasts increased in the solution containing F-DX. The increase of negative charge on the membrane of protoplasts could increase the repulsion between protoplasts, and therefore inhibit the electrofusion process. The electroporation phenomena were also investigated using fluorescent microscopy technique. It was found that F-DX could pass into the inside of protoplasts under an electronic pulse. It proves the presence of pores formed in the electroporation process.

Key words: Protoplasts of barley, Electrofusion, Electroporation, Membrane adsorption, Fluorescent dextra

References:

- [1] Berg H. Basic application of electric-fields on biological cells[J]. Bioelectrochem. Bioenergy, 1992, 27:89 ~ 97.
- [2] Hoffmann-Tsay S S, Ernst R, Hoffmann F. Design, Synthesis and application of surface-active chemicals for the promotion of electrofusion of plant protoplasts[J]. Bioelectrochem. Bioenergy, 1994, 34:115 ~ 122.
- [3] Wang Wei, Jiang Zhiyu. The influence of dextra and its anion derivatives on the electrofusion of barley protoplasts[J]. Electrochemistry (in Chinese), 1997, 3(2):215 ~ 218.
- [4] Jiang Z Y, Wang M Y, Wang W. Influence of additives on the protoplasts electrofusion [J]. Bioelectrochem. Bioenergy, 1999, 48:447 ~ 451.
- [5] Saulis G. Cell electroporation Part 3. Theoretical investigation of the appearance of asymmetric distribution of pores on the cell and their further evolution [J]. Bioelectrochem. Bioenergy, 1993, 32:249 ~ 265.