

· 研究简报 ·

葡聚糖及其衍生物对大麦细胞电融合的影响

王 伟 江志裕*

(复旦大学化学系 上海 200433)

细胞融合是指用人工方法使两个细胞融合成一个细胞的过程^[1,2]。体细胞融合可在不同种,不同属,甚至更远的生物间进行,所得到的细胞可具有新的特性。对于植物细胞,有望通过细胞融合培育出新的品种,有着很吸引人的前景。通常进行细胞融合是采用添加剂,如聚乙二醇(PEG)^[3,4]或硝酸钠^[1]。某些添加剂在细胞表面的吸附能使细胞互相靠拢,促进融合。利用外加电场的方法能更有效地促进细胞融合,即所谓的细胞电融合(Electrofusion)方法。目前常用两种电融合池,一种是利用平行板电极,其间放置含有细胞的溶液,在脉冲高电压下使细胞发生电融合。另一种则采用微栅电极,电极间距为几十到几百微米,在外加电压不高时,由于间距小亦可产生高的电场强度,以促进细胞电融合,这种电解池可置于显微镜下直接观察或摄像记录,比较方便。与通常的细胞融合相比,电融合可使细胞融合率提高上百倍,因此受到重视。

已经知道,一些大分子中性化合物,例如:葡聚糖(DX)^[5,6],聚左旋赖氨酸^[7],可促进大麦细胞的电融合。在添加葡聚糖(分子量从2 500到500 000)的情况下,大麦细胞的相对电融合率,即加添加剂后电融合率的提高倍数与 $\lg C$ 成正比(式中 C 为葡聚糖的摩尔浓度)^[6]。葡聚糖是一种无毒性的天然大分子化合物,可以直接用于培养新品种细胞的电融合研究中。本文研究了一系列葡聚糖的衍生物对大麦细胞电融合的影响。

关键词 细胞电融合, 大麦细胞, 葡聚糖

1 实验部分

取温室中培育了5~6 d的大麦苗叶片15支,洗净后刨开并撕下其背面表皮,剪成片段,浸入5 ml含0.6%纤维素酶的0.5 mol/L甘露醇溶液,于恒温槽(23℃)中放置2 h。此过程中,大麦细胞的细胞壁被分解,于是球形的原生质体可分散在溶液中。将含有细胞的溶液吸收到10 ml的离心管中,离心(600 rpm)5 min,吸去上层溶液,再加入5 ml 0.7 mol/L的蔗糖溶液,轻轻转动离心管使其混匀,用移液管吸取2 ml 0.5 mol/L的甘露醇溶液,小心轻放,使其在蔗糖溶液上形成一清液层。离心(500 rpm)3 min,由于大麦细胞原生质体的比重介于两种溶液的比重之间,因此在两种溶液的界面上形成一绿色层,吸去上层的甘露醇溶液,再用平头毛细吸管小心将绿色层取出,用0.5 mol/L的甘露醇溶液稀释后,放置冰箱(0℃)中,待原生

质体沉淀后吸去上层清液,再用 2 ml 0.5 mol/L 甘露醇溶液稀释。取相同体积含原生质体的溶液配制成含 0.016 mmol/L 的各种添加剂的 0.5 mol/L 甘露醇溶液,进行细胞电融合实验。应该指出,含细胞原生质体的溶液应经常保存在冰箱中,以使细胞保持稳定,数据易于重复。本文所用的添加剂有:葡聚糖,蓝色葡聚糖,汽巴蓝葡聚糖和荧光葡聚糖(用荧光素异硫氰酸盐标记)等,均为化学试剂级药品。

测试系统由 DF1645 型数字信号发生器, XFD-8A 型超低频信号发生器,显微镜和细胞电融合池组成(图1)。电融合池由间距为 0.2 mm 的 60 条平行微电极组成,电极材料为在玻璃板上喷镀的 NiCrAl 合金,厚度为 1.2 μm ,其上覆盖厚度为 0.035 μm 的 SiO_2 保护层。

使用微量移液器取 4 μl 含大麦细胞原生质体的 0.5 mol/L 的甘露醇溶液,放于细胞电融合池上,在 1 MHz 幅值为 1 kV/cm 的正弦波交流电作用下,由于介电泳作用大麦细胞原生质体可连接成链状。然后加上一个电压脉冲,在脉冲电

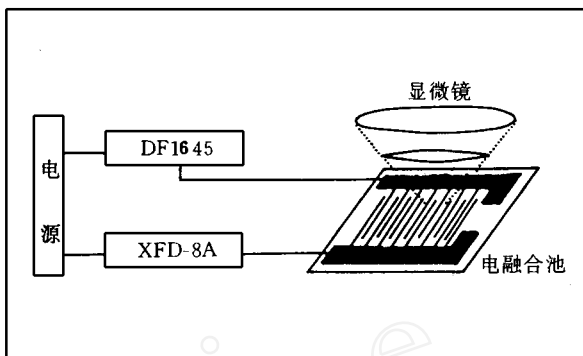


图1 测试系统示意图

Fig Testing system diagram

压作用下可使大麦细胞进行电融合。若将在交变电场下连接成链状的大麦细胞原生质体个数记为 N_b ,而发生电融合后的细胞原生质体个数记为 N_a ,则电融合率 F 为: $F = (N_b - N_a) / N_b$,并以 $F_r = F / F_0$ 表示加了添加剂之后大麦细胞的相对电融合率,式中 F_0 为空白电融合率, F 为加了添加剂之后的电融合率。文中每个数据均由三次以上实验平均而得。

2 结果与讨论

2.1 电脉冲对大麦细胞电融合的影响

大麦细胞的电融合与所加脉冲电压的强度及脉冲宽度有关。图2示出在无添加剂,脉冲持续时间 50 μs 情况下大麦细胞的电融合率 F_0 与脉冲强度 E 的关系。图3反映了在脉冲强度为 1.500 V/cm 时,电融合率 F_0 随脉冲持续时间 t 的变化。

由以上两图可见,电融合率 F_0 随 E 与 t 的增大而呈线性增加。本实验中细胞的电融合是在外加交变电场和脉冲电场的情况下发生的。在交流高频电场中,由于介电泳的作用细胞原生质体可连接成链状,原生质体间距很小。随后加上的脉冲电场可使原生质体表面产生小孔,即所谓的电生孔(Electroporation)。由于间距小,相临两原生质体表面的某些小孔可以沟通,细胞内的物质进行流动,最后形成一个新的细胞原生质体,产生了电融合。细胞电融合与细胞间距,细胞膜的表面张力,以及所加脉冲电压的特性有关。提高脉冲电压可增加电生孔的密度及孔的大小。增加脉冲时间可延长电生孔的开孔时间,也使细胞可获得足够的能量来克服它们之间的排斥力,以越过电融合的势垒。因此,这两者都有利于电融合的进行。

2.2 添加剂对大麦细胞电融合的影响

添加剂对大麦细胞电融合的影响,见表1。

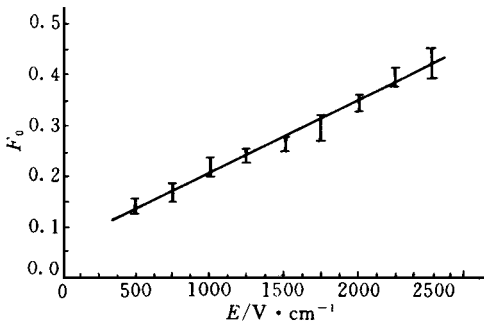


图2 电脉冲强度 E 与大麦细胞电融合率 F_0 的关系 电脉冲持续时间为 $50 \mu\text{s}$
 Fig 2 Relationship between electrical pulse strength E and the electrofusion yield F_0 of barley protoplasts electrical pulse duration time is $50 \mu\text{s}$

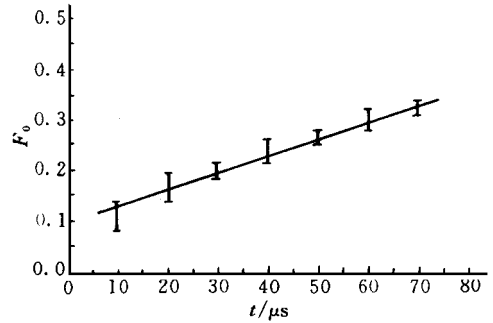


图3 电脉冲持续时间 t 与大麦细胞电融合率 F_0 的关系 电脉冲强度 E 为 $1\,500 \text{ V/cm}$
 Fig 3 Relationship between electrical pulse duration time and the electrofusion yield F_0 of barley protoplasts electrical pulse strength E is $1\,500 \text{ V/cm}$

表1 葡聚糖及其阴离子衍生物对大麦细胞电融合率 F_r 的影响
 电脉冲强度为 $1\,500 \text{ V/cm}$, 电脉冲持续时间为 $50 \mu\text{s}$

Tab 1 The influence of dextran and its anion derivatives on the electrofusion yield F_r of the barley protoplasts, $E = 1\,500 \text{ V/cm}$, $t = 50 \mu\text{s}$

添加剂*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
F_0	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27
F	0.68	0.21	0.16	0.19	0.20	0.20	0.21	0.18	0.20	0.19
F_r	2.50	0.78	0.59	0.70	0.74	0.74	0.78	0.67	0.74	0.70

* 1. 葡聚糖 ($M_w = 2\,500$), 2~ 3为蓝色葡聚糖 (M_w 依次为 $20\,000, 10\,900$), 4~ 7为汽巴蓝葡聚糖 (M_w 依次为 $500\,000, 77\,500, 3\,300, 110\,000$), 8~ 10为荧光葡聚糖 (M_w 依次为 $205\,000, 133\,000, 134\,100$).

葡聚糖是一种具有很强表面活性的物质 已经证明在很低的浓度下 (如 1 mmol/L) 它对极谱的氧还原极大峰已呈现强烈的抑制作用 它在大麦细胞原生质体表面的吸附可降低表面张力, 使细胞在电场下易于变形^[6]. 而且由于吸附在表面的葡聚糖与原生质体表面物质间的氢键作用, 葡聚糖起了一定的凝聚作用, 使细胞原生质体更为靠近 这样就有利于电融合的发生, 增加 F_r 值 添加剂对电融合过程的影响与其荷电情况有关 由于大麦细胞酯质膜的外侧存在负离子型基团, 使大麦细胞原生质体表面带有负电荷 对于一般添加剂, 如 EDTA、纺锤菌素、链霉菌蛋白酶、葡聚糖硫酸盐、聚乙二醇等, 阳离子型物质可促进大麦细胞电融合, 而阴离子型物质则降低电融合率^[8,9]. 葡聚糖是中性的的大分子化合物, 而蓝色葡聚糖、汽巴蓝葡聚糖和荧光葡聚糖是阴离子性的化合物 这些阴离子化合物在细胞膜表面的特性吸附, 可增加表面负电荷的密度 从而增强了原生质体间的排斥因素, 使原生质体不易靠拢 而且由于离子型添加剂的加入使溶液的电导率上升, 降低了细胞所处介质内的电场梯度 因此添加这些阴离子型的葡聚糖衍生物会使细胞电融合率降低

本实验中所采用的葡聚糖及其衍生物的分子量虽然较大, 但其体积比起细胞原生质体来讲仍是十分微小 按照吸附规律, 表面吸附物质的覆盖度由吸附平衡决定, 即吸附物的表面浓

度取决于溶液中物质的摩尔浓度 在实验中得出, 只要是同样品种的葡聚糖衍生物, 在相同摩尔浓度下其电融合率与分子量几乎无关 这是符合上述规律的

3 结论

利用具有微栅电极的细胞电融合池, 外加交流和脉冲电场的方法研究了葡聚糖、蓝色葡聚糖、汽巴蓝葡聚糖和荧光葡聚糖对大麦细胞电融合的影响 结果表明葡聚糖促进电融合, 而阴离子型的三种葡聚糖衍生物则起了抑制电融合的作用 在相同摩尔浓度下同种阴离子型葡聚糖衍生物对大麦细胞电融合率的影响与其分子量几乎无关 符合物质表面吸附的特性 这可能是由于后者增加了细胞原生质体表面的负电荷, 并降低介质内电场强度的缘故

德国分子生物技术研究所 H. Berg 教授提供了葡聚糖及各种分子量的蓝色葡聚糖、汽巴蓝葡聚糖和荧光葡聚糖, 特致谢意

The influence of dextran and its anion derivates on the electrofusion of barley protoplasts

Wang Wei Jiang Zhiyu*

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

Abstract The influence of dextran and its anion derivates (blue dextran, cibacron blue dextran, fluoresceinylthiocarbonyl-dextran) on the electrofusion of barley protoplasts has been investigated. It was found that as a kind of neutral surface active agent, dextran could promote the electrofusion, but these anion derivates could decrease the electrofusion yield. The phenomena were discussed from the view of adsorption of additives on the cell membrane.

Key words Cell electrofusion, Barley protoplasts, Dextran

References

- 1 方宗熙 普通遗传学 北京: 科学出版社, 1984, 315~ 333
- 2 李宝键, 曾庆平. 植物生物技术原理及方法 长沙: 湖南科技出版社, 1990, 302~ 320
- 3 Roos D, Davidson R, Choppin P, in Sowers A (ed). *Fusion of cell* New York: Plenum Press, 1988
- 4 Song L, Baldwin J, Reilly R. O, Lucy J. Relationship between surface exposure of acidic phospholipids and cell fusion in erythrocytes subjected to electrical breakdown. *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, 1104: 1~ 8
- 5 Zhang L, Fiedler U, Berg H. Modification of electrofusion of barley protoplasts by membrane-active agents. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 1991, 26: 87~ 96
- 6 Jiang Z, Berg H. Increase of protoplast electrofusion supported by dextran fractions. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1995, 38: 383~ 387
- 7 Grobner U, Velizarov S, Berg H. Polylysine supports electrofusion. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1996, 39: 181~ 184
- 8 Berg H. Basic applications of electric fields on biological cell. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1992, 27: 89~ 97
- 9 Zhang L. Polymer-supported electrofusion of barley protoplasts: a synergistic effect. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1994, 34: 109~ 113