

植物体细胞杂交参考资料

第 二 集

上海植物生理研究所
细胞生理室译

科 学 出 版 社

1 9 7 5

目 录

烟草的细胞培养·····	中田和男 (1)
植物细胞的培养和分化·····	林俊郎 (8)
具有明显的核的原生质体的融合·····	I. Potrykus (12)
自然融合的烟草叶肉原生质体海绵组织的制备和培养····· ·····	J. B. Power, E. M. Frearson, E. C. Cocking (13)
大豆原生质体的培养·····	(14)
高度液泡化的植物原生质体的融合····· ·····	L. A. Withers, J. B. Power, E. C. Cocking (16)
游离的燕麦芽鞘原生质体对吲哚-3-YI 乙酸的破裂反应 ····· ·····	M. O. Hall, E. C. Cocking (17)
植物细胞培养的工业化潜力·····	Z. Puhán, S. M. Martin (18)
叶细胞培养·····	加藤幸雄 (34)
从水稻胚根分离原生质体·····	前田英三 (36)
用生长点培养法获得无病毒植株·····	森宽一 (37)
从烟草和胡萝卜无性繁殖系的细胞分离原生质体····· ·····	A. И. Иванцов, Р. Г. Бутенко (54)
植物细胞原生质体——分离和发育·····	E. C. Cocking (59)
矮牵牛单离花粉在琼脂悬浮培养时的核和细胞分裂·····	H. Binding (73)
烟草单倍体原生质体再生开花植株·····	K. Ohyama, J. P. Nitsch (75)
离体培养的植物细胞和原生质体的分化和杂交····· ·····	O. L. Gamborg, H. J. Grambow, K. N. Kao, K. Ohyama, W. Steck, R. A. Miller (78)
从胡萝卜悬浮培养细胞原生质体中提取 DNA ····· ·····	K. Ohyama, O. L. Grambow R. A. Miller (81)
葡萄糖对光周期中性烟草 (Trapezond) 茎愈伤组织形态建成的影响 ····· ·····	T. Н. Константинова, Т. В. Баврина, Н. М. Акаменова, С. А. Голяновская (84)

培养瓶内成花的控制——高等植物形态建成研究的一个侧面·····	石原爱也 (91)
植物原生质体的培养·····	中野宽, 前田英三, 西村繁夫 (98)
无菌条件下作物细胞的分化控制·····	前田英三 (105)
在高等植物原生质体中细胞核的移植·····	I. Potrykus, F. Hoffmann (121)
植物细胞原生质体及体细胞融合第一次国际讨论会(简讯)·····	(122)

烟草的细胞培养

中 田 和 男

序 言

植物的组织培养可分为根、茎的生长点、叶柄、花器、未成熟的胚等器官的培养和细胞培养。在植物的组织培养中使用得最多的材料是烟草、胡萝卜。而烟草的细胞培养包括愈伤组织培养,液体培养和单细胞培养,此外尚有原生质体培养(经酶处理,从烟草叶中取得游离细胞,进而得无细胞壁的原生质体)和花药培养(通过花粉培养育成单倍体植物)。

就烟草的组织培养来说,早在十九世纪三十年代就已正式开始,自 White (1939)获得烟草杂种 (*Nicotiana glauca* × *Nicotiana langsdorffii*) 幼茎原形成层的愈伤组织继代培养成功以来,经过培养细胞的营养需要及其生长条件的许多研究,进而朝着形态建成的研究方向进展。

另一方面,在技术上,从愈伤组织的培养,经由细胞悬浮液培养途径,获得单细胞培养成功(Muir 等, 1954), 进而 Vasil 等报导,烟草单细胞可以分化发育成烟草植株。于是,完全证实了植物细胞的全能性 (totipotency)。

此外,建部等(1968)和与良等(1969)踏实地在进行烟草叶子游离细胞和其原生质体的培养工作,在原生质体水平上研究了植物病理学并取得成就。这和原生质体的培养与细胞杂交的研究也是有联系的。

就烟草组织培养来说,已有四十年的历史,发表了许多论文。这些论文终于要对发生学、遗传学、育种学、病理学上的利用作出贡献。特别是通过烟草的花药培养,由花粉育成单倍体植株,使能够进行遗传因子的分析和基因组的判断,并且能从低世代的杂种烟草中,立即得到遗传因子纯粹的纯系。能将遗传性固定,有作为杂交母本而发挥作用的可能性。

方 法

材料 烟草用作组织培养材料时,除了毛细胞外,叶;根;茎髓;生长点(主要是茎);刚发芽的部分;花药(以花粉培养为目的);子房;胚和胚乳等均可作为材料。此外,也可能进行由遗传性的、病毒感染、以及细胞感染所产生的肿瘤的培养。作为遗传性肿瘤,有名的例子是 (*N. glauca* × *N. langsdorffii*) 的杂种。此外尚知有几个杂交组合均能产生遗传性肿瘤。在使用由细菌感染产生的肿瘤时,应当采用不含细菌的二次形成的肿瘤。

移植 用于培养的组织必须进行表面灭菌,但是在进行花药培养时,由于在温室中

培育的烟草,在未开放的花蕾中的花药,多半处于无菌状态,因此不必进行花药表面灭菌。一般地说,用于表面消毒的方法如下:

- (1) 组织表面用去离子水充分洗涤。
- (2) 在 95% 酒精中浸渍几秒钟。
- (3) 在 10% 的次氯酸钠中浸渍 10 分钟。
- (4) 用无菌水充分洗涤。

烟草幼茎和叶的表面上生有密集的毛,当在消毒水中浸渍时,由于毛间空气泡的存在,使不能完全达到表面消毒的目的,造成灭菌失败。此时,就必须进行真空减压以抽去气泡。灭菌时间过长,愈伤组织的形成不良。在用茎髓做试验时,即使略带一些维管束,也能对愈伤组织的形成有好处。

培养部分叶片取得愈伤组织的方法,将 5×5 —10 毫米大小的一块叶片进行片刻表面灭菌,随后把它放置到培养基上,十五至二十天后,叶片就会膨胀,略微变白,此时,或是继续维持原状,或是将这膨胀而变白的叶片进一步切割,放在原来的培养基上。于是从这切口处,或从这叶片的表面形成愈伤组织。

在培养基上取得愈伤组织最简单的办法是将烟草种子播种在培养基上的办法。烟草种子用滤纸包好进行表面灭菌,然后播种于培养基上使之发芽。通常在十至十五天后,种子发芽,并在和培养基接触的表面上产生愈伤组织。用此法,非常容易得到愈伤组织,但是它存在着与由叶产生愈伤组织同样的缺点,即不能知道愈伤组织由何组织而来。愈伤组织获得后,除了目的在于获得愈伤组织外,想培养叶,根或生长点本身时,还需在寻找适当的培养基上下功夫。

人工合成培养基 培养基的成分因研究者的不同而有相当大的差异。作为著名的烟草愈伤组织培养基 RM-1964 培养基。这培养基是将 Murashige 及 Skoog 在 1962 年发表的培养基加以改良而得,其中去掉了 B_6 、烟碱酸和甘氨酸,增加了 B_1 的含量。

RM-1964 培养基的组成及其配制法如下,为便利起见将培养基分成 7 组贮藏液,贮藏液 A—G 贮存于冷藏库中,在配培养基时予以混合,贮藏液贮存超过 4—6 周以上,就不能使用。

EDTA 铁的配制: 将 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 用重蒸馏水溶解。另一方面将 Na_2 -EDTA 同样溶解在重蒸馏水然后加热,并将溶解的 Na_2 -EDTA 溶液和 $Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$ 溶液混合,冷却后,再加重蒸馏水定容到 1000CC,再加热使成稳定液。

这种培养基所含成分比 White 的培养基来得多。IAA 和激动素的含量以一定比率变化,就能使愈伤组织发生茎叶分化。

Hildebrandt (1962) 设计的烟草配方中含有天然产物椰子汁 (CM)。在 Hildebrandt 实验室中,将该培养基主要用于愈伤组织的继代培养,在日本由于取得 CM 较为困难,因此不常使用。

上述培养基再加入 2,4-D (6 毫克/升) 则称为烟草 D 培养基。

培养基的灭菌 一般地说,培养基的灭菌,多采用高压蒸气灭菌法 (1.0 公斤/厘米² 5—15 分钟)。作者每当蒸气压超过此压力时,就将电源关掉。灭菌时间过长,糖就会分解,培养基呈茶褐色,对于热不稳定的物质则采用细菌过滤器,最常用的细菌过滤器是 Milipore 过滤器。

培养条件 温度: 培养组织生长的最适温度范围,可以说,大致上和该植物原来生长最适温度相同,作者采用 25—35℃ 范围内的温度进行培养。

湿度: 在进行愈伤组织培养时,以培养基含有适量的水,处于溶解状态为佳。总之当将培养基倾斜时,在培养基上的水于底深处可见到约 5 毫米左右厚度的水为宜。通常用 8—10 克/升琼脂为好。

保持这种状态,就能使愈伤组织继续不断地良好生长。用棉塞的场合时,易于干燥可以用铝箔或橡胶栓和由滤纸做成的滤器。

pH: 通常用 6.0 左右,必须注意到,经高压灭菌后要下降 0.1—0.2 的程度。在长期培养过程中,尽管有偏碱和偏酸的变化,随后会变到中性附近。

光线: 在暗培养时,不论是愈伤组织培养,或是液体组织均能看到细胞分裂和生长。要使产生叶绿体,则必须置于漫射光下。

愈伤组织的培养

愈伤组织,易于从移植材料的分生组织或未成熟的薄壁组织中产生,但是用于移植的材料必需超过一定大小。一般地说,我们所用的材料,由于用的是些幼嫩的烟草植物,即使是用髓作材料时,也总混有各种不同组织的细胞,通常,略带一点儿绿色,对移植后愈伤组织的形成有利。

将形成的愈伤组织从原来组织切下来时,由于愈伤组织比较紧密,必须用刀子切割。随着继代培养的进行,愈伤组织变得脆弱,易于移植,形成愈伤组织的培养基以 RM-1964 培养基(IAA 2.0 毫克/升,激动素 0.5 毫克/升, 2, 4-D 0.6 毫克/升)为佳。

愈伤组织的生长 愈伤组织生长的测定,常用鲜重和干重表示,也有用细胞分裂指数和细胞计数法测定。和液体培养的情况有所不同,为了观察要将愈伤组织弄散,又冒破坏细胞结构之风险。

Capiin (1947) 提出如下公式以表示相对生长速度:

$$\frac{\log e(S_t/S_0)}{t}$$

S_0 = 培养开始时的大小, S_t = 培养结束时的大小, t = 时间。

又 Nickel (1956) 用生长值表示:

$$\text{生长值} = \frac{\text{培养结束时的大小或重量}}{\text{培养开始时的大小或重量}}$$

而 Kiein (1963) 以生长增值表示:

$$\text{生长增值} = \frac{\text{培养结束时的大小} - \text{培养开始时的大小}}{\text{培养开始时的大小}} \times 100$$

液 体 培 养

将愈伤组织移植于液体培养基中,进行振荡 (60—120 转/分) 培养时,就会看到液面上聚集游离的细胞,务必注意,其中不仅有单细胞,而且还有细胞块。由于细胞悬浮培养

成功,使得生物化学和生理学的研究成为可能。并且在实用方面,可以试图微生物工业那样进行大量发酵罐的培养。作者使用 RM-1964 培养基(2, 4-D0.6 毫克/升, IAA2.0 毫克/升)进行烟草细胞悬浮培养。在大量培养时,不采用机械振荡法,而使用将无菌空气从液体底层通入法,取得良好成绩。这方面的装置有必要逐渐改进,同时务必注意防止水分蒸发。

继代培养 在细胞悬浮培养进行再培养时,为了除去细胞碎片,细胞块和死细胞。要用尼龙布(网孔孔径随材料决定)进行无菌过滤,此后移植一定量,用于移植的接种源细胞密度要超过临界水平。这对于促进移植后细胞的生长和分裂是必要的。临界密度,常因使用的培养基的种类而有所不同。在使用含 CM 的烟草 C 培养基时,即使细胞接种量相当低,移植后的细胞生长和分裂却进行得相当顺利。如后所述,Visll 将烟草单细胞放在含 CM 的培养基中使进行细胞分裂。

细胞的形状 可观察到,球形、细长形的细胞以及巨形细胞,形状多种多样。常能看到具有螺旋形构造。细胞膜已木质化了的假导管管状细胞,还可看到多核细胞。

生长 在细胞悬滴培养的情况下,因为比较容易将细胞分离,所以常用分裂指数来测定生长。这儿介绍一下 Street(1966)的方法,在酒精和醋酸(3:1)中固定 2—24 小时后,贮藏在一20℃70% 的酒精中。离心除去酒精,在 60℃ 下,以 1N 盐酸将沉淀作成细胞悬浮液,放置 5—10 分钟,再用冰冷却这加水分解物,离心除去酸,然后将沉淀物放到孚尔根染色液中,贮放在暗中 1—4 小时,取一滴孚尔根悬浮液于载玻片上,盖上盖玻片,多余的染色液用滤纸吸去,此后撬开盖玻片的一端,加入一滴二氧化硫,并重新盖上盖玻片。这个漂白作用(几秒钟)如果进行得好,就能使核依旧染上颜色,只是细胞质被脱色,此后把滤纸放在盖玻片上,加压,吸去二氧化硫,再用甘油滴在染了色的细胞上将其封住,观察 1000 个核,以测定有丝分裂指数。作者采用简化方法,用醋酸苔黑素进行加热染色,就直接观察染了色的细胞。但是当将细胞块弄分散时,注意要点与弄碎愈伤组织时一样,此时常采用铬酸,螯合剂和果胶酶等。

单 细 胞 培 养

在烟草单细胞的培养中,划时代的创造要算 Muir (1954)提出的看护培养法。将烟草或万寿菊的肿瘤组织,置于液体培养基中,加以振荡,许多单细胞便在培养液中游离出来。在其生长最旺盛时,将数滴含有细胞的培养液注入培养皿中,在显微镜下从其中检出单细胞,并将这单细胞移置到在二天前已放置在旺盛生长的愈伤组织上的无菌滤纸(8×8cm)上。滤纸上的单细胞重复分裂而形成愈伤组织,于是建立了单细胞株。但是并不是所有的单细胞都能生长,平均达 8%,有时有达到 50% 的。此外,培养单细胞还可采用条件培养法。此法是将单细胞放入已经培养过细胞的培养液中,使单细胞生长、增殖。所谓条件培养,即在培养烟草细胞块时,从细胞中分泌出各种各样的物质,这些物质使得即使在培养液中只有单细胞也能进行细胞的生长分裂和增殖,以此说明这是培养基的附加条件。一般地说,在进行液体培养时,细胞分裂,易于在细胞块中发生,单独游离的单细胞不易发生分裂。但是在组织培养中总是希望使发生单细胞分裂。

此后 Torrey (1957)将 Maximow 的双层盖玻片法用于豌豆根的愈伤组织培养。Jones

等(1960)发表了微室培养法。他们用此法观察了杂种烟草培养细胞的分裂,不用说,当用新鲜培养基时,细胞接种量要大,当只放入单个细胞进行培养时,则使用椰子汁或必须使用预先让细胞块生长过的所谓条件培养基。

Hildebrandt 等用此法将细胞内形态学的变化摄成电影片,取得了很大成绩。

另一方面, Bergmann (1960) 将含 0.6% 的琼脂, 7% CM 及 0.5ppm 2, 4-D 的培养基注入培养皿底, 以构成薄层。再将预先经无菌过滤得约含 90% 游离细胞的烟草 (*N. tabacum* Var. Samsun) 的细胞悬浮液浸注于培养基上。在这种情况下, 有 20% 的细胞进行分裂, 用此法可取得许多种的单细胞株。

从单细胞来的植株的生长速度、颜色和表面长相, 以及对于各种培养基的反应均有差异。Sievert 等 (1965) 用 *N. tabacum* $\times$ *N. glutinose* 杂种烟草单细胞株 H196 株和 H241 株作为亲本株, 并由此进一步得次生株(无性繁殖系), 这时候, 主要地用看护培养法, 仅二株是用 Jones (1960) 微室法建立。由 H196 得 23 株, 由 H241 得 30 株。比较研究了亲株, 次生株对于各种糖类和生长激素的反应, 一般地说, 两次生株的生长和亲本株相类似。

然而, 即使是单细胞基因株, 在继代培养过程中, 株所具有的特性也常会失去。例如, Cooper 等 (1964) 从细胞角度研究了由 Morel 的烟草组织(烟草花叶病毒感染了的冠瘿组织)得来的二株单细胞株。八年中两系统用同一培养基培养。虽大部分细胞是 2N 的, 但也有 4N 或 8N 的。其原因可能很多, 然而不能忽视即使是所谓单细胞株也难免具有细胞学上不稳定性。

由单细胞培育成个体

竭尽培养技术的精华, 巧妙地克服细胞培养中的重重困难, 活用细胞培养技术, 以完成完整的植物体。这不仅对于从事组织培养者是最有魅力的课题之一, 对于从事于生物学研究者来说也具有同样的魅力。这儿谈一下 Vasil 等 (1965a, b) 所用的方法。将 *N. glutinose* $\times$ *N. tabacum* 的杂种烟草茎髓切成 0.25 $\times$ 0.5 厘米的圆柱形, 置放在烟草 D 培养基上使形成愈伤组织。将愈伤组织移植于液体的烟草 C 培养基中, 此后经振荡使分散得单细胞, 用硬质玻璃移液管吸取这单细胞, 移植于含 CM 的微室中(不用邻接细胞和条件培养基)细胞分裂的结果产生细胞块, 将细胞块移植于烟草 D 培养基中, 由于经该培养基培养最易使茎叶分化能力下降, 所以采用 MS 培养基(IAA 1 毫克/升, 激动素 1 毫克/升, 或 IAA 5 毫克/升, 激动素 0.1 毫克/升)在 3—4 周内即能看到茎叶分化。另一方面, 约经 8 周左右能看到根的分化。若将茎叶部分移植到不含生长素的培养基上, 就可使根的分化提早。具有茎叶和根的烟草幼株可移栽于土壤中。要使单细胞分化成植物时, 必须采用活力高的细胞。为此目的, 他们采用发芽种子得来的愈伤组织 (1967)。这些愈伤组织似乎主要是由胚得来的。这个也用微室法, 使之生长分裂。然而重要的是, 这种由烟草体细胞分化成植物的过程和胡萝卜的情况有所不同(Steward 等, 1958; Halperiu 等, 1964), 与由烟草花粉分化发育成植物体的情况也有差异(中田, 田中, 1967), 总之, 不是以相当于受精卵的方式进行体细胞的分裂。

叶肉组织的游离细胞和原生质体的培养 建部等(1968)从叶肉细胞中分离得游离细

胞和原生质体。此法作为细胞培养新技术可获得许多知识。尤其在研究病毒初期感染方面正起着重要作用。与良等(1968)还进行矮牵牛的原生质体培养。建部采用烟草(*N. tabacum cultivar: Bright yellow*)的60—80天苗龄的展开叶,剥掉下表皮,切成约2厘米大小见方。放到果胶酶溶液中,在25℃下,一边搅拌,一边与酶作用。此时酶液以甘露醇维持高渗透压,并加入硫酸葡聚糖,约经二小时,叶肉细胞全部游离于液体中,此后只残存叶脉和上表皮。他们还在发生原生质分离的条件下使酶起作用,和硫酸葡聚糖的加入成功地获得原生质体。原生质体的取得:将游离细胞保存在以甘露醇维持渗透压的液中,加入纤维素酶液,一边轻轻地搅拌,保持在36℃下,约2小时后,就变成球形的原生质体,在这方面的研究最有趣的是,从烟草叶肉组织分离出来的游离细胞在完全合成培养基上,到6—8细胞期就进行分裂,此点最近为簿井和建部(1969)所报导。

花药培养 将植物游离花粉置于人工合成培养基上进行培养试验,目的在于要查明花药内部的花粉细胞的分裂和花粉发育要素。

然而,自从Guha和Maheshwari 1966年由曼陀罗(*Datura innoxia*)花药得单倍体胚分化成功以来,即使用烟草花药进行培养也能成功地由花粉育成烟草单倍体植物。在烟草的花药培养中,采用处于花粉发育时期一核期的花粉的花药,容易得到由花粉育成植物。作者等(1967, 1968)将四分子期的花粉置于含椰子汁的培养基中,进一步移植到RM-1964培养基上,使从花药内分化出茎叶。然而在胡萝卜的胚培养中,Raghavan等(1963)报导:若将80 μ 以下的球状胚放在含硫酸腺嘌呤、激动素和吲哚乙酸的培养基中进行培养时,这球状胚继续进行细胞分裂生长。根据此点,中田和田中(1969)将硫酸腺嘌呤加到RM-1964培养基中,培养处一核期花粉的花药,由花粉分化得到30株幼植物。

Nitsch等(1969)获得成功率很高的由一核期花粉分化成单倍体植株。Sunderland(1970)将品种为White burley的烟草作材料,以蕾的大小分为下列四个阶段进行培养。(1)6—7毫米;(2)17—20毫米;(3)最老蕾;(4)二核期。其中最早出现幼植物的是(2)和(3),而(1)和(2)不出现幼植物。

在曼陀罗是以成熟花粉分化成单倍体胚的,中田等(1967)最初以处于四分子期的未成熟的花粉,约经80天分化得幼植物。此后由于改变了培养基的成分,使一核期的花粉约经30天左右就能成功地育成幼植物。在该条件下未见四分体期花粉的分化。

由此可见,因培养基成分的变化,幼植物分化的最适花粉发育期也相应地变化着。大概在中田刚开始实验时,从四分体期的花粉经长期培养后才勉强地分化成植物,其原因可能是,四分体期的花粉在含CM培养基上就那样进入一核期,其中的若干花粉具备了适于分化的条件。另一方面,一核期的范围是宽广的,其中有的已处于接近成熟花粉的状态,因此仅在四分体期花粉阶段才显示分化。

参 考 文 献

- Bergmann, L., *J. Gen. Physiol.*, 43, 841 (1960).
Caplin, S. M., *Bot. Gaz.*, 108, 379 (1947).
Cooper, L. S., Cooper, D. C., Hildebrandt, A. C. and A. J. Riker, *Amer. J. Bot.*, 51, 284 (1964).
Guha, S. and S. C. Maheshwari, *Nature*, 212, 97 (1966).
Halperin, W. and D. F. Wetherell, *Amer. J. Bot.*, 51, 274 (1964).
Jones, L. E., Hildebrandt, A. C., Riker, A. J. and J. H. Wu, *Amer. J. Bot.*, 47, 468 (1960).
Klein, R. M., *Physiol. Plant.*, 16, 73 (1963).

附表：烟草的细胞培养

1. RM-1964 培养基 (Linsmarer 和 Skoog)

母液	成分	母液浓度 (克/升)	加到培养基中的母液量 (毫升/升)	培养基的最终浓度 (毫克/升)
A	NH ₄ NO ₃	82.5	20	1650.0
B	KNO ₃	95.0	20	1900.0
C	H ₃ BO ₃	1.24	5	6.2
	KH ₂ PO ₄	34.00		170.0
	KI	0.166		0.83
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.05		0.25
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.005		0.025
D	CaCl ₂ ·2H ₂ O	88.0	5	440.0
E	MgSO ₄ ·7H ₂ O	74.0	5	370.0
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	4.46		22.3
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.72		8.6
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.005		0.025
F	Na ₂ EDTA	7.45	5	37.35
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.57		27.85
G	盐酸硫胺素	0.08	5	0.4
	蔗糖	30		
	肌醇			100
	IAA			1.0—30
	激动素			0.01—10
	琼脂	10		

2. 烟草 C 培养基 (Hildebrandt, 1962)

组 分	浓 度 (毫克/升)	组 分	浓 度 (毫克/升)	组 分	浓 度 (毫克/升)	组 分	浓 度 (毫克/升)
Na ₂ SO ₄	800.0	KCl	65.0	H ₃ BO ₃	0.00375	硫胺素	0.1
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	400.0	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	33.0	KI	0.03	蔗糖	20000.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	180.0	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.45	Fe(C ₄ H ₄ O ₆) ₃	40.0	琼脂	6000.00
KNO ₃	80.0	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.6	甘氨酸	3.0	椰子汁	50(毫升/升)
						NAA	0.1

3. Nitsch 培养基* (1969)

无 机 盐	毫克/升	有 机 物	毫克/升
KNO ₃	950	肌 醇	100
NH ₄ NO ₃	720	甘 氨酸	2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	185	尼 克 酸	5
CaCl ₂	166	吡 哆 醇	0.5
KH ₂ PO ₄	68	硫 胺 素	0.5
MnSO ₄ ·4H ₂ O	25	叶 酸	0.5
H ₃ BO ₃	10	生 物 素	0.5
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10	蔗 糖	20(克/升)
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	IAA	0.1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025		

* 铁与 RM-1964 培养基相同。

- Linsmaier, E. M. and Skoog, *Physiol. Plantarum*, **18**, 100 (1965).
 Muir, W. H., Hildebrandt, A. C. and A. J. Riker, *Science*, **119**, 877 (1954).
 Nakata, K. and M. Tanaka, *Japan. J. Genetics*, **43**, 65 (1968).
 Nickell, L. G., *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, **42**, 848 (1956).
 Nitsch, J. P. and C. Nitsch, *Science*, **163**, 85 (1969).
 Raghanan, V. and J. G. Torrey, *Amer. J. Bot.*, **50**, 540 (1963).
 Sievert, R. C. and A. C. Hildebrandt, *Amer. J. Bot.*, **52**, 742 (1965).
 Steward, F. C., Mapes, M. O. and K. Mears, *Amer. J. Bot.*, **45**, 705 (1958).
 Street, H. F. and G. G. Henshaw, *Cell and Tissues in Culture*. Acad. Press (London) New York, Vol. 3, 459 (1966).
 Sunderland, N. and F. M. Wicks, *Nature*, **224**, 1227 (1970).
 Takebe, I., Otsuki, Y. and S. Aoki, *Plant and Cell Physiol*, **9**, 115 (1968).
 Torrey, J. G., *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, **43**, 887 (1957).
 Usui, H. and I. Takebe, *Development Growth and Differentiation*, **11**, 143 (1969).
 Vasil, V. and A. C. Hildebrandt, *Science*, **147**, 1454 (1965a).
 ——— and ———, *Science*, **150**, 889 (1965b).
 ——— and ———, *Planta*, (Berl) **75**, 139 (1967).

[译自(日)遗传, 1970, **25**(5): 24—29]

植物细胞的培养和分化

林 俊 郎

细胞的增殖和酶活性

细胞的增殖过程 植物细胞的培养常使用琼脂固体静置培养法、液体振荡培养或转动培养法。一般地说,以增殖细胞为目的的培养采用盐浓度较高,如 Knop 液 3—4 倍的培养液为佳,但是以器官分化为目的时多数采用盐浓度比 Knop 液低的培养液。高浓度配方的代表是 Murashige 和 Skoog 液(简称 MS),低浓度配方的代表是 White 液。上述两液都要补充加入 Knop 液中所没有的微量元素,酌情添加椰子汁(简称 CM)酵母提取液(YE)水解酪蛋白(CH)等。不过,近年来,在很多情况下欢喜使用完全合成培养基。糖和维生素 B₁ 是必需的,除根器官培养和肿瘤组织培养以外,吲哚乙酸及其他植物激素也是必需的,为了使髓细胞增殖尚需加入激动素。

关于细胞增殖,在琼脂培养基上的生长,称为愈伤组织生长。而在液体培养基中进行振荡或转动培养时,细胞常以相当分散的状态进行旺盛生长。这是由于在愈伤组织生长情况下,细胞和培养基的接触面小,而且愈伤组织内部处于较为嫌气的状态。液体培养正巧消除了这些缺点。然而无论是固体培养或液体培养,其细胞增殖过程都是对数生长。在液体振荡培养情况下约每一天半增加一倍,连续增殖一周即达终点(成为恒定不变状态)。在琼脂固体培养情况下,约四天增加一倍,连续增殖二周多,此后增殖速度急剧下降,但不完全停止,约可持续地缓慢增殖二个月。此数据是将烟草 XD₆ 细胞株的细胞置于去除吲哚乙酸和激动素,加入 1 毫克/升 2, 4-D 的 MS 培养基上培养的结果。IAA 是植物体自身合成的生长素,而 2, 4-D 是人工合成的生长素,比 IAA 效力强。并且 2, 4-D 性质稳定,能耐高压消毒,适于长期培养。该物质原来以除莠剂而称著,在作除莠剂时采用高浓度,而

1 毫克/升的浓度用于培养时具有强烈的生长素作用,使细胞旺盛地分裂和增殖,为了使愈伤组织产生芽和根,需要除去 2, 4-D 或将浓度降至 $\frac{1}{100}$ 毫克/升的程度。

同步培养 细胞重复分裂时,静止期和分裂期(M期)相互交替。DNA 的合成时期是静止期的中途,称为 S 期。M 期和 S 期之间称 G_1 期, S 期以后到 M 期为止的一段时间称 G_2 期,总之以 $G_1-S-G_2-M-G_1$ 顺序进行的循环叫做细胞周期。

在普通的细胞培养系统中,各细胞的循环时期参差不齐,经常能看到所有时期的细胞。但是通过人为地调整这种参差不齐,可使各细胞的细胞周期取得一致。这样的培养称同步培养。调整的方法很多,如用核酸合成的抑制剂: 5-氟去氧尿核苷、羟尿素、过量的胸腺核苷等。由于这些抑制剂的作用,使细胞停留在 G_1 期,处理 12—24 小时,几乎所有的细胞都处于该期。此后,一旦将抑制剂除去,各细胞就一致地进入 S 期,经过 G_2 期进入分裂期。据 Eriksson 用单冠毛菊细胞的试验,细胞循环需 22 小时的培养,由于核酸合成受抑制,成功地使细胞集中于 M 期约 4 小时。

此外,通过将细胞暂时处于饥饿状态,或者调节光、温度条件均能在一定程度上取得同步培养成功。

微体 最近通过动植物细胞的研究得知微体的存在。它是直径长约 0.5—1 微米的小泡,外面围着一层膜,和内质网膜相接邻。内质网膜和微体很可能部分地连在一起。似乎在內质网膜中合成的蛋白质和酶是贮存在微体内的。

松岛用烟草的 $\times D_6-S$ 细胞株的研究指出:细胞在含有 2, 4-D 的 MS 培养基上增殖时,在细胞内只能看到许多微体。但是把这种细胞移植到含有 IAA 和激动素的培养基上,使之处于可能发生芽分化的状态,在此时微体中能观察到结晶体的出现。

此外尚知含结晶的微体存在于燕麦子叶鞘及其他的细胞中,它的出现和细胞分化有关,这是值得重视的。关于该结晶的属性目前还不太清楚,很可能是由于内质网供给微体的物质,在微体内超过了一定浓度,从而引起结晶产生。由于结晶体原来就是物质的一种不活泼状态,因此决不能认为在细胞分化期间,结晶体起积极作用。实际上很可能在分化以前,即细胞增殖时所必需的物质,在分化时成为不需要而变成结晶。已知不含结晶的微体除了含有过氧化物酶外尚含二羧酸循环的酶系统。同时这种结晶在某一定状态时可以反映酸性磷酸酶的活力。总之,不论微体含有结晶体与否,它和细胞内的呼吸、物质代谢等都有密切的关系,故在今后细胞分化的研究中应该予以重视。

原生质体的培养 植物细胞的原生质体的外层为纤维素构成的细胞壁所包围。动物细胞没有细胞壁而能生存,所以把植物细胞壁除去也不要紧吧!这是早就想到的事,实际上要想在高渗透压液中将植物细胞中将原生质体挤出而暂时能生存的尝试早已做过。但是最近则不用挤压法,而是利用霉菌的纤维素酶溶解细胞壁取出原生质体的方法。Cocking 用纤维素酶作用于番茄根尖得原生质体,把它悬浮在 White 培养液中(蔗糖 0.6M)约能生存一周。在此期间,观察到细胞壁的再生。但是在还未完全形成细胞壁前原生质体已崩溃。

最近,建部为了研究烟草花叶病毒(TMV)的感染机理开始使用原生质体。通常认为 TMV 不感染健康的细胞,而只是从细胞壁的伤口侵入。因此用除壁的原生质体则有可能使 TMV 的研究变得更容易一些。他先用果胶酶处理叶子,将栅状组织的细胞游离开并

收集之,随后将该游离细胞用纤维素酶处理得原生质体。把原生质体放在用甘露醇提高了渗透压的培养液中培养,生存数周。此期间,一方面再生细胞壁,另一方面细胞重复分裂多次。证实了当 TMV 的 RNA 和原生质体接触后就侵入内部,变成 TMV 而增殖之。

这样,植物细胞原生质体已能如此生存下去,可是要使它本身增殖,目前还没有成功。

细胞增殖和酶活性 将植物体的一部分置于适当的琼脂培养基上,不久细胞开始增殖,表面隆起,形成愈伤组织。一般地说,生物体受伤后,在伤口附近的细胞因受到刺激而使内部酶活性发生变化。各种酶中以呼吸酶系统的变化尤为显著。

诸桥将胡萝卜根切片培养于含生长素的培养基上,最初几天氧吸收增高数倍,2—3 周后恢复原状。酶系统的种类中,除 TCA 途径以外,PP 途径(磷酸五碳糖循环)的酶系也比以前活泼。当切片置于不含生长素的培养基上,切片不形成愈伤组织,类似的现象出现较弱,并出现酒精发酵,这是培养前所没有的。蛋白质代谢在最初 4—5 天内没有多大变动,此后急剧地增高,和呼吸相比可见有相当对照的变化。

还可以看一看在液体振荡培养时酶活性的变化。每次继代培养初期、中期和后期的酶活性有所不同。以烟草 $\times D_6$ 细胞株为材料所得的试验结果,当达到恒定不变时期(定常期),细胞变得相当大。此细胞进行移植,最初几天,在该细胞内进行分裂,作为总量来说几乎不变。此后细胞进入对数增殖期,不久即变为恒定不变状态。如将对数期细胞每到第三或第四天移植一次,则常常可维持小型细胞的对数增殖(将前面一种培养称慢培养,后面的称快培养)。测定这两种培养法各时期脱氢酶的活性是:慢培养的中途及进入对数期的前后一段时期活性最高,快培养时,经常维持大体上相同程度的酶活性。该数据是各种脱氢酶活性的总值。一般认为,这些脱氢酶活性的消长也与细胞分化密切相关。

细胞分化与酶活性 de Jong 等报道,由烟草 XD 株得来的 WR-132 细胞株置于新鲜培养基中再培养时,不久即发生活跃的细胞分裂。一周后几十个细胞连成连锁状,在此期间,前三天只是进行细胞分裂,没有看到细胞的伸长和生长,此后伸长和分裂同时发生。

用细胞化学方法测定酶活性的结果,最令人注意到的是:第三天 RNA 局限在各细胞的一端,过氧化物酶的活性在细胞链尖端部位的细胞表现最强。琥珀酸脱氢酶和顺丁烯二酸脱氢酶的活性,活性强的细胞,和几乎一点活力也没有的细胞之比,在第三天以 1:3 的比率排列,到第 4—5 天,全部细胞的活性相同了。乙醇脱氢酶的活性和上述情况相反,活性强的细胞和弱的细胞之间以 3:1 的比率排列。

再培养三天后看到的各细胞之间各种酶的酶活性的巨大差异,表明细胞出现了分化。如在这培养液中加入 0.5 毫克/升 2,4-D,细胞只旺盛分裂而不分化,使得各细胞间的酶活性取得一致。

细胞的分化

由单细胞分化发育到完整植株 如上所述,通常在培养基中加入 1 毫克/升 2,4-D

就使愈伤组织不形成芽和根,只进行不断的细胞增殖。若以IAA代替 2, 4-D, 另增加激动素,就能引起芽和根的分化。Vasil 以烟草杂种 (*N. glutinosa* × *N. tabacum*) 的愈伤组织为材料,经振荡培养得单细胞,再用微室培养得单细胞株,一旦得到单细胞的愈伤组织株,就将它们分别放在表 1 所示培养基上,先产生芽,后长根。将具有芽和根的部分栽于花盆中,长成完整植株。其过程是,先由单细胞形成愈伤组织,然后一部分愈伤组织分化出芽,另一部分愈伤组织长出了根,两者相连,变成植株。但是在细胞培养中形成植株常常不是经过这样的过程。胡萝卜和荷兰芹并不经过愈伤组织,而经历与受精卵同样的过程,从体细胞形成类胚。这事实的证实是细胞培养的一大成果。Vasil 以荷兰芹为材料见到了培养类胚,如同种子中的胚一样,首先形成子叶。胡萝卜和荷兰芹一旦形成愈伤组织也能经历烟草同样的过程而产生小植物。就目前所知,经过愈伤组织分化成植株是一条较为普遍的途径,从类胚发生植株还局限个别种类。

表 1 在含有各种浓度组合的 IAA 和激动素的培养基上,烟草愈伤组织的分化

IAA 浓度 (毫克/升)	激 动 素 浓 度 (毫克/升)				
	0	3	5	7.5	10
0	没有分化	在 3—4 周内产生芽, 8—10 周内产生根	同左	没有分化 硬愈伤组织	同左
1	没有分化 柔软愈伤组织	5—6 周内产生芽	5 周内产生芽	5—6 周内产生芽 并长出稀疏的根	没有分化 硬愈伤组织
1.5	同上	6—8 周长少量芽 和少量根(需光)	5—6 周内产生芽	5—6 周内产生芽和 稀疏的根	产生稀少的芽
5	同上	没有分化	产芽极少	没有分化	没有分化

中田证实,烟草也能通过花药培养,以花粉为起点,形成类胚并得到单倍体植株。

输导细胞的分化 无论从类胚或从愈伤组织形成芽和根,它们在一定时期内都要产生维管束,至少在肉眼能看到芽和根出现以前,在其内部理应开始分化出输导组织。

在输导细胞中,象假导管那样的细胞,其细胞壁部分地增厚,可看出与分裂细胞明显不同。所以可以作为研究导致器官分化条件的一种方法,将假导管出现作为器官分化的指标。

Fosket 将大豆子叶的愈伤组织置于含有各种比例的 NAA/激动素的培养基中,逐日取出愈伤组织,再以 5% 盐酸和 5% 铬酸的混合液处理愈伤组织,使细胞游离。检查其中所含假导管细胞的比例。NAA 为 $10^{-4}M$, 激动素为 $5 \times 10^{-7}M$ 时最易产生假导管。当 NAA 在 $10^{-5}M$ 以下,激动素在 $10^{-9}M$ 以下,再培养数次可以变成完全没有假导管的愈伤组织。

培养细胞在再培养时发生的变化 一般在再培养时细胞能不断地增殖,无限地进行再培养。但是未必能保持细胞原来的特性。例如:染色体数为 $2n$ 的细胞,随着培养天数的增加,就会出现 $4n$ 、 $8n$ 和其他偶数与奇数的多倍体细胞,甚至这些变化了染色体数的细胞比原来 $2n$ 的细胞增殖更快。虽然在植物体内也存在着极少几个多倍体细胞,但是它们的分裂是受到限制的,在体内几乎不增殖。在人工培养时却相反,特别是在 CM 和 YE 等生物体提取物加入培养基的情况下,进行振荡培养,多倍体细胞增加的数量,比用合成培养基和琼脂的固体培养法多得多。

为了尽可能取得均一的细胞群,采用单细胞细胞株,即令是这样的话,也不能保证在再培养期间不发生变化。

Cooper 以烟草冠瘿中取得的单细胞株 M_{471} 细胞,经 8 年培养后其中存在 $2n$ 、 $4n$ 、 $8n$ 的细胞,其所占比率各自为 80%、15%、5%。这还算是保持 $2n$ 细胞比较好的。Torrey 以豌豆根的愈伤组织,在含有 YE 培养基上培养二周后,就有 80% 的 $4n$ 细胞和 10% 的 $8n$ 细胞。但若在同样条件下置于不含 YE 完全合成培养基上二周后细胞都是 $2n$ 的。

Sievert 从烟草单细胞株 H_{241} 株得到 30 个次生单细胞株。研究各株在不同糖类培养基上的生长速度。所得结果是: 次生株的生长速度可以数倍于母株,也有的仅母株生长速度的几分之一。

再培养与分化能力的下降 众所周知愈伤组织随着再培养的进行,芽和根的分化能力不断下降。表 2 所示: 庄野的部分实验结果先将胡萝卜愈伤组织置于含有 YE 和 2,4-D 的 White 培养基中进行无分化状态的再培养。然后在不同时期移至没有 2,4-D 的培养基里,检查它的分化能力。观察到因株龄的不同其分化能力有所不同,在半年后到一年间用此方法任何一株也不发生分化。但是将上述再培养半年到一年的愈伤组织,经数日低温处理和放在含 CH 的培养基中培养,就会发生器官分化。但是若已再培养 38 个月以上则完全丧失分化能力。

表 2 六株胡萝卜细胞株的愈伤组织培养时期长短和分化程度(%)的关系(庄野)

细胞株	培养时间(月数) 每 4—6 周再培养一次														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
DSY1	100	50	100	25	25	78	17	13	0	0	0	0	0	0	0
DSY2	100	100	40	50	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DSY3	88	100	40		53	44	46	83	33		44	56	0		0
DSY4	23	66		100			33				0		0		0
DSY5	43	100		100			25		66		33		0		0
DSY6	62	100	25		13		0		66		0		0		0

庄野报导: 当胡萝卜愈伤组织随着再培养次数增加,逐渐降低增殖速度时,只要将胡萝卜根的酒精提取物加入培养液中,就能使它恢复。这是由于其中含有有效成分之一,核酸碱基。

经长期再培养的愈伤组织和刚从植物体中取出而形成的愈伤组织相比,常常在许多性状上有差别。不过也有一些细胞株,虽经 10 年再培养尚能保持其分化能力。

[译自(日)遗传,1970,24(5): 16—23]

具有明显的核的原生质体的融合

I. Potrykus

许多实验工作已启示了体细胞融合的可能性。在形式遗传学和应用遗传学方面,已能把不可杂交的基因型进行重组。在发育生理学方面,已把不同分化程度的细胞融合

起来。以前,用哺乳动物细胞为材料进行的研究推动了体细胞遗传学和细胞分化的研究^[1]。人们还试图把这个基本方法应用于高等植物的细胞。这方面的工作具有很大意义,因为植物分化问题只能研究植物细胞来解决,此外,被子植物的体细胞能够诱导长成完整的植物^[2]。

培育植物的体细胞杂种需要顺利通过许多阶段:体细胞单离出来、除去壁得到外形可变的原生质体、融合成异核体、核融合成同核原生质体、细胞壁再生、诱导核和细胞的分裂、诱导分化并使长成完整植株。前面二个阶段没有多大困难^[3],第三阶段也已找到方法^[4,5]。对于其他几个阶段抱有希望也是有理由的,因为目前已能从分离的原生质体形成新的细胞壁^[6]进行分裂^[7],并长成植株^[8]。各种细胞之间的融合可以从混杂的表现型本身得到证实。动物异核体在同步分裂过程中实现核的融合,这种核融合从不同染色体组的标记染色体的一起出现来判断。如果用有明显核的原生质体为材料,判断融合成功便方便多了。我们从矮牵牛胚珠中分离出原生质体,并使之融合。方法如下:从开花前约二天的花芽中取出胚珠,加载玻上,揉破组织并加盖玻片,在含有1%纤维素酶(Serva 16420)的0.275M NaNO₃溶液中,于18℃下保温四小时。这时融合产物主要是带有二个核的,也有带有3个、4个或5个核的原生质体。因为融合本身难于观察,为了了解确实,使所有具有多个核的原生质体恢复到融合前的状态,我们又用果胶酶(Serva 31660, 1%于0.275M NaNO₃溶液中以处理之。处理一小时后得到单细胞,它们包含着一个核。以兰猪耳草的胚珠用同样方法处理,得到了几乎相同的结果。

用较强的质壁分离来压缩多核原生质体的核,结果不能诱导核融合。已着手取得离体的多核原生质体并在微室中进行其个体培养。

参 考 文 献

- [1] Harris, H., *Cell Fusion*, Oxford Clarendon Press, 1970.
- [2] Steward, F. C. and M. O. Mapes, *Science*, **143**, 20 (1964).
- [3] Cocking, E. C., *Nature*, **187**, 962 (1960).
- [4] Power, J. B. et al., *Nature*, **225**, 1016 (1970).
- [5] Potrykus, I., *Nature*, (in Druck).
- [6] Pojnar, E. et al., *Protoplasma*, **64**, 460 (1967).
- [7] Nagata, T. and I. Takebe, *Planta*, **92**, 301 (1970).
- [8] Takebe, I. et al., *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **83**, 129 (1970).

[译自 *Naturwissen*, 1971, **58**: 328—329]

自然融合的烟草叶肉原生质体海绵组织的制备和培养

J. B. Power, E. M. Frearson, E. C. Cocking

苗龄50—60天烟草植株的全展叶进行表面消毒:用0.5% (W/V)的Cetavlon溶液(15分钟),70% (V/V)乙醇(30秒),再用2.5% (W/V)的次氯酸钠(30分),然后再在无菌的蒸馏水中洗四次,去掉下表皮的叶小片用含有微孔过滤的纤维素酶(4%, W/V)

(Onozuka P1500) 和果胶酶 (Macerozyme, 0.5%, W/V) 的酶混合剂, 在 20℃ 中无菌培养 3 小时。培养结束, 用含有 23% (W/V) 蔗糖的培养液洗二次, 然后就把它们放在培养液中过夜。用一块消毒的盖玻片, 上面放着飘浮在培养液中一个叶小片, 再轻轻地一压, 自然融合的烟草原生质体就出来了。这样得到的是有 30% 融合的原生质体和 70% 不融合的原生质体的混合培养物, 再在培养皿中于 20℃ 弱光下 (40—60 呎烛光) 无菌培养。用了二个培养基, 一个培养基类似于 Nagata 和 Takebe (1970) 所用的, 含有 2, 4-D、6-苯甲基腺嘌呤、甘氨酸、肌醇和盐酸硫胺素, 但是没有甘露糖醇, 另一个是商业上制备修改的 White 培养基 (S-3, Biocult 厂出品); 二者都加 23% (W/V) 蔗糖。为了观察融合原生质体的核, 用醋酸酒精 (1:3V/V) 固定三小时再用醋酸胭脂红或醋酸俄西印染色。

在修改的 Nagata 和 Takebe (1970) 培养基中经过 24 小时培养, 这些自然融合的原生质体中明显地出现了排对物 (systrophy), 核到一起去了, 而且在以后的培养中能如此保持下去。在 White 培养基中, 这现象较不明显。约培养四天后, 融合的原生质体有了第一次分裂。在二种培养基中原生质体都增大了, 融合的原生质体中含有二个或三个核, 某些核分裂是同步的并伴有细胞壁的再生。融合的原生质体再生了一个壁, 有些进行了重复的分裂, 但是从整个培养来说, 还没有再生细胞分裂的同步性。

在这些种内融合体中, 这些分裂的任何一次都能发生核的融合。这些结果表明壁的再生是已经发生了; 而在这些自然融合的植物原生质体中, 核的融合可能是在通常的纺垂丝形成后, 因为在有些例子中, 核是紧密地相互联着而进行同步的有丝分裂。

[译自 *Biochem. J.*, 1971, **123**(4): 29—30]

大豆原生质体的培养*

材料和方法

原生质体取材于大豆组织的液体培养: 细胞壁用部分纯化的纤维素酶 (Onozuka P1500) 和果胶酶 (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.) 去除。酶溶于加有 0.1M 蔗糖、0.3M 山梨醇和 0.005M 的柠檬酸的 B₅ 培养基中, 在加入酶之前 pH 调至 5.5。酶溶液通过 0.45 微米的微孔滤膜 (Millipore Corp, Bedford, Mass.) 过滤灭菌。酶溶液与细胞培养物以等量混合于一 Falcon 培养皿中, 以形成一薄层, 最后的酶-细胞混合物的渗透压约为 0.3M。每小时略为摇动其几秒钟。在加入酶后一小时内, 即开始形成原生质体。为得到最高的产率, 通常维持 4—6 小时。酶的清洗用加有 0.13M 山梨醇, 0.05M 蔗糖和 0.001M CaH₄(PO₄)₂ · H₂O 的 B₅ 条件培养基 (其制备方法为: 在 B₅ 培养基中接种后振荡培养 24 小时, 去除细胞即可), 用 0.05M NaOH 调至 pH 5.5, 浓度约为 0.28M。洗去酶的方法为: 用双层的微孔吸滤膜 (Millipore absorbent pads) 过滤酶-细胞混合物, 并缓慢加入上述清洗培养

* 本文根据下列文献编译:

Kao, K. N., Keller, W. A. and R. A. Miller, *Exp. Cell Res.*, **62**, 338 (1970).

Kao, K. N., Gamborg, O. L., Miller, R. A. and W. A. Keller, *Nature new Biol.*, **232**, 124 (1971).

Miller, R. A., Gamborg, O. L., Keller, W. A. and K. N. Kao, *Can. J. Genet. Cytol.*, **13**, 347 (1971).