

持不变(基本稳定在 0.19 左右)。因为 P 值比较稳定,并不因为 DPH 分子进入胞浆而升高或降低,因而荧光偏振度 P 值作为细胞膜脂流动性的参数是可靠的。为了尽量减小胞浆内脂质所产生的影响,温育时间以 30' 为最适宜。

4. 腹水癌细胞与 DPH 温育以后荧光偏振度 P 与温度的关系 温度与 P 值关系用 $\ln \bar{\eta}$ 对 $1/T$ 作图表示。由图 6 可以看出,在 13℃—37℃ 之间 P 值即 $\bar{\eta}$ 变化缓慢,38℃ 开始发生转折,因此腹水癌细胞膜的相变温度可能在 37℃ 以上。根据 Arrhenius 公式

$$\bar{\eta} = Ae^{\Delta E/KT}$$

$$\ln \bar{\eta} = \ln A + \frac{\Delta E}{KT}$$

$\bar{\eta}$ 为微粘度, ΔE 为流动活化能 K 为波尔兹曼常数, T 为绝对温度, A 为常数。从图 6 可以计算出 ΔE 为 4Kcal/mole。

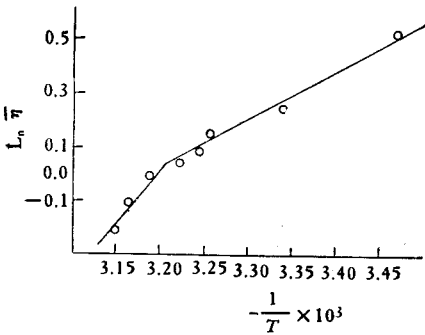


图 6 腹水癌细胞温度与微粘度的关系

结 论

荧光探针 DPH 和腹水癌细胞膜结合后,荧光光谱峰位比单纯 DPH 水溶液峰位蓝移,说明 DPH 结合在脂肪链的非极性区。DPH 和腹水癌细胞结合,30' 内主要结合在膜上,以后逐渐进入胞浆。荧光偏振度 P 不随时间延长而变化,因此,用荧光偏振方法测定完整细胞膜脂流动性,DPH 是一种有效的探针。荧光偏振度随温度变化而异,由此求得腹水癌细胞膜相变温度大约在 39℃。

参 考 文 献

- [1] Lenaz, G. et al.: *J. Bioenergetics*, **7**, 223, 1975.
- [2] Shinitzky, M. et al.: *Biochimica et Biophysica Acta*, **515**, 367, 1978.
- [3] 袁松青:《荧光偏振技术及其在分子生物物理学中的应用》中国第三届生物物理学会论文集 1980。(印刷中)
- [4] Vanderkooi, J. et al.: *Biochemical Fluorescence: Concepts*, **2**: 737, 1976, New York, Dekker.
- [5] Collard, J. G. et al.: *Experimental Cell Research*, **116**, 447, 1978.
- [6] Inbar, M. et al.: *Europ. J. Cancer*, **13**, 1231, 1977.
- [7] Ben-Bassat, H. et al.: *Cancer Res.*, **37**, 1307, 1977.
- [8] Watford, Road et al.: *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **76**, 869, 1977.
- [9] Pesce, A. J. et al.: *Fluorescence Spectroscopy an introduction for biology and medicine*, p. 87—91, 1971, New York Dekker.

[本文于 1981 年 2 月 25 日收到]

用“匀浆互补法”测试杂种优势的研究 (III)

杨福愉 邢菁如 陈文雯 王淑娅

(中国科学院生物物理研究所)

孙 鹤 雏

(辽宁省昭乌达盟农科所)

杂交育种是选育优良品种,从而提高粮食产量,改进粮食品质的一个有效途径。对农作物杂种优势的利用已经在粮食增产上取得显著

的效果,但强优势杂交种的获得一般都是建立在大量杂交组合与多年产量比较的基础上。为了减少育种工作的盲目性和减轻工作量。人们

都希望找出一些有效的生理、生化指标来进行预测。1966年美国Mc Daniel^[1]等曾提出用“线粒体互补法”预测杂种优势,但后来西德、英国等科学工作者都未能重复出Mc Daniel的实验结果^[2,3]。1972年以来在国内开展这方面工作的大多数实验室中也没有获得象Mc Daniel那样明显的结果^[4-7]。1977年开始,我们尝试用种籽黄化幼苗的匀浆替代线粒体,对玉米和谷子的杂种优势与匀浆氧化活性的互补作用的相关性进行了研究。实验结果表明,大多数具有明显杂种优势的玉米和谷子组合的亲本幼苗匀浆氧化活性均有显著的互补作用,而杂种优势不明显的组合则不表现出互补现象^[8]。进一步研究表明杂种优势比较明显的亲本幼苗匀浆的互补作用主要是由于两者内含的线粒体与上清液之间相互作用导致的结果^[9]。鉴于过去测试的玉米组合来自各个单位,种籽的年限与储存条件等也不尽一致,为了进一步验证“匀浆互补法”测试杂种优势的可靠性,本文对昭蒙农科所经田间小区试验鉴定的7个玉米组合(其中6个系强优组合,1个属弱优组合)用匀浆互补法进行测试,并对它们的杂交一代(F_1)的氧化活性与对照强优杂交种进行了比较。

一、实验材料和方法

种籽发芽时,先将干净的种籽用0.1%氯化汞浸泡10分钟灭菌,经清水冲洗半小时,再在水中浸泡15小时左右。然后将种籽均匀平铺在有纱布的搪瓷盘内,在30℃的恒温箱中发芽2—3天。为了使亲本杂交种萌发幼苗的长度尽可能一致,不同种籽催芽的时间可以根据具体情况加以掌握。在整个发芽过程中,注意控制温度。黄化幼苗剪下后在冰箱中放置一小时,然后倒入双层的细尼龙纱袋中以1:3的比例加入匀浆介质(0.25M蔗糖、0.067M磷酸缓冲液pH7.2、0.005M EDTA、牛血清清蛋白0.75毫克/毫升)在瓷钵中磨碎。过滤除去残渣(上述操作都在低温下进行)。过滤液用冰冻离心机离心($1000 \times g$)10分钟,上清液即为匀浆液。两个亲本的幼苗匀浆按1:1比例在0℃互

补30分钟。匀浆氧化活性的测定用瓦氏测压法。反应液内含:匀浆液1.3毫升0.2M α -酮戊二酸0.2毫升、0.06M氯化镁0.1毫升、匀浆介质1.3毫升,总体积为2.9毫升。反应温度30℃,平衡5分钟,测定30分钟。

二、实验结果和讨论

1. 用‘匀浆互补法’测试已知杂种优势(经田间鉴定)的玉米组合

从表1可以看出无论是对照强优组合门₁₄×吉₆₃,还是田间筛选的6个优势明显的组合:长冶矮×赤₁₂₃,赤₁₂₄×赤₁₁₉,武₂₀₂×赤₅₇₆,英₆₄×粗₆₁,M₀₁₇×粗₆₁,M₁₄×吉₆₃,它们的两个亲本的幼苗匀浆经体外等比混合后在氧化活性方面都表现出显著的互补作用。与此同时,经田间鉴定的优势不明显的组合(528×四11-2),它的两个亲本的幼苗匀浆的氧化活性并没有呈现互补现象。这说明幼苗匀浆的互补现象与杂种优势具有显著的相关性。这与我们过去报道的有关玉米和谷子的实验结果是一致的^[8]。

2. 玉米强杂优组合的杂交第一代(F_1)幼苗匀浆氧化活性的比较

除匀浆互补试验外,我们还对其中6个组合的玉米杂交第一代(F_1)的氧化活性进行测定。(其他组合由于种籽数量有限没有进行测试)田间小区试验的产量也一并列上,加以比较,以观察杂交种幼苗匀浆氧化活性与它们田间产量有无一定的相关性。从表2的实验结果可以看出,将推广种植的杂优组合门₁₄×吉₆₃作为对照进行比较,凡田间产量具有较高水平的,氧化活性也较高。528×四₁₁₋₂田间产量明显低于吉₆₃×门₁₄,其幼苗匀浆的氧化活性也很低。因此初步结果表明杂交种田间产量与其幼苗匀浆的氧化活性具有一定的相关性。但是产量大小的序列与幼苗匀浆氧化活性的序列并不完全相符。这是可以理解的,因为不仅氧化活性的测定难免有一定的误差,从而使测量数值有一定的波动范围,况且影响田间产量的因素也很多,因此很难要求两者都完全相符。

表 1 已知杂优的玉米组合同“匀浆互补法”测试结果

组合名称	氧化活性 微升 O ₂ /1 克幼苗/小时		组合名称	氧化活性 微升 O ₂ /1 克幼苗/小时	
		相对比值			相对比值
吉* 63 (♀)	255.9	1.38	英 64 (♀)	129.7	1.30
门 14 (♂ ⁺)	161.6		粗 61 (♂ ⁺)	125.4	
吉 63+门 14(+)	288.2		英 64+粗 61(+)	166.6	
长治矮 (♀)	88.8	1.34	Mo17 (♀)	182.1	1.40
赤 123 (♂ ⁺)	54.0		粗 61 (♂ ⁺)	186.0	
长治矮+赤 123(+)	95.7		Mo7+粗 61(+)	258.0	
赤 124 (♀)	230.8	1.38	M14 (♀)	102.0	1.25
赤 119 (♂ ⁺)	185.8		吉 63 (♂ ⁺)	109.3	
赤 124 赤 119(+)	287.8		M14+吉 63(+)	132.5	
武 202 (♀)	211.9	1.24	**528 (♀)	69.8	0.96
赤 576 (♂ ⁺)	166.4		四 11-2 (♂ ⁺)	55.2	
武 202+赤 576(+)	234.1		528+四 11-2(+)	60.0	

* 为生产上已推广种植的对照强优组合。
** 为经田间鉴定的杂交优势不明显组合。
表中其他组合均为经小区试验鉴定为强优组合。

表 2 玉米强杂优组合的杂交第一代 (F₁)
幼苗匀浆氧化活性的比较

组合名称	田间小区产量(斤)	氧化活性 微升 O ₂ / 1 克幼苗/小时
吉 63×门 14	1.278	440.3
长治矮×赤 12	1.075	424.2
赤 124×赤 119	1.283	419.9
英 64×粗 61	1.139	397.8
武 202×赤 5	982	392.8
528×四 11-2	889	259.3

但是从表 2 所列结果可以看出, 两者具有一定的相关性是很明显的。

我们认为, 除了用“匀浆互补法”预测杂种优势外, 对杂交第一代 (F₁), 甚至杂交种 (F₀) 的幼苗匀浆氧化活性同时进行测定与比较, 具有如下的意义:

(1) 通过两个亲本幼苗匀浆互补试验所得互补系数的大小只能反映杂交种与亲本相比较有否可能产生较强的杂种优势, 但仅仅根据互补系数很难定量反映杂种优势的相对程度。因此如果杂交种的优势程度与其幼苗匀浆氧化活性具有一定相关性的事实能够进一步确定的话, 那么, 除了互补系数以外, 再测定杂交种

(F₀) 的幼苗匀浆氧化活性并与对照杂交种 (例如, 当地推广的强优杂种) 相比较, 就可以为我们进一步提供这一杂交种的优势能否超过已知强优的对照杂交种的信息。

(2) 某一杂交组合的两个亲本的幼苗匀浆互补试验和杂交种 (F₀) 幼苗匀浆的氧化活性的比较测定对预测杂种优势可能具有相互补充的作用。由于技术操作等原因, 仅仅靠一个指标的测试结果很容易发生假象, 如果两个指标同时测试并加以综合就可能会减少差错, 从而提高预测准确率。

综上所述, 如果在根据育种经验选择杂交组合的基础上, 将“匀浆互补法”以及杂交种氧化活性的比较测试同时进行并加以综合, 这就有可能进一步提高预测杂种优势的准确性。当然这还需要进行更多的工作来加以验证。目前, 有关的研究正在进行之中。

参 考 文 献

[1] Mc Daniel, R.G. et al.: *Science*, **152** (1966) 1640.
[2] Zobe, R. G. et al.: *Plant physiol.* **50** (1972) 790.
[3] Ellis, J. R. S. et al.: *Nature* **241** (1973) 45.
[4] 浙江农业大学植物生理教研组, 《植物学报》1975 年第 17 期 250 页。

- [5] 上海植物生理所光合作用研究室二组,《植物学报》1977年19期216页。
[6] 广东植物研究所生理生化研究室,《植物研究》,1976年4期12页。
[7] 中国科学院生物物理研究所三室二组,《生物化学与生

- 物物理进展》,1978年1期1页。
[8] 杨福愉等,《科学通报》1978年23期752页。
[9] 杨福愉等,《科学通报》1979年24期24页。

[本文于1981年4月21日收到]

支原体膜的结构与功能——支原体膜上 ATPase 动力学参数的测定

董仁杰 蒋以文 王苏民 黄 芬

(中国科学院生物物理研究所)

ATPase 是生物膜上一种重要的酶,它不仅参与能量代谢,物质运送,氧化磷酸化等重要生化过程,而且它与膜上磷脂的结合状态,将影响膜的流动性,从而影响膜的其他功能。因此,研究 ATPase 的性质和功能,对生物膜的结构与功能的研究具有重要意义。

支原体膜上自发现有 ATPase 以来^[1],对其性质的研究,虽不及哺乳动物物质膜或线粒体膜的工作做的那么深入,但近年来也开展了一些研究^[2,3]。这种酶为 Mg^{2+} 所激活,某些二价阳离子也能在不同程度上使其激活。关于一价阳离子的作用以及某些抑制剂的作用则有不同的结果。

本文以鸡败血症支原体为材料,就某些因素对膜上 ATPase 活性的影响进行了研究。目的是选择一定条件,以便对 S_6 菌株膜上 ATPase 水解 ATP 的某些动力学常数进行测定。

一、材料和方法

1. 菌种 鸡败血症支原体 S_6 株(由农业部兽医药品监察所赠给)

2. 培养基配制与菌体培养 见前文^[4]。

3. 菌体的收集与膜的提取和纯化 接种后的培养液,在 37°C 培养 36 小时取出后, $13,000 \times g$ 离心 15 分钟,收集菌体,以 β -缓冲液 pH7.4 (含 $0.15M$ NaCl, $0.05M$ Tris, $0.01M$ β -巯基乙醇,用盐酸调到所需的 pH) 洗涤菌体两次。然后悬浮于适量的 $1:20 \beta$ -缓冲液中,置 37°C 恒温

水浴保温 20 分钟,使菌体低渗裂解。以 $8000 \times g$ 离心 5 分钟,除去未破的菌体,膜悬液再以 $48,000 \times g$ 离心 30 分钟收集膜。将膜再悬浮于 $1\text{ml}:20\beta$ -缓冲液中(含膜蛋白 $5-10\text{mg}$),将此膜悬液加入 6.5ml 梯度离心管的蔗糖液面上(先在此管中加入 $2\text{ml} 50\%(\text{W/W})$ 的蔗糖液,再缓缓加入 $2\text{ml} 35\%(\text{W/W})$ 的蔗糖液)再加入适量的 $1:20\beta$ -缓冲液,封管。在 MSE75 离心机中离心 2 小时(4°C), $100,000 \times g$ 。取出两层蔗糖液面上的膜^[5]再用 $1:20\beta$ -缓冲液洗涤两次, $48,000 \times g$ 离心收集膜,最后再悬浮于 $1:20\beta$ -缓冲液中于 4°C 冰箱保存备用。如需长时间保存应放于 -40°C 冰箱中或液氮内。蛋白含量按 Lowry 法^[4]测定。

4. ATPase 活性测定和比活性的计算

用分光光度法^[4]测 NADH OD_{340} 下降值。以每毫克蛋白每分钟 NADH 之 ΔOD_{340} 计算酶的比活。所用底物均经纯化。此外,还用测定 ATPase 反应释放出的无机磷的方法^[4]进行了比较。

5. ATPase 抑制常数 K_i 的计算^[6]

计算公式如下:

$$\frac{V_{\max}}{V_i} = 1 + K_i[I]$$

二、结果和讨论

1. 不同低渗液对膜上 ATPase 比活性的影响