

流式细胞术分析强声波对植物细胞周期的影响

李涛¹, 侯月霞², 蔡国友³, 沈子威⁴, 席葆树³, 陶祖莱¹

(1. 中国科学院力学研究所国家微重力实验室,北京 100080; 2. 中国农业大学应用化学系,北京 106094;
3. 清华大学工程力学系,北京 100084; 4. 清华大学生物科学与技术系,北京 100084)

摘要: 应用流式细胞术分析烟草细胞在交变应力作用下细胞周期的变化。用特制的强声波发生装置产生频率和强度可调的交变应力场,研究不同频率和强度的交变应力作用后烟草细胞周期的变化。实验结果表明,在交变应力作用下直接影响细胞或细胞分裂的同步化,促进S期的DNA合成,有助于细胞有丝分裂。声波频率在400Hz至800Hz,强度在90dB到110dB内,随频率和强度的增加,交变应力使S期细胞明显增加,但频率或强度过大,反而使S期细胞大大减少。

关键词: 流式细胞术(FCM); 交变应力; 细胞周期; 烟草细胞

中图分类号: Q689 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6737(2001)01-0195-04

植物生长在自然环境中,必然受到各种外界环境的刺激作用,其中包括机械应力对植物生长发育的影响。因此,生长和应力的关系一直是生物学家和物理学家关心的课题。机械刺激能影响植物的生长,这是人们很早就发现的现象。比如攀缘植物,通过对接触敏感的茎、叶柄、卷须、花柄和根来识别外界环境并沿着一定的路线伸展爬行。另外,国内有很多科学家曾经研究过音乐对植物生长发育的影响,他们发现一定强度的音乐刺激能够明显地促进植物的生长。也就是说音乐作为交变应力的一种特殊形式对植物的生长发育起着作用。有文章报道机械应力信号传导的作用机理还不清楚。本文试图从细胞和分子的水平来揭示其作用机理。由于植物的生长发育就是植物细胞的生长和分裂,而植物细胞周期的变化与其生长发育密切相关,因此我们首先利用流式细胞术分析交变应力对植物细胞周期的影响。流式细胞术(Flow Cytometry,简称FCM)是对细胞或细胞器快速测量的新技术,这项有用的技术广泛应用在动物细胞、细菌、酵母、昆虫细胞等的研究中,到目前为止用FCM研究交变应力对植物细胞周期的影响还未见报道。清华大学生物力学研究室已应用此项研究的初步结果,进行了强声波对叶类蔬菜和西红柿等从种子发育到植物生长及水稻发芽等实验,取得了预期的成果,在农业上有很好的推广前景。

1 材料与方法

1.1 供试生物材料

1.1.1 原生质体所用材料为普通三生烟(*Nicotiana tabacum* cv. "samsun")

1.1.2 烟草叶肉细胞原生质体的提取

在培养皿中置20ml新配制酶液,内含0.5%离析酶(Macerozyme R-10),0.7mol/ml甘

收稿日期: 2000-08-25

作者简介: 李涛,1969年生,助理研究员,硕士,电话:62558142,E-mail:leetao@imech.ac.cn.

露醇和 1% 硫酸葡聚糖钾, 酶液经过滤灭菌。撕去无菌烟叶平展幼叶的下表皮, 切成小片, 叶背向下平铺酶液面一层, 使酶液渗入组织。在 25℃ 下避光放置于摇床上, 轻轻摇动。30min 后更换酶液, 加入等量的过滤灭菌酶液, 内含 1.2% 纤维素酶 (Cellulase Onozuka R-10), 0.3% 离析酶, 0.7mol/ml 甘露醇和 1% 硫酸葡聚糖钾, 释放原生质体, 经 200 目尼龙网过滤, 转入离心管, 加入 5ml 蔗糖溶液, 离心 (1000r/min, 3min)。吸取上浮原生质体于离心管中, 加入 CPW13 清洗液, 混匀后离心 (500r/min, 1min), 清洗三次, 使原生质体浓度为 2×10^6 个/ml。

1.2 交变应力对烟草细胞原生质体的作用

交变应力场采用北京希必实机电技术公司提供的强声波装置来实现。装置自行研制。

取烟草叶肉细胞原生质体 2×10^6 个/ml, 实验分两部分 (1) 在一定声强不同频率的声波对烟草细胞原生质体作用 1h 后, 用 FCM 检测交变应力对烟草细胞周期的变化; (2) 在不同声强一定频率的声波对交变应力对烟草细胞原生质体作用 1h 后, 用 FCM 检测交变应力对烟草细胞周期的变化。同时设置对照实验。

1.3 流式细胞仪检测烟草细胞周期的变化

利用中国科学院力学研究所流式细胞仪检测, 型号: FACSCalibur™, 厂家: BECTON DICKINSON, USA。

实验组分为对照组和处理组。对照组: 取浓度为 2×10^6 个/ml 的原生质体悬浮液, 加入 PBS 液; 处理组: 交变应力对烟草细胞原生质体作用 1h 后, 加入染色液。用 FCM 检测交变应力对烟草细胞周期的变化。

染色测定: 用 70% 的冷乙醇固定原生质体后, 调整原生质体浓度为 2×10^6 个/ml, 用 CPW13 液清洗 3 次, 弃上清液, 加入 RNA 酶, 37℃ 水浴中孵育 30min, 立即放入冰浴中, 终止 RNA 酶的作用。加入 50ug/ml PI (Propidium iodide, 碘化丙啶) 染色液 (内含 129.6ml 生理盐

水、10mg PI, 1ml Triton X-100, 200mg 枸橼酸钠, 200ml 双蒸水) 进行 DNA 染色, 冰浴暗处放置 0.5h, 用 FCM 测定原生质体 DNA 的含量, 分析细胞周期变化。FACSCalibur™ 氩离子激光器, 激发波长 480nm, 用第二荧光 FL2 检测 PI 发射波长 630nm。

2 结果

2.1 交变应力对烟草细胞周期的影响

用 CPW13 液把未经交变应力和经过交变应力作用的原生质体浓度定容到 2×10^6 个/ml, 用 FCM 测定其 DNA 的含量, 结果如图一所示。

结果表明: 交变应力作用的烟草细胞周期发生了明显的变化。与未经声波处理的对照组相比, G_0/G_1 期细胞少, S 期细胞增多, 促进了细胞的生长。这一结果证实了交变应力

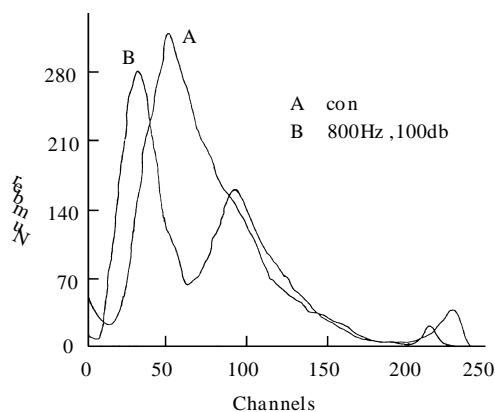


Fig. 1 Flow Cytometric Analysis of cell cycle using FL2. A: untreated with alternative stress; B: treated with alternative stress (800Hz, 100dB). A: $G_0 - G_1$: 80.31%, S: 19.65%, G₂: 0.04%; B: $G_0 - G_1$: 35.07%, S: 64.90%, G₂: 0.03%

能引起烟草细胞周期的改变。

2.2 一定声强不同频率的声波对烟草细胞原生质体的作用

声波强度固定为 100dB,频率分别选用 400Hz,800Hz,8000Hz,作用 1h 后分别用 FCM 检测交变应力作用对烟草细胞周期的影响,结果如表 1 所示。

Table 1 Changes of tobacco cells cycles after 1 hour treatment of 100db

频率(Hz)	G ₁ - G ₂ (%)	S (%)	G ₂ (%)
400	55.19	44.28	0.53
800	35.07	64.90	0.03
8000	88.07	7.18	4.75
Control	80.31	19.65	0.04

从表 1 可以看出:不同频率声波对细胞周期产生不同程度的影响。表现为 800 Hz 时,S 期细胞明显增多,促进了细胞增殖。

2.3 一定频率不同声强的声波对烟草细胞原生质体的作用

声波频率固定为 800 Hz,声波强度分别为 90、100、110dB,作用 1h 后分别用 FCM 检测交

Table 2 Changes of tobacco cells cycles after 1 hour treatment of 800Hz

声强(dB)	G ₁ - G ₂ (%)	S (%)	G ₂ (%)
90	38.23	48.47	13.3
100	35.07	64.90	0.03
110	66.31	33.63	0.06
Control	80.31	19.65	0.04

变应力作用对烟草细胞周期的影响,结果如表 2 所示。

从表 2 可以看出:不同声强的声波对细胞周期产生不同强度的影响。随着声强的增加,其变化明显。表现为声波频率为 800Hz、声强为 100dB 时的声波处理有利于细胞的生长。

3 讨论

细胞周期的同步化或者说细胞分裂的同步化,在植物生长中是很重要的,由于细胞群中每一个细胞对环境因素影响的敏感性是不一样的,导致细胞生长的不同步,直接影响植物细胞的生长和发育,甚至会抑制植物的生长和发育。根据文献报道,影响细胞周期或细胞分裂同步化的因素有化学的和物理的各种因素。比如辐射,辐射的强度对植物生长的影响从频谱上就能反应出来。交变应力也是一种波,当交变应力作用于植物细胞时,就会影响植物细胞的分裂。本实验结果表明,声波频率在 400Hz 至 800Hz 的强声波作用使得植物细胞 S 期明显增加,说明声波作为一种信号刺激能使细胞周期同步化,抑制了细胞的生长。每一种声波频率下,声波强度从 90dB 到 100dB,随声波强度的增大,S 期细胞明显增加,100dB 增加最大。但声波强度

过大,如 110dB 时,S 期细胞增加的幅度明显减少。

参考文献:

- [1] 宋平根,李素文.流式细胞术的原理和应用[M].北京:北京师范大学出版社,1992.
- [2] Doullard J Y,Langone J J,Vunakis H. *Enzyme - linked immunosorbent assay[J]. Methods in Enzymology*, 1983, 92: 168 - 169.
- [3] Wandee Yanpaisan, Nicholas J C King, Paunline M Doran. *Analysis of Cell Cycle Activity and Population Dynamics in Heterogeneous Plant Cell Suspensions Using Flow Cytometry[J]. Biotechnology and Bioengineering*, 1998,58.
- [4] Albert B, et al. *Molecular Biology of the Cell[M].* New York and London:Garland Publishing Inc, 1983. 611 - 671;776 - 811.

ANALYSIS OF THE EFFECT OF STRONG SOUND WAVE ON PLANT CELLS CYCLES USING FLOW CYTOMETRY

LI Tao¹, HOU Yue - Xia², CAI Guo - You³, SHEN Zi - Wei³, XI Bao - Shu⁴, TAO Zu - Lai¹

(1. Institute of Mechanics, Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China;

2. Department of Applied Chemistry, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

3. Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

4. Department of Mechanics, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Flow cytometry was used to measure cell cycle parameters in tobacco cell suspensions acted by alternative stress. The field of alternative stress was generated through a strong sound filed system. It was found that the effects of stress on cells depended greatly on the intensity and frequency of stress. In a certain range of intensity and frequency, the stress caused a significant changes to cell cycle paraments and an increase of the proportion of cells in S phase was seen, while the stress with higher frequency or intensity may cause the proportion of cells in S phase decreased evidently.

Key Words: Flow Cytometry (FCM); Alternative stress;
Cell cycle; Tobacco cell