

## 技术与方法 Techniques and Method

## 拟南芥叶肉原生质体分离条件的优化

孙琳琳, 佟少明, 侯和胜\*

辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁大连 116029

Conditions Optimization of *Arabidopsis* Mesophyll Protoplast Isolation

SUN Lin-Lin, TONG Shao-Ming, HOU He-Sheng\*

College of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116029, China

**摘要:**以野生型拟南芥的第5~8片叶子为材料,在酶解液浓度和酶解时间相同的条件下,探讨不同苗龄、取材部位、离心条件对原生质体得率和质量影响。结果表明:室内土培3~4周的拟南芥,取中部叶片,以离心力为40~60×g,升速档为1得到的原生质体得率和质量最佳。

**关键词:**拟南芥;原生质体;分离

拟南芥原生质体不仅遗传背景清楚(Davey等2005),且导入外源基因后,其表达具有较好的同步性,因而常用作研究外源的大分子物质,如DNA、RNA和蛋白等(Sheen 2001; Walmsley和Arntzen 2003)。但由于此种技术对原生质体的分离得率和质量都有较高的需求(Abel和Theologis 1994),这就对拟南芥原生质体分离技术提出了更高的要求。为此本文从苗龄、取材部位、离心条件3个因素对分离拟南芥原生质体的影响进行探讨。

## 材料与amp;方法

取野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)种子于1.5 mL EP管中,用10%次氯酸钠消毒10 min,无菌水冲洗6次后,加入适量的0.1%琼脂糖使之悬浮,用200 μL移液枪点播在灭菌的MS固体培养基(1%蔗糖、0.8%琼脂,pH 5.8)上。置于4 °C冰箱内处理3 d,之后转入光照培养(温度为23 °C,光照强度50~75 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,每天光照16 h,黑暗8 h,相对湿度60%~70%) (Yoo等2007)。当长出4片叶子时,将小苗移栽到营养土和蛭石按体积比1:1混合的培养介质上,用塑料保鲜膜覆盖缓苗2 d,备用。

原生质体的分离主要参照Yoo等(2007)文中的方法,并做了适当修改。选生长3~4周的拟南芥,取其完全展开的叶片,长度为1.5~2.5 cm。实验分别取叶片前端、中部及末端的5~7 mm部位,各实验取用的叶片均为1 g。在白纸上用刀片将叶片

横向切成0.5~1 mm的小条,置于盛有0.5 mol·L<sup>-1</sup>甘露醇等渗溶液的小平皿中备用。另取一个培养皿,加入5 mL酶解液(15 mL体系成分:0.15 g纤维素酶R10、1.09 g甘露醇、1 mL 4.5% Macerozyme R10、1 mL 0.3 mol·L<sup>-1</sup> KCl、3 mL 0.1 mol·L<sup>-1</sup> MES、7.45 mL灭菌水置于离心管中,50 °C水浴10 min,冷却到室温,再加入1 mL 0.15 mol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>、50 μL β-巯基乙醇、1.5 mL 1%牛血清蛋白溶,使用前1 h配制。),将浸泡于0.5 mol·L<sup>-1</sup>甘露醇溶液中的叶片小条移入其中。用锡纸将培养皿包好,置于23 °C恒温摇床或恒温培养箱中,酶解3 h后,用200目的筛子(70 μm尼龙膜)去除大组织块,取滤液。将过滤后的绿色混合物置于10 mL离心管中,在3K15高速低温离心机(德国SIGMA公司)中,4 °C低温、升速档设为1(升速档有1~9档,1档最低,9档最高)、离心力为60×g,离心5 min。弃去上清,用4 mL冰冷的W5溶液(50 mL体系各成分用量:0.92 g CaCl<sub>2</sub>、0.45 g NaCl、0.0185 g KCl、0.045 g葡萄糖、0.015 g MES,pH值调整为5.6。)轻柔洗涤管底的原生质体。设升速档为1、离心力为40×g离心5 min,离心后弃去上清液,用4 mL冰冷的W5溶液悬浮沉淀。观察计数。

收稿 2008-09-20 修定 2008-12-15

资助 国家自然科学基金(30671439)。

\* 通讯作者(E-mail: hesheng\_hou@126.com; Tel: 0411-84259112)。

## 结果与讨论

### 1 叶片取材部位对原生质体得率的影响

从表1可见, 叶片中部所分离的原生质体得率最高。其原因可能是叶片中间部位伸展最好, 边缘部位角质层较厚, 分离难度增大所致。

表1 不同叶片部位获得的原生质体得率

组数	原生质体得率 / 个·mL <sup>-1</sup>		
	前部叶	中部叶	后部叶
第1组	2.125×10 <sup>5</sup>	3.375×10 <sup>5</sup>	2.375×10 <sup>5</sup>
第2组	2.000×10 <sup>5</sup>	3.250×10 <sup>5</sup>	2.125×10 <sup>5</sup>
第3组	1.625×10 <sup>5</sup>	3.000×10 <sup>5</sup>	1.875×10 <sup>5</sup>
第4组	2.125×10 <sup>5</sup>	3.625×10 <sup>5</sup>	2.000×10 <sup>5</sup>
平均值	1.969×10 <sup>5</sup>	3.313×10 <sup>5</sup>	2.094×10 <sup>5</sup>

### 2 苗龄对原生质体得率的影响

图1结果显示: 生长3~4周的拟南芥分离得到的原生质体个体体积较大、数量多(图1-a), 而生长超过5周的拟南芥分离得到的原生质体个体体积较小、不饱满、数量也很少(图1-b), 产量差异非常明显。分析其原因可能是由于超过4周龄的拟南芥开始由营养生长转向生殖生长, 5周龄的拟南芥抽薹现象已经极其普遍, 以致叶片营养供给不充足, 含水量降低, 细胞老化加快, 细胞膜通透能力增强, 细胞更容易破裂。

### 3 离心转速档对原生质体质量的影响

图1显示: 转速档为5时分离得到的原生质体破损严重(图1-c); 而转速档设为1时原生质体破损较少(图1-d), 不需再做进一步的纯化处理, 可以直

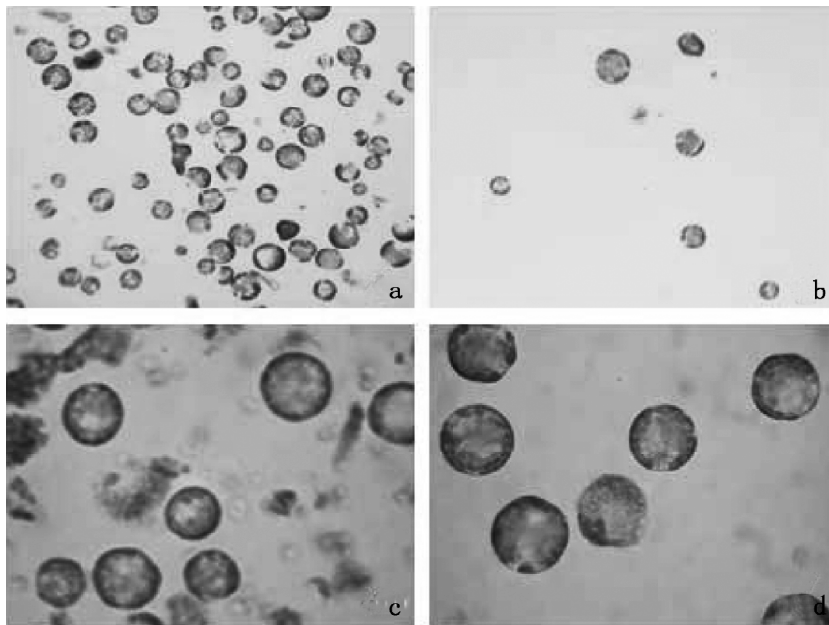


图1 不同苗龄和转速档对原生质体分离的影响

a: 生长25 d拟南芥的第5~8片叶的中部分离得到的原生质体(×100); b: 生长38 d拟南芥的第5~8片叶的中部分离得到的原生质体(×100); c: 以生长28 d拟南芥的第5~8片叶的中部为材料, 转速档设为5时分离得到原生质体(×400); d: 以生长28 d拟南芥的第5~8片叶的中部为材料, 转速档为1时分离得到原生质体(×400)。

接用于下一步的实验。从表2的结果来看, 后者的

得率也明显优于前者。

### 4 不同苗龄来源的原生质体的形态差异

如图2所示, 生长超过5周的拟南芥分离得到的原生质体为球形, 叶绿体分散在原生质体边缘, 中央液泡大而清澈, 细胞质稀薄(图2-a)。而生长期为3~4周的拟南芥分离得到的原生质体, 呈饱满球形, 淡绿色, 细胞质稠密, 并含有颗粒状内含物, 叶绿体

表2 转速档对原生质体得率的影响

转速档	碎片	原生质体得率 / 个·mL <sup>-1</sup>
5	较多	1.250×10 <sup>5</sup>
1	极少	3.625×10 <sup>5</sup>

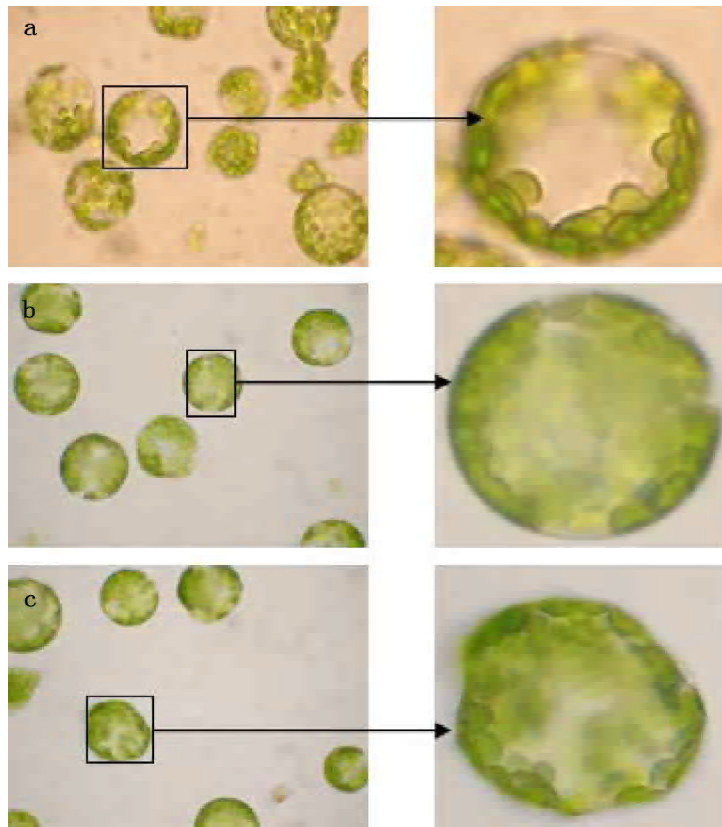


图2 不同苗龄的叶肉分离原生质体的形态差异

a: 生长 38 d 拟南芥第 5~8 片叶的中部分离得到的原生质体( $\times 400$ )和单个细胞; b: 生长 28 d 拟南芥第 5~8 片叶的中部分离得到的原生质体( $\times 400$ )和单个细胞; c: 生长 28 d 拟南芥第 5~8 片叶的中部分离得到的原生质体( $\times 400$ )和单个细胞示去壁不完全的原生质体。

多而清晰,且均匀的分布在原生质体中,中央液泡不清澈,说明周围被原生质包围,生理活性较高(图 2-b)。图 2-c 显示的是去壁不完全的叶绿体,其形态为不规则圆形,但其生理状态与图 2-b 相似。

#### 参考文献

Abel S, Theologis A (1994). Transient transformation of *Arabidopsis* leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression. *Plant J*, 5 (3): 421~427

- Davey MR, Anthony R, Powera JB (2005). Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnol Adv*, 23: 131~171
- Sheen J (2001). Signal transduction in maize and *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. *Plant Physiol*, 127: 1466~1475
- Walmsley AM, Arntzen CJ (2003). Plant cell factories and mucosal vaccines. *Curr Opin Biotechnol*, 14: 145~150
- Yoo SD, Cho YH, Sheen J (2007). *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature*, 2 (7): 1565~1572