

# 微型结球白菜原生质体游离与纯化研究

段英姿

(唐山师范学院 生命科学系 河北 唐山 063000)

**摘要:**以微型结球白菜无菌苗子叶为材料,探讨酶液浓度、酶解时间、酶液渗透压、离心转数对其原生质体分离效果的影响以及蔗糖浓度对纯化结果的影响。结果表明:以 1.0% Cellulase R-10, 0.08% Pectinase, 0.4 mol/L 甘露醇, 酶解 6 h, 第 1 次离心转速 1 200 r/min, 24% 蔗糖的条件组合最佳, 原生质体产量为  $2.10 \times 10^7$  个/g(FW), 活力达 91.20%。

**关键词:**微型结球白菜; 原生质体; 游离; 纯化

**中图分类号:**S 634.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)12-0144-03

除去细胞壁后获得的植物原生质体, 适合于进行各种细胞操作和遗传操作, 是理想的起始材料和受体, 可用来诱导融合, 引入细胞器、植物大分子、外源遗传物质和低等生物等<sup>[1]</sup>。而分离和纯化获得大量有活力的原生质体是这些研究得以顺利开展的前提。研究表明, 由于植物本身存在差异性, 不同种类, 甚至同种植物不同组织, 其原生质体分离所需条件都存在着很大差异。

微型结球白菜又称娃娃菜、嫩芽菜, 有别于传统的大白菜, 因外观小巧、色泽鲜嫩、风味独特而深受众多消费者喜爱, 近年来在宾馆饭店和超市上非常走俏。目前关于微型结球白菜的研究多停留在种植栽培上, 但对于原生质体方面的研究还未见报道。该试验以微型结球白菜的子叶为试材, 对影响原生质体产量和活力的因素进行研究, 以建立最佳的原生质体制备体系, 为利用体

细胞杂交和遗传转化等手段培育新品种奠定良好的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

生长 10~15 d 的微型结球白菜的无菌子叶(唐山玉田种植的品种 神狮金娃娃)。

### 1.2 酶解液的配制

将浓度 0.4%~1.3% 的纤维素酶(Cellulase R-10)和 0.04%~0.16% 的果胶酶(Pectinase)不同组合分别加入 CPW<sup>[2]</sup> (101 mg/L KNO<sub>3</sub>, 2 710 mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 246 mg/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1 480 mg/L CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O), 3 mmol/L MES 及 0.3~0.6 mol/L 甘露醇混合溶液中, pH 5.6。

### 1.3 原生质体的分离和纯化

取生长 10~15 d 无菌苗子叶 1 g, 切成 1 mm × 1 mm 的小块, 放入 10 mL 酶解液, 于 25 °C 条件下黑暗酶解。采用“过滤—离心—漂浮法”进行纯化<sup>[3]</sup>。酶解后经 200 目的镍丝网筛过滤, 滤液第 1 次离心 3 min, 倒去上清液, 加入 0.5 mL 悬浮液 (0.16 mol/L CaCl<sub>2</sub> ·

作者简介: 段英姿(1974), 女, 硕士, 讲师, 现主要从事植物育种与生物技术研究工作。E-mail: dyz03247@sohu.com。

基金项目: 唐山市科技攻关资助项目 (04360701B-10)。

收稿日期: 2010-03-29

## Establishment of Regeneration System and Callus Inducement in Seed of *Trifolium repens* Linn

JIN Zhong-min, SHA Wei, ZHANG Yan-fu, SUN Wei, LIU Wen-jing

(College of life Science and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006)

**Abstract:** The seed of the *Trifolium repens* was taken as the explants and studied the effects of different hormone compositions on callus induction, plantlet regeneration and plant roots. The results showed that MS+2,4-D 2.0 mg/L were better for callus induction, and MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L, the regeneration frequency was the highest, about 61.25%. The rooting rate reached 100% in 1/2MS+IBA 0.3 mg/L+NAA 0.3 mg/L. The best regeneration system had laid a sound foundation for the subsequent regeneration of transgenic research.

**Key words:** *Trifolium repens* Linn; callus tissue; regeneration system

2H<sub>2</sub>O, 0.1% MES, pH 5.6) 悬浮沉淀, 在离心管底部缓慢加入 2 mL 的蔗糖溶液, 以 1 000 r/min 进行第 2 次离心 5 min, 取含原生质体的中间层, 加 1 mL 原生质体培养基悬浮沉淀, 获得原生质体悬浮液备用。

1.4 原生质体产量和活力的测定

取少量上述原生质体悬浮液滴加在血球计数板上, 在显微镜下计数, 重复 3 次, 取平均值计算其产量。采用 0.1% 的中性红染色法对原生质体进行活力测定, 每个处理随机检查 20 个视野, 统计细胞不少于 100 个, 重复 3 次, 取平均值。

2 结果与分析

2.1 酶液浓度对原生质体提取的影响

用不同浓度的纤维素酶和果胶酶的混合酶液(含 0.4 mol/L 甘露醇)游离微型结球白菜子叶原生质体, 处理 6 h, 第 1 次离心转速 1 200 r/min, 由表 1 可知, 不同浓度的酶液组合对子叶原生质体产量及活力的影响明显不同。无论是纤维素酶还是果胶酶, 浓度一定, 原生质体的产量随着另一种酶浓度的升高呈上升趋势, 但到了一定浓度时, 产量开始下降; 而原生质体的活力随着 2 种酶浓度的升高而降低, 酶浓度组合越低, 活力越大, 酶浓度越大, 活力越小, 细胞出现皱缩现象, 碎片也相对增加。综合来看, 获得较高原生质体产量和活力的酶液组合为: 1.0% Cellulase R-10, 0.08% Pectinase。

表 1 不同浓度的酶组合对原生质体产量和活力的影响

处理	酶液组合		产量 /×10 <sup>7</sup> 个· g <sup>-1</sup> (FW)	活力 /%	细胞碎片
	Cellulase R 10 <sup>4</sup> %	Pectinase /%			
1	0.4	0.04	1.10±0.056	95.01±1.00	
2	0.4	0.08	1.45±0.050	91.00±0.26	+
3	0.4	0.12	1.86±0.062	91.20±0.10	++
4	0.4	0.16	1.77±0.046	80.00±0.10	++
5	0.7	0.04	1.85±0.053	91.90±0.75	++
6	0.7	0.08	1.96±0.016	90.70±0.21	++
7	0.7	0.12	2.03±0.044	89.70±0.46	++
8	0.7	0.16	1.87±0.053	88.20±0.46	++
9	1.0	0.04	1.58±0.056	92.00±0.56	++
10	1.0	0.08	2.01±0.053	91.50±0.26	++
11	1.0	0.12	2.05±0.046	85.60±0.26	+++
12	1.0	0.16	1.83±0.044	89.20±0.58	++
13	1.3	0.04	1.53±0.082	80.20±0.62	+++
14	1.3	0.08	1.85±0.083	74.00±0.66	++++
15	1.3	0.12	1.91±0.062	70.00±1.10	+++++
16	1.3	0.16	1.41±0.035	52.20±1.28	+++++

注+代表很少++代表多 下同。

2.2 渗透压对原生质体游离的影响

采用筛选出的最佳酶液 使用 0.3~0.6 mol/L 4 个梯度的甘露醇来调节渗透压, 酶解 6 h, 第 1 次离心转速 1 200 r/min。甘露醇作为渗透压稳定剂, 不同浓度对原生质体产量有较大影响。从图 1 可以看出, 随着甘露醇浓度的逐渐增加, 原生质体的产量和活力也随之增加,

当甘露醇浓度达到 0.5 mol/L 时, 原生质体的产量达最高, 从细胞碎片多少来看, 较低浓度的甘露醇, 有较多的碎片, 较高浓度的甘露醇, 除有较多碎片外, 原生质体不太规则, 0.5 mol/L 的甘露醇溶液中细胞碎片最少, 产量为 2.10×10<sup>7</sup> 个/g(FW), 活力达 91.20%。这可能是因为渗透压太高或太低, 导致原生质体浓缩干枯死亡或吸水涨破。因此甘露醇浓度为 0.5 mol/L 时, 制备微型结球白菜原生质体最适宜。

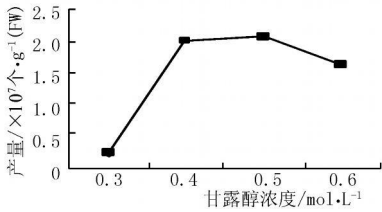


图 1 渗透压对原生质体产量的影响

2.3 酶解时间对原生质体提取的影响

采用筛选出的最佳酶液和甘露醇浓度, 分别进行了 2、4、6、8、10 h 的酶解处理, 第 1 次离心转速 1 200 r/min。由表 2 可知, 5 个处理中, 原生质体产量随着处理时间的延长而增加, 当超过最佳酶解时间时, 产量下降。从原生质体活力来看, 较短时间的酶解处理有利于原生质体的存活, 延长处理时间, 原生质体存活率显著下降。酶解时间的延长同时会增加原生质体破碎的几率, 试验中发现, 酶解过长时, 出现大量的细胞碎片。这也可能是导致原生质体产量和活力下降的原因之一。综合原生质体产量、活性及细胞碎片多少等多方面考虑, 酶解 6 h 后得到的原生质体形态完整, 质膜完好有活力的原生质体产量为 2.10×10<sup>7</sup> 个/g(FW)。

表 2 酶解时间对原生质体产量和活力影响

酶解时 间/h	产量/×10 <sup>7</sup> 个· g <sup>-1</sup> (FW)	差异显著性		活力/%	差异显著性		细胞 碎片
		0.05	0.01		0.05	0.01	
2	0.94±0.026	a	A	95.00±1.00	a	A	
4	1.82±0.044	b	B	91.00±0.26	b	B	+
6	2.10±0.051	c	C	91.20±0.10	c	C	+
8	2.12±0.044	c	C	80.00±0.10	d	D	++
10	2.02±0.058	d	D	71.90±0.75	e	E	+++

注: 小写字母表示 P<0.05 显著水平, 大写字母表示 P<0.01 极显著水平。

2.4 离心转速对子叶原生质体分离的影响

采用筛选出的最佳酶液、甘露醇浓度和酶解时间, 对第 1 次离心转速设了 1 100、1 200、1 300、1 400 r/min 4 个梯度, 由表 3 可知, 不同的离心转速对原生质体的产量和活力均有影响, 转速太小, 会有许多原生质体不能沉淀而影响原生质体的产量, 而离心转速太大会使细胞破碎, 降低原生质体的产量和活力, 产生较多的细胞碎片。综合原生质体的产量、活力和细胞碎片, 最佳离心转速为 1 200 r/min, 产量 2.10×10<sup>7</sup> 个/g(FW), 活力达 91.20%。

表 3 离心转数对原生质体产量和活力影响

离心转速 /r·min <sup>-1</sup>	产量/×10 <sup>7</sup> 个· g <sup>-1</sup> (FW)	差异显著性		活力/%	差异显著性		细胞 碎片
		0.05	0.01		0.05	0.01	
1 100	1.73±0.026	a	A	92.10±0.44	a	A	+
1 200	2.10±0.051	b	B	91.20±0.10	b	B	+
1 300	2.05±0.027	b	C	89.60±0.46	c	C	++
1 400	2.01±0.010	b	D	88.50±0.26	c	D	+++

2.5 蔗糖浓度对原生质体纯化的影响

通过比较 20%、24%、28%、32% 的蔗糖溶液对原生质体纯化的效果。由图 2 可知,24% 的蔗糖纯化效果最好,离心后得到的原生质体条带清晰,颜色深,纯化效果好,原生质体产量最高;28% 的蔗糖悬浮效果次之,离心后在溶液界面处形成 1 条颜色相对较深的绿色条带,底部几乎无沉淀,虽然原生质体产量较多,但杂质亦多;20% 的蔗糖悬浮,离心后得不到条带,原生质体随杂质一起沉淀到底部;32% 的蔗糖悬浮得到的原生质体条带不清晰,在整个上层的细胞悬浮液中都分布有原生质体。所以用漂浮法对神狮金娃菜原生质体进行纯化时,24% 的蔗糖纯化效果最好。

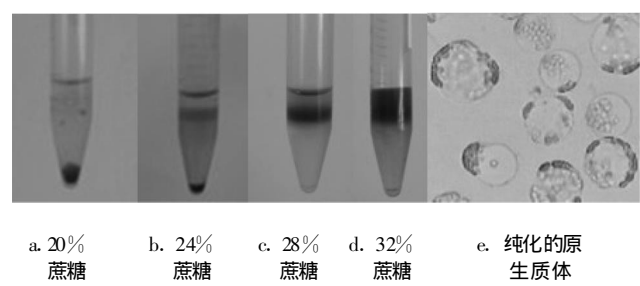


图 2 纯化时原生质体条带及原生质体的观察

3 讨论与结论

3.1 酶种类对原生质体分离的影响

酶是分离原生质体的关键因素,不同酶类组合效果也不同。该实验室曾用纤维素酶和离析酶组合分离出了菘蓝的原生质体<sup>[4]</sup>,而在提取微型结球白菜原生质体时,纤维素酶和果胶酶配合使用效果较好,在试验过程中还试用了离析酶,但效果不佳,没有分离出原生质体。

3.2 酶液浓度和酶解时间对原生质体分离的影响

原生质体分离时,适宜的酶液浓度和酶解时间因植物的种类不同有很大差异,即使同种植物,起始材料不同,其适宜的酶浓度和酶解时间也不同。因此,对于某个特定的植物材料,建立适宜的酶解浓度—酶解时间组合是获得高产优质原生质体的重要条件<sup>[5]</sup>。该试验在提取微型结球白菜原生质体时,若酶液浓度较大,酶解时间就要短,同时也会影响原生质体的活力,且原生质体破裂数增多。反之,同样会导致较早游离出的原生质体破裂。该试验最佳浓度组合为:1.0% Cellulase R-10, 0.08% Pectinase, 酶解 6 h 可获得大量活力较高的原生质体。

3.3 渗透压对原生质体分离的影响

不同植物甚至同一物种不同供体材料原生质体分离所要求的渗透压不尽相同,一般渗透压稳定剂有甘露醇、山梨醇、蔗糖、葡萄糖等<sup>[6]</sup>。因此,必须根据起始材料分别进行探索,建立一个稳定的渗透压体系,该试验中以甘露醇作为渗透压稳定剂,最适浓度为 0.5 mol/L 时,产量为 2.10×10<sup>7</sup> 个/g(FW),活力达 91.20%。

3.4 离心转速和蔗糖浓度对原生质体纯化的影响

该试验表明原生质体的纯化中蔗糖浓度和离心力,也是影响提取原生质体质量的重要因素,直接影响原生质体的稳定性,试验以 24% 的蔗糖,1 200 r/min 离心速度纯化的效果较好。

参考文献

[1] 陈发棣,赵宏波,房伟民,等.菊科植物原生质体研究进展[J].西北植物学报,2005,25(9):1913-1920.  
[2] 马占强,林良斌,董娜,等.紫罗兰下胚轴原生质体分离条件的研究[J].云南农业大学学报,2005,20(2):155-158.  
[3] 范春丽,陶澜,林呐,等.甘蓝型黄籽油菜原生质体的游离和纯化[J].中国农学通报,2005,21(2):43-45.  
[4] 张胜珍,客绍英,马作东,等.菘蓝叶肉原生质体游离与纯化研究[J].中草药,2009,32(5):664-666.  
[5] 陈泽雄,刘奕清.卡特兰叶片原生质体分离条件的研究[J].西南大学学报(自然科学版),2007,29(8):97-102.  
[6] 陈名红,熊立,陈学军.烟草叶肉原生质体分离与纯化研究[J].云南民族大学学报(自然科学版),2005,14(4):326-329.

Isolation and Purification of Proplast of the Micro-heading Chinese Cabbage

DUAN Ying-zi

(Department of Biology, Tangshan Teacher's College, Tangshan, Hebei 063000)

**Abstract:** Using the micro-heading Chinese cabbage cotyledon-free vaccine as material, the enzyme concentration, hydrolysis time, enzyme solution osmotic pressure, centrifugal rotation of its protoplast isolation as well as the effect of sucrose concentration on the purification of the outcome were explored. The results showed that: the best combination was the 1.0% Cellulase R-10, 0.08% Pectinase, 0.4 mol/L mannitol, hydrolysis 6 h, the first centrifugal speed of 1 200 r/min, and 24% sucrose, the production of protoplast was 2.10×10<sup>7</sup> Unit/g(FW), activity was 91.20%.

**Key words:** the micro-heading Chinese cabbage; protoplast; isolation; purification