

# 黄瓜幼苗子叶原生质体的分离纯化及融合条件优化研究

邓红梅, 马超, 王颖

(广东石油化工学院 化学与生命科学学院, 广东 茂名 525000)

**摘 要:**以黄瓜幼苗子叶为试材,采用正交实验,探讨了不同酶浓度、渗透剂浓度、酶解时间对原生质体产量和活性的影响,并研究了不同蔗糖浓度对原生质体纯化和不同 PEG 浓度对原生质体融合率的影响。结果表明:黄瓜幼苗子叶在含 1.0% 纤维素酶、0.8% 果胶酶和 0.3 mol/L 甘露醇的混合酶液中酶解 3 h,获得具有活力的原生质体最高,为  $7.2 \times 10^6$  个/g,原生质体活力为 83.72%。蔗糖浓度为 20% 时纯化效果最好,得到有活力原生质体  $7.1 \times 10^6$  个/g;PEG 浓度为 40% 时融合率最高,融合率为 32%。

**关键词:**黄瓜子叶;原生质体;分离;纯化;融合

**中图分类号:**S 642.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)11-0006-04

黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 是葫芦科的一种重要蔬菜作物,富含多种维生素和矿物质元素,在餐桌和美容方面有很大的地位,被誉为“厨房里的美容剂”。黄瓜原生质体分离与纯化的研究,是进行其体细胞杂交或基因操作的重要基础之一。原生质体由于除去了细胞壁,在某种程度上克服了不亲和障碍,便于进行原生质体融合(细胞杂交),而原生质体融合是从细胞水平上解决遗传物质交换的一条途径,为植物育种开辟了一条新的途径<sup>[1-2]</sup>。现以黄瓜子叶为试材,通过正交实验设计,研究了对原生质体分离和存活的影响因素,并对原生质体纯化及融合条件进行了优化。以期通过该项研究为黄瓜品种的改良提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为“津研”春秋露地王刺黄瓜种子。纤维素酶(>15 U/mg)、果胶酶(>50 000 U/g)由上海源聚生物科技有限公司生产;聚乙二醇 600、甘露醇为分析纯,由天津市光复精细化工研究所生产。试验仪器:AUY220 分析天平;13L-620S 电子天平(Shimadzu Corporation Japan);DK-S24 电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司);L-550 台式离心机(湘仪仪器有限公司);B203 显微镜(上海明兹精密仪器厂)。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 黄瓜幼苗的培育** 将黄瓜种子用 35℃ 温水浸泡 2~4 h,期间每隔 0.5 h 搅拌 1 次,后捞起种子均匀分布在纱布上,喷洒营养液,将种子放置在 28~30℃ 的温暖处保湿催芽。24 h 开始发芽后移植到干净湿润的沙石上种植,每天用 MS 营养液喷洒 1 次。以苗龄为 7 d 的健康黄瓜幼苗子叶为试验材料。

**1.2.2 黄瓜子叶原生质体的分离** 取黄瓜无菌幼苗的子叶,切成 1.0 mm 宽薄片后,以每份 1.0 g 分别放入 9 个锥形瓶中,各加入 15 mL 酶液后置于恒温水浴锅中,在 30℃ 黑暗条件下,酶解 3~7 h,然后用 300 目滤网过滤除去未完全消化的残渣。在 1 000 r/min 条件下离心 5 min,弃上清。加入 5.0 mL 13% CPW 洗液,相同条件下离心 5 min,弃上清,留 1.0 mL 洗液。以纤维素酶浓度、果胶酶浓度、甘露醇浓度和酶解时间为影响原生质体分离的因素,进行 4 因素 3 水平正交实验(表 1)。

表 1 正交实验因素及水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平 Levels	因素 Factors			
	A	B	C	D
	纤维素酶浓度 Cellulase concentration	果胶酶浓度 Pectinase concentration	甘露醇浓度 Mannitol concentrations	酶解时间 Enzymatic hydrolysis time
	/%	/%	/mol · L <sup>-1</sup>	/h
1	0.7	0.5	0.3	3
2	1.0	0.8	0.5	5
3	1.3	1.1	0.7	7

**1.2.3 原生质体的计数** 原生质体总量计数采用细胞计数法<sup>[3]</sup>:将稀释后的原生质体用吸管取 1 滴置于细胞计数板上,计算细胞计数板上四角的四大方格内的原生

**第一作者简介:**邓红梅(1965-),女,本科,副教授,现主要从事生物技术研究工作。E-mail:dhm005@126.com.

**收稿日期:**2013-03-06

质体数,根据计算公式算出原生质体的总量,对每个样品计数3次取平均值。用0.1%中性红溶液对原生质体染色,在显微镜下观察,被染成红色的就是具有活力的原生质体,记录原生质体总数和有活力的原生质体数,再根据原生质体活力计算公式算出原生质体活力。原生质体总数/g=四大方格内原生质体数/ $4 \times 10^4 \times$ 稀释倍数;原生质体活力/%=具活力原生质体产量/原生质体总量 $\times 100\%$ 。

1.2.4 黄瓜子叶原生质体的纯化 将上述经过过滤-离心的原生质体再采用界面法<sup>[4]</sup>进一步纯化:用滴管将分离后的原生质体分别轻轻铺于16%、18%、20%、22%、24%浓度的蔗糖溶液上,在1 000 r/min条件下离心5 min,由于密度梯度离心的作用,生活力强、状态好的原生质体分布在蔗糖溶液与13% CPW之间,破碎的细胞残渣沉入管底。重复上述步骤2次。

1.2.5 黄瓜子叶原生质体的融合 采用PEG-高pH-高 $\text{Ca}^{2+}$ 诱导融合法<sup>[4]</sup>:将纯化后的原生质体2.0 mL移到6 cm的培养皿中,用滴管缓慢滴加2.0 mL PEG融合液(pH 5.6),边加边轻微摇动,使原生质体悬浮液充分混合,然后静止15 min。缓慢加入pH 10,2.0 mL 0.08 mol/L  $\text{CaCl}_2$ 溶液,将混合物培养10 min。加入5.0 mL 13% CPW洗液,在750 r/min下离心5 min,去上

清液,将沉淀物用CPW洗液重复洗涤2次后进行培养。

## 2 结果与分析

### 2.1 原生质体分离的正交实验结果

由表2可以看出,原生质体总量各水平平均数的极差 $R_C > R_A > R_B > R_D$ ,黄瓜幼苗子叶原生质体分离总量的最优组合为 $A_2 B_1 C_2 D_1$ 。因为具活力原生质体产量各水平平均数的极差 $R_C' > R_A' > R_D' > R_B'$ ,所以黄瓜幼苗子叶原生质体分离提取高活力的最优组合为 $A_2 B_2 C_1 D_1$ 。由此可知,影响原生质体总量和活力的主要因素是甘露醇浓度,当甘露醇浓度较低时细胞膜容易破裂,而造成原生质体的数量偏低;当甘露醇浓度较高时,原生质体则易失水而收缩影响正常的代谢活动,其生理活性就会降低<sup>[5]</sup>。但分离得到原生质体的总量高时,原生质体活力不是最高。

由表3可知,除果胶酶浓度外,甘露醇浓度、酶解时间和纤维素酶浓度对产生有活力原生质体具有显著影响。影响强弱顺序为:甘露醇浓度>纤维素酶浓度>酶解时间>果胶酶浓度。最优组合为 $A_2 B_2 C_1 D_1$ ,也就是纤维素酶的浓度为1.0%,果胶酶浓度为0.8%,甘露醇浓度为0.3 mol/L,酶解时间为3 h时,可以获得有活力原生质体的数量最高。

表2 黄瓜原生质体分离正交实验结果与分析

Table 2 The results of orthogonal experiment and analysis of cucumber protoplast isolation

试验号 No.	因素 Factors				原生质体总量 Protoplast volume / $10^6$ 个 $\cdot \text{g}^{-1}$ FW	具活力原生质体产量 Vibrant protoplast yield / $10^6$ 个 $\cdot \text{g}^{-1}$ FW	原生质体活力 Protoplast vitality /%
	A	B	C	D			
	纤维素酶浓度 Cellulase concentration /%	果胶酶浓度 Pectinase concentration /%	甘露醇浓度 Mannitol concentrations / $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	酶解时间 Enzymatic hydrolysis time/h			
1	1(0.7)	1(0.5)	1(0.3)	1(3)	8.0	5.88	73.50
2	1(0.7)	2(0.8)	2(0.5)	2(5)	7.7	5.59	72.60
3	1(0.7)	3(1.1)	3(0.7)	3(7)	6.3	3.05	48.41
4	2(1.0)	1(0.5)	2(0.5)	3(7)	8.9	5.67	63.71
5	2(1.0)	2(0.8)	3(0.7)	1(3)	6.9	4.93	71.45
6	2(1.0)	3(1.1)	1(0.3)	2(5)	8.2	6.91	84.27
7	3(1.3)	1(0.5)	3(0.7)	2(5)	6.8	3.54	52.06
8	3(1.3)	2(0.8)	1(0.3)	3(7)	7.5	5.24	69.87
9	3(1.3)	3(1.1)	2(0.5)	1(3)	7.8	5.69	72.95
$k_1$	7.3	7.9	8.0	7.6			
$k_2$	8.0	7.4	8.0	7.6			
$k_3$	7.4	7.4	6.7	7.6			
$R$	0.7	0.5	1.3	0			
$k_1'$	4.84	5.03	6.01	5.50			
$k_2'$	5.84	5.25	5.65	5.35			
$k_3'$	4.82	5.22	3.84	4.65			
$R'$	1.02	0.22	2.17	0.85			

注: $k$ 表示原生质体总量各水平平均数; $R$ 表示原生质体总量各水平平均数的极差。 $k'$ 表示具活力原生质体产量各水平平均数; $R'$ 表示具活力原生质体产量各水平平均数的极差。

表 3 方差分析

源	III 型平方和	df	均方	F	Sig.
纤维素酶浓度 Cellulase concentration	2.601	2	1.301	66.368	0.003
果胶酶浓度 Pectinase concentration	0.134	2	0.067	3.414	0.169
甘露醇浓度 Mannitol concentrations	9.009	2	4.504	229.833	0.001
酶解时间 Enzymatic hydrolysis time	1.251	2	0.626	31.921	0.010
误差 Error	0.059	3	0.020		
总计 Total	336.053	12			
校正的总计 Correction of the total	12.612	11			

2.2 原生质体分离的最优条件验证

由于数据分析出的处理组合不在正交实验中,因此还需要以分析出来的最优组合再进行一次试验,以确定整理分析出来的处理组合是否为最优。

以分析得到的最优组合进行试验得到原生质体的总量为  $8.6 \times 10^6$  个/g,有活力的原生质体(图 2)数量为  $7.2 \times 10^6$  个/g,原生质体活力为 83.72%。所以可以得出, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>1</sub> 组合为提取黄瓜幼苗子叶原生质体的最优组合。

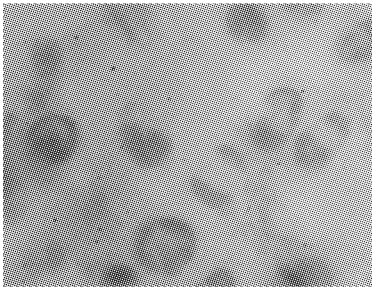


图 1 未染色的原生质体

Fig.1 Not dyed protoplasts

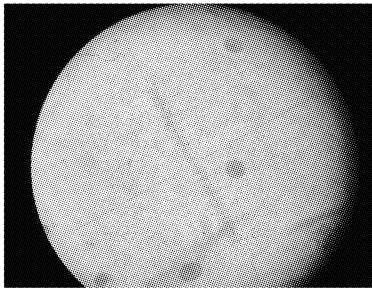


图 2 有活力的原生质体

Fig.2 Dynamic protoplasts

2.3 原生质体的纯化结果

由表 4 和图 3 可知,用 20% 的蔗糖溶液纯化的效果最好,离心后得到的原生质体条带清晰,颜色深

(图 3-③),原生质体产量最高;18% 浓度的蔗糖溶液纯化的效果次之,离心后在溶液界面处形成 1 条颜色稍浅的绿色条带(图 3-②),颜色带比 20% 浓度下的较浅、带宽不够集中;16% 浓度蔗糖溶液纯化后,离心得到的条带不明显,下部杂质沉淀最少(图 3-①),22% 蔗糖浓度溶液纯化离心后,得到原生质体条带很浅,细胞分散较宽(图 3-④);24% 蔗糖浓度溶液纯化离心后,得到的溶液浑浊,没有明显的颜色条带(图 3-⑤),且得到的原生质体数量少。所以用界面法对黄瓜幼苗子叶原生质体纯化时,20% 的蔗糖悬浮效果是最好的。

表 4 不同蔗糖浓度对原生质体纯化的影响

Effects of different concentrations of sucrose on purification of protoplasts		
蔗糖浓度 Sucrose concentration/ %	原生质体总量 Protoplast volume/个	具活力原生质体数量 Vibrant protoplast yield/个
16	$5.3 \times 10^6$	$4.9 \times 10^6$
18	$6.5 \times 10^6$	$6.2 \times 10^6$
20	$7.3 \times 10^6$	$7.1 \times 10^6$
22	$5.2 \times 10^6$	$5.0 \times 10^6$
24	$3.6 \times 10^6$	$3.3 \times 10^6$

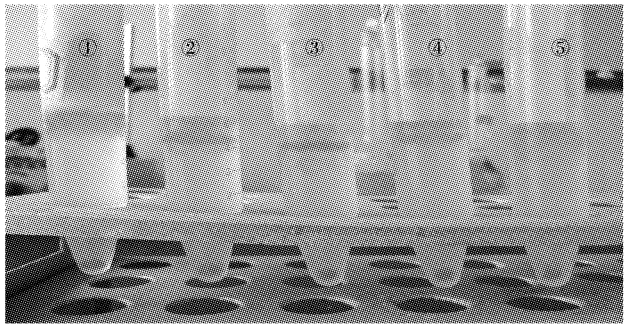


图 3 不同蔗糖浓度纯化得到原生质体

注:蔗糖浓度为①16%、②18%、③20%、④22%、⑤24%。

Fig.3 Different sucrose density purification by protoplast

Note: Sucrose concentrations are ①16%, ②18%, ③20%, ④22%, ⑤24% respectively.

2.4 原生质体的融合结果

将已经纯化好具有活力的原生质体进行 PEG 融合后,在显微镜下观察融合结果,计算原生质体的融合率。由表 5 可知,PEG 浓度在 40% 时黄瓜幼苗子叶原生质体的融合率最高,PEG 浓度为 50% 次之,PEG 浓度为 30% 没有 50% 浓度效果好,PEG 浓度为 60% 融合率最低。可能原因是 PEG 的浓度为 30% 时太低,容易破坏原生质体的贴壁状态,引起原生质体大量漂浮,不利于融合操作;PEG 浓度为 50% 时,浓度偏高,原生质体有少量破损;PEG 浓度为 60% 时,浓度太高,原生质体破损严重,操作时难以控制,重复性差;以 PEG 浓度为 40% 时处理效果最好(图 4),原生质体融合效率最高。



表 5 不同 PEG 浓度对原生质体融合效率的影响

Table 5 Effect of different PEG concentrations on the protoplast fusion rate

PEG 浓度 Concentration of PEG/ %	原生质体融合率 Protoplast fusion rate/ %
30	17
40	32
50	24
60	8



图 4 原生质体融合

Fig. 4 Protoplast fusion

### 3 结论

起始材料及其生理状态对原生质体的制备及其活力有很大的影响<sup>[6-7]</sup>。该试验采用苗龄 7 d 的健康黄瓜幼苗子叶为试验材料,能够保证得到具有较好活力的细胞,进而分离出活力较高的原生质体,可为黄瓜原生质

体的融合甚至培养再生打下基础。

该试验结果表明,黄瓜幼苗子叶原生质体分离的最佳条件为:纤维素酶浓度 1.0%,果胶酶浓度 0.8%,甘露醇浓度 0.3 mol/L,酶解时间 3 h;对黄瓜幼苗子叶原生质体分离影响因素的主次关系为:甘露醇浓度>纤维素酶浓度>酶解时间>果胶酶浓度;以最优组合进行试验得到原生质体的总量为  $8.6 \times 10^6$  个/g,有活力的原生质体数量为  $7.2 \times 10^6$  个/g,原生质体活力为 83.72%。用界法纯化黄瓜幼苗子叶原生质体时,使用 20%蔗糖溶液为纯化剂纯化效果最好,得到具活力原生质体数量为  $7.1 \times 10^6$  个/g;用 PEG 诱导融合法诱导黄瓜幼苗子叶原生质体融合时,PEG 的浓度为 40%时诱导融合率最高,融合率为 32%。

### 参考文献

- [1] 高东迎,黄雪清,孙立华.水稻体细胞杂交研究进展[J].生物工程进展,2001,21(3):38-42.
- [2] 夏光敏,陈惠民,王槐.小麦与高冰草原生质体融合及再生能力恢复[J].山东大学学报,1995,30(3):325-330.
- [3] 王金发,何炎明.细胞生物学实验教程[M].北京:科学出版社,2004.
- [4] 杨慎淑.细胞工程[M].北京:科学出版社,2009.
- [5] 屈红恩,王烈峰,刘仁林,等.不同酶解条件对金边瑞香幼叶原生质体分离的影响[J].福建林业科技,2009,36(4):140-152.
- [6] 张晓可,於丙军.大豆幼苗根和叶片原生质的分离与纯化[J].大豆科学,2009,28(4):697-702.
- [7] 乔永旭,张永平,王桂兰,等.蝴蝶兰原生质体提取方法的优化[J].植物生理学通讯,2008,44(6):1177-1180.

## Study on the Optimal of Separation, Purification and Fusion Conditions of Cucumber Seedlings Cotyledons Protoplast

DENG Hong-mei, MA Chao, WANG Ying

(College of Chemistry and Life Sciences, Guangdong University of Petrochemical Industry, Maoming, Guangdong 525000)

**Abstract:** Taking cucumber seedlings cotyledons as materials, the effect of different enzyme concentration, osmotic agent concentration, enzyme solution to time on protoplast yield and activity with orthogonal experiment were studied; and different concentration of sucrose protoplast purification and different PEG concentration on protoplast fusion rate were discussed. The results showed that cucumber seedlings in cotyledons containing 1.0% cellulose enzyme, 0.8% pectinase and 0.3 mol/L of mannitol in liquid enzymes mix enzyme solution 3 hours, would obtain the highest vibrant protoplast, about  $7.2 \times 10^6$  pieces/g, protoplast vigor for 83.72%. When sucrose density was 20% the purified effect was the best, it could get vigorous protoplast yield  $7.1 \times 10^6$  pieces/g; PEG concentration of 40% had the highest rate in the fusion, fusion rate of 32%.

**Key words:** cucumber cotyledons; protoplast; separation; purification; fusion