

莴苣原生质体的分离方法

王 卉^{1,2}, 宁慧霞¹, 刘 敏¹, 郝秀英³, 努尔波拉提¹, 王晓军¹

(1. 中国科学院新疆理化技术研究所, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039;

3. 新疆农业科学院微生物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830091)

摘 要:以莴苣无菌苗的幼叶为试材,研究了不同的分离材料、质壁分离时间、苗龄、酶液组合、酶解时间及酶液渗透压等对原生质体分离效果的影响。结果表明:幼叶在含有13%甘露醇的CPW溶液里质壁分离2 h,获得的原生质体产量存活率均高于其它质壁分离时间;苗龄为20 d的幼叶分离得到的原生质体质量高,原生质体呈圆形、内含物多、活力强;酶液组合为1.0%纤维素酶+0.2%离析酶,25℃黑暗条件下酶解12 h可获得大量有较高活力的原生质体;酶解液中添加浓度为9%的甘露醇较适合原生质体分离。

关键词:莴苣;幼叶;原生质体;分离

中图分类号:S 636.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)11-0109-04

莴苣(*Lactuca sativa* L.)为菊科莴苣属1 a或者2 a生草本植物。广泛栽植于世界各地,已成为深受人们喜爱的蔬菜之一。莴苣中碳水化合物含量低,而烟酸(胰岛素激活剂)含量丰富,经常食用对糖尿病患者有益;同时由于富含铁元素,故能防治缺铁性贫血;又因莴苣中钾离子含量为钠盐的27倍,因此具有利尿、降血压、预防

心律紊乱的作用^[1];此外莴苣还有增进食欲、刺激消化液分泌、促进胃肠蠕动等功能。近年来的研究发现,莴苣中的一种芳香烃羟化脂,能够分解食物中的致癌物质亚硝胺,对于肝癌、胃癌癌细胞的形成有一定的预防作用,也可减轻癌症患者放疗或化疗的反应^[1]。

目前国内对莴苣的研究大多数集中在栽培^[2]、品种筛选^[3]、莴苣生长和品质等方面^[4-6]。莴苣新品种选育工作正处于起步阶段,具有自主知识产权的品种和类型很有限,我国现有栽培品种主要靠引进国外已有的品种,生产上栽培的同一类型间莴苣的亲缘关系较近,遗传背景狭窄^[7],因此需要多角度、多方法开展种质资源的创新工作,开发出品质优良的莴苣新品种,用以满足国内莴苣生产上的需要。转基因莴苣已有报道^[8-9],因此,运用原生质体技术进行莴苣种质资源创新也是一个很好的途径。

第一作者简介:王卉(1986-),女,在读硕士,现主要从事植物生理生化等研究工作。E-mail:whui0221@yahoo.cn。

责任作者:王晓军(1962-),男,硕士,研究员,现主要从事植物资源利用等研究工作。E-mail:wangxj@ms.xjb.ac.cn。

基金项目:中科院“西部之光”人才培养计划“西部博士”资助项目(XBBS200913);国家自然科学基金青年基金资助项目(81102737);中科院“西部行动计划高新技术”资助项目(KGCXZ-YW-509)。

收稿日期:2012-02-27

Optimization of *Agrobacterium*-Mediated Transformation of HBsAg Gene into Cherry Tomato

ZHANG Yan-ting¹, GUO Bin¹, GUAN Zheng-jun², DAI Jia-kun^{3,4}, WEI Ya-hui¹

(1. Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, College of Life Science, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069; 2. Department of Life Science, Yuncheng University, Yuncheng, Shanxi 044000; 3. Enzyme Engineering Institute of Shaanxi Academy of Sciences, Xi'an, Shaanxi 710600; 4. Enzyme Engineering Technology Center of Shaanxi, Xi'an, Shaanxi 710600)

Abstract: Cherry tomatoes were used as the experiment materials, and the high frequency regeneration system was established. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) gene was used to transform cherry tomato explant mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, and the explant was cultured to optimize the transformation system. The results showed that, the highest transformation efficiency was obtained when 11 d old cotyledon explants were preconditioned on the culture medium of MS + 6-BA 3.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L for 2 days, infected with *Agrobacterium tumefaciens* ($OD_{600}=0.6$) for 15 min.

Key words: HBsAg gene; cherry tomato; optimization

植物原生质体是细胞杂交、遗传转化的良好受体^[10]。通过原生质体培养能得到由单细胞衍生出来的体细胞克隆,这是植物筛选高产、稳定细胞系的良好途径。因为莴苣的原生质体含有其个体的全部遗传信息,且具有结构简单、发育同步性好、群体数量大、DNA 分子易于进入细胞,易获得纯和性转化子的特点^[11],是遗传转化研究过程中的理想受体,因此通过对莴苣原生质体的研究可以为获得转基因莴苣提供良好的基础。该试验以莴苣的无菌苗为试材,并对其原生质体的分离条件进行了探索,旨在为莴苣的原生质体培养,遗传转化以及体细胞融合育种提供必要的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以莴苣属茎用莴苣中的“特大白尖叶”品种的无菌苗为试材。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的获得 取莴苣种子,用自来水冲洗60 min,置于超净工作台中用75%酒精表面消毒40 s,0.1%升汞灭菌5 min,无菌水冲洗4~6次,置于不含激素的1/2MS固体培养基上,无菌种子在温度(20±1)℃,光照3 000 lx,时间16 h/d,培养5~10 d后长出幼苗。

1.2.2 质壁分离液和酶解液的制备 质壁分离液为CPW溶液附加13%的甘露醇,pH 5.8。CPW溶液成分^[12]: KH_2PO_4 27.2 mg/L、 KNO_3 101 mg/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 246 mg/L、 KI 0.16 mg/L、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mg/L、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 480 mg/L。酶解液为CPW溶液附加9%的甘露醇、1%纤维素酶(Cellulase Onzuka R-10)、0.2%离析酶(Macerzyme)和5 mmol/L MES。并在混合酶液中加入10 mg/L庆大霉素、10 mg/L四环素和400 mg/L氨基青霉素,pH 5.8^[13]。酶液先经过0.45 μm混合纤维素微孔滤膜粗滤,再在无菌环境下经0.22 μm混合纤维素微孔滤膜过滤除菌及杂质。

1.2.3 原生质体的分离及纯化 取幼嫩叶片1 g,切成条状,然后放入20 mL质壁分离液的三角瓶中,置于25℃恒温摇床上以54 r/min黑暗条件下振荡质壁分离2 h,接着放入10 mL混合酶液中,在与上述同样条件下振荡酶解。酶解结束后,连同原生质体及酶液用300目的细胞筛网滤至小烧杯中,用移液枪吸取混合液放入10 mL离心管中以500 r/min离心5 min,弃去上清液,缓慢加入CPW+13%甘露醇的原生质体清洗液轻轻混匀,500 r/min离心5 min,去上清,清洗2次,留下2 mL原生质体沉淀,取另一只10 mL的离心管,加入8 mL CPW+21%的蔗糖溶液,在蔗糖液面上加入上述2 mL原生质体沉淀液,1 000 r/min离心5 min,离心结束后两液面间出现一条绿色原生质体带,即为纯化后的莴苣原生质体。

1.2.4 原生质体观察和图像采集 用 OLYMPUS

BX51 显微镜进行原生质体观察,CCD MetSystems COOLCube1 进行图像采集。

1.2.5 原生质密度测定 采用血球计数板上计数法测定。用移液枪吸取8 μL原生质体悬浮液滴加在0.1 mm血球计数板上,加盖18 mm×18 mm的盖玻片,当原生质体充满计数室后,在显微镜下计数,依次逐个计数中央大方格里的原生质体数,3次重复,求平均数,然后根据下式求出1 mL中的原生质体数:1 mL悬浮液中的原生质体数=1个大方格悬浮液(0.1 mm³,即0.1 μL)中的原生质体数×10×1 000,单位为:个/gFW^[14]。

1.2.6 原生质体活性测定 试验采用0.1%的酚藏花红染料对原生质体染色,从酶解液中取原生质体20 μL,加0.1%的酚藏花红染色液,混匀,静置5 min,放到血球计数板上,在显微镜下检测原生质体活性,细胞液泡被染成红色的是失去活性的原生质体。因此原生质体活性=(未被染成红色的原生质体数/观察的原生质体总数×100%)^[15]。

1.3 数据分析

应用 Microsoft Excel 和 SPSS 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 分离材料对分离结果的影响

对莴苣无菌叶片和下胚轴进行原生质体分离后,比较其产量和细胞碎片。由表1可知,叶片在产量上远远高于下胚轴,虽然碎片较下胚轴相比多一些,但是总体来看,叶片是莴苣原生质体分离的较适宜材料。

表1 分离材料对原生质体分离的影响

Table 1 Effects of material resources on the isolation of protoplast

分离材料 Separate material	原生质体产量 Protoplast yield	细胞碎片 Cell fragment
叶片 Leaf	+++	++
下胚轴 Hypocotyls	+	+

2.2 预处理对原生质体分离的影响

该试验对莴苣无菌苗叶片进行了不同质壁分离时间的处理。不同处理中,随着质壁分离时间的增加,莴苣原生质体的产量先是升高随后不断降低,在2 h时原

表2 质壁分离时间对叶片原生质体分离的影响

Table 2 Effects of plasmolysis time on the isolation of leaf protoplast

时间 Time /h	产量 Yield /×10 ⁵ 个·g ⁻¹	细胞碎片 Cell fragment
0	2.48±0.19c	+
1	3.57±0.21b	+
2	5.04±0.23a	+
3	3.43±0.22b	++
4	3.20±0.19b	+++

注:采用邓肯氏多重比较(P=0.05),数值后不同字母表示差异显著,相同字母表示差异不显著。其中“+”表示很少,“++”较多,“+++”很多。

Note: Using Duncan's multiple comparisons (P = 0.05), Values after the different letters after values indicate significant differences, the same letter indicate no significant difference. '+ ' means very little, '++' refers to more, '+++ ' refers to the many.

原生质体产量最高;质壁分离时间小于 2 h 时原生质体碎片较少,效果好,延长后原生质体碎片增多。从原生质体的产量和活力两方面考虑,莴苣叶片原生质体分离的最佳质壁分离时间为 2 h。

2.3 苗龄对原生质体分离的影响

不同植物及不同时间的器官和组织,其生理状态也不相同。对于多数植物来说,苗龄与原生质体的产量和活力有很大的关系。分别取莴苣 15、20、25、30 d 的苗龄进行原生质体分离,结果发现,莴苣游离原生质体的产量峰值出现在 20 d 苗龄(图 1),为 4.847×10^5 个/g,该苗龄分离得到的原生质体质量高,原生质体呈圆形、内含物多、活力强。苗龄超过 25 d 以后,原生质体的产量迅速下降,而苗龄较小时,产量也很低,所以取苗龄在 20 d 左右的莴苣无菌苗叶片游离原生质体效果最佳。

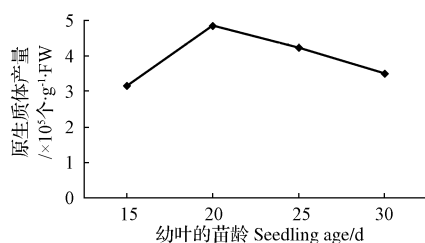


图 1 不同苗龄对原生质体分离的影响

Fig. 1 Effects of seedling age on the isolation of protoplast

2.4 原生质体分离的正交实验

选用 $L_9(3^4)$ 正交实验设计,研究甘露醇浓度、离析酶浓度、纤维素酶 R-10 浓度和酶解时间 4 个因素对莴苣原生质体分离效果的影响,表 3 为正交因素水平表,表 4 是莴苣原生质体分离正交实验结果的直观分析。

表 3 因素水平表

Table 3 Factor and level table

水平 Level	因素 Factor			
	A 纤维素酶浓度 Concentration of cellulose enzyme/%	B 离析酶浓度 Concentration of macerozyme/%	C 甘露醇浓度 Concentration of minstra/%	D 酶解时间 Enzymolysis time/h
1	1.0	0.2	9	12
2	1.5	0.5	11	14
3	2.0	0.8	13	16

由表 4 可看出, $R_B > R_D > R_A > R_C$, 在试验中离析酶浓度对莴苣原生质体产量和活力的影响最大,酶解时间次之,纤维素酶浓度的影响小于甘露醇浓度,甘露醇浓度影响最小。比较各试验因素的总和或平均数可知,莴苣原生质体分离的最优组合为 $A_1 B_1 C_1 D_1$, 即浓度为 1% 的纤维素酶,浓度为 0.2% 的离析酶,甘露醇浓度为 9%,酶解时间为 12 h 时,获得的有活力原生质体的产量最高(图 2~4)。

表 4 莴苣原生质体分离正交实验结果的直观分析

Table 4 Visual analysis of orthogonal test results on the isolation of protoplast

处理 Treatment	因素 Factor				原生质体产量 Protoplast yield / $\times 10^5$ 个 \cdot g ⁻¹ FW	原生质体活力 Protoplast viability /%	有活力的原生 质体产量 Viable protoplast yield / $\times 10^5$ 个 \cdot g ⁻¹ FW
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	4.920	93.42	4.597
2	1	2	2	2	0.567	85.93	0.487
3	1	3	3	3	2.720	84.52	2.299
4	2	1	2	3	2.680	83.34	2.234
5	2	2	3	1	1.287	96.97	1.248
6	2	3	1	2	0.830	94.47	0.784
7	3	1	3	2	1.487	93.34	1.388
8	3	2	1	3	1.170	81.02	0.948
9	3	3	2	1	2.147	89.54	1.922
T_1	7.383	8.219	6.329	7.767			
T_2	4.266	2.683	4.643	2.659			
T_3	4.258	5.005	4.935	5.481			
X_1	2.461	2.740	2.110	2.589			
X_2	1.422	0.894	1.548	0.886			
X_3	1.419	1.668	1.645	1.827			
R	1.042	1.846	0.562	1.703			

注: T 代表每个因素的水平之和; X 代表每个因素各水平的平均值; R 表示每个因素各水平平均数极差。

Note: T represents the sum of each factor level; X represents the average of each factor level; R represents the average range of each factor level.

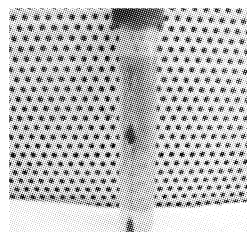


图 2 蔗糖纯化后绿色原生质体带
Fig. 2 Purified green protoplast zone by sucrose

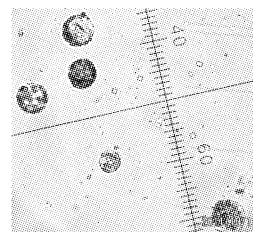


图 3 显微镜下纯化后的莴苣原生质体
Fig. 3 Purified protoplast of *Lactuca sativa* L. under microscope

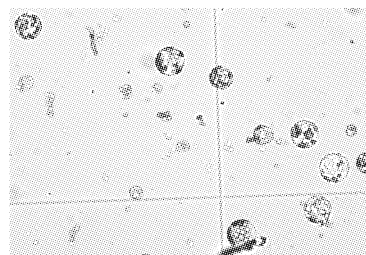


图 4 CCD 图像采集下的纯化后的莴苣原生质体
Fig. 4 Purified protoplast of *Lactuca sativa* L. under CCD image acquisition

3 讨论与结论

该研究是采用无菌莴苣试管苗的幼嫩叶片为供试材料来分离原生质体,无菌苗生长整齐,生理状态比较一致,成苗期短,经过继代培养,可保持植物的幼态特

征,同时无菌苗不用进行灭菌处理,因此能够在最大限度上保持原生质体的原有活力。该试验用 15、20、25、30 d 的叶龄均进行原生质体分离,发现 20 d 苗龄的莴苣幼叶是获得高产量叶肉原生质体的最佳材料。试验中还用到莴苣不同苗龄期的其它组织,如莴苣下胚轴,但原生质体分离效果均不如用 20 d 的幼叶。

Ishii S^[16]认为原生质体融合是由于胞间连丝外露,而高渗预处理使原生质体收缩,切断胞间连丝。把材料切成带状在含一定渗透压的处理液中对材料预处理能够增加原生质体活力和产量。该试验把幼叶切成 1~2 mm 的细条,浸入 CPW+13%甘露醇溶液中进行质壁分离预处理,原生质体的数量和存活率随预处理时间延长而增加,当预处理达 2 h 时获得大量原生质体,随后开始下降,因此质壁分离预处理 2 h 最佳。

分离植物原生质体时,酶解是关键,而酶液中纤维素酶与离析酶的浓度和比例对原生质体的解离效果有很大影响,该试验中离析酶浓度起到关键作用,但其浓度过大时会对细胞质膜造成影响,导致细胞破裂,原生质体的活力就明显下降;酶解时间较长,同样会导致较早分离出的原生质体破裂,酶解时间缩短,会导致酶解不充分,原生质体的产量降低。而在酶液中适当浓度的甘露醇稳渗剂能防止脱壁的原生质体发生破裂,起到保护作用^[17]。该试验中,莴苣的幼叶用 1.0%纤维素酶+0.2%离析酶,25℃黑暗条件下酶解 12 h 可获得数量最多高活力的原生质体,酶解液中添加浓度为 9%的甘露醇较适合原生质体分离。

参考文献

- [1] 钱丽珠.第二十六讲-莴苣[J].上海蔬菜,2001(2):42.
- [2] 谢远霖.早秋莴苣生物学特性及丰产栽培技术[J].福建农业科技,

2006(1):24.

- [3] 朱凤娟,邱正明,聂启军,等.高山莴苣品种筛选试验[J].长江蔬菜,2010(24):19-22.
- [4] 李会合,田秀英.不同品种莴笋的品质比较研究[J].北方园艺,2009(9):17-19.
- [5] 许莉,尉辉,齐连东,等.不同光质对叶用莴苣生长和品质的影响[J].中国果菜,2010(4):19-22.
- [6] 范双喜.不同营养液浓度对莴苣生长特性的影响[J].园艺学报,2003,30(2):152-156.
- [7] 付亚丽,牛瑞生.生菜生物技术育种研究进展[J].江西农业学报,2007(10):94-95.
- [8] Vanjildorj E, Bae T W, Riu K Z, et al. Overexpression of Arabidopsis ABF3 gene enhances tolerance to drought and cold in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2005(83):41-50.
- [9] Dias B B A, Cunha W G, Morais L S, et al. Expression of an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina* sp. in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Plant Pathology, 2006,55:187-193.
- [10] 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.
- [11] 于晓玲,李春强,彭明.植物原生质体技术及其应用[J].中国农学通报,2009,25(8):22-26.
- [12] 李俊明.植物组织培养教程[M].北京:北京农业大学出版社,1991.
- [13] Brown C, Lucas J A, Power J B. Plant regeneration from protoplasts of a wild lettuce species (*Lactuca saligna* L.) [J]. Plant Cell Reports, 1987(6):180-182.
- [14] 朱至清.植物细胞工程[M].北京:化学工业出版社,2003:25.
- [15] 袁永娟,王晓军,郝秀英,等.新疆雪莲胚性愈伤的诱导及原生质体分离[J].北方园艺,2010(8):125-128.
- [16] Ishii S. Factors influencing protoplast viability of suspension cultured rice cells during isolation process [J]. Plant Physiol, 1988(8):26-29.
- [17] 陈泽雄,刘奕清,丁茂倩.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):97-101.

(该文作者还有吴金平,工作单位同第一作者。)

Study on the Method of Isolation Protoplasts of *Lactuca sativa* L.

WANG Hui^{1,2}, NING Hui-xia¹, LIU Min¹, HAO Xiu-ying³, Nurbolat¹, WANG Xiao-jun¹, WU Jin-ping^{1,2}

(1. Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi, Xinjiang 830011; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039; 3. Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Science, Urumqi, Xinjiang 830091)

Abstract: Chosen young leaves of asepsis seedling of *Lactuca sativa* L. as test material, the effect of material resources, plasmolysis time, seedling age, enzyme combination, enzymolysis time and ostimum pressure on protoplast isolation were studied. The results showed that when young leaves were plasmolysed for 2 h in CPW solution containing 13% mannitol, the yield of protoplast and its survival rate were higher than those of other plasmolysis time. 20 d of the young leaves were isolated protoplasts high quality, protoplasm takes the shape of circular, many inclusion, strong vitality; The enzyme concent ration was 1.0% cellulase+0.2% macerozyme, isolate ezyme. A large amount of high-active protoplast could be obtained by enzymolysis for 12 h at 25℃ under dark conditions. The minstra of 9% were suitable for protoplast dissociation.

Key words: *Lactuca sativa* L.; young leaves; protoplast; isolation