

周一鹏,何 丽,罗 丽,等. 不同酶液组合对桧柑原生质体分离的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(21):45-47.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.21.010

不同酶液组合对桧柑原生质体分离的影响

周一鹏,何 丽,罗 丽,许晓玲,徐小勇

(扬州大学园艺与植物保护学院,江苏扬州 225009)

摘要:以桧柑愈伤组织和试管苗叶片为试验材料,采用纤维素酶 R-10 + 离析酶 R-10 的酶液组合 I 和纤维素酶 Worthington + 离析酶 R-10 的酶液组合 II 进行原生质体的分离,比较这 2 种酶液组合对原生质体的酶解时间、产量及活性氧含量的影响。结果表明,酶液组合 II 所需的酶解时间均短于酶液组合 I;酶液组合 II 所获得的原生质体产量均高于酶液组合 I,在愈伤组织中前者产量是后者的 9.09 倍,在叶片中前者产量是后者的 5.29 倍,差异显著;酶液组合 I 的愈伤组织原生质体的活性氧水平是酶液组合 II 的 1.96 倍,且差异显著,而对于叶肉原生质体,2 种酶液组合之间的差异不显著。因此可见,酶液组合 II 更适合用于桧柑原生质体的分离。

关键词:桧柑;原生质体;酶液组合;纤维素酶 R-10;纤维素酶 Worthington

中图分类号:S666.101 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)21-0045-03

原生质体指采用酶解法或机械法去掉细胞壁的裸露活细胞,在一定条件下可以发育成完整的植株,同时,原生质体也是一种理想的单细胞系统^[1]。因此,原生质体可以为现代生物技术研究等诸多方面提供有利的试验材料,已被广泛地应用于植物基础理论研究和遗传改良中^[2-3]。然而,原生质体技术应用的首要前提是分离出高质量的原生质体。由目前的研究现状可知,影响原生质体分离的因素主要有分离起始材料、预处理、酶液组合和浓度、酶解时间、渗透压等。其中,酶液组合是影响原生质体分离成败的关键因素之一^[4-5]。

目前,人们广泛使用的酶液组合为纤维素酶 + 离析酶或纤维素酶 + 果胶酶,已被成功地用于小麦、马铃薯、油菜、柑橘等植物的原生质体分离^[6]。另外,值得注意的是,不同来源的纤维素酶对原生质体分离也有影响。研究发现,相对于非

纯化的纤维素酶,纯化的纤维素酶用于烟草和葡萄原生质体分离时,可降低活性氧水平,提高分离效果^[7-8]。柑橘原生质体主要由愈伤组织和叶片分离而来,所使用的酶液组合皆为纤维素酶 R-10 + 离析酶 R-10,然而纤维素酶 R-10 是一种非纯化的纤维素酶。本研究拟采用纯化的纤维素酶 Worthington + 离析酶 R-10 的酶液组合与常规酶液组合进行桧柑原生质体的分离,比较它们在原生质体酶解时间、产量及活性氧含量上的差异,从而分析纤维素酶纯化与否对桧柑原生质体分离的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

将桧柑(*Citrus reticulata* Blanco)胚性愈伤组织保存于 MT 基本培养基中,每 20 d 继代 1 次;将愈伤组织用悬浮培养基(MT + 0.5 mg/L ME + 1.5 mg/L 谷胺酰氨 + 50 g/L 蔗糖)悬浮培养 4 代后用于原生质体的分离。

取新鲜桧柑果实,去掉果肉,将种子用水冲洗干净,用 1 mol/L NaOH 浸泡 10 min,去掉果胶,转入超净工作台内,用无菌蒸馏水冲洗后,再用 75% 乙醇浸泡 10 min,然后用 1% NaClO 溶液消毒 20 min,再然后用无菌蒸馏水冲洗 3 次,每次

268(26):19364-19368.

[13] Mandels M, Parrish F W, Reese E T. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride* [J]. Journal of Bacteriology, 1962, 83 (2): 400-408.

[14] Saloheimo M, Kuja - Panula J, Ylosmaki E, et al. Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei* beta - glucosidase BGLII (Cel1A) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(9): 4546-4553.

[15] Fowler T, Brown R Jr. The *bglII* gene encoding extracellular beta - glucosidase from *Trichoderma reesei* is required for rapid induction of the cellulase complex [J]. Molecular Microbiology, 1992, 6(21): 3225-3235.

[16] Zhou Q X, Xu J T, Kou Y B, et al. Differential involvement of β -

glucosidases from *Hypocrea jecorina* in rapid induction of cellulase genes by cellulose and cellobiose [J]. Eukaryotic Cell, 2012, 11 (11): 1371-1381.

[17] Shida Y, Yamaguchi K, Nitta M, et al. The impact of a single - nucleotide mutation of *bgl2* on cellulase induction in a *Trichoderma reesei* mutant [J]. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8(1): 230-247.

[18] 江 洁, 杜连祥, 路福平, 等. 基因工程菌里氏木霉染色体 DNA 的提取方法 [J]. 生物技术, 2004, 14(2): 24-26.

[19] 朱小燕. 对重叠延伸 PCR 技术原理解及举例分析 [J]. 生物学通报, 2013, 48(3): 16-17.

[20] 魏 薇, 李 凡, 陈海如. 利用重叠延伸 PCR 技术扩增长片段 DNA [J]. 云南大学学报(自然科学版), 2008, 30(增刊 1): 86-88.

收稿日期: 2017-07-03

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31372025)。

作者简介: 周一鹏(1991—), 男, 江苏灌云人, 硕士, 主要从事果树生物技术研究。E-mail: ypzhou0823@qq.com。

通信作者: 徐小勇, 博士, 副教授, 主要从事果树生物技术研究。E-mail: xyxu@yzu.edu.cn。

5 min。最后用灭过菌的手术刀片剥去内外种皮,接种到 MT 培养基上,大约过 30~40 d,待叶片充分展开后用于原生质体分离。

1.2 主要试剂

主要试剂有蔗糖、甘露醇、琼脂粉、吗啉乙磺酸(MES)、纤维素酶(R-10 Onozuka, Yakult Honsha, Tokyo)、纤维素酶(Worthington Biochemical Corporation)、离析酶(R-10 Onozuka, Yakult Honsha, Tokyo)、麦芽提取物、 NaH_2PO_4 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、CPW13(含 13% 甘露醇的细胞-原生质体清洗液)、CPW26(含 26% 蔗糖的细胞-原生质体清洗液)、活性氧检测试剂盒。

1.3 试验方法

1.3.1 桧柑原生质体的分离 原生质体的分离参照何丽等的方法^[9-10],稍作修改。

愈伤组织原生质体的分离。取 3 g 愈伤组织于培养皿中,加入 2 mL 0.7 mol/L EME 培养基(MT+0.7 mol/L 蔗糖+0.5 g/L ME)中,再加入 2 mL 酶液(含 2% 纤维素酶 R-10 或纤维素酶 Worthington+2% 离析酶 R-10+12.8% 甘露醇+0.011% NaH_2PO_4 +0.12% MES+0.36% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 值为 5.8)。将培养皿用封口膜封口,于 28℃ 暗条件下酶解 24 h,酶解过程中每隔一段时间观察原生质体的分离情况,以确定最佳酶解时间。

叶肉原生质体的分离。取出试管苗的叶片,置于铺有滤纸的无菌培养皿中,用手术刀片将叶片切成 1~2 mm 宽的条状,之后放入预先加了 2 mL 左右 0.6 mol/L EME(配方为 MT+0.6 mol/L 蔗糖+0.5 g/L ME)的培养基中,最后加入 2 mL 酶液(含 2% 纤维素酶 R-10 或纤维素酶 Worthington+2% 离析酶 R-10+10.9% 甘露醇+0.011% NaH_2PO_4 +0.12% MES+0.36% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 值为 5.8)。将培养皿用封口膜封口,于 28℃ 黑暗条件下酶解 24 h,其间每隔一段时间观察原生质体分离情况。

将酶解完成后的原生质体(酶解混合物)通过孔径为 45 μm 的不锈钢筛网过滤,并用 CPW13 冲洗,之后将滤液转移到 10 mL 离心管中,于 950 r/min 离心 10 min,去上清。将原生质体沉淀与 2 mL CPW13 混匀,之后用吸管轻轻转移到预先加入 6 mL CPW26 的离心管中,于 930 r/min 离心 2 min,经 CPW13/CPW26 界面梯度离心纯化后,用吸管将 2 个液面间的原生质体带吸出。将纯化后的原生质体悬浮于电融合液(含 12.7% 甘露醇+0.03% CaCl_2)中备用。

1.3.2 桧柑原生质体产量的测定 采用血球计数板进行原生质体产量的测定。先将盖玻片盖在计数室上,将原生质体悬浮液滴在盖玻片一侧边缘,使其沿着盖玻片和计数板间的缝隙渗入计数室,直到充满计数室为止。依次逐个计数中央大方格内 25 个中方格里的原生质体数,然后根据下式计算原生质体产量:

1 mL 悬浮液中的原生质体数=1 个大方格悬浮液中的原生质体数 $\times 10^4$;

原生质体产量(个/g)=原生质体密度(个/mL) \times 原生质体悬浮液的总体积(mL)/叶片质量(g)。

1.3.3 桧柑原生质体中活性氧含量的测定 采用活性氧检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)测定原生质体中

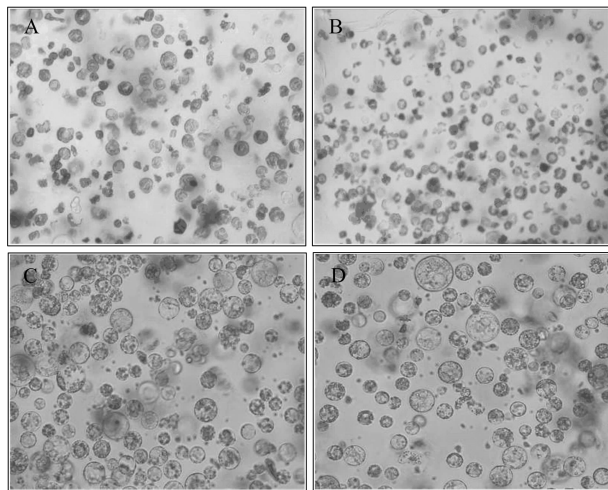
的活性氧含量。按照 1:1 000 的比例,用原生质体培养液稀释 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA),使其终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。将原生质体收集后悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中,使原生质体浓度为 $10^6 \sim 10^7$ mL,于 37℃ 水浴锅内孵育 20 min,每隔 3~5 min 颠倒混匀 1 次,使探针和原生质体充分接触。之后,用原生质体培养液将处理好的原生质体洗涤 3 次,以充分除去未进入原生质体内的 DCFH-DA。最后设置 1 个对照管,按照体积比 1:1 000 的比例加入阳性对照 Rosup,并设置 1 个未加 DCFH-DA 的阴性对照。做好前处理后,于 30 min 内上样,用 FACS Aria 流式细胞仪进行检测。

1.3.4 数据分析 试验重复 3 次,采用 Excel 2003 计算平均值和标准偏差,采用 SPSS 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同酶液组合对原生质体酶解时间的影响

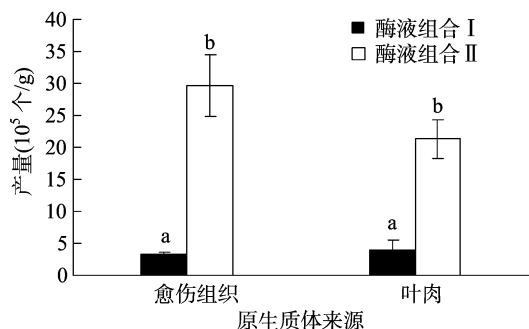
对于不同的酶液组合或酶解材料,其酶解时间一般也不同,因此在酶解过程中要进行持续观察,当观察到原生质体数量不再增多时,可停止酶解,开始后续试验,该阶段时间可视为适宜的酶解时间。本研究首先观察了酶液组合 I(纤维素酶 R-10+离析酶 R-10)和酶液组合 II(纤维素酶 Worthington+离析酶 R-10)对 2 种外植体酶解时间的影响。结果表明,对于愈伤组织或叶片,2 种酶液组合所需的酶解时间均存在差异(图 1)。总体而言,酶液组合 I 所需的酶解时间较长,分别为 18 h(愈伤组织)、20 h(叶片);酶液组合 II 所需的酶解时间则分别为 6 h(愈伤组织)、16 h(叶片)。上述结果表明,采用纯化纤维素酶的酶液组合可以缩短酶解时间,从而提高原生质体的分离效率。



A、B—酶液组合 I、II 分别酶解桧柑叶片 20、16 h 的状态;
C、D—酶液组合 I、II 分别酶解桧柑愈伤组织 18、6 h 的状态
图 1 不同酶液组合下桧柑叶片、愈伤组织最佳酶解时间的比较

2.2 不同酶液组合对桧柑原生质体产量的影响

原生质体产量是衡量原生质体分离效果的重要指标。因此,本研究测定了 2 种酶液组合条件下原生质体的产量。如图 2 所示,酶液组合 II 所获得的原生质体产量均比酶液组合 I 高,且差异显著。酶液组合 II 处理的愈伤组织原生质体的产量为酶液组合 I 的 9.09 倍,酶液组合 II 处理的叶肉原生质体产量为酶液组合 I 的 5.29 倍。由此可见,酶液组合 II 能较



不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下图同
图2 不同酶液组合分离椪柑原生质体的产量比较

大地提高原生质体产量,从而为后续的原生质体操作,如细胞融合、转化或分子生物学研究提供了量的保证。

2.3 不同酶液组合对椪柑原生质体活性氧水平的影响

水稻、油菜、烟草和葡萄等植物的原生质体在分离过程中会产生活性氧^[7,11-13],而过多的活性氧积累会影响原生质体的再生。此外有研究表明,纤维素酶的纯度会影响原生质体的活性氧水平^[7]。因此,本研究采用活性氧检测试剂盒测定了2种酶液组合条件下刚分离时原生质体的活性氧水平。结果发现,酶液组合I中的愈伤组织原生质体的活性氧水平是酶液组合II的1.96倍,且差异显著;对于叶肉原生质体,2种酶液组合间差异不显著(图3)。

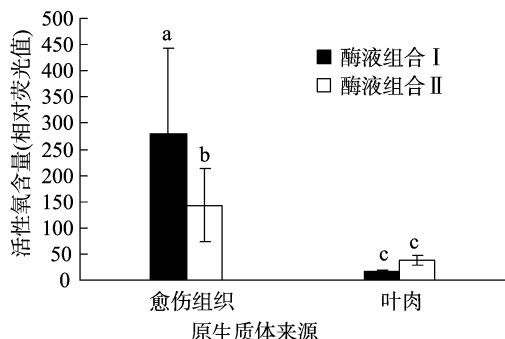


图3 不同酶液组合分离椪柑原生质体的 ROS 含量比较

3 结论与讨论

植物原生质体的分离涉及到细胞壁的去除,而这个过程需要借助一些酶制剂来完成。常用的酶制剂主要有纤维素酶、半纤维素酶、离析酶、果胶酶等。其中,纤维素酶可以降解细胞壁的主要成分纤维素,其纯度和活力的高低直接影响原生质体的分离效果。本研究比较了酶液组合I(纤维素酶 R-10 + 离析酶 R-10)和酶液组合II(纤维素酶 Worthington + 离析酶 R-10)对椪柑原生质体分离的影响。结果表明,酶液组合II在原生质体酶解时间和产量方面均明显优于酶液组合I。因此可见,酶液组合II更适合椪柑原生质体的分离。

对于这2种酶液组合在分离原生质体上的差异,可能有以下2个原因:一是酶液组合中的2种纤维素酶在酶活性上存在差异。纤维素酶 R-10 又称 1,4- β -D-葡聚糖葡萄糖苷水解酶,来源于绿色木霉,含有降解天然纤维素的活性,1 mg 酶制剂含有 10 U 酶活性单位;纤维素酶 Worthington 来源于

里氏木霉,具有外切、内切葡聚糖酶活性,能够有效水解纤维素,1 mg 酶制剂含有 140 U 酶活性单位。在同等浓度的条件下,纤维素酶 Worthington 降解细胞壁纤维素的速度更快,所需的酶解时间也就越短。二是2种纤维素酶在纯度上存在差异。纤维素酶 Worthington 是通过色谱法纯化而来的,在纯度上远高于纤维素酶 R-10。已有研究表明,非纯化的酶在原生质体酶解时易引起细胞损伤,而纯化的纤维素酶能减少活性氧含量,有助于原生质体的分离^[7,11],本研究也得到相似的研究结果。总体可以看出,纯化的纤维素酶 Worthington 可高效地分离椪柑原生质体,对于其他植物原生质体的分离具有重要的参考价值。

参考文献:

- [1] 夏镇澳. 植物原生质体培养理论技术研究进展[M]// 华南农业大学. 农业科学集刊第二集(农作物原生质体培养专辑). 北京: 中国农业出版社,1995:1-6.
- [2] 曹雪,戴忠良,秦文斌,等. 植物原生质体融合技术的研究进展[J]. 中国农学通报,2016,32(25):84-90.
- [3] 郝艳芳,王良群,刘勇,等. 禾谷类作物原生质体培养研究进展[J]. 中国农学通报,2016,32(35):19-23.
- [4] Liu J H, Xu X Y, Deng X X. Protoplast isolation, culture and application to genetic improvement of woody plants[J]. Journal of Food Agriculture and Environment,2003,1(3/4):112-120.
- [5] 张献龙. 植物生物技术[M]. 2版. 北京:科学出版社,2012:111-127.
- [6] Wang J, Jiang J J, Wang Y P. Protoplast fusion for crop improvement and breeding in China[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2013,112(2):131-142.
- [7] Papadakis A K, Roubelakis - Angelakis K A. The generation of active oxygen species differs in tobacco and grapevine mesophyll protoplasts[J]. Plant Physiology,1999,121(1):197-206.
- [8] Papadakis A K, Fontes N, Gerós H, et al. Progress in grapevine protoplast technology[M]//Roubelakis - Angelakis K. Grapevine molecular physiology and biotechnology. Netherlands:Springer,2009:429-460.
- [9] 何丽. 椪柑原生质体再生能力差异的机理与调控初探[D]. 扬州:扬州大学,2013.
- [10] Xu X Y, Xie G S, He L, et al. Differences in oxidative stress, antioxidant systems, and microscopic analysis between regenerating callus - derived protoplasts and recalcitrant leaf mesophyll - derived protoplasts of *Citrus reticulata* Blanco[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,2013,114(2):161-169.
- [11] Ishii S. Factors influencing protoplast viability of suspension - cultured rice cells during isolation process[J]. Plant Physiology, 1988,88(1):26-29.
- [12] Yasuda K, Watanabe Y, Watanabe M. Generation of intracellular reactive oxygen species during the isolation of *Brassica napus* leaf protoplasts[J]. Plant Biotechnology Journal,2007,24(4):361-366.
- [13] 蔡小东,曹文娟. 冰糖橙叶肉和愈伤组织原生质体分离期间氧化胁迫的比较分析[J]. 广东农业科学,2017,44(2):49-54.