

王 琪,雷秀娟,张 浩,等.三七原生质体的制备[J].江苏农业科学,2020,48(19):45-48.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.19.009

# 三七原生质体的制备

王 琪,雷秀娟,张 浩,王英平

(中国农业科学院特产研究所,吉林长春 130112)

**摘要:**原生质体因打破了细胞壁的限制,成为遗传转化和体细胞杂交的理想受体。为了以酶解法制备高产量、高活力的三七原生质体,基于组织培养技术,以三七的愈伤组织为试验材料,设置不同纤维素酶和果胶酶的浓度配比,同时探究三七愈伤组织不同培养天数、不同酶解时间、酶液不同渗透压以及离心纯化收集原生质体时不同离心力对原生质体制备的影响,确定三七愈伤组织原生质体分离的最佳条件,以获得较高产量和活力的原生质体材料。结果表明,三七愈伤组织继代培养 15 d,酶液组成为 15 mg/mL 纤维素酶 + 7 mg/mL 果胶酶 + CPW 液 + 0.7 mol/L 甘露醇,酶解时间为 7 h,以 800 r/min 离心收集原生质体时其产量和活力较高。

**关键词:**三七;原生质体;酶解法;纯化;原生质体活力

**中图分类号:** S567.23+6.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)19-0045-03

原生质体是除去细胞壁后被质膜包裹的有活力的细胞,具有细胞全能性<sup>[1]</sup>。因没有细胞壁的限制,原生质体成为遗传转化、细胞杂交、新型育种的理想材料之一<sup>[2]</sup>。三七是五加科人参属的一种极具药用价值的草本植物,主产于我国云南省,具有活血化淤、消肿定痛的功效<sup>[3]</sup>。本试验对三七原生质体的制备条件进行研究,以期对三七的转化试验和杂交育种等奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器

试验仪器主要有台式冷冻离心机、普通光学显微镜、荧光显微镜、超净工作台、恒温振荡器、血球计数板、高压灭菌锅、电子天平、恒温水浴锅等。

### 1.2 主要试剂

试验试剂主要有纤维素酶(上海源叶生物科技有限公司)、果胶酶(上海源叶生物科技有限公司)、甘露醇(美国 Sigma 公司)、荧光素双醋酸酯(FDA)(美国 Sigma 公司)、细胞-原生质体清洗液(CPW 液)(27.2 mg/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、101.0 mg/L  $\text{KNO}_3$ 、

1 480.0 mg/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、246.0 mg/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.16 mg/L KI、0.025 mg/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )、蔗糖、琼脂粉、天门冬氨酸(Asp)、核苷酸、氢氧化钠、水解乳蛋白(国药集团化学试剂有限公司)等。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 三七愈伤组织继代培养** 试验所用的三七愈伤组织为中国农业科学院特产研究所诱导培养。挑选质地较软、易于分散、颜色鲜黄、生长状态一致的愈伤组织进行继代培养,培养基为 MS 基本培养基 + 1.5 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸 + 8 mg/L Asp + 8 mg/L 核苷酸 + 0.5 g/L 水解乳蛋白 + 60 g/L 蔗糖 + 5.5 g/L 琼脂,继代后的同一批材料分别暗培养 5、10、15、30、40、60 d,探究三七愈伤组织不同的培养时间对于原生质体产量和活力的影响。

**1.3.2 三七原生质体分离** 以酶解法分离原生质体时,其产量和活力受酶的种类、酶液配比、酶解时间、渗透压等多方面因素的影响<sup>[4]</sup>。原生质体分离的基础条件为 1% 纤维素酶 + 0.5% 果胶酶 + 13% CPW 液<sup>[5]</sup>,暗酶解 6 h 并以 600 r/min 转速纯化原生质体。对纤维素酶和果胶酶的浓度配比、酶解时间、甘露醇浓度设置不同水平进行单因素试验,每组设 3 次重复。酶液用 NaOH 溶液调节 pH 值为 5.8~6.0,附加 0.3 mmol/L 2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)缓冲液作为 pH 值稳定剂,酶液经 0.22  $\mu\text{m}$  过滤器过滤灭菌使用。酶解前将酶液于 37  $^{\circ}\text{C}$  进行预热活化,愈伤组织中酶液加入量为 10 mL/g,在 100 r/min 转速的摇床上振荡酶解,酶

收稿日期:2019-12-05

基金项目:中国农业科学院科技创新工程项目(编号:CAAS-ASTIP-2016-ISAPS)。

作者简介:王 琪(1995—),女,山东淄博人,硕士研究生,从事基因编辑与原生质体融合研究。E-mail:1453865882@qq.com。

通信作者:王英平,博士,研究员,从事药用植物资源与育种研究。E-mail:yingpingw@126.com。

解温度为 25 ℃。

1.3.3 原生质体纯化 以离心沉淀的方式对原生质体进行纯化。将酶解产物经 100 μm 滤网过滤, 除去较大的或酶解不完全的细胞团, 收集滤液。将滤液离心 2 min, 用移液器回收上清酶液。向离心管底部沉淀加入 10 mL CPW 液, 离心洗涤 2 min 弃上清, 重复 2 次。用 10 mL 液体培养基离心 1 min, 洗涤原生质体 1 次。用 5 mL 培养液重悬原生质体。设置离心转速为 200、400、600、800、1 000、1 500、2 000 r/min 等 7 个水平, 离心收集原生质体后观察其形态并计算产量。

1.3.4 原生质体产量计算 用 25 × 16 血球计数板进行计数<sup>[6]</sup>。将纯化收集的原生质体温和颠倒几次混匀后, 吸取 1.0 mL 用培养液稀释 3 ~ 5 倍, 取 10 μL 滴加在计数板上, 每个样品计数 3 次取平均值。原生质体数(个/mL) = 80 个小格内原生质体数 ÷ 80 × 400 × 10 000 × 稀释倍数, 原生质体产量(个/g) = 原生质体数(个/mL) × 纯化悬浮体积 ÷ 酶解材料质量。

1.3.5 原生质体活力检测 以荧光双醋酸酯(FDA)染色法检测原生质体活力<sup>[7]</sup>。FDA 用丙酮溶液配制, 使用浓度为 5 mg/mL, 取 1 mL 纯化后的原生质体加入 25 μL 丙酮 - FDA 溶液, 染色 5 ~ 10 min, 吸取 100 μL 制片, 在荧光显微镜 495 nm 波长下进行观察统计, 有活力的原生质体在视野下呈现绿色荧光且活力越高荧光越强。每个试验组取样 3 次, 每次观察 3 个视野取平均值。原生质体活力 = 视野内发光细胞数/视野内细胞总数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 不同培养天数对原生质体产量和活力的影响

取同一时间继代, 分别培养 5、10、15、30、40、60 d 的三七愈伤组织各 0.5 g, 加入 5 mL 酶液, 设 3 组重复, 数据取平均值。在 100 r/min 转速摇床上酶解 6 h, 经 CPW 液洗涤 2 次, 培养液洗涤 1 次, 用 5 mL 培养液重悬并进行计数, 统计原生质体的产量, 以 FDA 染色法检测原生质体活力。结果(图 1)表明, 对培养 15 d 的愈伤组织进行酶解能获得较高的产量和活力。培养 30 d 以后的愈伤组织产量和活力都明显下降, 原因可能是培养后期愈伤组织变得紧实密集, 不易分散导致酶解不完全, 且长时间不更换培养液, 所需营养成分缺失, 细胞次生代谢产物积累, 细胞活力下降。

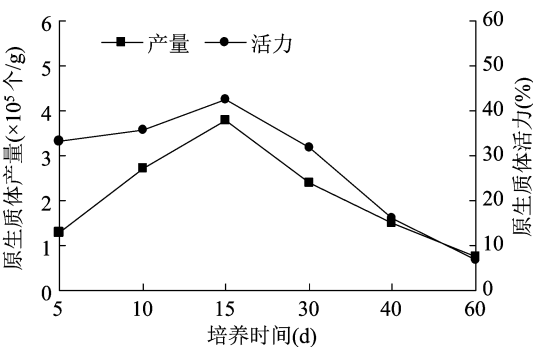


图1 愈伤组织培养天数对原生质体分离的影响

2.2 不同离心转速对原生质体产量和完整度的影响

将继代培养 15 d 的 3 g 愈伤组织用镊子分散, 加入 30 mL 酶液, 在 100 r/min 转速摇床上暗培养酶解 6 h, 温和颠倒混匀后用移液器吸 4 mL 培养液至 7 支 15 mL 离心管中, 分别以 200、400、600、800、1 000、1 500、2 000 r/min 转速离心, 对酶解的原生质体进行洗涤纯化。用 CPW 液洗涤 2 次, 用培养液洗涤 1 次, 加入 5 mL 培养液重悬原生质体, 取 1 mL 悬浮液稀释 3 倍, 再吸取 10 μL 于血球计数板在显微镜下计数并观察原生质体完整度, 试验重复 3 次。由表 1 可知, 将离心转速设为 800 r/min 时可以获得较高的原生质体产量, 且完整度较高。分析原因可能是离心转速较低时, 原生质体沉集不完全, 会在纯化过程中随上清液流失; 离心转速较高时会增加原生质体与管壁的碰撞次数和压力, 导致原生质体破裂, 细胞完整度下降, 碎片增加且产量降低。

表 1 离心转速对原生质体的影响

纯化离心转速 (r/min)	产量 ( × 10 <sup>5</sup> 个/g)	原生质体破裂程度
200	0.31	+
400	0.62	+
600	3.70	++
800	4.50	++
1 000	3.10	+++
1 500	0.66	++++
2 000	0.25	+++++

注: “+”的数量越多, 原生质体的完整度越低, 完整原生质体的数量越少。

2.3 不同渗透压对原生质体分离的影响

取继代 15 d 的 3 g 愈伤组织用镊子分散, 加入 30 mL 酶液, 取 7 支离心管, 每管分装 4 mL 酶解液, 分别按 0.2、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、1.0 mol/L 加入对应浓度的甘露醇, 在 100 r/min 转速摇床上暗培

养酶解 6 h。结果(图 2)表明,甘露醇浓度在 0.2 ~ 0.4 mol/L 之间时,原生质体的产量和活力很低,分析原因可能是该浓度的渗透压相对于组织细胞过低,显微镜下很多细胞体积膨胀,细胞质外流,细胞破裂;甘露醇浓度在 0.5 ~ 0.7 mol/L 之间时,随着渗透压增加,原生质体的产量和活力逐渐增加,显微镜下细胞形态多为球形,细胞形态较为稳定;甘露醇浓度继续增加后细胞体积减小,原生质体皱缩,产量和活力都下降,且在浓度为 1.0 mol/L 时产量大幅减少,活力也极低。因此以 0.7 mol/L 浓度的甘露醇调节酶液渗透压时能获得较高的原生质体产量和活力。

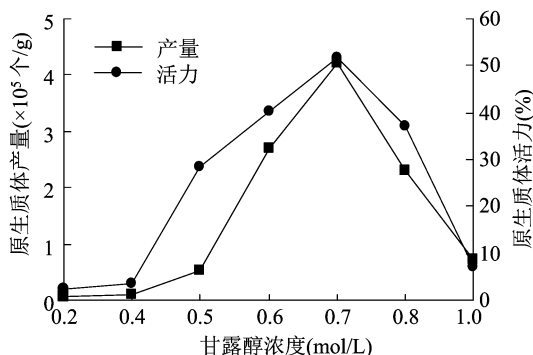


图2 酶液渗透压对原生质体分离的影响

## 2.4 不同酶解时间对原生质体分离的影响

取培养 15 d 的 0.5 g 愈伤组织于 5 mL 酶液中酶解,材料的酶解时间设置 7 个水平,分别为 3、5、7、8、9、11、13 h。在对应的培养时间取样进行原生质体产量和活力的计算。如图 3 所示,随着酶解时间的增加,原生质体的产量和活力呈现先上升后下降的趋势。酶解 3 h 左右在显微镜下能观察到较大的细胞团,游离的细胞数量少,原生质体的产量和活力较低;酶解 5 ~ 9 h 时,原生质体的释放量逐渐增多,但活力呈现先下降后上升的趋势;酶解 9 h 后,原生质体的产量明显降低,显微镜下细胞碎片增多,活力急剧下降。酶解 7 h 与酶解 8 h 时原生质体的产量差异不明显,但酶解 7 h 时原生质体的活力较高。高活力的原生质体更有利于后期的培养和应用,因此将酶解 7 h 设为最佳酶解时间。

## 2.5 不同酶液比对原生质体分离的影响

纤维素酶液浓度(质量体积比)设置 3 个水平,分别为 10、15、20 mg/mL,果胶酶液浓度(质量体积比)设置 3 个水平,分别为 5、7、9 mg/mL,共计 9 种不同的酶液组合,酶解 7 h 后计算原生质体的产量和活力。如表 2 所示,当纤维素酶浓度为 20 mg/mL、

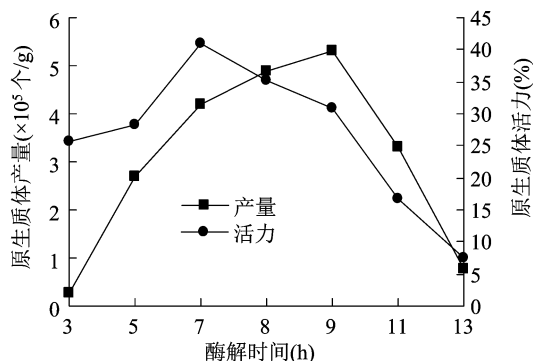


图3 酶解时间对原生质体分离的影响

果胶酶浓度为 7 mg/mL 时,原生质体产量可达到  $6.82 \times 10^5$  个/g,但活力仅为 33.7%;当纤维素酶浓度为 15 mg/mL、果胶酶浓度为 7 mg/mL 时,原生质体产量为  $6.44 \times 10^5$  个/g,活力达到 59.6%;当纤维素酶浓度为 15 mg/mL,果胶酶浓度分别为 7、9 mg/mL 时,二者的产量差异不明显,但原生质体的活力差异明显。原生质体的数量可以通过富集提高,而活力较高的原生质体更有利于后期的培养和应用,综合考虑,将最佳酶液配比组合设置为 15 mg/mL 纤维素酶 + 7 mg/mL 果胶酶。

表 2 不同酶液比对原生质体的影响

纤维素酶浓度 (mg/mL)	果胶酶浓度 (mg/mL)	原生质体产量 ( $\times 10^5$ 个/g)	原生质体活力 (%)
10	5	4.22	40.9
10	7	4.68	46.3
10	9	5.33	45.8
15	5	5.61	52.7
15	7	6.44	59.6
15	9	6.71	50.9
20	5	6.26	36.7
20	7	6.82	33.7
20	9	4.58	23.1

## 3 讨论与结论

原生质体的产量和活力受多种因素的影响,如材料的基因型和生理状态、培养基成分、制备方式、制备条件等。本研究以酶解法分离三七原生质体,将继代培养 15 d 的材料在 15 mg/mL 纤维素酶 + 7 mg/mL 果胶酶 + CPW 液 + 0.7 mol/L 甘露醇的酶液中酶解 7 h,并以 800 r/min 纯化收集原生质体时,能获得较为理想的原生质体材料,产量为  $6.44 \times 10^5$  个/g,活力为 59.6%。试验结果为下一步进行原生质体制备条件的优化和原生质体的培养再生奠定了基础。

任梦云,陈彦君,王建军,等.一种高效提取干燥植物样品 DNA 的方法[J].江苏农业科学,2020,48(19):48-51.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.19.010

# 一种高效提取干燥植物样品 DNA 的方法

任梦云<sup>1</sup>,陈彦君<sup>2,3</sup>,王建军<sup>1</sup>,王美兴<sup>1</sup>,黄益峰<sup>1</sup>,杜龙岗<sup>1</sup>,关 潇<sup>2</sup>

(1. 浙江省农业科学院作物与核技术利用研究所,浙江杭州 310021; 2. 中国环境科学研究院,北京 100012;

3. 海南大学热带农林学院,海南海口 570228)

**摘要:**野外采集样品通常采用硅胶干燥的方法,但会不同程度降解 DNA 影响提取效果。为解决干燥植物样品 DNA 难提取的问题,提出 CTAB 法与全式金植物基因组 DNA 提取试剂盒相结合的方法,并以 4 种中药材为试验材料,利用改良 CTAB 法、传统 CTAB 法及试剂盒法等进行鉴定,并用 PCR 扩增和酶切验证检测提取 DNA 的质量。结果表明,CTAB 法与全式金植物基因组 DNA 提取试剂盒相结合的方法能够有效去除多酚和糖类物质对 DNA 提取的干扰,并有效富集 DNA,尤其适用于临近干燥或枯萎的植物干燥叶片,PCR 扩增和酶切反应应进一步证明利用该方法提取 DNA 能够达到下游试验的要求。本研究有效解决了传统方法提取干燥样品 DNA 低效的问题,能为接下来分子标记的开发、遗传多样性和后续遗传学分析提供基础。

**关键词:**干燥植物;DNA 提取方法;DNA 产率;琼脂糖凝胶;电泳;PCR 扩增;酶切试验

**中图分类号:**Q94-34<sup>+</sup>1;S184

**文献标志码:**A

**文章编号:**1002-1302(2020)19-0048-04

从植物组织中提取高质量的基因组 DNA 是进行分子生物学研究的第 1 步和必要条件<sup>[1]</sup>。高质量的基因组 DNA 是进行如简单重复序列标记(SSR)、限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)、随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD)、简单重复序列间扩增(ISSR)等后续遗传多样性分析的基础<sup>[2]</sup>。迄今为止,人们提出了诸多提取 DNA 的方法,目前最常用的提取方法是十二烷基苯磺酸钠(SDS)法、十

六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法<sup>[3]</sup>。远距离采样一般无法对材料即刻提取 DNA,通常采用硅胶脱水干燥保存。然而有研究表明,从硅胶保存的植物样品中提取的基因组 DNA 会出现不同程度的降解现象,而且 DNA 的质量和浓度不及从新鲜样品中提取到的 DNA<sup>[4]</sup>。尤其枯萎的植物样品中 DNA 易被核酸内源酶降解,硅胶干燥后 DNA 降解程度更加严重,造成 DNA 提取质量下降<sup>[5]</sup>。因此,亟待开发一种能够适用于临近枯萎植物干燥样品的基因组 DNA 提取通用方法以适应研究要求。

本研究以山莨菪(*Anisodus tanguticus*)、桃儿七(*Sinopodophyllum hexandrum*)、四数獐牙菜(*Swertia tetraptera*)、椭圆叶花锚(*Halenia elliptica*)4 种中草药为材料,分别从紫外吸光度、凝胶电泳、PCR 扩增、酶切验证等方面对传统 CTAB 法、改良 CTAB 法和试剂盒法 3 种 DNA 基因组的提取方法进行比较,以期寻找能提取干燥样品较好质量 DNA 的方法。

收稿日期:2019-10-08

基金项目:浙江省农业(粮食)新品种选育重大科技专项(编号:2016C02050-9-2)。

作者简介:任梦云(1991—),女,安徽淮北人,博士,助理研究员,从事分子生物学研究。E-mail:916103207@qq.com。

通信作者:关 潇,博士,高级工程师,从事转基因作物风险评估工作,E-mail:cynthia815@126.com;杜龙岗,硕士,副研究员,从事鲜食玉米新品种选育及相关耕作制度研究,E-mail:dlgl38@163.com。

## 参考文献:

- [1]彭 章,童华荣,梁国鲁,等.茶树叶片和胚根原生质体的分离及 PEG 诱导融合[J].作物学报,2018,44(3):463-470.
- [2]蔡 肖,康向阳.小青杨叶肉原生质体分离条件的研究[J].中国农学通报,2011,27(10):18-22.
- [3]李云鹤,王晓梅.试论中药三七对血液系统的药理药效作用[J].中国现代药物应用,2016,10(8):253-254.

- [4]Wei Z M,Xu Z H. Plant regeneration from protoplasts of soybean (*Glycine max* L.)[J]. Plant Cell Reports,1988,7(5):348-351.
- [5]王 义,杨 晶,张 颖,等.人参原生质体的分离培养[J].吉林农业大学学报,2009,31(3):268-272.
- [6]李 晓.马铃薯原生质体培养再生及利用 CRISPR/Cas9 瞬时转化的研究[D].呼和浩特:内蒙古大学,2019.
- [7]苏 彤,姚陆铭,张 鑫,等.大豆愈伤原生质体的制备和培养方式探究[J].大豆科学,2018,37(5):741-747.