

黄芪原生质体分离技术

刘 强, 张宗申*, 丛丽娜*, 章凌雪

(大连工业大学 生物与食品工程学院, 辽宁 大连 116034)

摘 要: 以黄芪叶片和愈伤组织为材料, 对黄芪原生质体的制备分离技术进行了研究。结果表明: 采用黄芪叶片制备原生质体远远优于黄芪愈伤组织, 能够获得大量高活力的原生质体; 采用 2% 纤维素酶+0.5% 半纤维素酶+0.5% 果胶酶的混合酶水解 12 h 就能达到较好的分离效果, 获得高质量的黄芪原生质体, 然后进行原生质体的培养。

关键词: 黄芪; 原生质体; 愈伤组织; 组织培养

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2008)03-0411-03

Isolation of protoplast from the *Astragalus membranaceus*

LIU Qiang, ZHANG Zong-Shen*, CONG Li-Na*, ZHANG Ling-Xue

(College of Bio & Food Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract: Leaves and callus of the *Astragalus membranaceus* were used to examine the conditions for protoplast preparation and culture of the *A. membranaceus*. The results showed that the leaf segment of the *A. membranaceus* could release massive and vigorous protoplasts. Compared with the callus of the species, the protoplasts extracted from the leaf segment are more efficient in the cell fusion and tissue culture. The optimized treatment is 2% cellulase, 0.5% hemicellulase, and 0.5% pectinase for 12 h.

Key words: *Astragalus membranaceus*; protoplast; callus; tissue culture

黄芪 (*Astragalus membranaceus*) 为多年生豆科 (Fabaceae) 植物, 其干燥根为常用滋补中药材, 含有活性较强的三萜皂苷、黄酮类、多糖类、氨基酸、微量元素以及棕榈酸、羽扇豆醇等 (胡海英等, 2005)。但由于草原荒漠化以及乱采挖等原因, 药用野生黄芪资源已十分贫乏, 即使采用人工栽培的方法不仅产量不能满足市场需求, 而且品质也得不到保证 (郑志仁等, 1998)。因此, 利用现代生物技术提高种质资源生物量、优化品质具有重要意义。

植物原生质体融合与培养是通过体细胞杂交创造新的种质或优良品种的重要生物技术 (邢朝斌等, 2006)。分离高质量原生质体是进行原生质体培养和体细胞杂交的前提, 而原生质体产量和活力在很大程度上取决于材料来源、水解酶组成、酶解时间以及其它条件 (Tallman, 2006; Tian & Meng, 1998)。

目前, 国内外对植物黄芪原生质体的制备、纯化及融合的研究极少, 本实验对此进行大量实验并分析影响黄芪原生质体得率、活力的因素, 获得了制备黄芪原生质体的理想条件与参数, 为进一步利用植物细胞融合技术改良和生产黄芪提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

黄芪愈伤组织培养: 取即将成熟展开的黄芪叶片, 清水冲洗干净, 75% 酒精溶液浸泡数秒, 移入 0.1% 升汞溶液消毒 7 min, 其间不断摇动, 无菌水冲洗 4~5 次, 撕下叶片下表皮, 并将去掉下表皮一面放在 MS+2, 4-D 1.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L 培养基上, 在 25 °C 黑暗静置培养,

收稿日期: 2006-12-14 修回日期: 2007-04-22

基金项目: 辽宁省教育厅高等学校科研项目 (05L072) [Supported by High School Scientific Research Program of Education Department of Liaoning Province]

作者简介: 刘强 (1979-), 男, 辽宁抚顺人, 硕士研究生, 研究方向为药用植物细胞工程。

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: zhangzs@dlpu.edu.cn; linacong@dlpu.edu.cn)

诱导愈伤组织。3~4 d后,形成层部分开始膨胀,20 d后表面有颗粒状突起并形成黄色的愈伤组织。

1.2 方法

1.2.1 黄芪叶片的原生质体制备 选取植株顶端未充分展开的幼嫩叶片,清水冲洗干净,75%酒精浸泡数秒,再用0.1%升汞溶液消毒7 min,然后用无菌水清洗4~5次,撕下叶片下表皮,并将去掉下表皮一面置于盛有酶液培养皿中,25℃黑暗下静置约13 h,接着在25℃恒温摇床上50 r/min振荡1 h,以分离原生质体。水解酶液包括2%纤维素酶 Cellulase R-10(Japan)、0.5%半纤维素酶 Hemicellulase(Sigma)和0.5%果胶酶 Pectolase Y-23(Japan)。酶液用CPW-10溶液来配制,pH5.8,最后用微孔滤膜(0.22~0.45 μm)过滤灭菌,4℃可保存1周。

1.2.2 黄芪愈伤组织的原生质体制备 取继代5~10 d质地疏松的淡黄绿色愈伤组织1~2 g,置于盛有10 mL酶液的培养皿中,盖上盖子,Parafilm膜封口。25℃、30 r/min的摇床上黑暗振荡酶解约13 h,以分离原生质体。

1.2.3 原生质体的分离、纯化及检测 酶解液用200~400目不锈钢筛过滤,于800~1 000 r/min离心5 min收集原生质体,重复3次。原生质体悬浮于CPW-10洗涤液中(组成为0.56 mol/L甘露醇,1 480 mg/L CaCl₂·2H₂O,5 mmol/L MES等,pH5.8)。用18%蔗糖(pH5.8)溶液离心(500 r/min,10 min)漂浮纯化原

生质体。漂浮的原生质体吸至新管中,用CPW-10洗涤液洗涤1次,再用原生质体培养液洗涤1次,随后进行原生质体活力、密度的测定(汤章城,1999)。

1.2.4 原生质体的培养 经过分离、纯化的原生质体采用液体浅层培养,3~4 d后可观察到原生质体第1次分裂,但原生质体之间粘连严重,且部分原生质体破裂,再培养2周后,原生质体分裂形成细胞团,添加渗透浓度减半的新鲜培养基利于细胞的增殖。大量植物原生质体培养的实践表明,随着细胞壁的再生和细胞的持续分裂,渗透剂的浓度需不断降低,才有利于培养物的生长,此实验仍在进行中。

2 结果与分析

2.1 酶液组成对原生质体分离效果的影响

将在新鲜培养基上转接7 d,颜色淡黄、组织疏松的愈伤组织和幼嫩的黄芪叶片分别置于表1所示三种不同组合的水解酶液中。组合(1)与组合(2)相比,纤维素酶与半纤维素酶的组合比与果胶酶组合效果更好。组合(2)和组合(3)比较,三种酶的共同作用更有利于黄芪原生质体的分离,并且可以得出在原生质体分离过程中,纤维素酶起关键作用,这应该是与细胞壁是由大量纤维素成分组成有关。因此,在后面的实验中,采用纤维素酶+半纤维素酶+果胶酶的组合来制备黄芪的原生质体(表1)。

表1 酶液组成对原生质体分离的影响
Table 1 Effects of enzyme ingredients on separation of protoplasts

酶液组成 Enzyme ingredients	黄芪原生 质体产量 Yield(FW)/ ×10 ⁵ 个(g)	黄芪原生 质体活力 Protoplast viability(%)	原生质体状态 Protoplasts status
(1) 2%纤维素酶+0.5%果胶酶	0.70	65	原生质体数量较多,但活性不高,存在一些胞壁未被酶解的单细胞
(2) %纤维素酶+0.5%半纤维素酶	0.25	60	原生质体数量少,且活性不高,存在大量胞壁未被酶解的单细胞
(3) 2%纤维素酶+0.5%半纤维素酶+0.5%果胶酶	8.00	92	原生质体数量很多,呈非常规则的圆球形,活性很高,胞壁未被酶解的单细胞极少

2.2 酶液浓度对原生质体分离的影响

在确定了酶液组成的基础上,采用不同浓度的纤维素酶、果胶酶和半纤维素酶组合酶解黄芪叶片,其游离原生质体的产量明显不同(表2)。酶解后收集的原生质体的活力基本上都在70%以上。对黄芪来说,组合(3)的原生质体产量最高,故本研究均采用组合(3),即2.0%纤维素酶(Cellulase R-10)、0.5%半纤维素酶(Hemicellulase)和0.5%果胶酶(Pectolase Y-23)的组合来分离原生质体。

2.3 酶解时间对分离原生质体的影响

本实验对制备原生质体的酶解时间进行研究,每隔2 h检测一下原生质体的情况,如密度、活力等。结果表明:在酶解4 h后便有少量原生质体生成,随着时间的延长,原生质体的数量也逐渐增加;酶解12 h便产生大量原生质体,其密度和活力为最佳(图1),而后会出现密度和活力下降的趋势,可能是由于失去细胞壁后,原生质体受到酶液的伤害,或者是因为其它因素造成的(表3)。因此,当大量原生质体产生后,

应尽快将原生质体从水解酶液中洗涤出来。

2.4 黄芪取材原料不同对分离原生质体的影响

采用愈伤组织制备原生质体时,有部分细胞壁没有酶解掉,而所得原生质体用伊文思蓝和 FDA 检测,活力不高,且密度很低,为 0.5×10^4 个/mL,不能达到原生质体培养和融合的最佳密度,这可能是由于黄芪愈伤组织中有部分褐变、老化等原因所致。而采用黄芪叶片进行制备原生质体时,有大量活力很高的原生质体产生(图 2),图 A 和 C 中显示绿色荧光的为有活性的原生质体,原生质体内含有

表 2 酶液浓度对原生质体分离的影响

Table 2 Effects of enzyme concentration on separation of protoplasts

编号 No.	纤维素酶 Cellulase R-10 (%)	半纤维素酶 Hemicellulase (%)	果胶酶 Pectolase Y-23 (%)	黄芪原生质体产量 Yield(FW)/ $\times 10^5$ 个(g)	黄芪原生质体活力 Protoplast viability (%)
1	0.5	0.5	0.5	0.80	76
2	1.0	0.5	0.5	3.64	79
3	2.0	0.5	0.5	9.85	94
4	0.5	0.5	1.0	1.13	82
5	1.0	0.5	1.0	6.02	86
6	2.0	0.5	1.0	9.10	89

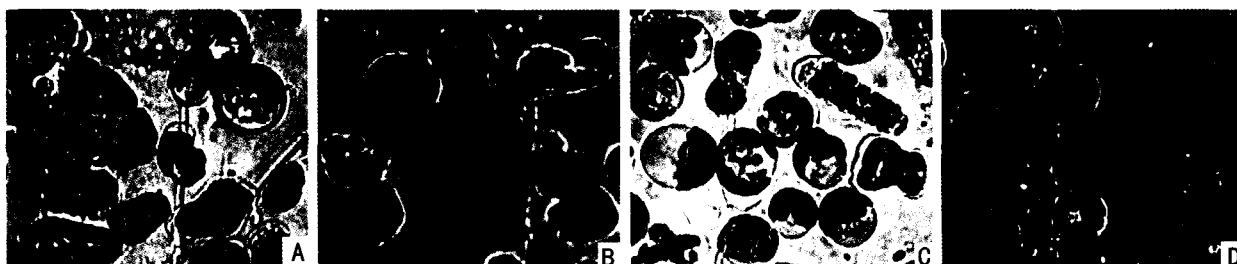


图 1 原生质体的分离与酶解时间的关系 ($\times 400$)

Fig. 1 Relation between protoplasts isolation and zymohydrolysis time ($\times 400$)

A. 酶解 4 h 的黄芪原生质体; B. 酶解 6 h 的黄芪原生质体; C. 酶解 10 h 的黄芪原生质体; D. 酶解 12 h 的黄芪原生质体。

表 3 酶解时间对原生质体分离的影响

Table 3 Effects of zymohydrolysis time on separation of protoplasts

编号 No.	酶解时间 Zymohydrolysis time (h)	黄芪原生质体产量 Yield(FW)/ $\times 10^5$ 个 (g)	黄芪原生质体活力 Protoplast viability (%)
1	4	0.85	62
2	6	2.50	65
3	8	5.00	80
4	10	7.00	85
5	12	9.85	94
6	14	6.85	79

合子的鉴定。从理论上讲,植物任何组织和器官都可以作为分离原生质体的材料,但实际工作中,只有生长旺盛、生命力强的组织和细胞才是获得高质量原生质体的最佳起始材料。根据本实验结果,使用幼嫩叶片制备原生质体比愈伤组织的效果好,这可能与愈伤组织的细胞特点有关,需要进一步研究。

3 讨论

许多易于识别的叶绿体,有利于融合时原生质体杂

起始材料是影响植物原生质体分离培养的重要

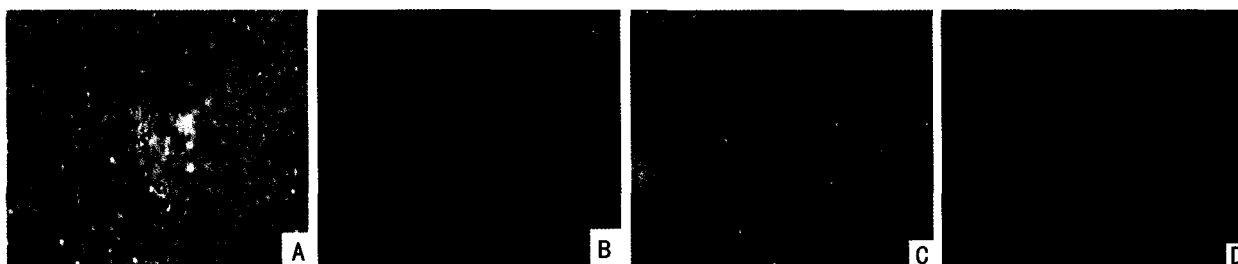


图 2 经 FDA 染色的黄芪叶片细胞的原生质体

Fig. 2 FDA-stained protoplasts isolated from *Astragalus membranaceus* leaves

A. 荧光显微镜下原生质体 ($\times 100$); B. 普通光学显微镜下原生质体 ($\times 100$); C. 荧光显微镜下原生质体 ($\times 200$); D. 普通光学显微镜下原生质体 ($\times 200$).

A. Protoplasts under fluorescence microscope ($\times 100$); B. Protoplasts under light microscope ($\times 100$); C. Protoplasts under fluorescence microscope ($\times 200$); D. Protoplasts under light microscope ($\times 200$).

(下转第 297 页 Continue on page 297)

Herb. Bar Code No. 00020870, designated here, PE!; isolectotype, PE!).

Spiraea martinii Lévl. var. *tomentosa* T. T. Yü 发表时, 作者(俞德浚等, 1963)指定保存于中国科学院植物研究所标本馆的 H. T. Tsai(蔡希陶) 53033 号标本为模式。

查阅该号标本, 发现有 2 份, 分别为 PE Herb. Bar Code No. 00020869 和 00020870, 并且在标本台纸上均贴有“模式标本/TYPUS”标签和作者于 1959 年 8 月 15 日手写的新变种命名标签, 但都没做任何交叉标示。

经比较, 发现 PE Herb. Bar Code No. 00020870 号标本保存状态较好, 其枝、叶、花序和花完整而开展, 无虫蛀和霉变, 符合原始描述。根据《国际植物命名法规》辅则 9A. 2 和 9A. 3 的精神, 在此选取 H.

T. Tsai 53033(=PE Herb. Bar Code No. 00020870)号标本为后选模式。

致谢 在本文完成过程中得到陆玲娣研究员和谷粹芝研究员的指导和帮助, 在此特致感谢。

参考文献:

- Greuter W, McNeill J, Barrie F R, et al. 2000. International Code of Botanical Nomenclature (St. Louis Code) [M]. Königstein: Koeltz Scientific, Books, 1-102
- Yü TT(俞德浚), Kuan KC(关克俭). 1963. Taxa nova Rosacearum sinicarum(I)(中国蔷薇科植物分类之研究(一))[J]. *Acta Phytotaxon Sin*(植物分类学报), 8(3): 202-234
- Yü TT(俞德浚), Li CL(李朝奎). 1981. New species of *Sibbaldia* from China(山莓草属植物之新种)[J]. *Acta Phytotaxon Sin*(植物分类学报), 19(4): 515-518
- Yü T T, Tsai H T. 1936. Contribution to the knowledge of Chinese Rosaceae (I). No. 3. [J]. *Bulletin of the Fan Memorial Institute of Biology, Botany Series*, 7: 113-126

(上接第 413 页 Continue from page 413)

因素(周延清等, 2003)。本实验对黄芪叶片和愈伤组织的原生质体的分离进行比较, 得出叶片制备的原生质体优于愈伤组织, 并且原生质体的活性非常高, 还具有叶绿体等特征明显的标记, 对进行细胞融合的研究非常有用(严寒等, 2005)。酶液的组成、浓度配比和酶解时间也对原生质体分离有很大的影响, 若酶液浓度大, 酶解时间就应缩短, 但原生质体破裂数也随之增多; 反之, 酶解时间长也会导致较早游离出来的原生质体破裂(李彦舫等, 1999)。本实验采用 2.0% 纤维素酶+0.5% 半纤维素酶+0.5% 果胶酶的组合来分离黄芪原生质体, 酶解时间为 12 h, 得到 9.85×10^5 高产量和 94% 高活力的原生质体, 达到了原生质体培养和细胞融合的标准, 并为下一步实验奠定了基础。因此, 选择适宜基因型的植物, 并建立原生质体高频再生植株的培养系统是十分必要的(Yang 等, 2000)。黄芪不但在中草药临床应用上是非常重要的, 而且也可能成为一种良好的原生质体培养材料, 在遗传工程基础研究领域发挥作用(刘凡等, 2006)。

参考文献:

- 汤章城. 1999. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 41-46
- 胡海英, 吴晓玲. 2005. 膜荚黄芪愈伤组织诱导培养[J]. *江苏农业科学*, 2: 97-98
- Li YF(李彦舫), Cheng XR(程肖蕊), Zhang YL(张亚兰), et al. 1999. Protoplast isolation and culture of young inflorescences of

- wild barley(野大麦幼穗原生质体的分离和培养)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报), 16(1): 67-71
- Liu F(刘凡), Zhao H(赵泓), Qin F(秦帆). 2006. The protoplast culture of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* and plant regeneration via somatic embryogenesis(结球白菜下胚轴原生质体培养及其体细胞胚植株再生)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报), 23(3): 275-280
- Tallman G. 2006. Guard cell protoplasts: isolation, culture, and regeneration of plants[J]. *Methods Mol Biol*, 318: 233-252
- Tian ZH, Meng JL. 1998. Plant regeneration from cultured protoplasts of *Moricandia nitens*[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55(3): 217-221
- Xing ZB(邢朝斌), Shen HL(沈海龙), Zhao XY(赵星宇), et al. 2006. Method for isolation of protoplast from young leaves of *Eleutherococcus senticosus*(刺五加幼叶原生质体的分离法)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), 42(2): 288-290
- Yan H(严寒), Tian ZH(田志宏). 2005. Techniques for isolation of protoplast from cotyledon of creeping *Dichondra* (*Dichondra repens*)(马蹄金子叶原生质体的分离技术)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), 41(1): 73-76
- Yang XS, Jian YY, Chen YL. 2000. Comparison of culture procedures for regeneration of plants from protoplast-derived calluse of rice(*Oryza sativa*)[J]. *Acta Agron Sin*, 26(4): 490-495
- Zheng ZR(郑志仁), Liu D(刘涤), Song CQ(宋纯清), et al. 1998. Studies on chemical constituent and immunological function activity of hairy root of *Astragalus membranaceus*(黄芪毛状根化学成分和免疫功能活性的研究)[J]. *Chin J Biotech*(生物工程学报), 14(2): 153-156
- Zhou YQ(周延清), Zhang GF(张根发), Jia JF(贾敬芬). 2003. Factors influencing protoplast culture of the seedlings of *Cassia obtusifolia*(Leguminosae)(影响决明无菌苗子叶原生质体分离和培养因素的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 23(4): 334-338