

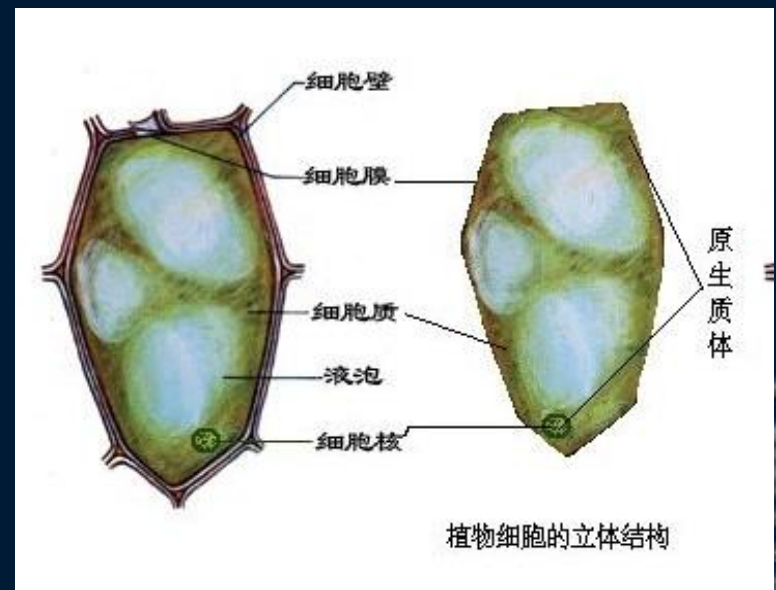
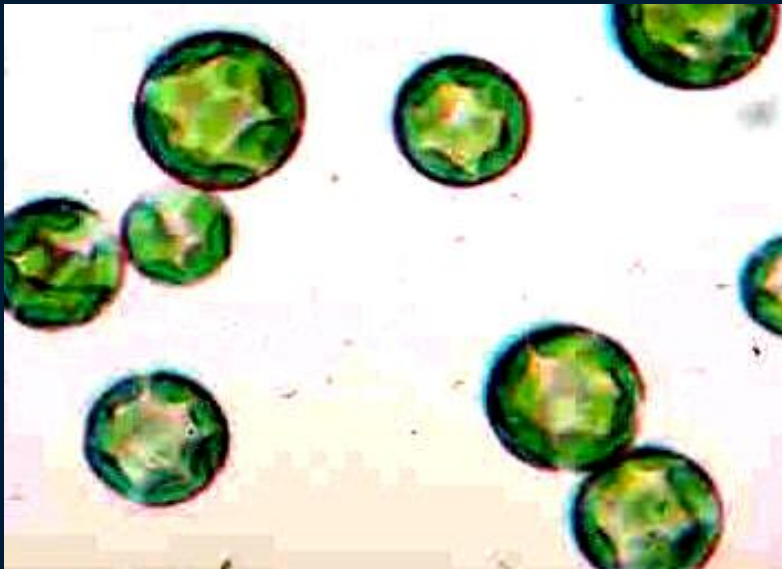
# 第五章 原生质体培养

# 教学内容

1. 掌握原生质体的概念，了解原生质体培养的发展史
2. 掌握原生质体的分离途径和纯化方法；掌握原生质体活力测定方法；
3. 掌握原生质体培养的方法、原生质体融合方法、杂种细胞筛选及杂种植株鉴定方法。

# 第一节原生质体（Protoplast）概述

**原生质体：**采用物理或化学的方法人为去掉细胞壁，由质膜（细胞膜）包裹的具有生活力的裸露细胞。



# 原生质体培养发展简史

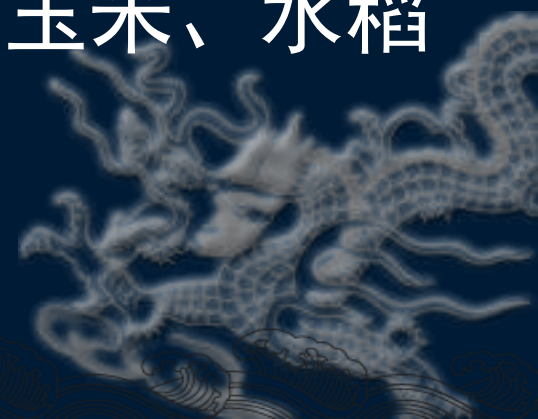
- 1880年，Hanstein首次起用原生质体(protoplast)一词。
- 1892年，Klereker首次采用机械法进行原生质体的分离，但分离的完整的原生质体较少。
- 1960年，Cocking首次应用酶法制备番茄根原生质体获得成功。
- 1971年，Takebe et al.首次得到烟草叶肉原生质体培养的再生植株。
- 1985年，Fujimura et al.第一例禾谷类作物—水稻原生质体培养再生植株。
- 1986年，Spangenberg et al.原生质体融合再生植株在甘蓝型油菜上获得成功。

据统计，截止到2014年，全世界已有49个科，160个属的367种植物经原生质体培养得到了再生植株。其中成功报道最多的是茄科，其次是豆科、禾本科、菊科、十字花科、伞形科等。

### 我国的发展概况：

原生质体培养的再生植株：烟草、胡萝卜、矮牵牛

原生质体融合：小麦×蚕豆、小麦×玉米、水稻  
×豌豆



# 原生质体分离及纯化

## 1. 原生质体分离途径



外植体



愈伤组织

# 1.1 材料来源

材料选择原则：**生长旺盛、生命力强的组织和细胞**是获得高活性原生质体的关键

- 多数植物分离原生质体的经典材料—**叶片（叶肉细胞）**
- ✓ 温室生长的植物，叶片干净幼嫩，是较好的材料来源。

**无菌苗的叶片、上胚轴和子叶**

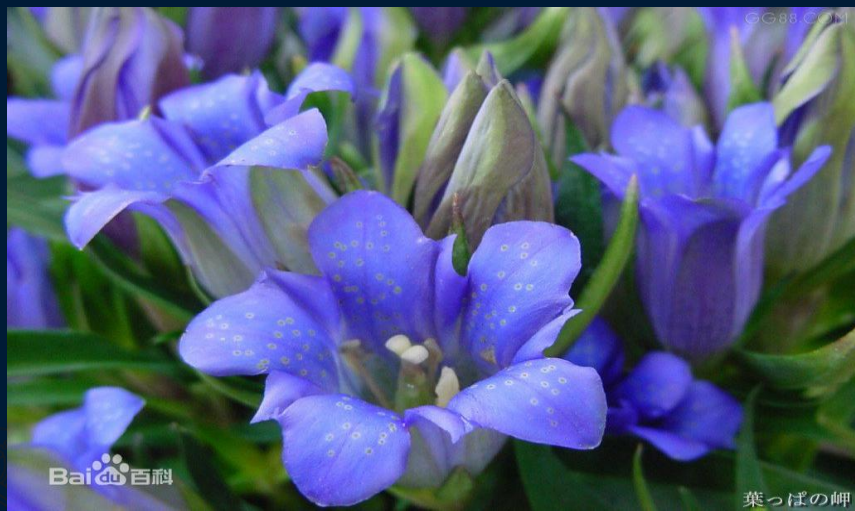


- 禾本科植物：**愈伤组织或悬浮细胞。**

# 材料预处理

用黑暗处理、低温处理和不同光质照射、添加化学试剂等方法，可提高某些材料原生质体的产量和活力。

☆ 龙胆试管苗的叶片用4°C处理较好，提高原生质体的活力。





# 材料预处理

☆ 甘蔗植株必须先**在黑暗**下培养**12h**后分离的原生质体才能分裂。



# 材料预处理

☆ 马铃薯试管苗叶片需在**黑暗**下处理**48h**后分离原生质体，才能获得高产量。

☆ 青天葵叶片需在**13%的甘露醇**溶液中预处理**1h**，原生质体的产量可明显提高。



## 1.2 分离方法

机械分离法

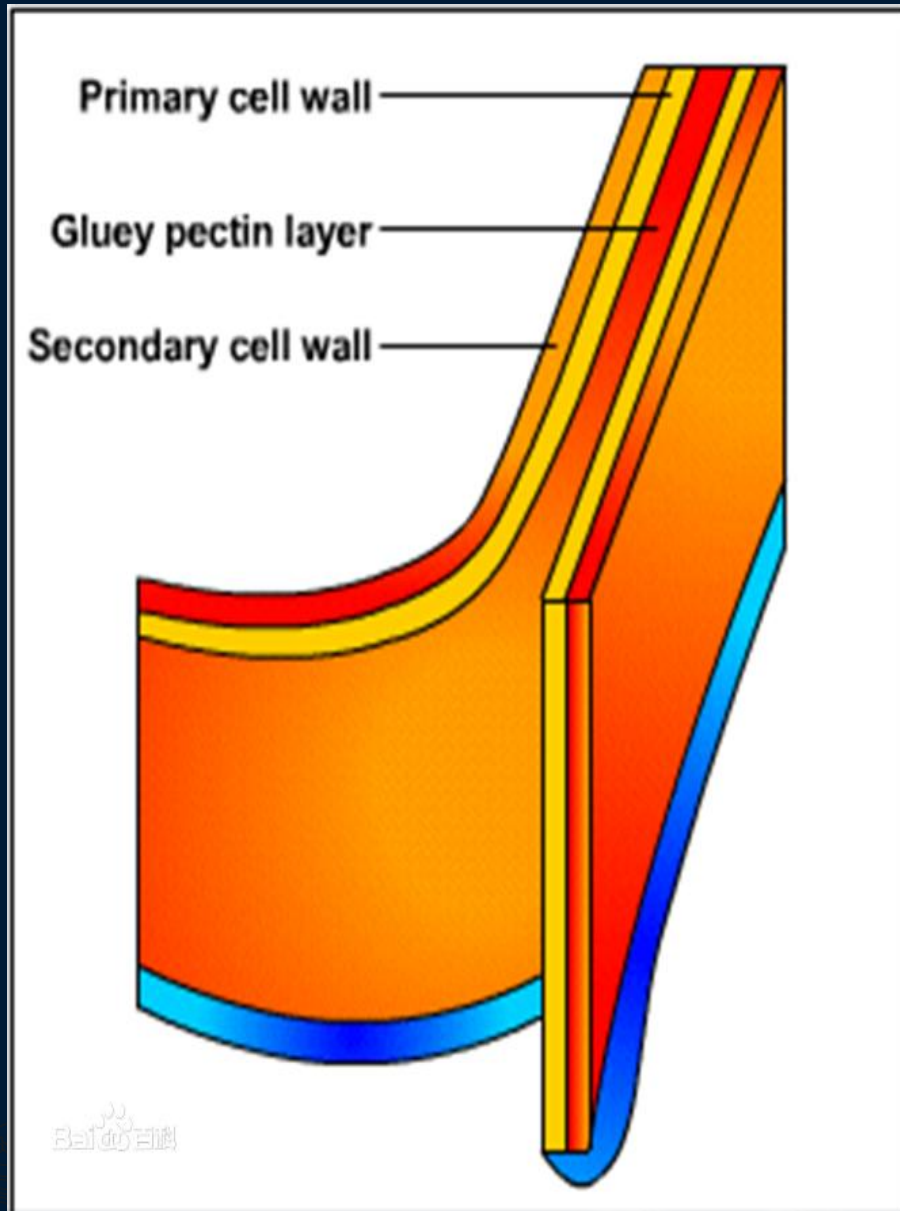
酶法分离法



# 细胞壁的结构及化学成分

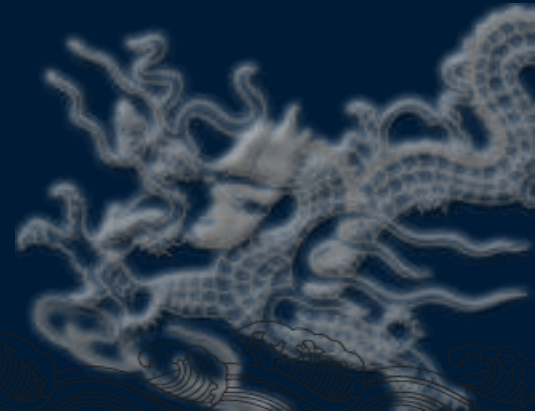
- ◇ 初生壁：纤维素、半纤维素、果胶质
- ◇ 次生壁：纤维素、半纤维素
- ◇ 胞间层：果胶质

**果胶质**是一种可塑性大且高度亲水的胶体，可是相邻细胞粘在一起，并起缓冲作用



## 1.2.1 机械分离法 (Mechanical isolation)

- **机械分离法**：先将细胞放在**高渗糖溶液**中预处理，待细胞发生**轻微质壁分离**，原生质体收缩成球形后，再用机械法磨碎组织，从伤口处可释放出完整的原生质体。

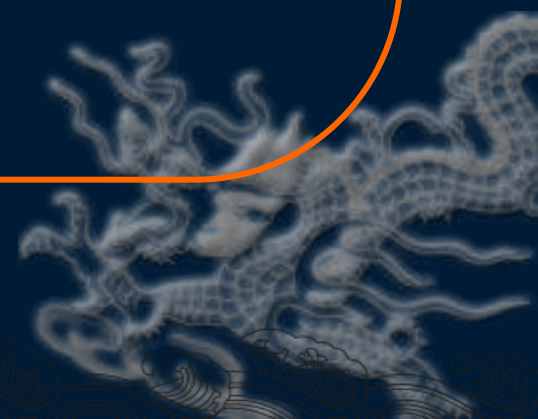


# 机械分离法的优缺点

**优点：**能排除酶对原生质体的破坏作用

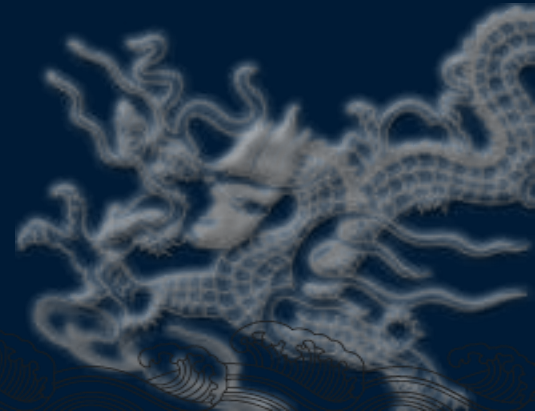
**缺点：**

- ✓ 局限性大，只限于能够广泛发生质壁分离的组织，不能从成熟的和分生细胞分离原生质体；
- ✓ 原生质体的产量低；得到的原生质体有限；
- ✓ 方法繁琐费力。



## 1.2.2 酶法分离 (Enzymatic isolation)

**酶法分离**：指将材料放入能降解细胞壁的混合等渗酶液中保温一定时间，在酶液的作用下，细胞壁被降解，从而获得大量有活力的原生质体的方法。



# 酶分离法使用的酶

种类：纤维素酶类、果胶酶类、半纤维素酶类、崩溃酶、蜗牛酶

- ◆ **果胶酶**：是从根霉、黑曲霉中提取的，使细胞间的果胶质降解，把细胞从组织内分离出来。
- ◆ **纤维素酶**：是从绿色木霉中提取的，降解细胞壁中纤维素的酶。





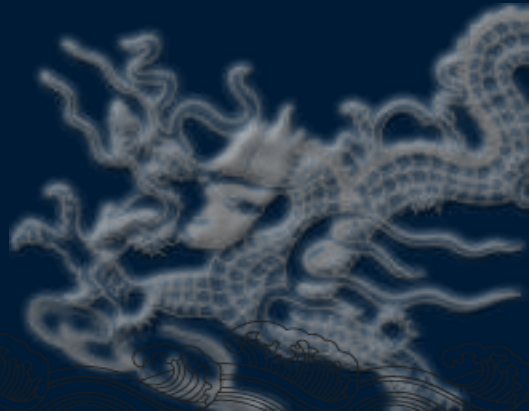
酶	来源	生产厂家
果胶酶类		
Macerozyme R-10	根霉	Yakult Honsha Co. Ltd., Tokyo, Japan
Pectinase	黑曲霉	Sigma Chemical Co.
Pectolyase Y-23	黑曲霉	Seishin Pharm. Co. Ltd., Tokyo, Japan
半纤维素酶		
RhozymeHP-150	黑曲霉	Rohm and Hass Co., Rhiladelphia, UAS

酶	来源	生产厂家
纤维素酶类		
Onozuka R-10	绿色木霉	Yakult Honsha Co. Ltd., Tokyo, Japan
Cellulysin	绿色木霉	Calbiochem., San Diego, CA 92037, USA
Driselase	<i>Irpex lutens</i>	Kayowa Hakko Kogyo Co., Tokyo, Japan

## ● 酶液的配制

渗透压稳定剂

酶的配比及浓度



# 酶解液的组成及浓度

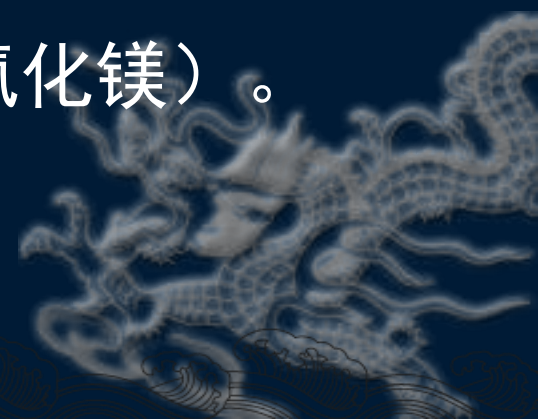
## (1) 酶的混合液

纤维素酶（1%-2% 浓度）、果胶酶（0.2%- 0.5% 浓度）等。

(2) 渗透稳定剂 促进酶解，保持原生质体的完整性。

甘露醇、山梨醇、葡萄糖等，适宜的浓度为450-800 mmol/L。

(3) 盐类 增加膜的透性（氯化钙、氯化镁）。



## 酶组合、浓度

几种草本植物原生质体分离使用的酶种类及浓度(%)

材料	纤维素酶	半纤维素酶	崩溃酶	果胶酶	离析酶	蜗牛酶	研究者
烟草叶片	1.0				0.1~0.2		Uchimiya
禾谷类叶片	2.0	1.0			0.5		Scott
油菜花粉	1.0			1.0			李仕琼
马铃薯子叶	1.0				0.5		戴朝曦
马铃薯花粉			0.5			1.0	王蒂

## 几种木本植物原生质体分离使用的酶种类及浓度(%)

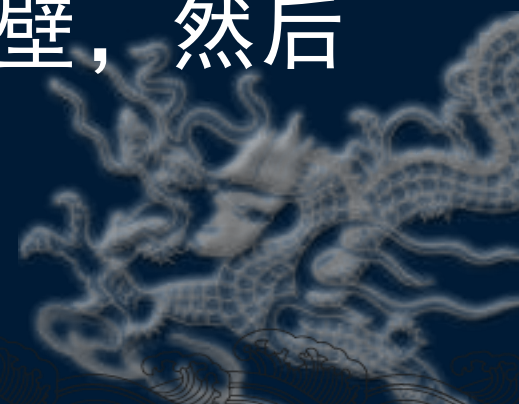
材料	纤维素酶	半纤维素酶	崩溃酶	果胶酶	离析酶	研究者
枸杞愈伤组织	0.5		0.2		0.2	孙勇如等
檀香幼叶	2.0	0.5	0.5	0.5		Lakshmi
檀香愈伤组织	1.0			0.5		Lakshmi
榆幼叶	0.1~0.2		0.05	0.01~0.03		Dorin
山毛榉幼叶	1.0			0.1	0.5	Ahuja
胡杨悬浮细胞	0.5	0.5		1.0	0.5	诸葛强

- 酶解法分离原生质体



两步分离法

用果胶酶离析植物组织，收集细胞，  
经洗涤后用纤维素酶解离细胞壁，然后  
获得原生质体。



- 酶解法分离原生质体

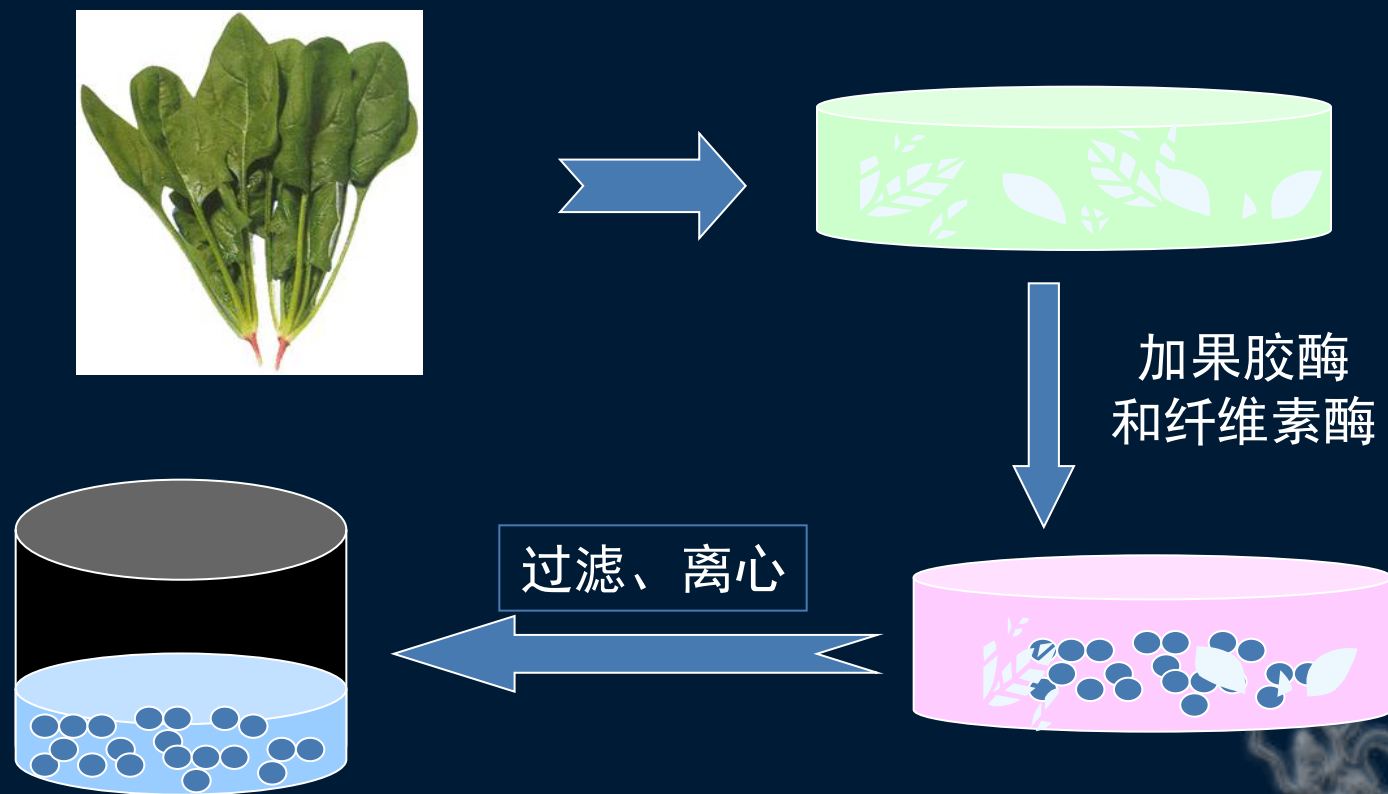
一步分离法

一定量的纤维素酶和果胶酶组成混合酶液，对材料进行一次性处理。





# 原生质体分离(一步分离)过程图示 (以叶片为例)



# 原生质体的分离具体步骤

## （一）取材（叶肉细胞）

充分展开的嫩叶。

洗涤、消毒、无菌水冲洗。

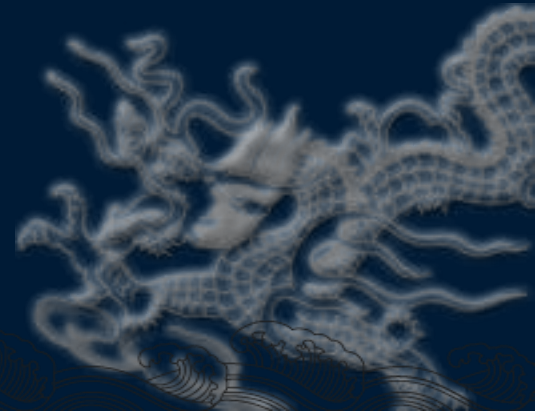
对禾本科植物叶片消毒时，使用苯烷铵  
(Zephiran) (0.1%)

- 酒精 (10%) 溶液漂洗5分钟效果最好。



## (二) 酶解

消毒后的材料→ 撕掉下表皮→ 修剪成2cm见方小块 → 置于6cm直径培养皿中(下表面朝下0.5g) → 加2ml酶解液→置于25-27℃下保持3-4小时左右→轻轻震荡→原生质体释出。



## 酶解法的优点

- (1) 能够容易地大量地得到原生质体
- (2) 条件温和，完整性好，有活力。
- (3) 几乎可以从任何组织（只要细胞还没有木质化）分离出原生质体。

现为最常用的进行原生质体分离的方法。



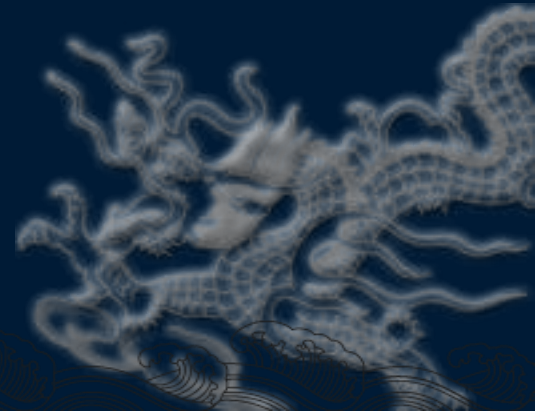
# 影响酶活性和酶解效果的因素

PH值：4.7-6.0之间

温度：植物所需温度为25-30 °C

时间：30分钟-20小时

用量：1g鲜组织用10ml酶解液的效果很好。



## 2. 原生质体纯化与活力测定

### 2.1 原生质体纯化

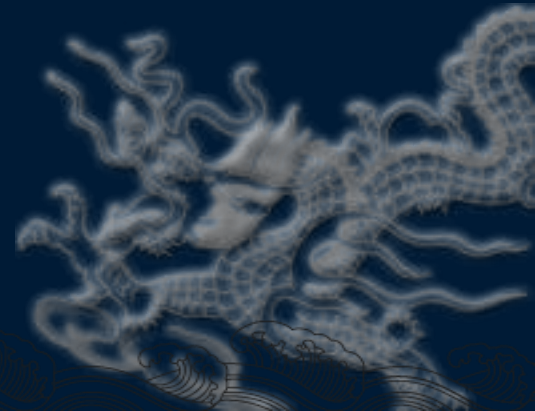
酶解后的混合物中除含有完整的原生质体外、亦含有亚细胞碎屑（线粒体、叶绿体、维管成分）、未被消化的细胞等，因而必须将这些杂质除去。

**初步筛选：** 利用**50-70 $\mu\text{m}$** 孔径的镍丝网过滤混合物，收集滤出液，做进一步的纯化。

# 原生质体纯化方法

离心沉淀法

漂浮法



## 2.1.1 离心沉淀法

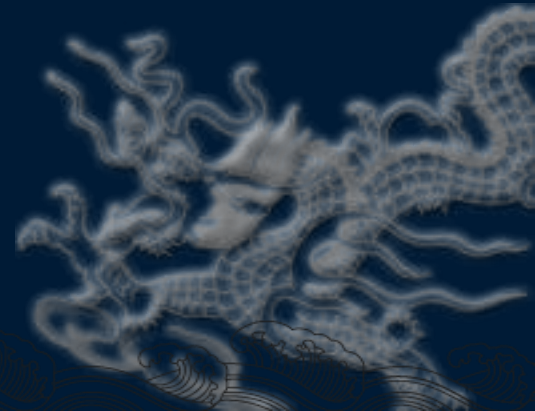
- **原理：**原生质体的比重大于溶液，离心后原生质体沉于底部。
- **步骤：**
  - (1) 原生质体溶液用400目网筛过滤。
  - (2) 离心（500-1000r/min，离心5-6min）
  - (3) 吸去上清液，洗涤液重新悬浮，再离心沉淀。如此2-3次。
  - (4) 用原生质体培养液洗1次，收集原生质体



# 离心沉淀法

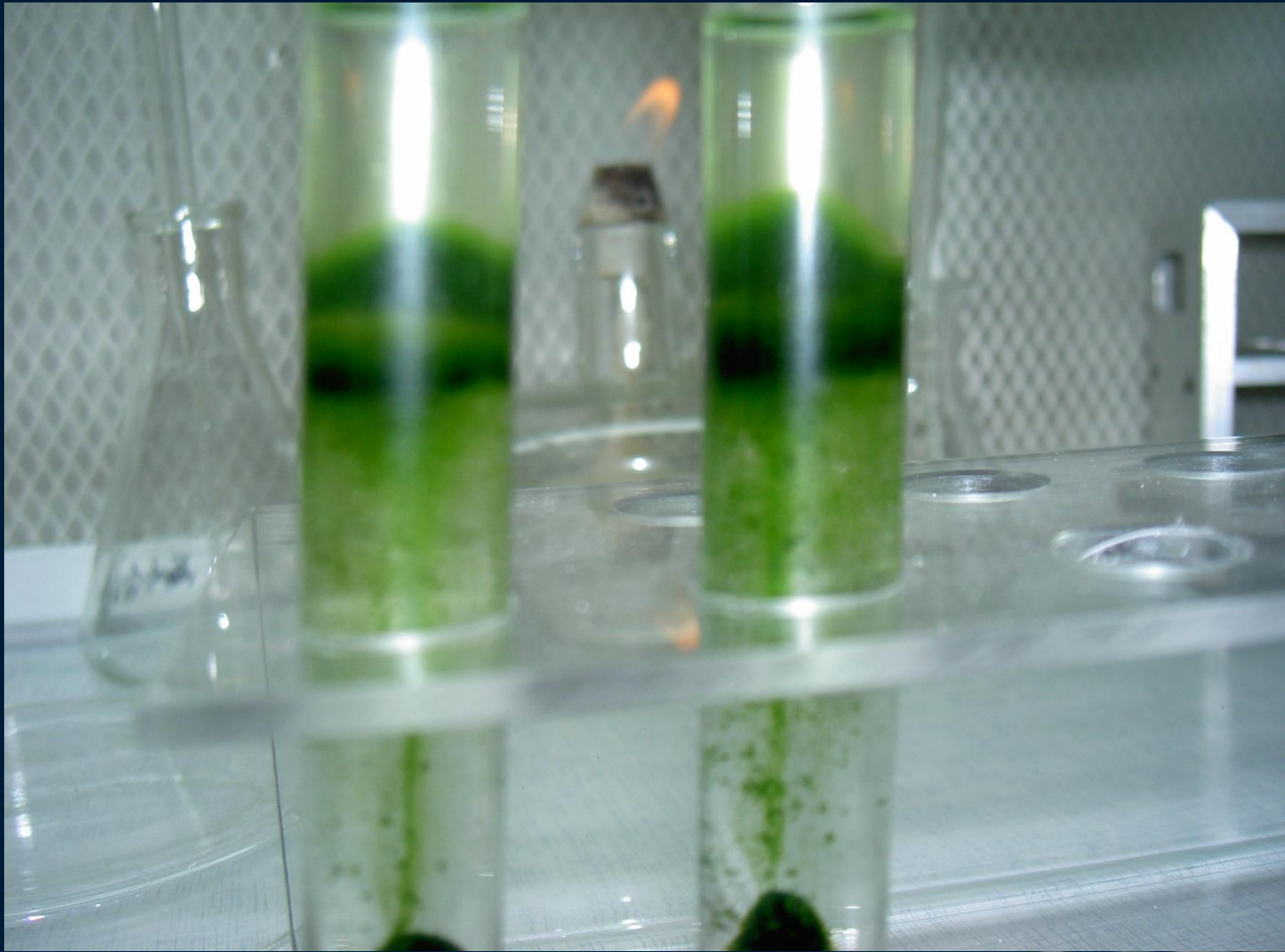
**优点：**纯化原生质体操作比较简单。

**缺点：**由于原生质体沉积于试管底部，造成相互挤压，常引起原生质体的破碎。



## 2.1.2 漂浮法

- **原理：**应用渗透剂含量较高的洗涤液（如蔗糖浓度21%比重大）使原生质体漂浮在液体的表面。
- **步骤：**
  - （1）400目网筛过滤。离心。
  - （2）吸取上层液，洗涤液重悬，离心沉淀。重复2—3次。
  - （3）收集溶液表面原生质体，用培养液洗1次



叶肉原生质体分离纯化（漂浮法）

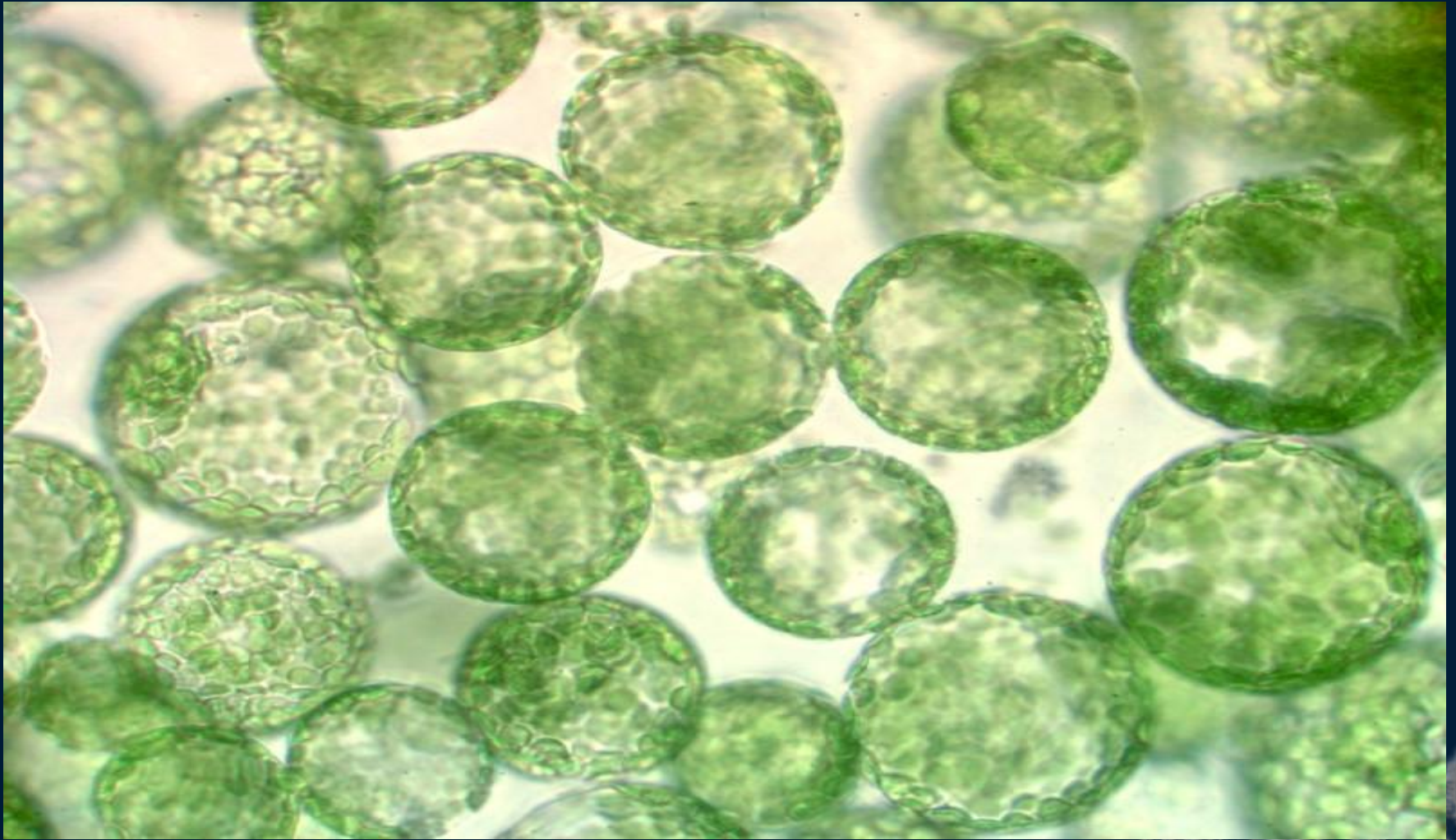
# 漂浮法的优缺点

## ❖ 优点：

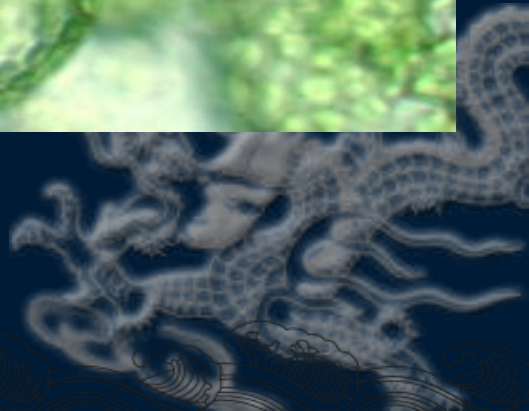
- ❧ 可以减少分离的原生质体因离心被组织碎片撞击而破损情况的发生。
- ❧ 所用药品简单，成本低。

## ❖ 缺点及补救措施：

对离心力要求比较严格，掌握不好，原生质体则不易漂浮。可采用不同浓度和不同离心速度分次漂浮的方法。

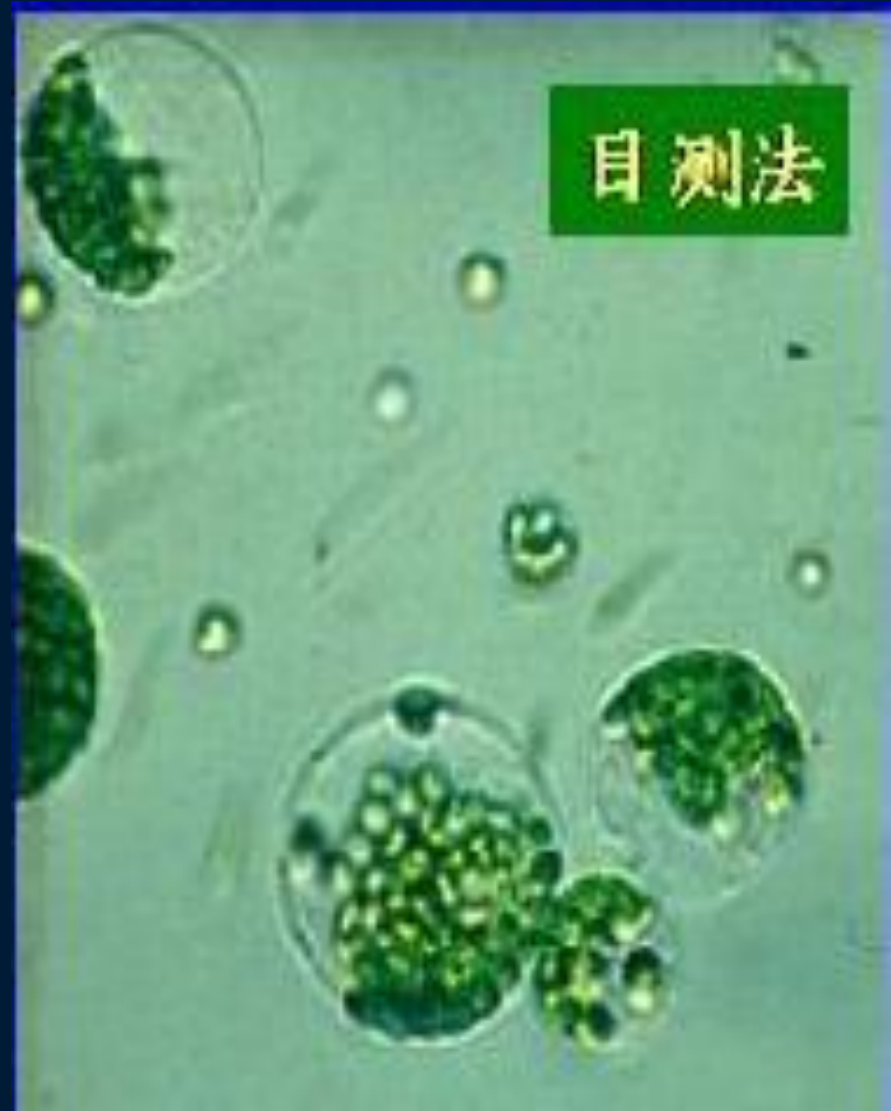


纯化后的叶肉原生质体



## 2.2 原生质体活力测定-形态识别法

- **形态识别法** 形态上完整，呈圆形，含有饱满的细胞质，颜色鲜艳的即为存活的原生质体。



## 2.2 原生质体活力测定-染色识别法

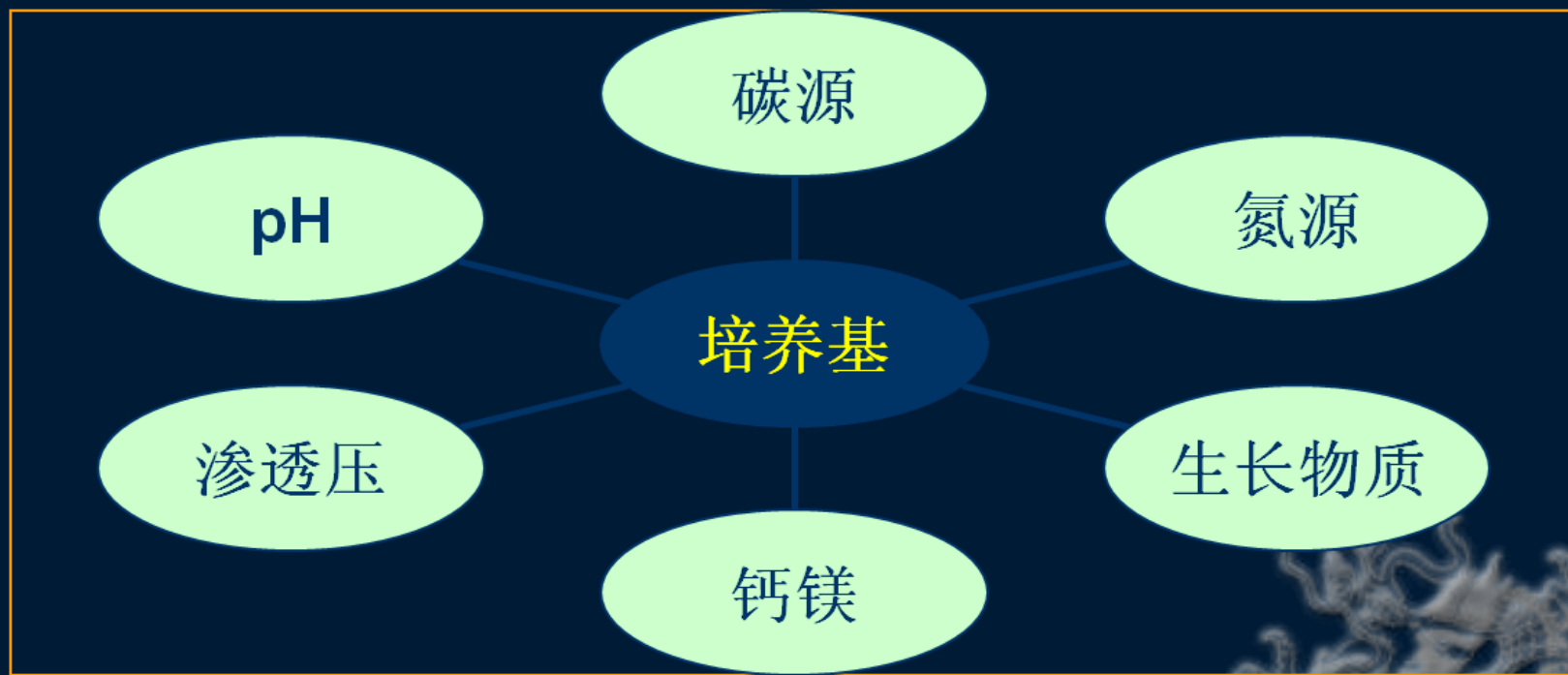
### ●染色识别法

- ✓ 0.1%酚番红或伊凡蓝染色：  
有活力的不被染色（无色），死亡的被染上色（红色）。
- ✓ 荧光素双醋酸酯（FDA，0.01%）染色法：  
在荧光显微镜下有荧光的即为有活性的原生质体。



# 第二节 原生质体培养

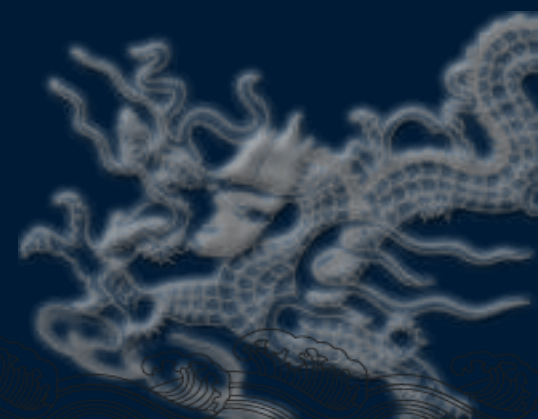
## 1. 培养基





- 碳源：葡萄糖
- 氮源：谷氨酰胺
- 生长物质：生长素与细胞分裂素
- 钙源：CaCl<sub>2</sub>可增强稳定性，提高分裂频率，明显改变细胞质内外的离子交换。
- 渗透压：高渗溶液，通常的渗透剂是甘露醇和山梨醇，调节渗透压。
- pH：5.6~6.0

## KM-8p培养基



## 2. 培养方法

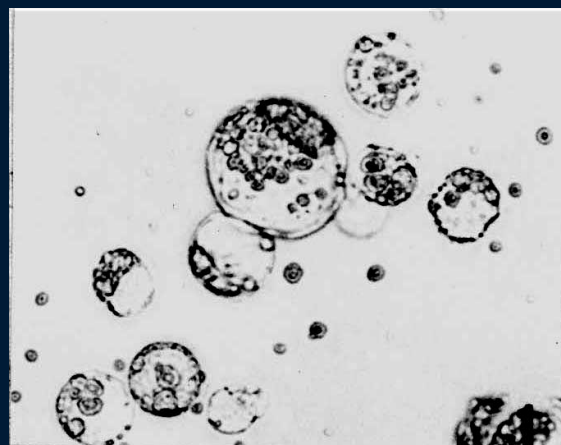
### 培养方法

液体浅层培养

平板培养法

双层培养法

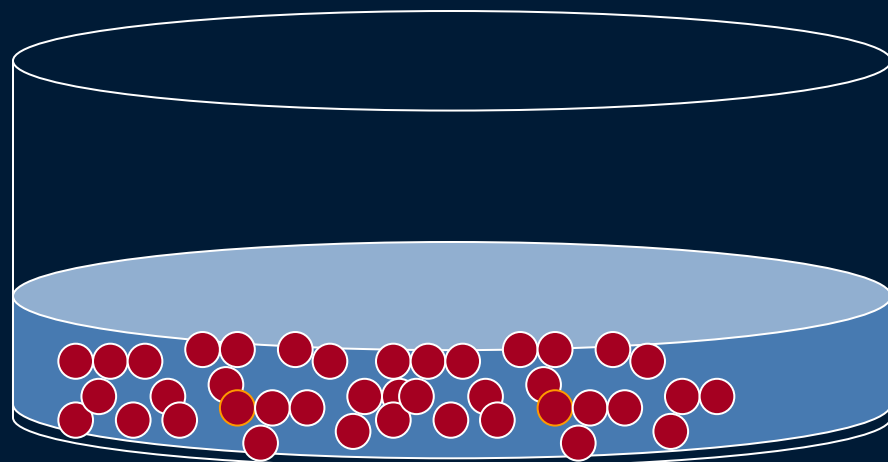
饲养层培养法



## 2.1 液体浅层培养

原生质体  
悬浮液

$10^5$ 个/ml



1mm厚液体培养基

# 液体浅层培养的优缺点：

## ❖优点：

吸收营养物质的能力强，表现出较强的细胞分裂能力；且易于添加新鲜培养基和转移培养物。

## ❖缺点：

分布不均匀，发生原生质体之间的粘连现象而影响生长和发育；难以跟踪观察某一个细胞的发育情况。

## 2.2 平板培养

原生质体纯化、离心、稀释后，再与1.4%琼脂（37°C左右）等体积混合成0.7%，培养于培养皿中。



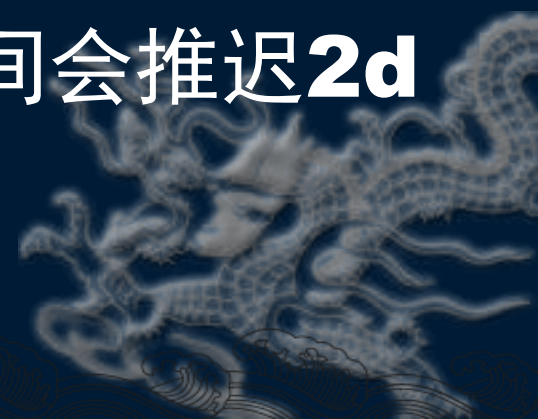
## 平板培养的优缺点：

### 优点：

原生质体处于固定位置，有利于对单个原生质体的细胞壁再生及细胞团形成的全过程进行定点观察

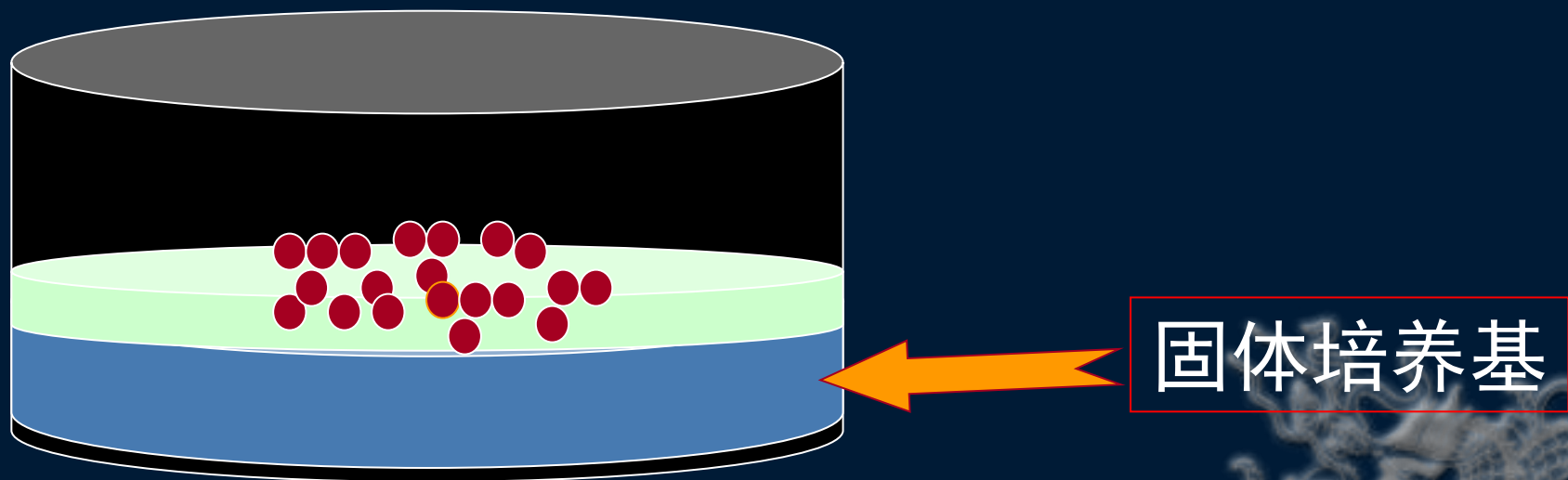
### 缺点：

通气状况不良，第一次细胞分裂时间会推迟**2d**左右。



## 2.3 双层培养法（固、液培养）

培养皿底部铺一层0.7%琼脂的固体培养基，在其上进行原生质体浅层培养。



# 双层培养法（固、液培养）的优缺点

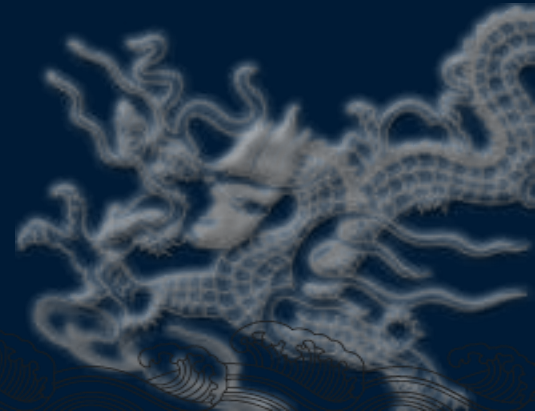
## 优点：

固相培养基可以补充液相培养基的营养；

固相中如果加入活性炭，可吸收培养物释放的有毒物质。

## 缺点：

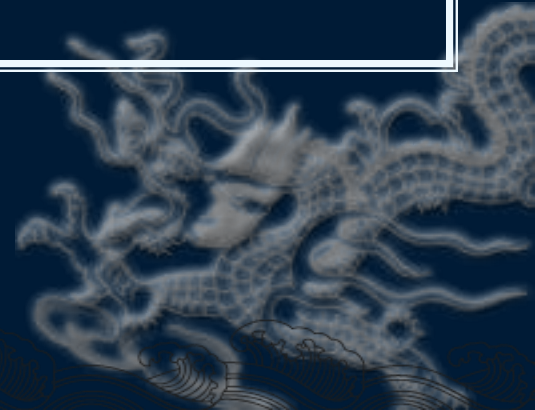
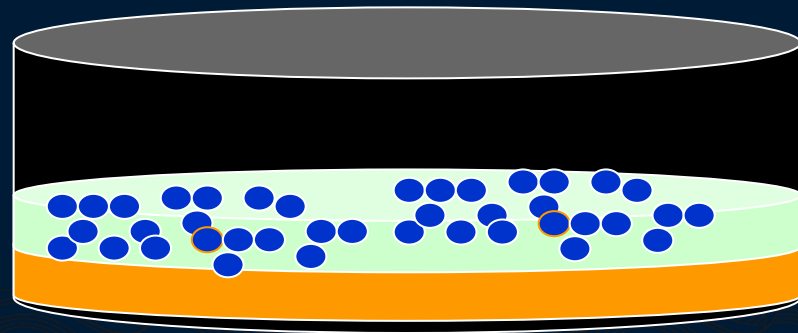
不易观察细胞的发育过程。





## 2.4 饲养层培养

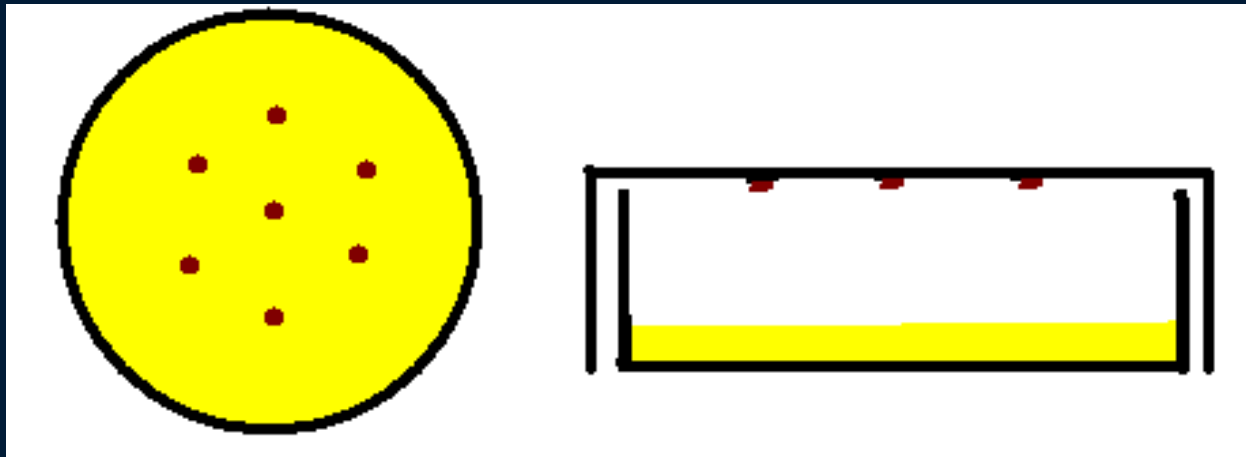
X-射线杀死某种植物细胞中的核，但细胞可正常代谢，与0.7%琼脂混合，在培养皿中铺成平板，作为**饲养层（固体）**，再将要培养的生活力正常的原生质体与0.7%琼脂混合（**液体**），培养于饲养层上。



## 2.5 微悬滴法培养

**方法：**吸取原生质体的悬浮液，滴于6cm直径的培养皿的盖上，液滴大小 20-50 $\mu$ l左右，悬滴培养。原生质体在液滴的中央生长。

为了防止培养基迅速蒸发，可以在培养基的底皿里加液体培养基保湿。



### 3. 培养条件

培养基：KM-8p培养基

培养温度：25℃—27℃，

暗培养：最初两周暗培养（壁的形成和细胞再生）；

光培养：分化时补充光照培养（光照16h/d，注意KM-8p在强光下对植物有毒）最初几天经常摇动，以助透气。

# 原生质体再生过程

原生质体



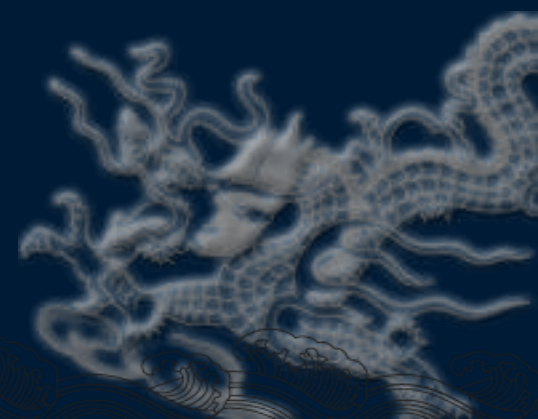
完整细胞（有细胞壁）



细胞分裂和愈伤组织或胚状体形成

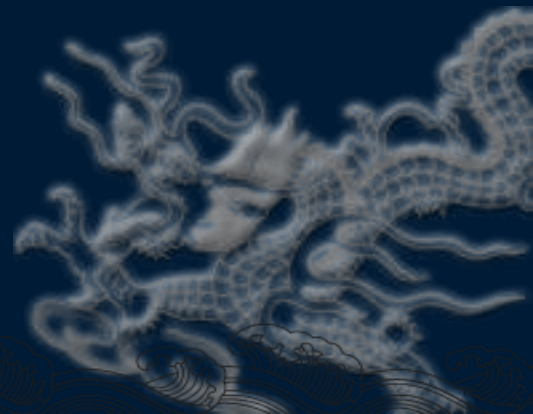


植株再生



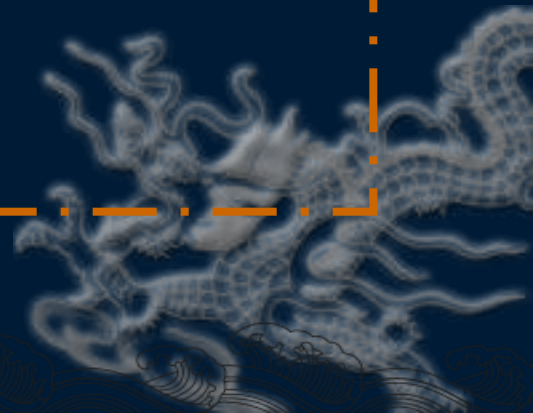
## 第三节 原生质体融合

**原生质体融合：** 也叫做**体细胞杂交**，即用分离出来的不同亲本的原生质体，在人工控制条件下，相互融合成一体，形成杂种细胞，并进一步发育成杂种植株的技术。



# 1. 原生质体融合的意义

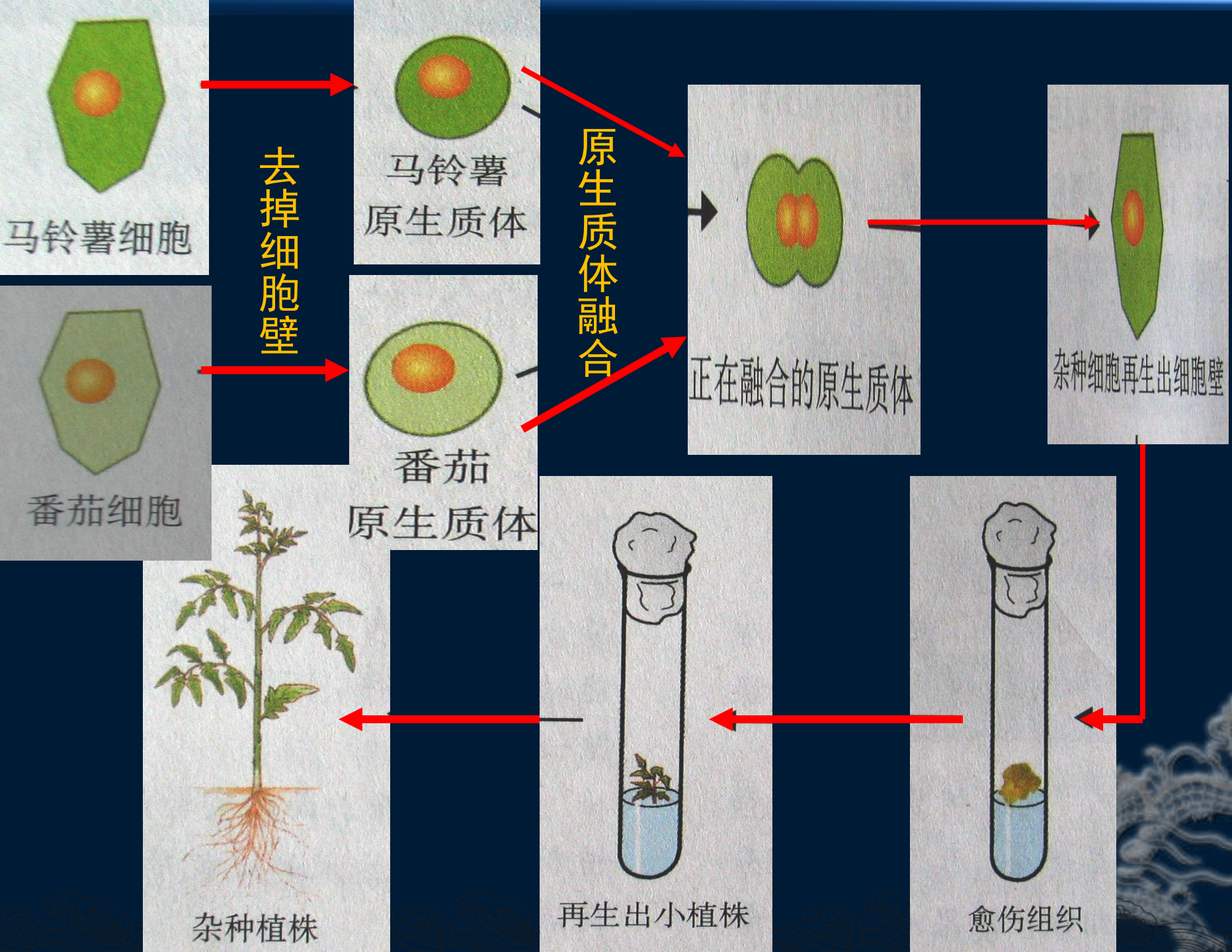
- 克服远缘杂交不亲合
- 克服生殖器官败育
- 克服双亲花期不遇
- 对品种的改良，培育新品种



# 番茄+马铃薯



1978年梅歇尔斯



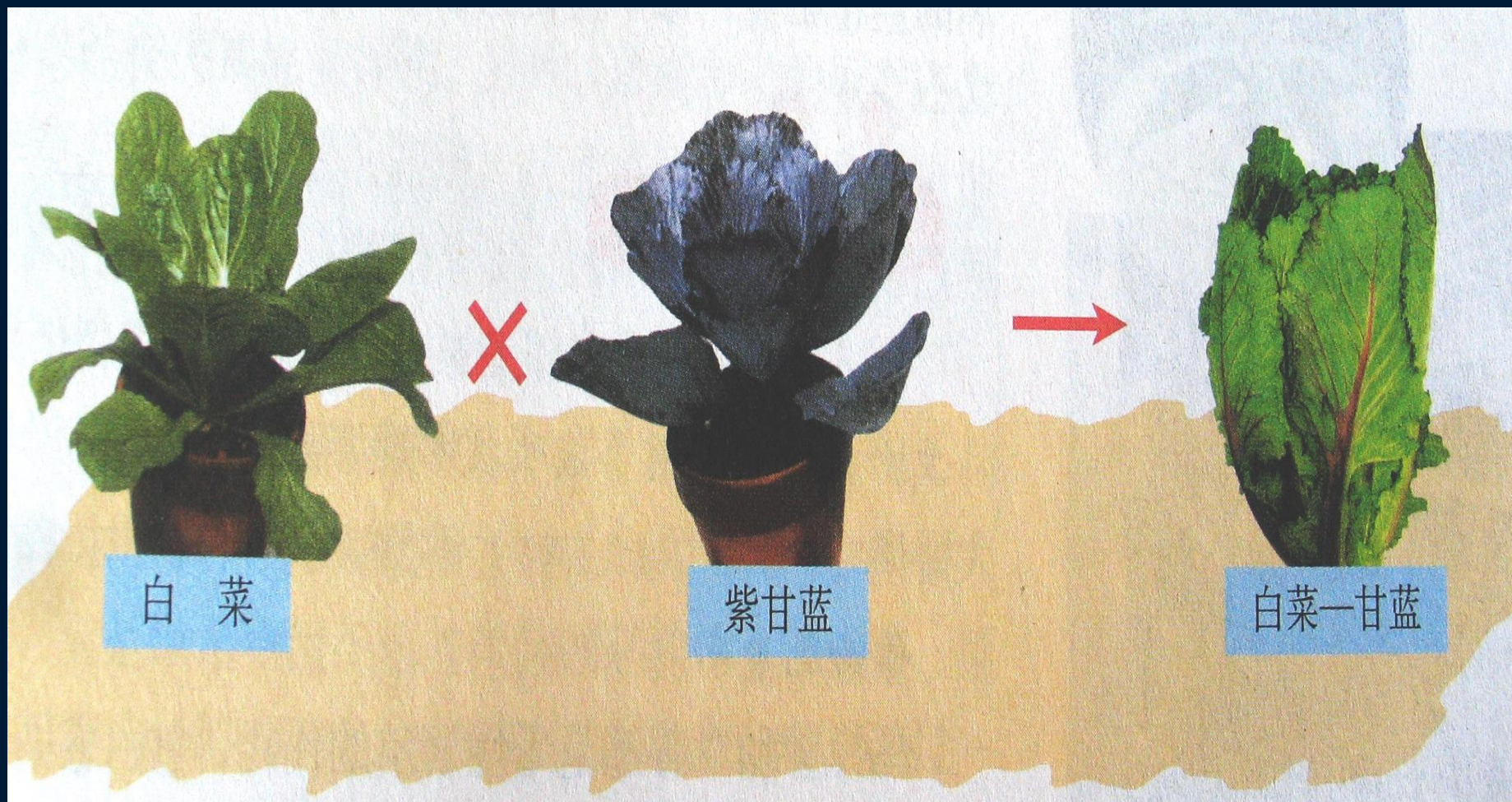


## ❖ 失败主要原因：

两种生物的基因表达不是孤立的，它们之间是相互调控、相互影响的，杂交株具有两个物种的遗传物质，但表达互相干扰。



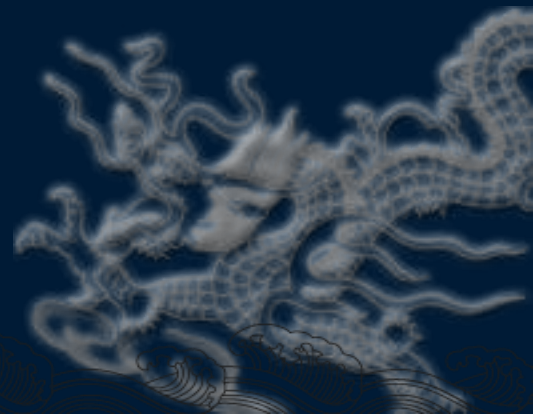
# 成功案例



白菜—甘蓝

## 2. 原生质体融合方法

- 无机盐诱导融合
- 电融合技术
- 高钙高PH法



## 2.1 无机盐诱导融合：NaNO<sub>3</sub>法

- 1972年：Carlson用此方法诱导原生质体融合获得首例杂种植株——粉蓝烟草和朗氏烟草体细胞杂种。

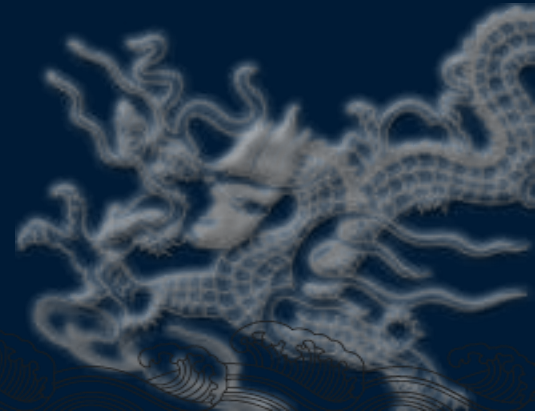
**NaNO<sub>3</sub>的作用：**中和原生质膜的**负电荷**，使原生质体不再相互排斥，而紧密结合在一起。此方法诱导频率不高（诱导融合率0.1%）。

## 2.2 电融合技术

Senda 1979年首先用此方法实现原生质体融合（融合率20%左右）

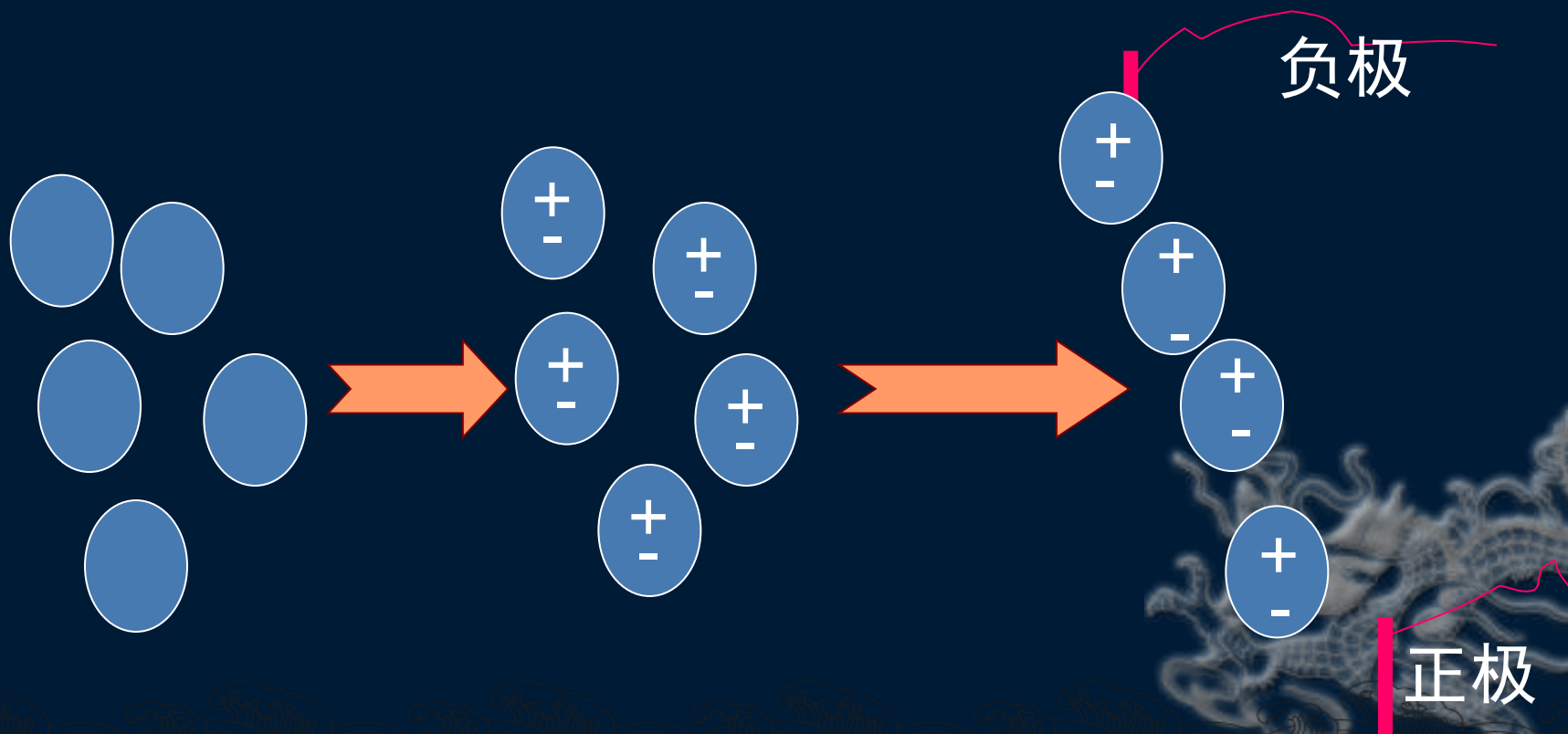


细胞融合仪

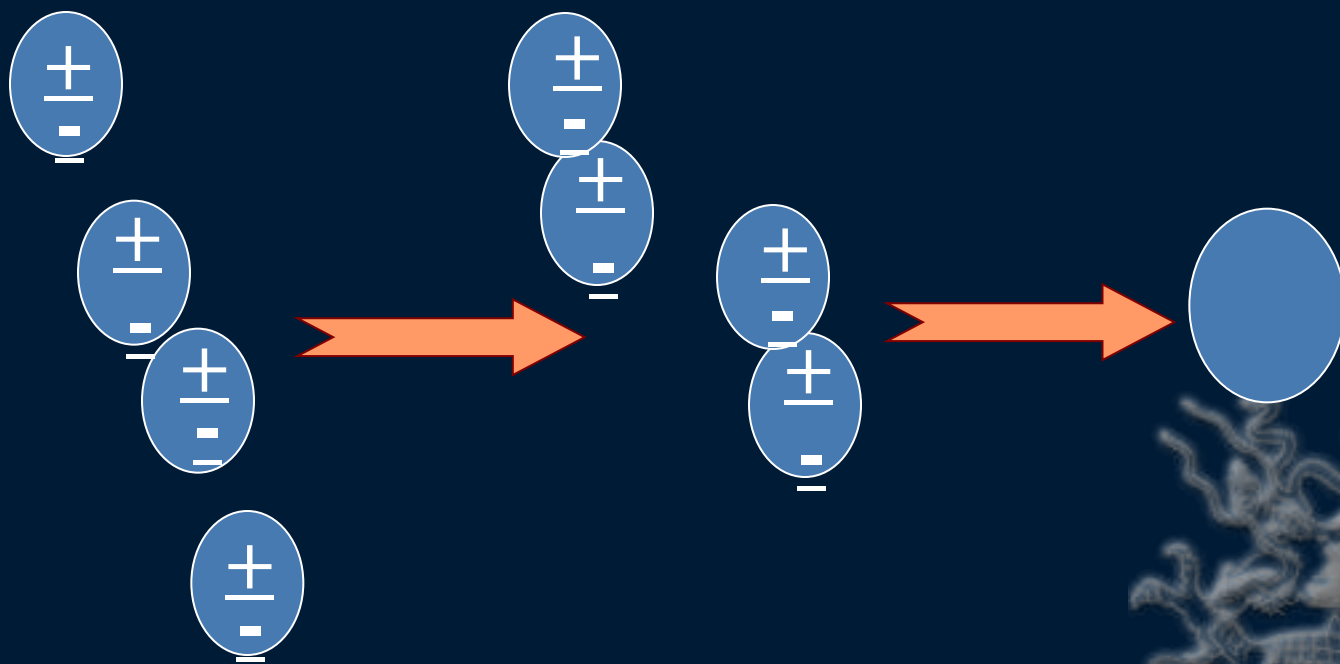


## ● 电融合法原理

交流电场使原生质体表面电荷偶极化，沿着电极排列，形成串珠。



施加直流电场后，形成串珠的原生质体在质膜接触处发生穿孔，开始遗传物质的交流。

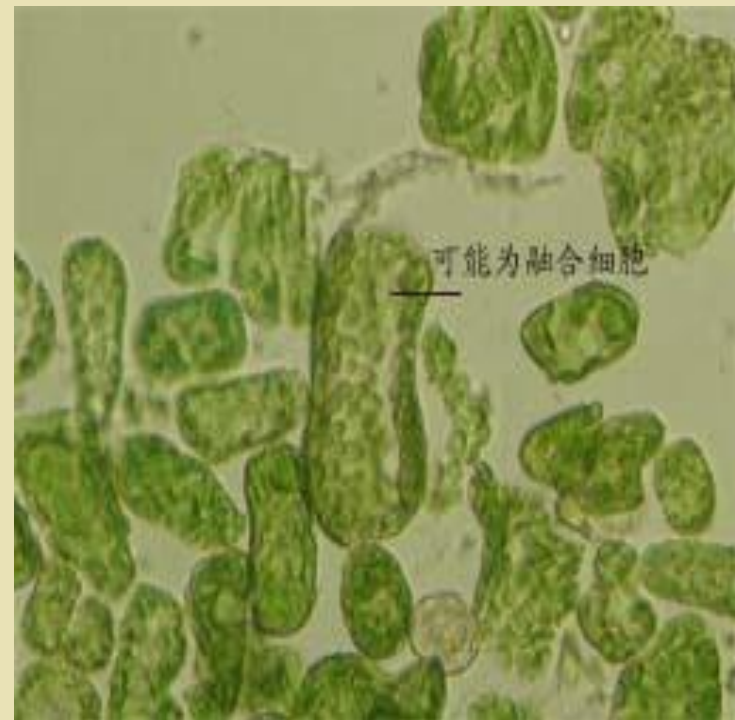


# 电融合法原生质体的融合结果

◆ 原生质体成串 (40×)



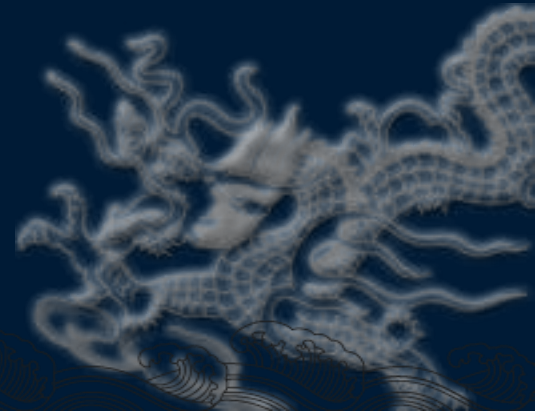
◆ 原生质体融合 (图1)





## 2.3高钙高PH法

高钙离子可促进质膜的流通性，从而促进原生质体融合，而高PH可改变质膜的表面电荷有利于融合。融合率为20%-50%。

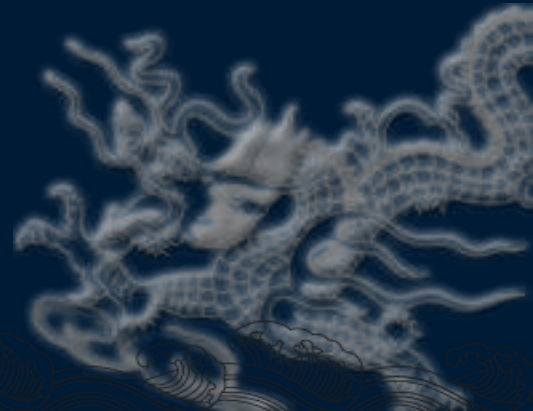


# 3. 杂种细胞筛选与鉴定

## 杂种细胞的筛选方法

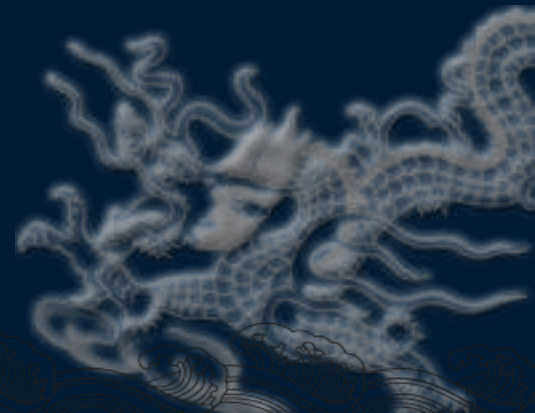
- 互补选择法

- 双荧光标记选择法



- 互补法筛选

利用2个亲本对培养基成分、抗代谢物、或温度等的敏感性存在着天然的互补性进行选择叫互补法选择。



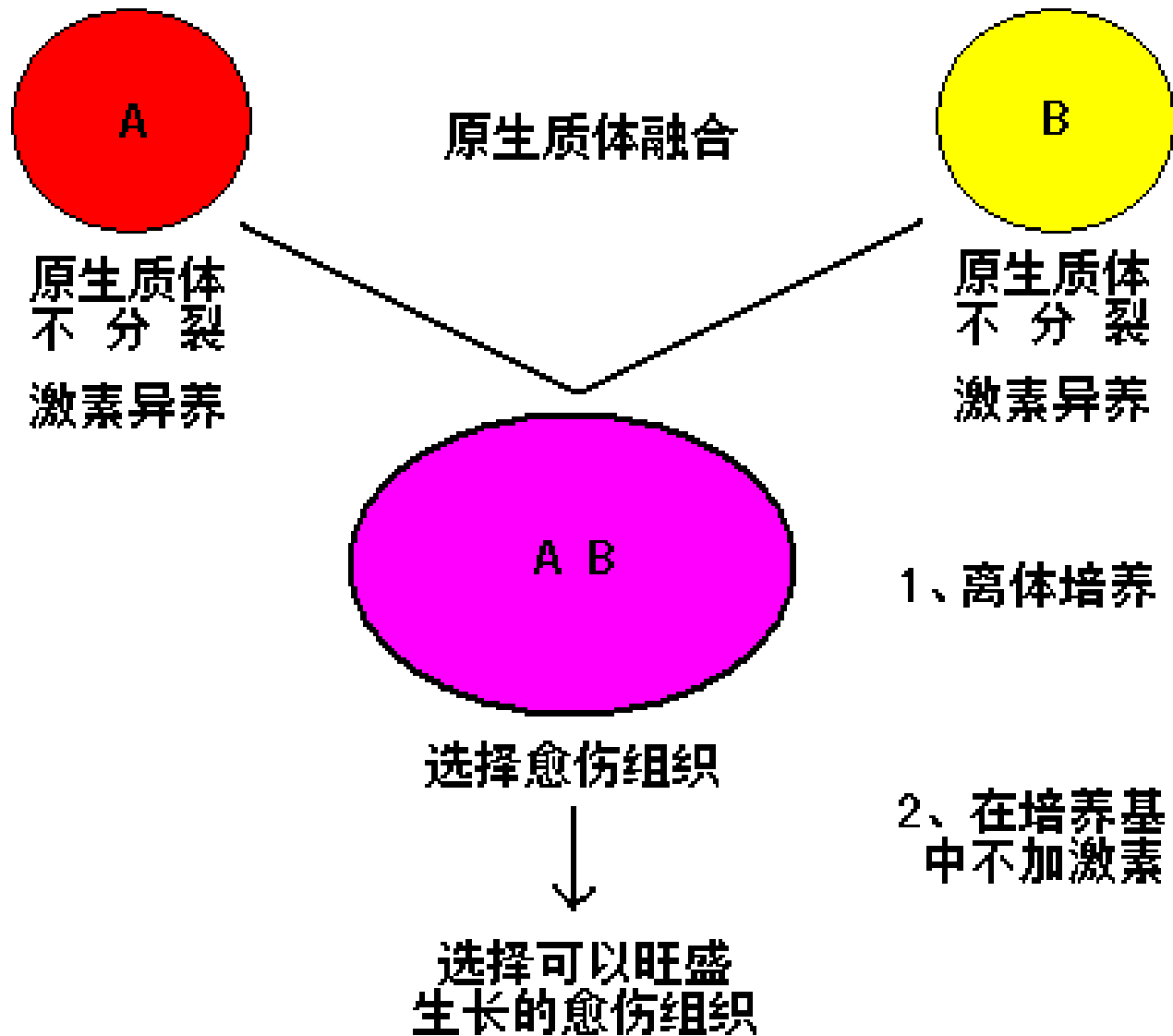
## (1) 激素自养型筛选

粉蓝烟草和郎氏烟草的野生型叶肉细胞原生质体是激素异养型细胞，且原生质体不分裂；

杂种细胞是激素自养型细胞，且在没有激素的培养基上可以旺盛分裂。

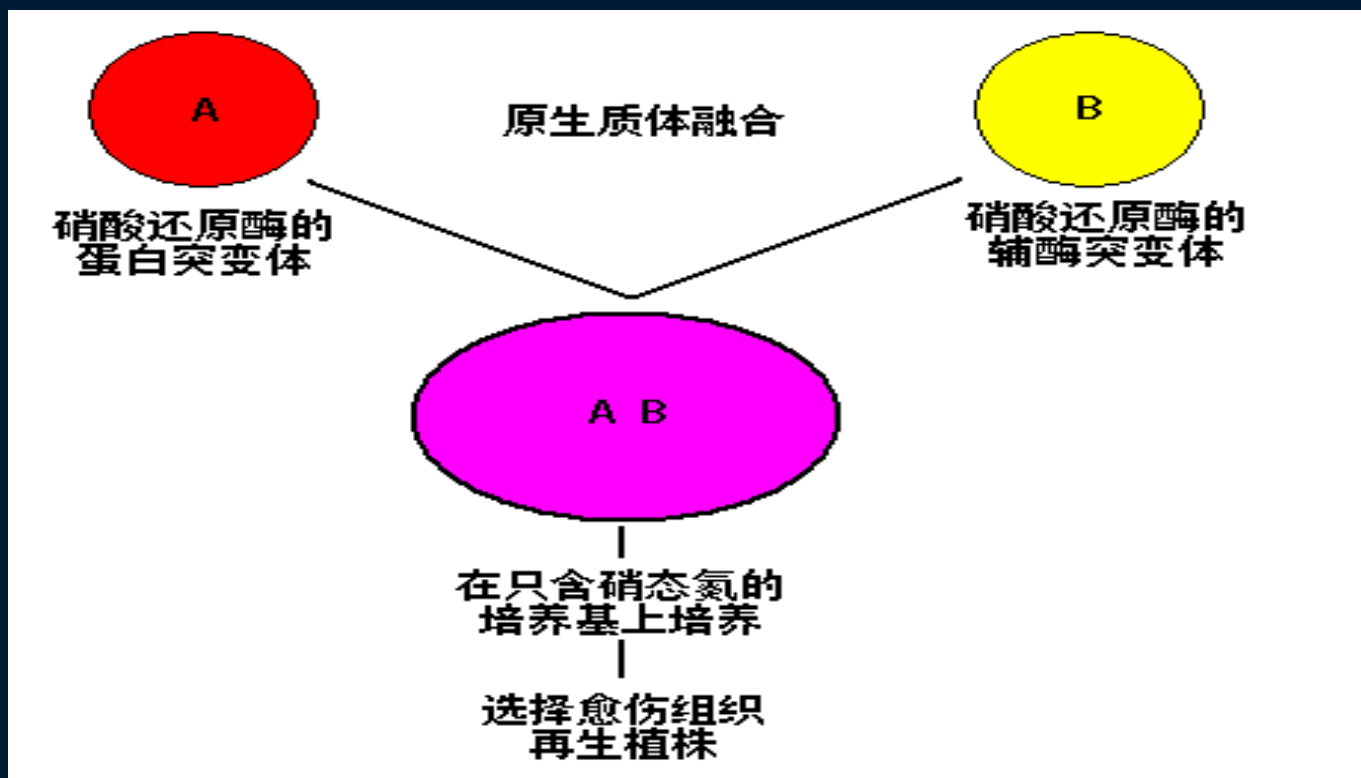
使融合产物在不含激素的培养基上培养，能够产生细胞团的就是融合的原生质体。

# 两步法激素自养型筛选



## (2) 营养缺陷型互补筛选

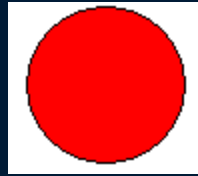
- 硝酸还原酶的蛋白突变体和辅酶突变体，突变体不能利用硝态氮，只能利用铵态氮。
- 两者的突变位点不同，原生质体融合后，硝酸还原酶恢复，可以利用硝态氮。



### (3) 利用对抗代谢物质的敏感性互补进行筛选

*Petunia parodii*

矮牵牛1



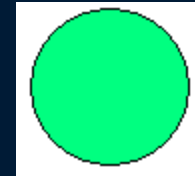
在 MS 培养基中只  
形成很小的细胞团，  
不能进行生长



加入1 $\mu$ g/L放线菌素-D，  
原生质体的分裂不受影响

*Petunia hybrida*

矮牵牛2



在 MS 培养基中  
可以形成肉眼可  
见的愈伤组织团



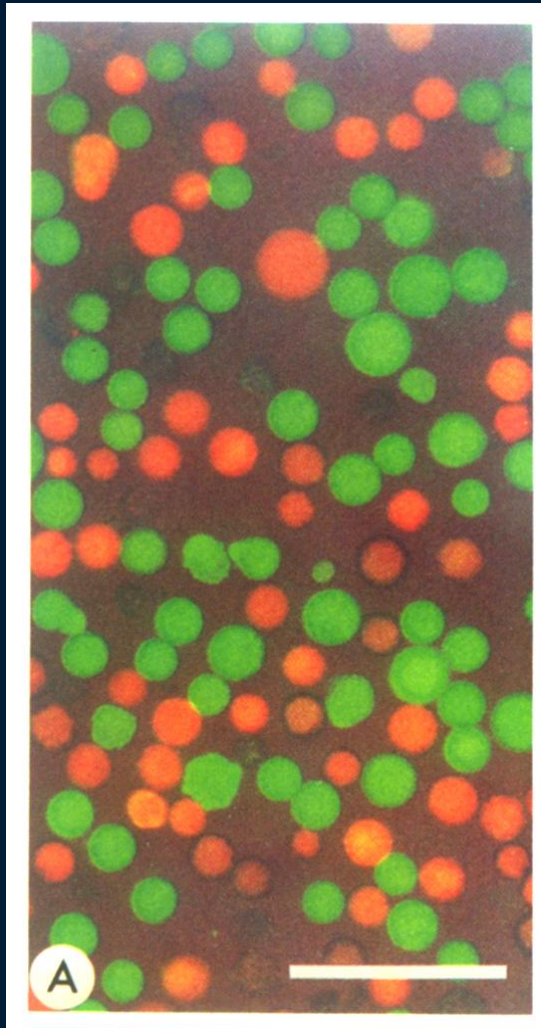
加入1 $\mu$ g/L放线菌素-D，  
原生质体完全不能分裂



原生质体融合

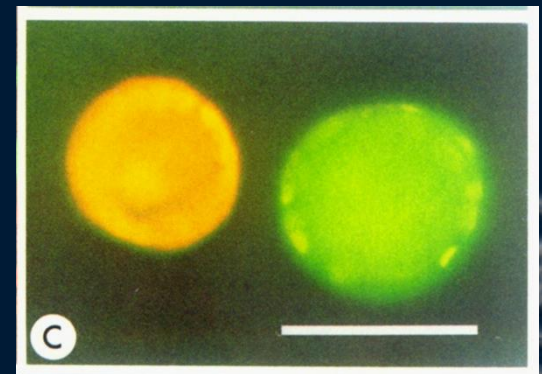
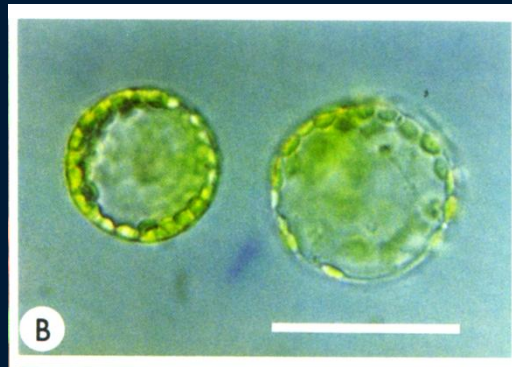
在加入1 $\mu$ g/L放线菌素-D的培养基中培养，  
能够进行生长的愈伤组织即为体细胞杂种

# ● 双荧光标记选择法

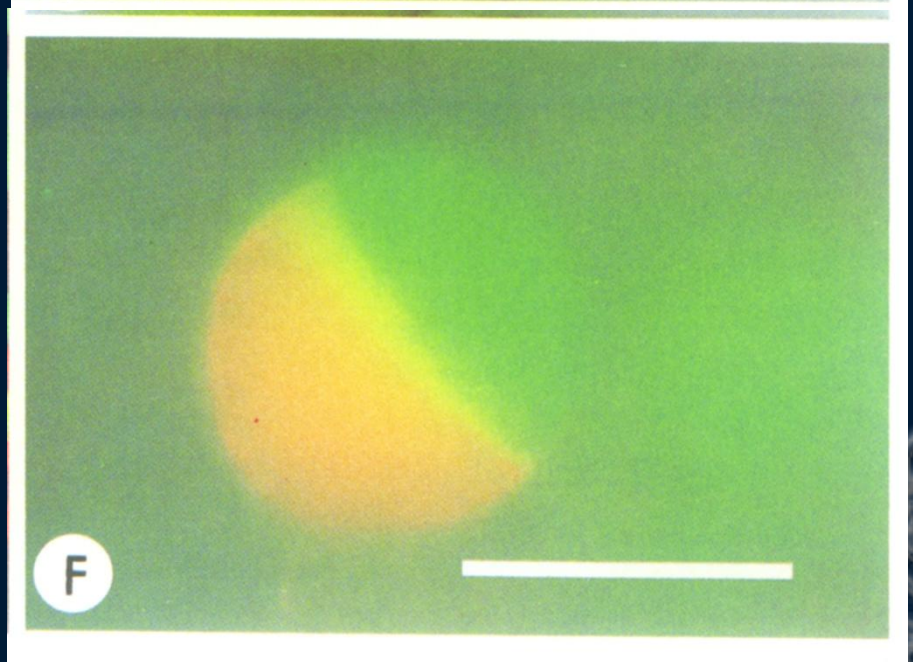
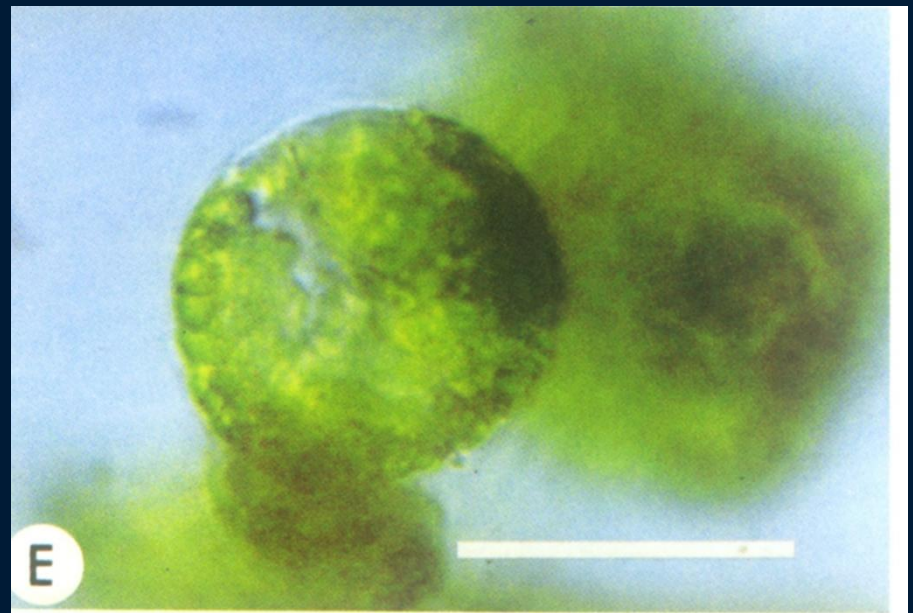
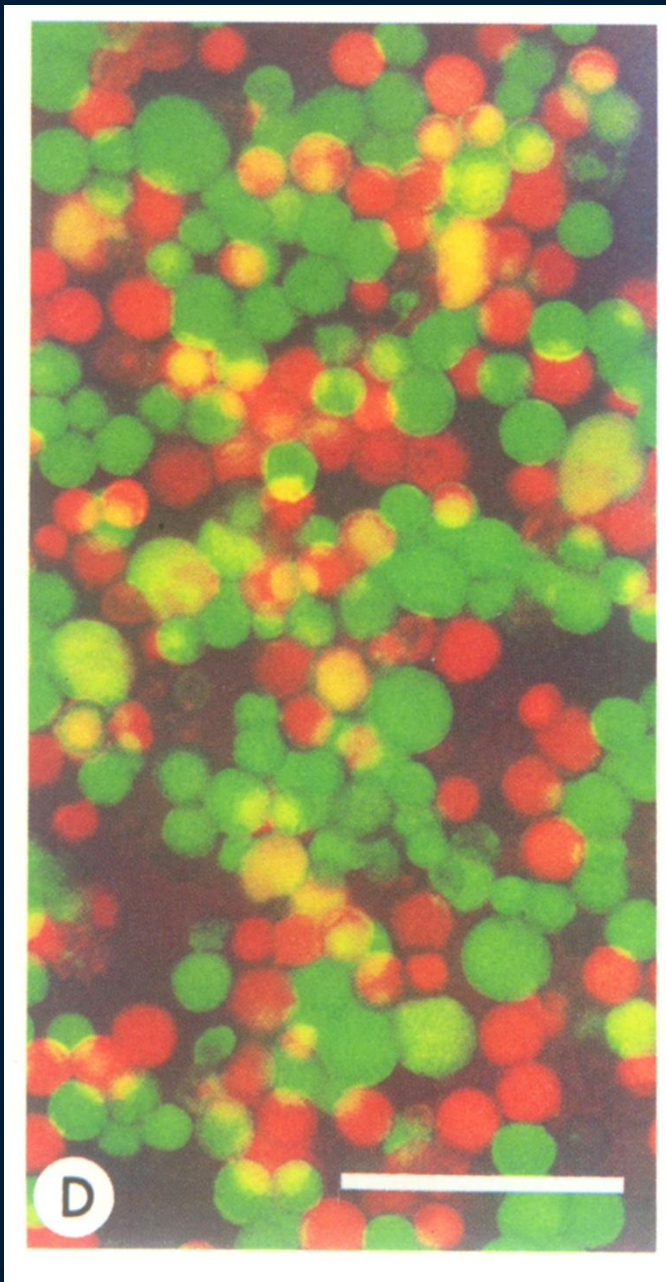


异硫氰酸荧光素 (FITC) : 绿色

异硫氰酸罗丹明 (RITC) : 红色

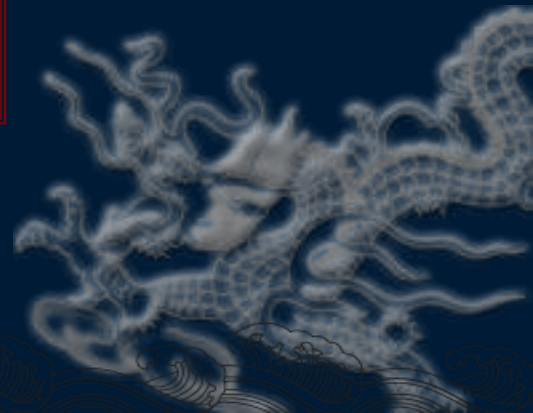




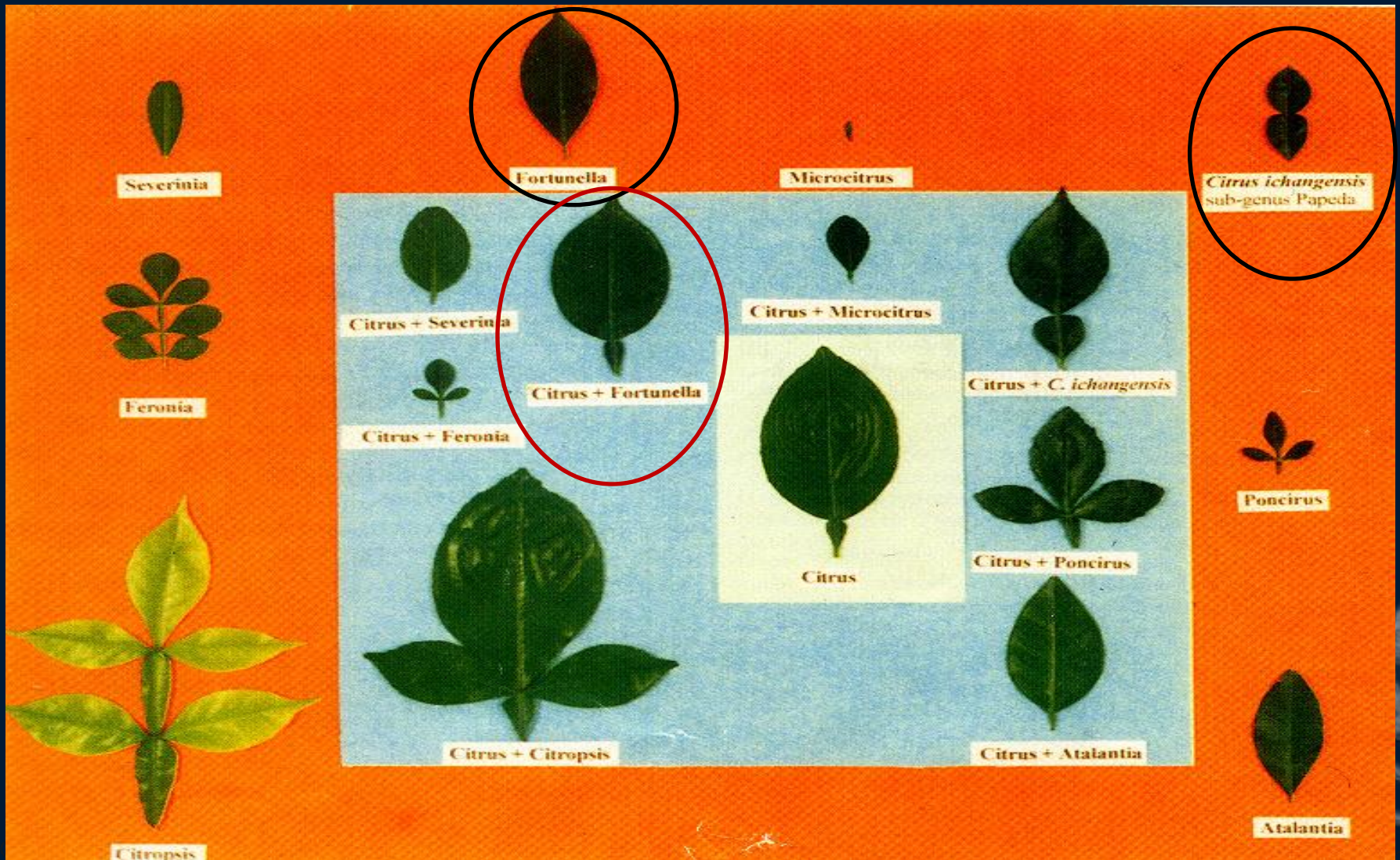


## 4. 体细胞杂种植株的鉴定

- 形态学鉴定
- 细胞学观察
- DNA图谱分析
- 同工酶分析

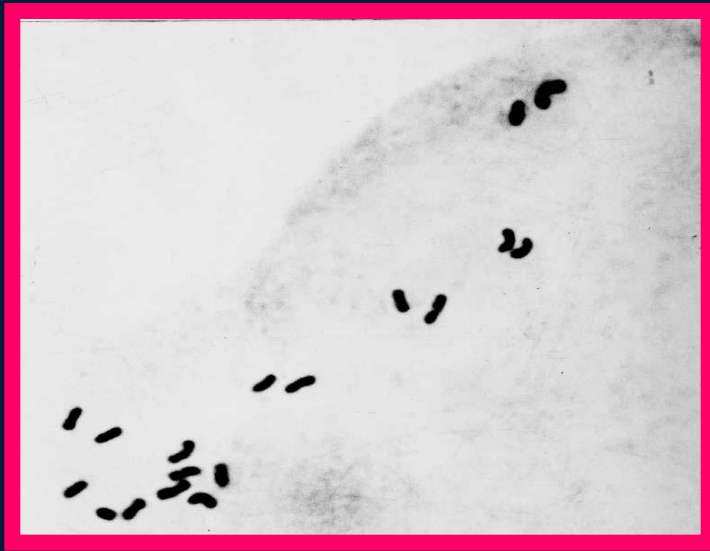


# 4.1 形态学鉴定



## 4.2 细胞学观察

### 染色体形态和数目的比较

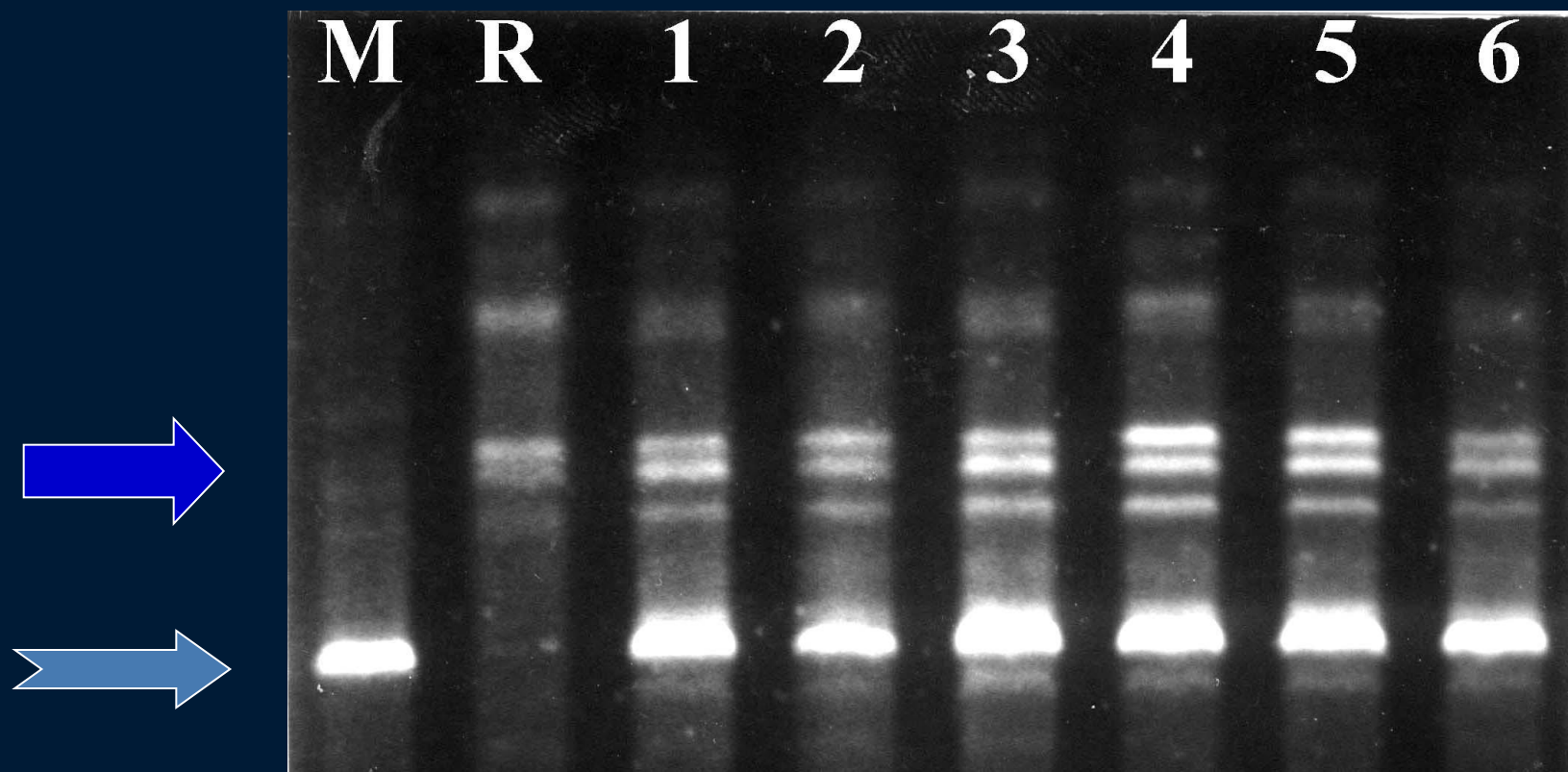


18条染色体



36条染色体

## 4.3 DNA图谱分析

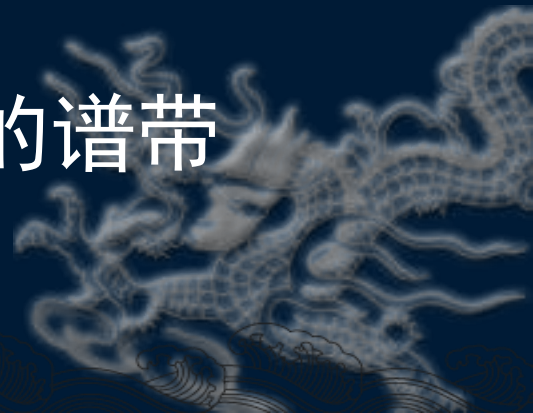


RAPD（随机扩增的多态性DNA）带型

## 4.4 同工酶谱分析

将体细胞杂种的同工酶谱与其双亲的酶谱比较：

- ✓ 杂种植株的酶谱可能是双亲酶谱带的总和
- ✓ 可能只出现双亲的部分酶带
- ✓ 或缺少双亲的某些酶谱而出现新的谱带



# 本章总结

1. 原生质体的概念、原生质体的分离与纯化方法
2. 原生质体的培养方法
3. 原生质体融合的概念、原生质体融合的方法；  
杂种细胞的筛选与鉴定、杂种植株的鉴定的方法。

