

忍冬原生质体分离条件研究

刘颖, 郭明晔, 王朝阳, 白根本*

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] **目的:** 探讨忍冬原生质体分离的最佳条件, 为忍冬原生质体培养、细胞融合以及遗传转化提供大量优质的原生质体。**方法:** 分别对忍冬原生质体分离过程中的若干影响因子如: 酶液组成、酶解方式、酶解时间、酶解温度、渗透压进行比较分析, 以确定最佳的分离条件。**结果:** 确定了最优化的忍冬原生质体分离条件, 即以生长旺盛的疏松的忍冬愈伤组织作为分离原生质体所需材料, 以 1.5% 纤维素酶 + 0.25% 果胶酶作为分离原生质体所用酶液, 以含有 $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇作为渗透保护剂的细胞-原生质体清洗液 (CPW) 溶液进行酶液的配制, 于 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置条件下酶解 12 h。**结论:** 利用该实验所确定的忍冬原生质体最佳分离条件可获得大量优质的原生质体, 为后续忍冬细胞融合以及遗传转化等实验奠定良好的实验基础。

[关键词] 忍冬; 愈伤组织; 酶解; 原生质体分离

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0125-05

Researches on Isolation Conditions of Protoplasts of *Lonicera japonica*

LIU Ying, GUO Ming-ye, WANG Chao-yang, BAI Gen-ben*

(School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To find out the best isolation conditions of protoplasts of *Lonicera japonica*. **Method:** Some influence factors on isolation of protoplasts, such as composition of enzyme solution, methods, hours and temperature of enzyme dissolving, osmotic pressure, and so on, were compared and analyzed to find out the best conditions of protoplasts isolation of *L. japonica*. **Result:** The callus flourishing well of *L. japonica* was used as materials for protoplasts isolation. $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ mannitol + 1.5% cellulose Onozuka R-10 + 0.25% pectolase Yakult Y-23 was the best composition of enzyme solution, which was dissolved in cell protoplast wash medium (CPW) solution. 12-hour enzyme dissolving at $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ was the best methods of protoplasts isolation. And standing was better than shaking. **Conclusion:** Abundant and superior protoplasts of *L. japonica* can be obtained under the best isolation conditions that this study has found out which will give the necessary help for protoplasts culture, cell fusion and genetic transformation of *L. japonica*.

[Key words] *Lonicera japonica*; callus; enzyme dissolving; protoplasts isolation

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花, 具有清热解毒、凉散风热、广谱抗菌及抗病毒等功效, 临床上用于治疗多种疾病^[1-2]。据不完全统计, 全国的中医药方剂中有 1/3 都用到了金银花。此外, 金银花在营养保健方面也具有很大的开发应用潜力, 如以金银花

为材料已开发出金银花茶、金银花露等饮料以及牙膏、痱子粉等日用品, 深受市场欢迎。

近些年来, 对忍冬属植物的研究主要集中在药理药效以及化学成分分析等方面^[1-3]。而生物技术在忍冬属植物研究中的应用起步较晚, 多个领域的研究还比较缺乏。目前为止, 对于忍冬原生质体分离、培养以及融合等方面的研究尚属空白。植物原生质体是指除去细胞壁后, 被质膜包被的“裸露的细胞”^[4]。近些年来, 随着原生质体研究的深入开展, 发现原生质体在植物生理学、体细胞遗传学、基因工程以及作物育种等许多领域均具有很好的应用潜力。首先, 由于每个原生质体均具有该个体的

[收稿日期] 20120508(010)

[第一作者] 刘颖, 讲师, 博士研究生, 从事分子生药学研究, Tel: 010-84738646, E-mail: liuyliwd@vip.sina.com

[通讯作者] * 白根本, Tel: 010-84738646, E-mail: baigb@263.net

全部遗传信息,因此离体培养的原生质体给予适当的培养条件后仍具备分化再生完整植株的能力^[5]。且在原生质体再生植株的过程中较易发生无性系变异,对其进行人工理化诱导,则可在单细胞水平上筛选出有利用价值的突变体植株^[6]。其次,原生质体是遗传转化的理想受体材料,可以有目的的向原生质体中转入特定基因,从而改良植物的性状^[7]。再次,通过原生质体融合还可以克服远缘杂交的不亲和障碍,获得有价值的杂种后代^[8]。然而,以上所有原生质体的应用操作必须建立在原生质体有效分离,并获得大量优质的原生质体的基础之上。

本文以忍冬作为研究对象,从多个方面对其原生质体的分离进行了研究,并确定了最优化的分离条件,将为忍冬原生质体培养以及在此基础上开展的遗传转化、良种选育等研究提供大量优质的原生质体材料来源。

1 材料

1.1 植物 本实验室诱导并继代保存的生长旺盛且疏松的忍冬愈伤组织。

1.2 试剂 纤维素酶(Onozuka R-10)、果胶酶(Yakult Y-23)购于北京拜尔迪生物技术有限公司。

KH_2PO_4 , KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KI, 无水 CaCl_2 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 甘露醇等化学试剂均为分析纯,购于北京拜尔迪生物技术有限公司。

1.3 仪器 SW-CJ-1CU 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),MLS-3750 型高压蒸气灭菌锅(日本三洋电机公司),DHZ-D 型冷冻恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂),HPG-280BX 型光照培养箱(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司),Olympus 普通复式光学显微镜,Anke TGL-16G 离心机,Eppendorf 微量移液器。

2 方法

2.1 忍冬愈伤组织的继代培养 采用 6,7-V 培养基作为基本培养基,添加 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA, $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6 BA。每隔 30 d 继代培养 1 次。

2.2 不同酶液组合对忍冬原生质体分离的影响 用于原生质体分离的酶液成分如表 1 所示,各处理均用 CPW-13% 甘露醇溶液配制,经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌,备用。

将生长旺盛的疏松的忍冬愈伤组织转移至装有滤纸的无菌培养皿中,用接种勺将其拨散;准确称取愈伤组织 100 mg 12 份(每个酶液组合 3 个重复),装入无菌 1.5 mL eppendorf 管中;按照 10:1 的比例

表 1 忍冬原生质体分离所用各酶液组合 %

No.	纤维素酶 Onozuka R-10	果胶酶 Yakult Y-23
1	1.0	0.25
2	1.5	0.25
3	1.0	0.50
4	1.5	0.50

加入表 1 中各酶液,用 Parafilm 封口;置于 28 °C 恒温培养箱中,于黑暗条件下静置酶解 12 h;60 目细胞筛网过滤后,加入 5 mL CPW-13% 甘露醇溶液洗涤;将滤液收集于 15 mL 锥形离心管中,1 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min;弃上清,将沉淀用 8 mL CPW-25% 蔗糖溶液悬浮后,沿管壁缓慢在蔗糖层上面加入 2 mL CPW-13% 甘露醇溶液,800 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min;小心吸取界面上的原生质体悬浮液,置于另一离心管中,加入 5 mL CPW-13% 甘露醇溶液,1 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min;收集沉淀,重新溶于 1 mL MS 液体培养基或 CPW-13% 甘露醇溶液中;台盼蓝染色;血球计数板分别进行死活细胞计数;计算原生质体活力及产量。

2.3 不同酶解时间及酶解温度对忍冬原生质体分离的影响 以生长旺盛且疏松的忍冬愈伤组织作为实验材料,以表 1 中 2 号酶液作为实验用酶液,设置了 8,10,12,14 h 共 4 种酶解时间,25,28 °C 2 种酶解温度,共计 8 种处理,各处理分别进行 3 个重复。其他实验步骤同 2.2。

2.4 不同渗透压对忍冬原生质体分离的影响 以生长旺盛且疏松的忍冬愈伤组织作为实验材料,以 25 °C 作为酶解温度,设置了 7 种渗透压条件,即甘露醇 0.6,0.65,0.7,0.75,0.8,0.85,0.90 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,分别用含有以上浓度甘露醇的 CPW 溶液进行表 1 中 2 号酶液的配制,并作为实验用酶液,每种酶液各进行 3 个重复。其他实验步骤同 2.2。

2.5 缓慢振动酶解方式对忍冬原生质体分离的影响 以生长旺盛且疏松的忍冬愈伤组织作为实验材料,以表 1 中 2 号酶液作为实验用酶液,以 25 °C 作为酶解温度,考察 40 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 酶解方式下酶解 6,8,10,12 h 的酶解效果,每处理各进行 3 个重复。其他实验步骤同 2.2。

2.6 忍冬原生质体产量和活力的计算方法 本实验中采用台盼蓝染色的方法进行原生质体的死活鉴别,台盼蓝是一种酸性染料,其不容易穿过活细胞的质膜进入胞内,却能渗入到死细胞内。因此,利用台

盼蓝染液进行染色后,死亡的原生质体着色,而活的原生质体不着色,从而可以区分死活原生质体。

$$\text{原生质体活力} = \frac{\text{活的原生质体数}}{\text{原生质体总数}} \times 100\%$$

$$\text{原生质体密度(1 mL 原生质体悬液中的原生质体个数)} \\ = 4 \text{ 个大格中的原生质体数} \times 10^4/4$$

因为每种不同的处理均称取了 100 mg 的实验材料,所以当以个/gfw 表示原生质体产量时,计算方法如下:

$$\text{原生质体产量(个/gfw)} = \text{原生质体密度} \times 10$$

3 结果与分析

3.1 忍冬愈伤组织的继代培养 采用 2.1 中提供的培养基配方对忍冬的愈伤组织进行继代培养,愈伤组织生长旺盛、迅速,颜色为白黄色。随着继代次数的增加,愈伤组织会进一步疏松,可用于原生质体的分离。

3.2 不同酶液组合对忍冬原生质体分离的影响 不同酶液组合对忍冬原生质体分离的影响实验结果见表 2。

表 2 酶液成分对忍冬原生质体分离效果的影响

酶液组合	原生质体活力/%	原生质体产量/ $\times 10^5$ 个/gfw
1	85.1b	10.68c
2	89.5a	30.26a
3	77.3c	18.75b
4	79.3c	21.38b

注:多重比较采用 SSR 法,不同小写字母表示差异达到 $\alpha = 0.05$ 的显著水平(表 3~5 同)。

根据表 2 结果,发现无论原生质体活力还是原生质体产量,2 号酶液组合均要显著好于其他组合,原生质体活力可以达到 89.5%,而原生质体产量可以达到 30.26×10^5 个/gfw。因此,综合考虑原生质体产量和活力两个方面的因素,确定了 2 号酶液组合,即 1.5% 纤维素酶 + 0.25% 果胶酶为最佳酶液组合。

3.3 不同酶解时间以及酶解温度对忍冬原生质体分离的影响 在 25, 28 °C 条件下分别静置酶解 8, 10, 12, 14 h 后,忍冬原生质体的分离情况见表 3。

根据表 3 结果,发现随着酶解时间的延长,无论是在 25 °C 条件下,还是在 28 °C 条件下,忍冬原生质体的活力和产量均表现出先升后降的趋势。就原生质体活力而言,当酶解时间为 12 h 时,忍冬原生质体的活力达到最高峰,为 90% 左右,当酶解时间继续延长至 14 h 后,原生质体活力会有所下降。

就原生质体产量而言,25 °C 条件下,酶解 12 h

表 3 不同酶解时间以及酶解温度对忍冬原生质体分离的影响

酶解时间/h	25 °C		28 °C	
	原生质体活力/%	原生质体产量/ $\times 10^5$ 个/gfw	原生质体活力/%	原生质体产量/ $\times 10^5$ 个/gfw
8	81.2c	24.2b	88.4a	16.7c
10	85.8b	25.3b	89.7a	32.5a
12	90.4a	37.0a	90.1a	28.4b
14	85.9b	13.0c	81.6b	16.5c

忍冬原生质体的产量可以达到峰值,为 37.0×10^5 个/gfw,而在 28 °C 条件下,酶解 10 h 忍冬原生质体的产量即可达到峰值,为 32.5×10^5 个/gfw。因此,当酶解温度较高时,可适当缩短酶解的时间。

综上,在 25 °C 条件下酶解 12 h,或者在 28 °C 条件下酶解 10 h 均能取得较好的效果,但二者相比较,前者更好。

3.4 不同渗透压对忍冬原生质体分离的影响 采用含有不同浓度甘露醇的 CPW 工作液进行酶液配制,以考察不同渗透压对忍冬原生质体分离的影响,结果见表 4。

表 4 不同渗透压对忍冬原生质体分离的影响

甘露醇浓度/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	原生质体活力/%	原生质体产量/ $\times 10^5$ 个/gfw
0.60	80.7c	32.59a
0.65	78.5d	31.75a
0.70	85.6b	31.75a
0.75	87.6a	29.72b
0.80	88.3a	28.45b
0.85	87.0a	19.31c
0.90	73.0e	10.67d

根据表 4 结果,发现随着甘露醇浓度的递增,忍冬原生质体的活力基本上呈现出先升后降的趋势,而原生质体的产量则出现递减的趋势。

就原生质体活力而言,当甘露醇浓度递增至 $0.80 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时出现峰值,为 88.3%,此后甘露醇浓度继续增加,而原生质体活力则开始下降。

就原生质体产量而言,当甘露醇浓度为 $0.60 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时产量最高,为 32.59×10^5 个/gfw,随着甘露醇浓度的递增,原生质体产量逐渐下降,当甘露醇浓度为 $0.90 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,原生质体产量降至最低,为 10.67×10^5 个/gfw。

根据镜下观察到的现象,发现较高的甘露醇浓度的确不能很好的起到原生质体的渗透保护作用,会造成原生质体的破坏。

综上,同时考虑原生质体活力及产量两个方面的因素,认为甘露醇浓度为 $0.70 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时有利于忍冬原生质体的分离。

3.5 缓慢振动酶解方式对忍冬原生质体分离的影响

在 $40 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 缓慢振动条件下进行忍冬原生质体的分离,酶解时间分别为 6, 8, 10, 12 h, 结果见表 5。

表 5 缓慢振动酶解方式对忍冬原生质体分离的影响

转速 / $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$	酶解时间 / h	原生质体活力 / $\%$	原生质体产量 / $\times 10^5 \text{ 个/gfw}$
40	6	71.3c	11.96c
40	8	84.1a	17.07b
40	10	85.6a	21.75a
40	12	79.9b	17.87b

根据表 5 结果,发现随着酶解时间的延长,忍冬原生质体的活力和产量均呈现出先升后降的趋势,且均在 $40 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 酶解 10 h 时达到峰值,原生质体活力为 85.6%,产量为 $21.75 \times 10^5 \text{ 个/gfw}$ 。

但是,与表 3 中静置酶解的效果相比较,发现无论在原生质体活力方面还是在原生质体产量方面, $40 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 缓慢振动条件下酶解的效果均比不上静置酶解的效果,静置酶解原生质体活力可以达到 90% 左右,而产量更是可以高达 $37 \times 10^5 \text{ 个/gfw}$ 左右。因此,确定 $40 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 酶解方式并不适合于忍冬原生质体的分离。

4 小结与讨论

从酶液组合、酶解时间、酶解温度、渗透压以及酶解方式 5 个方面对忍冬原生质体的分离进行了研究,并确定了最优化的分离条件,即以多次继代后生长旺盛且疏松的忍冬愈伤组织作为分离原生质体的材料,以 1.5% 纤维素酶 + 0.25% 果胶酶作为最佳酶液,以含有 $0.70 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇的 CPW 溶液进行酶液的配制,在静置条件下酶解 12 h。以此条件获得的忍冬原生质体完整、透明,质量良好。

近些年来,对于植物原生质体分离的研究多以无菌培养获得的无菌苗作为实验材料^[9-10],而本文采用生长旺盛的忍冬愈伤组织作为材料来源。愈伤组织为脱分化的细胞团,具有旺盛的分生分裂能力。利用愈伤组织分离获得的原生质体保留了愈伤组织的特性,与无菌苗相比较其更适应离体培养的环境,且可塑性更强,更容易诱导再生。就酶液组合而言,

目前的研究多采用纤维素酶和果胶酶不同浓度组合,但有些报道中还用到了离析酶^[10-11]。由于本实验中用到的材料是疏松的愈伤组织,细胞之间结合并不十分紧密,所以在实验过程中未使用离析酶。在进一步的研究中也可尝试添加离析酶,以考证其是否有利于以愈伤组织作为实验材料的忍冬原生质体的分离。就渗透保护情况而言,在本实验中过高的渗透压,如 $0.85 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以及 $0.90 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的确不能很好的起到渗透保护作用,会出现大量的原生质体的破坏;而其他的甘露醇水平,特别是 0.7, 0.75, 0.80 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对于原生质体分离的影响差异并不十分显著,均能较好的起到渗透保护作用,但是综合比较原生质体活力和产量两个方面的因素,0.70 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 效果更好。目前的研究报道中,不同植物进行原生质体分离时,适合的甘露醇浓度并不十分一致,这可能与植物材料本身有关^[12-13]。就酶解方式而言,有些植物进行原生质体分离时,缓慢振动的酶解方式似乎产量更高^[7],这与本实验的结果并不一致。在本实验中, $40 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的酶解方式显然比不上静置酶解方式。究其原因,一方面可能与分离原生质体的材料来源有关,由于本实验中用到的材料是愈伤组织,其特点与分化成熟的植物细胞相去甚远,而在震荡过程中这些脱分化细胞容易受到机械损伤,所以影响了原生质体的活力及产量;另一方面,也可能与植物本身有关,不同植物细胞结构差异较大,对于机械剪切力的忍受能力也自然不同。而就忍冬愈伤组织而言,缓慢振动的酶解方式并不适合于分离原生质体。

本课题组多年以来一直从事忍冬基因克隆以及遗传转化等相关研究工作,并取得了一定的进展^[14-15]。而原生质体由于其本身结构上的特点,已经成为遗传转化等相关研究工作的优良材料来源。近些年来,关于忍冬原生质体分离的研究未见报道,本实验全面且综合的考察了忍冬原生质体的分离条件,这将为以忍冬原生质体作为实验材料的细胞融合操作以及遗传转化操作提供必要的帮助和参考。

[参考文献]

- [1] 秦双双,袁媛,胡国强,等. 金银花及其变种有效成分含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15):81.
- [2] 杨欣,李洪波,陈诚,等. 金银花药性与功效的文献考证[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18):220.

零陵香水溶性多糖组分的 GC-MS 分析

刘长松,张贵君*,张智圆,李奇豫,董文茜,李景松,张雅楠
(北京中医药大学中药学院,北京 100102)

[摘要] 目的:鉴定零陵香水溶性多糖组分,为建立专属性的质量评价指标和中药药效组分新药研发奠定基础。方法:采用水提醇沉法制备零陵香粗多糖,Sevag 法除蛋白、H₂O₂ 脱色、透析得到精制多糖,衍生化后用 GC-MS 分析。结果:零陵香水溶性多糖主要组分依次为鼠李糖醇-阿拉伯糖-核糖-葡萄糖-木糖,其相对含量比例为 1.03:9.17:4.74:18.95:17.11。结论:GC-MS 联用法可快速鉴定零陵香水溶性多糖组分。

[关键词] 零陵香;水溶性多糖;药效组分;GC-MS;质量评价

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)19-0129-03

Analysis of Water-soluble Polysaccharide Components from Herba Lysimachiae Foenum-graeti by GC-MS

LIU Chang-song, ZHANG Gui-jun*, ZHANG Zhi-yuan, LI Qi-yu,
DONG Wen-xi, LI Jing-song, ZHANG Ya-nan

(School of Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** Identifying the water-soluble polysaccharide components of Herba Lysimachiae

[收稿日期] 20120310(001)

[第一作者] 刘长松,硕士,Tel:15201391423,E-mail:changsong1104@yeah.net

[通讯作者] *张贵君,教授/博导,从事中药鉴定方法学、中药药效组分及药效组分质量评价体系研究,E-mail:guijunzhang@163.com

- [3] 于静,邓雁如,陈奇,等. HPLC 测定金银花及金芪降糖片中 6 种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(19):57.
- [4] 孙勇如. 植物原生质体培养[M]. 北京:科学出版社,1991:172.
- [5] 张红梅,王俊丽. 植物原生质体游离、培养及应用[J]. 河北林果研究,2002,17(2):376.
- [6] 李志勇. 细胞工程[M]. 北京:科学出版社,2006:42.
- [7] 张学英,葛会波,刘艳萌,等. 草莓原生质体分离条件的研究[J]. 分子植物育种,2006,4(6S):147.
- [8] 周国海,陈雪香,雷勇,等. 虎杖原生质体分离纯化及电融合初步研究[J]. 西北植物学报,2008,28(6):1145.
- [9] 张胜珍,客绍英,马作东,等. 崧蓝叶肉原生质体游离与纯化研究[J]. 中药材,2009,32(5):664.
- [10] 廖嘉明,王伯初,王益川,等. 拟南芥叶肉原生质体分离条件的优化研究[J]. 西北植物学报,2010,30(6):1271.
- [11] 刘昕,余斌,陈晓燕,等. 提高甘草原生质体游离产量及分裂频率的研究[J]. 草地学报,2011,19(2):294.
- [12] 刘剑锋,程云清,陈智文. 高山红景天叶肉原生质体分离培养与植株再生[J]. 中草药,2009,40(7):1127.
- [13] 张小红,闵东红,邵景侠. 小麦愈伤组织诱导及原生质体的分离与纯化[J]. 中国农学通报,2010,26(21):49.
- [14] Xiaoxiao Peng, Weidong Li, Wenquan Wang, et al. Cloning and characterization of a cDNA coding a hydroxycinnamoyl-CoA quinate hydroxycinnamoyl transfe-rase involved in chlorogenic acid biosynthesis in *Lonicera japonica*[J]. Planta Med, 2010, 76: 1921.
- [15] Xiaoxiao Peng, Weidong Li, Wenquan Wang, et al. Identification of *Lonicera japonica* by PCR-RFLP and allele-specific diagnostic PCR based on sequences of internal transcribed spacer regions [J]. Planta Med, 2009, 76: 497.

[责任编辑 邹晓翠]