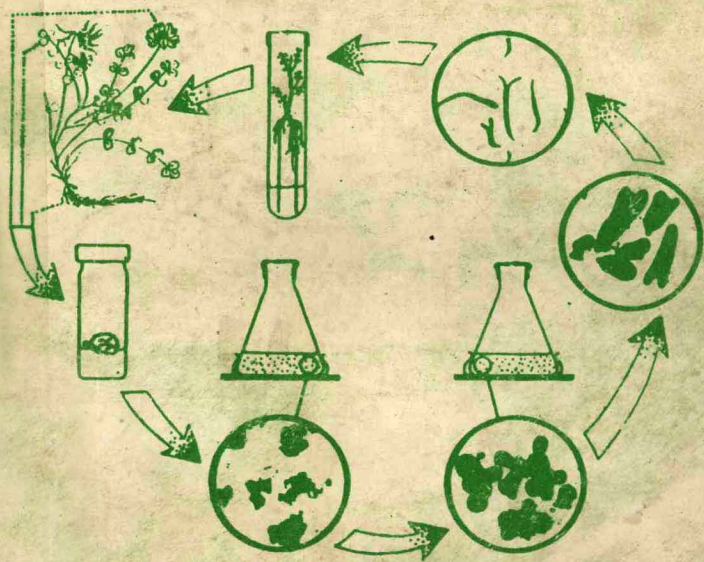


PRINCIPLE OF PLANT
PROTOPLAST MANIPULATION

植物原生质体操作原理

刘世贵 主 编
张兆清 曾 英



四川大学出版社

植物原生质体操作

Principle of Plant Protoplast Manipulation

刘世贵 主编

张兆清 曾英

四川大学出版社

一九九四年七月

(川) 新登字 014 号

责任编辑：陈昭麟

封面设计：唐利民

技术设计：陈昭麟

植物原生质体操作原理

刘世贵 主编

张兆清 曾英

四川大学出版社出版发行（四川大学内）

四川省地矿局测绘队印刷厂

787×1092mm 32 开本 5 印张 100千字

1994 年 12 月第 1 版 1994 年 12 月第 1 次印刷

印数：1—1000 册

ISBN 7-5614-1089-1/Q·23 定价：5.00 元

前 言

原生质体的研究,是近 30 年来生物学中比较活跃的领域之一。由于它涉及到植物学科的各个理论和实际应用方面,因而在近年来有着突飞猛进的发展。尤其是原生质体大量分离技术的成熟和培养技术的成功,大大推动了整个植物学科的发展。从 1971 年 Nagata 等人首次报道烟草叶肉原生质体培养得到再生植株以来,到现在已有数百种植物原生质体通过培养得到了再生植株,其中绝大多数是草本植物。

原生质体是用各种方式去掉细胞壁的“裸细胞”。去掉细胞壁,就意味着细胞质和外界环境之间的唯一屏障就是质膜,在这一点上,它和动物细胞一样。在大量制备原生质体的技术过关以前,植物细胞就是因为有细胞壁而在许多研究方面比动物细胞要困难得多。现在,原生质体的大量分离和成功培养,使得以前许多只能用于动物细胞的研究手段,也可以应用到植物中来。

原生质体最诱人的方面还是它在作物改良上的潜力。由于成熟的原生质培养体系的建立,现在人们已经能够通过原生质体融合或基因转化的方法,实现有性杂交难以实现的属间甚至科间遗传物质的转移。

目前,已有很多关于原生质体操作的文献和专著,但它们不是偏重于进展综述或结果讨论,就是着重介绍培养过程或具体操作技术,往往使初学者无从着手。我们知道,原生质体只是我们用来研究各种实际问题的一种工具,原生质体

的操作是一门技术，而不是一门学科。但是，在其操作的每一步骤都需要很多理论研究作为基础。所以，如何正确而方便地利用这种技术，解决植物学科中日益出现的新问题，仅靠生搬硬套一些文献或手册中的方法是不可行的，必须对每一步骤、每一过程的生物学意义充分了解，才能真正理解这门技术。

本书就是这样，介于理论与技术之间，有些与实验原理相似。我们希望它能够帮助读者了解这项技术，并将它成功地应用到自己的研究领域。书中着重以草本植物为例，特别是豆科牧草的例子较多，主要目的也是想尽快地推动现代生物技术在草原科学中的应用。

全书由刘世贵教授总体设计和最后校审，其中第二章和全部插图由曾英同志编写和设计，其余章节由张兆清同志编写。

侯若彤同志帮助打印，Mr. Holger Blasum 和朱文女士帮助校对，在此一并致谢！

编者

1994 年 12 月

目 录

前 言

第一章 原生质体的特点	(1)
第二章 设备与条件	(4)
第一节 常用设备与用具	(4)
一、仪器设备	(5)
二、玻璃器皿和用具	(7)
第二节 无菌条件	(9)
一、无菌室	(10)
二、超净工作台	(10)
三、无菌接种箱	(12)
第三节 培养条件	(12)
第三章 原生质体的分离	(14)
第一节 材料的选择	(14)
一、无菌幼苗	(15)
二、悬浮细胞及愈伤组织	(16)
三、根及贮藏器官	(16)
四、花粉	(17)
五、胚性细胞系	(19)
六、其它材料	(20)
第二节 材料的预处理	(20)
第三节 酶解液	(23)

	一、用于分离原生质体的酶	(23)
	二、渗透压稳定剂	(26)
	三、质膜稳定剂和其它试剂	(26)
第四节	原生质体的分离	(27)
	一、分离方法	(28)
	二、原生质体的纯化	(32)
	三、原生质体的活性检测	(36)
	四、平板密度	(37)
第五节	原生质体衍生系统的制备	(38)
	一、亚原生质体的自发形成	(39)
	二、质壁分离诱导亚原生质体	(40)
	三、密度梯度离心法制备亚原生质体	(41)
	四、用核失活技术来制备胞质体	(42)
第四章	原生质体的培养	(45)
第一节	培养基	(45)
	一、渗透压稳定剂和碳源	(47)
	二、无机盐	(48)
	三、植物生长调节剂	(50)
	四、其它有机成分	(52)
	五、pH 值	(52)
第二节	培养方法	(53)
	一、固体培养	(53)
	二、液体培养	(55)
	三、固液结合培养法	(60)
第三节	培养过程中的其它因素	(61)
	一、环境条件	(61)
	二、培养中的观察	(62)
	三、培养过程中的管理	(62)

第五章 原生质体分化与植株再生	(63)
第一节 细胞壁再生	(63)
第二节 分裂和生长	(65)
第三节 器官发生	(66)
一、器官发生的激素控制	(66)
二、器官发生的细胞来源	(69)
三、器官发生的方式	(69)
第四节 胚胎发生	(70)
一、胚胎发生的控制因素	(70)
二、胚胎发生的同步化	(73)
第五节 再生植株的移栽	(75)
第六章 原生质体融合	(76)
第一节 诱导融合的方法	(77)
一、早期的融合方法	(77)
二、聚乙二醇法	(78)
三、电融合法	(80)
四、激光诱导细胞融合	(89)
第二节 融合杂种的筛选	(90)
一、形态观察法	(90)
二、营养差异法	(93)
三、突变互补法	(94)
四、荧光标记法	(96)
第三节 胞质杂种的产生	(99)
第四节 体细胞杂种的鉴定	(101)
第七章 原生质体的摄取与遗传转化	(103)
第一节 外源物质的摄取	(103)
一、叶绿体的摄取	(105)

二、细胞核和染色体的摄取	(106)
三、细菌和真菌的摄取	(106)
四、藻类的摄取	(107)
五、病毒的摄取	(108)
六、其它	(108)
第二节 原生质体的转化	(109)
一、共培养法	(109)
二、脂质体介导法	(110)
三、PEG 转化法	(111)
四、电击穿孔法	(112)
五、微射轰击法	(113)
六、微注射法	(115)
附录 1 常见培养基的成分	(116)
附录 2 KM8p 培养基中的添加剂	(119)
参考文献	(120)

第一章 原生质体的特点

原生质体作为一个专用名词，其含义经过了一个转变过程。最早它是指“通过质壁分离，能够和细胞壁分开的那部分细胞质”（Hanstein, 1880）。1892年 Klercker、1909年 Küster、1931年 Plowe、1937年 Michel 等用机械法分离出原生质体，但由于这种方法得到的原生质体很少，几十年间对原生质体的研究一直进展不大。直至1960年，Cocking 成功地用酶法制备到番茄原生质体后，这方面的研究才突飞猛进地发展起来。这时，原生质体的含义已经转变为“植物（包括细菌）细胞壁消失后的球状体”。无论这两种说法有什么区别，总之，现在说的原生质体（protoplast），是指通过机械或酶解方法去掉细胞壁的“裸”细胞。

自从Cocking的酶法制备原生质体成功以来，原生质体的研究便进入了一个新的时期。现在人们已经能够从许多植物制备出大量有活力的原生质体，原生质体操作技术在生理学、病理学、遗传与育种等方面也已得到广泛应用。由于原生质体没有细胞壁，加之制备方法和培养技术的成功，使它得以作为生物学研究的理想材料。原生质体本身有如下特点：

第一，不同植物、不同来源的组织或离体培养组织都能用以大量制备均一的原生质体群。

第二，原生质体和起源细胞在形态结构上最明显的不同，就是原生质体没有细胞壁，质膜裸露，直接与外界接触。

分离出的原生质体一般呈圆球形，其质膜内所包围的内容与起源材料的细胞内含物没多大区别，只是由于张力作用，使原生质体的形状一般呈球形。形态研究最多的是叶肉细胞原生质体。在中央部位往往有一大液泡，叶绿体分布于周边细胞质中，紧贴质膜。另一类来源的原生质体是从培养的愈伤组织细胞中，通过酶解法制备的原生质体。它们一般大小不一，没有中央液泡，带有白色体、原质体或少量的片层。

第三，从各种植物分离出的原生质体仍具有细胞全能性，在合适的培养条件下，原生质体具有繁殖、分化、再生完整植株的能力。从近30年来日益增多的有关不同物种植物原生质体培养植株再生的报道可以看出，在现在尚不能用原生质体培养得到再生植株的那些物种中，只要探索出一套成熟的培养条件，植株再生是迟早都要实现的。原生质体的全能性已毋庸置疑。

第四，分离出的原生质体与完整细胞的新陈代谢没多大差别。这在黄瓜、蚕豆、葱、菠菜等植物的不同代谢过程中都得到证实。当然，刚分离的原生质体也常会因为质壁分离、萎焉脱水或脱壁过程而有一些特殊的生理效应。例如内质网、线粒体的增加，叶绿体的脱分化等，但这只是一个适应过程。从理论上讲，只要原生质体能保持在适宜的渗透压和培养条件下，其细胞内除了与细胞壁有关的那些代谢外，其它代谢与完整的植物细胞应该没有区别。

第五，同一植物，相同基因型，但不同器官来源的原生质体，分化与脱分化的程度会有不同，其生理效应和再生植株的能力也会有差异。例如在葱中进行的实验表明，蓝光能诱导葱叶表皮上气孔的张开。将葱叶表皮的保卫细胞原生质体

提取分离后，用蓝光处理，能明显看到原生质体的膨大，二者显示了一致的效应。在禾本科植物的原生质体培养中则发现，来源于胚性组织的原生质体才能较好地再生出植株来，而来源于芽、根等营养组织的原生质体，再生力很差。

第六，原生质体是研究基础理论和实际应用的理想材料。由于分离的原生质体没有细胞壁，因而它可以像动物细胞那样，在一定的诱导条件下进行细胞融合，克服有性杂交中的不亲和性问题；也能够摄取大到细胞器，小到病毒颗粒及DNA分子的外源物质；因而在遗传工程和农作物改良中，有着巨大的潜力。此外，从原生质体还可以建立不少衍生系统，即通过适当的方法能从中制备出各种各样的亚原生质体，可以为研究核质关系及进行遗传重组提供多种研究材料。

综上所述，植物原生质体能够在许多方面为基础研究和实际应用提供手段。也正因为如此，原生质体技术在下列几个方面的研究已得到了愈来愈多的应用：①质生质膜的研究；②细胞壁的再生；③细胞的分裂和分化；④原生质体融合；⑤原生质体摄入细胞器；⑥原生质体摄入外源物质；⑦种质低温保存及细胞冻害效应。

第二章 设备与条件

原生质体操作所需的条件并不十分苛刻，许多初学者或者没有从事过这方面工作的人，往往因为把设备条件看得很神秘而没能深入进去。实际上，一个成功的原生质体操作体系，除了培养基本身外，对设备与条件的要求不过是能保证分离、接种和转种等过程的无菌环境，保证培养过程中的光照和温度而已。在本章，我们假定要从无到有建立一个原生质体操作的实验室，从最基本的实验室用具到较高档的设备都予以介绍，但必须重申，最基本的条件是无菌环境、光照和温度。各人可以依照自己现有的设备及科研工作需要来购置和装备自己的实验室。

第一节 常用设备与用具

首先需有一间普通的实验室，用以进行器皿的洗涤和培养基的配制等。室内要设计足够的实验台及各种橱架，便于放置药品、培养基母液及玻璃器皿等。要进行植物原生质体分离、纯化、培养及植物再生等一系列工作，需具备一般生物学实验室的常备仪器、玻璃器皿、各种用具及一些特殊设备。

一、仪器设备

1. 天平

配制培养基、缓冲液等应具备不同称量度的天平，最好有感量为 0.1g、0.001g、0.0001g 的天平各一台。若有一台电子天平，也是很方便的。

2. 冰箱

普通冰箱可贮存培养基母液、生理盐水、维生素、激素及一些试验材料等。而酶制剂和配制的抗生素溶液等，需要冷冻保持其生物活性，而且存放时间长，应配置一台低温冰箱（ $-20^{\circ}\text{C}\sim-80^{\circ}\text{C}$ ）。

3. 烘箱

烘箱主要用于烘干洗涤的玻璃器皿和干热灭菌。在干热灭菌时，温度一般可达到 160°C ，维持 2~3 小时。

4. 蒸馏器

在很多情况下，我们需要使用双蒸水，甚至三蒸水，使水中尽量少含各种离子，更好地控制试验条件，因此应配制一套蒸馏器。有一种自动加水石英玻璃管加热的蒸馏器比较安全方便。此外，也可用离子交换器。

5. 酸度计

用于测定培养基、酶制剂及各种溶液的 pH 值，使用后应注意将探头部分洗干净。

6. 显微镜

对植物细胞、原生质体及培养过程中的观察记录都需要显微镜。显微镜可分为普通显微镜、倒置显微镜、相差显微镜、荧光显微镜等。倒置显微镜的物镜在镜台下面，可以从培养皿的底部观察培养物，光源由上垂直而下。相差显微镜

最适宜观察未经染色的活体生物样品，可看见细胞中生物细胞所特有的，或者和细胞亲和性很高的荧光物质与细胞结合后，便可用荧光显微镜来观察，荧光显微镜的使用也较普遍。

显微镜上除配置照相机外，有条件时还应配上摄影装置，这样，对培养过程中的观察和记录就更方便、更准确了。目前，带电脑系统的激光扫描共焦显微镜是很先进的，但价格也昂贵。图 2.1 就是一种激光显微镜。

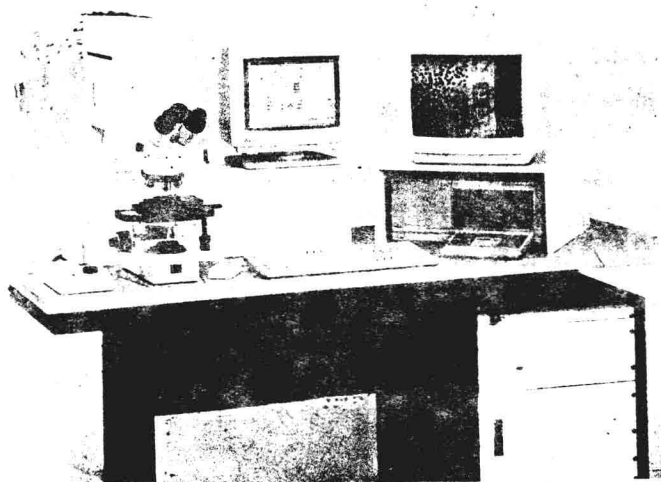


图 2.1 激光显微镜照片

7. 离心机

酶解后分离原生质体，制备酶液，提取细胞内含物等需要离心。根据分离物的不同，应选用不同转速的离心机；对于提取核酸、蛋白质等，则要用高速冷冻离心机。

8. 高压灭菌锅

原生质体和细胞培养中的各个环节都必须保证无杂菌污染，因此，所用的器皿、培养基和分离材料、转种的工具等都应事先灭菌处理。湿热灭菌是用得最普遍的。玻璃器皿、棉塞、吸管等可用 15 磅/英寸² 灭菌 30 分钟。而一般培养基可用 15 磅/英寸² 灭菌 20 分钟，对于含葡萄糖等易分解物质的培养基，最好用 8/英寸² 磅 15~20 分钟灭菌。

9. 细菌过滤装置

酶液、维生素溶液及一些培养液是不能高温灭菌的，只能用过滤的方法除菌。细菌滤器的种类很多，从用注射器推压过滤的简单滤器到高级的超过滤系统都可选用，这要根据自己实验室的条件而定。

10. 其它

除以上外，还可配制电磁搅拌器、细胞融合仪（用于原生质体融合）、恒温水浴、恒温振荡仪或摇床、细胞破碎器，以及显微操作器等。

二、玻璃器皿和用具

培养用玻璃器皿应选择透明度好、无毒的中性硬制玻璃制成品。

1. 培养皿

应配置各种大小的培养皿用于植物原生质体的分离、培养，直径可选用 90mm、60mm、30mm 等。

2. 三角瓶

50~2000ml 大小的三角瓶都应具备。从配制溶液、培养基等到原生质体培养及再生愈伤组织的分化等，都需使用三角瓶。

3. 离心管

离心管用于制备酶液和提纯原生质体等。

4. 培养用器皿

除培养皿和三角瓶外，由于需要不同，培养器皿还可制

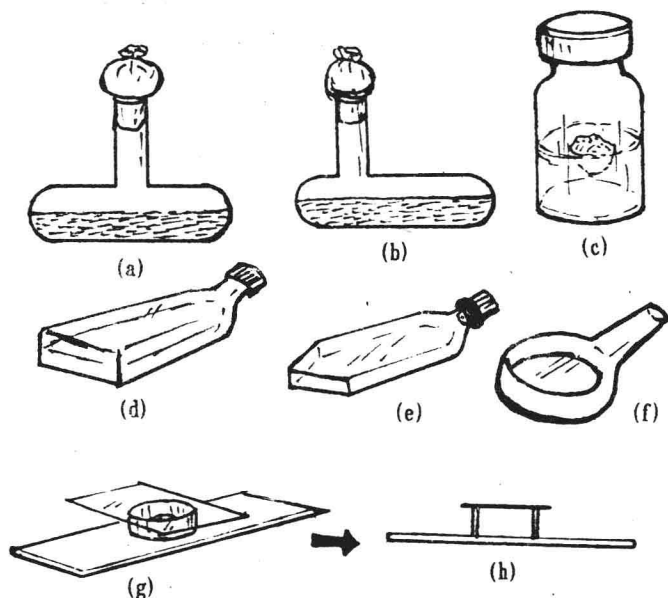


图 2.2 一些植物组织和细胞培养中常用的玻璃器皿

(a) T 形培养瓶； (b) L 形培养瓶； (c) 圆形培养瓶； (d) 长方形扁培养瓶； (e) 平形有角培养瓶； (f) 圆形扁培养瓶； (g) ~ (h) 微室培养装置。

成各种各样的形状，如图 2.2 所示。其中 L 型管和 T 型管可进行转动培养并使液体流动，管内培养的材料可轮换地处于培养液和空气之中，不致使培养的材料长期浸在液体中，因