

研究报告

DOI: 10.14188/j.ajsh.2021.01.006

## 高粱品种 BTx623 原生质体分离及瞬时表达体系的建立

曾弓剑, 程云伟, 韩少鹏, 吕 阳, 陆业磊, 周 超, 张德春, 沈祥陵\*

(三峡大学 三峡区域植物遗传与种质创新重点实验室/三峡大学生物技术研究中心, 湖北 宜昌 443002)

**摘要:** 高粱(*Sorghum bicolor*)是世界上仅次于小麦、水稻、玉米和大麦的重要粮食作物之一,虽然高粱基因组已经完成了测序,但是针对高粱测序品种 BTx623,遗传转化方法的缺乏限制了高粱遗传育种和功能基因组研究的发展。而原生质体瞬时表达技术,则因为其高效、快速的特性,在功能基因组研究中具有重要的作用。为了在高粱品种 BTx623 中建立原生质体瞬时表达体系,本研究以 BTx623 幼苗为材料,对原生质体分离过程中的渗透压、酶液成分、酶解时间进行研究。结果表明:BTx623 幼苗的原生质体分离过程中,最佳酶解液组成为 1% 纤维素酶、0.25% 离析酶、0.6 mol/L 甘露醇、10 mmol/L 吗啉乙烷磺酸、1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、0.1% 小牛血清蛋白和 5 mmol/L β-巯基乙醇,并获得了每毫升 1×10<sup>7</sup> 个的高质量原生质体,所获原生质体活性在 90% 以上。之后利用 PEG 介导的转化方法,将含有 35S::*egfp* 的质粒导入到原生质体中,并通过荧光显微观察统计,遗传转化率达到 (61.31±3.91)%。本研究通过优化高粱品种 BTx623 原生质体制备及瞬时转化的条件,成功建立了其原生质体瞬时表达体系,为进一步开展高粱品种 BTx623 功能基因组的研究奠定了基础。

**关键词:** 高粱; BTx623; 原生质体分离; 瞬时表达

**中图分类号:** Q943.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 2096-3491(2021)01-0042-08

## The establishment of protoplasts isolation and transient expression system of sorghum cultivar BTx623

ZENG Gongjian, CHENG Yunwei, HAN Shaopeng, LÜ Yang, LU Yelei, ZHOU Chao, ZHANG Dechun, SHEN Xiangling\*

(Key Laboratory of Three Gorges Regional Plant Genetics & Germplasm Enhancement/Biotechnology Research Center, Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China)

**Abstract:** Sorghum is one of the important crops next to wheat, rice, maize and barley in the world, although the sorghum genome has been sequenced, the lack of genetic transformation methods for the sorghum sequenced cultivar BTx623 has limited the development of sorghum genetic breeding and functional genome research. Because of the efficiency and rapidity, the protoplast transient expression technology plays an important role in the research of functional genome. In order to establish the protoplast transient expression system in BTx623, in this study BTx623 seedlings were used as materials to research the osmotic pressure, composition of enzyme solution and the time of digestion in the process of protoplast isolation. The results showed that in the process of protoplast isolation in BTx623 seedlings, the optimal composition of the enzyme solution is 1% cellulase, 0.25% mecerozyme, 0.6 mol/L mannitol, 10 mmol/L MES, 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.1% BSA and 5 mmol/L β-mercaptoethanol, then 1×10<sup>7</sup>/mL protoplasts with high vitality were ob-

收稿日期: 2020-09-03 修回日期: 2020-10-08 接受日期: 2020-12-27

作者简介: 曾弓剑(1981-), 男, 硕士生, 研究方向为分子植物育种。Email: gimchyx@yeah.net

\*通讯作者: 沈祥陵(1982-), 男, 博士, 教授, 现在主要从事植物育种与分子生物学研究。E-mail: shenxl1982@hotmail.com

基金项目: 三峡区域珍稀植物遗传发育与种质创新重点实验室开放基金(2018KZW01)

引用格式: 曾弓剑, 程云伟, 韩少鹏, 等. 高粱品种 BTx623 原生质体分离及瞬时表达体系的建立[J]. 生物资源, 2021, 43(1): 42-49.

Zeng G J, Cheng Y W, Han S P, et al. The establishment of protoplasts isolation and transient expression system of sorghum cultivar BTx623 [J]. Biotic Resources, 2021, 43(1): 42-49.

tained and the protoplast activity was higher than 90%. After that, the plasmids containing 35S::*egfp* was introduced into the protoplasts by PEG mediated transformation, from the observation under fluorescence microscope, the genetic transformation rate was  $(61.31 \pm 3.91)\%$ . In this study, by optimizing the conditions of protoplast preparation and transient transformation in BTx623, the protoplast transient expression system was successfully established, which laid a foundation for further study on functional genomics in sorghum cultivar BTx623.

**Key words:** sorghum; BTx623; protoplast isolation; transient expression

## 0 引言

高粱(*Sorghum bicolor*)是重要的粮食作物和能源作物,具有广泛的适应性和良好的抗逆性,在全世界分布广泛,具有较高的研究价值。高粱品种BTx623是一种广泛使用的自交系品种,其全基因组于2009年完成测序,是高粱参考基因组品种<sup>[1]</sup>。然而遗传转化技术的缺乏,限制了高粱品种BTx623的遗传改良和功能基因组研究的发展。

植物原生质体是植物细胞去除细胞壁后裸露的细胞,具有容易摄取外源核酸片段的特性,广泛应用于植株再生<sup>[2]</sup>、体细胞杂交<sup>[3]</sup>、植物细胞生理研究<sup>[4]</sup>和功能基因组研究<sup>[5]</sup>等。自1960年Cocking等<sup>[6]</sup>首次利用纤维素酶粗制剂,从番茄(*Solanum lycopersicum*)根尖分离出大量的原生质体以来,科研人员已经在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)<sup>[7]</sup>、水稻(*Oryza sativa* L.)<sup>[8]</sup>、玉米(*Zea mays* L.)<sup>[9]</sup>、烟草(*Nicotiana tabacum* L.)<sup>[10]</sup>等模式植物中建立了原生质体分离系统。有研究者在马铃薯(*Solanum papita*)品种中建立了原生质体分离系统,并在此基础上建立了植物遗传转化及再生体系<sup>[11]</sup>;还有学者在甜樱桃中建立了原生质体分离体系,并以*gfp*为报告基因获得了转化率84.1%的原生质体瞬时表达系统<sup>[12]</sup>。在甜高粱品种POTCHETSTRM中,原生质体系统被用来证明SbSTOP1蛋白位于细胞核中,并调控*SbGlu1*和*SbSTAR2b*的表达,从而参与甜高粱品种POTCHETSTRM对铝毒害的反应<sup>[13]</sup>。在高粱品种BTx623中,有研究以其黄化苗为材料,利用酶解法分离出原生质体并进行了转化,但是转化效率仍然不高<sup>[14]</sup>,限制了后续实验的开展。因此高效遗传转化技术的开发对于BTx623相关高粱基础研究的发展是亟待解决的问题。

植物瞬时表达是一种将目标基因转入靶细胞,并在短时间内使外源基因高效表达的技术。而原生质体易于摄取外源基因的特性,为植物瞬时表达技术的应用提供了良好的实验系统。在植物原生质体中进行瞬时表达所需时间短,不需要将外源基因整合到靶细胞基因组中,被广泛应用于蛋白的亚细胞定位、基因瞬时表达、蛋白质互作、启动子活性等多

种植物基因功能研究中。有研究学者利用拟南芥原生质体瞬时表达体系,对高粱*SbC4H1*基因进行了亚细胞定位,发现*SbC4H1*基因定位于细胞质中<sup>[15]</sup>。还有研究通过瞬时表达技术,将Cas9蛋白和sgRNA转入苹果和葡萄的原生质体中,对葡萄*MLO-7*基因和苹果的*DIPM-1*、*DIPM-2*和*DIPM-4*基因进行了编辑,并通过测序确定了相关基因发生突变<sup>[16]</sup>。也有研究利用瞬时表达技术,在水稻原生质体中进行了免疫共沉淀、亚细胞定位、蛋白质互作和双分子荧光标记实验,并通过上调*OsGLK1*基因来研究水稻光反应过程<sup>[17]</sup>。而在高粱品种BTx623中,由于稳定遗传转化体系的缺乏,瞬时表达体系未能得到广泛的应用,因此建立高粱品种BTx623的瞬时表达体系将是其遗传育种和功能基因组研究的重要补充。

本研究以高粱品种BTx623幼苗为材料,对其原生质体分离过程中的重要条件进行优化和分析,建立了稳定高效的高粱品种BTx623原生质体分离体系,并在此基础上利用PEG介导的遗传转化技术,建立了稳定的原生质体瞬时表达体系,对高粱品种BTx623的遗传育种和功能基因组研究有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及仪器

高粱品种BTx623来源于三峡大学生物技术研究中心,实时荧光定量PCR仪的型号为Bio-RAD CFX96。

纤维素酶(Cellulase R-10)和离析酶(Macecozyme R-10)均为日本Yakult进口分装、2-N-吗啉乙烷磺酸(2-Morpholinoethanesulfonic Acid, MES, Aladdin)、聚乙二醇(Polyethylene Glycol, PEG, average Mn 4000, Macklin)、二乙酸荧光素(Fluorescence Diacetate, FDA, Macklin)、RNA总提取液(上海启文)、乙二胺四乙酸(Ethylene Diamine Tetraacetic Acid, EDTA, Biofroxx)、胎牛血清(Foetal Bovine Serum, FBS, Biological Industries)、小牛血清蛋白(Bovine serum albumin, BSA, BioFroxx)、M-MLV( $H^-$ ) Reverse Transcriptase (Vazyme)、ChamQ SYBR qPCR Master Mix(Vazyme)。

其他试剂如甘露醇(D-Mannitol)、 $CaCl_2$ 、KCl、

NaCl和 $\beta$ -巯基乙醇(2-Hydroxy-1-ethanethiol,  $\beta$ -ME)等实验试剂均购于生物工程上海有限公司。

## 1.2 植物培养

选择饱满的高粱BTx623种子,自来水冲洗1h,沥干后转入无菌超净工作台,用75%酒精消毒1~2min,无菌水清洗2次,用0.1%的升汞(含0.1%吐温-20)浸泡消毒20min,可适当旋转玻璃瓶,无菌水清洗5~6次,每次1~2min。尽量将种子上的升汞残留清洗干净,将种子种于含有1/2MS培养基的玻璃瓶中,移至组织培养室,26℃每日光照16h培养12~15d备用。

## 1.3 质粒抽提

含有绿色荧光蛋白基因的表达载体pLS10来源于三峡大学生物技术研究中心,具有花椰菜花叶病毒(cauliflower mosaic virus, CaMV)35S启动子,绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, *egfp*)基因、胭脂碱合成酶终止子(nopaline synthase terminator, NOS)等元件。

本研究所用质粒DNA均采用Qiagen Plasmid Midi Kit(25)质粒大提试剂盒提取,具体方法按试剂盒所提供的操作。

## 1.4 高粱原生质体的分离及纯化

选取培养12~15d的无菌BTx623幼苗,称取茎1g,用刀片将其切成0.5~1.0mm的碎片放于装有0.6mol/L甘露醇溶液的50mL三角瓶中,避光静置20min,将甘露醇移除后加入10mL酶解液(表1),混匀后避光放入真空装置,室温下保持30~40r/min低速摇动,抽真空1h后继续酶解2~8h。酶解结束后调整摇床速度至80r/min维持10min,加入等体积的W5溶液(2mmol/L MES、154mmol/L NaCl、5mmol/L KCl、125mmol/L CaCl<sub>2</sub>,调整pH到5.7)继续摇10min,用200目的尼龙网过滤到50mL的离心管中,100×g离心3min,弃上清,加入0.5~1mL W5溶液重悬,置于冰上备用。

表1 酶解液组成

Table 1 The composition of enzyme solution

Stock	Make 10 mL	Final conc
MES (0.2 mol/L, pH 5.7)	0.5 mL	10 mmol/L
Mannitol (0.8 mol/L)	7.5 mL	0.6 mol/L
CaCl <sub>2</sub> (1 mol/L)	0.01 mL	1 mmol/L
Beta-ME	0.003 mL	5 mmol/L
BSA (10%, m/V)	0.1 mL	0.1%
Cellulase R10	0.1 g	1%
Macerozyme R10	0.025 g	0.25%
H <sub>2</sub> O	1.89 mL	—

## 1.5 原生质体的得率与活力检测

①得率:使用0.1mm血球计数板统计原生质体数,取分离纯化后的原生质体悬浮液10 $\mu$ L,滴在血球计数板上,在普通光学显微镜下镜检。每毫升原生质体数(个)=80小格内细胞个数/(80×400×10<sup>4</sup>×稀释倍数)。

②活力检测:取100 $\mu$ L原生质体加入FDA母液(5mg FDA溶于1mL丙酮)2 $\mu$ L混合均匀,室温静置5min。在荧光显微镜下检查,此时活力高的原生质体在紫外光激发下能发出荧光,计数原生质体存活率。原生质体活力(%)=发出荧光的原生质体数/原生质体总数×100%。

## 1.6 PEG介导的原生质体转化

用MMG溶液(4mmol/L MES、0.6mol/L甘露醇、15mmol/L MgCl<sub>2</sub>,调整pH到5.7)将原生质体浓度调整到每毫升2×10<sup>5</sup>个,在100 $\mu$ L原生质体中加入10 $\mu$ g质粒和110 $\mu$ L PEG-Ca溶液(20%~50% PEG4000、0.6mol/L甘露醇、0.1mol/L CaCl<sub>2</sub>),混匀后室温避光静置5~15min。在混匀液中加入440 $\mu$ L W5溶液终止反应,4℃100×g离心3min后去除上清,再加入500 $\mu$ L WI溶液(4mmol/L MES、0.6mol/L甘露醇、4mmol/L KCl,调整pH到5.7),转移到用胎牛血清(FBS)提前润湿过的24孔培养板中。转化后的原生质体细胞在室温条件下避光培养16~20h,利用荧光显微镜观察*egfp*表达结果,并计算原生质体转化效率,公式如下:原生质体转化效率(%)=发出绿色荧光的原生质体数目/所有原生质体数×100%。

## 1.7 原生质体RNA的提取

将1×10<sup>6</sup>个以上的原生质体移至RNase-Free的离心管中,4℃100×g离心3min去除上清,放入液氮中速冻,用研磨棒快速研磨原生质体,反复2~3次后加入1mL RNA总提取液,冰上静置5min,加入200 $\mu$ L氯仿,剧烈振荡30s后冰上静置5min,4℃12000r/min离心15min,小心吸取上层水相到新离心管中并加入500 $\mu$ L异丙醇,-20℃静置1h后4℃12000r/min离心15min,弃上清,加入1mL预冷的75%乙醇(DEPC水配制)后4℃12000r/min离心5min,弃上清,超净工作台中风干10~20min,加入20~40 $\mu$ L RNase-Free water,60℃金属浴10min溶解RNA。

## 1.8 反转录及实时荧光定量分析

在RNase-Free离心管中加入1~5 $\mu$ g RNA、1 $\mu$ L DNaseI和1 $\mu$ L DNaseI Buffer,37℃水浴15min,加入1 $\mu$ L EDTA(25mmol/L)后65℃水浴10min,

再分别加入 1  $\mu\text{L}$  M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu\text{L}$ )、4  $\mu\text{L}$  5 $\times$ RT Buffer、1  $\mu\text{L}$  Oligo(dT)<sub>18</sub> 和 1  $\mu\text{L}$  dNTP Mix, 42  $^{\circ}\text{C}$  水浴 45 min 后 85  $^{\circ}\text{C}$  金属浴 5 min, 稀释 10 倍备用。

本实验设计的荧光定量引物为, *egfp*-F: 5'-GA-CAACCACTACCTGAGCAC-3'; *egfp*-R: 5'-CAG-GACCATGTGATCGCG-3', 使用 SYBR Green 作为荧光标记, 荧光定量 PCR 的反应体系为: 2 $\times$  ChamQ SYBR qPCR Master Mix 10  $\mu\text{L}$ , 上下游引物均为 0.4  $\mu\text{L}$ , cDNA 为 2  $\mu\text{L}$ , 最后用 RNase-Free Water 补足至 20  $\mu\text{L}$ , 以 *actin* 基因 (Gene ID: LOC110436378 来源: NCBI) 为内参, 反应条件为: 95  $^{\circ}\text{C}$  30 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 个循环。

## 2 结果与分析

### 2.1 高粱原生质体制备体系的优化

为了建立高粱品种 Btx623 原生质体分离体系, 本研究参照拟南芥和水稻原生质体分离的方法进行预实验, 得到约每毫升  $1.0 \times 10^6$  个的原生质体, 活力为 56%。为了进一步提高原生质体的质量, 针对渗透压、纤维素酶和离析酶浓度、酶解时间这四个重要条件进行了优化, 建立了适合高粱 Btx623 的原生质体分离体系。

#### 2.1.1 渗透压浓度对原生质体分离的影响

渗透压直接关系到原生质体的质量, 本研究选择 0.3、0.4、0.5、0.6 和 0.7 mol/L 五种浓度的甘露醇, 酶解后分别检测原生质体的产量。甘露醇 0.3 mol/L 条件下得到的原生质体平均浓度为每毫升  $(5.25 \pm 0.86) \times 10^5$  个, 0.4 mol/L 为每毫升  $(9.75 \pm 4.97) \times 10^5$  个, 0.5 mol/L 为每毫升  $(12.3 \pm 4.95) \times 10^5$  个, 0.6 mol/L 为每毫升  $(19.8 \pm 5.1) \times 10^5$  个, 0.7 mol/L 每毫升为  $(5.62 \pm 3.75) \times 10^5$  个。其中 0.3 mol/L 时原生质体产量最低, 0.6 mol/L 时产量最高, 比 0.3 mol/L 时原生质体产量高 3 倍以上, 通过显著性分析发现, 甘露醇浓度为 0.6 mol/L 时和其他浓度下的产量均有显著性差异 (图 1a), 所以甘

露醇 0.6 mol/L 为最优的选项。

#### 2.1.2 不同酶浓度对原生质体分离的影响

为了选择纤维素酶和离析酶的适宜浓度, 用纤维素酶 3 种浓度 1%、1.5%、2% 和离析酶 3 种浓度 0.25%、0.5%、0.75% 进行两两组合, 得到 9 种组合, 酶解后检测原生质体的平均产量 (表 2), 其中 1.5% 纤维素酶和 0.25% 离析酶的原生质体产量最高, 为每毫升  $(19.5 \pm 5.3) \times 10^5$  个, 2% 纤维素酶和 0.75% 离析酶的产量最低, 为每毫升  $(9.25 \pm 2.75) \times 10^5$  个, 相差约 1 倍。通过数据分析, 首先排除产量较低的 4 组数据, 剩下 5 个组合的产量之间没有显著性差异。之后分析纤维素酶及离析酶各自对原生质体产量的影响, 发现随着两种酶浓度的上升, 原生质体的产量却随之下降 (图 1b, 1c)。综上所述, 选择纤维素酶 1% 和离析酶 0.25% 作为最优组合。

#### 2.1.3 酶解时间对原生质体分离的影响

为探究合适的酶解时间, 分别在酶解 2、3、4、5、6、7、8 h 后进行抽样, 检测原生质体的产量。其中酶解 2 h 的平均产量最低, 为每毫升  $(2.53 \pm 0.3) \times 10^5$  个, 酶解 5 h 和 6 h 的平均产量相当, 并列最高, 为每毫升  $(17.33 \pm 3.05) \times 10^5$  个和  $(17.33 \pm 4.51) \times 10^5$  个, 通过数据分析 4、5、6、7 h 的原生质体产量均无显著性差异 (图 1d), 结合在显微镜下的观察, 发现 5 h 游离的原生质体中破碎的细胞组织开始增多, 所以选择 5 h 作为适合的酶解时间。

#### 2.1.4 原生质体分离及活力检测结果

根据以上结果分析, 高粱品种 Btx623 原生质体分离的最优体系为: 含有 1% 纤维素酶和 0.25% 离析酶的酶解液, 适合的渗透压为 0.6 mol 甘露醇, 真空 1 h 后室温下继续酶解时间 4 h, 利用离心法将原生质体富集后加 W5 溶液重悬得到浓度为每毫升  $(1.24 \pm 0.07) \times 10^7$  个的高粱原生质体。

分离后的原生质体采用 FDA 法检测原生质体的活力, 在倒置显微镜下观察 (图 2), 对原生质体总数和发荧光的原生质体数分别计数, 计算出原生质

表 2 不同酶浓度条件下的原生质体产量

Table 2 Protoplast yield in different enzyme concentrations

离析酶含量/%	原生质体产量/ $10^5$ 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$		
	1.0% 纤维素酶	1.5% 纤维素酶	2.0% 纤维素酶
0.25	18.25 $\pm$ 3.30 <sup>b</sup>	19.50 $\pm$ 5.30 <sup>b</sup>	14.00 $\pm$ 3.16 <sup>b</sup>
0.50	18.75 $\pm$ 3.50 <sup>b</sup>	16.50 $\pm$ 3.87 <sup>b</sup>	14.00 $\pm$ 2.16 <sup>a</sup>
0.75	17.50 $\pm$ 3.00 <sup>ab</sup>	10.50 $\pm$ 3.69 <sup>ab</sup>	9.25 $\pm$ 2.75 <sup>a</sup>

注: 不同小写字母表示显著性差异 ( $P < 0.05$ )

Note: different lowercases show significant difference ( $P < 0.05$ )

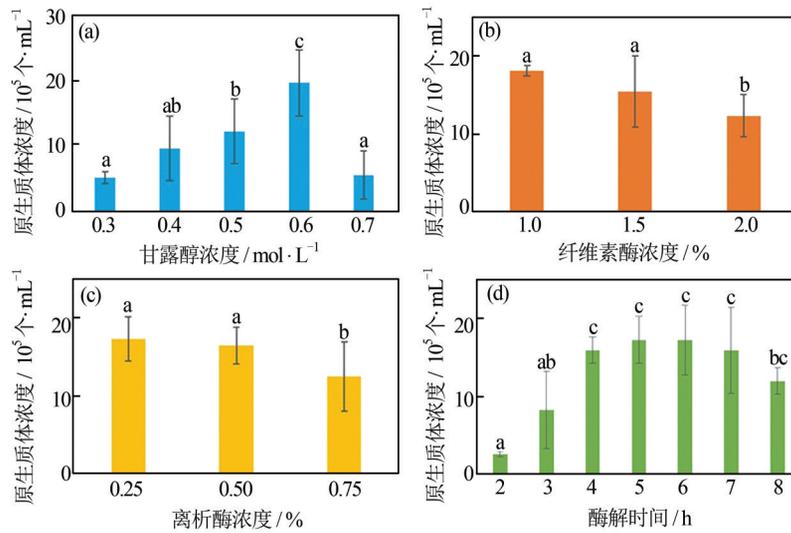


图1 不同条件下原生质体的平均浓度 ( $P < 0.05$ )

Fig. 1 The average concentration of protoplasts under different conditions ( $P < 0.05$ )

注:a,甘露醇对原生质体分离的影响;b,纤维素酶对原生质体分离的影响;c,离析酶对原生质体分离的影响;d,酶解时间对原生质体分离的影响

Note: a, effect of mannitol on protoplast isolation; b, effect of cellulase on protoplasts isolation; c, effect of macerozyme on protoplasts isolation; d, effect of digestion time on protoplast isolation

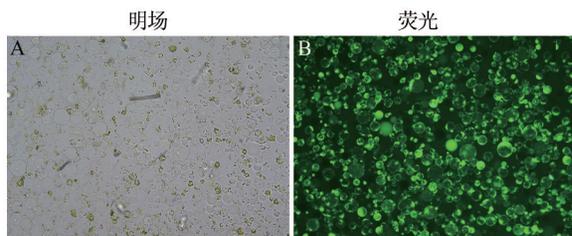


图2 高粱原生质体活力检测

Fig. 2 Viability detection of sorghum protoplasts

注:红色比例尺,75  $\mu\text{m}$

Note: red scale bars, 75  $\mu\text{m}$

体的活力为  $(91.3 \pm 3.8)\%$ 。

## 2.2 BTx623原生质体瞬时表达体系的优化

本研究以2.1建立的高粱BTx623原生质体分离体系为基础,利用PEG介导法将含有35S::*egfp*的质粒转到高粱原生质体中,其转化率在20%~30%之间,为进一步提高转化效率,分别探究了PEG4000的浓度和转化时间两个因素对转化效率的影响,建立了适合高粱品种BTx623的瞬时表达体系。

### 2.2.1 PEG浓度的优化

为选择合适的PEG4000浓度,本实验设置4种PEG4000的浓度,分别为20%、30%、40%和50%,得到高粱原生质体的平均转化率分别为  $(34.6 \pm 17.55)\%$ 、 $(61.31 \pm 3.91)\%$ 、 $(39.53 \pm 0.43)\%$ 和  $(25.39 \pm 4.12)\%$ ,可以看出在30%的PEG4000浓度下转化率最高,在50%浓度下转化率最低,两者相比,30%的PEG4000浓度下转化率比50%浓度

下高出1倍以上,且有显著性差异(图3A)。因此,PEG4000浓度为30%时是最佳选择。

### 2.2.2 转化时间的优化

为选择合适的转化时间,在对高粱BTx623原生质体的转化中,使用PEG4000浓度30%的PEG-Ca溶液,分别转化5 min、10 min和15 min,孵育16~20 h,用荧光显微镜统计原生质体的平均转化率分别为  $(31.58 \pm 3.26)\%$ 、 $(61.31 \pm 3.91)\%$ 和  $(36.81 \pm 2.77)\%$ 。其中10 min的转化率最高,并且和转化5 min、15 min的转化率相比较有显著性差异(图3B),所以10 min是最合适的转化时间。

### 2.2.3 原生质体瞬时表达遗传转化

使用PEG4000浓度为30%的PEG-Ca溶液对高粱BTx623原生质体进行转化,转化时间10 min,孵育16~20 h后进行荧光检测,在倒置荧光显微镜下观测,统计平均转化率为  $(61.31 \pm 3.91)\%$ 并进行验证(图3C,3D)。

### 2.2.4 实时荧光定量PCR检测验证

为了进一步验证转入到高粱原生质体中的*egfp*基因表达的真实性,本实验将转入*egfp*基因的高粱原生质体和未转入外源基因的高粱原生质体分别提取总RNA,通过反转录获得cDNA,利用实时荧光定量PCR进行相对定量分析,以没有转入任何外源基因的高粱原生质体为阴性对照,其值设为1,根据数据分析发现转入35S::*egfp*的高粱原生质体中*egfp*的表达量是阴性对照的7200多倍(图3C),说明转

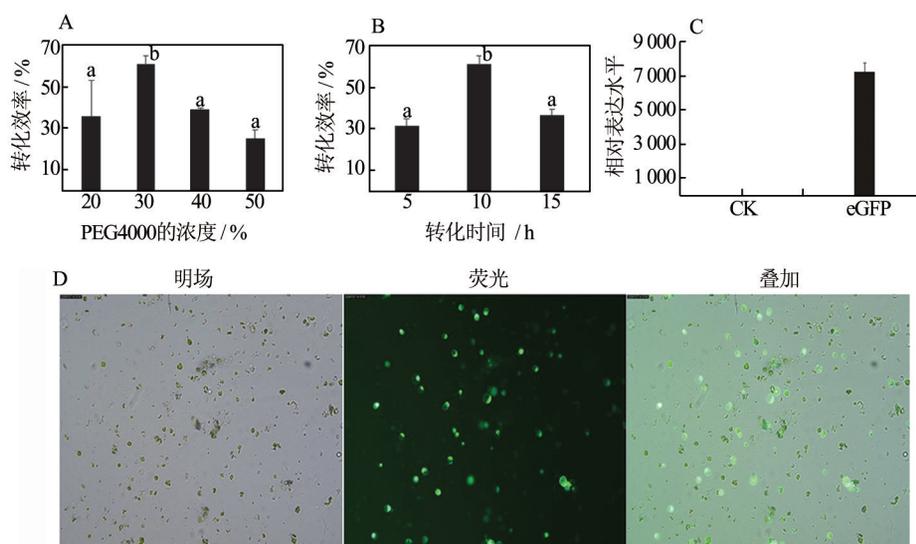


图3 转化条件的优化及转化结果

Fig. 3 Optimization of transformation conditions and transformation results

注:A, PEG4000浓度对原生质体转化的影响;B,转化时间对原生质体转化的影响;C,实时荧光定量PCR对转化结果的验证;D,荧光显微镜下的转化结果;红色比例尺,75  $\mu\text{m}$

Note: A, effect of PEG4000 concentration on protoplast transformation; B, effect of transformation time on protoplast transformation; C, verification of transformation results with quantitative real-time PCR; D, transformation results under fluorescence microscope; red scale bars, 75  $\mu\text{m}$

入到高粱原生质体中 *egfp* 基因的高效表达,进一步证明转入到高粱原生质体中 *egfp* 基因的真实性。

### 3 讨论

植物原生质体瞬时表达体系可以用于基因瞬时表达、蛋白质亚细胞定位、蛋白质互作和启动子分析等,是用于遗传育种和功能基因组研究的有力工具。本研究以前人在模式植物拟南芥、水稻和玉米等中建立的原生质体瞬时表达体系为基础,通过摸索和优化体系中的渗透压、酶浓度、酶解时间、PEG4000浓度和转化时间,建立了高质量的高粱品种BTx623的原生质体瞬时表达体系,其转化效率达到60%以上,和以往报道有显著的提高。

目前常用的原生质体分离体系大都和2007年在拟南芥中建立的原生质体分离体系类似<sup>[7]</sup>,多以叶肉为材料利用纤维素酶和离析酶分离原生质体,使用真空装置及慢速振荡等方法来加快酶解过程,使用离心法或者界面法来纯化富集原生质体。也有研究使用水稻幼苗的茎和叶鞘为材料获得了大量优质原生质体<sup>[17]</sup>,且有文献报道在相同的酶解条件下,幼茎和叶鞘的酶解效果显著高于幼叶<sup>[18]</sup>。因此本研究在高粱中也使用茎和叶鞘为材料,获得了大量高活力的原生质体,证实了在高粱中使用茎和叶鞘分离原生质体的可行性。另外对比高粱和其他植物的原生质体分离体系,我们发现高粱和亲缘关系较近

的水稻<sup>[17]</sup>、玉米<sup>[19]</sup>所需的渗透压是一致的,而和拟南芥<sup>[7]</sup>、杨树<sup>[20]</sup>、柑橘<sup>[21]</sup>等则相差较大,可能是亲缘关系越近的植物中细胞的组成更为接近,导致所需渗透压相同,结合前人在水稻中的研究,如在水稻品种日本晴中使用愈伤和幼茎作为材料分离原生质体所需渗透压分别为0.4 mol/L<sup>[22]</sup>和0.6 mol/L<sup>[17]</sup>,综合上述可以推断由于不同植物或相同植物不同环境、不同取材部位以及不同生长阶段都会导致细胞内的组成有一定的区别,其所需渗透压也明显差异,所以要根据材料的不同来摸索适合的渗透压,只能通过经验来判断。再对比原生质体分离中细胞壁降解酶的浓度,发现不同植物中所需酶的浓度差别较大,如高粱(1%纤维素酶、0.25%离析酶)和亲缘关系较近的水稻(1.5%纤维素酶、0.75%离析酶)<sup>[17]</sup>、玉米(1.5%纤维素酶、0.5%离析酶)<sup>[19]</sup>、小麦(0.5%纤维素酶、0.6%离析酶)<sup>[23]</sup>之间所需酶浓度有不小的差异,和木本植物杨树(3%纤维素酶、0.8%离析酶)<sup>[20]</sup>、柑橘(2.4%纤维素酶、1.2%离析酶)<sup>[21]</sup>等相比则纤维素酶的差异更大,离析酶的差异则较小,这是由于取材不同(不同植物、不同生长时期或者不同组织部位)导致细胞壁的组成不一样,所以即使亲缘关系较近的植物之间所用酶的浓度仍有一定区别,而木本植物的细胞壁中含有更多的纤维素,导致了纤维素酶浓度上的巨大差异。在高粱原生质体分离体系建立的过程中我们还发现原生质体随着酶解时

间的增加先是逐步上升后逐步下降的过程,类似一个正态分布,中间存在一个平衡期,这个平衡期则是适合的酶解时间,利用真空处理后,酶解时间大都集中在4~6 h<sup>[7,17,19~21,23]</sup>。

为了建立高粱BTx623原生质体瞬时表达体系,本研究对PEG浓度和转化时间等条件对原生质体转化的影响进行摸索,最终发现30%浓度的PEG4000和转化时间10 min的条件下转化率达到60%以上。对比其他研究结果可以看出大多数植物的原生质体中分子量4 000的聚乙二醇在20%~40%的浓度下就能打开足够数量和大小的通道,让外源遗传物质进入细胞内,并且不管是草本或者是木本植物,在失去细胞壁后,对于作用于细胞膜的PEG来说,耐受性相差不大,且差异主要表现在作用时间上。另外很多植物原生质体的转化中都使用低渗溶液,其甘露醇浓度都在0.2 mol/L,如拟南芥<sup>[7]</sup>、水稻<sup>[17]</sup>、玉米<sup>[19]</sup>和杨树<sup>[20]</sup>等,理由是在低渗透压下,胞外水分会自动进入胞内,这种水势会导致外源遗传物质更易进入胞内。但是本研究中为了提高原生质体的存活率仍然使用0.6 mol/L的甘露醇来保持一个等渗环境,也取得了较好的效果,但如果需要更高的转化率,我们也可以采用低渗溶液来进一步增加转化率。

#### 4 结 论

本研究在拟南芥、水稻和玉米等模式植物原生质体制备及瞬时转化体系的基础上,对影响高粱原生质体制备和PEG-Ca介导的原生质体转化的重要因素,如酶解液中纤维素酶和离析酶的浓度、酶解时间、渗透压、PEG-Ca溶液中PEG4000的浓度和转化时间进行了探索,确定了较为合适的原生质体分离和转化条件,成功建立了高粱品种BTx623原生质体分离和瞬时转化体系,为以后高粱品种BTx623的遗传育种和功能基因组研究提供了一种快速、高效的工具。

#### 参 考 文 献

- [1] Paterson A H, Bowers J E, Bruggmann R, *et al.* The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses [J]. *Nature*, 2009, 457(7229): 551-556.
- [2] Wei Z M, Xu Z H, Huang J Q, *et al.* Plants regenerated from mesophyll protoplasts of white mulberry [J]. *Cell Res*, 1994, 4(2): 183-189.
- [3] Miller R A, Gamborg O L, Keller W A, *et al.* Fusion and division of nuclei in multinucleated soybean protoplasts [J]. *Can J Genet Cytol*, 1971, 13(2): 347-353.
- [4] Aleksandra W, Florina V, Caroline S, *et al.* An update on abscisic acid signaling in plants and more [J]. *Mol Plant*, 2008(2): 198-217.
- [5] Wang Y H, Zhang L R, Zhang L L, *et al.* A novel stress-associated protein SbSAP14 from *Sorghum bicolor* confers tolerance to salt stress in transgenic rice [J]. *Mol Breed*, 2013, 32(2): 437-449.
- [6] Cocking E C. A method for the isolation of plant protoplast and vacuoles [J]. *Nature Protocol*, 1960, 187(4741): 962-963.
- [7] Yoo S D, Cho Y H, Sheen J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(7): 1565-1572.
- [8] He F, Chen S, Ning Y, *et al.* Rice (*Oryza sativa*) protoplast isolation and its application for transient expression analysis [J]. *Curr Protoc Plant Biol*, 2016, 1(2): 373-383.
- [9] Sheen J. Signal transduction in maize and *Arabidopsis* mesophyll protoplasts [J]. *Plant Physiol*, 2001, 127(4): 1466-1475.
- [10] Jiang L, Wang J, Liu Z, *et al.* Silencing induced by inverted repeat constructs in protoplasts of *Nicotiana benthamiana* [J]. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 2010, 100(2): 139-148.
- [11] Espejo R, Cipriani G, Golmirzaie A. An efficient method of protoplast isolation and plant regeneration in the wild species *Solanum papita* Rydberg [J]. *BioTecnología*, 2012, 16(4): 24-31.
- [12] Yao L P, Liao X, Gan Z Z, *et al.* Protoplast isolation and development of a transient expression system for sweet cherry (*Prunus avium* L.) [J]. *Sci Hortic*, 2016, 209: 14-21.
- [13] Gao J, Yan S Q, Yu H Y, *et al.* Sweet sorghum (*Sorghum bicolor* L.) SbSTOP<sub>1</sub> activates the transcription of a  $\beta$ -1,3-glucanase gene to reduce callose deposition under Al toxicity: a novel pathway for Al tolerance in plants [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, 83(3): 446-455.
- [14] 谢鑫, 蒋君梅, 王勇, 等. 高粱原生质体的制备及转化方法研究[J]. *种子*, 2019, 38(8): 43-46.  
Xie X, Jiang J M, Wang Y, *et al.* Study on the method of protoplast isolation and transformation of *Sorghum bicolor* [J]. *Seed*, 2019, 30(8): 43-46.
- [15] 闫丽, 夏光敏, 黄应华, 等. 高粱肉桂酸羟化酶基因SbC4H1降低拟南芥的木质素合成[J]. *植物生理学报*, 2013, 49(12): 1433-1441.  
Yan L, Xia G M, Huang Y H, *et al.* Cinnamic acid 4-hydroxylase of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) gene *SbC4H1* restricts lignin synthesis in *Arabidopsis*

- [J]. *Plant Physiol Commun*, 2013, 49(12): 1433-1441.
- [16] Malnoy M, Viola R, Jung M H, *et al.* DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins [J]. *Front in Plant Sci*, 2016, 7: 1904.
- [17] Zhang Y, Su J B, Duan S, *et al.* A highly efficient rice green tissue protoplast system for transient gene expression and studying light/chloroplast - related processes [J]. *Plant Methods*, 2011, 7(1): 30.
- [18] Bart R, Chern M, Park C J, *et al.* A novel system for gene silencing using siRNAs in rice leaf and stem-derived protoplasts [J]. *Plant Methods*, 2006, 2: 13.
- [19] 张龄丹. PEG介导玉米叶肉细胞原生质体瞬时基因转化体系的应用研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2016.
- Zhang D L. A study on the application of a PEG-mediated transient gene expression system in maize mesophyll protoplasts [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2016. .
- [20] Guo J J, Morrell-Falvey J L, Labbé J L, *et al.* Highly efficient isolation of *Populus* mesophyll protoplasts and its application in transient expression assays [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44908.
- [21] 杨威. 柑橘原生质体瞬时转化体系的建立及应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- Yang W. Establishment and application of citrus protoplast transient transformation system [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016.
- [22] 黄红杰. 水稻 OsSPX 家族表达特征分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- Huang H J. Expression profiling of OsSPX family in rice (*Oryza sativa* L.) [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2006.
- [23] 杜晓敏, 王均, 安子玄, 等. 小麦叶肉细胞原生质体制备参数解析及在基因瞬时表达上的应用[J]. *华北农学报*, 2015, 30(6): 52-60.
- Du X M, Wang J, An Z X, *et al.* Factors influencing the preparation of wheat mesophyll protoplasts and the application of wheat mesophyll protoplasts in gene transient expression [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2015, 30(6): 52-60.

□

(编辑: 张丽红)