

技术与方法 Techniques and Methods

一种植物原生质体分离与瞬时转化的方法

赖叶林, 贺莹, 李欣欣*, 廖红

福建农林大学资源与环境学院根系生物研究中心, 福州350002

摘要: 本研究以拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)和大豆(*Glycine max*)为试验材料, 通过酶解法结合去除叶片下表皮的预处理, 以及PEG介导的转化, 建立了一种操作简单且高效的原生质体分离和瞬时转化方法, 为目标基因的亚细胞定位分析和基于原生质体为受体材料进行遗传等方面的基础研究提供方法支撑。结果表明, 利用上述方法, 3种植物均能获得较高产量且低破损率的原生质体, 同时避免了原生质体的纯化过程。其中, 拟南芥的原生质体产量最高, 其次是大豆和烟草; 并且, 烟草和拟南芥原生质体转化效率较高, 大豆较低, 烟草和拟南芥原生质体的转化效率高达50%以上, 分别是大豆的3.84和3.62倍。进一步的亚细胞定位分析发现, 烟草和拟南芥的原生质体在GFP和RFP共转定位时存在优势, 可用于目标基因的亚细胞定位分析。

关键词: 原生质体; 分离; 瞬时转化; 亚细胞定位

植物原生质体是除去细胞壁由质膜包被, 具有活力的裸露细胞。由于原生质体含有完整的遗传物质, 具有全能性, 是进行原生质体培养和融合等细胞工程研究的基础。目前, 原生质体技术已成功应用于多个领域(Gamborg和Holl 1977; Eeckhaut等2013; Jones等2015)。首先, 原生质体是遗传转化的良好受体, 通过转入特定目标基因, 改良作物产量、品质和抗逆性; 其次, 通过原生质体培养可获得再生植株, 结合在培养过程中产生无性系变异, 可进一步进行突变体分离、纯化及种质保存; 第三, 实现植物远缘遗传重组, 利用原生质体进行体细胞杂交, 可以打破有性杂交和远缘杂交的生殖障碍, 获得常规育种所无法创制的新种质或新品种; 第四, 利用原生质体进行理化诱变, 可创造有价值的突变体。此外, 在分子生物学基础研究中, 原生质体常常作为受体进行目的基因的瞬时表达继而分析亚细胞定位(Nagpal等2016)、蛋白质互作(Walter等2004; Chen等2006)、基因沉默(Zhang等2017)及基因编辑(Lin等2018a)等, 是快速、高效的常规技术手段。然而, 上述研究顺利开展的基础是获得高质量的原生质体, 因此, 原生质体高效分离方法的建立和优化具有十分重要的意义。

原生质体的制备主要通过物理或化学的手段去除细胞壁, 使原生质体游离出来的过程。物理

机械分离的方法首先是将植物进行质壁分离, 原生质体收缩成球形后, 将细胞壁切破而获得。此方法游离的原生质体产量较少, 并且对植物种类具有选择性。随后, 纤维素酶的发现以及在酶解细胞壁中的应用, 为原生质体的分离与培养开辟了新道路。酶解分离方法获得的原生质体数量多, 完整性好, 具有广适性。目前, 主要利用此方法分离植物的原生质体。影响原生质体分离效率和质量的因素有很多, 包括植物材料的种类及预处理、酶解条件, 例如酶解液的组合、酶解液pH、酶解时间和温度、渗透压和质膜稳定剂的选择与配比, 以及原生质体的纯化方法等(Aoyagi等1999; Zhu等2005; 陈名红等2005; 雷海英等2018)。植物的细胞壁组分存在差异(Won等2010), 如何提高细胞壁酶解效率同时减少原生质体损伤, 是原生质体高效分离方法建立的关键。

原生质体瞬时转化体系是分析基因功能和亚细胞定位的快速途径。转化方法通常包括聚乙二醇(PEG)介导法(Krens等1982; Wu等2017)、电击转化(Fromm等1985)及显微注射(Crossway等1986)

收稿 2019-03-24 修定 2020-04-05

资助 国家自然科学基金青年科学基金(31601814)和中国博士后科学基金第九批特别资助项目(2016T90592)。

* 通讯作者(lixinxin0476@163.com)。

等。其中, PEG转化方便、省时、不依赖仪器成本低, 并且具有相对较高的转化效率, 是一种较优的瞬时转化模式。目前, 以原生质体为受体进行瞬时表达的亚细胞定位研究中, 虽然在不同植物, 例如大豆(舒英杰等2017)、小麦(刘鑫等2017)中进行了报道, 但还是多见于双子叶拟南芥(Yoo等2007)以及单子叶水稻(Zhang等2011; He等2016)。与此同时, 不同植物原生质体的转化效率存在明显差异, 而转化效率与植物原生质体分离的质量及转化方式密切相关。

为建立一种简单、高效的原生质体分离和瞬时转化方法, 本研究以模式植物拟南芥和烟草以及大豆为研究材料, 进行了酶解前去除叶片下表皮的预处理, 免去由于纯化过程对细胞的损伤, 从而获得了大量完整的原生质体; 利用PEG介导的瞬时转化方法, 导入不同荧光蛋白的表达载体, 分析了亚细胞定位情况并进一步统计了原生质体的转化效率。研究结果为植物原生质体培养、融合试验, 以及以原生质体为受体材料进行亚细胞定位分析和各种遗传操作提供了方法参考。

1 材料与方法

1.1 植物材料培育

供试植物包括拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.] Columbia生态型、本氏烟草(*Nicotiana benthamiana* Domin.)和大豆[*Glycine max* (L.) Merr.] ‘Williams 82’。上述植物种子播于营养土(商品名为“捷菲Jiffy”)中, 在空气相对湿度为60%, 光周期为16 h光/8 h暗的步入式培养室中培养。其中, 拟南芥和烟草培育的光照强度为 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 并且分别在播种后20和30 d待4片新叶完全展开时, 剪取新叶进行原生质体游离; 而大豆在光照强度为 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 条件下, 播种后10 d收获完全展开的真叶进行游离。

1.2 试验方法

1.2.1 试剂的配置

拟南芥和烟草酶解液: 1.5%纤维素酶、0.3%离析酶、 $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇、 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl、 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2-吗啉乙磺酸(MES)。

大豆酶解液: 1%纤维素酶、0.3%果胶酶和9%甘露醇溶解于CPW溶液中。

CPW溶液: $225 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 、 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 、 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KNO_3 、 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgSO_4 、 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KI、 $100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 、 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 , 用KOH将pH值调至5.6。

W5溶液: $125 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 、 $154 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl、 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖、 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MES, 用KOH将pH值调至5.6。

MMG溶液: $15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 、 $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MES、 $400 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇, 用KOH将pH值调至5.6。

PEG溶液: 40% PEG4000、 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇、 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 。

1.2.2 原生质体分离

将上述拟南芥和烟草的酶解液10 mL放置在 55°C 水浴锅中10 min, 待酶解液冷却至室温后, 加入 $100 \mu\text{L}$ $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 和0.1%牛血清白蛋白(BSA), 并使用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤至培养皿中。挑选长势良好的植物叶片(图1-A和E), 平铺在型号为GJ2120的硬质绝缘胶带(日本中山TRUSCO)上, 再用硬质绝缘胶带覆盖, 并形成胶带-植物叶片-胶带类似“三明治”的处理模式, 随后轻轻剥离粘有植物下表皮的胶带, 在分离胶带的同时, 植物叶片下表皮随之剥离(图1-B和F), 将粘有植物上表皮的胶带按叶片形状进行修剪, 以胶带朝上叶片朝下的方式放入酶解液中(图1-C和G), 移至 28°C 、 $40 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床中酶解40 min。

而大豆酶解液直接使用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤至培养皿中, 取大豆真叶按着上述操作游离1 h (图1-I~L)。随后, 使用3层医用纱布过滤并将原生质体收集在50 mL圆底离心管中, 在 4°C 、 $100\times g$ 离心4 min。弃上清后, 缓慢加入5 mL预冷的W5溶液, 大豆原生质体则加入含9%甘露醇的CPW, 冰浴30 min。 4°C 、 $100\times g$ 离心3 min。弃上清, 用1 mL MMG溶液重悬, 获得叶片原生质体。

1.2.3 原生质体产量计算与观察

本试验采用血球计数板来计算原生质体数量。各取 $5 \mu\text{L}$ 上述原生质体于 25×16 型血球计数板中, 光学显微镜下统计中间25个方格内原生质体个

数。原生质体破损率(%)=破裂原生质体/原生质体总数 $\times 100$ 。原生质体产量 $[10^6 \cdot g^{-1} (FW)]$ =原生质体总数/0.1 $\times 1000$ /植物材料鲜重, 其中, 0.1为中间25个方格的体积, 单位为 mm^3 。每个样品计数3个重复。

1.2.4 原生质体瞬时转化

拟南芥和烟草原生质体瞬时转化共转载体为pCAMBIA1300和pm-rb *CD3-1008* (Nelson等2007); 大豆原生质体瞬时转化载体为pA7-YFP。

各吸取100 μL 拟南芥和烟草原生质体于2 mL离心管中, 分别加入10 μL 浓度为1 $g \cdot L^{-1}$ 的pCAMBIA1300和pm-rb *CD3-1008*质粒, 以及等体积即120 μL PEG后用手指轻弹管壁使溶液完全混匀, 静置诱导转化混合物5 min。随后加入480 μL W5溶液稀释混合物, 并轻柔管壁使其混匀以终止反应,

在离心力为100 $\times g$ 的条件下离心1 min, 弃上清, 加入100 μL W5重悬。

大豆原生质体的瞬时转化与拟南芥和烟草的相似, 取10 μL 浓度为1 $\mu g \cdot \mu L^{-1}$ 的pA7-YFP质粒加入到含有100 μL 原生质体的离心管中, 同样加入等体积即110 μL PEG后用手指轻弹管壁使溶液完全混匀, 静置诱导转化混合物15 min。随后加入440 μL 含9%甘露醇的CPW终止反应, 在上述条件下离心弃掉上清后, 加入100 μL 含9%甘露醇的CPW重悬。

瞬时转化的原生质体水平放置在20~25 $^{\circ}C$ 的弱光条件下培养16 h后, 在激光共聚焦显微镜(LSM880, Carl Zeiss)下观察亚细胞定位并统计转化效率。转化效率(%)=携带荧光的原生质体数目/原生质体总数 $\times 100$ 。选取3个有代表性的视野进

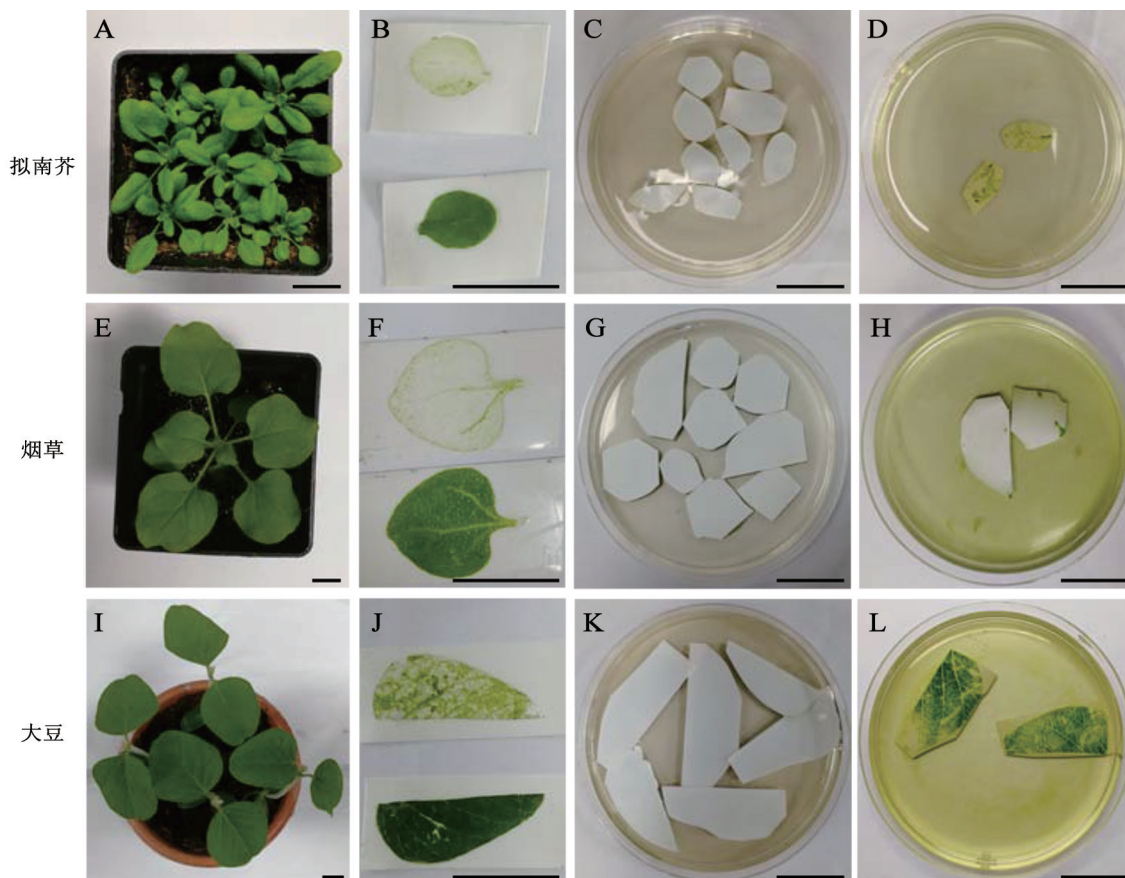


图1 不同植物叶片原生质体的分离处理

Fig.1 Isolation of leaf protoplasts from different plant species

A~D: 拟南芥叶片原生质体的分离; E~H: 烟草叶片原生质体的分离; I~L: 大豆叶片原生质体的分离。B、F和J: 叶片下表皮的去除; C、G和K: 去除下表皮的叶片, 以胶带朝上叶片朝下的方式在酶解液中酶解; D、H和L: 叶片酶解后原生质体被分离在酶解液中。图中标尺为2 cm。

行统计, 并计算平均值。观察绿色荧光蛋白(GFP)时, 激光共聚焦显微镜激发光波长为488 nm, 发射光波长为500~525 nm; 观察红色荧光蛋白(RFP)时, 激发光波长为543 nm, 发射光波长为560~615 nm; 观察黄色荧光蛋白(YFP)时, 激发光波长为514 nm, 发射光波长为520~560 nm。

2 实验结果

2.1 植物叶片原生质体的分离

植物生长状态直接影响原生质体质量。为了获得高活性的原生质体, 本研究利用生长20 d的拟南芥和30 d的烟草, 生长至四片叶完全展开时进行分离(图1-A和E), 而大豆于生长10 d分离真叶的原生质体(图1-I)。试验中, 结合硬质胶带去掉叶片下表皮, 不同植物叶片下表皮被剥离并在胶带上清晰可见(图1-B、F和J)。随后, 植物叶片朝下, 放入酶解液中酶解40 min至1 h (图1-C、G和K), 培养皿中酶解液明显变成黄绿色。将粘有叶片的胶带反转, 发现除大豆叶片仍有部分残留外(图1-L), 拟南芥和烟草叶片几乎全部被酶解(图1-D和H)。说明,

去掉叶片下表皮, 酶解液与植物叶片充分接触, 有助于原生质体的高效分离。

进一步利用光学显微镜观察分离获得的原生质体状态, 结果如图2所示, 通过剥离植物叶片下表皮, 酶解后能获得大量完整的原生质体。同时, 拟南芥(图2-A)、烟草(图2-B)和大豆(图2-C)叶片原生质体包含大量叶绿体且具有相似的形态。然而, 3种植物分离获得原生质体产量存在差异(表1)。其中, 拟南芥叶片原生质体产量最高且破损率最低, 产量分别是烟草和大豆的2.17和1.88倍, 说明, 在相同酶解液和酶解时间条件下, 拟南芥能获得更多的原生质体。而烟草和大豆叶片分离获得的原生质体产量和破损率相近, 每克幼嫩叶片分别能制备 $(6.6\pm0.1)\times10^6$ 和 $(7.6\pm0.2)\times10^6$ 个原生质体(表1)。

2.2 PEG介导的原生质体转化分析

本研究利用PEG介导的原生质体转化法, 对拟南芥、烟草和大豆原生质体进行转化比较分析。结果如图3所示, 同一视野条件下, 拟南芥(图3-A)和烟草(图3-B)的多个原生质体成功被转化而含有GFP信号, 对比而言, 大豆原生质体转化效率

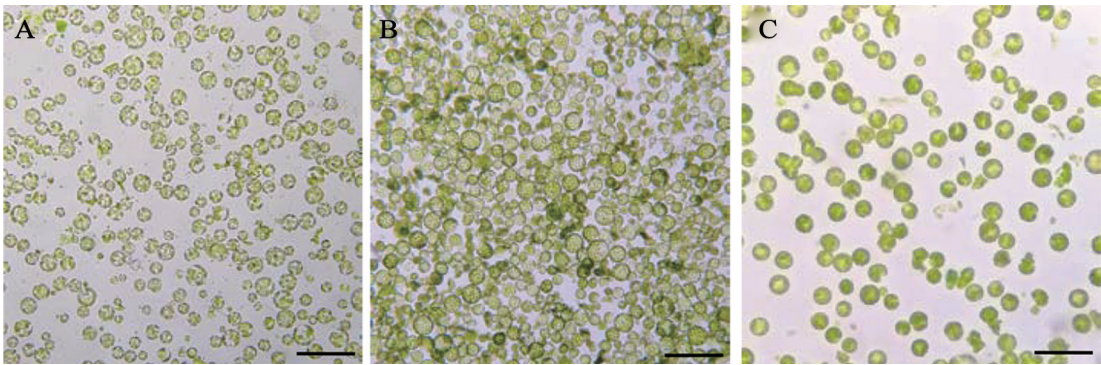


图2 光学显微镜观察不同植物叶片原生质体
Fig.2 Observation of mesophyll protoplasts from different plant species through light microscope
A: 拟南芥叶片分离获得的原生质体; B: 烟草叶片分离获得的原生质体; C: 大豆叶片分离获得的原生质体。图中标尺为200 μm。

表1 不同植物原生质体产量及转化效率比较分析

Table 1 Comparative analysis of output and transformation efficiency of protoplasts isolated from different plant species			
植物名称	原生质体破损率/%	原生质体产量/ $10^6\cdot g^{-1}$ (FW)	转化效率/%
拟南芥	3.5±0.5	14.3±0.8	52.5±1.3
烟草	7.0±0.6	6.6±0.1	55.7±2.7
大豆	6.9±0.3	7.6±0.2	14.5±1.0

较低(图3-C)。进一步数据统计发现(表1), 拟南芥和烟草的转化率分别达到了52.5%和55.7%, 而大豆仅有14.5%。暗示了PEG转化法可能更适合应用于拟南芥和烟草原生质体的转化, 针对大豆原生质体转化效率的提高还需要进一步试验探索。

2.3 亚细胞定位分析

为了分析上述方法分离的原生质体功用性, 将pCAMBIA1300 (GFP)和pm-rb *CD3-1008* (RFP)质粒分别共同转入拟南芥(图4-A)和烟草(图4-B)的原生质体, 将pA7-YFP质粒转入大豆原生质体(图

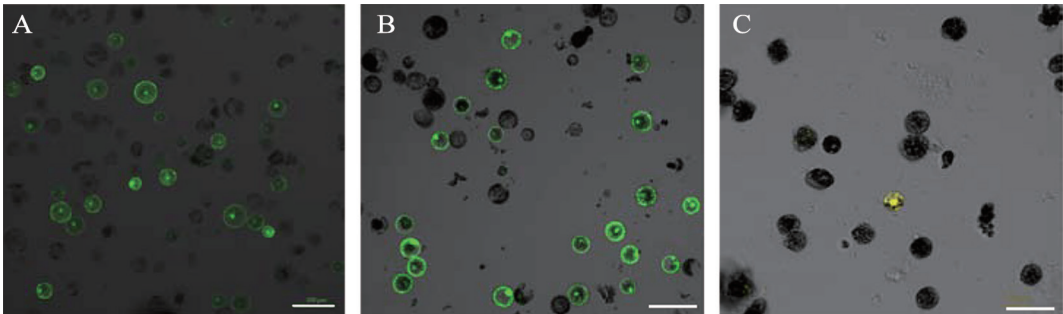


图3 PEG介导的原生质体转化

Fig.3 PEG-mediated protoplast transformation

A: 拟南芥原生质体的转化; B: 烟草原生质体的转化; C: 大豆原生质体的转化。图中标尺为100 μm。

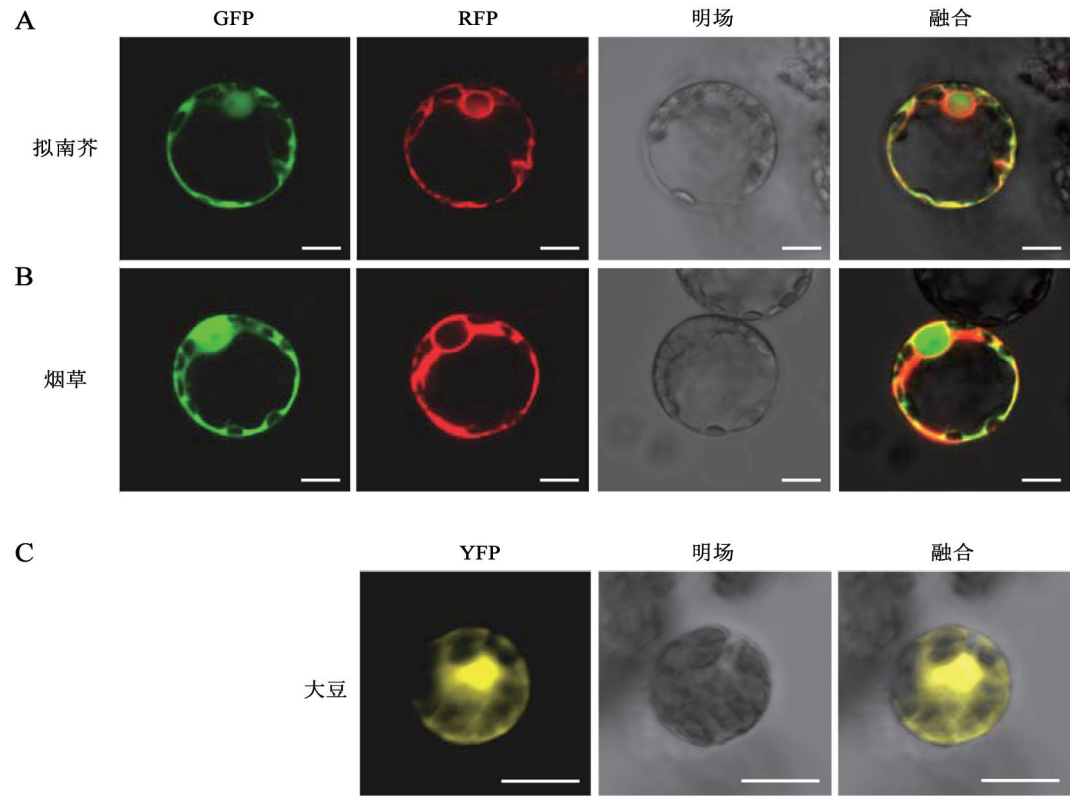


图4 空载体在不同植物原生质体中的亚细胞定位

Fig.4 Subcellular localization of empty vector in protoplasts from different plant species

A: 拟南芥原生质体中的荧光信号; B: 烟草原生质体中的荧光信号; C: 大豆原生质体中的荧光信号。GFP代表绿色荧光蛋白, RFP代表红色荧光蛋白, YFP代表黄色荧光蛋白。图中标尺为100 μm。

4-C), 在激光共聚焦条件下观察亚细胞定位。结果如图4所示, 拟南芥和烟草原生质体细胞核、细胞质和细胞膜中均检测到GFP信号, 在质膜和核膜中检测到RFP信号, 并且GFP和RFP呈现很好的融合。考虑到大豆原生质体转化效率问题, 本试验利用小载体pA7-YFP分析其在大豆中的黄色荧光信号。从图4-C中看出, 黄色荧光主要集中在细胞质、细胞膜和细胞核中。综上可知, 利用酶解法结合去除叶片下表皮而分离获得的原生质体, 通过PEG转化技术, 能够进行亚细胞定位分析。

3 讨论

植物原生质体是研究基因功能、亚细胞定位、信号传导、细胞融合及新品种培育等方面的重要试验材料(Lin等2018b)。然而, 原生质体的高效分离是相关试验顺利开展的前提。因此, 本研究以拟南芥、烟草和大豆为材料, 建立了一种简单、高效且易操作的原生质体分离和瞬时转化方法, 以期为目标基因的亚细胞定位以及以原生质体为材料的基础研究等提供可操作的技术支撑和方法参考。

本研究的原生质体分离采用酶解法, 主要结合硬质胶带去掉植物叶片下表皮的处埋, 省去原生质体纯化过程。以往的研究通常将叶片切成0.5 mm左右的细条后进行酶解, 而酶解后的原生质体中会含有大量未酶解完的叶片残渣、组织和细胞碎片等, 对后续实验操作影响很大, 因此需要对酶解产物进行纯化(王莉和姚占军2009)。与传统的叶片切条或镊子撕取下表皮相比, 利用硬质胶带不仅简单、易操作, 酶解充分而且避免了原生质体纯化时相互挤压而引起的细胞破裂。此外, 将切成细条的植物叶片进行酶解时, 所需的时间较长, 在拟南芥(Yoo等2007)和大豆(Wu和Hanzawa 2018)中为4~6 h, 本试验中对拟南芥、烟草和大豆的酶解可在1 h内完成, 极大地节省了时间。同样作为模式植物, 烟草应用于原生质体的瞬时转化中的应用研究远少于拟南芥。从本试验中烟

草原生质体的产量、转化率及转化效果来看(表1和图4), 烟草也是进行原生质体瞬时转化的理想材料。

植物生长状态直接影响原生质体分离的质量, 根据不同植物的生长速率, 作物一般采用培养7~10 d细胞活力高的幼苗叶片进行游离, 包括玉米(雷海英等2018)、小麦(杜晓敏等2015)和大豆(舒英杰等2017)等均能获得较高产量的原生质体。模式植物, 例如拟南芥和烟草生长至4片叶完全展开时, 即可用于原生质体游离。通过比较分离烟草无菌苗和温室苗叶片原生质体, 发现其质壁分离预处理时间、原生质体质量和细胞碎片含量等存在明显差异(陈名红等2005)。说明, 植物苗龄和培养模式均会影响原生质体的高效分离和后续试验。本研究利用播种后20、30和10 d生长状态良好的拟南芥、烟草和大豆进行原生质体分离(图1), 获得了高产量且低破损率的原生质体(图2)。虽然拟南芥和烟草使用同一酶解方案, 但相比而言, 拟南芥原生质体产量最高同时破损率仅占3.5% (表1), 暗示了试验中所用的分离方法更适合拟南芥叶片原生质体的游离。

20%~50%的高分子化合物PEG能对原生质体产生瞬间冲击效应而使其快速收缩, 同时PEG连接阳离子 Ca^{2+} 与带负电荷的质粒DNA之间形成桥, 能促使质粒进入原生质体, 是一种便捷、快速的转化方法(Datta和Datta 1999; Wu等2017)。本研究利用PEG介导的转化比较了不同植物原生质体的转化效率和亚细胞定位(图3和4), 发现拟南芥和烟草虽然分离获得的原生质体产量存在差异, 但其转化效率相近且均达到50%以上(表1)。同时亚细胞定位的试验表明, 两者在共转定位时存在优势, GFP和RFP在同一原生质体中能高效表达(图4-A和B), 可用于目标基因的亚细胞定位分析。利用大豆叶片分离原生质体, 虽然产量较高, 但其转化效率比较低, 即使使用小载体pA7-YFP, 转化率不到20% (表1)。Xiong等(2019)利用短日照条件下生长10 d的大豆真叶进行原生质体游离和转化试验,

发现PGE4000介导的转化效率高达80%以上。然而, 本试验中采用的是长日照生长的植株叶片, 这种植物生长条件的差异可能是造成大豆转化效率低的原因之一, 如何提高大豆原生质体的转化效率还需要进一步试验验证。

参考文献(References)

- Aoyagi H, Takayanagi T, Jitsufuchi T, et al (1999). Development of an apparatus for monitoring protoplast isolation from plant tissues based on both dielectric and optical methods. *J Biosci Bioeng*, 87 (6): 752–768
- Chen MH, Xiong L, Chen XJ (2005). Isolation and purification of mesophyll protoplast in tobacco. *J Yunnan Natl Univ (Nat Sci Ed)*, 14 (4): 326–329 (in Chinese with English abstract) [陈名红, 熊立, 陈学军(2005). 烟草叶肉原生质体分离和纯化研究. 云南民族大学学报(自然科学版), 14 (4): 326–329]
- Chen S, Tao L, Zeng L, et al (2006). A highly efficient transient protoplast system for analyzing defence gene expression and protein-protein interactions in rice. *Mol Plant Pathol*, 7 (5): 417–427
- Crossway A, Oakes JV, Irvine JM, et al (1986). Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Mol Genet Genomics*, 202: 179–185
- Datta K, Datta SK (1999). Transformation of rice via PEG-mediated DNA uptake into protoplasts. *Methods Mol Biol*, 111: 335–347
- Du XM, Wang J, An ZY, et al (2015). Factors influencing the preparation of wheat mesophyll protoplasts and the application of wheat mesophyll protoplasts in gene transient expression. *Acta Agric Boreali-Sin*, 30 (6): 52–60 (in Chinese with English abstract) [杜晓敏, 王均, 安子玄等 (2015). 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. 华北农学报, 30 (6): 52–60]
- Eeckhaut T, Lakshmanan PS, Deryckere D, et al (2013). Progress in plant protoplast research. *Planta*, 238 (6): 991–1003
- Fromm M, Taylor LP, Walbot V (1985). Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82: 5824–5828
- Gamborg OL, Holl FB (1977). Plant protoplast fusion and hybridization. *Basic Life Sci*, 9: 299–316
- He F, Chen S, Ning Y, et al (2016). Rice (*Oryza sativa*) protoplast isolation and its application for transient expression analysis. *Curr Protoc Plant Biol*, 1 (2): 373–383
- Jones AMP, Shukla MR, Biswas GC, et al (2015). Protoplast-to-plant regeneration of American elm (*Ulmus americana*). *Protoplasma*, 252 (3): 925–931
- Krens FA, Molendijk L, Wullems GJ, et al (1982). *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. *Nature*, 296: 72–74
- Lei HY, Bai FL, Feng Y, et al (2018). Preparation of maize leaf protoplasts and establishment of transient transformation system. *J Changzhi Univ*, 35 (02): 11–14 (in Chinese with English abstract) [雷海英, 白凤麟, 冯宇等(2018). 玉米叶片原生质体的制备及瞬时转化体系的建立. 长治学院学报, 35 (02): 11–14]
- Lin CS, Hsu CT, Yang LH, et al (2018a). Application of protoplast technology to CRISPER/Cas9 mutagenesis: from single cell mutation detection to mutant plant regeneration. *Plant Biotechnol J*, 16: 1295–1310
- Lin HY, Chen JC, Fang SC (2018b). A protoplast transient expression system to enable molecular, cellular, and functional studies in *Phalaenopsis* orchids. *Front Plant Sci*, 9: 843
- Liu X, Wei XN, Zhang XW, et al (2017). Establishment of a highly-efficient transformation system of wheat protoplasts. *J Plant Gen Res*, 18 (1): 117–124 (in Chinese with English abstract) [刘鑫, 魏学宁, 张学文等(2017). 小麦原生质体高效转化体系的建立. 植物遗传资源学报, 18 (1): 117–124]
- Nagpal A, Ndamukong I, Hassan A, et al (2016). Subcellular localizations of *Arabidopsis* myotubularins MTM1 and MTM2 suggest possible functions in vesicular trafficking between ER and *cis*-Golgi. *J Plant Physiol*, 200: 45–52
- Nelson BK, Cai X, Nebenführ A (2007). A multicolored set of *in vivo* organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant J*, 51: 1126–1136
- Shu YJ, Huang LY, Chen M, et al (2017). Establishment and optimization of systems for protoplasts isolation of soybean and chickpea that used in subcellular location. *Chin J Biotech*, 33 (6): 976–985 (in Chinese with English abstract) [舒英杰, 黄丽燕, 陈明等(2017). 基于亚细胞定位的大豆和鹰嘴豆原生质体分离体系的建立与优化. 生物工程学报, 33 (6): 976–985]
- Walter M, Chaban C, Schütze K, et al (2004). Visualization of

- protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J*, 40 (3): 428–438
- Wang L, Yao ZJ (2009). Advances on the preparation and vitality testing for plant protoplast. *Biotech Bull*, (S1): 46–50 (in Chinese with English abstract) [王莉, 姚占军 (2009). 植物原生质体的制备与活力检测研究进展. *生物技术通报*, (S1): 46–50]
- Won SK, Choi SB, Kumari S, et al (2010). Root hair-specific *EXPANSIN B* genes have been selected for *Graminaceae* root hairs. *Mol Cells*, 30 (4): 369–376
- Wu F, Hanzawa YA (2018). A simple method for isolation of soybean protoplasts and application to transient gene expression analyses. *J Vis Exp*, 131: e57258
- Wu JZ, Liu Q, Geng XS, et al (2017). Highly efficient mesophyll protoplast isolation and PEG-mediated transient gene expression for rapid and large-scale gene characterization in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *BMC Biotechnol*, 17 (1): 29
- Xiong L, Li C, Li HY, et al (2019). A transient expression system in soybean mesophyll protoplasts reveals the formation of cytoplasmic GmCRY1 photobody-like structures. *Life Sci*, 62: 1–8
- Yoo SD, Cho YH, Sheen J (2007). *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc*, 2: 1565–1572
- Zhang Y, Su J, Duan S, et al (2011). A highly efficient rice green tissue protoplast system for transient gene expression and studying light/chloroplast-related processes. *Plant Methods*, 7: 30
- Zhang N, Zhang D, Li JF (2017). A simple protoplast-based method for screening potent artificial miRNA for maximal gene silencing in *Arabidopsis*. *Curr Protoc Mol Biol*, 117: 26.9.1–26.9.10
- Zhu LQ, Wang BC, Zhou J, et al (2005). Protoplast isolation of callus in *Echinacea augustifolia*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 44 (1): 1–5

An approach to isolation and transient transformation of protoplasts in plants

LAI Yelin, HE Ying, LI Xinxin*, LIAO Hong

Root Biology Center, College of Resources and Environment, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: In this study, *Arabidopsis thaliana*, tobacco (*Nicotiana benthamiana*) and soybean (*Glycine max*) plants were used as experimental materials to establish a simple and efficient method for isolation and transient transformation of protoplasts through enzymatic hydrolysis combined with pretreatment for removing the lower epidermises and PEG-mediated transformation, respectively. Our study aims to provide technical support for the subcellular localization analysis and the genetic related fundamental research using protoplasts as the receptor. The results showed that it could obtain the protoplasts with high yield and low broken rate, as well as eliminate the purification processes from all three plant species by using the above approach. Among them, *A. thaliana* produced the highest yield of protoplasts, followed by soybean and tobacco. Furthermore, tobacco and *A. thaliana* had higher transformation rates of protoplasts than that of soybean. The transient transform rate of protoplasts in tobacco and *A. thaliana* was more than 50%, which was 3.84 and 3.62-fold of soybean, respectively. The results from subcellular localization analysis showed that the protoplasts from tobacco and *A. thaliana* exhibited advantages in the co-localization of GFP and RFP, which could be used for the subcellular localization analysis of target genes.

Key words: protoplast; isolation; transient transformation; subcellular localization

Received 2019-03-24 Accepted 2020-04-05

This work was supported by National Natural Science Foundation of China Youth Science Foundation (31601814), and Special Financial Grant from the China Postdoctoral Science Foundation (2016T90592).

*Corresponding author (lixinxin0476@163.com).