

## 研究简报

## 海带雌性原生质体的分离与培养\*

秦松 王希华 童顺 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

**提要** 于1993年1月—1993年4月,为了制备遗传性纯一的基因工程受体,用酶法从海带雌配子体单性生殖系分离雌性单倍体原生质体。从皱纹盘鲍消化腺及消化器官提取出鲍酶,在25℃下、1%(W/V)的鲍酶与2%(W/V)的纤维素酶(Onozuka R-10)合用能有效解离单细胞和原生质体。海带雌性原生质体经2d培养再生了细胞壁。

**关键词** 海带 雌配子体 原生质体 鲍酶 纤维素酶

褐藻原生质体为实验生物学提供了新的研究系统(Butler et al., 1989),另一方面,又是基因工程重要的受体系统。1984年 Saga 等利用海胆酶分离海带(*Laminaria japonica*)原生质体成功,但没有获得细胞壁再生和细胞分裂的结果。Butler 等(1989)用鲍酶和纤维素酶制备了糖海带(*L. saccharina*)和掌状海带(*L. digitata*)原生质体,并获得了壁的再生。迄今为止,海带原生质体再生植株一直没有成功。方宗熙等(1978a, 1978b)创立了海带配子体单性生殖系及单倍体育种方法,其特点在于遗传性纯一,便于育种上形成纯种。海带单倍体原生质体的制备,国际上尚未见报道。本研究用鲍酶与纤维素酶从雌性配子体单性生殖系制备单倍体原生质体,试图克服从孢子体制备原生质体(二倍体)再生的困难,并为外源基因导入准备遗传性一致的受体,便于今后形成纯合转基因植株。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料及培养方法** 于1993年1月—1993年4月进行试验。海带(*Laminaria japonica*)雌配子体单性生殖系由本所蒋本禹教授提供。用灭菌的 N-P 海水(N, 0.5 mmol/L; P, 0.05 mmol/L)在12.0℃±0.5℃和连续光照(约2000lx)培养。原生质体用加蔗糖(1%, W/V)和 NaCl(1%, W/V)的灭菌 N-P 海水在12.0℃±0.5℃、光暗周期12h/12h下培养。

**1.2 鲍酶的提取** 皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)购自黄岛。从消化腺、胃及嗉囊提取解壁酶的方法参考 Liu 等(1984),冷冻干燥结晶。酶活力以褐藻酸酶(alginase)活力表示,定义为:在25℃、2.5mg/ml褐藻酸钠(Sigma 产品 A-7128)反应体系(10

\* 国家科委及山东省科委合同攻关项目部分资助。博士论文一部分。秦松,男,出生于1968年5月,博士,副研究员。

彭国宏同志给予协助,谨志谢忱。

收稿日期:1994年4月11日,接受日期:1994年7月8日。

mmol/L Tris 缓冲液, pH = 7.8) 中, 使 O.D.<sub>235</sub> 每增加一个单位所需的酶量为一个活力单位 (UA)(Kloareg et al., 1987)。用海带胶纯品代替褐藻酸钠, 用 751 型分光光度计测量 235nm 处的吸光值, 估算酶活力。

**1.3 原生质体的制备与鉴定** 将鲍酶晶体用 0.1mol/L 的磷酸缓冲液 (pH6.5) 溶解, 于 18000r/min(4℃) 离心 20min, 上清液调 pH = 6.5, 并加入 0.7mol/L NaCl 作为渗透剂。海带雌配子体单性生殖系用离心 (1000r/min, 10min) 法收集, 用上述酶液悬浮, 雌配子体浓度在  $(1-5) \times 10^6$ /ml, 使鲍酶终浓度为 1%(W/V)。这时加入纤维素酶 (Onozuka R-10) 至 2%(W/V)。于 25℃ 保温后离心 (1000r/min) 收集细胞及原生质体, 去上清, 用灭菌海水 + 1%(W/V) NaCl + 1%(W/V) 葡萄糖悬浮。离心, 去上清, 再用 0.9mol/L 蔗糖漂浮原生质体。快速离心 (500r/min), 静止 10min 后, 吸取上层悬浮液, 用上述清洗液稀释、洗涤两次, 以除去酶和残物。观察时取出一滴, 加一滴 VBL 型荧光增白剂 (青岛肥皂厂) (0.1% W/V, 溶于 0.7mol/L NaCl 中), 染色 5min。用 Opton 荧光显微镜 Epi-fluorescent  $\times 16$  物镜, 紫外光蓝紫波长 (370nm) 激发荧光, 观察壁的有无。视原生质体对高渗或低渗溶液有无渗透反应而判断是否存活。培养 1—2d 后观察细胞壁的形成。

## 2 结果与讨论

**2.1 鲍酶的分离结果及其活力** 从皱纹盘鲍制取的解壁酶, 呈浅褐色针状结晶。其褐藻酸酶活力约为 0.33UA/mg。据 Liu 等(1984)报告, 海螺 *Turbo* sp. 消化器官提取物 30% 与 90% 饱和度之间的硫酸铵分级沉淀产物, 包括纤维素酶、褐藻酸酶、木聚糖酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、蛋白酶等; 另据 Boyen 等(1990)报告, 鲍 *Haliothis rufescens* 的提取物主要成份为褐藻酸酶、纤维素酶与墨角藻糖苷酶 (fucosidase); 据 Yamaguchi 等(1989)报告, 皱纹盘鲍内脏提取物主要含有纤维素酶、褐藻糖胶 (fucoïdan) 酶、甘露聚糖 (mannan) 酶、木聚糖酶; 据 Kloareg 等(1987)报告, 鲍 *Haliothis tuberculata* 提取物 45% 与 80% 饱和度之间的硫酸铵分级沉淀产物, 主要为甘露糖醛酸酶 (mannuronate lyase)。根据以上四篇文献推论, 本实验制取的鲍酶, 即 30% 与 90% 饱和度之间硫酸铵分级沉淀产物, 应包含褐藻酸酶、纤维素酶及甘露糖醛酸酶等成份, 能够分解褐藻细胞壁中的褐藻胶、纤维素、甘露聚糖等成份。下述结果也表明这一点。

**2.2 单细胞与原生质体的分离** 实验表明 (1% 鲍酶 + 2% 纤维素酶) 于 25℃ 保温 3h 后, 海带雌配子体单性生殖系丝状体结构 (图版 I:1) 松动, 游离出少量单细胞。5h 后单细胞明显增多, 部分单细胞聚集在一起, 细胞壁荧光很弱, 部分细胞已完全脱去细胞壁 (图版 I:2 为荧光观察, 图版 I:3 为荧光染色后普通观察)。保温过夜 (12h—16h) 后荧光观察, 大部分细胞已完全脱去细胞壁, 而且成活, 可见聚集成群的原生质体 (图版 I:4)。黑暗中保温, 可以增强酶的作用。

尽管鲍酶中含有少量的纤维素酶成份, 但活力较低, 与纤维素酶合用, 能够增强对褐藻细胞壁中纤维素骨架的解离作用。吴少波(1988)发现将海螺酶与纤维素酶结合使用能够提高裙带菜原生质体的得率。本实验证实, 以 0.7mol/L NaCl 为渗透剂, 以及 pH=6.5、25℃ 条件是酶解的适宜条件, 与吴少波(1988)用海螺酶分离裙带菜 (二倍体) 原生质体的条件基本一致。但吴少波的最适宜反应时间为 3—4h, 而本实验要酶解过夜后才能获得

大量原生质体,可能与海带雌配子体和裙带菜细胞的细胞壁在结构与成份上有差异,以及制备的酶活力较低有关。但提高酶的浓度,原生质体成活率下降,可能与酶液中有毒组分的作用有关。本实验还发现黑暗有利于解壁,以前学者没有黑暗对解壁影响的报道,仅吴少波(1988)发现光照有利于再生细胞壁,黑暗不利于壁的再生。

**2.3 原生质体的培养与壁的再生** 培养 2d 后荧光显微观察,可见部分细胞外围形成一层很弱的绿色荧光,为壁的结构,细胞质呈橙黄色(图版 1:5),与丝状体雌配子体细胞(图版 1:1)以及雌性原生质体(图版 1:4)的细胞质叶绿体自发红色荧光颜色有别。若继续培养,再生壁的细胞逐渐死亡,不能分裂。

Saga 等(1984)分离得到海带原生质体,用多种培养基培养,没有获得再生结果。Butler 等(1989)分离制备糖海带和掌状海带的原生质体,培养 1—2d 部分原生质体再生细胞壁,没有获得进一步结果。吴少波(1988)分离褐藻裙带菜原生质体,并培养成幼体,未获得完整植株。一般认为,植物激素对褐藻的生长发育有很大影响。N-P 海水培养紫菜原生质体能够再生完整植株(唐延林等,1982)。褐藻可能依赖某种内源或外源激素,有待进一步研究。

褐藻原生质体已作为生理、生化研究(Davison et al., 1990; Butler et al., 1990)、分化发育研究(Kloareg et al., 1987; Ducreux et al., 1988)模型;本研究提供的海带雌性原生质体,既可作为原生质体,研究海带雌配子体的各种性质、规律;又可作为雌性单倍体材料,导入外源基因,诱导细胞分裂,培育纯种转基因海带,具有学术上和实践上两方面的价值。

### 参 考 文 献

- 方宗熙等,1978a,海带配子体无性生殖系培育成功,科学通报,1: 115—116。  
 方宗熙等,1978b,海带单倍体遗传育种的实验,中国科学,2: 226—231。  
 吴少波,1988,裙带菜原生质体的分离和培养,青岛海洋大学学报,18(2): 57—65。  
 唐延林,1982,用酶法分离紫菜营养细胞和原生质体获得成功,海洋通报,1(5): 94—96。  
 Boyen, C. et al., 1990, Preparation of alginate lyases from marine molluscs for protoplast isolation in brown algae, *Phycologia*, 29(2): 173—181。  
 Butler, D. M. et al., 1989, Isolation conditions for high yields of protoplasts from *Laminaria saccharina* and *L. digitata*, *J. Exp. Bot.*, 40(220): 1237—1246。  
 Butler, A., et al., 1990, Studies of vanadium-bromoxidase using surface and cortical protoplasts of *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta), *J. Phycol.*, 26: 589—592。  
 Davison, I. and Polne-Fuller, M., 1990, Photosynthesis in protoplasts of *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta), *J. Phycol.*, 26: 384—387。  
 Ducreux, G. and Kloareg, B., 1988, Plant regeneration from protoplasts of *Sphaclaria*(Phaeophyceae), *Planta*, 174: 25—29。  
 Kloareg, B. and Quatrano, R. S., 1987, Enzymatic removal of the cell walls from zygotes of *Fucus distichus* (L.) Powell (Phaeophyta), *Hydrobiologia*, 151/152: 123—129。  
 Liu, W. et al., 1984, Studies on the preparation and on the properties of sea snail enzymes, *Hydrobiologia*, 116/117: 319—320。  
 Saga, N. and Sakai, Y., 1984, Isolation of protoplasts from *Laminaria* and *Porphyra*, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 50(6): 1085。  
 Yamaguchi, K. et al., 1989, Algal cell wall-degrading enzymes from viscera of marine animals, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55(1): 105—110。

## ISOLATION AND CULTURE OF FEMALE HAPLOID PROTOPLASTS FROM *LAMINARIA JAPONICA*

Qin Song, Wang Xihua, Tong Shun, Zeng Chengkui (C. K. Tseng)

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071*)

### ABSTRACT

Female haploid protoplasts were isolated in January to April, 1993 from female gametophytes of *Laminaria japonica* using abalone enzymes extracted from the digestive organs of the abalone *Haliotis discus hannai*. Single cells and protoplasts could be isolated effectively from filamentous gametophytes after incubation with 1% (W/V) abalone enzymes and 2% (W/V) cellulase (Onozyka R-10) at 25°C. Microscopy and fluorescent microscopy revealed that viable female haploid protoplasts were isolated, and that cell walls were regenerated after 2 days.

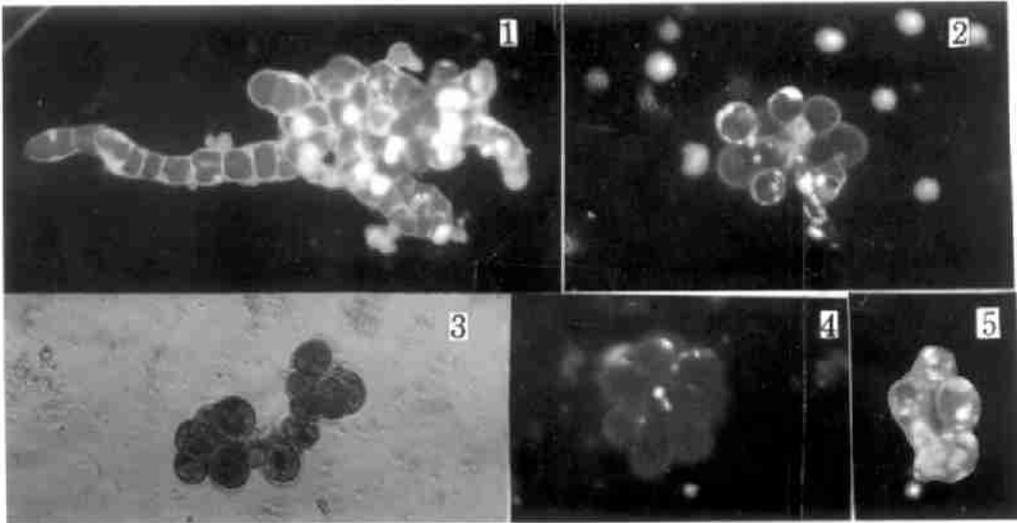
**Key words** *Laminaria japonica* Female gametophyte Protoplast  
Abalone enzymes Cellulase

### 欢迎订阅《海洋与湖沼》学报

《海洋与湖沼》学报遵循科学技术要面向经济建设的宗旨,倡导不同学术观点的争鸣,开展国内外学术交流,以繁荣学术、提高研究水平;报道最新科研成果,为促进科学技术的发展和加速社会主义现代化建设服务;发挥老科学家的指导作用、中年科技人员的骨干作用,热情扶植青年学者,以利于科技人才的尽快成长,从而不断壮大科技力量。《海洋与湖沼》学报,系海洋湖沼科技领域综合性的学术刊物,以报道基础研究、应用基础研究论文为主,同时重视应用研究、开发研究成果的发表;论文涉及水圈范围内的物理学、化学、地质学、环境学、生物学等学科及其分支学科的研究报告、简报、综述(还另设学术争鸣、学术简讯、书评等栏目)。对于发明创造和同国计民生有重大关系的研究成果、带有崭新学术观点的论文,特别是青年学者的优秀论文,将予以优先刊登。

《海洋与湖沼》学报由中国海洋湖沼学会主办,于1957年创刊,双月刊,国内外发行(国内邮发代号为2—421,国外刊号为BM69,每期定价8.00元,全年48.00元)。由于一向注重高水平、高质量,为学术交流、国家建设、人才成长作出引人注目的贡献,因而在国内外均享有较高声誉。1988—1993年获省部级以上优秀科技期刊奖7项,最高为国家二等奖。

《海洋与湖沼》学报愿同国内外广大科技工作者携手进步。



图版 I 海带雌性原生质体的分离和培养 (×160)

Plate I Isolation and culture of female haploid protoplasts from *Laminaria japonica*

1. 丝状海带雌配子体单性生殖系 (荧光增白剂染色观察结果) (filamentous female gametophytes of *L. japonica*, stained with VBL and excited by UV); 2, 3. 酶解5h后染色: 2. 荧光显微镜观察结果, 3. 相差显微镜观察结果 (2. after 5h of incubation with enzymes, stained and UV excited; 3. after 5h of incubation, stained but without UV excitation); 4. 酶解12h后染色, 荧光显微镜观察结果 (after 12h of incubation, stained and excited by UV); 5. 经培养2d后染色, 荧光显微镜观察结果 (after 2d of culture, stained and UV excited)。