

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2018.40562

楠迪娜, 薛敏, 唐宽刚, 任美艳, 王茅雁. 沙冬青子叶原生质体瞬时表达体系的建立及其 AmDREB1 蛋白的亚细胞定位[J]. 植物科学学报, 2018, 36(4): 562-568

Nan DN, Xue M, Tang KG, Ren MY, Wang MY. Establishment of the cotyledon protoplast transient expression system of *Ammopiptanthus mongolicus* and subcellular localization of the AmDREB1 protein[J]. *Plant Science Journal*, 2018, 36(4): 562-568

# 沙冬青子叶原生质体瞬时表达体系的建立及其 AmDREB1 蛋白的亚细胞定位

楠迪娜, 薛敏, 唐宽刚, 任美艳, 王茅雁\*

(内蒙古农业大学生命科学学院, 呼和浩特 010018)

**摘要:** 以沙冬青 (*Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f.) 幼苗的子叶为材料, 对其原生质体的分离、纯化和瞬时表达体系进行了研究。结果表明, 子叶原生质体分离的最佳酶解液组成为 CPW 溶液 + 3.0% 纤维素酶 R-10 + 0.5% 离析酶 R-10 + 0.3% 半纤维素酶 + 9.0% 甘露醇 (pH5.8); 最佳酶解条件为室温、避光、40 r/min 轻摇 14 h。采用 W5 溶液作为漂洗液将酶解物稀释后进行过滤, 将过滤液在 4℃、700 r/min 条件下离心 5 min, 所得纯化原生质体的产量约为  $2.50 \times 10^6$  cells/g, 活力达到 90%; 以纯化的原生质体作为受体, 利用聚乙二醇(PEG)介导法成功将植物瞬时表达载体 pBI-GFP 导入其中, 转化效率达到 50.8%。利用本研究建立的原生质体瞬时表达体系, 检测到沙冬青脱水应答转录因子 AmDREB1 定位于细胞核内。

**关键词:** 沙冬青; 原生质体; 瞬时表达; DREB 转录因子; 亚细胞定位

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2018)04-0562-07

## Establishment of the cotyledon protoplast transient expression system of *Ammopiptanthus mongolicus* and subcellular localization of the AmDREB1 protein

Nan Di-Na, Xue Min, Tang Kuan-Gang, Ren Mei-Yan, Wang Mao-Yan\*

(College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

**Abstract:** Using young cotyledons of *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f. seedlings as donor material, the technical system for the isolation, purification, and transient expression of the cotyledon protoplasts was studied. Results showed that the optimal enzyme solution for the protoplast isolation was CPW solution + 3.0% cellulase R-10 + 0.5% macerozyme R-10 + 0.3% hemicellulose + 9.0% mannitol (pH5.8), and the optimal enzymolysis conditions were gentle shaking of the enzyme solution containing cotyledon tissues at 40 r/min in the dark for 14 h at room temperature. Using the W5 solution as a washing solution, the enzymatic hydrolysate was diluted and filtered, with the filtrate then centrifuged at 4℃ and 700 r/min for 5 min. The purified protoplast yield was approximately  $2.50 \times 10^6$  cells/g and the protoplast viability reached 90%. Using the PEG-mediated method, the protoplasts were successfully transformed with plant transient expression vector pBI-GFP

收稿日期: 2018-03-26, 退修日期: 2018-05-23。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31260256, 31560299); 内蒙古自然科学基金重大项目(2012ZD02)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31260256, 31560299) and Major Project of Natural Science Fund of Inner Mongolia Autonomous Region (2012ZD02)。

作者简介: 楠迪娜(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物抗逆分子生物学(E-mail: nandina2014@163.com)。

\* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: wangmaoyan@163.com)。

and the transformation efficiency was 50.8%. Moreover, using the established protoplast transient expression system, a dehydration-responsive transcription factor of *A. mongolicus*, namely AmDREB1, was found in the nucleus.

**Key words:** *Ammopiptanthus mongolicus*; Protoplast; Transient expression; DREB transcription factor; Subcellular localization

植物原生质体是去除细胞壁后由细胞质膜包裹着的裸露细胞,由于其基本保持与来源组织或完整细胞相似的生理特征和胁迫应答反应,故可作为一种快捷、高效的多功能实验体系,广泛应用于植物分子生物学与基因工程研究。植物原生质体没有细胞壁的阻碍,易于实现外源基因的高效导入和快速表达,可作为建立基因瞬时表达体系比较理想的转化受体<sup>[1-5]</sup>。目前已在烟草(*Nicotiana tabacum* L.)<sup>[6, 7]</sup>、玉米(*Zea mays* L.)<sup>[1]</sup>、拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)<sup>[1, 2]</sup>、水稻(*Oryza sativa* L.)<sup>[4, 8]</sup>、杨(*Populus tremula* L.)<sup>[9]</sup>和大豆(*Glycine max* (L.) Merr.)<sup>[10]</sup>等模式植物和重要作物中建立了比较成熟的原生质体瞬时表达体系,其中以拟南芥叶肉原生质体瞬时表达体系的应用最为广泛。这些表达体系不仅被用作同种或异种植物目标蛋白亚细胞定位的常规技术,而且在激素与胁迫信号转导、基因表达调控、启动子活性分析、蛋白质胞内运输和蛋白质互作等研究中也得到应用<sup>[1-4, 7, 9]</sup>。近年来,随着转录组测序和功能基因组学研究的兴起,许多非模式植物,如一品红(*Euphorbia pulcherrima* Willd. et Kl.)<sup>[11]</sup>、油棕榈(*Elaeis guineensis* Jacq.)<sup>[12]</sup>、陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)<sup>[13]</sup>、菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.)<sup>[14]</sup>和鹰嘴豆(*Cicer arietinum* L.)<sup>[10]</sup>的原生质体瞬时表达体系已成功建立,为促进其功能基因的研究与利用提供了有力工具。

沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f.)是中亚荒漠区的常绿阔叶植物,主要分布于内蒙古、宁夏和甘肃的部分沙荒地。沙冬青具有很强的抗寒、抗旱和耐盐碱等抗逆特性,故成为研究植物抗逆机理和发掘抗逆基因的宝贵植物资源<sup>[15]</sup>。近年来,通过转录组学研究,已从沙冬青基因组中获得数万条功能基因序列和数千个抗逆相关基因<sup>[16-18]</sup>。后续的主要工作应围绕这些基因的功能分析与应用。因此,建立沙冬青的遗传转化体系十分必要。然而,由于该物种为多年

生灌木,通过组培再生途径来建立其稳定的遗传转化体系尚有难度且所需周期较长,而利用其原生质体等瞬时表达体系进行基因功能研究是一种较好的选择。本研究建立了沙冬青幼苗子叶原生质体的制备与目标基因瞬时表达体系,同时利用该体系对其抗逆相关转录因子 AmDREB1 (dehydration-responsive element-binding 1)进行了亚细胞定位分析,旨在为深入开展沙冬青抗逆相关基因的功能研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

沙冬青种子采于内蒙古自治区巴彦淖尔盟磴口县。采用 1% 的次氯酸钠溶液对种子表面进行消毒,接种于 1/2 MS 培养基上,放入 25℃ 光照培养箱中培养。

### 1.2 原生质体的分离与纯化

取培养 7 ~ 10 d 的无菌苗子叶 1 g,在超净台中切成约 1 mm 宽的细条并浸泡于 CPW 溶液(包含:27.2 mg/L 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、101 mg/L 的  $\text{KNO}_3$ 、1480 mg/L 的  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、246 mg/L 的  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2.5 mg/L 的  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.16 mg/L 的 KI 和 0.025 mg/L 的  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , pH5.8)中 1 h;同时将 10 mL 酶解液(用 CPW 溶液配制,包含:2.5%、3.0%或 3.5%的纤维素酶 R-10、0.5%或 1.0%的离析酶 R-10、0.3%或 0.6%的半纤维素酶、8% ~ 12%的甘露醇和 20 mmol/L 的 MES)(表 1、表 2)在 37℃、150 r/min 和避光条件下活化 30 min;用镊子将 CPW 溶液中的子叶条夹取到酶解液中,于室温、40 r/min 和避光条件下酶解 8 ~ 18 h。

酶解结束后,加入等体积的 W5 溶液(含 154 mmol/L 的 NaCl、125 mmol/L 的  $\text{CaCl}_2$ 、5 mmol/L 的 KCl 和 4 mmol/L 的 MES, pH5.7)稀释酶解物,然后采用 200 目尼龙滤网进行过滤;将滤液分装于 2 个 50 mL 离心管中,于 4℃ 下、

700 ~ 800 r/min 离心 5 min; 弃上清, 向 2 个管中各加入 2 mL W5 溶液, 悬浮沉淀, 再次于同样条件下离心 5 min; 弃上清, 向其中一个试管中加入 1 mL MMG 溶液 (含 4 mmol/L 的 MES、15 mmol/L 的  $MgCl_2$  和 400 mmol/L 的甘露醇, pH5.7), 悬浮沉淀; 将悬浮液移入另一个试管中, 悬浮沉淀, 置于冰上备用。

### 1.3 原生质体产量与活力的检测

吸取 10  $\mu$ L 纯化后的原生质体悬浮液于血球计数板上, 在显微镜下计数 (共计数 4 个方格, 每格 0.1  $\mu$ L), 重复 4 次, 取平均值计算产量。原生质体密度 (cells/mL) = (4 个方格内原生质体总数/4)  $\times 10^4$ ; 原生质体产量 (cells/g) = 原生质体密度 (cells/mL)  $\times 1$  mL/g。

取 100  $\mu$ L 原生质体悬浮液置于载玻片上, 加入 2  $\mu$ L 荧光素双乙酸 (FDA) 溶液, 轻轻混均, 于室温下静置 5 min, 然后在荧光显微镜下用蓝光进行观察, 有活力的原生质体发出绿色荧光, 无活力者不产生荧光。每个样品观察 4 次, 每次取 5 个视野计数, 取平均值统计活力 (存活率)。原生质体活力 = 发绿色荧光的原生质体数/观察原生质体总数  $\times 100\%$ 。

### 1.4 原生质体的转化

从含有植物瞬时表达载体 pBI-GFP (Green fluorescence protein; 35S 启动子) 的大肠杆菌中提取质粒 DNA, 同时将制备的原生质体稀释至  $1.0 \times 10^5$  cells/mL, 避光, 置于冰上 30 min, 然后进行转化。步骤为: 在 2 mL 离心管中加入 100  $\mu$ L 原生质体悬浮液和 20  $\mu$ L (1  $\mu$ g/ $\mu$ L) 质粒 DNA, 混匀; 加入等体积 40% 的 PEG 4000 溶液 (含 200 mmol/L 的甘露醇和 100 mmol/L 的  $CaCl_2$ , pH8.0), 混匀, 于 25 $^{\circ}$ C 下遮光放置 20 min; 再加入 440  $\mu$ L W5 溶液, 转化终止, 于 4 $^{\circ}$ C、700 r/min 离心 5 min; 弃上清, 加入 1 mL W5 溶液悬浮沉淀, 于 25 $^{\circ}$ C 下暗培养 16 h; 同样条件下再次离心 5 min, 去掉大部分上清液, 用剩余的上清液重悬浮沉淀; 取 1 滴悬浮液滴于载玻片上, 在荧光显微镜下 (激发光 488 nm) 观察绿色荧光信号, 被转化的原生质体发出绿色荧光。实验重复 3 次, 每次观察至少 300 个原生质体, 取平均值计算转化效率。

## 1.5 AmDREB1 瞬时表达载体的构建及亚细胞定位

将已克隆测序的沙冬青 AmDREB1 转录因子编码区 cDNA (将终止密码子突变) 从克隆载体 pMD19 上酶切下来 (采用 *Xba* I 和 *Sma* I 双酶切), 采用 T4 DNA 连接酶定向连接到植物瞬时表达载体 pBI-GFP 的 35S 启动子下游, 构建融合蛋白表达载体 pBI-AmDREB1-GFP。分别通过菌落 PCR 检测和质粒 DNA 酶切鉴定法对所构建的载体进行验证, 然后按照本研究建立的方法制备沙冬青子叶原生质体并进行转化与观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 沙冬青子叶原生质体制备技术的建立

本研究参照拟南芥和大豆叶肉原生质体的制备方法对沙冬青子叶原生质体进行了分离与纯化<sup>[2, 10]</sup>, 获得原生质体的产量为  $5.5 \times 10^4$  cells/g, 存活率为 60%。为了进一步提高原生质体的产量和活力, 对酶解液中酶的浓度组合及渗透调节剂的浓度、酶解反应时间和纯化时的离心速度等因素进行了优化, 建立了一套适于沙冬青子叶原生质体分离与纯化的技术体系。

#### 2.1.1 酶浓度组合

酶解液中酶的种类与浓度组合是影响原生质体分离的关键因素<sup>[10, 19]</sup>。前期的预备实验表明, 沙冬青子叶组织在含有纤维素酶、离析酶和半纤维素酶的酶解液中原生质体产量高于只含纤维素酶和离析酶的组合。因此, 本研究在其他因素相同的条件下 (9% 的甘露醇, 酶解时间 12 h, 离心速度 700 r/min) 对上述 3 种酶的 6 种不同浓度组合的分离效果进行了比较 (表 1)。结果表明, 6 种酶浓度组合所得原生质体产量为  $0.44 \times 10^6 \sim 2.10 \times 10^6$  cells/g, 活力为 63.0% ~ 91.0%, 其中以组合 3 效果最佳, 酶解物中细胞碎片较少, 大而完整的原生质体相对较多; 组合 4 在 2 项指标上略低于组合 3, 但其离析酶和半纤维素酶的用量为组合 3 的 2 倍; 其余 4 个组合的分离效果较差。因此, 组合 3 为沙冬青子叶原生质体分离最适宜的酶浓度组合。

#### 2.1.2 渗透调节剂的浓度

酶解液的渗透压偏低或偏高会使游离出来的原生质体吸涨破碎或失水皱缩, 是原生质体分离的又一重要影响因素。实验中通常使用甘露醇调节酶解

表 1 酶浓度组合对沙冬青子叶原生质体产量与活力的影响

Table 1 Effect of enzyme combinations on the yield and viability of protoplasts isolated from <i>Ammopiptanthus mongolicus</i> cotyledons					
酶组合 Enzyme combination	纤维素酶 Cellulase (%)	离析酶 Macerozyme (%)	半纤维素酶 Hemicellulase (%)	产量 Yield ( $\times 10^6$ cells/g)	活力 Viability (%)
1	2.5	0.5	0.3	0.44	69.5
2	2.5	1.0	0.6	0.54	63.0
3	3.0	0.5	0.3	2.10	91.0
4	3.0	1.0	0.6	1.94	87.0
5	3.5	0.5	0.3	1.40	85.0
6	3.5	1.0	0.6	0.75	73.6

液的渗透压。本研究在确定了适宜的酶浓度组合之后，进一步对甘露醇浓度进行了筛选。结果表明，当甘露醇浓度为 9%时，原生质体完整性较好，产量为  $2.87 \times 10^6$  cells/g，活力达到 90.0%(表 2)。因此，9%的甘露醇是沙冬青子叶原生质体分离酶解液适宜的渗透压调节剂浓度。

表 2 甘露醇浓度对沙冬青子叶原生质体产量与活力的影响  
Table 2 Effect of mannitol concentrations on the yield and viability of protoplasts isolated from *A. mongolicus* cotyledons

甘露醇 Mannitol (%)	产量 Yield ( $\times 10^6$ cells/g)	活力 Viability (%)
8	0.58	64.6
9	2.87	90.0
10	1.48	89.5
11	1.22	86.0
12	0.74	85.5

2. 1. 3 酶解反应的时间

在酶解液适宜的条件下，反应时间对于原生质体的产量和活力也具有明显影响。显微观察结果表明，酶解 8 h 后，有少量原生质体游离出来；酶解 10 ~ 12 h 后，游离原生质体的数量明显增多；酶解 14 h 后，原生质体产量最高，达到  $2.24 \times 10^6$  cells/g；酶解 16 ~ 18 h 后，原生质体破裂加重，产量明显降低(表 3)。同时，原生质体的活力也呈一致的变化趋势，即在酶解 10 ~ 14 h 后活力逐渐增高，且在 14 h 后达到最高值 90.4%，此后明显降低(表 3)。因此，14 h 是沙冬青子叶原生质体分离较适宜的酶解时间。

2. 1. 4 纯化时的离心速度

研究表明，酶解反应结束后必须及时去除酶解液和细胞碎片等杂质，以尽可能获得大量高纯度、高活力的原生质体。本研究采用 W5 溶液作

表 3 酶解时间对沙冬青子叶原生质体产量与活力的影响  
Table 3 Effect of enzymolysis time on the yield and viability of protoplasts isolated from *A. mongolicus* cotyledons

酶解时间 Digestion time (h)	产量 Yield ( $\times 10^6$ cells/g)	活力 Viability (%)
10	1.05	61.7
12	1.46	72.4
14	2.24	90.4
16	1.48	72.9
18	1.45	57.9

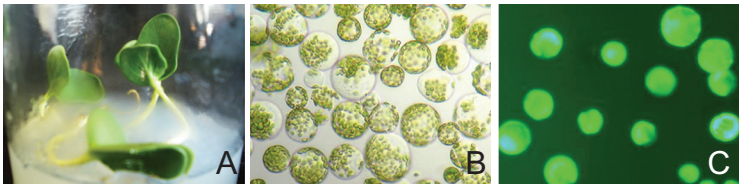
为漂洗液和离心沉淀法对酶解物进行纯化，并对转速 700、800 r/min 的纯化效果进行了比较。观察结果显示，700 r/min 时纯化物中的细胞碎片和小原生质体均比 800 r/min 时少，原生质体产量为  $2.65 \times 10^6$  cells/g，约为 800 r/min 时 ( $1.46 \times 10^6$  cells/g) 的 2 倍。因此，700 r/min 时沙冬青原生质体分离物的纯化效果较好。

综合上述实验结果，本研究优化出一套沙冬青幼嫩子叶原生质体制备的技术体系：(1) 酶解液的组成：CPW 溶液 + 3.0%纤维素酶 R-10 + 0.5%离析酶 R-10 + 0.3%半纤维素酶 + 9%甘露醇，pH5.8；(2) 酶解条件：室温、避光，40 r/min 轻摇 14 h；(3) 酶解物的纯化：W5 溶液做漂洗液，200 目尼龙网过滤，4℃、700 r/min 离心 5 min，采用 MMG 溶液重悬原生质体沉淀，置于冰上备用。采用该技术制备的原生质体产量约为  $2.50 \times 10^6$  cells/g，活力可达 90%(图 1)。

2. 2 沙冬青叶肉原生质体瞬时表达体系的建立

本研究以 2.1 中分离纯化的原生质体作为受体，以植物瞬时表达载体 pBI-GFP 质粒 DNA 作为目标 DNA，利用 PEG 介导法进行转化实验。结果显示，约 50.8%的原生质体在 488 nm 激发光下发





A: 沙冬青幼苗; B: 分离纯化的原生质体; C: FDA 检测的原生质体。  
A: *A. mongolicus* seedlings; B: Purified protoplasts; C: Protoplasts stained by FDA.

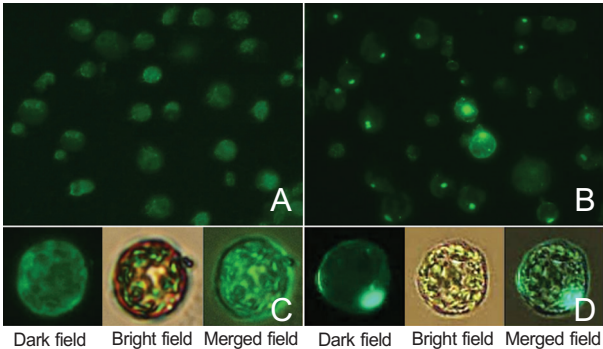
图 1 沙冬青子叶原生质体的分离与活力检测

Fig. 1 Isolation and viability tests of *A. mongolicus* cotyledon protoplasts

出较明亮的绿色荧光, 表明其已被成功转化, 预期的瞬时表达体系已初步建立。

2.3 沙冬青 AmDREB1 蛋白的亚细胞定位

基于荧光标记的原生质体瞬时表达体系的主要用途之一是进行目标蛋白的亚细胞定位<sup>[2]</sup>。*AmDREB1*是本实验室在前期克隆得到的沙冬青胁迫应答基因, 属于植物 DREB 转录因子亚家族成员, 该亚族在植物抗逆基因转录调控和抵抗非生物胁迫中起关键作用<sup>[20]</sup>。经 SoftBerry-protcomp 软件预测 AmDREB1 蛋白可能定位于细胞核内。为了验证这一结果, 本研究利用上述原生质体瞬时表达体系对 AmDREB1 蛋白的亚细胞定位进行了检测。实验首先构建了瞬时表达载体 pBI-AmDREB1-GFP, 经菌落 PCR 检测和质粒 DNA 酶切鉴定均获得了预期大小的目的条带, 表明载体构建成功(图 2)。提取其质粒 DNA 后, 按照 2.1 中优化的方法制备沙冬青子叶原生质体, 并利用 PEG 介导法对其进行转化。荧光显微观察结果显示, 约 52.1% 的原生质体中可见绿色荧光信号聚集于细胞核中(图 3: B、D), 而利用空载体 pBI-GFP 转化的原生质体中绿色荧光分布于整个细胞(图 3: A、C)。研究结果表明, AmDREB1 蛋白分布于细胞核内, 本研究所建立的原生质体瞬时表



A, C: 分别为暗视野和 3 种视野下表达 GFP 的原生质体; B、D: 分别为暗视野和 3 种视野下表达 AmDREB1-GFP 的原生质体。  
A, C: Protoplasts expressing GFP in the dark field (A) and three fields (C), respectively; B, D: Protoplasts expressing AmDREB1-GFP in the dark field (B) and three fields (D), respectively.

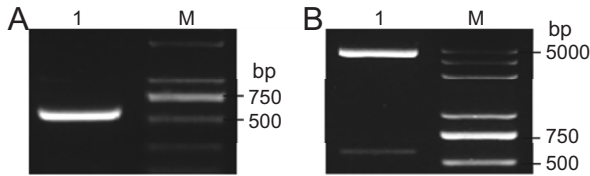
图 3 GFP 和 AmDREB1-GFP 蛋白在沙冬青子叶原生质体中的定位

Fig. 3 Subcellular localization of GFP and AmDREB1-GFP proteins in *A. mongolicus* cotyledon protoplasts

达体系可以有效进行目标蛋白的亚细胞定位。

3 讨论

原生质体瞬时表达体系是开展基因功能研究的有力工具, 技术流程主要包括载体构建、原生质体制备与转化等步骤, 其中分离大量高活力的原生质体是建立瞬时表达体系的前提和基础。酶解法是获得原生质体粗提物的常规方法, 然后采用过滤、离心或糖溶液漂浮相结合等方法对其进行纯化<sup>[2, 8, 13, 14, 19, 21]</sup>。研究表明, 多种因素可以影响原生质体的产量和活力, 其中以分离原生质体使用的植物材料、酶解液中酶的种类与浓度组合、酶解液的渗透压和酶解反应时间以及纯化时的离心转速影响较大<sup>[10, 13, 19, 21, 22]</sup>。本研究也得到类似的结果, 此外还发现若以沙培法培养的沙冬青幼苗(2 ~ 6 周苗龄)的叶片作为分离材料, 很难分离得到大量高质量的原生质体。采用 7 ~ 10 d 苗龄的



A: 菌落 PCR; 1: PCR 产物。B: 质粒酶切; 1: 酶切产物。M: DNA marker。  
A: Colony PCR; 1: PCR products. B: Plasmid enzyme digestion; 1: Digestion products. M: DNA marker.

图 2 重组载体 pBI-AmDREB1-GFP 菌落 PCR 检测(A)与质粒酶切鉴定(B)

Fig. 2 Confirmation of the recombinant vector pBI-AmDREB1-GFP by colony PCR (A) and restriction analysis (B)

无菌苗子叶虽然可以实现此目的,但需要 3.0% 的纤维素酶和少量半纤维素酶,且酶解时间长达 14 h。这与银白杨<sup>[19]</sup>和茶(*Camellia sinensis*(L.) O. Ktze.)<sup>[21]</sup>叶片原生质体的分离条件类似,而与拟南芥<sup>[2]</sup>、水稻<sup>[4, 8]</sup>、棉花<sup>[13]</sup>和菜豆<sup>[14]</sup>等植物的分离条件具有一定差异。这些草本类植物叶片原生质体分离所需的纤维素酶浓度约为 0.5% ~ 1.5%,通常无需添加半纤维素酶,且酶解时间大多不超过 8 h。沙冬青成熟叶片角质层较厚,叶肉栅栏组织化、细胞排列紧密且细胞壁较厚,这可能增加了酶解的难度,使原生质体不易游离出来<sup>[15]</sup>。而无菌苗子叶具有生理状态一致、生长快且组织幼嫩等优点,因此是叶肉组织原生质体分离较为理想的材料。本研究通过对几种影响原生质体分离与纯化的因素进行优化,建立了适合于沙冬青无菌苗子叶原生质体的制备技术,为开展相关研究奠定了基础。

原生质体最广泛的用途之一是进行蛋白质的亚细胞定位分析,从而为目标基因的功能研究提供信息<sup>[2]</sup>。本研究首次建立了沙冬青原生质体瞬时表达体系,并成功利用该体系对其干旱与低温诱导转录因子 AmDREB1 进行了亚细胞定位分析。实验结果显示,高活力的原生质体和高纯度的质粒 DNA 是保证获得较高转化效率的关键因素。此外,原生质体密度、质粒 DNA 的用量以及 PEG 质量对转化效率也有一定影响。后续实验将优化这些因素,进一步提高转化效率。利用该体系开展沙冬青基因表达调控和启动子活性等方面的研究还有待深入开展。

## 参考文献:

- [1] Sheen J. Signal transduction in maize and *Arabidopsis* mesophyll protoplasts[J]. *Plant Physiol*, 2001, 127(4): 1466–1475.
- [2] Yoo SD, Cho YH, Sheen J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2: 1565–1572.
- [3] Zhai Z, Sooksa-nguan T, Vatamaniuk OK. Establishing RNA interference as a reverse-genetic approach for gene functional analysis in protoplasts[J]. *Plant Physiol*, 2009, 149: 642–652.
- [4] Zhang Y, Su J, Duan S, Ao Y, Dai J, 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: 30–43.
- [5] 赵文婷,魏建和,刘晓东,高志晖. 植物瞬时表达技术的主要方法与应用进展[J]. *生物技术通讯*, 2013, 24(2): 294–300.  
Zhao WT, Wei JH, Liu XD, Gao ZH. Advance of the main methods and applications of plant transient expression system[J]. *Letters in Biotechnology*, 2013, 24(2): 294–300.
- [6] Ficher R, Hain R. Tobacco protoplast transformation and use for functional analysis of newly isolated genes and gene constructs[J]. *Method Cell Biol*, 1995, 50: 401–410.
- [7] Jiang L, Wang J, Liu Z, Wang L, Zhang F, et al. Silencing induced by inverted repeat constructs in protoplasts of *Nicotiana benthamiana*[J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2010, 100: 139–148.
- [8] Bart R, Chern M, Park CJ, Bartley L, Ronald PC. A novel system for gene silencing using siRNAs in rice leaf and stem-derived protoplasts[J]. *Plant Methods*, 2006, 2: 13–21.
- [9] Guo JJ, Morrell-Falvey JL, Labbé JL, Muchero W, Kalluri UC, et al. Highly efficient isolation of *Populus* mesophyll protoplasts and its application in transient expression assays[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44908.
- [10] 舒英杰,黄丽燕,陈明,陶源,王占奎,麻浩. 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[J]. *生物工程学报*, 2017, 33(6): 976–985.  
Shu YJ, Huang LY, Chen M, Yuan T, Wang ZK, Ma H. Establishment and optimization of systems for protoplasts isolation of soybean and chickpea that used in subcellular location[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2017, 33(6): 976–985.
- [11] Pitzschke A, Persak H. Poinsettia protoplasts—a simple, robust and efficient system for transient gene expression studies[J]. *Plant Methods*, 2012, 8: 14.
- [12] Masani MYA, Noll GA, Parveez GKA, Sambanthamurthi R, Prüfer D. Efficient transformation of oil palm protoplasts by PEG-mediated transfection and DNA microinjection[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e96831.
- [13] 李妮娜,丁林云,张志远,郭旺珍. 棉花叶肉原生质体分离及目标基因瞬时表达体系的建立[J]. *作物学报*, 2014, 40(2): 231–239.  
Li NN, Ding LY, Zhang ZY, Guo WZ. Isolation of mesophyll protoplast and establishment of gene transient expression system in cotton[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2014, 40(2): 231–239.
- [14] Nanjareddy K, Arthikala MK, Blanco L, Arellano ES, Lara M. Protoplast isolation, transient transformation of leaf mesophyll protoplasts and improved *Agrobacterium*-mediated leaf disc infiltration of *Phaseolus vulgaris*; tools for rapid gene expression analysis[J]. *BMC Biotechnol*,

- 2016, 16: 53.
- [15] 周宜君, 刘春兰, 冯金朝, 贾晓红. 沙冬青抗旱、抗寒机理的研究进展[J]. 中国沙漠, 2001, 21(3): 312–315.  
Zhou YJ, Liu CL, Feng JC, Jia XH. Advances of drought-resistance and frigid-resistance mechanism research on *Ammopiptanthus mongolicus*[J]. *Journal of Desert Research*, 2001, 21(3): 312–315.
- [16] Zhou Y, Gao F, Liu R, Feng J, Li H. *De novo* sequencing and analysis of root transcriptome using 454 pyrosequencing to discover putative genes associated with drought tolerance in *Ammopiptanthus mongolicus*[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 266.
- [17] Wu YQ, Wei W, Pang XY, Wang XF, Zhang HL, *et al.* Comparative transcriptome profiling of a desert evergreen shrub, *Ammopiptanthus mongolicus*, in response to drought and cold stresses [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 671.
- [18] Pang T, Guo L, Shim D, Cannon N, Tang S, Chen J. Characterization of the transcriptome of the xerophyte *Ammopiptanthus mongolicus* leaves under drought stress by 454 pyrosequencing [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (8): e0136495.
- [19] 景艳春, 康向阳, 王君, 李代丽. 新疆杨叶肉原生质体游离和纯化的研究[J]. 西北植物学报, 2007, 27(3): 509–514.  
Jing YC, Kang XY, Wang J, Li DL. Isolation and purification of mesophyll protoplasts of *Populus alba* L. var. *pyramidalis* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2007, 27(3): 509–514.
- [20] Lata C, Prasid M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants [J]. *J Exp Bot*, 2011, 62: 4731–4748.
- [21] 刘艳丽, 金孝芳, 马林龙, 曹丹, 龚自明, 韦朝领. 茶叶叶肉原生质体的分离与纯化[J]. 植物科学学报, 2017, 35(6): 908–911.  
Liu YL, Jin XF, Ma LL, Cao D, Gong ZM, Wei CL. Isolation and purification of mesophyll protoplasts from the leaves of *Camellia sinensis* [J]. *Plant Science Journal*, 2017, 35(6): 908–911.
- [22] 廖嘉明, 王伯初, 王益川, 田继权. 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): 1271–1276.  
Liao JM, Wang BC, Wang YC, Tian JQ. Optimization conditions of *Arabidopsis* mesophyll protoplast isolation [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2010, 30(6): 1271–1276.

(责任编辑: 周 媛)