

## 坛紫菜和条斑紫菜的原生质体电融合

陈昌生

(厦门水产学院, 集美)

用日本岛津公司生产的电融合装置(SSH-2), 进行了坛紫菜和条斑紫菜的原生质体融合试验。探讨了不同的电刺激条件、融合缓冲液种类以及蛋白酶的前处理与细胞融合的关系。其结果是, 高频电压30—35V, 印加时间25—30s; 脉冲电压300—350V, 印加时间60 $\mu$ s, 及添加3m mol/L  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 的融合缓冲液可使融合率达到21—31%。蛋白酶的前处理对细胞融合有明显的效果。融合细胞培养7天后产生细胞壁, 41天长成多细胞团。

**关键词** 紫菜; 电融合; 原生质体

紫菜是富有营养成分, 深受人们喜爱的海藻。紫菜属中的坛紫菜、条斑紫菜是我国的主要养殖品种。近年来, 由于各种病害的发生, 使紫菜的质量降低、产量也受到一定的影响。通过人工杂交选拔和培育紫菜的新品种还存在着一定的困难。应用生物技术, 从各种紫菜中分离出单个的原生质体, 进行同种、异种间的细胞融合, 然后培养和选拔杂种优势细胞, 改良养殖品种, 则是现在及未来的一种发展趋势。

近年来, 国内外有很多学者对紫菜的原生质体分离<sup>[1-4]</sup>和细胞融合<sup>[5-7]</sup>进行了研究。我们分别使用细菌酶、鲍鱼酶、蝶螺酶分离了坛紫菜和条斑紫菜的原生质体, 然后通过电融合法, 分别以不同的条件, 将这两种原生质体进行融合试验, 现报道如下。

### 材料与方 法

#### (一) 材料

1. 试验紫菜的培养: 室内培养的坛紫菜 *Porphyra haitanensis* T.J.Chang et B.F. Zheng、条斑紫菜 *P. yezoensis*

Ueda的贝壳丝状体, 使其放散出壳孢子, 并附着于尼龙单丝上。在温度为20℃、光强2000 lx、光周期12L:12D、PES培养液条件下, 进行通气培养。室内培养的坛紫菜幼苗的上端为紫红色, 下端为绿紫色, 条斑紫菜幼苗为紫红色(野生型), 试验所用的小紫菜长为1—3 cm。

2. 酶: 2%蛋白酶(含50m mol/L HEPES, 0.3mol/L NaCl, pH8.0), 3%鲍鱼酶、蝶螺酶(含50m mol/L MES, 0.3mol/L NaCl, 0.5%葡聚糖硫酸钾, pH6.0)以及细菌酶<sup>[3]</sup>。

#### (二) 原生质体分离和电融合

用消毒刀片切取坛紫菜的绿紫色叶片和条斑紫菜的赤紫色叶片, 然后分别细切成大小为1mm<sup>2</sup>左右的小碎片。用消毒海水把碎片洗2—3遍后, 加入2%蛋白酶, 用振荡器振荡1h, 然后用含有0.3mol/L NaCl的消毒海水洗两遍, 吸掉上清液, 加入细菌酶振荡2h(使用3%鲍鱼酶或3%蝶螺酶时, 振荡2.5h), 然后用孔径为20—25 $\mu$ m的尼龙筛绢过滤, 滤掉大

本文于1990年12月6日收到。

本文承蒙日本国长崎大学农学博士藤田雄二教授指导, 谨致谢意。

的未解壁的碎块,滤液经离心分离(2000r/min, 5min)后,加入融合缓冲液Ⅲ(如表4)洗涤和离心分离两次。然后加入缓冲液,按1:1的比例把两种原生质体混合起来,密度大约调节到 $10^5$ 个/ml左右。吸取0.1ml混合液滴于电融合槽(日本岛津公司产品SSH-2型细胞融合装置)分别进行:

1. 不同高频电压下的融合试验: 电压为15、20、25、30、35、40V, 分别刺激25s(脉冲电压300V, 印加时间60 $\mu$ s)使两种原生质体融合, 然后通过倒置显微镜观察并计算其融合率, 融合率按下式计算:

$$\text{全融合率} = \frac{\text{已融合的原生质体(同种 + 异种 + 3个原生质体以上)}}{\text{原生质体总数}} \times 100\%$$

异种原生质体融合率 =

$$\frac{\text{异种原生质体的融合数}}{\text{原生质体总数}} \times 100\%$$

2. 不同的高频电压印加时间(20、25、30、40s)和脉冲电压250、300、350、400V(Pulse width: 60 $\mu$ s)对融合的影响试验。

3. 不同的融合缓冲液对融合的影响试验: 在缓冲液中添加不同浓度的 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ (表4), 观察其对融合的影响(电压30V, 印加时间25s; 脉冲电压350V, 印加时间60 $\mu$ s)。

4. 不同浓度蛋白酶的前处理对融合的影响试验: 两种紫菜碎片分别用0、0.5、1、2、3%蛋白酶预处理1h后, 加入细菌酶酶解2h, 获得的原生质体进行电融合, 电刺激条件同3。

5. 融合细胞的培养: 培养方式有两种: (1)液体培养: 用微细玻璃管挑选已融合的细胞, 置于 $f/2^{(8)}$ 培养液中进行单独培养观察; (2)固体培养: 培养基是

$f/2$ 培养液里含0.5%琼胶、0.1%青霉素和0.2%链霉素。融合细胞滴于塑料培养皿底, 加入琼胶培养基, 然后在培养皿底(外面)划圈标志, 定点观察融合细胞的生长。培养条件是温度20—21 $^{\circ}\text{C}$ , 光强2500 lx, 光周期12L:12D。

## 结 果

### (一) 两种原生质体及电融合过程

用细菌酶、鲍鱼酶、螺蛳酶分离出来的原生质体数目如表1所示。坛紫菜的原生质体大小为17—22 $\mu\text{m}$ (图版I-1, 箭头所示), 呈绿紫色, 条斑紫菜的原生质体为15—19 $\mu\text{m}$ (图版I-1)呈紫红色。当两种自然色泽不同的原生质体悬浮液滴于融合槽中, 在高频电压的刺激下, 原生质体就相互靠近、粘连, 形成原生质体链(图版I-2), 在脉冲电压的作用下, 相互接触的原生质体膜的脂质二重层结构被扰乱, 当这种扰乱的结构被修复时, 邻接的原生质膜就自然融合起来。融合的全过程见图版I-4-7。

表1 不同的酶对原生质体分离的影响  
Table 1 The effects on protoplast isolation by different enzymes

种 类 Species	细菌酶 Bacterial enzyme	鲍鱼酶 Abalone enzyme	螺蛳酶 Turban enzyme
<i>P. haitanensis</i>	$3.2 \times 10^7$	$3.9 \times 10^6$	$4.9 \times 10^6$
<i>P. yezoensis</i>	$4.9 \times 10^7$	$5.8 \times 10^6$	$6.7 \times 10^6$

酶活力单位(U): 原生质体个数/0.1g 鲜重藻体  
Protoplasts/0.1g fresh wt.

### (二) 不同的电刺激条件对融合的影响

高频电压的作用是使原生质体相互靠近, 形成原生质体链。在15—40V内, 随着高频电压的增大, 链就增长。但是, 原生质体链过长, 会导致多重融合频

率增大,这样就难于获得融合杂种细胞。从表 2 可看出,当高频电压为 30—35V 时,异种原生质体的融合率高达 12.3—12.9%。从表 3 的结果来看,高频电压印加时间以 25—30s 为宜。脉冲电压为 250V 时,全融合率较低,仅为 10.5—

12.5%,当脉冲电压增大到 300—350V 时,融合率也随着增大,达到 16.2—22.3% (鲍鱼酶组)。当脉冲电压增大到 400V 时,相互粘连、接合的原生质体的膜间所产生的小孔过大,导致融合后的质膜无法得到修复,一部分原生质体就破裂死亡,使融

表 2 高频电压对融合率的影响  
Table 2 The effects on the fusion rate by AC field

高频电压(V) AC	15	20	25	30	35	40
融合率 Fusion rate(%)	12.6*(5.2)	20.4(7.8)	27.0(9.6)	29.2(12.3)	29.9(12.9)	29.1(10.7)

电压印加时间 AC field initial time: 25s; 脉冲电压 DC pulse: 300V, 印加时间 Pulse width: 60μs;  
\*, 全融合率 All fusion rate, ( ); 异种原生质体融合率 Heteroplasmic fusion rate. (表 3—5 与此同 Table 3—5 is same as this)

表 3 高频电压的印加时间和脉冲电压的大小对融合率(%)的影响  
Table 3 The effects on the fusion rate (%) by the duration time of AC field and DC pulse

组 别 Groups	脉冲电压 DC pulse(V)	时 间 Time(s)			
		20	25	30	40
I	250	10.5*(3.8)	11.5(4.6)	11.8(5.0)	12.5(3.9)
	300	17.8 (6.4)	18.1(8.9)	18.9(7.2)	16.2(6.1)
	350	21.4 (6.6)	21.6(9.9)	22.3(9.6)	17.6(6.9)
	400	11.9 (5.5)	12.5(4.6)	16.3(8.5)	14.4(5.1)
II	250	4.0 (1.9)	9.5(3.7)	9.6(5.4)	9.7(4.2)
	300	15.2 (5.4)	15.9(6.2)	18.3(6.6)	17.8(7.1)
	350	17.3 (8.3)	18.5(7.5)	19.9(5.6)	16.6(6.4)
	400	13.8 (6.5)	13.9(5.7)	15.4(5.7)	14.2(5.2)

- I. 用 2% 蛋白酶和 3% 鲍鱼酶分离出来的原生质体  
Protoplast yield after isolation in 3% abalone enzyme following 2% protease treatment  
II. 用 2% 蛋白酶和 3% 螺蛳酶分离出来的原生质体  
Protoplast yield after isolation in 3% turban enzyme following 2% protease treatment  
Pulse width: 60μs; AC: 35V

合率降低。

### (三) 不同的融合缓冲液对融合的影响

使用融合缓冲液 I 进行电融合时,形成的原生质体链很长,链的原生质体数目达 10 个以上。但是,使用缓冲液 I,原生质体极易破裂,往往在短暂的 20—60s 内,有 80% 以上的原生质体破裂死亡。使用融合缓冲液 II,用电刺激后,原生质体链由

3—6 个原生质体组成,其中由 2—4 个原生质体融合成一个的多重融合现象较多,这样就较难获得由两个原生质体组成的融合细胞。融合缓冲液 III,原生质体链由 2—3 个原生质体组成,而且异种原生质体的融合率高达 13.5%,是 4 种缓冲液中,融合率最高的一组(见表 4),用这种缓冲液获得的融合细胞较健壮、理想。融合缓冲液 IV 中,原生质体链虽然也是由

表 4 融合缓冲液成分与融合率的关系

Table 4 The relation between the composition of fusion buffer and fusion rates

成 分 Composition	缓 冲 液 Buffer			
	I	I	II	IV
Mannitol(mol/L)	0.7	0.7	0.7	0.7
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O(mmol/L)	0	1	3	5
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O(mmol/L)	0	1	3	5
Tris(mmol/L)	0.2	0.2	0.2	0.2
融 合 率 Fusion rate(%)	0	23.4*(10.3)	29.6(13.5)	25.1(11.2)

用 2% 蛋白酶预处理后,再用细菌酶分离出来的原生质体

Protoplast yield after isolation in bacterial enzyme following 2% protease treatment

高频电压 AC field: 35V, 印加时间: Initial time: 25s,

脉冲电压 DC pulse: 350V, Pulse width: 60μs

2—3 个原生质体组成,但是不容易形成原生质体链,即一部分原生质体没有相互靠近接合,所以融合率较低。

#### (四) 蛋白酶的前处理对融合的影响

两种紫菜的碎片要先用蛋白酶预处理后,再用细菌酶酶解所获得的原生质体才能进行融合。仅仅用细菌酶酶解获得的原生质体不会进行融合。从蛋白酶的浓度来

表 5 蛋白酶的浓度与融合率的关系

Table 5 The relation between the concentration of the protease and the fusion rate

浓 度 Concentration (%)	0	0.5	1	2	3
融 合 率 Fusion rate (%)	0	12.9*(5.2)	27.9(12.2)	31.1(13.9)	30.0(12.7)

用蛋白酶预处理1h后,再用细菌酶分离2h所获得的原生质体

Protoplast yield after 2h isolation in bacterial enzyme following 1h protease treatment

AC field: 35V, Initial time: 25 s, DC pulse: 350V, Pulse width: 60μs

看, 1—2% 蛋白酶对融合有利, 蛋白酶浓度大, 融合率没有提高。

#### (五) 融合细胞的培养

融合细胞的大小为 27—35μm, 刚融合时, 细胞内两个不同颜色即紫绿色和赤紫色的色素体明显可见, 在 10—60min 内, 两个色素体融合成一个(图版 I-7), 呈黄褐色。但有的融合细胞内的两个色素体没有融合, 各自存在。这种融合细胞往往是 2—3 天内死亡。已融合的异种原生质体往往是在融合后 7—9 天产生细胞壁, 然后细胞分裂(图版 I-8), 培养 30 天后, 分裂成 9 个细胞(图版 I-9), 41 天后长得多细胞团(图版 I-10)。这种细胞团

为紫绿色和赤紫色的细胞不规则地嵌合在一起。但是, 杂种融合细胞生长慢, 且容易死亡。其原因可能是培养方法、条件还不适宜。融合杂种细胞的再生, 有待今后进一步研究。

## 讨 论

戴继勋等<sup>[5]</sup>、Araki<sup>[7]</sup>分别用 PEG 法进行异种紫菜原生质体的融合。PEG 化学融合法的不足之处是融合率低(一般为 5—10%), 而且由于 PEG 具有毒性, 使细胞的活力降低。电融合法与此不同, 融合率高达 21—31%, 是 PEG 法的 3—6 倍, 而且毒性小, 融合体色泽正常。

Fujita等<sup>[6]</sup>用细菌酶分离出来的条斑紫菜的绿色型和野生型的原生质体进行细胞融合。本试验除了用细菌酶外,还用鮑鱼酶、蝶螺酶分离坛紫菜和条斑紫菜的原生质体并进行电融合,也同样获得融合细胞。融合缓冲液中添加 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 会

使融合率提高。这主要是 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ ,尤其是在 $\text{Ca}^{2+}$ 的存在下,质膜的磷脂中的六晶体(hexagonal)结构部位增加,有助于融合。适宜的 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 浓度应为3—5mmol/L左右。

### 参 考 文 献

- [1] 王素娟等: 海洋与湖沼, 17(3):217—221, 1986.
- [2] 唐廷林: 山东海洋学院学报, 12(4):37—50, 1982.
- [3] 藤田雄二等: 长崎大学水产学部研究报告, 57:39—45, 1985.
- [4] 榑手英雄等: 日本水产学会志, 52(3):545—548, 1986.
- [5] 戴继勋等: 海洋与湖沼, 21(3):293—296, 1990.
- [6] Fujita, Y. and Migita S.: *Jap. J. Phycol.*, 35: 201—208, 1987.
- [7] Araki, T. et al.: *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56(7): 1161, 1990.
- [8] Waaland, S.A. and Watson B.A.: *Planta*, 149: 493—497, 1980.

## Electrofusion of Protoplasts from *Porphyra haitanensis* and *Porphyra yezoensis* Thalli(Rhodophyta)

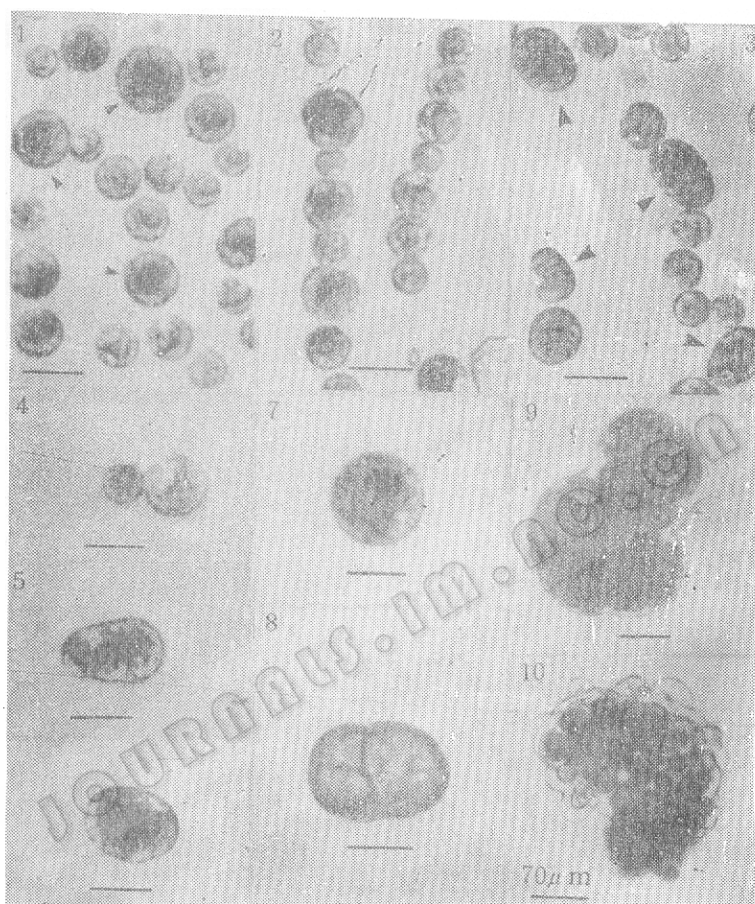
Chen Changsheng

(Xiamen Fisheries College, Jimei)

This paper described the electrofusion of protoplasts from *P. haitanensis* and *P. yezoensis* thalli by using an electrofusion instrument (Shimazu Company, Japan) under different conditions of AC field, DC pulse, fusion buffer and concentration of protease. The results showed that the fusion rate could reach 21—31% by applying AC field of: 1MHz, 30—35V for 20—30s and DC pulse of: 300—350V for 60  $\mu\text{s}$  and in the presence of 3mmolL<sup>-1</sup>  $\text{Ca}^{2+}$  and 3mmolL<sup>-1</sup>  $\text{Mg}^{2+}$  in the fusion buffer. The pretreatment with protease has a positive effect on cell fusion. The fusion cells formed cell walls after 7 days culture and grew into cell aggregates after 41 days culture.

### Key words

*Porphyra*; electrofusion; protoplasts



1. 坛紫菜(箭头所示)和条斑紫菜的原生质体  
Protoplast of both *P. haitanensis*(with arrows)and *P. yezoensis*
2. 在电刺激下, 形成原生质体链  
The protoplast chains formed after stimulation by electricity
3. 原生质体的融合 The fusion of protoplasts
- 4.—7. 融合的全过程 The fulls procedure of the electrofusion
8. 培养10天后的融合杂种细胞  
Heteroplasmic fusion cells after 10 days in culture
9. 培养30天后的融合杂种细胞  
Heteroplasmic fusion cells after 30 days in culture
10. 培养41天后的融合杂种多细胞团  
Callus-like cell aggregates after 41 days in culture  
(1—9: 标尺 Bar = 20μm)