

# Eppendorf 多功能电转仪 在薄荷原生质体的体细胞杂交实验中的使用

## 摘要

细胞融合是产生具有新特性细胞的技术基础，分为化学诱导方法：PEG（聚乙二醇）和电融合方法。这项技术在自然科学的基础研究、药物学测试、生物工程应用和植物育种这些领域得到广泛的应用。

除了哺乳动物细胞融合这方面，通过原生质体间的融合产生植物的杂交体也是一项极为重要的应用，这个植物杂交体产生的过程称之为体细胞杂交（SH）。与传统经典的植物育种方法相比，SH 具有其自身的优势，基因多样性可以在短时间内得到迅速扩增，对那些难以通过自然杂交育种方法产生或杂交效率很低的植物系来说，SH 方法提供了一个可行途径。另外，SH 突破了以往的转化极限，只需把微量的基因元素导入目标基因背景，从而能扩增染色体数量或倍性，达到增加产量的目的（即：杂种优势效应）。

细胞融合方法中电融合法的优势在于操作方便快捷，对原生质体伤害更小，实验效率更高。它包括三个过程，第一阶段：排列；细胞膜紧密相接触彼此吸引；第二阶段：在高电场下非常短的电脉冲，在细胞膜上产生电穿孔，然后就是融合过程；第三个阶段：后排列，细胞膜仍然相互接触直到形成稳定的胞膜联接；至此，细胞融合全过程就圆满结束了。

以下实验就是以薄荷为对象摸索原生质体融合的最佳参数，创造一个新的、比以往更适合于薄荷醇生产的薄荷品种。

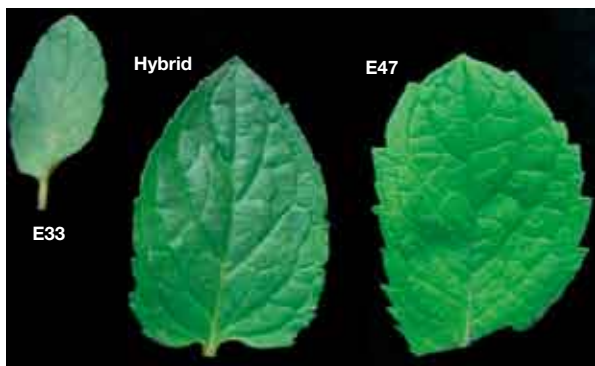


图 1：两种不同的薄荷品种的叶片照片（E33，E47）以及用这两品种的原生质体融合产生的杂交植物叶片的图片（中间）

## 材料和方法

### 植物

用于电转的薄荷品种：Mentha piperita 变异体 Piperita multimentha、Mentha piperita 变异体 Piperita mitcham 和 Mentha suaveolens Ehrh。由于花房植物的产量和传代速度非常低，我们使用了体外培养的植株。

### 电融汇器和配件

Eppendorf 的多功能电转仪 Multiporator 是一台电穿孔仪器，整合了电融合的模式，使用特定的插件可将不同的融合杯与仪器相连（图 2A），比如说 Eppendorf 的螺旋杯（电极间距为 0.2 mm，能容纳 250  $\mu$ l）；Eppendorf 的微融合杯（电极距离为 0.2 mm）（图 2B）用于在显微镜下观察实验过程以优化实验参数。



图 2A：带螺旋融合杯的 Eppendorf 多功能融合仪

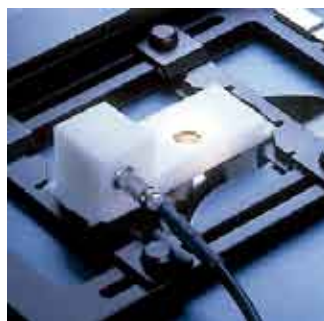


图 2B：Eppendorf 的微融合杯

## 方法

根据 Sato 等人<sup>[13]</sup> 整理的方法分离出原生质体, 对电融合实验来说, 细胞的密度要达到每毫升  $5.0-9.0 \times 10^5$  原生质体, 保存在 0.7M 山梨醇中。实验中, 吸取一定体积的混合液, 完全覆盖微融合杯的电极腔, 对螺旋杯则应加入 250  $\mu$ l 的混合物, 设置的参数在结果中列出。

为了观察融合过程, 我们用 DAPI (4, 6-Diamidino-2-Phenylindol) 标记原生质体的细胞核 (图 4B)。根据形态的改变来判断融合是否完成。

为了能挑出杂交体细胞, 我们选出具有不同培养特性的薄荷品种, 一种能在原生质体状态下传代的薄荷与另一种传代能力弱但高产的品种结合, 具有传代能力的品种用 IOA (iodine acetamide) 处理, 因为原生质体不能分裂, 两个样本的遗传信息能在杂交体中混合, 因此比起原来单一品种的特性具有了选择性的提高。

## 结果

“排列阶段”和“融合脉冲”的电压参数, 脉冲时间和脉冲次数都经过了优化。应该注意的是电场强度 (电融合的重要参数) 决定于设定的电压和电极间距, 当使用不同电极间距的电融合杯时, 必须依据下列的公式调节设定电压以保持同样大小的场强: 场强 [V/cm] = 电压 [V] / 电极间距 [cm]。

## 排列参数的确定

### 电压

在微融合杯中, 在选择可变电压 1.5 - 3 V 间, 以每步 0.5 V 的递增来摸索最佳参数。当电压达到 2.5 V 以上, 原生质体被极度拉长、破裂, 所以 1.5 V 的电压值是最合适的, 如图 3, Sato 等人也曾描述过这个现象。这个电压值也能直接适用于螺旋融合杯的实验中。



图 3: M. Piperita 与 Piperita mitcham. 的原生质体在微融合杯中 1.5 V 电压下的排列 ( $\times 200$ )

### 时间

选择了 30 - 60 s 这个范围进行测试, 每次增加 10 s, 我们发现 40 s 是最佳值, 这个参数同样适用于融合后阶段。

## 脉冲长度和数量

获得膜穿孔的最小场强可从下面的公式, 依据细胞大小计算  $E_c = V_c / (0.75 \times d)$

$V_c$ : 穿透电压 (对真核细胞来说是 22 , 1V) [V]

$d$ : 细胞直径 [cm]

原生质体的细胞直径 ( $d$ ) 变化很大, 所以计算时使用平均直径 25  $\mu$ m 即可。因此要得到膜穿孔就需要 533.33 V/cm 大小的场强, 由于是两个细胞相互融合, 则电压要加倍至 1066.7 V/cm, 那么在多功能电融合仪的 0.2 mm 融合杯中只需要 21.3 V 的电压降, 在这个基础上以 25 V 为准, 来优化脉冲时间 ( ) 及脉冲次数 ( $n$ )。

我们分为三类分析, 以下三种情况对原生质体的活力没有不良影响, 在镜下数微融合杯电极间的融合细胞数, 融合后的细胞形态很大, 相互间紧密排列或排成“8”状, 第 2 种方式的融合产生了 9 个融合细胞, 其他两种各得到了 6-7 个融合细胞, 然后确定 25  $\mu$ s 的脉冲长度, 2 个脉冲数进行下面试验 (如表 1)。

|                  |            |    |
|------------------|------------|----|
| $U' \sim 1.5$ V  | 40 s       |    |
| $U \pi$ V        | 25 $\mu$ s | 2x |
| $U'' \sim 1.5$ V | 40 s       |    |

- 1) 50  $\mu$ s 脉冲长度 + 1 个脉冲
- 2) 25  $\mu$ s 脉冲长度 + 2 个脉冲
- 3) 20  $\mu$ s 脉冲长度 + 3 个脉冲

## 脉冲电压的确定

为获得脉冲电压, 在场强 750 - 2,500 V/cm 下进行了 8 次实验, 计算原生质体的存活率和融合率, “双细胞融合”中的胞核以 DAPI 做标记进行计算, 但不考虑多个融合的个数, 结果显示在表 1 中。

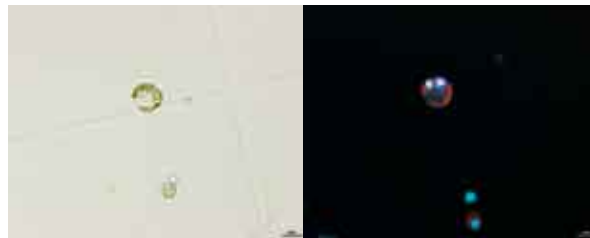


图 4A: 在 transmitted 光下的融合原生质体

图 4B: 在荧光显微镜下的融合原生质体。两个细胞核用 DAPI 染色 ( $\times 200$ )

当融合率上升则原生质体存活率下降，在 150 V 和 170 V 的电压下能得到 82% 或 81% 的存活率，而此融合率仍能保持在 25% - 24%。

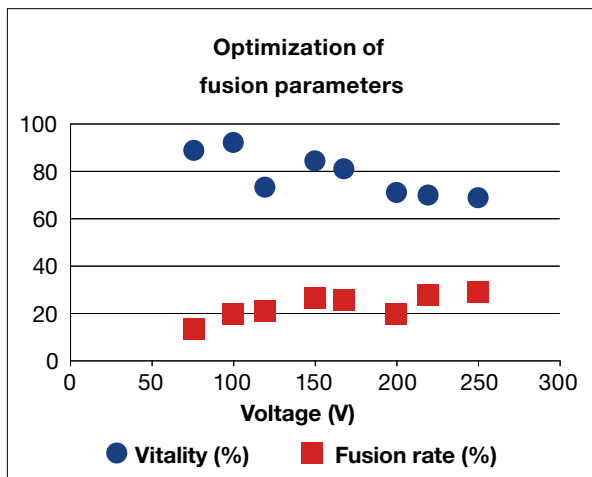


表 1：随电压变化 M.Piperita 与 Piperita mitcham. 的原生质体间的融合效率和存活率的变化

## 总结

本文以薄荷为对象，摸索原生质体融合的最佳参数，我们将富含薄荷醇的品种与一个高产的品种融合，创造一个新的、比以往更适合于薄荷醇生产的薄荷品种。

多功能电转仪非常适合不同种类的体细胞杂交实验，融合率达到了 16-27%，同时原生质体的存活率维持在 97%。与以往 6% 的融合率相比，这个实验结果得到相当程度的提高，这是与多功能电转仪的性能分不开的，它保证了高效而准确的实验得以进行。

多功能电转仪是个高效的、目的性强的细胞融合工具，使用不同规格的融合杯，多功能电转仪可应用于各种类型的使用（从小量摸索到大规模的商业应用的案例均可）。其质量和效率让那些专业从事细胞融合方面的公司（如：Phytowelt Green Technologies GmbH 公司）也感到非常满意。

表 2

|             |       |    |
|-------------|-------|----|
| U' ~ 7.5 V  | 40 s  |    |
| U π 170 V   | 25 μs | 2x |
| U'' ~ 7.5 V | 40 s  |    |

|             |       |    |
|-------------|-------|----|
| U' ~ 7.5 V  | 40 s  |    |
| U π V       | 25 μs | 2x |
| U'' ~ 7.5 V | 40 s  |    |

## 参考文献

- [1] Power, J., Cummins, S., Cocking, E. (1970). *Nature* 225: 1016-1018
- [2] Carlson, P.S., Smith, H.H., Dearing, R.D. (1972). *Proc Natl Acad Sci U S A* 69(8):2292-2294
- [3] Galun, E., Aviv, D., Perl, A. (1994). In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Somatic hybridization in crop improvement, Vol. 27*, Bajaj Y.P.S. (Ed), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 167-182
- [4] Grosser, J.W., Ollitrault, P., Olivares-Fuster, O. (2000). *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 36:434-449
- [5] Brewer, E.P., Saunders, J.A., Angle, J.S., Chanery, R.L., McIntosh, M.S. (1999). *Theoretical and Applied Genetics* 99: 761-771
- [6] Kao, K.N., Michayluk, M.R. (1974). *Planta*. 115:355-367
- [7] Zimmermann U., Scheurich, P. (1981). *Planta*. 151:26-32
- [8] Cheng, J., Saunders, J.A. (1995). In *Methods in Molecular Biology, Vol. 55: Plant Cell Electroporation and Electrofusion Protocols* Edited by: J.A. Nickoloff Humana Press Inc., Totowa, NJ
- [9] Saunders, J.A., Bates, G.W. (1987). In *Cell Fusion* (Sowers, A.E., ed.), Plenum, New York: 497-520
- [10] Fish, N., Karp, A., Jones, M.G.K. (1988). *Theor. App. Genet.* 76:260-266
- [11] FNR-Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. Plenum, New York: 497-520.
- [12] Smith, M.A.L., McCown, B. (1982/1983). *Plant Sci. Lett.* 28: 149-156
- [13] Sato, H., Enomoto, S., Oka, S., Hosomi, K., Ito, Y. (1993). *Plant Cell Reports*, 12:546-550
- [14] Sato, H., Yamada, K., Mii, M., Hosomi, K., Okuyama, S., Uzawa, M., Ishikawa, H., Ito, Y. (1996). *Plant Science* 115:101-107(7)

作者 Ellen Nissing & Andreas Müller,  
Phytowelt Green Technologies GmbH, Nettetal, Germany  
Natascha Weiß, Eppendorf AG, Hamburg