

王丹丹, 李成阳, 李 强. 甘薯高效原生质体瞬时转化系统的建立及应用[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(12): 2201-2206.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.12.002

甘薯高效原生质体瞬时转化系统的建立及应用

王丹丹, 李成阳, 李 强

(江苏徐淮地区徐州农业科学研究所/农业农村部甘薯生物学与遗传育种重点实验室/中国农业科学院甘薯研究所, 江苏 徐州 221131)

摘要: 原生质体瞬时转化系统简便高效, 已被广泛用于植物基因功能分析。然而, 目前甘薯中尚未建立原生质体瞬时转化系统。本研究以徐紫薯 8 号水培根系为试验材料, 通过聚乙二醇(PEG)介导, 建立了一个操作简便且高效的原生质体分离和瞬时转化系统。结果表明, 水培根系制备的原生质体产量高达每 1 g 1.106×10^7 个, 质粒转化效率高达 69.46%。并利用该系统, 首次成功将甘薯蔗糖转运蛋白(IbSUT4)定位到甘薯细胞膜上。本研究结果为甘薯功能基因研究和分子育种提供了重要技术支撑。

关键词: 甘薯; 原生质体; 瞬时转化; 亚细胞定位

中图分类号: S531 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2024)12-2201-06

Establishment and application of an efficient protoplast transient transformation system in sweet potato

WANG Dandan, LI Chengyang, LI Qiang

(Xuzhou Institute of Agricultural Sciences in Jiangsu Xuhuai District/Key Laboratory of Biology and Genetic Breeding of Sweetpotato, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Sweetpotato Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xuzhou 221131, China)

Abstract: The protoplast transient transformation system is simple and efficient, and has been widely used in plant gene function analysis. However, the protoplast transformation system has not yet been established in sweet potato. In this study, the hydroponic roots of Xuzishu 8 were used as materials to establish a simple and efficient protoplast isolation and transient transformation system mediated by polyethylene glycol (PEG). The results showed that the yield of protoplasts prepared from hydroponic roots was as high as 1.106×10^7 per gram, and the plasmid transformation efficiency was as high as 69.46%. Using this system, the sweet potato sucrose transporter (IbSUT4) was successfully localized on sweet potato cell membrane for the first time. The results of this study provide important technical support for sweet potato functional gene research and molecular breeding.

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

甘薯[*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] 是重要的粮食作物之一, 其适应性强、高产和营养丰富, 已成为

未来保障粮食供应的重要作物^[1]。深入挖掘并解析甘薯产量、品质和抗性相关基因, 对于培育高产、优质和高抗的甘薯品种具有重要意义^[2]。随着基因组测序技术的快速发展, 已成功测序并组装出多个高质量的甘薯基因组序列, 如 *Ipomoea batatas* Beauregard (<http://sweetpotato.uga.edu>) 和徐薯 18 的基因组序列^[3]。这些基因组数据极大促进了甘薯进化机制的探索及重要性状遗传位点的鉴定。然

收稿日期: 2024-02-25

基金项目: 国家甘薯产业技术体系项目(CARS-10-甘薯)

作者简介: 王丹丹(1994-), 女, 山东烟台人, 博士研究生, 主要研究方向为甘薯遗传育种。(E-mail) wdd201712@126.com

通讯作者: 李 强, (E-mail) instrong@163.com

而,由于甘薯具有六倍体和高度杂合的特点,其基因组复杂且庞大,为功能基因的研究带来了巨大挑战^[3-5]。甘薯突变体资源有限且遗传转化周期较长,也进一步阻碍了研究人员对其基因功能的深入研究。因此,亟需简便且高效的工具来加速甘薯基因的挖掘与功能分析。

原生质体瞬时转化是一种基因功能研究方法,相比于稳定的遗传转化系统,原生质体瞬时转化系统可以更加高效、简便地进行基因功能分析,可用于亚细胞定位分析、体内分子相互作用和信号转导研究等^[6]。利用该系统,可以实现多种植物蛋白质在内源系统中的亚细胞定位分析^[7-10]。然而,由于部分植物细胞壁较厚或富含多糖、多酚,原生质体的制备较为困难,只能利用异源表达系统进行亚细胞定位分析^[11-13]。并且,由于不同物种之间进化距离差异较大,蛋白质的错误靶向可能会导致目标蛋白质在异源系统中丧失活性^[14]。因此,针对具体物种建立适用的原生质体瞬时转化体系至关重要。

1979 年,吴耀武等^[15]报道了甘薯愈伤组织原生质体的分离和培养;随后,学者又从甘薯茎、叶柄和叶肉细胞中陆续分离出原生质体^[16-23]。然而,由于甘薯富含多糖、多酚^[24],原生质体的制备较为复杂,至今尚未建立完整的同源瞬时转化体系。本研究拟以徐紫薯 8 号水培根系为试验材料,初步建立甘薯水培根系高效原生质体制备及瞬时转化体系,以为甘薯蛋白质亚细胞定位分析和甘薯基因功能研究和性状改良提供高效、简便的工具。

1 材料与方法

1.1 材料

试验选用甘薯品种徐紫薯 8 号。将徐紫薯 8 号茎段置于温室中水培 3~5 d,待根系长至 2~3 cm 时,取水培根系按照 Liu 等^[25]的方法培养徐紫薯 8 号的愈伤组织,待愈伤组织直径达到 3~5 mm 时用于制备原生质体。

1.2 试剂

纤维素酶(型号 Cellulase R-10)和离析酶(型号 Macerozyme R-10)来自日本 Yakult Honsha 公司。其他用于原生质体制备及转化的试剂均购自 Sigma 公司。

1.3 原生质体分离

原生质体分离参照 Nishimaki 等^[26]和 Yoo

等^[7]的方法并稍作修改。具体操作步骤如下:使用锋利的刀片将根和愈伤组织(1.0 ± 0.1) g 切成 2 mm 的碎块,将切好的碎块立即转移至装有 7.5 mL 新鲜酶解液的培养皿中,酶解前,将含有愈伤组织的酶解液在真空泵中抽真空处理 30 min,含有根系的酶解液无需进行抽真空处理,将含有酶解液的根和愈伤组织置于 28 ℃ 培养箱中避光酶解 4.5 h,其间每隔 1 h 轻晃培养皿,用适量的 W5 溶液冲洗孔径 40 μ m 细胞过滤器和 50 mL 锥形离心管,酶解结束后,利用孔径 40 μ m 细胞过滤器对酶解混合物进行过滤,并用等体积的 W5 溶液冲洗培养皿和过滤器,随后将滤液以 100 g 离心 3 min,同时通过缓慢加速和缓慢减速保护原生质体的完整性。离心结束后,小心去除上清液,加入 5 mL W5 溶液重悬原生质体,并将悬浮液在室温下以 100 g 离心 2 min,离心后小心去除上清液,加入 1 mL W5 溶液重悬原生质体,取 100 μ L 悬浮液在显微镜下计算原生质体产量并评估其活性,将剩余的悬浮液置于冰上 30 min,30 min 后小心去除上清液,利用单分枝酰基甘油(MMG)溶液将原生质体含量调节至每 1 mL $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 个。所用溶液的配方如表 1 所示。

1.4 聚乙二醇介导质粒瞬时转化

聚乙二醇(PEG)介导的瞬时转化系统所用 35S::GFP 和 35S::IbSUT4-GFP 载体均为本实验室所有。SCAMP1-mCherry 和 D53-mCherry 载体由南京农业大学万建民教授实验室赠与。其中,IbSUT4 为甘薯蔗糖转运蛋白基因,GFP 为绿色荧光蛋白基因,mCherry 为红色荧光蛋白基因,35S 为 GFP 启动子。

原生质体瞬时转化体系建立方法参考 Yoo 等^[7]的方法并略微修改。具体操作如下:将 10 μ L 质粒(10~20 μ g)与 100 μ L 原生质体置于预涂有 0.1% BSA 的 2 mL 离心管中,轻轻混合,随后加入 110 μ L 新鲜制备的 40% PEG 溶液并充分混合。室温静置 8 min 后,缓慢加入 440 μ L W5 溶液以终止反应,将混合溶液在室温下 100 g 离心 1 min,弃上清液,用 W5 溶液重悬原生质体后,再次离心,去除上清液,加入 1 mL W5 溶液重悬原生质体,将转化后的原生质体悬浮液放置于 12 孔细胞培养板中,25~28 ℃ 黑暗条件下孵育 16 h。所用溶液的配方如表 1 所示。

表 1 原生质体提取及转化溶液

Table 1 Protoplast extraction and transformation solution

名称	成分	储存条件	功能
酶解液	1.5%纤维素酶、0.4%离析酶、0.4 mol/L甘露醇、20 mmol/L KCl、20 mmol/L MES、10 mmol/L CaCl ₂ 、0.035% β -巯基乙醇和0.1% BSA	4 ℃ (现用现配)	酶解细胞壁释放原生质体
W5	154 mmol/L NaCl、125 mmol/L CaCl ₂ 、5 mmol/L KCl、2 mmol/L MES 和 5 mmol/L葡萄糖, pH 值 5.8	4 ℃	清洗原生质体
MMg	15 mmol/L MgCl ₂ 、4.7 mmol/L MES 和 0.4 mmol/L甘露醇, pH 值 5.6	4 ℃	重悬原生质体
40% PEG	40% PEG4000、0.2 mol/L甘露醇和 100 mmol/L CaCl ₂	25~28 ℃ (现用现配)	介导质粒转化
WI	0.5 mmol/L甘露醇、4 mmol/L MES 和 20 mmol/L KCl, pH 值 5.7	4 ℃	培养原生质体

1.5 显微镜观察和数据统计

使用血球计数板计算原生质体的产量^[27]。使用荧光素二乙酸酯(FDA)将原生质体染色^[28],并在显微镜下检查原生质体活性。在转化过程中,将携带绿色荧光蛋白(GFP)基因的质粒导入原生质体,如果转化成功,原生质体会表达 GFP 蛋白并发出绿色荧光,因此可以通过统计表达绿色荧光蛋白(GFP)原生质体的数量计算转化效率^[13]。使用 Le-

cia 显微镜(型号 DM40008,德国 Leica 公司产品)分析蛋白质亚细胞定位,绿色荧光蛋白(GFP)和红色荧光蛋白(mCherry)的激发和发射波长分别为 470/510 nm 和 538/584 nm。使用 Image J 软件测量原生质体的直径。使用 DPS 软件进行统计分析,采用单因素方差分析(ANOVA)和最小显著性差分法(LSD)比较处理间差异。每个试验重复 3 次。试验流程如图 1 所示。

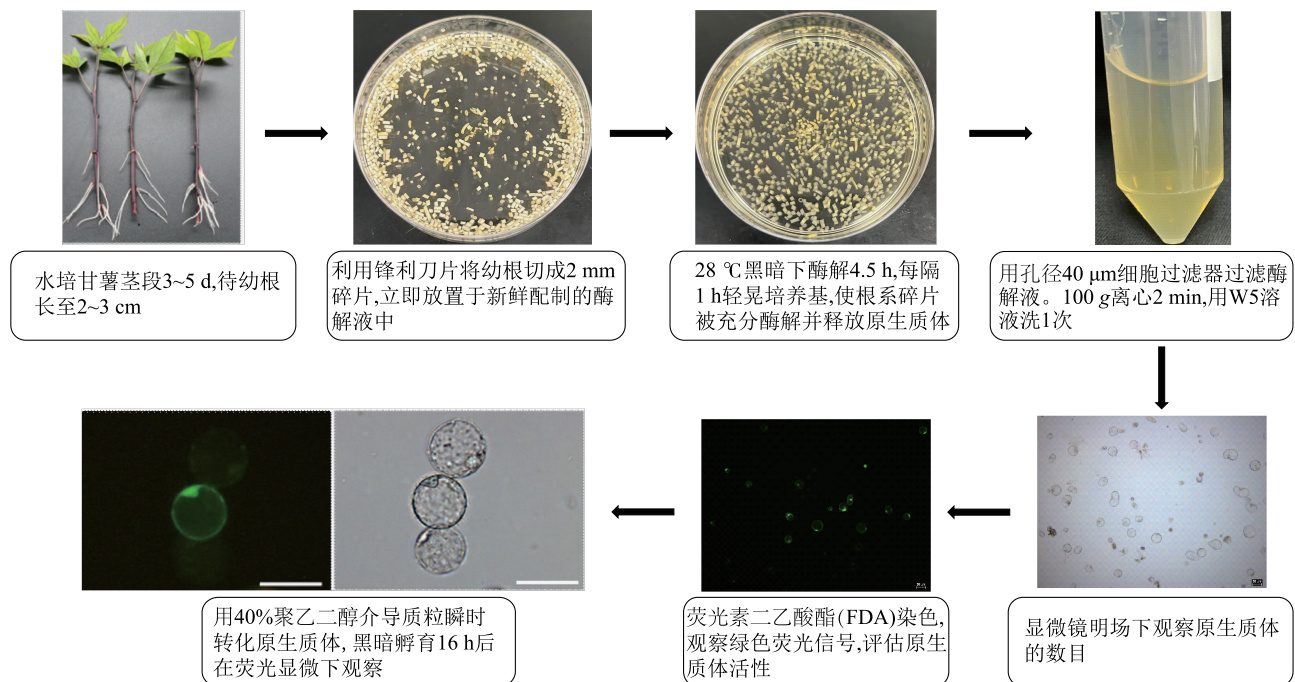


图 1 甘薯水培根系原生质体分离和转化流程

Fig.1 Flow chart of sweet potato hydroponic root protoplast isolation and transformation

2 结果与分析

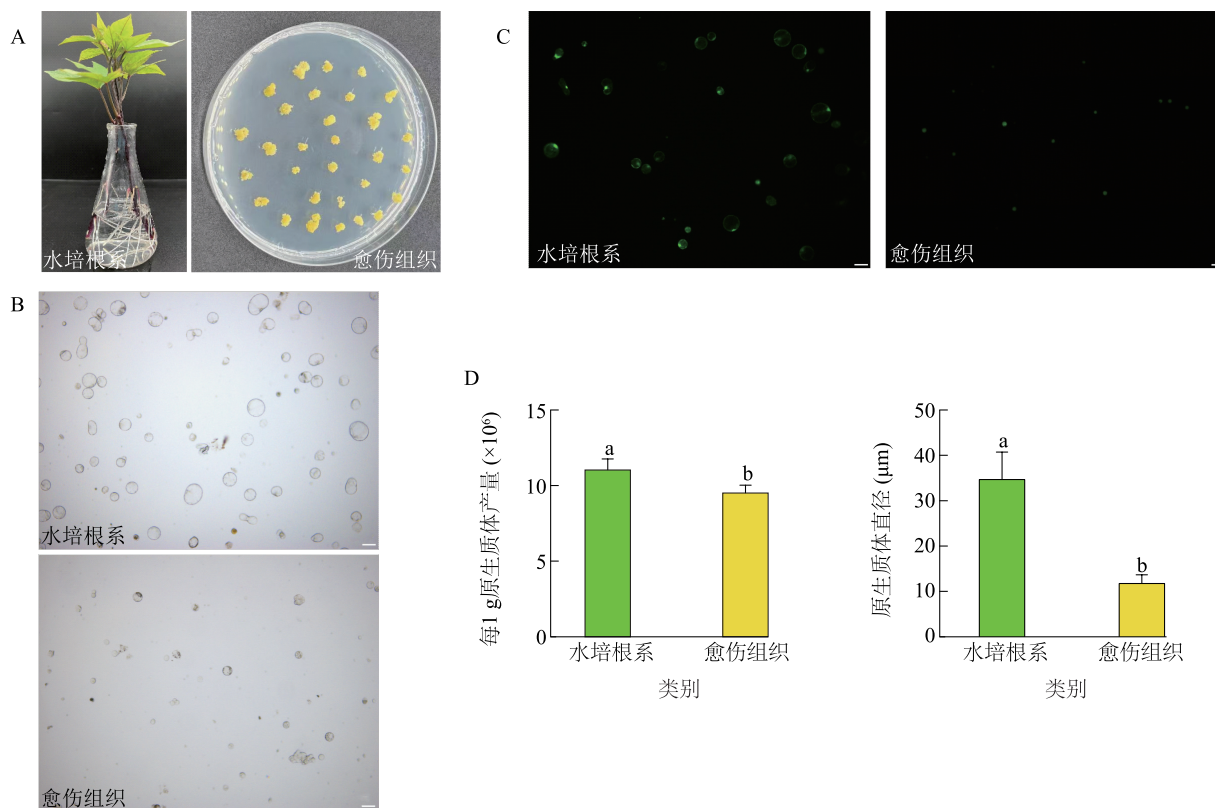
2.1 甘薯不同组织制备得到的原生质体

以愈伤组织和水培根系为材料制备原生质体,

比较获得的原生质体的数量和质量,从而选择合适的试验材料(图 2A)。结果表明,水培根系制备的原生质体数量显著高于愈伤组织($P < 0.05$)(图 2B)。经 FDA 染色后,2 种组织制备的原生质体均

有绿色荧光信号,表明分离得到的原生质体完整且有活力(图 2C)。进一步分析发现,根系原生质体的

直径显著大于愈伤组织原生质体 ($P < 0.05$) (图 2D),更利于观察。



比例尺 = 50 μm 。图柱上不同小写字母表示显著差异 ($P < 0.05$)。

图 2 甘薯不同组织制备得到的原生质体

Fig.2 Protoplasts prepared from different tissues of sweet potato

2.2 甘薯根系原生质体的蛋白质亚细胞定位

孵育时间从 4 min 增加到 16 min,原生质体转化效率从 54.33% 提高到 72.53%,其中孵育 8 min 与孵育 12 min 的原生质体转化效率无显著差异(图 3A)。孵育 12 min 时的完整原生质体的数量显著低于孵育 8 min 时的完整原生质体的数量 ($P < 0.05$),因此最佳孵育时间确定为 8 min(图 3B)。随后,利用该系统进一步对蛋白质进行亚细胞定位,以验证该体系的准确性。结果表明,分泌载体膜蛋白 1 (SCAMP1) 和核蛋白 (D53) 均可被准确定位(图 3C~图 3E),表明该系统适用于蛋白质亚细胞定位分析。将 35S:*IbSUT4*-GFP 质粒转入甘薯水培根系原生质体中,在荧光显微镜下观察 *IbSUT4* 亚细胞定位。结果表明,原生质体膜上存在 GFP 蛋白,且 GFP 蛋白与 SCAMP1 共定位,表明 *IbSUT4* 定位在细胞膜上(图 3F)。

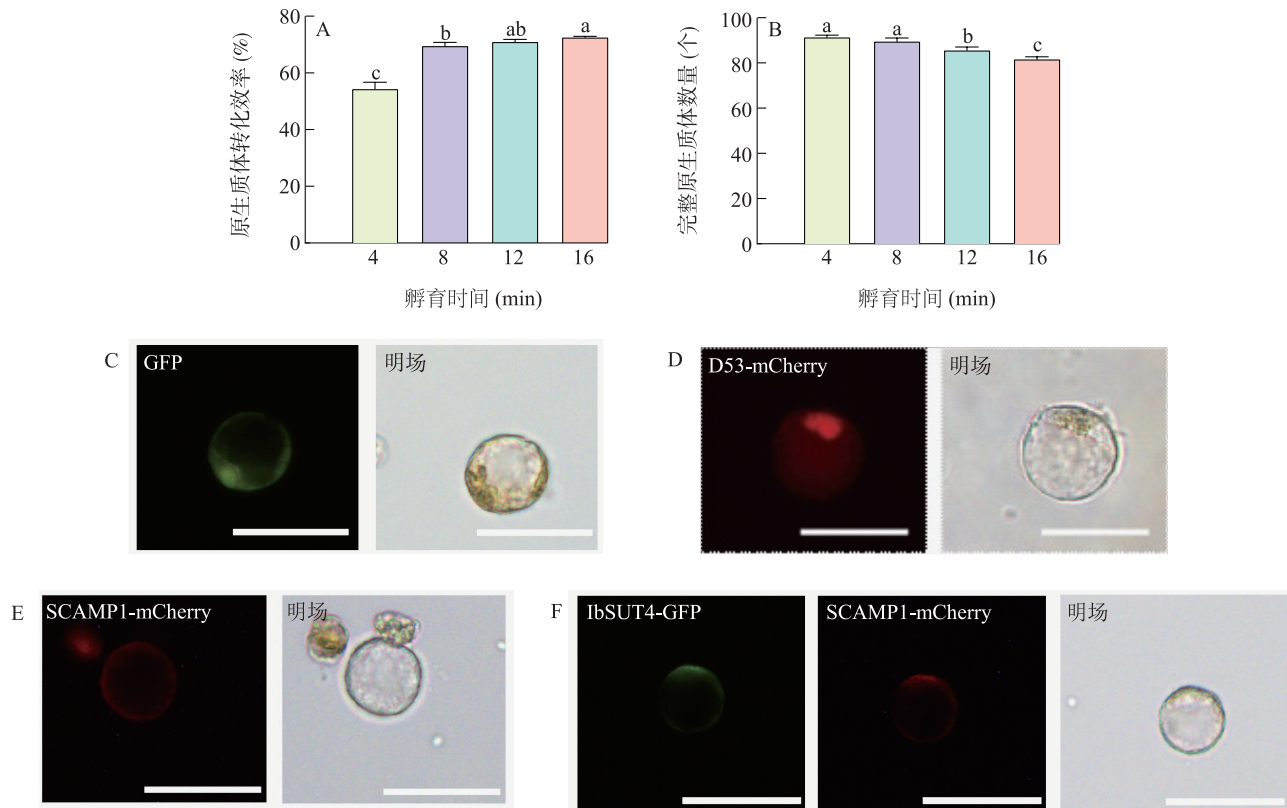
3 讨论

无细胞壁的原生质体是研究基因功能、蛋白质亚细胞定位、信号转导、细胞融合和培育新品种的理想试验材料^[28-31]。在拟南芥和水稻等植物中,已经建立了高效的原生质体分离、瞬时转化系统,在甘薯中,仍亟需一种简便且高效的原生质体分离、瞬时转化系统。

多种因素会影响甘薯原生质体的释放,包括试验材料的生长状态、多糖含量、多酚含量以及器官的选择等。因此,选择合适的试验材料是成功分离甘薯原生质体的关键。Sihachakr 等^[19]将甘薯茎和叶柄酶解过夜,得到原生质体。本研究发现,以水培根系和愈伤组织为试验材料,仅需酶解 4.5 h 即可获得原生质体,大大缩短了制备时间。Dhir 等^[22]使用 1% 纤维素酶、2% 离析酶和 0.3% 果胶酶配置酶解

液,酶解叶柄后,原生质体产量为每 1 g $3.0\sim 5.0\times 10^6$ 个。本研究中,仅使用 1.5% 纤维素酶和 0.4% 离析酶,原生质体产量达到每 1 g 1.106×10^7 个,显著降低了酶的用量。此外,本研究发现,与愈伤组织相

比,利用水培根系制备原生质体产量更高,且所需时间更短。愈伤组织培养耗时且需无菌环境,不适合大规模分离原生质体,而水培根系培养周期短、产量高,是更优质的试验材料。



C: 阳性对照 (35S:GFP) 亚细胞定位;D: 细胞核蛋白 (D53) 亚细胞定位;E: 分泌载体膜蛋白 1 (SCAMP1) 亚细胞定位;F: 35S:IbSUT4-GFP 亚细胞定位 (比例尺 = 50 μm)。GFP: 绿色荧光蛋白; mCherry: 红色荧光蛋白。图注上不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 3 甘薯根系原生质体亚细胞定位分析

Fig.3 Subcellular localization analysis of sweet potato root protoplasts

前人多采用烟草原生质体进行甘薯蛋白质亚细胞定位分析^[10,32]。然而,与同源原生质体相比,异源原生质体会导致蛋白质定位的偏差。本研究中,利用 GFP 质粒评估质粒转化效率,最高达 69.46%,明显高于其他作物^[27],表明基于甘薯水培根系原生质体的瞬时转化系统能够高效地将外源 DNA 引入甘薯细胞。核蛋白和膜蛋白标记物在甘薯原生质体中的正确定位进一步验证了该体系的准确性,定位结果表明,甘薯蔗糖转运蛋白 IbSUT4 定位于细胞膜。此外,本研究提出的甘薯根系原生质体分离及瞬时转化系统还可用于研究蛋白质与蛋白质、蛋白质与 DNA 的相互作用,验证启动子功能,以及探索信号转导等分子机制。

综上所述,本研究成功建立了甘薯水培根系原生

质体分离与瞬时转化体系,可高效、准确地分析甘薯蛋白质在同源系统中的亚细胞定位,这一体系将为甘薯功能基因研究和分子育种提供重要技术支撑。

参考文献:

- [1] SAPAKHOVA Z, RAISSOVA N, DAUROV D, et al. Sweet potato as a key crop for food security under the conditions of global climate change: a review[J]. Plants, 2023, 12(13): 2516.
- [2] LIU Q C. Improvement for agronomically important traits by gene engineering in sweetpotato[J]. Breeding Science, 2017, 67(1): 15-26.
- [3] YOON U H, CAO Q H, SHIRASAWA K, et al. Haploid-resolved and chromosome-scale genome assembly in hexa-autoploid sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) [J]. BioRxiv, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1101/2022.12.25.521700>.
- [4] YANG J, MOEINZADEH M H, KUHLM H, et al. Haplotype-re-

- solved sweet potato genome traces back its hexaploidization history [J]. *Nature Plants*, 2017, 3(9): 696-703.
- [5] ISOBE S, SHIRASAWA K, HIRAKAWA H. Challenges to genome sequence dissection in sweetpotato [J]. *Breeding Science*, 2017, 67(1): 35-40.
- [6] DAVEY M R, ANTHONY P, POWER J B, et al. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives [J]. *Biotechnology Advances*, 2005, 23(2): 131-171.
- [7] YOO S D, CHO Y H, SHEEN J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis [J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(7): 1565-1572.
- [8] BAO W Y, ZHANG W J, HUANG Y C, et al. Protein kinase ATR inhibits E3 ubiquitin ligase CRL4^{PRLI} to stabilize ribonucleotide reductase in response to replication stress [J]. *Cell Reports*, 2023, 42(7): 112685.
- [9] XIANG Y H, YU J J, LIAO B, et al. An α/β hydrolase family member negatively regulates salt tolerance but promotes flowering through three distinct functions in rice [J]. *Molecular Plant*, 2022, 15(12): 1908-1930.
- [10] WANG D D, LIU H J, WANG H X, et al. A novel sucrose transporter gene *IbSUT4* involves in plant growth and response to abiotic stress through the ABF-dependent ABA signaling pathway in sweetpotato [J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20: 1-15.
- [11] ZHANG H, WANG Z, LI X, et al. The IbBBX24 - IbTOE3 - IbPRX17 module enhances abiotic stress tolerance by scavenging reactive oxygen species in sweet potato [J]. *New Phytologist*, 2022, 233(3): 1133-1152.
- [12] ZHANG B, FAN W M, ZHU Z Z, et al. Functional analysis of MdSUT2. 1, a plasma membrane sucrose transporter from apple [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2023, 22(3): 762-775.
- [13] ZHANG K, LIU S H, FU Y Z, et al. Establishment of an efficient cotton root protoplast isolation protocol suitable for single-cell RNA sequencing and transient gene expression analysis [J]. *Plant Methods*, 2023, 19(1): 1-12.
- [14] ROTTMANN T M, FRITZ C, LAUTER A, et al. Protoplast-esculin assay as a new method to assay plant sucrose transporters: characterization of AtSUC6 and AtSUC7 sucrose uptake activity in *Arabidopsis* Col-0 ecotype [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 430.
- [15] 吴耀武, 马彩萍. 甘薯 (*Ipomoea batatas*) 原生质体的分离、培养与愈伤组织的形成 [J]. *植物学报*, 1979(21): 334-338.
- [16] BIDNEY D L, SHEPARD J F. Colony development from sweet potato petiole protoplasts and mesophyll cells [J]. *Plant Science Letters*, 1980, 18(4): 335-342.
- [17] OTANI M, SHIMADA T, NIIZEKI H. Mesophyll protoplast culture of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) [J]. *Plant Science*, 1987, 53(2): 157-160.
- [18] 程增书. 甘薯叶柄原生质体的分离、培养及愈伤组织的形成 [J]. *河北农作物研究*, 1992(4): 6.
- [19] SIHACHAKR D, DUCREUX G. Regeneration of Plants from Protoplast of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L. Lam.) [C]//CAI Q G, TSAI C K, QIAN Y Q, et al. *Plant Protoplasts and Genetic Engineering IV*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1993.
- [20] BELARMINO M M, ABE T, SASAHARA T. Plant regeneration from stem and petiole protoplasts of sweet potato (*Ipomoea batatas*) and its wild relative, *I. lacunose* [J]. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 1994, 37: 145-150.
- [21] 李洪杰, 梁增霞. 甘薯叶肉和细胞悬浮原生质体植株再生 [J]. *国外农学-杂粮作物*, 1995(44): 35-40.
- [22] DHIR S K, OGLESBY J, BHAGSARI A S. Plant regeneration via somatic embryogenesis, and transient gene expression in sweet potato protoplasts [J]. *Plant Cell Reports*, 1998, 17(9): 665-669.
- [23] GUO J M, LIU Q C, ZHAI H, et al. Regeneration of plants from *Ipomoea cairica* L. protoplasts and production of somatic hybrids between *I. cairica* L. and sweetpotato, *I. batatas* (L.) Lam. [J]. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 2006, 87(3): 321-327.
- [24] LIU T G, XIE Q T, ZHANG M, et al. Reclaiming agriceuticals from sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) by-products [J]. *Foods*, 2024, 13(8): 1180.
- [25] LIU Q C, ZHAI H, WANG Y, et al. Efficient plant regeneration from embryogenic suspension cultures of sweetpotato [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 2001, 37(5): 564-567.
- [26] NISHIMAKI T, NOZUE M. Isolation and culture of protoplasts from high anthocyanin-producing callus of sweet potato [J]. *Plant cell reports*, 1985, 4(5): 248-251.
- [27] YU G H, CHENG Q, XIE Z N, et al. An efficient protocol for perennial ryegrass mesophyll protoplast isolation and transformation, and its application on interaction study between LpNOL and LpNYC1 [J]. *Plant Methods*, 2017, 13: 1-8.
- [28] WANG Q L, YU G R, CHEN Z Y, et al. Optimization of protoplast isolation, transformation and its application in sugarcane (*Saccharum spontaneum* L.) [J]. *The Crop Journal*, 2021, 9(1): 133-142.
- [29] GROSSER J W, GMITTER F G. Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2011, 104(3): 343-357.
- [30] HE F, CHEN S B, NING Y S, et al. Rice (*Oryza sativa*) protoplast isolation and its application for transient expression analysis [J]. *Current Protocols in Plant Biology*, 2016, 1(2): 373-383.
- [31] LIN C S, HSU C T, YANG L H, et al. Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: from single-cell mutation detection to mutant plant regeneration [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(7): 1295-1310.
- [32] MENG X Q, LIU S Y, ZHANG C B, et al. The unique sweet potato NAC transcription factor IbNAC3 modulates combined salt and drought stresses [J]. *Plant Physiology*, 2023, 191(1): 747-771.

(责任编辑:成纾寒)