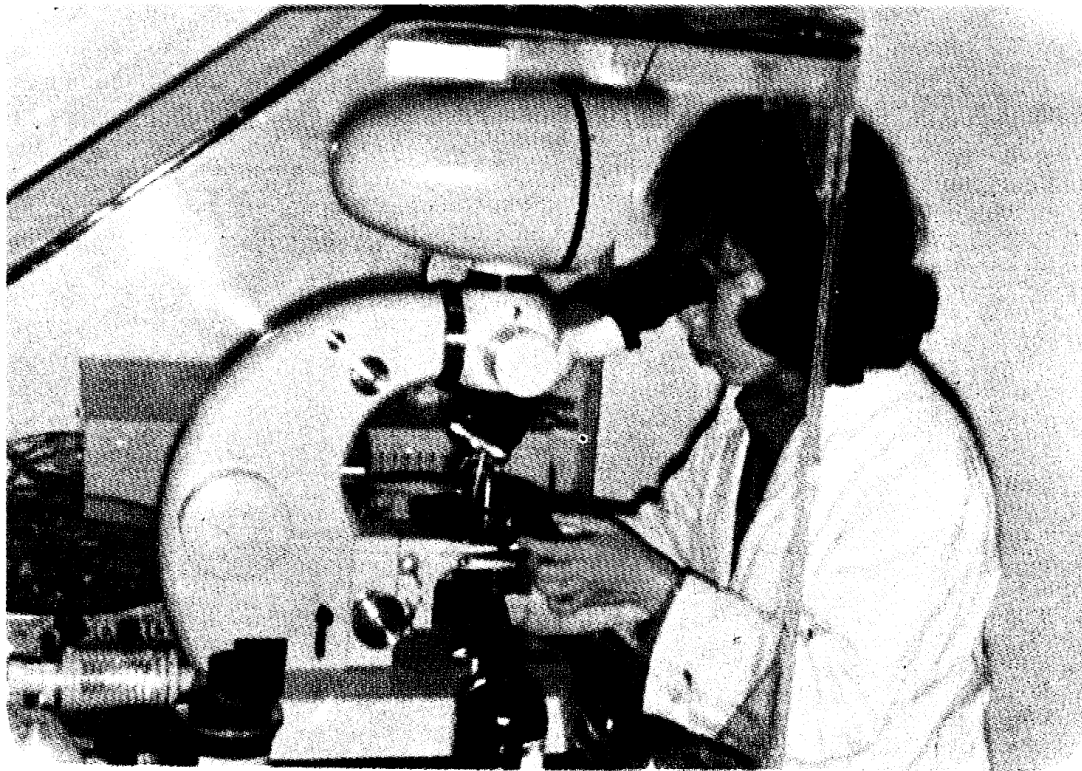


原生質體的研究

高中教師組生物第一名

臺北市立第一女子高級中學

作者：林英子



一、緒言：

高等植物及細菌的原生質體 (protoplast)，因為不具細胞壁，故已成為一熱門的研究工具，利用這一個特殊性質的研究系統，包括細胞學、細胞遺傳學、植物病理學，以及新近的遺傳物質介入試驗 (incorporation of hereditary substances) 和體細胞雜交 (somatic hybridization) 等，並為作物育種 (crop

breeding) 的新途徑，引起作者對研究原生體的注意。

高中生物學上、下冊均提到植物細胞與動物細胞的異同，同學們對於這二類細胞，在實驗室裡用顯微鏡觀察比較，他們都看到植物細胞和動物細胞的外形有很大的差別，植物細胞因為有細胞壁，故不呈圓形，觀察植物細胞的細胞質萎縮 (plasmolysis) 時，好幾位同學問我：沒有細胞壁的植物細胞像什麼樣子？植物細胞去掉細胞壁以後還會活嗎？用什麼方法可以把細胞壁“剝”掉？爲了回答同學們的問題，乃着手收集一些分離原生質體的方法，並進行實驗，研究植物細胞及細菌細胞原生質體的特性，以作爲將來指導學生親自試驗分離原生質體。

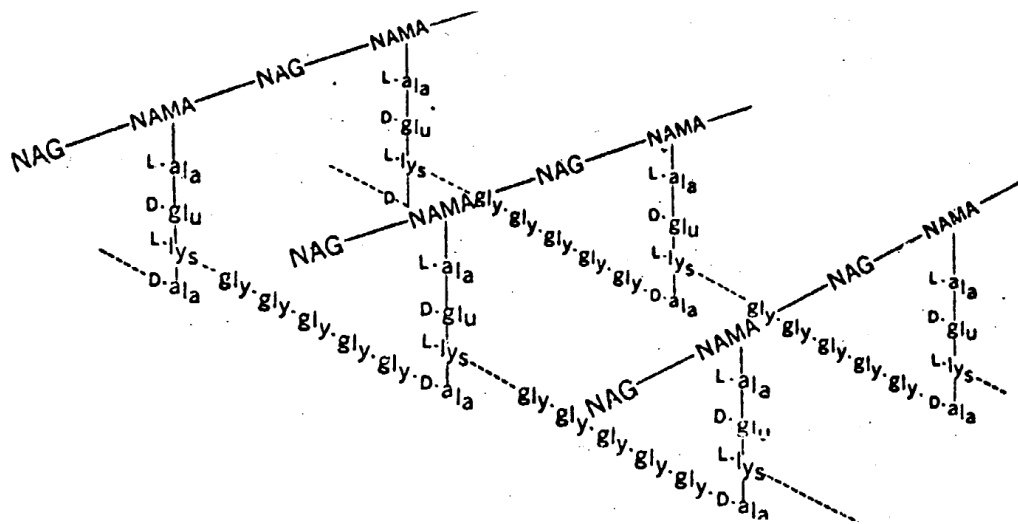
二、研究目的：

1. 分離植物及細菌的原生質體，研究其特性及原生質體內各種胞器 (organelles) 的觀察。
2. 探討分離原生質體的簡易方法，以便將來讓學生們可以在實驗室內親身研究原生質體的特性。
3. 大量分離活的原生質體，並加以培養，以研究利用體細胞雜交培育優良新品種的途徑。

三、原生質體與細胞壁分離的原理：

沒有細胞壁的植物細胞或細菌體叫作原生質體。原生質體因無細胞壁的保護，故必須像動物細胞一樣在等張溶液 (isotonic solution) 內才不會發生細胞解體現象。

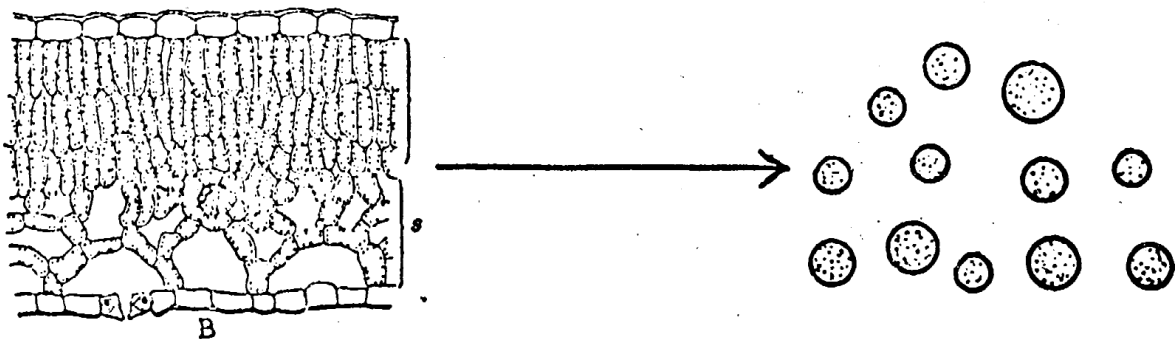
用酵素方法水解細胞壁，以獲得活的原生質體，爲最溫和的方法，也是最常被採用的，但必須先瞭解細胞壁的組成份，以作爲選擇酵素的依據。細菌可說是原始的植物，有細胞壁，但其細胞壁的組成份與高等植物不同。構成細菌細胞壁的主要成份爲肽聚糖 (peptidoglycan)，係由兩種乙醯胺基葡萄糖的衍生物組成直鏈結構，並由四肽 (tetrapeptide) 及五肽 (pentapeptide) 相互連接而成爲一交錯的構造，如下圖：



上述兩種乙醯胺基葡萄糖的衍生物，一為N—乙醯胺基葡萄糖（N—acetylglucosamine，簡稱NAG），另一為N—乙醯胞壁胺糖酸（N—acetylmuramic acid，簡稱NAMA），此二種乙醯胺基糖係由 β -1,4—糖苷鏈（ β -1,4—glycosidic bond）所連接。

溶菌酶（lysozyme）即在於水解這一個 β -1,4—糖苷鏈，而使胞壁的結構解體，形成原生質體。

高等植物的細胞壁，主要的成份為纖維素（cellulose）及果膠質（pectin），故用纖維水解酶（cellulase）及果膠質水解酶（pectinase）混合使用，即可將細胞壁去除，而得完整的原生質體。



四、實驗材料及方法：

↳細菌原生質體的製備

1 材料

黃萎桿菌屬(*Xanthomonas*) 的兩種細菌，水稻白葉枯病菌(*X. oryzae*) 及樹薯流膠病菌(*X. manihoti*) 均為中央研究院植物所分離的菌種。

2 培養基的配製

Casein hydrolysate	1.0 g
Peptone	5.0 g
Sucrose	15.0 g
Ca (NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0.5 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.0 g

加水至 1 公升，PH = 7.0 高壓滅菌後備用。

3 細菌培養及原生質體的分離

細菌在上述培養基中振盪培養 16 小時，用冷凍離心機(Sorvall) 離心 10 分鐘(3000 xg) 用蔗糖緩衝液(0.01 M tris-HCl buffer, PH8.5 及 0.08M 蔗糖溶液) 溶出，細菌的濃度調整為 2×10^9 個/ml，每 10 ml 菌液加入 0.8 ml 的 0.11 M EDTA (ethylenediamine tetra acetate)；0.5 ml 的 0.5% 牛血清蛋白(bovine serum albumin) 及 0.8 ml 溶菌酶(配製成 2 mg/ml) 作用 1~2 分鐘後，加入 0.4 ml 的 0.5 M MgSO₄ 以中止溶菌酶的作用。

4. 原生質體形成的過程：

細菌經溶菌酶作用後，在不同作用時間取出樣品觀察：

- ① 相位差顯微鏡觀察(phase-contrast Microscopy)，用 4% formaldehyde 固定原生質體後，用相位差顯微鏡觀察並照相。
- ② 電子顯微鏡觀察(Electron Microscopy)

經過固定後的樣品，取少量滴在有薄膜(Formual-film) 的樣品銅篩(grid) 上，乾燥後用白金絲(Pl-

atinum) 作陰影 (Shadow) 或用 1% uranyl acetate (PH = 5.0) 作負染色，然後用 Hitachi HU-11A 電子顯微鏡觀察及照相。該電子顯微鏡係向中央研究院植物所借用，並得該所周德源博士之技術指導。

(二) 植物原生質體的製備

1 材料：

使用蔬菜類四種植物，均為雙子葉植物，採自宿舍附近菜園，另一種單子葉植物水稻係使用台中 65 號品種，用培養皿在 30℃ 萌芽的

萵苣 (*Lactuca sativa* L. 英文名 lettuce)

茼蒿 (*Chrysanthemum coronarium* L. 英文名 Garland Chrysanthemum)

菠菜 (*Spinacia oleracea* L. 英文名 Spinack)

白菜 (*Brassica juncea* Rupr. 英文名 Chinese cabbage)

水稻 (*Oryza sativa* L.) 台中 65 號品種

2 植物原生質體的分離

① 蔗糖酵素液的配製

纖維分解酶 (cellulase) 3%，果膠質分解酶 (pectinase) 2% 配在 0.6M 蔗糖溶液或 0.45M 甘露醇 (mannitol) 溶液內。

② 蔬菜葉肉組織原生質體的分離

新鮮的葉片洗淨後，將表皮斜斜撕下，用鋒利的刀片切取葉肉組織，其大小為 2 mm 正方形，置於蔗糖酵素液中 (2 克的組織用 10ml 酵素液)，經過二小時後取出，用尼龍布 (Nylon cloth) 過濾，即可用顯微鏡觀察。

③ 水稻原生質體的分離

用發芽五天的水稻葉鞘，切取尖端 2 mm，加入蔗糖酵素液中，方法同上。

④ 原生質體融合誘導劑 (fusion-inducing agent) 的處理

，用 15% 的 polyethylene glycol (PEG-6000) 當作

誘導劑，加入于原生質體懸浮液內，10 分鐘後觀察並計數融合頻率（ frequency ）。

五、結果與討論：

本研究已成功地分離出大量活的植物及細菌原生質體，茲分述如下：

(一)細菌原生質體：

1 原生質體形成的條件

① 酵素濃度

用不同濃度的溶菌酶處理細菌，作用溫度為 28℃，發現溶菌酶的濃度在 0.13mg/ml，就能在 2 分鐘內使全部的細菌轉變成原生質體，結果見表一。

表一 細菌在不同溶菌酶濃度下轉變成原生質體的速率

溶菌酶 濃度 mg/ml	原生質體百分比	
	一 分 鐘	二 分 鐘
0.065	20	52
0.13	72	99
0.2	95	100

利用相位差顯微鏡可以計數原生質體轉變的比例，圖一為細菌外形，圖二為原生質體。

溶菌酶存在於眼淚、唾液中，但以蛋白的含量較高。

用纖維分解酶加上果膠質分解酶混合液，無法使細菌轉變成為原生質體。

② 蔗糖濃度

在 0.08M 蔗糖溶液下，原生質體可以維持其圓形形狀降低蔗糖濃度，會引起原生質體破裂。

2 原生質體形成的過程：

利用電子顯微鏡（EM）的觀察，發現細胞壁開始受溶菌酶作用的位置沒有一定，或由桿菌的兩端開始（如圖三）或

由桿菌的中部開始（如圖四），又細菌轉變成原生質體後，鞭毛仍然留在原生質體上，顯示鞭毛係由細胞膜伸出，而非接在細胞壁上（見圖五）。

（圖六）為完整的 *X. oryzae* 細菌可以清楚的看到細菌之一端有一條呈波浪狀的頂端鞭毛，其長度約為細菌體的八倍。

（圖七）為細菌及原生質體大小的比較。

3. 原生質體的培養及活性

原生質體的活性，可用顯微鏡觀察其游動情形（因為有鞭毛，故可游動）作為指標，但本實驗尚無法培養原生質體使其分裂生成菌落。

(一) 高等植物的原生質體

1. 原生質體形成的條件

① 用纖維分解酶及果膠質分解酶的混合液，可自葉肉組織中分離出大量的原生質體，這些原生質體活性高，其內部的胞器（organelles）如葉綠體仍極完整。在室溫下，作用二小時即可有多量的原生質體產生，產量可達 $1 \sim 2 \times 10^6$ 個/克組織。圖八、九分別為冬萵及萵苣的原生質體。分離自同一種植物的原生質體，其大小不完全一致。利用溶菌酶無法使高等植物細胞轉變成原生質體。

② 蔗糖濃度一般用 0.6M 蔗糖溶液或用 0.45M 甘露醇溶液，可得較好的結果。

2. 原生質體融合的觀察

正常的原生質體和動物細胞一樣，細胞與細胞間並不自動融合，但可以用某些物質促使其融合，如用 PEG-6000 處理 10 分鐘，可提高融合率到 50% 融合的原生質體，為兩個至多個（見圖 10 ~ 13）融合後的原生質體不易分開。

六、結 論：

(一) 利用適當的酵素分別處理細菌和各種不同植物組織，已成功的得到大量沒有細胞壁的活原生質體。

(二) 高等植物和細菌的細胞壁，因組成份不同，故須選用不同的酵

素分離原生質體。

(三)溶菌酶可由雞蛋白中抽取純化。

(四)細菌形成原生質體的過程，可自兩端或中央開始，似無一定的起始點。

(五)由溶菌酶處理形成的原生質體，仍帶有鞭毛，故證明細菌鞭毛源自細胞膜。

(六)高等植物細胞須用纖維分解酶及果膠質分解酶混合作用，才能得到多量的原生質體，單子葉植物及雙子葉植物的原生質體一樣容易分離。

(七)在等張溶液或高張溶液下才能保持原生質體的完整。

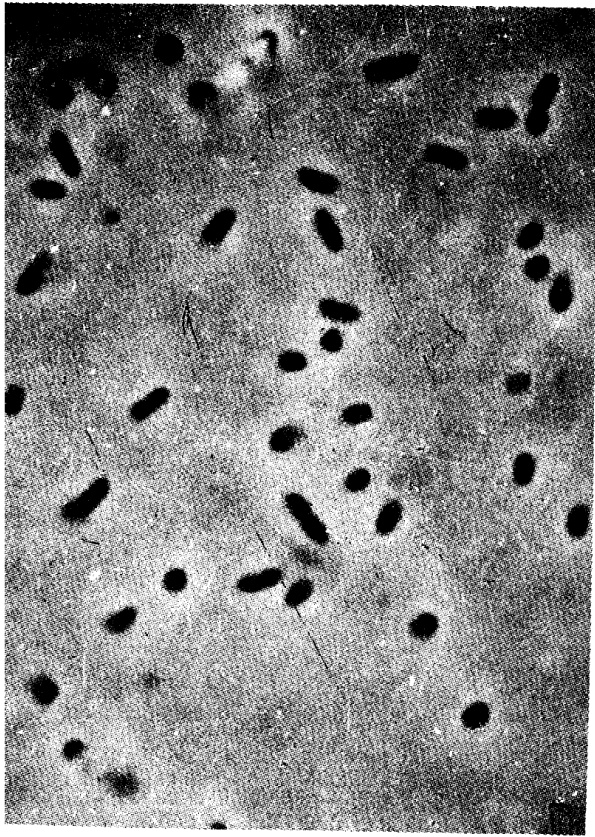
(八)分離自葉肉組織的原生質體，其體內的胞器（organelles），如葉綠體仍極完整。

(九)原生質體可以被誘導發生融合現象。

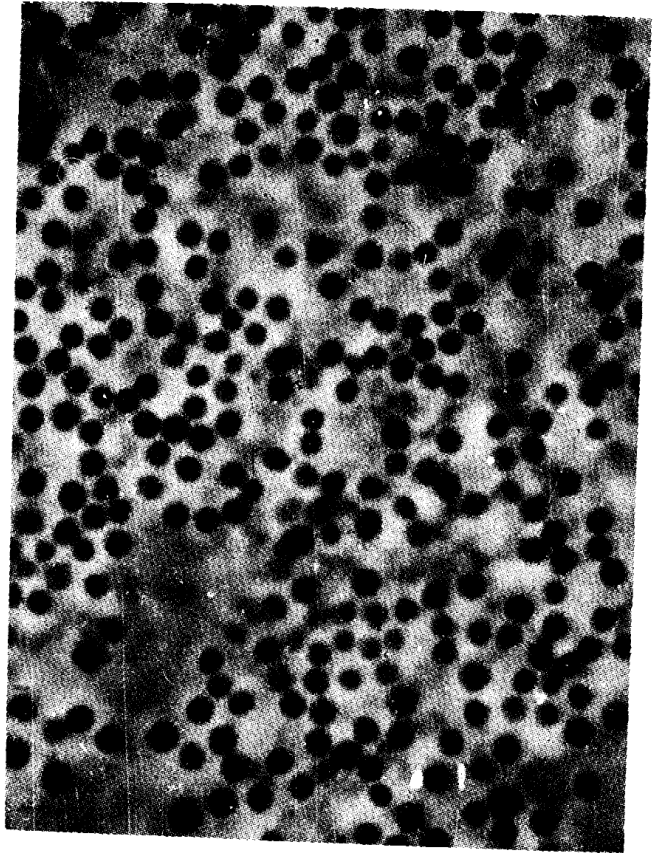
(十)融合的原生質體的數目不限于兩個，可由2個至多個原生質體融合在一起，融合的原生質體不易分開。

七、今後的研討計劃：

本實驗順利的分離到大量的原生質體，並能誘導高等植物的原生質體發生融合現象，故希望能繼續研究，找出一適當的培養條件使原生質體能分裂、生長，或有機會長大成一顆植物體，以利用原生質體研究基因重組及體細胞雜交，作為育種的新工具。



圖一 放大 4,000 倍



圖二 放大 4,000 倍



圖三 放大 80,000 倍

圖四 放大 40,000 倍 ▶

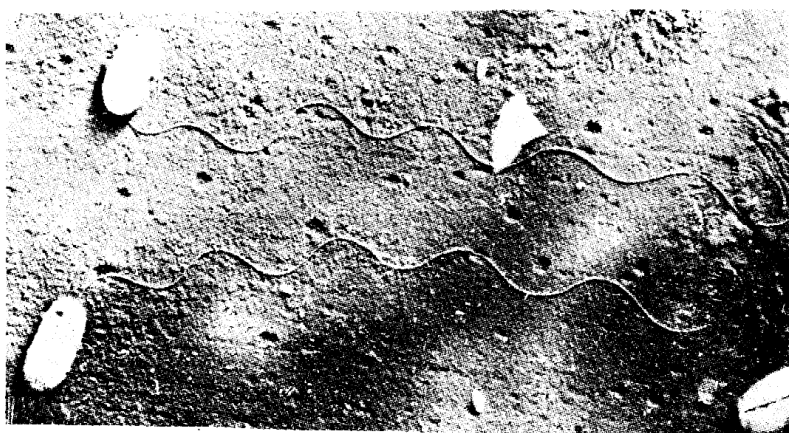


◀ 圖五

放大 24,000 倍

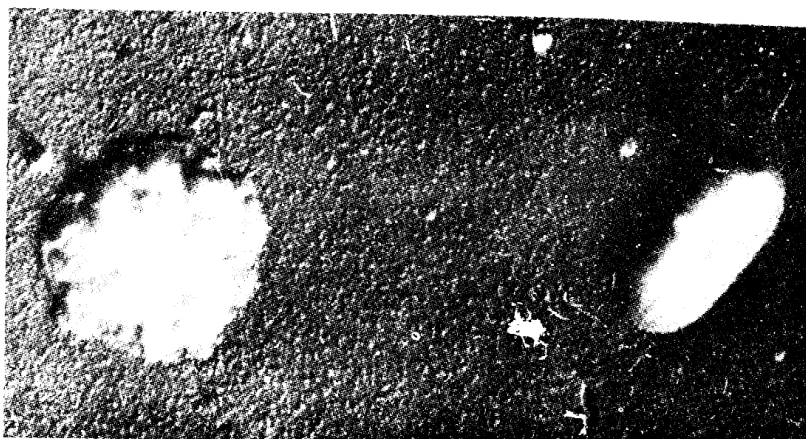
圖六

放大 12,000 倍 ▶



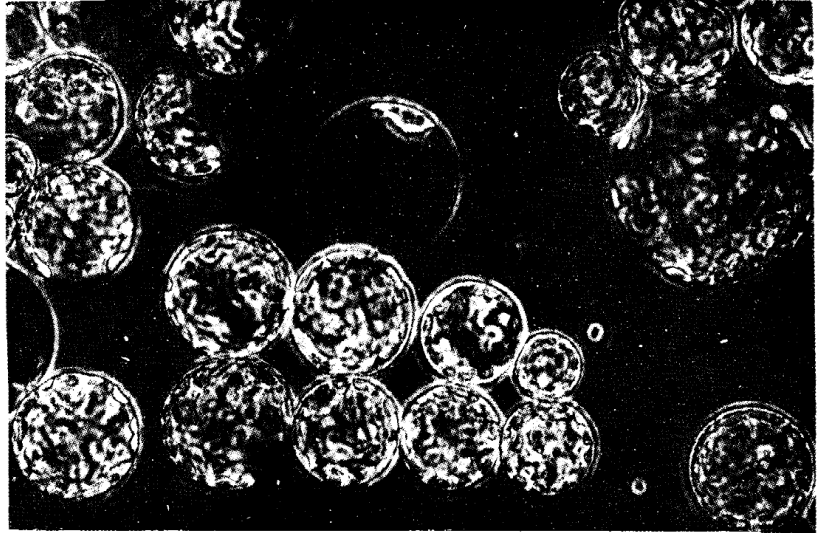
◀ 圖七

放大 32,000 倍





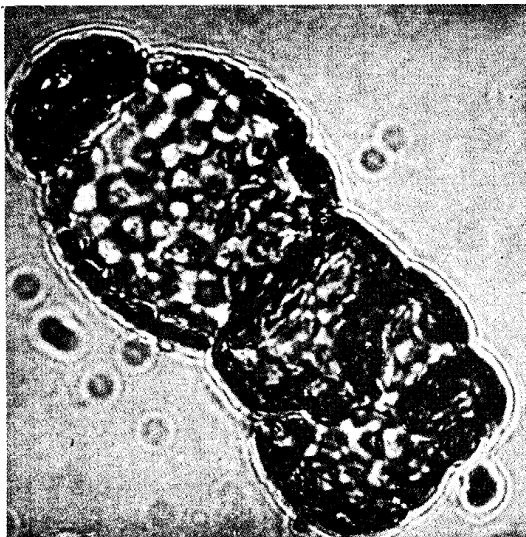
↑ 圖八 放大 1,500 倍



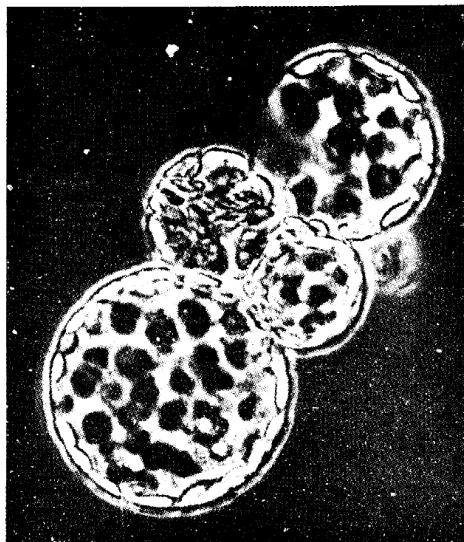
↑ 圖九 放大 2,100 倍



← 圖十 放大 2,500 倍



↑ 圖十一 放大 3,700 倍



↑ 圖十二 放大 4,500 倍