

# 应用 percoll 密度梯度离心分离不同类型的花粉粒

黄大年 谷明光 颜秋生 张雪琴

(中国科学院遗传研究所,北京)

密度梯度离心方法是纯化生物大分子、分离细胞和细胞亚结构(核、叶绿体、线粒体)以及病毒的一种有用技术,在细胞生物学和分子生物学的研究中,它起了很重要的作用。曾经使用过的密度梯度离心介质[如蔗糖、血清白蛋白、Ficoll(聚蔗糖)等],都不是理想的介质。近年来新发展的梯度离心介质——percoll 是目前理想的介质。它具有渗透性低、不穿透细胞、粘度低、密度高和无毒害等优点。

percoll 密度梯度离心成功地用于动物细胞及其细胞器的分离。已经纯化了人血液细胞、骨髓细胞、红血球细胞、白血球细胞、淋巴细胞、肝细胞等十余种动物细胞<sup>[2,3,7,8]</sup>,同时也开始利用这一技术分离和纯化植物原生质体、核、叶绿体和线粒体,为了提高花粉粒离体培养的诱导频率,借助 percoll 密度梯度离心方法,分离筛选经过预培养的花药中具有成胚的花粉粒或分离花粉粒中“两型性”小孢子已获得初步结果<sup>[4,9]</sup>。

## 材料和方法

试验选用烟草 (*Nicotiana tabacum*)、玉米 (*Zea mays*)、黑麦 (*Secale cereale*) 和小麦 (*Triticum aestivum*) 的不同发育时期(单核—双核)的新鲜花粉以及经过预处理和预培养的烟草花粉为材料。在盛有 0.25M 蔗糖溶液的小玻皿中,用玻棒轻轻挤压药壁使花粉溢出,去除药壁后,经过 400 目镍丝网过滤,花粉最终悬浮在 1ml 0.25 M 蔗糖液中,在 4°C 冰箱中保存,待作梯度的样品液。

密度梯度离心的操作程序是:

1. 按 9 份体积 percoll (pharmacia, Uppsala)

和 1 份体积 2.5 M 蔗糖溶液混合配制等渗的 percoll 母液 (PIS)。

2. 0.25 M 蔗糖溶液和上述等渗 percoll 母液按表 1 的比例混合,配成密度为 1.042 g/cm<sup>3</sup> 到 1.135g/cm<sup>3</sup> 8 种不连续密度工作液。

表 1 配制不连续 percoll 密度工作液

工作液号	1	2	3	4	5	6	7	8
PIS (ml)	1	2	3	4	5	6	7	8
0.25 M 蔗糖(ml)	9	8	7	6	5	4	3	2
$\rho(g/cm^3)$	1.042	1.055	1.068	1.082	1.095	1.108	1.122	1.135

3. 在 15 ml 离心管中铺设不连续梯度。用 1ml 注射器分别吸取各 1ml 梯度工作液,从高密度 (1.135 g/cm<sup>3</sup>) 到低密度 (1.042 g/cm<sup>3</sup>),由管底向上一层一层十分小心地依次叠加,操作时绝对防止冲动两层梯度工作液之间的界面。最终形成 7 层清晰可见的界面层,8ml 不连续梯度溶液。

4. 将 0.5ml 制备好的花粉悬液小心地加在一不连续梯度液的最上层 (1.042 g/cm<sup>3</sup>)。

5. 国产 800 型台式离心机 88×g 离心 10 分钟。

6. 离心后花粉被分配到不同密度层上(图 1),用注射器从上向下分层收集各层花粉,分别装入小离心管中,加 2—3 倍体积 0.25M 蔗糖溶液,混匀后再次离心除去 percoll。每一管中加入 0.5ml 培养液,转入小平皿中密封在 26—

Huang Danian et al.: Separation of Plant Pollen in Different Phases of Development by Density Gradient Centrifugation of Percoll

28℃ 培养, 也可以用 3:1 酒精-冰醋酸固定液固定 12—24 小时, 用丙酸苏木精染色观察各层花粉粒的发育状态<sup>[1]</sup>。

## 结 果

在铺好的 percoll 梯度液的离心管内加上花粉悬液后, 一般按  $88 \times g$  离心 10 分钟分离各种作物花粉。我们试验的烟草、玉米、黑麦和小麦等花粉, 经密度梯度离心后, 分别都把它们分成 4—7 层(图 1)。每一层花粉都位于两种密度的界面上, 密度最小的花粉粒分布在最上层, 密度大的花粉分布在底部各层上。根据我们多次试验结果发现, 花粉在密度梯度上分布的变化, 与取样时花粉发育的程度密切相关。在我们的烟草花粉分离试验中, 获得 4 层花粉, 从分层收集的大量烟草花粉经染色镜检可以看到, 单核花粉主要集中在第一密度层上(样品— $1.042g/cm^3$  界面)[图版 I, 1], 约占 64%, 双核花粉占 26%, 还有少数空瘪花粉(表 2)。双核花粉集中地分布在第二密度层 ( $1.042-1.055g/cm^3$ ) 上(图版 I, 2), 约占 64%, 单核花粉占 18%, 也还有一些空瘪花粉。第三、四密度层随着 percoll 密度的增加, 充满淀粉粒的花粉也增多。

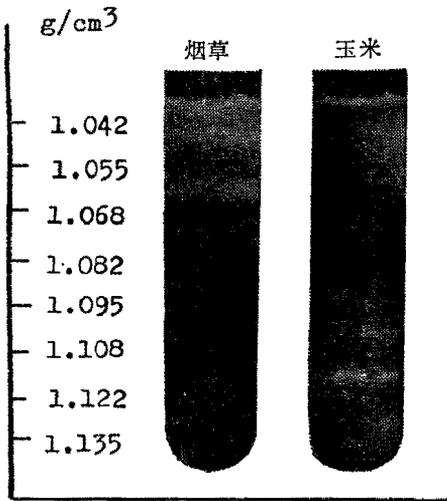


图 1 在两种密度的界面上形成的花粉层

用 percoll 分离经预处理的烟草花粉(花药先在  $4^\circ C$  低温处理 3 天, 然后把花药在液体培养基中预培养 3 天)时, 发现均等分裂和非均等

表 2 percoll 不连续密度梯度离心分离烟草新鲜花粉粒<sup>1)</sup>

花粉层	总花粉数	单核花粉		双核花粉		空花粉	
		数	%	数	%	数	%
第一花粉层	425	276	64	110	26	39	10
第二花粉层	211	38	18	135	64	38	18

1)  $88 \times g$  离心 10 分钟。

分裂的花粉在各密度层上的分布是不同的, 经染色镜检其结果列于表 3 中。在 393 粒均等分裂的花粉中, 处在第一、二、三和四花粉层上分别为 5%、75%、18% 和 16%。均等分裂花粉密集在第二花粉层上。然而, 非均等分裂花粉的密度约高于均等分裂花粉。由表 3 可见它主要分配在第四花粉层上。percoll 密度梯度离心机机械分离均等分裂花粉和非均等分裂花粉, 可以有选择地区分开两种不同发育途径的花粉粒。

表 3 percoll 不连续密度梯度离心分离预处理烟草花粉, 其均等分裂和非均等分裂花粉在各层上的分布

花粉类型	总花粉数	第一花粉层		第二花粉层		第三花粉层		第四花粉层	
		数	%	数	%	数	%	数	%
均等分裂花粉	393	2	5	296	75	55	18	40	16
非均等分裂花粉	177	2	1	51	28	45	25	79	44

表 4 说明, 经过低温 ( $4^\circ C$ ) 预处理 3 天, 又经液体培养基预培养 3 天的烟草花粉, 用 percoll 密度梯度离心后分别收集各层花粉将其直接培养在 Nitsch 烟草液体培养液中<sup>[6]</sup>, 经一个月培养后的各层发育状况如下: 第一花粉层花粉粒密度较稀, 绝大部分是空瘪花粉和未启动并尚未形成淀粉粒花粉。第二花粉层的花粉经过一个月培养后, 可以直接观察到形成了许多细胞数目不等的多细胞花粉团, 从 2 个细胞到 20 多个细胞团的花粉粒星罗棋布(图版 I, 3、4)。表 4 中多细胞团花粉百分率不包括双核和多核花粉粒。同时, 该层也开始出现相当数量的含有

表 4 经 percoll 密度梯度分离的各层烟草花粉培养一个月后的状况

花粉层	总花粉数	多细胞团花粉		形成淀粉粒花粉		其它(未启动、液胞化、空瘪)	
		数	%	数	%	数	%
第一花粉层	336	0	0	2	1	334	99
第二花粉层	718	20	2	96	15	602	83
第三花粉层	640	0	0	87	14	553	86
第四花粉层	637	0	0	71	12	566	88

淀粉粒花粉和液胞化及空胞花粉。此外,也有极少数花粉粒萌发长出长的花粉管。二次重复试验结果一致表明,多细胞团花粉粒只分布在来源于第二花粉层中,来源于其他各层的花粉均未发现过。第三花粉层上除了含有形成淀粉粒花粉粒外,多为细胞内含物丰富、密度较高的液胞化花粉。第四花粉层上花粉粒不仅形成淀粉粒而且花粉粒的体积也明显地增大。

## 讨 论

许多文献报道 percoll 密度梯度离心技术成功地分离动植物细胞及其细胞器,此方法简便迅速,其效果比蔗糖和 Ficoll (聚蔗糖) 等密度梯度离心介质均佳。我们的试验结果可以将植物不同发育类型的新鲜花粉分离在不同密度梯度层上,把取样的花粉群体中处在不同发育阶段的单核和双核以及累积大量淀粉粒的花粉细胞大体上分开。目前第一花粉层上的单核花粉和第二花粉层上的双核花粉虽然各占 60% 左右,但只要改进技术后其同步性花粉百分数还可以相应提高。

新鲜烟草花粉处于单核和双核期尚未形成淀粉粒之前,这时它们的区别在核的数目多少不同,此时细胞核对细胞密度起很大作用,

percoll 密度梯度离心可以依据核的变化将两者分开。随着花粉内液泡的变化和淀粉粒形成,细胞密度不仅与核的变化有关,而且还与其他内含物的消长有关。因此,percoll 分离经过预处理的花粉粒,其单核和双核花粉以及其他各类花粉的分布情况不同于新鲜花粉粒的分布。

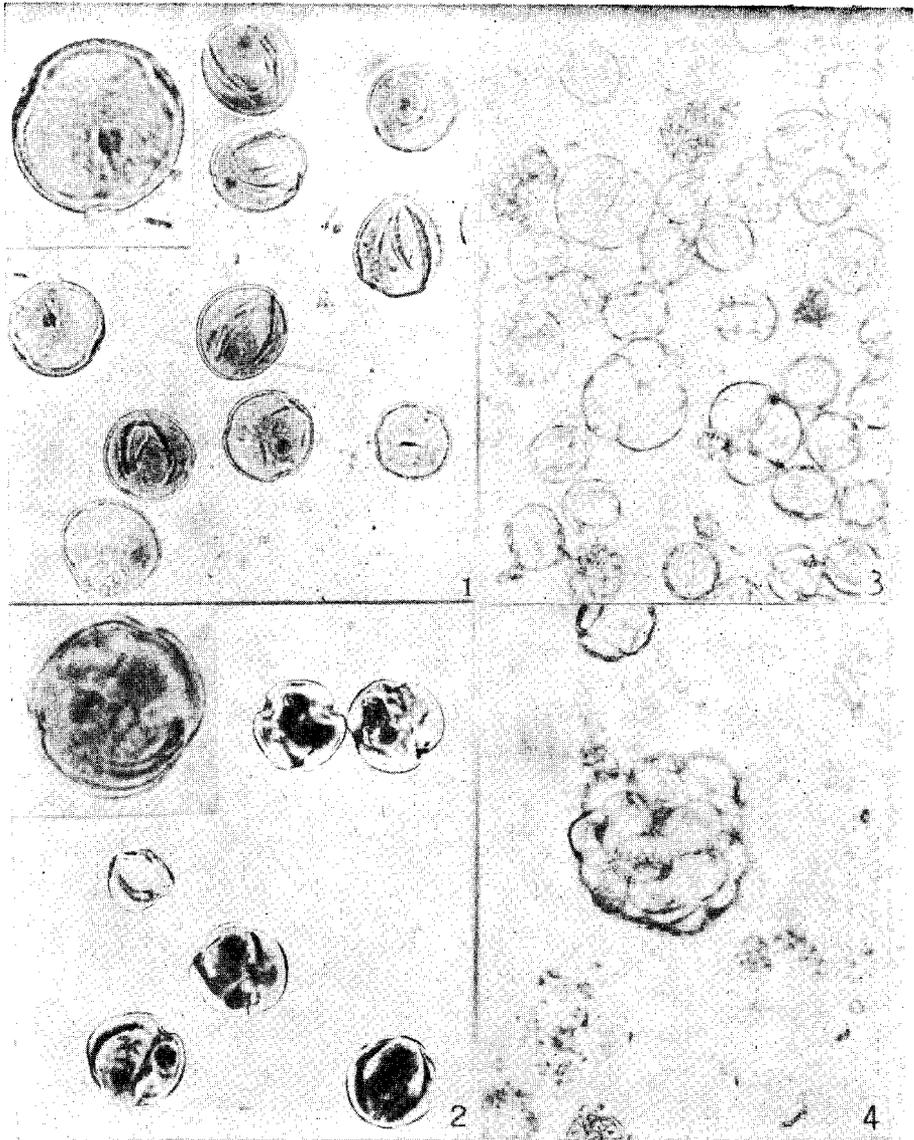
低温处理过的烟草花粉显著增加均等分裂花粉数,它是提高花粉诱导频率的一种措施。percoll 密度梯度离心又可以将均等分裂和非均等分裂以及单核花粉区分开来,均等分裂花粉高度集中地分配在第二花粉层上,并发育成多细胞团的花粉粒。因而,只要收集并培养第二花粉层上的花粉,就可以获得许多由均等分裂花粉进一步发育的多细胞团结构细胞。percoll 密度梯度离心实际上淘汰了大量不能发育成愈伤组织(或胚状体)的花粉粒,筛选出花粉中具有成胚的花粉粒,既节省了人力和物力,又提高了效率。可望利用 percoll 密度梯度离心技术作为分离筛选植物突变细胞,原生质体融合细胞,染色体加倍细胞和微型小孢子等的手段具有一定的价值。

## 参 考 文 献

- [1] 李正理等: 1978. 植物杂志, 3: 18—19.
- [2] Bont, W. S. et al.: 1979. *J. of Immunological Methods*, 29(1): 1—16.
- [3] Catsimpoolasm, N.: 1977. *Methods of Cell Separation*, (1): 25—61.
- [4] Heberle-Bors, E. et al.: 1980. *Naturwissenschaften*, 67: 311.
- [5] Jackson, C.: 1979. *Plant Physiol.*, 64(1): 150—153.
- [6] Nitsch, C.: 1974. *C. R. Acad Sci., Paris. T.*, 278: 1031—1034.
- [7] Segal, A. W. et al.: 1980. *J. of Immunological Methods*, 32(3): 209—214.
- [8] Ulmer, A. J. et al.: 1979: *ibid.*, 30(1): 1—10.
- [9] Wernicke, W. et al.: 1978. *Naturwissenschaften*, 65: 540.

更 正

《遗传》4卷6期第31页脚注1)“上海农科院”应为“上海农学院”。



1. percoll 密度梯度离心分离新鲜烟草花粉,从第一花粉层收集的单核花粉粒。2. percoll 密度梯度离心分离新鲜烟草花粉,从第二花粉层收集的双核花粉粒。3. percoll 密度梯度离心分离预处理过的烟草花粉,从第二花粉层细胞经一个月培养后形成多细胞团花粉粒。4. 同 3。