

# 拟南芥悬浮细胞系的玻璃化法超低温保存

胡明珏, 王君晖\*

(浙江大学生命科学学院, 杭州 310028)

**摘要:** 悬浮培养细胞系是植物生理生化研究的好材料之一。为了保持细胞系的遗传稳定性, 需要采用超低温保存技术。玻璃化法是一种不用程序降温仪的超低温保存技术。本文报道了从模式植物拟南芥建立悬浮细胞系并对其进行玻璃化法超低温研究。细胞经过合理的预培养处理和保护剂处理, 直接投入液氮贮存。复温后的细胞能恢复生长, 恢复生长的细胞保持着植株再生能力。国外, 拟南芥悬浮细胞系的程序降温法保存和包埋脱水法保存已经报道, 玻璃化法保存尚未见报道。

**关键词:** 拟南芥 悬浮细胞 超低温保存 玻璃化

中图分类号: Q25, Q945 文献标识码: A 文章编号: 0253-9977(2004)01-81-04

拟南芥是一种模式植物, 在植物生物学研究中广泛采用。悬浮培养细胞系是植物生理生化研究的好材料, 这在拟南芥中也如此<sup>[1-3]</sup>。在细胞系的长期继代过程中, 往往会发生遗传变异, 使细胞失去形态发生能力和原有的科研价值<sup>[1-3]</sup>。因此, 需要有效的方法保存悬浮细胞系。液氮超低温保存是最常用的方法之一。1990年, 拟南芥悬浮细胞的程序降温法超低温保存被首次报道, 但该文没有说明复温后恢复生长的细胞能否再生植株<sup>[2]</sup>。Ribeiro等对程序降温法保存拟南芥悬浮细胞系作了进一步的研究, 并从冻后恢复生长的细胞再生植株<sup>[3]</sup>。2000年, Bachir等将包埋脱水法应用于拟南芥悬浮细胞的超低温冻存, 获得了较高的存活率<sup>[1]</sup>。

植物细胞的玻璃化法超低温保存技术是从1989年发展起来的<sup>[4,5]</sup>。目前, 采用该方法已保存了油菜、脐橙、芦笋、水稻、烟草、草莓、大麦和胡萝卜等10多种植物材料的悬浮细胞系<sup>[6-10]</sup>。本文用玻璃化法超低温保存拟南芥悬浮细胞系, 并成功地从复温后恢复生长的细胞获得了再生植株。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验中所用的拟南芥基因型为 Wassilewskija (WS)。

### 1.2 拟南芥悬浮细胞系的建立

灭菌后的种子在 B<sub>5</sub> 培养基上萌发, 培养基中含有 1% 蔗糖和 1% 琼脂, 不加任何激素, pH 5.8。

培养条件为 25℃, 16/8h 光/暗培养。两星期后取出小苗, 切成 2 mm 左右的小段, 放在愈伤组织诱导培养基上。诱导培养基是在 B<sub>5</sub> 培养基的基础上添加 1 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L KT, 2% 葡萄糖和 1% agar。在上述培养室条件下, 3 天后就可看到愈伤组织生成。一个月后挑取颜色鲜艳, 生长快速, 结构松散的愈伤组织进行继代。继代大约每月一次。

取继代后 15 天的大约 2g 左右的愈伤组织, 投入 250ml 的三角摇瓶中, 加入约 50 ml 的悬浮培养液, 在摇床上以 100 rpm 的转速在黑暗中振荡培养。悬浮培养液为 MS 液体培养基加 1 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L KT, 3% 蔗糖, 此培养液代号为 MS-1.0。以后每隔 7d 继代一次, 一个月后就可以得到一个生长快速, 分散均匀的悬浮细胞系。

### 1.3 玻璃化法超低温保存

玻璃化冻存法的主要步骤按王君晖等在水稻中采用的方法加以改进<sup>[6, 8, 10]</sup>。

**1.3.1 双预培养:** 取指数生长期的悬浮细胞(继代后 3 天), 用下列方法预培养。P1: 在 MS-1.0 + 6% 蔗糖培养液中培养 3 天。P2: 在 MS-1.0 + 0.4 mol/L 山梨醇培养液中培养 1 天。P1+P2: 细胞在 MS-1.0 + 6% 蔗糖中培养 3 天转移入 MS-1.0 + 0.4 mol/L 山梨醇培养液中培养 1 天。

收稿日期: 2003-06-27; 修回日期: 2003-10-31

基金项目: 国家自然科学基金 39900012 资助。

\* 通讯作者, E-mail: junhuiwang@zju.edu.cn

1.3.2 过渡: 预培养后的细胞转移入2ml的冷冻管中, 每管含约0.15g细胞。加入25%PVS2, 在0℃过渡不同时间。PVS2是一种玻璃化保护剂, 由MS-1.0+30%甘油, 15%乙二醇, 15%DMSO, 0.4 mol/L蔗糖混合而成<sup>[11]</sup>, pH 5.8。

1.3.3 脱水: 移去25%PVS2, 马上加入100%的PVS2。在0℃脱水不同时间。

1.3.4 冷冻: 将冷冻管迅速投入液氮灌中。细胞在液氮中至少保存24小时以上。

1.3.5 复温: 从液氮中将冷冻管取出, 马上投入37℃水浴中复温。待冷冻管中100%PVS2完全融化, 立即将冷冻管从水浴锅中取出。

1.3.6 洗涤: 吸去100%PVS2, 加入MS-1.0+1.2 mol/L山梨醇溶液, 室温下洗涤20分钟; 吸去MS-1.0+1.2 mol/L山梨醇溶液, 加入MS-1.0+0.4 mol/L山梨醇溶液。

#### 1.4 细胞活性的测定

采用TTC(triphenyl tetrazolium chloride)法检测细胞活性<sup>[12]</sup>。也用FDA-PI双色荧光显微技术观测细胞活性情况<sup>[13]</sup>。

#### 1.5 植株再生

经过复温和洗涤的细胞, 先恢复生长2周, 再转移到再生培养基MS+5.0 mg/L Zea + 3%琼脂上诱导小芽产生。将这样的小芽从愈伤组织中分离出来, 转移到MS + 3%琼脂培养基上以诱导小苗长大。

## 2 结果与分析

### 2.1 预培养

在拟南芥悬浮细胞的玻璃化法超低温保存中, 预培养是一个重要的步骤。比较对照细胞和预培养后的细胞, 前者存活率远远低于后者( $P < 0.05$ )。而在P1+P2双预培养之后, 悬浮细胞存活率达到了最高值( $P < 0.01$ )。另外, 由表1还可看出, 随着预培养方式的不同, 细胞的含水量也有显著的改变。

Ford 曾用程序降温法保存拟南芥悬浮细胞, 但未采用预培养处理<sup>[2]</sup>。Ribeiro 等在拟南芥悬浮细胞程序

表1 预培养对拟南芥悬浮细胞玻璃化法超低温保存中的影响

预培养方式	存活率 (%±SE)	细胞含水量 (%±SE)
对照	27.58±3.4	86.21±0.4
P2	45.11±5.2	78.34±0.3
P1	60.95±4.9	81.60±0.3
P1+P2	81.07±10.6	76.36±0.3

降温法保存中, 采用了单预培养处理, 悬浮细胞在含有0.25-1.0 mol/L甘露醇的培养液中预培养, 结果发现含0.63 mol/L甘露醇的培养液可以达到最大存活率<sup>[3]</sup>。本文采用了双预培养方法, 获得了较高的存活率, 这同我们在水稻悬浮细胞玻璃化超低温保存中的研究一致<sup>[6, 8, 10]</sup>。分析在预培养过程中脱水蛋白和可溶性糖的累积行为<sup>[14]</sup>, 是今后要做的工作之一。

### 2.2 过渡

在某些情况下, 过渡对于成功地进行玻璃化法超低温保存来说, 是一个重要的步骤。过渡中用较低浓度的玻璃化保护剂浸润细胞, 帮助提高玻璃化保护剂的渗透效果, 防止将细胞直接投入高浓度的玻璃化保护剂时造成的渗透伤害。但实际操作中是否需要过渡这一步骤还要根据细胞具体生理特性决定。对我们以前研究的水稻悬浮细胞来说, 过渡是有益的<sup>[2, 6, 15]</sup>。对于经过冷适应的黑麦原生质体来说, 过渡这一步骤就是可以省略的<sup>[15]</sup>。

在本试验体系下, 结果表明, 过渡对拟南芥悬浮细胞来说, 是一个可以省略的步骤。从图1可以看出, 经历不同过渡时间的细胞在存活率上没有明显的区别, 即使在不过渡条件下, 细胞存活率也可以达到38.38%。相反, 过渡时间的延长还可能造成细胞受渗透伤害。

### 2.3 脱水

对于玻璃化法超低温保存来说, 掌握合适的脱水时间是一个重要的因素。PVS2等玻璃化保护剂对提高细胞活性来说既有有益的一面, 又有有害的一面。一方面, 它们可以通过改变胞内水的物理特性, 如降低冰点, 减少冰晶生成的效率, 改变冰晶形态等来提高细胞存活率; 另一方面, 玻璃化保护剂本身是一种毒性物质, 它的作用时间过长又会

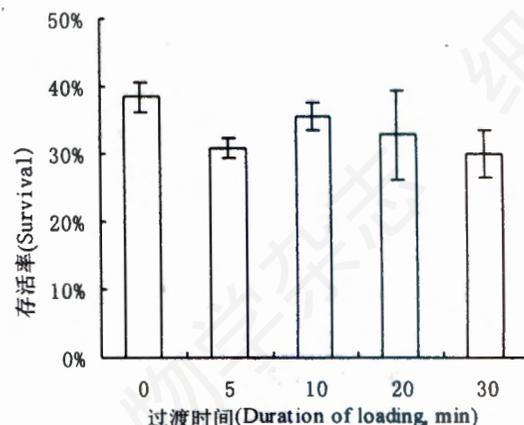


图1 室温下过渡不同时间对拟南芥细胞存活率影响

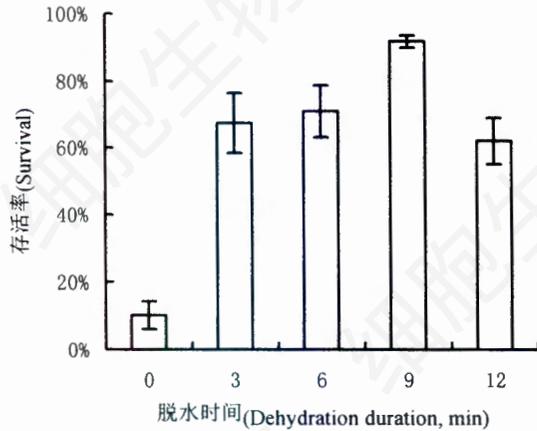


图2 在0℃下脱水不同时间对细胞存活率影响

对细胞造成毒害, 并使细胞过度脱水。因此, 合适的脱水时间要根据细胞膜特性, 细胞大小, 细胞的耐脱水性以及玻璃化保护剂对细胞的渗透性等要素来综合考虑。

据图2所示, 0℃下, 当拟南芥悬浮细胞脱水时间分别为0, 3, 6, 9, 12min时, 它的存活率分别为10.20%, 67.26%, 70.85%, 91.66%, 60.88%。在脱水时间为9min时, 细胞冻后活性明显高于其他脱水处理, 达到最高点( $P < 0.01$ )。证明对于拟南芥悬浮细胞来说, 脱水9min是比较合适的脱水时间。

#### 2.4 再生植株

拟南芥悬浮细胞在经过合适的玻璃化法超低温保存后获得了较高的细胞存活率。除了上面用TTC法检测细胞活性外, 还用FDA-PI双色荧光法检测细胞活性, 也显示出高的存活率(图3)。另外, 还对保存后的细胞进行生物学功能的直接试验。复温后的细胞恢复生长较快, 大约两天后, 细胞就开始增殖。两周后, 将恢复生长的细胞转移到分化培养基上, 1个月内, 即可得看到长出绿色的小芽或小植株。将这些小芽或小植株再转移到不加任何激素的培养基上, 一个月后即可得到再生苗(图4)。这一结果说明, 本试验所建立的玻璃化法保存参数是合理的。

#### 参 考 文 献

[1] BACHIRI Y, BAJON C, SAUVANET A, *et al.* Effect of osmotic stress on tolerance of air-drying and cryopreservation of *Arabidopsis thaliana* suspension [J]. *Protoplasma*, 2000, **214**: 227 - 243.

[2] FORD K G. Plant regeneration from *Arabidopsis thaliana*

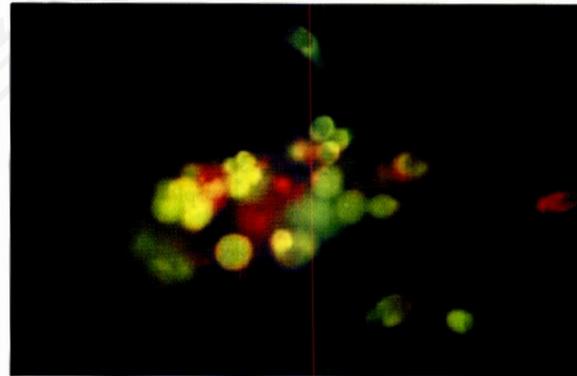


图3 拟南芥悬浮细胞的FDA-PI染色

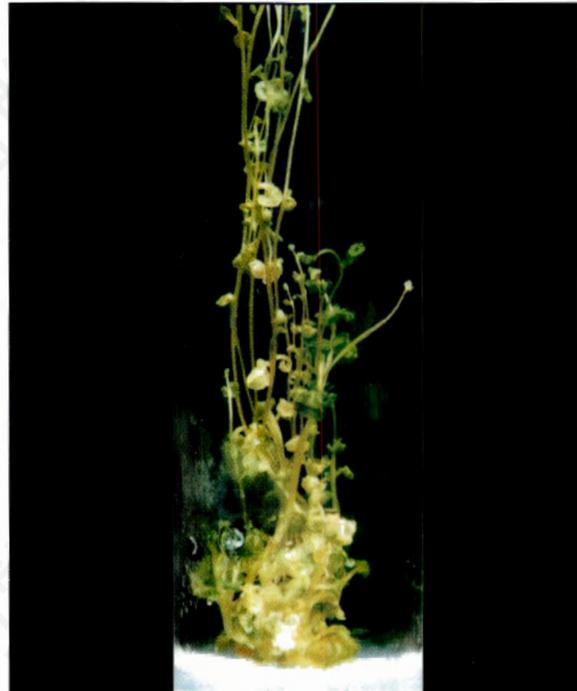


图4 拟南芥悬浮细胞超低温保存后得到的再生植株

protoplasts [J]. *Plant Cell Rep*, 1990, **8**: 534 - 537.

[3] RIBEIRO RCS, JEKKELE Z, MULLIGAN BJ, *et al.* Regeneration of fertile plants from cryopreserved cell suspensions of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh [J]. *Plant Sci*, 1996, **115**: 115 - 121.

[4] LANGIS R, SCHNABEL ED, STEPONKUS PL. Cryo-preservation of *Brassica campestris* L. cell suspensions by vitrification [J]. *Cryo Lett*, 1989, **10**: 421 - 428.

[5] URAGAMI A, SAKAI A, NAGAI M, *et al.* Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis*

- cryopreserved by vitrification [J]. *Plant Cell Rep*, 1989, **8**: 418 — 421.
- [6] 王君晖, 郑泳, 严庆丰等. 水稻胚性悬浮细胞的玻璃化法超低温保存和可育植株再生[J]. 科学通报, 1996, **41**: 2801 — 2804.
- [7] CHEN Y, WANG J-H. Cryopreservation of carrot (*Daucus carota* L.) cell suspensions and protoplasts by vitrification [J]. *Cryo Lett*, 2003, **24**: 57 — 64.
- [8] HUANG C-N, WANG J-H, YAN Q-S, *et al.* Plant regeneration from rice (*Oryza sativa* L.) embryogenic suspension cells cryopreserved by vitrification [J]. *Plant Cell Rep*, 1995, **14**: 730 — 734.
- [9] TSUKAZAKI H, MII M, TOKUHARA K, *et al.* Cryopreservation of Doritaenopsis suspension culture by vitrification [J]. *Plant Cell Rep*, 2000, **19**: 1160 — 1164.
- [10] WANG J-H, GE J-G, LIU F, HUANG C-N. Ultrastructural changes during cryopreservation of rice (*Oryza sativa* L.) embryogenic suspension cells by vitrification [J]. *Cryo Lett*, 1998, **19**: 49 — 54.
- [11] SAKAI A, KOBAYASHI S, OIYAMA I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Var *brasiliensis* Tanaka) by vitrification [J]. *Plant Cell Rep*, 1990, **9**: 30 — 33.
- [12] TOWILL L E, MAZUR P. Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as viability assay for plant tissue cultures [J]. *Can J Bot*, 1975, **53**: 1097 — 1102.
- [13] 黄纯农. 用FDA-PI双色荧光法鉴定原生质体活性[J]. 细胞生物学杂志, 1988, **10**: 133 — 135.
- [14] BIAN H W, WANG J H, LIN W Q, *et al.* Accumulation of soluble sugars, heat-stable proteins and dehydrins in cryopreservation of protocorm-like bodies of *Dendrobium candidum* by the air-drying method [J]. *J Plant Physiol*, 2002, **159**: 1139 — 1145.
- [15] LANGIS R, STEPONKUS P L. Cryopreservation of rye protoplasts by vitrification [J]. *Plant Physiol*, 1990, **92**: 666 — 671.

## Cryopreservation of Arabidopsis Cell Suspensions by Vitrification

HU Ming Jue, WANG Jun Hui\*

( College of Life Sciences, University of Zhejiang, Hangzhou 310028, China )

**Abstract:** Cell suspensions are valuable materials for plant physiology and biochemistry studies. To keep the genetic stability of plant cell suspensions, the cryopreservation technique is required. Vitrification is a method of cryopreservation without the usage of programmable freezers. In the present paper, cell suspensions from Arabidopsis, a model plant, were established and cryopreserved by vitrification. After suitable preculture and dehydration treatment, cells were quenched into liquid nitrogen directly. Thawed cells were able to recover, and recovered cells were able to regenerate plants. This is the first report of cryopreservation of Arabidopsis cell suspension cells by vitrification.

**Key words:** Arabidopsis Cell suspensions Cryopreservation Vitrification

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 39900012)

\*Corresponding author, E-mail: junhuiwang@zju.edu.cn