

磐南SSH講座「生物化学」実験
プロトプラストの単離と細胞融合

1. 目的 細胞壁を溶解することによりプロトプラストを作製・単離する。
異種植物のプロトプラストを接着・融合させ異種融合細胞を作製する。
2. 準備 (1) 材料 色素を持つ果皮 (ピーマン、パプリカ、シシトウ、レモン、ミカン、
グレープフルーツ、ニンジン、トマト、メロン等)
- (2) 器具 顕微鏡、実験箱 (ピンセット、カミソリ、スライドガラス、爪楊枝)、
マイクロメーター、パスツールピペット、減圧ビン、酵素液 (白チューブ)、
PEG液 (緑チューブ) 恒温槽、アスピレーターセット、減圧ビン
チューブ立て、チューブフロート

3. 方法 (1) 資料の準備

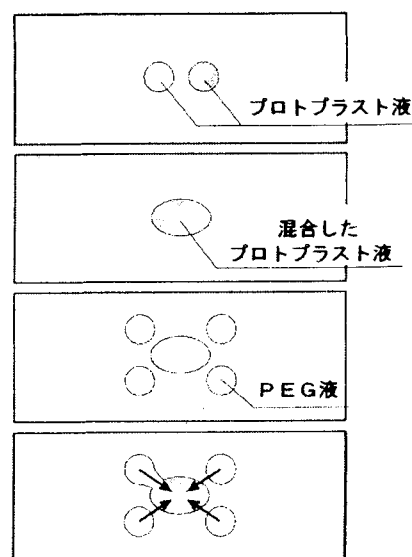
- ①植物材料を軽く水洗いし、カミソリで3~4mm角に切断する。
(切り取る部分は別紙参照)
- ②切片を10片ほど(5~8分目)酵素液の入った白チューブへ入れる。

(2) 減圧処理・酵素反応

- ①チューブのふたを開けたまま減圧ビンに立て、栓をしてゴム管をアスピレーターに取り付ける。
- ②スクリーコックが開いていることを確かめ、水を流し、その後、コックを閉める。
- ③資料から気泡が出てくるので、突沸しそうになったらコックを緩めて、調節する。
- ④気泡が出なくなったら(2~3分後) 先にコックを緩めてから水道を止める。
- ⑤チューブを取り出し、ふたを閉め、フロートにさして、30℃の恒温槽に浮かべる。
- ⑥15分間反応させる。その間、3分毎にフロートごとチューブを振ること。
- ⑦チューブをフロートから取り外し、1本ずつよく振り、資料片をピンセットで取り除いた後、ラックにさして5分間静置させる。

(3) プロトプラストの単離

- ①パスツールピペットでチューブ底から液を少量取り、一滴スライドガラスに置く。カバーガラスはかけない。
2種類滴下し、それぞれ観察する。(図1)
- ②スケッチ、色の識別、直径の計測等を記入する。



(4) プロトプラストの融合

- ①スライドガラス中央に、2種類のプロトプラスト液を1滴ずつ置き、爪楊枝で2つをよく混ぜる。(図2)
- ②混合液の周り4箇所PEG液を1滴ずつ置き(図3)糸を引くように爪楊枝で混合液に接触させ、静かに混合する。(図4)
- ③接着したプロトプラストを探し、スケッチ、色の識別等を記入する。
- ④時間経過とともに、接着プロトプラストは融合していく様子を確認する。

4. 結果

(1) プロトプラスト

材料 _____ 倍率 _____ × 直径 _____ μm 色 _____	材料 _____ 倍率 _____ × 直径 _____ μm 色 _____
--	--

(2) 細胞接着・融合

材料 _____ ×

酵素液の組成 (pH 5.8)	100ml 中の量
0.5 M マンニトール	9.1 g
1.0 % セルラーゼ・オノヅカ R-10	1.0 g
0.2 % マセロザイム R-10	0.2 g
0.01 % ペクトリアーゼ Y-23	10 mg
3.5 % KCl	3.5 g
0.5 % CaCl ₂	0.5 g

5. 考察

- (1) プロトプラストとは何か? _____
- (2) 材料に果皮を用いた理由 (利点) は何か? _____
- (3) 資料を酵素液に入れた後、減圧した理由は何か? _____
- (4) 酵素液中の各成分の働きは何か?
- ・セルラーゼ _____
 - ・マセロザイム、ペクチナーゼ _____
 - ・マンニトール _____
- (5) PEG (ポリエチレングリコール) の働きは何か? _____

6. 感想