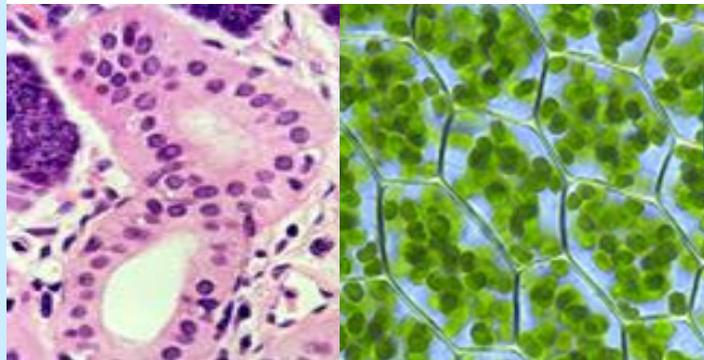
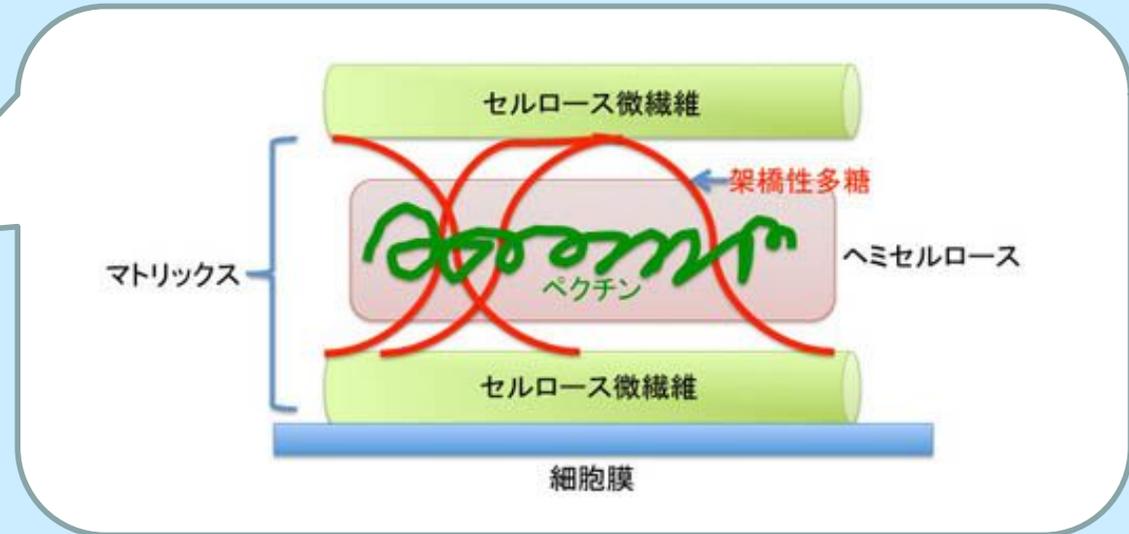
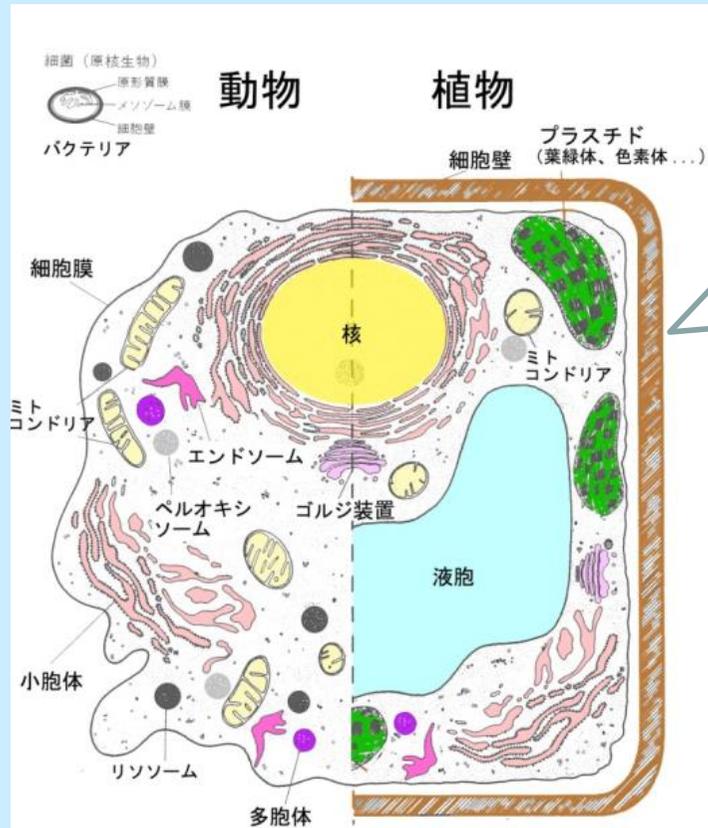


生物学実験

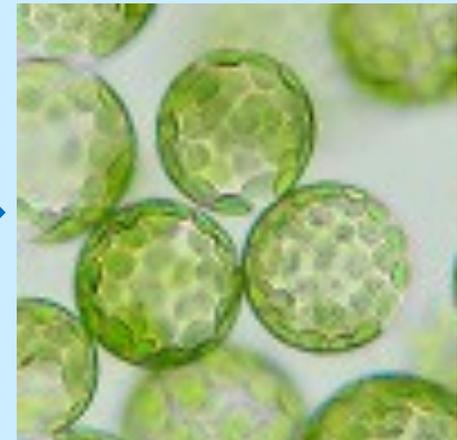
プロトプラストの単離

応用植物学コース 深山 浩

プロトプラストとは？



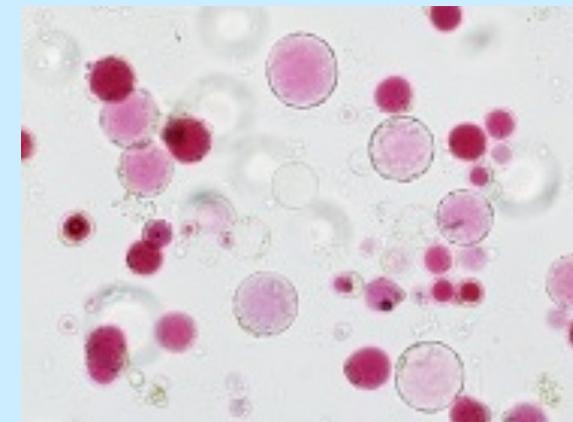
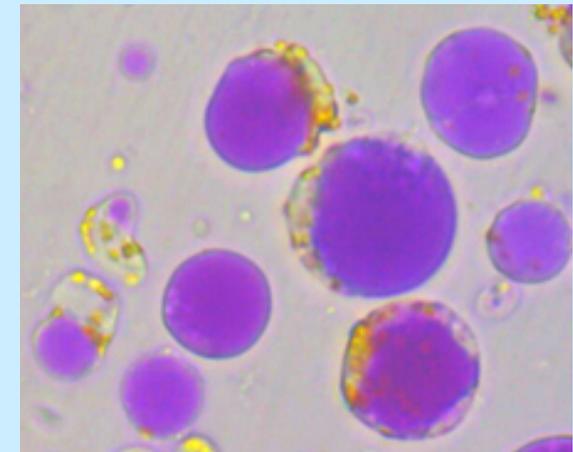
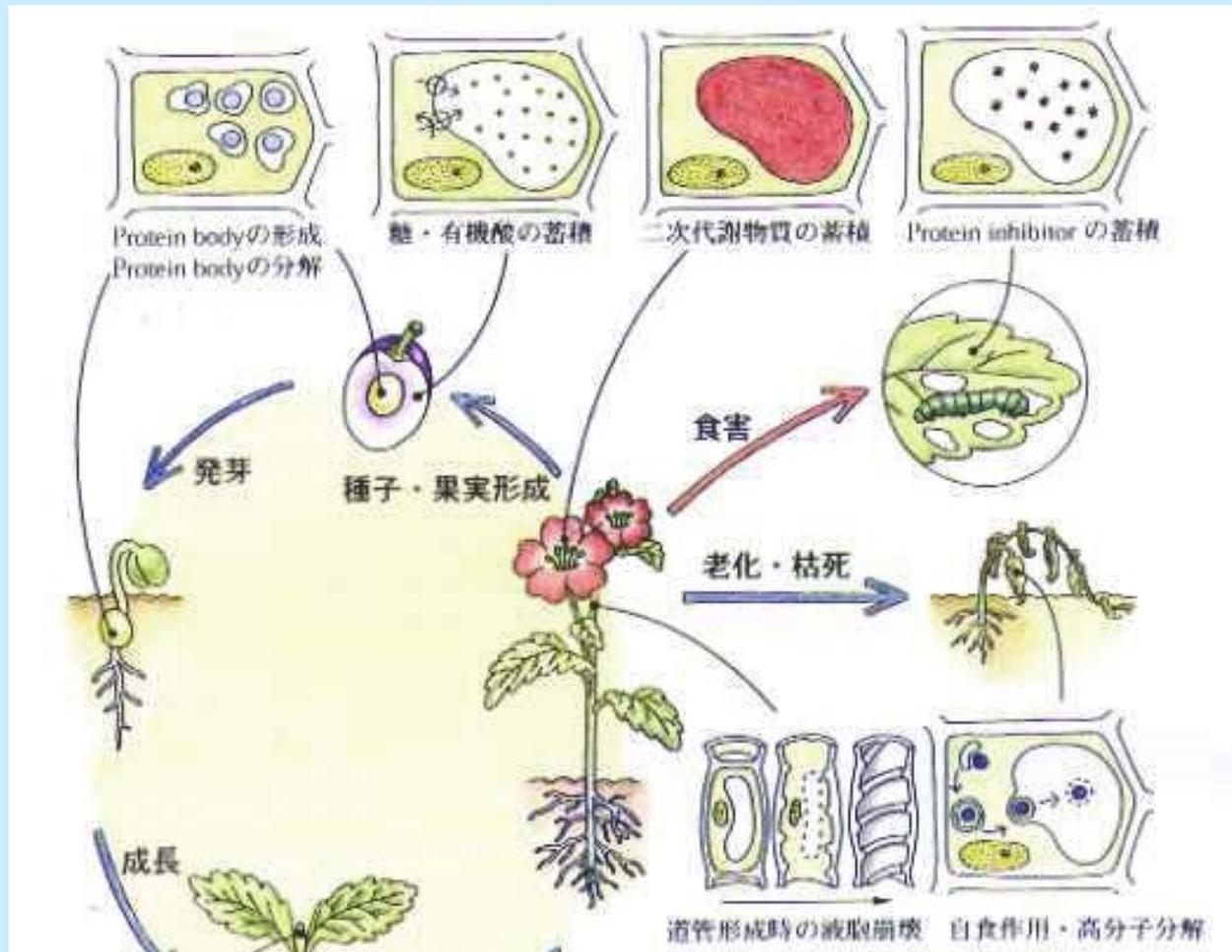
セルラーゼ
マセロザイム
ペクトリアーゼ
で細胞壁を分解



プロトプラスト

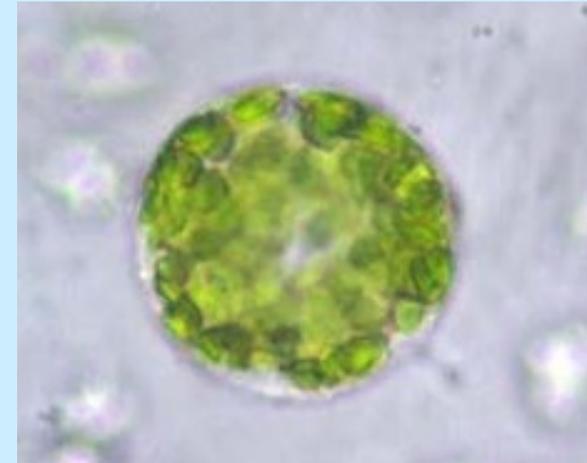
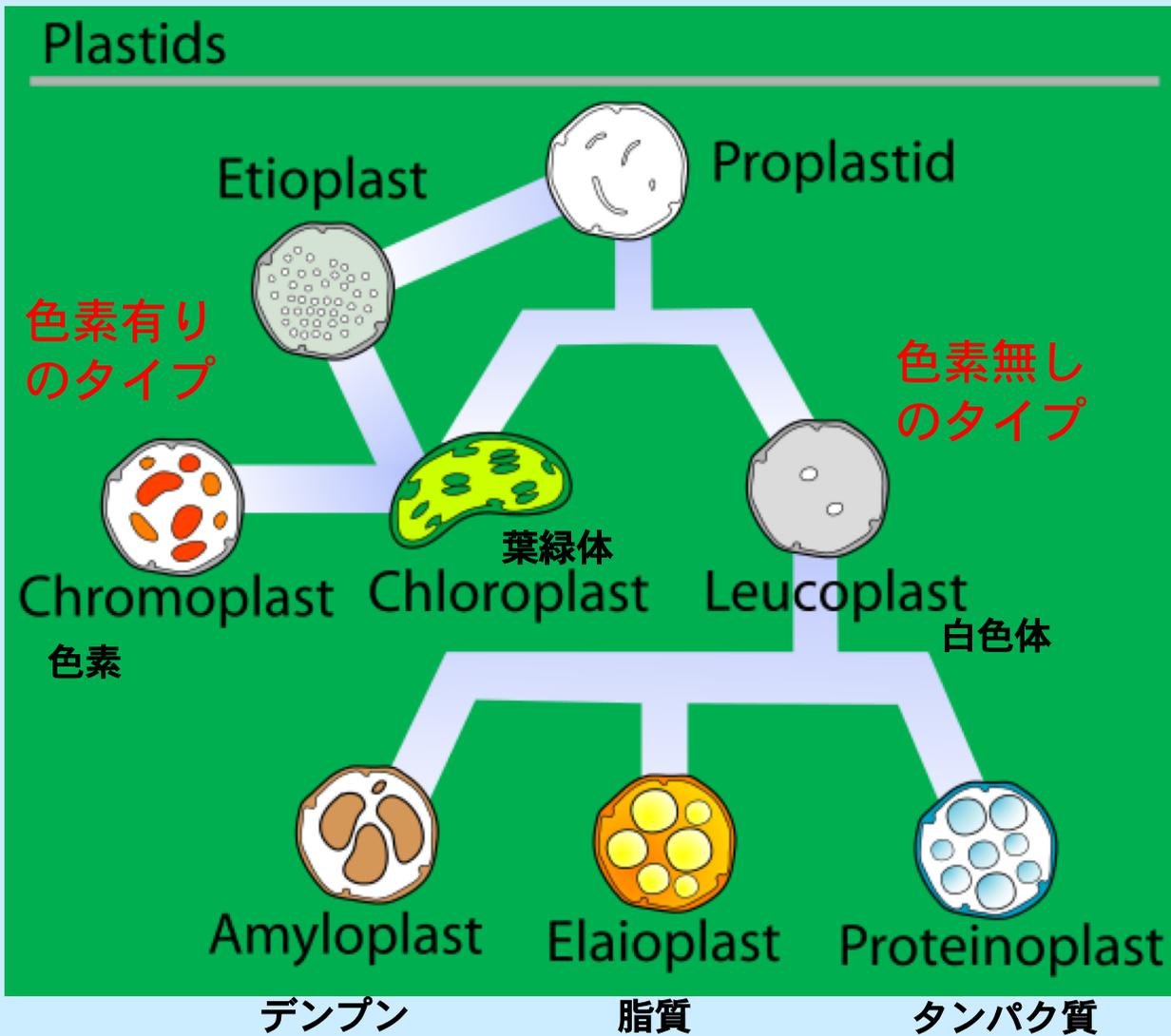
色素を蓄積したプロトプラストの観察 液胞型 or プラスチド型？

液胞



液胞型の場合，細胞全体に色が観察できる

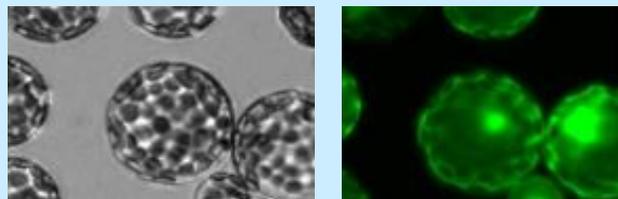
プラステド（色素体）



プラステド型の場合，顆粒状に色が観察できる

プロトプラストで何ができる？

- ・ 遺伝子導入・遺伝子の発現調節メカニズム
プロトプラストは遺伝子導入が簡単。レポーター遺伝子（GFP, ルシフェラーゼなど）を用いて発現調節メカニズムを調べる。



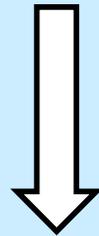
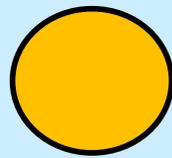
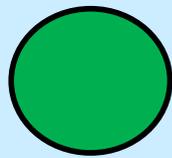
- ・ 細胞膜における物質の輸送
イオン, 糖, アミノ酸, タンパク質などの輸送メカニズムを調べる。
- ・ 細胞内小器官の単離
葉緑体, ミトコンドリアなどの細胞内小器官を単離する際の最初の段階としてプロトプラストが利用される。

・ 細胞融合

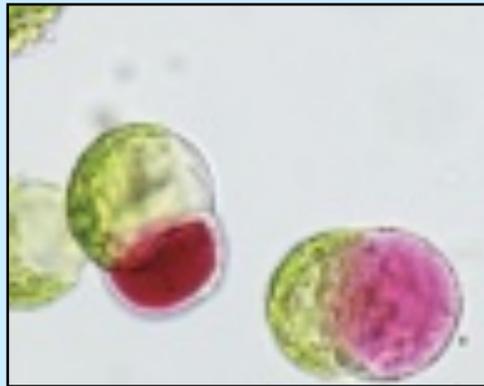
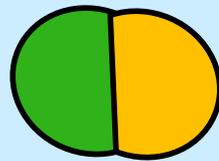
交雑が不可能な遠縁な種間での雑種を作成することが可能。

細胞融合によって新しい植物をつくる

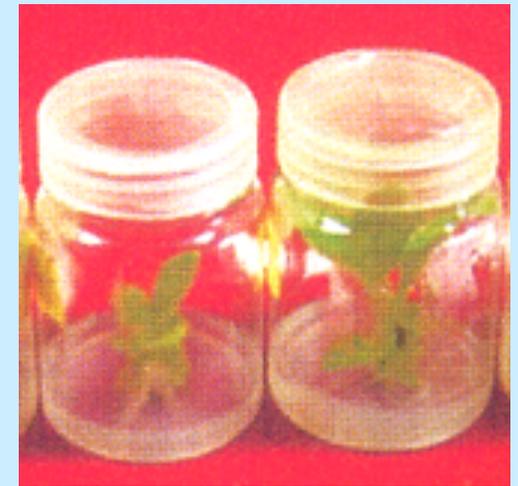
2種類の植物からプロトプラストを作成



PEG処理
電気ショック

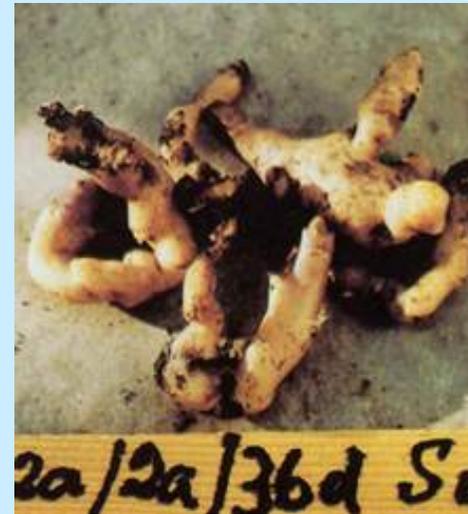


培養
再分化



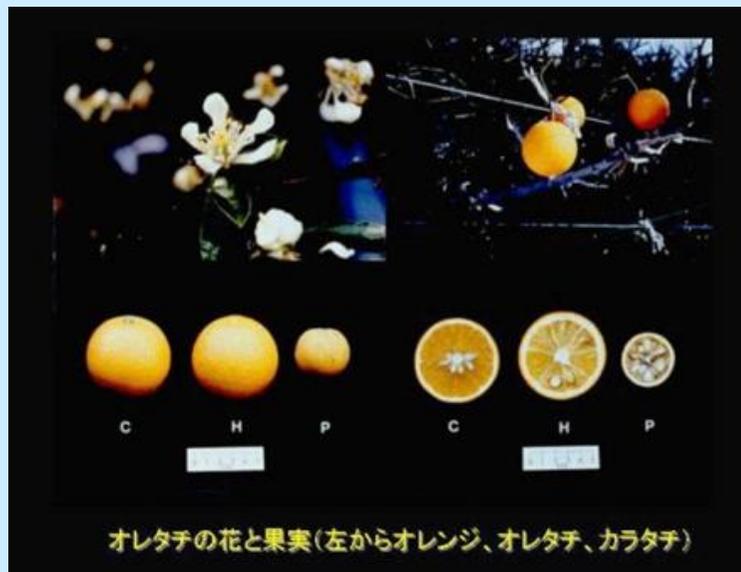
新しい植物の誕生！

ポテト+トマト=ポマト



オレンジ+カラタチ=オレタチ

ハクサイ+キャベツ=ハ克蘭



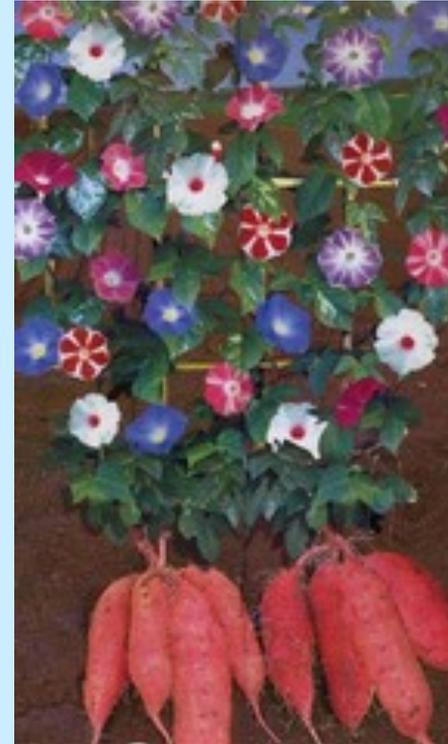
合体植物（これらは接ぎ木）

キャベツ+ダイコン=キャベコン



キャベツの連作障害の回避（JAいわて）

アサガオ+サツマイモ=アサガイモ



園芸店で販売

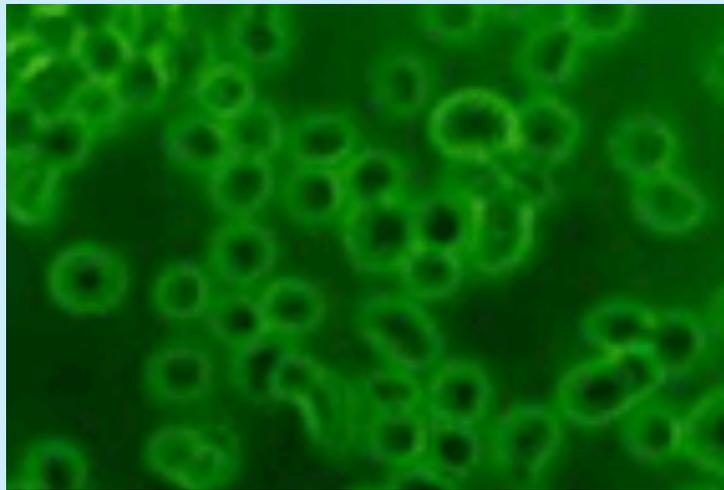
ハボコン，ケールコン，ブロッコンなどもある

動物では？



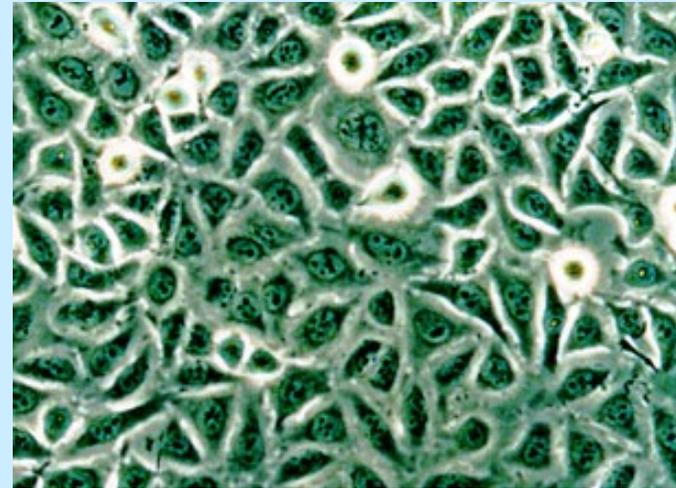
Henrietta Lacks (1920-1951)

ハイブリドーマ



- ・モノクローナル抗体の作成
(B細胞 + ミエローマ・ガン細胞)

HeLa細胞



- ・様々な細胞と融合でき不死化
(タバコ細胞でも融合可能)
- ・ガン, ポリオなど病気の研究
- ・細胞周期の研究

実験の概要・実験手順

実験1：プロトプラストを観察

花びらや葉、果実など色素を蓄積している細胞からプロトプラストを作成し顕微鏡観察。

- ・色素の蓄積が液胞型かプラスト型か？
 - ・どの植物のプロトプラストか？
- を判定

実験2：細胞接着・融合

2種類のプロトプラストを使って細胞融合

- ・細胞融合で何ができるか？

1) 酵素液の調製

1. 50 mLビーカーに下記の試薬を入れる.

マンニトール (0.5 M)	4.6 g
セルラーゼ・オノズカ R-10	0.5 g
マセロザイム R-10	0.1 g
ペクトリアーゼ Y-23	5 mg
KCl (3.5%)	1.75 g
CaCl ₂ (0.5%)	0.25 g

2. 40-45mLの蒸留水を加えスターラーを使って溶かす。

3. pHメーターでpH 5.8 に調整する。

4. メスシリンダーで50mLにメスアップ。



2) 植物材料を3 mm角に切断 (10-15個程度)

アロエ：透明なゲル状の部分を取り除いた表皮



レモン：白い部分を取り除いた果皮



赤ピーマン：果肉と果皮



赤タマネギ：白い部分を取り除いた赤い表皮



おすすめ：アロエ、レモン、ニンジン、パプリカ、ピーマン、ペチュニア、カーネーション

10種類選んで切断したサンプルをマイクロチューブに入れる

3) 植物切片の入ったマイクロチューブに 酵素液を0.9 mL入れる

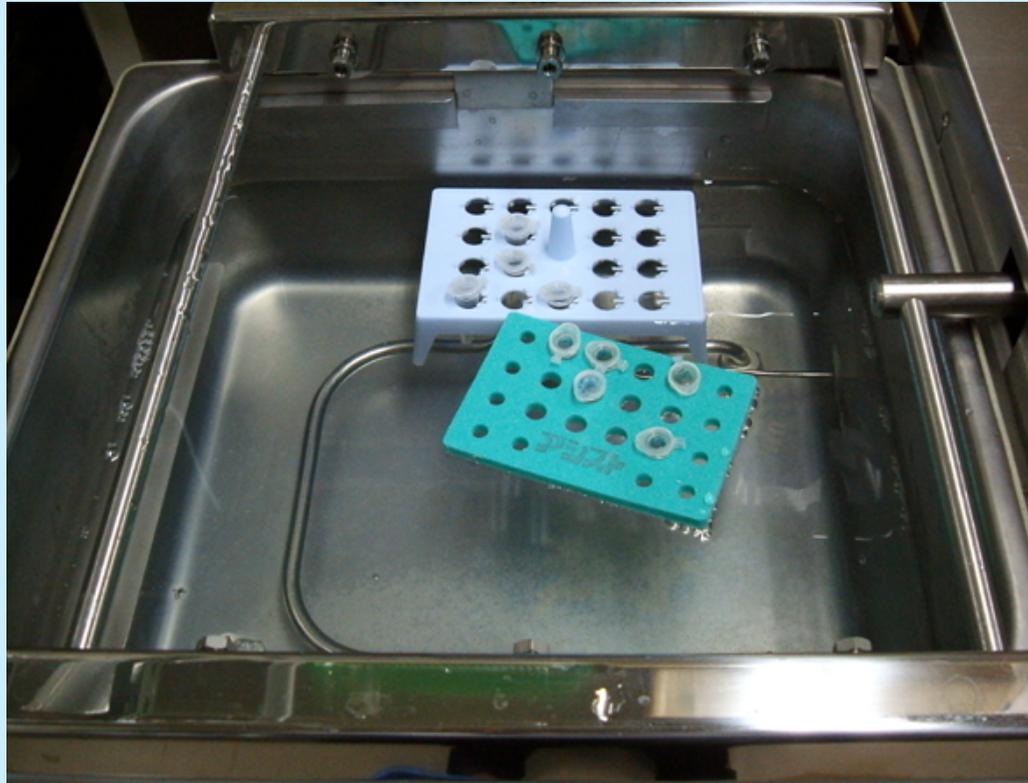


4) 減圧して脱気する

マイクロチューブのフタに穴をあけデシケーターに入れて、5分ほどアスピレーターで減圧し、試料から気泡を追い出し、酵素液を組織内にしみこませる。



5) 30°Cの恒温槽で30分間反応させる。



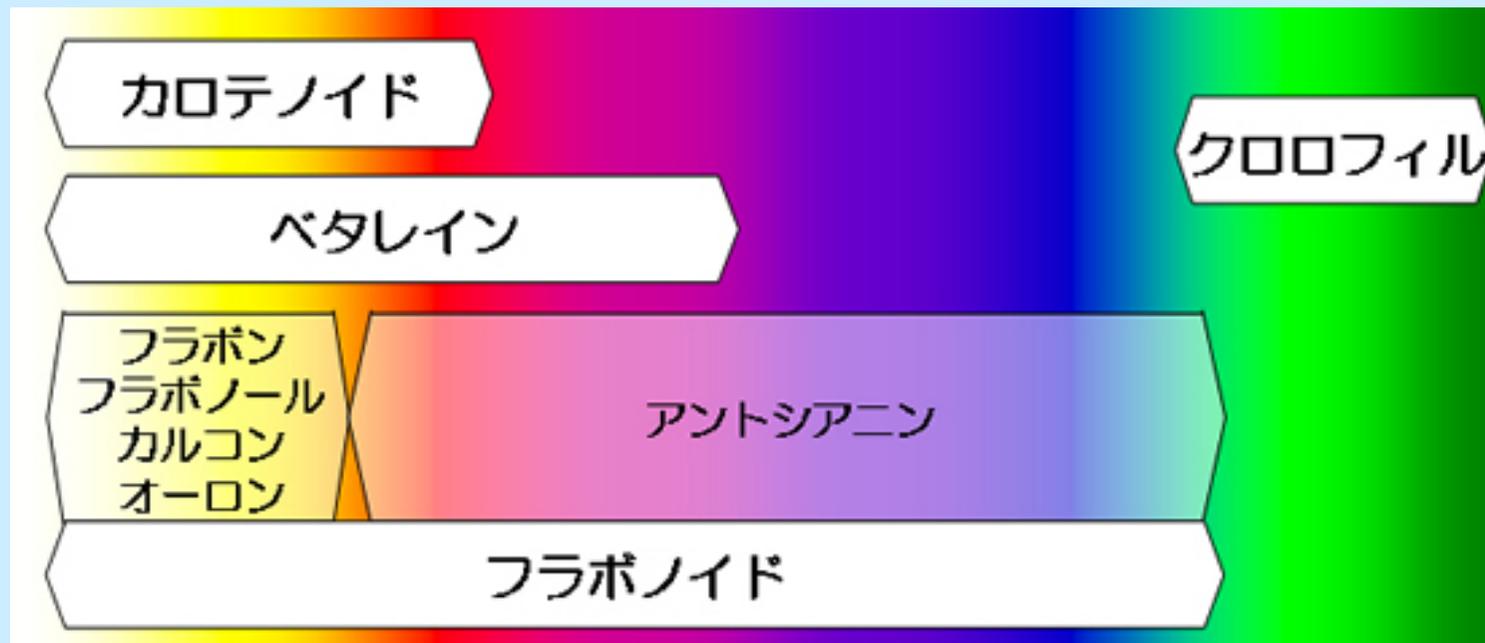
5-10分ごとに手で軽く振る。
細胞壁が酵素で溶けてプロトプラストができる。

実験1：プロトプラストを観察

- ①マイクロチューブを軽く振り，30秒間静置
- ②底の方に沈んできたプロトプラストをオートピペットのイエローチップで、そっと20 μ l採る.
- ③ホールスライドグラスの上に乗せて100倍で観察。
細胞が小さく見えにくい場合は400倍で観察する。
別のサンプルを見るときはスライドグラスを水で洗ってキムワイプで拭く。

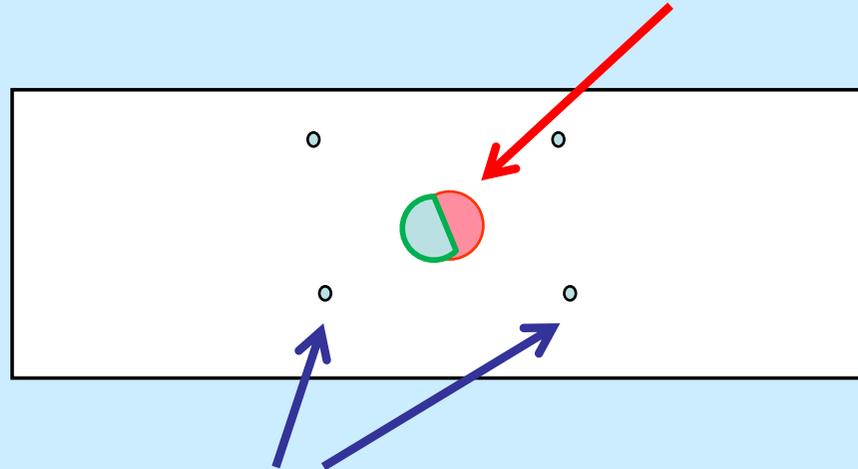
色素の分類と局在部位

色	色素	細胞内局在性
緑	クロロフィル	プラスチド
黄-赤	カロテノイド	プラスチド
黄-赤	ベタレイン	液胞
赤-青	アントシアニン	液胞
黄-青	フラボノイド	液胞



実験 2 : 細胞接着・融合

- ①ホールスライドガラスの中央に **2種類のプロトプラスト懸濁液** を $20\mu\text{L}$ ずつ置き混ぜる。



- ②周辺部 **4カ所**に **PEG液** を $20\mu\text{L}$ ずつ置く。
プロトプラスト懸濁液とPEG液1つを静かに混合し、
100倍程度で観察する。
- ③接着・融合が見られない場合は、2つ目のPEG液を
混合し観察する。だめな場合は順次、PEG液を混合し
観察。

レポートについて

- ・ 氏名と学番
- ・ A-Hの写真はどの植物のプロトプラスト？
- ・ A-Hは液胞型？プラスチド型？を判定
- ・ 細胞融合技術で何ができるか？新品種？

レポートは1—2ページにまとめて
電子メールで生物共同に提出