



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105136552 B

(45)授权公告日 2018.09.14

(21)申请号 201510666870.7

(56)对比文件

(22)申请日 2015.10.15

CN 205067195 U,2016.03.02,

(65)同一申请的已公布的文献号

审查员 全先荣

申请公布号 CN 105136552 A

(43)申请公布日 2015.12.09

(73)专利权人 北京农学院

地址 102206 北京市昌平区北农路7号

(72)发明人 张卿 秦岭 邢宇 房克凤
姜奕晨 曹庆芹 王建立 杨柳
杨瑞 杨凯 郝敬虹 南张杰

(74)专利代理机构 北京凯特来知识产权代理有限公司 11260

代理人 郑立明 付久春

(51)Int.Cl.

G01N 1/34(2006.01)

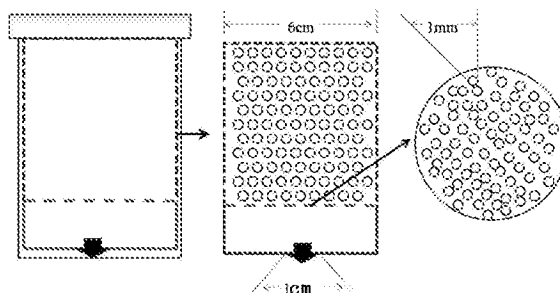
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种从植物果实组织中提取质外体汁液的装置及方法

(57)摘要

本发明公开了一种从植物果实组织中提取质外体汁液的装置及方法,该装置包括:离心瓶、离心筛和活动筛板;其中,所述离心瓶为圆柱形结构;所述离心筛为圆柱形结构,设在所述离心瓶内,所述离心筛内卡装设置布满通孔的活动筛板,将所述离心筛分为两层,处于上层的所述离心筛的外壁上设有若干通孔,所述离心筛的底部设有若干通孔。该装置及方法能实现从植物果实组织中提取质外体汁液,可以更广泛地应用于所有植物质外体汁液的提取,这对于研究质外体物质参与的植物生长发育、信号转导和胁迫应答等机制具有重要意义。



1. 一种从植物果实组织中提取质外体汁液的装置,其特征在于,包括:
离心瓶、离心筛和活动筛板;其中,
所述离心瓶为圆柱形结构;
所述离心筛为圆柱形结构,设在所述离心瓶内,所述离心筛内卡装设置布满通孔的活动筛板,将所述离心筛分为两层,处于上层的所述离心筛的外壁上设有若干通孔,所述离心筛的底部设有若干通孔;所述活动筛板在所述离心筛上分隔出的上层高度大于下层高度。
2. 根据权利要求1所述的一种从植物果实组织中提取质外体汁液的装置,其特征在于,所述处于上层的所述离心筛的外壁上设有若干通孔均为直径1mm的通孔;
所述离心筛的底部设有的若干通孔均为直径1cm的通孔;
所述活动筛板上的通孔均为直径1mm的通孔。
3. 根据权利要求1至2任一项所述的一种从植物果实组织中提取质外体汁液的装置,其特征在于,所述离心瓶采用钢制离心瓶;
所述离心筛采用钢制离心筛;
所述活动筛板采用钢制筛板。
4. 一种从植物果实组织中提取质外体汁液的方法,其特征在于,包括:
 - (1) 将待提取的植物果实组织切成 0.1cm^3 的小块,去离子水冲洗后并入容器,用去离子水浸没所述植物果实组织后真空抽滤;
 - (2) 将所述步骤(1)中所述的植物果实组织取出吸干水后放入权利要求1至3任一项所述的装置;
 - (3) 对所述步骤(2)的所述装置进行离心处理后,离心处理后分离到所述装置的离心瓶内的离心液即为从所述待提取植物果实组织中分离得到的质外体汁液。
5. 根据权利要求4所述的一种从植物果实组织中提取质外体汁液的方法,其特征在于:所述步骤(3)中的离心处理为:
 - (a1) 以第一离心力L对所述装置进行离心,除去所得的离心液一;
 - (a2) 以第二离心力H对所述装置进行离心,收集所得的离心液二,所述离心液二为从所述待提取植物果实组织中分离得到的质外体汁液;所述第一离心力L小于所述第二离心力H。
6. 根据权利要求5所述的一种从植物果实组织中提取质外体汁液的方法,其特征在于:所述第一离心力L为如下(a)或(b):(a) 单一离心力:3000g;(b) 梯度离心力:小于3000g的任一或若干离心力;
所述第二离心力H为3500g。
7. 根据权利要求4至6任一项所述的方法,其特征在于,所述步骤(3)中,对所述装置进行离心处理中的每次离心的时间为5~8min。
8. 根据权利要求4至6任一项所述的一种从植物果实组织中提取质外体汁液的方法,其特征在于,所述步骤(1)中的真空抽滤时间为5min,压力为0.8个大气压;
所述方法中,各步骤操作均在 4°C 条件下进行。
9. 根据权利要求4至6任一项所述的方法,其特征在于,所述待提取的植物果实为草莓果实。

一种从植物果实组织中提取质外体汁液的装置及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及植物果实组织质外体汁液提取领域,特别是涉及一种从植物果实组织中提取质外体汁液的装置及方法。

背景技术

[0002] 物质外体是由细胞膜外的细胞内空间、细胞壁、细胞间隙和分化成熟的木质部所组成。物质外体是一个动态的组分,其组分参与矿质营养和水分运输、组织形态的维持、细胞内外环境的动态平衡、细胞生长和发育调控、信号转导以及胁迫应答等重要的生理生化过程。

[0003] 目前普遍采用的物质外体汁液提取方法为淋洗法和离心法。1969年,Bernstein利用该方法成功获得叶片质外体汁液,该方法在真空下用去离子水淋洗叶片的一面,使水分穿过另一面的气孔并采用真空抽滤的方式将水分抽出,用试管连续收集滤液。1990年,Long等利用该方法成功获得蚕豆叶片质外体中 K^+ 的含量,该方法将叶片的表皮去除后,质外体中的离子扩散到淋洗液中,根据离子扩散量和扩散时间的相关性计算出 K^+ 的含量。淋洗法提出物质外体操作简单,不需要精密仪器,可以连续获得较多的滤液,但是该方法在抽滤时对细胞膜破坏,滤液被细胞液污染并被稀释。1980年,Terry等利用该方法成功提取豌豆质外体,该方法用酸性溶液淋洗豌豆幼苗的茎段切口后,将植物材料置于特定容器内,通过离心将质外体分离出来。通过测定苹果酸脱氢酶或磷酸己糖异构酶的活性来选取最佳离心时间和最佳离心力,以减少切口胞浆造成的污染。1995年,Dannel等利用该方法成功收集了向日葵叶片质外体,该方法先将植物材料用去离子水冲洗净,准确称取一定的质量,真空状态下向植物材料渗入一定浓度的山梨醇溶液后再离心。离心法可以直接收取比较纯净的质外体汁液,但是对离心时间和离心力要求严格,容易造成细胞溶液污染。

[0004] 通过前人研究看出,分离不同物质外体的方法均有各自的优缺点且主要集中在植物叶片和茎组织。迄今为止,仍没有出现植物果实质外体汁液提取方法的报道。而植物果实质外体汁液的组分对于调控果实生长、发育和应对各种生理胁迫具有重要意义。

发明内容

[0005] 基于上述现有技术所存在的问题,本发明提供一种从植物果实组织中提取质外体汁液的装置及方法,能从植物果实组织中提取质外体汁液,方便研究植物果实质外体汁液的组分。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明提供一种从植物果实组织中提取质外体汁液的装置,包括:

[0007] 离心瓶、离心筛和活动筛板;其中,

[0008] 所述离心瓶为圆柱形结构;

[0009] 所述离心筛为圆柱形结构,设在所述离心瓶内,所述离心筛内卡装设置布满通孔的活动筛板,将所述离心筛分为两层,处于上层的所述离心筛的外壁上设有若干通孔,所述

离心筛的底部设有若干通孔。

[0010] 上述装置中,活动筛板在所述离心筛上分隔出的上层高度大于下层高度。

[0011] 上述装置中,处于上层的所述离心筛的外壁上设有若干通孔均为直径1mm的通孔;

[0012] 所述离心筛的底部设有的若干通孔均为直径1cm的通孔;

[0013] 所述活动筛板上的通孔均为直径1mm的通孔。

[0014] 上述装置中,离心瓶采用钢制离心瓶;

[0015] 所述离心筛采用钢制离心筛;

[0016] 所述活动筛板采用钢制筛板。

[0017] 本发明实施例还提供一种从植物果实组织中提取质外体汁液的方法,包括:

[0018] (1) 将待提取的植物果实组织切成 0.1cm^3 的小块,去离子水冲洗后并入容器,用去离子水浸没所述植物果实组织后真空泵抽滤;

[0019] (2) 将所述步骤(1)中所述的植物果实组织取出吸干水后放入权利要求1至4任一项所述的装置;

[0020] (3) 对所述步骤(2)的所述装置进行离心处理后,离心处理后分离到所述装置的离心瓶内的离心液即为从所述待提取植物果实组织中分离得到的质外体汁液。

[0021] 上述方法中,步骤(3)中的离心处理为:

[0022] (a1) 以第一离心力L对所述装置进行离心,除去所得的离心液一;

[0023] (a2) 以第二离心力H对所述装置进行离心,收集所得的离心液二,所述离心液二为从所述待提取植物果实组织中分离得到的质外体汁液;

[0024] 所述第一离心力L小于所述第二离心力H。

[0025] 上述方法中,第一离心力L为如下(a)或(b):(a)单一离心力:3000g;(b)梯度离心力:小于3000g的任一或若干离心力;

[0026] 所述第二离心力H为3500g。

[0027] 上述方法中,步骤(3)中,对所述装置进行离心处理中的每次离心的时间为5~8min。

[0028] 上述方法中,步骤(1)中的真空抽滤时间为5min,压力为0.8个大气压。所述方法中,各步骤操作均在 4°C 条件下进行。

[0029] 上述方法中,待提取的植物果实为草莓果实;优选的,草莓为花后25天的草莓。

[0030] 本发明的有益效果为:通过将离心筛设在离心瓶内,并由布满通孔的活动筛板将离心筛分层,在上层的离心筛壁上设置若干通孔,以及在离心筛底部设置若干通孔形成了一种特定结构的分离装置,能方便以离心方式从植物果实组织中分离质外体汁液,并可保证分离的质外体汁液顺利分离,可以防止组织和与离心出来的质外体汁液再次接触,方便有效的回收离心产物。该提取方法操作比较简单,只需将果实材料分成 0.1cm^3 的小块,既能保证尽可能将质外体汁液分离出来,又能避免细胞损伤造成的污染,提出汁液的纯度最高,效率最高。

附图说明

[0031] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本

领域的普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他附图。

[0032] 图1为本发明实施例提供的装置结构示意图;

[0033] 图2为本发明实施例提供的不同离心力下获得的离心液中样品酶活力的分析鉴定结果曲线图;

[0034] 图3为本发明实施例提供的不同离心力下获得的离心液中样品纯度的分析鉴定结果曲线图。

具体实施方式

[0035] 下面对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明的保护范围。

[0036] 本发明所提供的从植物果实组织中提取质外体汁液的方法,具体可包括如下步骤:

[0037] 步骤(1),用干净的刀片将待提取的植物果实样品切成 0.1cm^3 左右小块,去离子水冲洗三遍;这样的尺寸,可避免尺寸太大不容易将质外体汁液离心出来,太小了细胞损伤严重容易污染。

[0038] 步骤(2),将冲洗干净的植物果实样品放入小烧杯,用去离子水浸没,在0.8个大气压的真空状态下向果实渗入去离子水,时间不超过5min,压力太大将破坏细胞膜,造成质外体汁液的污染;

[0039] 步骤(3),取出植物果实样品并迅速用吸水纸吸干,放入本发明的果实质外体汁液提取用装置进行离心处理,本发明的果实质外体汁液提取用装置结构如图1所示,分为两部分,第一部分是500ml的标准规格的钢制离心瓶,瓶口和瓶底直径相同,第二部分是圆柱形的离心筛,外直径略小于离心瓶内直径,保证可放进离心瓶,离心筛分两层,用打满孔的活动钢板(即活动筛板)隔开,上层的离心筛壁上打满小孔,保证质外体汁液在离心力作用下有效进入离心瓶,下层为一底部带小孔的空间,离心下的质外体汁液可通过底部小孔进入离心瓶;离心处理后获得分离液即为从待提取植物果实组织中分离得到的质外体汁液,该装置的离心筛外直径为6cm,上层离心筛壁上小孔直径为1mm,下层底部小孔直径为1cm。

[0040] 分离处理中,为清除植物果实样品上的杂质和污染物,先用低速的第一离心力L去掉植物果实样品表面吸附的杂质和污染物,然后再用最适的第二离心力H收集保存。最适的第二离心力不能太高,否则会将细胞膜破坏,第一离心力L低于第二离心力H。

[0041] 为确定最适离心力H,可采用梯度加速方法:

[0042] 按照500g为一个梯度,从1500g开始收集离心液,分别测定提取的果实质外体和匀浆中苹果酸脱氢酶的活性。当在某一个离心力下,苹果酸脱氢酶活性突然升高,并且随着离心力增大而增加,即可确定这个离心力前的离心力为最适的第二离心力H,这样的离心力既能保证有大量的质外体汁液,又能确保分离的质外体汁液没有污染。

[0043] 本发明所提供的方法特别适合于仍没有成熟的植物果实组织。优选的,本发明采用的植物果实样品为草莓果实,更进一步,为花后25天的草莓果实。

[0044] 通过上述方法最终确定分离草莓果实组织中的质外体汁液的最适离心力(即第二

离心力L)为2500g。

[0045] 上述方法中,每次离心的时间均可为5-8min(如6min)。

[0046] 在本发明的一个实施例中,从所述草莓果实组织中分离质外体汁液时,采用的所述离心瓶为500ml,自制离心筛外直径为6cm,上层壁上小孔直径为1mm,下层底部小孔直径为1cm。

[0047] 为了防止质外体液成分的改变,上述方法的所有操作可在4℃条件下进行。

[0048] 本发明从植物果实组织中提取质外体汁液的方法以草莓为研究对象,对于研究果实质外体物质参与的生长发育和信号转导具有重要的意义。

[0049] 下面结合具体实施例对本发明装置和方法作进一步说明。

[0050] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0051] 草莓(*Fragaria × ananassa* Duch)材料为北京农学院组织培养中心的红颜品种,生长环境保持在日间温度25℃,夜间20℃,同时保持着50±10%的相对湿度。种子播种于蛭石上,以浅沙覆盖,种子萌发后,改用1/2Hoagland营养液进行浇灌,每周一次。选择花后25天的草莓果实进行实验。

[0052] 所用离心装置的结构如图1所示,该装置分两部分,第一部分为500ml的标准规格的钢制离心瓶,瓶口和瓶底直径相同,第二部分为圆柱形的离心筛,外直径为6cm略小于离心瓶内直径,保证可放进离心瓶,离心筛分两层,用打满孔的活动钢板隔开,上层的壁上打满直径为1mm小孔,保证质外体汁液在离心力作用下有效进入离心瓶,下层为一底部带直径为1cm小孔的空间,离心下的质外体汁液可通过底部小孔进入离心瓶;该装置有中国农业大学农机实验车间加工。

[0053] 苹果酸脱氢酶试剂购自SIGMA-ALDRICH公司(<http://www.sigmaaldrich.com/china-mainland.html>)。

[0054] 实施例一

[0055] 本实施例为从草莓果实组织中分离质外体汁液的方法:

[0056] 一、分离质外体汁液

[0057] 1、取花后25天的草莓果实3个,为减少果实质外体成分的改变,之后的操作都要在4℃条件下进行。

[0058] 2、用消过毒的刀片将果实切成0.1cm³的小块,用去离子水冲洗三遍,然后放入100ml的小烧杯,用去离子水浸没,放在真空泵中抽滤,时间为5min。

[0059] 3、样品取出后立刻用吸水纸将样品表面的水吸干,放入自制的离心装置。

[0060] 4、将离心机转速设定为1500g,离心6min,然后用移液枪吸取提取液并丢弃。

[0061] 5、分梯度离心,每次离心6min,离心力从1500g逐渐增加到5000g,每次递增500g。分别收集同一样品每次离心后的液体,4℃保存,1500g收集的液体丢弃(主要原因:切取组织的时候伤口条带过长,机械损伤会造成组织液流出,因此该离心力下收获的质外体汁液不能反映真实的结果),其他离心力提取的质外体汁液保存用于分析鉴定。

[0062] 二、各离心力下提取的质外体汁液的分析鉴定:

[0063] 1、离心液纯度分析

[0064] 苹果酸脱氢酶是细胞内的酶,在质外体中含量极低,所以本发明将对各离心力下提取的离心液进行苹果酸脱氢酶的活性测定,将其作为负对照。

[0065] 按照如下方法对步骤一各离心力下所得离心液苹果酸脱氢酶活性进行测定。为了评价各离心液污染的程度,将花后25天的草莓果实直接研磨,得到匀浆,并对其苹果酸脱氢酶的酶活进行测定,作为对照值,与不同离心力下所得离心液的酶活进行比较。若离心后的组分中酶活与匀浆中的酶活比率越低,表示离心液样品纯度越高,说明质外体汁液所占离心液的比例越高。离心液样品纯度公式如下:

[0066] 离心液样品纯度 = (1 - 离心液中酶活 / 匀浆中酶活) × 100%;

[0067] 实验设三次重复,结果取平均值。

[0068] 苹果酸脱氢酶 (MDH) 在 NAD^+ 和 NADH 的参与下,可以催化苹果酸与草酰乙酸间的可逆转换。

[0069] 将50 μL 步骤一中获得的离心液加入到1mL反应液(46.5mM Tris, 0.1mM NADH和0.4mM的草酰乙酸, pH9.5, 各浓度均为相应组分在反应液中的终浓度)中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应5min, 每一分钟用紫外分光光度计分别测定340nm (NADPH 和 NADH 因为含有二氢吡啶环, 在340nm有吸收峰)处的吸收值, 根据反应前后OD340的变化率来代表离心液中苹果酸脱氢酶 (MDH) 的活性。即用 $\Delta\text{OD340}/\text{min}$ 来表示。

[0070] 步骤一各离心力下所得离心液中样品纯度的测定结果如图2、3所示(具体是通过苹果酸脱氢酶的活性来测算组分纯度, 图2、3中, 纵坐标表示不同的离心力, 横坐标分别表示酶活力和纯度), 随着离心力的增大, 组分的纯度不断降低。离心力在2500g左右, 酶活力突然增加, 纯度显著降低。通过苹果酸脱氢酶测算的纯度, 从3000g之前就保持在98.5%以上, 不出现显著的变化。综合以上结果, 认为在2500g离心力下收集的离心液为质外体液。

[0071] 该提取方法操作比较简单, 只需将果实材料分成0.1 cm^3 的小块, 即保证尽可能将质外体汁液分离出来, 又能避免细胞损伤造成的污染。步骤(1)在0.8个大气压的真空环境保证果实组织不被损坏, 摸索出合适的真空抽滤时间为5min。采用本发明的特定提取用装置, 上层离心筛壁和隔板上的直径1mm的小孔可保证分离的质外体汁液顺利分离, 可以防止组织和与离心出来的质外体汁液再次接触。离心筛下部直径为1cm的小孔可是分离的汁液流出, 方便有效的回收离心产物。本发明确定了草莓果实组织质外体提取的最适离心力为2500g, 该离心力下提出汁液的纯度最高, 效率最高。

[0072] 综上所述, 本发明建立了一种适合于从植物果实组织中提取质外体汁液的方法。该方法除了适用于草莓质外体液的提取外, 同时, 可以更广泛地应用于所有的植物组织质外体汁液的提取, 对于研究质外体物质参与的植物生长发育、信号转导和胁迫应答等机制具有重要意义。

[0073] 以上所述, 仅为本发明较佳的具体实施方式, 但本发明的保护范围并不局限于此, 任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明披露的技术范围内, 可轻易想到的变化或替换, 都应涵盖在本发明的保护范围之内。因此, 本发明的保护范围应该以权利要求书的保护范围为准。

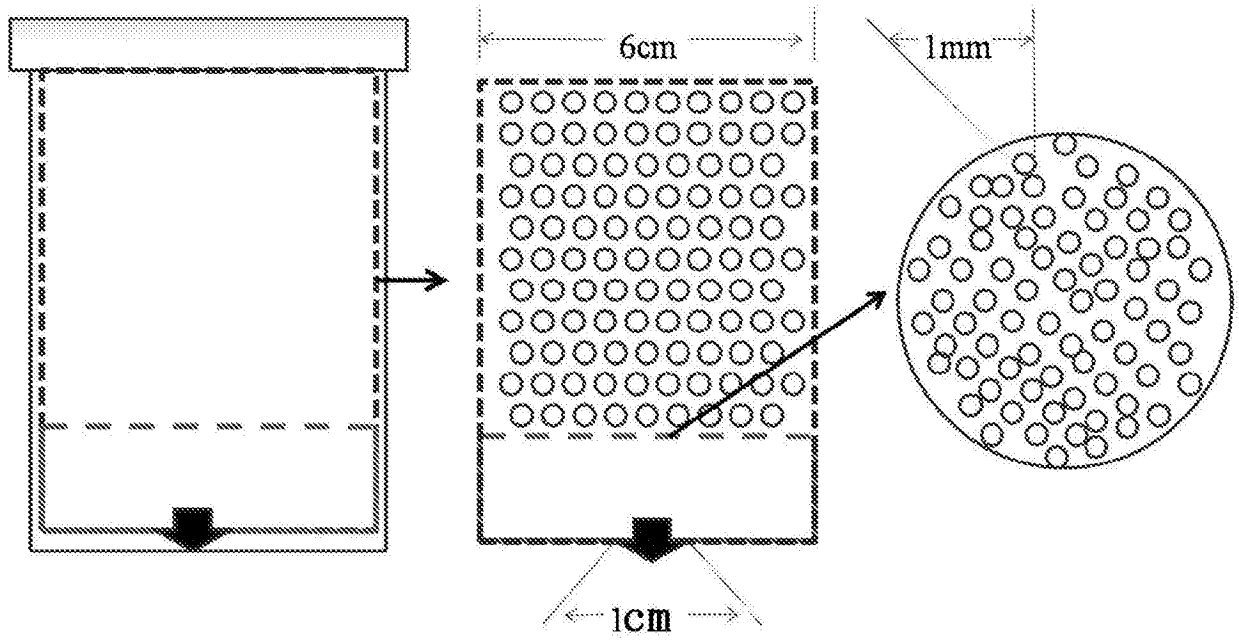


图1

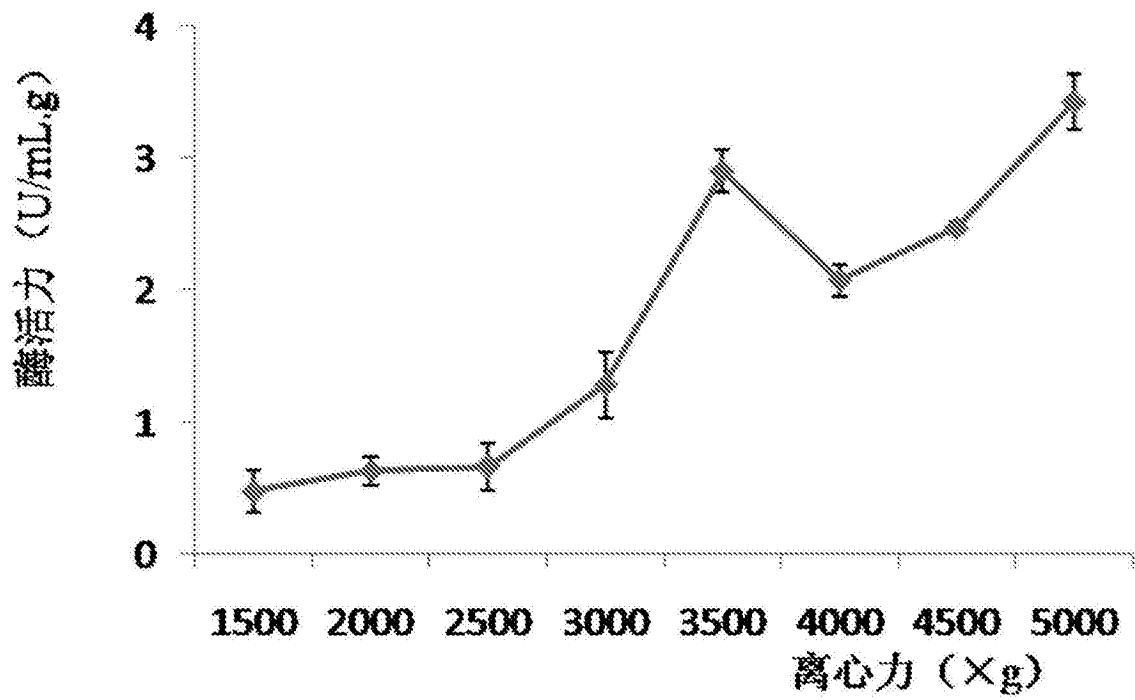


图2

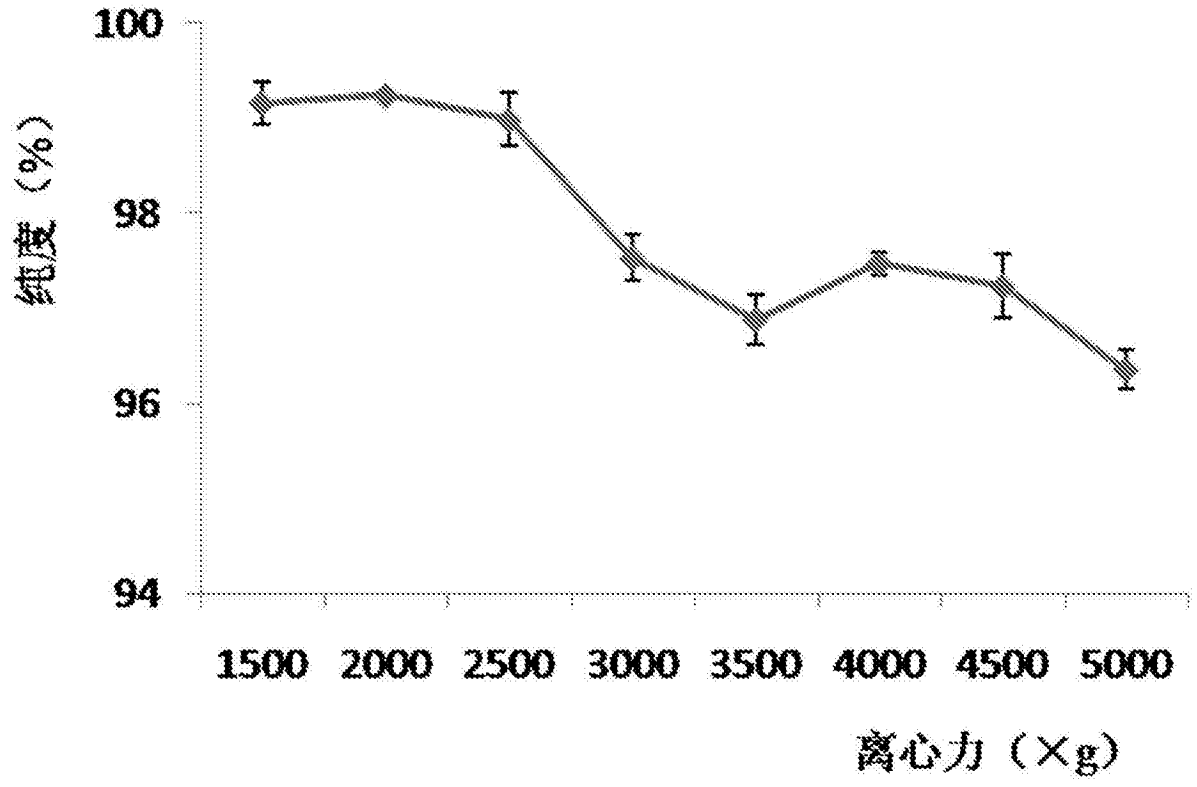


图3