

李晓君,王绍梅,谢艳兰,等. 农杆菌渗透法转化烟草条件的优化[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):45-47.

# 农杆菌渗透法转化烟草条件的优化

李晓君,王绍梅,谢艳兰,和 敏

(临沧师范高等专科学校农学系,云南临沧 677000)

**摘要:**植物瞬时表达系统常用于研究基因表达产物的亚细胞定位和蛋白间的互作,将 GFP-GUS 融合蛋白植物表达载体导入农杆菌 EHA105,获得工程菌,制备不同浓度的农杆菌浸染液,用注射法对烟草叶片进行转化,荧光显微镜检测烟草叶片原生质体和下表皮中 GFP 的表达情况。结果表明,浸染注射液的  $D_{600\text{ nm}}$  在 0.3~0.7 之间均具有较高的转化效率,注射后第 4 天至第 6 天为较佳观察时间。

**关键词:**植物瞬时表达系统;渗透法;转化;农杆菌渗透注射;烟草;绿色荧光蛋白(GFP)

**中图分类号:** S572.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0045-03

植物瞬时表达系统常用于基因产物的亚细胞定位、蛋白间互作、转录因子与启动子之间的互作、启动子分析等方面的研究<sup>[1-2]</sup>。植物瞬时表达系统中外源基因的导入方法有植物病毒介导法、PEG 法、电击法、基因枪法和农杆菌渗透法<sup>[2]</sup>。农杆菌渗透法是一种比较简便的方法,通过将植物表达载体导入农杆菌,用真空法或注射法将农杆菌导入植物细胞,使得农杆菌 Ti 质粒上的 T-DNA 区整合到植物基因组中,T-DNA 区的目标基因培养几天后即可得到表达<sup>[3]</sup>。较其他方法而言,农杆菌渗透法具有转化效率高、基因表达在完整活体内进行、可携带较大片段的目的基因等优点<sup>[2]</sup>。原生质体是观察基因瞬时表达情况的优选材料,传统的原生质体转化方法首先要制备高浓度、高质量的质粒,经过从植物活体材料中分离纯化原生质体,在 PEG 的介导下将质粒 DNA 导入原

生质体,进行原生质体培养后再检测目标基因的表达情况<sup>[4]</sup>。用该方法转化后的原生质体敏感、易破裂,使得阳性细胞检出率低,不利于观察。以农杆菌渗透法转化材料提取原生质体,可缩短从原生质体提取到观察的时间,原生质体完整,镜检阳性率高。本研究在 Sparke 等的研究基础<sup>[5]</sup>上简化了农杆菌注射液的制备和注射过程,通过荧光显微镜观察注射区域下表皮和原生质体中绿色荧光蛋白(GFP)的表达情况,检测不同注射浓度下和注射后不同时间的转化效率,总结出一种高效简易的农杆菌渗透注射转化烟草的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

**1.1.1 植物材料** 将普通烟草(*Nicotiana tabacum*)种子播撒在育苗盘中,2 周后移至小花盆,5~6 周后即可作为转化受体。

**1.1.2 菌种和质粒** 农杆菌 EHA105 为临沧师范高等专科学校农学系植物生理实验室保存,植物表达载体 pCAM-BIA1304 图谱如图 1(空载体表达 GFP-GUS 基因,亚细胞定位特点:胞质<sup>[6]</sup>)所示。

收稿日期:2013-11-25

基金项目:临沧师范高等专科学校高层次人才引进科研启动项目(编号:LXJ2012);临沧师范高等专科学校校级课题(编号:LCSZL2013001)。

作者简介:李晓君(1985—),女,云南临沧人,博士,讲师,主要从事植物生物技术与种质创新研究。E-mail:lxj-148@163.com。

[3] Ke J, Laskar D D, Singh D, et al. In situ lignocellulosic unlocking mechanism for carbohydrate hydrolysis in termites: crucial lignin modification[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2011, 4(1): 1-12.

[4] Ziegler A, Mooi R, Rolet G, et al. Origin and evolutionary plasticity of the gastric caecum in sea urchins (Echinodermata: Echinoidea)[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2010, 10(6): 313.

[5] 李 伟,张付云,孙秋颖,等. 海胆及其共附微生物的活性物质研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2010, 31(9): 202-206.

[6] 王铁南,刘艳萍,常亚青. 患病与健康虾麦马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)体腔液菌群的 PCR-DGGE 分析比较[J]. *中国农业科技导报*, 2011, 13(1): 111-116.

[7] 刘 丹,凌 云. PCR-DGGE 实验过程中常见问题的分析与改进[J]. *湖南农业科学*, 2010, 24(24): 26-27.

[8] 王 玢,汪天虹,张 刚,等. 产低温纤维素酶海洋嗜冷菌的筛选及研究[J]. *海洋科学*, 2003, 27(5): 42-45.

[9] 郝建华,孙 谧,王跃军,等. 产脂肪酶海洋嗜冷菌的鉴定及酶学性质研究[J]. *高技术通讯*, 2008, 18(7): 748-753.

[10] 纪明侯. 海藻化学[M]. 北京:科学出版社,1997.

[11] 罗 璋. 斑点叉尾鮰肠道益生菌的筛选与特性研究[D]. 武汉:华中农业大学,2007.

[12] 冷晓飞,姜海峰,刘小林,等. 皱纹盘鲍肠道菌群组成及 PCR-DGGE 指纹图谱分析[J]. *海洋科学*, 2013, 37(5): 10-14.

[13] Weiner R M, Walch M, Labare M P, et al. Effect of biofilms of the marine bacterium *Alteromonas colwelliana* (LST) on set of the oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) and *C. virginica* (Gmelin, 1791)[J]. *Journal of Shellfish Research*, 1989, 8(1): 117-123.

[14] Vinderola G, Matar C, Perdigon G. Role of intestinal epithelial cells in immune effects mediated by gram-positive probiotic bacteria: Involvement of Toll-like receptors[J]. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2005, 12(9): 1075-1084.

[15] 孙 奕,陈 驊. 刺参体内微生物组成及其生理特性的研究[J]. *海洋与湖沼*, 1989, 20(4): 300-307.



表 1 注射后各烟草样品叶片下表皮中 GFP 表达情况

| $D_{600\text{ nm}}$ | 表达强度  |       |       |       |       |       |       |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                     | 第 2 天 | 第 3 天 | 第 4 天 | 第 5 天 | 第 6 天 | 第 7 天 | 第 8 天 |
| 0.1                 | —     | —     | +     | +     | +     | —     | —     |
| 0.3                 | —     | +     | ++    | +++   | +++   | ++    | —     |
| 0.5                 | —     | ++    | ++++  | ++++  | ++++  | +++   | ++    |
| 0.7                 | —     | +     | +++   | +++   | +++   | ++    | +     |
| 0.9                 | —     | +     | +     | ++    | +     | —     | —     |
| 1.2                 | —     | +     | +     | —     | —     | —     | —     |
| 1.5                 | —     | +     | —     | —     | —     | —     | —     |

注：—、+、++、+++、++++ 分别表示无信号、阳性细胞率为 0 ~ 10%、阳性细胞率为 10% ~ 20%、阳性细胞率为 20% ~ 40%、阳性细胞率在 40% 以上。

2.2 菌液注射浓度对转化效率和原生质体成活率的影响

转化后第 4 天,提取不同浓度菌液注射后的烟草叶片原生质体进行观察,对 GFP 阳性细胞的比率进行统计,并在明场下统计破损原生质体的比例,结果如图 2 所示。当  $D_{600\text{ nm}}$  为 0.1 或大于 0.9 时,阳性细胞的检出率均低于 20%;而在 0.3 ~ 0.7 之间时,阳性细胞检出率均在 30% 以上;0.5 则为最佳转化浓度,转化率达 45%,原生质体较为完整,转化效率较高。随着注射浓度的增加,菌液对叶片细胞的伤害增强,当  $D_{600\text{ nm}} > 0.9$  时,提取的原生质体成活率降低至 60% 以下。图 3 为转化后第 4 天注射菌液浓度  $D_{600\text{ nm}}$  为 0.5 时注射区域烟草下表皮和原生质体中 GFP 的表达情况。

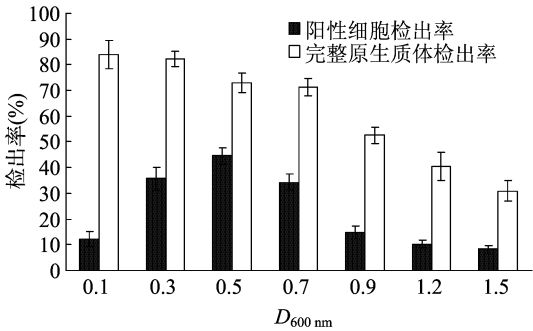
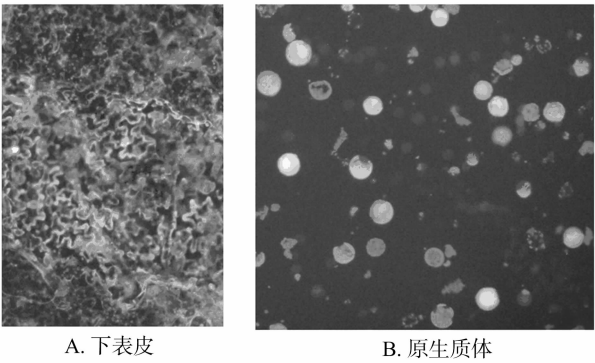


图2 不同菌液注射浓度对GFP表达和原生质体成活率的影响



注:  $D_{600\text{ nm}} = 0.50$

图3 转化后第4天烟草下表皮和原生质体中 GFP 的表达情况

3 结论

农杆菌介导转化烟草的瞬时表达常常通过离体渗透法,

也可通过注射法进行<sup>[8-9]</sup>。本研究所用的农杆菌渗透转化法在转化过程中只需配制菌体培养液和注射液,注射液现配现用,比较方便快捷。通过荧光显微镜在细胞水平对转化效率进行分析,并分析注射液浓度对原生质体成活率的影响,结果表明注射液的浓度对试验结果有重要影响,注射液浓度  $D_{600\text{ nm}}$  为 0.3 ~ 0.7 时均能得到理想的结果,在第 4 天至第 6 天时进行检测最为合适。在亚细胞定位研究中,利用 X - GFP - GUS 融合蛋白表达系统,其优点是在检测目标蛋白的表达时,既可以通过 GUS 染色的方法观察目的基因在植物不同组织和不同发育时期的表达情况,也可以直接通过显微镜观察细胞中的 GFP 荧光信号分析目的基因的亚细胞定位和蛋白互作情况;且 X - GFP - GUS 融合蛋白分子量较大,可以防止融合蛋白自由扩散,对于目的蛋白分子量较小的基因可以减少定位误差<sup>[10]</sup>。

参考文献:

[1] 吴 玉,杨迎伍,邓 伟,等. 番茄 *EBF2* 基因的克隆、亚细胞定位与遗传转化[J]. 核农学报,2010,24(3):490 - 494.

[2] 赵文婷,魏建和,刘晓东,等. 植物瞬时表达技术的主要方法与应用进展[J]. 生物技术通讯,2013,2(2):294 - 300.

[3] 王华忠,陈雅平,陈佩度. 植物瞬间表达系统与功能基因组学研究[J]. 生物工程学报,2007,23(3):367 - 374.

[4] McIntosh K B,HuIm J L,Young L W,et al. A rapid *Agrobacterium* - mediated *Arabidopsis thaliana* transient assay system [J]. Plant Molecular Biology Reporter,2004,22(1):53 - 61.

[5] Sparkes I A,Runions J,Kearns A,et al. Rapid,transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants[J]. Nature Protocols,2006,1(4):2019 - 2025.

[6] 周雪莉,王 园,刘菊华,等. 香蕉 *MuMADS1* 基因表达产物的亚细胞定位[J]. 生命科学研究,2009,13(5):418 - 421.

[7] Rao K S,Prakash A H. A simple method for the isolation of plant protoplasts [J]. Journal of Biosciences,1995,20(5):645 - 655.

[8] 吴英杰,姜 波,张 岩,等. 农杆菌介导的烟草瞬时表达试验条件优化[J]. 东北林业大学学报,2010,38(9):110 - 112.

[9] 黎 茵,张以顺. 农杆菌注射渗透法转化烟草实验研究[J]. 实验技术与管理,2010,27(11):50 - 52.

[10] Poon I K,Jans D A. Regulation of nuclear transport:central role in development and transformation? [J]. Traffic,2005,6(3):173 - 186.