

农杆菌介导的 pCB302-3 载体在本氏烟中 瞬时表达条件优化

孙春莲 王洪洋 田振东

园艺植物生物学教育部重点实验室/国家蔬菜改良中心华中分中心/
湖北省马铃薯工程技术研究中心/华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070

摘要 以 GFP 为报告基因构建植物表达载体 pCB302-3-GFP, 采用农杆菌叶片注射法对其在本氏烟叶片中瞬时表达条件进行优化。分析基因沉默抑制子 *p19*、菌液不同浓度以及侵染时间对 GFP 荧光强度的影响, 结果显示, 当农杆菌菌液 D_{600} 为 0.8~1.0 并与含有 *p19* 基因的载体共注射条件下, 农杆菌注射 3~5 d 后本氏烟草叶片表现出很强的绿色荧光, 实现了 GFP 在本氏烟草中的高效瞬时表达。

关键词 pCB302-3 载体; 瞬时表达优化; 农杆菌叶片注射; 本氏烟; 基因沉默抑制子 *p19*; GFP

中图分类号 Q 785 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)03-0008-05

农杆菌介导的稳定转化技术包括基因超量表达和 RNAi 干扰技术, 是目前研究基因功能的常用方法。但是稳定转化技术的转化效率及再生效率低, 而且耗时比较长, 如果要对多个基因开展功能研究会耗费大量时间和精力。近年发展起来的基于农杆菌注射技术 (agroinfiltration) 的基因瞬时沉默和瞬时表达技术由于耗时短、可以高通量进行基因功能研究, 已成为开展基因功能研究的重要方法^[1-2]。瞬时表达 (transient gene expression) 是指将外源基因导入到植物细胞后, 作为一种基因组外的遗传物质在一定时间内实现转录和翻译并积累相应表达产物的技术^[3]。该技术已广泛用于基因表达^[4]、基因相互作用^[5]、蛋白表达^[6-7]和疫苗生产^[8]等方面的研究。用于植物瞬时表达的常用载体包括病毒和非病毒载体。病毒载体主要利用病毒在植物体内的快速复制实现目标基因的高效表达^[9-10]。非病毒载体主要是农杆菌植物表达载体, 利用组成型强启动子驱动来实现目标基因的表达。小型化植物表达载体易于克隆操作, 一般不含选择标记, 常用于植物瞬时表达研究。pCB302-3 载体是 Xiang 等^[11]在 pBIN19 基础上改建的小型化农杆菌植物高效二元表达载体, 启动子为 CaMV35S, 后接 Ω 增强子元件, 含有多克隆位点, 质粒大小约 6.5 kb, 易于克隆操作, 可

以实现有效稳定转化。本研究以 pCB302-3 为载体, 通过监测绿色荧光蛋白 GFP 的表达, 在模式植物本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*) 中优化其瞬时表达条件, 提高蛋白表达量, 以期将其作为植物活体免疫共沉淀 (in planta coimmunoprecipitation) 的高效植物瞬时表达载体。

1 材料与与方法

1.1 植物材料及菌种

本氏烟 (*N. benthamiana*) 种子由湖北省马铃薯工程技术研究中心保存。先将种子播种在填充腐殖土的蔬菜育苗穴盘上, 当幼苗长出 3~4 片叶子后分苗, 移栽到 10 cm × 10 cm 大小的塑料钵中。置于 22~24 °C 的培养室中生长, 18 h 光照, 生长 6 周的幼苗用于农杆菌注射实验。

大肠杆菌 DH5 α 、农杆菌 GV3101、含有 *p19* 基因质粒农杆菌菌株 GV3101 和 pFF19 质粒由笔者所在实验室保存。pCB302-3 载体由英国邓迪大学 Paul Birch 教授惠赠。

1.2 载体构建

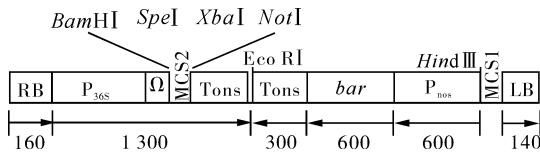
pCB302-3 载体基本结构见图 1, 启动子为 CaMV35S, 后接 Ω 增强子元件。多克隆位点 MCS2 为目标基因插入位点。

收稿日期: 2013-11-30

基金项目: 国家“863”项目(2013AA102603); 国家自然科学基金项目(31171603); 教育部博士点基金项目(20110146110019)

孙春莲, 硕士研究生, 研究方向: 蔬菜分子生物学与生物技术. E-mail: sclhbmy@163.com

通信作者: 田振东, 博士, 教授, 研究方向: 抗病分子生物学. E-mail: tianzhd@mail.hzau.edu.cn



图中标出多克隆位点 MCS2 酶切位点顺序为本研究测序结果,与原文献报道相反。The order of the restriction enzyme sites in MCS2 is based on our sequencing result, which is in opposite direction as reported in reference.

图 1 pCB302-3 载体基本结构 (图片引自 Xiang et al^[11])

Fig. 1 Schematic structure of the pCB302-3 vector

为了将 GFP 基因插入 pCB302-3 载体多克隆位点,用 primer5 软件设计引物:pCB-GFP-F: 5'-CGGGATCCATGGTGAGCAAGG-3' (下划线为 BamH I 酶切位点) pCB-GFP-R: 5'-GCAC-TAGTTTCACTTGTACAGCT-3' (下划线为 Spe I 酶切位点),酶切位点前为保护碱基。然后以含有 GFP 基因的 pFF19 质粒为模板扩增 GFP 基因编码区。PCR 扩增体系为: 2 × PCR GC Buffer 25 μL, dNTP (10 mmol/L) 2 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 分别为 0.4 μL, 载体质粒 pFF19 DNA 50 ng, TaKaRa LA Taq 0.4 μL, 加水补充至 50 μL。扩展条件为: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 34 个循环, 72 °C 延长 10 min, 扩增条带大小为 720 bp。目的片段凝胶回收后用 A-T 克隆法插入 pMD18-T 载体, 挑取阳性克隆测序确认。用 BamH I 和 Spe I 双酶切 pCB302-3 和 pMD18-T-GFP 质粒。回收目的片段和载体用 T4DNA Ligase 连接, 转化大肠杆菌 DH5α, PCR 检测为阳性的菌落提取质粒, 用 BamH I 和 Spe I 进行双酶切鉴定。利用电击转化法将鉴定正确的质粒 pCB302-3-GFP 转化到农杆菌 GV3101 中, -70 °C 保存备用。

1.3 pCB302-3-GFP 农杆菌瞬时表达与绿色荧光检测

首先在含有 50 mg/mL 的卡那霉素和 10 mg/mL 的利福平的 LB 固体平板培养基上画线分离含有 pCB302-3-GFP 和含有 p19 质粒的农杆菌 GV3101 单菌落。挑取单菌落在添加 50 mg/mL 的卡那霉素和 10 mg/mL 利福平的 LB 液体培养基中于 28 °C、225 r/min 培养 24 h 左右。然后从中吸取 200 μL, 加入含有相同质量浓度的卡那霉素和利福平的新鲜 LB 液体培养基中(附加 10 mmol/L MES 和 200 mmol/L 的乙酰丁香酮)继代培养。培养至

D_{600} 达 2.0 左右时离心收集菌液, 将收集的菌体悬浮于 10 mmol/L MES、10 mmol/L MgCl₂、200 mmol/L 的乙酰丁香酮混合液中 (pH 5.7), 将其浓度调成 D_{600} 分别为 0.6、0.8、1.0 和 1.2, 再将不同浓度的菌液分别和含 p19 基因质粒的农杆菌菌液等体积混合, 室温放置 2 h, 然后用不带针头的 1 mL 注射器从叶背面将菌液缓慢注入烟草叶片中, 当菌液完全浸润整个叶片时停止。每个浓度梯度注射 5 株各 4 片叶, 注射完毕后烟草放入培养室中培养, 2、3、4、5 和 6 d 后每个处理分别剪取 4 片叶在 Olympus SZX12 荧光解剖显微镜下观察绿色荧光强度, 每个叶片观察 5 个视野并拍照, 试验重复观察 3 次。

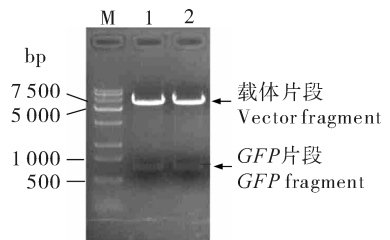
1.4 绿色荧光检测定量分析

用 Image J 软件^[12] 打开需要分析的荧光图片, 按“Image-Adjust-Color Threshold”步骤, 依次调整相应的参数, 再“Analyze Particles”, 即可得到各图片的相对荧光强度。

2 结果与分析

2.1 pCB302-3-GFP 载体的构建

以 pFF19 质粒为模板, pCB-GFP-F 和 pCB-GFP-R 为引物, PCR 扩增出与预期大小一致 (720 bp) 的条带, pMD18-T-GFP 质粒测序确认为 GFP 基因, 无突变。GFP 编码区插入 6.5 kb pCB302-3 相应酶切位点, 阳性转化子抽提质粒后 BamH I 和 Spe I 双酶切鉴定正确 (图 2), 将该载体命名为 pCB302-3-GFP。最后将 pCB302-3-GFP 转化到农杆菌 GV3101 中用于农杆菌注射。



M: Trans 15k DNA 标记; 泳道 1、2 为载体的双酶切产物。2 个箭头分别所示载体和 GFP 酶切片段。M: Trans 15k molecular marker; Lane 1, 2 pCB302-3-GFP vector was digested by enzymes. Two arrows indicate fragments of digested vector and GFP respectively.

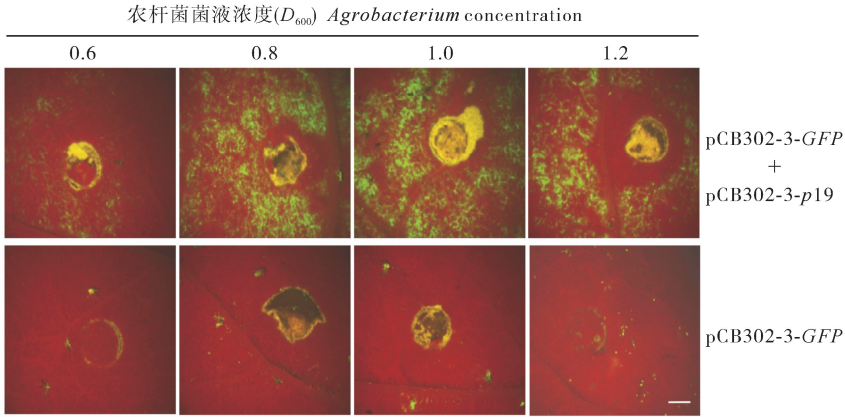
图 2 pCB302-3-GFP 载体双酶切鉴定

Fig. 2 Confirmation of pCB302-3-GFP plasmid by enzyme double digestion

2.2 RNA 沉默抑制子 p19 对 GFP 表达的影响

为了初步确定 pCB302-3-GFP 农杆菌瞬时表达的基本条件,本研究在同一株本氏烟的同一叶片选 4 个点注射不同浓度农杆菌菌液,另一叶片上选 4 个点共同注射含有 pCB302-3-GFP 质粒不同浓度农杆菌和含有番茄丛矮病毒基因沉默抑制子 p19 基因的表达载体农杆菌菌液,观察不同浓度农杆菌菌液和 p19 沉默抑制子对 GFP 表达的影响。从图 3 可以看出, p19 沉默抑制子对 pCB302-3-GFP 载

体 GFP 瞬时表达具有十分明显的影响,在没有 p19 的情况下,GFP 荧光强度显著下降,即便在农杆菌菌液浓度 D_{600} 达 1.2 时,荧光强度依然很弱。而共同表达 p19 沉默抑制子的 4 个农杆菌浓度处理中,都能观察到明显的绿色荧光,且随着农杆菌浓度的增加,GFP 的荧光强度有增强的趋势。以上结果显示, pCB302-3-GFP 载体能够实现瞬时表达。同时,沉默抑制子对于 GFP 荧光具有明显的增强作用。



上:同一叶片上 4 个点渗透注射不同浓度农杆菌菌液(pCB302-3-GFP+pCB302-3-p19)3 d 注射点周围的荧光强度;下:同一植株另一叶片上 4 个点渗透注射不同浓度农杆菌菌液(pCB302-3-GFP)3 d 后的荧光强度。GFP expression around four infiltration sites in same *N. benthamiana* leaf 3 d after infiltration by different optical density of *Agrobacterium* suspension co-infiltrated with p19 (upper 4 pictures) or without p19 (lower 4 pictures). Bar=2 mm.

图 3 不同浓度农杆菌菌液和沉默抑子 p19 对 GFP 表达的影响

Fig. 3 Effects of optical density of *Agrobacterium* and p19 GFP expression level

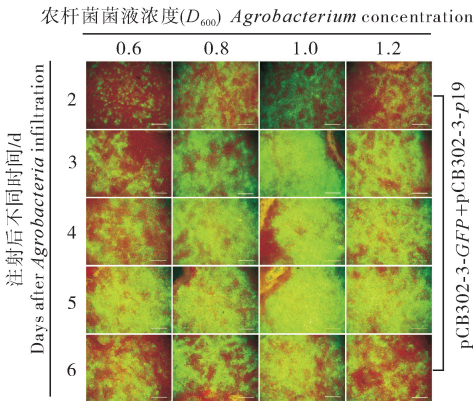


图 4 不同菌液浓度注射本氏烟叶片后不同时间点的荧光图像

Fig. 4 GFP expressions in *N. benthamiana* leaves infiltrated by different optical density of *Agrobacterium* at different days after infiltration (Bar=500 μ m)

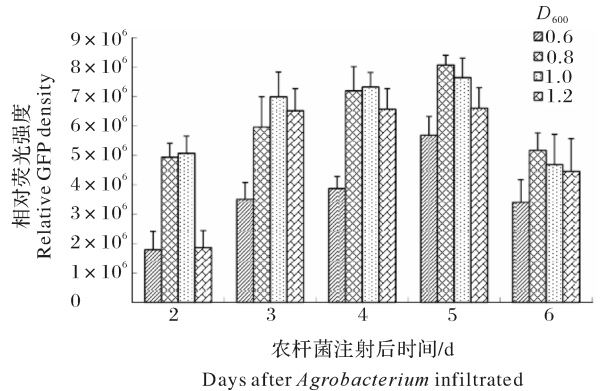


图 5 不同浓度菌液注射本氏烟草叶片后 GFP 相对荧光强度

Fig. 5 Relative GFP densities detected by Image J software in *Agrobacterium* infiltrated *N. benthamiana* leaves

2.3 不同菌液浓度及侵染时间对 GFP 瞬时表达效率的影响

设置4个农杆菌菌液 D_{600} 值(0.6、0.8、1.0和1.2),同时共同表达 $p19$,依次观察注射后2、3、4、5和6 d的GFP荧光强度,以期找到最佳浓度和表达时间组合。荧光强度观察(图4)结果显示,注射2 d后各菌液浓度本氏烟叶片上均可以观察到GFP的表达,但荧光强度差别明显;总体上,随着农杆菌菌液浓度增加,荧光呈现增强趋势,但是当菌液浓度 D_{600} 达到1.2时,荧光强度反而下降;随着侵染时间的延长,荧光强度也表现出增强趋势,但是到第5天后荧光强度表现出下降趋势;当农杆菌菌液 D_{600} 达到0.8时,侵染3 d就能观察到比较强的荧光。从图4中可以明显看出,农杆菌菌液 D_{600} 值为0.8和1.0、侵染后3~5 d,烟草叶片都能表现出很强的荧光。而农杆菌菌液浓度过高(D_{600} 值为1.2)或过低(D_{600} 值为0.6)GFP的表达效率都会受到影响。在本研究中,用 D_{600} 值为1.2的农杆菌菌液注射后,叶片有泛黄现象,表明高浓度农杆菌可能对叶片造成一定程度的伤害。用Image J软件对不同处理的GFP绿色荧光强度进行量化处理结果(图5)显示,适宜的农杆菌菌液浓度和时间与图4中观察到的结果一致。综上所述,就本研究结果而言,瞬时表达的适宜农杆菌菌液浓度 D_{600} 值为0.8~1.0,瞬时表达率最理想的时间是注射后3~5 d。

3 讨论

本研究以GFP为报告基因,通过检测荧光强度,探索了pCB302-3作为植物瞬时表达载体的理想表达条件。该载体约6.5 kb,较一般的植物表达载体小,具有多克隆位点,易于插入外源基因。本研究构建过程中测序结果显示(图1),该载体多克隆位点(CMS2)的酶切位点顺序与原始文献^[12]报道相反,实际上BamHI紧邻 Ω 增强子元件,以后应用需引起注意。瞬时表达要依赖于外源基因在植物细胞内高效表达来实现。这种高效表达一方面可以通过高拷贝来实现,例如病毒载体是利用病毒的高效复制来实现外源基因的高效表达^[10];另一方面也可以通过强启动子和增加启动子增强元件驱动外源基因表达来实现。pCB302-3载体含有组成型强启动子CaMV35S,同时其后接有 Ω 增强子元件,理论上更有利于外源基因的高效表达。研究结果显示pCB302-3载体瞬时表达晚疫病病菌无毒基因和对

应的抗病基因互作时,无需共注射沉默抑制子 $p19$ 基因,表明该载体可以作为研究基因互作的有效瞬时表达载体^[13]。基因沉默抑制子 $p19$ 蛋白能够显著增强基因瞬时表达效率^[14]。本研究中,在没有共注射 $p19$ 基因载体农杆菌时,本氏烟叶片上绿色荧光表达强度都很弱,但共同注射 $p19$ 载体能够显著增强荧光强度(图3)。本研究结果表明,要研究与信号传导有关的基因,不一定要求很高的表达量,瞬时表达此类基因无需共注射沉默抑制子 $p19$;而要求外源基因有很高的表达量,例如利用烟草叶片瞬时表达进行植物活体免疫共沉淀时,就需要共同注射基因沉默抑制子 $p19$,来提高瞬时表达效率。利用农杆菌菌液注射技术实现基因瞬时表达时,农杆菌菌液浓度对表达效果具有显著影响^[1]。从本试验结果来看,农杆菌菌液浓度 D_{600} 由0.6增加到1.0时,总体上绿色荧光强度增强(图4),但是当 D_{600} 达到1.2时,本氏烟叶片上的荧光强度有下降趋势。我们注意到当 D_{600} 值为1.2,菌液注射4 d后叶片稍微发黄,表明高浓度农杆菌可能造成叶片伤害,从而影响外源基因的表达。本研究结果显示,农杆菌注射叶片后随着侵染时间的延长,荧光强度表现出增强趋势,但是6 d后荧光强度出现下降趋势(图5),表明农杆菌注射后外源基因有一个最佳的表达时期。就本研究而言,农杆菌菌液浓度 D_{600} 为0.8~1.0、注射后3~5 d,本氏烟叶片能表现出很强的荧光。本研究结果表明,通过共同注射基因沉默抑制子 $p19$ 基因、调整合适的农杆菌菌液浓度,利用植物二元表达载体 pCB302-3 能够在本氏烟叶片中一定时期实现外源基因瞬时高效表达。因此,该载体可用于植物活体免疫共沉淀、外源基因瞬时表达及基因功能快速鉴定等相关研究,笔者所在实验室正在利用该载体进行植物活体免疫共沉淀研究。

参 考 文 献

- [1] 邱初,陶刚,李奇科,等.农杆菌渗入法介导的基因瞬时表达技术及应用[J].分子植物育种,2009,7(5):1032-1039.
- [2] WROBLEWSKI T, TOMCZAK A, MICHELMORE R. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis* [J]. Plant Biotechnol J, 2005, 3(2):259-273.
- [3] WERR W, LÖRZ H. Transient gene expression in a *Gramineae* cell line: a rapid procedure for studying plant promoters[J].

- Mol Gen Genet, 1986, 202(3):471-475.
- [4] ZOTTINI M, BARIZZA E, COSTA A, et al. Agroinfiltration of grapevine leaves for fast transient assays of gene expression and for long-term production of stable transformed cells[J]. Plant Cell Rep, 2008, 27(5):845-853.
- [5] VAN DER HOORN R A, LAURENT F, ROTH R, et al. Agroinfiltration is versatile tool that facilitates comparative analysis of Avr9/C-9-induced and Avr4/Cf-4-induced necrosis[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2000, 13(41):439-446.
- [6] SCHOLTHOF K B, MIRKOV T E, SCHOLTHOF H B. Plant virus gene vectors: biotechnology applications in agriculture and medicine[J]. Genet Eng (NY), 2002, 24:67-85.
- [7] CAÑIZARES M C, NICHOLSON L, LOMONOSSOFF G P. Use of viral vectors for vaccine production in plants[J]. Immunol Cell Biol, 2005, 83(3):263-270.
- [8] KOMAROVA T V, BASCHIERI S, DONINI M, et al. Transient expression systems for plant-derived biopharmaceuticals[J]. Expert Rev Vaccines, 2010, 9(8):859-876.
- [9] LINDBO J A. High-efficiency protein expression in plants from Agroinfection-compatible Tobacco mosaic virus expression vectors[J]. BMC Biotechnology, 2007, 7:52.
- [10] MARILLONNET S, THOERINGER C, KANDZIA R, et al. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants[J]. Nat Biotechnol, 2005, 23(6):718-723.
- [11] XIANG C, HAN P, LUTZIGER I, et al. A mini binary vector series for plant transformation[J]. Plant Mol Biol, 1999, 40(4):711-717.
- [12] COLLINS T J. ImageJ for microscopy[J]. Bio Techniques, 2007, 43(1 Suppl):25-30.
- [13] SONG J, WIN J, TIAN M, et al. Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(5):1654-1659.
- [14] VOINNET O, RIVAS S, MESTRE P, et al. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus[J]. Plant J, 2003, 33(5):949-956.

Optimizing agroinfiltration-mediated transient expression in *Nicotiana benthamiana* using pCB302-3 vector

SUN Chun-lian WANG Hong-yang TIAN Zhen-dong

Key Laboratory of Horticultural Plant Biology (HZAU), Ministry of Education/
National Center for Vegetable Improvement (Central China)/
Potato Engineering and Technology Research Center of Hubei Province,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract pCB302-3 is a plant mini-binary stable transformation vector. To investigate the transient expression of pCB302-3 vector in plant, *GFP* was inserted into pCB302-3 vector as a reporter gene, and various factors including density of *Agrobacterium* cell, supplementation of gene silencing suppressor p19 and days post infiltration were optimized based on agroinfiltration method in *Nicotiana benthamiana* leaves. Results showed that high levels of *GFP* expression were observed in *N. benthamiana* leaves 3-5 d after infiltration by *Agrobacterium* cell suspension contained pCB302-3-*GFP* with an optical density (D_{600}) of 0.8-1.0 co-infiltrated with p19 gene.

Key words pCB302-3 vector; transient gene expression; agroinfiltration; *Nicotiana benthamiana*; gene silencing suppressor p19; *GFP*

(责任编辑:张志钰)