

农杆菌介导的怀山药叶片瞬时表达方法的建立

韩林林^a, 李俊华^{a,b,c}, 赵喜亭^{a,b,c}, 张晓丽^a, 宋志辉^a, 刘世宇^a, 李明军^{a,b,c}

(河南师范大学 a. 生命科学学院; b. 河南省绿色药材生物技术工程实验室;
c. 河南省高校道地中药材保育及利用工程技术研究中心, 河南 新乡 453007)

摘要:高效的瞬时表达体系是方便、快捷的研究怀山药基因启动子活性、基因功能和生产重组蛋白的新途径。本研究选取怀山药叶片为受体,以 β -葡糖醛酸酶(GUS)和绿色荧光蛋白(GFP)的基因为报告基因,对共培养时间进行分析,得到二者瞬时表达的最初时间以及较佳观察时间,建立根癌农杆菌介导的怀山药瞬时表达技术体系。结果显示:当注射的菌液浓度 $OD_{600}=0.6$,共培养3 d时,GUS基因和GFP基因开始有表达,二者适于观察的共培养时间分别为5 d和4 d。

关键词:怀山药;叶片;瞬时表达;GUS;GFP

中图分类号:Q943.2

文献标志码:A

怀山药(*Dioscorea opposita* Thunb.)又称薯蓣,是薯蓣科(*Dioscorea*)薯蓣属多年生缠绕草质藤本植物,为著名的“四大怀药”之一,主产于河南温县、武陟等地,铁棍山药(*D. opposita* cv. tiegun)是怀山药中的极品,药食兼优,具有降糖降脂、健脾、补肺等功效,其产品畅销国内外^[1]。

植物中的瞬时表达(transient expression)是基因功能鉴定的有效方法,与稳定遗传转化体系相比,瞬时表达具有较多的优点。一、简单快速:操作简单,不需要经过组织培养过程,可在一周内分析转化的基因;二、表达水平高;三、安全:由于被转基因未整合到基因组中,不产生可遗传的后代,避免了基因漂移的生态风险^[2]。 β -葡糖醛酸酶(β -glucuronidase, GUS)和绿色荧光蛋白(*green fluorescent protein*, GFP)基因作为报告基因,被广泛地应用在植物瞬时表达体系中。目前,在月季^[3]、烟草^[4]、拟南芥^[5]、莴苣^[2]、番茄^[5]、大豆^[6]、小麦^[7]、刘易斯猴面花^[8]等植物中,以GUS和GFP为报告基因,已建立瞬时转化体系。与怀山药同属于薯蓣科的大薯^[9]、紫参薯^[10]、黄山药^[11]已建立稳定遗传转化体系,同时,以大薯类原球茎为材料对GUS基因的瞬时表达已有研究。

本研究以怀山药叶片为材料,采用农杆菌注射的方法,以GUS和GFP作为报告基因,建立瞬时转化方法,研究怀山药叶片瞬时表达的最初时间以及较佳观察时间,以期作为山药基因功能鉴定奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

以铁棍山药零余子萌发后7~14 d的幼苗叶片为实验材料。

1.2 实验试剂

50 mg·mL⁻¹硫酸卡那霉素(Kanamycin sulfate, Kan);50 mg·mL⁻¹利福平(Rifampicin, Rif);1 mol·

收稿日期:2016-05-20;修回日期:2016-10-1。

基金项目:国家自然科学基金项目(81274019);国家“十二五”科技重大专项子课题(2012ZX09304006-014);国家中医药管理局中医药行业科研专项子课题(201407005-08);河南省创新型科技人才队伍建设工程(C20130037)。

第1作者简介:韩林林(1991—),女,河南孟州人,河南师范大学硕士研究生,研究方向为药用植物生物技术,E-mail: m15893863122_1@163.com

通信作者:李明军(1962—),男,河南温县人,教授,博士,长期从事药用植物生物技术研究与应用,E-mail: limingjun2002@263.net。

L^{-1} 2-(N-吗啉代)乙磺酸[2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, MES](pH5.6);100 mmol· L^{-1} 乙酰丁香酮(Acetosyringone, AS);10 mmol· L^{-1} $MgCl_2$;GUS 染液:50 mmol· L^{-1} Na_3PO_4 (pH 7.2),10 mmol· L^{-1} Na_2EDTA ,0.5 mmol· L^{-1} $K_3[Fe(CN)_6]$,0.5 mmol· L^{-1} $K_4[Fe(CN)_6]$,0.1% Triton,20 mmol· L^{-1} X-gluc.

1.3 菌株与载体

所用根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)为 EHA105 菌株,由河南师范大学梁卫红老师惠赠;植物表达载体 pCAMBIA1301 购于郑州久是生物公司,植物表达载体 pCAMBIA1300 由中国农业大学观赏园艺与园林系观赏植物采后与逆境生理实验室惠赠。

采用冻融法^[12]将携带 35S:GUS 的载体质粒 pCAMBIA1301 和携带 35S:GFP 的载体质粒 pCAMBIA1300 转入农杆菌。

1.4 实验方法

1.4.1 农杆菌菌液制备

将分别含有 pCAMBIA1301 和 pCAMBIA1300 的农杆菌在含有 50 mg· L^{-1} Kan 和 50 mg· L^{-1} Rif 的 LB 固体培养基上划线,28℃ 培养 30 h. 挑取单菌落于含相应抗生素的 1 mL LB 液体培养基中,28℃、180 r· min^{-1} 震荡过夜. 按 1:100(V/V) 比例取活化菌液接种于 20 mL 附加相应抗生素的 LB 液体培养基中,加入 1 mmol· L^{-1} MES 和 4 μ mol· L^{-1} AS,28℃、180 r· min^{-1} 震荡培养至 OD_{600} 为 0.6. 将菌液于 4000 r· min^{-1} 离心 15 min,用 10 mmol· L^{-1} $MgCl_2$ 悬浮菌体沉淀,调节 OD_{600} 为 1.0,加入 4 μ mol· L^{-1} AS,震荡混匀。

1.4.2 叶片注射及培养

挑取生长一致且状态良好的铁棍山药幼苗(图 1A),用蒸馏水清洗叶子背面,并用吸水纸吸干水分. 用注射器针头在叶子背面扎数个小孔,针头不能穿透叶片,然后用去掉针头的一次性注射器吸取菌液,在叶背小孔处轻推注射器,使菌液沿小孔渗入叶片(图 1B-C),注射后将山药幼苗置于光下共培养. 以未注射山药幼苗为对照,置于相同光照条件下培养。

1.4.3 GUS 染色检测

取对照及共培养 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d 和 7 d 的铁棍山药叶片,用蒸馏水清洗后置于 GUS 染液中,37℃ 过夜. 除去染液,将叶片用系列梯度乙醇溶液(50%,75%,90%)脱色处理,每级 30 min,直至叶片脱色完全,在体视显微镜下观察染色结果。

1.4.4 荧光显微镜下观察 GFP 的表达量

取对照和共培养 1~7 d 的叶片,用蒸馏水清洗叶片,将叶片剪成 5 cm×5 cm 大小,盖上盖玻片,在荧光显微镜下观察叶片背面表皮细胞 GFP 基因的表达情况。

2 结果与分析

2.1 共培养时间对 GUS 基因瞬时表达的影响

不同的共培养时间影响 GUS 基因的表达量. 实验结果如图 1 所示,未注射叶片培养 1~5 d 均没有 GUS 基因的表达(图 1-D,E). 注射后的叶片共培养 1~2 d 时,没有检测到 GUS 活性(图 1-F,G),共培养 3~4 d 时,少量叶片中可以观察到 GUS 基因表达,但表达量较少(图 1-H,I). 当共培养至第 5 d 时,GUS 基因表达量明显提高,染色效果较好(图 1-J). 随着共培养时间增加至第 7 d,GUS 基因表达量与第 5 d 的表达量没有明显差异(图 1-K,L). 因此,转化后共培养第 5 d 为较佳观察时间。

2.2 共培养时间对 GFP 基因表达量的影响

如图 2 所示,未注射叶片没有 GFP 的表达(图 2-A,B),共培养 1~2 d 时,GFP 没有表达(图 2-C,D),共培养 3 d 时,GFP 有微量表达(图 2-E),共培养 4 d 时,可以明显观测到 GFP 的表达(图 2-F),随着共培养天数增多,即第 5 d、6 d、7 d,GFP 的表达量有微量的增加,但与第 4 d 差异不大(图 2-G~I). 因此,可观察到 GFP 表达的时间是转化后 3 d,较佳观察时间为转化后 4 d。



(a)生长良好的叶片; (b)叶片注射; (c)注射后叶片; (d)-(e)未注射叶片培养1 d和5 d的GUS染色结果(对照); (f)-(l):分别为注射后1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d和7 d的GUS染色结果。

图1 铁棍山药叶片GUS基因瞬时表达组织化学染色结果

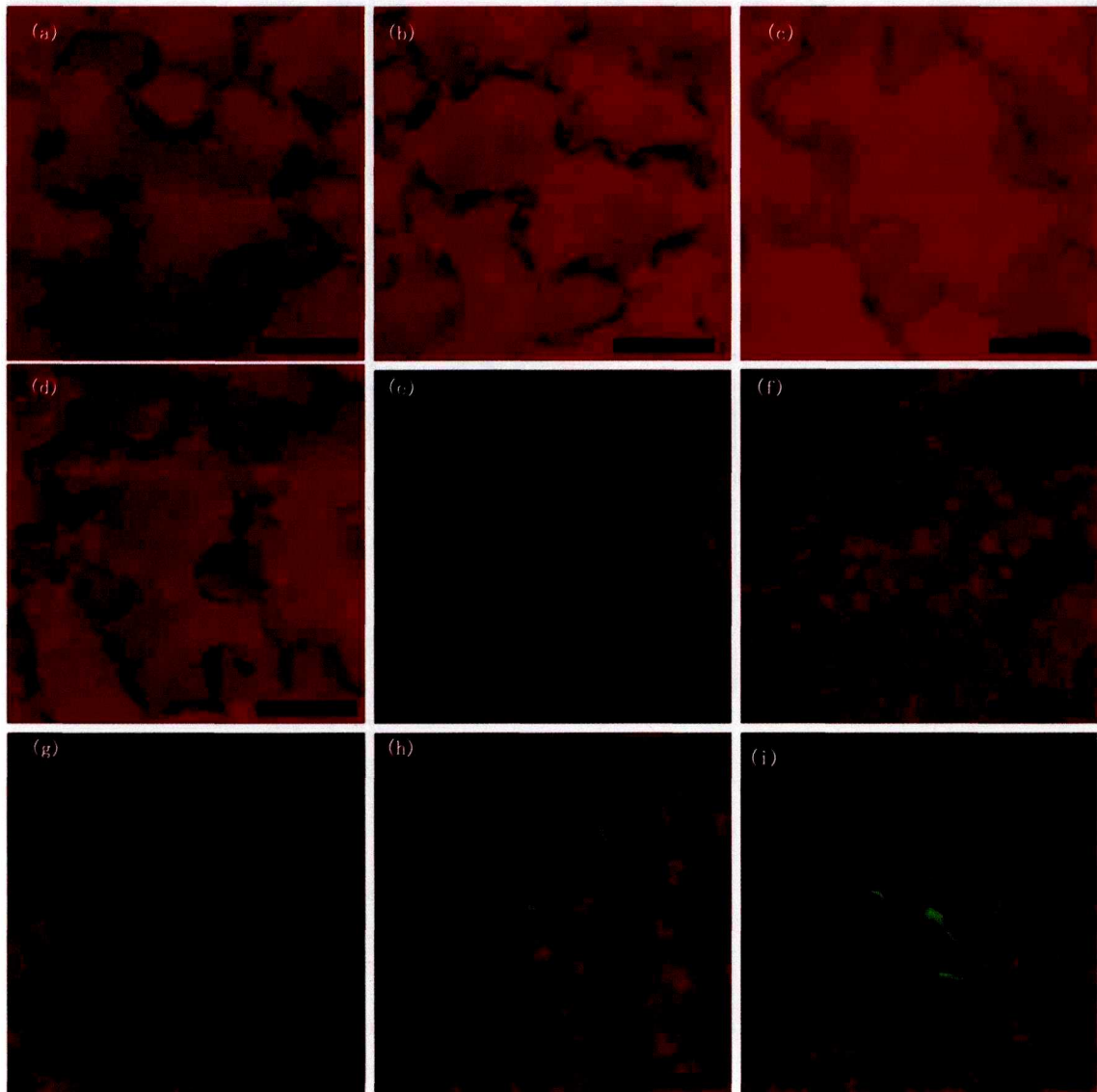
3 讨论

瞬时表达作为一种重要的研究手段,主要应用在启动子分析、蛋白质亚细胞定位、基因互作和生产重组蛋白等方面,其不受基因位置效应和基因沉默的影响,表达效率较稳定,转化率高^[13]。因此,在分子生物学研究中被广泛应用。

目前,植物瞬时表达系统根据操作方法可分为PEG法、基因枪法、农杆菌介导法和病毒介导法等^[14]。1993年瑞典科学家Rossi等创立了农杆菌介导法^[15],采用真空渗透方法,利用农杆菌的转化机制,将外源基因导入植物细胞并实现了外源基因的瞬时表达。目前常采用注射器注射法代替真空渗透法,此方法更加方便与实用^[16]。

孵育时间即植物侵染农杆菌后外源基因在宿主细胞内瞬时表达直到取样检查的一段时间。若要取得较好的表达效果,孵育时间不能过短或过长。如时间过短,外源基因还未开始表达或者表达量不够;如时间过长,表达产物由于降解而得不到理想效果。同时,农杆菌侵染后,诱导植物启动自身防御系统,容易产生过敏

反应,导致植物坏死^[5].本实验中,共培养1~2 d时,未能检测到GUS和GFP基因的表达;共培养时间达17 d时,叶片枯萎,较难进行外源基因表达的检测.



(a)–(b): 未注射叶片培养1 d和5 d后GFP表达情况(对照); (c)–(i): 注射1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d后GFP表达情况。标尺: 50 μm 。

图2 GFP基因在铁棍山药叶片中的瞬时表达

瞬时转化中常用的报告基因是GUS和GFP.在已有研究中,以GUS作为报告基因,不同植物所需共培养时间不同.烟草^[4]和棉花^[17]的叶片注射农杆菌后共培养2 d,可得到较多的GUS基因表达;在油菜^[18]、大豆^[6]中,注射后的子叶分别共培养4 d、3 d后,GUS活性较高;莴苣^[2]真叶共培养6 d才可以得到较高的GUS基因表达;侵染共培养3 d后的大薯^[9]类原球茎GUS染色结果明显.本实验中,共培养5 d时检测到较高的GUS活性.

GFP作为一种报告分子,在分子生物学和细胞生物学领域中得到广泛应用,常用于与目的基因组成融合蛋白,从而直接监控蛋白在细胞内的活动.金太成等的研究表明,在烟草中注射农杆菌,7 d后GFP基因在新叶中表达量达到最大^[19].本研究结果显示,山药注射共培养4 d后表达量较大.因此,与GUS类似,GFP基因的瞬时表达因背景材料不同而存在差异.

4 结 论

本实验通过对怀山药叶片瞬时表达中共培养时间的研究,确定了 *GUS* 和 *GFP* 最初可观察到表达的时间为 3 d,共培养 5 d 可观察到较高的 *GUS* 表达量,而检测到较高的 *GFP* 荧光表达量需要 4 d。

参 考 文 献

- [1] 李海兵,周娜,赵姣,等. 怀山药种质资源的包埋玻璃化超低温保存与植株再生[J]. 植物学报,2010,45(3):379-383.
- [2] 李静,陈敏,刘现伟,等. 莴苣高效瞬时表达体系的建立[J]. 园艺学报,2006,33(2):405-407.
- [3] 王磊,陈雯,刘娅,等. 月季花瓣中农杆菌介导的基因瞬时表达体系的优化及其在 RNAi 中的应用[J]. 农业生物技术学报,2014,2(22):133-140.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 刘栋,石强,王宁宁. 利用 *GUS* 基因瞬时表达大豆子叶节和胚尖转化方法的比较及优化[J]. 生物学通报,2008,43(12):35-39.
- [7] 朱元芳,校现周. 小麦连体叶片高效瞬时表达体系的构建[J]. 植物生理科学,2007,23(7):280-284.
- [8] DING Baoqing, YUAN Yaowu. Testing the utility of fluorescent proteins in *Mimulus lewisii* by an *Agrobacterium*-mediated transient assay[J]. *Plant Cell Rep*,2016,35:771-777.
- [9] 许云. 大薯遗传多样性的 AFLP 分析和类原球茎遗传转化体系的研究[D]. 海口:海南大学,2014.
- [10] 夏赞. 紫参薯再生体系的建立及遗传转化的初步研究[D]. 海口:海南大学,2012.
- [11] 顾月华,李艳. 中药植物黄山药发根基因的遗传转化[J]. 植物生理学通讯,2005,41(6):755-757.
- [12] 郭晓博. 怀山药 DoSERK2 基因的克隆、表达模式分析及其过表达载体的构建[D]. 新乡:河南师范大学,2014.
- [13] 于一帆,朱小彬,葛会敏,等. 基于绿色荧光蛋白瞬时表达的植物亚细胞定位方法[J]. 江苏农业科学,2014,42(12):58-61.
- [14] 吕彦,王平荣,孙业盈,等. 农杆菌介导遗传转化在水稻基因工程育种中的应用[J]. 分子植物育种,2005,3(4):543-549.
- [15] ROSSI L, ESCUDERO J, HOHN B. Efficient and sensitive assay for T-DNA-dependent transient gene expression[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*,1993,11(3):220-229.
- [16] 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(5):1032-1039.
- [17] 刘雪梅,王蕾,文添龙,等. 农杆菌介导的棉花子叶瞬时表达系统的建立[J]. 植物学报,2014,49(5):587-594.
- [18] 谭小力,诸葛锐军,李冠英,等. 农杆菌介导的油莱子叶瞬时表达[J]. 生物学杂志,2012,29(6):93-96.
- [19] 金大成,孟大伟,刘璐,等. 利用叶片真空侵染法表达外源蛋白 GFP[J]. 吉林农业科技学院学报,2015,24(4):40-42.

Establishment of *Agrobacterium*-mediated Transient Expression System in Leaf of *Dioscorea Opposita*

HAN Linlin^a, LI Junhua^{a,b,c}, ZHAO Xiting^a, ZHANG Xiaoli^a, SONG Zhihui^a,
LIU Shiyu^a, LI Mingjun^{a,b,c}

(a. College of Life Science; b. Engineering Laboratory of Green Medicinal Material Biotechnology, Henan Province; c. Engineering Technology Research Center of Nursing and Utilization of Genuine Chinese Crude Drugs, University of Henan Province, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Transient expression system is a new way to conveniently and efficiently studying promoter activity, gene function and producing recombination protein in *Dioscorea opposita*. An *Agrobacterium*-mediated transient expression method with *GUS* and *GFP* as reporter was established in *D. opposita*. We analyzed the expression of *GUS* and *GFP* in different culture time after leaf infiltration and studied the dynamic of transient expression. The result showed that the initial expression of *GUS* and *GFP* could be obtained after three-day of co-culture and the highest expression could be acquired after five-day and four-day, respectively.

Keywords: *Dioscorea opposita*; leaf; transient expression; *GUS*; *GFP*