

用于蛋白亚细胞定位研究的 烟草愈伤组织培养条件优化

夏玉凤

(河北师范大学 生命科学学院, 河北 石家庄 050016)

摘 要:使用绿色荧光蛋白作为报告基因来研究目的蛋白的亚细胞定位得到广泛应用. 使用稳定表达系统研究蛋白的亚细胞定位比较耗时, 但可以先选择愈伤组织进行观察以确保构建的载体能够表达. 优化了愈伤组织的培养条件, 得到了质地疏松柔软的白色愈伤, 不受叶绿体的荧光干扰, 便于进行荧光观察.

关键词:稳定表达; 亚细胞定位; 融合蛋白; 愈伤组织

中图分类号:Q 786

文献标识码:A

文章编号:1000-5854(2006)03-0343-03

以农杆菌介导法转化烟草, 用这个稳定表达系统研究目的蛋白的亚细胞定位. 由于烟草根部受叶绿体的自发红色荧光干扰较少, 适合进行荧光观察; 另外, 以根为材料进行免疫胶体金标记法进一步精确研究蛋白定位, 在实验操作方面也很方便, 所以笔者使用成苗的根进行研究, 但从转化的烟草叶片开始至长成小苗并出现根需要 2~3 个月时间, 比较耗时. 为加快实验进程, 笔者选用愈伤组织检测构建的表达载体是否能在转化材料中表达; 通过摸索组培条件, 得到了质地疏松柔软的白色愈伤, 适合荧光观察, 在较短时间内检测出载体表达, 为后续实验打下坚实的基础.

1 材料与方法

1.1 材 料

E. coli DH5 α , 农杆菌 LBA4404, 质粒 pBI-121, pBI-F12-GFP, 烟草 (*Nicotiana tabacum* Xanthi) 由中国农业大学农业生物技术国家重点实验室植物基因工程室提供.

1.2 载体构建

pBI-F12-GFP 载体构建参照文献[1], 农杆菌感受态制备、表达载体转入农杆菌参考文献[2].

1.3 实验中所用的培养基

MS 培养基(1 L): MS 大量元素、微量元素、有机物, 30 g 蔗糖, 8 g 琼脂, pH 5.8.

烟草分化培养基: MS 培养基 + 3 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 100 mg/L 卡那霉素(Kan) + 500 mg/L 羧苄青霉素(Cb), pH 5.8.

1.4 烟草转化

1) 烟草叶片的无菌处理: 取温室生长的烟草叶片, 流水下冲洗掉表面杂物, 再用蒸馏水洗涤; 700 mL/L 的乙醇灭菌 30 s 后, 无菌水冲洗 1 次; 用稀释 4 倍的市售安替福尼处理 8~10 min, 无菌水冲洗 3 次, 备用.

2) 无菌的烟草叶片切去边缘和主要叶脉, 切成 0.4 cm $\times$ 0.6 cm 大小.

3) 切好的外植体在农杆菌菌液中浸泡 10 min.

收稿日期: 2005-10-31; 修回日期: 2005-12-12

基金项目: 国家转基因植物与产业化专项基金资助(JY03A14-01)

作者简介: 夏玉凤(1972-), 女, 河北省藁城市人, 河北师范大学讲师, 博士, 主要从事分子生物学领域植物基因工程研究, 已在生化与分子生物学领域发表多篇文章.

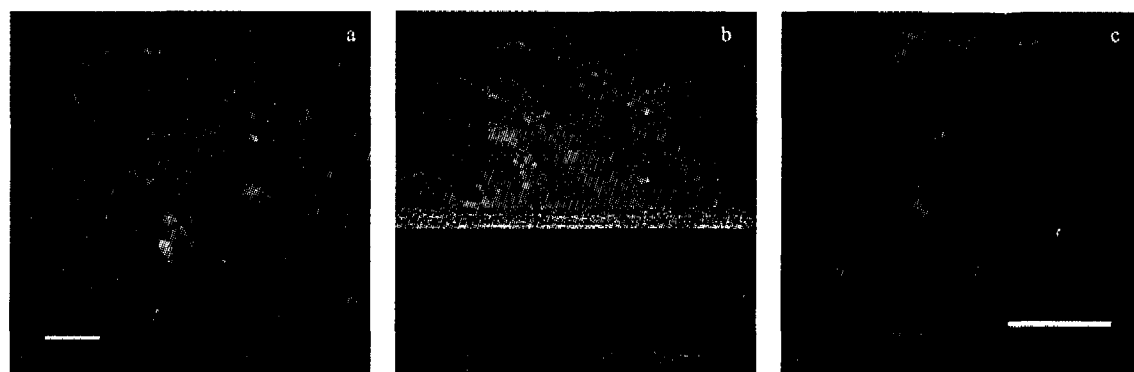
4) 用无菌滤纸吸干植物材料表面的菌液,转入上铺一层滤纸的 MS 基本培养基,28℃暗培养。

1.5 荧光观察

取小块愈伤组织置载玻片上,滴加一滴 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0),盖上盖玻片,用镊子轻敲盖玻片直至愈伤分散开。将上述处理的愈伤置 Olympus B51 荧光显微镜下,以 488 nm 光激发, Olympus DP70 相机拍照。

2 结 果

农杆菌侵染的烟草叶片在分化培养基上见光培养 20 d 左右(温度 28℃)长出愈伤,但愈伤非常致密坚硬。用这样的愈伤组织进行压片,不容易离散开细胞,并且盖玻片经常被压碎,而且这样的愈伤组织中叶绿体的自发荧光很强,不便于观察绿色荧光蛋白(GFP)的绿色荧光。荧光检测结果见图 1a、图 1b。图 1a 为转化空载体 pBI-121 的对照烟草愈伤,没有 GFP 的绿色荧光,只观察到叶绿体自发红色荧光以及少量的黄绿色自发荧光;而图 1b 为转融合基因 F12-GFP 的烟草愈伤,可以看到叶绿体自发红色荧光,同时能够看到细胞内 GFP 的绿色荧光,但效果不明显。将与农杆菌共培养 3 d 的烟草叶片直接转移到含有 0.6 mg/L 2,4-D,100 mg/L Kan,500 mg/L Cb 的 MS 培养基,培养 12 d 左右,结果发现烟草圆片均褐化,不能分化出愈伤组织。把共培养的烟草叶片先在分化培养基上培养 10 d 左右,这时叶片边缘长出非常小的愈伤;把这样的叶片转移至含有 0.6 mg/L 2,4-D,100 mg/L Kan,500 mg/L Cb 的 MS 培养基,避光培养 10 d 后得到了疏松柔软的白色愈伤。取小块愈伤在荧光镜下观察,结果如图 1c。图 1c 是在避光条件下的愈伤,可以看到有明显绿色荧光,图片比较清晰,并且没有明显的叶绿体自发的红色荧光干扰。这一实验表明,该组织培养方法的优化效果是比较明显的,适合荧光观察。本次实验也证明所构建的载体转入烟草后,能够发出荧光,可用来进行后续的研究工作。



a 转 pBI-121 载体的烟草愈伤组织; b 光照条件下生长的转 pBI-F12-GFP 载体的烟草愈伤组织,其培养基中含有 3 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA; c 暗培养的转 pBI-F12-GFP 载体的烟草愈伤组织,其培养基中含有 0.6 mg/L 2,4-D; 标尺 = 20 μ m。

图 1 荧光检测融合蛋白在愈伤组织的表达

3 讨 论

gfp 用作报告基因有众多优点:比较稳定并且分子量小,易于与其他目标基因构建在一起表达融合蛋白;灵敏度高,易检测并且是活体检测,对细胞组织不具破坏性;在活体内表达不受生物类型、基因型、细胞和组织类型的限制;不需任何底物和外源辅因子参与^[3]。随着 GFP 在植物中的应用和改进,越来越多的研究人员用 *gfp* 为报告基因研究细胞生理。另外,给目的蛋白加上 GFP 标签后,可以使用 GFP 单克隆抗体以免疫胶体金标记的方法对目的蛋白进一步精确定位。如果不给目的蛋白加标签,则需要自己制备目的蛋白的抗体,才能做免疫胶体金标记。尽管 *gfp* 用做报告基因存在一定的局限性(比如 GFP 的检测受背景荧光和光漂白现象的限制),但鉴于它在生物学研究中的极大优越性,仍选择 *gfp* 作为报告

基因来研究目的蛋白的亚细胞定位。

由于用瞬时表达研究亚细胞定位省时、省力、经济,所以不少实验室在做稳定表达之前,往往先做瞬时表达以观效果,检查载体是否能表达。笔者也曾经尝试用农杆菌法转化洋葱表皮作瞬时表达,但最终未得到有明显荧光的细胞。

Akane 等使用基因枪轰击烟草悬浮细胞(TBY2)做瞬时表达、用农杆菌转化植株进行稳定表达,他们想用这2个表达体系来研究CAT1(过氧化物酶)系列缺失区段的亚细胞定位,却得到了相互矛盾的结果。他们建议瞬时表达系统不太适合定位信号研究,认为在瞬时表达系统,蛋白表达过量可能会造成蛋白从胞器溢出^[4]。因此,笔者实验使用稳定表达系统研究目的蛋白的定位。

在实验中,通过调节培养基成分及避免光照,得到的愈伤质地非常疏松。由于在避光条件下培养,愈伤中几乎没有叶绿体形成,避免了干扰,并且这样的愈伤可以保持20 d左右的时间而不分化,适合于荧光观察,为后续研究工作提供了保证。

衷心感谢中国农业大学农业生物技术国家重点实验室植物基因工程室的教光明教授、赵倩副教授、于静娟副教授的指导和帮助。

参考文献:

- [1] 夏玉凤,赵倩,于静娟,等. PF40 的亚细胞定位研究 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2005, 32(11): 1 020-1 025.
- [2] 王关林,方宏筠. 植物基因工程原理与技术 [M]. 北京:科学出版社, 1998.
- [3] 汪恒英,周守标,常志州,等. 绿色荧光蛋白(GFP)研究进展 [J]. 生物技术, 2004, 14(3): 70-73.
- [4] AKANE Kamigaki. Identification of peroxisomal targeting signal of pumpkin catalase and the binding analysis with PTS1 receptor [J]. Plant Journal, 2003, 33: 161-175.

Optimizing the Tobacco Callus Culture Condition to Study Protein Subcellular Localization

XIA Yu-feng

(College of Life Science, Hebei Normal University, Hebei Shijiazhuang 050016, China)

Abstract: GFP is widely used as a report gene to study protein subcellular localization. It is time-consuming to study protein subcellular location using stable expression system. However people could select callus as materials to verify whether the constructed vector could be expressed in a short time. The callus culture condition was optimized. White and soft callus were obtained. They are fitful to be observed under fluorescence microscope, having no interference of chloroplast.

Key words: stable expression; subcellular localization; fusion protein; callus

(责任编辑 柴 键)