

线粒体定位序列介导的绿色荧光蛋白 基因在烟草中表达的分析*

贺竹梅¹, 李华平¹, 陈 谷¹, 黄定华², 李志芳², 刘荣维², 李宝健¹

(1. 中山大学基因工程教育部重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 深圳农科中心花卉技术应用研究所, 广东 深圳 518040)

摘 要: 由于绿色荧光蛋白可在活组织或细胞中直接检出, 因而近年已在转基因植物的研究中用作报告基因, 这样可在植物生长的任何阶段进行活体筛选和鉴定。本研究利用线粒体定位序列对改良 *gfp* 基因在转基因烟草中的表达进行了观察, 结果表明: 将 GFP 直接在细胞质中大量表达会对植物细胞产生毒性, 从而影响植物细胞的分化, 而将其定位在线粒体中, 则从转化细胞产生植株的频率明显增高。

关键词: 改良绿色荧光蛋白; 线粒体定位序列; 烟草

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2002) 03-0048-04

近年来在转基因动植物的研究中, 常使用从水母 (*Aequorea victoria*) 来源的绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 作为报告基因^[1,2]。GFP 是荧光编码在氨基酸内的惟一蛋白质, 它在异源细胞内可自发形成生色基团而无需特殊的辅助因子, 但野生型 GFP (wtGFP) 的荧光强度偏低, 而且其发射光谱也不适合一些仪器如传统的荧光显微镜或 FACS (fluorescence activated cell sorter) 的检测^[3]。为增强 GFP 的荧光强度或光谱特性, 提高其在真核生物细胞中的表达强度, 许多作者对 *gfp* 基因进行了改良。Heim 等^[4] 将 Ser 65 分别突变成为 Ala、Leu、Cys、Thr, 发现突变体都在 470 ~ 490 nm 处有单一的吸收峰, 荧光强度比 wtGFP 增加 4 ~ 6 倍, 且 Ser 65 Thr 突变株 (S65T) 的吸收 (490 nm) 和发射 (510 nm) 波长均有所增加, 且翻译后氧化形成生色基团的速度也提高了 4 倍。本研究所用突变体含有 S65T 位的突变^[5]。本研究对这一改良 GFP 突变体在转基因烟草细胞及线粒体中的表达情况进行了观察, 以期 GFP 在转基因植物中的利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材 料

实验所用烟草品种为 N-28 (*Nicotiana tabacum* cv. N-28)。大肠杆菌 (*Escherichia coli*)

菌株为 Top10; 农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株为 LBA4404。质粒 pRHK2 和 pRHK4 由 Rainer H. Kohler 惠赠^[5]。

1.2 质粒 pRHK2 与 pRHK4 的鉴定

根据质粒图谱提供的酶切位点, 分别用 *EcoRI* + *HindIII* 双酶切后, pRHK2 出现 11 kb 及 1.7 kb (35S35SAMV + *mgfp4* + NOS) 二条带; pRHK4 出现 11 kb 及大约 1.9 kb (35S35SAMV + *coxIV* + *mgfp4* + NOS) 的片段, 该质粒带有线粒体定位序列 *coxIV*。二者均与原始图谱相符 (图 1)。用直接导入法将这二个植物表达载体转入农杆菌 LBA4404 中。

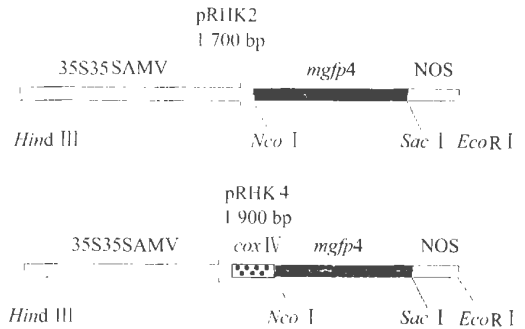


图 1 植物表达载体 pRHK2 和 pRHK4 的结构示意图

Fig 1 Schematic diagram of plant expression vectors pRHK2 and pRHK4 used for tobacco transformation

1.3 植物转化

选取在 MS 培养基上生长的烟草试管苗健壮叶

* 收稿日期: 2001-11-01

基金项目: 国家转基因植物研究与产业化专项 (J00-A-009) 资助项目; 广东省自然科学基金资助项目 (980310); 深圳市科技计划资助项目

作者简介: 贺竹梅 (1962-), 男, 博士, 副教授; E-mail: lsshezm@zsu.edu.cn

片, 用打孔器将其打成 5 mm 直径叶圆片, 放入 MS+BA (1 mg/L) + NAA (0.1 mg/L) 的培养基上预培养 48 h, 随后分别与含不同植物表达载体的农杆菌共培养 48 h。共培养后, 将外植体转移到含 Cefradium (Cef) 500 mg/L 和 kanamycin (Km) 100 mg/L 的同样培养基上进行筛选和分化, 每 2 周继代培养 1 次。3 周后陆续将从叶圆片边缘分化出的正常幼苗 (1~2 cm 高) 切下, 转入 MS + NAA (0.2 mg/L) + Km (100 mg/L) + Cef (200 mg/L) 的培养基上诱导根的发生, 1 周至 10 d 左右转入 MS+Km (100 mg/L) + Cef (200 mg/L) 的培养基上让根和苗进一步生长, 打开瓶盖使健壮完整小苗炼苗 3 d 后移栽入土。

1.4 DNA/DNA 分子杂交实验

点杂交参照 Sambrook 等^[4]的方法进行: 取 5 μ g 植物总 DNA, 以用 Hind III+ EcoRI 双酶切质粒 pRHK2 回收的 1.7 kb 片段为探针, 分别与 pRHK2 和 pRHK4 转化后的植株 DNA 杂交。

1.5 GFP 的观察

1.5.1 原生质体的制备 取转基因植株及对照植株的幼嫩叶片剪碎, 放入培养皿中, 加入 25 mL 原生质体分离酶液 (配制方法: $\rho=1\%$ Cellulase onozuka R-10, $\rho=0.1\%$ Macerozyme R-10, 溶于原生质体分离缓冲液中)。以 20~30 r/min 于 28 $^{\circ}$ C 轻摇 4~6 h, 在倒置显微镜下观察原生质体分离情况, 将分离良好的原生质体悬液用 60~80 μ m 孔径的筛网过滤, 滤液经 600 r/min 离心 5 min, 除去上清酶液, 在离心管内加入 2 mL 原生质体分离缓冲液重悬沉淀, 然后在管底缓缓加入 $\rho=16\%$ 蔗糖溶液, 800 r/min 离心 10 min, 吸取漂浮在蔗糖溶液与分离缓冲液中间界面上的原生质体, 用分离缓冲液洗涤, 600 r/min 离心 3 min, 去上清液。反复洗涤 2~3 次后, 用分离缓冲液重悬沉淀。原生质体分离缓冲液的配制: $\rho=0.07\%$ 2N-(吗啉) 乙基磺酸, $w=0.1\%$ CaCl₂, $w=0.11\%$ Na₂HPO₄, 0.5 mol/L 甘露醇, pH 5.8。

1.5.2 植物粗蛋白的提取 准确称取转基因植物及对照植物材料各 0.5 g, 置液氮中迅速研磨成粉。将冻粉转入 eppendorf 管中, 加入 0.5 mL 抽提液 (50 mol/L Tris HCl, $w=0.029\%$ NaN₃, pH 9.5), 混匀, 4 $^{\circ}$ C 抽提过夜, 14 000 r/min 离心 5 min, 取上清立即用于荧光分光光度仪的分析。

1.5.3 绿色荧光的观测

(1) 荧光显微镜 (BH2-RFC, Olympus) 观察: 按荧光显微镜的说明对材料进行观察及拍照。

(2) 荧光分光光度仪 (F 4500 Fluorescence

Spectrophotometer, HITACH) 分析: 植物抽提的粗蛋白立即用于荧光分光分析, 采用 380 nm 为激发光和 400 nm 的滤光片。

(3) 手提长波紫外灯观察: 于黑暗处用长波紫外灯照射, 直接观察。

2 结果与讨论

2.1 转基因植物体的获得及分子检测

转化后培养 10 d 左右观察发现, 部分叶圆片外植体的边缘有绿色或黄绿色的愈伤出现, 3 周后陆续有小芽在叶盘边缘长出。

pRHK2 与 pRHK4 转化烟草后的再生频率有较为明显的差异。在转化时, 外植体经预培养后分成两组, 分别同时与含 pRHK2 的农杆菌或含 pRHK4 的农杆菌共培养, 并尽可能保持两者转化条件的一致性。结果表明: pRHK2 与 pRHK4 转化烟草后均能获得再生植株, 但 pRHK4 转化后的植株再生频率要高得多。由于 pRHK2 与 pRHK4 所用的启动子都是 35S35SAMV, 它比 35S 启动子的表达强度提高了 20 倍^[5], 因此能高水平地表达 GFP 蛋白, 二者的差别在于在 pRHK4 中的 *mgfp4* 基因前接有一线粒体定位序列, 而在 pRHK2 中没有, 因此 pRHK2 转化后的 GFP 的分布是遍布在整个细胞质中的, 在实验中也发现, 在烟草的再生过程中, 有一些在长波手提紫外灯照射下能发出明亮绿色荧光的愈伤, 但不能再生成植株, 这可能是由于高水平的 GFP 表达对植物造成毒性从而影响植株再生的。在水母的光细胞中, GFP 是汇集在细胞质的颗粒体中, 因而可耐受高水平的 GFP^[7], pRHK4 转化的植株中, 其 GFP 是在 *cox IV* 的指导下定位到线粒体中, 与水母光细胞中的机制类似, 因此降低了对植物细胞的毒性。这与 Haseloff 等 (1997) 通过将 GFP 定位到内质网的结果类似^[8]。

为了确证 *gfp* 基因整合到植物基因组中, 用 DNA 斑点杂交 (Dot blot) 方法进行了检验。分别从用 pRHK2 和 pRHK4 转化后的 Km 抗性植株中提取植物总 DNA, 点样在尼龙膜上。用相应的探针与之进行点杂交分析。结果表明: 用 pRHK2 和 pRHK4 转化的大部分抗性植株都出现杂交阳性信号, 而仅小部分转化的抗性植株没有出现杂交信号 (图 2)。

2.2 GFP 在植物中表达的荧光显微镜观察

荧光显微镜是目前观察 GFP 绿色荧光的主要手段, 它能直观地获得观察结果, 因而可作为转化子的筛选手段, 但它要求材料能透光 (如原生质体或透明愈伤组织等)。



图 2 转基因烟草的点杂交结果

Fig. 2 Results of dot blot of transgenic tobacco

A1 质粒 pRHK2; A2 未转化的对照植物;

A3-D12 Km 抗性植株

mgfp4 是针对拟南芥会把 *gfp* 基因 383—463 之间的核苷酸序列当作内含子剪切^[8]，而在不改变氨基酸序列的前提下，对 *gfp* 基因的密码子进行了改造，即将其密码子更换成植物偏好的密码子，再加上 S65T 的突变而成。将转基因植物的叶

肉细胞制成原生质体，在荧光显微镜下观察发现，所有的转基因植物细胞中都有清晰可见的绿色荧光。从图 3 可以清楚地看到 pRHK2 转化的细胞其绿色荧光的分布是片状的遍布于整个细胞质中（图 3b），而 pRHK4 转化的烟草细胞中的绿色荧光是以点状分布的，其绿色荧光仅出现在细胞的某些部位而非遍布于整个细胞质（图 3a），这是因为在 pRHK4 中 *mgfp4* 基因前面加上了一小段酵母细胞色素氧化酶Ⅳ亚基线粒体转移肽—*cox IV*，它能在烟草中有效地将 GFP 定位到线粒体^[9]，由于我们所用的荧光显微镜放大倍数有限，未能做进一步的线粒体结构观察。在显微镜下观察到的红色为叶绿素所发的荧光，未转化的植物细胞只观察到红色荧光（图 3c）。

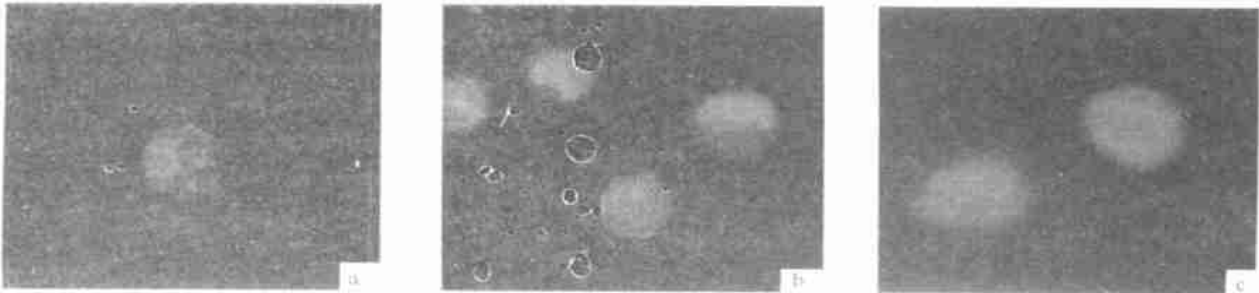


图 3 转 GFP 烟草植株的原生质体绿色荧光显微观察

Fig. 3 Fluorescent microscopy comparison of green fluorescence of protoplasts

a 用 pRHK4 转化; b 用 pRHK2 转化; c 未转化对照

不管是用 *mgfp2* 还是 *mgfp4* 转化，在整个生长发育过程，即从外植体边缘长出小芽到长成小苗，再移栽入土到开花，均能观察到 GFP 相关的绿色荧光，说明在当代中我们所用的 *gfp* 是能稳定表达的。

2.3 荧光分光光度计分析结果

取等质量的植株鲜嫩叶片粗提总蛋白后，立即用荧光分光光度计进行检测发现，未转化的对照植物粗提蛋白中带有自发荧光物质，在蓝光（450 nm）处有一发射峰，而转化的植物也都保留了此发射峰，但绿色荧光的强度都有不同程度的增加。从图 4 看到，pRHK2 转化后的烟草叶抽提物中绿色荧光比用 pRHK4 转化所获得的提取物的绿色荧光要强，这可能是由于蛋白提取过程中，一部分线粒体定位蛋白未被充分提取出来所造成的。另一方面，由于外源基因在植物中的表达水平受很多因素的影响，即使同一外源基因转化，在获得的转基因植物的不同株系之间其表达水平也有差异。因而，目前还难以确定线粒体定位序列对外源基因在植物中的表达量是否存在影响，还需要进一步的实验验证，

但加入细胞器定位序列（如 *cox IV*）对于获得转基因植株是有帮助的。

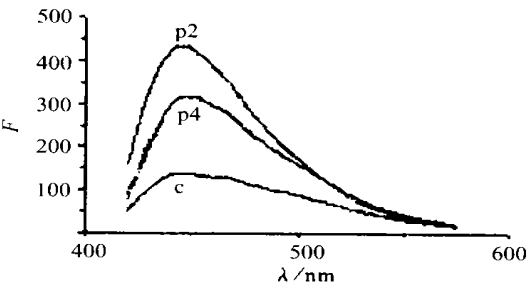


图 4 GFP 转基因烟草的荧光分光分析

Fig. 4 Fluorescence spectrophotometric analysis of GFP expression in transgenic tobacco

c 未转基因对照植物;

p2 和 p4 分别用 pRHK2 和 pRHK4 转化所得植物

参考文献:

[1] CHALFIE M, TU Y, EUSKIRCHEN G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. Science, 1994, 263: 802—805.
[2] 贺竹梅, 李华平, 李宝健, 等. 绿色荧光蛋白在生命科

学研究中的应用[J] . 遗传, 1998, 20: 43—46.

[3] CHENG L, FU J, TSUKAMOTO A, et al. Use of green fluorescent protein variants to monitor gene transfer and expression in mammalian cells[J] . Nature Biotechnology, 1996, 14: 606—609.

[4] HEIM R, CUBITT A B, TSIEN R Y. Improved green fluorescence[J] . Nature, 1995, 373: 663—664.

[5] KOHLER R H, ZIPFEL W R, WEBB W W, et al. The green fluorescent protein as a marker to visualize plant mitochondria *in vivo*[J] . Plant J, 1997, 11: 613—621.

[6] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: A laboratory manual[M] . 2nd ed. Beijing: Science Press, 1993.

[7] DAVENPORT D, NICHOL J A C. Luminescence in hydromedusae[J] . Proceedings of the Royal Society, Series B, 1955, 144: 399—411.

[8] HASELOFF J, SIEMERING K R, PRASHER D C, et al. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly[J] . Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 2122—2127.

The Expression Analysis of Modified *gfp* Gene Fused to Mitochondrial Transit Peptide in Tobacco

HE Zhu mei¹, LI Hua ping¹, CHENG Gu¹, HUANG Ding hua²,
LI Zhi fang², LIU Rong wei², LI Bao jian¹

(1. The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education,
Sun Yat sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China;

2. Institute of Horticulture, Shenzhen Center of Agricultural Sciences, Shenzhen 518140, China)

Abstract: Using the green fluorescent protein (GFP) from *Aequorea victoria* as a reporter enables transgenic plant cells and tissue to be screened *in vivo* at any growth stage, so it has begun to be widely used in making transgenic plants. Modified GFPs can increase the fluorescence coefficients and improve expression characteristics or alter spectral properties. In this study, the expression of modified *gfp* gene was analyzed with or without mitochondrial transit peptide in transgenic tobacco. The result shown that was is some deleterious effect on differentiation of transgenic tobacco cells when GFPs directly exist in cytoplasm, but the frequency of plant regeneration from transgenic cells increased significantly when GFP was tagged into mitochondria. *gfp* gene was very useful to detect gene expression in location of organelle or cells or organs exactly and plant genetic transformation, which is better than *gus* gene.

Key words: modified green fluorescent protein; reporter gene; mitochondria; tobacco