烟草体系 BiFC

BiFC Assay for Detecting Protein-protein Interaction in Tobacco Leaves

袁猛*, 许纯珏

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: myuan@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 袁猛, 许纯珏. (2018). 烟草体系 BiFC. *Bio-101*: e1010133. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010133.

How to cite: Yuan, M. and Xu, C. Y. (2018). BiFC assay for detecting protein-protein interaction in tobacco leaves. *Bio-101*: e1010133. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010133. (in Chinese)

实验原理: 在荧光蛋白(YFP、GFP、Luciferase 等)的两个 β 片层之间的环结构上有许多特异性位点可以插入外源蛋白而不影响荧光蛋白的荧光活性。BiFC 技术正是利用荧光蛋白家族的这一特性, 将荧光蛋白分割成两个不具有荧光活性的分子片段, 再分别与目标蛋白融合表达。如果两个目标蛋白因物理相互作用而靠近, 就使得荧光蛋白的两个分子片段在空间上相互靠近, 重新形成有活性的荧光基团而发出荧光。

实验目的: 在烟草植株活体细胞中检测蛋白质-蛋白质相互作用。

关键词: 烟草, BiFC, 蛋白质互作

材料与试剂

1. 注射器
2. *Nicotiana benthamiana* 烟草
3. 农杆菌 (已转入带目的基因的载体)
4. MES (4-morpholineethanesulfonic acid; Sigma, catalog number: M8250)
5. 利福平(rifampicin; Sigma, catalog number: R3501)
注: 利福平用 DMSO 溶解配制。
6. LB 培养基
7. 乙酰丁香酮
8. $MgCl_2$

9. 0.5 M MES (pH 5.6) (见溶液配方)
10. 100 mM 乙酰丁香酮 (见溶液配方)

仪器设备

1. 激光共聚焦显微镜
2. 普通离心机

实验步骤

1. 种植 *Nicotiana benthamiana* 烟草。在 14 h 光照/10 h 黑暗，温度 25 °C，相对湿度 70%条件下培养大概 4~5 周。
2. 将含有目的地基因的载体转入农杆菌中。
注：GV3101、EHA105、LBA4404 这三种农杆菌均有报道可以用于烟草瞬时转化。在培养农杆菌时候除了添加载体所含有的抗生素外，不同农杆菌还需要添加其它种类抗生素，比如 GV3101 还需要添加 50 µg/ml 的利福平。
3. 挑取含有目的载体的农杆菌单克隆至含有相应抗生素的 5 ml LB 培养基中，在 28 °C，200 rpm 的条件下培养 2 d。(新鲜转化的农杆菌单克隆在 3 ml 培养基培养过夜至 1 d 即可)
4. 转移 1 ml 培养的农杆菌菌液至 20 ml 含有相应抗生素的 LB 培养基中扩大培养，该 LB 培养基含 15 µM 乙酰丁香酮。在 28 °C，200 rpm 的条件下培养至农杆菌生长的对数期($OD_{600} = 0.5-0.6$)。
5. 在室温，5,000 rpm 离心 10 min 以收集菌体，用浸染液 (含 10 mM $MgCl_2$, 10 mM MES, 150 µM 乙酰丁香酮, pH = 5.6)悬浮农杆菌菌体至 $OD_{600} = 1.0$ 。室温静止 2~3 h (至少 0.5 h，至多不超过 3 h。)
6. 等体积混合两种含有不同质粒的菌体，用 1 ml 的针头在烟草叶片背面轻轻点开一个小口 (注意不要刺穿)，再用去掉针头的针管吸取菌液，从叶片伤口处注射到叶片中。用记号笔标记烟草叶片水渍状区域。(见图 1)
7. 注射过的植株于 21 °C 左右培养 2 d 后观察烟草注射农杆菌的区域有无荧光。撕取烟草叶片标记区域 (可以不撕，直接用刀挖出靠近伤口的叶片部分即可) 用激光共聚焦显微镜进行荧光的成像 (叶片背面表皮细胞层较好观察)。(见图 1)

图 1. 农杆菌注射烟草叶片

注意事项

1. 选择健康、处于壮年的烟草叶片进行注射，幼嫩或皱缩叶片不易注射，衰老叶片的表达效率较低。叶片气孔打开的时候比较容易注射，因此最好在白天注射。
2. 农杆菌菌液浓度是需要自己摸索的一个参数， $OD_{600} = 1.0$ 并不一定适用于所有的基因，高浓度可能导致叶片死亡，或者影响定位结果，建议设置不同浓度梯度进行比较，在可以获得荧光信号的前提下尽量采用低浓度的菌液。
3. 不同外源基因的瞬时表达效率大不相同——这一点在单转做亚细胞定位的时候表现得特别明显，效率高者基本每次都能达到 100% 发光，低者可能转 10 次只能表达出一两次，建议在 BiFC 之前先做个亚细胞定位评价一下两个基因的表达效率，以便调整两个质粒的转化条件。

4. 注射后的植株通常在 2 d 之后观察，但不同基因表达的时间可能在 1-7 天不等。

溶液配方

1. 0.5 M MES (pH 5.6)

称取 9.75 g 无水 MES 用去离子水溶解，用 NaOH 调 pH 至 5.6，定容至 100 ml，过滤灭菌后于 4 °C 保存。

2. 100 mM 乙酰丁香酮

称取 196.2 mg 乙酰丁香酮，用 5 ml DMSO (二甲基亚砷) 溶解，再加去离子水定容至 10 ml，过滤灭菌后于-20 °C 保存。