

外源蛋白在烟草叶片瞬时表达

陈香嵩, 李甜甜, 周少立, 赵毓*

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: zhaoyu@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 陈香嵩, 李甜甜, 周少立, 赵毓. (2018). 外源蛋白在烟草叶片瞬时表达. *Bio-101* e1010127.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010127.

简要原理: 利用农杆菌将外源基因导入到烟草叶片中进行表达, 可以借此进行蛋白的亚细胞定位、蛋白互作(BiFC)和蛋白的纯化等实验操作。

关键词: 烟草, 外源蛋白, 瞬时表达

材料与试剂

1. 一次性注射器
2. 培养皿
3. 本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*)
4. 农杆菌菌株: EHA105
5. MES
6. MgCl₂
7. 乙酰丁香酮 (acetosyringone, AS) (上海生工, catalog number: A601111)
8. 抗生素 (根据实验需求)
9. LB
10. 0.5 M MES (pH 5.6) (见溶液配方)
11. MgCl₂ 溶液 (见溶液配方)
12. 100 mM 乙酰丁香酮 (见溶液配方)

仪器设备

1. 恒温摇床
2. 分光光度计

3. 移液枪
4. 离心机

实验步骤

1. 挑取转化有表达质粒的农杆菌克隆(菌株: EHA105)于 1 ml 含有相应抗生素的 LB 中, 28 度摇床 250 rpm 培养 24 小时。
2. 于 5 ml 含有相应抗生素的 LB 中, 加入 100 μ l 0.5 M MES, 2 μ l 100 mM AS, 再接种 50 μ l 农杆菌菌液, 28 度摇床 250 rpm 培养至 OD₆₀₀=1.0 (大约 12-18 小时)。
3. 4,000 rpm 常温离心 10 分钟收集菌体, 用 10 mM MgCl₂ 重悬至 OD₆₀₀=1.0, 以每毫升菌液加入 2 μ l 的比例加入 100 mM AS, 静置 3 小时以上。
4. 取正处于生长旺盛时期(一个月左右, 未开花)的本生烟草(*Nicotiana benthamiana*), 用注射器吸入菌液, 去掉针头, 以手指抵住叶片正面, 将菌液从叶片的反面渗透进去(见图 1), 若注射不顺畅, 可用针头在叶片上制造一个微小的伤口, 再将菌液从伤口注入。



图 1.烟草叶片农杆菌注射

5. 正常条件下放置, 24-48 小时即可取样。

注意事项

1. 有的文献报道烟草注射前需黑暗处理, 有的文献则报道需要持续光照处理, 个人经验至少对于蛋白表达这一操作来说不需要任何处理, 正常条件生长即可, 但是用于蛋白互作(BiFC)可能需要特定的条件, 可参见 BiFC 部分 (参见“烟草体系 BiFC”,

- 袁猛等, 2018)。
2. 表达载体的启动子一般是 35 秒, 若需要特异基因自身的启动子驱动, 需考虑水稻与烟草的单/双子叶植物的区别造成的差异。
 3. 一般情况下, 转化后 24 小时即有蛋白表达, 而 48 小时后会渐渐消失。
 4. 若需要提高外源蛋白的表达, 可用同样的方法制备含有番茄丛矮病毒基因 p19 超表达载体的农杆菌, 与目的基因的农杆菌等量混合后再注射烟草, 此方法的蛋白表达时间为注射后 3-7 天, 且可以大幅提高表达量, 但是只适用于本生烟草 (*Nicotiana benthamiana*) (Voinnet 等, 2003)。
 5. 如果要抽提并纯化蛋白在未用 p19 的情况下需 5-10 g 烟草叶片, 加 p19 的情况下可以减半。

溶液配方

1. 0.5 M MES (pH 5.6)
MES 粉末溶于双蒸水中, 利用 1 M KOH 溶液调 pH 值至 5.6
2. MgCl₂ 溶液
MgCl₂ 粉末溶于双蒸水中
3. 100 mM 乙酰丁香酮
乙酰丁香酮粉末溶于双蒸水中

参考文献

1. Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. and Baulcombe, D. (2003). [An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus.](#) *Plant J* 33(5): 949-956.
2. 袁猛, 许纯珏等. (2018). 烟草体系 BiFC. *Bio-101* e1010133. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010133. (in press)