

文章编号:1673-1689(2008)02-0098-05

利用绿色荧光蛋白 GFP 作为报告基因 检测转基因植物

杨明瑜, 刘翔, 褚华硕, 王晓光, 朱文华, 曲桂芹*

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: GFP 作为报告分子被广泛地运用在转基因植株检测中。利用 PCR 技术扩增得到番茄 Bax inhibitor-1 基因(LeBI-1), 亚克隆到含 GFP 基因的 pEGFP 载体上, 进一步将中间载体构建到植物表达载体 pBI121 上。重组 pBI121-LeBI-1-EGFP 经农杆菌介导的叶盘转化法转化烟草, 分化筛选后获得抗性烟草植株。利用 GFP 作为报告基因, 采用 PCR、southern blot 及荧光方法验证外源基因 LeBI-1 成功转化到烟草中。分析讨论报告蛋白 GFP 不同检测方法的优缺点。

关键词: GFP; 转基因烟草; 检测; 长波紫外灯; 体视荧光显微镜

中图分类号: Q 344

文献标识码: A

Using Green Fluorescent Protein as a Reporter Gene to Detect Transgenic Plant

YANG Ming-yu, LIU Xiang, CHU Hua-shuo, WANG Xiao-guang,
ZHU Wen-hua, QU Gui-qin*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: GFP was widely used as a reporter to detect transgenic plant. The LeBI-1 gene was amplified from tomato with PCR and was subcloned to the vector pEGFP, which contained a GFP gene. The gene was further cloned to the plant expression vector pBI121. The recombinant vector pBI121-LeBI-EGFP was then transformed into tobacco mediated with Agrobacterium. The GFP as a reporter gene to detect the transgenic plant was then carried out by different methods, including PCR, Southern blot and green fluorescent detection. The advantage and disadvantages of these methods were summarized in this manuscript.

Key words: GFP; transgenic tobacco; detect; UV lamp; fluorescent microscope

绿色荧光蛋白(GFP)是一类存在于水母、水螅和珊瑚等腔肠动物体内的生物发光蛋白。当受

收稿日期:2007-05-17.

基金项目:国家自然科学基金项目(30500352).

作者简介:杨明瑜(1982-),女,四川绵阳人,食品生物技术专业硕士研究生.

* 通讯作者:曲桂芹(1970-),女,北京人,副教授,主要从事食品生物技术方面的研究.

Email:quguiqin2000@sina.com

到紫外或蓝光激发时,GFP 发射绿色荧光。作为报告分子,GFP 在植物中主要有 2 个作用:监测基因的表达和蛋白质的定位;并且能作为转基因植物的分子标记,代替 GUS 的作用^[1]。作为转基因植株的报告分子 GFP,最大的优点是,在不破坏细胞和化学染色的情况下直接成像,检测极为方便^[2]。此外,如果转基因植物中有较高水平的 GFP 转录本时,可使用长波紫外灯进行检测,如在手提式紫外灯的直接照射下,利用 GFP 发荧光的现象进行检测^[3]。但 GFP 荧光检测的最大缺点就是没有放大作用,它不能像酶一样通过加工无数的底物分子而将信号放大。所以一般都需强启动子以驱动 GFP 基因在细胞内足量的表达^[2]。GFP 在转基因中的应用需要满足 3 个条件:(1)在植物细胞中,必须要有足够的转录本才能观测到 GFP 的荧光现象;(2)GFP 必须经过合适的转录后修饰才能产生成熟的 GFP;(3)GFP 需要定位在合适的位置,才能发生转录过程,从而进行适量的积累来便捷地检测表达细胞。为了使 GFP 的荧光效果得到进一步增强,研究获得增强型 GFP(EGFP),它能极大地增强 GFP 基因的表达,为 GFP 作为报告因子提供更便利的条件。

作者利用 GFP 作为报告基因检测转基因植株中的外源基因。将番茄 Bt-1 基因(LeBI-1)基因克隆到 pEGFP 载体上,然后构建表达载体 pBI121-LeBI-1-EGFP。重组的 pBI121-LeBI-1-EGFP 转化农杆菌后,经农杆菌介导的叶盘转化法转化烟草,分化筛选后获得抗性烟草。利用 GFP 被同时整合到植物基因组中的特点,选用直接鉴定 GFP 的方法检测转基因植株。首先,PCR 扩增抗性烟草中是否转入 GFP,以此来确定和 GFP 融合在一起的 LeBI-1 是否也成功地转入到烟草中,然后 Southern 杂交进行验证,最后对转基因植株产生荧光信号强弱加以比较分析,并且讨论了不同检测方法的优缺点,为将来进一步利用 GFP 作为报告基因检测转基因植株等应用提供了思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

烟草(三生烟)由作者所在实验室保存并繁殖;长波紫外灯 365nm;ZEISS V11 体视荧光显微镜。

1.2 载体的构建

为使 LeBI-1 基因带上报告基因增强型绿色荧光蛋白(GFP),故构建了中间载体 pLeBI-1-EGFP。然后,用 *SacI* 和 *XbaI* 分别双酶切 pEGFP-LeBI-1

和植物表达载体 pBI121,将质粒 pLeBI-1-EGFP 小片段和酶切所得的 pBI121 大片段连接,获得植物表达载体 pBI121-LeBI-1-EGFP。

1.3 抗性烟草的获得

成功构建植物表达载体后,经农杆菌介导的叶盘转化法转化烟草。研究中将烟草叶盘预培养 2 d,经农杆菌(携带 pBI121-LeBI-1-EGFP 载体)浸染,暗培养 1 d,再转移到含 50 mg/L Kan 的 MS 抗性培养基上,25 ℃,光照培养。20 d 后,将已分化的抗性芽继代培养,长至 2~3 cm 时,插入生根筛选培养基(Kan 25 mg/L)中生根。10~15 d 左右形成明显的根系,经驯化后,移栽至土壤。

1.4 转基因烟草的鉴定

1.4.1 PCR 检测 分别设计两对引物,用来扩增 35 S 启动子和 GFP。转化再生植株小量法提取 DNA,取 1 μl 作 PCR 模板。两对引物分别为:

35S-500s;5'CAG ATG GTT AGA GAG GCT TAC GC 3'

35S-500a;5'ATA GCT GGG CAA TGG AAT CCG AG 3'

Gfp-300a;5'AGT TCA CCT TGA TGC CGT TC 3'

Gfp-300s;5'GTG CTT CAG CCG CTA CCC 3'

扩增条件为:扩增 35 S 时,退火温度为 58 ℃。扩增 GFP 时,退火温度为 56 ℃。

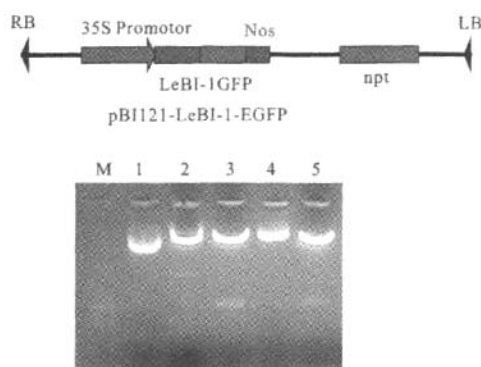
1.4.2 Southern blot 检测 用罗氏 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 试剂盒,采用 DIG 随机引物法标记 GFP 探针,*Hind* III 消化 PCR 呈阳性的烟草基因组,Southern 杂交检测最终确定转基因植株,即在分子角度上确认 LeBI-1-EGFP 转入到烟草中。

1.4.3 转基因烟草的绿色荧光检测 转入 GFP 和融合 GFP 的 LeBI-1 的烟草叶片在紫外波长的光激发下会发荧光。利用该特点,分别用长波紫外灯、体式荧光显微镜观察转基因烟草的绿色荧光现象。

2 结果与讨论

2.1 载体的构建和鉴定

用 *XbaI*、*SmaI* 双切 pEGFP 载体后,将含有这两个酶切位点的 LeBI-1 基因连接到 pEGFP 载体上,构建形成 pLeBI-1-EGFP。然后用 *SacI*、*XbaI* 同时酶切 pBI121 和 pLeBI-1-EGFP,回收后连接,转化大肠杆菌,构建 pBI121-LeBI-1-EGFP 载体。(见图 1)最后电击法转化农杆菌,获得工程菌株。



M 为标准相对分子质量 Maker DL2000; 1 为植物表达载体 pBI121-LeBI-1-GFP 质粒; 2 为 1 经过 *SacI*、*XbaI* 双酶切; 3 为 1 经过 *XbaI*、*SmaI* 双酶切; 4 为 pBI121-GFP 质粒; 5 为 4 经过 *XbaI*、*SacI* 双酶切。

图 1 植物表达载体 pBI121-LeBI-1-EGFP 的构建和酶切鉴定图

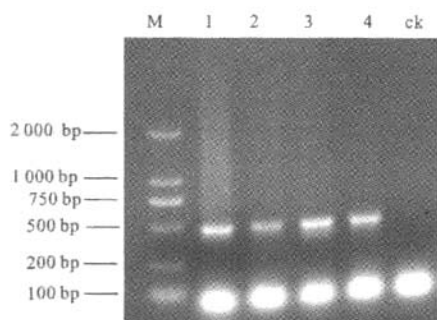
Fig. 1 Construction and restricted enzyme analysis of the pBI121-LeBI-1-EGFP

2.2 抗性烟草的获得

将构建好的植物表达载体经电击法转入农杆菌中,经农杆菌介导的叶盘转化法转化烟草,抗性筛选获得转基因烟草。

2.3 抗性植株的检测

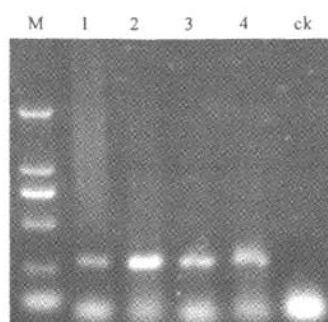
2.3.1 PCR 检测 对 4 株转化组成型启动子的烟草植株进行 PCR 检测,分别检测报告基因 GFP 和 35S 启动子。图 2 为扩增 35 S 启动子,在 500 bp 位置出现了明显的 PCR 条带;图 3 为扩增 GFP,在约 300 bp 位置处出现了明显的 PCR 条带,初步证明 LeBI-1-EGFP 基因已整合到烟草基因组中。



M 为 DL2000 标准相对分子质量 Maker; 1、2、3、4 均为转基因烟草的基因组进行的 PCR 扩增; ck 为阴性的番茄基因组进行的 PCR 扩增。

图 2 转基因烟草的 PCR 检测(500bp35S)

Fig. 2 The PCR detection of the transgenic tobacco (500 bp 35 S)

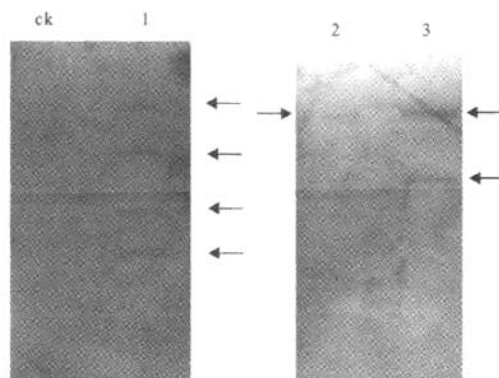


M 为 DL2000 标准相对分子质量 Maker; 1、2、3、4 均为转基因烟草的基因组进行的 PCR 扩增; ck 为阴性的番茄基因组进行的 PCR 扩增。

图 3 转基因烟草的 PCR 检测(300bpGFP)

Fig. 3 The PCR detection of the transgenic tobacco (300 bp GFP)

2.3.2 抗性烟草植株的 Southern 杂交分析 从 PCR 呈阳性的植株中提基因组进行 Southern 杂交分析,结果显示 PCR 扩增呈阳性的烟草基因组 DNA 可与 GFP 的探针产生杂交信号,而阴性烟草无杂交信号,如图 4 所示。可见,分子杂交鉴定外源 LeBI-1-EGFP 序列转入烟草基因组。



ck 为阴性植株; 1、2、3 为随机抽取的 PCR 呈阳性的转基因植株(箭头所指为 GFP 杂交条带)。

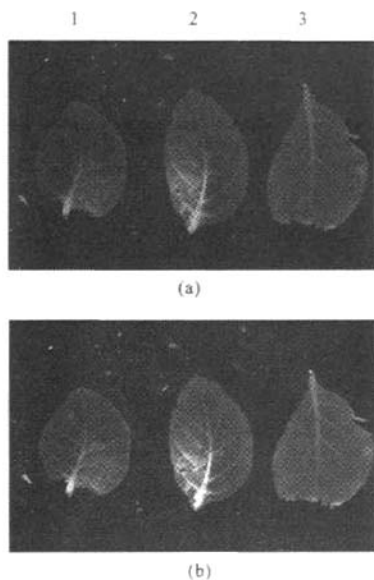
图 4 转化 LeBI-1-EGFP PCR 呈阳性的植株 PCR 检测

Fig. 4 Southern blot analysis of the PCR positive tobacco

农杆菌介导的遗传转化外源基因是随机插入基因组中, Southern 杂交图上的杂交带分析表明, LeBI-1-EGFP 插入位点和拷贝数不同。1 号有 4 个拷贝, 2 号只有 1 个拷贝, 3 号有 2 个拷贝。这为后面不同转 LeBI-1-EGFP 的烟草植株所发荧光情况不同提供了分子证据。

2.3.3 绿色荧光检测 Southern 杂交呈阳性植株在手携式紫外灯照射下,发现并不是所有阳性植株的叶片都有绿色荧光现象,两棵出现荧光,见图 5

(a)、(b),1 棵没有出现荧光。经过分析后得出,这些不发荧光的转基因烟草虽然都是转 LeBI-1-EGFP 的烟草,但是拷贝数都比较低,均为单拷贝。由此可以证明,如果 GFP 的拷贝数不足,会导致转基因烟草叶片发荧光不足的现象。由图 5(a)可见荧光现象主要集中于烟草的叶脉部分。



1、2 为转 LeBI-1-EGFP 的植株;3 为阴性对照。其中(a)为在紫外 280 nm 下转 LeBI-1-EGFP 的烟草叶片,而(b)为在白光下的转 LeBI-1-EGFP 的烟草叶片

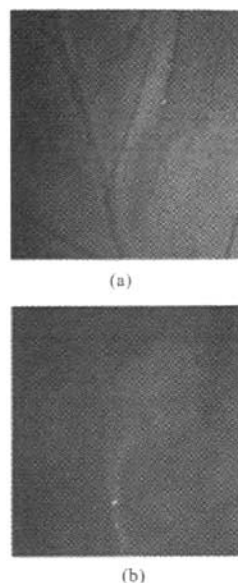
图 5 在 365 nm 的紫外光下,转 LeBI-1-EGFP 的烟草叶片

Fig. 5 The transgenic tobacco's leave(with LeBI-1-EGFP) in ultra light 365 nm

在 ZEISS V11 体视荧光显微镜下,观测到的发绿色荧光的烟草叶片(激发波峰是 488 nm,发射波峰是 520 nm)主要是在叶脉附近,这和用便携式紫外灯观察到的现象一致。如图 6 所示。

2.4 讨论与分析

1) PCR 检测早已被广泛地用作转基因植株的初步筛选方法,它的优点是快速大量检测。一般转基因植株的筛选都可以直接选择 PCR 扩增 35S 启动子;如果插入的是外源基因,也可以选择扩增外源基因。在扩增 GFP 的过程中发现,由于 GFP 的 GC 含量非常的高,所以很难扩增出 GFP 全长。此后,又设计了扩增 500 bp 的 GFP 和 300 bp 的 GFP 两对引物,实验结果发现,这两对引物都能用来检测抗性烟草,但是由于扩增 500 bp GFP 片段的引物退火温度很低,所以扩增后的非特异性条带很多。而相对的,扩增 300 bp GFP 片段的引物则能达到一个较高的特异性扩增,能有效地用来检测抗



(a)为阴性的烟草叶片在体式荧光显微镜下所成的图像;(b)为转 LeBI-1 的烟草叶片在体式荧光显微镜下所成的图像。

图 6 在 ZEISS V11 体视荧光显微镜下,转 LeBI-1-EGFP 的烟草叶片

Fig. 6 The transgenic tobacco's leave(with LeBI-1-EGFP) under ZEISS V11

性番茄和烟草的假阳性。所以最终选择了扩增 300bp 片段 GFP 引物作为检测转基因烟草和番茄的引物。用 PCR 扩增进行检测,在很大程度上能节约时间,但它的最大问题就是 PCR 扩增存在假阳性问题,PCR 扩增的每一种试剂都有可能被污染而导致扩增结果出现假阳性,尤其是利用 35S 启动子作为目的基因,而利用 GFP 时,则可以减少假阳性率。

2) Southern 杂交检测是目前公认的检测转基因植物的方法,它的优点是检测结果非常可靠,能从分子的水平上鉴定转基因植株,同时它还能反映外源基因的拷贝数。这些都能为后面的研究提供很好的分子依据。本实验中得到的转基因烟草用 GFP 作为探针(不选用 LeBI-1 作为探针,是因为烟草中存在 LeBI-1 基因的同源基因),进行杂交检测时,杂交膜上出现 GFP 不同拷贝数的现象。3 棵转基因烟草 GFP 拷贝数分别为 1、2、4 个,这个现象为后面利用荧光检测转基因植株时发现不同转基因植株发出的绿色荧光强度不同,提供了分子水平的依据。但 Southern 杂交的缺点是过程比较麻烦,耗时较长。

3) PCR 扩增 GFP 和 Southern 杂交检测转基因植株的方法都是常规的检测方法,都需要提取基因组,破坏植株的组织。而且相对于直接利用 GFP

发荧光检测来说,过程均比较复杂。因此,如果融合 GFP 的转基因植株能直接利用荧光检测,就方便很多。首先可以利用便携式长波紫外灯检测携带 GFP 的转基因烟草。它的最大优点是,可以进行活体检测,即可以采取直接用紫外灯照射转基因烟草的方法。在紫外灯的照射下,能够看到携带 GFP 的烟草叶片发绿色荧光。这与 Barbara 的报道一致^[4]。这种检测方法的缺点是必须要有足够的 GFP 转录本,如果 GFP 转录不足的话,就会导致荧光现象不足而检测不出来,此外叶片的叶绿素会干扰观测。

4) 利用体视荧光显微镜进行携带 GFP 的转基因植株检测,它的最大优点是可以直接观察叶片或者果实的荧光现象,从而确定外源基因是否成功插入,与手提式长波紫外灯检测相比,它能避免叶肉细胞、木质部、微观束等自发荧光的干扰,较清楚地看到 GFP,同时还能初步确定基因的细胞定位。缺点是体视荧光显微镜的造价比较高,需要足够的资金购买设备。

5) 利用 GFP 进行转基因植株检测时,需要注

意几个方面的问题。首先 GFP 的表达水平受多种因素的影响。很明显高基因拷贝数和强启动子/增强子有利于转录和翻译。一般都需要强启动子以驱动 GFP 基因在细胞内足量表达。而本实验中选用的载体 pBI121 可能因为只有一个 35S 启动子,不能有效驱动 GFP 在植物中的表达,导致叶片发荧光不足。其次,不同的植物组织,发绿色荧光的情况不同,选择实验操作步骤相同、且同一时期的转基因植株作比较,对于 GFP 的检测非常重要^[6]。

3 结 语

实验中采用不同的方法对融合 GFP 的 LeBI-1 基因的转基因烟草进行检测。不同方法各有利弊。作为一种新型的转基因植株报告基因,它的诸多优点如直接在长波紫外灯下发绿色荧光、利用立式荧光显微镜进行荧光检测等等,都值得对 GFP 融合蛋白做进一步的研究。它为便捷、迅速地检测转基因植株提供了一个很好的方法,并且可以根据需要,选择多种检测 GFP 方法中的一种进行检测。

参考文献(References):

- [1] Jim H, Brad A. GFP in Plant[J]. **Technical Focus**, 1995, 8(11):10—11.
- [2] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green Fluorescent Protein as a Maker for Gene Expression[J]. **Science**, 1994, (263): 802—805.
- [3] Stewart. GFP Helps Monitor Transgenic Plants[J]. **Biophotonics News**, 2000, (3):117.
- [4] Peter V R, Andrea H. Brand Imaging into the Future; Visualizing Gene Expression and Protein Interactions with Fluorescent Proteins[J]. **Nature Cell Biology**, 2002, 4(11):15—20.
- [5] El Meskini R, Jin L, Marx R, et al. A signal sequence is sufficient for green fluorescent protein to be routed to regulated secretory granules[J]. **Endocrinology**, 2001, 142(2): 864—873.
- [6] Matthew D H, Reginald J M. Green fluorescent protein quantification in whole plants[J]. **Methods and Protocols**, 2003, (4):215—225.

(责任编辑:杨 萌,秦和平)