

# Establishment and Optimization of Agrobacterium-Mediated Transient Gene Expression System in Tobacco

Liwei Wen, Hongliang Zhu\*

Department of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing  
Email: [210824@cau.edu.cn](mailto:210824@cau.edu.cn), [hlzhu@cau.edu.cn](mailto:hlzhu@cau.edu.cn)

Received: Apr. 15<sup>th</sup>, 2015; accepted: May 1<sup>st</sup>, 2015; published: May 6<sup>th</sup>, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.  
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).  
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

---

## Abstract

To establish and optimize a transient expression system in *Nicotiana benthamiana*, the method was developed with the  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) and Ripening Inhibitor (*RIN*) as marker genes. Using the agrobacterium-mediated transformation method, GV3101 was used for the effects of different bacteria concentration on the efficiency of protein transient expression in *Nicotiana benthamiana*. Observed by the results, a higher transient expression level of *GUS* & *RIN* gene could be obtained as OD600 value of *A. tumefaciens* for intiltration 1.0. The entire process only took 25 days from sowing seed to protein analysis. Therefore, this method is simple and rapid. It has a potential application in dissecting gene expression and function in *Brassica napus*.

## Keywords

Tobacco, Leaf, Transient Expression System

---

# 烟草基因瞬时表达体系的建立与优化研究

文莉薇, 朱鸿亮\*

中国农业大学, 食品科学与营养工程系, 北京  
Email: [210824@cau.edu.cn](mailto:210824@cau.edu.cn), [hlzhu@cau.edu.cn](mailto:hlzhu@cau.edu.cn)

---

\*通讯作者。

收稿日期：2015年4月15日；录用日期：2015年5月1日；发布日期：2015年5月6日

## 摘要

本研究以GUS基因和RIN基因作为报告基因，利用农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101对烟草叶片注射侵染，探究了农杆菌侵染浓度对本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)叶片瞬时表达效果的影响，建立并优化了烟草中的瞬时表达体系。结果表明， $\beta$ -葡萄糖苷酶(*GUS*  $\beta$ -glucuronidase)基因与RIN基因在OD600 = 1.0的侵染浓度时表达效果最佳。农杆菌介导的烟草叶片瞬时表达方法简单高效，结果准确可靠，从种子播种到收获蛋白只需25天左右。该体系的建立与优化为基因表达和蛋白功能性研究等方面提供了一定支持。

## 关键词

烟草，叶片，瞬时表达

## 1. 引言

本氏烟草(*N. benthamiana*)是一种原产于澳大利亚北部地区的一种茄科烟草属的植物，于1837年首次被 Benjamin Bynoe 发现并采集。自发现以来，本氏烟草因其叶片的易感染性与免疫和防御信号功能，被作为植物病毒学中的典型物种[1]，同时它也是病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)实验的植物生物反应器。在 Gene Bank 中可获得 16,000 个本氏烟草的单个基因序列，通过序列对比分析发现烟草与其他物种在 24 个基因上具有直系同源性[2]。

目前植物瞬时表达技术已经被广泛利用，该体系具有操作简便，安全性更高的特点，是迄今为止分子生物学研究中应用最广泛的方法[3]，主要用于研究外源基因的表达、蛋白质间的互作、转录因子与顺式作用元件的互作、启动子功能分析、蛋白的亚细胞定位等方面[4]。但是仍有一些技术问题尚未解决，如目前大部分研究仅处在叶片组织层面，农杆菌本身对植物抗病性有一定影响[5]；在体外表达蛋白质过程中，并非所有的核糖体都能翻译表达全长蛋白，此过程可能影响抗体与蛋白的结合，甚至难以筛选到结合的抗体[6]。

$\beta$ -葡萄糖苷酸酶(GUS)是一种以  $\beta$ -葡萄糖苷酸酯类物质为底物的水解酶，其产物可通过组织化学法、分光光度法和荧光法等多种方法检测[7]。多数植物体内无内源的 GUS，而通过外源导入 GUS 基因所表达出的 GUS 在植物体中可保持稳定和良好的活性。

MADS-box 转录因子 RIN 是番茄果实成熟的主要调控因子。通过染色质免疫沉淀法，现已证明 RIN 在番茄果实的成熟过程中与大量启动子结合调控基因的表达[8]，而且 RIN 基因控制单隐性遗传性状[9]。近几年，rin 突变体逐渐发展为研究果实成熟机理的重要材料。rin 突变体果实在室温下可贮藏两个多月，果实在转色期采下贮藏，品质与正常番茄相近，但是最终果实仍然呈现绿色，这就要求在今后的育种过程中要改善 rin 突变体果实颜色缺陷，提高其商品性[10]。

以农杆菌介导的烟草瞬时表达体系主要是利用农杆菌 Ti 质粒上的 T-DNA(transfer DNA)的复制转移并整合到植物细胞的基因组中的特性，通过构建含有 T-DNA 片段中带有外源基因的载体，进而通过农杆菌介导，瞬时表达 T-DNA 中编码的基因，进行植物细胞的转化。通常 2~3 天后即可检测到外源基因的表达。目前常用载体有 pMOG800、pBI121 等，常用的农杆菌主要有 GV3101、LBA4404、EHA105、AGL1 等。目前，瞬时表达体系已在多个物种间逐渐建立[11]，并已成功应用于多种植物，如草莓[12]、拟南芥、

莴苣[13]、玉米[14]和黄瓜[15]等,更适用于基因-蛋白的相关细胞生物学研究。有实验表明,将 LB 培养基上活化后的农杆菌以 10%接种量重新接种到新的培养基上有利于提高蛋白的表达量[16]。本研究以 pCAMBIA-35S-35S-FMF-*GUS* 和 pCAMBIA-35S-35S-FMF-*RIN* 为载体,采用农杆菌注射侵染的方法,以 *GUS* 基因和 *RIN* 基因作为报告基因,检测了不同农杆菌侵染浓度对瞬时表达效率的影响,优化了烟草叶片中的基因瞬时表达体系,高效表达了 *GUS* 基因及 *RIN* 基因。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 烟草材料

本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)种子。

### 2.2. 菌株与载体

农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 GV3101,植物表达载体 pCAMBIA-35S-35S-FMF-*GUS* (图 1)、pCAMBIA-35S-35S-FMF-*RIN* (图 2)。

### 2.3. 主要生化试剂

吗啉乙磺酸 MES、乙酰丁香酮 ASG、卡那霉素(Kanamycin) (50 mg/ml)、庆大霉素(Gentamicin) (50 mg/ml)、利福平(Rifampicin) (50 mg/ml)、一抗 Anti-c-myc Rabbit、Anti-Plant-Actin Rabbit Polyclonal Antibody、二抗 Anti-Rabbit IgG HRP 均购于 Sigma 公司, PVDF 膜购于 Millipore 公司, ECL 发光液购于普利莱公司。MgCl<sub>2</sub> 为国产化学纯。

### 2.4. 仪器

Trans-Blot SD 半干转印槽购于 BIO-RAD 公司, P4 蛋白垂直电泳仪 DY CZ-25E 型购于北京市六一仪器厂, X-OMAT BT 医用 X-光片购于柯达公司, X 射线摄影暗夹购于粤华公司, 易杰膜购于 EASYBIO 公司。

### 2.5. 方法

选取饱满烟草种子, 4℃用水浸泡 48 h, 播种于土壤中, 在(26 ± 1)℃、16 h/d 光照的培养箱中培养。约 25 天后待其为五叶或六叶期时取其植株中较宽大平坦的叶片用于实验。

分别将含有 pCAMBIA-35S-35S-FMF-*GUS*、pCAMBIA-35S-35S-FMF-*RIN* 质粒的 GV3101 农杆菌进行活化。用已灭菌的 1 ml 枪头挑取农杆菌加入 LB 培养基(含 50 mg/L 卡那霉素, 100 mg/L 利福平, 100 mg/L 庆大霉素)中, 28℃下, 200 rpm 培养过夜。吸取 60 μl 菌液加入 3 ml LB 液体中, 按比例加入 2-(N-吗啡啉)-乙磺酸(MES, 工作浓度 10 mM)、乙酰丁香酮(ASG, 工作浓度 20 μM)、卡那霉素(工作浓度 50 mg/L), 利福平(工作浓度 100 mg/L)和庆大霉素(工作浓度 100 mg/L) (表 1)。于 28℃, 200 rpm 培养过夜。第二天收集菌体, 4℃下, 5000 ×g 离心 5 min, 去除上清液, 留菌体。将不同量的菌体悬沉在侵染液(10 mM 的 MES, 200 μM 乙酰丁香酮, 10 mM 氯化镁)中, 配制 3 种不同浓度梯度的农杆菌菌液(OD<sub>600</sub> = 0.2, 1.0, 2.0), 室温下静置培养 3 h 后待用。

用已消毒的 1 ml 注射器, 取其针头, 在烟草植株叶片背面扎 2~3 个孔, 用无针头的针管注射叶片, 依靠压力将菌液注入叶片的叶脉之间。注射完毕后, 置于 22℃人工培养室中培养两天。

收集不同农杆菌浓度(OD<sub>600</sub> = 0.2, 1.0, 2.0)下注射的烟草样本, 各取 300 mg 烟草叶, 低温(液氮)下研磨成粉末状, 用等体积 4 × Protein SDS extracting Buffer 溶解, 95℃加热 10 min, 6000×g 离心 3 min,

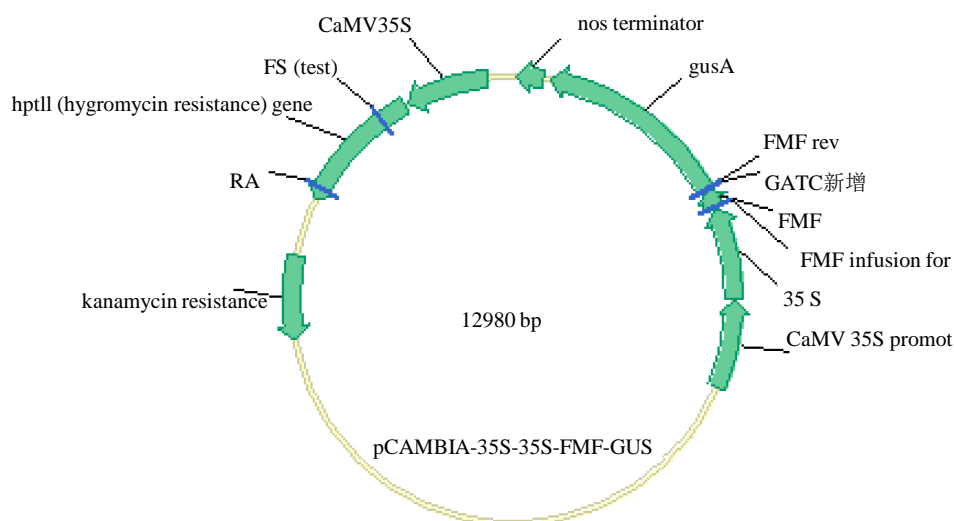


Figure 1. Construction of pCAMBIA-35S-35S-FMF-GUS

图 1. pCAMBIA-35S-35S-FMF-GUS 构建示意图

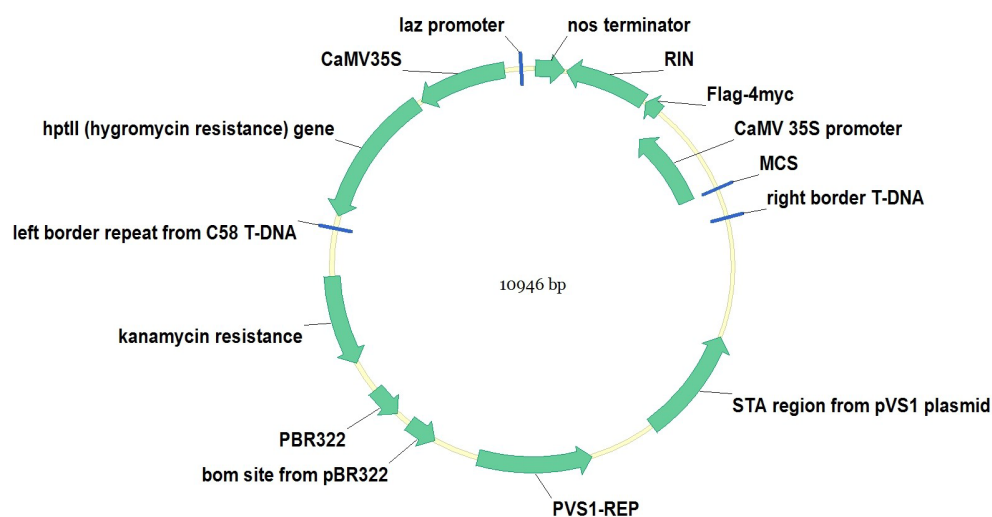


Figure 2. Construction of pCAMBIA-35S-35S-FMF-RIN

图 2. pCAMBIA-35S-35S-FMF-RIN 构建示意图

Table 1. Concentration of reagents

表 1. 各试剂浓度

浓度	MES	ASG	Kan	Gen	Rif	MgCl <sub>2</sub>
储液浓度	1 M	100 mM	50 mg/ml	50 mg/ml	50 mg/ml	1 M
工作浓度	10 mM	20 μM/200 μM	50 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	10 mM

取上清液，置于-20℃保存。

按照分离胶 12%，浓缩胶 4% 的浓度配制电泳胶，加入浓缩胶后插入梳齿，待胶凝固后放入电泳仪中，加入蛋白电泳缓冲液，拔出梳齿，以 120 V 电泳 90 min。

电泳结束后，切去浓缩胶，量取剩余电泳凝胶胶部分的长宽，按照比电泳凝胶面积略大的尺寸剪裁 PVDF 膜及滤纸，按照四层滤纸 - PVDF 膜 - 胶 - 四层滤纸的顺序铺好，用半干式转移装置将蛋白质转移

到 PVDF 膜上,根据凝胶面积按  $0.7 \text{ mA/cm}^2$  电流转移 70 min。将脱脂奶粉与 washing buffer 按照 1:20 (m/V) 配制封闭液(TBST),将 PVDF 膜转移至装有封闭液的盒子中,置于室温下脱色摇床振荡封闭 2 h,之后将封闭液倒掉。将一抗(anti-c-myc)用(washing buffer)稀释(1:5000 V/V)之后,加入装有 PVDF 膜中的盒子中,摇床常温振荡 2 h。倒出一抗液,加入 washing buffer,洗膜 10 分钟,重复洗膜三次。配制二抗(anti-Rabbit)稀释液(1:5000 V/V)并加入封闭盒中,重复上述振摇及洗涤步骤。

将 ECL 发光液加到 PVDF 膜上,放入压片夹中,静置 3 min。将压片夹移入暗室,把医学 X 胶片放在 PVDF 膜上,关上压片夹,曝光 3 min。结束后,将胶片取出放入显影液中静泡 15 s,之后放入定影液中静泡 15 s,取出 X 胶片观察显色情况。用扫描仪扫描 X 胶片,并分析目标带是否出现。

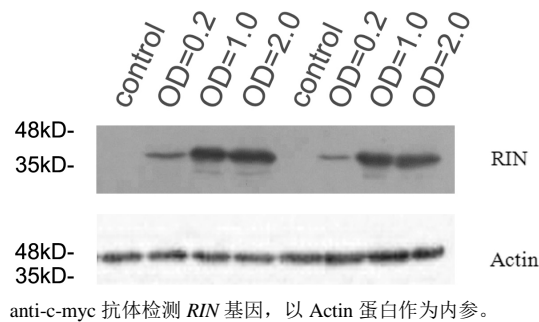
### 3. 结果与分析

#### 3.1. *RIN* 基因瞬时表达结果

蛋白印记结果(图 3)表明,注射 3 种菌液浓度的烟草叶片均能表达出 *RIN* 蛋白,但不同浓度的农杆菌诱导基因瞬时表达的水平不同;总体上,*RIN* 蛋白表达量随农杆菌菌液浓度增大而呈增强趋势。在内参蛋白 Actin 基本表达一致的情况下,当 OD 值分别为 1.0 和 2.0 浓度时,*RIN* 瞬时表达水平明显高于农杆菌浓度为 0.2 时的表达水平。但是,1.0 与 2.0 浓度下,*RIN* 蛋白表达量相差不大(图 3)。

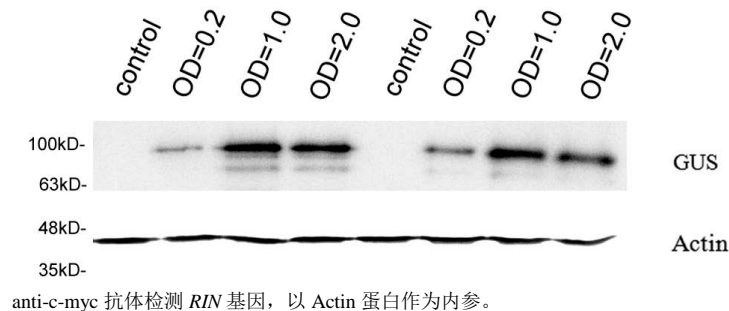
#### 3.2. *GUS* 基因瞬时表达结果

同样,对于 *GUS* 基因,图 4 表明菌液浓度为 1.0 和 2.0 的瞬时表达水平高于侵染浓度为 0.2,而且,1.0 时的表达效果比 2.0 的更佳,表明高浓度农杆菌可能会影响基因瞬时表达。



**Figure 3.** Effects of optical density of *Agrobacterium* to *RIN* expression

**图 3.** 烟草中不同农杆菌侵染浓度对 *RIN* 瞬时表达的影响



**Figure 4.** Effects of optical density of *Agrobacterium* to *GUS* expression

**图 4.** 烟草中不同农杆菌侵染浓度对 *GUS* 瞬时表达的影响

综上所述, 本实验设置了3个农杆菌菌液浓度( $OD_{600} = 0.2$ 、 $1.0$ 、 $2.0$ ), 分别表达了 *GUS*、*RIN* 两种基因, 检测了不同菌液浓度下蛋白表达量的大小。研究结果表明, *GUS* 以及 *RIN* 的最佳瞬时表达水平的农杆菌菌液浓度为  $OD_{600}1.0$ 。

## 4. 讨论

本实验以农杆菌为介导, 以 *GUS* 和 *RIN* 为报告基因, 通过检测蛋白表达量, 探索了烟草叶片中农杆菌菌液浓度对基因瞬时表达的影响及最佳诱导菌液浓度。如图3和图4, 菌液浓度过低时, 农杆菌数目偏少, 会使瞬时表达率降低; 而农杆菌密度过大时, 叶片细胞中农杆菌的结合位点是有限的, 农杆菌之间过于激烈的竞争不利于菌体与植物细胞的结合, 同时过高的菌液浓度会对烟草造成较大的毒性伤害, 影响基因瞬时表达率[17]。因此寻找适合的侵染条件是十分必要的。我们的实验结果表明, 农杆菌菌株 GV3101 的侵染浓度为  $OD_{600} = 1.0$  时, 瞬时表达效果最好。目前其他研究也发现在多种植物中建立的瞬时表达体系与植物材料的遗传背景、生长状态和农杆菌的菌株和侵染浓度等都有关系[18]。本研究以在细胞质中表达的 *GUS* 基因以及在细胞核中表达的 *RIN* 基因为报告基因, 研究在烟草叶片中统一进行的蛋白瞬时表达系统, 探寻烟草叶片中蛋白瞬时表达时最佳农杆菌菌液浓度, 为蛋白亚细胞定位、外源基因的表达、蛋白质间的互作、转录因子与顺式作用元件的互作、启动子功能分析、蛋白功能的研究提供了简便快捷的方法。

## 致 谢

本论文由国家自然科学基金 31471921、“中央高校基本科研业务费专项(2014RC006)资金”和中国农业大学本科生科研训练计划(URP)共同资助, 感谢杨永芳、于童童、王恬、李冉、李蕊对本实验的技术支持。

## 参考文献 (References)

- [1] Goodin, M.M., Zaitlin, D., Naidu, R.A. and Lommel, S.A. (2008) *Nicotiana benthamiana*: Its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**, 1015-1026.
- [2] Bombarely, A., Rosli, H.G., Vrebalov, J., Moffett, P., Mueller, L.A. and Martin, G.B. (2012) A draft genome sequence of *Nicotiana benthamiana* to enhance molecular plant-microbe biology research. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **25**, 1523-1530.
- [3] 谭小力, 诸葛锐军, 李冠英, 卢长明, 王政, 张志燕 (2013) 农杆菌介导的油菜子叶瞬时表达. *生物学杂志*, **6**, 93-96.
- [4] 吴英杰, 姜波, 张岩, 李彦邦, 贺琳, 王玉成 (2010) 农杆菌介导的烟草瞬时表达试验条件优化. *东北林业大学学报*, **9**, 110-112.
- [5] 赵文婷, 魏建和, 刘晓东, 高志晖 (2013) 植物瞬时表达技术的主要方法与应用进展. *生物技术通讯*, **2**, 294-300.
- [6] 王长松, 刘友生, 陈燕平 (2005) 蛋白质体外表达与进化技术. *生命的化学*, **4**, 333-336.
- [7] Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. (1987) *GUS* fusions: Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, **6**, 3901-3907.
- [8] Martel, C., Vrebalov, J., Tafelmeyer, P. and Giovannoni, J.J. (2011) The tomato MADS-box transcription factor RIPENING INHIBITOR interacts with promoters involved in numerous ripening processes in a COLORLESS NONRIPENING-dependent manner. *Plant Physiology*, **157**, 1568-1579.
- [9] 侯文秀, 李景富, 刘剑峰, 康立功, 张贺, 许向阳 (2010) 番茄成熟突变体 *rin* 基因的 AFLP 分子标记. *东北农业大学学报*, **02**, 20-24.
- [10] 王辉, 李文丽, 王富, 石丽 (2008) 番茄成熟突变体 *rin* 的生长特性和果实耐贮性的初步研究. *青岛农业大学学报(自然科学版)*, **1**, 21-23.
- [11] Zheng, L., Liu, G.F., Meng, X.N., Li, Y. and Wang, Y. (2012) A versatile agrobacterium-mediated transient gene expression system for herbaceous plants and trees. *Biochemical Genetics*, **50**, 761-769.

- [12] 刘敏, 滕文静, 董清华, 晁慧娟, 李凤岚, 邱德有 (2009) 草莓果实外源基因瞬时表达系统的建立. *果树学报*, **1**, 60-65.
- [13] 李静, 陈敏, 刘现伟, 沈法富, 王鹏 (2006) 莴苣高效瞬时表达体系的建立. *园艺学报*, **2**, 405-407.
- [14] 马亮, 梅晓宏, 许文涛, 罗云波, 周忻, 唐小革, 黄昆仑 (2010) 玉米 In-5 启动子功能区域在洋葱瞬时表达系统中的分析. *农业生物技术学报*, **6**, 1073-1078.
- [15] 徐冉, 汤雪燕, 缪旻珉, 曹碯生 (2010) 黄瓜疏松愈伤组织瞬时表达系统的建立. *北方园艺*, **13**, 127-128.
- [16] Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K. and Blatt, M.R. (2010) A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *The Plant Journal*, **64**, 355-365.
- [17] Sparkes, I.A., Runions, J., Kearns, A., et al. (2006) Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature protocols*, **1**, 2019-2025.
- [18] 邱初, 陶刚, 李奇科, 邱又彬, 刘作易 (2009) 农杆菌渗入法介导的基因瞬时表达技术及应用. *分子植物育种*, **5**, 1032-1039.