

Agroinfiltration 在植物分子生物学研究中的应用

刘兆明^{1 2} 刘宗旨¹ 白庆武² 方荣祥^{1*}

¹(中国科学院微生物研究所,北京 100080) ²(齐齐哈尔大学生命科学院,齐齐哈尔 161006)

摘要 农杆菌渗入法(Agroinfiltration)是近几年发展起来的一项快速、高效、重复性好的植物瞬间基因表达系统,已应用于外源基因表达分析、防卫反应、基因沉默、启动子分析及分离新的防御基因等领域。介绍了 Agroinfiltration 的原理、技术及其在植物分子生物学研究中的应用,并结合我们的经验介绍了对该项技术的改进。

关键词 Agroinfiltration, 植物, 瞬间表达

中图分类号 Q75 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2002)04-0411-04

1993 年瑞士科学家 Rossi 等创建了一种农杆菌介导的基因瞬间表达系统,他们将带有重组质粒的农杆菌,经诱导后通过抽真空渗透入植物叶片并进而渗透植物细胞,通过目的基因瞬间表达来检测植物中农杆菌介导的 T-DNA 转移的效率^[1]。随后人们又采用针管注射活体植株叶片进行农杆菌介导的基因瞬间表达检测。现在把这两种方法所进行的农杆菌介导的基因瞬间表达统称为 Agroinfiltration。近几年该技术不断完善、发展,已被广泛应用于外源基因表达分析、无毒基因与抗性基因的相互作用、基因沉默、启动子分析及分离新的防御基因等诸多植物分子生物学领域。

1 原理

Agroinfiltration 是在根癌农杆菌 Ti 质粒介导植物细胞转化的理论上形成并发展起来的。它是将目的基因插入共整合载体或二元载体,转化根癌农杆菌,后者经酚类化合物(如乙酰丁香酮)诱导处理后,通过真空渗透或针管注射入植物叶片组织中,农杆菌在叶片内与植物细胞紧密接触。诱导处理在转录水平激活 Vir 区基因,真空渗透或注射使得农杆菌与植株叶片细胞接触,从而实现了 T-DNA 转移进入植物细胞核。大部分 T-DNA 并未整合入植物基因组,暂时存在于核内并在植物细胞转录、翻译成份的协助下瞬间表达 T-DNA 基因,几天后即可检测到外源基因的表达,而少量整合进植物染色体的 T-DNA 在瞬间表达中不起作用或极为微弱^[2]。

2 技术介绍

该技术主要包括载体的构建、农杆菌的培养及诱导、真空渗透或针管注射 3 个主要步骤(图 1)。

①载体的构建。将

目的基因插入共整合载体或二元载体,如 pBI121、pLRG、pMOG800、pTJK136、pCAMBIA1391Z、pBIN19 等,转化农杆菌,如 GV3101、LBA4404、EHA105、pGV2260、C58C1 等。

②农杆菌的培养及诱导。将农杆菌培养液按 1%(V/V)转接于含抗生素、2-(N-吗啉)-乙基磺酸(MES)和乙酰丁香酮(AS)的液体培养基中,振荡培养至对数生长期,离心收集菌体,重悬于 MMA 溶液(含 MgCl₂、MES、AS),并调整菌液浓度使其 OD₅₉₅ = 1.5 左右。室温静置放置 3h。

③真空渗透或针管注射。真空渗透法一般是将离体叶片浸入菌液中,抽真空一定时间并迅速释放使得菌液渗入叶片内,把处理后的叶片放入盛有用无菌水或 MS 培养液浸湿的滤纸的培养皿中,培养一段时间后取样检测。针管注射法是用无针头的针管,靠压力将菌液注入叶片的两个分叶脉之间。我们发现事先用针头刺破叶表皮并在破处注射叶片效果更好,几天后可在叶片的菌液扩散区取样检测。

乙酰丁香酮的诱导和真空渗透或注射是实现 Agroinfiltration 的两个必不可少的条件^[1]。农杆菌在含有酚类化合物(如乙酰丁香酮)的培养液中,当 pH 值降至 5.0~5.8 时,Vir 区基因的诱导达到一个最高水平。所以一般将 MES 的 pH 值调为 5.6。除了 Rossi 等最初用真空渗透处理幼苗^[1]、Kapila 等用真空渗透处理叶片外^[2],现多采用针管在完整植株上注射叶片,因为后者更能真实反映叶片在植株上生长过程中基因表达情况。

植株和叶片的生理状况在很大程度上影响到 Agroinfiltration 的转化效率, Yang 等用针管注射 GUS 报告基因来检测其在烟草叶片中的瞬间表达活性时发现,完全展开的老叶片转化效率低,半展开的嫩叶在不同叶片之间,或即使是同一叶片的不同区域的转化效率变化很大,6 周龄植株的中部

即将完全展开的叶片的转化效率相互之间变化小、可重复性强^[3]。这可能是因为老叶子难于注射且细胞内转录活性降低,嫩叶的生理状况相互之间差别大,叶肉细胞间菌体渗透不匀,而即将完全展开的叶片生理状况相对稳定且易于注射。我们将带有异源基因增强子的 35S 杂合启动子与 GUS 基因融合,通过 Agroinfiltration 在烟草叶片中检验增强子功能时发现,不同烟草品种之间、同一品种不同株之间、同一株不同部位叶片之间瞬间表达差异很大,这与烟草品种是否适于

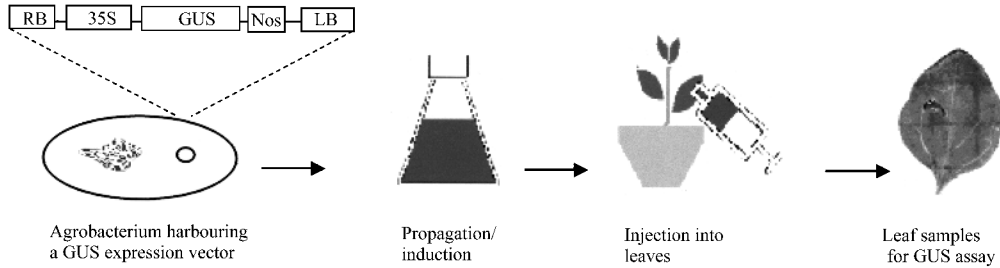


图1 农杆菌渗透方法的流程

Fig.1 Flow chart of Agroinfiltration

3 Agroinfiltration 的优点

在快速检测 DNA 克隆、评价人工改造的启动子和转录活性系统等方面,Agroinfiltration 提供了比转基因植株的稳定表达和其它瞬间表达方法更简单、有效的方法。

3.1 与转基因植株的稳定表达相比

①因为叶片只用于目的基因蛋白产物的瞬间表达,所以与再生转基因植株相比,不需选择标记基因来鉴定转化的细胞,不需被转化细胞再生出转基因植株就可分析基因的表达情况,因而可以快速处理大量样品,减少繁琐的组织培养操作^[4]。②注射后农杆菌转化了大量细胞,基因表达水平是多个细胞综合作用的结果,所以误差小,基因表达不受转基因植株中常遇到的染色体位置效应的影响。③对难于再生的植株品种尤其适用。

3.2 与其它瞬间表达方法(原生质体电转化、基因枪转化等)相比

①不需昂贵的设备,更简单易行。②因为在完整植株而不是离体的组织或原生质体上分析外界因素如病菌感染、盐胁迫、热激等对启动子的影响,所以该方法更能真实反映植株体内基因表达模式。③转化效率高。农杆菌利用 Vir 区基因的表达产物有效地把 T-DNA 转入植物细胞^[2,5],Agroinfiltration 使得叶片的表皮与叶肉细胞均与农杆菌接触而被转化,而电穿孔转化植物组织时,主要转化植物组织的表皮层^[6]。④DNA 直接转化技术尽管不受植物器官类型(茎、叶)的限制,但只能转化一些特殊的细胞,呈“点状”模式,而 Agroinfiltration 转化的大量细胞以“块状”分布紧密相邻,因而可以观察到转化的组织块^[1]。⑤以病毒为载体的瞬间表达系统尽管在叶片中表达量高^[7-9],但插入病毒基因组的外源基因因大小受到限制,而 Agroinfiltration 中 T-DNA 可容纳大基因,如抗性基因 Cf-9 的 2.6kb 的开放阅读框(ORF)^[10],并能以同样高

注射、植株生理状态、叶片生长状况有密切关系。实验表明 6~8 周龄的三生烟(*Nicotiana tabacum* cv. Xanthic nc)生长于中上部即将完全展开的叶片适于进行 Agroinfiltration,瞬间表达量高,实验结果可重复性强(尚未发表)。

农杆菌注射后的取样时间似乎没有严格的限制,这可能 与构建的载体以及实验目的不同有关,但一般都在 1 周内取样。

的转化率用于分析瞬间表达。

虽然 Agroinfiltration 有上述优点,但像原生质体瞬间表达分析一样,可能不适于分析组织特异性启动子和发育阶段特异性启动子的调控活性,另外在分析病原体诱导的启动子时必须考虑到农杆菌本身的潜在影响^[4]。

4 Agroinfiltration 在植物分子生物学研究中的应用

4.1 外源基因的表达的定量分析

Kapila 等以 CaMV35S 启动子驱动带内含子的 GUS 基因通过真空渗透在菜豆(*Phaseolus vulgaris*)叶片中进行农杆菌介导的瞬间表达,组织化学分析显示出叶片的 90% 以上部位有 GUS 表达。并对比不同的双元载体 pTJK136 和 pTHW136 叶片中 GUS 表达情况,认为该瞬间表达系统可以进行量化对比^[2]。

4.2 宿主抗性(R)基因与病原体无毒(Avr)基因间相互作用研究

现在一般认为抗性是植物品种所具有的抗性基因和与之相应的病原物的无毒基因结合时才得以表现。过敏反应(Hypersensitive reaction, HR)是宿主的局部防卫反应,它是在非亲和性病原感染后在病原侵染部位产生的抗病反应,侵染部位细胞编程死亡。

Van den Ackerveken 等通过注射法在胡椒叶片中表达 AvrBs3 带有抗性基因 Bs3 的植株过敏性细胞死亡尤其严重^[11]。Palanichelvam 等通过注射法在烟草叶片上表达 CaMV W260 株的 VI 基因,1 周内即引起 HR,9~12d 引起细胞死亡^[12]。

Tang 等将 CaMV35S 启动子驱动的 *AurPto* 基因通过 Agroinfiltration 在烟草叶片中表达来验证 *AvrPto* 蛋白是否诱导 HR^[13]。Scotfield 等用同样方法证明了 *AvrC* 和 *Rj4* 基因产物直接

相互作用引起 HR^[14]。Frederick 的工作第一次通过注射用一个二元载体 pBTEX 在烟草叶片中同时表达无毒基因 AvrPto 和抗性基因 Pto₃ 5d 后引起 HR, 而 AvrPto/Fen 没发生 HR。当把 Pto 激酶的 Thr-204 置换入 Fen 激酶, 则可与 AvrPto 蛋白作用, 引起特异性防御反应^[15]。

Van der Hoon 等通过 Agroinfiltration 成功地在分别转有抗性基因 Cf-9 和 Cf-4 番茄叶片中表达了来源于番茄叶霉菌 (*Cladosporium fulvum*) 的胞外蛋白 Avr9 和 Avr4, 认为 Agroinfiltration 是研究 Avr/Cf 介导的识别反应的一个灵活又可靠的手段, 更重要的是该方法可用来对比、量化 Avr/Cf 反应。该实验也是第一次表明 Agroinfiltration 可用来研究胞外识别反应^[10]。而在此之前 Agroinfiltration 仅用来表达细胞质蛋白 Pto^[15, 16]。

4.3 基因沉默研究中的应用

基因沉默现象是导致转基因不能正常表达的一个重要因素。其作用机理主要有: 位置效应、转录水平的沉默和转录后水平的沉默。

Schöb 等在转基因烟草(35S-CHN48)中通过 Agroinfiltration 表达 CaMV35S 驱动的几丁质酶基因 CHN48, 发现叶片中多余的 CHN48 拷贝被转基因烟草中原有的、沉默了的基因所沉默。而 CaMV35S-GUS 的瞬间表达不受原转基因 CaMV35S-CHN48 的影响, 从而说明 CHN 基因的沉默不是启动子相互作用的结果, 也表明多余的 CHN48 拷贝的沉默不需基因插入染色体中^[17]。该方法提供了一个快速、简单的手段筛选和植物中原有的外源转基因反应的重组基因克隆, 进行基因沉默研究。

4.4 植物启动子和转录因子分析

早在 Kapila 等的实验中就推测该瞬间表达系统可适用于启动子的功能分析^[2], 而 Yang 等的实验使得 Agroinfiltration 成为一种快速分析植物启动子和转录因子的方法。他们以 GUS 为报告基因, 通过 Agroinfiltration 辅助以生物或非生物处理验证了逆境反应元件 *as-1*、热休克元件、酵母 GAL4 转录活性系统。系列缺失烟草 *PRIa* 启动子和一个新的 *myb1* 启动子并以 GUS 为报告基因, 通过注射成功地证明这两个启动子中对水杨酸(SA)处理、烟草花叶病毒(TMV)感染的顺式作用元件。该实验的结果表明 Agroinfiltration 是一个简单而有效的体内分析植物启动子和转录因子的手段^[4]。

我们把水稻 GRP(Glycine-rich proteins)基因启动子内一段正调控片段正向、反向、正向重复与 GUS 融合, 通过 Agroinfiltration 注射烟草证实该正调控片段可增强 35S-92 基本启动子活性(尚未发表)。

4.5 分离新的抗性基因

Bendahmane 等在表达土豆病毒 X(PVX)外壳蛋白的转基因烟草叶片上通过 Agroinfiltration 瞬间表达候选基因 R。用该方法他们在诱导物 PVX 外壳蛋白存在下, 分离到了一个引起 HR 的土豆基因 *Rx2*。Agroinfiltration 比传统的图谱克隆(Map-based cloning)或转座子示踪(Transposon tagging)更容易, 并可用于克隆其他任何 R 基因^[18]。用此方法, 他们用 10

个异源菌株稀释该菌株, 发现 *Rx-1* 介导的 HR 仍很明显。他们认为, 在 1cm² 烟草叶片上可以注射 10 个克隆, 一个叶片中大约有 20 个地方共可注射 200 个克隆, 因而可以在农杆菌二元载体中筛选完整基因组文库, 对于有几百个同源 R 基因, 完整文库要几千个克隆, 用此方法筛选特殊防御功能的基因是一项相对简单的工作^[18]。

5 展望

从最开始的真空渗透到现在的用针管注射, Agroinfiltration 开辟了一个基因表达分析的新途径。尤其在近几年, 通过 Agroinfiltration 已在烟草、菜豆、白杨、胡椒等植物中进行了诸多分子生物学领域的研究。该技术的完善将从以下几个方面考虑: 因 Agroinfiltration 的载体不需抗生素抗性标记基因, 故可构建小载体以便进行有效的农杆菌转化和 T-DNA 转移; 不同的植物采用不同的有利于菌体培养、注射的条件; 分析不同的菌株/宿主株间的组合。相信 Agroinfiltration 技术一定会在植物分子生物学研究中发挥愈来愈重要的作用。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Rossi L, Escugero J, Hohn B *et al.* Efficient and sensitive assay for T-DNA-Dependent transient gene expression. *Plant Mol Bio Rep*, 1993, **11**(3): 220 ~ 229
- [2] Kapila J, Rycke R D, Van Montagu M *et al.* An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science*, 1997, **122**: 101 ~ 108
- [3] Yang Y N, Li R G, Qi M. *In vivo* analysis of plant promoter and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *Plant J*, 2000, **22**(6): 543 ~ 551
- [4] Fischer R, Vaquero-Martin C, Sack M *et al.* Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. *Biotech Appl Biochem*, 1999, **30**: 113 ~ 116
- [5] An G. High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiol*, 1985, **79**: 568 ~ 570
- [6] Dillen W, Engler G, Van Montagu M *et al.* Electroporation-mediated DNA delivery to seeding tissues of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean). *Plant Cell Rep*, 1995, **15**: 119 ~ 124
- [7] Takamatsu N, Ishikawa M, Meshi T *et al.* Expression of bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene in tobacco plants mediated by TMV-RNA. *EMBO J*, 1987, **6**: 307 ~ 311
- [8] Chapman S, Kavanagh T, Baulcombe D. Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant J*, 1992, **2**: 549 ~ 557
- [9] Rommens C M T, Salmeron J M, Baulcombe D C *et al.* Use of a gene expression system based on potato virus X to rapidly identify and characterize a tomato *Pto* homolog that controls fenthion sensitivity. *Plant Cell*, 1995, **7**: 249 ~ 257
- [10] Van der Hoon R A L, Laurent F, Roth R. Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analyses of Avr9/Cf-9-induced and Avr4/Cf-4-induced necrosis. *Mol Plant-Micro Interact*, 2000, **13**(4): 439 ~ 446
- [11] Van den Ackerveken G, Marois E, Bonas U. Recognition of the bac-

- Cell*, 1996, **87**: 1307 ~ 1316
- [12] Palanichelvam K, Cole A B. Agroinfiltration of Cauliflower mosaic virus gene VI elicits hypersensitive response in *Nicotiana* species. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2000, **13**(11): 1275 ~ 1279
- [13] Tang X Y, Frederick R D, Zhao J M. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science*, 1996, **274**: 2060 ~ 2063
- [14] Scofield S R, Tobias C M, Rathjen J P *et al.* Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science*, 1996, **274**: 2063 ~ 2065
- [15] Frederick R D, Thilmong R L, Sessa G *et al.* Recognition specificity for the bacterial avirulence protein AvrPto is determined by Thr-204 in the activation loop of the tomato Pto kinase. *Mol Cell*, 1998, **2**: 241 ~ 245
- [16] Rathjen J P, Chang J H, Staskawicz B J *et al.* Constitutively active *Pto* alleles include a *Prf*-dependent hypersensitive response in the absence of AvrPto. *EMBO J*, 1999, **18**: 3232 ~ 3240
- [17] Schöb H, Kunz C, Meins F Jr. Silencing of transgene introduced into leaves by agroinfiltration: a simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing. *Mol Gen Genet*, 1997, **256**: 581 ~ 585
- [18] Bendahmane A, Querci M, Kanyuka K *et al.* *Agrobacterium* transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the *Rx2* locus in potato. *Plant J*, 2000, **21**(1): 73 ~ 81

Agroinfiltration a Useful Technique in Plant Molecular Biology Research

LIU Zhao-Ming^{1 2} LIU Zong-Zhi¹ BAI Qing-Wu² FANG Rong-Xiang^{1*}

¹(*Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China*)

²(*College of Life Science, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China*)

Abstract Agroinfiltration is a newly developed plant transient gene expression technique, which is simple, rapid and reproducible. It has been widely used in analyses of foreign gene expression, hypersensitive reaction, gene silencing, promoter activity and identification of new disease-resistance genes. In this paper, we describe the principle and the operation procedure of Agroinfiltration and its application in diverse aspects of plant molecular biology research. Our experiences in modification of the Agroinfiltration technique are also provided.

Key words Agroinfiltration, plant, transient gene expression

Received: 11-02-2001

This work was supported by Grant from the Special State Funds for Transgenic Plant R&D (No. J99-A-021).

* Corresponding author. Tel 86-10-62548243; Fax 86-10-62548243; E-mail: fangrx@sun.jim.ac.cn <http://journals.im.ac.cn>