

• 实验技术与方法 •

一种检测转基因植物细胞中 β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) 活性的实用方法

尹中朝 许耀 杨凡 李宝健

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

A Practical Method for Detection of GUS Activity in Transgenic Plant Cells

Yin Zhongchao Xu Yao Yang Fan Li Baojian

(Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) 基因是近年来在植物基因工程研究中应用得最为广泛的报告基因之一^[4]。其产物 GUS 活性的检测有多种方法, 其中最常用的是组织化学染色法和荧光分析法。但前者为定性检测而且如操作不慎很容易产生假阳性, 而后者虽可精确定量测定但需要相应的配套仪器。我们采用的这种方法是首先将植物细胞粗提蛋白在非变性聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳分离, 然后直接在电泳后的凝胶中进行酶反应染色分析。此法源于 Reiss 等测定新霉素磷酸转移酶 (NPT II) 活性的方法^[6], 改进后使之适合于 GUS 特性并可获得理想的结果。

1 材料和方法

1.1 转基因水稻培养细胞的获得

我们参考 Hiei 等方法对水稻 IR72 悬浮培养细胞进行根癌农杆菌转化^[3]。所用的根癌农杆菌菌株及质粒 EHA101 (pBYT2) 由美国华盛顿大学 E.W.Nester 教授惠赠。转化处理后的水稻培养细胞经过严格的筛选并通过 DNA 分子杂交、GUS 活性的荧光分析和组织化学染色观察证明外源 GUS 基因已整合进水稻基因组中并获得稳定表达 (结果待发表)。

1.2 GUS 粗酶的提取

按 Jefferson 等方法提取植物细胞粗提蛋白^[5], 采用 Bradford 法测定粗提液中蛋白含量^[2]。植物细胞粗提蛋白可置-80℃保存。

1.3 ndPAGE 电泳

除不加 SDS 外, 按萨姆布鲁克等方法制备非变性聚丙烯酰胺凝胶分离胶 (10%) 和积层胶 (3.5%)^[1]。电泳缓冲液为 Tris-甘氨酸缓冲液 (25mmol/L Tris-HCl, 200mmol/L 甘氨酸, pH8.3)。约 50 μ g 植物粗提蛋白或 GUS 标准蛋白 (Sigma 公司, G0876) 用 GUS 抽提缓冲液 (50mmol/L NaPO₄, pH7.0, 10mmol/L DTT, 1mmol/L Na₂EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.1% Sarcosyl) 稀释至 25 μ l, 加等体积 2 倍凝胶加样缓冲液 (100mmol/L Tris·Cl, pH6.8, 200mmol/L DTT, 0.2% 溴酚蓝, 20% 甘油), 上样电泳, 4℃, 电压 7.5V/cm。当电泳至溴酚蓝迁移出凝胶后, 继续电泳 2 小时。

1.4 GUS 酶反应

电泳结束后, 取下凝胶, 用预冷的无菌 ddH₂O 振荡洗涤凝胶两次, 每次 5 分钟。在冰浴上用适量预冷的

GUS 抽提缓冲液平衡凝胶 10 分钟。将凝胶移至一块干净的玻璃板上,用吸水纸于凝胶边缘吸去多余的缓冲液,在凝胶上覆盖一张和凝胶同样大小的滤纸,去除气泡,于滤纸上均匀地加上一层 X-Gluc 溶液(1mmol/L X-Gluc, 50mmol/L NaPO₄, pH7.0)。连同玻璃板一起将凝胶转至瓷盘中的支持物上,调水平,盘底另加少量 ddH₂O。用保鲜膜封紧瓷盘口,放于 37℃ 保温 4—12 小时。中间补加少量 X-Gluc 溶液一次。

2 结果和讨论

取 3 个生长较为旺盛的稳定的水稻 IR72 转化细胞系,抽提植物蛋白连同 GUS 标准蛋白分别经 ndPAGE 电泳分离和酶反应染色,所得结果如图 1。

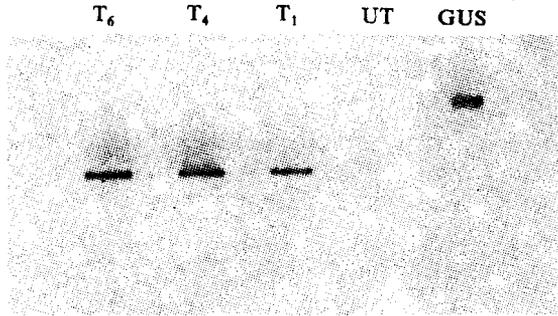


图 1 水稻细胞粗提蛋白经 ndPAGE 电泳分离后 GUS 酶反应染色结果
GUS, Sigma 公司标准 GUS 蛋白; UT, 未转化水稻细胞粗提蛋白; T₁、T₄、T₆, 分别代表来源于不同水稻转化细胞系的粗提蛋白。

图 1 示经 GUS 酶反应染色后,除未转化水稻细胞粗提蛋白外,GUS 标准蛋白和各转化水稻细胞粗提蛋白泳道中均有一条蓝色带,这是 X-Gluc 经 GUS 酶解后的产物再经氧化而产生的靛蓝的颜色,表明该处有 GUS 活性的存在。所不同的是从图中可以明显地看出 Sigma 公司 GUS 蛋白的分子量与水稻转化细胞中的 GUS 蛋白的分子量明显不同,这可能是由于前者来源或亚基组成不同所致(该产品是从 *Helix pomatia* 中提取的 GUS 粗提蛋白)。当我们改用自己提取的来源于 *E.coli* (pBI121) 的 GUS 粗提蛋白作对照时,其分子量大小则与转化水稻细胞中 GUS 蛋白一致(结果未显示)。

在 X-Gluc 与 GUS 进行酶反应时,最快于 2 小时左右即可见有显色反应,4—12 小时后可达到最深颜色。电泳时让溴酚蓝指示剂迁移出凝胶是为了防止它对酶反应染色的干扰,而且由于 GUS 蛋白的分子量达 69kD,不用担心它会电泳迁移出凝胶,在凝胶上加盖一层滤纸是为了避免将 X-Gluc 溶液直接加到光滑的凝胶上而滑落。为节省 X-Gluc 溶液,在酶反应后期,可在滤纸上均匀地追加一些 GUS 抽提缓冲液以补充因蒸发而失去的水份。此外,由于靛蓝染料较稳定,酶反应后的凝胶还可做成干胶长期保存。

鉴于 GUS 酶较为稳定,我们设计了此种检测方法。该法较为简单实用,它不仅可用于检测转基因植物细胞中 GUS 基因的表达,也适用于其它来源的 GUS 活性的定性检测。

参 考 文 献

- (1) 萨姆布鲁克等,1993. 分子克隆实验指南(第二版),北京:科学出版社,880—885.
- (2) Bradford M, 1976. Anal. Biochem., (72): 248—254.
- (3) Hiei Y *et al*, 1994. The Plant Journal, 6(2):271—282.
- (4) Jefferson R A, 1987. Plant Mol. Bio. Rep., 5(4):387—405.
- (5) Jefferson R A *et al*, 1987. EMBO J., 6(13):3901—3907.
- (6) Reiss B *et al*, 1984. Gene, (30): 211—218.

本文于 1995 年 9 月 25 日收到,1995 年 11 月 13 日修回。