

NPT II 蛋白质在转基因水稻中的表达特征研究*

兰金苹^{1)**} 武鹏程^{2)**} 郭美岑¹⁾ 史佳楠¹⁾ 韦汉福²⁾ 荣瑞娟¹⁾ 郝育杰²⁾
杨 烁¹⁾ 白影影¹⁾ 李莉云¹⁾ 吴 琳³⁾ 刘斯奇³⁾ 尹长城^{2)***} 刘国振^{1)***}

(¹⁾ 河北农业大学生命科学学院, 保定 071001; (²⁾ 北京华大蛋白质研发中心有限公司, 北京 101318;

(³⁾ 中国科学院北京基因组研究所, 北京 100101)

摘要 *npt II* 编码新霉素磷酸转移酶, 是转基因实验中最常用的筛选标记基因之一. 本研究中, 表达了重组新霉素磷酸转移酶(NPT II)蛋白质, 制备了单克隆抗体, 建立了用免疫印迹检测转基因水稻中 NPT II 蛋白质的方法, 调查了 NPT II 蛋白质的表达特征, 包括遗传特征、表达时空特征、表达丰度和亚细胞定位等. 结果表明, 该方法可检测到单粒稻米的 0.25%(约 0.025 mg)样品中的 NPT II 蛋白质, NPT II 的表达符合显性遗传规律, 根据 NPT II 的表达可对转基因 T₁ 代种子进行阴阳性及纯合株系的鉴定, 对 T₁ 幼苗中 NPT II 丰度的分析可为纯合单株的鉴定提供参考信息. 定量分析表明苗期叶片中 NPT II 蛋白质的含量约为鲜重的 0.08‰. 在 CaMV-35S 启动子驱动下 NPT II 蛋白质在水稻苗期、成株期的叶片和根部组织中表达量较高, 而在分蘖期、孕穗期较低, NPT II 在不同时期的根、茎、叶、穗子、花及种子等组织中均有表达, 只是在分蘖节、茎节、穗轴和花药等组织中表达量相对较低. 此外, NPT II 蛋白质的表达主要定位在细胞质中. 综上所述, 本研究建立了具有应用价值的检测 NPT II 蛋白质的免疫印记方法并系统揭示了其在水稻中的表达特征.

关键词 转基因水稻, CaMV-35S 启动子, NPT II 蛋白质, 免疫印迹技术

学科分类号 Q7, Q81, Q816, S511, Q51

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0376

npt II 是植物遗传转化中最常用的筛选标记基因之一, 来自大肠杆菌转座子 Tn5 上的 *aph II* 基因, 编码新霉素磷酸转移酶 (neomycin phosphotransferase II, NPT II)^[1]. NPT II 可使 ATP 分子上的 γ 磷酸基转移到抗生素分子上, 从而影响抗生素与核糖体亚基的结合, 使氨基糖苷类抗生素 (如 G418、卡那霉素、巴龙霉素和新霉素等) 因磷酸化而失活. 这样, 带有 *npt II* 基因的植物可以在氨基糖苷类抗生素的培养基上生长, 从而进行筛选. 1983 年, Bevan 等^[2]首次通过农杆菌介导的方式将 *npt II* 基因转入烟草细胞, 发现转化子可以在 G418 培养基上生长, 由此开始了其应用. 目前, *npt II* 基因已被广泛应用于水稻、玉米、小麦、大麦、高粱、棉花、草莓等多种植物甚至动物的转基因研究中^[3-7]. 据报道, 2001 年~2002 年美国批准进行田间试验的转基因植物共 1970 例, 其中用 *npt II* 作为筛选标记的占 48.2%^[8].

转基因技术的应用正在对农业生产发挥着重要

的影响, 转基因已经从实验室中的概念成为现实, 其推广应用引起了社会的广泛关注. 据统计, 全世界种植的转基因作物每年都以较高的速率递增^[9]. 在转基因植物的基础研究和应用领域都离不开高灵敏度、高特异性的检测方法^[10]. 针对外源 DNA 以 PCR 为核心的检测方法具有极高的灵敏度, 也已被广泛采用, 但 PCR 对实验要求比较高, 且只能确定转基因样品是否含有外源 DNA. 针对外源蛋白质的检测方法主要是以免疫学为核心的, 免疫学方法的操作比较简单、省时, 它可以揭示外源基因的表达状态. 目前对转基因植物中外源蛋白质的表

* 国家科技部转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08012-006B)及北京市自然科学基金重点项目(5121001)资助.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

尹长城. Tel: 010-80493132, E-mail: yincc@genomics.cn

刘国振. Tel: 0312-7528250, E-mail: gzhliu@hebau.edu.cn

收稿日期: 2014-12-08, 接受日期: 2015-01-12

达特征还很少涉及。

常见的免疫检测方法有 ELISA、试纸条和蛋白质印迹(Western blot, WB)等, 一般来讲, ELISA 方法操作简单、易于规范, 但因为没有对全蛋白质的分离过程, 其检测结果易受植物体内多酚等多种因素的影响, 数据不能直观展示, 甚至没有分子质量等基本信息。试纸条的使用最为简便, 但灵敏度相对较低, 结果也难以定量。免疫印迹方法是将蛋白质混合物通过凝胶分离后转移到固相支持介质上, 然后用特异性抗体与被固定到膜上的靶蛋白质杂交并检测放大后的信号, 这种方式具有较高的灵敏度、特异性^[11-12], 甚至可以做到单细胞水平的分析^[13], 是目前揭示蛋白质表达特征的重要手段。对 NPT II 蛋白质的检测, 最初是使用放射性标记的^[32P]ATP 检测磷酸基团的转移^[14]。这种方法操作烦琐, 同位素的使用还会造成环境污染。随后人们采用 ELISA 方法检测转基因植物中 NPT II 蛋白质的含量^[15-16]。目前, 用于 NPT II 蛋白质检测的 ELISA 试剂盒已经有国外来源的商业化渠道供应, 其检测灵敏度可达 ng 级, 但价格较贵, 在大规模的转基因植物检测中应用成本较高。此外, 也有国外公司销售商业化的免疫检测试纸条。国内王新桐等^[17]建立了双抗体夹心 ELISA 检测转基因棉花中 NPT II 的方法。

启动子是决定基因表达时空和强度的重要调控元件, 花椰菜花叶病毒(CaMV)的 35S 启动子能在许多植物中驱动靶基因组成型表达, 被广泛用于转基因研究^[18], 据估计, 大约有 80%~85%的转基因植物中使用了该启动子。目前对启动子驱动的目标基因的表达主要是基于转录水平, 分析也都是以个别组织为对象^[19], 尚未见到系统调查 CaMV-35S 启动子驱动 NPT II 蛋白质表达特征的报道。

本研究在细菌中表达了 NPT II 蛋白质, 制备筛选了高特异性单克隆抗体, 在此基础上, 建立优化了高灵敏度检测 NPT II 蛋白质的 WB 技术, 可实现对单粒稻米的检测, 同时系统调查了转基因水稻中 NPT II 蛋白质的表达特征。

1 材料与方法

1.1 *npt* II 基因的克隆

利用 Primer CE 软件^[20], 设计了 *npt* II 基因的特异扩增引物, 上游引物加 *Eco*R I 酶切位点, 下游引物加 *Hind* III 酶切位点, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。上游引物序列为

5' GCGAATTCGAACAAGATGGATTGCAC 3', 下游引物序列为 5' GCAAGCTTTCAGAAGAAGCTCGTCAAG 3', 其中下划线为相应的酶切位点。以大肠杆菌基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 将 PCR 产物与 pET30a(+)载体分别双酶切, 纯化回收 PCR 及酶切产物, 连接后转化大肠杆菌 DH5 α , 酶切鉴定后的重组子由华大基因进行测序验证。

1.2 NPT II 蛋白质的表达与纯化

将测序正确的质粒转入表达菌 BL21, 按 1:100 的比例将过夜菌转接至 100 ml 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养至 A_{600} 为 0.6~0.8, 按 1:100 比例加入 100 mmol/L 的 IPTG, 37℃ 震荡培养 3 h, 收菌后超声破碎, 用 Ni²⁺-NTA 亲和层析柱进行蛋白质纯化, SDS-PAGE 电泳检测, 并用抗 His 抗体检测纯化的蛋白质。

1.3 抗体的制备及特异性检测

用大肠杆菌表达的全长 NPT II 蛋白质做免疫原, 免疫小鼠制备单克隆抗体, 单克隆抗体的制备由北京华大蛋白质研发中心有限公司进行, 用 WB 方法检测抗体的特异性。水稻 ATPase2 (LOC_Os11g29490)抗体也由北京华大蛋白质研发中心有限公司制备。

1.4 重组 NPT II 蛋白质的定量

采用 Bradford 法对 NPT II 蛋白质进行定量分析: 配制 BSA 蛋白质标准液(终浓度依次为 4、3.5、3.0、2.5、2.0、1.5、1.0、0.5 和 0 g/L)与 0.1 mol/L HCl、双蒸水混合, 室温放置 0.5 min, 再在各试管中加入考马斯亮蓝 G-250 测定工作液, 摇匀后室温放置 10 min, 用分光光度计测定各管在 595 nm 处相对吸光度, 用稀释液调整待测 NPT II 蛋白质浓度至测定范围内, 按照以上步骤测定其吸光值, 测定 3 个平行样品, 取其平均值, 绘制标准曲线并计算出待测 NPT II 蛋白质的浓度。

1.5 水稻总蛋白质提取及 WB 检测

将冻存于-70℃的水稻样品用高通量组织研磨仪(北京鼎昊源科技有限公司, TL2010)或手工充分研磨成细粉状, 加入蛋白质提取液(62.5 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4), 10%甘油, 0.1% SDS, 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF, 5% β 巯基乙醇), 混匀冰上放置 30 min, 12 000 r/min 4℃ 离心 20 min, 取上清即为总蛋白质, 具体方法参见文献[21]。可溶性蛋白质的提取与上述过程类似, 只是在蛋白质提取液中不加入 SDS。试验至少重复 3 次, 并用 anti-HSP 抗体的检测信号作为等量加样的内参^[22]。

用 Image J 软件扫描采集 X 光片上的 WB 条带信号或直接用化学发光成像仪(北京赛智创业科技有限公司, MiniChemi 610)采集, 分别采集 3 次 WB 分析的信号, 计算其平均值和方差.

1.6 数据的归一化

为了能对不同水稻样品中的 NPT II 含量进行相对比较, 对采集的 WB 数据进行了归一化处理, 具体方法是将同一次 WB 分析中采集的 NPT II 或 HSP 的总信号强度设置为 10 000, 单个样品中 NPT II 或 HSP 的信号强度按比例进行折算进行归一化, 然后计算 NPT II 和 HSP 信号比值.

1.7 转化质粒的构建及水稻转化

转化质粒 pCambia2300 由江光怀博士(中国科学院遗传与发育生物学研究所)赠送, 该质粒上带有 35S 启动子驱动的 *npt II* 标记基因, 通过农杆菌介导法将质粒 DNA 转入水稻, 在培养基中用 G418 进行筛选, 遗传转化由武汉伯远生物科技有限公司完成^[2]. 转化受体材料为 TP309, 转基因水稻栽培于河北农业大学(河北保定)水稻实验田和温室内, 取不同时期和不同组织的水稻材料, 液氮速冻、备用.

2 结果与分析

2.1 *npt II* 基因的克隆

根据 *npt II* 基因的序列设计 PCR 引物, 以大肠杆菌基因组 DNA 为模板进行扩增(图 1a), 将扩增产物定向插入到 pET30a(+)载体相应的酶切位点上, 构建重组表达载体 pET30a-*npt II*, 如图 1b 所示, 双酶切后得到约 5.4k 的 pET30a(+)线性片段和约 790 bp 的插入片段, 根据测序结果选择无碱基

突变的质粒, 获得 *npt II* 基因的原核表达载体.

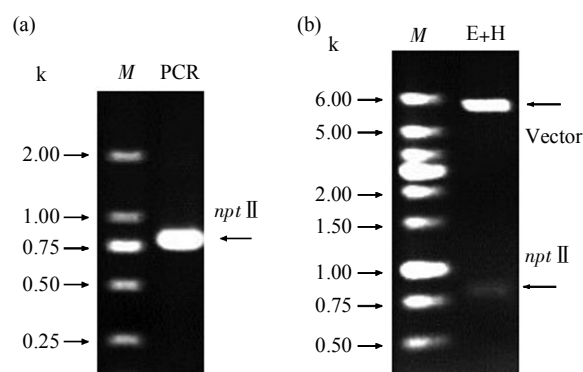


Fig. 1 PCR amplification and restriction enzyme digestion verification of *npt II* gene

M: Molecular mass marker; PCR: *npt II* gene amplification product; E+H: Restriction enzyme (*EcoR* I and *Hind* III) digested plasmid DNA.

2.2 NPT II 蛋白质的表达及抗体制备

将重组载体 pET30a-*npt II* 转入表达菌中, 挑取单菌落进行诱导表达. 细菌超声破碎后离心分离上清和沉淀, 用 Ni^{2+} -NTA 亲和层析柱纯化, 进行 SDS-PAGE 分析. 图 2a 为考马斯亮蓝染色结果, 由图可见, 在大肠杆菌的上清和沉淀中均能清楚地看到诱导条带, 纯化后获得了分子质量约为 38 ku 的单一蛋白质条带, 与预期大小一致. 图 2b 是用抗 His 抗体进行 WB 检测的结果, 由图可见, 未经诱导的样品中没有信号, 而在上清、沉淀和纯化后蛋白质样品中均出现分子质量符合预期的信号, 确认获得了纯化的重组表达的 NPT II 蛋白质.

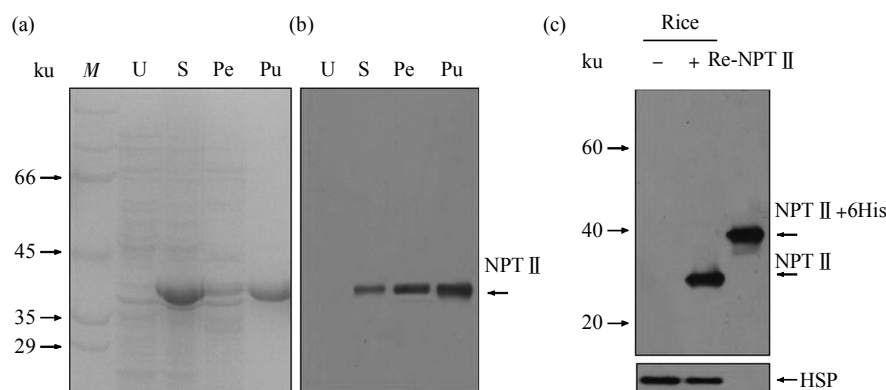


Fig. 2 The expression and antibody generation of recombinant NPT II protein

(a) Coomassie blue stained gel showed bacterial expressed recombinant NPT II protein. (b) WB detection of bacterial expressed NPT II protein using anti-His antibody. (c) Specificity verification of anti-NPT II antibody. U: Un-induced; S: Supernatant; Pe: Pellet; Pu: Purified; Re-NPT- II : Recombinant NPT- II protein; Rice -: Non-GMO sample; Rice +: GMO sample with NPT II protein; HSP: The abundance of HSP protein detected by anti-HSP antibody was used as loading control.

以纯化的 NPT II 蛋白质为免疫原, 免疫小鼠后获得 32 株单克隆抗体, 经筛选发现部分细胞株产生的抗体只能识别重组抗原或只能识别天然抗原, 只有部分细胞株能同时识别重组和天然抗原(数据未附), 经比较鉴定发现 #13 株具有较高的灵敏度. 用 #13 抗体对转基因水稻及重组 NPT II 蛋白质进行平行免疫印记检测(图 2c). 结果表明, 在非转基因水稻样品中没有可见的背景信号, 在转基因水稻中, 有分子质量在 30 ku 左右的特异条带(天然 NPT II 蛋白质的理论分子质量为 29 ku), 而在重组 NPT II 蛋白质的样品中, 特异条带的分子质量较高, 是因为重组的 NPT II 蛋白质带 6xHis 标签及其他链接序列. 这一结果证明所制备的 NPT II 抗体具有很好的特异性. 同样地, 我们还用该抗体检测了转基因拟南芥、烟草、杨树中的 NPT II 蛋白质, 均能显示清晰的特异条带, 表现出很好的特异性和灵敏度(数据未附), 说明该抗体具有更广的应用潜力.

2.3 转基因水稻的鉴定

组培再生的转基因材料为 T_0 代, 其所结种子为 T_1 代, 尽快地鉴定阳性转基因材料以及遗传上纯合的株系具有重要的应用价值. 我们对 8 个独立转基因水稻株系的 T_1 代种子进行了免疫印迹分析, 其中 2 个代表性株系的检测结果如图 3a 所示, 每个株系检测了 10 粒种子, Line 5 的种子均为阳性, 而 Line 8 的种子中有 7 粒阳性, 3 粒为阴性, 据此可初步推测, Line 5 很可能为纯合株系, Line 8 为杂合株系. 为了进一步证明该推论, 随机选取 50 粒 Line 5 植株种子进行栽培, 对 T_1 代幼苗进行 WB 检测, 结果均为阳性(数据未附), 因此, 转基因水稻 Line 5 为纯合株系. 由此也可说明, WB 检测的 NPT II 表达为显性性状, 分析转基因水稻 T_1 代种子, 不但可以筛选阳性转化子, 还可通过一定数目种子的分析鉴定可能的纯合株系, 对 T_1 代种子的快速鉴定可减轻栽培和后续鉴定的工作量.

为了尝试从 T_1 代幼苗中鉴定纯合个体, 我们对 Line 8 的 40 个独立的 T_1 代幼苗叶片进行 NPT II 蛋白质的检测(图 3b), 由图可见, 40 株中有 31 株阳性, 9 株阴性, 比例为 31:9, 符合 3:1 比例, 说明 NPT II 阳性为单基因控制的事件. 进一步比较发现, 阳性个体间的 NPT II 信号强度有较为明显的差异, 为了进行定量比较, 我们采集了 NPT II 蛋白质及内参蛋白质 HSP 的信号, 通过归一化后计算 NPT II 蛋白质与 HSP 蛋白质信号的比值(详见

附表 S1), 计算结果表明, 比值最高的 10 份材料的平均信号比为 2.19, 其余 21 株阳性材料的平均信号比为 0.86. 水稻是二倍体植物, 纯合个体的基因型为 AA, 杂合个体的基因型为 Aa, NPT II 蛋白质丰度的区别可能源自基因型不同, 进一步讲, NPT II 蛋白质表达量较高的个体很可能是纯合的, 为了验证这一结果, 我们对 3 个比值最高的个体(14, 18 和 21, 图中下划线标示)后代种子进行了检测, 证明没有分离确为纯合材料. 另外, 为了确定 *npt* II 基因的拷贝数, 对该转基因水稻进行了实时定量 PCR 分析, 证明 Line 8 中的拷贝数为 1(数据未附).

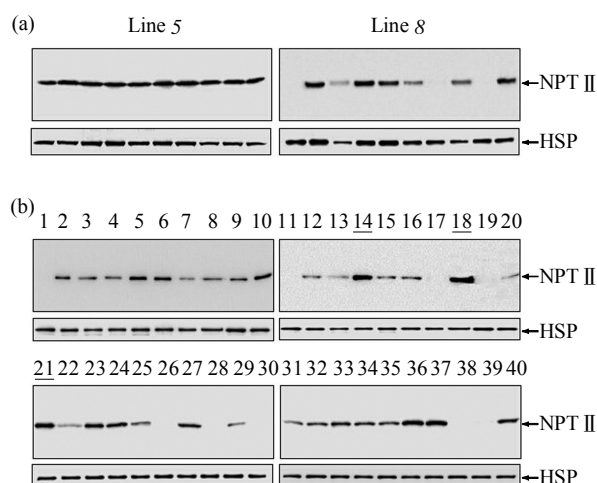


Fig. 3 The identification of transgenic rice

(a) WB analysis for NPT II protein in transgenic rice T_1 seeds. The total protein was isolated from transgenic T_1 seeds, and separated by SDS-PAGE. WB analysis was carried out using anti-NPT II antibody. Line 5 and Line 8 were independent transgenic lines. Ten seeds were analyzed for each line. (b) WB analysis for NPT II protein in transgenic T_1 seedlings. Forty randomly selected seedlings were chosen from Line 8, total proteins were isolated from T_1 seedlings and separated by SDS-PAGE. WB analysis was carried out using anti-NPT II antibody. Number 1 ~ 40 are individual T_1 seedlings from Line 8. HSP: The abundance of HSP protein was used as loading control.

2.4 转基因水稻叶片中 NPT II 蛋白质的丰度

为了解 NPT II 抗体的检测灵敏度以及水稻叶片中 NPT II 蛋白质的丰度, 以不同浓度的 NPT II 重组蛋白质为检测对象绘制了 WB 检测的标准曲线(图 4). 图中所示重组 NPT II 蛋白质的上样量依次为 1、2、4、8、16 和 32 ng, 从图 4a 可见, 约 1 ng 的重组 NPT II 蛋白质仍然能清晰表现出明显的 WB 信号, 且信号强度随蛋白质上样量加大而

增加,采集各条带的灰度值,计算3次重复实验的平均值及方差,绘制标准曲线并获得了线性回归方程(图4b).同时,将鲜重为0.02 g水稻苗期(三叶期)叶片加裂解液和上样缓冲液获得400 μ l的蛋白质样品,分别上样4 μ l和8 μ l,与重组蛋白质同时进行WB检测,采集水稻样品的信号值,将信号值带入方程式计算出对应NPT II蛋白质含量分

别为17 ng和32 ng,取两者平均得到电泳水稻样品中NPT II蛋白质含量约为4.08 mg/L,折合在水稻苗期叶片中NPT II蛋白质的含量约为鲜重的0.008%.文献[23]曾提到,在转基因作物中NPT II蛋白质的含量仅占全部可溶性蛋白质的0.00005%~0.001%,与此结果相比,本研究提供了一个更为具体的数据.

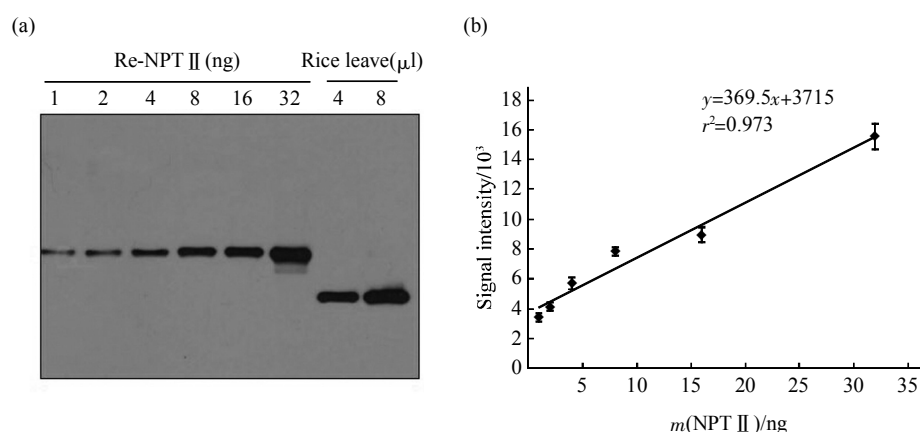


Fig. 4 Concentration analysis of NPT II protein in rice leaves

(a) WB detection of NPT II protein using anti-NPT II antibody. Re-NPT- II : recombinant NPT II protein; Rice leave: Total protein isolated from rice leave at seedling stage. (b) Standard curve of NPT II protein concentration against the intensity of WB signals. x axis is the content of NPT II protein and y axis is the signal intensity detected in WB analysis.

2.5 转基因稻米中 NPT II 蛋白质的检测

水稻种子成熟后,经加工去除颖壳和胚成为稻米,是人们的食用部分.为了解对稻米中 NPT II 蛋白质检测的灵敏度,对单粒稻米(去壳、去胚)样品进行了检测.将稻米用研钵磨碎后,提取单粒稻米的蛋白质,然后对单粒稻米的0.125%、0.25%、0.5%、1.0%和2.0%样品进行蛋白质印迹分析(图5).结果表明,从单粒稻米的0.25%、0.5%、1.0%

和2.0%的样品(重量分别为0.025、0.05、0.1和0.2 mg)中,都可以检测到清晰的NPT II信号,而0.125%的泳道几乎检测不到相应的条带.因此,只需要单粒稻米的1/40即可确定是否含有NPT II成分.

2.6 转基因水稻中 NPT II 蛋白质的表达谱

为了解 NPT II 蛋白质在转基因水稻中的表达谱,我们尽可能多地采集了水稻生长不同时期多个组织的样品,包括全种子、胚、胚乳和颖壳;苗期的地上部、地下部;分蘖期的茎、分蘖节、茎节、叶鞘、叶枕、叶片上部、叶片中部、叶片下部和根尖,孕穗期的茎、叶鞘、叶枕、叶片、根尖,幼穗(长度分别为1、5、10、15、20和25 cm)、成熟穗子及穗轴;开花期的茎、叶鞘、叶枕、叶片、根尖、穗子、穗轴、花药、柱头、颖壳;灌浆期的茎、叶鞘、叶枕、叶片、穗子、穗轴和根尖,授粉后不同时期的种子(分别为授粉后1、5、10、15、20和30 d),以及灌浆期的胚、胚乳和颖壳,完熟

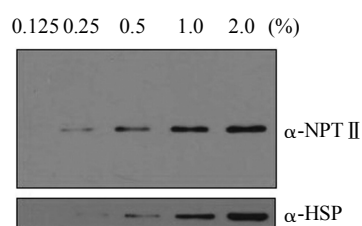


Fig. 5 WB detection of NPT II protein in rice grain

0.125%, 0.25%, 0.5%, 1% and 2% represent the percentage of loaded sample in total protein isolated from single rice grain. HSP: The abundance of HSP protein was used as loading control.

期的茎、叶鞘、叶枕、叶片、穗子、穗轴和根尖。提取总蛋白质后用 NPT II 特异抗体进行 WB 检测(图 6)。由图可见, NPT II 蛋白质在上述所有组织中

都有表达, 只是在分蘖节、茎节、穗轴和花药等组织中表达量相对较低。

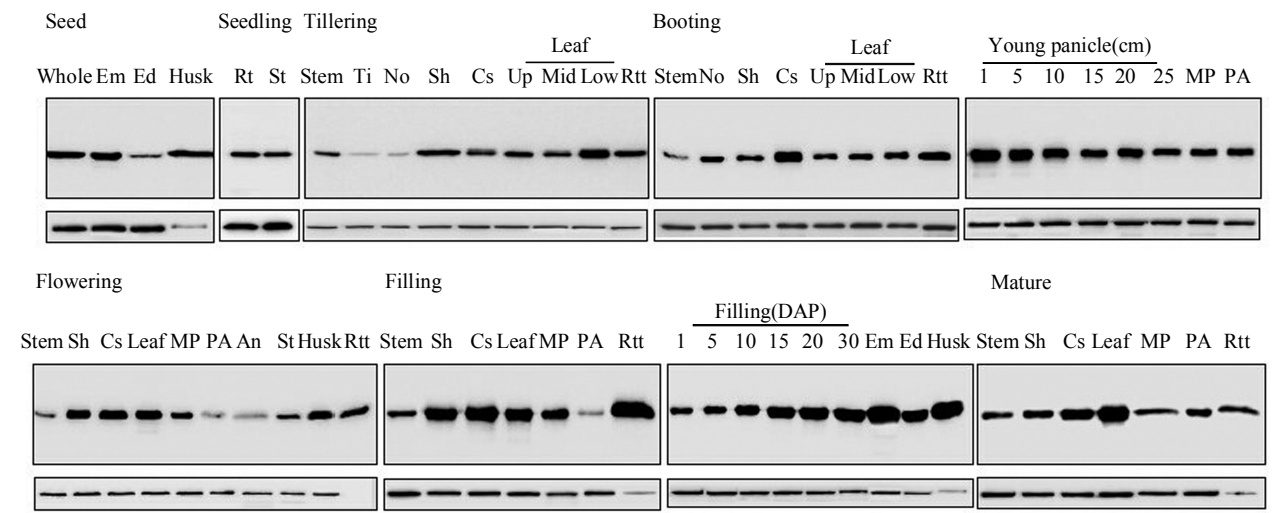


Fig. 6 The expression pattern of NPT II protein in transgenic rice

Different tissues of rice samples were collected. Total proteins were isolated and separated by SDS-PAGE. WB analysis were carried out using anti-NPT II antibody. The list of tissues are as follows: Seed: whole seed, embryo (Em), endosperm (Ed) and husk; Seedling stage: shoot (St) and root (Rt); Tillering stage: stem, tillers (Ti), node (No), sheath (Sh), cushion (Cs), upper part of leaf (Up), middle part of leaf (Mid), lower part of leaf (Low) and root tip (Rtt); Booting stage: stem, node (No), sheath (Sh), cushion (Cs), upper part of leaf (Up), middle part of leaf (Mid), lower part of leaf (Low) and root tip (Rtt), young panicle of 1, 5, 10, 15, 20 and 25 cm in length, mature panicle (MP) and panicle axis (PA); Flowering stage: stem, sheath (Sh), cushion (Cs), leaf, mature panicle (MP), panicle axis (PA), anther (An), stigma (St), husk and root tip (Rtt); Filling stage: stem, sheath (Sh), cushion (Cs), leaf, mature panicle (MP), panicle axis (PA), root tip (Rtt), filling panicle (1, 5, 10, 15, 20 and 30 days after pollination (DAP)), embryo (Em), endosperm (Ed) and husk; Mature stage: stem, sheath (Sh), cushion (Cs), leaf, mature panicle (MP), panicle axis (PA) and root tip (Rtt). HSP: The abundance of HSP protein was used as loading control.

2.7 NPT II 蛋白质在不同时期叶片和根部表达丰度的比较

叶片和根是水稻最主要的组织, 其生长贯穿于全生育期中, 相对定量比较 NPT II 蛋白质在这两个组织中的表达丰度变化有助于对其表达特征的了解。我们首先比较了水稻生长不同时期(三叶期、四叶期、五叶期、六叶期、分蘖期、孕穗期、开花期、灌浆期和完熟期)叶片中 NPT II 蛋白质的表达丰度(图 7a), 由图可见, NPT II 蛋白质在所有时期的叶片中都能检测到, 但幼苗期和成株期表达量较高, 在分蘖期和孕穗期表达量较低。同样比较了不同生长阶段的根部样品(图 7b), 结果表明, 根部的表达趋势与叶片相似, 在幼苗期和成株期根部的 NPT II 蛋白质表达丰度较高, 在分蘖期表达量最低。

2.8 NPT II 蛋白质的亚细胞定位

分别提取了转基因水稻全蛋白质和可溶性部分, 用 ATPase2 和 NPT II 抗体进行 WB 分析(图 8),

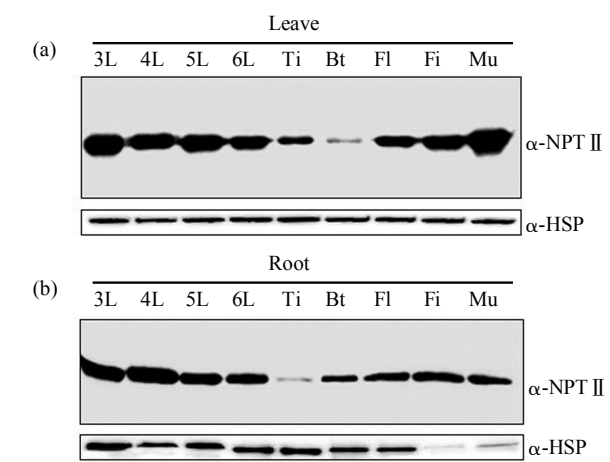


Fig. 7 The abundance of NPT II protein in leaves and roots at different developmental stages

(a) The abundance of NPT II protein in leaves at different developmental stages. (b) The abundance of NPT II protein in roots at different developmental stages. 3L, 4L, 5L and 6L represent three leaves, four leaves and five leaves stages respectively; Ti: Tillering stage; Bt: Booting stage; Fl: Flowering stage; Fi: Filling stage; Mu: Mature stage. HSP: The abundance of HSP protein was used as loading control.

由图 8a 可见, ATPase2 为膜蛋白质, 在可溶性成分中检测不到, 说明提取的可溶性成分中没有膜蛋白质污染, 由图 8b 可见, 在全蛋白质和可溶性部分中都能检测到 NPT II 蛋白质, 说明 NPT II 蛋白质主要存在于可溶性的细胞质中. 这一特性决定了 NPT II 的提取和检测都是比较方便的.

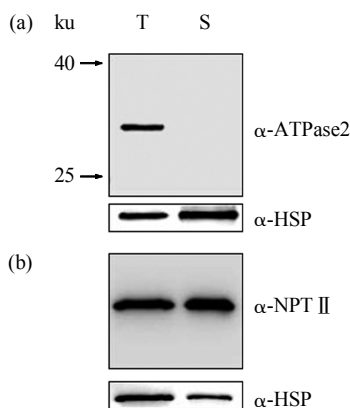


Fig. 8 The subcellular localization of NPT II protein

T: Total protein; S: Soluble protein; HSP: The abundance of HSP protein was used as loading control.

3 讨 论

本研究制备了 NPT II 特异的单克隆抗体, 建立了基于免疫印记技术的检测方法, 调查了转基因水稻中 NPT II 蛋白质的丰度, 系统分析了 NPT II 蛋白质在转基因水稻中表达的遗传特征、时空特征和亚细胞定位, 获得了 CaMV-35S 启动子驱动的 NPT II 蛋白质在水稻中组成型表达的证据.

利用本研究制备的抗体及所建立的免疫印迹方法可检测 ng 级的重组蛋白质, 可检测 1/40 粒稻米中(约 0.025 mg)的 NPT II 蛋白质, 达到了具有实用价值的检测灵敏度和特异性, 由于稻米是食用部分, 对稻米的检测尤其具有重要的价值. 该方法不仅可用于水稻中的 NPT II 蛋白质的检测, 还可用于拟南芥、烟草以及杨树等其他植物的检测(数据未附). 该方法基本不受植物中内源物质的干扰, 检测结果直观可靠, 可方便地进行相对定量分析. 从实际应用的角度看, 虽然目前的免疫印迹分析过程还需要较长的时间和较为复杂的操作, 但也是分子生物学实验室的常规技术, 相信随着自动化免疫印迹分析仪的推广, 可以逐步实现 WB 分析的自动化、满足对大量样品检测的需要.

WB 检测 NPT II 蛋白质的表达符合显性遗传规律, 可对转基因 T_1 代种子进行阴阳性鉴定, 进而可通过对较多数目 T_1 种子的检测筛选纯合或杂合株系. 因为 NPT II 的表达丰度可能在一定程度上受拷贝数的影响, 所以可通过对 T_1 代幼苗的分析, 根据表达丰度的区别推测可能的纯合单株. 与 PCR 分析相比, WB 分析操作要求较低, 一般不会出现假阳性结果, 更重要的是, WB 检测的阳性直接证明了 NPT II 蛋白质的存在, 而 PCR 检测阳性植株中仍有部分没有蛋白质的表达. 需要说明的是, 外源蛋白质的表达丰度除与拷贝数有关外, 有时也受插入位点等因素的影响. 所以, 靠 NPT II 蛋白质的高丰度判断纯合株系存在着一定的风险, 不排除个别高表达植株为杂合子, 而个别低表达植株为纯合子的情形. 当然, 本实验中展示的 Line 8 中 NPTII 蛋白质的表达数据具有一定的外源基因和转化事件的特异性, 结果并不能简单推广到所有的转基因事件中. 对纯合材料的确认还应该从多个高表达的株系入手, 结合后代的遗传分析等方法进行. 本方法的建立对转基因材料的快速鉴定提供了又一个重要的选项.

根据报道, 35S 启动子驱动的 GUS 在转基因水稻中主要在叶片、根、花器官以及胚、胚乳和休眠或发芽的种子表达^[9]; 在棉花中, 35S 启动子驱动的 NPT II 在棉花苗期(5 片真叶)、棉株新展开叶、功能叶(顶 3、4 叶)、主茎、叶柄和根具有表达^[17]. 本研究系统检测了几十份水稻样品中的 NPT II 蛋白质, 获得了在不同时空条件下蛋白质水平的组成型表达特征. 值得指出的是, 在不同部位中的表达量并不均匀, 在特定的部位, 如分蘖节、茎节、穗轴和花药等组织中表达量相对较低, 而在苗期叶片和根部、幼穗发育早期以及种子灌浆后期等表达量相对较高. 此外, 亚细胞定位结果表明, NPT II 蛋白质主要表达在可溶性的细胞质中, 比较容易提取. 可以说, 这些表达特征让我们能够在水稻生长的任何时期、任何部位进行检测, 本研究提供的数据也可为深入调查 CaMV-35S 启动子的调控机理提供参考.

附件 表 S1 见本文网络版附录(<http://www.pibb.ac.cn>)

参 考 文 献

[1] Beck E, Ludwig G, Auerswald E A, *et al.* Nucleotide sequence and

- exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene*, 1982, **19**(3): 327–336
- [2] Bevan M W, Flavell R B, Chilton M D. A chimaeric antibiotic resistance marker gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature*, 1983, **304**(14): 184–187
- [3] Safitri F A, Ubaidillah M, Miswar, *et al.* Response of explants of calli rice (*Oryza sativa* L.) Japonica cv. "Ilmi" to gene transformation using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated. *Am J Plant Sci*, 2013, **4**(4): 838–843
- [4] Hiei Y, Ishida Y, Komari T. Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Front Plant Sci*, 2014, **5**(7): 628
- [5] Liu G, Godwin I D. Highly efficient sorghum transformation. *Plant Cell Rep*, 2012, **31**(6): 999–1007
- [6] Zhang T, Wu S J. Enhanced *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calli of upland cotton. *Methods Mol Biol*, 2012, **847**(3): 245–253
- [7] Pantazis C J, Fisk S, Mills K, *et al.* Development of an efficient transformation method by *Agrobacterium tumefaciens* and high throughput spray assay to identify transgenic plants for woodland strawberry (*Fragaria vesca*) using NPT II selection. *Plant Cell Rep*, 2013, **32**(3): 329–337
- [8] Miki B, Mchugh S. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J Biotechnol*, 2004, **107**(3): 193–232
- [9] Prado J R, Segers G, Voelker T, *et al.* Genetically engineered crops: from idea to product. *Annu Rev Plant Biol*, 2014, **65**: 769–790
- [10] Waiblinger H U, Grohmann L, Mankertz J, *et al.* A practical approach to screen for authorised and unauthorised genetically modified plants. *Anal Bioanal Chem*, 2010, **396**(6): 2065–2072
- [11] Kurien B T, Scofield R H. Western blotting. *Methods*, 2006, **38**(4): 283–293
- [12] Li X, Bai H, Wang X, *et al.* Identification and validation of rice reference proteins for western blotting. *J Exp Bot*, 2011, **62**(14): 4763–4772
- [13] Hughes A J, Spelke D P, Xu Z, *et al.* Single-cell Western blotting. *Nat Methods*, 2014, **11**(7): 749–755
- [14] Reiss B, Sprengel R, Will H, *et al.* A new sensitive method for qualitative and quantitative assay of neomycin phosphotransferase in crude cell extracts. *Gene*, 1984, **30**(1–3): 211–217
- [15] McKenzie M, Mett V, Jameson P. Modified ELISA for the detection of neomycin phosphotransferase II in transformed plant species. *Plant Cell Rep*, 2000, **19**(3): 286–289
- [16] Kim H J, Lee S M, Kim J K, *et al.* Expression of PAT and NPT II proteins during the developmental stages of a genetically modified pepper developed in Korea. *J Agric Food Chem*, 2010, **58**(20): 10906–10910
- [17] 王新桐, 孙佳芝, 高丽丽, 等. 转基因棉花中新霉素磷酸转移酶(NPT II)双抗体夹心 ELISA 定量检测方法的建立. *农业生物技术学报*, 2014, **22**(3): 372–379
- Wang X T, Sun J Z, Gao L L, *et al.* *J Agric Biotechnol*, 2014, **22**(3): 372–379
- [18] Benfey P N, Chua N H. The Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science*, 1990, **250**(4983): 959–966
- [19] Terada R, Shimamoto K. Expression of CaMV35S-GUS gene in transgenic rice plants. *Mol Gen Genet*, 1990, **220**(3): 389–392
- [20] Cao Y, Sun J, Zhu J, *et al.* PrimerCE: designing primers for cloning and gene expression. *Mol Biotechnol*, 2010, **46**(2): 113–117
- [21] 兰金苹, 李莉云, 贾霖, 等. 叶绿体基因编码蛋白质在水稻叶片生长过程中的表达研究. *生物化学与生物物理进展*, 2011, **38**(7): 652–660
- Lan J P, Li L Y, Jia L, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2011, **38**(7): 652–660
- [22] Nishimura A, Aichi I, Matsuoka M. A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. *Nat Protoc*, 2006, **1**(6): 2796–2802
- [23] Fuchs R L, Heeren R A, Gustafson M E, *et al.* Purification and characterization of microbially expressed neomycin phosphotransferase II (NPT II) protein and its equivalence to the plant expressed protein. *Biotechnology*, 1993, **11**(13): 1537–1542

The Expression Properties of NPT II Protein in Transgenic Rice Plant*

LAN Jin-Ping^{1)**}, WU Peng-Cheng^{2)**}, GUO Mei-Cen¹⁾, SHI Jia-Nan¹⁾, WEI Han-Fu²⁾, RONG Rui-Juan¹⁾,
HAO Yu-Jie²⁾, YANG Shuo¹⁾, BAI Ying-Ying¹⁾, LI Li-Yun¹⁾, WU Lin³⁾,
LIU Si-Qi³⁾, YIN Chang-Cheng^{2)***}, LIU Guo-Zhen^{1)***}

¹⁾ College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

²⁾ Beijing Protein Innovation Co., Ltd. Beijing 101318, China;

³⁾ Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract The *npt II* gene, encoding neomycin phosphotransferase II, is one of the most commonly used selection marker in transgenic research. In this study, recombinant NPT II protein was expressed in *E. coli* and monoclonal antibodies were generated. The inheritance, temp-spatial profiling, abundance and subcellular localization properties were investigated using established Western blot (WB) analysis. The results showed that NPT II protein in 0.25% of a single rice grain (about 0.025mg) was detectable, the expression of NPT II protein is consistent with dominant inheritance law, positive seeds and homozygous lines can be identified in transgenic T₁ generation, furthermore, the abundance of NPT II protein can provide clues for the identification of homozygous individual in T₁ seedlings. Quantitative analyses shows that NPT II protein accounts for about 0.08‰ of total protein in the leaves at seedling stage. The expression profile of NPT II protein in transgenic rice shows that the abundance of NPT II driven by CaMV-35S promoter in the leaves and roots at seedling and adult stage are higher than that at tillering and booting stage. NPT II was detectable at different stages in rice root, stem, leaf, panicle, flower and seed, however, the abundance of NPT II in tillers, node, panicle axis and anther tissues is lower than others. In addition, the NPT II protein is mainly localized in the soluble portion of cytoplasm. Taken together, an applicable immunoblot method was established and the expression properties of NPT II protein in transgenic rice were demonstrated.

Key words transgenic rice, CaMV-35S promoter, NPT II protein, Western blot

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0376

*This work was supported by grants from Cultivate New Varieties of Genetically Modified Organisms Technology Major Projects from The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China (2009ZX08012-006B) and Beijing Municipal Natural Science Foundation Key Project (5121001).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

YIN Chang-Cheng. Tel: 86-10-80493132, E-mail: yincc@genomics.cn

LIU Guo-Zhen. Tel: 86-312-7528250, E-mail: gzhliu@hebau.edu.cn

Received: December 8, 2014 Accepted: January 12, 2015

附 录

Table S1 Quantitative analysis of NPT II signal intensity in T₁ seedlings

#Plants	NPT II -I	NPT II -C	NPT II -N	HSP-I	HSP-C	HSP-N	NPT II -N/HSP-N	Results
1	263	2.27	598	5308	2.09	1106	0.05	Negative
2	4497	2.27	10208	4591	2.09	9596	1.06	Positive
3	3869	2.27	8784	3646	2.09	7620	1.15	Positive
4	3258	2.27	7395	4062	2.09	8489	0.87	Positive
5	7309	2.27	16592	4701	2.09	9826	1.69	Positive
6	6751	2.27	15325	4868	2.09	10173	1.51	Positive
7	2295	2.27	5209	4047	2.09	8459	0.62	Positive
8	4136	2.27	9388	4876	2.09	10191	0.92	Positive
9	4870	2.27	11055	6430	2.09	13439	0.82	Positive
10	6758	2.27	15341	5304	2.09	11085	1.38	Positive
Sub-total	44005			47833				
11	629	2.57	1614	3932	2.79	10977	0.15	Negative
12	2605	2.57	6694	3450	2.79	9625	0.70	Positive
13	2082	2.57	5352	2731	2.79	7619	0.70	Positive
14	9846	2.57	25304	2993	2.79	8350	3.03	Positive
15	2840	2.57	7299	3555	2.79	9919	0.74	Positive
16	3445	2.57	8853	3546	2.79	9893	0.89	Positive
17	586	2.57	1507	3018	2.79	8419	0.18	Negative
18	12406	2.57	31884	3679	2.79	10264	3.11	Positive
19	2011	2.57	5169	4848	2.79	13527	0.38	Negative
20	2510	2.57	6452	4069	2.79	11354	0.57	Positive
Sub-total	38960			35821				
21	8053	3.12	25141	3715	2.52	9354	2.69	Positive
22	1904	3.12	5940	3830	2.52	9652	0.62	Positive
23	6306	3.12	19676	4112	2.52	10361	1.90	Positive
24	5676	3.12	17710	4069	2.52	10255	1.73	Positive
25	2554	3.12	7968	3602	2.52	9078	0.88	Positive
26	65	3.12	203	4324	2.52	10897	0.02	Negative
27	5691	3.12	17756	3791	2.52	9553	1.86	Positive
28	78	3.12	244	4186	2.52	10548	0.02	Negative
29	1634	3.12	5098	4611	2.52	11619	0.44	Positive
30	70	3.12	218	3475	2.52	8758	0.02	Negative
Sub-total	32031			39715				
31	2190	2.52	5515	4005	2.33	9340	0.59	Positive
32	3813	2.52	9609	5087	2.33	11854	0.81	Positive
33	5064	2.52	12761	4434	2.33	10331	1.24	Positive
34	4250	2.52	10709	4131	2.33	9625	1.11	Positive
35	3755	2.52	9463	4571	2.33	10650	0.89	Positive
36	7626	2.52	19218	3938	2.33	9176	2.09	Positive
37	7690	2.52	19378	4065	2.33	9472	2.05	Positive
38	40	2.52	101	4492	2.33	10465	0.01	Negative
39	43	2.52	108	4149	2.33	9667	0.01	Negative
40	5240	2.52	13204	4003	2.33	9326	1.42	Positive
Sub-total	39711			42875				

NPT II -I: Intensity of NPT II protein; NPT II -C: 100000/Sub-total of NPT II -I; NPT II -N: NPT II -I*NPT II -C. HSP-I: Intensity of HSP protein; HSP-C: 100000/sub-total of HSP-I; HSP-N: HSP-I*HSP-C.