pigment systems in spinach chloroplasts. Biochim Biophys Acta, 1969, 189: 171~181
9 Garab G, Kieleczawa J, Sutherland J C, et al. Organisation of pigment-protein complexes into macrodomains in the thylakoid membranes of wild-type and chlorophyll b-less mutant of barley as revealed by circular dichroism. Photochem Photobiol, 1991, 54: 273~281

(1998-07-23 收稿, 1998-11-23 收修改稿)

一种简单有效的检测基因表达产物的方法

许家喜 麻 密④ 麻 远㈣ 林忠平④
(北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871; ④中国科学院植物研究所, 北京 100093; ㈣清华大学化学系, 北京 100084)

摘要 外源基因转入动植物细胞后在翻译水平上正确表达产物的定性定量测定是基因工程中的重要问题. 通常生物中某些酶的含量很低, 如异戊烯基转移酶, 在进行其转基因研究时较难测定. 根据其 cDNA 序列, 预测出抗原位点肽并用固相法合成, 与载体蛋白偶联后获得对其起专一性反应的抗体, 用该抗体通过 ELISA 法可以有效测定转基因烟草中的基因表达产物. 为测定难以分离纯化的低含量的基因表达产物提供了一种简便而有效的方法.

关键词 转基因植物 异戊烯基转移酶 抗原肽 检测方法

外源基因转入动植物细胞后是否能够在翻译水平上正确表达, 表达的量如何, 是基因工程中至关重要的问题. 翻译水平上的检测, 虽然可以通过 Western blot 和 ELISA 等方法进行定性和定量分析[1], 但对于一些编码生物体内原本含量很微的酶的基因而言, 获得它们的纯化的表达产物十分困难. 本文报道一种在计算机辅助下根据 cDNA 序列预测出其抗原位点肽, 用固相法合成后制成复合抗原, 免疫家兔后获得专一性抗体, 再通过 ELISA 和 Western blot 法测定转基因植物中外源基因表达产物的一种简便而有效的方法.

1 材料与方法

(1) 试剂和材料. 保护氨基酸 Boc-His (Tos), Boc-Arg(Tos), Boc-Ile, Boc-Ala, Boc-Glu (Obzl), Boc-Lys (Z), Boc-Phe, Boc-Gln, 氯甲基树脂(含氯量 1.04 mmol/g, 1% 交联度), HOBt, HOSu 和三氟乙酸(Sigma 公司), Sephadex G15 (Pharmacia 公司), 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (HRP-羊抗兔 IgG) (华美公司), 其他试剂为国产分析纯. 烟草(*Nicotina tobacco* W38) 无菌苗继代培养于 MS 培养基中, 取其叶片和茎段作为转基因受体而得到的转基因植株.

(2) 仪器. IBM PC586 计算机; 手工固相多肽合成仪; LKB2151 高压液相色谱仪, 柱 XWG-C18 (4.6 mm(I.D.) × 250 mm); Hitachi 835-50 型氨基酸分析仪; Perkin-Elmer 241 MC 旋光仪; ELISA Reader G4500 Bio-Rad 酶标仪. 核酸蛋白紫外检测仪, Bruker Instrum Biflex ㈣质谱仪.

(3) 抗原肽的合成. 预测出的抗原肽用固相法合成[2,3], 先将 0.53 g (2 mmol) Boc-Phe 与 0.33 g (1 mmol) 碳酸铯反应制成铯盐, 再连到 0.5 g (含氯 0.52 mmol) 固相载体氯甲基树脂上, 用无水乙酸钾、苯甲酰氯依次封闭, 30% 三氟乙酸/二氯甲烷脱保护, 三乙胺中和, 茚三酮法测得氨基含量为 0.35 mmol (0.70 mmol/g), 按预测出的抗原肽序列, 以 1 mmol 保护氨基酸为原料, HOBt 或 HOSu 和 DCC 为缩合剂, 用逐步接长法依次接至所需肽段. 合成好的肽段以苯甲醚和苯甲硫醚为捕获剂, 用无水氟化氢从树脂上切下及脱去侧链保护, 抽干氟化氢后, 冷无水

乙醚洗涤, 30% 乙酸提取, 冻干后用 Sephadex G15 凝胶过滤, 以 1 mol/L 乙酸水溶液为洗脱剂, 冻干后得到纯度较好的抗原肽. 再经 HPLC 分离制备得到纯度大于 95% 的抗原肽 265 mg, 总收率 59% (以接上 Phe 后计算). HPLC 洗脱条件为: 洗脱剂 A: 0.1% TFA-H_2O, 洗脱剂 B: 0.1% TFA-MeOH, 以 A: B= 60: 40 洗脱, 检测波长 220 nm, 流速 1 mL/min, 保留时间为 7.45 min. 6 mol/L 盐酸水解后进行氨基酸组成分析 Glu 4.23 (4), Ala 1.15 (1), Ile 1.00 (1), Phe 0.97 (1), Lys 0.92 (1), Arg 0.86 (1), His 0.93 (1). MALDI-TOF 质谱确定其分子量为(m/z): 1284 $(M+1)^+$. 旋光$[\alpha]_{Hg}^{16}= -54.4°$ (0.63, H_2O).

(4) 抗原肽与载体蛋白的偶联. 20 mg 抗原肽和 40 mg 载体蛋白 BSA 溶液 8 mL(0.1 mol/L pH= 7.8 的磷酸缓冲液) 中, 加入 2 mL 2.5% (体积比) 的戊二醛, 室温搅拌 24 h, 透析 48 h, 冷冻干燥得到抗原.

(5) 抗体的制备和纯化. 将 300 μg 上述制备的抗原的磷酸缓冲液 500 μL (0.1 mol/L pH= 7.5 0.15 mol/L NaCl), 与等体积的福氏完全佐剂混合均匀后免疫家兔, 15 d 后再用上述量抗原与等体积的福氏不完全佐剂混合均匀后加强免疫 1 次, 30 d 后不加佐剂再加强免疫 1 次, 40 d 后动脉采血得到 20 mL 抗血清[4], 经硫酸铵沉淀纯化后冻干得到抗体.

(6) 用酶联免疫吸附实验(ELISA) 测定转基因烟草中 *T-cyt* 基因的表达量. ( ) 抗血清滴度的测定[5]. 以未免疫的家兔血清作对照, 用 ELISA 法测定得到的抗体的效价为 132: 1, $A_{492\ nm}$值为 0.95. ( ) 转基因烟草中粗蛋白的提取. 分别随机选取 7 个不同株系的转基因烟草和 3 个未经转基因的烟草, 分别取其根、茎、叶各 6 份, 每份重 1 g(鲜重), 加入 1 mL 0.2 mol/L pH= 4.7 的磷酸缓冲液, 匀浆后 4 ℃, 6000 r/min 离心 5 min, 取出上清液供测定使用. ( ) Western blot 免疫分析. 参照文献[6], 将从转基因烟草叶、茎、根和未转基因烟草中提取的粗蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后, 用半干式石墨印迹法将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上, 封闭后与上述方法中所获得的抗体在 37 ℃保温反应 4 h, 经 0.05% Tween-20 和 1 mol/L NaCl 的 PBS 洗涤后, 以辣根过氧化酶标记的羊抗兔 IgG 为二抗进行检测. ( ) ELISA 测定[5]. 应用方阵实验确定被测样品包被量、酶稀释度. 按下述步骤完成 ELISA 实验: 抗原包被: 96 孔板中每孔加入 20 μL 被测样品溶液, 用 0.05 mol/L pH= 9.5 碳酸包被缓冲液稀释至 100 μL, 4 ℃过夜; 封闭: 每孔加入 1% 牛血清白蛋白-碳酸盐缓冲液(pH= 7.4) 300 μL, 37 ℃封闭 2 h, 然后用含 0.2 mmol/L PBS 的 0.1% Triton X-100 溶液洗涤 5 遍; 每孔加入用 1% 牛血清白蛋白-磷酸盐缓冲液(pH= 7.4)-0.01% Tween-20 稀释 10 倍的抗体溶液 100 μL, 37 ℃保温 2 h, 同前法洗涤; 每孔中加入辣根过氧化酶标记的羊抗兔 IgG 稀释液 100 μL (1: 100), 37 ℃保温 2 h, 同前法洗涤; 加入 0.04% OPD(邻苯二胺) 的碳酸-柠檬酸缓冲液和少量 H_2O_2, 避光显色 30 min 后, 以每孔加入 50 μL 2 mol/L硫酸终止反应; 用 Bio-Rad 酶标仪读取 $A_{492\ nm}$值. 阴性对照平均 $A_{492\ nm}$值 0.067, 样品 $A_{492\ nm}$值小于等于 0.10 即为阴性, 样品 $A_{492\ nm}$值大于 0.1 者为阳性.

2 结果与讨论

2.1 抗原位点的预测和抗原肽的合成

首先根据文献报道的异戊烯基转移酶 cDNA 序列所推导的氨基酸序列[7], 在计算机辅助下, 用 PC-Gene 软件中的 ANTIGEN 和 FLEXPRO 程序分析了该蛋白的亲水性(Hopp-Woods 法) 和流动性[8,9]. 从亲水性图(图 1) 中可以看出该蛋白有 4 个亲水性高的区域, 分别位于该蛋白

的 47~ 56, 122~ 130, 133~ 141 和 210~ 218 氨基酸残基处; 从流动性图(图 2) 中可以看出, 该蛋白的 3 个流动性高的区域分别位于 42~ 48, 96~ 104 和 214~ 221 氨基酸残基处. 虽然多肽片段 GSGRPTVEEL(44~ 53) 和 IHARQQEQKF(212~ 221) 均同时具有较高的亲水性和流动性, 但从电荷分布来看, 肽段 212~ 220 中含有较多的带电残基(H, R, E 和 K) , 肽段 44~ 53 只含有 R, E 和 E 3 个带电残基; 从二级结构的分析来看[10], 肽段 212~ 221 中的 QQEQ(216~ 219) 部分具有很好的形成 β-转角结构的可能, 而肽段 44~ 53 中的 GSGR(44~ 47) 部分也具有较好的形成 β-转角结构的可能. 以上结果表明这 7 个肽段均可能是较好的抗原位点肽. 根据我们对曼氏和日本血吸虫 26 ku 谷胱甘肽 S-转移酶的 3 个同工酶抗原肽的研究结果[8, 11, 12], 靠近蛋白质端基的抗原肽的抗原性往往较好, 最后我们选取靠近羧基端的肽段 IHARQQEQKF(212~ 221) 作为首选抗原肽段. 所选肽段用 t-Boc 化学合成策略固相法合成, 纯化后经氨基酸组成和质谱分析确证.

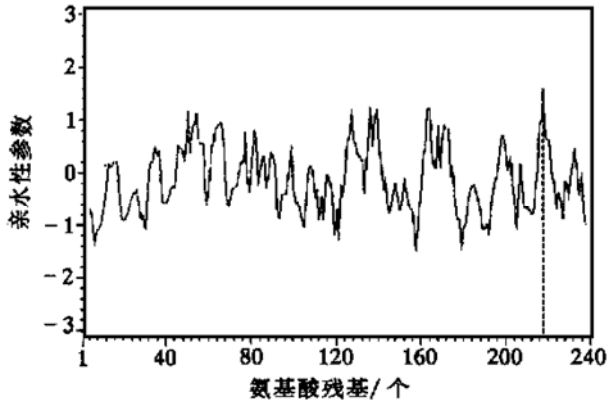


图 1　异戊烯基转移酶的亲水性预测图

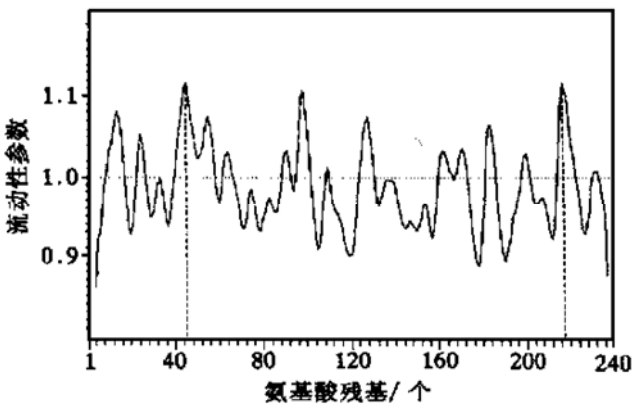


图 2　异戊烯基转移酶的流动性预测图

2. 2　抗体的制备和基因表达产物的测定

异戊烯基转移酶(isopentenyl transferase, ipt) 是细胞分裂素合成中的第 1 步关键酶[13], 它能催化异戊烯基焦磷酸和单磷酸腺苷的分解, 产生异戊烯基单磷酸腺苷(isopentenyl AMP, iAMP) , 这是所有细胞分裂素的前体[14]. 将细胞分裂素基因(*T-cyt*) 转移到烟草中, 通过研究转基因烟草中 *T-cyt* 基因的表达及其对烟草生长发育的影响可以揭示异戊烯基转移酶在烟草生长发育中的作用, 但该基因来自农杆菌, 在生物体内的含量很低, 不易分离得到纯品, 给转基因表达产物的测定带来了一定的困难.

合成的异戊烯基转移酶抗原肽经戊二醛法与牛血清白蛋白偶联后制得复合抗原, 加福氏佐剂免疫家兔后获得可用于检测转基因烟草中基因表达产物 ——异戊烯基转移酶的抗体. Western blot 免疫分析结果表明, 转基因植株叶、茎和根的蛋白提取物在约 27 ku 处均有阳性带, 而未转基因对照株的蛋白提取物未显示任何条带, 表明用人工合成的复合抗原制备的抗体可以与异戊烯基转移酶发生特异性反应, 可用于测定转基因植株中的异戊烯基转移酶. 由 ELISA 方法确定该抗体的滴度为 132∶ 1, $A_{492\ nm}$ 值为 0. 95. 随机选取 7 株转基因烟草和 3 株未转基因的烟草, 分别从其根、茎和叶中得到蛋白粗提取物进行基因表达产物 ——异戊烯基转移酶的检测, 测定的统计结果见表 1.

表 1　转 *T-cyt* 基因烟草中异戊烯基转移酶的 ELISA 测定

植株	植株数	$A_{492\ nm}(\bar{X} \pm SE)$		
		叶	茎	根
转基因烟草	7	0.19 ±0.02	0.32 ±0.02	0.91 ±0.03
未转基因烟草	3	0.06 ±0.02	0.08 ±0.02	0.06 ±0.02

从表 1 的结果可以看出, 转基因烟草株 E1-3, E2-1, F1-1, F1-3, F1-15, F2-1 和 F3-1 叶、茎、根中的蛋白粗提取物的吸收值均大于 0.1(阳性) , 而 3 个对照株叶、茎、根中的蛋白粗提取物的吸收值均小于 0.1(阴性) , 表明这 7 个转化株中均有 *T-cyt* 基因的表达产物, 同时也可以测出表达产物在不同部位的含量差别. 以上结果说明, 利用化学合成的抗原肽制备的复合抗原诱导产生的抗体可以用来检测基因表达产物. 该法不仅克服了难以得到纯化的异戊烯基转移酶的困难, 还避免了间接测定时其他物质的干扰, 为在翻译水平上检测基因的表达部位和表达量提供了一种新的手段.

在进行转基因动植物研究过程中, 在转录和翻译水平上检测外源基因是否能够表达及表达量具有同样的重要性, 目前在转录水平上测定是否有 mRNA 的积累可以很方便地通过 RT-PCR 或 Northern blot 分析来实现[1]; 但在翻译水平上欲测定基因表达的直接产物在很大程度上取决于是否能获得合适的抗体, 但对于原本在生物体内含量很低的基因表达产物 ——如某些酶的测定, 由于分离纯化非常困难而难以实现. 我们借鉴肝炎的血清诊断和合成多肽疫苗的研究结果[8, 9, 11, 12], 根据异戊烯基转移酶的氨基酸序列预测出其抗原肽, 利用化学合成的抗原肽复合物诱导的抗体成功地检测了转基因烟草根、茎和叶中的基因表达产物 ——异戊烯基转移酶, 为在翻译水平上检测基因的表达产物提供了一种新的手段. 近年来随着反向遗传学的发展, 在各种物种中克隆出许多新基因, 这些基因的表达产物目前尚未或很难从生物体内纯化得到, 但这些基因的功能是人们急需了解的. 我们所报道的方法不仅可用于转基因动植物中的外源基因表达产物的测定, 也可以用于新基因的表达产物的功能的研究.

致谢　本工作为国家自然科学基金(批准号: 29572034, 29772002, 39470158) 资助项目.

参 考 文 献

1　Sambrook J, Friston E F, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Mannual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990

2　Merrifield R. Solid phase peptide synthesis iv: the synthesis of a tetrapeptide. J Am Chem Soc, 1963, 85: 2149~ 2154

3　许家喜, 金 声. 罂粟花粉十七肽类似物和片段的合成及其抗肿瘤活性研究. 高等学校化学学报, 1997, 18: 1098~ 1102

4　Stiefel V, Perez-Grau L, Albericio F, et al. Molecular cloning of cDNAs encoding a putative cell wall protein from Zea mays and immunological identification of related polypeptides. Plant Mol Biol, 1988, 11: 483~ 493

5　彭生斌, 麻　密, 陶国清, 等. 细胞分裂素对离体黄瓜子叶中微管蛋白基因表达的调节. 植物学报, 1990, 32: 674~ 679

6　Clark M S. Plant Molccular Biology. Berlin: Springcr Vcrlag, 1997

7　Berker R F, Idler K B, Thompson D V, et al. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *A. tumefaciens* octapine Ti plasmid pTi 15955. Plant Mol Biol, 1983, 21: 335~ 350

8　许家喜, 蔡孟深, 石佑恩. 曼氏血吸虫合成多肽抗原研究. 高等学校化学学报, 1996, 17: 424~ 426

9 许家喜, 秦致辉, 蔡孟深, 等. 戊型肝炎病毒(HEV)蛋白抗原肽的化学合成及其在血清学诊断的应用. 药学学报, 1999, 34(4): 286~289
10 Chou K C. Prediction of β-turns. J Peptide Res, 1997, 49: 120~144
11 Xu J X, Cai M S. Mapping the antigenic peptides of Sm26/2 in glutathione S-transferases of Schistosoma mansoni. Chin Chem Letts, 1998, 9: 377~379
12 许家喜, 蔡孟深. 曼氏血吸虫谷胱甘肽S-转移酶Sm26/2的抗原肽研究. 高等学校化学学报, 1998, 19: 1975~1978
13 Barry G F, Rogers S G, Fraley R T, et al. Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81: 4776~4780
14 McGaw B A, Scott I M, Hotgan R. Cytokinin biosynthesis and metabolism. In: Crozier A, Hillman J R eds. The Biosynthesis and Metabolism of Plant Hormones. London: Cambridge University Press, 1984. 105~133

(1998-08-13收稿, 1998-11-12收修改稿)

气孔保卫细胞微管对质膜上钾离子通道的调节作用

周希明 武维华* 袁 明 王学臣
(中国农业大学生物学院, 北京 100094. * 联系人)

摘要 利用膜片钳技术探讨了气孔保卫细胞微管对质膜上钾离子通道的可能调节作用. 在细胞内分别加入微管解聚剂甲基胺草磷与微管稳定剂紫杉醇均显著地抑制保卫细胞全细胞内向钾电流. 结果表明, 保卫细胞质膜上内向钾离子通道的正常活性有赖于细胞微管的正常解聚/聚合的动态变化, 微管系统对钾离子通道的调节可能是细胞骨架调控气孔运动的生理机制之一.

关键词 微管 气孔调节 钾离子通道

植物叶片表面的气孔结构是植物与环境进行气体交换的门户, 植物光合作用对 CO_2 的吸收与植物蒸腾作用所散发的水汽主要是通过气孔进行的[1]. 气孔通过其自身的开放与关闭运动来调节气孔的开度, 从而实现对植物生理与代谢活动的调控. 在气孔开闭运动的渗透调节机制中, 钾离子的出入细胞是影响胞内溶质浓度的重要因素[2], 因此, 跨膜钾离子流的大小及变化是研究气孔运动调节的重要生理指标. 当保卫细胞质膜上的内向钾离子通道被激活或外向钾离子通道被抑制时, 胞质内钾离子浓度升高, 气孔趋于开放; 反之, 当内向钾离子通道活性被抑制或外向钾离子通道被激活时, 胞质内钾离子浓度降低, 气孔趋于关闭[3].

利用动物细胞进行的许多研究工作已经证实, 细胞骨架系统在离子通道的调控中有重要作用[4]. 有人曾报道微丝结构对植物气孔保卫细胞的钾离子通道有调节作用[5], 由此认为微丝结构可能参与气孔运动的调节. 我们曾应用微管解聚剂APM研究了微管在气孔运动中的可能调节作用, 结果发现APM对光照诱导气孔开放或ABA诱导气孔关闭均有显著抑制作用[6]. 本工作利用膜片钳技术探讨了微管是否通过对保卫细胞钾离子通道的影响而参与气孔运动的调节, 这也是研究细胞微管对气孔保卫细胞离子通道调控作用的首次报道.