

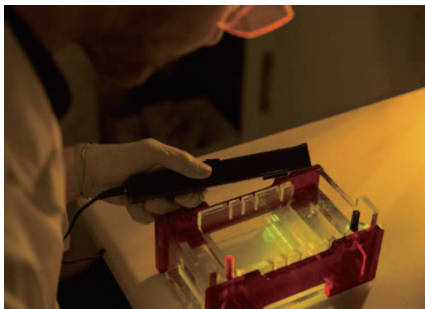


Technical Data

## In vivo 蛍光タンパク検出

### 用途

- GFP等の検出に
- 極めて強いシグナルに
- ゲルドキュメンテーションに
- DNA分解フリー
- 核酸の検出に
- 細胞ストレスフリー



FastGene™ BG-LED フラッシュライト：  
本来は蛍光 DNA 色素検出のために開発され  
ました。

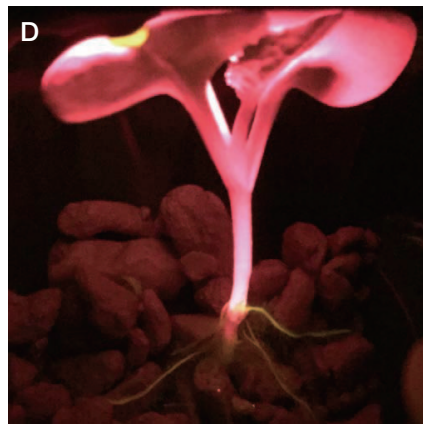
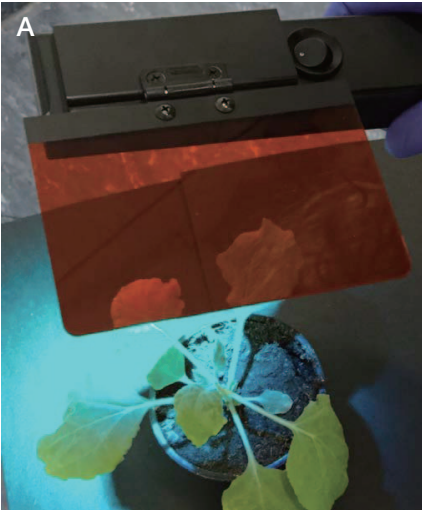
### はじめに

蛍光タンパク質は、植物分子生物学の分野において遺伝子組み換えを検出するためのマーカーとしてよく利用されています。遺伝子組み換えは植物全体または植物器官の安定的／一過的な形質転換によってもたらされますが、形質転換の成否を簡便で非侵襲的な手法により確認することが望まれます。植物に青色光を照射するとGFPの発現が視覚化されることがこれまでに実証されています (Baker *et al.* 2012)。ここでは、本来はゲル内のDNAを視覚化するために開発されたFastGene™ Blue/Green LEDフラッシュライトが、黄色／緑色蛍光タンパク質を発現する緑色／非緑色植物組織が発する強い蛍光シグナルの検出に利用できることを実証します。

### 方法

遺伝子組み換え植物の作出に使用したベクターは、「カリフラワーモザイクウイルスプロモーター (35S) に駆動されたイントロン (Dadami *et al.* 2013) を含む702GFPタンパク質」、あるいは「同じく35Sプロモーター (GenBank: KF499077.1, Dahncke, Witte 2013) に制御された増強黄色蛍光タンパク質との融合タンパク質」を含んでいました。*Nicotiana benthamiana*の葉の一過性浸潤 (Witte *et al.* 2004; Werner *et al.* 2008) および大豆毛状根の形質転換 (Kereszt *et al.* 2007) については過去に報告された手順に従いました。*Brassica carinata*毛状根の形質転換については2004年のViewegらの方法を改変しましたが、要約すると*Brassica carinata*の種子を暗所

下、4℃で3日間春化処理した後、3日間発芽処理しました (光周期、明期16時間／暗期8時間；温度、昼20℃／夜15℃；相対湿度、100%；光強度、220  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )。RI (root inducing) プラスミド (Arqua1) を含む *Agrobacterium tumefaciens* C58 を YEBプレート上で2日間増殖後、プレートから掻き取り、6mL PSバッファー (0.7% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (w/v)、0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (w/v)、0.5% NaCl (w/v)、150  $\mu\text{M}$  アセトシリンゴン、pH 7) に再懸濁しました。1.5時間以上培養した後、*B. carinata*実生を菌液で濡らし、インスリン注射器 (U-40インスリン、0.3 mm×12 mm) で胚軸に沿って傷をつけるとともに、菌液を植物に注入しました。形質転換直後の実生を暗所で20時間培養した後、発芽時と同じ条件下において粘土粒で更に栽培しました。1週間後、植物体に2.25 mM Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> × 4 H<sub>2</sub>O、2.5 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1 mM MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O、0.25 mM KCl および 25  $\mu\text{M}$  H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、1.5  $\mu\text{M}$  MnSO<sub>4</sub>、1.5  $\mu\text{M}$  ZnSO<sub>4</sub>、0.5  $\mu\text{M}$  CuSO<sub>4</sub>、0.025  $\mu\text{M}$  (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo7O<sub>24</sub> および 35.8  $\mu\text{M}$  Fe (FeIII-EDTA) を含む養液を施肥しました。形質転換から2週間後、成長した毛状根から粘土粒を除去しました。更に1週間後、蛍光マーカーとしてGFPを用い、形質転換された根を有する植物体をスクリーニングしました。シロイヌナズナの安定的な形質転換は、過去の報告 (Clough, Bent 1998) に従い「フローラルディップ法」法により実施しました。暗室で付属のフィルターを通してFastGene™ Blue/Green LEDフラッシュライトを照射しながら、植物体および植物器官の写真を携帯電話のカメラで撮影しました。



- (A) *Nicotiana benthamiana* 植物体へのフラッシュライトの使用例  
 (B) 一過的浸潤した *N. benthamiana* の葉における YFP 発現。黄色っぽく見える部分が浸潤領域、葉の非浸潤領域 (赤い部分) と明確に識別できる  
 (C) 大豆の根 (赤) の近接写真、毛状根で GFP が発現している (緑)  
 (D) *Brassica carinata* 植物体、毛状根で GFP が発現している (緑)  
 (E) YFP を発現している (黄色) または蛍光タンパク質を発現していない (赤) 安定的に形質転換したシロイヌナズナ実生

## 結果

FastGene™ Blue/ Green LED フラッシュライトを照射すると、光合成活性のある植物組織は赤色を呈し、根は薄赤色または白色を呈します。ただし蛍光タンパク質が発現していると、FastGene™ Blue/ Green LED フラッシュライト照射下で緑/黄色シグナルとしてはっきり視認できます。毛状根の形質転換および葉の浸潤法では、観察された黄/緑色シグナルは他の蛍光検出法 (共焦点レーザー顕微鏡法、蛍光双眼顕微鏡法) の結果と一致していました。安定的に形質転換されたシロイヌナズナの実生では、蛍光を発光していると予想された実生はすべて他の検出方法によって蛍光が確認されましたが、FastGene™ Blue/Green LED フラッシュライト照射下でシグナルが検出されなかった遺伝子組み換え実生も多数同定されたこ

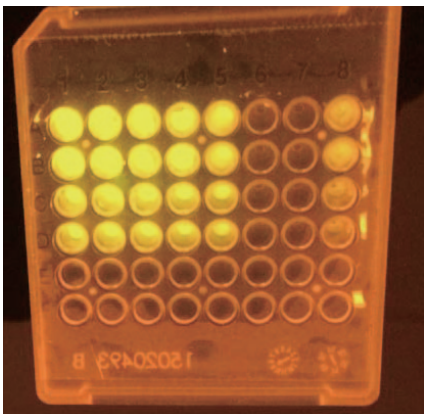
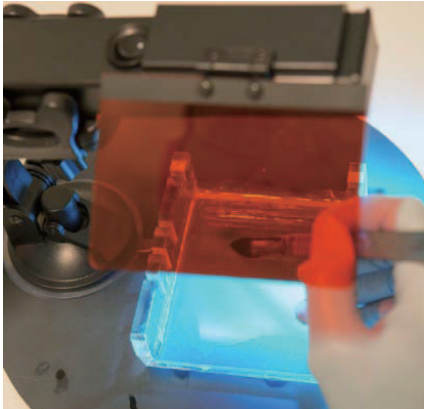
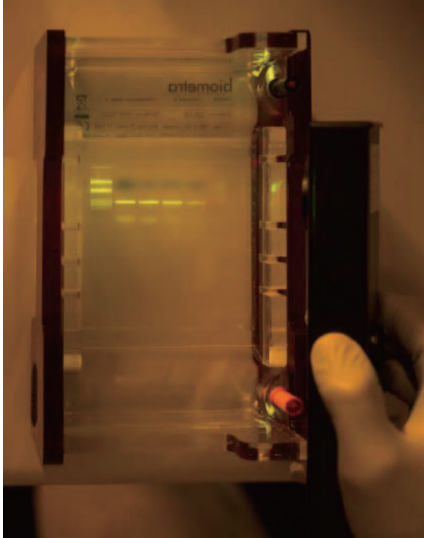
とから、蛍光タンパク質が強く発現していないと FastGene™ Blue/Green LED フラッシュライトでは検出できないことが示唆されました。

## 考察

FastGene™ Blue/Green LED フラッシュライトは、様々な植物組織内の緑色/黄色蛍光タンパク質の検出に便利な装置です。電源プラグと比較的暗い場所 (植物用グローブチャンパー内では黒っぽい布を使用) さえあれば他の設備を必要としないため、簡便な蛍光検出法として形質転換の成功に貢献します。FastGene™ Blue/Green LED フラッシュライトの感度では蛍光が弱い植物組織を検出できない場合もありますが、裏を返せばタンパク質を強く発現する実生を面倒な方法を用いることなく集団内で選抜できるという利点でもあります。GFP マーカー遺伝子の発現と標的遺伝子の発現強度との間には相関性があると実証されている (Harper *et. al.* 1999) ことを踏まえると、これは大変興味深いことです。

## 【参考文献】

Baker, Stokes S.; Vidican, Cleo B.; Cameron, David S.; Greib, Haittam G.; Jarocki, Christine C.; Setaputri, Andres W. *et al.* (2012) : An epifluorescent attachment improves whole-plant digital photography of *Arabidopsis thaliana* expressing red-shifted green fluorescent protein. In AOB PLANTS. DOI: 10.1093/aobpla/pls003.  
 Clough, S. J.; Bent, A. F. (1998) : Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. In PLANT JOURNAL 16 (6), pp. 735–743.  
 Dadami, Elena; Moser, Mirko; Zwiebel, Michele; Krczal, Gabi; Wassenegger, Michael; Dalakouras, Athanasios (2013) : An endogene-resembling transgene delays the onset of silencing and limits siRNA accumulation. In FEBS letters 587 (6), pp. 706–710. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.01.045.  
 Dahncke, Kathleen; Witte, Claus-Peter (2013) : Plant Purine Nucleoside Catabolism Employs a Guanosine Deaminase Required for the Generation



of Xanthosine in Arabidopsis. In *PLANT CELL* 25 (10), pp. 4101–4109. DOI: 10.1105/tpc.113.117184.

Harper, B. K.; Mabon, S. A.; Leffel, S. M.; Halfhill, M. D.; Richards, H. A.; Moyer, K. A.; Stewart, C. N., JR (1999) : Green fluorescent protein as a marker for expression of a second gene in transgenic plants. In *Nature biotechnology* 17 (11), pp. 1125–1129. DOI: 10.1038/15114.

Kereszt, Attila; Li, Dongxue; Indrasumunar, Arief; Nguyen, Cuc D. T.; Nontachaiyapoom, Sureeporn; Kinkema, Mark; Gresshoff, Peter M. (2007) : *Agrobacterium rhizogenes* - mediated transformation of soybean to study root biology. In *NATURE PROTOCOLS* 2 (4), pp. 948–952. DOI: 10.1038/nprot.2007.141.

Vieweg, M. F.; Fruhling, M.; Quandt, H. J.; Heim, U.; Baumlein, H.; Puhler, A. et al. (2004) : The promoter of the *Vicia faba* L. leghemoglobin gene *VfLb29* is specifically activated in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants. In *MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS* 17 (1), pp. 62–69.

Werner, Andrea K.; Sparkes, Imogen A.; Romeis, Tina; Witte, Claus-Peter (2008) : Identification, biochemical characterization, and subcellular localization of allantoate amidohydrolases from Arabidopsis and soybean. In *PLANT PHYSIOLOGY* 146 (2), pp. 418–430. DOI: 10.1104/pp.107.110809.

Witte, Claus-Peter; Noel, Laurent D.; Gielbert, Janine; Parker, Jane E.; Romeis, Tina (2004) : Rapid one-step protein purification from plant material using the eight-amino acid StrepII epitope. In *Plant molecular biology* 55 (1), pp. 135–147. DOI: 10.1007/s11103-004-0501-y.

#### まとめ

FastGene™ BG-LEDフラッシュライトを利用して植物組織内の緑色・黄色蛍光タンパク質を検出できました。また、蛍光の輝度からGFPの相対的な発現レベルも推測できたことから、フラッシュライトを利用して発現の強い個体を選抜しました。