

实时观测化合物或药物影响细胞的标记物、方法、试剂盒及其应用

技术领域

本发明属于生物领域，具体而言，本发明涉及一种能用来实时观测化合物或药物影响细胞的标记物，以及使用该标记物实现实时观测化合物或药物影响细胞的方法、试剂盒及其应用。

背景技术

在药物开发和生物学研究过程中，研究一个分子或药物对细胞的影响效果是至关重要的。这通常是通过观察细胞的整体健康情况，如死亡或复制率来实现的。以这种方式来研究一个分子或药物的作用，只是估测了使用该分子或药物的最终结果。这会错过该分子或药物对细胞中一个持续过程的影响效果。在现实中，一个分子或药物通常用于治疗细胞或生命中的一个方面，这是死亡或复制之前的一个持续过程。因此，目前的方法来研究一个分子或药物对细胞的影响效果是非实时的、间接的或不准确的。迄今还没有研究一个分子或药物对细胞的实时影响效果的方法。

对于任何有用的分子，例如药物，要商业化必须进行副作用或毒性测试。通常，测试会在动物上进行，这会非常昂贵和耗时。此外，动物权利倡导者也反对用动物进行药物测试。因此，迫切需要能够快速提供结果而又不使用动物的敏感、测试实时效果的方法。

发明概述

基于以上存在的现有技术需求及不足，本发明的一个目的是，提供一种用于实时观测化合物或药物影响细胞的标记物；本发明的另一个目的是，提供了一种实时观测化合物或药物影响细胞的方法；本发明的另一个目的是，提供了一种实时观测化合物或药物影响细胞的试剂盒；本发明的还一个目的是，提供了一种用于实时观测化合物或药物的非特异性毒性的方法。

为实现上述目的，本发明采用了如下的技术方案：

一方面，本发明提供了一种用于实时观测化合物或药物影响细胞的标记物，所述标记物为：1) SEQ No.1 和/或 SEQ No.2 所示的氨基酸序列；或

2)具有可用于实时观测化合物或药物影响细胞的功能，且与 SEQ No.1

和/或 SEQ No.2 所示氨基酸序列具有至少 80%以上、优选 85%以上、更优选 90%、进一步优选 95%、最优选 99%同源性的氨基酸序列。

优选地，所述细胞选自植物细胞、酵母、真菌、绿藻或动物细胞。

更优选地，所述影响为：所述化合物或药物的非特异性毒性。

- 5 进一步优选地，所述实时观测化合物或药物影响细胞为：实时观测 VirE2-GFP 在内质网/actin 网络中的运动。

再进一步优选地，所述标记物为：编码所述标记物的核苷酸。

另一方面，本发明提供了一种实时观测化合物或药物影响细胞的方法，所述方法包括以下步骤：

- 10 1) 向所述细胞引入或使得所述细胞包含可用来实时观测化合物或药物影响细胞的标记物或前述的标记物；

2) 在所述细胞中加入所述被观测的化合物或药物；和

3) 实时观测所述细胞中所述标记物的形态、运动轨迹和/或速度。

优选地，所述细胞选自植物细胞、酵母、真菌、绿藻或动物细胞。

- 15 更优选地，所述步骤 3) 中标记物的形态包括由 VirE2-GFP 形成的丝状结构的尺寸、形状、移动模式和/或位置。

进一步优选地，所述实时观测化合物或药物影响细胞为：实时观测 VirE2-GFP 在内质网/actin 网络中的运动。

再进一步优选地，所述化合物为核苷酸和/或所述药物为小分子药物。

- 20 更优选地，所述化合物或药物选自秋水仙素、细胞松弛素 D、布雷菲德菌素 A、ML-7、RFD-MBD、MBD、ER-mCherry、ABD、myosin 尾部片段。

进一步优选地，所述影响为：所述化合物或药物的非特异性毒性。

- 25 又一方面，本发明提供了一种实时观测化合物或药物影响细胞的试剂盒，优选地，所述细胞选自植物细胞、酵母、真菌、绿藻或动物细胞，其所述试剂盒包含可用来实时观测化合物或药物影响细胞的标记物或前述的标记物。

优选地，所述化合物为核苷酸和/或所述药物为小分子药物。

- 30 更优选地，所述化合物或药物选自秋水仙素、细胞松弛素 D、布雷菲德菌素 A、ML-7、RFD-MBD、MBD、ER-mCherry、ABD、myosin 尾部片段。

进一步优选地，所述实时观测化合物或药物影响细胞为：实时观测 VirE2-GFP 在内质网/actin 网络中的运动。

再进一步优选地，所述影响为：所述化合物或药物的非特异性毒性。

再一方面，本发明提供了一种用于实时观测化合物或药物的非特异性毒性的方法，所述方法包括：使用如前述的标记物和/或前述的试剂盒。

5 根据本发明的以上基本技术方案，就本发明的构思进一步阐述如下：

本发明已经开发了一种方法，可以实时观测到一个蛋白质（VirE2-GFP）在细菌细胞中产生，转运到真核细胞质，然后移动到细胞核的整个运动的实时过程。整个过程可以在自然状态下实时观测到。当将
10 一种分子或药物加入到这一测试系统中时，该分子或药物对细胞或蛋白质运动过程的实时影响便可直接显现出来。

本发明测试了几种化合物，其中一些是药物。本发明人发现市场上的口服性药物不影响蛋白质 VirE2-GFP 的实时运动过程，而有毒化合物可以显著干扰其运动过程。

15 因此，本发明开发了一种技术，可以直接观测任何化合物或药物对细胞的实时影响，包括非特异性毒性反应。这可能成为革新性的药物研发技术，这一技术可以在早期发现候选药物的非特异性（或毒性）作用。这样，药物开发公司可以尽早评估任何候选药物的副作用和毒性，从而节省药物开发的时间和金钱。它还为公众提供了一个直接和快速地评估任何药物的
20 毒性和非特异性的平台。这也有助于为民众建立对药物测试的信心。

方法

本发明开发了一个基于细胞、包括细菌细胞和真核细胞的系统。采用两段式绿色荧光蛋白（split-GFP）方法可以观测农杆菌产生的蛋白质
25 VirE2，该 VirE2 蛋白可以在自然条件下由农杆菌转导到真核细胞中。为了实时观测转导到真核细胞中的 VirE2，将小 GFP 片段（GFP11）插入到 VirE2 允许的位点上以产生在农杆菌中表达的 VirE2-GFP11 融合蛋白。同时在受体细胞中表达大片段（GFP1-10）。在 VirE2-GFP11 转导到受体细胞中后，GFP 荧光信号便可以观测到。VirE2-GFP11 的功能和 VirE2 相同。因此，
30 VirE2-GFP 融合蛋白的运动情况可以代表 VirE2 被农杆菌转导后的实时运动情况。

该系统可用于实时观测一个蛋白质在细菌中产生，转运到真核细胞质，然后移动到细胞核的整个运动。整个过程可以在自然状态下实时观测

到。当化合物被加入到这一测试系统中时，化合物对蛋白质的任一实时运动过程的影响便可直接显现出来。

VirE2 具有聚集成丝状结构的能力，该丝状结构可在细胞内顺利运动，并且很容易被观测和记录。对细胞的任何影响将会影响到 VirE2 丝状结构的尺寸、形状、移动模式和位置，以及其运动轨迹和速度。这会使得这种测试方法特别敏感。

结果

本发明测试了几种化合物，其中一些是药物。本发明人发现市场上的口服性药物毒性较小，不太影响蛋白质的实时运动过程，而有毒化合物可以显著干扰其运动过程。

该测试系统覆盖了所有细胞位置和所有重要的生化过程。该测试非常敏感，可以检测任何潜在的非特异性反应。此测试非常快捷，可以在 2 天内完成。

分析

因此，本发明开发出了一种可以实时观测任何药物的非特异性反应的技术。这可能成为革新性的药物研发技术，这一技术可以在早期发现候选药物的非特异性（或毒性）作用。这样，药物开发公司可以尽早评估任何候选药物的副作用和毒性，以便节省药物开发的时间和金钱。它还为客户提供了一个直接和快速地评估任何药物的毒性和非特异性的平台。这也有助于为市民建立对药物测试的信心。

结论

本发明开发了一种可以实时观测任何药物的非特异性效应或者毒性作用的技术。该测试可以直接提供非特异性或毒性反应的机理视图。这可以在早期快速测试候选药物是否具有潜在的非特异性或毒性作用，从而可以节省用于药物发现的时间和金钱。

药物的安全性可以用可见的以及可理解的方式来进行评价，从而可以改善公众对药物的信心。测试系统可以帮助生物学家对任何分子进行机理研究。该技术可用于开发一个无偏见的服务中心，以测试候选药物和市场上的现有药物的潜在非特异性或毒性作用。

此外，本发明也可以用来观测化合物或药物对细胞的实时影响，从而

帮助基础研究。

附图的简要说明

以下，结合附图来详细说明本发明的实施方案，其中：

- 5 图 1 示出农杆菌传递的 VirE2 沿着一个细胞结构运动，并进入细胞核；
图 2 示出农杆菌传递的 VirE2 与内质网位置重叠，并沿着内质网运动；
图 3 示出农杆菌传递的 VirE2 与 F-actin 丝位置重叠，并沿着 F-actin 丝运动；
图 4 示出 ML-7 和超表达 Myosin 尾部片段对 VirE2 运动的影响；
10 图 5 示出化学试剂对各自细胞结构的影响；
图 6 示出农杆菌传递的 VirE2 位于内质网的胞质面；
图 7 示出超表达 myosin 末端对 VirE2 运动的影响；
图 8 示出 NLS1 突变的 VirE2 在内质网丝上运动的延时图像；
图 9 示出 ML-7 处理对致根瘤实验的影响；
15 图 10 示出 RNAi 沉默 XI-2 和 XI-K 后对致瘤的影响；
图 11 示出药物对 VirE2 运动的影响。

发明详述

20 方案

根瘤农杆菌是土壤中一种能在不同物种间跨界转移遗传物质的植物病原菌。这种细菌能够将一段特殊的单链转移 DNA (T-DNA) 通过 VirB/D4 四型分泌系统 (T4SS) 转移到不同的宿主细胞内部。在自然界中，农杆菌通常以植物作为其主要的宿主。在实验室条件下，这种细菌能够有效地将
25 外源遗传物质转移到其他种类的真核生物的细胞内部，这包括酵母，真菌，绿藻和动物细胞等。在植物损伤信号物质，如乙酰丁香酮(acetosyringone)，存在的情况下，农杆菌能够高效地完成对这些真核生物细胞的转化。因此，农杆菌作为植物和各种真菌的转化工具具有极其广泛的应用。

四型分泌系统广泛存在于各种革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌中，这些
30 细菌能够通过这一系统将各种蛋白和蛋白核酸复合分子转移到受体细胞内部。农杆菌的四型分泌系统由 Ti 质粒上的 vir 基因编码的 12 种毒性蛋白 (VirB1-VirB11 及 VirD4) 组成。在转化过程中，毒性蛋白 VirD1-VirD2 组成的核酸内切酶复合体能够将转移 DNA 单链从 Ti 质粒上切割下来，

VirD2 与转移 DNA 形成的核蛋白复合体进一步通过四型分泌系统进入到受体细胞内部。除此之外,农杆菌还同时将 VirD5, VirE2, VirE3 和 VirF 以同样的分泌系统传递到受体细胞内,这些毒性蛋白在受体细胞内部相互合作并最终完成对受体细胞的转化过程。

- 5 作为农杆菌中表达量最高的毒性蛋白, VirE2 能够通过对 T-DNA 的包裹有效地保护 T-DNA 在受体细胞内的转移过程中不被降解。VirE2 之所以能够有效地保护 T-DNA, 是因为这种毒性蛋白具有天然的单链 DNA 结合能力并且能够自己头尾相连形成螺线管型的超级结构(solenoid super structures)。除此之外, VirE2 自身含有的真核细胞核定位序列也使得它能在不依靠 VirD2 的情况下为 T-DNA 的细胞核靶向运输提供协助。虽然过去的异位表达实验显示 VirE2 主要存在于不同种类的植物细胞的细胞质中, 但是本发明所建立的两段式绿色荧光蛋白标记方法表明, 在正常转化过程中, 有大量的 VirE2 能够直接靶向植物细胞核。这一结果也强调了研究 VirE2 的运动过程对我们了解整个转化过程的重要性。
- 10 为了能够更好地保护 T-DNA, 使它不被降解, VirE2 自己能够相互聚合形成螺旋型的结构, 而要实现这样的大型分子复合结构的细胞核靶向运输需要借助受体细胞自身的主动运输机制。过去的研究表明, VirE2 能够与宿主细胞的转录因子 VIP1 相互作用, 从而利用 MAPK 信号通路来完成细胞核靶向运输。然后这一结论还存在争议, 还需要进一步的实验来验证。
- 15 因此, 这些农杆菌的毒性蛋白在宿主细胞内部如何传递, 并且与宿主蛋白相互作用进而达到促进转化的过程, 目前还不清楚。

- 20 体外研究表明, 利用核质蛋白的核定位信号序列来替换 VirE2 本来的核定位序列能够在非洲爪蟾卵(*Xenopus*)提取物中诱发以微管(microtubule)为介质的主动运输。在正常的动物细胞中, 微管通常以中心体为核心呈辐射状分布, 这样的结构能够有助于核定位大分子蛋白的靶向运输。研究表明, 在酵母细胞中异位表达的 VirE2 也能够与微管发生相互作用。这些结果都表明宿主细胞的微管结构在 VirE2 的运输过程中具有重要作用。但是与动物细胞和真菌不同的是, 开花植物中并没有介导逆向运输的动力蛋白分子(dyneins)。除此之外, 植物细胞中的微管束也并没有明显的结构中心,
- 25 因此在植物细胞中的微管结构并不能有效地介导对细胞核的靶向运输。综上所述, 植物细胞中的微管结构在 VirE2 运输过程中所起到的作用还有待进一步研究验证。
- 30 过去对于 VirE2 和 T-DNA 复合体的运输过程的研究都缺乏一个合适

的天然的系统，而基于体外实验得出的结论也具有很大的局限性。因此对于何种植物细胞结构在 T-DNA 复合体的运输过程中起到的不同作用仍然需要进一步的研究。

本发明基于两段式绿色荧光蛋白的方法建立起了直接在植物细胞内
5 部追踪和研究 VirE2 的标记系统。这一系统能够让我们在植物细胞中直接实时地观察到 VirE2 的运动过程。通过这一系统，本发明人发现农杆菌对植物细胞的转化过程能够达到极其高效的 100%。本发明的实验结果表明，VirE2 的运输过程需要借助于肌球蛋白(myosin)提供动力的内质网-肌动蛋白网络(ER/actin)。由于肌动蛋白网络的保守结构广泛存在于不同种类的真
10 核细胞中，本发明的结果也表明农杆菌能够通过利用保守的宿主细胞骨架结构来实现对不同种类细胞的高效转化过程。

结果

农杆菌传递的 VirE2 沿着一个绳状的细胞结构运动

15 本发明人曾利用两段式 GFP(split-GFP)手段成功地在植物宿主细胞中观察到了农杆菌转运的 VirE2。本发明将编码有 VirE2-GFP11 的融合蛋白的农杆菌细胞 EHA105*virE2::GFP11* 注射渗透到一株常表达 GFP1-10 和指示细胞结构及细胞核的 DsRed 的转基因烟草中 (Nb308A)。当转运发生时，VirE2-GFP11 与 GFP1-10 互补，由此产生 VirE2-GFPcomp 信号便
20 能够在植物细胞内被检测到。农杆菌注射渗透两天后，因 VirE2 自我聚集而形成的丝状结构开始被检测到。

如图 1a 所示，VirE2-GFPcomp 沿着一个被 DsRed 所标识的绳状细胞结构运动。更惊人的是，VirE2 能够直接进入细胞核。为了确保这一观察并非源于轴向投影导致的假重叠，本发明人对原始图像数据进行了 3D 重
25 构。3D 旋转图像显示，原始图像的光学切片和 VirE2-GFPcomp 信号局限于细胞核范围内，这证明了中的 VirE2-GFPcomp 信号的确进入了细胞核。本发明人观察到 VirE2 在线性路径上的平均速度可以达到 1.1 $\mu\text{m/s}$ 。在细胞核附近，这个速度下降为 0.434 $\mu\text{m/s}$ 。一般来说，VirE2 在线性路径上运动的速度较快，尽管在不同的线性轨道上速度也有不同。而在弯转的
30 轨道上，运动速度较慢。

VirE2 的运动对 Cytochalasin D 和 Brefeldin A 敏感

接下来，为了研究协助农杆菌转入的 VirE2 在植物细胞内运动的细胞

结构的性质，本发明利用已知可以干扰特定细胞结构的药物，对常表达 GFP1-10 和自由 DsRed 的转基因烟草(Nb308A)做了处理。如图 1b-d 所示，Cytochalasin D(CytoD)和 Brefeldin A (BFA) 严重地影响了 VirE2 运动，而 Colchicine(Colc)仅展示了轻微效果。每组实验，本发明人观察了 20 个独立的运动轨迹。本发明人发现 CytoD 和 BFA 处理使 VirE2 的平均速率降低至原有水平的 20%以下，而 Colc 处理相较于对照组的平均速率，则在 60%以上 (图 1c)。

CytoD 是一个高效的 actin 聚合抑制剂。BFA 通过膨大内质网(ER)而抑制蛋白从内质网到高尔基体的运输。Colc 抑制微管的聚合。通过观察上述实验浓度下，各个药物对烟草叶细胞的相应细胞结构的抑制效果，本发明人可以看到 Colc, BFA 和 CytoD 确实破坏了微管，内质网和 actin 结构。于是本发明假设 VirE2 的运动很可能是由内质网/actin 结构协助发生的。

VirE2 的运动与内质网结合

为了验证 VirE2 的运动是否和内质网结合，本发明使用了一个内质网标记蛋白 ER-mCherry，它的 N 端有内质网定向多肽序列，C 端有四肽内质网滞留序列 HDEL。本发明构建了一个在 T-DNA 区域同时含有 GFP1-10 和 ER-mCherry 的二元质粒，由此得到 pQH308ER。而后将该质粒导入表达 VirE2-GFP11 的菌株 EHA105*virE2::GFP11* 中。菌株中所表达的 VirE2-GFP11 在功能上和野生型的 VirE2 相同。

本发明人将 EHA105*virE2::GFP11*(pQH308ER)菌液注射渗透到烟草株 *N. benthamiana* 的叶片中，然后观察 VirE2-GFPcomp 信号。如图 2a 所示，VirE2 在烟草细胞中聚集的信号呈点状或丝状。这两种形态的 VirE2 均能够和由 ER-mCherry 所示的相互交织的内质网管道位置重合。线状 VirE2 与绳状的内质网并未完全重合(图中下方一行)。时间延迟影像(time-lapse imaging)显示 VirE2 聚合体沿着绳状 ER 运动(图 2b)，该影像中 VirE2 在线性路径上的平均速度为 0.502 微米每秒，和前述的观察大致相同。

VirE2 存在于植物细胞内内质网的细胞溶质一侧

因为内质网是一个相互连接的，由扁平的膜状结构包被的囊或管状网络，所以内质网膜将细胞分割为内腔和细胞溶质两个空间。于是，本发明人希望知道 VirE2 是位于内质网的内腔一侧，还是细胞溶质一侧。本发明人构建了一个 ER-GFP1-10 质粒，在 GFP1-10 的 N 端有一段内质网定向多

肽序列，C端有一段四肽内质网滞留序列 HDEL。一同构建的质粒还有两个串联的 GFP11 (2xGFP11) 和它的内质网定向版本 (ER-2xGFP11)，它含有 N 端内质网定向多肽序列，和 C 端四肽内质网滞留序列 HDEL。

这些质粒通过农杆菌注射渗透的方式在野生型的烟草株 *N.*

- 5 *benthamiana* 中获得表达。当 ER-GFP1-10 和 ER-2xGFP11 共表达的时候，GFPcomp 信号被成功地检测到（图 6a-b）。这表明 ER-GFP1-10 位于内质网腔，且互补功能正常。表达有 VirE2-GFP11 的农杆菌菌株 EHA105virE2::*GFP11* 被注射渗透至瞬时表达 GFP1-10 或者 ER-GFP1-10 的烟草株 *N. benthamiana* 的叶子里。如图 6c 所示，农杆菌传递的
- 10 VirE2-GFP11 能互补 GFP1-10，但是不能互补 ER-GFP1-10。这证明了农杆菌传递的 VirE2 在进入植物细胞质后，在内质网的细胞溶质一侧。

VirE2 沿着 F-actin 丝状物运动

- 因为 CytoD 可以停止 VirE2 的运动(图 1b-d)，而且 CytoD 可以结合
- 15 F-actin 并阻止其单体的聚合，所以本发明尝试确定 VirE2 的运动是否和 F-actin 丝状物有关联。

- 为了同时观察 F-actin 和 VirE2，本发明人将农杆菌菌株 EHA105virE2::*GFP11* 注射渗透到表达 GFP1-10 的烟草株(Nb307A)当中。同时，该菌株携带编码 F-actin 标记物 tdTomato-ABD2 的二元质粒，用于
- 20 在该烟草中表达。如图 3 所示，VirE2-GFPcomp 信号和 F-actin 丝状物的位置重叠。时间推移成像显示 VirE2 沿着 F-actin 丝运动。

VirE2 的运动依赖于 Myosin

- 因为内质网/F-actin/myosin 能够进行三相交互作用，本发明人于是决定检验 myosin 是否在 VirE2 在植物细胞内的运动中扮演角色。首先，本发
- 25 明使用一个选择性 myosin 轻链激酶抑制剂 ML-7 抑制了植物 myosin 的活性。如图 4 所示，ML-7 处理明显地停止了 VirE2 的运动。相较于对照组，VirE2 运动的平均速率下降了 95%。

- 接下来，本发明人利用 dominant-negative 手段来确定影响 VirE2 的是
- 30 哪一种特定的 myosin。在 VirE2 传递的同时，在植物叶子中超量表达了各种 dominant-negative 的 myosin 蛋白。这些蛋白是去除了 myosin N 端的动力区域的蛋白片段，他们可以特异性地抑制其对应的 myosin 活性。农杆菌菌株 EHA105virE2::*GFP11* 的悬液被注射渗透到常表达 GFP1-10 和自

由 DsRed 的烟草株 Nb308A 当中,该菌株同时携带有在植物中表达 myosin 尾部片段的质粒。由于这些蛋白的表达,在时间上晚于 VirE2 的传递,所以当抑制效果呈现的时候,并没有影响 VirE2 的传递。在所有受测的 myosin 当中,只有 myosin XI-K 的尾部片段明显地抑制了 VirE2 的运动(图 4c, 图 5 7c)。相较于对照组, VirE2 的运动速率下降到仅有 10%的水平(图 4d)。相反的,超表达 myosin XI-2 或其他 myosin 的尾部片段,仅产生了微弱影响(图 4c 和 图 7c)。上述数据暗示, myosin 为 VirE2 的运动提供了动力,而 myosin XI-K 是主要的贡献者。

VirE2 在植物内的运动是否依赖于核定位信号(NLS)于是成为了一个有趣的问题。由于 VirE2 的 NLS1 突变会使 VirE2 失去正常功能,突变菌株可能无法用于正常的农杆菌介导的蛋白表达。而在 VirE2 传递实验中混入野生菌株可能会导致嵌合型的 VirE2 聚合体,进而影响对 VirE2 NLS1 突变的行为。于是本发明建立了一株新的可以常表达 GFP1-10 和内质网标记蛋白 ER-mCherry 的转基因烟草 Nb308ER。

15 农杆菌菌株 EHA105virE2 Δ NLS1::GFP11 被注射渗透到烟草株 Nb308ER 的叶表皮中。如图 8 所示, VirE2 Δ NLS1 与绳状内质网位置重叠,并沿着绳状内质网运动。这一结果显示, VirE2 在细胞之内的运动独立于 NLS,尽管 NLS 对其核定位非常必要。

20 农杆菌介导转化需要 myosin XI-K

本发明人想要确定所观察到的 VirE2 运动是否和农杆菌介导转化相关。于是本发明测试了选择性 myosin 轻链激酶抑制剂 ML-7 对拟南芥根转化的影响。在 10 μ M ML-7 的环境下,拟南芥根尖切段经受了致瘤菌株 A348 的接种浸润。如图 9 所示, ML-7 的存在,显著地降低了转化效率。25 本发明测试了 ML-7 分别在根尖切段和农杆菌生长中的毒性。为了模拟根尖切段被 A348 接种浸润实验的条件,根尖切段被暴露于 10 μ M ML-7 两天。这正是根尖切段和农杆菌共培养的时间。如图 9c 所示,根尖切段在植物激素的环境下正常生长,并没有因为经过 ML-7 处理而受到影响。ML-7 也不影响农杆菌的生长(图 9d)。以上数据暗示,抑制 myosin 活性会导致农杆菌介导的转化效率下降。30

为了确定特定种类的 myosin 对转化的影响,本发明利用含有部分 myosin XI-2 和 XI-K 编码序列的 RNAi 质粒来沉默相应的 myosin 基因。用于研究的 RNAi 质粒可以产生特异性的沉默效果,并不产生脱靶效果。

如图 10 所示, 沉默 myosin XI-K 之后, 致癌效果被削弱。数据清晰地显示 myosin XI-K 影响了 VirE2 的运动, 并最终影响农杆菌介导的转化。

药物的毒性测定

- 5 本发明测试了几种药物; 发现市场上的药物 Ketoconazole 不太影响蛋白质 VirE2-GFP 的实时运动过程, 被认为毒性较低; 而 Econazole 很明显地影响蛋白质 VirE2-GFP 的实时运动过程, 被认为毒性较高 (图 11)。

讨论

- 10 根瘤农杆菌拥有非凡的转化能力, 它在自然界中可以转化相当广泛的植物种类, 并能够在实验室条件下转化各种受体细胞。此外, 该细菌能够对其接触的植物细胞实现高达 100% 的转化效率。这一高水平的转化效率是所属领域技术人员有能力解构农杆菌传递的 VirE2 在植物细胞内的运动情况。如本发明在此所展示的, 该细菌绑架了宿主细胞中的保守网络来运
15 输毒性因子 VirE2, 并导向细胞核。这可能对农杆菌发展其宽泛的宿主范畴至关重要。

- 为了转化植物细胞, 农杆菌必须能够高效地转运它的毒性因子到宿主细胞中。这些外源因子必须能够移动到植物细胞中的正确位置以便执行它们的功能。而这个过程非常的复杂, 任何体外研究所引入的干扰都可能导
20 致假象。

- 本发明利用一种两段式 GFP(split-GFP)手段, 观察到了在自然设置情况下的 VirE2。这使得即时观察毒性因子 VirE2 在细胞内的运动成为可能。本发明的研究表明, 农杆菌转运的 VirE2 经由内质网/actin 组成的网络运输。这一过程有 myosin XI-K 提供动力。所属领域技术人员都知道, 内质
25 网、actin 和 myosin 可以相互作用, 并形成网络结构。因此本发明的数据显示, 外源生成并转运的 VirE2 蛋白复合体可以利用内源宿主内质网/actin 网络进行细胞内运动。

- VirE2 对于 T-DNA 的命运有着诸多方面的决定作用。因此, 研究 VirE2 如何在细胞之内运动并到达细胞核成为了一个至关重要的题目。VirE2 含
30 有两个经由两段组成的核定位信号(NLS)。它们位于 VirE2 螺旋状结构的外侧。这种结构安排可能使得 NLS 暴露出来便于和别的因子进行结合, 以利于 VirE2 的运动。

 事实上, 在超表达的情况下, VirE2 的确被证明可以和拟南芥 importin

α 的一个异构体 IMPa-4 结合, 而且 VirE2 位于细胞核内。当将 VirE2 的 NLS 突变为可以被动物细胞所识别的 NLS 形态时, 这一“动物化”的 VirE2 可以沿着非洲爪蟾 (*Xenopus*) 卵细胞的无细胞提取物当中的微管运动。

而动力蛋白 (dynein) 对于这一运动非常重要。然而, 植物中尚未发现动力蛋白的存在。在植物细胞中 VirE2 是否可以沿着微管运动也尚不清楚。

“动物化”的 VirE2 在动物细胞中的运动因此可能不足以代表其在植物细胞中的运动情况。事实上, 以 colchicine 干扰微管并不能显著影响 VirE2 的运动(图 1d)。这暗示 VirE2 可能利用了微管之外的系统在植物细胞内运动。

在本研究的体内运动系统中, 没有细胞结构的破坏。因此本研究揭示了 VirE2 在自然设置情况下在植物内依靠肌球蛋白(myosin)来运动。由于 VirE2 可以在表面包被 T-complex, 很可能有 VirE2 结合的 T-complex 是利用同样的运动模式。因而, 本研究或许可以为以下事实提供一个可能的解释: 农杆菌转化酵母和植物细胞拥有巨大的效率差异 (0.2% 酵母细胞 *S. cerevisiae* 被转化, 而 100.0% 烟草细胞 *N. benthamiana* 被转化), 然而, 这两种受体细胞接受蛋白的效率却是相当的 (50.9% 酵母细胞 *S. cerevisiae* 接受了蛋白, 100.0% 烟草细胞 *N. benthamiana* 接受了蛋白)。VirE2 运动可能需要植物特异性的 myosin XI-K。这使得 VirE2 在酵母细胞中无法运动, 进而严重影响了其转化效率。

Myosin 是真核生物当中的沿着 actin 细丝运动的重要运动蛋白(motor protein)。在植物中, myosin 可以大致分为三类 VIII, XI 和 XIII。植物 myosin XI 家族成员与动物 myosin V 家族在进化上保守, 并且参与了细胞质流, 内质网动态, 以及细胞器和微泡的运动。这一家族包含速度可达若干微米每秒的快速运动成员, 它们甚至可以超越其 myosin V 家族成员的速度达数十倍。尽管构造结构近似于 myosin V, myosin XI 拥有植物中特异的结合机制, 因而可以识别与 myosin V 完全不同的货物 (cargo)。本发明的研究证实, myosin XI-K 在 VirE2 的运动中相较于 XI-2 扮演了更重要的角色。XI-2 和 XI-K 都是在植物中大量表达的运动蛋白。然而 myosin XI-K 在内质网流动过程中是一个主要的贡献者。

本发明假设农杆菌进化出了这样一个机制来促进 VirE2 在细胞内的运动: 它使得 VirE2 可以搭上细胞基础过程中的内质网流 (细胞质流的重要组成部分), 这样一个顺风车。由于 VirE2 具有膜亲合性, 这可能使得 VirE2 能够结合细胞内广泛存在的内膜结构—内质网 (图 2b)。当然也

VirE2 也可能是通过某种位置的因子和内质网相结合。有 VirE2 结合的内质网，接下来被结合于内质网的 myosin 所驱动。结合于内质网的 myosin 然后又沿着 actin 微丝运动。正是由于 ER、F-actin 和 myosin 的三相相互作用，使得农杆菌传递的 VirE2 就能够以受 myosin 驱动，在内质网/actin 形成的网络中运动。目前尚不清楚，VirE2 的哪一部分是运动所必要的，这有待继续研究。

内质网充斥了整个细胞质，并且与细胞核的外膜相连接。这为 VirE2 到达细胞核提供了一个有利的途径。内质网上的细胞质溶液朝向或许为 VirE2 接近核孔复合体的开口提供了条件，使得 VirE2 以 NLS 介导的核定位得以实现。此外，VirE2 与内质网结合，暗示了 VirE2 可能在运动过程中还和别的因子有相互作用。事实上，有研究表明一个类似 SNARE 蛋白的可以与 VirE2 进行很强的结合。这暗示了膜泡生成或融合的过程或许也参与了 VirE2 在细胞质内的运动。当前，其他被传递到宿主细胞的毒性蛋白如何运动尚不知道。这些问题有待未来继续研究，并很有可能为研究转化过程提供更重要的新发现。

实施发明的最佳方式

下面进一步结合附图、通过具体的实施例进一步说明本发明，但是，应当理解为，这些实施例仅仅是用于更详细具体地说明之用，而不应理解为用于以任何形式限制本发明。

本部分对本发明试验中所使用到的材料以及实验方法进行一般性的描述。虽然为实现本发明目的所使用的许多材料和操作方法是本领域公知的，但是本发明仍然在此作尽可能详细描述。本领域技术人员清楚，在上下文中，如果未特别说明，本发明所用材料和操作方法是本领域公知的。

首先，对于各实施例所使用的材料以及实验方法统一说明如下：

菌株、质粒、引物以及生长条件

本试验所用到的菌株和质粒在表 1 中列出。

表 1. 本试验所用到的菌株和质粒

菌株和质粒	相关特性
-------	------

菌株和质粒	相关特性
根瘤农杆菌	
EHA105	C58 菌株包含 pTiBo542 质粒, 含有 <i>vir</i> 基因但是不含 T-DNA
EHA105 <i>virE2::GFP11</i>	EHA105 衍生菌株, 含有 GFP11 编码序列插入到 pTiBo542 上的 <i>virE2</i> 基因上从 ATG 之后的 162 bp
EHA105 <i>virE2::GFP11nls1</i>	EHA105 <i>virE2::GFP11</i> 衍生菌株, 第一个核靶向信号序列从 221KLR...KYGRR237 用丙氨酸替换
A348	A136 (pTiA6NC) (羧乙基精氨酸型)
质粒	
pQH308A	GFP1-10 编码序列插入并替换掉 pDs-Lox 里面的 Bar。得到的 Pmas:GFP1-10:Tnos 组件用 PCR 扩增并插入到 pBI121 上的 <i>Clal-HindIII</i> 位点; DsRed ORF 插入到 pBI121 上面 35S 启动子下面的 <i>XbaI-BamHI</i> 位点上
pER-rk	二元质粒编码了定位到 ER 上的 mCherry 序列
pQH308ER	用 pQH308A 上的 DsRed 编码序列从 pER-rk 上克隆的 ER-mCherry 序列替换
pQH307A	删除了 pQH308A 上的 DsRed 编码序列
pCB302	带 35S 启动子的迷你二元质粒

菌株和质粒	相关特性
pCB302-XIK-IQC	pCB302 质粒表达 myosin XI-K 尾端从 Ala731 开始的片段
pCB302-XI2-IQC	pCB302 质粒表达 myosin XI-2 尾端从 Val735 开始的片段
pCB302-XIF-IQC	pCB302 质粒表达 myosin XI-F 尾端从 Ile740 开始的片段
pCB302-VIII1-IQC	pCB302 质粒表达 myosin VIII1 尾端从 Thr827 开始的片段
pCB302-VIII2-IQC	pCB302 质粒表达 myosin VIII2 尾端从 Glu864 开始的片段
pCB302-VIII B-IQC	pCB302 质粒表达 myosin VIII B 尾端从 Val831 开始的片段
pCB302-dsXIK	pCB302 质粒表达 RNAi 构件, 涵盖了 myosin XI-K 开放阅读框 3,153-3,357 核苷酸序列区间
pCB302-dsXI2	pCB302 质粒表达 RNAi 构件, 涵盖了 myosin XI-2 开放阅读框 3,146-3,357 核苷酸序列区间
pB5tdGW-ABD2	二元质粒编码了 tdTomato-融合 actin
pH7WGR2-RFP-MBD	二元质粒编码了 RFP-融合 microtubule 结合域

菌株和质粒	相关特性
pBI121	二元质粒带有 35S 启动子和 Gus-A 编码序列
pQH121	pBI121 中 Gus-A 编码序列用多克隆位点替换
pQH121-ER-GFP1-10	pQH121 编码了 GFP1-10 序列，并在 N 端融合了 ER 定位信号以及 C 端融合了 HDEL ER-保留信号
pQH121-2×GFP11	pQH121 编码了 2 个串联的 GFP11
pQH121-ER-2×GFP11	pQH121 编码了 2 个串联的 GFP11，并在 N 其端融合了 ER 定位信号以及 C 端融合了 HDEL ER-保留信号

农杆菌 (*A. tumefaciens*) 生长在 28 摄氏度的 MG/L 培养基以及诱导培养基 (IBPO4) 里面。大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 菌株用于质粒构建，生长于 37° C 下的 LB 培养基里面。

5 质粒构建以及转基因烟草植物株 (*N. benthamiana*) 的制作。

携带了解码 GFP1-10 的表达组件或者编码 GFP1-10 和 ER-mCherry 双组件的二元质粒被构建以用来制作转基因烟草植物株 (*N. benthamiana*)。质粒 pQH308A 用 XbaI 和 SacI 内切酶消化以去除 DsRed 编码序列。线性化的质粒被 Klenow fragment 酶平端化后自连，形成了 pQH307A。pER-rk 质粒上面的 ER-mCherry 编码序列克隆到 pQH308A 的 XbaI-SacI 位点以代替 DsRed，形成 pQH308ER。

烟草植物 (*N. benthamiana*) 的叶片组织用于农杆菌注射渗透烟草植物。转基因愈伤组织在添加了 100 mg / L kanamycin, 2 mg / L 6-BA 和 0.2 mg / L NAAde MS 培养基 (Murashige and Skoog media) 上面。通过转移生芽的愈伤组织到添加了 0.1 mg / L IBA 的 1/2 MS 板上，最终获得转基因烟草苗。得到的转基因株系被命名为 Nb307A 和 Nb308ER，以对应相应的二元质粒

pQH307A 和 pQH308ER。

毒性测定实验 (Virulence assays)

- 5 拟南芥种子用 0.5% 的次氯酸钠消毒，放置在添加了 1% sucrose 和 0.5 g/L MES, pH 5.8 的 1/2 MS 板上。培养板之后放置在 16 小时光照 25 摄氏度的环境下培养 10-12 天。从每个幼苗的根上剪成每个 3-5 mm 的小片段，悬浮在 1 ml 的加入了 5×10^8 cell/ml (均为此浓度，否则另述) 农杆菌的 1/2 MS 培养液里面。混悬液然后铺到 1/2 MS 培养板上在 25° C 下培养 2 天。拟南芥根被切段之后摆到 100 µg/L Cefotaxime 的 1/2 MS 培养板上在 25° C 下培养 4 周后进行拍照。

- 烟草叶片用 0.5% 的次氯酸钠消毒，用打孔器打成小盘状。小叶盘悬浮到的加入了 1×10^8 cell/ml (均为此浓度，否则另述) 农杆菌的 1/2 MS 培养液里面，然后摆在 1/2 MS 板上在 25° C 下培养 2 天。之后再转到 100 µg/L Cefotaxime 的 1/2 MS 培养板上在 25° C 下培养 2 周后进行拍照。

农杆菌注射渗透实验 (Agroinfiltration)

- 为了实时观测农杆菌转运的 VirE2，对农杆菌进行了注射渗透实验，其步骤按照之前描述的程序进行。简单来说就是，细菌生长过夜用 MG/L 稀释 50 倍后接着培养 6 小时。细菌收集后悬浮在浸润液 (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, pH 5.5) 至 OD₆₀₀=1.0。菌体悬浮液用注射器从叶子背面注射渗透并扩散到烟草叶片。注射渗透后的植物放在 22°C 在 16h 光照/8h 黑暗的环境中。为了实时观测化合物或药物对细胞的实时影响，本发明人将化合物或药物以适当的浓度注射渗透到已被注射渗透农杆菌 EHA105virE2::GFP11 细胞的叶子内，6 小时后，用共聚焦显微镜下以 UPLSAPO ×60 N.A. 1.20 水浸镜头进行观察。

qRT-PCR法检测mRNA

30

为了定量测定 RNAi 沉默 (RNAi-silenced) 后的植物的 mRNA 水平，提取每种处理植物的总 RNA，用反转录试剂盒 iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) 反转录。定量实时 PCR (qRT-PCR) 通过 KAPA SYBRs 试剂盒

在 CFX384 Real-Time PCR system (Bio-Rad) 机器上进行, 每个样品有 3 个重复, actin 基因作为内对照 (引物为: 5'-CTTGAAACAGCAAAGACCAGC-3' 和 5'-GGAATCTCTCAGCACCAATGG-3')。qRT-PCR 的基因特异性引物如下: 烟草 myosin XI-2 基因(accession number: DQ875135)引物为

- 5 5'-TCGTTTCGGTAAGTTTGTGG-3' 和
5'-CATTGCCCTTCTTGTAGCC-3'。烟草 myosin XI-K 基因(accession number DQ875137) 引物为 5'-GAATCAGTGAGGAAGAGCAGG-3' 和
5'-CCGTCATATTGAGATGAAATCG-3'。

10 共聚焦显微成像 (Confocal microscopy)

- 配备有 EM-CCD 镜头的 PerkinElmer 公司的 UltraView Vox Spinning Disk system 盘式共聚焦显微镜系统用于共聚焦显微成像。为了实时观测叶片表皮细胞, 农杆菌注射渗透后的叶片组织从烟草植株上分离, 放在铺有 2%
15 低熔点的琼脂凝胶的载玻片上并盖上盖玻片。所以的图片均采用多层共聚焦 (Z-stacks) 生成, 处理后显示的是整合的多聚集图片或者用 Volocity® 3D Image Analysis Software 6.2.1 处理后的 3D 透明视图。

实施例 1: 农杆菌传递的 VirE2 沿细胞结构运动并进入细胞核

20

- 图 1 示出农杆菌传递的 VirE2 沿着一个细胞结构运动, 并进入细胞核, 农杆菌 EHA105 *VirE2::GFP11* 细胞注射渗透至常表达 GFP1-10 和 DsRed 的转基因烟草系 NB308A 中。两天后, 被注射渗透的叶子的下表皮用共聚焦显微镜以 UPLSAPO $\times 60$ N.A. 1.20 水浸镜头进行观察。红色: 自由 DsRed; 绿色: VirE2-GFPcomp (a) VirE2 聚合物沿着一个线性细胞结构运动并进入细胞核的时间延迟拍摄影像。相对时间轴标于右上方。比例尺代表 20 μm 。(b) 化学物处理对于 VirE2 运动的影响。化学物在观察前六小时被注射渗透至叶子样本中。Control, 0.5% DMSO. Colc、秋水仙素 (colchicine) 500 μM 、CytoD、cytochlasin D 20 μM 、BFA、brefeldin A 100 $\mu\text{g/mL}$ 。比例尺代表 20 μm 。(c)
25 VirE2 聚合物在化学物处理后的平均速度。(d) 20 个 VirE2 聚合物运动轨迹的共原点图。
30

实施例 2: 农杆菌传递的 VirE2 与内质网位置重叠并沿着内质网运动

图2示出农杆菌传递的VirE2与内质网位置重叠,并沿着内质网运动;含有二元质粒pQH308ER的农杆菌EHA105virE2::GFP11细胞被注射渗透至野生型烟草N. benthamiana叶子中。pQH308ER编码有35S启动子驱动的ER-mCherry和mas启动子驱动的GFP1-10。受注射渗透的叶子下表皮在两天后置于共聚焦显微镜下以UPLSAPO ×60 N.A. 1.20水浸镜头观察。红色:ER-mCherry;绿色, VirE2-GFPcomp. (a) VirE2聚合体与相互交织的内质网管位置重叠。比例尺代表10 μm。(b) VirE2聚合体沿着绳状内质网运动的时间延迟影像。相对时间轴标于右上方。比例尺代表20 μm。

10

实施例3: 农杆菌传递的VirE2与F-actin丝位置重叠并沿着F-actin丝运动

图3示出农杆菌传递的VirE2与F-actin丝位置重叠并沿着F-actin丝运动;含有二元质粒pB5tdGW-ABD2的农杆菌EHA105virE2::GFP11细胞被注射渗透至常表达GFP1-10的转基因烟草系Nb307A当中。质粒pB5tdGW-ABD2编码了35S启动子驱动的actin标记蛋白tdTomato-ABD2。被注射渗透的叶子的下表皮于两天后置于共聚焦显微镜UPLSAPO ×60 N.A. 1.20水浸镜头下观察。红色:F-actin;绿色, VirE2-GFPcomp. (a)示出VirE2聚合体和F-actin丝位置重叠。比例尺代表20 μm。(b)示出VirE2聚合体沿着F-actin丝运动的时间延迟影像。相对时间轴标于右上方。比例尺代表10 μm。

25

实施例4: ML-7和超表达Myosin尾部片段对VirE2运动的影响

图4示出ML-7和超表达Myosin尾部片段对VirE2运动的影响;(a) myosin轻链激酶抑制剂ML-7对VirE2运动的影响。农杆菌EHA105virE2::GFP11细胞被注射渗透至常表达GFP1-10和DsRed的转基因烟草系Nb308A当中。100 μM ML-7或1% DMSO(实验对照)于观察前四小时被注射渗透至叶子中。叶表皮细胞与农杆菌注射渗透两天后置于共聚焦显微镜下以UPLSAPO ×60 N.A. 1.20水浸镜头观察。红色:自由DsRed;绿色: VirE2-GFPcomp. 显微图像下方为20个VirE2聚合体运动轨迹的共原点图。比例尺代表20 μm。(b) ML-7处理后, VirE2聚合体的平均运动速度。(c) myosin

尾部片段超表达对 VirE2 运动的影响。含有编码 35S 驱动的尾部片段的二元质粒的农杆菌 EHA105virE2::GFP11 细胞被注射渗透至常表达 GFP1-10 和 DsRed 的转基因烟草系 Nb308A 中。被注射渗透的叶片下表皮于两天后置于共聚焦显微镜下以 UPLSAPO $\times 60$ N.A. 1.20 水浸镜头观察。红色：自由 DsRed；绿色：VirE2-GFPcomp。显微图像下方为 20 个 VirE2 聚合体运动轨迹的共原点图。比例尺代表 20 μm 。(d) 超表达 myosin 尾部片段条件下，VirE2 聚合体运动的平均速度。EV，空白载体对照。(e) 农杆菌注射渗透法表达 myosin 尾部片段的叶片粗体物的 Western 印迹法检验。EV，空白载体对照。Myosin 尾部片段均由 HA 标记。图下方的 GFP1-10 的检测用于评价上样量。

实施例 5：图 5 示出化学试剂对各自细胞结构的影响

图 5 示出化学试剂对各自细胞结构的影响；野生型烟草植物叶片用含有编码不同荧光标记物的二元质粒的农杆菌注射渗透。叶表皮细胞与农杆菌注射渗透两天后置于共聚焦显微镜下以 UPLSAPO $\times 60$ N.A. 1.20 水浸镜头观察。上一排 a-c：样品叶片表达亚细胞标记物。下一排 d-f：表达亚细胞标记物的样品叶片用化学试剂处理。(a) RFP-MBD。MBD, Microtubule Binding Domain, 微管结合域。(b) ER-mCherry。(c) tdTomato-ABD2。ABD, Actin Binding Domain, 肌动蛋白结合域。(d) RFP-MBD。样品叶片于摄像前 6 小时用 500 μM colchicine 处理。(e) ER-mCherry。样品叶片于摄像前 6 小时用 100 mM BFA 处理。(f) tdTomato-ABD。样品叶片于摄像前 6 小时用 20 μM cytochalasin D 处理。比例尺代表 20 μm ；

实施例 6：图 6 示出农杆菌传递的 VirE2 位于内质网的胞质面

图 6 示出农杆菌传递的 VirE2 位于内质网的胞质面；野生型烟草植物叶片用含有编码带或者不带 ER 定位信号的 GFP1-10 或者 GFP11 的二元质粒的农杆菌注射渗透。叶表皮细胞与农杆菌注射渗透两天后置于共聚焦显微镜下以 UPLSAPO $\times 60$ N.A. 1.20 水浸镜头观察。(a) 引入到烟草细胞的基因构造。(b) 左侧：共表达 2 $\times$ GFP11 和 ER-GFP1-10。右侧：共表达 ER-2 $\times$ GFP11 和 ER-GFP1-10。(c) 左侧：用 EHA105virE2::GFP11 带有编码 GFP1-10 二元质粒的农杆菌注射渗透。右侧：用 EHA105virE2::GFP11 带有编码

ER-GFP1-10 二元质粒的农杆菌注射渗透。比例尺代表 20 μm ;

实施例 7: 图 7 示出超表达myosin末端对VirE2 运动的影响

- 5 图 7 示出超表达 myosin 末端对 VirE2 运动的影响; 农杆菌 EHA105*virE2::GFP11* 含有编码 35S 启动子驱动的各个 myosin 末端片段的细胞被注射渗透至常表达 GFP1-10 和 DsRed 的转基因烟草系 Nb308A 当中。叶表皮细胞与农杆菌注射渗透两天后置于共聚焦显微镜下以 UPLSAPO $\times 60$ N.A. 1.20 水浸镜头观察。红色: 自由 DsRed; 绿色: VirE2-GFPcomp。(a) 导入农杆菌的不同 myosin 末端结构示意图。(b) 用不同 myosin 末端结构的农杆注射渗透的叶片样品进行的 Western 印迹分析。EV 代表空白载体对照。Myosin 末端用 HA 标记。下排显示的是检测到的 GFP1-10, 用来估计加入的样品量。(c) 超表达 myosin 末端对 VirE2 运动的影响。Z-多层切片图像用 0.5 μm 每步来获取。图片显示的是扩展聚焦图像。右上方显示的是相对时间。
- 10 比例尺代表 20 μm 。下排图表显示的是 20 个 VirE2 聚合体运动轨迹的共原点图;

实施例 8: 图 8 示出 NLS1 突变的VirE2 在内质网丝上运动的延时图像

- 20 图 8 示出 NLS1 突变的 VirE2 在内质网丝上运动的延时图像; 农杆菌 EHA105*virE2 Δ nls1* (氨基酸序列 221KLR...KYGRR237 用丙氨酸替换) 注射渗透到常表达 ER-mCherry 和 GFP1-10 的转基因烟草系 Nb308A 叶片中。右上方显示的是相对时间。比例尺代表 10 μm 。

实施例 9: 图 9 示出ML-7 处理对致根瘤实验的影响

- 25 图 9 示出 ML-7 处理对致根瘤实验的影响; 生长 10 天的野生型拟南芥根段用致瘤型农杆菌 A348 侵染。3 周后对根瘤进行拍照。(a) 用或者不用 ML-7 处理生成的根瘤。ML-7 (10 μM) 加到共培养液然后在根段转移到新
- 30 板上的时候洗脱。(b) 致瘤效率由致瘤的根段比例来确定。(c) ML-7 对根段活性的影响。(d) ML-7 对农杆菌活性的影响;

实施例 10: 图 10 示出RNAi沉默XI-2 和 XI-K后对致瘤的影响

图 10 示出 RNAi 沉默 XI-2 和 XI-K 后对致瘤的影响；野生型烟草植物用不同的农杆菌 RNAi 构造菌株注射渗透。3 周以后进行 mRNA 分析和农杆菌侵染。(a) 不同 RNAi 构造形成的叶盘瘤。(b) 实时 PCR 检测到的不同基因沉默后的植物 mRNA 水平。(c) 叶盘瘤的平均湿重。

实施例 11：图 11 示出药物对 VirE2 运动的影响

图 11 示出药物对 VirE2 运动的影响；农杆菌 EHA105*virE2::GFP11* 细胞被注射渗透至常表达 GFP1-10 和 DsRed 的转基因烟草系 Nb308A 当中。药物于观察前 6 小时被注射渗透至叶子中。叶表皮细胞与农杆菌注射渗透两天后置于共聚焦显微镜下以 UPLSAPO $\times 60$ N.A. 1.20 水浸镜头观察。红色：自由 DsRed；绿色：VirE2-GFPcomp。Z-多层切片图像用 0.5 μm 每步来获取。上排图表显示的是 20 个 VirE2 聚合体运动轨迹的共原点图。下排图表显示的是 20 个 VirE2 聚合体运动的平均速度。

尽管本发明已进行了一定程度的描述，明显地，在不脱离本发明的精神和范围的条件下，可进行各个条件的适当变化。可以理解，本发明不限于所述实施方案，而归于权利要求的范围，其包括所述每个因素的等同替换。

序列表

<110> 潘申权

5 <120> 实时观测化合物或药物影响细胞的标记物、方法、试剂盒及其应用

<160> 2

10 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 565

<212> PRT

15 <213> 人工序列

<220>

<223> VirE2-GFP11

20 <400> 1

Met Asp Pro Ser Ser Asn Glu Asn Val Tyr Val Gly Arg Gly His Asn

1 5 10 15

25

Ile Glu Asn Asp Asp Asp Thr Asp Pro Arg Arg Trp Lys Lys Ala Asn

20 25 30

30 Ile Ser Ser Asn Thr Ile Ser Asp Ile Gln Met Thr Asn Gly Glu Asp

35 40 45

Val Gln Ser Gly Ser Pro Arg Asp His Met Val Leu His Glu Tyr Val
50 55 60

5 Asn Ala Ala Gly Ile Thr Thr Arg Thr Glu Val Val Ser Pro Arg Leu
65 70 75 80

Asp Tyr Gly Ser Val Asp Ser Ser Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Ser Glu
10 85 90 95

His Gly Asn Gln Ala Glu Ile Gln Lys Glu Leu Ser Val Leu Phe Ser
100 105 110

15 Asn Met Ser Leu Pro Gly Asn Asp Arg Arg Pro Asp Glu Tyr Ile Leu
115 120 125

20 Val His Gln Thr Gly Gln Asp Ala Phe Thr Gly Ile Ala Lys Gly Asn
130 135 140

25 Leu Asp Gln Met Pro Thr Lys Ala Glu Phe Asn Ala Cys Cys Arg Leu
145 150 155 160

Tyr Arg Asp Gly Ala Gly Asn Tyr Tyr Pro Pro Pro Leu Ala Phe Asp
30 165 170 175

Lys Ile Ser Val Pro Glu Gln Leu Glu Glu Lys Trp Gly Met Met Glu

	180	185	190
	Ala Lys Glu Arg Asn Lys Leu Arg Phe Gln Tyr Lys Leu Asp Val Trp		
5	195	200	205
	Asn His Ala His Ala Asp Met Gly Ile Thr Gly Thr Glu Ile Phe Tyr		
	210	215	220
10			
	Gln Thr Asp Lys Asn Ile Lys Leu Asp Arg Asn Tyr Lys Leu Arg Pro		
	225	230	235 240
15			
	Glu Asp Arg Tyr Val Gln Thr Glu Lys Tyr Gly Arg Arg Glu Ile Gln		
	245	250	255
20			
	Lys Arg Tyr Gln His Glu Leu Gln Ala Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ile		
	260	265	270
25			
	Met Ile Lys Thr Pro Gln Asn Asp Ile His Phe Val Tyr Arg Phe Ala		
	275	280	285
30			
	Gly Asp Asn Tyr Ala Asn Lys Gln Phe Ser Glu Phe Glu His Thr Val		
	290	295	300
	Lys Arg Arg Tyr Gly Asp Glu Thr Glu Ile Lys Leu Lys Ser Lys Ser		
	305	310	315 320

5 Gly Ile Met His Asp Ser Lys Tyr Leu Glu Ser Trp Glu Arg Gly Ser
325 330 335

10 Ala Asp Ile Arg Phe Ala Glu Phe Val Gly Glu Asn Arg Ala His Asn
340 345 350

Arg Gln Phe Pro Thr Ala Thr Val Asn Met Gly Gln Gln Pro Asp Gly
355 360 365

15 Gln Gly Gly Leu Thr Arg Asp Arg His Val Ser Val Asp Phe Leu Met
370 375 380

20 Gln Ser Ala Pro Asn Ser Pro Trp Ala Gln Ala Leu Lys Lys Gly Glu
385 390 395 400

25 Leu Trp Asp Arg Val Gln Leu Leu Ala Arg Asp Gly Asn Arg Tyr Leu
405 410 415

Ser Pro Pro Arg Leu Glu Tyr Ser Asp Pro Ala His Phe Thr Glu Leu
420 425 430

30 Met Asn Arg Val Gly Leu Pro Ala Ser Met Gly Arg Gln Ser His Ala
435 440 445

Ala Ser Ile Lys Phe Glu Lys Phe Asp Ala Gln Ala Ala Val Ile Val
450 455 460

5
Leu Asn Gly Pro Glu Leu Arg Asp Ile His Asp Leu Ser Pro Glu Lys
465 470 475 480

10
Leu Gln Asn Leu Ser Thr Lys Asp Val Ile Val Ala Asp Arg Asn Glu
485 490 495

15
Asn Gly Gln Arg Thr Gly Thr Tyr Thr Ser Val Ala Glu Tyr Glu Arg
500 505 510

20
Leu Gln Leu Arg Leu Pro Pro Asp Ala Ala Gly Val Leu Gly Glu Ala
515 520 525

25
Thr Asp Lys Tyr Ser Arg Asp Phe Val Arg Pro Glu Pro Ala Ser Arg
530 535 540

30
Pro Ile Ser Asp Ser Arg Arg Ile Tyr Glu Ser Arg Pro Arg Ser Gln
545 550 555 560

Ser Val Asn Ser Phe
565

<210> 2
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

5

<220>
<223> GFP1-10

<400> 2

10

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15

15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Arg Gly
20 25 30

20

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Ile Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45

25

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60

30

Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65 70 75 80

Arg His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85 90 95

Arg Thr Ile Ser Phe Lys Asp Asp Gly Lys Tyr Lys Thr Arg Ala Val
100 105 110

5
Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
115 120 125

10
Thr Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
130 135 140

15
Asn Phe Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asn Lys Gln Lys Asn
145 150 155 160

20
Gly Ile Lys Ala Asn Phe Thr Val Arg His Asn Val Glu Asp Gly Ser
165 170 175

25
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
180 185 190

30
Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Thr Val Leu
195 200 205

30
Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys
210 215

权 利 要 求

1. 用于实时观测化合物或药物影响细胞的标记物，其特征在于，所述
5 标记物为：
- 1) SEQ No.1 和/或 SEQ No.2 所示的氨基酸序列；或
 - 2) 具有可用于实时观测化合物或药物影响细胞的功能，且与 SEQ No.1 和/或 SEQ No.2 所示氨基酸序列具有至少 80%以上、优选 85%以上、更优选 90%、进一步优选 95%、最优选 99%同源性的氨基酸序列。
- 10 2. 根据权利要求 1 所述的标记物，其特征在于，所述细胞选自植物细胞、酵母、真菌、绿藻或动物细胞。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的标记物，其特征在于，所述影响为：所述化合物或药物的非特异性毒性。
4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的标记物，其特征在于，所述实时观
15 测化合物或药物影响细胞为：实时观测 VirE2-GFP 在内质网/actin 网络中的运动。
5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的标记物，其特征在于，所述标记物为：编码所述标记物的核苷酸。
6. 一种实时观测化合物或药物影响细胞的方法，其特征在于，所述方
20 法包括以下步骤：
- 1) 向所述细胞引入或使得所述细胞包含可用来实时观测化合物或药物影响细胞的标记物或权利要求 1-5 任一项所述的标记物；
 - 2) 在所述细胞中加入所述被观测的化合物或药物；和
 - 3) 实时观测所述细胞中所述标记物的形态、运动轨迹和/或速度。
- 25 7. 根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述细胞选自植物细胞、酵母、真菌、绿藻或动物细胞。
8. 根据权利要求 6 或 7 所述的方法，其特征在于，所述步骤 3) 中标记物的形态：包括由 VirE2-GFP 形成的丝状结构的尺寸、形状、移动模式和/或位置。
- 30 9. 根据权利要求 6-8 任一项所述的方法，其特征在于，所述实时观测化合物或药物影响细胞为：实时观测 VirE2-GFP 在内质网/actin 网络中的运动。
10. 根据权利要求 6-9 任一项所述的方法，其特征在于，所述化合物

为核苷酸和/或所述药物为小分子药物。

11. 根据权利要求 6-10 任一项所述的方法，其特征在于，所述化合物或药物选自秋水仙素、细胞松弛素 D、布雷菲德菌素 A、ML-7、RFD-MBD、MBD、ER-mCherry、ABD、myosin 尾部片段。

5 12. 根据权利要求 6-11 任一项所述的方法，其特征在于，所述影响为：所述化合物或药物的非特异性毒性。

13. 一种实时观测化合物或药物影响细胞的试剂盒，优选地，所述细胞选自植物细胞、酵母、真菌、绿藻或动物细胞，其特征在于：所述试剂盒包含可用来实时观测化合物或药物影响细胞的标记物或权利要求 1-5 任
10 一项所述的标记物。

14. 根据权利要求 13 所述的试剂盒，其特征在于，所述化合物为核苷酸和/或所述药物为小分子药物。

15 15. 根据权利要求 13 或 14 所述的试剂盒，其特征在于，所述化合物或药物选自秋水仙素、细胞松弛素 D、布雷菲德菌素 A、ML-7、RFD-MBD、MBD、ER-mCherry、ABD、myosin 尾部片段。

16. 根据权利要求 13-15 任一项所述的试剂盒，其特征在于，所述实时观测化合物或药物影响细胞为：实时观测 VirE2-GFP 在内质网/actin 网络中的运动。

20 17. 根据权利要求 13-16 任一项所述的试剂盒，其特征在于，所述影响为：所述化合物或药物的非特异性毒性。

18 用于实时观测化合物或药物的非特异性毒性的方法，其特征在于，所述方法包括：使用如权利要求 1-5 任一项所述的标记物和/或权利要求 13-17 任一项所述的试剂盒。