

绿色荧光蛋白基因 *gfp* 在苏云金芽胞杆菌中表达的初步研究

周 琴, 孙 明, 周俊初, 喻子牛

(华中农业大学, 农业部农业微生物重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 将携带蜡状芽胞杆菌特异启动子的 *gfpmut3a* 基因克隆到穿梭载体 pHT304 后, 电转化至苏云金芽胞杆菌 BMB171, CryB, IPS78-11, 4Q7, HD-80-21 中。通过荧光显微镜和 Bio-assay Reader 对含重组质粒 pGFP-304 的 5 个受体菌分别进行荧光检测及定量分析。结果表明, *gfpmut3a* 基因仅在苏云金芽胞杆菌无晶体突变株 BMB171, CryB, IPS78-11, 4Q7 中表达并可检测得到菌体发光, 并建立了一套适合于苏云金芽胞杆菌的 GFP 标记与检测方法。

关键词: 绿色荧光蛋白基因(*gfp*); 苏云金芽胞杆菌; 荧光检测

A Preliminary Study on the Expression of *gfp* Gene in *Bacillus thuringiensis*

ZHOU Qin, SUN Ming, ZHOU Jun-chu, YU Zi-niu

(The Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: The gene *gfpmut3a* with specific promoter of *Bacillus cereus* were cloned into a shuttle plasmid pHT304 between *E. coli* and *B. thuringiensis*. It was then introduced into recipient strains of BMB171, CryB, IPS78-11, 4Q7 and HD80-21 by electroporation. The results showed that green fluorescence could only be detected in acrySTALLIFEROUS strains.

Key words: Green fluorescent protein gene(*gfp*); *Bacillus thuringiensis*; Fluorescence detection

苏云金芽胞杆菌制剂是研究最为广泛深入的细菌杀虫剂, 其产品占当前生物农药市场的 90% 以上。目前国内外研究者将主要精力致力于构建遗传工程菌以及基因产品的获得上。然而, 随着人们环境生态意识的加强, 工程菌的使用面临着极大的挑战, 例如重组质粒稳定性差, 重组 DNA 在环境中易发生水平转移导致基因的扩散, 尤其是广泛使用抗生素抗性基因作为标记基因, 从而引发人们在环境释放时对工程菌安全性的担忧。笔者试图寻求一种利用 *gfp* 替代抗性基因, 构建高效、安全工程菌的方法。

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)是一类存在于包括水母、水螅和珊瑚等腔肠动物体内

的生物发光蛋白。自 Shimomura^[1]和 Ward^[2]等相继对 GFP 结构和功能的研究表明, 其分子量为 30 ku 的单体发光蛋白, 受近紫外光(395 nm)或蓝光(470 nm)激发后, 能发出波长为 510 nm 的绿荧光。自美国的 Chalfie^[3]等首次在《Science》上报道分别用 T₇ 启动子和 mec-7 启动子成功地使 *gfp* 在大肠杆菌(*E. coli*)和线虫(*C. elegans*)等 2 个异源宿主表达以来, *gfp* 作为报告基因已被成功地应用于原核、真核及动植物研究中。Webb^[4]等将 *gfp* 与芽胞衣蛋白基因 *cotE* 融合, 在荧光显微镜下直接观察到枯草芽胞杆菌芽胞形成时期的不同特异性蛋白在芽胞与母细胞中的定位, 以了解不同特异蛋白在芽胞形成中的功能。Dunf^[5]等构建了一个以 *gfpmut3a* 为报告基因

收稿日期 2001-11-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170032)和国家“863”计划资助项目(2001AA212301)

作者简介: 周 琴(1975-), 女, 浙江嵊县人, 博士研究生, 主要从事微生物分子生物学研究。周俊初为通讯作者, Tel: 027-87283455; Fax: 027-

87280670; E-mail: zhouqin@mail.hzau.edu.cn

的蜡状芽胞杆菌启动子探针载体,通过鸟枪法克隆获得一系列组成型和诱导型克隆子,并用激光共聚焦扫描显微镜检测到在番茄幼苗根表面定殖的标记细菌。笔者将蜡状芽胞杆菌组成型表达启动子 44-12 与 *gfpmut3a* 的融合基因,克隆导入苏云金芽胞杆菌无晶体突变株 BMB171、CryB、IPS78-11、4Q7 和有晶体突变株 HD-80-21,成功地实现了异源启动子-*gfp* 融合基因在苏云金芽胞杆菌中的表达。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒、培养条件和试剂

蜡状芽胞杆菌 UW85 及 GFP 表达载体 pAD4412 由美国 Wisconsin 大学 Handelsman 博士惠赠,受体菌大肠杆菌为 DH5 α ,芽胞杆菌为 BMB171、CryB、IPS78-11、4Q7、HD-80-21。*E. coli*-*B. thuringiensis* 穿梭载体为 pHT304。

大肠杆菌采用 LB 培养基,于 37℃ 下培养。蜡状芽胞杆菌 UW85 采用半强度的 TSB,苏云金芽胞杆菌用 LC 培养基,于 28℃ 下培养。抗生素及使用浓度:氨苄青霉素(Amp^r):100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$,氯霉素(Cm^r):10 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$,红霉素(Em^r):25 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

DNA 片段回收试剂盒购自 QIAGEN 公司。各种 DNA 限制性内切酶和 T₄ 连接酶等为华美公司产品。

1.2 质粒 DNA 的分离与重组质粒的构建

蜡状芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌质粒提取均采用碱变性法,菌体培养至对数期,溶液 I 重悬菌体时加入溶菌酶(终浓度 1 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$),于冰上放置 1~2 h。重组质粒的构建参照 Sambrook 等^[6]的方法进行。

1.3 重组质粒的转化

大肠杆菌的常规转化采用氯化钙法^[6];苏云金芽胞杆菌采用电转化法^[7]。

1.4 质粒稳定性检测

将待测菌株在 LB 液体摇瓶培养 8 h,按 1/1 000 接种量转至新鲜 LB 液体培养 8 h,再转种 1 次使其转代 40 代以上。梯度稀释后涂布 LB 平板,于 30℃ 培养至长出单菌落。对携带抗性质粒的菌株分别点种于抗性及无抗性 LB 平板观察其抗性是否丢失,从而鉴定其复制子在无抗性选择压力下的遗传稳定性。

1.5 供试菌发光特性的检测

用荧光显微镜 Leica MZFLIII 对供试菌株进行荧光检测,同时用 SONY 3CCD 的 Color Video Camera 拍照,滤光片选择 GFP-plus 型。

1.6 供试菌的荧光强度的检测

供试菌用 LC 培养基于 28℃ 下活化后每隔 2 h 收集培养物,每次吸取 200 μl 待测菌液至 96 孔板上。设置出发菌作为对照,然后用 Bio-assay Reader 检测,并重复 3 次,选择激发滤光片为 485 nm、发射滤光片为 520 nm。用 HT Soft 软件分析所得数据。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pGFP-304 的构建

为使 *gfp* 在苏云金芽胞杆菌中表达,首先要选择合适的启动子。笔者采用了与苏云金芽胞杆菌同源性很高的蜡状芽胞杆菌。为此,从 pAD44-12 上酶切回收大约 4.5 kb 的 *EcoRI*-*HindIII* 片段(包括 3.6 kb 启动子和 0.9 kb 的 *gfpmut3a* 基因)克隆到苏云金芽胞杆菌-大肠杆菌穿梭载体上,获得 *gfp* 在苏云金芽胞杆菌中的表达载体 pGFP-304。

2.2 pGFP-304 的电转化与转化菌株的筛选

用电转化的方法将重组质粒 pGFP-304 导入 BMB171 等 5 个受体菌后从 LC + Amp^r + Em^r 平板中筛选转化子,并提取质粒进行酶切验证。初筛结果表明,pGFP-304 已成功地转入苏云金芽胞杆菌受体菌 BMB171、CryB、IPS78-11、4Q7 和 HD-80-21 中。

2.3 质粒遗传稳定性检测

携带质粒 pGFP-304 的重组菌株 BMB171、CryB、IPS78-11、4Q7 和 HD-80-21 在无抗性 LB 液体培养基中传代 40 代后,稀释涂于 LB 平板培养至单菌落,分别随机挑取 100 个单菌落点种于红霉素抗性平板,发现均带有红霉素抗性。这表明重组质粒 pGFP-304 在 5 种受体菌中均可稳定遗传。

2.4 转化菌株的荧光显微观察

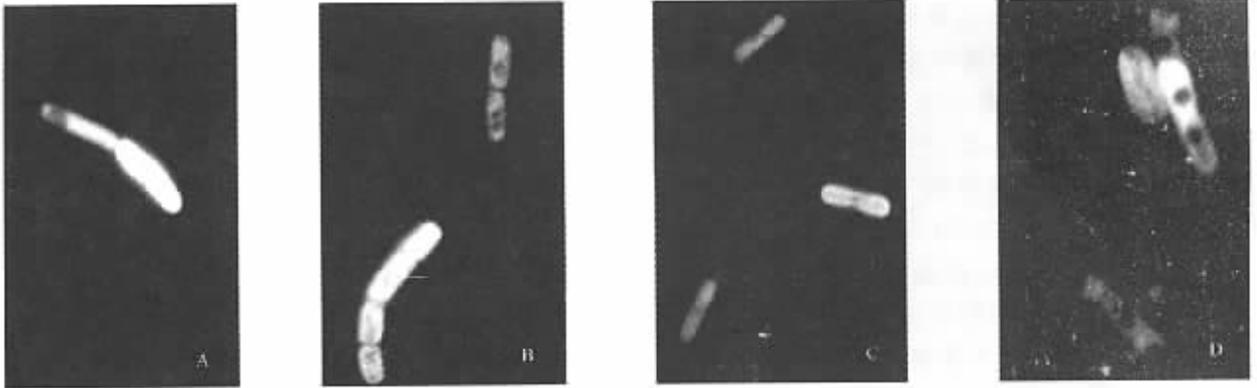
将上述 5 个转化菌株分别用 LC 液体培养基培养,于不同时间取样用荧光显微镜观察。结果发现 GFP 可在 BMB171、CryB、IPS78-11 和 4Q7 等 4 个供试菌中表达(图 1),其发光强度与菌体培养时间有关。GFP 既能在营养体细胞中的表达,也可以在芽胞形成时期表达。但在有晶体突变株 HD-80-21 的任何培养时期,都无法观察到 GFP 的表达。

2.5 供试菌株生长曲线的测定与发光强度的定量分析

从以上荧光显微镜观察结果可初步判断:GFP 表达量与菌龄有关。下一步通过测受体菌株的生长曲线与荧光定量分析,找出二者的相关性。结果表明,GFP 的表达量与菌龄是成正比的。当菌体培养至稳定期(8h 左右)时,GFP 表达量基本也同时达到最大。由图 2 以 BMB171/pGFP-304 和 CryB/pGFP-304

为例)可知,若荧光强度达 30 000 ~ 50 000 时, BMB171/pGFP-304 和 CryB/pGFP-304 需要培养 4 ~ 7

h。4 种重组菌株的荧光强度基本上是按生长时间较缓慢、平稳地增加。

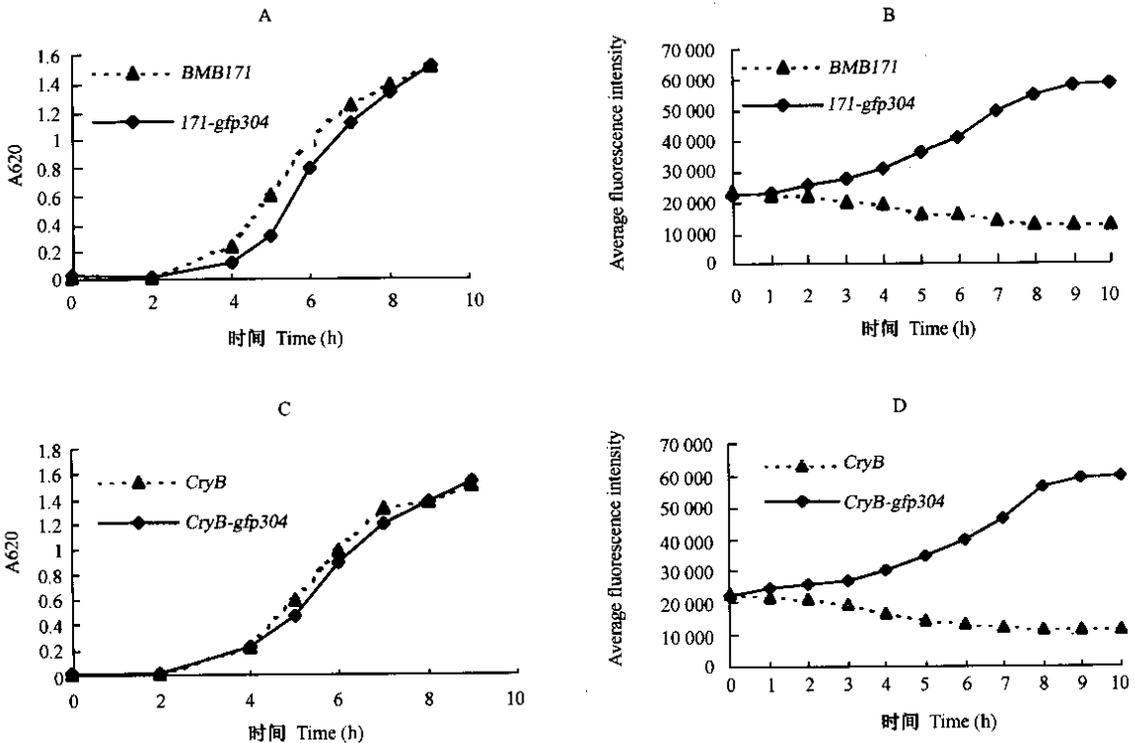


A. *gfp* 在苏云金芽胞杆菌受体菌 BMB171 中的表达; B. *gfp* 在苏云金芽胞杆菌受体菌 CryB 中的表达; C. *gfp* 在苏云金芽胞杆菌受体菌 IPS78-11 中的表达; D. *gfp* 在苏云金芽胞杆菌受体菌 4Q7 中的表达

A. Expression of *gfp* in recipient strain BMB171 of *Bacillus thuringiensis*; B. Expression of *gfp* in recipient strain CryB of *Bacillus thuringiensis*; C. Expression of *gfp* in recipient strain IPS78-11 of *Bacillus thuringiensis*; D. Expression of *gfp* in recipient strain 4Q7 of *Bacillus thuringiensis*

图 1 *gfp* 在苏云金芽胞杆菌中的表达

Fig.1 Expression of *gfp* in *Bacillus thuringiensis*



A :BMB171 和 BMB171/pGFP-304 的生长曲线; B : BMB171 和 BMB171/pGFP-304 的荧光强度; C : CryB 和 CryB/pGFP-304 的生长曲线; D : CryB 和 CryB/pGFP-304 的荧光强度

A , C : Growth curves of strains BMB171/pGFP-304 and BMB171 , CryB/pGFP-304 and CryB; B , D : Average fluorescence intensity over time for strains BMB171/pGFP-304 and BMB171 , CryB/pGFP-304 and CryB

图 2 供试菌株生长曲线与荧光强度的分析

Fig.2 Fluorescence intensity and growth curves of representative clones

3 讨论

迄今尚未见到有关利用异源启动子在苏云金芽胞杆菌中表达 GFP 蛋白的报道。本研究选用苏云金芽胞杆菌无晶体突变株和晶体突变株作为受体菌,通过荧光检测,发现 GFP 仅在无晶体突变株 BMB171、CryB、IPS78-11、4Q7 中表达,而未能在晶体突变株 HD-80-21 中检测得到。推测是蜡状芽胞杆菌特异性启动子在 HD-80-21 中无法调节 *gfp* 的表达,或是 HD-80-21 中有负控制因素存在,造成启动子失效,在产品体菌株中的表达有待进一步研究。

尽管 GFP 发出荧光不需要任何辅助因子,但荧光强度并非总是同 GFP 总量成正比。由于 GFP 生色团的形成需要分子氧,因此荧光经常在厌氧或强还原性环境中减弱^[9]。温度也能影响 GFP 发光,因为 GFP 倾向于随温度的升高而形成不发光的包含体^[8]。低温(25~30℃)有氧条件下培养可以增强荧光信号^[9,10]。笔者对苏云金芽胞杆菌中 GFP 信号的检测方法进行了初探,并为今后利用 *gfp* 基因作为报告基因,在苏云金芽胞杆菌中构建安全、高效的基因工程菌提供了理论依据,进一步为揭示苏云金芽胞杆菌杀虫机理打下基础。

致谢 美国 Wisconsin-Madison 大学 Handelsman 博士提供部分试验材料。本研究后期工作在荷兰 Leiden 大学分子细胞生物系完成,得到了 Spaink 教授、Brussel、Stuurman 和 Andre 博士热诚的指导与帮助,在此表示衷心感谢!

References

[1] Shimomura O. Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein. *Federation of European Biochemical Societies Letter*.

1979,104:220-222.

- [2] Ward W W, Cody C W, Hart R C, Cormier M J. Spectrophotometric identity of the energy transfer chromophores in *Renilla* and *Aequorea* green-fluorescent protein. *Photochemistry and Photobiology*, 1980, 31:611-615.
- [3] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward W W, Prasher D C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, 263:802-805.
- [4] Webb C D, Decatur A, Teleman A, Losick R. Use of Green Fluorescent Protein for visualization of cell-specific gene expression and sub-cellular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177:5906-5911.
- [5] Dunn A K, Handelsman J. A vector for promoter trapping in *Bacillus cereus*. *Gene*, 1999, 226:297-305.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [7] 李林,杨超,刘子铎,李阜棣,喻子牛. 苏云金芽胞杆菌无晶体突变株的逐级升温筛选及其转化性能. *微生物学报*, 2000, 40(1):85-90.
Li L, Yang C, Liu Z D, Li F D, Yu Z N. Screening of acrySTALLIFEROUS mutants from *Bacillus thuringiensis* and their transformation properties. *Acta Microbiologica Sinica*, 2000, 40(1):85-90. (in Chinese)
- [8] Ogawa H, Inouye S, Tsuji F, Yasuda K, Umeson K. Localization, trafficking and temperature dependence of the *Aequorea* green fluorescent protein in cultured vertebrate cells. *Proceeding of National Academy of Science USA*, 1995, 92:11899-11903.
- [9] Heim R, Prasher D C, Tsien R Y. Wavelength mutations and post-translational autooxidation of green fluorescent protein. *Proceeding of National Academy of Science USA*, 1994, 91:12501-12504.
- [10] 马立新,史巧娟,周俊初,陈华葵. 以绿色荧光蛋白基因为报告基因的广宿主启动子探针载体的构建和应用. *微生物学报*, 1999, 39(5):408-415.
Ma L X, Shi Q J, Zhou J C, Chen H K. Construction of a GFP broad-host-range promoter-probe vector and its application. *Acta Microbiologica Sinica*, 1999, 39(5):408-415. (in Chinese)

(责任编辑 王红艳)