

绿色荧光蛋白和潮霉素抗性双标记载体转化草酸青霉菌 P8 的研究

张 磊¹ 范丙全^{2*} 黄为一¹

(¹ 南京农业大学生命科学院 南京 210095)

(² 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所 北京 100081)

摘 要 草酸青霉菌 P8 (*Penicillium oxalicum*) 溶磷菌株具有较强的溶解多种无机难溶磷的能力和促进作物生长的作用。为研究 P8 在作物根际的定殖状况, 用携带加强型绿色荧光蛋白和潮霉素抗性的双标记载体转化溶磷青霉菌 P8 的原生质体, 筛选出稳定、高效表达 GFP 并对潮霉素产生抗性的转化菌株, Southern 杂交分析结果显示, 外源质粒 DNA 是以非同源重组方式整合到转化菌株基因组染色体上。试验证明转化菌株的形态学特征和溶磷能力与野生型菌株无明显差别。

关键词 草酸溶磷青霉菌 P8 转化 绿色荧光蛋白(GFP) 潮霉素磷酸转移酶基因(*hph*)

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)06-0842-04

Spelling 等^[1]首次报道用 GFP 标记植物致病菌 *Ustilago maydis*, 借助激光共聚焦显微镜原位观察研究 *U. maydis* 的定殖、增殖及与作物的互作关系, 随之 GFP (Green Fluorescent Protein) 成为土壤微生物的生态学研究的一个有效工具。国内外已见大量报道用 GFP 标记生防菌、植物致病菌及内生菌利用激光共聚焦扫描显微镜监测目标菌在施入土壤后的分布、存活状态及其与作物的互作形式。Elbeltagy 等^[2]用 GFP 标记固氮细菌 *Herbaspirillum* sp., 通过原位观察研究 *Herbaspirillum* sp. 在不同基因型水稻根际的定殖能力, 发现 *Herbaspirillum* sp. 在两种基因型水稻根际定殖的菌体数量有很大差异。Nomander 等^[3]利用 GFP 标记的 *P. fluorescens* 菌株 DR54-BN14 接种生长在不同土壤中的燕麦植株, 用激光共聚焦显微镜原位检测了标记菌在燕麦根际的定殖、生长与分布状况。Unge 等^[4]构建 *gfp-luxAB* 双标记系统, 分别转化假单胞菌和大肠杆菌, 接种土壤 30d 后检测 GFP 标记细胞仍有较高数量, 但发光酶活性由于营养条件限制而缓慢下降。Yeoung 等^[5]用 GFP 基因标记生防菌 *Trichoderma harzianum* 研究其在土壤中的活性和定殖状况, 结果表明 *T. harzianum* 在土壤中能生存并繁殖。Mette^[6]用 GFP 基因标记生防真菌 *Clonostachys rosea* 研究了转化菌在引入土壤后的定殖和生长动态, 研究发现 *C.*

rosea 在土壤中主要以孢子形态存在, 在营养丰富的根际能观察到萌发的菌丝和新生的孢子。国内对应用 GFP 标记微生物研究其定殖也见报道, 但是以 GFP 标记丝状真菌仍未见报道^[7,8]。

迄今, 应用 GFP 标记溶磷菌株以研究其在作物根的定殖还未见报道, 本试验旨在用 GFP 和潮霉素抗性的双标记载体标记草酸青霉菌 P8 溶磷菌株, 筛选稳定、高效表达 GFP 并对潮霉素产生抗性的双标记转化菌株, 为应用激光共聚焦显微镜原位观察研究其在作物根际的空间分布、繁殖和存活能力奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 草酸青霉菌 P8 (*Penicillium oxalicum*) 由中国农业科学院土壤肥料研究所范丙全^Δ 分离。穿梭质粒 phyEGFP 由本课题组构建的双标记真核表达载体, 在 GPI (3-磷酸甘油醛脱氢酶) 启动子和 *TrpC* 终止子 (均来源于构巢曲霉) 表达信号的调控下表达加强型绿色荧光蛋白 (EGFP, 激发峰 488nm, 发射峰 507nm) 和潮霉素磷酸转移酶融合蛋白^[9]。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 保藏和扩增质粒, 含 50 μ g/mL 氨苄青霉素的液体 LB 培养基 37 $^{\circ}$ C 过夜培养细菌。

基金项目: 国家自然科学基金(30270048)

* 通讯作者。Tel 86-10-68918683; Fax 86-10-68918636; E-mail: bqfan@caas.ac.cn

作者简介 张 磊(1975-) 女, 黑龙江人, 硕士研究生, 从事微生物学研究。E-mail: zhanglei_75@163.com

收稿日期 2005-03-07, 修回日期 2005-07-09

^Δ范丙全. 北方石灰性土壤中青霉菌 P8 (*Penicillium oxalicum*) 活化难溶磷的作用和机理研究. 2001, 博士论文.

1.1.2 试剂 :纤维素酶、蜗牛酶及其他生化试剂均购于北京经科生物公司,潮霉素 B 和氨苄青霉素购于上海 Sangon 公司,地高辛标记和检测试剂盒为 Roche 公司产品。

1.2 DNA 的操作

采用碱裂解法小量提取质粒,质粒的提取和纯化的具体操作步骤参考文献 [10]。青霉菌原生质体的制备和转化参考文献 [3] 和 [8] 进行。

1.3 选择稳定转化菌株

以 PDA 平板和含 $150\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B 的 PDA 平板交替转接筛选稳定转化菌株。先在有压力的培养基平板上转接,间隔为 3d,每次挑单菌落的菌丝和孢子在荧光显微镜下观察,选择荧光强度高的菌落再次转接,连续转接 5 次后,将孢子转接到不含潮霉素 B 的 PDA 平板上,按上述方法继续转接 5 次后,用 PDA 试管转接单菌落孢子,培养 40d 后,荧光显微镜观察菌体荧光并用含潮霉素 B 的培养基检测转化菌株的稳定性。

1.4 野生型菌株和转化菌株的 Southern 杂交检测

青霉菌全基因组提取参考文献 [11];选择在重组质粒上无酶切位点的 *Bst*X I 酶切全基因组,以 GFP 基因和潮霉素磷酸转移酶基因序列为模板制备地高辛标记探针,杂交和检测方法参照试剂盒说明书进行。

1.5 野生型菌株与转化菌株形态学特征和溶磷能力的比较

在液体 PDA 中培养了 10h 的野生型菌株孢子和一株转化菌株的孢子,转接在 PDA 平板培养基上 30°C 培养 8d。接种后第 4d、6d、8d 测量菌落直径,观察菌落外观、菌丝生长状况和孢子产量,并观察菌丝形态差异。

分别在含有 $5\% \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 和 CaHPO_4 的改良 Picovoskaya 平板^[12]上接种野生型青霉菌 P8 和一株转化菌株,接种后第 6 天测定菌落直径和溶磷圈直径。比较二者在固体培养基中的溶磷能力的差别,考察青霉菌 P8 基因标记后溶磷能力的变化情况。

1.6 数据统计分析

应用 Olympus IX71 荧光显微镜观察标记菌株,用 SAS 软件进行数据统计分析。

2 结果和分析

2.1 筛选稳定转化菌株

培养 5d 后既可观察到转化后的原生质体再生菌落。菌落直径大小不一,个别菌落在同一个菌落

上生长并不相同。选择不同形态再生菌落挑取菌丝和孢子制成水压片,在荧光显微镜下观察(488nm 激发)发现并不是所有菌落的菌丝都产生绿色荧光,产生绿色荧光的菌丝生长健壮,细胞质在菌丝体中分布均匀,菌落外观表现为菌落直径大,产生孢子多。有些菌落长势较弱,菌丝在 488nm 激发下不产生绿色荧光,将其转接至含有潮霉素 B 的培养基上不再生长。

选择 20 个菌体产生荧光的再生菌落,筛选稳定转化菌株。经过有/无抗生素压力的固体培养基转接 10 次,有 5 株转化菌株在连续转接中镜检荧光强度无明显变化,对潮霉素 B 的抗性能力一直没有减弱,命名为 P8-a、P8-b、P8-c、P8-d、P8-e。

2.2 杂交结果分析

为进一步分析质粒在宿主 P8 内的去向,通过 Southern 杂交分析稳定转化菌株的外源质粒是否融合到基因组 DNA 上,并初步判断质粒的拷贝数。

未经酶切的转化菌株 DNA 的杂交结果(图版 I -A-a)表明,野生型菌株 DNA 无杂交信号,说明野生型菌株基因组与 *gfp* 基因和 *hph* 基因无同源序列,转化菌株均能在总 DNA 条带处形成一条杂交条带,无其他杂交信号,说明外源质粒整合到基因组上,染色体外无游离质粒存在;虽然上样量相同,但各个转化菌株的杂交信号强度却不相同。总体看,杂交信号强的 P8-b 在 488nm 荧光激发下表现出更高的荧光强度。经 *Bst*X I 酶切的 DNA 杂交结果(图版 I -A-b)表明,质粒在基因组中融合的部位不同,转化质粒在基因组中的整合具有一定的随机性,表明质粒是以非同源重组的方式融合到染色体基因组上。

2.3 转化菌株融合蛋白的表达

5 株转化菌均可以在含 $1\text{mg}/\text{mL}$ 潮霉素 B 的 PDA 培养基上生长良好,在液体和培养基固体上接种转化菌株的孢子,不同培养时间取样,在荧光显微镜下可观察到菌体在整个生长周期高效表达的强绿色荧光(488nm 激发)(图版 I -B)。生成孢子后荧光强度逐渐减弱。

2.4 野生型菌株和转化菌株生理生态学比较

在含有 $150\mu\text{g}/\text{mL}$ 的固体 PDA 培养基上接种野生型 P8 和转化菌株,二者在生长速度、菌落外观及菌丝和分生孢子的显微形态都不见明显差别。

2.5 转化菌株与野生型菌株在固体培养基上的溶磷能力比较

把转化菌株 P8-b 和野生型菌株分别接种到含

Ca₃(PO₄)₂ 和 CaHPO₄ 的改良 Picovoskaya 培养基上培养 6d 后 ,测定菌落直径和溶磷圈直径 ,统计分析二者的菌落直径和溶磷圈直径都不见有显著差异(表 1) 。说明野生型菌株在与标记基因遗传重组后既能高效表达外源基因 ,又不影响其溶磷能力 ,因此可以利用其高效表达的报告基因 GFP 和潮霉素抗性基因跟踪研究溶磷青霉菌 P8-b 的定殖能力。

表 1 草酸青霉菌 P8 和 P8-b 在不同培养基上培养 6d 的菌落直径和溶磷圈直径

Table 1 Halo zone and colony diameter of *Penicillium oxalicum* P8 and P8-b incubation on the different culture medium after 6 days

Strain	Culture medium with Ca ₃ (PO ₄) ₂		Culture medium with CaHPO ₄	
	Colony diameter /mm	Halo zone /mm	Colony diameter /mm	Halo zone /mm
P8	38.6a	48.7a	38.3a	45.1a
P8-b	37.8a	48.7a	37.1a	45.0a

Results are means of five replicates. a : Two results are not significantly different , p < 0.01.

3 讨论

对于以抗生素作为筛选标记的真菌转化体系来说 ,检测受体菌对抗生素的敏感性至关重要 ,实验证明潮霉素 B 对多种真核细胞产生抑制作用^[13]。转化之前 ,检测潮霉素 B 对青霉菌 P8 的孢子和原生质体的抑制作用 ,测得青霉菌 P8 对潮霉素 B 非常敏感 ,在 PDA 固体培养基中加入 100μg/mL 的潮霉素 B 即可完全抑制青霉菌的孢子和原生质体的萌发 ,因此 ,潮霉素 B 可作为 P8 原生质体转化理想的选择性标记。试验中发现 ,如果培养基中的无机盐超过一定浓度 ,青霉菌 P8 对潮霉素 B 的敏感性显著降低 ,表现为原生质体能够在含潮霉素 B 的再生培养基中萌发 ,长出很小的菌落 ,产生少量孢子 ,部分菌丝发生自溶现象。然而青霉菌 P8 原生质体只有在含 0.6mol/L NaCl 的高渗培养基中能达到最大的再生率。如用含无机盐的高渗培养基加入潮霉素 B 作为再生培养基筛选转化子 ,则潮霉素 B 就失去了作为筛选标记的作用。为了克服此矛盾 ,本试验先用不加潮霉素 B 的高渗液体培养基预培养原生质体使其萌发 ,然后再用低渗的双层平板筛选(上层含有潮霉素 B) ,可有效获得转化菌株^[14]。

PEG 介导的遗传转化是目前较常用的丝状真菌转化方法。本研究采用 PEG 介导法用质粒转化溶磷青霉菌 P8 原生质体 ,可获得约 40 个/μg DNA 的再生菌落。但是再生菌落的大小、菌丝形态和孢子生

成量却呈现很大的差别。小部分菌落大 ,孢子丰厚与野生型青霉 P8 的菌落相似 ,荧光显微镜观察菌体可见菌体产生绿色荧光 ,用含潮霉素的平板转接再生菌落 ,在继代培养过程中即保持了潮霉素抗性又产生绿色荧光 ,认为是稳定转化菌株 ,其产生几率约为 15 个/μg DNA ,仅占总体再生菌落的 26.7%。而长势较弱的再生菌落菌体不产生绿色荧光 ,将其转接至含潮霉素 B 的培养基上也不再生长 ,应属于不稳定转化菌株^[15]。Southern 杂交试验表明 ,稳定转化菌株的外源质粒整合到基因组中 ,染色体外并无游离质粒存在 ,因此不难说明正是由于 *gfp* 和 *hph* 基因随染色体的复制而稳定遗传 ,转化菌株才能在继代培养中保持 GFP 活性和潮霉素抗性 ,而如果外源质粒没有整合到基因组中 ,则可能会产生短暂表达潮霉素抗性的不稳定转化菌株。

微生物基因标记的最终目的是获得能高效、稳定表达标记基因且便于分析的标记体。本试验所采用的 EGFP(Enhance Green Fluorescent Protein)加强型绿色荧光蛋白 ,激发峰 488nm ,是野生型 GFP 的激发峰红移的 GFPmut2 型突变体 ,荧光强度是野生型的 35 倍^[16] ,更适合于应用荧光显微镜和激光共聚焦显微镜的 FITC 率光片对 GFP 标记菌的观察分析。所得转化菌株在其整个发育繁殖阶段都能高效表达 GFP 和潮霉素 B 抗性 ,转化菌株的溶磷能力与野生型青霉菌 P8 也未见差别。因此 ,GFP 和潮霉素抗性双标记基因的应用 ,为后续研究中用激光共聚焦显微镜原位观察研究其定殖能力提供了方便而有效的工具。

参 考 文 献

[1] Spellig T , Bottin A , Kahmann R , et al . Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* . *Mol Gen Genet* , 1996 , **252** : 503 – 509 .
[2] Elbeltagy A , Nishioka K , Sato T , et al . Endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp . isolated from wild rice species . *Appl Environ Microbiol* , 2001 , **67** (11) : 5285 – 5293 .
[3] Normander B , Niels B S , Nybroe O , et al . Green fluorescent protein-marked *Pseudomonas fluorescens* : localization , viability , and activity in the natural barley rhizosphere . *Appl Environ Microbiol* , 1999 , **65** (10) : 4646 – 4651 .
[4] Unge A , Tombolini R . Simultaneous monitoring of cell number and metabolic activity of specific bacterial populations with a dual *gfp-luxAB* marker system . *Applied and Environmental Microbiology* , 1999 , **2** : 813 – 821 .
[5] Bae Y S , Knudsen G R . Cotransformation of *Trichoderma harzianum* with β-glucuronidase and green fluorescent protein genes provides a useful tool for monitoring fungal growth and activity in natural soils . *Appl Environ Microbiol* , 2000 , **66** (2) : 810 – 815 .
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

- [6] Lübeck M , Knuderson I M B , Jesen B , *et al.* Gus and GFP transformation of the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726 and the use of these marker genes in ecological studies. *Mycol Res* , 2002 , **106** (7) : 815 – 826.
- [7] 安千里 , 杨学健 , 董越梅 . 用共聚焦激光扫描显微镜观测 GFP 标记的内生固氮菌 *Klebsiella oxytoca* SA2 侵染水稻根 . 植物学报 , 2001 , **43** (6) : 558 – 564.
- [8] 田 涛 , 王 琦 , 梅汝鸿 . 芽孢杆菌绿色荧光蛋白标记及其在小麦体表定殖的初探 . 植物病理学报 , 2004 , **34** (4) : 346 – 351.
- [9] Punt P J , Oliver R P , Dingemense M A , *et al.* Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli* . *Gene* , 1987 , **56** : 117 – 124.
- [10] Sambrook J , Russell D W . Molecular Cloning : A Laboratory Manual . 3rd ed . New York : Cold Spring Harbor Lab (CSHL) Press , 2001 .
- [11] Pikovskaya R I . Mobilization of phosphates in soil in connection with the vital activities of some microbial species. *Mikrobiologiya* , 1948 , **17** : 362 – 370.
- [12] Thrane C , Lübeck M , Green H , *et al.* A tool for monitoring *Trichoderma harzianum* . I : Transformation with the GUS gene by protoplast technology. *Phytopathology* , 1995 , **85** : 1428 – 1432.
- [13] Blochlinger K , Diggelmann H , Hygromycin B . Phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with higher eucaryotic cells. *Molecular and Cellular Biology* , 1984 , **12** : 2929 – 2931.
- [14] Roberts C A , Oliver R P , Punt P J , *et al.* Expression of the *Escherichia coli* β -glucuronidase gene in industrial and phytopathogenic filamentous fungi. *Curr Genet* , 1989 , **15** : 177 – 180.
- [15] Sivan A , Stasz T E , Hemmat M , *et al.* Transformation of *Trichoderma* spp. with plasmids conferring hygromycin B resistance. *Mycologia* , 1992 , **84** : 687 – 694.
- [16] Cormack B P , Valdivia R H , Falkow S . FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). 1996 , *Gene* , **173** : 33 – 38.

Study on transformation of P-dissolving *Penicillium oxalicum* P8 with double-marker vector expressing green fluorescent protein and hygromycin B resistance

ZHANG Lei¹ FAN Bing-quan^{2*} HUANG Wei-yi¹

(¹ Department of Life Science , Nanjing Agriculture University , Nanjing 210095 , China)

(² Soil and Fertilizer Institute , Chinese Academy of Agriculture Sciences , Beijing 100081 , China)

Abstract : P-dissolving *Penicillium oxalicum* P8 was isolated previously in this lab which has a considerable ability to dissolve many kinds of inorganic phosphorus and improve crop growth. In order to study rhizosphere colonization of plants by *Penicillium oxalicum* P8 , protoplasts were transformed with a double-marker expression vector of green fluorescent protein and hygromycin B resistance. Some transformants were selected which expressed both the GFP and hygromycin B phosphotransferase and did not show significant morphological or physiological differences as compared to wild-type strain. Southern blot analysis confirmed the heterogeneous genomic integration of the vector DNA into the transformants.

Key words : *Penicillium oxalicum* P8 , Transformation , Green fluorescent protein gene , Hygromycin B phosphotransferase gene (*hph*)

Foundation item : National Natural Science Fund of China (30270048)

* Corresponding author. Tel 86-10-68918683 ; Fax 86-10-68918636 ; E-mail : bqfan@caas.ac.cn

Received date 03-07-2005