

利用绿色荧光蛋白基因 *gfp* 研究芽胞杆菌的启动子活性

周 琴 孙 明 喻子牛*

(华中农业大学 农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

摘 要 利用绿色荧光蛋白基因 *gfpmut3*, 分别标记苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的 *cry3A* 启动子 P_{cry3A} 、*BtI*-*BtII* 启动子 $P_{BtI-BtII}$ 和来自蜡状芽胞杆菌特异启动子 P_{44-12} 以研究其表达差异。其中 P_{cry3A} 和 $P_{BtI-BtII}$ 分别与 *gfpmut3* 构成融合基因, 以调控 *gfpmut3* 在苏云金芽胞杆菌中的表达。将重组质粒 pGFP-304(含 P_{44-12})、pGFPExpA(含 P_{cry3A} -*gfpmut3* 融合基因)和 pGFPExpB(含 $P_{BtI-BtII}$ -*gfpmut3* 融合基因)分别导入大肠杆菌(*Escherichia coli*)和苏云金芽胞杆菌后发现 P_{44-12} 和 $P_{BtI-BtII}$ 在大肠杆菌与苏云金芽胞杆菌中均可表达 *gfpmut3*, 其中 $P_{BtI-BtII}$ 在大肠杆菌中具有极强的启动基因表达的能力。而 P_{cry3A} 不能启动 *gfpmut3* 在大肠杆菌中表达, 在苏云金芽胞杆菌中启动的 *gfpmut3* 表达的荧光强度也较弱。进一步通过荧光显微镜和生物活性检测器对含重组质粒 pGFP-304、pGFPExpA 和 pGFPExpB 的转化子分别进行荧光检测及微量热检测。结果表明 3 种启动子驱动下的 *gfpmut3* 基因均可在苏云金芽胞杆菌无晶体突变株 BMB171 中表达并检测得到不同的发光类型。微量热法检测发现 P_{44-12} 和 $P_{BtI-BtII}$ 启动 *gfpmut3* 表达的代谢热低于 P_{cry3A} 驱动 *gfpmut3* 表达的代谢热。

关键词 绿色荧光蛋白基因(*gfp*), 苏云金芽胞杆菌, 荧光活性检测, 启动子, 微量热

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2004)04-0543-04

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)作为一种应用最为广泛的杀虫微生物, 已成功地用于防治农业、林业、贮藏物害虫及医学昆虫。近 10 多年来, 随着微生物农药需求量的增大和人类环境保护意识的增强, 生物安全性已越来越引起人们的重视。目前利用 GFP 作为一种新型的标记基因来研究各种生物学现象已成为热点。Dunn 等^[1]通过构建一个以 *gfp* 为报告基因的启动子探针载体而获得一系列组成型和诱导型克隆子, 成功地用于标记番茄幼苗根表面定殖的蜡状芽胞杆菌。周 琴等^[2]也报道了 *gfp* 在苏云金芽胞杆菌中的表达。Ruan 等^[3]报道 苏云金芽胞杆菌中外源基因的表达和它的热动力学曲线有内在关系, 表达的外源基因越多消耗的能量也越多, 向外释放的热量就少。本研究分别选取 3 种来自芽胞杆菌的特异性启动子 P_{cry3A} 、 $P_{BtI-BtII}$ 和 P_{44-12} , 分别启动外源标记基因 *gfp* 的表达。其中非芽胞依赖型启动子 P_{cry3A} 和芽胞依赖型启动子 $P_{BtI-BtII}$ 是目前广泛用于构建苏云金芽胞杆菌工程菌的常用启动子。 P_{44-12} 是在蜡状芽胞杆菌中用于表达外源基因的组成型启动子。通过研究试图找到一种用于苏云金芽胞杆菌中驱动标记基因最优的表达体系, 为进一步构建高效、安全的基因工程菌创造条件。

1 材料和方法

1.1 菌株和培养条件

1.1.1 菌株和质粒 本实验所用菌株和质粒参见表 1。

1.1.2 培养基和培养条件: 大肠杆菌(*Escherichia coli*)采用 LB 培养基^[4], 于 37℃ 培养。苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)用 LB 或 LC 培养基, 于 28℃ 培养。

1.1.3 抗生素和使用浓度: 氨苄青霉素(Amp)100μg/mL, 氯霉素(Cm)10μg/mL, 红霉素(Em)25μg/mL。

1.2 试剂、酶和引物

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

本研究所用 PCR 扩增引物序列由 GENSET OLIGOS 公司或 GIBCO BRL 公司合成。Bt-5 和 Bt-*gfp*-3 用于扩增 *BtI*-*BtII* 启动子片段, Bt-*gfp*-5 和 *gfp*-3 用于扩增含 *gfp* 基因的片段, Bt-5 和 *gfp*-3 用于扩增 *BtI*-*BtII*pro-*gfp* 融合基因片段, 3A-N 和 3A-H 用于扩增 p827-304 中 *cry3A* 启动子片段, 3A-N 和 3A-B 用于扩增重组质粒 pGFPExpA 中 *cry3A* 启动子片段, GFP1 和 GFP1 用于扩增 *gfp* 基因编码序列。

Bt-5 :5'-AACTGCAGGCATGGATAATGGCGAG-3' ;Bt-*gfp*-3 :5'-GTTCTTCTCCCTTACCCATAAGTTACCTCCATCTCTTTTAT-3' ;Bt-*gfp*-5 :5'-ATAAAAGAGATGGAGCTAAGTTATGGGTAAGGGAGAA-GAAC-3' ;*gfp*-3 :5'-CCGGAATTCCCGATGTACT-3' ;3A-N :5'-CAT-GCCATGGTTTTCTTCTCCCTTTCTTATCATAATAC-3' ;3A-H :5'-GGATCCGAAACGTAAGATGAAAC-3' ;3A-B :5'-CGCGGATCCAA-GCTTAATTAAAG-3'。

基金项目 国家自然科学基金(30170032) 国家 863 计划(2003AA214011 和 2003AA23081)

* 通讯作者。E-mail: yz41@public.wh.hb.cn

作者简介 周 琴(1975-)女, 浙江嵊州人, 博士, 主要从事微生物分子生物学研究。E-mail: zhouqin@mail.hzau.edu.cn

收稿日期 2003-09-22, 修回日期 2004-02-17

表 1 供试菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids tested

Strain or plasmid	Characteristics	Source or reference
<i>E. coli</i> DH5α	<i>SupE44 Δ lacU₁₆₉ (Φ80 lacZ ΔM15) Hsd R17 recA1 endA1 gyrA₉₆ thi⁻¹ relA1</i>	This Laboratory
DH5α(pHT3101)	DH5α containing pHT3101	This work
DH5α(pGFP-304)	DH5α containing pGFP-304	This work
DH5α(pAD4412)	DH5α containing pAD4412	This work
DH5α(pGFPExpA)	DH5α containing pGFPExpA	This work
DH5α(pGFPExpB)	DH5α containing pGFPExpB	This work
<i>B. thuringiensis</i> BMB171	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> , H3abc α crystalliferous	This Laboratory
BMB171(pGFP-304)	BMB171 containing pGFP-304	This work
BMB171(pGFPExpA)	BMB171 containing pGFPExpA	This work
BMB171(pGFPExpB)	BMB171 containing pGFPExpB	This work
Plasmid		
pHT304	<i>E. coli</i> - <i>B. thuringiensis</i> shuttle vector , Amp ^r , Erm ^r , 6.5kb	[7]
pHT3101	<i>E. coli</i> - <i>B. thuringiensis</i> shuttle vector , Amp ^r , Erm ^r , 6.7kb	Institut Pasteur [8]
pAD4412	<i>E. coli</i> - <i>B. cereus</i> shuttle vector with <i>gfpmut3</i> gene , Amp ^r , Cm ^r , 9.5kb	[2]
pGFP-304	P ₄₄₋₁₂ - <i>gfpmut3</i> fusion gene , Amp ^r , Erm ^r , 11kb	This work
pGFPExpA	P _{cr3A} - <i>gfpmut3</i> fusion gene , Amp ^r , Erm ^r , 8.5kb	△
pGFPExpB	P _{BtI-BtII} - <i>gfpmut3</i> fusion gene , Amp ^r , Erm ^r , 7.9kb	△

1.3 使用仪器

PCR 仪 : Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cyclcr ;电脉冲仪 : BIO-RAD pulse controller(Gene Pulser™) 荧光显微镜 : Leica MZFLIII (Stereo Fluoresence Microscope);显微成像系统 : SONY 3CCD Color Video Camera/CCD-IRIS ;生物活性检测器 : LKB-2277 热动力学检测记录仪 LKB-2210.

1.4 质粒 DNA 的分离和重组质粒的构建

苏云金芽胞杆菌质粒提取采用碱变性法 ,菌体培养至对数期 ,溶液 I 重悬菌体时加入溶菌酶(终浓度 1mg/mL),于冰上放置 1 ~ 2h. 重组质粒的构建参照文献 [4] 的方法进行.

1.5 重组质粒的转化和质粒稳定性检测

大肠杆菌的常规转化采用氯化钙法^[4] ,苏云金芽胞杆菌采用电转化法^[5].

将待测菌株在 LB 液体摇瓶培养 24h ,每 8h 按 1 : 1000 接种量转至新鲜 LB 液体培养基 ,其细菌传代数为 40 代以上^[6]. 梯度稀释后涂布 LA 平板 ,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 LA 平板观察其抗性是否丢失 ,鉴定其复制子在无抗性选择压力下的遗传稳定性.

1.6 供试菌发光特性和荧光强度的检测

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.

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

1.7 供试菌株微量热动力学的检测

安瓿瓶法热动力学检测 :将供试菌株接种于新鲜 LB 液体培养基中 ,28℃ 培养过夜活化. 挑一接种环菌液接种于装

有 5mL 新鲜 LB 培养基的无菌安瓿瓶中 ,将接过菌的安瓿瓶置于热动力学检测器中 ,预热 30min 得到稳定基线后 ,自动记录仪开始记录样品生长的产热数据和产热曲线 ,待样品培养到记录笔回到基线 ,实验结束.

2 结果和分析

2.1 重组质粒 pGFP-304、pGFPExpA 和 pGFPExpB 的构建

从质粒 pAD44-12 上酶切回收约 4.5kb 的 *Eco*RI-*Hind* III 片段 (包括 3.6kb 启动子和 0.9kb 的 *gfpmut3* 基因)克隆到苏云金芽胞杆菌-大肠杆菌穿梭载体 pHT304 上 ,获得 *gfp* 在苏云金芽胞杆菌中的表达载体 pGFP-304. 利用重叠引物剪切术 (Splicing by overlap extension ,SOE) ,设计 *cr3A*、*Bt* I -*Bt* II 特异启动子片段和 *gfpmut3* 的扩增引物 ,将 *cr3A* 启动子和 *Bt* I -*Bt* II 启动子分别与 *gfpmut3* 进行融合 ,经穿梭载体克隆后 ,电转化至苏云金芽胞杆菌受体菌 BMB171 中.

2.2 转化菌株的筛选

用电转化的方法将重组质粒 pGFPExpA、pGFPExpB 和 pGFP-304 分别导入受体菌 BMB171 后从抗性平板中筛选转化子 ,并提取质粒进行酶切验证. 初筛结果表明 3 种重组质粒已成功地转入苏云金芽胞杆菌受体菌 BMB171 中.

2.3 质粒遗传稳定性检测

携带质粒 pGFP-304、pGFPExpA 和 pGFPExpB 的重组菌株 BMB171 在无抗性 LB 液体培养基中传 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. 表明这 3 种重组质粒均能在受体菌中稳定遗传.

2.4 转化菌株的荧光显微观察

将上述 3 个转化菌株分别用 LC 液体培养基培养 20 ~ 24h 后取样用荧光显微镜观察. 结果发现 GFP 基因在重组菌 BMB171 中均能表达 (图 1) ,同步生长的菌体其发光强度是一

致的 随着菌体的生长 ,GFP 基因不断积累而表达 ,所以荧光强度与菌体培养时间是相关的。GFP 基因既能在营养体细胞中的表达 ,也可以在芽胞形成时期表达。

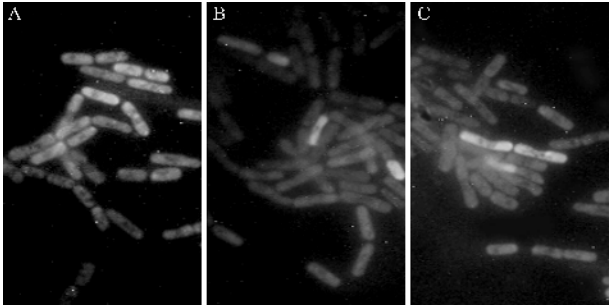


图 1 GFP 基因在苏云金芽胞杆菌 BMB171 中的表达
Fig.1 Expression of *gfpmut3* in *Bacillus thuringiensis* BMB171
A. Expression of *gfpmut3* in recombinant strain BMB171(pGFP-304) of *B. thuringiensis*; B. Expression of *gfpmut3* in recombinant strain BMB171(pGFPExpA) of *B. thuringiensis*; C. Expression of *gfpmut3* in recombinant strain BMB171(pGFPExpB) of *B. thuringiensis*.

2.5 供试菌株 GFP 基因表达的时序检测

在荧光显微镜下观察不同培养时期相同光密度的苏云金杆菌群体细胞(图 2),发现转化子 BMB171(pGFP-304)从培养 2h 起就可检测到绿荧光,随着时间的延长而增大,在培养至 8~9h 时荧光强度达到最大值,故其荧光强度与菌体培养时间成正比。BMB171(pGFPExpA)在培养至 2h 后开始检测,但其荧光强度一直维持较低的水平。而转化子 BMB171(pGFPExpB)则在培养至 8h 后的荧光强度最高,此后一直维持在该水平。

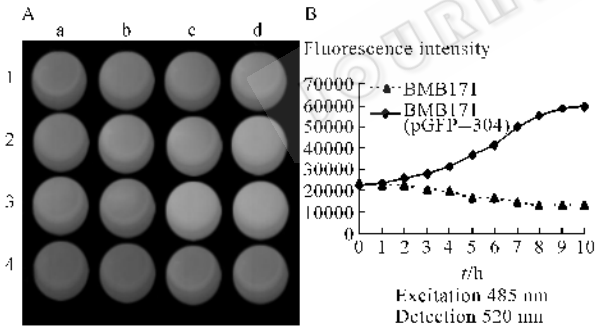


图 2 GFP 基因在苏云金芽胞杆菌转化菌株中的时序表达及荧光强度
Fig.2 Time-course detection and fluorescence intensity of GFP gene expression in *B. thuringiensis* transformants
A: 1. Cells of strain BMB171(pGFPExpA); 2. Cells of strain BMB171(pGFPExpB); 3. Cells of strain BMB171(pGFP-304); 4. Cells of strain BMB171. a: 2h culture; b: 4h culture; c: 6h culture; d: 8h culture.
B: Average fluorescence intensity over time for strains BMB171 and BMB171(pGFP-304).

2.6 供试菌株微量热动力学的检测分析

采用安瓿瓶法将含不同启动子表达载体的受体菌进行微量热动力学检测。分析表 2 中的微量热动力学数据可知含芽胞依赖型启动子 $P_{Btl-BtlII}$ 驱动 *gfp* 表达的 BMB171(pGFPExpB)代谢热低于非芽胞依赖型启动子 P_{cry3A} 启动的 BMB171(pGFPExpA),而 BMB171(pGFPExpA)和 BMB171(pGFPExpB)

的差别仅在于二者表达载体的启动子不同,故导致代谢热差距的主要原因是启动子不同。即芽胞依赖型启动子 $P_{Btl-BtlII}$ 启动效果高于非芽胞依赖型启动子 P_{cry3A} 的启动效果。结果还表明 BMB171(pGFP-304)的代谢热与 BMB171(pGFPExpB)相当。

表 2 供试菌株的微量热动力学参数

Table 2 Thermokenetic parameters of strains tested

Strain	Log phase		Sporulation		Area	Q_{total}/J	Promoter
	P_{max}/mW	t_{max}/min	P_{max}/mW	t_{max}/min			
BMB171(pGFPExpA)	0.229	310	0.4937	2679	1181.4614	70.887	P_{cry3A}
BMB171(pGFPExpB)	0.2206	413	0.5677	2033	1134.5555	68.0733	$P_{Btl-BtlII}$
BMB171(pGFP-304)	0.2269	373	0.5142	2196	1135.033	68.102	P_{44-12}

3 讨论

Agaisse 和 Lereclus^[9]对非芽胞依赖型启动子 P_{cry3A} 的研究发现,*cry3A* 基因的表达需要 635bps 的启动子序列,按功能可将该启动子序列分为上游区、中间序列和下游区共 3 部分。启动子的缺失实验和其它相关实验结果表明, σ^A 因子在芽胞形成前期激活上游区启动子,从 -558 位开始 mRNA 的转录,形成的 T-558 mRNA 经剪切形成稳定的 T-129 mRNA。启动子的中间序列没有编码调控蛋白,该区段的缺失对 *cry3A* 的充分表达没有明显影响,但可能对 *cry3A* 的表达起负调控作用。启动子的下游区并不具备转录为相应 mRNA 的功能,可能对 T-129 mRNA 的半衰期具有重要作用。本研究中由于酶解位点的限制,以 *Cry3A* 蛋白的起始密码子为 +1 位,取 -1 位到 -568 位的 *cry3A* 启动子序列与 *gfp* 基因形成融合基因,在苏云金芽胞杆菌中表达的 GFP 蛋白荧光强度较弱。推测由于缺失了 *cry3A* 启动子上游区的 -35 区,仅保留了 -10 区。

属于双重叠启动子的 $P_{Btl-BtlII}$,其启动子上游的序列中包含丙酮酸脱羧酶 E2 蛋白的结合位点和一段对基因表达具有负调控作用的序列^[10]。因此本研究在扩增 183bps 的 *Btl-BtlII* 启动子片段时,仅保留了核糖体结合位点部分,*Btl* 启动子的 -10 区和 -35 区,*BtlII* 启动子的 -10 区和 -35 区以及两启动子的转录起始位点。与 *gfp* 基因形成融合基因后, σ^{35} 因子在芽胞形成前期识别 *Btl* 启动子,启动 *gfp* 基因 mRNA 合成,而 σ^{28} 因子则在芽胞形成后期识别 *BtlII* 启动子,启动 *gfp* 基因的转录。与 P_{cry3A} -*gfpmut3* 融合基因在苏云金杆菌中的表达一样, $P_{Btl-BtlII}$ -*gfpmut3* 融合基因的表达也受到苏云金杆菌细胞中其它调控系统及蛋白酶活性的影响,最终 GFP 蛋白仅在营养生长期和芽胞形成前期的细胞中含量较高。Park 等^[11]的研究结果显示,在苏云金芽胞杆菌中, $P_{Btl-BtlII}$ 的活性较 P_{cry3A} 高。*Cry3A* 基因在 $P_{Btl-BtlII}$ 启动下的表达量比在 P_{cry3A} 启动下的单拷贝的 *cry3A* 基因表达量高 12.7 倍,比含 2~3 个拷贝的 *cry3A* 基因表达量高 1.4 倍。本研究也再次验证了这一结论,在荧光显微镜下,同等条件下的转化 BMB171(pGFPExpB)

比 BMB171(pGFPExpA) 显示出更强的绿色荧光。

来自蜡状芽胞杆菌特异启动子 44-12 是 Dunn 等^[2]通过鸟枪克隆法, 构建以 *gfp* 为报告基因的启动子探针载体而获得的组成型克隆子筛选而来。由于蜡状芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌有着极高的同源性, 故选取它作为一类组成型表达的启动子应用于苏云金芽胞杆菌, 研究结果表明它可以驱动异源蛋白在苏云金芽胞杆菌中表达, 甚至比非芽胞依赖型启动子 *cry3A* 效率要高, 与芽胞依赖型启动子 *BtI-BtII* 效率相当。但由于其大小约为 3.6kb, 在基因操作上稍有不便, 需改造后可更加方便的为人们所利用。

致谢 Wisconsin-Madison 大学 Jo Handelsman 博士、新加坡国立大学张炼辉博士提供部分实验材料, 本研究部分工作在荷兰 Leiden 大学完成。

参 考 文 献

- [1] Dunn A K, Handelsman J. A vector for promoter trapping in *Bacillus cereus*. *Gene*, 1999, **226**: 297-305.
- [2] 周 琴, 孙 明, 周俊初, 等. 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. 中国农业科学, 2003, **8**: 981-984.
- [3] Ruan L, Liu Y, Gao Z, et al. Microcalorimetric study on expression of foreign genes in *Bacillus thuringiensis*. *J Thermal Analysis and Calorimetry*, 2002, **70**: 521-525.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

- [5] 李 林, 杨 超, 刘子铎, 等. 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.
- [6] Sanchis V, Agaisse H, Chauvaux J, et al. A recombinase-mediated system for elimination of antibiotic resistance gene markers from genetically engineered *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 779-784.
- [7] Arantes O, Lereclus D. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene*, 1991, **108**: 115-119.
- [8] Lereclus D, Arantes O, Chauvaux J, et al. Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett*, 1989, **60**: 211-218.
- [9] Agaisse H, Lereclus D. Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis cryIIIA* toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and is increased in a *spo0A* mutant. *J Bacteriol*, 1994, **176**: 4734-4741.
- [10] Cheng P, Wu L, Yu Z, et al. Subspecies-dependent regulation of *Bacillus thuringiensis* protoxin genes. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 1849-1853.
- [11] Park H W, Ge B X, Baner L S, et al. Optimization of *Cry3A* yields in *Bacillus thuringiensis* by use of sporulation-dependent promoters in combination with the STAB-SD mRNA sequence. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 3932-3928.

Studies on The Activities of Promoters of *Bacillus* Using Green Fluorescent Protein Gene

ZHOU Qin SUN Ming YU Zi-Niu

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

Abstract: Three kinds of promoters from *Bacillus* (P_{44-12} , P_{cry3A} and $P_{BtI-BtII}$) were chosen to drive the expression of *gfp-mut3* gene and were cloned into shuttle plasmids. Three recombinant plasmids of pGFP-304, pGFPExpA and pGFPExpB obtained were transformed into recipient strains of *Escherichia coli* DH5 α and *Bacillus thuringiensis* BMB171 by electroporation. The results showed that *gfp-mut3* gene driven by P_{cry3A} could only express in BMB171. The $P_{BtI-BtII}$ was found to show strong green fluorescence not only in BMB171 but also in DH5 α . The activities of P_{cry3A} in recipient strains were much weaker than that of P_{44-12} and $P_{BtI-BtII}$. Fluorescent intensities of BMB171(pGFP-304), BMB171(pGFPExpA) and BMB171(pGFPExpB) were detected by using fluorescent microscope and bioactivity monitor. The results showed that *gfp-mut3* gene could be expressed by three kinds of promoters. Thermogenic curves and the results of metabolism heat output revealed that the heat output of BMB171(pGFP-304) and BMB171(pGFPExpB) were less than that of BMB171(pGFPExpA).

Key words: Green fluorescent protein gene (*gfp*), *Bacillus thuringiensis*, Fluorescent activities detection, Promoter, Microcalorimetry

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation (30170032); Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2001AA212301)

* Corresponding author. E-mail: yz41@public.wh.hb.cn

Received date: 09-22-2003