

以绿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*

马立新** 史巧娟 周俊初*** 陈华癸

(农业部农业微生物重点实验室 华中农业大学 武汉 430070)

摘 要 将以绿荧光蛋白基因(*gfp*)的 cDNA 为模板,用人工合成引物经 PCR 扩增获得的 0.9kbDNA 片段克隆到表达载体 pET-11C 上构建成 *gfp* 表达载体 pHN115。从 pHN115 上切下的不含启动子,但保留了 SD 序列的 *gfp* 基因经克隆载体 SK(+)和 pIJ2925 亚克隆后再克隆到广谱稳定性质粒 pTR102 上构建成广谱、稳定、可视的启动子探针载体 pHN127。并用它从费氏中华根瘤菌 HN01 的总 DNA 中成功地钓出组成型和诱导型表达的启动子。

关键词 绿荧光蛋白基因(*gfp*),费氏中华根瘤菌,启动子探针载体

分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)05-0408-415

绿色荧光蛋白(GFP)是 Morse 等^[1]在研究水母生物萤光现象时首先报道的。其后 Shimomura^[2]和 Ward 等^[3]相继对 GFP 的结构和功能进行了较详尽的研究,证实它是分子量为 30kD 的单体发光蛋白,受 395nm 近紫外光或(470nm)蓝色光激发后,在 Ca²⁺催化下,能发出波长为 510nm 的绿色荧光。该作用不需要酶参与,也不需作用底物,发光蛋白对细胞没有毒性、结构稳定、作用持久,可以在活体组织、细胞内部以及经甲醛等固定后的组织切片标本上直接检测。

Prasher 等^[4]从多管水母(*Aequorea victoria*)的 cDNA 文库中用人工合成的绿色荧光蛋白基因 *gfp* 的 5'寡核苷酸为探针筛选出编号为 *gfp*10 的阳性克隆。1994 年 2 月,美国的 Chalfie 等^[5]首次报道分别用 T₇ 启动子和 *mec-7* 启动子成功地使 *gfp* 作为报告基因在 *E. coli* 和线虫等两个异源宿主表达。

启动子探针载体是分离和测定启动子效率的主要工具,通常借助于易检测的报告基因来完成。在细菌研究中目前常用的报告基因主要有抗性基因和非抗性基因。但不论抗性基因或非抗性基因标记方法本身都存在一定局限性。而且,传统细菌启动子探针载体的不足之处还表现在宿主范围窄和稳定性不高。为此,以 *gfp* 为报告基因并选择适用于 G⁻细菌的广谱稳定性质粒 pTR102 为载体来构建广宿主、稳定和可视的启动子探针载体,并将其应用于大豆根瘤菌启动子的分离与克隆。

1 材料和方法

1.1 菌株和培养条件

1.1.1 菌株与质粒,实验用菌株和质粒见表 1。

* 本研究受国家 863 高技术研究发展计划(No. 863-101-03-03-7)和国家自然科学基金课题资助(No. 39770013)

现在湖北大学生命科学院工作 *联系作者

收稿日期:1997-12-22,修回日期:1998-04-20

表 1 供试菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids tested

供试菌株或质粒 Strain or plasmid	基因型或表型 Genotype or phenotype	来源或参考文献 Source or reference
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 hsdR17 ΔlacU169 <i>reaA1 endA1</i> , <i>gryA96 thi-1 relA1</i></i>	本室保存 This laboratory
BL21(DE3)	<i>hsd5 galcIts857 ind1 sam7</i> , <i>nin5 lacUVs-T7 gene1</i>	[6]
费氏中华根瘤菌		
<i>Sinorhizobium fredii</i> HN01	Nod ⁺ ,Fix ⁺	本室保存 This laboratory
质粒 plasmid		
pAC- <i>gfp</i>	克隆有 <i>gfp</i> cDNA 的杆状病毒转移载体 ,Ap ^r	武汉大学 齐义鹏教授 Wuhan University
SK(+)	克隆载体 ,Ap ^r	本室保存 This laboratory
pET-11C	表达载体 ,Ap ^r	[6]
pIJ2925	衍生于 pUC19 的克隆载体 Ap ^r	本室保存 This laboratory
pTR102	广谱性稳定载体 , <i>mob</i> ⁺ , <i>tra</i> ⁻ ,Ap ^r ,Tc ^r	[7]
pBR322	克隆载体 ,Ap ^r ,Tc ^r	本室保存 This laboratory
pRK2013	协助质粒 <i>mob</i> ⁻ , <i>tra</i> ⁺ ,Km ^r	[8]
pHN114	SK(+)上克隆有 <i>gfp</i> 的 cDNA	本研究 This work
pHN115	pET-11C 上克隆有 <i>gfp</i> 的表达载体	本研究 This work
pHN116	SK(+)上携带有 pHN115 上的 <i>gfp</i> (去掉了 Φ 10 启动子)	本研究 This work
pHN117	pIJ2925 携带有 pHN116 上的 <i>gfp</i>	本研究 This work
pHN127, pHN128	pTR102 上携带有来源于 pHN117 的 <i>gfp</i> ,两者的插入方向相反	本研究 This work
pHN129	pHN127 上克隆有来源于 pBR322 的具双向 启动子活性的 670bp 的 <i>Sau</i> 3AI DNA 片段	本研究 This work

1.1.2 培养基与培养条件 :大肠杆菌采用 LB 培养基 ,于 37℃ 下培养。根瘤菌采用 TY 或 SM 培养基 ,于 28℃ 下培养。BL21(DE3)(pHN115)的诱导表达见文献 [6]

1.1.3 抗生素及使用浓度 :四环素(Tc)为 20 μ g/mL ;卡那霉素(Km)为 50 μ g/mL ;氨基青霉素(Ap)为 100 μ g/mL。

1.2 试剂和酶

DNA 片段回收试剂盒购自 Clontech 公司。IPTG 和 X-gal 购自 Sigma 公司。M13 正反向引物购自 Promega 公司。限制性酶、碱性磷酸酶和 Taq 酶等购自 Bio-Rad、Promega、Gibco/BRL 等公司。

1.3 PCR 扩增

引物序列 P gfp (GAATAAAAGCTAGCAAAGATGAGTAAAG)由 Sangon 公司合成 ,分别与 M13 的正向、反向引物配对。PCR 扩增程序为 95℃ 2 min、40℃ 1 min、65℃ 1 min 后 ,94℃ 1 min、52℃ 1 min、72℃ 1 min 共 30 个循环后于 72℃ 维持 8 min。PCR 反应体积 50 μ L ,内含模板 DNA 5 μ L ,引物各 25pmol 和 TaqDNA 聚合酶 2u。

1.4 DNA 的分离及操作

根瘤菌总 DNA 的分离参见 Long 等^[9]的方法。质粒抽提、酶切、去磷酸化、连接和转化等一系列克隆操作参照 Sambrook 等^[10]的方法。

1.5 接合转移

采用三亲本滤膜杂交法^[11]。

1.6 大豆种子提取物的制备

参照 Mulligan 等^[12]的方法。

1.7 荧光检测与照相

用 Fotodyne 在 360nm 的长波紫外光照射下检测菌落和菌液荧光。用日立 RF-5000 型荧光分光光度计测定其激发光谱、发射光谱与不同启动子的相对强度。用彩色摄影记录菌体绿色荧光时,选用绿色滤光片。

2 结果

2.1 绿荧光蛋白基因在大肠杆菌中的表达

2.1.1 *gfp* 表达载体的构建 用 *EcoRI* 酶切载体 *pAC-gfp*, 回收约 0.9kb 的片段, 插入到 SK(+) 的 *EcoRI* 位点, 得到重组质粒 pHN114 并经酶切鉴定(图 1)。然后以合成引物 P*gfp* 与 M13 的正向、反向引物分别组成引物对, 以 pHN114 为模板进行 PCR 扩增, 结果只有 P*gfp* 与 M13 的反向引物对扩增出了 0.9kb 的片段。PCR 产物经 *EcoRI* 和 *NheI* 双酶切后, 插入到经相同双酶切的表达载体 pET-11C, 得到的重组质粒 pHN115 经 *EcoRI* 和 *NheI* 消化证实含有 0.9kb 的片段(图 2)。*gfp* 表达载体 pHN115 的构建过程见图 3。

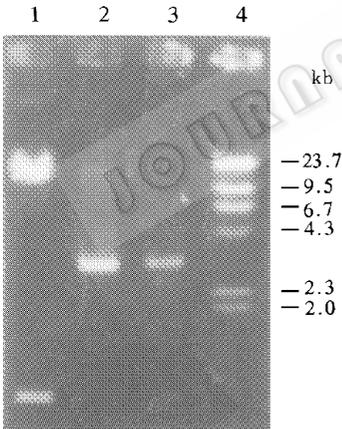


图 1 重组质粒 pHN114 的酶切鉴定

Fig. 1 Electrophoresis identification of HN114 by the method of enzyme digestion

1. pAC-*gfp*/*EcoRI* ; 2. SK(+) *EcoRI* ;
3. pHN114/*EcoRI* ; 4. λ DNA/*Hind*III.

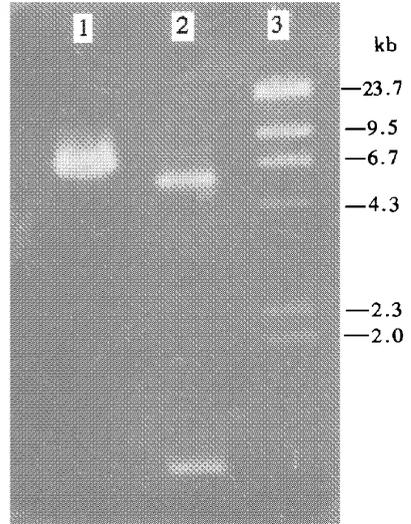
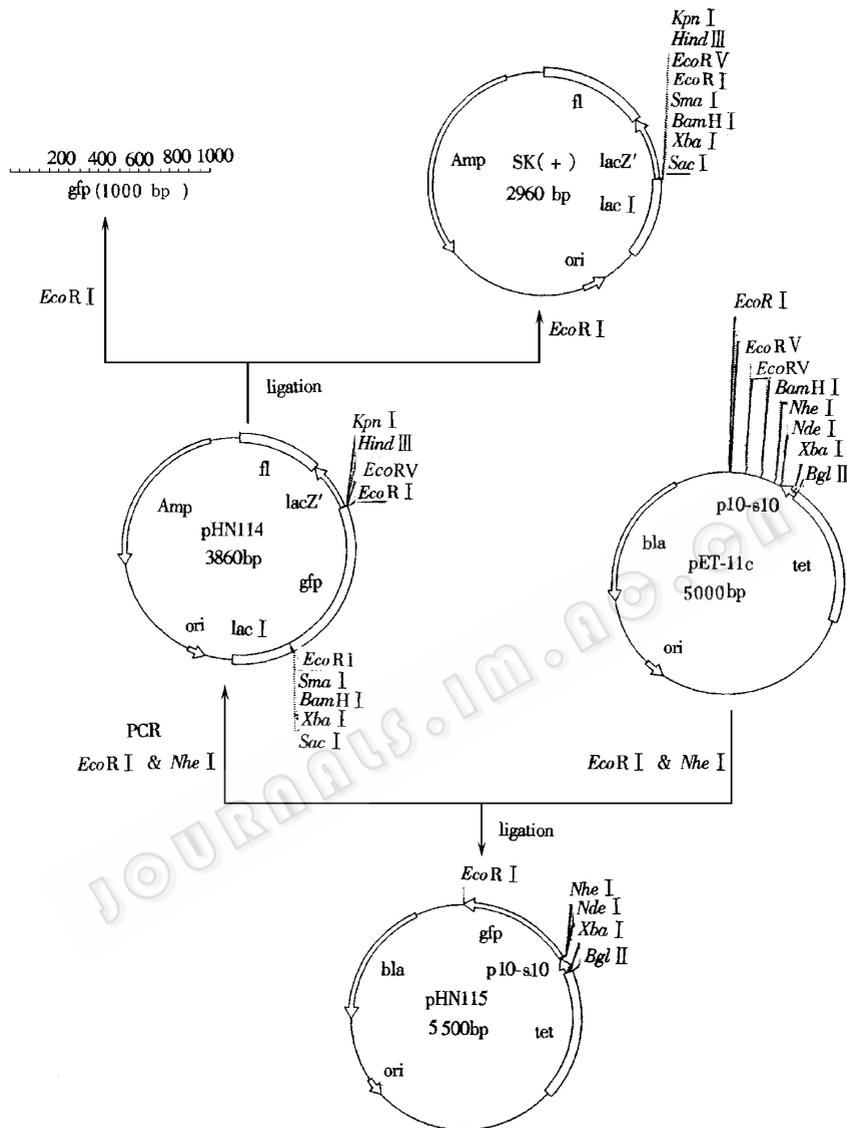


图 2 重组质粒 pHN115 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pHN115 by the method of enzyme digestion

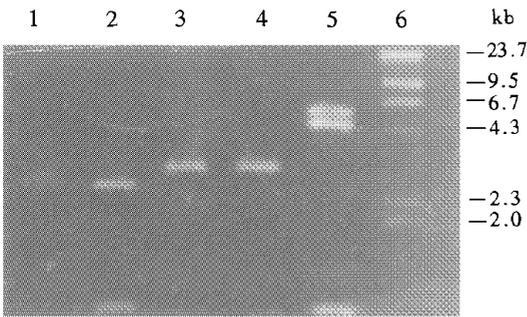
1. pET-11C/*EcoRI* + *Xba*I ;
2. pHN115/*EcoRI* + *Xba*I ; 3. λ DNA/*Hind*III.

图3 *gfp* 表达载体 pHN115 的构建Fig. 3 Construction of the *gfp* expression vector pHN115

2.1.2 *gfp* 在 BL21(DE3) 中的表达 将用 pHN115 转化 BL21(DE3) 得到的转化子接 LB + Ap 液体培养基 经 37°C 摇瓶培养至对数中期 用终浓度为 1mmol/L 的 IPTG 诱导 3~4h 经长波紫外光照射检测未见到绿色荧光。改将转化子在 LB + Ap 平板上于 37°C 培养形成的单菌落也未检测到绿色荧光。但当培养温度改为 28°C 后重复上述过程 均能检测出荧光。说明 *gfp* 只有在 28°C 培养时才能在大肠杆菌中正确表达(图版 I - 1)。

2.2 广宿主、可视启动子探针载体 pHN127 的构建

用 *Eco*RI 和 *Xba*I 双酶切质粒 pHN115 回收约 1.0kb 的片段 该片段保留了 *gfp* 表



达单元的 SD 序列,但不含 $\Phi 10$ 启动子), 插入到经同样双酶切的克隆载体 SK(+) 得到重组质粒 pHN116,用 *EcoRI* 和 *XbaI* 双酶切复证,产生 1.0 和 2.9kb 两个片段。用 *HindIII* 和 *XbaI* 双酶切质粒 pHN116, 回收 1.0kb 的片段,插入到经同样双酶切的表达载体 pIJ2925 上,得到重组质粒 pHN117 经 *HindIII* 和 *XbaI* 双酶切复证产生 1.0 和 2.6 两个片段(图 4)。用 *BglII* 酶切 pHN117,回收 1.0kb 的 *BglII* 片段所含 *gfp* 基因的上游 SD 序列和单一 *BamHI* 位点,克隆到 pTR102 的 *BamHI* 位点,得到的重组质粒用 *KpnI* 酶切可鉴定出 *gfp* 的两种插入方向。将能切出约 4.0kb 片段的重组质粒命名为 pHN127,切出约 3.0kb 片段的重组质粒,命名为 pHN128 (图 5)。启动子探针载体 pHN127 的构建过程见图 6。

图 4 重组质粒 pHN116 和 pHN117 的酶切鉴定

Fig. 4 Identification of pHN116 and pHN117 by the method of enzyme digestion

1. pIJ2925/*HindIII* + *XbaI* 2. pHN117/*HindIII* + *XbaI* ;
3. K Σ + *EcoRI* + *XbaI* 4. pHN116/*EcoRI* + *XbaI* ;
5. pHN115/*EcoRI* + *XbaI* 6. λ DNA/*HindIII*.

4.0kb 片段的重组质粒命名为 pHN127,切出约 3.0kb 片段的重组质粒,命名为 pHN128 (图 5)。启动子探针载体 pHN127 的构建过程见图 6。

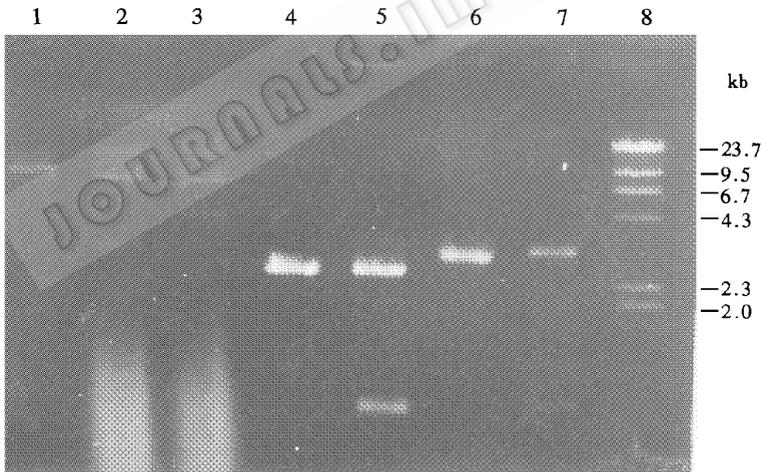


图 5 重组质粒 pHN127 和 pHN128 的酶切鉴定

Fig. 5 Identification of pHN127 and pHN128 by the method of enzyme digestion

1. pHN127/*BamHI* 2. pHN128/*BamHI* 3. pHN127/*KpnI* 4. pIJ2925/*BglII* ;
5. pHN117/*BglII* 6. K Σ + *XbaI* + *HindIII* 7. pHN116/*XbaI* + *HindIII* 8. λ DNA/*HindIII*.

2.3 pHN127 启动子探针特性的证实

用 *Sau3AI* 酶切 pBR322,回收具有双向启动子活性的约 670bp 的片段^[13],插入到 pHN127 的 *BamHI* 位点得到质粒 pHN129 转化 DH5 α ,得到的转化子用长波紫外光照射可发绿色荧光。挑取发光菌落提取质粒,用 *Sau3AI* 酶切检测到 670bp 的片段,从而证实

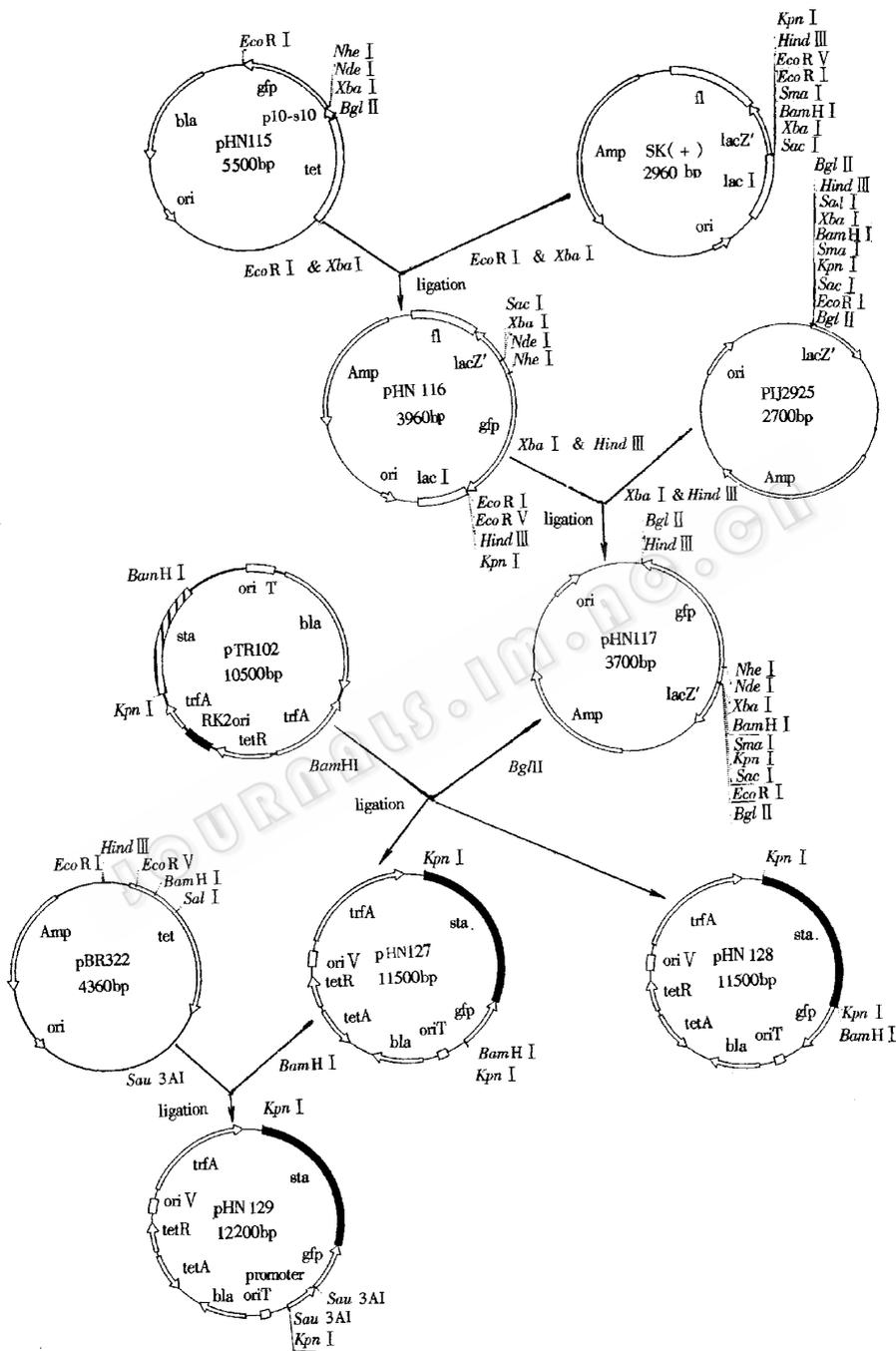


图 6 启动子探针载体 pHN127 的构建

Fig. 6 Construction of promoter-probe vector pHN127

pHN127 的启动子探针特性。通过三亲本接合转移法将质粒 pHN129 导入费氏中华根瘤菌 HN01 检测转移接合子均能发绿光(图版 I-2),说明 *gfp* 也能在根瘤菌中表达。

2.4 用“鸟枪克隆”法钓取大豆根瘤菌的启动子

用 *Sau3AI* 部分酶切费氏中华根瘤菌 HN01 的总 DNA,与经 *BamHI* 酶切并经脱磷酸化处理的 pHN127 连接,转化大肠杆菌 DH5 α 后,将在 LB+Tc 平板上长出的转化子混合培养后通过三亲本接合转移导入 HN01 中,用长波紫外光检查转移结合子,有 3% 的菌落发光,且发光有强有弱。表明已克隆到不同强度组成型表达的根瘤菌启动子。将所有不发光的 HN01 转移结合子转接到加大豆种子抽提物的 TY 培养基上,筛选到 3 个受种子抽提物诱导发光的启动子(图版 I-3)。

3 讨论

迄今尚未见到启动子探针载体同时具备稳定性、广宿主性和报告基因极易检测等特性的报道。本研究构建的启动子探针载体 pHN127 的上述优点是由其载体 pTR102 和报告基因 *gfp* 决定的。pTR102 衍生于革兰氏阴性细菌的广宿主质粒 RK2,由 miniRK2 和 RK2 的 *par* 区域构成。后者由两个反向转录的操纵子 *parCBA* 和 *parDE* 组成^[14],通过 *parCBA* 和 *parDE* 的协调作用,能以一种不依赖于复制子、广宿主的方式稳定质粒。研究表明 *parDE* 通过编码能杀伤无质粒细胞的蛋白来维持质粒稳定^[15]。*parCBA* 则可能编码某种有效分配系统来维持质粒稳定^[16]。由于 *gfp* 基因在任何细菌中表达都不会有本底荧光干扰并易于定性和定量检测,连同 pTR102 的广宿主性和稳定性,从而赋予启动子探针载体 pHN127 以广宿主性、稳定性和可视的优点。研究结果表明 *gfp* 在大肠杆菌中正常表达的关键是培养温度。据文献资料分析我们未能在 37℃ 下检测到转化子的诱导发光的原因可能与表达出的 GFP 蛋白在 37℃ 下的错误折叠并形成包含体有关^[17,18],转化子在 28℃ 培养条件下表达的 GFP 由于能有效折叠,因而发出较强的绿色荧光。

已知根瘤菌与豆科植物共生关系的建立涉及根瘤菌的早期结瘤基因与植物基因在分子水平上的对话,组成型表达的根瘤菌调节基因 *nodD* 产生的 NodD 蛋白经植物根分泌的类黄酮化合物诱导活化后,能激活根瘤菌的早期结瘤基因(如 *nodABC* 等)表达产生特殊的寡糖类结瘤因子(Nod factor)。后者又反过来诱发植物根的皮层细胞分裂产生根瘤^[19]。快生型大豆根瘤菌虽然首先在我国发现并广为分布,但目前对它们参与早期结瘤过程的基因定位、结构和功能的了解几乎处于空白状态。用启动探针载体 pHN127 去钓取它们的早期结瘤基因,必将进一步促进快生型大豆根瘤菌分子生物学的进展。

参 考 文 献

- [1] Morise S G, Shimomura O, Johnson F H, et al. *Biochemistry*, 1974, **13**: 2656-2662.
- [2] Shimomura O, Johnson F H, Saiga Y. *J Cell Comp Physiol*, 1962, **59**: 223-240.
- [3] Ward W W, Cody C W, Hart R et al. *Photochem. photobiol*, 1980, **31**: 611-615.
- [4] Prasher D C, Eckenrode V K, Ward W W et al. *Gene*, 1992, **111**: 229-233.
- [5] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G et al. *Science*, 1994, **263**: 802-805.
- [6] William S, Alan H R, John J D et al. *Methods in Enzymol*, 1990, **185**: 61-89.
- [7] Weinstein M, Roberts R C, Helinski D R. *J Bacteriol*, 1992, **174**: 7486-7489.

- [8] Ditta G Stanfield S, Corbin D, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, **77** : 7347~7351.
- [9] Long S R, Baikema W J, Ausubel F M. *Nature*, 1982, **298** : 485~488.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *Molecular cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory 1989.
- [11] 朱光富, 周俊初, 陈华葵. *遗传学报*, 1996, **23**(2) : 131~141.
- [12] Mulligan J T, Long S R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82** : 6609~6613.
- [13] Bolivar F, Rodriguez R L, Greene P J *et al.* *Gene*, 1977, **2** : 95
- [14] Eberl L, Giskov M, Schwab H. *Mol Microbiol*, 1992, **6** : 1969~1979.
- [15] Roberts R C, Strom A, Helinski D R. *J Mol Biol*, 1994, **237** : 35~51.
- [16] Davis T L, Helinski D R, Roberts R C. *Mol Microbiol*, 1992, **6** : 1981~1994.
- [17] Cormack B, Valdivia R H, Falkows. *Gene*, 1996, **173** : 33~38.
- [18] Heim R, Prasher D C, Tsien R Y. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** : 12501~12504.
- [19] Long S. *Annu Rev Gen*, 1989, **23** : 483~506.

CONSTRUCTION OF A GFP BROAD-HOST-RANGE PROMOTER-PROBE VECTOR AND ITS APPLICATION

Ma Lixin Shi Qiaojuan Zhou Junchu Chen Huakui

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

Abstract The 0.9 kb DNA fragment was obtained by PCR and using a pair of special designed primers from the green fluorescent protein gene (*gfp*). It was then cloned into an expression vector pET-11C and named as pHN115. A promoterless *gfp* vector with SD fragment was obtained from pHN115 and subcloned into SK(+), pIJ 2925 and finally into pTR102. A broad-host-range and visible promoter-probe vector, pHN127 was constructed and used successfully for the identification of constitutive and inducible promoters from *Sinorhizobium fredii* HN01.

Key words Green fluorescent protein gene (*gfp*), *Sinorhizobium fredii*, Promoter-probe vector

图 版 说 明

Explanation of plate

1. *E. coli* BL21(DE3) 受 IPTG 诱导发绿光 (→ 示发荧光的转化子菌落 ⇨ 示受体菌菌落)
2. *gfp* 在快生型大豆根瘤菌 *Sinorhizobium fredii* HN01 中的表达 (a. 发绿光的转移接合子 HN01(pHN129) b. 受体菌 HN01)
3. 三个诱导发绿光的转移接合子 (a. 未经种子抽提物诱导 b. 经种子抽提物诱导)

1. *E. coli* BL21(DE3) emitting green light after IPTG induction (Black arrow points the colony of transformant emitting green fluorescent light and empty arrow points the colony of recipient strain); 2. Expression of *gfp* in *Sinorhizobium fredii* HN01 (a. the conjugant HN01(pHN129) emitting green light b. recipient strain HN01); 3. Three induced green light emitting transconjugants (1. without soybean seed exudate induction, b. with soybean seed exudate induction).

* Project of Chinese National Programs for Science and Technology Development (No. 863-101-03-03-7)

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39770013)