

# 绿色荧光蛋白基因标记野生型生防枯草芽孢杆菌的研究

姚震声<sup>1, 2, 3</sup> 陈中义<sup>1\*</sup> 陈志谊<sup>2\*</sup> 郑小波<sup>3</sup> 张 杰<sup>1</sup> 黄大昉<sup>1</sup>

<sup>1</sup>( 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094 )

<sup>2</sup>( 江苏省农业科学院植物保护研究所, 南京 210014 )

<sup>3</sup>( 南京农业大学植物保护学系, 南京 210095 )

**摘 要** 根据绿色荧光蛋白基因和枯草芽孢杆菌木糖诱导型启动子 *PxyIR* 序列, 分别设计两对特异引物 primers *PxyF/R* 和 primers *gfpF/R*, 扩增获得了完整的启动子 *PxyIR* 和 *gfp* 基因序列。进一步以上述产物混合物为模板, 以 primer *PxyF*/ primer *gfpR* 做引物进行重迭 PCR 获得了 *PxyIR-gfp* 重组翻译融合表达盒。经 *Sph* I 和 *Kpn* I 完全酶切后, 将 *PxyIR-gfp* 表达盒分别插入大肠杆菌-苏云金芽孢杆菌穿梭载体 pHT315 和大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭载体 pRP22。相应的重组表达质粒 pGFP315 和 pGFP22 转化枯草芽孢杆菌感受态细胞。前者在标准菌株 168 中得到良好发光表型, 后者则在标准菌株 168 和野生目标菌株 B916 中均得到良好的发光表型。室内平板抑菌实验结果显示 B916 生防效果与出发菌株没有明显差异, 遗传稳定性研究表明连续稀释培养约 175 代后, 工程菌株稳定性为 94%, 质粒丢失频率低于  $3.5 \times 10^{-4}$ /代。

**关键词** 绿色荧光蛋白基因, 重迭 PCR, 枯草芽孢杆菌, 生物防治, 基因工程

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)05-0551-06

研究阐明生防微生物具有的植株的定殖、扩散和生存竞争能力是揭示生防作用机制的重要方面, 对提高和稳定菌剂的生防效果、制定科学的施用技术具有重要意义。发光标记系统等现代基因标记技术的兴起, 为探明拮抗细菌的根围定殖动态提供了有效的研究手段。绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)标记系统具有标记基因小(约 1kb), 直接肉眼检测荧光、对细胞安全、稳定等优点<sup>[1]</sup>, 已成功用于微生物定殖<sup>[2]</sup>、对宿主组织侵染<sup>[3]</sup>、微生物动态监测<sup>[5]</sup>、基因表达调控<sup>[6]</sup>等研究, 但用 *gfp* 基因标记植生防枯草芽孢杆菌尚未见报道。

B916 是江苏省农科院植保所分离的一株枯草芽孢杆菌, 对水稻纹枯病具有良好的防效, 近年在江苏、安徽省等地每年推广使用近百万亩, 为绿色无公害大米的生产提供了有力的技术支撑<sup>[7]</sup>。通过基因工程将对水稻二化螟高效的 *cry* 基因转入 B916, 获得了杀虫防病效果良好的工程菌<sup>[8-9]</sup>。但对 B916 在水稻根围或土壤中的定殖、存活、繁殖、运动等微生态行为规律及其抗菌防病机制仍缺乏深入系统的了解。本研究通过绿色荧光蛋白标记基因与枯草芽

孢杆菌木糖启动子翻译融合, 构建了适合枯草芽孢杆菌的标记系统, 获得了 *gfp* 标记的 B916 工程菌, 为进行相关跟踪研究创造了条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株与质粒

本研究所用菌株与质粒见表 1。

### 1.2 培养基、抗生素与试剂

枯草芽孢杆菌感受态细胞培养基为 MD 与 MDCH 培养基<sup>[10]</sup>, 枯草芽孢杆菌和大肠杆菌培养采用 LB 培养基<sup>[11]</sup>。限制酶购自 TaKaRa 公司, T4DNA 连接酶购自 Promega 公司, DNA 凝胶回收试剂盒, Taq plus DNA 聚合酶购自上海生物工程公司, PCR 引物由上海生物工程公司合成。氯霉素和氨苄青霉素购自经科生物工程公司, 使用浓度分别为大肠杆菌(氨苄青霉素): 100 μg/mL, 枯草芽孢杆菌(氯霉素) 5 μg/mL。

### 1.3 重迭 PCR 扩增

根据绿色荧光蛋白基因和枯草芽孢杆菌高效表达启动子木糖启动子 *PxyIR* 序列, 分别设计两对特

收稿日期 2003-04-07, 修回日期 2003-07-01。

基金项目: 863 计划课题(2001AA212301); “973”计划课题(2001CB109005); 植物病虫害生物学国家重点实验室开放课题。

\* 通讯作者。 Tel 86-10-62817545; Fax 86-10-62894642; E-mail: dh313@public.bta.net.cn 或 chzy@jaas.ac.cn  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 1 菌株和质粒  
Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Genotype	Source
Strains		
<i>Escherichia coli</i>		
JM110	<i>dam dem supE44 hsdR17 thi leu rpsL lacy galK galT ara tonA thr tsXΔ(lac-proAB) F'([ traD36 proAB lacI<sup>q</sup> lacZΔM15 ])</i>	This lab
<i>Bacillus subtilis</i>		
168	<i>trpC</i>	This lab
B916	Wild type	This lab
B168- <i>gfp315</i>	B168 carrying pGFP315	This research
B168- <i>gfp22</i>	B168 carrying pGFP22	This research
B916- <i>gfp</i>	B168 carrying of pGFP22	This research
Plasmids :		
pHT315	<i>E. coli-B. thuringiensis</i> shuttle vector , Amp <sup>R</sup> Er <sup>R</sup>	This lab
pRP22	<i>E. coli-B. subtilis</i> shuttle plasmid , Amp <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	This lab
pGFP315	pHT315 carrying 2.3 kb <i>Kpn</i> I / <i>Sph</i> I <i>PxyLR-gfp</i> cassette	This research
pGFP22	pRP22 carrying 2.3 kb <i>Kpn</i> I / <i>Sph</i> I <i>PxyLR-gfp</i> cassette	This research
pGFPuv	Amp <sup>r</sup> , <i>gfp</i>	NAU*
pHT315- <i>xyLR</i>	pHT315 carrying promoter <i>PxyLR</i>	Institute Pasteur

\* NAU : Nanjing Agriculture University

引物 primers *PxyF/R* 和 primers *gfpF/R* ,并在 *gfp* 上游引物和 *PxyLR* 下游引物分别引入 *Kpn* I 和 *Sph* I 酶切位点 ,并使 *gfp* 上游引物和 *PxyLR* 下游引物中 *gfp* 起始密码子与 *PxyLR* 正确连接。

primer *PxyF* ( *PxyLR* 上游 ): 5'-CAC A TG CAT GC C ATG TCA CTG TTG CTT CAG-3'

*Sph* I

primer *PxyR*( *PxyLR* 下游 ):5'-TTC TTC TCC TTT ACT CAT GTG ATT TCC CCC TTA-3'

primer *gfpF*( *gfp* 上游 ):5'-TAA GGG GGA AAT CAC ATG AGT AAA GGA GAA GAA-3'

primer *gfpR*( *gfp* 下游 ):5'-GG G GTA CC A TTA TTT TTG ACA CCA GA-3' *Kpn* I

分别以引物对 primers *PxyF/R* 和 primers *gfpF/R* 扩增 *PxyLR* 和 *gfp* 序列 ,然后以其混合物做模板 ,以 primer *PxyF*/ primer *gfpR* 做引物进行二次 PCR。PCR 反应参数 :94℃、30 s ,56℃、30 s ,72℃、2 min ,30 个循环。

#### 1.4 遗传转化与基因重组

枯草芽孢杆菌感受态细胞制备、遗传转化和质粒提取按文献[10]方法 ;大肠杆菌质粒提取、DNA

酶切、片段回收、连接及遗传转化采用常规方法<sup>[11]</sup>。

#### 1.4 工程菌株发光表型观察

采用约 365 nm UV 激发 ,肉眼直接观察。

#### 1.5 工程菌株稳定性测定

过夜活化菌株 ,以 0.1% 接种无抗生素 LB 培养液 ,30℃ 培养 ,在对数生长期(小于 5 h)取样 ,继续以 0.1% 接种无抗生素 LB 培养液 ,重复直至约 50 h ,进行连续稀释培养。过夜连续活化的菌株以 0.1% 接种无抗生素 LB 培养液 ,30℃ 培养约 50 h。在两种条件下 ,不定时取样 ,涂布无抗性 LB 平板培养 ,选取约 300 个克隆转入抗性 LB 平板 ,以抗性菌株所占百分比计算工程菌株的遗传稳定性<sup>[8]</sup>。

#### 1.6 工程菌株抑菌活性检测

B916 和 B916-*gfp* 接种 PDA 平板两端 ,同时在平板中央接种一小块纹枯病菌丝体 ,26℃ 培养 ,2d 后观察抑菌圈的大小 ,分别在自然光、紫外光、自然光与紫外光同时存在 ,对平板进行拍照 ,记录结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 重迭 PCR 构建 *PxyL-gfp* 表达盒

分别以质粒 pHT315-*xyLR* 和 pGFP22 为模板 ,引

物对 *PxyF/R* 和 *gfpF/R* 为引物,经 PCR 扩增分别获得了 1.5 kb *PxyLR* 片段和 0.8 kb 的 *gfp* 片段。进一步以上述扩增产物混合物为模板,以 *PxyF* 和 *gfpR* 为引物,PCR 扩增得到了约 2.3kb 的 *PxyLR-gfp* 转录翻译融合表达盒片段(图 1)。

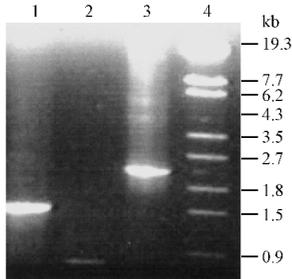


图 1 PCR 与重迭 PCR 产物电泳分析

Fig. 1 Electrophoresis of overlapping PCR products

1. PCR production of promoter *PxyLR* ;
2. PCR production of *gfp* ;
3. PCR production of *PxyLR-gfp* ;
4. Marker( $\lambda$ DNA/ *Eco1301* )

## 2.2 枯草芽孢杆菌标记系统的构建

将获得的表达盒 *PxyLR-gfp* 用 *Kpn I* 和 *Sph I* 进行双酶切,与相应酶切的大肠杆菌-苏云金芽孢杆菌穿梭载体 pHT315 连接,转化 JM110,提取重组子质粒,限制酶切电泳分析后,转化枯草芽孢杆菌标准菌株 168 结合抗性标记和发光表型筛选得到 168 工程菌株 B168-*gfp315*,重组质粒命名为 pGFP315。用 *Kpn I* 和 *Sph I* 进行双酶切 pGFP315,将 *PxyLR-gfp* 克隆到大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭载体 pRP22 转化 JM110,得到重组质粒 pGFP22。重组质粒 pGFP22 转化 168 同样得到了 GFP 发光表型的转化子 B168-

*gfp22*。重组质粒 pGFP315 和 pGFP22 构建流程和酶切分析鉴定见图 2,Plate I -A, B。

## 2.3 B916 标记菌株的构建与发光表型观察

提取质粒 pGFP22 和 pGFP315,分别转化 B916 感受态细胞,pGFP22 成功获得了转化子,但 pGFP315 多次转化均没有成功。经结合发光表型、质粒提取和酶切分析筛选获得了重组质粒 pGFP22 的 B916 转化子 B916-*gfp*(图片从略),将 B916-*gfp* 涂布 LB 平板 37°C 过夜培养。紫外下未标记菌株 B916 菌落色泽昏暗,没有任何荧光(Plate I - $\alpha$ (a)),而肉眼即能看到 B916-*gfp* 强烈的荧光(Plate I - $\alpha$ (b)),且荧光显微镜下单个 B916-*gfp* 细胞发光非常明显(Plate I - $\alpha$ (c))。自然菌株和标记菌株之间菌落颜色差别十分明显,容易区分。

## 2.4 B916 标记菌株抑菌活性检测

接种 B916、B916-*gfp* 和病原真菌指示菌于 10 个 PDA 平板,进行平板抑菌活性检测。结果表明标记菌株 B916-*gfp* 与原始菌株 B916 的抑菌活性无明显差异,随机选取一个平板拍照。在自然光下,自然菌株 B916(Plate I - $\beta$ (a))(b)中左右菌落)与标记菌株(Plate I - $\beta$ (a))(b)中上下菌落)抑菌活性无明显差异,颜色虽有差异,但不够显著(Plate I - $\beta$ (a))。在紫外和灯光共同照射下,标记菌株发出强烈荧光,自然菌株则没有(Plate I - $\beta$ (b)),在只有紫外光照射下,标记菌株菌落发出强烈荧光,而自然菌株菌落则没有任何荧光(图片从略)。

## 2.5 B916 标记菌株遗传稳定性测定

接种 B916-*gfp* 于 5 mL LB 培养液(含氯霉素),37°C 过夜活化菌株。以 0.1% 接种于 5 mL LB 培养

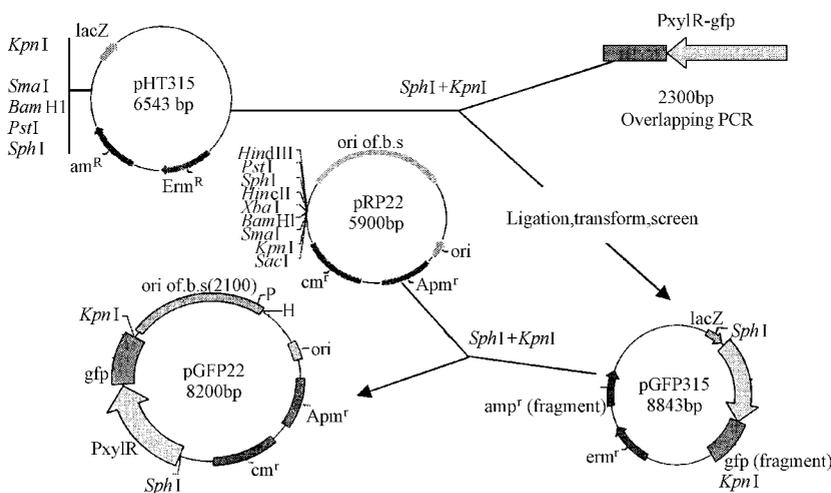


图 2 携带 *PxyLR-gfp* 表达盒重组质粒 pGFP315 和 pGFP22 的构建

Fig. 2 Construction of recombinant plasmids pGFP315 and pGFP22 carrying *PxyLR-gfp* element. <http://journals.im.ac.cn>

液,连续稀释培养和连续培养 58.5 h,在不同时间取样涂 LB 平板,紫外下计算具有绿色荧光表型的菌落所占百分比,以此作为工程菌株的稳定性。实验结果表明:B916-*gfp* 在连续稀释培养 58.5 h 后的质粒稳定性为 94%,连续培养的稳定性为 83%(图 3)。

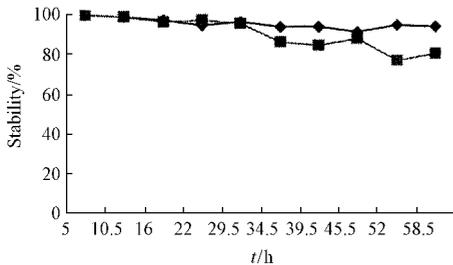


图 3 B916-*gfp* 的质粒稳定性实验

Fig. 3 Stability of engineered strains B916-*gfp*

◆ Incubation with continual dilution  
■ Successively incubation

### 3 讨 论

芽孢杆菌是土壤、植物根际和叶围的重要微生物种群,许多天然分离株能够促进植物生长和产生抗菌物质,是植物病害生防菌株的重要来源<sup>[1]</sup>。通过现代生物技术对生防菌株进行遗传标记,是研究和阐明其在生态环境中的生物学行为规律的重要技术手段和有效的途径。

本研究选择枯草芽孢杆菌木糖启动子和绿色荧光蛋白基因作为标记材料,根据它们的 DNA 序列设计两对特异引物,通过重迭 PCR 构建了木糖启动子与 *gfp* 转录翻译融合表达盒。采用重迭 PCR 构建重组表达盒方法简单、易于操作,其关键是要确保重迭引物中 *gfp* 的开放阅读框与启动子读码框的准确连接。为了避免 PCR 引起的错配,我们首先采用 Taq plus DNA 高保真聚合酶进行 DNA 扩增;其次,我们提取了多个重组克隆质粒转化枯草芽孢杆菌模式菌,通过发光表型进一步筛选重组质粒;最后,我们对筛选到的重组质粒进行序列测定,证实了两个 DNA 元件的准确连接(结果从略)。

野生型芽孢杆菌往往存在复杂的遗传修饰系统,遗传转化效率低甚至不能转化<sup>[8]</sup>。本研究中我们构建了两个不同的重组穿梭表达质粒,它们能有效转化模式菌 168 并表达良好的发光表型。但只有一个重组质粒能够转化 B916,且转化效率很低(约  $10^2$  cfu/ $\mu$ g DNA),这与文献报道基本一致,也反应了野生型菌株基因操作的复杂性。如何进一步克服和改进野生型芽孢杆菌遗传转化效率还需进行系统深

入的研究。

质粒稳定性实验表明工程菌株在连续稀释培养 58.5 h 后,仍有 94% 的菌株含有重组质粒。如果 B916-*gfp* 在连续稀释培养条件下处于对数生长状态,代时为 20 min,则 B916-*gfp* 细胞分裂了约 175 代,质粒分离稳定性为 99.9646%/代,质粒丢失频率低于  $3.5 \times 10^{-4}$ /代。连续培养条件下稳定性低于连续稀释培养,原因可能是连续培养时工程菌株生成芽孢,质粒在分配进入孢子较营养生长更容易丢失。

在自然环境中,不仅温度、湿度、氧气和营养条件与实验室完全不同,而且,还要承受天然微生物群落的生存竞争压力。微生物在环境中的生长繁殖速度远远低于实验室条件,如枯草芽孢杆菌在土壤中代时一般在 50 ~ 100 h,是实验室条件下 150 ~ 300 倍<sup>[12]</sup>。因此,我们可以认为即使进行一个生长季节的追踪检测,工程菌株的遗传稳定性也基本满足研究的需要。

### REFERENCES (参考文献)

- [1] Halfie M, Tu Y, Euskirchen G *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, **263**: 802 - 805
- [2] Gage D J, Bobo T, Long S R. Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and *Alfalfa* (*Medicago sativa*). *J Bacteriol*, 1996, **178**(24): 7159 - 7166
- [3] CHEN Y (陈莹), XIA X (夏晓勤), LU C F (陆承平). Antigen uptake and dynamic distribution of green fluorescent protein marked *Aeromonas hydrophila* in fish. *Journal of Agricultural Biotechnology* (农业生物技术学报), 1999, **7**(4): 329 - 332
- [4] Eberl L, Schulze R, Ammevdola A *et al.* Use of green fluorescent protein as a marker for ecological studies of activated sludge communities. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, **149**: 77 - 83
- [5] Zhao H, Thompson R B, Lockatell V *et al.* Use of green fluorescent protein to assess urease gene expression by Uropathogenic *Proteus mirabilis* during experimental ascending Urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 1998, **66**(1): 330 - 335
- [6] Chris D. Web b, Amy D *et al.* Use of green fluorescent protein for Visualization of cell-specific gene expression and subcellular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 1995, **177**(20): 5906 - 5911
- [7] CHEN Z Y (陈志谊), GAO T D (高太东), YAN D F (严大富) *et al.* Biocontrol of rice sheath blight disease by *Bacillus subtilis* B916 in the fields. *Chinese J Biological Control* (中国生物防治), 1997, **13**(2): 75 - 78
- [8] CHEN Z Y (陈中义), ZHANG J (张杰), CAO J F (曹景萍) *et al.* Construction of genetically engineered strains of *Bacillus subtilis* against insect pests and plant pathogens. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1999, **15**(2): 215 - 220
- [9] CHEN Z Y (陈中义), ZHANG J (张杰), HUANG D K (黄大昉).

plant diseases biocontrol *Bacillus*. *Chin J Plant Pathol*(植物病理学报), 2003, 33(2): 97 - 103

- [ 1 0 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning : a laboratory manual, 2nd ed. 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- [ 1 1 ] Msadek T, Dartois V, Kunst F *et al.* ClpP of *Bacillus subtilis* is

required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Mol Microbiol*. 1998 27(5): 899 - 914

- [ 1 2 ] Msadek T. When the going gets tough : survival strategies and environmental signaling networks in *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 1999 7(5): 201 - 201

## Genetically Marking of Natural Biocontrol Bacterium *Bacillus subtilis* Strains with Green Fluorescent Protein Gene

YAO Zhen-Sheng<sup>1, 2, 3</sup> CHEN Zhong-Yi<sup>1\*</sup> CHEN Zhi-Yi<sup>2\*</sup> ZHENG Xiao-Bo<sup>3</sup> ZHANG Jie<sup>1</sup> HUANG Da-Fang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>( State Key Lab for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100094, China )

<sup>2</sup>( Academy of Agricultural Science of Jiangsu Province, Nanjing 210014, China )

<sup>3</sup>( Department of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China )

**Abstract** The full length sequence of the promoter and *gfp* gene were obtained respectively by PCR with two pairs unique primers *PxyF/R* and primers *gfpF/R*, which were designed according to the *gfp* gene and promoter sequence of xylase operon from *Bacillus subtilis* 168, and the DNA template plasmids pHT315-xyIR and pGFPuv. Furthermore, the fused translational expression cassette *PxyIR-gfp* was constructed using overlapping PCR technique with the primers pair *PxyF/gfpR* and the mixture of above PCR production. After being digested by *Kpn* I and *Sph* I, *PxyIR-gfp* expression cassette was inserted into *E. coli-B. thuringiensis* shuttle vector pHT315 and *E. coli-B. subtilis* shuttle vector pRP22, and the resulted recombinant plasmids were named as pGFP315 and pGFP22 respectively. Both recombinant plasmids were transferred into *B. subtilis* lab strain 168 and the resulted transformants are bright green performance under 365 nm UV light. However, only pGFP22 can be introduced into the natural strain B916. The transformants containing pGFP22 have bright green performance under 365 nm UV light and was named B916-*gfp*. Antifungal activities testing results proved that there is no obvious difference between B916 and the engineered strains B916-*gfp*. Research results also showed that the stability of B916-*gfp* was 94% after growth about 175 generations at 37°C, and the losing rate of plasmid was less than  $3.5 \times 10^{-4}$  per generation.

**Key words** green fluorescent protein, overlapping PCR, *Bacillus subtilis* biological control, genetically engineering

Received : 04-07-2003

\* Corresponding author. Tel 86-10-62817545 ; Fax 86-10-62894642 ; E-mail ydh313@public.bta.net.cn 或 chzy@jaas.ac.cn