

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20140139

绿色荧光蛋白基因在木葡糖酸醋杆菌中的表达

钟 成, 刘 淼, 李 晶, 韩培培, 谭之磊, 贾士儒

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘 要: 绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)广泛应用于报告基因、基因的表达与调控以及微生物信号传导. 以 pMV24 穿梭质粒为载体, 实现了 GFP 在木葡糖酸醋杆菌(*Gluconacetobacter xylinus*)中的成功表达. 采用 PCR 技术扩增出绿色荧光蛋白基因, 连接至木葡糖酸醋杆菌表达载体 pMV24 中, 构建成功的质粒命名为 pMV24-*gfp*⁺. 采用电转化技术将重组载体导入木葡糖酸醋杆菌中, 转化子在荧光显微镜的蓝色激发光下发出绿色荧光, 为木葡糖酸醋杆菌趋化性的观察及菌体中运动蛋白的分析提供了重要的理论依据.

关键词: 绿色荧光蛋白; 木葡糖酸醋杆菌; 穿梭质粒; 趋化性

中图分类号: Q785

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2015)04-0013-04

Expression of Green Fluorescent Protein Gene in *Gluconacetobacter xylinus*

ZHONG Cheng, LIU Miao, LI Jing, HAN Peipei, TAN Zhilei, JIA Shiru

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology,
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Green fluorescent protein (GFP) as a reporter protein is widely used in signal conduction and gene expression and regulation in microbiology. In this research, GFP genes were successfully expressed in *Gluconacetobacter xylinus* with shuttle plasmid pMV24. GFP genes were cloned from pMUTIN-*gfp*⁺ plasmid and connected to pMV24 to build prokaryotic expression plasmid pMV24-*gfp*⁺. Electrotransformation was applied to introduce pMV24-*gfp*⁺ into *G. xylinus*. The transformant exhibits bright green fluorescence when exposed to blue light in the ultraviolet range of fluorescence microscope. It can provide very important theoretical basis for the observation of cell movement and the analysis of kinesin of *G. xylinus* under chemotaxis.

Key words: green fluorescent protein; *Gluconacetobacter xylinus*; shuttle plasmid; chemotaxis

木葡糖酸醋杆菌(*Gluconacetobacter xylinus*)的静置培养过程中, 在气液界面处生成细菌纤维素膜, 这一现象被认为是木葡糖酸醋杆菌的趋氧性造成的^[1]. 此外, 李晶等^[2]研究表明, 木葡糖酸醋杆菌对氨基酸、碳源、酸和重金属等都有一定程度的趋化性. Sano 等^[3]通过在水中外加电场, 利用电解的作用产生氧气, 诱导好氧性的木醋杆菌有序运动, 从而实现了细菌纤维素的有序纤维结构. 然而, 目前研究者对微生物的趋化过程和鞭毛驱动蛋白的作用机理尚不

明确.

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)是由 238 个氨基酸组成的单体蛋白, 其相对分子质量约为 2688. GFP 最初是由 Shimomura^[4]从多管水母属(*Aequorea victoria*)中分离出来的, 以其良好的物理特性和荧光特性, 而成为良好的报告基因和荧光标记分子, 并在探索生命现象过程中得到了非常广泛的应用^[5], 可用于活细胞中直接观察细胞运动. 本文通过构建重组质粒 pMV24-*gfp*⁺, 并在木葡糖酸醋杆菌中

收稿日期: 2014-10-30; 修回日期: 2014-11-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21106105)

作者简介: 钟 成(1979—), 男, 湖南人, 副教授; 通信作者: 贾士儒, 教授, jiashiru@tust.edu.cn.

数字出版日期: 2015-02-04; 数字出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20150204.0801.001.html>.

进行表达,证明其可作为选择标记用于今后的研究.开展 GFP 相关的信号传导研究,可为研究木葡糖酸醋杆菌生物合成细菌纤维素与趋化性之间的关系提供重要的依据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒和培养基

木葡糖酸醋杆菌(*Gluconacetobacter xylinus*) CGMCC 2955 由工业发酵微生物教育部重点实验室筛选,中国普通微生物菌种保藏管理中心(China general microbiological culture collection center, CGMCC)保藏.大肠杆菌(*E. coli*) DH5 α 由工业发酵微生物教育部重点实验室保藏.

pMV24 穿梭载体由日本 Mitsukan 集团有限公司赠予.

木葡糖酸醋杆菌培养基(g/L):葡萄糖 25,酵母粉 7.5,蛋白胨 10, Na₂HPO₄ 10, 初始 pH 6.0. 固体培养基加 2%琼脂. 121 °C 灭菌 15 min.

LB 培养基(g/L):蛋白胨 10, 酵母粉 5, 氯化钠 10, pH 7.0. 固体培养基加 2%琼脂. 121 °C 灭菌 15 min.

1.1.2 试剂与仪器

蛋白酶 K, 北京鼎国生物技术有限责任公司;溶菌酶、引物、Taq DNA 聚合酶、dNTPs, 上海生工生物工程有限公司;DNA Marker、pCR2.1 T-Vector、DNA 柱回收试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒, 大连宝生物科技(北京)有限公司;RNase A, 美国 Genview 公司;限制性内切酶, Fermentas 公司.

电热恒温水浴锅, 天津市中环实验电炉有限公司;台式高速离心机, 上海医用分析仪器厂;稳压稳流电泳仪, 北京六一仪器厂;基因扩增仪、凝胶分析仪、Micro pulser 型电转化仪, 美国 Bio-Rad 公司;荧光显微镜、BX51 型荧光显微镜, 日本Olympus 公司.

1.2 方法

1.2.1 引物设计

设计引物分别在上游和下游加上 *EcoR* I 和 *Xba* I 的酶切位点及相应保护碱基. F: 5'-CGGAATT CAAGAAGATATACATATGGCT-3'; R: 5'-CTCTAGA CTCGAATTCATTATTTGTAG-3'. 下划线为酶切位点.

1.2.2 转基因木葡糖酸醋杆菌 CGMCC 2955/pMV24-*gfp*⁺的构建

以质粒 pMUTIN-*gfp*⁺为模板扩增 *gfp* 基因. PCR

体系为 25 μ L 反应程序: 95 °C 模板预变性 5 min; 95 °C 模板变性 30 s, 50 °C 引物退火 30 s, 72 °C 引物延伸 1 min, 共 33 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min. PCR 产物利用 1%琼脂糖凝胶电泳进行分析.

取出后纯化 PCR 产物. PCR 产物片段与表达载体 pMV24 用 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切. 酶切后的 *gfp* 基因与 pMV24 按 3 : 1 和 5 : 1 体系连接, 得到重组质粒 pMV24-*gfp*⁺. 质粒构建流程如图 1 所示. 将重组质粒化转入 *E. coli* DH5 α (方法见 1.2.3), 阳性克隆进行质粒提取并测序. 将同源性最高(100%)的重组质粒命名为 pMV24-*gfp*⁺.

提取 pMV24-*gfp*⁺质粒, 电转入木葡糖酸醋杆菌 CGMCC 2955 感受态细胞(方法见 1.2.4). 随机挑取转化子, 提取质粒, 酶切验证并测序. 验证正确的转化子命名为 CGMCC 2955/pMV24-*gfp*⁺.

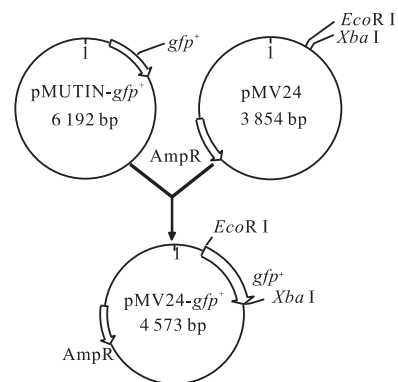


图1 质粒构建流程图

Fig. 1 Construction of pMV24-*gfp*⁺ plasmid

1.2.3 化学转化

于感受态细菌中加入 5.0 μ L 连接产物, 轻轻搅拌均匀, 冰浴 30 min; 42 °C 水浴热激 90 s, 冰浴 2 min; 每管加 LB 液体培养液 900 μ L, 37 °C 水浴 60 min, 180 r/min 振荡培养 1 h; 将上述菌液按原倍和稀释 10 倍分别涂布于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素 100 μ L 和 40 μ g/mL 的 X-Gal 的 LB 平板, 置于 37 °C 培养箱, 37 °C 正放至涂布液体基本被吸收, 再倒置培养 18 ~ 24 h. 从平板上挑取单个分离良好的白色菌落.

1.2.4 木葡糖酸醋杆菌电转化

取甘油管中保存的木葡糖酸醋杆菌的菌液接入装有 100 mL 液体培养基的 500 mL 摇瓶中, 30 °C、160 r/min 振荡培养 24 h, 向液体摇瓶中加入 1 mL 纤维素酶(10 000 U/mL), 30 °C 酶解 2 h. 酶解后离心洗涤后的细胞, 经 10%甘油-氯化镁溶液洗涤、离心各 2 次, 再以 10%甘油悬浮、离心各 2 次, 最后用 10%甘

油溶液悬浮制成感受态细胞. 电击条件为: 电压 2.40 kV、电容 25 μ F、电阻 200 Ω . 在含氨苄青霉素 100 μ g/mL 的抗性固体平板上筛选转化子.

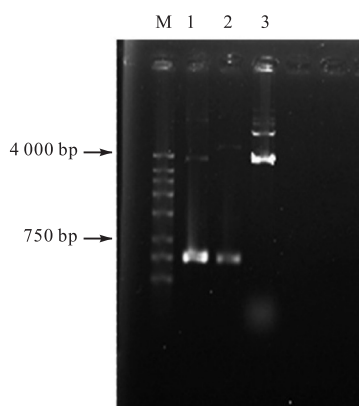
1.2.5 转基因芽的 GFP 荧光观察

在 BX51 型荧光显微镜下观察转基因的细胞中 GFP 荧光的表达情况, 采用自动成像系统拍照.

2 结果与分析

2.1 目的基因的扩增结果与克隆载体的构建

以质粒 pMUTIN-*gfp*⁺ 为模板扩增 *gfp* 基因, 扩增的片段与表达载体 pMV24 用 *Eco*R I 和 *Xba* I 双酶切, 结果如图 2 所示. 从电泳结果看, 在 PCR 扩增的 *gfp* 基因与预期大小相符. 经切胶回收, 连接 pCR2.1 T 载体, 转化到大肠杆菌 DH5 α . 阳性克隆测序结果分析显示 *gfp* 基因片段与 pMUTIN-*gfp*⁺ 的目的片段序列大小 (717 bp) 一致, 二者的碱基序列相同.



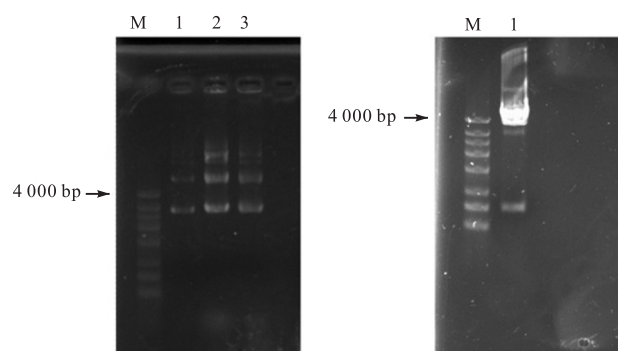
M. Marker, 4 000 bp; 1. 质粒 pMUTIN-*gfp*⁺ 的 *gfp* 基因扩增条带;
2. *gfp* 基因酶切条带; 3. 质粒 pMV24 酶切条带

图 2 目的基因和穿梭质粒的双酶切电泳图

Fig. 2 Electrophoretogram of target gene and shuttle plasmid with restriction enzyme digestion

2.2 重组质粒的构建和鉴定

将 *Eco*R I 和 *Xba* I 双酶切处理后的 pCR2.1 T/*gfp*⁺ 质粒, 通过琼脂糖凝胶电泳分离 T 载体片段和 *gfp* 目的片段, 将 *gfp* 基因回收后, 与 pMV24 按 3 : 1 和 5 : 1 体系分别过夜连接, 并转化至大肠杆菌感受态细胞中. 挑取绿色菌落, 提取质粒并采用 *Eco*R I 和 *Xba* I 双酶切验证, 结果如图 3 所示. 由图 3 (b) 可以看出, 在 4 000 bp 和 750 bp 的 DNA Marker 条带附近有与预期大小抑制的条带出现.



M. Marker; 1—3. 转化子质粒 M. Marker; 1. 转化子质粒酶切
(a) 转化子质粒 (b) 转化子质粒酶切

图 3 *gfp*⁺ 转化子的鉴定

Fig. 3 Identification of *gfp*⁺ transformation

2.3 GFP 在 *G. xylinus* CGMCC 2955 中的表达

将构建好的质粒 pMV24-*gfp*⁺ 电转化至木葡糖酸醋杆菌中. 将转化菌株置于荧光显微镜下进行观察, 结果如图 4 所示. 转化菌株在荧光显微镜的蓝色激发光下可发出绿色荧光, 拍照可观察到菌体发出绿色的荧光, 说明重组质粒 pMV24-*gfp*⁺ 在木葡糖酸醋杆菌中表达, 证明其可作为选择标记用于今后木葡糖酸醋杆菌的趋化性研究.

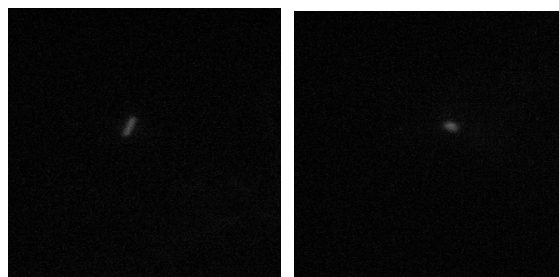


图 4 转化子荧光显微照片

Fig. 4 Fluorescence micrograph of transformant

3 讨论

作为一种报告基因, GFP 比 lacZ、CAT 等报告基因有许多无可比拟的优越性: GFP 不具有种属依赖性, 在多种原核和真核生物细胞中都表达; 不需要反应底物与其他辅助因子, 在蓝光的激发下可产生绿色荧光; 通过替换特性氨基酸, 可产生不同颜色的光, 满足不同的研究需求等^[6]. 因而, GFP 可广泛应用于报告基因、基因的表达与调控、蛋白质的定位、信号传导、转染与转化以及细胞的分离与纯化等领域^[7], 可在更接近自然真实状态的条件下进行活细胞实时

定位观察. 如在活细胞中直接观察蛋白质向细胞核、内质网运动的状态, 还可实时观察到外界信号刺激下目的蛋白的变化过程.

然而, 蛋白在原核表达系统中表达时, 常常受到目的基因本身结构、转录水平调控和蛋白质折叠等诸多因素的影响. 目的基因在原核表达系统的有效表达成为基因工程技术的难点之一, 制约了蛋白质的功能研究和应用. 本文所采用的穿梭质粒 pMV24 是由日本 Mizknan Holdings 中央研究院构建而成, 目前已广泛用作醋酸菌属的穿梭质粒和表达质粒^[8]. Fukay 等^[8]使用 pMV24 穿梭质粒研究 *Acetobacter polyoxogenes* 中乙醛脱氢酶对醋酸产量的影响. 本文也成功使用该质粒使 GFP 蛋白在木葡糖酸醋杆菌中表达. 此外, pMV24 质粒中的氨苄青霉素抗性筛选基因也正是木葡糖酸醋杆菌所缺失的. 因而, 阳性克隆细胞的筛选简便、成功率高.

目前, 由于木葡糖酸醋杆菌的定向运动可直接引起细菌纤维素的规则性排列, 使得木葡糖酸醋杆菌的趋化性广泛受到研究者的关注. 孙臻^[9]利用荧光染料 coriphosphine O 对木醋杆菌 (*Acetobacter xylinus*) 进行染色, 以观察微生物细胞在单根条纹管道和网格状微流控芯片中的运动. 然而, 其染色过程通常伴随着对菌体的离心和洗涤等多个处理程序, 往往造成微生物细胞的损伤. 而 GFP 无毒性且是菌体在不受任何外界环境影响的前提下自发表达的, 可在最自然的状态下追踪细胞的运动. 或者, 将 GFP 与其他蛋白融合追踪蛋白的变化过程. Englert 等^[10]就曾使用表达绿色荧光蛋白和红色荧光蛋白的大肠杆菌对趋化性进行了定量分析. Sourjik 等^[11-12]用荧光共振能量转移技术 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 研究了趋化信号传导系统中各种蛋白的相互作用.

综上所述, 将 GFP 基因在木葡糖酸醋杆菌中成功表达是追踪菌体细胞运动和胞内蛋白迁移的最佳选择, 还可用于检测基因表达的时序性, 例如观察使木葡糖酸醋杆菌具有趋化反应的鞭毛及其动力蛋白等分子发动机的形成. 因此, 本实验采用 PCR 技术扩增出绿色荧光蛋白, 以 pMV24 穿梭质粒为载体, 实现了 GFP 绿色荧光蛋白基因在木葡糖酸醋杆菌中的表达; 在荧光显微镜的蓝色激发光下可观察到绿色荧光; 此转化子的成功构建为木葡糖酸醋杆菌趋化性的深入研究奠定了坚实的研究基础.

参考文献:

- [1] Morgan J L W, McNamara J T, Zimmer J. Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic di-GMP[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2014, 21 (5): 489-496.
- [2] 李晶, 贾士儒, 杨洪江, 等. 木葡糖酸醋杆菌趋化性的初步研究[J]. *天津科技大学学报*, 2012, 27 (1): 1-4.
- [3] Sano M B, Rojas A D, Gatenholm P, et al. Electromagnetically controlled biological assembly of aligned bacterial cellulose nanofibers[J]. *Annals of Biomedical Engineering*, 2010, 38 (8): 2475-2484.
- [4] Shimonura O. Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein[J]. *FEBS Letters*, 1979, 104 (2): 220-222.
- [5] Prasher D C, Eckenrode V K, Ward W, et al. Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein[J]. *Gene*, 1992, 111 (2): 229-233.
- [6] Cubitt A B, Heim R, Adams S R, et al. Understanding, improving and using green fluorescent protein[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1995, 20 (11): 448-455.
- [7] Kain S R, Adams M, Kondepudi A, et al. Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization[J]. *BioTechniques*, 1995, 19 (4): 650-655.
- [8] Fukaya M, Tayama K, Tamaki T, et al. Cloning of the membrane-bound aldehyde dehydrogenase gene of *Acetobacter polyoxogenes* and improvement of acetic acid production by use of the cloned gene[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55 (1): 171-176.
- [9] 孙臻. 图案化细菌纤维素的可控生物制造[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- [10] Englert D L, Manson M D, Jayaraman A. Flow-based microfluidic device for quantifying bacterial chemotaxis in stable[J]. *Competing Gradients Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (13): 4557-4564.
- [11] Sourjik V, Berg H C. Receptor sensitivity in bacterial chemotaxis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99 (1): 123-127.
- [12] Sourjik V, Berg H C. Functional interactions between receptors in bacterial chemotaxis[J]. *Nature*, 2004, 428 (6981): 437-441.

责任编辑: 郎婧