

·成果简介·

绿色荧光蛋白基因(gfp)在华癸中生根瘤菌与紫云英共生固氮作用研究中的应用

周俊初 史巧娟 谢波

(华中农业大学农业部农业微生物重点实验室,武汉 430070)

[关键词] 绿色荧光蛋白基因(gfp),华癸中生根瘤菌,启动子探针载体

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)最初是从维多利亚多管水母(*Aequoria victoria*)中发现的发光蛋白^[1]。天然 GFP 的生色团由 65-67 位 Ser-Tyr-Gly 的氨基酸残基组成,并经环化和脱氢形成一个咪唑环^[2]。其最大激发峰为 395 nm,在 475 nm 处有一副激发峰,最大发射峰位于 510 nm。gfp 作为一种新型的报告基因具有许多优越性:首先它分子量较小,只编码 238 个氨基酸的多肽,对细胞没有毒性,不干扰标记蛋白的功能和定位。其分子结构及光谱特性稳定,能在多种条件下研究。在多数情况下,GFP 的异源表达并不影响细胞的正常活动,另外,GFP 是目前唯一能在异源细胞内表达并自发产生荧光的蛋白,由于不需要辅助因子的参与,故可直接用于活体测定。可以说,GFP 是当前研究活体细胞中基因表达和蛋白质分布的最好手段之一,具有广阔的应用前景。自从 1994 年 Chalfie 等首次在大肠杆菌和线虫中表达 gfp^[3]以来,迄今为止,GFP 已在多种生物,如细菌、蓝细菌、粘菌、酵母、植物和哺乳动物中表达和应用。GFP 的这一种属不依赖的特性使其成为广泛运用的荧光标记分子,尤其适用于监测基因表达和活体内蛋白质定位等研究。

豆科植物紫云英(*Astragalus sinicus*)是生长于我国南方的一种重要绿肥和蜜源,华癸中生根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*)感染紫云英后形成有效固氮的根瘤,在互接种族中独属一族^[4,5]。华癸中生根瘤菌-紫云英共生固氮体系是我国独特的共生固氮资源,与其他代表性根瘤菌相比,目前有关华癸中生根瘤菌参与早期结瘤过程的基因定位、结构和功能等的报道仍十分落后。本研究室过去已在营养、生

理、共生过程的细胞分化及分类地位等方面进行了大量的研究工作。近年来在国家自然科学基金的支持下,又以 gfp 为报告基因开展了华癸中生根瘤菌-紫云英早期共生关系的研究,主要研究内容有:验证 gfp 在华癸中生根瘤菌中的异源表达,探讨其表达条件与可能存在的问题;构建基于 gfp 的广宿主范围启动子探针载体,通过鸟枪克隆技术从华癸中生根瘤菌基因组 DNA 中钓取 gfp 组成型表达与受紫云英种子浸提物诱导表达的启动子片段;以 gfp 为报告基因原位活体监测华癸中生根瘤菌侵染紫云英的早期结瘤过程。

1 利用野生型 wtgfp 作报告基因的启动子探针载体的构建

1.1 基于野生型 wtgfp 的广宿主范围启动子探针载体 pHN127 的构建及验证

将含 gfp 编码区的 DNA 片段连接到大肠杆菌表达载体 pET-11C 上获得的重组质粒为 pHN115,用 EcoRI 和 XbaI 双酶切质粒 pHN115,回收 1 kb 片段,再连接到质粒 pIJ2925 上,得到重组质粒 pHN117。这样,gfp 上游区保留了 SD 序列,但没有启动子区,载体上多克隆位点中的 XbaI、BamHI、SmaI、KpnI 和 SacI 可以作为克隆启动子的酶切位点。用 BglII 酶切质粒 pHN117 回收 1 kb 片段连接到 BamHI 酶切并去磷酸化的广宿主载体 pTR102 上,得到广宿主范围启动子探针载体 pHN127。将质粒 pBR322 上 665bp 具 tetA/tetR 双向启动子活性的 Sau3AI 片段连接到 BamHI 酶切并去磷酸化的载体 pHN127 上,将连接物转化大肠杆菌 DH5 α ,28℃培养。形成的菌落受长波

国家自然科学基金资助项目。

本文于 2001 年 3 月 21 日收到。

紫外灯照射时,可以检测到发绿光的微菌落,表明 pHN127 具有启动子探针的功能。其中一个质粒命名 pHN129。

1.2 组成型表达的华癸中生根瘤菌 7653R 中具启动子活性片段的钓取

提取华癸中生根瘤菌 7653R 的总 DNA,用 Sau3AI 部分酶切后和 BamHI 酶切并去磷酸化的载体 pHN127 混合连接。将连接物转化 DH5 α , 28 $^{\circ}$ C 培养。形成的菌落受长波紫外光照射时,可以检测到个别菌落发绿光,将发光最强的菌落,提取质粒命名为 pHN136。酶切验证结果表明克隆到具有转录调节活性的 DNA 片段。

1.3 共生条件下野生型 gfp 在华癸中生根瘤菌中表达的原位监测

用电转化法将 pHN136, pHN129 和 pHN127 分别导入华癸中生根瘤菌 7653R,采用微根盒栽培法。将 7653R(pHN136)接种紫云英,在共生的不同时期用荧光显微镜原位检测早期结瘤阶段根瘤菌侵染植物的过程,由于受植物本身较强的自发荧光的干扰,未观察到预期的侵染过程。从紫云英所结的完整根瘤中也检测不到明显的荧光信号,这可能是因为在根瘤中的微氧环境不利于 GFP 的成熟所导致的。但从根瘤中分离出的根瘤菌受长波紫外光的激发,仍可检测到绿色荧光。表明 pHN136 在共生条件下能在华癸中生根瘤菌中稳定存在。

此外还发现启动子探针载体 pHN127 上的 gfp 受载体 pTR102 上的启动子转录通读可产生荧光本底,只能筛选到转录活性较强的启动子片段,而无法筛选到弱启动子,这给钓取诱导型启动子带来困难。而新一代 GFP 突变体的出现,使 GFP 荧光信号的敏感性和蛋白的可溶性都进一步改善。从而拓宽了 GFP 的应用范围,并提高了敏感性。

2 基于 gfp mut3 的广宿主稳定启动子探针载体 pHN1006 的构建与应用

Cornack 等人利用核苷酸定点诱变法对编码发光基团的 Ser-Tyr-Gly 与侧翼的 55-77 位氨基酸的 DNA 序列进行替代诱变,在大肠杆菌中构建了受严谨可诱导型启动子 Ptac 控制的 gfp 突变基因库^[6]。用荧光激活细胞分选术(FACS)筛选出比 wtGFP 发光强 20-35 倍 EGFPmut1-3 三类突变蛋白。其中适合于在细菌中表达的 EGFPmut3(S65G, S72A)的激发波长为 501nm,发射波长为 511nm,荧光强度比 wtGFP 提高了 21 倍,在单个细胞中可产生强荧光,是研究

细菌基因表达的最佳选择。

2.1 广宿主稳定启动子探针载体 pHN1006 的构建

本研究首先构建了大肠杆菌启动子探针载体 pHN1005。BglII 酶解 pHN1005 回收含启动子探针单元的 1.7 kb 片段连接到 BamHI 酶解并去磷酸化的质粒 pTR102 上,即得到基于 gfp mut3 的广宿主范围启动子探针载体 pHN1006。该载体具有如下特点:

(1)其 5' 端的 BamHI 位点可用来克隆具有启动子活性的 DNA 片段和用于定量分析插入的启动子强度;

(2)该载体上 gfpmut3 结构基因的 3' 端含 rRNA T1T2 终止子,可允许克隆强启动子;

(3)在 BamHI 上游同样插入 rRNA T1T2 终止子以防止载体 pUC19 上启动子的转录通读;

(4)gfpmut3 结构基因上游还插入一段内含子序列,可使正反六种读码框的翻译均被终止,以保证 gfpmut3 按正确的读码框翻译。BamHI 两侧的 SmaI、KpnI 和 SacI 等位点可用于鉴定克隆的启动子片段。

2.2 华癸中生根瘤菌 7653R 基因组中调控活性片段的克隆

提取华癸中生根瘤菌 7653R 的总 DNA,经 Sau3AI 部分酶解后,与 BamHI 酶解并去磷酸化的 pHN1006 酶连,将连接物电转化 7653R 感受态细胞,在 TY + Ap 平板上筛选转化子。用长波紫外激发可观察到部分转化子发绿色荧光,而对照 7653R (pHN1006)则检测不到绿色荧光。表明已克隆到含不同转录水平的组成型启动子。挑取其中最亮的转化子,抽提质粒,命名为 pHN2-33。将转化平板中不发光或发光较弱的转化子同时点种 TY + Ap + 紫云英种子浸提物和 TY + Ap 平板,从上万个融合子中,筛选到一个添加种子浸提物前无荧光,但添加种子浸提物后有显著荧光的重组子,抽提质粒命名为 pIN32,重新电转化 7653R 并验证菌落发光表型后,命名为 IN32。

本研究构建了严格意义上的 gfpmut3 为报告基因的广宿主范围启动子探针载体 pHN1006,经过大量筛选获得了一批具有不同强度 GFP 荧光表型的重组子,表明已克隆到具有调控序列的 DNA 片段,不同程度的 GFP 荧光信号表明其间存在转录水平的差异。并在进一步的筛选中获得了一个受紫云英种子浸提物诱导表达并产生可视荧光信号的重组子。这为进一步大量钓取共生固氮基因提供了新的思路,也为推进紫云英根瘤菌分子遗传学研究积累

了材料。

3 华癸中生根瘤菌标记菌株 2-33 与紫云英共生早期结瘤阶段的原位监测

用 *gfp* 组成型表达的华癸中生根瘤菌标记菌株 2-33 为代表原位监测其与紫云英共生早期结瘤阶段中细胞发育与形态变化的可行性。

3.1 标记质粒的稳定性和 GFP 表达对宿主细胞生理代谢与共生性能的影响

分别任选在连续转接 8 次过程中的平板上的单菌落,用长波紫外激发,比较不同转接次数后菌落的荧光信号,未发现有明显的区别。连同用菌落记数法得到的菌落发光率的测定结果表明标记质粒在宿主根瘤菌营养生长条件下具有很高的稳定性。用 2-33 接种微根盒内培养的紫云英幼苗进行植物结瘤实验,并以 7653R 作为对照,选取早期根瘤和现瘤 20 d 左右的成熟根瘤用荧光显微镜均可检测到很强的荧光信号,从 2-33 所结根瘤中分离的根瘤菌长出的单菌落在 UV 激发后可检测到所有菌落均发绿色荧光。表明标记质粒在共生条件下也能稳定存在。而利用透射电镜和扫描电镜对根瘤的超微结构进行分析,结果表明 7653R 和 2-33 所结根瘤、含菌细胞和类菌体的超微结构相似。

对标记菌株 2-33 与出发菌 7653R 的生长曲线进行比较测定,没有发现明显的差异。说明 *gfpmut3* 的存在与表达对宿主菌没有明显影响。

3.2 利用荧光显微镜原位监测 7653R 与紫云英共生早期结瘤过程

用激光共焦扫描显微镜(LCSM)和微根盒栽培法于接种菌悬液两天后开始检测标记根瘤菌 2-33 在根毛区的动态与 *gfp* 表达。已成功地观察并记录到标记菌在紫云英幼苗根部的定殖、感染及幼小根瘤与成熟根瘤不同层面中由 *gfp* 表达的绿色荧光。

虽然紫云英根系也有一定程度的自发荧光,但利用 LCSM 仍可较好地观察到 *gfp* 在共生条件下的稳定表达。从根瘤及根瘤不同层面成像中可以看到只有含菌细胞才有荧光信号,说明荧光的确来自于 *gfp* 标记的根瘤菌。

我们又选用了配置有 CCD 镜头和 FISH 专用软件的 Zeiss 荧光显微镜,检测到单个根瘤菌、类菌体和不同大小的根瘤产生的荧光信号。本研究在荧光显微镜下看到的类菌体形态多样,常见的有梨形、Y 形、纺锤形和不规则形态等,与用电镜中观察到的类

菌体形态相一致。

4 蓝色荧光蛋白基因在华癸中生根瘤菌中的表达

Heim 等人采用倾向错误 PCR 技术对 wtGFP 进行随机诱变,在 475nm 和 395nm 的激发光源下筛选到光谱改变的突变株^[7]。其中 Y66H 突变株 P4 用近紫外光激发可产生明亮的蓝色荧光,并命名为蓝荧光蛋白(BFP),相应的基因称为 *bfp*。本研究对 *bfp* 基因进行了亚克隆,并在华癸中生根瘤菌中成功表达,其意义在于以 BFP 和 GFP 组成双标记可用于原位监测不同基因的表达调控,结合荧光共振能量转移(FRET)技术,可检测细胞内不同蛋白质的亚细胞定位等。为研究根瘤菌与宿主植物间的相互作用关系提供可能。

5 小结

本研究初步建立起一套主要应用绿色荧光蛋白基因(*gfp*)研究根瘤菌与豆科植物共生关系早期结瘤阶段分子遗传学的载体系统和研究方法。成功构建了严谨的基于 *gfpmut3* 的启动子探针载体,并钓取到部分华癸中生根瘤菌 7653R 组成型表达的启动子和一个受紫云英种子浸提物诱导表达的启动子片段。既为深入开展研究华癸中生根瘤菌的分子生物学研究积累了实验材料,也提出了应用 *gfp* 作为报告基因研究根瘤菌基因表达调控的新方法。

参 考 文 献

- [1] Shimomura O, Johnson F H, Saiga Y. Extraction, purification and properties of a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol.*, 1962, **59**:223—240.
- [2] Prasher D C, Eckenrode V K, Ward W W, Prendergast F G, Cormier M J. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 1992, **111**:229—233.
- [3] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward W W and Prasher D C. Green-fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, **263**:802—805.
- [4] 陈华癸. 草籽绿肥根瘤力人工接种. *新科学*, 1952, **3**:33—38.
- [5] Chen W X, Li G S, Qi Y L et al. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *Int. J Syst. Bacteriol.*, 1991, **41**:275—280.
- [6] Cormack B P, Baldivia R H, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 1996, **173**:33—38.
- [7] Heim R, Prasher D C, Tsien R Y. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, **91**:12 501—12 504.

APPLICATION OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN GENE (gfp) IN THE SYMBIOSIS BETWEEN MESORHIZOBIUM HUAKUII AND ASTRAGALUS SINICUS

Zhou Junchu Shi Qiaojuan Xie Bo

(Key laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Key words green fluorescent protein gene (gfp), Mesorhizobium huakuii, promoter-probe vector

·资料·信息·

“21 世纪生物科学前沿论坛”在京举行

为庆祝国家自然科学基金委员会成立 15 周年及 CUSBEA 实施 20 周年,由北京大学、吴瑞协会、国家自然科学基金委员会、科技部、教育部等单位联合举办的“21 世纪生物科学前沿论坛”报告会于 2001 年 6 月 21—25 日在北京大学交流中心会议厅举行,北京大学副校长陈章良教授主持了开幕式,北京大学校长许智宏院士、国家自然科学基金委员会副主任朱作言院士、科技部前部长朱丽兰、教育部副部长韦钰、诺贝尔奖获得者 Joseph Goldstein 博士、Michael Brown 博士、Phillip Sharp 博士、康奈尔大学吴瑞博士、吴瑞协会董事会的有关成员等出席了开幕式。许智宏校长、朱作言副主任、Joseph Goldstein 博士、Michael Brown 博士、Phillip Sharp 博士等在开幕式上作了重要讲话,近百名海外青年科学家和数百名国内学者参加了会议。

诺贝尔奖获得者 Joseph Goldstein 博士、Michael Brown 博士、Phillip Sharp 博士在大会上作了主题发言,近百名青年学者作了专题报告,内容涉及信号传导、转录及转录后修饰、细胞粘附、细胞迁移和细胞骨架、神经细胞的发育和功能、神经细胞的死亡与疾病、凋亡、干细胞生物学、细胞命运调控、植物生物学、免疫学和基因组学等生命科学的前沿领域,与会

的国内代表普遍反映这些报告在一定程度上反映了这些领域的最高水平。

会议期间,国家自然科学基金委员会生命科学部副主任杜生明向海外学者介绍了国家自然科学基金委员会的情况,并着重介绍了生命科学部“十五”优先资助发展领域的情况,吴瑞协会董事会的成员及部分青年学者就此展开了讨论,并提出了十分中肯和宝贵的意见。这些意见对生命科学部确定“十五”优先资助领域具有重要的参考价值。另外,国家自然科学基金委员会生命科学部的有关工作人员还介绍了生命科学部近年支持国际合作与交流的情况,并就海外学者感兴趣的问题进行了讨论。双方经过讨论,达成了今后进一步开展合作的协议:双方初步拟定今后每 2 年共同举办一次生命科学某一领域的专题学术研讨会,以促进相关领域的海内外专家及时交流;国家自然科学基金委员会生命科学部将继续邀请部分海外优秀学者参加国家自然科学基金的年度评审专家会,并将逐步邀请优秀的海外学者参加国家自然科学基金重点项目、杰出青年基金的函评工作。

(生命科学部 吕群燕 供稿)