

适用于粉红粘帚霉绿色荧光标记的重组质粒的构建及应用

牛秋红, 柯涛, 张林, 惠丰立, 陈吉宝

南阳师范学院生命科学与技术学院, 南阳 473061

摘要: 【目的】构建含有完整的绿色荧光蛋白 (Green Fluorescence Protein, GFP) 和潮霉素抗性基因的表达式粒, 观察该质粒在丝状真菌粉红粘帚霉中的表达。【方法】采用 PCR、酶切、去磷酸化、酶连、转化等多种分子生物学手段, 利用原生质体制备及转化的方法将其转入机会真菌粉红粘帚霉中, 并在荧光显微镜下观察表达情况。【结果】成功构建了用于真菌标记的真核表达载体 pANGH3, 将其转化粉红粘帚霉后, 在荧光显微镜下观察到菌丝有绿色荧光产生。【结论】重组质粒 pANGH3 的成功建立及其在染粉红粘帚霉中的表达, 为研究真菌侵染机理的模型奠定了实验基础。

关键词: 绿色荧光蛋白, 质粒, 真菌, 原生质体制备, 转化

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011)07-0991-07

绿色荧光蛋白 (Green Fluorescence Protein, GFP) 来源于海洋生物水母^[1], 近年来在微生物学和细胞生物学中成为广泛应用的标记性蛋白质之一^[2-7]。作为报告基因, *gfp* 具有很多优良的特性: (1) GFP 荧光反应不需要外加底物和辅助因子, 灵敏度高; (2) GFP 对光漂白有较强的耐受性, 能耐受长时间的光照; (3) GFP 的表达几乎不受种属范围的限制; (4) GFP 分子量较小, 与目的基因融合后, 对目的基因的结构功能没有影响, 大量表达对细胞也无毒性作用, 细胞仍可连续传代培养, 更能使结果接近自然真实的状态。上述特性使得 GFP 作为分子标记物得到广泛的应用^[8-10]。GFP 分子标记法已成为研究微生物在环境中存活、繁殖、扩展以及空间定位的重要手段。

粉红粘帚霉 (*syn. Gliocladium roseum*) 异名粉红螺旋聚孢霉 (*Clonostachys rosea*) 是一种重寄生真菌

(hyperparasites), 能够寄生于其它真菌而营寄生生活。长期以来, 粉红粘帚霉作为植物病原真菌的生防菌被广泛应用, 能有效地抑制病原真菌的扩展和危害^[11-13]。它还是植物寄生线虫的重要天敌, 能够寄生线虫的幼虫、雌虫和卵, 对控制线虫种群数量起一定的作用^[14]。此外粉红粘帚霉能在植物根部组织中生存, 对植物的生长具有一定的促进作用^[15-16]。然而, 粉红粘帚霉是如何寄生其它真菌并在宿主体内生长繁殖的? 作为一种没有捕食器官的机会真菌, 它又是如何侵染线虫的? 粉红粘帚霉对植物的生长促进作用的机制是什么? 是否与其对植物病原真菌的侵染和对植物寄生线虫的杀灭有关联? 要研究这些科学问题, 我们就需要一种容易观察的标记质粒做为工具。

本文利用 PCR、酶切、去磷酸化、酶连、转化等多种分子生物学手段, 得到了一个绿色荧光蛋白标

基金项目: 校专项人才启动基金 (ZX2011004)

作者简介: 牛秋红 (1979 -), 女, 河南省焦作人, 讲师, 博士, 从事病原细菌与宿主之间的相互关系研究。Tel/Fax: +86-377-63525086; E-mail: qiuqiu@yaho.com.cn

收稿日期: 2011-01-04; 修回日期: 2011-03-07

记质粒 pANGH3, 该质粒含有完整的绿色荧光蛋白真核表达元件和潮霉素抗性表达元件, 且该质粒的启动子强度大、有广泛的宿主范围, 因而, 理论上该质粒适用于广泛的潮霉素敏感型的真菌。将该质粒转化粉红粘帚霉, 得到了成功表达。本研究结果为下一步观察粉红粘帚霉在植物根部的分布情况, 研究粉红粘帚霉侵染宿主的机理提供了有力的工具, 为筛选和开发出更有针对性和适于规模化生产和应用的生防制剂奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: *Taq* 酶、限制性内切酶、PCR Fragment Recovery Kit (TaKaRa); 引物合成及序列测定 (Invitrogen); PCR 仪、核酸电泳仪、紫外凝胶成像分析系统 (Biorad)、各型规格移液器 (Eppendorf); 小型离心机 (Eppendorf 5418)。

1.1.2 菌株和质粒: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 用于质粒扩增和分子克隆等操作过程。质粒 pAN52-1N 由荷兰营养与食品研究院 (TNO Nutrition and FoodResearch Institute, Zeist, The Netherlands) 的 P. J. Punt 教授赠送。该质粒含有构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 的三磷酸甘油醛脱氢酶基因的启动子 *Pgpd* 和 *trpC* 基因的终止子 *TtrpC*^[17]。含潮霉素抗性基因 *hph* 的质粒 pBS/SK-*hph* 由西南农业大学生物技术研究中心的张永军博士提供。pEGFP-C1 (BD Biosciences Clontech, CA, USA) 含有增强型绿色荧光蛋白基因 *egfp*。pMD18-T 载体 (TaKaRa) 用于测序和验证目的序列。

1.2 实验流程设计

图 1 为本实验的方法和过程。

1.3 pANG18 质粒的构建

从 NCBI 数据库中搜索获得 pEGFP 质粒序列, 在 EGFP 的编码基因两端引入 *Nco* I 酶切位点, 设计引物为: GFP 上游 (*Nco* I): 5'-ATCGCCA-TGCTGAGCAAGGGCGAG-3'; GFP 下游 (*Nco* I): 5'-ATCGCCATGGCTTGTACAGCTCGTCC-3'。将 PCR 产物的回收片段连接到 pMD18-T 载体上后再进行酶切反应, 将 EGFP 片段去磷酸化, 并与 *Nco* I 酶切质粒 pAN52 产物连接。

1.4 酶切验证连接方向

由于是单酶切产物相连, 对连接方向有必要进行验证, 具体通过酶切和 PCR 双重验证。(1) 酶切验证: *Bsp*1407 I 在 pAN52 上的酶切位点为 1422; 在 *gfp* 上的酶切位点为 717; *Nco* I 在 pAN52 上的酶切位点为 2305; 而 EGFP 片段总长 724 bp。如果是正向插入, 用 *Bsp*1407 I 切出的片段大小应该为 $2305 - 1400 + 717 = 1600$; 如果是反向插入, 用 *Bsp*1407 I 切出的片段大小应该为 $2305 - 1422 + 724 - 717 = 889$ 。(2) PCR 验证: 分别采用 EGFP 基因的上下游引物为上游, 用 *TrpC* 的下游引物为下游, 设计了 2 组 PCR 实验 (图 2), 用于验证 EGFP 基因在 pAN52 酶切片段上的插入方向。

1.5 pANGH3 质粒的构建

用 *Xba* I 对质粒 SK-*hph* 进行单酶切, 得到含有启动子 *PgpdA* 和终止子 *TrpC* 的潮霉素基因片段, 去磷酸化后与质粒 pANG18 的 *Xba* I 酶切产物相连。将连接产物转化 *E. coli* DH5 α , 对阳性转化子利用 PCR 验证: 在 *PgpdA* 下游 100 bp 左右和 *TrpC* 上游 100 bp 左右处设计引物, 进行 PCR, 由于 *gfp* (0.75 kb) 和 *hph* (1 kb) 都是用 *pgpdA* 启动子和 *TrpC* 终止子, 所以预期出现 2 条带, 并且大小分别为 1 kb 和 1.2 kb 左右。

1.6 粉红粘帚霉原生质体的制备及转化

将出发菌株接种到 PDA 平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养 5 d 后, 收集其孢子接种到装有 500 μ L TG 液体培养基的 1.5 mL 离心管中, 26 $^{\circ}$ C, 180 r/min 培养 36 h; 3000 \times g 离心 5 min 收集菌丝体, 并用 500 μ L MN buffer (0.3 mol/L MgSO₄, 0.3 mol/L NaCl) 洗涤菌丝 2 次; 取适量菌丝体悬浮于 500 μ L 细胞壁降解酶液 (MN 液中含有 5 mg/mL snailase 和 5 mg/mL cellulose) 中, 28 $^{\circ}$ C, 180 r/min 酶解过夜; 3000 \times g 离心 10 min 收集原生质体, 加入 500 μ L KTC buffer (1.2 mol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 50 mmol/L CaCl₂), 洗涤菌丝 2 次, 最后将原生质体悬浮于 100 μ L KTC 溶液中备用。

上述转化实验参考了文献所述的方法^[18-20]。

1.7 pANGH3 质粒在真菌中的表达

转化子菌落出现后, 将其分别转移到 PDA 斜面上进行纯培养, 连续传代 5 次, 利用荧光显微镜观察 GFP 的表达情况。

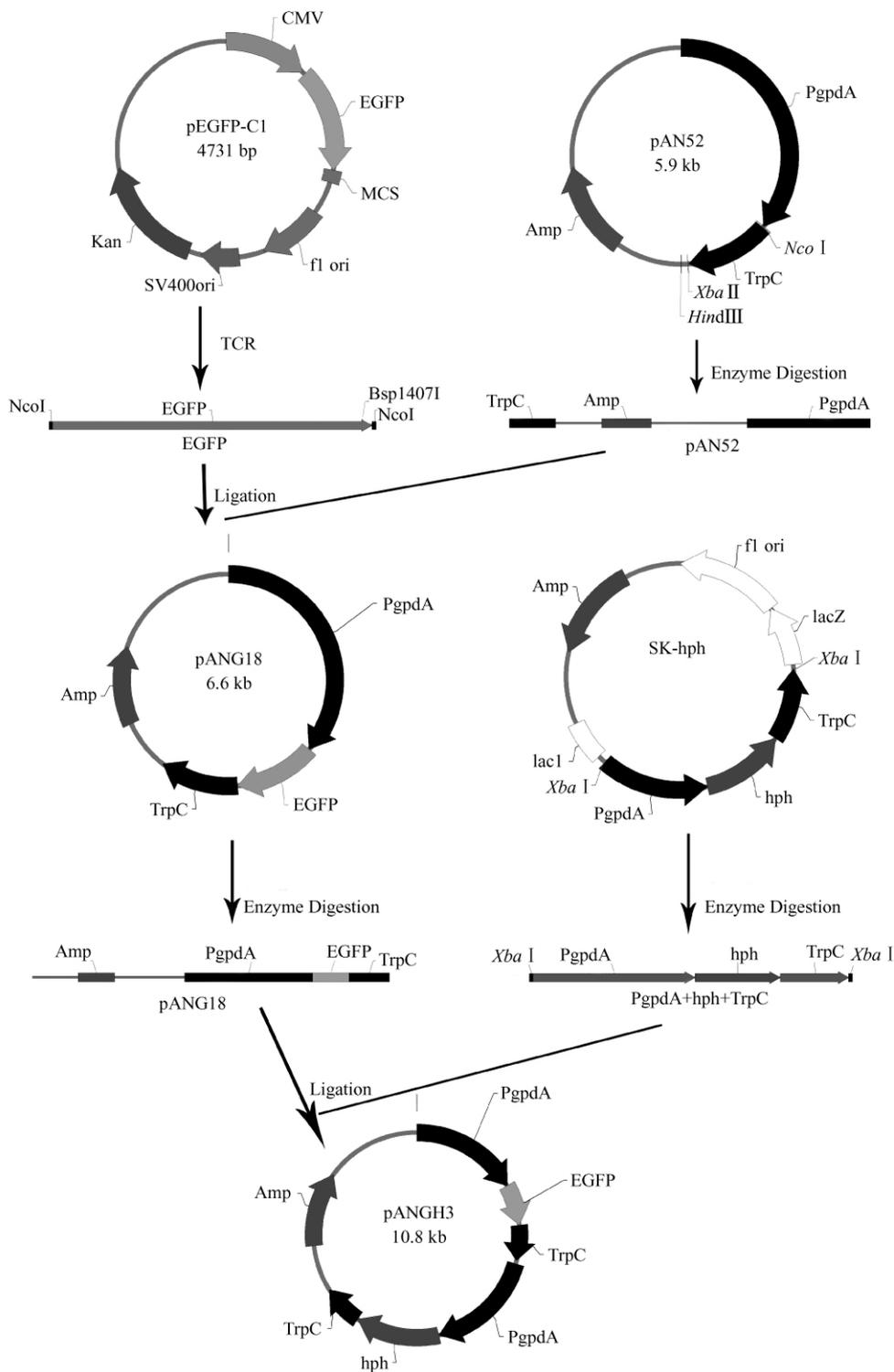
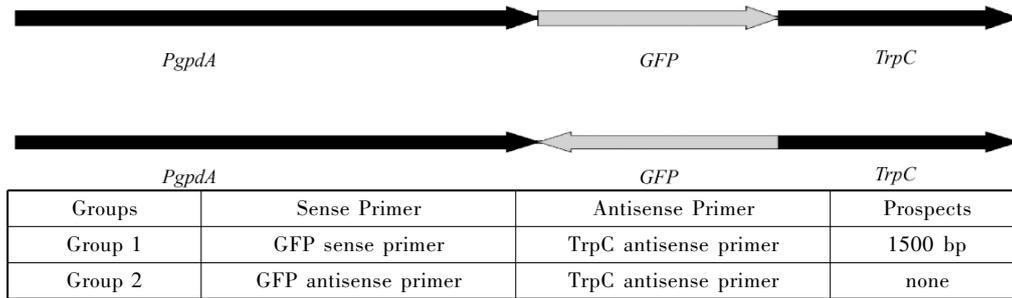


图 1 质粒构建的过程

Fig. 1 The process of plasmid construction.

图2 *egfp* 基因插入方向验证方案Fig. 2 The scheme of investigation on insertion direction of *egfp*.

2 结果

2.1 pANGH3 质粒构建

2.1.1 EGFP 基因片段的获得与连接: PCR 大小与预期结果一致,经测序为正确的 EGFP 基因。通过 *Nco*I 酶切片段的结果,验证该基因与 pAN52 质粒成功连接。

2.1.2 EGFP 基因的片段插入 pAN52 质粒方向的验证:通过 *Bsp*1407I 酶切,18 号转化子切出了约为 1600 bp 的片段,显示该转化子为正向插入,而 19、20 号转化子切出大约 900 bp 的片段,显示这两个转

化子为反向插入(图 3-A)。对 18 号转化子用 PCR 进行进一步验证,组 1 克隆出 1500 bp 大小的片段,而组 2 的结果为阴性,证明该转化子确实为正向插入(图 3-B),将该质粒命名为 pANG18。

2.1.3 潮霉素基因片段的获得与连接:利用 *Xba* I 酶切 SK-hph 质粒得到了大小约为 4 kb 和 3 kb 的两个片段,其中 4 kb 的片段为潮霉素抗性基因片段(图 3-C)。PCR 验证潮霉素抗性基因与 pANG18 质粒的 *Xba* I 酶切产物的连接结果见图 3-D,如预期所示,两个 PCR 产物条带大小分别约 1100 bp 和 1200 bp,从而表明潮霉素抗性基因正确连接到 pANG18 质粒中,最终成功构建了质粒 pANGH3。

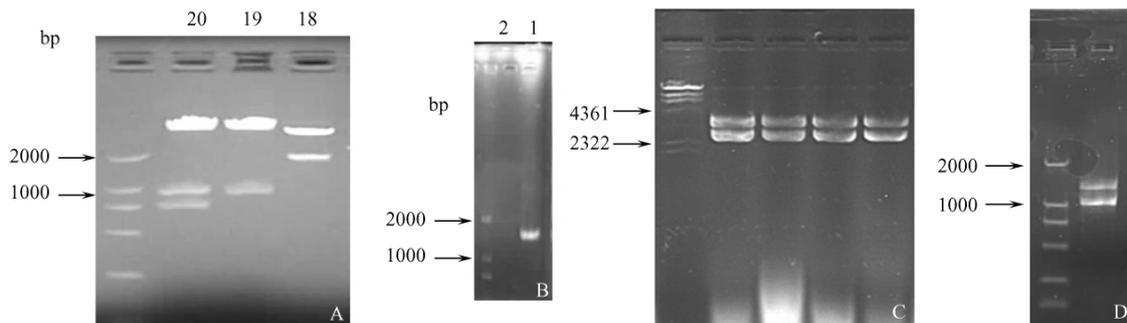
图3 *egfp* 基因的片段插入质粒 pAN52 方向验证及潮霉素基因 *hph* 的扩增与连接

Fig. 3 Analysis of insertion direction of *egfp* in plasmid pAN52 and results of amplification of gene *hph* and its ligation. A: Results of restriction enzyme digestion showed that No. 18 was positive insertion, and No. 19 and No. 20 were both reverse insertion; B: As respected, the insertion direction of No. 18 was right by further PCR investigation; C: The plasmid SK-hph was digested into two fragments by restriction enzyme *Xba* I, and the sizes were respectively 4 kb and 3 kb. Among them, the 4 kb fragment was the *hph* gene; D: The gene *hph* was succeeded in inserting into plasmid pANG18 by PCR results.

2.2 pANGH3 质粒在真菌中的表达

转化子均表现出对潮霉素抗性的稳定性,并且 *egfp* 基因也可稳定表达,在 PDA 平板上传 5 代后仍可以检测到绿色荧光(图 4)。

3 讨论

该实验中,得到含有 *Nco*I 酶切位点的 EGFP 基

因的片段后,并没有直接进行酶切,而是将该片段连接到 pMD18-T 载体上后,才进行酶切反应。其原因是:如果直接酶切的话,两端被切掉的片段很小,只有 8 个 bp,只凭借琼脂糖凝胶电泳不能分辨出酶切是否成功。将该片段连接到 pMD18-T 载体上,可以直观的检测到该步的酶切效果,保证下一步酶连的正确实施。

由于质粒及连接片段的限制,该实验中的两次

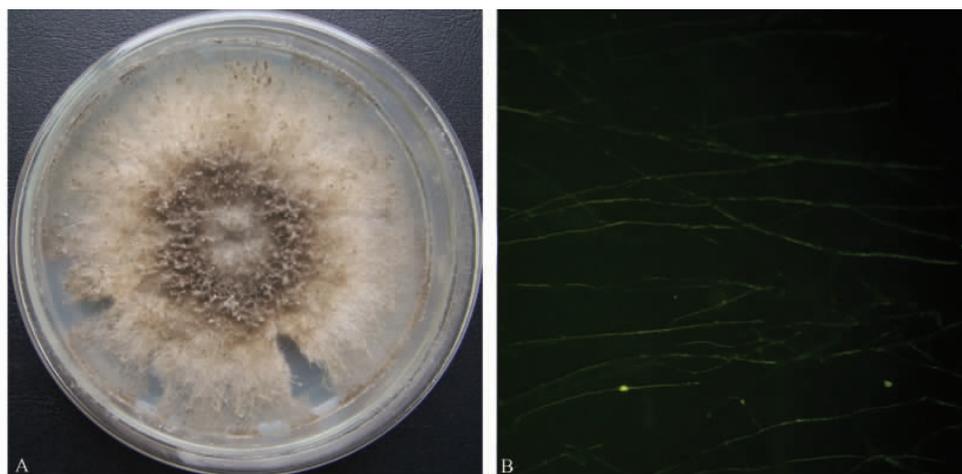


图 4 转化子的菌落特征及在荧光显微镜下的菌丝特征

Fig. 4 Colony morphology of the transformant 611g and the characterization of mycelia under the fluorescence microscopy. A: Colony morphology of the transformant; B: Mycelia of the transformant 611g after five transfers, observed under the fluorescence microscopy.

本研究中,EGFP 片段与 pAN52 酶切片段的连接、潮霉素基因片段与 pANG18 酶切片段的连接均为单酶切连接,然而,由于 EGFP 片段是插入到 pAN52 质粒的 PgpdA 启动子和 TrpC 终止子之间的,为了确保 EGFP 基因的正确表达,必须对 EGFP 片段进行插入方向的验证。而潮霉素基因片段本身包含了完整的启动子、抗性编码基因、终止子,其插入方向并不影响基因的表达,故不用验证插入方向。

日益增加的有关真菌基因的文献提供了一般的规律,即在丝状子囊菌及相应半知菌(无性阶段)内,真菌启动子有广泛的宿主范围^[21]。本实验构建的质粒的启动子为来源于构巢曲霉的 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 *gpdA* 的启动子 PgpdA,该启动子在许多丝状真菌如青霉、曲霉等中均有活性,任志红^[22]等对几种真核启动子在产黄青霉中效率评价,结果发现 PgpdA 启动子启动基因表达能力最强,因此推测本文中构建的质粒可能广泛适用于对潮霉素抗性敏感的丝状真菌。

重要酶切反应均为单酶切。单酶切的片段给后续的连接过程带来了一定的困难,单酶切得到的片段在酶连过程中极易造成自连,表现为转化出的结果基本上都是空载体,令酶连失败。解决这一问题的有效手段是将小的目的片段进行去磷酸化反应,本实验中的体会为:虽然去磷酸化造成了一定的 DNA 损失,但是正确的去磷酸化操作可以在很大程度上避免自连现象的产生,大大提高了连接效率。

综上,本研究利用 PCR、酶切、去磷酸化、酶连、转化等多种分子生物学手段,得到了用于标记真菌的质粒 pANGH3,该质粒含有完整的 GFP 真核表达系统和潮霉素抗性,并将该质粒成功在机会真菌粉红粘帚霉中得到成功表达,为进一步观察粉红粘帚霉在植物根部的分布情况,研究该病原真菌感染宿主的分子机制提供了有力的工具,并为将来筛选和开发更有针对性和适于规模化生产及应用的生防制剂奠定了理论基础。由于该质粒的启动子有很宽的宿主范围,推测其可以广泛适用于真菌,有望成为研究真菌在环境中存活、繁殖、扩展以及空间定位等的重要工具。

参考文献

- [1] Johnson FH, Shimomura O, Saiga Y. Action of cyanide on *Cypridina luciferin*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 1962, 59(3): 265-272.
- [2] Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*,

- 1996, 173: 33-38.
- [3] Valdivia RH, Hromockyj AE, Monack D, Ramakrishnan L, Falkow S. Application for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interactions. *Gene*, 1996, 173: 47-52.
- [4] Gage DJ, Bobo T, Long SR. Use of green fluorescent protein to visualize early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfalfa. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178: 7159-7166.
- [5] Epel BL, Padgett HS, Heinlein M, Beachy RN. Plant virus movement protein dynamics probed with a GFP protein fusion. *Gene*, 1996, 173: 75-79.
- [6] Qazi SN, Rees CE, Mellits KH, Hill PJ. Development of *gfp* vectors for expression in *Listeria monocytogenes* and other low G + C gram positive bacteria. *Microbial Ecology*, 2001, 41(4): 301-309.
- [7] 姚震生, 陈中义, 陈志谊, 郑小波, 张杰, 黄大昉. 绿色荧光蛋白基因标记野生型生防枯草芽胞杆菌的研究. *生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)*, 2003, 19(5): 551-555.
- [8] Olofsson AC, Zita A, Hermansson M. Floc stability and adhesion of green-fluorescent-protein-marked bacteria to flocs in activated Sludge. *Microbiology*, 1998, 144(2): 519-528.
- [9] Unge A, Tombolini R, Molbak L, Jansson JK. Simultaneous monitoring of cell number and metabolic activity of specific bacterial populations with a dual *gfp-luxAB* marker system. *Applied and environmental microbiology*, 1999, 65(2): 813-831.
- [10] Parry JD, Heaton K, Drinkall J, Jones HL. Feasibility of using GFP expressing *Escherichia coli*, coupled with fluorimetry, to determine protozoan ingestion rates. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 35(1): 11-17.
- [11] 何迎春, 高必达. 立枯丝核菌的生物防治. *中国生物防治 (Chinese Journal of Biological Control)*, 2000, 16: 31-34.
- [12] 莫明和, 董林茜, 迟胜起, 张克勤. 立枯丝核菌重寄生真菌的筛选. *植物病理学报 (Acta Phytopathologica Sinica)* 2002, 32(1): 84-88.
- [13] Vaili NG. Biological seed treatment of corn with mycopathogenic fungi. *Journal of Phytopathology*, 1992, 134: 313-323.
- [14] Hay FS, Skipp RA. Fungi and actinomycete associated with cysts of *Heterodera trifolii* Goffart (Nematoda: *Tylenchida*) in pasture soils in New Zealand. *Nematologica*, 1993, 39: 376-384.
- [15] 肖盛元, 郭顺星, 杨俊山. 粉红粘帚霉菌丝体化学成分研究. *菌物系统 (Mycosystema)* 2001, 20(4): 536-538.
- [16] 王春兰, 张集慧, 郭顺星, 杨俊山, 肖培根. 粉红粘帚霉化学成分的研究. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2001, 28(4): 42.
- [17] Punt PJ, Dingemans MA, Kuyvenhoven A, Soede RD, Pouwels PH, van den Hondel CA. Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene*, 1990, 93(1): 101-109.
- [18] Lu S, Lyngholm L, Yang G, Bronson C, Yoder OC, Turgeon BG. Tagged mutations at the *Tox1* locus of *Cochliobolus heterostrophus* by restriction enzyme-mediated integration. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(26): 12649-12653.
- [19] Tunlid A, Ahman J, Oliver RP. Transformation of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 173(1): 111-116.
- [20] Xu J, Mo MH, Huang XW, Zhang KQ. Improvement on genetic transformation in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* and its quantification on dung samples. *Mycopathologia*, 2005, 159(4): 533-538.
- [21] 梁平彦. 丝状真菌的质粒、原生质体转化和外源基因表达. *生物工程进展 (Biotechnology Progress)*, 1992, 12(1): 21-28.
- [22] 任志红, 徐平, 王富强, 苏彩云, 丰玫玫, 张佳, 戴梦, 韦春玲, 穆岷, 贺建功. 产黄青霉工业生产菌种基因报告系统的构建及启动子效率的评价. *菌物学报 (Mycosystema)*, 2005, 24(3): 376-384.

Construction of a recombination plasmid labelled with green fluorescence and its application in *Clonostachys rosea*

QiuHong Niu^{*}, Tao Ke, Lin Zhang, Fengli Hui, Jibao Chen

School of life science and technology, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China

Abstract: [Objective] We constructed a recombinant eukaryotic expression vector harboring green fluorescent protein (GFP) and the hygromycin resistance gene *hph*, and observed its expression in *Clonostachys rosea*. [Methods] We used PCR, enzyme digestion, phosphorylation, ligation and transformation to construct the plasmid. Using protoplast preparation and transformation technologies, we expressed the plasmid in the fungi *C. rosea*. [Results] We created the eukaryotic expression vector, transformed it into *C. rosea* and observed green fluorescence with fluorescence microscope. [Conclusion] The successful construction of the pANGH3 recombinant plasmid and its expression in *C. rosea* establishes a new model for studying fungal infection mechanisms.

Keywords: green fluorescent protein, plasmids, fungus, protoplast generation, transformation

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Research Fund for the Doctoral Start-up of Higher Education of China (ZX2011004)

^{*} Corresponding author. Tel/Fax: +86-377-63525086; E-mail: qiuHongniu@yahoo.com.cn

Received: 4 January 2011 / Revised: 7 March 2011

本刊为了加强对综述投稿的管理,在2010年10月30日召开的《微生物学报》第九届编委会第四次会议上,讨论通过对综述类投稿的要求,增加了作者数量和第一作者的要求。2003年4月本刊出台了综述类投稿的具体要求(6条),坚持实行“Mini Review”的原则,在此基础上又增加了2条。下面就是最新修订的具体要求,欢迎大家根据要求踊跃投稿。感谢大家对《微生物学报》的支持!

《微生物学报》综述文章投稿要求

2010年11月修订

为了避免篇幅庞大、罗列文献、内容空泛、缺乏观点,力求内容更加新颖、并更具可读性,本刊对综述类投稿提出以下几点要求。

1. 本刊主要刊登微型综述(mini review),来稿字数最好控制在5000字以内(不包括参考文献)。
2. 综述的选题要有新意,对读者及同行确有一定的启发作用和参考价值。
3. 参考文献应控制在40篇以内,近3年发表的文献不少于10篇。
4. 应结合文献扼要评述国内外学者在本领域的研究进展,不要泛泛罗列文献,只述不评。
5. 应结合自己的研究工作,就该研究领域存在的问题和解决的途径提出自己的观点。
6. 综述文章不同于研究报告,规定作者的数量应不多于3人。
7. 要求文章的第一作者提供一份不少于200字的研究经历的简介。
8. 欢迎投送“能够反映国际研究热点、对学科发展有指导意义”的述评类文章。