

表达绿色荧光蛋白重组乳酸杆菌的 构建及电击转化条件

田兴山¹, 张玲华^{1,2}, 周凤珍¹, 李国立¹, 孙晓刚¹

(1 广东省农业科学院 农业生物技术研究所, 广东 广州 510640; 2 华南理工大学 生物工程学院, 广东 广州 510640)

摘要:应用 DNA 重组技术构建了表达绿色荧光蛋白(GFP)的重组乳酸杆菌. 将 pGFP2 质粒中的绿色荧光蛋白基因切下, 克隆进表达载体质粒 pThioHisB 的 *Nco*I 和 *Sac*I 位点之间, 构建成重组表达质粒 pThioGFP, 然后转化大肠杆菌 BL21. 从 BL21 中提取重组质粒, 用电击法转化乳酸杆菌 *Lac*1001, 当细菌处于 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.6 的生长期时, 使用 PEB 作为电击缓冲液, 对 100 μL 体积的细胞悬液在电容 25 μF , 电阻 200 Ω , 电压 2.2 kV 的电击条件进行完整质粒转化可得到较高的转化率. 电击转化后 *Lac*1001 于 LB 培养基上呈绿色, 在荧光透射仪下观察, 整个菌体发绿色荧光. 构建的重组乳酸杆菌能够稳定表达绿色荧光蛋白.

关键词:绿色荧光蛋白; 重组乳酸杆菌; 质粒构建; 电击

中图分类号: S852.6

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2005)03-0117-03

Construction of recombinant *Lactobacillus* expressing green fluorescent protein gene and transformation conditions by electroporation

TIAN Xing-shan¹, ZHANG Ling-hua^{1,2}, ZHOU Feng-zhen¹, LI Guo-li¹, SUN Xiao-gang¹

(1 Bio-Tech Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;

2 College of Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: A recombinant *Lactobacillus* expressing green fluorescent protein (GFP) gene was constructed using recombinant DNA techniques. The GFP gene was excised from plasmid pGFP2 and subcloned into expression vector pThioHisB as an *Nco*I / *Sac*I fragment. The resulting recombinant plasmid was named as pGhisGFP and then transformed into the BL21 strain of *E. coli*. The recombinant plasmid pThioGFP was extracted from the BL21, and then transformed into *Lactobacillus* by electroporation. The optimum parameters for electroporation were: $D_{600\text{nm}}$ 0.6, voltage 2.2 kV, buffer PEB, 100 μL cell volume. The recombinant bacterial grew on LB plate as green colonies, and the results showed that the GFP gene was expressed stably in the host bacterial (*Lac*1001).

Key words: green fluorescent protein; recombinant *Lactobacillus*; plasmid construction; electroporation

绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 是海洋中无脊椎动物体内 (如水母) 的一种天然蛋白, 相对分子质量为 27 000, 由 238 个氨基酸组成. 该蛋白 65~67 位 Ser、Thr、Gly 3 种氨基酸环化加氧形成特殊的生色团结构. GFP 是生物发光过程中能量转移的最后受体, 接受来自动物体内的荧光素酶氧化荧光素激发态复合物或转移钙依赖光蛋白释放的能

量, 从而发出绿色荧光. GFP 标记系统具有标记基因小 (约 1 kb), 直接肉眼检测荧光、对细胞安全、稳定等优点^[1], 已被成功用于微生物定殖^[2]、对宿主组织侵染^[3]、微生物动态监测^[4]、基因表达调控^[5-9] 等研究. 作为动物肠道内的有益微生物, 利用表达 GFP 的重组乳酸杆菌, 不需染色便可直接通过荧光透射仪分析重组菌与宿主免疫系统相互作用的规律. 为

收稿日期: 2004-06-17

作者简介: 田兴山 (1964-), 男, 副研究员, 博士; E-mail: xstian@tom.com

基金项目: 广州市科技攻关重点项目 (2003Z2-E0221); 广东省农业项目 (2003B21403)

此,本研究将GFP基因插入表达载体 pThioHisB 中构建重组质粒,然后转化大肠杆菌 BL21,最后用电击法转入乳酸菌 *Lac1001*。经试验证明,本试验构建的重组菌能够稳定表达绿色荧光蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 BL21、乳酸杆菌 *Lac1001*、pThioHisB 质粒、pGFP2 质粒由广东省农业科学院农业生物技术研究所保存。

1.1.2 工具酶、试剂盒 T₄DNA 连接酶、限制性内切酶等购自 BioLab 公司,质粒小量提取、DNA 凝胶回收试剂盒为杭州维特洁生化技术有限公司产品。

1.1.3 其他生化试剂 酵母抽提物、蛋白胨为美国 Sigma 公司产品。

1.1.4 电击缓冲溶液 PEB 液,按 Partizia 等^[1]方法。

1.2 方法

1.2.1 重组 DNA 的常规技术 质粒的提取及纯化,质粒的酶切、连接及回收,质粒转化细菌和感受态细胞的制备均参考文献[8]方法进行。

1.2.2 含有 GFP 基因重组表达质粒 pThioGFP 的构建及筛选 将含有 GFP 基因的质粒 pGFP2 和表达载体质粒 pThioHisB 分别用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Sac* I 消化(37 °C 2 h),经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳(100 V、2 h)后,切下凝胶中约 791 bp GFP 基因和线性化的 pThioHisB。将切下的 DNA 片段用 DNA 凝胶回收试剂盒回收,回收的线性化质粒 pThioHisB 与 GFP 以 1:3(物质的量比)混合,加入 T₄DNA 连接酶,16 °C 过夜。连接产物用 CaCl₂ 转化法转化大肠杆菌 BL21,将感受态 BL21 及转化后的 BL21 分别涂布 LB 平板,37 °C 培养过夜,观察对照板(感受态 BL21 菌)上无细菌,而转化后的 BL21 LB 板上有细菌。挑取单个菌落,于荧光透射仪下观察,有荧光的菌落则为阳性克隆,将其携带的重组质粒命名为 pThioGFP。

1.2.3 重组质粒 pThioGFP 的酶切分析 小量培养 BL21 阳性转化子,用质粒小量提取试剂盒制备质粒 DNA,取 10 μL,用 *Nco* I 和 *Sac* I 双酶消化,同时将 pGFP2 及 pThioHisB 以相同酶消化(37 °C 2 h),经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳(100 V 2 h)后,观察结果。

1.2.4 重组乳酸杆菌 *Lac1001* 的构建 培养大肠杆菌 BL21 阳性转化子,从中提取重组质粒 pThioGFP。

使用美国 Bio-Rad 公司的基因脉冲仪(GenePulser)和脉冲控制器(Pulse controller)进行电击转化。将 *Lac1001* 单菌落接入 5 mL LB 培养基中,37 °C 振荡

培养过夜。以 10 g/L 的接种量转接至 50 mL LB 中,250 r/min 摇菌至所需 $D_{600\text{nm}}$ 值,取下置于冰水浴中数分钟,以 4 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 50 mL 电击缓冲液悬浮,洗涤 2 次。最后悬浮于 0.5 mL 同一电击缓冲液中。加入 pThioGFP 质粒 DNA 使其终质量浓度为 0.25 μg/mL,置冰浴数分钟,加入 0.2 cm 的电击杯中,设置电击电压、电容等参数,电击完毕后在杯中加入 1 mL SOC 培养基,37 °C 150 r/min 培养 2~3 h。取 100 μL 涂布于含氨苄(100 μg/mL)的 LB 平板上,培养 16~24 h。于荧光透射仪下观察,有荧光的菌落则为阳性克隆。计数阳性转化子并对不同条件下得到的转化频率进行比较分析。

从 *Lac1001* 阳性转化子中提取重组质粒,进行酶切鉴定。

1.2.5 绿色荧光蛋白 GFP 的稳定性表达 将重组菌 *Lac1001* (pThioGFP)用 LB 液体和固体培养基过夜培养,观察细菌颜色,并将重组菌 *Lac1001* 反复传代培养 10 次,于荧光透射仪下观察,观察绿色荧光蛋白 GFP 表达的稳定性。

2 结果与分析

2.1 重组表达质粒 pThioGFP 的构建与鉴定

表达性质粒 pThioHisB 的 P_{trc} 启动子的下游有 1 个多克隆位点,用 *Nco* I 和 *Sac* I 消化后,将回收的 GFP 基因定向地插入表达载体,构建成融合蛋白表达质粒 pThioGFP,转化大肠杆菌 BL21,提取重组质粒 pThioGFP,用 *Nco* I 和 *Sac* I 双酶消化,载体质粒 pThioHisB 及 pGFP2 用 *Sac* I 酶消化作对照,电泳结果显示:从重组质粒中能切出约为 791 bp 的条带,表明 GFP 基因已被克隆入载体质粒中。

2.2 重组乳酸杆菌 *Lac1001* 的电击转化及鉴定

2.2.1 影响电击法转化率的因素 *Lac1001* 的生长时期对转化率表现出较大的影响,当 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.6 时的转化率最高,为 1 μg DNA 获得 3.2×10^4 转化子,随着 *Lac1001* 培养时间的延长,电击转化率反而下降,说明使用处于对数生长期的细胞可以获得较高的转化效果。电压 2.0 kV,电阻 200 Ω,电容 25 μF,电击反应体积 100 μL 条件下的转化,随着 $D_{600\text{nm}}$ 增大,转化率也升高,当 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.6 时,转化率最高,达到 1 μg DNA 获得 3.2×10^4 转化子,再继续提高 $D_{600\text{nm}}$,则转化率又下降。

用不同体积的细菌细胞做转化,发现维持一定的反应体积对电击转化有一定的影响。用 20 μL 细胞时,几乎得不到转化子,当体积增大到 50~200 μL 时,就能得到有效的转化。电压 2.0 kV,电阻 200 Ω,

电容 25 μF , 电击反应体积 100 μL 条件下的转化结果发现:电击反应体积过高或过低,都会影响转化率,当反应体积在 100 μL 时,转化率最高,1 μg DNA 获得 4.8×10^4 转化子。

固定其他参数,仅改变电压,对乳酸杆菌进行电击转化,转化率随电压的增加而增加。当电压为 2.2 kV 即场强为 11.0 kV/cm 时,获得最高转化率,1 μg DNA 获得 14.8×10^4 转化子,电压继续增加,转化率则急剧下降。这种转化频率随电压的变化,说明了较低的电压不足以将外源 DNA 导入细胞中,而电压过高则会对细胞造成较大的伤害,使细胞死亡率过高,有效转化频率反而降低。因此适当的电压也是影响电击转化效率的关键因素之一。

2.2.2 重组乳酸杆菌 *Lac1001* 的鉴定 将电击转化子培养后,提取重组质粒 pThioGFP,用 *Nco* I 和 *Sac* I 双酶消化,载体质粒 pThioHisB 及 pGFP2 用同样的酶消化作对照,电泳结果表明:从重组质粒中能切出约为 791 bp 的条带,表明重组质粒已被导入乳酸杆菌中。

2.3 重组蛋白的表达

重组菌于 LB 液体中过夜培养,菌液呈绿色;重组菌于 LB 固体培养基上过夜培养,菌落亦呈绿色(图 1),可见 GFP 蛋白已在乳酸杆菌中表达。



图1 液体培养基中含 GFP 的乳酸菌和未重组乳酸菌的荧光照片

Fig. 1 Recombinant *Lactobacillus* showing green fluorescence

3 结论

要获得表达 GFP 基因的重组乳酸杆菌,建立有效的基因转化技术是分子遗传研究的必要前提,笔者以乳酸杆菌为对象,初步研究了乳酸杆菌高效电

击转化的条件。试验结果发现:用电击法转化乳酸杆菌,当细菌处于 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.6 的生长期时,使用 PEB 作为电击缓冲液,对 100 μL 体积的细胞悬液在电容 25 μF ,电阻 200 Ω ,电压 2.2 kV 的电击条件进行完整质粒转化可得到较高的转化率。电击其他转化条件的优化工作正在进行中,可望使转化率得到进一步提高,为进一步研究微生态制剂的作用机制打下良好的基础。

参考文献:

- [1] CHALFIE M, TU Y, EUSKIRCHEN G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. *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 meliati* and alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(24): 7 159-7 166.
- [3] CHEN Y, XIA X Q, LU C P. Antigen uptake and dynamic distribution of green fluorescent protein marked *Aeromonas hydrophila* in fish[J]. *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 actinolate sludge communities[J]. *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[J]. *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*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(20): 5 906-5 911.
- [7] PATRIZIA B, EDDA D R, GIOVANNA R, et al. A highly efficient electroporation system for transformation of *Bacillus licheni* formis[J]. *Biotechnology Techniques*, 1991, 5(1): 5-8.
- [8] 萨姆布鲁克 J. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂,等译. 北京: 科学出版社, 2002. 87-96.

【责任编辑 柴 焰】