

# 不同荧光蛋白基因标记利迪链霉菌

刘慧<sup>1</sup>, 吴慧玲<sup>2</sup>, 刘伟成<sup>2</sup>, 李锦锦<sup>2</sup>, 陈宝桦<sup>3</sup>, 王林嵩<sup>1</sup>

1. 河南师范大学生命科学学院, 新乡 453007
2. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北京 100097
3. 中国绿色食品发展中心, 北京 100081

**摘要** 利迪链霉菌(*Streptomyces lydicus*) A01 是一株分离自北京郊区对植物病原真菌具有广谱抑制作用的放线菌, 在植物真菌病害防治中具有良好的应用前景。为了检测红霉素启动子在利迪链霉菌 A01 中的活性, 为后期对菌株 A01 进行遗传改造提供技术支持, 同时对生防菌 A01 进行遗传标记以研究和阐明其在生态环境中的生物学行为规律, 本实验采用两亲本接合的方法, 将增强绿色荧光蛋白(EGFP)和红色荧光蛋白(RFP)基因片段克隆到携带红霉素启动子(ermE\*)的链霉菌表达载体 pIB139 中, 成功构建了以 *egfp* 和 *rfp* 为报告基因的重组载体 pIB139-EGFP 和 pIB139-RFP, 并转化利迪链霉菌 A01, 突变株在荧光显微镜下观察到较强的绿色荧光和红色荧光, 同时 PCR 鉴定结果正确。这表明重组载体 pIB139-EGFP 和 pIB139-RFP 成功转入菌株 A01, 并且 ermE\* 启动子成功启动 *egfp* 和 *rfp* 基因表达。

**关键词** 利迪链霉菌; 绿色荧光蛋白; 红色荧光蛋白; 红霉素启动子

**中图分类号** Q939.92

**文献标志码** A

**doi** 10.3981/j.issn.1000-7857.2014.12.001

## Different Fluorescent Protein Gene to Label *Streptomyces lydicus* A01

LIU Hui<sup>1</sup>, WU Huiling<sup>2</sup>, LIU Weicheng<sup>2</sup>, LI Jinjin<sup>2</sup>, CHEN Baohua<sup>3</sup>, WANG Linsong<sup>1</sup>

1. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China
2. Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China
3. China Green Food Development Center, Beijing 100081, China

**Abstract** *Streptomyces lydicus* A01 is isolated from the soil of the suburban vegetable field in Beijing (China), and it shows a strong inhibitory activity against several plant pathogenic fungi. In order to detect the activity of the erythromycin promoter (ermE\*) in *Streptomyces lydicus* A01, and to obtain the labeled strain for further research, the *egfp* 720 bp and *rfp* 678 bp segments are inserted into the expression vector pIB139 separately, the recombinant vectors pIB139-EGFP and pIB139-RFP are successfully obtained. The pIB139-EGFP and pIB139-RFP are transformed into *Streptomyces lydicus* A01 strain by intergeneric conjugation. Transformants are identified by the fluorescence observation with microscope. It is shown that the two recombinant vectors are successfully integrated into the strain A01, and that the ermE\* promoter could induce *egfp* and *rfp* gene expression in *Streptomyces lydicus* A01.

**Keywords** *Streptomyces lydicus*; green fluorescent protein; red fluorescent protein; ermE\* promoter

收稿日期: 2014-01-27; 修回日期: 2014-03-18

基金项目: 北京市自然科学基金项目(6101001); 北京市农林科学院科技创新专项(KJCX201101001); 公益性行业(农业)科研专项(200903049-07)

作者简介: 刘慧, 研究方向为生物化学与分子生物学, 电子邮箱: luckystar513@163.com; 王林嵩(通信作者), 教授, 研究方向为酶的结构与功能, 电子邮箱: wls@htu.cn

引用格式: 刘慧, 吴慧玲, 刘伟成, 等. 不同荧光蛋白基因标记利迪链霉菌[J]. 科技导报, 2014, 32(12): 15-18.

利迪链霉菌(*Streptomyces lydicus*) A01 是北京市农林科学院植保环保研究所从京郊菜园土壤中筛选到的一株对作物多种病原真菌有很强拮抗活性的生防放线菌,进一步分离鉴定表明,该菌株能够合成多烯大环内酯类抗生素纳他霉素,且合成能力较强,有望开发成为纳他霉素高效生产菌株<sup>[1,2]</sup>。

增强绿色荧光蛋白(EGFP, 720 bp)和红色荧光蛋白(RFP, 678 bp)基因作为报告基因,由于可直接肉眼检测荧光、具有对细胞安全、稳定等优点,已被广泛用于研究基因表达调控及微生物定殖、侵染、植物信号转导等研究<sup>[3,4]</sup>,目前未见关于标记利迪链霉菌的报道。

本文拟以 *egfp* 和 *rfp* 基因作为报告基因,研究 *ermE*\* 启动子是否具有菌种专一性,即能否在异源宿主利迪链霉菌 A01 中具有启动活性,从而为后期进行利迪链霉菌 A01 菌株改良提供遗传转化工具。同时,对生防菌株 A01 进行荧光标记也为阐明该拮抗细菌的根围定殖动态提供有效的研究手段。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试菌株及质粒

本实验用到的菌株和质粒见表 1。

表 1 菌株和质粒  
Table 1 Strain and plasmid

菌株或质粒	特性	来源
大肠杆菌 DH5 $\alpha$	感受态细胞	购于天根生化科技(北京)有限公司
西瓜枯萎病菌( <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Niveum</i> )	供试病原菌	北京市农林科学院植物保护环保所保存
利迪链霉菌 A01	野生型	北京市农林科学院植物保护环保所保存
pMD18EGFP	Amp <sup>r</sup> <i>gfp</i>	北京市农林科学院植物保护环保所保存
pMD18RFP	Amp <sup>r</sup> <i>rfp</i>	北京市农林科学院植物保护环保所保存
pIB139	Apm <sup>r</sup> 链霉菌表达载体	上海交通大学陈捷惠赠
ET12567(pUZ8002)	去甲基化质粒, <i>kna</i> <sup>r</sup> , <i>Cm</i> <sup>r</sup>	上海交通大学陈捷惠赠

### 1.2 培养基

大肠杆菌培养基为 LB<sup>[5]</sup>,利迪链霉菌固体产孢培养基为 PDA<sup>[6]</sup>,液体发酵培养基为 YEME<sup>[7]</sup>;大肠杆菌与利迪链霉菌的接合转移 MS 培养基<sup>[8]</sup>;LB 中氨苄青霉素使用浓度为 100  $\mu$ g/mL,阿泊拉霉素 100  $\mu$ g/mL,氯霉素 25  $\mu$ g/mL,卡那霉素 25  $\mu$ g/mL;链霉菌中阿泊拉霉素 30  $\mu$ g/mL,萘啶酮酸为 25  $\mu$ g/mL。

### 1.3 主要试剂

PCR 试剂、氨苄青霉素(Amp)、DNA Marker、DNA 凝胶回收试剂盒等均购自天根生化科技有限公司;限制性内切酶、T4DNA 连接酶、pMD18-T、阿泊拉霉素载体等均购自 TaKaRa 生物技术公司。

### 1.4 *egfp* 和 *rfp* 基因的克隆及表达载体的构建

*egfp* 的 PCR 扩增,以载体 pMD18EGFP 为模板,使用引物 GF 5'-GGAATTCATATGATGGTGAGCAAGGGCG -3'(NdeI) 和 GR 5'-CGGAATTC TACTTGTACAGCTCGTCC -3'(EcoRI),反应在 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;30 个循环(94 $^{\circ}$ C 40 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min);72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。*rfp* 的 PCR 扩增,以 pMD18RFP 为模板,使用引物 RF 5'-GGAATTCATATGATGGCCTCCTC CGAGAA-3'(NdeI),RR 5'-CGGAATTCCTACAGGAACAGGT GGTGGC-3'(EcoRI),将扩增片段克隆到质粒 pMD18-T 载体上。通用引物测序,得到的 *egfp* 和 *rfp* 基因序列用 BLAST 搜索程序从 GenBank 中进行比对验证。将 PCR 扩增得到的带有

酶切位点的 *egfp* 和 *rfp* 基因片段于经过相同内切酶切割的表达载体 pIB139 连接,在阿泊拉霉素抗性平板上筛选得到的阳性克隆进行 PCR 检测,挑取阳性克隆子培养并提取质粒进行酶切验证。

### 1.5 利迪链霉菌的荧光标记

通过两亲本接合作用转化利迪链霉菌,参照 Antonet 等<sup>[9]</sup>并做了适当修改。将已构建好的表达载体 pIB139-EGFP 和 pIB139-RFP 转入到去甲基化供体大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 感受态细胞,过夜培养转化子,以 1:100 接种量将培养物转接于新鲜 LB 中,培养 OD<sub>600</sub> 值至 0.4~0.6,离心,去上清液,用 20 mL 冰冷的纯 LB 培养液洗涤 2 遍,用 2 mL 冰冷的纯 LB 培养液重悬沉淀。提前 1 周培养的链霉菌,用 ddH<sub>2</sub>O 冲洗孢子,50 $^{\circ}$ C 热击 10 min,自然冷却。等体积混合 ET12567(含目的质粒)和活化好的孢子,离心并去掉部分上清液,混匀沉淀,涂布于 MS 培养基,28 $^{\circ}$ C 培养 18 h,1 mL ddH<sub>2</sub>O(含适量萘啶酮酸+阿泊拉霉素)覆盖平板。2~3 d 后挑取单菌落到新的 MS+抗生素平板上。

### 1.6 DNA 操作

质粒提取和转化等基本操作见文献[10];链霉菌培养、总 DNA 提取,大肠杆菌与链霉菌的属间接合转移方法见文献[9]。

### 1.7 摇瓶发酵无菌滤液对真菌抑制活性的检测

将活化好的野生型 A01,及标记菌株 A01-*egfp* 和 A01-*rfp* 分别用 500 mL 三角瓶装 50 mL 发酵培养基摇瓶培养,每瓶接

种适量菌体, 28℃, 220 r/min 摇床培养 3~4 d, 取发酵液 5000 r/min 离心 10 min, 上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤灭菌后得无菌发酵液。采用抑菌圈法测定抑菌活性。首先将靶病原菌与冷却的 PDA 培养基混合制成平板, 在平板内用直径为 7 mm 打孔器均匀打 3 个孔, 将野生型及标记菌株的无菌发酵液 15 μL 分别注入孔内, 28℃ 培养 3~4 d, 观察抑菌情况<sup>[11]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 *egfp* 及 *rfp* 基因的 PCR 扩增

分别以载体 pMD18EGFP 和 pMD18RFP 为模板, 以 GF、GR 和 RF、RR 为引物, 扩增得到 *egfp* 720 bp 和 *rfp* 678 bp 的片段, 结果如图 1 所示, 其中 PCR 产物上样量为 4 μL。将测序得到的序列通过 NCBI 数据库 BLAST 分析, 显示与数据库中 *gfp* 及 *rfp* 序列同源性 100%, 从而获得了完整的荧光标记基因。

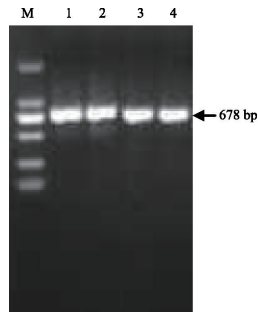


图 1 *egfp* 和 *rfp* 基因的扩增

Fig. 1 Amplification of *egfp* and *rfp*

注: M 为 DNA Marker; 1, 2 为 *egfp* 基因; 3, 4 为 *rfp* 基因

### 2.2 荧光蛋白表达载体的构建

将荧光蛋白表达载体热激转化 *E. coli* DH5α, 得到的转化子进行 PCR 检测, 挑取阳性克隆提取质粒酶切验证。结果如图 2 所示, 分别得到绿色荧光蛋白基因 720 bp 的片段和 5.9 kb 的 pIB139 质粒以及红色荧光蛋白基因 678 bp 的片段和 5.9 kb 的 pIB139 质粒。

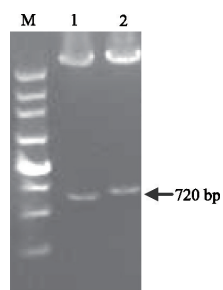


图 2 阳性克隆双酶切电泳图

Fig. 2 Restriction enzyme cutting of positive cloning plasmid

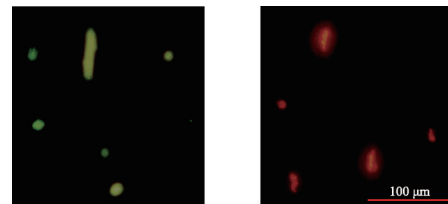
注: M 为 DNA Marker; 1 为 *rfp* 基因片段和 pIB139 质粒;

2 为 *egfp* 基因片段和 pIB139 质粒

### 2.3 荧光蛋白表达载体在 *E. coli* DH5α 的表达

将分别携带绿色荧光蛋白和红色荧光蛋白的 *E. coli* DH5α 置于荧光显微镜下观察, 携带绿色和红色荧光表达载体大肠杆菌都能发出相应的荧光(图 3), 但是只有在菌落

聚集成团状的时候能观察到较强的荧光, 单一的菌体发出的荧光较微弱, 表明该红霉素启动子在大肠杆菌中成功启动荧光蛋白表达, 但是启动活性较弱。



(a) *E. coli* DH5α/*egfp*

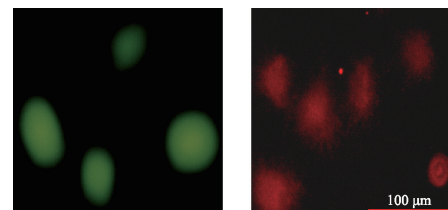
(b) *E. coli* DH5α/*rfp*

图 3 DH5α/*egfp* 和 DH5α/*rfp* 在荧光显微镜下的照片

Fig. 3 Fluoroscopic images of DH5α/*gfp* and DH5α/*rfp*

### 2.4 标记菌株的荧光观察

构建好的两个荧光标记载体 pIB139-EGFP 和 pIB139-RFP 经去甲基化供体 *E. coli* ET12567/pUZ8002 接合转移到利迪链霉菌 A01 的染色体中, 将筛选得到的 *egfp*、*rfp* 标记菌株置于荧光显微镜下观察, 结果表明红霉素启动子下的绿色荧光和红色荧光标记基因在利迪链霉菌中都得到了很好的表达, 不同荧光标记突变体都发出了较强的相应的荧光(图 4)。



(a) A01/*egfp*

(b) A01/*rfp*

图 4 A01/*egfp* 和 A01/*rfp* 在荧光显微镜下的照片

Fig. 4 Fluoroscopic images of A01/*egfp* and A01/*rfp*

为了检测标记菌株的稳定性, 将标记菌株在无抗性的 YEME 斜面 and 液体培养基中连续传代 5 次后, 仍然具有较强的发光特性。表明含有外源基因 *egfp* 或 *rfp* 的质粒导入到利迪链霉菌中, 在继代培养中能够稳定遗传。因此, 可以应用于其在生态环境中的生物学行为规律及定殖研究。

### 2.5 荧光标记对病原菌抑菌活性的影响

通过抑菌圈法实验, 对标记菌株和野生菌株的抑菌活性进行了检测, 结果见图 5。菌株 A01/*egfp* 和 A01/*rfp* 与野生型 A01 菌株相比, 抑菌活性、菌落形态及生长情况没有差异, 表明转入外源基因 *egfp* 或 *rfp* 对菌株的生长及抑菌活性没有影响, 标记菌株可以用于高效生防菌构建。

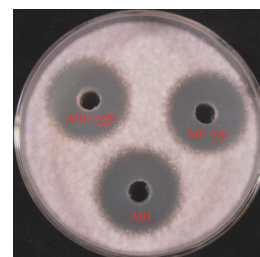


图 5 标记菌株与野生型菌株抑菌西瓜枯萎病菌活性比较

Fig. 5 Inhibition effect of A01/*egfp* and A01/*rfp* and A01 against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Niveum*

### 3 讨论

荧光标记技术具有易检测、灵敏、稳定、无干扰无毒无害、广谱等优点,为分子生物学和细胞生物学研究的有效手段,广泛应用于启动子分析、监控转基因及其表达、细胞的信号转导与药物的筛选等研究领域。荧光蛋白GFP和RFP具有不同的激发波长和发射波长,通过颜色即可分辨不同的荧光蛋白标记<sup>[12,13]</sup>。

链霉菌(*Streptomyces*)是一类(G+C)%含量高、形态及代谢调控复杂的革兰氏阳性菌,链霉菌基因的启动子结构多样,不同的启动子在不同的链霉菌中表达活性各异<sup>[14]</sup>。红霉素抗性基因启动子(PerME)来源于红色糖多孢菌的红霉素合成基因簇,位于ermE和eryC之间,是红霉素抗性基因启动子,研究表明该启动子可以在一些链霉菌中作为组成型表达的强启动子启动基因的表达<sup>[14,15]</sup>,传统的启动子活性检测采用 $\beta$ -葡萄糖苷酸酶基因、氯霉素乙酰转移酶基因和冠瘿碱合成酶基因等作为报告基因,检测时需要特定的底物和辅助因子,而且对细胞具有破坏性。*egfp*是启动子分析的新型报告基因,利用荧光显微镜观察基因表达情况,能比较正确地鉴定启动子活性大小。

本文通过不同荧光蛋白标记拮抗链霉菌A01,一方面对A01进行遗传标记,为进一步观察和研究其在生态环境中的生物学行为规律提供方法手段,从而为后期进行利迪链霉菌A01菌株改良中载体构建提供方法手段,同时也探明红霉素启动子在利迪链霉菌A01中具有启动外源基因*egfp*、*rfp*转录的功能,为后期进行利迪链霉菌A01菌株改良提供遗传转化工具。

### 4 结论

通过双亲接合的方法,将荧光标记蛋白EGFP和RFP基因片段克隆到携带红霉素启动子的链霉菌表达载体pIB139中,成功构建了以*egfp*和*rfp*为报告基因的利迪链霉菌A01荧光标记菌株A01/*egfp*和A01/*rfp*。同时对突变体进行了荧光观察及稳定性检测、生长及抑菌活性检测。

1) 克隆得到720 bp *egfp*和678 bp *rfp*的基因片段,测序验证其正确性。

2) 红霉素启动子ermE\*能够诱导两种荧光蛋白在大肠杆菌*E.coli* DH5 $\alpha$ 和利迪链霉菌A01中的表达。

3) 突变体稳定性试验及生长、抑菌试验表明,含有外源基因*egfp*或*rfp*的质粒导入到利迪链霉菌中能够稳定遗传,同时对菌株的生长及抑菌活性没有影响。

4) PerME\*是一个活性很强的启动子,在利迪链霉菌中表现出很高的启动基因表达活性,可以在后续试验中加以利用。

#### 参考文献(References)

[1] 隋勤, 刘伟成, 裘季燕, 等. 利迪链霉菌A01的抑菌谱及其抑菌活性的稳定性[J]. 植物保护, 2007, 33(5): 67-71.  
Sui Qin, Liu Weicheng, Qiu Jiyan, et al. Determination on the

antimicrobial spectrum and the stability of the antagonistic activity of *Streptomyces lydicus* A01[J]. Plant Protection, 2007, 33(5): 67-71.  
[2] 隋勤, 刘伟成, 卢彩鸽, 等. 利迪链霉菌A02抗真菌活性产物的分离和结构鉴定[J]. 生物工程学报, 2009, 25(6): 840-846.  
Sui Qin, Liu Weicheng, Lu Caige, et al. Extraction and structural identification of the antifungal metabolite of *Streptomyces lydicus* A02[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2009, 25(6): 840-846  
[3] 赵婧婧, 王爽, 王琦, 等. 多粘类芽孢杆菌菌株M1启动子片段的克隆及绿色荧光蛋白的表达[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(4): 788-792.  
Zhao Qianqian, Wang Shuang, Wang Qi, et al. Cloning of promoter fragment from *panebacillus polymyxa* M1 and expression of its green fluorescent protein[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2010, 18(4): 788-792.  
[4] 范晓静, 邱思鑫, 吴小平, 等. 绿色荧光蛋白基因标记内生枯草芽孢杆菌[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(4): 530-534.  
Fan Xiaojing, Qiu Sixin, Wu Xiaoping, et al. Endophytic *bacillus subtilis* Strain BS-2 labeled with green fluorescent protein gene[J]. Chinese Journal of Applied Environmental Biology, 2007, 13(4): 530-534.  
[5] Maniat T, Fritsch E F, Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.  
[6] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.  
Zhou Deqing. Microbiology lab manual[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publisher, 1986.  
[7] Du Y L, Chen S F, Cheng L Y, et al. Identification of a novel *Streptomyces chattanoogensis* L10 and enhancing its natamycin production by overexpressing positive regulator ScnR11[J]. Journal of Microbiology, 2009, 47(4): 506-513.  
[8] Lee K M, Lee C K, Choi S U, et al. Cloning and *in vivo* functional analysis by disruption of a gene encoding the c-butylrolactone autoregulator receptor from *Streptomyces natalensis*[J]. Archives of Microbiology, 2005, 184(4): 249-257.  
[9] Anton N J, Santos-Aberturas M V, Mendes S M, et al. PimM, a PAS domain positive regulator of pimarin biosynthesis in *Streptomyces natalensis*[J]. Microbiology, 2007, 153(9): 3174-3183.  
[10] 奥斯伯·F, 布伦特·R, 金斯顿·R E, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998.  
Fred M A, Roger B, Robert E K, et al. Current protocols in molecular biology[M]. Beijing: Beijing Publishing House, 1996.  
[11] 潘争艳, 刘伟成, 裘季燕, 等. 放线菌III-61和A-21对蔬菜枯萎病和灰霉病的控制作用[J]. 华北农学报, 2005, 20(4): 92-97.  
Pan Zhengyan, Liu Weicheng, Qiu Jiyan, et al. Control effect of the actinomycetes strains III-61 and A-21 to *Fusarium* wilt and gray mold of vegetables[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2005, 20(4): 92-97.  
[12] 肖文丽, 关大伟, 李俊, 等. 采用*egfp*和*rfp*基因标记评价大豆根瘤菌竞争结瘤能力[J]. 大豆科学, 2010, 29(3): 366-369.  
Xiao Wenli, Guan Dawei, Li Jun, et al. Evaluation on the competitiveness of strains of soybean *Rhizobia* marking with *egfp* and *rfp* genes[J]. Soybean Science, 2010, 29(3): 366-369.  
[13] Stuurman N, Bras C P, Schlaman H R M, et al. Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2000, 13(11): 1163-1169.  
[14] 李佳, 向四海, 杨秀山, 等. 报告基因法比较两种放线菌启动子的活性[J]. 微生物学报, 2009, 49(11): 1454-1458.  
Li Jia, Xiang Sihai, Yang Xiushan, et al. Evaluation of the activities of two promoters in *Streptomyces* by reporter gene method[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(11): 1454-1458.  
[15] 吴杭. 红霉素生物合成基因eryA启动子的克隆与功能研究[D]. 安徽: 安徽大学, 2007.  
Wu Hang. Cloning and characterization of the eryA promoter region of erythromycin biosynthetic genes from *saccharopolyspora erythraea*[D]. Anhui: Anhui University, 2007.

(责任编辑 吴晓丽)