

· 基础研究 ·

含有绿色荧光蛋白基因的质粒载体的构建 及其在水稻白叶枯细菌中的表达

郝 敏¹, 邢 达^{1*}, 谢 波², 周俊初², 曾列先³

(1. 华南师范大学激光生命科学研究所, 中国广东 广州 510631;

2. 华中农业大学农业部微生物重点实验室, 中国湖北 武汉 430070;

3. 广东省农业科学院植物保护所, 中国广东 广州 510640)

摘 要 本文用绿色荧光蛋白基因(green fluorescent protein)标记水稻白叶枯细菌, 观察其在白叶枯细菌中的表达情况。光激发后, 白叶枯细菌发出绿色荧光, 表明 *gfp* 在白叶枯细菌中得到了高效表达。后续工作意在利用 *gfp* 所发出的绿色荧光, 来追踪白叶枯细菌侵染水稻的路径, 以及检测水稻在遭受白叶枯病害时的一些生理生态变化, 进一步探讨水稻对白叶枯细菌的抗生机理, 希望能够为水稻抗性品种的检测提供新的理论依据。文中重点介绍了对质粒 pM2464 的改造过程, 经 *gfp* 标记后的水稻白叶枯细菌, 在紫外或蓝光的激发下, 发出绿色荧光, 证明了用标记有 *gfp* 基因的白叶枯细菌来观察其侵染水稻过程的想法是可行的。

关键词 绿色荧光蛋白基因(*gfp*); 水稻白叶枯细菌; 侵染

中图分类号: Q 782; Q786

文献标识码: A

文章编号: 1007-7146(2002)06-0427-04

Construction of the Plasmid Vector Carrying GFP Gene and the Expression of *Xanthomonas Oryzae* pv. *Oryzae* (*Xoo*) in Rice

HAO Min¹, XING Da^{1*}, XIE Bo², ZHOU Jun-chu², ZENG Lie-xian³

(1. Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, Guangdong, China;

2. The key laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China;

3. Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong, China)

Abstract This paper introduced *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* was marked with green fluorescent protein(*gfp*) gene and observation the expression of *gfp*. Excited with light, the pathogen emitted green fluorescence, showed *gfp* was expressed high efficiently. In the follow-up work, by tracing the green fluorescence, can be known the infestation path of the pathogen in rice and the physiological changes of rice infested by pathogen; so the disease resistance mechanism of rice versus pathogenic bacteria can be further probed into through the above work. In this paper the process of reconstruction plasmid pMP2464 was introduced particularly, the pathogen marked with *gfp* was excited by ultraviolet or blue light and emitted fluorescence, this all proved that the idea stated as previous is feasible.

Key words: green fluorescent protein(*gfp*); *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; infestation

0 引言

绿色荧光蛋白(GFP)是一类存在于包括水母、水螅和珊瑚等腔肠动物体内的生物发光蛋白。当受

到紫外或蓝光激发时, GFP 发射绿色荧光。其独特之处在于:它产生荧光无需底物或辅因子, 而其它已知的荧光素酶(Luciferase)都是氧化酶, 它利用分子氧来氧化底物, 使产物分子处于一种激发态而发光。

* 基金项目: 广东省自然科学基金团队项目(015012)和华中农业大学农业微生物重点实验室开放课题基金(AML2001-04)
** 通讯作者
收稿日期: 2002-09-06

这种酶/底物(Luciferase/Luciferin)的相互作用是生物发光的普遍模式^[1]。而 GFP 是第一个例外,它是分子量为 30KD 的单体发光蛋白,受 395 nm 近紫外光或 470 nm 蓝光激发后,在 Ca²⁺ 催化下,能发出波长为 510 nm 的绿色荧光。该作用不需要酶参与,也不需作用底物,发光蛋白对细胞没有毒性、结构稳定、作用持久,其最大的特点是在可以在活体组织、细胞内部直接检测^[2]。

由革兰氏阴性菌黄单孢水稻变种(*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, *Xoo*)引起的白叶枯病是水稻生产中最严重的细菌性病害。白叶枯病菌由水稻叶片上的气孔或伤口侵入,沿叶脉产生灰白色病斑。水稻遭受白叶枯病后,会严重减产,甚至绝收^[3]。如何选育出抗白叶枯病的水稻抗性品种,是农业育种方面亟待解决的问题。常规的育种方法一般是根据水稻被白叶枯细菌感染后其外观形态的变化来进行抗病和感病品种的筛选。这种方法耗时长,易受外界环境的影响,而且不能从根本上解释抗/感病的机理。本实验意在利用 *gfp* 基因标记白叶枯细菌,根据 *gfp* 发出的绿色荧光,观察白叶枯细菌的侵染过程,及其与水稻之间的互作。通过对水稻叶绿体、线粒体 ATP 酶的活性^[4]及叶片可溶性蛋白^[5]的研究,有望提出抗白叶枯病菌水稻品种筛选的新方法。

1 材料和方法

1.1 菌株和培养条件

1.1.1 本实验中所用的是水稻白叶枯病优势致病型 IV 型菌,由广东省农业科学院植物保护所曾列先老师提供;大肠杆菌 S-17(*Escherichia coli* S17-1 mobiliser strain)以及质粒 pMP2464 均由华中农业大学农业部农业微生物重点实验室提供。

1.1.2 培养基与培养条件 大肠杆菌采用 LB 培养基,于 37℃ 下培养;水稻白叶枯细菌采用 TY 培养基,于 28℃ 下培养。

1.2 实验步骤

1.2.1 绿色荧光蛋白基因(*gfp*)在大肠杆菌(*E. coli*)中的表达

用 *EcoR* I 酶切载体 pAC-*gfp*,回收 0.9 kb 的片段插入到 SK(+)的 *EcoR* I 位点得到重组质粒 pHN114,然后用合成引物 P*gfp* 以 pHN114 为模板进行 PCR 扩增,产物经 *Bam*HI-*Xba*I 酶切后插入到表达载体 pBBR1MCS5 上构建成重组质粒 pMP2464(见图 1)。将 pMP2464 的 *E. coli* 转化子经 37℃ 摇瓶培养,直至对数中期。

1.2.2 水稻白叶枯细菌抗性菌株的筛选

在 TY 液体中培养 48 小时 ~ 60 小时活化该菌,

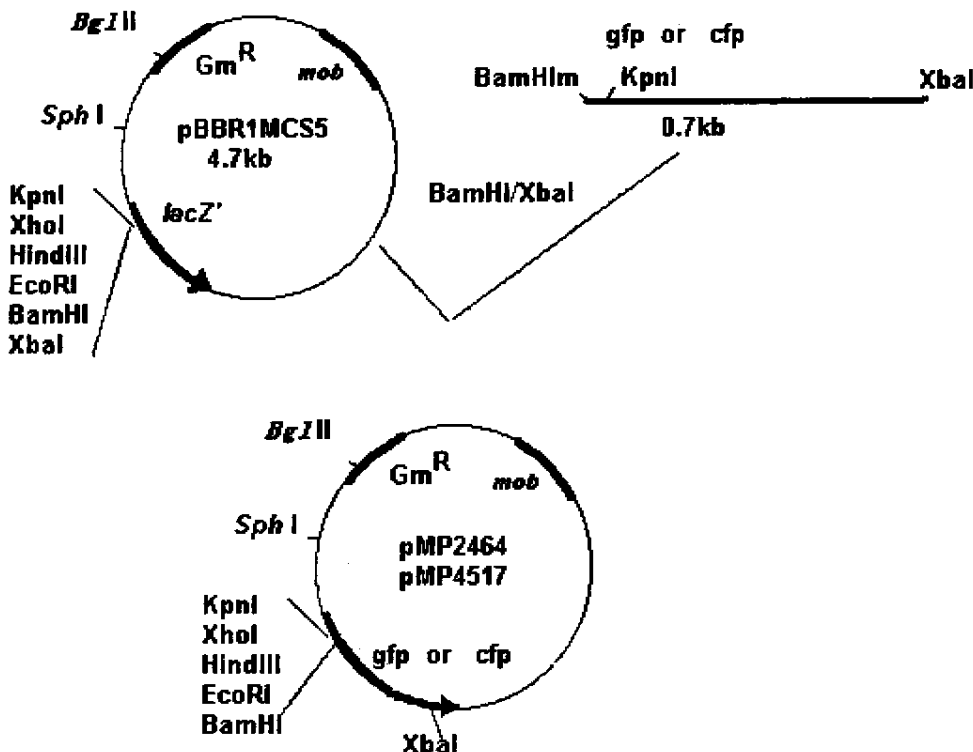


图 1 *gfp* 表达载体 pBBR1MCS5 的构建过程

Fig. 1 Construction course the pBBR1MCS5 expression vector carrying GFP gene

将菌液稀释至 10^{-3} 均匀涂在 TY + 链霉素 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 平板上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 长出的菌落再在 TY + 链霉素平板上验证抗性, 即获得带链霉素抗性的突变株。

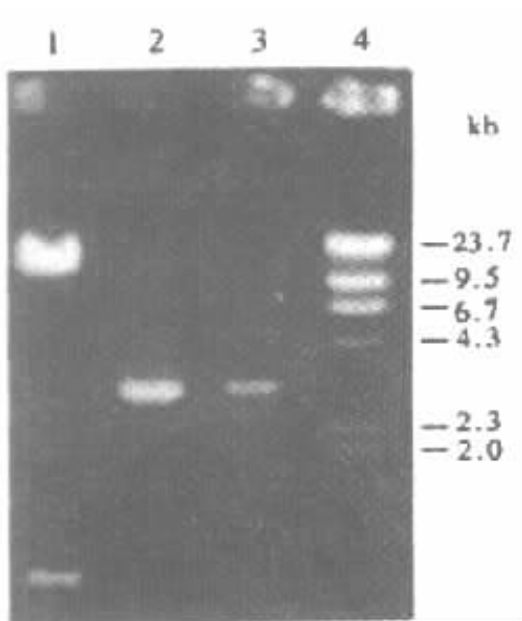
1.2.3 利用 *gfp* 基因标记白叶枯细菌

质粒 pMP2464(Gm^{R}) 上携带有由 lac 启动了控制表达的 *gfp* 基因, 能在多数革兰氏负反应细菌中稳定复制, 并且带有可诱导转移的 RK χ RP4)mob 位点。将 pMP2454 质粒转化到大肠杆菌 S17-1(协助转移宿主菌)中。S17-1(pMP2464) 在 LB 液体中培养至对数中期, 与培养至对数中期的水稻白叶枯细菌等体积混合, 菌体用 TY 液体洗涤 3 次, 再用微量 TY 液体溶解, 滴加到铺在 TY 平板上的微孔滤微膜上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 天。菌膜用无菌水稀释, 涂在 TY + 链霉素 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) + 庆大霉素 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 平板上。长出的菌落经纯化后即获得 *gfp* 标记菌株。

2 实验结果

2.1 *gfp* 基因在大肠杆菌中正确表达的检测

重组质粒 pHN114 经酶切、电泳鉴定 (见图 2), 证明含有 pAC-*gfp* 片段。将含有质粒 pMP2464 的 *E. coli* 转化子培养至对数中期, 经 470 nm 的光照射, 能检测出绿色荧光。表明 *gfp* 可以在大肠杆菌中正确表达。



1. pAC-*gfp*/*EcoR* I ; 2. SK(+) *EcoR* I ;
3. pHN114/*EcoR* I ; 4. λ DNA/*Hind*

图 2 重组质粒 pHN114 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification the recombination plasmid by enzyme incising

2.2 水稻白叶枯细菌的发光检测

2.2.1 平板检测 将长有用 *gfp* 基因标记的白叶枯细菌的平板与长有未用 *gfp* 基因标记的初发菌平板进行对比。在以汞灯为激发光源的荧光显微镜下观察现象, 含有 *gfp* 基因的白叶枯菌落有微弱的绿色荧光发出 (见图 3)。而初发菌的菌落呈现浅黄色, 看不到绿色荧光。

2.2.2 涂片检测 用接种环挑取少许菌落, 用蒸馏水稀释。在酒精灯上灼烧接种环, 待冷却后, 把接种

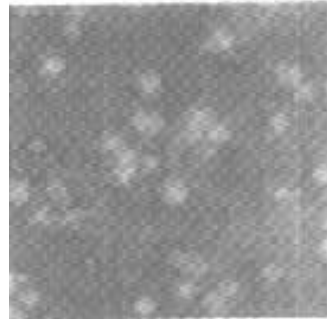


图 3 含有 *gfp* 基因的白叶枯菌落

Fig. 3 The colony of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* carrying GFP gene

环浸于稀释好的菌液里, 使接种环上能够形成单层水膜。把接种环上的水膜均匀涂布在洁净的载玻片上, 使所涂布的菌膜尽可能的稀薄。用 395 nm 的光激发, 检测其发光情况。观察发现, 经 *gfp* 标记的细菌较对照有明显发光。

3 结论

gfp 是目前被广泛采用的新型标记基因, 文中通过对质粒 pMP2464 进行改造, 将 *gfp* 基因标记到水稻白叶枯细菌上, 光激发后, 可看到标记菌有明显绿色荧光发出, 表明 *gfp* 基因已在白叶 2 细菌中成功表达。这为后续工作中利用 *gfp* 所发出的荧光, 来在体实时观测白叶枯细菌在水稻中的侵染提供了可能。

References

- [1] HASTING J W, et al. Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review [J]. *Gene*, 173: 5-11.
- [2] JIN Ying. Progress on green fluorescent protein research [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 1999, 22(3): 228-233.
- [3] JWU Shang-zhong, et al. Prevention and cure of the bacterial leaf blight [M]. Shanghai: Science and Technology Publishing House, 1983 (in Chinese).
- [4] KE Yu-qin, et al. Effects of bacterial leaf-blight infection on ATPase activity of chloroplast and mitochondrion in rice seedling

[J]. Journal of Agricultural College , 1993 22(2) 237-240.

[5]WU Jian-sheng , et al. Changes in soluble proteins in rice leaves in the interaction between rice plants and bacterial blight(*Xan-*

thomonas oryzae pv. *oryzae* [J]. Journal of Southwest Agricultural University , 1998 , 20(4) 321-327.



作者简介

郝敏 女,河南开封人,1977年11月出生。2000年毕业于河南师范大学生命科学学院,取得学士学位。现正在华南师范大学激光生命科学研究所以攻读硕士学位。

Biography

HAO Min female , was born in Kaifeng of Henan province in November 1977 ; graduated from Life Science College , Henan Normal University and won the bachelor degree of science . Now , the author is reading up the master degree at Institute of Laser Life Science , South China Normal University .

·科技动态·

关于组团参加第19届国际遗传学大会的通知

各地遗传学会：

第19届国际遗传学大会将于2003年7月6日-12日在澳大利亚召开,主题是:Genomes - The Linkage to Life(基因组:生命的纽带)。中国遗传学会曾在今年6月份发出通知,届时将组团前往,目前报名人数已达30人,组团条件已经成熟。估计每人总费用在2万元左右。(往返机票及悉尼和莫尔本食宿全部费用,并含4天参观费用。7月5日启程,7月14日返回。)组团价格大约可为每人节省3000余元。19届大会秘书Phil教授将于12月访华,请欲参加组团的同志报来姓名、单位和职称以便向澳大利亚申请邀请信。请与学会联系。(E-mail :xpan@genetics.ac.cn Tel :010-64889611 Fax :010-64853199)大会的信息请参考网页(www.genetic-scongress2003.com)

中国遗传学会

2002年11月6日