

嘉南藥理學院專題研究計劃成果報告

計劃名稱:創傷弧菌 *Vibrio vulnificus* 藍色螢光蛋白之特性研究

計劃編號:CNIS-88-02

執行期間:87 年 9 月 1 日至 88 年 6 月 30 日

計劃類別:☒個人型

主持人:張淑玉

協同研究:蘇哲弘 ; 陳連輝

摘要

由 pBR322 載體構築的 *Vibrio vulnificus* 基因庫中，選殖到一長約 2.7 kb 之 DNA 片段，此 DNA 片段涵蓋了一個可產生藍色螢光蛋白(BFP)的基因(*bfp*)，將含 *bfp* 之質體轉形至 *Escherichia coli* XL1B 時，以長波 UV 光(340nm)照射，則此轉形體即可產生明顯的藍色螢光。目前完成了此螢光基因的限制四圖譜，並將選殖的 DNA 片段縮短至 1.4kb，再與 pUC19 載體相接，完成了次選殖的工作，而增強了其螢光強度。但目前已知此選殖基因並不含有其原始構造基因之操縱子，而是利用載體上的操縱子以表現其特性。

關鍵詞 *Vibrio vulnificus*，藍色螢光蛋白基因，基因選殖。

前言

許多不同的生物體如細菌、真菌、螢火蟲、和魚類等，皆與生俱有發光的能力[1、2、3]，但生物體產生螢光之機制並不相同。細菌的螢光酵素基因彼此間具有同源性(homologous)[4]，而其它生物發光系統在演化上並非被保留者，故螢光蛋白基因之間，並不具有同源性，可分為許多不相關的化學類別[5]。細菌的螢光酵素(Lase)乃屬於氧化還原四，可利用氧分子氧化受質，而此受質通稱為螢光素(luciferin)，即攜帶光的分子(chromophore)，當其被氧化時即處於受激態，而其非輻射性之能量轉移，即可釋出螢光[6、7]；即使在不同菌種中，雖然 luciferin / Lase

system 之構成相同，卻也可能產生不同顏色的螢光[5]。目前細菌所屬的螢光酵素，可引起藍光或紅光者，已從各種不同種類之菌株中分離出來[4]。螢光蛋白研究最具特色者為北大西洋之水母的螢光蛋白，由水母傘邊緣之光細胞放出綠色螢光[8]，此一螢光乃是經由兩種螢光蛋白：即水母素(aequorin)及綠色螢光蛋白(green fluorescent protein)(GFP)依序活化產生[8]。多年來，此兩種蛋白質之特性已被廣為研究[9]，然而 GFP 之基因卻延至 1992 年才由水母之 cDNA 基因庫選殖出來[10]。許多實驗室的工作顯示，GFP 能在各種不同生物體中，如細菌、黏菌、植物及動物，經由長波 UV 光(395nm)照射後產生綠色螢光。目前此 GFP 已經由 X 射線結晶攝影技術做分子結構方面的研究，並經由氨基酸殘基之改造，可將其激發波及發射光譜位移，造成螢光強度增大，使得在應用上更為方便[11、12]。

螢光蛋白的應用可有多種，包括：利用螢光蛋白作為基因表現的 reporter [13]，或作為細胞發育中血源研究的 marker[14]。又由於 fusion tag protein 可用來定位蛋白質，以便追蹤其移動，故可將其應用在細胞組成之動力學方面的研究，因此可將螢光蛋白作為 protein tag 利用[15]。本實驗室已成功由創傷弧菌(*Vibrio vulnificus*)基因庫，找出藍色螢光基因(*bfp*)，並完成了基因限制四圖譜的製作及次選殖的工作，其解譯之藍色螢光蛋白(BFP)可經由短波 UV 燈照射而發出顯著的藍色螢光，希望此 BFP 可作為日後實驗室各功能基因產物之 reporter 或 tag，從而發展並建立出一套適合實驗室各選殖基因之功能性蛋白質，快速確認或追蹤之系統；並期望更有效的應用在微生物的偵測、活性污泥效能的分析、及食品的檢驗上。

材料與方法

(一) 使用菌株及其培養條件

我們所使用的菌株是由成大醫學院分離篩選到的 *Vibrio vulnificus* CKM-1。取 *V. vulnificus* 染色體 DNA 以 *Sau*3A1 作部分切割(partial digestion)後，與經 *Bam*H1 切割之載體 PBR322 接合，形質轉換(transformation)至 *E. coli* MC1061，估計總菌落數約 10,000 個純株，依照 Clarke 和 Carbon 的公式計算，P 值大約為 99%，完成了基因庫之製作[16]。用來進行形質轉換(transformation)的宿主細胞 *E. coli* MC1061： $(araD139) \Delta 7697 \Delta lacx17galU^-galK^-hsr^-hsm^-strA$ ；*E. coli* XL1B： $F' : : Tn10 proA^+B^+lac1^q \Delta (lacZ) M15/recA1 endA1 gyrA96 (NaI^r) thi hsdR17 (r^-m^+)supE44 relA11ac$ ，LB 完全培養基 (Luria-Bertani medium) 含 1% Bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract 1% NaCl。

(二) 質體 DNA 在大腸桿菌之轉形作用 (transformation)

將大腸菌接種於 20 ml LB 液態培養基中，37°C 振盪培養過夜。以 10 ml Low buffer (含 10 mM Mops, 10 mM RbCl, pH 7.0) 清洗菌體，加入 10 ml High buffer (含 10 mM Mops, 10 mM RbCl, 50 mM CaCl₂, pH 6.5)，在 4 °C 放置 30 ~ 60 分鐘。以 5000 rpm 在 4°C 離心 5 分鐘。以 2 ml High buffer 溶解 pellet。取 100 ul 菌液，加入適量的質體 DNA。放置於 4°C 30~60 分鐘。於 43°C 加熱 30 秒使質體 DNA 進入細胞內。加入 1 ml LB 液態培養基，於 37°C 培養 1 小時。取 50 ul 均勻塗抹在 (LB + Ampicillin) 之固態培養基上，於 37°C 培養。

(三) 抽取質體 DNA

將帶有質體 DNA 的菌株接種於 20 ml (LB+Ap) 液態培養基，在 37 °C 振盪培養過夜，solution I (含 50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris - HCl pH 7.5, lysozyme 4~5 mg/ml) 使細胞溶解，放置於室溫 5 分鐘；隨後加入 solution II (含 1% SDS, 0.2 N NaOH)，混合均勻，於 4 °C 冰中靜置 5 分鐘；再加入 1.5 ml solution III (含 11.5 ml

glacial acetate, 60 ml 5 M CH₃COOK, 28.5 ml dist. H₂O), 搖勻後繼續於 4 °C 冰中放置 5 分鐘; 以 12000 rpm 轉速在 4 °C 離心 10 分鐘, 取上清液至新離心管中, 以等體積的 phenol:chloroform: isoamylalcohol (25:24:1) 萃取, 取水層, 加入 2~3 倍體積 99% 酒精, 於 -20 °C 沉澱, 再以 70% 酒精清洗, 利用冷凍真空濃縮機抽乾後, 加入適量 TE buffer (含 10 mM Tris-HCl pH 7.5~8.0, 1 mM EDTA pH 8.0)。

(四) *bfp* 基因之選殖及次選殖

當 *V. vulnificus* 之基因庫形質轉換 (transformation) 至 *E. coli* XL1B 菌株上, 以 Ampicillin 為選擇標記 (selective marker), 將含質體之菌落以 UV 燈照射而選擇具有生物螢光者。由於 pUC19 載體上具有多重選殖位 (multiple cloning site), 有助於將來的次選殖, 故著手將選殖到的質體 DNA 上的載體 pBR322 置換成 pUC19; 選用 pBR322 上具有的限制四切割位 *Hind* III 對選殖到的質體進行完全切割 (complete digestion)。如此得到整段完整的原始 *bfp* 基因, 將 pUC19 分別以相同限制酵素切割成線狀 (linear), 再以 Bacterial alkaline phosphatase 處理, 去除 5'-末端磷酸根, 再與上述 DNA 片段進行接合反應, 再形質轉換至大腸桿菌之菌株 XL1B, 均勻塗抹於含 40mg/ml X-Gal, 0.5mM IPTG, 及 100mg/ml Ampicillin 之 LB 固態培養基。由於 IPTG 可誘發 LacZ 基因表現半乳糖酵素 (galactosidase), 分解 X-Gal 成藍色衍生物, 使菌落變成藍色; 若在 pUC19 的多重選殖位置 (multiple cloning site) 有插入外來 DNA, 則破壞了 LacZ 基因的表現, X-Gal 不被分解, 菌落呈白色。由此法篩選出有插入外來 DNA 的白色菌落, 方便基因的次選殖作用。

結果與討論

由 pBR322 構築的 *V. vulnificus* 基因庫中的重組質體, 形質轉換 (transformation) 至 *E. coli* XL1B, 然後培養到 LB+AP 固態培養基上, 以 UV 燈 (340nm) 照射而選擇具有生物螢光者。從約 3000 個轉形體 (transformants) 中, 篩選到一株可表現藍色螢光之轉形體 (圖一), 將其質體命名為 pVF101。質體純化後, 利用電泳分析, 可得到單一質體 supercoil form 之電泳帶 (bands), 但也常會出現數個長度不同的電泳帶, 其長度由短至長依序代表此質體之 supercoil form、dimer form、trimer form、tetramer form, 其在電泳圖上之位置皆不足以代表質體之真正長度, 因質體之長度乃指線狀質體 (linear form) 之長度, 唯 dimer form 之位置與線狀質體之位置較為相當, 而一般通常需要藉由單一切割位之限制四將 supercoil form 切一缺口使其成為線狀質體, 而加以確認此質體之長度。將質體 pVF101 抽出後純化, 電泳分析之電泳帶乃 pVF101 supercoil form 之位置 (圖三), 利用數種限制 分別切割, 確認其長度約為 7 kb 左右, 估計其插入的 DNA 片段長度約為 2.7 kb 左右。因其必須經由 UV 燈照射之後才可產生螢光, 故認為其與一般細菌之螢光酵素自然產生螢光的機制顯然不同, 而遍尋有關 *Vibrio vulnificus* 之論文, 皆無與本螢光蛋白基因類似之研究報告發表, 至於是否有類似之基因研究, 將待 DNA 序列分析後加以比對, 方可明白。

為了進一步的基因分析, 須先從事 pVF101 限制四圖譜的製作, 在一連串單一或配對的限制四處理及電泳分析後, 利用 DNA 片段移動的距離與它的長度對數值成線性關係的原理, 找出選殖到之 DNA 片段, 其各個限制四 (restriction site) 的相對位置 (圖二)。

接下來進行 pVF101 之次選殖工作, 利用各種限制四將 pVF101 切成各種不同長度的 DNA 片段, 再將它們分別接到載體 pUC19, 並形質轉換至 *E. coli* XL1B, 逐一偵測, 找出具有螢光特性的質體。其中以 *Hind* III 所切之 DNA 片段約為 1.4 kb 左右, 因其末端切割位皆為 *Hind* III, 故接入 pUC19 時將產生兩種不同方向之接合狀況,

其一質體 pVF1019 (圖二、圖三)，是能表現藍色螢光活性的最小質體，而另一與 pVF1019 等長之質體 pVF1091，卻無法表現螢光活性 (圖二)，由以上結果顯示此螢光基因並未涵蓋其操縱子，故 pVF101 上之螢光基因乃是利用 pBR322 載體上之 Tetracycline gene 之操縱子來啟動，而 pVF1019 之螢光基因，則是利用 pUC19 上 *lacZ* 基因之操縱子來啟動，至於 pVF1091 因無操縱子可資利用，故無法表現螢光活性。又因為 pUC19 是具高 copy number 之載體，而 pBR322 則屬於低 copy number 之載體，故將 pVF1019 與 pVF101 分別形質轉換至 *E. coli* XL1B，則含 pVF1019 之轉形體其螢光活性較含 pVF101 之轉形體者強 (圖一)。為了將 BFP 發展為實驗室各功能基因之快速確認或追蹤系統，對於其 DNA、氨基酸序列之分析及強化發光系統的研發，皆是將來更進一步研究的課題。

Cloning of BFP (Blue Fluorescent Protein) Gene from *Vibrio vulnificus*

Abstract

A plasmid, constructed with pBR322, containing a 2.7 kb DNA fragment was cloned from *Vibrio vulnificus* gene library and was used to transform *E. coli* XL1B. The transformants were optimized for blue fluorescence when excited by long-wave UV light. The DNA fragment was subjected to restriction endonuclease mapping and was subcloned into pUC19, then resulted in a higher fluorescence intensity. A tetracycline promoter on pBR322 vector or a *lacZ* promoter on pUC19 vector contributes to transcription of this blue fluorescent protein gene (*bfp*) which has no active promoter.

Key words : *Vibrio vulnificus*, blue fluorescent protein gene, gene cloning.

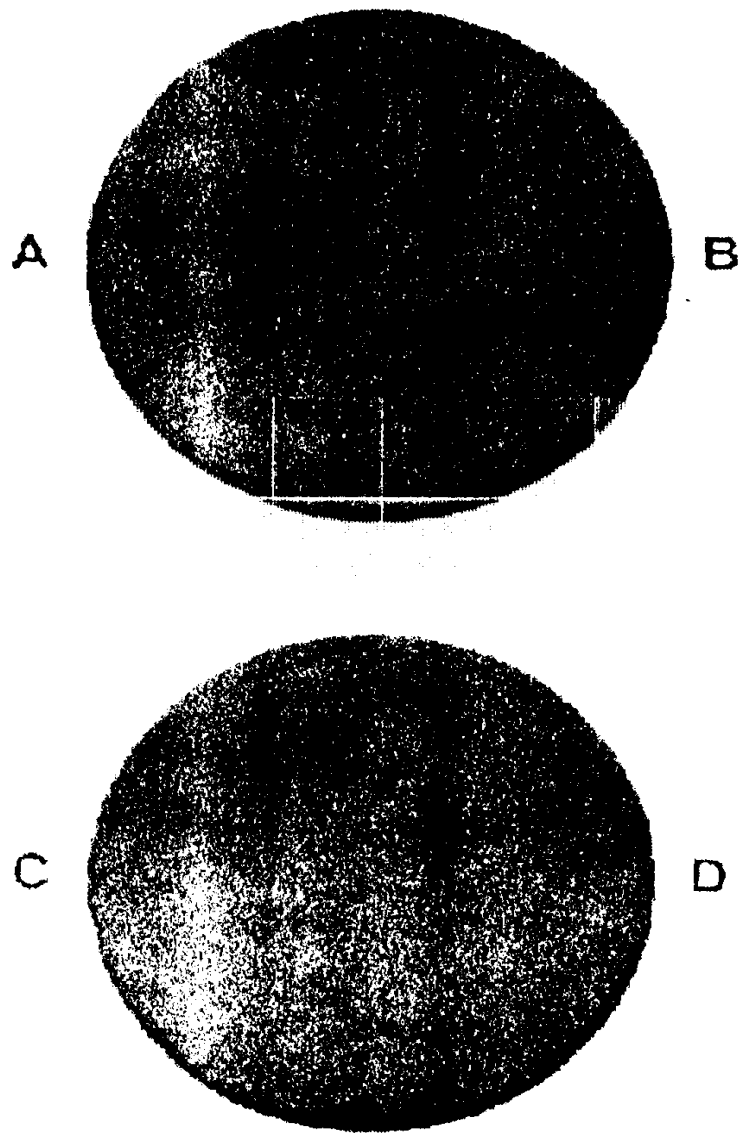
參考文獻

- [1] Harvey, E.N. (1952) Bioluminescence. Academic Press, New York, NY.
- [2] Herring, P.J. (1978) Bioluminescence in action. Academic Press, London
- [3] Hasting, J.W. and Morin, J.G. (1991) Bioluminescence. In: Prosser, C.L. (Ed.), Neural and Integrative Animal physiology. Wiley Interscience, New York, NY, 131-170.
- [4] Edward A. and Meighen. (1991) Molecular Biology of Bacterial Bioluminescence. Microbiological Reviews. Mar. p123-142.
- [5] Hastings, J.W. (1996) Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review. Gene, 173, 5-41.
- [6] Eckstein, J., Cho, K.W., Colepicolo, P., Ghisla, S., Hastings, J.W. and Wilson, T. (1990) A time-dependent bacterial luminescence emission spectrum in an vitro single turnover system: energy transfer alone cannot account for the yellow emission of *Vibrio fischeri* Y-1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 1466-1470.
- [7] Lee, J., Matheson, I.B.C., Muller, F., O'Kane, D.J., Vervoort, J. and Visser, A.J.J.W.G.

- (1991)The mechanism of bacterial bioluminescence. In: Muller, F. (Ed.), Chemistry and Biochemistry of Flavin and Flavoenzymes, Vol. 2. CRC Press, Orlando, FL, pp109-1151.
- [8] Prasher, D.C.(1995) Using GFP to see the light. Trends Genet. 11, 320-323.
- [9] Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A. and Tsien, R.Y.(1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. Trends Biochem. Sci. 20, 448-455.
- [10] Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. and Cormier, M.J. (1992) Structure of the murine lactotransferrin gene is similar to the structure of other transferrin-encoding genes and shares a putative regulatory region with the murine myeloperoxidase gene. Gene 110, 229-234.
- [11] Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., and Remington, S.J. (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein. Science 273, 1392-1395.
- [12] Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., and Tsien, R.Y. (1995) Understanding, improving and using green fluorescent protein. TIBS 20,448-455.
- [13] Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. and Prasher, D.C. (1994) Green Fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263, 802-805.
- [14] Tannahill, D., Bray, S. and Harris, W.A. (1995) A *Drosophila E(spl)* gene is “Neurogenic” in *Xenopus*: A green fluorescent protein study. Dev. Biol. 168, 694-697.
- [15] Wang, S. and Hazelrigg, T. (1994) Implication for *bcd* mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. Nature 369,400-403.
- [16] Chuang Y.C., Chiou S.F., Su J.H., Wu M.L., and Chang M.C. (1997) Molecular analysis and expression of the extracellular lipase of *Aeromonas hydrophila* MCC-2. Microbiology 143, 803-812.

[圖一] A : *E. coli* XL1B / pBR322、B : *E. coli* XL1B / pVF101、C : *E. coli* XL1B / pUC19、D : *E. coli* XL1B / pVF1019，在 LB plate 上經由短波 UV 燈照射，表現藍色螢光之情形。A、C 菌株不產生藍色螢光，B、D 菌株則產生藍色螢光。

[圖三] 以 pBR322 或 pUC19 為載體而具有藍色螢光蛋白之基因。M : Marker ; Lane1 : pBR322 ; Lane2 : pVF101 ; Lane3 : pUC19 ; Lane4 : pVF1019。



[圖一]A:*E. coli* XLIB/Pbr322、B:*E. coli* XLIB/pVF101、C:*E. coli* XLIB/Puc19、D:*E. coli* XLIB/pVF1019，在 LB plate 上經由短波 UV 燈照射，表現藍色螢光之情形。

A、C 菌株不產生藍色螢光，B、D 菌株則產生藍色螢光。



[圖三]以 Pbr322 或 Puc19 為載體而具有藍色螢光蛋白之基因。M: Marker Lanel:pBR322 ; Lane2:pVF101 ; Lane3:pUC19 ; Lane4:pVF1019 。