



研究报告

荧光标记珊瑚组织来源细菌及其与虫黄藻相互作用的显微观察

琚慧敏^{1,2} 杨键¹ 张偲¹ 李洁^{*1}

1 中国科学院南海海洋研究所 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室 广东 广州 510301

2 中国科学院大学 北京 100049

摘要:【背景】研究珊瑚-细菌、虫黄藻-细菌的相互作用是解析珊瑚健康机理的关键。对珊瑚共附生细菌进行稳定荧光标记有助于原位观察细菌与虫黄藻或珊瑚的相互作用。当前,对于野生型珊瑚共附生细菌遗传操作体系的研究有限,限制了对细菌与珊瑚、虫黄藻原位互作模式的揭示。【目的】建立一种适合专性海洋细菌的遗传操作体系,利用其对珊瑚组织来源细菌进行绿色荧光蛋白标记,用于研究标记菌株与虫黄藻的相互作用。【方法】通过电穿孔的方式将构建好的广宿主重组质粒转入供体菌(*Escherichia coli* WM3064),然后将供体菌与添加海水才可以生长的受体菌 SCSIO 12696 (港口球菌科, *Porticoccaceae*; 分离自鹿角杯形珊瑚组织)按供、受体菌细胞数比分别为 4:1、2:1、1:1 比例混合,在 25 °C 和 30 °C 下于改良 LB 培养基上接合转移。显微观察标记细菌与虫黄藻相互作用。【结果】改良的 LB 培养基适用于需海水才可生长的专性海洋细菌的接合转移实验。接合转移的效率与供、受体菌的比例及温度有关。确定优化的接合转移条件为:供、受体菌的比例为 1:1,温度为 30 °C。利用建立的接合转移体系,构建了增强型绿色荧光蛋白标记菌株 SCSIO 12696。在激光扫描共聚焦显微镜下能清晰观察到标记菌株 SCSIO 12696 和虫黄藻在共培养时的相互作用。【结论】建立了适合专性海洋细菌的遗传操作体系,利用其构建荧光蛋白标记菌株可用于虫黄藻-细菌、珊瑚-细菌相互作用的研究,有助于揭示珊瑚共附生细菌的生态作用机制。

关键词: 珊瑚共附生细菌, 接合转移, 荧光标记, 虫黄藻, 菌-藻互作

Foundation items: Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholars of Guangdong Province (2017A030306025); National Natural Science Foundation of China (41676155); National Key Research and Development Program of China (2017YFC0506303)

***Corresponding author:** Tel: 86-20-89023105; E-mail: lijietaren@scsio.ac.cn

Received: 19-02-2020; **Accepted:** 30-03-2020; **Published online:** 30-06-2020

基金项目: 广东省自然科学基金杰出青年基金(2017A030306025); 国家自然科学基金(41676155); 国家重点研发计划(2017YFC0506303)

***通信作者:** Tel: 020-89023105; E-mail: lijietaren@scsio.ac.cn

收稿日期: 2020-02-19; **接受日期:** 2020-03-30; **网络首发日期:** 2020-06-30

Labeling a coral tissue-derived bacterium with stable fluorescence and microscopic observation of the interaction between the labeled strain and *Symbiodiniaceae*

JU Huimin^{1,2} YANG Jian¹ ZHANG Si¹ LI Jie^{*1}

¹ Key Laboratory of Tropical Marine Bioresource and Ecology, Chinese Academy of Sciences; South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510301, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Background] Investigations of coral-bacterial and *Symbiodiniaceae*-bacterial interactions are crucial for unravelling the mechanisms of coral health maintaining. Labeling coral-associated bacteria with stable fluorescence is useful for visualization of interactions between bacteria and *Symbiodiniaceae* or coral host in real time. Presently, the lack of the genetic manipulation system of coral-associated bacteria hampers the research on coral-bacterial and *Symbiodiniaceae*-bacterial interactions. [Objective] We tried to establish a genetic manipulation system that is suitable for obligate marine bacteria, and then label a coral-associated bacterial strain with an enhanced green fluorescent protein gene (eGFP). The interaction between eGFP-labeled strain and *Symbiodiniaceae* can be visualized. [Methods] The recombinant plasmid was transferred to the donor strain (*Escherichia coli* WM3064) by electroporation. The donor strain was mixed with the recipient strain SCSIO 12696 (*Porticoccaceae*, isolated from the tissue of coral *Pocillopora damicornis*), growth of which requires seawater, at different cell amount ratios (4:1, 2:1, 1:1). The mixed cells were then cocultured on the modified LB medium at 25 °C and 30 °C. The interaction between *Symbiodiniaceae* and the eGFP-labeled strain was observed by using microscopy. [Results] The modified LB medium met the growth requirement of the obligate marine bacterium SCSIO 12696, and was preferably used in the conjugational transfer experiment. The efficiency of conjugational transfer was influenced by the ratio of the donor and recipient bacterial cells and the incubation temperature. The optimum incubation temperature was 30 °C, and the optimum ratio of donor to recipient bacterial cells was 1:1. Strain SCSIO 12696 was labeled with an eGFP gene by using the conjugational transfer approach established in this study. The interaction between eGFP-labeled SCSIO 12696 and *Symbiodiniaceae* was clearly observed by using confocal laser scanning microscopy. [Conclusion] A genetic operation system that is suitable for the obligate marine bacteria has been established. The coral-associated bacterial strains can be labeled with fluorescent proteins by using this system. Moreover, the fluorescence-labeled bacteria can be used for investigations of the *Symbiodiniaceae*-bacterial and coral-bacterial interactions, which is helpful to revealing the ecological function of coral-associated bacteria and its mechanism.

Keywords: coral-associated bacteria, conjugational transfer, fluorescence labeling, *Symbiodiniaceae*, bacteria-*Symbiodiniaceae* interaction

珊瑚与虫黄藻(*Symbiodiniaceae*)、细菌、古菌、真菌、病毒等微生物共同构成珊瑚共生体(Coral Holobiont)^[1]。珊瑚共生体成员之间的相互作用直接影响珊瑚健康状态^[1-2]。研究发现,珊瑚与虫黄藻互利共生,珊瑚为虫黄藻提供栖息环境和营养代谢物^[3];虫黄藻通过光合作用,将合成的有机物提供给珊瑚^[4]。珊瑚和其他共附生微生物的关系更加复杂微妙。珊瑚为微生物抵挡紫外线使其免受伤害,

微生物通过光合作用、固氮作用为珊瑚提供营养,产生抗菌物质防止珊瑚感染疾病等^[5-6]。但在胁迫条件下,某些微生物会导致珊瑚发生白化或感染疾病^[7-11]。关于虫黄藻和细菌的相互作用研究较少^[12]。导致珊瑚白化的施罗氏弧菌(*Vibrio shilonii*)分泌一种富含脯氨酸的肽类——毒素 P,会抑制虫黄藻的光合作用^[13]。

利用显微技术针对目标菌进行原位观察,有助

于揭示宿主-细菌之间复杂、动态的相互作用。虫黄藻叶绿体含有叶绿素 a, 用蓝光激发时, 可产生波长更长的红色荧光信号。目前大多数虫黄藻的离体培养还未达到无菌纯培养的状态^[14], 而且无菌可能会影响虫黄藻的生长^[15]。因此, 为了避免虫黄藻自发荧光的干扰, 并且区别于虫黄藻培养液中原有的细菌, 对目标细菌进行标记, 可利用标记信号通过显微技术研究虫黄藻与目标细菌的原位相互作用。

荧光蛋白被广泛应用于细胞标记^[16]。通常采用自然转化、化学转化、电穿孔、接合转移的方法^[17], 将携带荧光蛋白基因的外源 DNA 插入目标菌。目前, 海洋细菌遗传操作体系的研究有限, 仅针对部分海洋细菌建立了成熟的遗传操作系统^[17]。例如, 霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)^[18]、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)^[19]、需钠弧菌(*Vibrio natrieigens*)^[20]等海洋弧菌具有吸收细胞外遗传物质的天然能力。截至目前, 海洋细菌只有 *V. natrieigens* 能通过化学方法转化^[21]。另外, 一些海洋菌已通过电穿孔法成功转化, 如 *Bacillus marinus* B-9987^[22]、*Fischerella*^[23]、*Chlorogloeopsis* strains^[23]、*Halomonas* sp. O-1^[24]、*Marinobacter adhaerens* HP15^[25]、*Pseudoalteromonas* sp. BSi20429^[26]、*Roseobacter* clade sp.^[27]、*Synechococcus* sp. CC931^[28]、*Vibrio vulnificus*^[29]、*Vibrio parahaemolyticus*^[30]等。接合转移通过细菌间的直接接触交换遗传物质, 是细菌间水平基因转移的主要方式, 驱动微生物环境适应性演化。在基因工程领域, 接合转移也是向微生物细胞内导入异源质粒的重要手段。已有的研究表明, 接合转移过程需要 4 个要素协同完成: 转移起始序列 oriT、弛豫酶(Relaxase)、IV 型偶联蛋白 T4CP 及 IV 型分泌系统^[31]。接合转移最常用的是相对较小、具有自主复制作用的遗传元件——质粒。由于许多宿主携带的限制修饰系统会降解双链质粒 DNA^[32-33], 因此, 比起电穿孔转移的双链 DNA, 通过接合转移方法转移的单链相对更稳定^[32]。另外, 对于那些难以通过电穿孔和化学方法转化的菌株, 接合转移是最有效的转基因方法^[17]。目前, 只有

Dinoroseobacter shibae DFL12^[27]、*Prochlorococcus* sp. MIT9313^[34]、*Marinobacter adhaerens* HP15^[25]、*Pseudoalteromonas* sp. SM9913^[35]、*Roseobacter* clade sp.^[27]、*Vibrio harveyi* ORM4^[36]、*Vibrio natrieigens*^[37]、*Vibrio* sp.^[38]等海洋细菌已成功通过接合转移将外源遗传物质转入其细胞内。

细菌 SCSIO 12696 分离自鹿角杯形珊瑚(*Pocillopora damicornis*)组织, 需在添加海水的培养基中生长。基于 16S rRNA 基因序列分析, 发现其与 *Porticoccus litoralis* IMCC2115^T (*Gammaproteobacteria*, *Cellvibrionales*, *Porticoccaceae*) 的相似性最高(91.83%), 是港口球菌科(*Porticoccaceae*) 的潜在新属。据报道, *Cellvibrionales* clade BD1-7 是柳珊瑚“核心菌群”的成员, 并且很可能在珊瑚共生体中发挥有益作用^[39]。港口球菌科的菌株能够利用藻类产生的代谢物促进生长^[40]。在珊瑚微生物学领域, 对珊瑚-致病菌互作研究相对较多, 例如利用绿色荧光蛋白标记珊瑚条件致病菌溶珊瑚弧菌(*Vibrio coralliilyticus*), 进而观察标记菌株与珊瑚宿主的互作, 以期揭示其致病机理^[41], 而关于珊瑚益生菌及其益生机制的研究有限^[42]。港口球菌科成员 SCSIO 12696 有望作为模式菌株研究珊瑚-共生藻-益生菌三者相互作用模式与机理。荧光标记可有效将目标细菌从复杂的原位环境中区分开, 是研究生物相互作用的重要技术手段。本研究以菌株 SCSIO 12696 为受体菌, 以带有性菌毛的 *Escherichia coli* WM3064 为供体菌^[43], 采用接合转移的方法构建绿色荧光蛋白标记菌株。我们希望通过首次建立纤维弧菌目成员 SCSIO 12696 的遗传操作与荧光蛋白标记技术体系, 期为原位环境虫黄藻-细菌相互作用的研究提供材料, 为进一步深入研究该潜在有益菌的生态功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

研究所用菌株和质粒的信息详见表 1。

表 1 实验所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒 Strains and plasmids	特征 Characteristics	来源 Source
SCSIO 12696	<i>Porticoccaceae</i> , wild type strain is sensitive to ampicillin and chloramphenicol, but resistant to kanamycin, gentamycin, and streptomycin	Isolated from coral tissue of <i>Pocillopora damicornis</i> by Professor LI Jie
WM3064	<i>Escherichia coli</i> , 2,6-diaminopimelic acid auxotrophic	Given by Professor WANG Xiaoxue
pBBR1MCS2-Tac-mCherry plasmid	Red fluorescent protein expression plasmid, a broad host plasmid, 6 195 bp, kanamycin resistance	Given by Associate Professor YANG Jian
pET22b-EGFP plasmid	Red fluorescent protein expression plasmid, expression host: <i>E. coli</i> BL21(DE3), 6 177 bp, ampicillin resistance	Purchase from Miaoling plasmid

1.2 主要试剂和仪器

卡那霉素(Kanamycin Sulfate, Kana)、氨苄青霉素(Ampicillin Sodium Salt, Amp)、氯霉素(Chloramphenicol, Chl)、链霉素(Streptomycin Sulfate, Str)、庆大霉素(Gentamycin Sulfate, Gen), 生工生物工程(上海)股份有限公司; 二氨基庚二酸(Diaminopimelic Acid, DAP), Sigma 公司; 柠檬酸铁, Aladdin 公司。PCR 仪、电转杯, Bio-Rad 公司; *Taq* 酶、*Pfu* 酶, 北京全式金生物技术有限公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒小量快速抽提试剂盒, Magen 公司; 荧光显微镜、激光扫描共聚焦显微镜, Leica 公司; Isopore 聚碳酸酯膜, Millipore 公司。

1.3 培养基

普通海水培养基(MB): BD Difco™ Marine Broth 商品培养基 37.4 g/L, 纯水 1.0 L; 普通海水培养基(MA): MB 培养基中加琼脂 15.0 g/L; LB 改良培养基(LB_{modified}, g/L): 胰蛋白胨 5.0, 酵母粉 1.0, 柠檬酸铁 0.137, 人工海水(盐度为 3%) 1.0 L; 藻-菌共培养所用的培养基为 f/2-Si 培养基^[44]。

1.4 荧光标记接合质粒的构建

利用 SnapGene 软件设计引物, 序列信息见表 2。引物由上海美吉生物医药科技有限公司合成。

因野生型菌株 SCSIO 12696 对氨苄青霉素敏感而对卡那霉素不敏感, 需将广宿主表达质粒中的卡那抗性基因替换成氨苄抗性基因。分别以 Amp-F/R 为引物, 以质粒 pET22b-EGFP 为模板扩增氨苄抗

性基因; 以 pBBR1MCS2-Tac-mCherry-Amp-F/R 为引物, 以广宿主质粒 pBBR1MCS2-Tac-mCherry 为模板反向扩增线性化载体。PCR 扩增体系(50 μL): 引物 Amp-F/R 或 pBBR1MCS2-Tac-mCherry-Amp-F/R (10 μmol/L)各 2 μL, 模板 pET22b-EGFP (40 μg/mL) 或 pBBR1MCS2-Tac-mCherry (38 μg/mL)质粒 2 μL, 2×*TransStart*[®] *FastPfu* PCR SuperMix (−Dye) 25 μL, ddH₂O 19 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 50 s, 32 个循环; 72 °C 5 min。按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书纯化目的片段。按照无缝连接试剂盒 ClonExpress[®] II One Step Cloning Kit 说明书, 将氨苄抗性基因和线性化广宿主载体连接, 连接产物转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 利用添加氨苄抗生素(50 μg/mL)的 LB 平板 37 °C 培养 12 h, 筛选出单克隆。挑单克隆至含氨苄(50 μg/mL)抗性的 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 扩大培养 12 h 后, 进行 PCR 验证质粒是否成功转化至大肠杆菌感受态细胞(引物用 Amp-F/R), 获得含氨苄抗性和红色荧光蛋白的广宿主质粒 pBBR1MCS2-Tac-mCherry-Amp。参照上述方法, 将质粒 pBBR1MCS2-Tac-mCherry-Amp 中的红色荧光蛋白基因替换成 *egfp* 基因, 所用引物为 Green-F/R 和 pBBR1MCS2-Tac-mCherry-Green-F/R, 构建重组质粒 pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp。

1.5 接合转移实验

电击转化(2 500 V 电压)质粒 pBBR1MCS2-Tac-

表 2 实验所用引物信息
Table 2 Primer information used in this study

引物名称 Primer	序列 Sequences (5'→3')
Amp-F	TGAGGATCGTTTCGCATGAGTATTCAACATTTC
Amp-R	ACCCAGAGTCCCGCTTACCAATGCTTAATCAGTG
pBBR1MCS2-Tac-mCherry-Amp-F (pBBR-Amp-F)	GCGAAACGATCCTCATCCTGTCTCT
pBBR1MCS2-Tac-mCherry-Amp-R (pBBR-Amp-R)	GCGGGACTCTGGGGTTCGAA
Green-F	CAGGAAACAGTATTCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
Green-R	AGCAGCCTAGGTTAATTACTTGTACAGCTCGTCCA
pBBR1MCS2-Tac-mCherry-Green-F (pBBR-Green-F)	TTAACCTAGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAA
pBBR1MCS2-Tac-mCherry-Green-R (pBBR-Green-R)	GAATACTGTTTCCTGTGTGAAATATCCGCT
M13-F	CAGGAAACAGCTATGACC
M13-R	TGTAAAACGACGGCCAGT

EGFP-Amp 至 *E. coli* WM3064, 即得重组供体菌 *E. coli* WM3064/pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp。取 2 mL 供体菌(OD_{600} 为 1.034 ± 0.003), 分别取 1、2 或 4 mL 受体菌 SCSIO 12696 (OD_{600} 为 0.775 ± 0.002), $4\,000\times g$ 离心 5 min 收集菌体, 分别用 100 μ L FASW (0.2 μ m Filtered Autoclaved Seawater, 盐度 3%)重悬, 供体菌细胞量为 2.06×10^9 个, 受体菌细胞量分别为 5.39×10^8 、 1.08×10^9 或 2.16×10^9 个, 按约 4:1、2:1、1:1 的供、受体菌细胞比例, 将混合菌液滴于添加二氨基庚二酸(0.3 μ mol/L)的固体 LB 改良培养基(LB_{modified})上, 分别置于 25 $^{\circ}$ C 和 30 $^{\circ}$ C 的培养箱中培养 48 h。利用氨苄抗性筛选接合子。

挑取添加氨苄抗生素(50 μ g/mL)的改良 LB 培养基上生长的单克隆, 用 M13-F/R 引物对进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系(50 μ L): 引物 M13-F/R (10 μ mol/L) 各 2 μ L, 模板菌液 1 μ L, 2 \times Easy Taq[®] PCR SuperMix (+Dye)酶 25 μ L, ddH₂O 20 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳和测序验证。在荧光显微镜下观察荧光信号, 判断细菌体内的荧光蛋白基因是否表达。DAPI 信号观察条件: 激发波长 350 \pm 50 nm, 发射波长 460 \pm 50 nm; 绿色荧光蛋白信号观察条件: 激发波长 480 \pm 40 nm, 发射波长 527 \pm 30 nm。

1.6 测定接合转移效率及质粒稳定性

参照 1.5 描述的方法进行接合转移, 将 25 $^{\circ}$ C 和 30 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后的混合菌分别用 1 mL FASW 从平板上洗脱, 收集菌液, 稀释 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 倍, 取 100 μ L 涂布于添加 Amp (50 μ g/mL)的 LB_{modified} 平板上, 分别置于 25 $^{\circ}$ C 和 30 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后, 计菌落数, 每组 3 个平行。将野生型受体菌 SCSIO 12696 用 FASW 稀释 10^5 、 10^6 倍, 各取 100 μ L 涂布于 LB_{modified} 平板, 计菌落数, 每组 3 个平行。根据以下公式计算接合转移效率^[45-46]:

接合转移效率(%) = $\frac{\text{接合子数}}{\text{受体菌数}} \times 100$ 。

将 SCSIO 12696/pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp 接合子在不添加 Amp 的 MA 培养基上传代 5 次后, 随机挑取 100 个单菌落接种于添加 50 μ g/mL Amp 的 MA 培养基上, 观察菌株生长情况, 以判断质粒的稳定性。

1.7 虫黄藻 CCMP 2433 与 SCSIO 12696/pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp 的共培养观察

虫黄藻 CCMP 2433 (*Symbiodinium*)分离自鹿角杯形珊瑚, 由 National Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA) 保藏。菌株 SCSIO 12696/pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp 在添加 50 μ g/mL Amp 的 MB 培养基于 25 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后, 用 f/2-Si

培养基洗涤 2 次, 4 000×g 离心 5 min 收集细菌细胞。随后与 CCMP 2433 在无菌天然海水配制的 f/2-Si 培养基中共培养。菌株 SCSIO 12696/pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp 和虫黄藻 CCMP 2433 的初始细胞比例为 10:1。培养条件为 25 °C、光照强度为 25 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、光周期为 12 L:12 D。2 d 后取 1 mL 培养液用减压抽滤装置过滤到直径 25 mm、孔径 0.2 μm 的聚碳酸酯膜上, 在激光扫描共聚焦显微镜下观察。叶绿素 a 观察通道: 激发波长 488 nm, 发射波长 650–690 nm; SCSIO 12696/pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp 观察通道: 激发波长 488 nm, 发射波长 495–520 nm。

2 结果与分析

2.1 表达荧光蛋白广宿主接合质粒的构建

广宿主质粒 pBBR1 分离自支气管败血博德特氏杆菌(*Bordetella bronchiseptica*), 含有 2 个关键蛋白 Rep 和 Mob 编码序列。Rep 蛋白使该质粒在多个宿主内复制, Mob 蛋白与该质粒在不同宿主间的移动密切相关^[47–48]。该质粒可在革兰氏阴性细菌如布鲁氏菌(*Brucella*)、博德特氏菌(*Bordetella*)、弧菌(*Vibrio*)、大肠杆菌(*Escherichia*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)和根瘤菌(*Rhizobium*)等^[49]以及革兰氏阳性细菌如芽孢杆菌(*Bacillus*)^[50]中稳定复制。由于其优良的可移动性和宿主适应性, pBBR1 自发现以来被广泛改造应用于异源蛋白在非模式细菌体内表达。鉴于该质粒的成功应用案例, 本研究尝试改造该质粒使其应用于珊瑚共附生细菌 SCSIO 12696 的荧光标记。

结合细菌 SCSIO 12696 及虫黄藻的特性, 首先采用两步 Gibson Assembly 方法, 按图 1 所示流程改造 pBBR1MCS2-Tac-mCherry, 替换该质粒卡那抗性基因为氨苄抗性基因, 同时将该质粒原有的红色荧光蛋白基因替换为绿色荧光蛋白基因。经 PCR 测序验证后, 成功构建了 pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp。该质粒图谱如图 1 所示, 绿色荧光蛋白基因 *egfp* 位于 Tac 启动子下游, 同时含有蛋白 Rep 和

Mob 编码序列。质粒 pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp 用于后续接合转移研究。

2.2 重组质粒接合转移

2.2.1 接合转移培养基改良

由于菌株 SCSIO 12696 仅在海水培养基(如 MA)上生长, 但是 DAP 缺陷型的大肠杆菌 WM3064 可以在不添加 DAP 的 MA 培养基上生长(表 3), 所以 MA+Amp 培养基不适合在接合转移实验中用于接合子的筛选。然而供、受体菌株在接合转移过程中的活力是接合转移效率的决定因素之一。因此, 选择合适的培养基用于大肠杆菌 WM3064 和 SCSIO 12696 接合转移实验十分关键。考虑到 DAP 缺陷型的大肠杆菌 WM3064 在未添加 DAP 的 LB 培养中不生长(表 3), 本研究以 LB 为基础培养基进行改良。

LB 改良培养基(LB_{modified})既能满足海洋细菌 SCSIO 12696 的生长需求, 同时, WM3064/pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp 在添加 DAP 的 LB_{modified} 培养基上能生长, 但不会在缺乏 DAP 的 LB_{modified} 培养基上生长(表 3)。因此, 添加 DAP 的 LB_{modified} 培养基可用于接合转移过程中供/受体菌的共培养, 而不添加 DAP 的 LB_{modified}+Amp 培养基可用于接合子的筛选。

2.2.2 接合转移条件优化

接合转移效率分析结果表明, 在相同温度下, 供、受体菌的比例在一定范围内, 受体菌的比例越高其接合转移效率越高(表 4); 供、受体菌比例一定时, 30 °C 的接合转移效率高于 25 °C (表 4)。

2.2.3 接合子的验证

依照上述优化后的接合转移条件, 挑取添加氨苄的改良 LB 培养基上生长的单克隆进行 PCR 扩增, PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果表明其与目的片段大小吻合。切胶回收目的条带, 测序验证结果显示与 *egfp* 基因完全匹配。同时, 荧光显微镜下可清晰观察到绿色荧光蛋白表达的信号(图 2)。以上结果表明已成功构建 EGFP 标记菌株 SCSIO 12696/pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp。

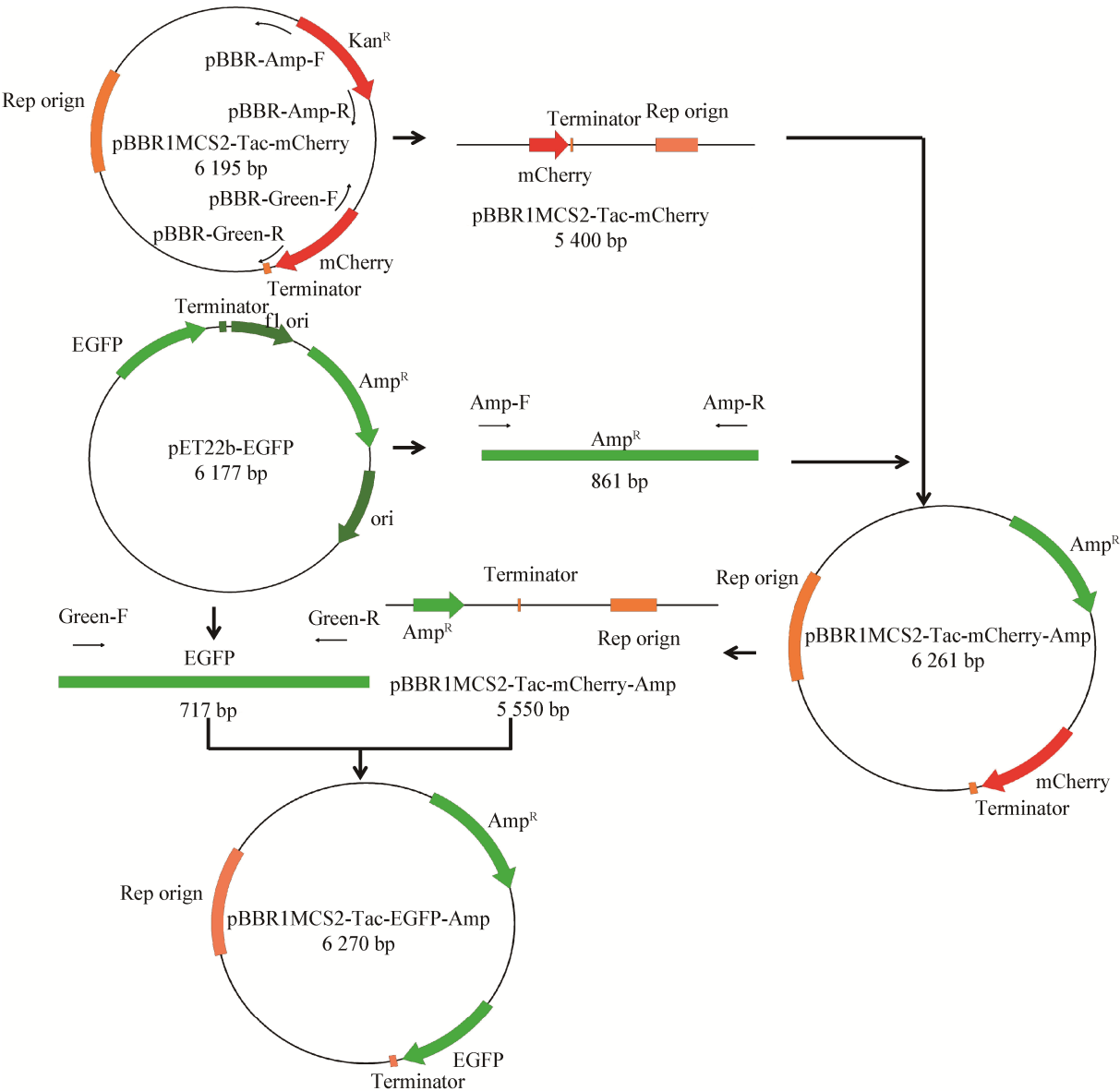


图 1 构建质粒 pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp 的流程示意图

Figure 1 Flow chart of constructing plasmid pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp

表 3 菌株生长情况

Table 3 Growth of the strains

培养基 Medium	<i>E. coli</i> WM3064	<i>E. coli</i> WM3064/pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp	SCSIO 12696
MA	+	+	+
MA+DAP	+	+	+
LB	-	-	-
LB+DAP	+	+	-
LB _{modified}	-	-	+
LB _{modified} +Amp	-	-	-
LB _{modified} +DAP	+	+	+
LB _{modified} +DAP+Amp	-	+	-

注: +: 菌株能生长; -: 菌株不能生长

Note: +: The strain can grow; -: The strain cannot grow

表 4 接合转移效率

Table 4 Conjugational transfer efficiency

温度 Temperature (°C)	供/受体菌细胞比例 Donor/receptor cell amount ratio	接合子 Conjugants ($\times 10^6$ CFU/mL)	受体菌 Receptor (CFU/mL)	接合转移效率 Conjugation efficiency (%)
25	4:1	2.23 \pm 0.16	5.39 $\times 10^8$	0.41 \pm 0.02
	2:1	2.57 \pm 0.31	5.39 $\times 10^8$	0.48 \pm 0.03
	1:1	2.73 \pm 0.53	5.39 $\times 10^8$	0.51 \pm 0.01
30	4:1	4.42 \pm 0.51	5.39 $\times 10^8$	0.82 \pm 0.05
	2:1	6.72 \pm 0.27	5.39 $\times 10^8$	1.25 \pm 0.03
	1:1	10.07 \pm 0.63	5.39 $\times 10^8$	1.99 \pm 0.06

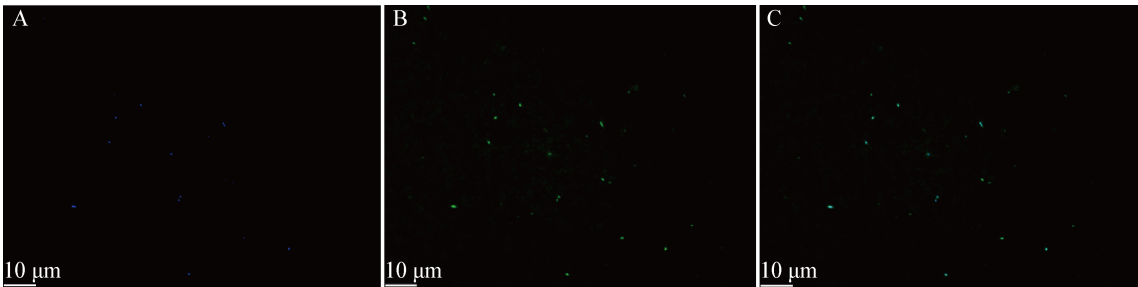


图 2 *egfp* 基因在 SCSIO 12696/pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp 中的表达

Figure 2 Expression of *egfp* in SCSIO 12696/pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp

注: A: 为 SCSIO 12696/pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp 经 DAPI 染色后的显微观察照片; B: SCSIO 12696/pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp 在激发波长为 480 \pm 40 nm, 发射波长为 527 \pm 30 nm 通道下可见绿色荧光蛋白表达信号; C: DAPI 和绿色荧光蛋白信号重叠图

Note: A: The microscopic observation of SCSIO 12696/pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp stained by DAPI; B: The green fluorescent protein signal of SCSIO 12696/pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp observed at the excitation wavelength of 480 \pm 40 nm and emission wavelength of 527 \pm 30 nm; C: The overlapping of DAPI and GFP signals

2.3 质粒在菌株 SCSIO 12696 中的稳定性

由于在后续共培养体系中不便加入抗生素, 因此在无选择压力条件下, 检测重组质粒 pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp 能否在宿主传代过程中稳定存在和正常表达, 才可确保后续实验中观察到荧光信号。SCSIO 12696/pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp 在无抗性的 MA 培养基上传代 5 次后, 随机挑取 100 个单菌落接种于添加 Amp 的 MA 培养基上, 结果显示 100 个单菌落均能生长, 说明质粒 pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp 可在 SCSIO 12696 中稳定存在。

2.4 SCSIO 12696/pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp 和 CCMP 2433 共培养的显微观察

对虫黄藻 CCMP 2433 和绿色荧光蛋白标记菌 SCSIO 12696/pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp 共培养物进行显微观察。激光扫描共聚焦显微镜观察结果

显示, 在激发波长 488 nm 和发射波长 650–690 nm 通道下清晰可见虫黄藻叶绿素 a 荧光信号; 在激发波长 488 nm 和发射波长 495–520 nm 通道下清晰可见 SCSIO 12696/pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp 绿色荧光信号(图 3)。在共培养条件下, 菌株 SCSIO 12696 可附着在虫黄藻 CCMP 2433 细胞表面(图 3), 是否进入虫黄藻细胞内部仍需进一步实验验证。

3 讨论与结论

近年来, 国内外学者对于海洋细菌遗传操作系统的研究有限^[17]。自然转化和化学转化对细菌本身有一定的要求^[17]; 电穿孔虽然是一种快速、高效率的手段, 但因为盐分的限制使其不适用于一些需盐或需海水方可生长的海洋细菌。因此, 接合转移是最可能被广泛应用于海洋细菌的转化技术^[33]。本研

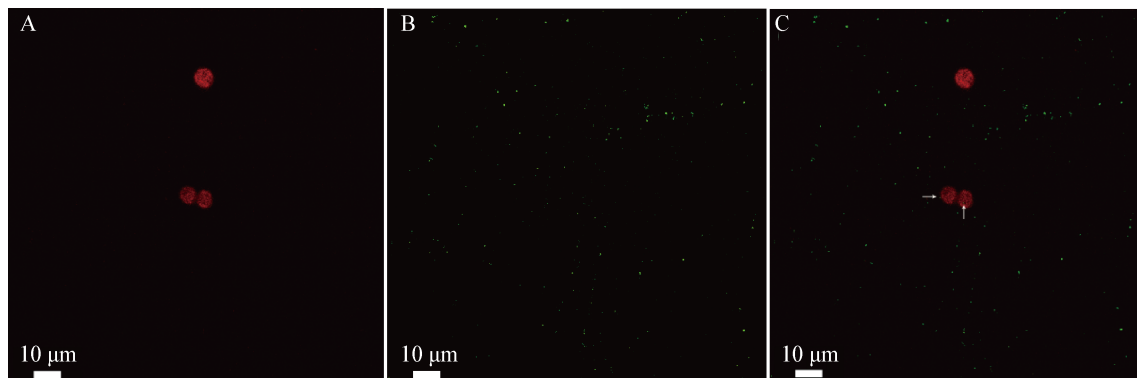


图3 虫黄藻 CCMP 2433 与 *egfp* 标记的 SCSIO 12696 的共存方式

Figure 3 Coexistence of *Symbiodinium* CCMP 2433 and *egfp*-labeled SCSIO 12696

注: A: 在激发波长 488 nm 和发射波长 650–690 nm 通道下虫黄藻叶绿素 a 的荧光信号; B: 在激发波长 488 nm 和发射波长 495–520 nm 通道下菌株 SCSIO 12696/pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp 表达的绿色荧光蛋白信号; C: 图 A 和图 B 叠加图, 箭头指示标记菌株 SCSIO 12696

Note: A: The fluorescence signal of chlorophyll a of zooxanthellae under the channel of excitation wavelength 488 nm and emission wavelength 650–690 nm; B: The green fluorescent protein expressed by SCSIO 12696/pBBR1MCS2-Tac-EGFP-Amp observed under the channel of excitation wavelength of 488 nm and emission wavelength of 495–520 nm; C: An overlay of Figure A and B, arrows indicate cells of the eGFP-labeled strain SCSIO 12696

研究所用的菌株 SCSIO 12696 是从鹿角杯形珊瑚组织中分离的港口球菌科潜在新属, 需在添加海水的培养基中生长。然而, DAP 营养缺陷型大肠杆菌 WM3064 在不含 DAP 的常用海洋菌培养基 MA 上也能正常生长, 因此 MA 培养基虽然能满足供、受体菌的生长需求, 但不适用于接合子筛选。常见的接合转移方法没有提供一种专性海洋细菌能够正常生长且具有筛选作用的培养基。本研究改良了 LB 培养基, 使其盐度发生变化, 使供体菌和专性海洋受体菌都能生长, 并且能利用抗生素抗性和营养缺陷进行接合子的筛选, 为专性海洋菌的接合转移遗传操作提供了关键培养条件。研究发现, 在本系统中接合转移效率与供、受体菌的比例及温度有关, 相关结果可为珊瑚共附生细菌的遗传操作提供借鉴。

众所周知, 在全球气候变化和人类活动的影响下, 世界范围内的珊瑚正面临着大面积的白化和死亡^[51]。探究珊瑚共生体各成员之间的相互关系是寻求珊瑚健康维护和恢复手段的关键^[42]。本研究成功建立了适合专性海洋细菌的遗传操作体系, 为深入研究珊瑚-细菌、虫黄藻-细菌相互作用奠定了基础。

构建的 *egfp* 基因标记菌株, 将为后续从微观角度研究虫黄藻-细菌原位相互作用提供材料。同时, 替换不同的荧光蛋白基因可使目标菌株携带其他的荧光蛋白信号, 使之更适用于在珊瑚共生体复杂自发荧光背景下的原位观察。此外, 基于本研究所建立的遗传操作体系及荧光标记技术, 可对相关海洋菌进行遗传操作, 以便于进一步深入研究细菌的附着动力学过程和机制、细菌在宿主微环境中的增殖能力和方式以及细菌与宿主或虫黄藻的互作机制。

致谢: 感谢中国科学院南海海洋研究所王晓雪研究员赠予菌株 *Escherichia coli* WM3064, 以及李茹在实验操作中给予的指导。

REFERENCES

- [1] Bourne DG, Garren M, Work TM, Rosenberg E, Smith GW, Harvell CD. Microbial disease and the coral holobiont[J]. Trends in Microbiology, 2009, 17(12): 554-562
- [2] Krediet CJ, Ritchie KB, Paul VJ, Teplitski M. Coral-associated micro-organisms and their roles in promoting coral health and thwarting diseases[J]. Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences, 2013, 280(1755): 20122328
- [3] Rowan R. Coral bleaching: thermal adaptation in reef coral symbionts[J]. Nature, 2004, 430(7001): 742

- [4] Dubinsky Z, Jokiel PL. Ratio of energy and nutrient fluxes regulates symbiosis between zooxanthellae and corals[J]. Pacific Science, 1994, 48(3): 313-324
- [5] Radecker N, Pogoreutz C, Voolstra CR, Wiedenmann J, Wild C. Nitrogen cycling in corals: the key to understanding holobiont functioning?[J]. Trends in Microbiology, 2015, 23(8): 490-497
- [6] Shnit-Orland M, Sivan A, Kushmaro A. Antibacterial activity of *Pseudoalteromonas* in the coral holobiont[J]. Microbial Ecology, 2012, 64(4): 851-859
- [7] Thompson JR, Rivera HE, Closek CJ, Medina M. Microbes in the coral holobiont: partners through evolution, development, and ecological interactions[J]. Frontiers Cellular Infection Microbiology, 2015, 4: 176
- [8] Ben-Haim Y, Banim E, Kushmaro A, Loya Y, Rosenberg E. Inhibition of photosynthesis and bleaching of zooxanthellae by the coral pathogen *Vibrio shiloi*[J]. Environmental Microbiology, 1999, 1(3): 223-229
- [9] Ben-Haim Y, Thompson FL, Thompson CC, Cnockaert MC, Hoste B, Swings J, Rosenberg E. *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(1): 309-315
- [10] Rosenberg E, Kushmaro A. Microbial diseases of corals: pathology and ecology[A]//Dubinsky Z, Stambler N. Coral Reefs: An Ecosystem in Transition[M]. Dordrecht: Springer, 2011: 451-464
- [11] Richardson LL, Aronson RB. Infectious diseases of reef corals[A]//Proceedings 9th International Coral Reef Symposium[C]. Bali, Indonesia, 2000, 2: 1225-1230
- [12] Ritchie KB. Bacterial symbionts of corals and *Symbiodinium*[A]//Rosenberg E, Gophna U. Beneficial Microorganisms in Multicellular Life Forms[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2012: 139-150
- [13] Banin E, Khare SK, Naider F, Rosenberg E. Proline-rich peptide from the coral pathogen *Vibrio shiloi* that inhibits photosynthesis of zooxanthellae[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(4): 1536-1541
- [14] Dixon GK, Syrett PJ. The growth of dinoflagellates in laboratory cultures[J]. New Phytologist, 1988, 109(3): 297-302
- [15] Alavi M, Miller T, Erlandson K, Schneider R, Belas R. Bacterial community associated with *Pfiesteria*-like dinoflagellate cultures[J]. Environmental Microbiology, 2001, 3(6): 380-396
- [16] Balch WE, Der CJ, Hall A. Regulators and effectors of small GTPases: Rho family[J]. Methods in Enzymology, 2006, 406: 1-798
- [17] Zeaiter Z, Mapelli F, Crotti E, Borin S. Methods for the genetic manipulation of marine bacteria[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2018, 33: 17-28
- [18] Pollack-Berti A, Wollenberg MS, Ruby EG. Natural transformation of *Vibrio fischeri* requires *tfoX* and *tfoY*[J]. Environmental Microbiology, 2010, 12(8): 2302-2311
- [19] Gulig PA, Tucker MS, Thiaville PC, Joseph JL, Brown RN. USER friendly cloning coupled with chitin-based natural transformation enables rapid mutagenesis of *Vibrio vulnificus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(15): 4936-4949
- [20] Dalia TN, Hayes CA, Stolyar S, Marx CJ, McKinlay JB, Dalia AB. Multiplex genome editing by natural transformation (MuGENT) for synthetic biology in *Vibrio natriegens*[J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(9): 1650-1655
- [21] Weinstock MT, Hesek ED, Wilson CM, Gibson DG. *Vibrio natriegens* as a fast-growing host for molecular biology[J]. Nature Methods, 2016, 13(10): 849-851
- [22] Liu Y, Zheng H, Zhan GH, Qin W, Tian L, Li WL. Establishment of an efficient transformation protocol and its application in marine-derived *Bacillus* strain[J]. Science China Life Sciences, 2014, 57(6): 627-635
- [23] Stucken K, Ilhan J, Roettger M, Dagan T, Martin WF. Transformation and conjugal transfer of foreign genes into the filamentous multicellular cyanobacteria (subsection V) *Fischerella* and *Chlorogloeopsis*[J]. Current Microbiology, 2012, 65(5): 552-560
- [24] Harris JR, Lundgren BR, Grzeskowiak BR, Mizuno K, Nomura CT. A rapid and efficient electroporation method for transformation of *Halomonas* sp. O-1[J]. Journal of Microbiological Methods, 2016, 129: 127-132
- [25] Sonnenschein EC, Gardes A, Seebah S, Torres-Monroy I, Grossart HP, Ullrich MS. Development of a genetic system for *Marinobacter adhaerens* HP15 involved in marine aggregate formation by interacting with diatom cells[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 87(2): 176-183
- [26] Zhao DL, Yu ZC, Li PY, Wu ZY, Chen XL, Shi M, Yu Y, Chen B, Zhou BC, Zhang YZ. Characterization of a cryptic plasmid pSM429 and its application for heterologous expression in psychrophilic *Pseudoalteromonas*[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10(1): 30
- [27] Piekarski T, Buchholz I, Drepper T, Schobert M, Wagner-Doebler I, Tielen P, Jahn D. Genetic tools for the investigation of *Roseobacter* clade bacteria[J]. BMC Microbiology, 2009, 9(1): 265
- [28] Chen HX, Lin HZ, Jiang P, Li FC, Qin S. Genetic transformation of marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. CC9311 (*Cyanophyceae*) by electroporation[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2013, 31(2): 416-420
- [29] Klevanskaa K, Bier N, Stingl K, Strauch E, Hertwig S. PVv3, a new shuttle vector for gene expression in *Vibrio vulnificus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(4): 1477-1481
- [30] Hamashima H, Nakano T, Tamura S, Arai T. Genetic transformation of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio*

- alginolyticus*, and *Vibrio cholerae* non O-1 with plasmid DNA by electroporation[J]. Microbiology and Immunology, 1990, 34(8): 703-708
- [31] Smillie C, Garcillán-Barcia MP, Francia MV, Rocha EPC, De La Cruz F. Mobility of plasmids[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2010, 74(3): 434-452
- [32] Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(9): 711-721
- [33] Wang PX, Yu ZC, Li BY, Cai XS, Zeng ZS, Chen XL, Wang XX. Development of an efficient conjugation-based genetic manipulation system for *Pseudoalteromonas*[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14(1): 11
- [34] Tolonen AC, Liszt GB, Hess WR. Genetic manipulation of *Prochlorococcus* strain MIT9313: green fluorescent protein expression from an RSF1010 plasmid and Tn5 transposition[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(12): 7607-7613
- [35] Yu ZC, Zhao DL, Ran LY, Mi ZH, Wu ZY, Pang XH, Zhang XY, Su HN, Shi M, Song XY, et al. Development of a genetic system for the deep-sea psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM9913[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13(1): 13
- [36] Le Roux F, Binesse J, Saulnier D, Mazel D. Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counterselectable suicide vector[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(3): 777-784
- [37] Hoffart E, Grenz S, Lange J, Nitschel R, Müller F, Schwentner A, Feith A, Lenfers-Lücker M, Takors R, Blombach B. High substrate uptake rates empower *Vibrio natriegens* as production host for industrial biotechnology[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(22): e01614-17
- [38] Luo P, He XY, Liu QT, Hu CQ. Developing universal genetic tools for rapid and efficient deletion mutation in *Vibrio* species based on suicide T-vectors carrying a novel counterselectable marker, vmi480[J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0144465
- [39] Van De Water JAJM, Voolstra CR, Rottier C, Cocito S, Peirano A, Allemand D, Ferrier-Pagès C. Seasonal stability in the microbiomes of temperate gorgonians and the red coral *Corallium rubrum* across the Mediterranean Sea[J]. Microbial Ecology, 2018, 75(1): 274-288
- [40] Klindworth A, Mann AJ, Huang SX, Wichels A, Quast C, Waldmann J, Teeling H, Glöckner FO. Diversity and activity of marine bacterioplankton during a diatom bloom in the North Sea assessed by total RNA and pyrotag sequencing[J]. Marine Genomics, 2014, 18: 185-192
- [41] Pollock FJ, Krediet CJ, Garren M, Stocker R, Winn K, Wilson B, Huete-Stauffer C, Willis BL, Bourne DG. Visualization of coral host-pathogen interactions using a stable GFP-labeled *Vibrio coralliilyticus* strain[J]. Coral Reefs, 2015, 34(2): 655-662
- [42] Bourne DG, Morrow KM, Webster NS. Insights into the coral microbiome: underpinning the health and resilience of reef ecosystems[J]. Annual Review of Microbiology, 2016, 70(1): 317-340
- [43] Dehio C, Meyer M. Maintenance of broad-host-range incompatibility group P and group Q plasmids and transposition of Tn5 in *Bartonella henselae* following conjugal plasmid transfer from *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(2): 538-540
- [44] Guillard RRL, Ryther JH. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1962, 8(2): 229-239
- [45] Wang F, Qiu RG, Tang L. Establishment and optimization for conjugal transfer system of tautomycin-producing strain *S. griseochromogenes*[J]. Journal of Dalian University of Technology, 2012, 52(3): 338-342 (in Chinese)
- 王芬, 邱荣国, 唐莉. 变构菌素产生菌 *S. griseochromogenes* 接合转移体系建立与优化[J]. 大连理工大学学报, 2012, 52(3): 338-342
- [46] Ohtani N, Sato M, Tomita M, Itaya M. Restriction on conjugational transfer of pLS20 in *Bacillus subtilis* 168[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2008, 72(9): 2472-2475
- [47] Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop II RM, Peterson KM. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes[J]. Gene, 1995, 166(1): 175-176
- [48] Kovach ME, Phillips RW, Elzer PH, Roop RM, Peterson KM. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector[J]. Biotechniques, 1994, 16(5): 800-802
- [49] Antoine R, Loch C. Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from Gram-positive organisms[J]. Molecular Microbiology, 1992, 6(13): 1785-1799
- [50] Richhardt J, Larsen M, Meinhardt F. An improved transconjugation protocol for *Bacillus megaterium* facilitating a direct genetic knockout[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(6): 1959-1965
- [51] Goldberg J, Wilkinson C. Global threats to coral reefs: coral bleaching, global climate change, disease, predator plagues, and invasive species[A]//Wilkinson CR. Status of Coral Reefs of the World[M]. Townsville, Australia: GCRMN Australian Institute of Marine Science, 2004: 67-92