

文章编号 :1009-038X(2004)04-0098-03

高渗透压对细菌电转化率的影响

徐 敏 , 马骏双 , 王正祥

(江南大学 生物工程学院 江苏 无锡 214036)

摘 要 :研究了革兰氏阴性细菌大肠杆菌 JM109 和革兰氏阳性细菌地衣芽孢杆菌 0204 在电转化过程中 ,高渗溶液如山梨醇、甘露醇、甘油、蔗糖和葡萄糖对其电转化率的影响。结果表明 ,高渗溶液能够有效保护细胞 ,提高转化率。在复苏培养基中 0.7 mol/L 甘露醇对地衣芽孢杆菌 0204 的保护效果最好 0.1 mol/L 蔗糖对大肠杆菌 JM109 的保护效果最好。由此得到质粒 DNA 对地衣芽孢杆菌 0204 的最高电转化率为 9.8×10^2 转化子/ μg ,质粒 DNA 对大肠杆菌 JM109 的最高电转化率为 5.9×10^8 转化子/ μg 。

关键词 :电转化 ;高渗透压 地衣芽孢杆菌 ;大肠杆菌

中图分类号 :Q 813

文献标识码 :A

Effect of High Osmolarity on Electrotransformation Efficiency of Bacteria

XU Min , MA Jun-shuang , WANG Zheng-xiang

(School of Biotechnology , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China)

Abstract : The effect of hyperosmolarity , such as sorbitol ,mannitol ,glycerol ,sucrose and glucose on electrotransformation of the gram-negative *Escherichia coli* JM109 and the gram-positive *Bacillus licheniformis* 0204 were studied. Recovery media containing 0.7 mol/L mannitol protected the cells of *Bacillus licheniformis* well , and so did 0.1 mol/L sucrose for *E. coli* JM109. At the optimal electrotransformation condition , the highest transformation efficiency of 9.8×10^2 transformants/ μg DNA was obtained for *Bacillus licheniformis* , and 5.9×10^8 transformants/ μg DNA for *E. coli* JM109.

Key words : electrotransform ; hyperosmolarity ; *Bacillus licheniformis* ; *Escherichia coli*

在细菌转化实验中 ,电穿孔是一种快速、简单而又有效的转化方法。影响电转化效率的主要因素是随着电场强度的增加 ,产生的疏水小孔越多 ,细胞膜通透性越好 ,外源 DNA 越容易进入细胞 ,但细胞的死亡率也会随着电场强度的增加而增加。所以要得到最高的电转化率 ,一方面要提高电场强度到

一个合适数值 ,另一方面又要尽量降低死亡率。细胞在电击后很容易死亡 ,若加入高渗溶液 ,由于能有效保护细胞从而提高细胞的存活率 ,最终提高电转化率。作者曾用芽孢杆菌饥饿法^[1]将整合型质粒转化到地衣芽孢杆菌 0204 时 ,转化率极低 ,所以有必要采用新的转化方法来提高其转化率 ,同时研究

收稿日期 2003-11-26 ; 修回日期 2004-01-12.

作者简介 :徐敏 (1978-) ,男 ,江苏昆山市人 ,发酵工程硕士研究生。

万方数据

高渗透压对细菌转化效率的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒 菌种 :大肠杆菌 JM109 (*Escherichia coli*),地衣芽孢杆菌 0204(*Bacillus licheniformis*)(本实验室保存);质粒 :pHY-amyI⁺ :: Ω Kn(本实验室构建 ,另文发表).

1.1.2 培养基 生长培养基 :含 0.5 mol/L 山梨醇的 LB 培养基 ;电转化缓冲液 0.5 mol/L 山梨醇 0.5 mol/L 甘露醇和体积分数 10% 甘油 ;复苏培养基 :含 0.5 mol/L 山梨醇和 0.38 mol/L 甘露醇的 LB 培养基.

1.1.3 主要仪器设备 Multiporator 电转化仪 ,电转化池 (1 mm) 德国 Eppendorf 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌电转化方法 见文献 [2].

1.2.2 地衣芽孢杆菌电转化方法 按文献 [3] 接种地衣芽孢杆菌于 2.5 mL LB 培养基中 ,过夜培养后 ,转接入 50 mL 生长培养基中 ,于 37 ℃ 培养至 OD_{600nm} 值为 0.85 ~ 0.95. 将菌体在冰水浴中放置 10 min ,于 4 ℃ ,10 000 r/min 离心 5 min 收集菌体. 用预冷的电转化缓冲液反复洗涤细胞 4 次. 将细胞悬浮于约 1 mL 的预冷电转化缓冲液中. 取 60 μ L 菌体分装于 1.5 mL Eppendorf 管中. 取 1 μ L 质粒 DNA(50 ng/ μ L)与感受态细胞混匀 ,移入预冷的电转化池 ,电击(2 000 V 5 ms)后 ,加入 1 mL 复苏培养基 ,37 ℃ 80 r/min 培养 3 h ,然后涂布卡那霉素 (5 μ g/mL)抗性平板.

2 结果与讨论

2.1 复苏培养基中加入不同高渗溶液对电转化率的影响

在 LB 复苏培养基中 ,细胞得不到有效保护 ,所以细胞死亡率很高 ,转化率非常低. 在复苏培养基中加入高渗溶液后 ,细胞得到了有效保护 ,提高了转化率. 对于地衣芽孢杆菌 0204 ,复苏培养基中加入 0.5 mol/L 甘露醇时 ,质粒 DNA 转化率达到最高值 9.0×10^2 转化子/ μ g. 与不加任何渗透压稳定剂的 LB 相比 ,转化率提高了 180 倍. 对于 *E. coli*

JM109 ,复苏培养基中加入 0.5 mol/L 蔗糖时 ,质粒 DNA 转化率达到最高值 2.0×10^7 转化子/ μ g. 与标准使用的 SOC 培养基相比 ,转化率提高了近 3 倍 (见表 1).

表 1 复苏培养基中加入不同高渗溶液对电转化率的影响
Tab.1 Effects of several hyperosmotic recovery media on electrotransformation efficiency

复苏培养基	0204 转化率/ (转化子/ μ g)	JM109 转化率/ (转化子/ μ g)
LB	5	3×10^2
SOC	—	7.2×10^6
LB + 0.5 mol/L 葡萄糖	2.0×10^2	10.8×10^6
LB + 0.5 mol/L 山梨醇	3.8×10^2	3.4×10^6
LB + 0.5 mol/L 蔗糖	5.2×10^2	20.0×10^6
LB + 体积分数 10% 甘油	5.6×10^2	4.0×10^6
LB + 0.5 mol/L 甘露醇	9.0×10^2	4.6×10^6

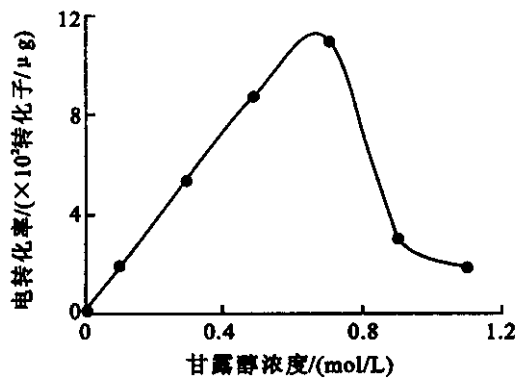
2.2 生长培养基中加入不同高渗溶液对电转化率的影响

进一步确定细胞生长培养基对电转化率的影响 ,对于地衣芽孢杆菌 0204 ,在生长培养基中加入不同的高渗溶液后转化率都有所提高 ,当 LB 中加入 0.5 mol/L 山梨醇后 ,转化率提高了一倍. 对于 *E. coli* JM109 ,在 LB 中加入不同高渗溶液后 ,除蔗糖外 ,其它高渗溶液都能提高转化率 ,当加入 0.5 mol/L 葡萄糖时 ,转化率提高了 55%. 在生长培养基中加入高渗溶液能一定程度上提高转化率 ,其原因可能是如果生长培养基只是 LB ,当菌体转移到电转化缓冲液时 ,渗透压的突然改变会对细胞产生有害作用 ,从而影响转化率.

2.3 复苏培养基中甘露醇浓度对电转化率的影响

进一步确定复苏培养基中渗透压稳定剂的最适浓度. 对地衣芽孢杆菌 0204 而言 ,复苏培养基中的甘露醇浓度在 0.5 ~ 0.7 mol/L 时对电转化率具有显著影响. 当甘露醇浓度为 0.7 mol/L 时 ,质粒 DNA 对地衣芽孢杆菌 0204 的转化率可达到 9.1×10^2 转化子/ μ g(见图 1).

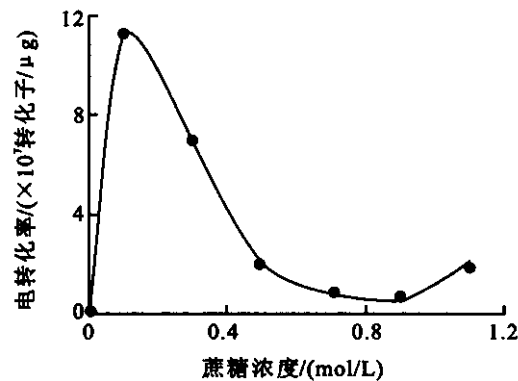
对 *E. coli* JM109 而言 ,蔗糖浓度大于 0.1 mol/L 时 ,随着蔗糖浓度的增加 ,电转化率呈下降趋势 ,当蔗糖浓度超过 1 mol/L 时 ,转化率略有上升. 当蔗糖浓度为 0.1 mol/L 时 ,*E. coli* JM109 的转化率最高 ,为 1.11×10^8 转化子/ μ g(见图 2).



甘露醇浓度为 0 mol/L 时表示复苏培养基为 LB 培养基

图 1 复苏培养基中甘露醇浓度对电转化率的影响

Fig.1 Effects of mannitol concentration in recovery media on transformation efficiency of *B. licheniformis*



蔗糖浓度为 0 mol/L 时表示复苏培养基为 LB 培养基

图 2 复苏培养基中的蔗糖浓度对电转化率的影响

Fig.2 Effects of sucrose concentration in recovery media on transformation efficiency of *E. coli* JM109

3 结 论

根据实验得出 ,复苏培养基中渗透压状态对电转化率有显著影响. 地衣芽孢杆菌 0204 最佳电转化条件是 :生长培养基为 LB + 0. 5 mol/L 山梨醇 ,

复苏培养基为 LB + 0. 7 mol/L 甘露醇 ,电场强度为 20 kV/cm ,由此得到质粒 DNA 对于该菌的电转化率为 9.8×10^2 转化子/μg. 与芽孢杆菌饥饿法^[1]得到的最高转化率相比 ,提高了近 4 倍. 复苏培养基中渗透压状态对其他微生物细胞电转化率的影响正在研究中.

参考文献 :

[1] 唐雪明 ,邵蔚蓝 ,沈微 ,等. 地衣芽孢杆菌感受态细胞的形成及高效电转化[J]. 无锡轻工大学学报 ,2002 ,21(5) :460 - 463.

[2] Sambrook J ,Fritsch E ,Maniatis T. Molecular Cloning : A Laboratory Manual ,3rd ed.[M]. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press ,2001.

[3] Xue G-P ,Johnson J S ,Dalrymple B P. High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*[J]. **Journal of Microbiological Methods** ,1999 ,34 :183 - 191.

(责任编辑 杨 勇)