

文章编号:1673-1689(2007)03-0070-05

## 产甘油假丝酵母两种转化方法的比较

张永光, 陈献忠, 饶志明, 沈微, 方慧英, 诸葛健  
(江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡 214122)

**摘要:** 为了研究产甘油假丝酵母高产甘油和耐高渗的机制, 以 Zeocin 作为选择标记, 考察和比较了两种转化方法, 即醋酸锂法和电转化法的转化效果, 以建立简单有效的产甘油假丝酵母转化体系。结果表明, 细胞生长时期是影响转化率的关键因素。在  $OD_{600}$  约为 1.3 时制备感受态细胞, 在电压为 1.5 kV 时进行电击, 可获得较高转化率, 为每微克 DNA 139 个转化子。在  $OD_{600}$  约为 1.0 时制备感受态细胞, 醋酸锂预处理细胞 1 h, 获得的转化率为每微克 DNA 154 个转化子。综合考虑, 醋酸锂法更适合于产甘油假丝酵母的转化。

**关键词:** 产甘油假丝酵母; 转化; 醋酸锂

**中图分类号:** Q 933

**文献标识码:** A

### Comparison of Two Transformation Methods for *Candida glycerinogenes*

ZHANG Yong-guang, CHEN Xian-zhong, RAO Zhi-ming,  
SHEN Wei, FANG Hui-ying, ZHUGE Jian

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** In order to develop a high efficiency genetic transformation system for *Candida glycerinogenes*, two different transformation methods (lithium acetate and electroporation transformation) were compared in this study. It was found that the cell growth stage plays key role on the transformation efficiency. Under the condition of  $OD_{660} = 1.3$ , voltage of 1.5 kV, a high transformation efficiency (139 transformants/ $\mu$ g DNA) was achieved. However, with the lithium acetate transformation method, 154 transformants/ $\mu$ g DNA was detected under the conditions of  $OD_{660} = 1.0$ , 1 h LiAc treatment. All results demonstrated that, LiAc transformation method will be beneficial to develop the genetic transformation system for *Candida glycerinogenes*.

**Key words:** *Candida glycerinogenes*; transformation; lithium acetate

产甘油假丝酵母 *Candida glycerinogenes* 是目前我国用于发酵甘油生产的主要优良菌株, 具有高

产量、高转化率等优点<sup>[1-2]</sup>。转化是酵母基因操作技术的重要前提, 高效的酵母转化体系是实现外源

收稿日期: 2006-10-26.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30570142), 江苏省青年科技创新人才基金项目(BK2006504).

作者简介: 张永光(1976-), 男, 河南三门峡人, 发酵工程博士研究生。

通讯作者: 诸葛健(1939-), 男, 浙江金华人, 教授, 博导, 主要从事工业微生物菌种选育及其相关研究. Email: jzhuge@hotmail.com

基因表达的关键之一,也是深入研究酵母遗传资源和进行途径工程改造的基础。最早使用的酵母转化方法是原生质体法,随后有 LiAc 法、电转化法、粒子轰击法、玻璃珠振荡法等<sup>[3]</sup>。转化方法的选择取决于试验的目的,通常以转化率,即每微克 DNA 转化时所获得的转化子个数(转化子个数/ $\mu\text{g}$  DNA)作为主要考察指标。目前,作者所在工业微生物研究中心已对 *C. glycerinogenes* 的菌株特性、发酵工艺等进行了较广泛的研究,对耐高渗和过量合成甘油的机理,以及其基因操作平台等方面也作了探讨<sup>[1-2,4-8]</sup>。研究中以 Zeocin 作为选择标记,比较了醋酸锂法和电转化法转化 *C. glycerinogenes*,考察和优化了细胞生长时期、电压等,以期建立高效、简单的产甘油假丝酵母转化体系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与质粒** *C. glycerinogenes* 由江南大学生物工程学院工业微生物研究中心保藏,培养基为 YPD,选择培养基为含 Zeocin 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 YPD。*Escherichia coli* DH 5a 用于质粒的构建与增殖,其培养基为含 Zeocin 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LB。pGAPZ B 购自 Invitrogen 公司,pGEM T easy Vector 购自 Promega 公司。

**1.1.2 试剂** Hind III、Nde I、rTaq DNA Polymerase、Pyrobest DNA Polymerase、T4 DNA ligase、相对分子质量标准 DL-2000,购自 TaKaRa 公司;Zeocin 购自 Invitrogen 公司;Sorbitol 购自 AM-RESCO 公司;PEG3350 购自 Sigma 公司;鲑鱼精 DNA 购自华美公司;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 质粒的构建** PCR 扩增获得了编码 *C. glycerinogenes* URA3 基因的部分片段,将其与 pGEM T easy vector 连接,得到 pTU。将 Pyrobest DNA Polymerase 扩增得到 pGAPZ B Zeocin 抗性基因表达盒,与经 Nde I 线性化且平端化的 pTU 连接,得到本研究所用质粒 pTUZ。PCR 扩增获得了编码 *C. glycerinogenes* URA3 基因的部分片段(引物两端有 Bgl II 酶切位点),将所得到的 PCR 产物经 Bgl II 酶切后,插入到线性化的 pGAPZ B 的 Bgl II 位点,得到转化用质粒 pBU。

**1.2.2 质粒的制备** 质粒的提取、纯化和线性化,参照文献[9]。用 Nde I 线性化质粒 pBU, Hind III 线性化 pTUZ。

**1.2.3 电转化** 方法参照文献[10]。将 50  $\mu\text{L}$  感

受态细胞和 1  $\mu\text{g}$  质粒混匀后,移入预冷的 2 mm 规格电击杯中。设定电阻 200  $\Omega$ 、电容 25  $\mu\text{F}$  不变,进行电击。迅速加入 0.9 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇轻柔悬浮细胞,30  $^{\circ}\text{C}$  静置培养 1 h。加入 1 mL 液体 YPD,于 30  $^{\circ}\text{C}$ 、100 r/min 下培养 1 h。浓缩培养液,将其均匀涂布选择培养基。30  $^{\circ}\text{C}$  避光培养,2~3 d 开始统计和挑取转化子。

**1.2.4 醋酸锂转化** 方法参照文献[11-12]。

**1.2.5 转化子的验证** 基因组 DNA 的提取参照文献[3]。根据 Zeocin 抗性基因 *Shble* 序列设计引物,ble-5 (5'-ATG GCC AAG TTG CCA GT GCC GTT C-3') 和 ble-3 (5'-GTC AGT CCT GCT CC T CGG CCA CGA AG-3')。分别以转化子和野生型菌株基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 条件为 95  $^{\circ}\text{C}$  3 min;94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,51  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  40 s,35 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  6 min。2%(质量分数)琼脂糖凝胶电泳检测。

## 2 结果

### 2.1 转化质粒的构建

在缺少菌株自身的表达元件和质粒的条件下,基于已克隆的 *C. glycerinogenes* URA3 基因部分片段,构建了用于转化的整合质粒 pBU(见图 1 A)和 pTUZ(见图 1 B)。pBU 包含有毕赤酵母的组成型表达的强启动子 3'-磷酸甘油醛脱氢酶启动子(3'-GAP),以便在产甘油假丝酵母中表达外源蛋白质基因。pTUZ 则把含有 Zeocin 抗性基因 *Sh ble* 及其启动子和终止子的片段,插入到产甘油假丝酵母 URA3 基因片段中间,为鉴定基因功能摸索条件。

### 2.2 电转化

研究表明,细胞生长时期和电压是影响电转化的重要因素。为此,考察了这些因素对转化的影响。收集了 6 个处于不同 OD<sub>600</sub> 的菌体制备感受态细胞,用 1 mol/L 山梨醇稀释到相同的 OD<sub>600</sub>(细胞浓度约为  $1.5 \times 10^9$  个/mL),在 1.5 kV 下电击。不同指数生长期细胞对转化率的影响很大,结果见图 2。在 OD<sub>600</sub> 为 1.3 时制备感受态细胞可获得最佳转化效果。当 OD<sub>600</sub> 大于 1.3,转化率急剧下降。

电转化是通过电场强度造成细胞膜瞬时通透性变化,从而将外界 DNA 导入细胞。因此选择合适的电压是电转化的关键。收集 OD<sub>600</sub> 约为 1.3 的菌体,制备感受态细胞。在电阻 200  $\Omega$ 、电容 25  $\mu\text{F}$  不变的条件下,研究电击电压对转化的影响,结果见图 3。在电压为 1.5 kV(电场强度为 7.5 kV/

m)时,转化率最高。继续加大电压导致转化率的下降,在电压为2.5 kV时,转化率为0。

Fig. 1 Construction of plasmid pBU and pTUZ

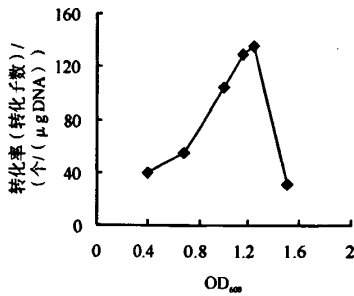


图2 细胞生长时期对转化的影响

Fig. 2 Effect of cell growth stage on transformation

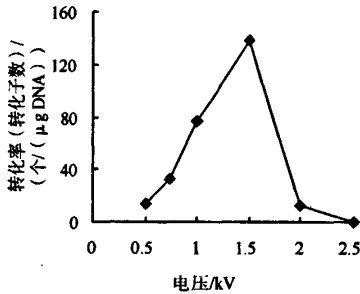


图3 电压对转化的影响

Fig. 3 Effect of voltage on transformation

2.3 醋酸锂法

醋酸锂法转化酵母的原理是利用碱性 Li<sup>+</sup> 改变细胞膜的通透性,促进感受态的形成,使细胞易于吸收外界 DNA<sup>[14]</sup>。显然, LiAc 对酵母细胞的处理时间与方式是关键因素。在研究中发现,用文献[12]的方法转化 *C. glycerinogenes* 时获得的转化率较低,而用文献[11]的方法所得到的转化效果要优于前者。二者主要的差异是后者用 LT (TE (pH 7.5), 0.1 mol/L LiAc (pH 7.5)) 于 30 °C 100 r/min 振荡培养 1 h,说明文献[11]的方法能较好地诱导 *C. glycerinogenes* 细胞感受态的出现。为此,进一步考察了 LT 处理酵母细胞时间与转化率之间可能的关系。具体情况见图 4。

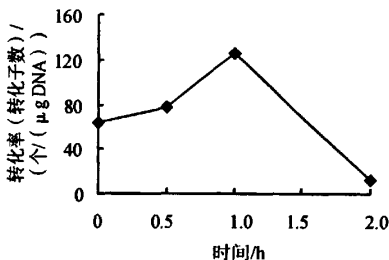


图4 LT处理细胞时间对转化的影响

Fig. 4 Effect of cell pretreatment time on transformation

LT 处理细胞 60 min 可提高转化率约 1 倍,但是当处理时间延长至 2 h 时转化率急剧下降,可能 LiAc 处理时间过长,对细胞损伤较大。这说明了转化方法的具体操作因菌株而异,与宿主菌的细胞壁结构、生理特性及遗传差异有直接的关系。

收集处于不同指数生长期的菌体制备感受态细胞(终浓度约 2.0 × 10<sup>9</sup> 个/mL),然后用于 LiAc 转化,结果见图 5。在 OD<sub>600</sub> 约为 1.0 时适宜制备感受态细胞。醋酸锂法不同于电转化,制备感受态细胞的最佳生长期相对较短。可能的原因是:电击瞬时高压造成细胞大量死亡,同时处于较早生长前期的细胞的细胞膜难以复原; Li<sup>+</sup> 改善细胞膜对外界 DNA 的通透性相对较温和,但诱导力度有限。

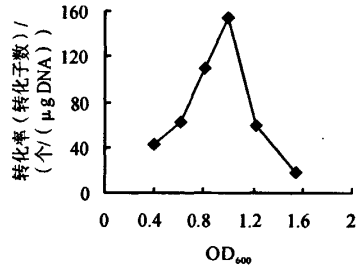


图5 细胞生长时期对醋酸锂法转化的影响

Fig. 5 Effect of cell growth stage on LiAc transformation

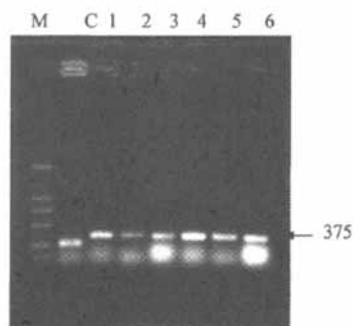
醋酸锂转化时,酵母细胞的热激时间因菌株而异。产甘油假丝酵母细胞分别经 42 °C 热激 10、15、20、25、45 min 后用于转化。结果表明:细胞在热激 20 min 之后转化率没有大的变化,转化子约为 154 个/(μg DNA)。为此确定热激时间为 20 min。

2.4 转化子的验证

从选择性平板上随机挑取了 6 个转化子,提取其基因组 DNA 用于 PCR 反应。电泳结果见图 6。阳性转化子基因组的 PCR 产物中有长为 375 bp 的 Zeocin 抗性基因中的 *Sh ble* 特异条带,对照野生型菌株的则无此带,表明外源质粒 DNA 已成功地整合到 *C. glycerinogenes* 基因组中。

3 讨论

酵母转化的基本原理是通过不同方式来改变细胞膜的通透性,从而使外界 DNA 进入酵母细胞。因此,选择一个简单、高效的转化方法是进行酵母基因操作的重要前提。本研究的目的是考察醋酸锂法和电转化法两种方法应用于 *C. glycerinogenes* 转化的效果,以确定一种操作简单、高效的转



M为相对分子质量标准DL-2000; C为PCR模板为野生型菌株基因组DNA; 1~6, PCR模板为转化子基因组DNA。

图6 转化子的PCR鉴定

Fig. 6 Confirmation of transformants by PCR

化方法。以上实验结果显示,通过对酵母细胞进行预处理,确定制备感受态细胞的最佳时机、热激时间等因素,醋酸锂法转化可获得转化子高达154个/ $(\mu\text{g DNA})$ 。通过电转化得到的转化率较低,且操作步骤较繁琐,即在电击结束后所得到的细胞必须进行后培养,否则难以获得大量转化子,因此电转化法用于 *C. glycerinogenes* 转化不够理想。综合考虑,醋酸锂法更适合于 *C. glycerinogenes* 的转化。

## 参考文献(References):

- [1] Zhuge Jian, FANG Hui-ying, WANG Zheng-xiang, et al. Glycerol production by a novel osmotolerant yeast *Candida glycerinogenes*[J]. *Applied and Microbiol Biotechnology*, 2001, 55:686-692.
- [2] Wang Zheng-xiang, Zhuge Jian, Prior BA. Glycerol production by microbial fermentation; a review [J]. *Biotechnology Advances*, 2001, 19:201-223.
- [3] Burke D, Dawson D, Stearns T. *Methods in Yeast Genetics. A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual* [M]. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.
- [4] 陈璐,林海,王正祥,等. 双重筛选产甘油假丝酵母营养缺陷型菌株及其发酵性能[J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(2):95-99.  
CHEN Jun, LIN Hai, WANG Zheng-xiang, et al. Screening of *ura*-mutants in *Candida glycerinogenes*[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2000, 19(2):95-99. (in Chinese)
- [5] 金海如, 诸葛健. 产甘油假丝酵母在丙三醇发酵过程中的有机酸种类及其变化[J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(3):205-208.  
JIN Hai-ru, ZHUGE Jian. Kinds and amount variation of organic acids during microbial glycerol production with *Candida glycerinogenes*[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2000, 19(3):205-208. (in Chinese)
- [6] 郭雪娜, 诸葛斌, 邱重晏, 等. 高强度产甘油假丝酵母突变株的选育及其发酵性状[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(4):336-339.  
GUO Xue-na, ZHUGE Bin, QIU Chong-yan, et al. Screening *Candida glycerinogenes* mutants with high productivity and the fermentation performance of the mutants[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2002, 21(4):336-339. (in Chinese)
- [7] 张君胜, 饶志明, 吴蕾, 等. 根癌农杆菌介导酿酒酵母的遗传转化[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(3):37-41.  
ZHANG Jun-sheng, RAO Zhi-ming, WU Lei, et al. Research of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(3):37-41. (in Chinese)
- [8] LI Yan-li, SHEN Wei, WANG Zheng-xiang, et al. Isolation and sequence analysis of the gene *URA3* encoding the orotidine-5-phosphate decarboxylase from *Candida glycerinogenes* WL2002-5, an industrial glycerol producer [J]. *Yeast*, 2005, 22:423-430.
- [9] Sambrook J, Russell D V. *Molecular cloning: A Laboratory Manual* [M]. 3rd edn, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001:1. 32-1. 34.
- [10] Thompson J R, Register E, Kelley R. An improved protocol for the preparation of yeast cells for transformation by electroporation [J]. *Yeast*, 1998, 14:565-571.
- [11] Schiestl R H, Gietz R D. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier[J]. *Current Genetics*, 1989, 16:339-346.
- [12] Gietz R D, Woods R A. Transformation of yeast by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method[J]. *Methods in Enzymology*, 2002, 350:87-96.
- [13] Ito H, Fukuda Y, Murata K, et al. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations[J]. *Journal of Bacteriology*, 1983, 153:163-68.

(责任编辑:秦和平,朱明)