

文章编号 :1009-038X(2002)05-0460-04

地衣芽孢杆菌感受态细胞的诱导形成 及其高效电转化方法

唐雪明, 邵蔚蓝, 王正祥, 方惠英, 诸葛健
(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘 要:通过体外处理诱导地衣芽孢杆菌产生感受态性能,同时调整参数,建立了感受态细胞对质粒 pAPR 的高效电转化方法.当质粒 DNA 为 $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$,转化时电压为 $1\ 750\ \text{V}$ 时,可得到 261 个转化子,经鉴定均为阳性克隆子.此为以芽孢杆菌为宿主进行高效电转化及为建立适合工业应用的分泌型表达载体提供参考.

关键词:地衣芽孢杆菌;感受态细胞;高效电转化

中图分类号:Q 785

文献标识码:A

Formation of Competent *Bacillus licheniformis* Cell and High Efficiency Electrotransformation for Vectors

TANG Xue-ming, SHAO Wei-lan, WANG Zheng-xiang, Fang Hui-ying, ZHUGE Jian
(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: *Bacillus licheniformis* was induced to form competent cells in vitro, and by changing parameters, a method of high efficiency electrotransformation for plasmid pAPR was established. When DNA concentration was $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ and the voltage was $1\ 750\ \text{V}$, 261 transformants were obtained on screen plates. By the identification, all of transformants were positive clones. With ordinary electrotransformation method, 20 transformants were obtained on screen plates. The experiments provided a model for high efficiency electrotransformation with *Bacillus* strains as host cells, and constructed a foundation for looking for adaptable secretory expression vectors in industry.

Key words: *Bacillus licheniformis*; competent cells; efficiency electrotransformation

研究转化首先要考虑宿主细胞感受态(competent)的形成能力.对于大肠杆菌宿主细胞,经过 CaCl_2 处理后可使大肠杆菌得到较好的感受态性能,每微克质粒转化得到 10^7 个转化子.而对于革兰氏阳性菌如枯草杆菌、地衣芽孢杆菌要使其经过特殊

处理得到较好的感受态性能并非易事.因为革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌在感受态细胞形成和 DNA 转化的机制上有很大的不同,目前有关机理知道的还很少,所以用于处理革兰氏阴性菌的方法并不适用于革兰氏阳性菌^[1].然而,在工业生物技术的研

收稿日期 2002-04-15; 修订日期 2002-07-10.

基金项目 教育部高等学校骨干教师资助项目课题.

作者简介 唐雪明(1970-),男,湖南道县人,博士研究生,讲师.

究和应用中,十分需要以分泌型革兰氏阳性菌为宿主的菌株,这对产品的后提取和精制很有意义,特别是在以基因工程手段进行的新菌种的构建过程中更是十分必要的。目前以分泌型革兰氏阳性菌作为表达宿主已经成为工业生物技术领域的研究热点。将外源 DNA 转入宿主必须面对宿主细胞的感受态性能问题,以及需要寻找到高效转化的途径。有学者以枯草杆菌为宿主制备成感受态细胞,并成功进行了转化,但转化效率很低,均在 10 个转化子以下^[2]。在以地衣芽孢杆菌为宿主时,往往难以寻找到好的感受态细胞处理方法而选择原生质体融合的方法,但成功的情况并不多,且过程较为烦琐^[3]。作者在研究构建整合型碱性蛋白酶工程菌的过程中,以地衣芽孢杆菌为宿主,诱导培养使其形成具有感受态性能的细胞,并通过摸索,建立了适用于地衣芽孢杆菌的电转化条件,得到了较好的结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 *Bacillus licheniformis* 2709 突变株由本实验室保存;质粒 pAPR 为含有碱性蛋白酶基因的整合型载体,并含有卡那霉素抗性基因,由作者构建,另文发表。

1.1.2 试剂 5 倍的微量盐溶液(1 000 mL):10 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 74 g K_2HPO_4 , 27 g KH_2PO_4 , 9.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0;质量分数为 20% 的葡萄糖溶液,质量分数为 20% 的酪氨酸溶液;所用试剂均为分析纯。

1.1.3 培养基

LB 液体培养基:常规方法配制,在液体培养基中添加质量分数为 1.5% 的琼脂即为 LB 固体培养基。LB 固体培养基和液体培养基在需要时加入卡那霉素至 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

芽孢杆菌基本培养基(100 mL):20 mL 5 倍的微量盐溶液,2.5 mL 质量分数为 20% 的葡萄糖,1 mL 质量分数为 20% 的酪氨酸溶液。

芽孢杆菌饥饿培养基(诱导芽孢生成培养基)(100 mL):20 mL 5 倍的微量盐溶液,2.5 mL 质量分数为 20% 的葡萄糖。

酪素固体培养基(1 000 mL):干酪素 8 g,酵母膏 2 g, K_2HPO_4 14 g, KH_2PO_4 6 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, 琼脂 12 g, pH 7.2~7.4。

BY 液体培养基(1 000 mL):牛肉膏 5 g,酵母膏 5 g,蛋白胨 10 g, NaCl 5 g,葡萄糖 5 g, pH 7.2~

7.4。

1.2 方法

1.2.1 *Bacillus licheniformis* 感受态细胞的诱导形成 接种新鲜 *Bacillus licheniformis* 2709 单菌落至 10 mL 芽孢杆菌基本培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 剧烈振荡培养 16~18 h,250 r/min,培养至 OD_{600} 为 1.0 时,取 1.5 mL 培养液加入到 10 mL 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴预热 40 mL 新鲜芽孢杆菌基本培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 剧烈振荡培养 4 h,250 r/min。加入 10 mL 芽孢杆菌饥饿培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 剧烈振荡培养 4 h,250 r/min。将细菌在冰水浴冷却 15 min,分装于 0.5 mL Eppendorf 管中,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 g 离心 10 min,沉淀物用预冷的水轻轻溶解悬浮,可直接进行实验,也可于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。

1.2.2 非诱导型 *Bacillus licheniformis* 转化前细胞(对照)的制备 接种新鲜 *Bacillus licheniformis* 2709 单菌落至 10 mL LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 剧烈振荡培养 16~18 h,250 r/min,培养至 OD_{600} 为 1.0 时,取 1.5 mL 该培养液加入到 50 mL 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴预热的新鲜 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 剧烈振荡培养 4 h,250 r/min。将细菌在冰水浴冷却 15 min,分装于 0.5 mL Eppendorf 管中,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 10 000 r/min 离心 10 min,沉淀物用预冷的水轻轻溶解悬浮,可直接进行实验,也可于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。

1.2.3 电转化 将新鲜制备的转化前细胞 0.5 mL 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 10 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,加入 0.5 mL 冰水悬浮,如此反复洗涤细胞 3 次,轻柔操作。冰浴 10 min 后分别加入不同质量浓度的质粒 DNA 混匀,将溶液转移到预冷的无菌电转化池中,吸干池表面水分,将电转化池放入电转仪的样品槽中,在不同的电场强度下电击转化。迅速取出电转化池,加入 1 mL BY 液体培养基稀释细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴摇床培养 1.5 h,取 200 μL 涂布于 LB 固体卡那霉素抗性平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养。

1.2.4 阳性转化子的筛选 将阳性转化子点种于酪素固体卡那霉素抗性平板上筛选,观察透明圈。

2 结果

2.1 不同电压下诱导型感受态细胞的电转化

选择 1 μg 质粒 DNA 在不同的电压下对诱导型感受态细胞进行电转化(取平均值, $P < 0.05$,下同)结果如图 1 所示。在 1 000,1 250,1 500,1 750,2 000,2 500 V 电压下分别平均得到了 11,57,102,235,46,6 个转化子。以 1 750 V 电压下的转化效率最高。

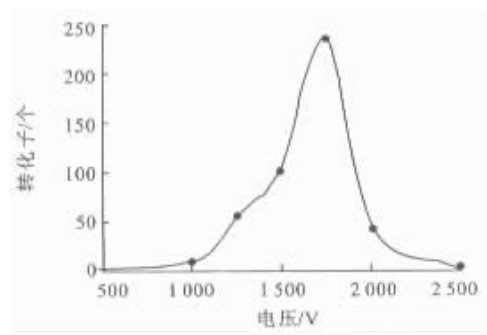


图 1 诱导型感受态细胞在不同电压下的转化 (1 µg DNA)

Fig.1 The electrotransformation of induced competent cells with 1 µg DNA

2.2 不同电压下非诱导型转化前细胞的电转化

选择 1 µg 质粒 DNA 在不同电压下对非诱导型转化前细胞进行电转化,结果如图 2 所示.在 1 000 , 1 250 ,1 500 ,1 750 ,2 000 ,2 500 V 电压下分别平均得到了 1.6 ,1.1 ,1.8 ,2.0 个转化子.以 1 750 V 电压下的转化效率最高,但是转化效率远远低于应用诱导型感受态细胞进行电转化的效率.

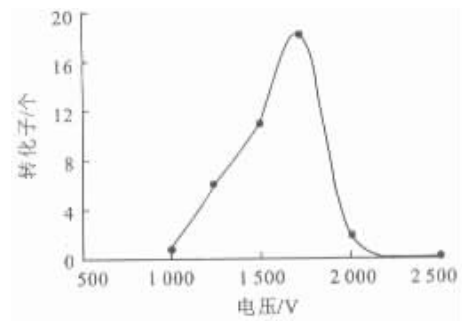


图 2 非诱导型感受态细胞在不同电压下的转化 (1 µg DNA)

Fig.2 The electrotransformation of non-induced competent cells with 1 µg plasmid DNA

2.3 不同 DNA 质量浓度下诱导型感受态细胞的电转化

选择不同质量浓度的质粒 DNA 在 1 750 V 电压下对诱导型感受态细胞进行电转化,结果如图 3 所示.在质粒 DNA 质量浓度(µg/mL)为 0.5 ,1.0 , 1.5 ,2.0 ,2.5 时分别平均得到了 93 ,235 ,261 ,149 , 71 个转化子.以质粒 DNA 质量浓度为 1.5 µg/mL 的转化效率最高.

2.4 不同 DNA 质量浓度下非诱导型转化前细胞的电转化

选择不同质量浓度的质粒 DNA 在 1 750 V 电压下对非诱导型转化前细胞进行电转化,结果如图 4 所示.在质粒 DNA 质量浓度(µg/mL)为 0.5 , 1.0 ,1.5 ,2.0 ,2.5 时分别平均得到了 7 ,18 ,20 ,11 , 5 个转化子.

4 个转化子,以质粒 DNA 质量浓度为 1.5 µg/mL 的转化效率最高,但是转化效率远远低于应用诱导型感受态细胞进行电转化的效率.

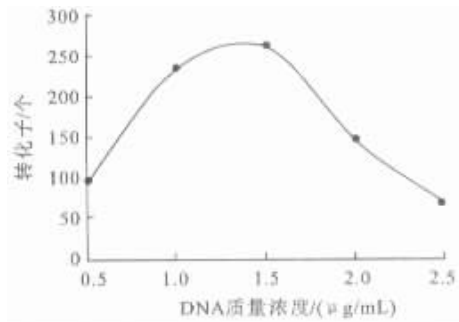


图 3 不同质量浓度 DNA 在 1 750 V 电压下的电转化

Fig.3 The electrotransformation of induced competent cells with different concentration of plasmid DNA at 1750 voltage

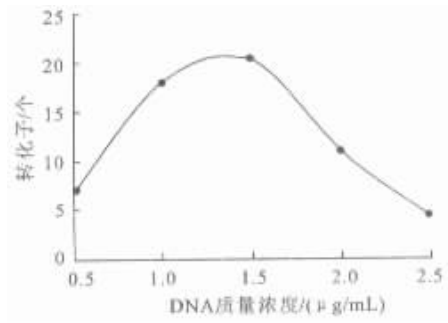


图 4 不同质量浓度 DNA 在 1 750 V 电压下的电转化

Fig.4 The electrotransformation of non-induced competent cells with different concentration of plasmid DNA at 1750 voltage

2.5 阳性克隆子的筛选鉴定

将质量浓度为 1.5 µg/mL 的质粒 DNA 在 1 750 V 下对诱导型感受态细胞电转化转化子进行挑选,点种转移至酪素固体卡那霉素抗性平板上筛选,37 ℃ 培养 2 4 h,可以观察到这些转化子周围均产生明显的透明圈,如图 5 所示.这表明整合型质粒 pAPR 成功转入宿主细胞,并将碱性蛋白酶基因插入到宿主染色体中成功表达,转化子均为阳性克隆子.

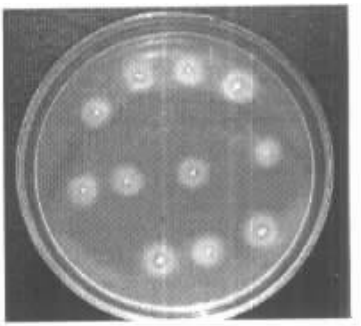


图 5 阳性克隆子的鉴定

Fig.5 Identification of positive clones

3 讨 论

目前,细菌感受态产生的机制有两种假说:一是局部原生质化假说.支持这种假说的现象是发芽的芽孢杆菌相对于营养体更加容易转化,适当的溶菌酶处理可以提高转化率;二是酶受体假说.支持这种假说的现象是枯草杆菌、链球菌、肺炎双球菌中都分离到相对分子质量为 5 000~10 000 的感受态因子^[4].最新对转化机制的研究认为,革兰氏阳性菌中首先产生感受态因子,双链 DNA 吸附于细胞壁后,单链 DNA 进入细胞,细胞中特定的蛋白质包裹住外源 DNA 防止被降解,最后重组产生稳定的分子.而革兰氏阴性菌未发现感受态因子,且外源 DNA 是以双链形式进入细胞的.

在细菌中能够形成感受态的细胞是很少的,一般认为 0.1%~1.0%,而且细菌处于感受态是短暂的.肺炎双球菌、枯草杆菌、地衣芽孢杆菌等属于这类菌.一般认为,感受态是在细菌生长到对数后期产生的.有学者认为,芽孢杆菌在营养缺乏的饥饿状态下,细胞易产生感受态因子,处于生长芽孢时期的芽孢杆菌更容易产生感受态^[5].作者在实验中正是利用芽孢杆菌极限营养培养基,使地衣芽孢杆菌处于产生感受态因子状态,结合电转化,同时探索了影响电转化效率的有关参数.

一般影响电转化的因素有细胞培养的时间、电压的选择、DNA 质量浓度、转化液的离子强度等,作者选取的电压和质粒 DNA 质量浓度作为基本考察对象,处理后的转化前,细胞由于经过冰水反复洗涤,溶液中离子强度已经很低.对于电转化而言,并非电场强度越高转化率越高,因为随着电压升高,细胞在瞬间高压下死亡率就越高.不同的细胞对电压耐受力有一个限度,在本实验中,当电压达到 2 500 V 时,细胞已经大量死亡,转化率极低.但是,所选择电压也不能太低,如果细胞表面的动作电位处于不应期的时间较长,转化率也将很低.另外,并非质粒 DNA 质量浓度越高转化率就越高,对于大肠杆菌常规转化以及其他细菌的转化研究中都证实了这一点^[6],本实验得出的结果也是如此.有关详细机制目前尚不明确,是否高质量浓度的质粒 DNA 影响了细胞表面的电位变化或是封闭了 DNA 进入的通道还有待进一步研究.

本实验得到的转化率远远低于常规大肠杆菌为宿主转化所得到的转化率(这与革兰氏阴性和阳性菌的生理状态和细胞结构有很大关系),但是比之常规方法处理的地衣芽孢杆菌的转化率提高了 13 倍.转化子经过鉴定均为阳性克隆子,很好地满足了进一步实验的需要.本实验的结果为以芽孢杆菌为宿主进行高效电转化以及为建立适合工业应用的分泌型表达载体提供了参考.

参考文献:

- [1] 李育阳. 基因表达技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [2] MATI I, SADAIE Y, KADA T. DNA Repair in competent cell of *bacillus subtilis*. *J Bacteriology*, 1983, 155(2): 933-936.
- [3] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIST. Molecular Cloning: A laboratory Manua[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [4] 盛小禹. 基因工程实验技术教程[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1999.
- [5] HARWOOD C R, CUTTING S M. Molecular Biological Methods for Bacillu[M]. New York: John Wiley Press, 1990.
- [6] 彭秀铃, 袁汉英, 谢毅等. 基因工程实验技术[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1998.

(责任编辑 杨 勇)