

# 一种筛选自然感受态缺陷突变株方法的改进\*

谢志雄 沈 萍

(武汉大学生命科学学院 武汉 430072)

**摘要** 对平板筛选自然感受态缺陷突变株的方法进行了改进,采用改进后的方法可以节省转化 DNA 用量 80% 以上,而且筛选时转化 DNA 相对浓度提高约 1 倍,筛选效果较好。

**关键词** 自然感受态,突变株,筛选

**分类号** Q933 **文献标识码** B **文章编号** 0253-2654(1999)-02-0126-27

自然感受态缺陷(natural transformation deficient)突变株的获得是进行自然遗传转化机制研究的重要途径,如与自然感受态建立相关基因的定位<sup>[1]</sup>,特别是在目前研究自然环境中基因工程微生物的 DNA 分泌和转化关系具有重要的意义<sup>[2~3]</sup>。自然感受态是细菌在一定生长阶段才建立的生理状态<sup>[4~5]</sup>,因此筛选自然感受态缺陷突变株有一定的困难。已有的平板筛选方法需要大量的转化 DNA,且筛选效率不尽理想,我们对此作了改进,可减少筛选时转化 DNA 用量并同时提高筛选效率,现介绍如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

诱变出发菌为携带 pUB110 质粒(Km<sup>r</sup>)的 *Bacillus subtilis* BR151p (*trpC2metB5lys3amy*) 菌株,本室构建; *B. subtilis* 168 菌株(*ilvAl pyrDtrpC2Km<sup>s</sup>*),由中国典型培养物保藏中心(CCTCC)提供。

### 1.2 培养基

LB: 蛋白胨 10g, 酵母抽提物 5g, 氯化钠 5g, 定容至 1L 水中, pH7.2。

Spizizen 基本培养基: 葡萄糖 5g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O 18.34g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6g, Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> · 2H<sub>2</sub>O 1g, 定容至 1L 水中。

选择培养基: Spizizen 基本培养基补加

50μg/mL Met 和 20μg/mL Trp。

TM1: Spizizen 基本培养基, 0.5% Casamino Acid, 100μg/mL Met, 100μg/mL Lys 和 40μg/mL Trp。

TM2: Spizizen 基本培养基, 0.25μg/mL caseine, 25μg/mL Met, 25μg/mL Lys 和 10μg/mL Trp。

固体培养基另加琼脂粉至 1.5%。

### 1.3 方法

**1.3.1 转化 DNA 的制备:** 从平板上挑取 168 菌株单菌落于 5mL LB 中, 37℃, 250r/min 振荡培养至对数生长末期, OD<sub>600</sub> 2.0 左右; 吸取该菌液 2mL 于 50mL LB 中, 37℃, 250r/min 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 2.0 左右, 离心收集菌体。

总 DNA 的制备纯化及 DNA 浓度的测定方法详见文献 [6]。

**1.3.2 诱变:** 按文献 [7] 方法稍加修改。从平板上挑取 BR151p 菌株单菌落于 5mL LB 中, 37℃, 250r/min 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 2.0 左右后; 吸取 200μL 于 5mL LB 中, 37℃, 250r/min 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 2.0 左右, 取 100μL 涂布 LB 于平板, 待表面液体渗入琼脂平板后, 用无菌牙签挑

\* 国家自然科学基金资助项目 (No.39670397)。

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No.39670397)

1998-01-24 收稿, 1998-07-17 修回

少量(不需定量)的亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, NG or NTG; Fluka)固体粉末点种于平板上不同部位(一般可等距离点种在3~4个位置),待固体 NTG 粉末润湿后,于37℃倒置培养过夜,至出现明显的抑菌圈。

**1.3.3 平板筛选:**从 NTG 抑菌圈边缘刮取菌苔稀释涂布于 LB 平板,分单菌落。

在选择平板和 LB 平板上作好标记,一般每平板筛选 69 个菌落。将 168 菌株总 DNA 点于选择平板,然后直接从上述 LB 平板上随机挑取菌落先点种于选择平板上 DNA 处,稍稍涂匀,再对应点于 LB 平板,37℃培养 36~48h 观察结果。

挑选选择平板上不长而在 LB 平板上生长的菌落复筛,再进行液体转化检测,保留转化频率低于出发菌株 2 个数量级以上的菌落。

**1.3.4 液体转化方法:**从平板上挑单菌落接于 LB 中培养至  $OD_{600}$  2.0 左右,以 4% 接种量转接于预热的 LB 中培养至  $OD_{600}$  2.0 左右,取 3.5mL 菌液,10000r/min 离心 1min,菌体悬浮于 25mL 预热的 TM1,37℃培养至对数生长末期,取 5mL 培养液于 25mL 预热的 TM2 中,30℃培养 2h,即得到感受态细胞。

将转化 DNA 加入感受态细胞(终浓度 100 $\mu$ g/mL),补加  $MgCl_2$  至终浓度为 10mmol/L,混合,于 37℃保温 40min,加入 20 $\mu$ g DNaseI,37℃保温 10min,终止反应,稀释涂布于选择平板。具体参见文献 [1] 进行。

## 2 结果与讨论

从 2949 个菌落中获得 727 个在选择平板上不长而在 LB 平板上生长的菌落,筛除率 75.3%。

筛除率 =  $N_g/N_s \times 100\%$ 。其中  $N_g$  为在选择平板上生长的菌落数, $N_s$  为筛选的总菌落数。

经多次复筛,从中得到 52 个在选择平板上不长而在 LB 平板上生长的菌落,进行液体转化实验,结果有 7 个转化频率低于对照 BR151p,其中一个突变株转化频率低于对照 2~3 个数量级,符合筛选要求,称之为 BR151pm。经多次传代,进行液体转化实验,结果稳定,BR151pm 转化频率平均为  $5.26 \times 10^{-5}$ ,而 BR151p 转化频率平均为  $1.09 \times 10^{-2}$ 。

按原筛选方法 [1],转化 DNA 是涂布于选择平板上,涂布一平板需转化 DNA 50 $\mu$ g,而采用将转化 DNA 点于选择平板的方法,按每平板筛选 69 个菌落计算,50 $\mu$ g 转化 DNA 至少可用于 6 个平板的筛选,可节省转化 DNA 用量 80% 以上。

50 $\mu$ g 转化 DNA 涂布于  $\phi 9$ cm 或  $\phi 10$ cm 的平板, DNA 浓度约为 8ng/mm<sup>2</sup> 或 6.4ng/mm<sup>2</sup>; 而点 2.5 $\mu$ L 浓度为 45 $\mu$ g/mL 的转化 DNA 于选择平板,形成  $\phi 2.5 \sim 3$ mm 的斑点,则 DNA 的浓度约为 16~23ng/mm<sup>2</sup>,约较前者高 1 倍。

由于平板表面琼脂的吸附和涂棒的粘附作用以及操作精确性的影响,涂布方法难以做到平板表面各点之间单位面积内 DNA 量的均一,从而影响筛选效果,点种 DNA 的方法则可克服此点,提高筛选的精确性。

由于 DNA 的相对浓度高于涂布方法,故筛选效果较好。在同样条件下,采用涂布转化 DNA 的方法筛选一次,筛除率约为 50%,而采用点的方法筛选一次,筛除率约为 75%。

经过这一简单的改进,在减少筛选时转化 DNA 用量同时可提高筛选效率。

## 参 考 文 献

- [1] Fani R, Mastromei G, Polsinelli M *et al.* J Bacteriol, 1984, 157:152~157.
- [2] Lorenz M G, Wackernagel W. Microbiol Rev, 1994, 58:563~602.
- [3] 沈 萍, 彭珍荣. 遗传, 1995, 17(增刊):89~91.
- [4] 沈 萍编著. 微生物遗传学. 武汉:武汉大学出版社, 1995.
- [5] 门大鹏, 郭三堆, 贾士芳. 微生物学通报, 1982, 9(3):117~119.
- [6] Cutting S M, Horn P B V. Genetic analysis. In: Harwood C R, Cutting S M. ed. Molecular biological method for *Bacillus*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1990, 27~74.
- [7] 陈中孚, 潘星时, 沈淑瑜. 遗传, 1982, 4(1):36~37.