

嗜热脂肪芽孢杆菌质粒 DNA 的高压电穿孔转化研究*

陈兰明 盛祖嘉 毛裕民

(复旦大学遗传学研究所 上海 200433)

摘要: 采用高压电穿孔法将穿梭质粒导入了嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) K1041 和 T521 菌株。以对数生长后期的菌体制备 K1041 转化细胞, 以 LB 平板上于 50℃ 培养过夜菌制备 T521 转化细胞, 细胞密度为 $5 \sim 7 \times 10^9$ 细胞/mL。电击条件如下: 电容 25μF, 电场强度 10.0KV/cm, 脉冲控制器设定 200Ω。K1041 和 T521 最高转化效率分别达 2.01×10^4 和 1.19×10^2 转化子/μg DNA。此外, 研究发现 T521 和 K1041 中存在着 DNA 的限制/修饰系统。

关键词: 嗜热脂肪芽孢杆菌, 质粒, 电击转化

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)02-0085-05

STUDY ON GENETIC TRANSFORMATION OF *BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* WITH PLASMID DNA BY ELECTROPORATION

CHEN Lan-Ming, SHENG Zu-Jia, MAO Yu-Min

(Fudan University, Institute of Genetics, Shanghai 200433)

Abstract: Transformation of shuttle plasmids into *Bacillus stearothermophilus* K1041 and T521 by electroporation was carried out. K1041 cells for transformation were prepared from late-logarithmic growth phase, T521 cells prepared after growth on LB plate at 50℃ overnight. The cell concentration was about $5 \sim 7 \times 10^9$ cells/mL. The electroporation conditions were to set capacitor at 25μF, electrical field strength at 10.0KV/cm and the pulse controller at 200 ohms. The maximum transformation efficiencies of K1041 and T521 were up to 2.01×10^4 and 1.19×10^2 transformants/μg DNA, respectively. In addition, evidence indicated that T521 and K1041 possessed DNA restriction and modification systems.

Key words: *B. stearothermophilus*, Plasmid, Electrotransformation

转化是分子遗传学研究的一种重要手段。在 *B. stearothermophilus* 中一种有效的遗传交换系统的建立将有助于揭示嗜热菌生命活动的基本规律及其耐热机制的分子基础。最初采用 PEG 诱导的原生质体转化方法将质粒 DNA 成功地引入了 *B. stearothermophilus*^[1], 但原生质体细胞的形成、稳定、转化和再生的条件不仅复杂而且重复较困难。Narumi I. 等^[2]将高压电穿孔转化技术应用于 *B. stearothermophilus*, 发展

了适用于 K1041 菌株的电转化方法, 他们导入 K1041 的两种质粒 pUB110 (4.5Kb) 和 pIH41 (7.6Kb) 都来自枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)。为了进一步分析 *B. stearothermophilus* 这一潜在的转化受体系统的性质, 我们将穿梭启动子探

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39230020)
Project Granted by Chinese National Natural Sciences Fund (No. 39230020)

收稿日期: 1998-11-09, 修回日期: 1999-01-18

测质粒 pPGV5 (7.7Kb) 成功地导入了 K1041, 从而沟通了 *E. coli*, *B. subtilis* 和 *B. stearothermophilus* 三者之间的遗传交换系统。此外, 还对影响电转化效率的因素进行了研究, 发展了 *B. stearothermophilus* T521 菌株的电转化方法。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

本文所用菌株和质粒的遗传特性和来源见表 1。

表1 菌株和质粒

菌株或质粒	基因型或表型	来源
<i>E. coli</i> TGI	SupE hsd $\Delta 5$ thi Δ (lac-proAB) F' [traD36 proAB ⁺ lacI ^q lacZ Δ M15]	Laboratory stock
<i>B. subtilis</i> BR151	TrpC2 lys-3 metB10	Laboratory stock
<i>B. stearothermophilus</i> T521		Laboratory stock
<i>B. stearothermophilus</i> CU21	Sm ^r	Provided by Imanaka T.
<i>B. stearothermophilus</i> K1041		Narumi I. et al. (1992)
pUB110	Km ^r (Nm ^r)	Cryczan T. J. and Dubnau DX(1978) ^[1]
pPL703	Km ^r (Nm ^r)	Ambulos N. P. et al. (1985) ^[4]
pPGV5	Km ^r (Nm ^r), Ap ^r (only in <i>E. coli</i>)	Provided by P. Dhase
pPGVPB452	Km ^r (Nm ^r), Ap ^r (only in <i>E. coli</i>)	unpublished
pPGVPB832	Km ^r (Nm ^r), Ap ^r (only in <i>E. coli</i>)	unpublished
pPGBPB1775	Km ^r (Nm ^r), Ap ^r (only in <i>E. coli</i>)	unpublished

1.2 培养基

细菌常规培养使用 LB 培养基^[5], *B. subtilis* 感受态细胞制备和转化使用 TM 培养基 (按文献 [6] 的基本培养基的配方, 添加葡萄糖 0.5mg/mL, 色氨酸 100 μ g/mL, 水解酪蛋白 0.1mg/mL, MgSO₄ 5mmol/L)。 *B. stearothermophilus* 电转化使用 2LBG 培养基^[2]。培养基中添加抗生素的浓度一般为: 氨苄青霉素 (Ap) 100 μ g/mL; 卡那霉素 (Km) 10 μ g/mL。

1.3 质粒 DNA 的制备和酶切

质粒 DNA 的制备和定量按文献 [5] 中的方法进行, 小量制备采用碱裂解法, 大量制备时采用 PEG 沉淀法纯化质粒 DNA。限制性核酸内切酶购自 New English Biolabs 公司, 酶切按 Biolabs 推荐的条件进行。

1.4 细菌转化

E. coli 转化按文献 [5] 中的方法进行。 *B. subtilis* 感受态细胞制备和转化采用文献 [7] 中的方法: 受体菌 BR151 接入 TM 培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 以 10% (ϕ) 接种量转接新鲜的

TM, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 2h 后加入甘油至 10%, 分装小管冻存于 -70 $^{\circ}$ C。转化时取一管置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中融化, 以新鲜的 TM 稀释 5 倍, 加入质粒 DNA, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 1h, 涂布于含抗生素的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。 *B. stearothermophilus* 的电击转化参考 Narumi I. 等的方法^[2], 稍加改进 (见结果 2.1)。在 BIO-RAD 基因脉冲仪上进行, 操作方法按说明书。

2 结果

2.1 质粒的来源对转化效率的影响

穿梭启动子探测质粒 pPGV5 是由适用于 *B. subtilis* 的启动子探测质粒 pPL703 和 *E. coli* 载体质粒 pUC4 通过各自单一 EcoRI 酶切位点连接而成的 *E. coli* / *B. subtilis* 穿梭质粒 (P. Dhase, 未发表)。我们从不同宿主中抽提 pPGV5, 通过电击转化 K1041。

受体菌 K1041 接种于 LB 液, 于 50 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 以 5% (ϕ) 接种量转接 LB 液, 50 $^{\circ}$ C 振荡培养至 A₆₀₀ 为 0.95, 冰浴菌体 30min, 于

4℃离心收集。用冰浴的无菌双蒸水和10%的甘油分别洗涤菌体各2次,再用10%的甘油悬浮菌体至 $5\sim7\times10^9$ 细胞/mL,分装小管冻存于-70℃。转化时取一管于37℃水浴融化,放置于冰上,加入4~6μL质粒DNA,混匀后转入冰浴的0.2cm电击杯中,在电容25μF、电压2.0KV、脉冲控制器设定200Ω的电击条件下脉冲处理1次,立即加入1mL 2LBG,将菌悬液转入试管中,48℃轻摇90min。涂布于LB+Km平板,48℃培养过夜。

根据转化子数计算出相应的转化效率,见表2。实验结果表明,来自*B. subtilis* BR151和*B. stearothermophilus* T521的质粒能够有效地转化K1041,但是从*E. coli* TGI和*B. stearothermophilus* CU21中抽提的质粒则不能被转入K1041,提示在K1041与BR151、T521之间没有限制/修饰系统,而K1041与TGI、CU21之间则存在着DNA的限制屏障。

表3 不同大小的质粒对受体菌K1041的转化效率

质粒	大小	来源	转化效率(转化子/μg DNA)
pUB110	4.5	<i>B. subtilis</i> 383	9.73×10^3
pPGV5	7.7	<i>B. stearothermophilus</i> T521	1.49×10^4
pPGVPB452	9.1	<i>B. stearothermophilus</i> T521	2.01×10^4
pPGVPB832	9.9	<i>B. subtilis</i> BR151	3.61×10^3
pPGVPB1775	10.8	<i>B. subtilis</i> BR151	7.24×10^3

2.3 电击介质对转化效率的影响

据 Stephenson M.等^[8]报道,PEG可显著提高*B. subtilis*的电转化效率。为了了解在电转化中PEG是否有利于*B. stearothermophilus*对质粒DNA的吸收,我们以不同浓度的PEG(Mr=8000)作为电击介质,测定了pPGV5对K1041的转化效率。在制备转化细胞时,用冰浴无菌双蒸水洗涤菌体沉淀4次,最后用冰浴的PEG悬浮到 $5\sim7\times10^9$ 细胞/mL。对照电击介质为10%的甘油,结果见图1。实验结果表明,1%~30%的PEG可促进K1041细胞的转化,相应的转化效率比10%甘油(1.03×10^4 转化子/μg DNA)高2.0~3.2倍。当PEG浓度从30%上升到40%时,转化效率迅速降低458倍,推测是高粘度的电击介质阻碍了DNA与细胞膜的有效接触所

表2 不同来源的pPGV5对受体菌K1041的转化效率

质粒来源	转化效率(转化子/μg DNA)
<i>E. coli</i> TG1	0
<i>B. subtilis</i> BR151	3.46×10^3
<i>B. stearothermophilus</i> CU21	0
<i>B. stearothermophilus</i> T521	1.49×10^4

2.2 质粒的大小对转化效率的影响

质粒pPGVPB452(9.1Kb)、pPGVPB832(9.9Kb)和pPGVPB1775(10.8Kb)是我们以pPGV5为基础构建的重组质粒(结果待发表)。我们将大小不同的5种质粒通过电转化导入K1041,实验结果见表3。从表3可以看到,质粒的大小和转化效率之间没有明显的相关性,通过上述方法至少可将10.8Kb的质粒导入K1041,而且构建的重组质粒,通过穿梭转化同样具有 $10^3\sim10^4/\mu\text{g DNA}$ 的转化效率。这一结果也提示了通过电转化直接在K1041中进行分子克隆的可能性。

致;另外,高粘度降低了电击介质的导电率,由此产生较长的脉冲时间,使细胞存活率下降也是导致转化效率降低的原因之一。

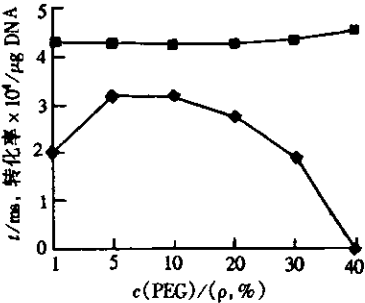


图1 电击介质对pPGV5转化K1041的转化效率的影响
◆ TE 转化效率($\times10^4$ 转化子/μg DNA),
■ TC 脉冲时间(ms)

2.4 质粒在宿主中的性质

挑取选择性平板上的转化子,抽提质粒作

限制酶切分析,结果证明各种质粒在电转化过程中没有发生缺失和重排,质粒上的 Km^r 基因都能在 K1041 中表达。

经鉴定带有不同质粒的 K1041 转化子,接种于 LB + Km 平板,在 48℃ 培养后,于 LB 平板上分离单菌落,分别置于不同温度下培养 12h,点种于 LB + Km 平板,置于 48℃ 培养,统计 Km^r 菌落数。结果(见表 4)表明,当培养温度高于 55℃ 时,一旦不加药物培养, pPGV5 及其衍生质粒在 K1041 宿主中很快丢失,对卡那霉素的抗性迅速降低,推测 55℃ 以上的高温影响了质粒的拷贝数。何笑松等^[9]在 CU21 (pPGV5) 中也发现了类似的现象。

表5 *B. stearothermophilus* T521质粒的电击转化

质粒	大小	来源	转化效率(转化子/μg DNA)
pUB110	4.5	<i>B. subtilis</i> 383	20
pPL703	5.0	<i>B. subtilis</i> BR151	58
pPGV5	7.7	<i>E. coli</i> TG 1	0
pPGV5	7.7	<i>B. subtilis</i> BR151	119
pPGV5	7.7	<i>B. stearothermophilus</i> CU21	<1

无菌双蒸水和 10% 的甘油洗涤菌体各两次,电击条件同 K1041,结果见表 5。

尽管不同质粒电击转化 T521 的转化效率都较低,但发现与 K1041 类似,从 TG 1 中抽提的质粒 pPGV5 也不能导入 T521 中,说明 TG 1 与 T521 之间同样存在着 DNA 的限制屏障。

3 讨论

Narumi I. 等报道了 pUB110 和 pIH41 对 K1041 的电转化,我们在稍加改进的基础上,成功地将穿梭启动子探测质粒 pPGV5 导入了 K1041 和 T521,从而沟通了 *E. coli*、*B. subtilis* 和 *B. stearothermophilus* 三者之间的遗传交换系统。我们可以利用 *E. coli* 系统便于操作的特点,在 *E. coli* 中进行嗜热菌基因的重组 DNA 操作,然后经 *E. coli*/*B. subtilis* 之间的穿梭转化,克服 DNA 的限制屏障,再通过 *B. subtilis*/*B. stearothermophilus* 之间的遗传交换,将克隆在常温菌中的嗜热菌基因送回 *B. stearothermophilus* 中,在高温条件下,对其基因的表达和调控性质进行研究(结果待发

表4 质粒在 *B. stearothermophilus* K1041

宿主中不同温度下的稳定性

质粒	稳定性(%)		
	生长温度(℃)		
	48	55	65
pPGV5	100	—	0
pPGVPB832	100	100	19.7
pPGVPB1775	100	99.5	20.9

2.5 质粒 DNA 对受体菌 *B. stearothermophilus* T521 的高压电转化

受体菌 T521 接种于 LB 平板, 50℃ 培养 12~17h, 冰浴平板 30min, 用 4mL 冰浴的无菌双蒸水悬浮细胞, 离心收集菌体, 分别用冰浴的

表)。

通过电击介质对转化效率影响的实验,我们发现 PEG 比甘油更有利于 K1041 的电击转化,而且 10%PEG(Mr = 8000)可使转化效率提高 2~3.2 倍。Stephenson M. 等^[8]也发现 30% 的 PEG(Mr = 6000)可使 *B. subtilis* 获得 10^3 转化子/μg DNA 的转化效率。因此也有理由认为作为电击介质的 PEG 的链长(分子量)对电转化似乎没有影响。

在优化 T521 菌株电转化方法的过程中,我们采用生长在液体培养基中的细胞制备电转化细胞,以不同的转化条件(收菌时期、质粒 DNA、电击介质和电击参数)共进行了 15 次转化实验,但始终不能得到转化子,而采用生长在 LB 平板上的细胞,则可以获得转化子,只是转化效率较低。Miller J. F. 等^[10]在建立 *Campylobacter jejuni* 电转化方法时也有类似的发现。我们推测这种现象的原因可能是, LB 平板上生长的细胞,处于细胞生长周期中的各个时期,其中也包含了某一有利于电转化的可能

较短暂的时期,而我们以液体培养基中不同生长阶段的细胞进行电转化时,恰恰错过了这一短暂时期。此外,菌株之间细胞壁结构的差异,如 S-层的层数,影响着高场强电脉冲下细胞瞬间通透性改变的程度,可能是导致 T521 菌株低转化效率的一个主要因素,值得进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Zhang M, Nakai H, Imanaka T. Appl. Environ. Microbiol, 1988, **54**:3162~3164.
- [2] Narumi I, Sawakami K, Nakamoto S *et al.* Biotechnology Techniques, 1992, **6**:83~86.
- [3] Cryczan T J, Dubnau D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, **75**:1428~1432.
- [4] Ambules N P, Mongkolsuk S, Kaufman J D *et al.* J. Bacteriol, 1985, **164**:696~703.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed, New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989.
- [6] Anagnostopoulos C J, Spizizen. J. Bacteriol, 1961, **81**:741~746.
- [7] 何笑松,沈仁权,盛祖嘉. 遗传学报, 1990, **17**: 313~320.
- [8] Stephenson M, Jarrett P. Biotechnology Techniques, 1991, **5**:9~12.
- [9] 何笑松,沈仁权,盛祖嘉. 遗传学报, 1990, **17**: 46~52.
- [10] Miller J F, Dower W J, Tompkins L S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, **85**:856.