

# 植病生防菌成团泛菌电击转化条件的研究\*

李艳琴 申 泉 赵春贵 李新锋 赵立平\*\*

(山西大学省生物工程开放实验室 太原 030006)

**摘要:** 研究了植病生防菌成团泛菌 (*Pantoea agglomerans*) 的电击转化条件。结果表明受体菌固体培养、生长到对数早期时的细胞转化效果最好; 质粒 DNA 分子量增加 10 倍, 转化效率降低 100 倍; 质粒 DNA 浓度在  $0.01 \sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  范围内其变化与转化频率呈正比, 与转化效率成反比; 从成团泛菌中提纯的质粒 DNA

---

• 国家高技术研究发展计划项目 (“863” 项目)

Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development

国家教委“资助优秀青年教师基金”

山西省留学基金资助

\*\*项目负责人

收稿日期: 1999-03-01, 修回日期: 1999-05-10

比从大肠杆菌中提纯的相同质粒 DNA 转化成团泛菌的效率高出 30 倍;最佳电击条件为场强 15kV/cm、电阻 200Ω、电容 25μF,在此条件下受体菌的存活率约为 10%。按给出的条件,每微克 5kb 大小的质粒 DNA 可以稳定地得到  $10^5 \sim 10^8$  个转化子。

**关键词:** 成团泛菌,电击转化,转化效率

**中图分类号:** Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)04-0245-04

## TRANSFORMATION OF BIOLOGICAL CONTROL STRAIN OF *PANTOEA* AGGLOMERANS BY ELECTROPORATION

LI Yan-Qin SHEN Quan ZHAO Chun-Gui LI Xin-Feng ZHAO Li-Ping

(Shanxi University, Shanxi Key Laboratory of Biotechnology, Taiyuan 030006)

**Abstract:** Experiments for high efficiency transformation of *Pantoea agglomerans* via electroporation were performed with Bio-Rad Gene Pulser and Pulse Controller. The optimized conditions were 15kV/cm, 25μF and 200Ω when survival rate was 10 percent. The transformation efficiency of cells from early log phase and by solid culture was higher than those from late growth stage and by liquid culture. When size of DNA increased ten times, the transformation efficiency reduced a hundred-fold. Concentration of DNA was in direct proportion with transformation frequency and negatively correlated with transformation efficiency. Transformation with plasmid from 308R (pExSec1) was thirty times higher than that with plasmid from DH5α(pExSec1).  $10^5 \sim 10^8$  transformants per μg DNA of about 5kb can be readily obtained with the optimized method.

**Key words:** *Pantoea agglomerans*, Elec-transformation, Transformation efficiency

利用高压电脉冲在细胞膜上形成瞬时性小孔的办法将外源 DNA 导入细胞,达到改变遗传性状的目的,是一种行之有效的转基因技术。这种所谓的电转化方法在动物细胞、植物原生质体、以及细菌和酵母转基因中已经得到广泛应用<sup>[1]</sup>。据报道目前已经有上百种细菌可以实现电转化<sup>[2]</sup>。对于许多野生型的细菌,电转化是目前少有的比较可靠和有效的转基因途径<sup>[3]</sup>。

成团泛菌原名草生欧氏杆菌是植物体上常见的附生菌。由于该菌可以产生多种多样的抗生物质,在植物体上定殖的能力也比较强,因此,有许多研究者利用成团泛菌进行植物病害的生物防治<sup>[4]</sup>。利用分子遗传手段研究成团泛菌的生防作用机理,对于提高生防效果、构建新型生防工程菌都有重要的意义。建立有效的基因转化技术则是分子遗传研究的必要前提。关于成团泛菌的分子遗传研究已经有不少报道<sup>[5,6]</sup>,

但是对于成团泛菌基因转化方法,特别是电转化尚无系统的报道。不同的菌株被化学转化的难易程度不同,电转化也是如此。我们在研究多功能生防工程菌的过程中,筛选了许多成团泛菌菌株,本文以一株可以抑制链格孢属病原真菌生长的成团泛菌为对象系统报道了其高效电转化的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与质粒

受体菌 308R 为对链格孢属真菌有拮抗作用的成团泛菌菌株 308 的抗利福霉素自发突变株,由本室从番茄叶面上分离,经系统分类学鉴定,并用 ERIC 引物进行 PCR,其扩增物理图谱与 ATCC33243 的扩增物理图谱相同。

质粒 pExSec1, 3.38kb, 带有卡那霉素抗药性标记,由德国明斯特大学 Heckmen 教授惠

赠。质粒 pCPP9, 5.8kb, pCPP430, 45kb, 均带有壮观霉素抗药性标记, 由美国康乃尔大学 Beer 教授惠赠。质粒 DNA 按照说明书, 用 Promega 公司的 Wizard-plus Midi-Prep 试剂盒制备, 浓度调整为  $0.1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

## 1.2 培养基与抗生素

用 LB 培养基进行受体菌的培养与保存, 根据菌株或质粒的抗药性加入相应的抗生素, 利福霉素 (Rm), 卡那霉素 (Km), 壮观霉素 (Sp), 浓度分别为  $300\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $30\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $40\mu\text{g}/\text{mL}$ 。SOC 培养基用于电击后的预培养<sup>[7]</sup>。

## 1.3 受体细胞的制备与电击操作

### 1.3.1 液体培养制备受体细胞:

从新鲜平板上挑取 308R 单菌落于 LBRm 液体培养基中,  $28^\circ\text{C}$  振荡培养过夜。按 1% 的接种量转接于 1L LBRm 液体培养基中,  $28^\circ\text{C}$  振荡培养到  $OD_{620\text{nm}}$  为 0.3~0.7。将培养物冰浴 15~30min, 然后用 Sigma 3K30 冷冻离心机,  $4^\circ\text{C}$ 、 $10000 \times g$  离心 10min。尽可能把上清液(培养基)去除干净。将细胞沉淀重新悬浮在 1L 冰冷的无离子灭菌水中, 注意不要使细胞裂解。按前述方法离心, 弃上清液, 重新悬浮在 0.5L 冰冷的无离子灭菌水中。同样的条件离心, 弃上清液, 重新悬浮在约 20mL 冰冷的 10% 的甘油中。同样的条件再离心, 弃上清液。最后悬浮在终体积为 2~3mL 的 10% 冰冷的甘油中备用。其细胞浓度应为  $1\sim 3 \times 10^{10}\text{cfu}/\text{mL}$ 。

### 1.3.2 固体培养制备受体细胞:

从新鲜 308R 平板上挑取单菌落于 10mL LBRm 液体培养基中,  $28^\circ\text{C}$  培养约 10h, 以 1% 的接种量转接于 100mL LBRm 液体培养基中,  $28^\circ\text{C}$  培养, 当  $OD_{620\text{nm}}$  达 0.3 左右时,  $10000 \times g$  离心 10min, 弃上清液, 加入  $200\mu\text{L}$  LB 液体培养基悬浮菌体, 取  $100\mu\text{L}$  ( $3.2 \times 10^{10}$ ) 涂于一个 LB 平板上,  $28^\circ\text{C}$  培养 9h, 无离子灭菌水洗下, 收集菌体, 再用无离子灭菌水洗两次, 10% 甘油洗 1 次, 最后悬浮于  $300\mu\text{L}$  10% 甘油中备用。其细胞浓度应为  $10^{10}\text{cfu}/\text{mL}$  左右。

### 1.3.3 电击操作:

使用美国 Bio-Rad 公司的基因脉冲仪 (Gene-Pulser) 和脉冲控制器 (Pulse

controller) 进行电击转化。将样品池和样品池支架置于冰上。在 1 只 1.5mL 离心管中, 把  $40\mu\text{L}$  受体细胞与  $2\mu\text{L}$  的质粒 DNA 混匀, 然后转移到一只冷的样品池中, 置于样品池支架上。将支架推进样品池腔, 使样品池与腔底部的电极接头接触好, 施行 1 次脉冲。从样品池腔中取出样品池, 立即加入 1mL SOC 培养液使细胞充分悬浮。将细胞悬浮液转移到无菌试管 ( $15\text{mm} \times 100\text{mm}$ ) 中, 在  $28^\circ\text{C}$  振荡培养 1h。然后倍比稀释, 取  $100\mu\text{L}$  在 LBRm 平板和选择性平板上涂板。

## 1.4 细胞浓度的测定方法

平板计数法。

## 1.5 计算方法

### 1.5.1 存活率:

以受体菌不加 DNA 电击的细胞浓度为分子, 未电击的细胞浓度为分母, 求其百分比。

### 1.5.2 转化效率:

每微克 DNA 的转化子数。

### 1.5.3 转化频率:

转化子数与存活细胞数的百分比。

## 2 结果与讨论

### 2.1 受体细胞的制备方法与电转化效率的关系

#### 2.1.1 受体菌菌龄对电转化效率的影响:

受体菌 308R 在 LBRm 液体培养基中培养, 每隔 1h 取样测其  $OD_{620\text{nm}}$  值, 得到其生长曲线 (图 1)。

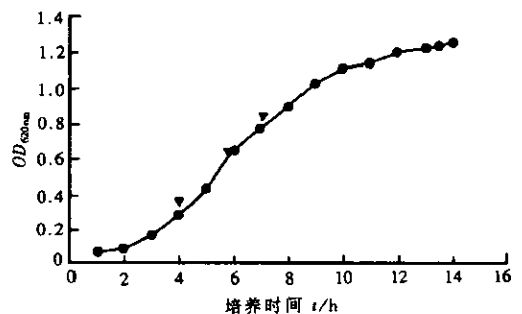


图1 308R生长动力曲线

当  $OD_{620\text{nm}}$  分别为 0.288, 0.596, 0.777, 相当于对数生长的早、中、后期时收集菌体, 制备受体细胞, 用质粒 pExSec1 进行电转化。转化效率分别为  $2.11 \times 10^6$ ,  $5.15 \times 10^5$ ,  $4.51 \times 10^5\text{cfu}/$

μg DNA。可以看出以对数生长早期的细胞为受体得到的转化效率明显高于中、后期的细胞。这可能是由于对数早期的细胞生命力最旺盛,对电击造成的损伤恢复能力强。对数早期的细胞电击后存活率高,相应的转化效率也高。据资料报道:除大肠杆菌外,弯曲杆菌,各种葡萄球菌等也都符合这一情况<sup>[8,9]</sup>。然而也有例外,如某些芽孢杆菌培养到静止期或静止前期才最适于电转化<sup>[2]</sup>。这可能是由于芽孢杆菌属革兰氏阳性菌,细胞壁坚实,一般不宜转化,静止期或静止前期正是芽孢形成前期,这时候可能细胞壁变薄,接收外来 DNA 而发生遗传转化的可能性就增强了。

**2.1.2 受体菌生长方式对转化效率的影响:**分别以液体、固体法培养 308R,收集菌体,制备受体细胞,用质粒 pExSec1 进行电转化。固体法培养细胞的转化效率比液体法高 10 倍。由于固体法培养的细胞在电击时,存活率高(约是液体法培养的细胞存活率的 4 倍),转化子得率也高,因此转化效率就高(表 1)。

表1 不同生长方式转化结果比较

培养方式	存活率 (%)	转化子 (cfu/40μL)	转化效率 (cfu/μg DNA)
液体	7.9	$2.76 \times 10^6$	$1.38 \times 10^7$
固体	28.2	$3.54 \times 10^7$	$1.77 \times 10^8$

**2.2 质粒 DNA 的特性与电转化效率的关系**

**2.2.1 DNA 分子量对电转化效率的影响:**分别用大小不同的 3 种质粒 pExSec1、pCPP9 和 pCPP430 转化 308R。转化效率分别为  $8.00 \times 10^3$ 、 $3.17 \times 10^3$ 、 $2.11 \times 10^1$  cfu/μg DNA。结果表明质粒越小越容易转化。质粒 DNA 分子量增加 10 倍,转化效率降低 100 倍。这与 Shigekawa 等人的实验结果相符<sup>[10]</sup>。45kb 的 pCPP430 能转化到成团泛菌中,说明比较大的 DNA 分子也能通过电转化进入细胞,虽然转化效率比较低。

**2.2.2 DNA 浓度与转化效率以及转化频率的关系:**分别以浓度为 1μg / μL、0.1μg / μL 和 0.01μg / μL 的 pExSec1 DNA 转化 308R(图 2),结果表明增加质粒 DNA 的浓度虽可增加转化子绝对数,但转化效率却相应降低,所以应根据

实验目的选择适当的质粒 DNA 浓度。例如在构建基因文库时不希望有共转化,则要求转化效率高而转化频率低。本实验中,0.01μg/μL 的 DNA 浓度可得到  $4.16 \times 10^5$  个转化子。

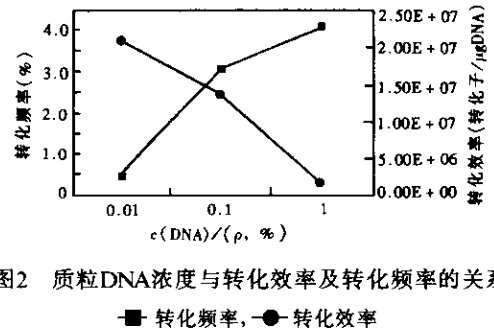


图2 质粒DNA浓度与转化效率及转化频率的关系  
■ 转化频率, ● 转化效率

**2.2.3 DNA 的来源对电转化效率的影响:**不同受体菌存在的限制-修饰系统往往因质粒的来源不同而给转化带来困难。分别从大肠杆菌 DH5α (pExSec1) 和成团泛菌 308R (pExSec1) 中提取质粒,再转化 308R。转化效率分别为  $4.72 \times 10^5$ 、 $1.38 \times 10^7$  cfu/μg DNA。结果表明:从同一种菌提出的质粒比从不同菌提出的质粒更易转化,这可能是由于成团泛菌中存在一定的限制-修饰系统,从异种来源的质粒进入后会被该系统破坏,而从同种细胞来源的质粒经过修饰可以避免这种限制。因此,对于受体菌存在的限制-修饰系统造成的转化效率降低,可通过将 DNA 在受体菌中重复转化来解决。

**2.3 电击条件与转化效率的关系**

影响电击转化效率的主要参数是电场强度和 时间常数。电场强度的高低反映的是施加在细胞上的电脉冲的强度,也决定着电脉冲在细胞膜上形成的穿孔的数目和大小。时间常数决定电脉冲维持的时间长短,对穿孔的保留时间有影响。不同的细菌对电脉冲的敏感性不一样。因此,我们研究了电场强度和 时间常数对成团泛菌电击转化效率的影响。

**2.3.1 电场强度对电转化效率的影响:**分别以电场强度 8、10、12、15、18、20kV / cm,电容 25μF,电阻 200Ω 对 308R 进行转化,质粒为 pExSec1(图 3)。受体菌的存活率随着电场强度的增高而降低。场强过高或过低都不利于转

化。场强太低难以在细胞膜上形成穿孔, DNA不能进入细胞;场强过高细胞膜上的穿孔太多、太大,细胞难以存活,转化子绝对值下降,转化效率也会降低。受体菌本身性质与所需的场强很有关系。本实验电场强度在 15kV/cm、细胞存活率在 10% 时,转化效率最高。

转化效率分别为  $2.00 \times 10^6$ 、 $5.00 \times 10^6$ 、 $2.15 \times 10^6$  cfu/ $\mu$ g DNA。本实验中,时间常数为 5ms 时转化效率较高。与电场强度相比,时间常数对转化效率的影响小得多。

#### 2.4 转化子的质粒检测

从 308R 的转化子中随机挑取单菌落进行质粒抽提并用限制性内切酶 *TaqI* 处理,以提供做电转化的质粒 pExSec1 及 308R 作对照(图 4)。电泳结果表明转化子中的质粒与 pExSec1 大小及 *TaqI* 酶切物理图谱一致,而 308R 中无质粒。

综上所述,成团浮菌在固体培养、生长对数早期收集菌体制备的受体细胞转化效率较高;小分子 DNA、适当的浓度、经成团泛菌修饰后转化效率较高;电场强度 15kV/cm,时间常数 5ms 时转化效率较高。本研究通过对成团泛菌电转化条件的优化,使转化效率由原来的  $10^5$  提高到  $10^8$ ,为成团泛菌的分子遗传研究、构建新型生防工程菌的工作奠定了基础。

#### 参 考 文 献

- [1] 宋诗铎,张同海,祁伟等. 生物工程学报, 1993, 9(3): 237~240.
- [2] 陈乃用. 微生物学通报, 1991, 18(2): 97~103.
- [3] 孙良武,梁平彦,田颖川等. 生物工程学报, 1994, 10(1): 1~6.
- [4] Wodzinski R S, Paulin J-P. Journal of Applied Bacteriology, 1994, 76: 603.
- [5] Heddi A, Charles H, Khatchadourian C et al. J Mol Evol, 1998, 47(1): 52~61.
- [6] Manulis S, Haviv Chesner A, Brandl M T et al. Mol Plant Microbe Interact, 1998, 11(7): 634~642.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning A Laboratory Manual, 2nd ed, 1989.
- [8] Miller J F, Dower W J, Tompkins L S. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 856~860.
- [9] Augustin J, Götz F. FEMS Microbiol. Lett 1990, 66: 203~208.
- [10] Shigekawa K, Dower W J. Biotechniques, 1988, 6: 742~751.

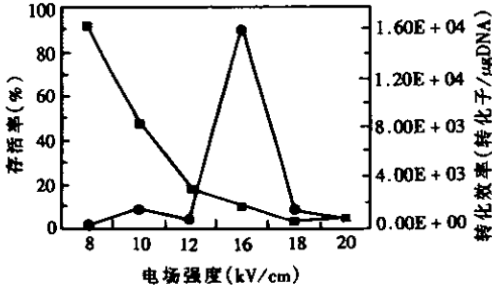


图3 电场强度与转化效率及存活率的关系

■—存活率, ●—转化效率

2.3.2 时间常数对电转化效率的影响: 改变电阻即可改变脉冲时间常数,在电压 15kV/cm、电容 25 $\mu$ F 时,分别以电阻 100 $\Omega$ 、200 $\Omega$ 和 400 $\Omega$ ,理论时间常数为 2.5ms、5ms、10ms 进行电脉冲。

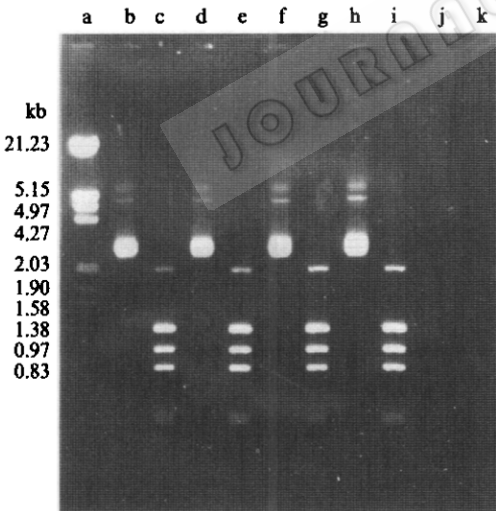


图4 转化子质粒DNA及酶切物理图谱

a  $\lambda$ DNA/*HindIII*+*EcoRI* Marker, b pExSec1, c pExSec1/*TaqI*, d,f,h 转化子质粒, e,g,i 转化子质粒*TaqI*酶切, j 308R质粒, k 308R质粒用*TaqI*酶切