

影响枯草杆菌原生质体转化的因素

张义正

(四川联合大学生物工程系 成都 610064)

刘白玲* 何先祺

(四川联合大学皮革工程系 成都 610065)

摘要 原生质体转化是将外源基因导入细菌的主要方法之一,其转化频率受制于多种因素。本研究以 *Bacillus subtilis* DB104 为宿主菌,以枯草杆菌的高表达型质粒 pNQ122 为外源 DNA,研究了原生质体再生率、原生质体浓度和用于制备原生质体的细胞生长期对转化频率的影响,获得了在该系统中实现高频率转化的条件。该转化条件使外源基因在多个 *B. subtilis* 菌株中的转化成为可能,并使从 *B. subtilis* 中筛选中性蛋白酶基因获得成功。

关键词 枯草杆菌,原生质体再生率,原生质体转化,转化频率

枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 不仅是重要的工业用酶生产菌,能将产生的一些酶分泌至胞外,已成为基因工程重要的宿主菌之一,因而具有十分重要的研究及应用价值^[1,2]。将外源基因导入枯草杆菌的方法很多,如感受态细胞转化法、噬菌体感染法、电冲击法、以及原生质体转化法等。已有的研究表明,原生质体转化法对实现外源基因在枯草杆菌中的克隆具有十分重要的地位。这是因为用其它方法,如感受态细胞转化法转化枯草杆菌,成功率及转化率都很低^[3]。Chang 等人^[4]于 1979 年建立的原生质体转化法,使外源 DNA 导入枯草杆菌,获得高频率的转化成为可能。迄今为止,Chang 的方法仍然是各国研究人员普遍采纳的转化方法。

作者在筛选中性蛋白酶基因的研究中,按照 Chang 的方法,用质粒载体 pNQ122 与蛋白酶高产菌 *B. subtilis* ML 染色体片段所构建的重组 DNA 分子转化 *B. subtilis* DB104^[5],多次转化都因转化效率极低而使筛选失败。因此,实现在 *B. subtilis* DB104 中的高效率转化,是获得蛋白酶基因的前提。研究证明:原生质体的形成率与再生率、原生质体浓度、以及用以制备原生质体的菌体的培养时间,均对转化效率有较大的影响。本研究逐一探讨了这些因素对所使用克隆系统转化效率的影响,获得了满意的结

果。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

B. subtilis DB104(his nprR2,nprE18 ΔaprA3)^[5],为转化条件研究及 npr 基因筛选的宿主菌。

B. subtilis BG2036(Δapr-684,ΔnprE522)^[6],*B. subtilis* AS1.398 和 *B. subtilis* ML^[7],用于验证本研究所建立的转化条件。

pNQ122(4.8kb, Cm^r, Km^r)^[8],用作外源基因研究转化条件。

1.2 培养基

LB 培养基^[9]。

DMP 再生培养基(由丁二酸钠溶液、营养琼脂、磷酸缓冲液、葡萄糖、MgCl₂等组成)^[11]。

1.3 转化用溶液^[11]

2 × SMM(含 1 mol / L 蔗糖, 40 m mol / L 顺丁烯二酸钠, 40 m mol / L MgCl₂); LBV。

SMMLBV 由 2 × SMM 与 LBV 等体积混合配成。

国家九五攻关资助项目

* 联系作者,现在地址:四川联合大学(成都科技大学)高分子研究所,成都610065

1996-07-20收稿

40%PEG(40%w / v, M. W. 6000); 溶菌酶(国产)。

1.4 枯草杆菌原生质体的制备

按文献[10]的方法进行,溶菌酶用量按实验中确定量加入。

1.5 原生质体转化

实验初期按 Chang 的方法^[4]制备原生质体进行转化,之后逐渐采用实验中所确定的条件进行。

1.6 原生质体形成率、再生率及转化频率

用文献[11]中的公式进行计算。

2 结果与讨论

2.1 原生质体的形成率、再生率与转化频率的关系

已有研究表明,原生质体的形成率与溶菌酶的用量和处理时间有关^[10,12]。本研究采用浓度为 1.1×10^8 / ml 的 *B. subtilis* DB104 培养物,对不同溶菌酶用量、不同处理时间下原生质体的形成率、再生率和转化频率进行了测定,结果列于表 1。

由表 1 可知,溶菌酶的用量越大,处理时间越长,原生质体的形成率越高;原生质体的再生率则随其形成率的增加而下降。当用 $0.4 \mu\text{g}$ 的 pNQ122 转化不同处理条件下获得的原生质体制备液时,样品 4 获得的转化子数目和转化频率最高。

由此可见,在实验范围内,原生质体的形成

条件以 $0.5 \text{mg} / \text{ml}$ 的溶菌酶用量(以 50ml 培养液离心收集菌体悬浮在 5ml SMMLBV 溶液中), 37°C 下摇床处理 1h 为最佳。实验中曾按 Chang 的方法,用 $2 \text{mg} / \text{ml}$ 的溶菌酶,于 37°C 下摇床处理 2h 制备原生质体,但所获得的原生质体再生率在 0.05% 以下。用这种原生质体制备液进行转化,出现在选择平板上的转化子几乎为零。

2.2 原生质体浓度对转化频率的影响

本研究制备原生质体时所采用的菌体浓度为 $\text{OD}_{600} 0.7 \sim 0.8$ (相应细胞浓度为 $8 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9 / \text{ml}$)。细菌经离心后悬浮在 $1 / 10$ 原始体积的 SMMLBV 中,加入 $0.5 \text{mg} / \text{ml}$ 的溶菌酶,于 37°C 摇床温和处理 1 小时,统一制备原生质体。经离心后再悬浮于 $1 / 100$ 的 SMMLBV 中,制备成浓缩悬浮液。再用 SMMLBV 配制成为常规浓度 $8, 6, 4, 3, 2$ 倍的原生质体悬浮液,用 $1 \mu\text{g}$ 的 pNQ122 进行转化,实验结果如图 1 所示。

用原生质体浓度代替细胞浓度进行转化效率研究,消除了菌体浓度的差别所带来的在原生质体形成率、再生率及转化效率上的差异,又能较准确、合理地反映菌体浓度对转化效率的影响。实验表明,原生质体浓度是影响转化效率的重要因素之一。由图 1 可知,当原生质体的浓度为通常使用浓度的 3 倍时,转化效率最高。继续提高原生质体浓度,则会使转化效率急剧下降。

2.3 细胞生长期对转化效率的影响

用对数期生长的细菌,以不同的接种量控

表 1 不同处理条件下 DB104 原生质体的形成率、再生率和转化频率间的关系

样品	原生质体制备条件		酶处理后 LB 平板上的 菌落数 (cfu/ml)	原生质体 形成率 (%)	再生细胞		转化子数 [*] (cfu/ml)	转化频率 (cfu.cells/ml)
	溶菌酶用量 (mg/ml)	作用时间 (min)			DMP 平板上 菌落数 (cfu/ml)	原生质体 再生率 (%)		
1	0.1	30	1.75×10^5	99.84	5.34×10^6	4.67	2.8	5.2×10^{-7}
2	0.1	60	6.8×10^4	99.94	ND		7.6	ND
3	0.5	30	2.0×10^3	99.998	1.82×10^6	1.65	7.4	4.1×10^{-6}
4	0.5	60	0	100	1.35×10^5	0.12	32.6	2.4×10^{-4}

* 8 个 DMP 再生平板上转化子的平均数

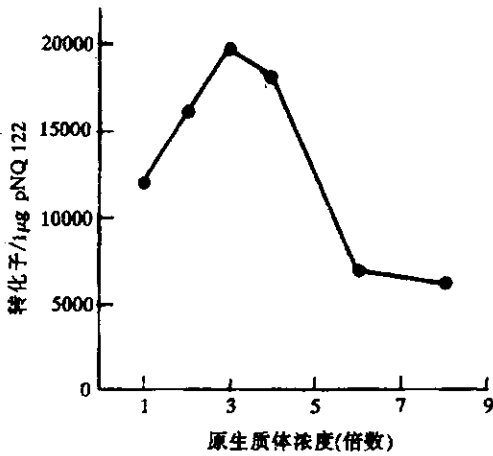


图1 原生质体浓度与转化效率的关系

制细胞培养液终浓度的方法,得到了菌龄不同,但细菌浓度相近的培养液。用这些培养液制备原生质体,探讨细胞生长期对转化频率的影响,结果如图2所示。

实验表明,用转种后培养4h的菌体制备原生质体,可得到最好的转化效率。这一结果说

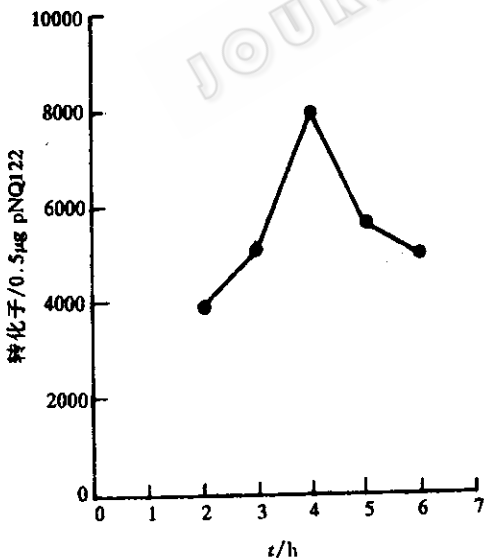


图2 细胞培养时间与转化效率的关系

明转化与宿主菌特定的生理过程有关。Dubnau^[13]在谈到枯草杆菌的遗传感受态时指出,枯草杆菌存在着天然的感受态,但受制于三

种调节模式:一定的生长阶段,营养应答(nutritionally responsive)及特定的细胞种类。本实验用4h培养物制备原生质体可获得最好的转化效率,也许是此刻的细胞正处于天然感受态,从而提高了外源DNA的导入效率。将原生质体再生率、外源DNA用量、原生质体浓度以及菌龄所获得的最佳水平值应用于转化实验,获得的转化效率为: $2.6\sim 2.8 \times 10^4$ 转化子 / $1\mu\text{g pNQ122}$

2.4 原生质体转化条件的应用效果

当确定了 *B. subtilis* 的原生质体转化条件后,用本实验室所筛选的蛋白酶高产菌株 *B. subtilis* ML 的染色体片段与质粒 pNQ122 相连接后转化 *B. subtilis* DB104。仅两次实验就筛选出了20多个含有 *B. subtilis* ML 中性蛋白酶基因的重组子^[14]。把具有蛋白酶高表达活性的三个重组子 pMPR4、pMPR8 和 pMPR16 及用作对照的 pNQ122 对 *B. subtilis* BG2036、*B. subtilis* AS1.398、*B. subtilis* ML 等三个菌株,用本研究确定的原生质体转化法进行转化,均获得了理想的转化效果:在含有酪蛋白和氯霉素的转化再生平板上出现了明显的蛋白水解圈。对克隆蛋白酶基因的表达研究还表明,除 AS.1.398 (pNQ122) 转化菌外,AS1.398 (pMPR4)、AS1.398 (pMPR8)、AS1.398 (pMPR16) 转化菌的蛋白酶表达水平均大大高于受体菌 AS.1.398^[14]。

这一结果表明,用 *B. subtilis* DB104~pNQ122 体系研究出的原生质体转化条件,在枯草杆菌原生质体的转化中具有一定的普遍意义和广泛的使用价值。

参 考 文 献

- [1] Glover D M(ed). In: *DNA Cloning*, vol.2. p1~16. RL Press Limited, New York, 1985
- [2] Wu R(ed). *Methods Enzymol. recombinant DNA*. vol. 68, 342~357, Academic Press, New York, 1979.
- [3] Ehrlich S D. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 74: 1689~1682.
- [4] Chang S, Cohen S N. *Mol Gen Genet*, 1979, 168: 111~115.
- [5] Kawamura F, Doi R H. *J Bacteriol*. 1984, 160:

- 442~444.
- [6] Yang M Y, Ferrari U, Henner D J. *J Bacteriol*, 1984, 160: 15~21.
- [7] 刘白玲, 柯先祺, 张义正. 皮革科学与工程, 1995, 5(3): 1~7.
- [8] 蒋如璋, 乔明强. 生物工程学报, 1988, 4(4): 278~286.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- [10] 董金兰, 张士文, 王茜等. 微生物学通报, 1990, 17(1): 10~14.
- [11] 江行娟, 杨庆云, 任大明等. 遗传学报, 1981, 8(1): 1~7.
- [12] 王岳五, 江波, 焦瑞身. 微生物学报, 1991, 31(2): 94~99.
- [13] Dubnau D. *Microbiol. Rev.* 1991, 55: 395~424.
- [14] 刘白玲, 柯先祺, 张义正. 微生物学通报, 1994, 21(1): 48~51.

STUDIES ON THE EFFECT OF VARIOUS FACTORS ON PROTOPLAST TRANSFORMATION IN *BACILLUS SUBTILIS*

Zhang Yizheng

(Department of Biotechnology, Sichuan Union University, Chengdu 610064)

Liu Bailing He Xianqi

(Department of Leather Engineering, Sichuan Union University, Chengdu 610065)

Abstract Using *Bacillus subtilis* DB104 as a host and plasmid pNQ122 as a heterogeneous DNA, the effects of regeneration percentage and concentration of protoplast, as well as the incubation time of the bacterial cells on the transformation efficiency in *B. subtilis* were studied. The optimal parameters to achieve a high transformation efficiency have been obtained and their availability has been proved in the transformation of various *B. subtilis* strains and in the cloning of npr gene from *B. subtilis*.

Key words *B. subtilis*, Regeneration percentage of protoplast, Protoplast transformation, Transformation efficiency