

## 高渗提高凝结芽孢杆菌 P4-102B 菌株的电击转化效率

赵春云 杨颂 欧阳立明 王永红\*

(华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

**摘要:**【目的】凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)是一种非常有工业应用前景的微生物,但遗传转化的困难是限制对其进行代谢工程改造的关键因素。本研究主要考察生长培养基、电击缓冲液、复苏培养基中添加高渗剂如山梨醇、甘露醇等对凝结芽孢杆菌转化效率稳定性的影响,并对凝结芽孢杆菌电击转化条件进行优化。【方法】用穿梭质粒 pNW33N 电转化凝结芽孢杆菌 P4-102B,系统地考察高渗条件下细胞生长阶段、感受态菌体浓度、电击缓冲液组分和复苏培养基组成等因素对转化效率的影响。【结果】同一电场压力下高渗体系转化效率较低渗体系明显提高且稳定性较好,菌体在含有 0.5 mol/L 山梨醇的 LB 培养基中生长到  $OD_{600}$  为 0.8 时收集,用 SMG [0.5 mol/L 山梨醇, 0.5 mol/L 甘露醇, 10% (质量体积比)甘油]电击缓冲液洗涤菌体 4 次制备感受态,在固定电场强度 14 kV/cm、脉冲时间 5 ms、1 mm 规格的电转杯进行电击转化,电转化后立即加入含有 0.5 mol/L 山梨醇和 0.38 mol/L 甘露醇的 LB 复苏培养基培养,能够获得最佳的转化效率  $2.7 \times 10^2$  CFU/ $\mu$ g DNA。【结论】使用高渗电击转化法能够提高电击转化的稳定性和重复性,并且可以获得较高的转化效率。

**关键词:** 凝结芽孢杆菌, 电击转化, 转化效率, 高渗

High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the gram-positive bacteria *Bacillus coagulans* P4-102B

ZHAO Chun-Yun YANG Song OUYANG Li-Ming WANG Yong-Hong\*

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** [Objective] One of the genetic manipulation restriction factors in *Bacillus coagulans* is the absence of an efficient and reproducible transformation method. This study optimized the concentrations of the osmoticums, sorbitol and mannitol, in the growth, electroporation and recovery media and other conditions to improve the transformation efficiency of *B. coagulans* P4-102B. [Methods] To optimize the conditions for electroporation of *B. coagulans* P4-102B, a shuttle vector for *E. coli* and *B. coagulans* pNW33N was used. Factors including growth phase, competent cell density, electroporation buffer, re-growth medium were investigated. [Results] Results showed that the

**Foundation item:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2013CB733600); National High-Tech Research and Program of China (863 Program) (No. 2015AA021005)

\*Corresponding author: Tel: 86-21-64253021; E-mail: yhwang@ecust.edu.cn

Received: January 27, 2016; Accepted: March 10, 2016; Published online (www.cnki.net): March 21, 2016

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目(No. 2013CB733600); 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(No. 2015AA021005)

\*通讯作者: Tel: 86-21-64253021; E-mail: yhwang@ecust.edu.cn

收稿日期: 2016-01-27; 接受日期: 2016-03-10; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-03-21

electro-transformation efficiency under high osmolarity was higher than that under the low osmolarity and the stability of electro-transformation efficiency was enhance. The highest transformation efficiency of  $2.7 \times 10^2$  CFU/ $\mu$ g DNA in strain P4-102B was obtained under the optimized conditions: growth  $OD_{600}$  0.8, electro-transformation buffer SMG [(0.5 mol/L sorbitol, 0.5 mol/L mannitol and glycerol 10% (W/V)], 1 mm cuvette, electro-transformation field strength 14 kV/cm and pulse constant for 5 ms, re-growth medium RGM (LB with 0.5 mol/L sorbitol and 0.38 mol/L mannitol). **[Conclusion]** High osmolarity improved the stability and reproducibility of electro-transformation and obtained a high electro-transformation efficiency.

**Keywords:** *Bacillus coagulans*, Electro-transformation, Transformation efficiency, High-osmolarity

凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)从变质的罐装牛奶中分离出来<sup>[1]</sup>, 它是一种能产乳酸的芽孢杆菌<sup>[2]</sup>。除了具有一般乳酸菌的特性外, 还有一些非常有价值的特性: 它的生长和发酵最适条件为 50–55 °C, pH 5.0, 底物利用率高<sup>[3]</sup>。另外, 它还能利用不同生物质分解的糖发酵生产生物基化学品, 如乳酸、乙醇等<sup>[4]</sup>。它的生长和发酵温度和工业上常用的真菌纤维素酶的最适温度相近。因此, 在同步糖化发酵(SSF)中, 利用凝结芽孢杆菌发酵能比利用嗜常温的酵母(30 °C)等菌株发酵纤维素酶的使用量要减少很多<sup>[5]</sup>。而且因为高的生长温度, 低的生长 pH, 使其在工业上不用灭菌即可发酵生产 L-乳酸, 节省生产原料成本和时间<sup>[6]</sup>。

凝结芽孢杆菌具有很多巨大工业应用价值, 但是目前在工业上对凝结芽孢杆菌的利用还很少<sup>[7]</sup>, 最主要的原因是外源 DNA 导入凝结芽孢杆菌的效率极低, 严重制约着凝结芽孢杆菌的遗传操作和代谢工程的研究。限制转化的原因主要是两方面: (1) 宿主本身的限制修饰系统; (2) 宿主本身的细胞壁的结构。2007 年, Rhee 等<sup>[2]</sup>研究发现凝结芽孢杆菌 P4-102B 转化效率不受 DNA 的来源限制, 即质粒 DNA 分离提取于甲基化缺陷的 *Escherichia coli* GM272 或分离提取于凝结芽孢杆菌 P4-102B 菌株都不会影响转化效率, 即凝结芽孢杆菌 P4-102B 的限制修饰系统不会影响转化效率。因此, 凝结芽孢杆菌 P4-102B 的低转化效率主要是因为凝结芽孢杆菌属于革兰氏阳性菌, 细胞壁厚而致密<sup>[8]</sup>。电击转化方法由于操作简便省时, 转化效率相对较高<sup>[9]</sup>, 因此目前凝结芽孢杆菌的转化方法主要是电转化法。电转化法是通过高压电击, 在细胞壁和细胞膜

上产生瞬间空隙, 使得外源 DNA 进入细胞<sup>[10-11]</sup>。Rhee 等曾报道在低渗环境电转化 *B. coagulans* P4-102B 法获得成功<sup>[2]</sup>, 但作者经过多次实验, 发现此方法重复性和稳定性差。在电击转化中, 随着电场强度的增加, 产生的疏水小孔越多, 细胞膜通透性越好, 外源 DNA 越容易进入细胞, 但细胞的死亡率也会随着电场强度的增加而增加。所以要得到较高的电转化率, 一方面要提高电场强度, 另一方面又要尽量降低细胞死亡率。细胞在电击后很容易死亡, 其主要原因是电击导致细胞膜穿孔, 会使部分细胞壁和细胞膜重新复原的能力丧失以及细胞内容物流出导致细胞死亡。此时若高渗剂存在, 由于能给细胞提供一个较细胞内胞质渗透压高的环境而且高渗剂能使细胞收缩, 提高细胞膜的再密封能力, 因此能降低细胞内容物的流出速度, 提高细胞的存活率, 最终提高电转化效率<sup>[9]</sup>。同时很多其它因素都能影响电击转化法的效率, 包括生长培养基<sup>[12]</sup>、生长状态<sup>[13]</sup>、电场强度<sup>[14]</sup>、质粒的浓度、质粒的纯度<sup>[15]</sup>、电击缓冲液<sup>[16]</sup>、感受态细胞的数量<sup>[13]</sup>、复苏培养基<sup>[17]</sup>等。本研究首先采用添加高渗剂的 LB 培养基进行细胞培养, 以提高感受态细胞对高渗环境适应能力, 继而对菌体的生长状态和电击缓冲液中高渗剂的种类和组合、复苏培养基中山梨醇的浓度进行优化, 从而提高凝结芽孢杆菌 P4-102B 的转化稳定性和转化效率。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株和质粒

菌株: 凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*) P4-102B 由 K. T. Shanmugam 教授赠送; 大肠杆菌

(*Escherichia coli*) Top10, 本实验室保存, 用于扩增质粒。

质粒: 穿梭质粒 pNW33N (4 217 bp), K. T. Shanmugam 教授赠送; 氯霉素抗性质粒 pIM1773-PRHIII-sfGFP-pNW33N (5 062 bp) 购买于 Addgene Vector Database; 氯霉素抗性和荧光蛋白基因<sup>[18]</sup>。

## 1.2 培养基

LB 培养基(g/L)<sup>[18]</sup>, 固体培养基加入 2% 的琼脂糖(用于培养大肠杆菌 pH 7.0, 用于培养凝结芽孢杆菌 pH 5.0)。

GM (Growth medium)培养基(g/L): NaCl 10, 酵母提取物 5, 蛋白胨 10, 0.5 mol/L 山梨醇, pH 5.0, 用于培养凝结芽孢杆菌。

RGM1 (Re-growth medium)培养基(g/L): NaCl 10, 酵母提取物 5, 蛋白胨 10, 甘露醇 0.38 mol/L, 山梨醇 0.2 mol/L, pH 5.0, 用于电击后凝结芽孢杆菌的复苏。RGM2 (Re-growth medium)培养基(g/L): NaCl 10, 酵母提取物 5, 蛋白胨 10, 蔗糖 0.5 mol/L, MgCl<sub>2</sub> 20 mmol/L, 葡萄糖 1%。

## 1.3 主要试剂和仪器

氯霉素、蔗糖、山梨醇、甘露醇均购自上海生物工程技术有限公司; *Pfu* DNA 聚合酶购自天根生化科技(北京)有限公司; 琼脂糖及 DNA Marker 购自宝生物(大连)有限公司; 质粒 DNA 小量抽提试剂盒购自爱思进生物技术(杭州)有限公司。

氯霉素: 储存浓度为 7.5 g/L, 工作浓度为 7.5 mg/L。

基因导入仪(GenePulser Xcell), 美国伯乐有限公司; 荧光显微镜(M30C), 万衡仪器有限公司。

## 1.4 电击缓冲液 (Electroporation medium, ETM)

SMG 电击缓冲液: 0.5 mol/L 山梨醇, 0.5 mol/L 甘露醇, 10% (质量体积比)甘油。

MG 电击缓冲液: 0.5 mol/L 甘露醇, 10% (质量体积比)甘油。

SG 电击缓冲液: 0.5 mol/L 山梨醇, 10% (质量体积比)甘油。

SG1 电击缓冲液: 0.5 mol/L 蔗糖, 10% (质量体积比)甘油。

## 1.5 引物合成

为了验证转化子, 设计引物 CAT F/R 拷贝出质粒 pNW33N 的氯霉素抗性。引物合成由上海生工生物有限公司进行。引物: CATF: 5'-CCCGGGTGA TTCTAATGAAGAAAGCAGACAAGTAAGCC-3', CATR: 5'-CCCGGGATTTCGAATCGTGCCAGCCC TTCAAACCTCCCA-3'。

## 1.6 凝结芽孢杆菌质粒的提取

质粒的提取参照 Rhee 等<sup>[2]</sup>的碱裂解法, *B. coagulans* P4-102B 转化子在 4 mL LB 液体培养基中 50 °C、200 r/min 培养过夜。培养好的菌体 4 °C、10 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。菌体用 500 μL SET (25%蔗糖, 50 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris pH 8.0)试剂洗涤 3 次, 将菌体悬浮在 250 μL 含有 1 g/L 溶菌酶和 40 g/L RNase 的 SET 中, 37 °C 水浴 30 min, 直至菌液变澄清。加入 250 μL 碱裂解液 (0.2 mol/L NaOH, 1% SDS), 轻轻混匀, 放置 3 min, 直到悬浮液变澄清。然后加入 250 μL 酸性中和试剂 (3 mol/L K<sup>+</sup>-5 mol/L COOH), 轻轻混匀, 离心 10 min。用苯酚抽提法去除蛋白(苯酚:氯仿:异戊醇=25:24:1, 体积比)。加入异丙醇沉淀质粒 DNA, 70% 的乙醇洗涤质粒 DNA, 倒掉乙醇, 晾干。加适量超纯水溶解质粒, -20 °C 保存质粒。

## 1.7 凝结芽孢杆菌感受态的制备

通过 LB 培养基划线纯化 *B. coagulans* P4-102B, 挑取单菌落接种于 15 mL 新鲜 LB 液体培养基中, 50 °C 静置培养过夜。从培养过夜的摇瓶中取 750 μL 菌液接种至含有 50 mL 新鲜 GM 培养基中, 50 °C、200 r/min 培养至 OD<sub>600</sub> 达到 0.4 时, 将生长好的菌液转移至 50 mL 离心管中, 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min, 去除上清, 用预冷的 30 mL 电击缓冲液重复洗涤 4 次菌体, 最后用 4 °C 预冷的电击缓冲液悬浮感受态细胞, 使感受态细胞的数量为 10×10<sup>9</sup>-10×10<sup>10</sup> 个/mL, 并分装到预冷的 1.5 mL 无菌离心管中, 每管 80 μL, 4 °C 放置, 待用。

## 1.8 质粒电击转化

将 50 ng 质粒 pNW33N 加入 80  $\mu$ L 凝结芽孢杆菌感受态细胞悬液中, 并轻轻混合, 4  $^{\circ}$ C 放置 10 min。用移液枪转移至预冷的 1 mm 电转杯中, 将电转杯壁外擦拭干净, 置于电穿孔仪中, 设置参数 14 kV/cm、5 ms 进行电击。电击结束后, 将 1 mL 复苏培养基 RGM1 立即加入电转杯中, 把电转杯中的含菌液体转入至含有 1 mL RGM1 培养基的 Eppendorf 管里, 50  $^{\circ}$ C、100 r/min 培养 3 h。然后 5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 菌体重悬在 0.2 mL RGM1 中, 菌液涂布于氯霉素抗性平板, 50  $^{\circ}$ C 培养 48 h, 挑取转化子验证。

## 1.9 转化子验证

由于质粒 pNW33N 在 *B. coagulans* P4-102B 中的拷贝数很低, 从转化子中提取质粒直接进行核酸凝胶电泳, 在电泳结果所得凝胶中看不到条带。因此在转化子验证中首先提取转化子质粒, 再利用提取质粒作为模板, 通过质粒上氯霉素抗性基因上下游引物聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)扩增氯霉素抗性基因。

## 2 结果与分析

### 2.1 凝结芽孢杆菌转化子的验证

随机挑取 10 个转化后长出来的单克隆, 根据

1.6 节的操作步骤提取单克隆的质粒, 并将其作为模板, 通过氯霉素抗性基因上下游引物聚合酶链式反应(PCR)扩增氯霉素抗性基因。扩增产物以 1%琼脂糖凝胶电泳检测分析, 如在约 810 bp 处出现目的条带, 则证明凝结芽孢杆菌 P4-102B 能在抗性平板上生长是由于转入氯霉素抗性基因所致; 另外用原质粒 pNW33N 作为阳性对照, 同时进行琼脂糖凝胶电泳检测, 如二者条带位置一样则进一步证明质粒 pNW33N 已转化入凝结芽孢杆菌 P4-102B, 电泳结果如图 1 所示。

### 2.2 凝结芽孢杆菌菌体生长状态的优化

为了研究凝结芽孢杆菌不同的生长状态对感受态的制备和后期转化的影响, 在培养细胞  $OD_{600}$  值分别为 0.4、0.6、0.8、1.0 时, 收集菌体, 根据 1.7 节感受态的制备方法, 获得不同生长时期的感受态细胞。将穿梭质粒 pNW33N 根据 1.8 的操作步骤转化至感受态细胞中, 涂布于 7.5 mg/L 氯霉素抗性的 LB 固体培养基平板, 计数转化菌落, 计算转化率, 其中电击缓冲液为 SMG, 再生培养基为 RGM1。由图 2 中 B 图可知: 当  $OD_{600}$  值为 0.8 时, 转化率达到最高, 平均为  $0.4 \times 10^2$  CFU/ $\mu$ g DNA, 由图 2A 可知, 此时菌体为指数生长的中期阶段。当  $OD_{600}$  小于 0.8 时, 菌体处在指数生长前期, 转化率

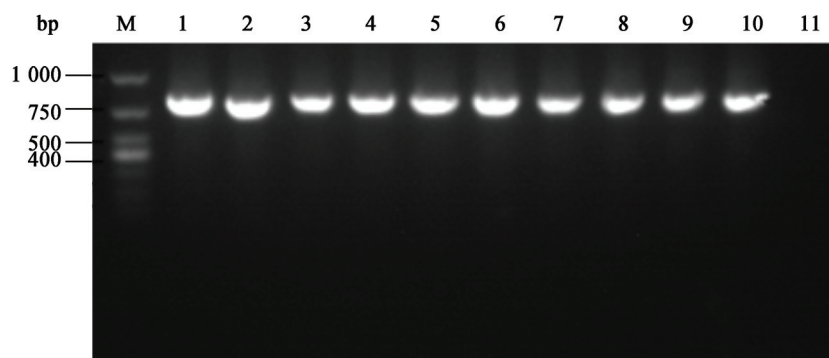


图 1 转化子的验证

Figure 1 Verification of transformants

注: M: Marker DL1000. 1-9: 为采用随机挑取的 9 个转化子提取质粒作为模板的 PCR 后凝胶电泳结果; 10: 质粒 pNW33N 的 PCR 结果; 11: 没有转化质粒 pNW33N 的菌体提取质粒的 PCR 结果, 阴性对照。

Note: M: Marker DL1000. 1-9: The PCR amplification of the plasmid isolation from transformants; 10: The PCR amplification of the plasmid pNW33N; 11: The PCR amplification of the plasmid isolation from negative strain.

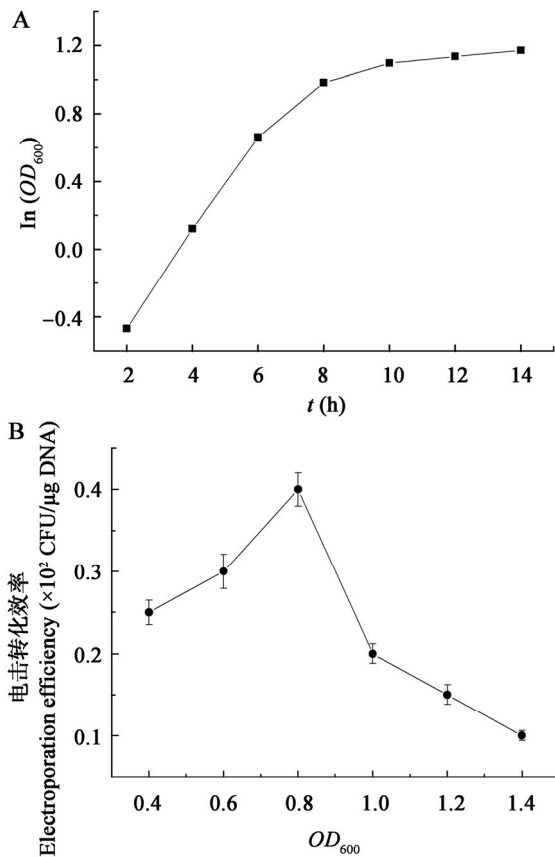


图2 菌体的生长状态对转化效率的影响

Figure 2 Effects of growth phase on the electroporation efficiency

注: A: *B. coagulans* P4-102B 的生长曲线; B: 菌体不同生长  $OD_{600}$  对转化效率的影响.

Note: A: The growth curve of *B. coagulans* P4-102B; B: Effects of different  $OD_{600}$  on the electroporation efficiency.

变低, 可能是因为菌体在指数生长前期时, 菌体数量不多, 在制备感受态时, 菌体数量太少; 当  $OD_{600}$  大于 0.8 时, 菌体在指数生长后期时, 菌体过老, 细胞壁较厚, 细胞壁电穿孔效率降低。

### 2.3 电击缓冲液的优化

在  $OD_{600}$  为 0.8 时, 收集菌体制备感受态。制备感受态时用不同的电击缓冲液 SMG、MG、SG、SG1 洗涤细胞, 电击感受态和质粒的混合物。电击后, 立即加入含 0.2 mol/L 山梨醇和 0.38 mol/L 甘露醇的复苏培养基, 48 h 后观察转化结果。由图 3 可知, 在使用 SMG 制备感受态后立即进行电击转化, 转化效率最高, 转化率达到  $1.4 \times 10^2$  CFU/ $\mu$ g DNA。

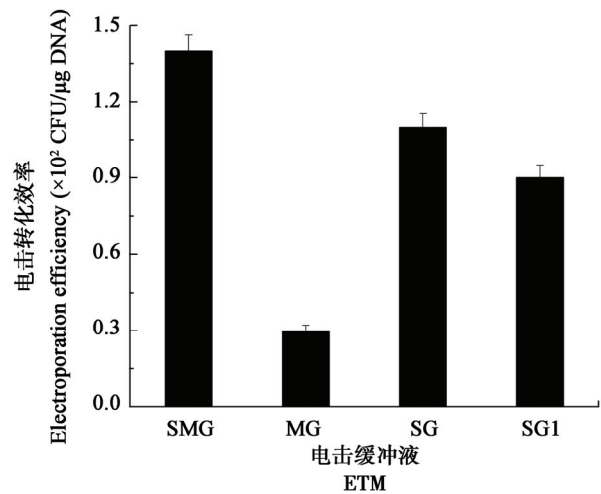


图3 电击缓冲液对转化率的影响

Figure 3 Effects of electroporation medium (ETM) on the electroporation efficiency

### 2.4 电击后复苏培养基中高渗剂浓度的优化

在菌体生长到  $OD_{600}$  为 0.8 时, 收集菌体制备感受态, 并调节感受态的浓度  $OD_{600}$  为 20 时, 电击感受态和质粒的混合物。电击后, 立即加入含不同浓度的山梨醇(0.2、0.4、0.5、0.8、1 mol/L)的复苏培养基并观察转化结果。由图 4 A 可知, 电击后加入含 0.5 mol/L 山梨醇的复苏培养基时, 平均转化率最高达到  $2.7 \times 10^2$  CFU/ $\mu$ g DNA。为了研究甘露醇对转化效率的影响, 在电击转化后立即加入含有 0.5 mol/L 山梨醇和不同浓度的甘露醇(0.1、0.3、0.38、0.5、0.7 mol/L)的复苏培养基并观察结果。由图 4 可知, 电击后加入含 0.5 mol/L 山梨醇和 0.38 mol/L 甘露醇的复苏培养基时, 平均转化率最高达到  $2.7 \times 10^2$  CFU/ $\mu$ g DNA。电击后加入电击后的复苏培养基中山梨醇的浓度为 0.5 mol/L, 甘露醇的浓度为 0.38 mol/L 时, 转化率最高; 山梨醇的浓度高于 0.5 mol/L, 甘露醇的浓度高于 0.38 mol/L 时, 转化率快速下降。这可能是因为山梨醇和甘露醇的浓度过大时, 体系总渗透压过大影响了细胞的生长。

### 2.5 低渗法和高渗法对转化效率的影响

低渗法即根据 Rhee 等在 2007 年的报道<sup>[2]</sup>, 在低渗环境电击转化凝结芽孢杆菌 P4-102B。菌体在 LB 中培养到细胞  $OD_{600}$  为 0.8 时, 根据 1.7 节感受

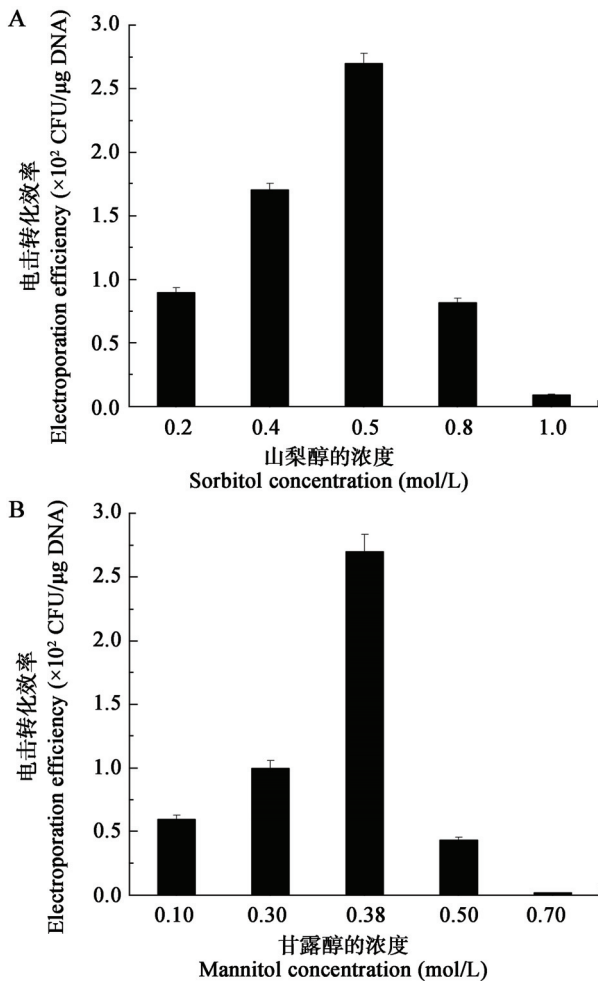


图4 复苏培养基中添加高渗剂对转化效率的影响

Figure 4 Effects of osmotic stabilizers in regeneration media on the electroporation efficiency

注: A: 复苏培养基中山梨醇的浓度对转化效率的影响; B: 复苏培养基中甘露醇的浓度对转化的影响。

Note: A: Effects of sorbitol concentrations in regeneration media on the electroporation efficiency; B: Effects of mannitol concentrations in regeneration media on the electroporation.

态的制备方法,用SG1电击缓冲液制备感受态,电击后加入RGM2培养基。高渗法即根据本研究的结果电击转化P4-102B。P4-102B在GM中培养,在菌体细胞 $OD_{600}$ 值为0.8时,收集菌体,根据1.7节感受态的制备方法,用SMG缓冲液制备感受态,电击后立即加入含0.5 mol/L山梨醇和0.38 mol/L甘露醇的LB复苏培养基。对比两种方法的电击转化率和感受态细胞的存活率(表1)可知,在相同的电击条件下,高渗条件下的转化率总体都要高于低渗

条件下的转化率。在低电压下,高渗条件和低渗条件下的转化率相差不大,但是在高电压的条件下,高渗条件下的转化率要远远的高于低渗条件下的转化率;从表1还可看到3组平行组的实验中,高渗条件下转化效率的稳定性要远远高于低渗条件。图5所示细胞存活率研究结果为上述现象提供了支撑。在图5中,可以看到在相同的电击条件下,高渗条件下细胞的存活率要高于低渗条件下细胞的存活率。在低的电压条件下这种高渗保护细胞作用不明显,但是在高电压条件下,渗透剂能大大提高细胞的存活率。另外,可以看到在高电压条件下,例如14 kV/cm,高渗条件下细胞存活率是低渗条件的2.5倍,可见渗透剂加入大大提高了细胞的存活率。在高渗条件下转化效率高于低渗条件并且高渗条件下的转化效率稳定性更好的主要原因是:(1)山梨醇和甘露醇能够使细胞收缩,提高细胞膜的再密封能力,使细胞膜的可逆性回复几率增大,提高了细胞的存活率,并且山梨醇和甘露醇能降低细胞表面的离子强度,减少细胞在电击时的击穿现象,从而提高了细胞的存活率;(2)山梨醇和甘露醇能增加细胞膜的通透性,使得外界的DNA更容易进入到细胞内。因此经过这两方面的作用,提高了电击转化效率。

表1 高渗条件和低渗条件对转化效率的影响

Table 1 Effects of osmolarity on the electroporation efficiency

电场电压 Field strength (kV/cm)	转化条件 Electroporation condition	转化效率 Electroporation efficiency ( $\times 10^2$ CFU/ $\mu$ g DNA)		
8	高渗	0.9	0.87	0.85
	低渗	0.7	0.54	0.31
12	高渗	1.8	1.75	1.69
	低渗	1.3	0.90	0.52
14	高渗	2.7	2.60	2.58
	低渗	1.8	1.40	0.59
15	高渗	1.2	1.09	1.05
	低渗	0.5	0.32	0.15
16	高渗	0.7	0.58	0.56
	低渗	0.1	0.03	0

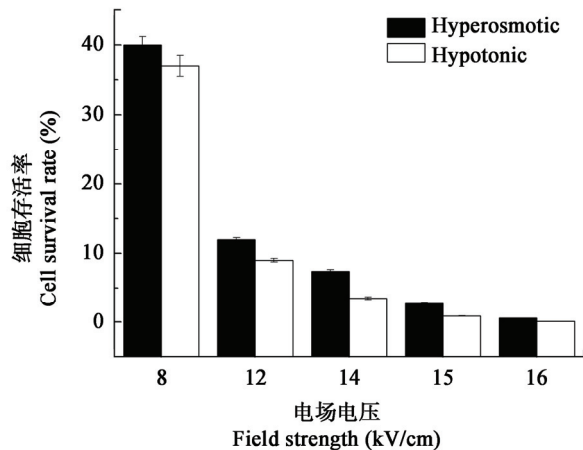


图5 渗透剂对电击后细胞存活率的影响

Figure 5 Cell survival rate of *B. coagulans* P4-102B after electroporation

### 3 讨论

从已有文献[2]可知,本文首次研究了高渗剂对凝结芽孢杆菌电击转化的影响,并且从实际效果来看同一电场压力下高渗体系转化效率较低渗体系明显高,且稳定性和重复性都比较好。通过研究可知,菌体在含有0.5 mol/L山梨醇的高渗培养基中生长,并且在 $OD_{600}$ 约为0.8时收集,用含0.5 mol/L山梨醇和0.5 mol/L甘露醇的电击缓冲液洗涤菌体制备感受态,在固定电场强度14 kV/cm,脉冲时间5 ms,1 mm规格的电转杯电击转化,以含有0.5 mol/L山梨醇和0.38 mol/L甘露醇的LB复苏培养基培养,获得最佳的转化效率达 $2.7 \times 10^2$  CFU/ $\mu$ g DNA,并且用质粒pIM1773-PRHIII-sfGFP-pNW33N验证了方法的可行性(数据没有列出)。本研究结果为凝结芽孢杆菌的电击转化提供了新的方法,也为凝结芽孢杆菌的基因转移和分子生物学操作奠定了基础。

### 参考文献

- [1] Nakamura LK, Blumenstock I, Claus D, et al. Taxonomic study of *Bacillus coagulans* Hammer 1915 with a proposal for *Bacillus smithii* sp. nov.[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1988, 38(1): 63-73
- [2] Rhee MS, Kim JW, Qian YL, et al. Development of plasmid vector and electroporation condition for gene transfer in sporogenic lactic acid bacterium, *Bacillus coagulans*[J]. Plasmid, 2007, 58(1): 13-22
- [3] Wang QZ, Ingram LO, Shanmugam KT. Evolution of D-lactate dehydrogenase activity from glycerol dehydrogenase and its utility for D-lactate production from lignocellulose[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(47): 18920-18925
- [4] Ou MS, Mohammed N, Ingram LO, et al. Thermophilic *Bacillus coagulans* requires less cellulases for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to products than mesophilic microbial biocatalysts[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009, 155(1/3): 76-82
- [5] Ou MS, Ingram LO, Shanmugam KT. L(+)-Lactic acid production from non-food carbohydrates by thermotolerant *Bacillus coagulans*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(5): 599-605
- [6] Qin JY, Zhao B, Wang XW, et al. Non-sterilized fermentative production of Polymer-grade L-lactic acid by a newly isolated thermophilic strain *Bacillus* sp. 2-6[J]. PLoS One, 2009, 4(2): e4359
- [7] Su F, Xu P. Genomic analysis of thermophilic *Bacillus coagulans* strains: efficient producers for platform bio-chemicals[J]. Scientific Reports, 2014, 4: 3926
- [8] Turgeon N, Laflamme C, Ho J, et al. Elaboration of an electroporation protocol for *Bacillus cereus* ATCC 14579[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 67(3): 543-548
- [9] Xue GP, Johnson JS, Dalrymple BP. High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*[J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 34(3): 183-191
- [10] Tsong TY. 4-Time sequence of molecular events in electroporation[J]. Guide to Electroporation and Electrofusion, 1992: 47-61
- [11] Zhang GQ, Bao P, Zhang Y, et al. Enhancing electro-transformation competency of recalcitrant *Bacillus amyloliquefaciens* by combining cell-wall weakening and cell-membrane fluidity disturbing[J]. Analytical Biochemistry, 2011, 409(1): 130-137
- [12] Peng D, Luo Y, Guo S, et al. Elaboration of an electroporation protocol for large plasmids and wild-type strains of *Bacillus thuringiensis*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(6): 1849-1858
- [13] Lu YP, Zhang C, Lyu FX, et al. Study on the electro-transformation conditions of improving transformation efficiency for *Bacillus subtilis*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2012, 55(1): 9-14
- [14] McDonald IR, Riley PW, Sharp RJ, et al. Factors affecting the electroporation of *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1995, 79(2): 213-218
- [15] Dorella FA, Estevam EM, Cardoso PG, et al. An improved protocol for electrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*[J]. Veterinary Microbiology, 2006, 114(3/4): 298-303
- [16] Schlaak C, Hoffmann P, May K, et al. Desalting minimal amounts of DNA for electroporation in *E. coli*: a comparison of different physical methods[J]. Biotechnology Letters, 2005, 27(14): 1003-1005
- [17] Zhang S, Xue ZL, Chen H, et al. Optimization of a Method about electro-transformation in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Chongqing University of Technology (Natural Science), 2014, 28(8): 60-63,80 (in Chinese)
- [18] 张爽, 薛正莲, 陈环, 等. 一种电击转化枯草芽孢杆菌方法的优化[J]. 重庆理工大学学报: 自然科学版, 2014, 28(8): 60-63,80
- [18] Kristen B, Srebrenka R, Ichiro M. Transformable facultative thermophile *Geobacillus stearothermophilus* NUB3621 as a host strain for metabolic engineering[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(15): 6715-6723