

枯草芽孢杆菌突变株 IA857 高效转化方法的研究*

Studying on the Efficient Transformation Method for Mutant *Bacillus Subtilis* IA857

牛福星^{1,2},于晶晶^{1,2},汤宏赤^{1,2},刘金平^{1,2},滕 昆^{1,2},韦宇拓^{1,2**}

NIU Fu-xing^{1,2}, YU Jing-jing^{1,2}, TANG Hong-chi^{1,2}, LIU Jin-ping^{1,2}, TENG Kun^{1,2}, WEI Yu-tuo^{1,2}

(1. 广西大学生命科学与技术学院,广西南宁 530005;2. 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室,广西南宁 530005)

(1. College of Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530005, China; 2. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Nanning, Guangxi, 530005, China)

摘要:【目的】研究比较枯草芽孢杆菌突变株 IA857 高效转化的最优方法。【方法】以质粒 pHCMC04(大小为 8089bp)转化突变型枯草芽孢杆菌 IA857,分别用电转化法、原生质体法、电击法诱导的原生质体法、Spizizen 低盐环境感受态转化法(简称 S 法)、低盐环境形成饥饿感受态法及其改良方案在其它突变菌株的试验方法(简称 C 法)进行实验,通过比较优化得出最优转化方法。【结果】采用 S 法转化枯草芽孢杆菌突变株 IA857,质粒加入量为 70ng 时,转化后直接摇床培养 1h 转化率最高达到 1.2×10^4 CFU/ μ g DNA,可以满足枯草芽孢杆菌高效转化的要求。【结论】得出了枯草芽孢杆菌突变株 IA857 最优转化方法并提出转化枯草芽孢杆菌的基本框架。

关键词:枯草芽孢杆菌 转化 电击法 原生质体法 低盐环境 感受态

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2014)02-0119-05

Abstract:【Objective】Studying and comparing efficient transformation methods for mutant *B. subtilis* IA857. 【Methods】The plasmid of pHCMC04 (8089bp) has been transformed into *B. subtilis* IA857, and many methods, just like electroporation, protoplast method, protoplast induced by electroporation, the method forming hunger feeling competent in low salt environment (short S method) and its improved method used in other strains (short C method), were compared and optimized. 【Results】The optimization of conversion rate was conducted by means of S method. When the mutant *B. subtilis* IA857 was transformed with 70 ng plasmid and directly shaker cultured for 1h, the highest transformation efficiency reached 1.2×10^4 CFU/ μ g DNA, which meets the requirement for efficient transformation. 【Conclusion】This study provides an optimal transformation method and puts forward the basic framework of transformation of *Bacillus subtilis*.

Key words: *B. subtilis*, transformation, electroporation, protoplast method, low salt environment, competence

收稿日期:2014-02-18

修回日期:2014-03-04

作者简介:牛福星(1988-),男,硕士研究生,主要从事基因工程菌的构建和酶工程方向的研究。

* 广西科学研究与技术开发计划(No. 11107008-3),广西研究生教育创新计划项目资助。

** 通讯作者:韦宇拓(1971-),男,教授,主要从事发酵与酶工程方向的研究。

【研究意义】枯草芽孢杆菌是具有重要工业应用价值的菌种之一^[1],因此建立简便、有效的 DNA 转化方法,对枯草芽孢杆菌的基因改造、提高其生产性能具有重要意义,因而其高效转化方法依然是个值得研究的方向。【前人研究进展】自上世纪 Spizizen 成功转化野生枯草菌株以来,在其它相应突变型枯草菌

株中的转化方法也在不断更新,如电转化法^[2~4]、原生质体法^[5~7]、电击法诱导的原生质体转化^[8]、低盐环境形成饥饿感受态^[9~12]等。【本研究切入点】目前的枯草芽孢杆菌转化方法虽然在不同的菌株中得到成功转化的报道不少,但并非对所有的菌株都适用。【拟解决的关键问题】以成功在不同枯草芽孢杆菌中转化的多种方法为依据,用质粒 pHCMC04 (8089 bp)^[13] 转化突变型枯草芽孢杆菌 IA857^[14],对可行的方法进行比较优化,得出最优的转化方法并提出转化枯草芽孢杆菌的基本框架。

1 材料和方法

1.1 材料

LB培养基;BTX公司电穿孔仪;离心机为:Het-tich Zentrifugen Mikro 22/Universal 32R, Hitachi Himc CR22F, Beckman Microfuge Lite 和 Eppendorf Centrifuge 5415D; HYG-II 恒温摇床; Grant L TD 20G 恒温水浴锅; 国产数显恒温水浴锅; Amer-sham pharmacia biotech Hoefler mini VE 电泳仪。

1.2 菌株和质粒

枯草芽孢杆菌 IA857 及表达载体 pHCMC04 均购自 BGSC, 大肠杆菌 DH5a 为本实验室保存。

1.3 培养基

1.3.1 电转化法用培养基

据多种电转化培养基配方^[2]优化而得,具体为:

溶液 A(100mL): 蛋白胨 1g, 酵母粉 0.5g, NaCl 1g, 山梨醇 9g, pH 值为 7.0;

溶液 B(100mL): 山梨醇 9g, 甘露醇 9.25g, 葡萄糖 10g;

溶液 C(10mL): 9mL 溶液 B+1mL 甘油;

复苏培养基; SOC 培养基。

1.3.2 spizizen 低盐环境感受态制备培养基

根据多人^[9~12]引用、改进、总结及自己试验改进,简称 S 法,具体为:

溶液 A(20mL): 酵母提取物 0.2g, 酪蛋白氨基酸 0.04g;

溶液 B(10mL): 缺陷型菌株需添加的必须氨基酸各占 0.5% (本菌株添加色氨酸 0.05g, 亮氨酸 0.05g, 蛋氨酸 0.05g), 葡萄糖 5g, 过滤除菌;

溶液 C(100mL): KH_2PO_4 2.4g, K_2HPO_4 5.6g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.8g, 柠檬酸钠 0.4g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.08g;

溶液 D(500mL): 硼酸 1.415g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.9g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.68g, 酒石酸钠 0.855g, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 13.45mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 23.5mg,

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20.2mg, 高钼酸钠 12.6mg;

溶液 E(10mL): $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.086g;

溶液 F(10mL): CaCl_2 73.5mg;

溶液 G(50mL): 山梨醇 18.25g。

以上溶液分开灭菌后混合,避光保存,混合方案参照文献[10],具体为:

GM I: 10mL 溶液 A+1.5mL 溶液 B+25mL 溶液 C+100 μL 溶液 D+25mL 溶液 G,并用灭菌水补足 100mL,混匀备用;

GM II: 98mL GM I+1mL 溶液 E+1mL 溶液 F,混匀备用;

GM III: GM II 9mL+1mL 甘油,混匀备用。

1.3.3 低盐环境形成饥饿感受态在其它菌株中的改良方法用培养基(简称 C 法)

该培养基按文献[15]配制,所不同的是里面用的氨基酸是按本实验用菌株缺陷型添加(色氨酸、亮氨酸、蛋氨酸)。

1.3.4 原生质体转化用培养基

该培养基按照文献[5]进行配制。

1.3.5 电击法诱导的原生质体转化

本方法是在原生质体制备的情况下,借助电击法进行转化^[8],因此本方法中原生质体制备用的培养基同 1.3.4,而电击转化用的培养基同 1.3.1 中的溶液 A、溶液 B 和溶液 C,复苏培养基和平板培养基则同 1.3.4 原生质体法中的培养基。

1.4 方法

试验结果采用菌落形成单位 CFU 表示。

1.4.1 感受态制备与转化方法

电转化法感受态制备步骤如下:

1) 接菌种于 2mL 溶液 A 中,37 $^{\circ}\text{C}$,200rpm 过夜培养,约 10h。

2) 将 2mL 过夜培养的菌液添加到 98mL 溶液 A 中,37 $^{\circ}\text{C}$,200rpm 培养 3~4h。

3) 将菌体冰水浴 10~15min,后 5000rpm,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10min 收集菌体。

4) 用 20mL 预冷的溶液 B 重悬,如此漂洗 3 次。

5) 将洗涤后的菌体重悬于 600 μL 溶液 C 中,混匀后按 60 μL 每管分装于预冷的 EP 管中。

电转化方法:将质粒加入感受态细胞中并冰上预冷 10min,后加入预冷的电转化杯中;电击后,迅速加入 SOC 培养基约 500 μL ,再转至 EP 管中,37 $^{\circ}\text{C}$,200rpm 复苏 2~3h 后涂布于相应抗性 LA 平板上。

S 法感受态制备步骤如下:

1) 接菌种于 2mL GM I 中,37 $^{\circ}\text{C}$,200rpm 过夜培养 10h。

2)将2mL过夜培养的菌液添加到98mL GM I 中,37℃,200rpm 培养4h。

3)取上述培养物接种于GM II 中,37℃,200rpm 培养90min。

4)将菌体冰水浴10~15min后5000rpm,4℃离心10min,收集菌体。

5)去上清,加入10mL GM III,混匀后按500 μ L每管分装于预冷的EP管中。

S法转化方法^[10,15]:从-70℃冰箱中取出感受态细胞,在37℃迅速解冻后加入一定量质粒,直接置于37℃,200rpm 摇床培养1h或者先37℃温浴30min,再摇床培养1~2h。摇床培养后会出现菌体大量上浮现象,可能是吸收氧气的原因,所以涂板时应吸取上清进行涂布。

C法感受态制备步骤及转化方法按照文献[15]进行。

原生质体法中的原生质体制备及转化方法按照文献[5]进行。

电击法诱导的原生质体转化法与电转化法类同^[2,5~7],原生质体制备参照文献[5]进行,转化方法同电转化方法,只是复苏培养基和平板培养基用原生质体法中的培养基。

1.4.2 实验设计

(1)Cm抗性最适添加浓度的确定:分别在Cm浓度为0.0 μ g/mL、2.0 μ g/mL、4.0 μ g/mL、6.0 μ g/mL、8.0 μ g/mL、10.0 μ g/mL条件下进行实验,37℃,200rpm 摇床培养24h后稀释涂板,以0.0 μ g/mL时单菌落生存率为100%。

(2)电转化实验条件的确定:质粒加入量为70ng,分别在电压为1.5kV、2.0kV、2.5kV、3.0kV条件下进行转化,其它条件按仪器默认,37℃,200rpm 摇床培养3h后取100 μ L涂板。在确定最适电压后,再分别加入42ng、70ng、98ng、140ng、210ng、280ng条件下进行质粒加入量确定实验,37℃,200rpm 摇床培养3h后取100 μ L涂板。

(3)S法实验条件的确定:对大量前人引用spizizen低盐环境制备感受态方法并改进后的实验进行总结,然后根据自己的需要,确定出添加的必须氨基酸(按菌株基因型缺失)加入量及最适盐成分(配方1.3.2)后,进行最适培养条件的确定实验:质粒加入量为70ng,分别在37℃摇床直接培养1h;先37℃温浴30min,再37℃摇床培养1h;先37℃温浴30min,再37℃摇床培养2h这三种情况下进行实验后各取100 μ L培养液涂板。在确定最适培养条件后对质粒加入量进行确定:分别在加入42ng、70ng、

98ng、140ng下进行实验。

(4)C法实验条件的确定:本实验参照文献[15]进行,只是调整了中间要加入的必须氨基酸种类。最后取200 μ L涂板。

(5)原生质体法转化实验条件的确定:本实验参照文献[5]进行。

(6)电击法诱导的原生质体法实验条件的确定:分别在20V、50V、0.1kV、0.25kV、0.5kV、1kV条件下进行转化,其它条件按仪器默认,37℃,200rpm 摇床培养3h后取100 μ L涂板。

2 结果与分析

2.1 Cm抗性最适添加浓度的确定

如图1所示,突变型枯草芽孢杆菌IA857在Cm浓度大于6.0 μ g/mL时存活率为0%,所以后期转化时加入Cm终浓度选为10.0 μ g/mL。

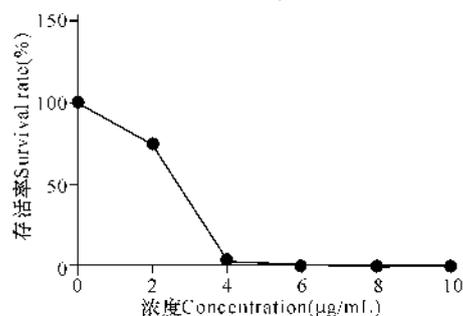


图1 Cm浓度确定实验

Fig. 1 Cm concentration determined experimentally

2.2 电转化实验条件的确定

如图2所示,在电压为1.5kV(P. LENGTH=100us,PULSES=04,INTERVAL=555ms)条件下转化率最高,且实验过程中,当电压高于2.5kV时特别容易形成电火花,有相关文献报道^[2]称,更换缓冲体系会减少电火花产生。在确定最适电压为1.5kV条件下进行质粒加入量实验,结果如图3所示,在质粒加入量为140ng时取得最优转化率,达到 1×10^4 CFU/ μ g DNA。

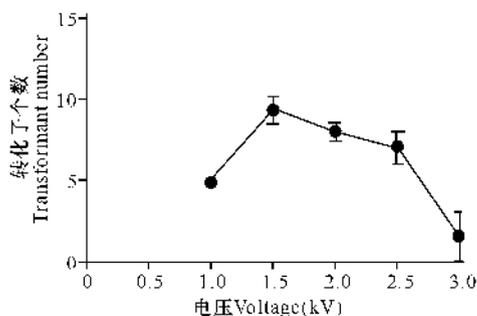


图2 电击法转化实验

Fig. 2 Electroporation experiments

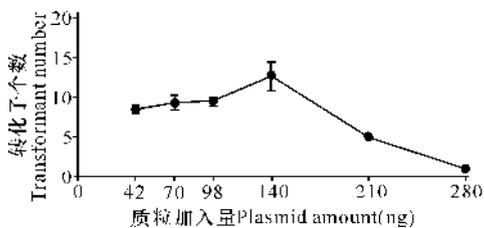


图3 电压 1.5kV 下质粒加入量实验

Fig. 3 Experiments of plasmid amount at 1.5kV voltage

2.3 S 法实验条件的确定

如图 4 所示,改进的实验配方具有很好的转化效果,且在转化后直接培养 1h 获得最好的转化效率。在确定最适转化培养条件下进行质粒加入量实验,结果如图 5 所示,在质粒加入量为 70ng 且转化后直接摇床培养 1h 转化率最优,达到 1.2×10^4 CFU/ μ g DNA;若先温浴 30min 再摇床培养 1~2h,转化率最高达到约 1×10^4 CFU/ μ g DNA。所以最后确定加入 70ng 质粒直接摇床培养 1h 为最终实验方法,且后期用质粒 pHCMC04 连接淀粉酶基因 BL-amy(大小约 10kb)直接进行转化实验,结果转化率不见降低。值得注意的是,本实验配方需分开灭菌后再混合,否则会有沉淀产生,导致实验失败。

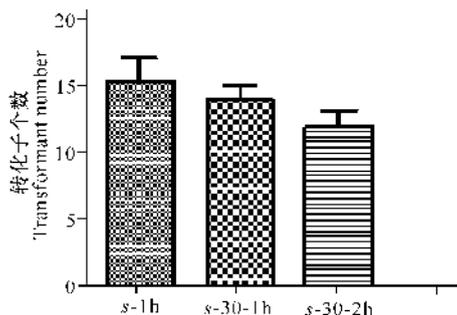


图4 转化方法

Fig. 4 Transformation methods

注: s-1h 代表 s 法直接 37℃ 摇床培养 1h; s-30-1h 代表 s 法先温浴 30min 再 37℃ 摇床培养 1h; s-30-2h 代表 s 法先温浴 30min 再 37℃ 摇床培养 2h;

Note: s-1h means direct shaker culture under 37℃ for 1h; s-30-1h means 30 minutes of warm bath and then shaker culture under 37℃ for 1h; s-30-2h means 30 minutes of warm bath and then shaker culture under 37℃ for 2h;

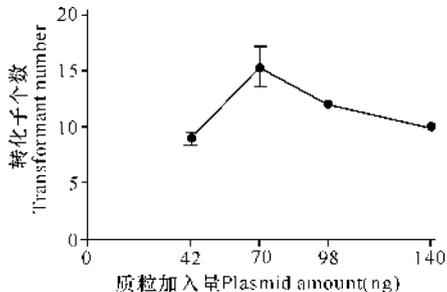


图5 s-1h 质粒加入量实验

Fig. 5 Plasmid amount experiments with the methods of

s-1h

2.4 C 法实验条件的确定

如图 6 所示,在质粒加入量为 98ng,先温浴 30min 转入摇床培养 30min,达到最优转化率为 0.7×10^4 CFU/ μ g DNA。但后期实验发现,此法的培养基所含必须离子有限,并非对所有菌株均适用。

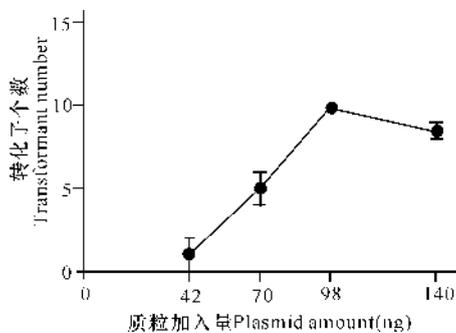


图6 C 法质粒加入量实验

Fig. 6 Plasmid amount experiments of C method

2.5 不同转化方法转化效率的比较

对 5 种转化方法进行总结比较,结果如图 7 所示,原生质体法和电击法诱导的原生质体法实验失败,电转化法、S 法和 C 法均能获得较好的转化效率,其中,S 法所需时间最短且转化率最高,达到 1.2×10^4 CFU/ μ g DNA,故作为后续实验的最终实验方法,S 法最优实验条件为:将感受态细胞置 37℃ 解冻,加入 70ng 质粒后直接置 37℃,200rpm 摇床培养 1h,取适量培养液涂布抗性平板。

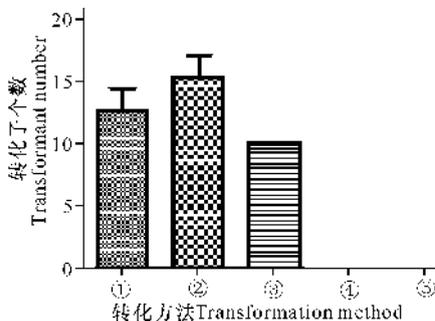


图7 不同转化方法转化效率的比较

Fig. 7 Comparison of different transformation methods

①电转化 1.5kV, ② s-1h, ③c 法, ④原生质体法, ⑤电击-原生质体法。

①Electroporation, 1.5kV, ② s-1h, ③c method, ④Protoplast method, ⑤Electroporation-protoplast method.

3 结论

本实验确立了一种更优的质粒转化枯草芽孢杆菌突变株 IA857 的方法,得出了转化突变型枯草芽孢杆菌方法的基本框架,这是前人没有给出的,且将 3 种成功转化方法在同一菌株中进行比较优化也属先例。但与质粒转化大肠杆菌的转化效率相比还是

大有不足。此外,在实验过程中有6点值得注意:1)在进行转化实验前先确定所选菌株的最适抗性浓度至关重要;2)S法实验中所用的溶液在配制时需分开灭菌后再混合,以保证不会产生沉淀,否则将导致实验失败;3)在保证最基本的离子及其浓度的条件下,所用的氨基酸只需要根据相应菌株基因型缺失的氨基酸改变即可,这一点已在本次质粒转化枯草芽孢杆菌突变株 IA786 的实验中得到验证;4)此方法培养过程中会出现菌体大量上浮呈吸氧状,所以涂板时吸取上面的浑浊液;5)电转化实验用培养基在不加甘油的情况下转化效率会有所提高,但不利于感受态细胞的保存;6)C法实验在后期实验中发现其培养基所含必须离子有限,并非对任何菌株都适用。下一步实验将利用枯草芽孢杆菌作为宿主进行外源蛋白的表达,但由于枯草芽孢杆菌是革兰氏阳性菌,细胞壁较厚,将给后续实验(如质粒快速提取)等造成一定的困难,有待进一步摸索。

参考文献:

[1] 赵璐璐,贺春萍,郑肖兰,等. 枯草芽孢杆菌 Czk1 菌株对橡胶树根病菌的抑制作用及对炭疽病生防效果研究初报[J]. 南方农业学报,2011,42(7):740-743.
Zhao L L, He C P, Zheng X L, et al. Effect of *Bacillus subtilis* strain Czk1 on different rubber root pathogens and in vitro control of *Colletotrichum gloeosporioides* on rubber leaf[J]. Journal of Southern Agriculture, 2011, 42(7):740-743.

[2] 周天鸿,李月琴,刘飞鹏,等. 枯草杆菌电击法转化[J]. 暨南大学学报:自然科学与医学版,1992,13(1):65-68.
Zhou T H, Li Y Q, Liu F P, et al. Transformation of *Bacillus subtilis* by electroporation [J]. Journal of Jinan University: Natural Science & Medicine Edition, 1992, 13(1):65-68.

[3] 肖华胜,程希平,张萍,等. 快速高效质粒转化方法的研制[J]. 第四军医大学学报,1998,19(4):474-475.
Xiao H S, Cheng X P, Zhang P, et al. Development of a rapid and efficient plasmid transformation method[J]. Journal of The Fourth Military Medical University, 1998, 19(4):474-475.

[4] 王园园,蔡仕英,姚志建. 几种制备感受态细胞及质粒转化方法的比较[J]. 军事医学科学院院刊,1991,15(2):152-155.
Wang Y Y, Cai S Y, Yao Z J. Comparison of several methods of competent cells preparation and plasmid transformation[J]. Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences, 1991, 15(2):152-155.

[5] Chang S, Cohen S N. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA[J]. Molecular and General Genetics MGG, 1979, 168(1):111-115.

[6] 郭兴华,贾士芳,陈乃用,等. 芽孢杆菌原生质体作为质

粒 DNA 转化的受体[J]. 微生物学报,1982,22(3):263-268.

Guo X H, Jia S F, Chen N Y, et al. *Subtilis* protoplasts as receptors for plasmid DNA transformation[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1982, 22(3):263-268.

[7] 门大鹏,陈永南,Spizizen J. 甘露醇再生培养基的改进[J]. 微生物学报,1986,26(4):366-368.
Men D P, Chen Y N, Spizizen J. Improvement of mannitol regeneration medium[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1986, 26(4):366-368.

[8] 燕克勤,朱宝成,赵会良,等. 电击法介导的紫孢侧耳原生质体转化[J]. 生物工程学报,1996,12(1):40-44.
Yan K Q, Zhu B C, Zhao H L, et al. Electroporation mediated transformation of protoplasts of *Pleurotus sapidus* [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 1996, 12(1):40-44.

[9] Spizizen J. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1958, 44(10):1072-1078.

[10] 余志强. 枯草芽孢杆菌麦芽糖启动子 P Δ glvA 整合表达载体的构建及启动子功能的初步探讨[D]. 武汉:华中农业大学,2004:19-25.
Yu Z Q. Construction of the integrative expression vector for the Glv operon promoter P Δ glvA of *Bacillus Subtilis* and a preliminary discussion on promoter function[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2004:19-25.

[11] 李瑞芳,薛雯雯,黄亮,等. 枯草芽孢杆菌感受态细胞的制备及质粒转化方法研究[J]. 生物技术通报,2011(5):227-230.
Li R F, Xue W W, Huang L, et al. Competent preparation and plasmid transformation of *Bacillus subtilis* [J]. Biotechnology Bulletin, 2011(5):227-230.

[12] 陆雁,王青艳,朱绮霞,等. 枯草芽孢杆菌高效转化及其转化子验证方法[J]. 广西科学院学报,2012,28(2):117-119.
Lu Y, Wang Q Y, Zhu Q X, et al. Methods for enhancing the transformation efficiency in *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2012, 28(2):117-119.

[13] Nguyen H D, Nguyen Q A, Ferreira R C, et al. Construction of plasmid - based expression vectors for *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability[J]. Plasmid, 2005, 54(3):241-248.

[14] Nguyen H D, Schumann W. Establishment of an experimental system allowing immobilization of proteins on the surface of *Bacillus subtilis* cells[J]. Journal of biotechnology, 2006, 122(4):473-482.

[15] Vojcic L, Despotovic D, Martinez R, et al. An efficient transformation method for *Bacillus subtilis* DB104[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 94(2):487-493.

(责任编辑:陆 雁)