

枯草芽孢杆菌高效转化及其转化子验证方法*

Method for Enhancing the Transformation Efficiency in *Bacillus subtilis*

陆雁¹, 王青艳², 朱绮霞², 秦艳², 申乃坤², 廖思明^{1,2}, 谢能中², 黄日波^{1,2**}
LU Yan¹, WANG Qing-yan², ZHU Qi-xia², QIN Yan², SHEN Nai-kun², LIAO Si-ming^{1,2}, XIE Neng-zhong², HUANG Ri-bo^{1,2}

(1. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004; 2. 广西科学院国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西南宁 530007)

(1. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 2. National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要:用构建好的重组质粒转化枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) WB600 感受态细胞, 进行不同时间预培养后, 涂布于抗生素平板培养, 研究一种更高效的转化方法。用载体与外源片段的连接产物转化 WB600 感受态细胞, 进行最佳预培养时间培养后, 涂布于抗生素平板培养, 培养得到的转化子用 PCR 快速验证和双酶切鉴定, 研究一种转化子的快速验证方法。

关键词: 枯草芽孢杆菌 转化方法 转化率 感受态细胞

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7378(2012)02-0117-03

Abstract: In order to study an effective method for transformation, *Bacillus subtilis* WB600 competent cells, transformed with pre-built recombinant plasmids, were precultured with different period of time and smeared to the plates containing antibiotics. In order to construct a fast and effective method for transformants verification, WB600 competent cells were transformed with vector and foreign DNA, preincubated with the optimal time, and smeared to the plates containing antibiotics. The transformants were verified with PCR and double restriction enzyme digestion.

Key words: *Bacillus subtilis*, transformation approach, transformation efficiency, competent cell

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 是一类好氧型、内生抗逆孢子的杆状细菌, 是革兰氏阳性细菌的典型代表, 具有无致病性、能直接将多种蛋白分泌到培养基中等优点, 是重要的 GRAS 有机体, 在医药、农业、科研等方面应用广泛^[1]。

目前, 枯草芽孢杆菌质粒转化方法主要有原生质体转化法、碱金属离子转化法和电转化法。原生

质体转化法条件温和, 不需要相应的转化设备。但是, 制备原生质体时, 对溶菌酶用量、破壁时间和破壁温度等条件均有严格要求, 试验步骤繁琐, 而且转化效率较低; 碱金属离子转化法能特异性地转化质粒 DNA, 但是转化效率也不高; 电转化法是当前转化效率较高的方法, 约为碱金属离子法的 100 倍, 但是该方法实际操作中的影响因素很多, 需要进行条件摸索, 新手不易在短期内掌握方法, 而且要求有配套的转化设备。因此, 建立一种高效、便捷的 DNA 转化及转化及验证方法, 对枯草芽孢杆菌表达系统的应用和提高其生产性能具有重要意义。

本研究对 Spizizen^[2] 创立的枯草芽孢杆菌营养缺陷型突变株染色体 DNA 转化方法进行改进研

收稿日期: 2012-04-25

修回日期: 2012-05-10

作者简介: 陆雁 (1983-), 女, 工程师, 主要从事微生物技术研究。

* 广西自然科学基金重点项目 (2010GXNSFD013030)、广西培养新世纪学术和技术带头人专项资金项目、广西科学研究与技术开发课题项目 (桂科攻 11107008-4) 资助。

** 通讯作者。

究,以期建立更简便高效的枯草芽孢杆菌质粒 DNA 转化方法,为分子量较大的质粒转化提供参考。首先用构建好的重组质粒 pHY-P43-ZQ 进行转化,确定出最佳预培养时间。然后将枯草芽孢杆菌载体 pWB980 与 LU 片段的连接产物直接转化枯草芽孢杆菌感受态细胞,用最佳预培养时间培养,获得的转化子用沸水浴结合反复冻融的方法处理,以处理液为模板进行 PCR 快速验证,对验证为阳性的转化子进行双酶切鉴定,提出一种更简便且行之有效的革兰氏阳性菌转化子的验证方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

宿主菌:枯草芽孢杆菌 WB600 和大肠杆菌 XL-10,枯草芽孢杆菌载体 pWB980 和大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭载体 pHY-P43 等均为本实验室保存。各种工具酶均为 Fermentas 公司产品,卡那霉素和四环素购自上海生工有限公司,PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒均为天根生物工程有限公司产品。其它试剂和药品均为国产或进口分析纯的生化试剂。

菌种培养及转化平板使用 LB 培养基,添加 1.5% 琼脂糖为 LB 固体培养基。必要时补加终浓度为 $10\mu\text{g/ml}$ 的四环素或者 $30\mu\text{g/ml}$ 的卡那霉素, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养。

枯草芽孢杆菌普通化学感受态细胞制备所用试剂是 $10\times$ 最低盐溶液: K_2HPO_4 70g, KH_2PO_4 30g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10g, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g,在蒸馏水中依次溶解,加水至 500 ml。根据不同菌株的基因缺陷型准备氨基酸溶液 10 mg/ml ,过滤除菌或 $113\text{ }^\circ\text{C}$ 灭菌 30 min 后贮存于棕色瓶内,用黑纸包裹。枯草芽孢杆菌 WB600 使用的氨基酸溶液为色氨酸溶液。GM I 溶液: $1\times$ 最低盐溶液 95.6 ml, 20% 葡萄糖 2.5 ml, 5% 水解酪蛋白 0.4 ml, 10% 酵母汁 1 ml, 10 mg/ml 氨基酸溶液 0.5 ml ($50\mu\text{g/ml}$)。GM II 溶液: $1\times$ 最低盐溶液 96.98 ml, 20% 葡萄糖 2.5 ml, 5% 水解酪蛋白 0.08 ml, 10% 酵母汁 0.04 ml, 1M MgCl_2 0.25 ml (2.5 mM), 1M CaCl_2 0.05 ml (0.5 mM), 10 mg/ml 氨基酸溶液 0.1 ml ($5\mu\text{g/ml}$)。

1.2 方 法

DNA 的酶切、连接及质粒提取等均参考文献 [3]。枯草杆菌感受态细胞的制备:将菌种接种在 LB 平板上, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养过夜。用接种环挑取单菌落

转接于 5ml GM I 溶液,在 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、125 r/min 的摇床培养过夜。次日取 2 ml 转接到 18 ml GM I 中,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、250 r/min 的摇床培养 3.5 h。再取 10 ml 上一步骤的培养液转接到 90 ml GM II 中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、125 r/min 培养 90 min 后, 5000r/min 离心 10 min, 收集菌体。用 10 ml 原培养液上清液轻轻悬浮菌体,悬浮后的菌体即为感受态细胞,可以直接用于转化;也可以加 30% 的灭菌甘油至终浓度为 10%, 混匀后分装到离心管中 (0.5 ml/tube), 放到 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。

重组质粒转化枯草芽孢杆菌感受态细胞:大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭载体 pHY-P43 是 5.1kb, 外源片段 3.3kb, 它们构建成的重组质粒 pHY-P43-ZQ 8.4kb。取出冷冻保存的感受态细胞, $45\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴溶化,将重组质粒 pHY-P43-ZQ $2\mu\text{l}$ 加入感受态细胞中,置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、200 r/min 摇床,分别培养 15min、30min、45min、60min、75min、90min、105min、120min 后,取 $100\mu\text{l}$ 培养液涂布于四环素抗性平板,于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱倒置培养过夜。

连接产物直接转化枯草芽孢杆菌感受态细胞:将分子量较小的枯草芽孢杆菌载体 pWB980 与外源片段 LU 分别酶切后进行连接。取出冷冻保存的枯草芽孢杆菌 WB600 感受态细胞, $45\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴溶化,加入 $20\mu\text{l}$ 连接产物,于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、200r/min 摇床培养 90 min 后涂布于卡那霉素抗性平板,于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱倒置培养过夜。

枯草芽孢杆菌转化子的快速验证:从平板上挑取少量转化子菌体稀释于 $30\mu\text{l}$ 无菌水中,沸水浴 5min,再置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻 5min 后,室温溶解, 12000r/min 离心 2min,取 $1\mu\text{l}$ 上清液作为模板,按调取外源片段的方法进行 PCR 验证,其中,空白对照用无菌水代替模板。枯草芽孢杆菌转化子的双酶切鉴定:挑取经 PCR 快速验证为阳性的转化子转接于含有卡那霉素的液体 LB 培养基, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、200 r/min 摇床培养过夜,提取质粒,用 *Bam*HI 和 *sph*I 进行双酶切鉴定。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的高效转化

由图 1 可知,预培养时间对枯草芽孢杆菌的化学转化效率有显著影响,时间过长或过短都会直接导致转化率下降,预培养 60~90min 转化率较稳定,最佳预培养时间 90min。重组质粒 PHY-P43-ZQ 的转化效率可以达到 $2.58\times 10^4\text{ CFU}/\mu\text{g DNA}$ 。

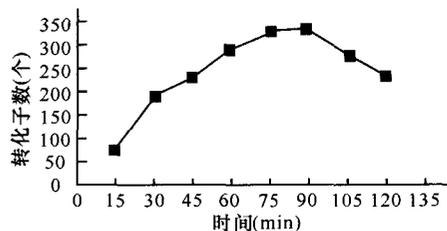


图1 预培养时间对转化率的影响

2.2 连接产物的直接转化及转化子验证

将连接产物直接转化枯草芽孢杆菌感受态细胞, 过夜培养后得到(53±10)个转化子。任意挑取23个转化子进行PCR验证, 结果有19个阳性转化子, 效率达到82.6%(图2)。任意挑取3个经PCR快速验证为阳性的转化子扩大培养后, 提质粒并进行双酶切验证, 结果均得到大小约为3.8kb和2.1kb的明显亮带(图3), 表明重组质粒pWB980-LU于枯草芽孢杆菌WB600中构建成功, 同时也证明PCR验证转化子的方法是有效的。

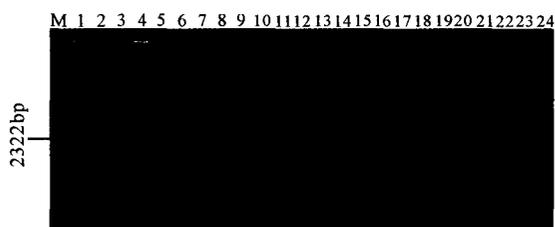


图2 转化子的PCR验证

M: λ DNA/*Hind* III Marker; 1: CK; 2~24: 以处理过的转化子为模板进行PCR。

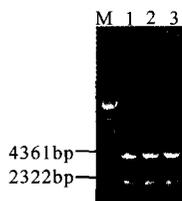


图3 转化子的双酶切鉴定

M: λ DNA/*Hind* III Marker; 1~3: 转化子质粒/*Bam* HI, *sph* I。

3 讨论

化学转化法中枯草芽孢杆菌感受态的形成原理可能是饥饿诱导机制, 枯草芽孢杆菌首先在丰富的营养培养基中生长, 当正处于增殖分裂旺盛期时突然转入营养贫瘠的培养基中, 由此导致的营养饥饿诱导细胞内发生一系列生理变化, 使细胞壁和细胞膜形成缺陷, 从而增加细胞的通透性, 利于外源DNA的进入, 而且培养基中的Ca²⁺和Mg²⁺均利于

感受态细胞的形成。

本研究在90min的预培养时间条件下, 使用8.4kb的大质粒进行转化, 转化效率达到 2.58×10^4 CFU/ μ g DNA。李瑞芳等^[4]也曾进行过类似研究, 用7.5kb的质粒pSBPTQ转化枯草芽孢杆菌非营养缺陷型突变株WB800, 37℃水中静置30~60min, 然后37℃、200r/min振荡培养2~4h, 涂布于抗性平板后37℃倒置培养过夜, 最后得到转化率仅为1070CFU/ μ g DNA。而质粒大小与转化效率成反比。可见, 本研究的方法不仅操作简单, 耗时更短, 转化率也更高, 是李瑞芳等所改进方法得到转化率的24倍, 在不需要复杂设备的条件下也可以达到与电转化法相当的转化效率, 而且易于掌握, 即使直接用连接产物进行转化也可以得到较多的转化子, 是一种高效简便的枯草芽孢杆菌转化方法。

传统的革兰氏阳性菌转化子的验证方法是先将筛选平板上的转化子转接到液体培养基中培养12~16h后, 再逐一提质粒进行PCR和双酶切验证, 工作量大, 耗时长。本实验采用沸水浴结合反复冻融的方法处理枯草芽孢杆菌的转化子, 将所得的处理液作为模板进行PCR, 即可以达到验证阳性转化子的目的, 这种方法也适用于革兰氏阳性菌巨大芽孢杆菌的转化子验证。由此可见, 沸水浴结合反复冻融的方法可以有效的破坏革兰氏阳性菌的细胞壁, 使质粒DNA释放出来, 便于进行转化子PCR验证, 从而简化了实验步骤, 节省了时间和成本。

参考文献:

- [1] 李明, 双宝, 李海涛, 等. 枯草芽孢杆菌的研究与应用[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(9): 111-114.
- [2] Spizizen J. Transformation of biochemically deficient strain of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1958, 44(10): 1072-1078.
- [3] Joseph S, David W R. Molecular cloning[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [4] 李瑞芳, 薛雯雯, 黄亮熊, 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.

(责任编辑: 陈小玲)