

电脉冲穿孔法将苏云金杆菌 δ -内毒素 基因导入野生型芽孢杆菌

孙良武 梁平彦 田颖川 莽克强

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

巴峰 计平生 梅汝鸿

(北京农业大学, 北京 100094)

摘要 利用电脉冲穿孔法将带有苏云金杆菌毒蛋白基因的穿梭质粒导入几株野生型芽孢杆菌中, 它们是野生型的蜡状芽孢杆菌、短芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌。通过观察在新霉素和氨基青霉素平板上长出的抗性菌落数, 计算出转化效率为 10^1-10^4 转化子/ μgDNA 。从转化子中分离到的质粒 DNA 大小及其用 Hind III 酶切的片段与原始质粒 DNA 相同, 毒性测试表明重组转化子对烟青虫六天的致死率达 90—100%。

关键词 电穿孔转化, 蜡状芽孢杆菌, 短芽孢杆菌, 苏云金杆菌毒蛋白基因

随着分子生物学的飞速发展, 已经建立起多种基因转移方法。但对有些细菌, 其中包括一些在农业、工业和医学上有重要用途的生产菌种, 如蜡状芽孢杆菌, 短芽孢杆菌, 枯草芽孢杆菌等野生型菌株, 由于难于形成原生质体或难于制备感受态细胞, 用常规方法不能有效转化。本文报道在改进条件下对上述 3 个菌株的成功转化。虽然国外已有用电穿孔法转化革兰氏阳性菌成功的例子^[1-8], 但国内还未见报道。

1 材料与方 法

1.1 菌株和来源

实验用的菌株见表 1。

表 1 菌株和来源

Table 1 Strains and sources

Strains	Main genotype	Source
<i>Bacillus cereus</i> 83-10	Wide type	Beijing Agricultural University
<i>B. Cereus</i> a-47	Wied type	Beijing Agricultural University
<i>B. brevis</i> A-5	Wide type	Beijing Agricultural University
<i>B. subtilis</i> 90-8	Wide type	Beijing Agricultural University
<i>B. subtilis</i> BR151	trp ⁻ , met ⁻ , lys ⁻	P. Guo Xinhua's gift
<i>B. subtilis</i> IA511	lys-3, thy-A, thy-B, thy-C	P. Guo Xinhua's gift
<i>E. coli</i> DH5 α	supE44 Δ lacU169 hsdR17recA1 endA1 gyrA96	Lab stock

1.2 酶和试剂

Hepes 和限制酶 Hind III 为 Boehringer Mannheim Ltd. 产品; 电击洗脱液: 1mmol/L Hepes (pH7.0); 电击缓冲液 HG: 1mmol/L Hepes, 10%甘油, (pH7.0)

本文于 1992 年 6 月 17 日收到。

1.3 抗生素

氨苄青霉素工作浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 新霉素为 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 贮存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.4 培养基及生长条件

需要生孢培养基^[9], LB 液体和固体培养基^[10]。将菌培养至对数生长中期 (30 $^{\circ}\text{C}$) 收集后做转化。

1.5 仪器

Bio-Rad Gene PulserTM。清华大学制 Gene Pulser。

1.6 质粒及其分离纯化

1.6.1 pBE-2 由本所郭兴华先生提供, 它是一种大肠—枯草穿梭载体^[11]。

1.6.2 pAMY 为带苏云金杆菌毒蛋白基因的 pBE-2 质粒, 自行组建 (待发表)。

1.6.3 质粒的分离纯化用碱法^[10]。

1.7 电穿孔细胞的制备及转化

以单个细菌菌落接种到 10ml LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 强烈振荡下培养过夜, 翌晨, 取 5ml 接种到 50ml LB 培养基中振荡到对数中期, 冰浴 20 分钟, 离心收集菌体。用预冷的 1 mmol/L Hepes (pH7.0) 洗一次, 再用电击缓冲液 HG 洗 2 次, 然后悬浮在 1ml HG 中, 每管分装 200 μl , -70 $^{\circ}\text{C}$ 贮存。取一管放在冰上, 融化后加 0.5 μg pBE-2 或 pAMY 质粒 DNA, 放置 1 分钟后转移到 0.2cm 电转化水池中, 在 1-27 μF , 0.7-2.5 kV, 100-1000 Ω 条件下电击 1 次, 加 1 ml LB 培养基培养 1 小时后涂在相应的抗性平板上。

1.8 抗虫生物活性测定

分别取 0.2ml 或 0.8ml 菌液 (10⁸ CFU/ml) 混合在饲料中, 总体积为 25ml, 喂饲初孵的烟青虫 (*Heliothis assulta*), 每个样品喂 20 条虫, 6 天后观察致死虫数。

2 结果和讨论

2.1 利用芽孢杆菌感受态细胞进行转化

根据 Duibnau 等的方法^[12] 制备枯草杆菌 IA511, BR151 的感受态细胞, 用同样方法处理增产菌中的野生型枯草芽孢杆菌 90-8, 蜡状芽孢杆菌 a-47, 83-10, 以及短芽孢杆菌 A-5。用质粒 pBE-2 和 pAMY 分别转化, 结果见表 2, 它表明只有枯草杆菌 IA511 和 BR151 可以转化, 几种野生型的枯草芽孢杆菌 90-8, 蜡状芽孢杆菌 a-47, 83-10 和短芽孢杆菌 A-5 都不能转化。

表 2 利用感受态细胞进行转化

Table 2 Transformation of competent cells with plasmids pBE-2 and pAMY

Strains	Plasmid	Transformation efficiency ($\times 10^8$)
<i>B. subtilis</i> IA511	pBE-2	2.4
<i>B. subtilis</i> BR151	pBE-2	2.1
<i>B. subtilis</i> IA511	pAMY	1.5
<i>B. subtilis</i> BR151	pAMY	1.2

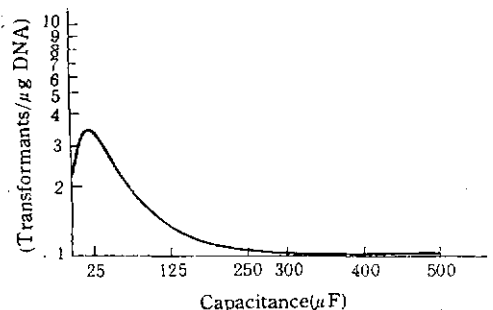


图 1 电容对电穿孔转化效率的影响

Fig. 1 Effect of capacitance on transformation efficiencies

2.2 电容对电穿孔转化的影响

当其他条件相同时，只改变电容，从 0.25—500 μ F. 由图 1 可知，在 25 μ F 时对枯草杆菌 IA511 转化效率最高，而在 500 μ F 几乎得不到转化子。

2.3 电阻对电穿孔转化效率的影响

由图 2 可知，在实验范围内，电阻对电穿孔转化效率的影响不大，虽然在 400 Ω 时转化效率最高，但在 100-1000 Ω 都能得到较好的转化效率。

2.4 电压对电穿孔转化效率的影响

电压的高低对电穿孔转化效率有着重要影响，电压过低不足以使细胞极化产生微孔通道，DNA 不能进入细胞；如果电压太高，就会使大部分细胞破裂死亡，大大影响转化效率。受体细胞本身性质与所需的电压大小很有关系。从图 3 可知，大肠杆菌 DH52 α 在 5kV/cm 有最高的转化效率，较枯草杆菌 *B. subtilis* IA511 的最适转化电压 10 kV/cm 要低一些。可能是因为大肠杆菌属于革兰氏阴性菌，而枯草杆菌属于革兰氏阳性菌，两者细胞壁结构不同所致。大肠杆菌在一个较大的电压范围内都能较好地转化，而枯草杆菌 *B. subtilis* IA511 只能在一个小的电压范围可以被转化。

2.5 电击缓冲液的离子强度对电穿孔转化效率的影响

为了研究离子强度与电穿孔转化效率的关系，分别用 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 倍的 HG 电击缓冲液做电穿孔转化，由图 4 可知 1.0 倍的 HG 电击缓冲液效果最好。

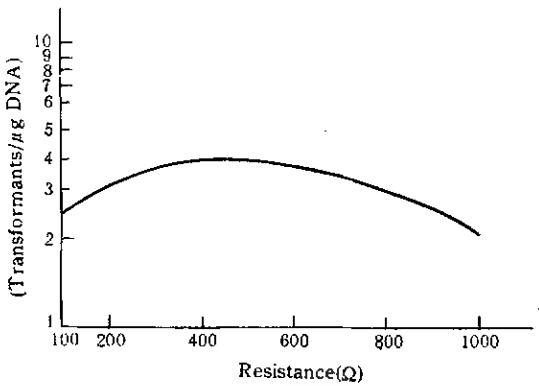


图 2 电阻对电穿孔转化效率的影响

Fig. 2 Effect of resistance on transformation efficiencies

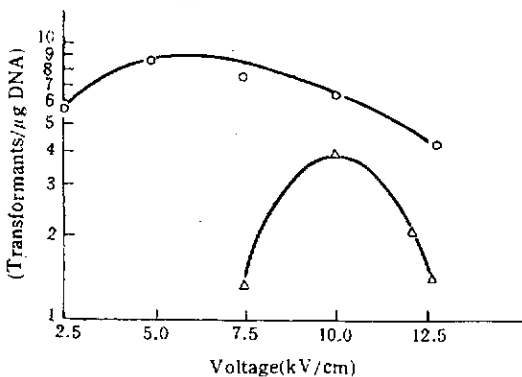


图 3 电压对电穿孔转化效率的影响

Fig. 3 Effect of voltage on transformation efficiencies

Δ *B. subtilis* IA511, \circ *E. coli* DH5 α

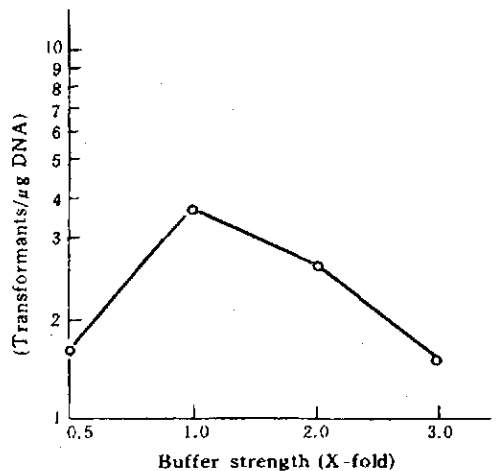


图 4 电击缓冲液的离子强度对电穿孔转化效率的影响

Fig. 4 Effect of buffer strength on transformation efficiencies

2.6 质粒 DNA 的量对电穿孔转化效率的影响

电穿孔转化是因为细胞被电击后细胞膜形成通道,使细胞外的 DNA 进入细胞内。进入细胞的 DNA 量及转化效率与细胞外的 DNA 的量是有一定关系的。了解这个关系可以使我们用最少量的 DNA 获得最高的转化效率。在 200 μ l 制备的枯草杆菌 IA511 细胞中分别加入 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 μ g 的 DNA 进行转化, 结果见表 3, 它说明质粒 DNA 的量与转化效率不成正比, 在 0.5 μ g 时转化效率最高。

表 3 质粒 DNA 的量与转化效率的关系

Table 3 The relation between DNA concentration and transformation efficiencies

Plasmid DNA (μ g)	Number of transformants	Transformation efficiency ($\times 10^3$)
0.1	2.7×10^2	2.7
0.2	7.2×10^2	3.6
0.5	2.1×10^3	4.2
1.0	3.1×10^3	3.1
2.0	4.8×10^3	2.4
5.0	7.5×10^3	1.5
10.0	1.1×10^4	1.1

2.7 质粒大小对电穿孔转化效率的影响

用质粒 pBE-2 (5.8kb) 和 pAMY (约 10kb) 转化枯草杆菌 IA511, 各质粒在相同条件下转化效率相近, 见图 5。由此可见, 质粒大小对电穿孔转化效率影响不大。

2.8 清华大学制的 Gene pulser 与 Bio-Rad Gene PulserTM 转化效果的比较

清华大学制的 Gene pulser 与 Bio-Rad Gene PulserTM 相近似的条件下, 用 pBE-2 转化枯草杆菌 BR151, 也能得到转化子, 但最高转化效率比 Bio-Red PulserTM 略低, 见表 4。

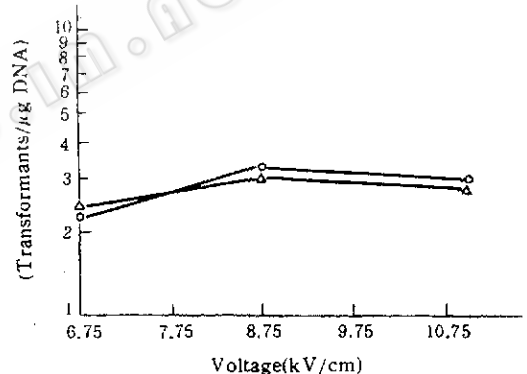


图 5 质粒大小对电穿孔转化效率的影响

Fig. 5 Effect of plasmid size on transformation efficiencies

△ Plasmid pBE-2 (5.8kb), ○ Plasmid pAMY (10kb)

表 4 清华大学制的 Gene PulserTM 与 Bio-Rad Gene PulserTM 转化效率的比较

Table 4 Comparison of transformation efficiencies of Gene PulserTM by Tsinghua University and Bio-Rad company

Gene Pulser	Capacitance (μ F)	Resister (Ω)	Voltage (kV/cm)	Transformation efficiencies (Transformants/ μ gDNA)
Tsinghua	27	470	8.75	6.0×10^2
Tsinghua	27	470	11.0	3.4×10^2
Bio-Rad	25	400	7.5	2.0×10^2
Bio-Rad	25	400	10.0	4.8×10^2
Bio-Rad	25	400	12.0	1.2×10^2

2.9 野生型菌株的电穿孔转化

在生产中被广泛应用的增产菌均为野生型菌株, 如 *B. cereus* a-47、*B. cereus* 83-10、*B. brevis* A-5 以及 *B. subtilis* 90-8, 它们用常规方法难以转化, 也很难制备原生质体。利用电穿孔法则成功地将质粒 pAMY 和 pBE-2 转入到这些野生型菌株^[1] (见表 5)。

表 5 电穿孔法转化野生型菌株

Table 5 Electroporation of wide type bacteria

Strains	Voltage (kV/cm)	Transformation efficiency (Transformants/ μ g DNA)
<i>Bacillus cereus</i> a-47	8.75	1.3×10^4
<i>B. cereus</i> 83-10	8.75	1.3×10^4
<i>B. brevis</i> A-5	8.75	1.2×10^4
<i>B. subtilis</i> 90-8	8.75	8.2×10^2
<i>B. subtilis</i> 90-8	11.0	4.5×10^2

2.10 转化子的质粒检测

从 *B. Subtilis* IA511 以及野生型的 *B. cereus* a-47, *B. cereus* 83-10 和 *B. brevis* A-5 的电穿孔转化子中分别提取质粒, 取一部分用 Hind III 处理, 以提供做电穿孔转化的质粒 pAMY 做对照, 电泳结果表明转化子中的质粒与 pAMY 大小及 Hind III 酶切片段一致 (见图 6), 说明电穿孔转化不影响质粒结构。

2.11 抗虫生物活性测试

B. cereus a-47 是没有转化的菌株, *E. coli* TH48 是带苏云金杆菌蛋白基因的大肠杆菌, *B. cereus* a-47 转化子 (1)、(2) 以及 *B. cereus* 83-10 转化子是用 pAMY 做电穿孔转化得到的转化子。从表 6 可知转化子对烟青虫都有毒杀作用, 6 天后的致死率达 90—100%。

表 6 不同转化子对烟青虫的毒杀作用

Table 6 Toxicity of different transformants to tobacco hornworm

Strains	Concentration (bacteria/ml)	Mortality after six days (%)
Distilled water	0.0	5.0
<i>Bacillus cereus</i> a-47	0.0	5.0
<i>B. cereus</i> a-47 transformant (1)	8×10^5	90.0
<i>B. cereus</i> a-47 transformant (2)	8×10^5	95.0
<i>B. cereus</i> 83-10 transformant (2)	8×10^5	40.0
<i>E. coli</i> TH 48	8×10^5	60.0
<i>B. cereus</i> a-47	3.2×10^6	10.0
<i>B. cereus</i> a-47 transformant (1)	3.2×10^6	95.0
<i>B. cereus</i> a-47 transformant (2)	3.2×10^6	100.0
<i>B. cereus</i> 83-10 transformant	3.2×10^6	90.0
<i>E. coli</i> TH 48	3.2×10^6	80.0

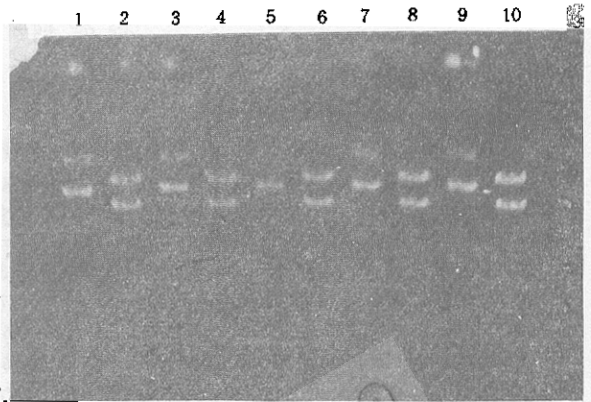


图 6 转化子质粒 DNA 及其 Hind III 处理后的电泳图谱

Fig. 6 Plasmid patterns of transformants and their Hind III restriction fragments

1. Plasmids pAMY, 2. pAMY was digested with Hind III, 3, 5, 7, 9. Plasmids from transformants of *B. cereus* 83-10, *B. cereus* a-47, *B. brevis* A-5, and *B. subtilis* IA511, 4, 6, 8, 10. Plasmids from transformants of *B. cereus* 83-10, *B. cereus* a-47, *B. brevis* A-5 and *B. subtilis* IA 511. were digested with Hind III

2.12 电穿孔转化子菌落形态的变化

几个野生型的菌株经电穿孔转化后,有的菌株形态与未经电击的原菌株形态相比有些变化,形成的菌落较小。经电穿孔后这些菌株的生理生化特性及转化后质粒在这些菌株中的稳定性还有待研究。

参 考 文 献

- [1] Luchansky J B *et al.* Microbiol, 1988, 2: 637—646.
- [2] Chassy B M *et al.* TIBTECH, 1988, 6: 303—309.
- [3] Belliveau B H *et al.* Appt Environ Microbiol, 1989, 55: 1649—1652.
- [4] Schurter W *et al.* Mol Gen Genet, 1989, 218: 177—181.
- [5] Takaqi H *et al.* Agric Biol Chem, 1989, 53: 3099—3100.
- [6] Bone J E *et al.* FEMS Microbiol, 1988, 58: 171—178.
- [7] Vehmaan P J. FEMS Microbiol, 1989, 62: 165—169.
- [8] Lisa D and William F FEMS Microbiol Lett, 1990, 66: 135—128
- [9] 战立克, 刘聿太. 微生物学报, 1977, 17: 343—347.
- [10] Maniatis T *et al.* Molecular Cloning New York, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, CSH. 1982.
- [11] 郭兴华等. 生物工程学报, 1991, 7 (3), 224—229.
- [12] Duibnau D and Davidoff-Abelson. J Mol Biol, 1971, 56: 209—221.

Transfer of Shuttle Vector Containing *Bacillus thuringiensis* Toxingene into Wild Type *B. cereus*, *B. brevis* and *B. subtilis* by Electroporation

Sun Liangwu Liang Pingyan Tian Yingchuan Mang Keqiang

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Ba Feng Ji Pingsheng Mei Ruhong

(*Institute of Plant Ecological Engineering, Beijing Agricultural University, Beijing 100094*)

Abstract Electroporation is one of the most effective methods for transferring DNA into cells. The technique is fast, simple and appears to be applicable to a wide range of bacterial species previously thought untransformable. We have successfully introduced shuttle vector containing *B. thuringiensis* Toxin gene into wild type *B. cereus*, *B. brevis* and *B. subtilis* by electroporation. The transformation efficiency was determined by counting the number of neomycin and ampicillin resistant colonies. The efficiencies for these bacteria were around 10^1 — 10^4 transformants per μg DNA. The structure of the transferred plasmid was unaffected by electroporation based on the size and restriction digestion pattern of the plasmid isolated from the transformants. Toxicity assays showed that the transformants gave a mortality of 90—100% against caterpillar of *Heliothis assulta*, indicating that the gene function was not changed by electroporation.

Key words Electroporation, wild type species of *B. cereus*, *B. brevis*, *B. thuringiensis* toxingene