生物工程学报 11(3):245～249,1995
Chinese Journal of Biotechnology

棒状类细菌电击转化中多种条件对转化效率的影响

沈天翔　那淑敏　肖文中　贾盘兴
(中国科学院微生物研究所 北京　100080)

摘　要　以质粒 PXZ10145 电击转化不同棒状类细菌菌株，研究了影响电击转化效率的诸个因素，在含 4%甘氨酸的培养基中生长至对数前期的菌体最适用于电击转化，当以同源 DNA 进行电击转化时，1μgDNA 中转化效率最高可达到 8×10^6 转化子，但用异源 DNA 时，转化效率要比前者低 10^2～10^3 倍。

关键词　棒状类细菌，高压电击转化，转化效率

针对非致病性棒状类细菌(Non-pathogenic coryneform bacteria)建立有效的 DNA 转化方法一直是研究人员们关注并着力加以研究的内容，原生质体转化是最初被选用的方法，它包括溶菌酶处理形成原生质体，PEG 介导的 DNA 转化[1～3]。由于棒状类细菌胞壁中存在着如霉菌酸(Mycoli acid)等物质，对溶菌酶的作用有一定抗性，因此，在制备棒状类细菌原生质体时，需要在菌体培养过程中添加青霉素 G 或甘氨酸之类的胞壁形成抑制剂。采用这一措施后，棒状类细菌 1μgDNA 转化效率一般在 10^2～10^5 转化子，有些报道里 1μgDNA 中转化子可高达 10^6。但由于该方法存在原生质体制备繁琐，转化后细胞再生时间长(一般 4～7 d)等问题，所以，采用新的转化方法对深入开展棒状类细菌分子生物学研究很有必要。

高压电击转化(High voltage electroporation)是通过对受体细胞施以一个瞬间高压电脉冲，从而造成细胞膜形成暂时通透使 DNA 分子进入，原核细胞电击转化的最初实验工作是以大肠杆菌作受体的[4]，转化效率可达到 10^8～10^{10}/μg。该方法被应用于棒状类细菌是在 1989 年以后，由于在操作中无需制备原生质体，转化子生长迅速，1μgDNA 转化效率可高达 10^6～10^7，且重复性良好[5～7]，所以在近年的研究中被广泛采用。

1　材料和方法

1.1　菌种和质粒 DNA

钝齿棒杆菌(*Corynebacterium crenatum*)B9，T6-13；黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*)075；谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)10147，这株菌是由谷氨酸棒杆菌 1014～6T 经消除质粒后得到的。

质粒 pXZ10145 是谷氨酸棒杆菌 1014-6T 中含有的 4.9kb 小质粒[8,9]，带氯霉素抗性基因，pSWY902 是由大肠杆菌质粒 pACYC177 和 pXZ10145 的 EcoRI-BamHI 大片段连接而成的重组质粒，其上的卡那霉素抗性基因可用作棒状类细菌中的筛选标记。

本工作属国家自然科学基金及科学院重点项目。
本文于 1993 年 12 月 12 日收到。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

1.2 培养基和缓冲液

LB培养基用于棒杆菌培养，含1%琼脂的固体LB培养基用于转化子的筛选和细胞计数，抗菌素浓度除文章中专门列出外一般为：氯霉素20μg/ml，卡那霉素20μg/ml。PSB缓冲液：272mmol/L 蔗糖，1mmol/L $MgCl_2$，7mmol/L KH_2PO_4/K_2HPO_4(pH7.4)。SOC缓冲液：2%蛋白胨，0.5%酵母粉，10mmol/L NaCl，2.5mmol/L KCl，$MgCl_2$，10mmol/L $MgSO_4$，20mmol/L 葡萄糖。

1.3 实验方法

1.3.1 质粒提取：棒杆菌质粒采用改进的碱法提取[9]，并用CsCl梯度离心加以纯化；大肠杆菌质粒以碱法提取，RNase酶解后以PEG沉淀方法去除RNA[10]，提取的质粒用紫外吸收法定量。

1.3.2 电击转化：在后面内容中如无特别指出，转化受体菌为谷氨酸棒杆菌10147，质粒DNA是由1014-6T中提取的pXZ10145。

挑取单菌落接入2ml LB液体培养基中，30℃振荡培养过夜，次日按1%～2%接入50ml LB培养基中。当细胞生长到OD_{600}为0.15～0.25时，离心收集菌体。离心下来的菌体以50ml 1mmol/L Hepes缓冲液洗一次，再用25ml PSB缓冲液洗一次，最后离心下来的菌体用0.2～0.5ml的PSB缓冲液悬浮在40μl浓缩细胞悬液中加入适量的DNA(一般DNA溶液体积不要超过5μl)，在小离心管中混合并在冰浴中放置10～20 min后转至预冷的0.2cm电击小杯中，高压脉冲电击转化仪是Bio-Rad公司产品(Gene Pulser)。电击转化条件如下：2.5kV，25μF，200Ω，放电时间为3.9～4.5ms。电击后立即加1ml SOC缓冲液于小杯中，混合均匀后吸入小离心管中，30℃下静置保温一段时间，取100μl涂布在含氯霉素的LB平板上，30℃培养24～36 h，计数转化子数并计算转化效率。

2 结果和讨论

根据国外报道的内容为最初的转化实验设计了如下条件：LB培养基培养谷氨酸棒杆菌10147至对数前期(OD_{600}值约为0.2)；转化实验所用的DNA是由谷氨酸棒杆菌1014-6T中提取的pXZ10145。浓缩的细胞悬液与适量DNA混合后加入0.2cm的电击杯中；在12.5kV/cm，25μF条件下电击，并在含20μg/ml氯霉素的LB平板上筛选转化子。以这个方法得到的转化子极为有限，转化效率大约只有10^2～10^3/μg。这表明某些实验条件需要改进，以进一步提高转化效率。为此在液体LB培养基中加入2%的甘氨酸，并在不同氯霉素浓度的LB平板上涂布筛选转化子。结果发现，菌体培养时加甘氨酸使转化效率提高，达到10^4～10^5/μg。而且筛选用平板中氯霉素浓度降至10μg/ml也使转化子数量增加。在此基础上，系统地研究了棒杆菌电击转化中多种条件对转化效率的影响。

2.1 培养基中甘氨酸浓度对转化效率的影响

谷氨酸棒杆菌10147分别生长在含2%～10%甘氨酸的LB培养基中。在培养至相同细胞量的前提下，转化效率随甘氨酸浓度的增加而提高，但甘氨酸浓度超过6%以后，转化效率下降(图1)，甘氨酸据认为可取代D-丙氨酸掺入革兰氏阳性细菌胞壁中，形成较少交联的松散壁结构，这样就有利于电击转化时DNA能够容易地进入细胞内，Haynes等人的工作也发现了相似的实验结果，同时他们认为，除甘氨酸外，加入适量(4mg/ml)的异

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

烟肼——可使转化效率进一步提高[6]。

考虑到高浓度甘氨酸的存在造成细菌生长缓慢这一不利因素，在实验中一般选用4%的甘氨酸，大约只需 2～3 h 细菌生长便可达到对数前期(OD_{600}为 0.2 左右)

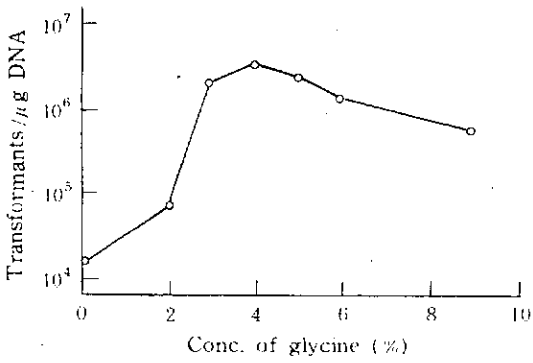

图 1　细胞在不同甘氨酸浓度下培养时对转化效率的影响

Fig. 1　Effect of glycine in the growth on transformation efficiency

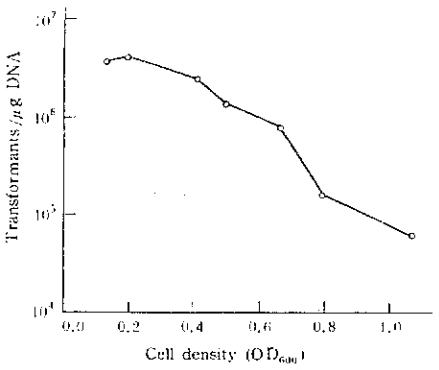

图 2　不同生长时期的细胞对转化效率的影响

Fig. 2　Effect of growth phase on transformation efficiency

2.2　细菌生长至不同时期对转化效率的影响

在含 4%甘氨酸的 LB 培养基中培养菌体至不同生长时期(OD_{600}在 0.1～1.1 之间)，离心收集菌体，经相同的洗涤浓缩程序后用于电击转化。如图 2 所示，生长至对数早期(OD 0.2)的细胞转化效率较高，可达 2×10^6。随 OD 值增加转化效率下降，特别当细胞培养至对数中期以后，转化效率下降得十分明显。OD_{600}达到 1.0 时，转化效率只有 OD 值 0.2 时的 1/100。Bset 和 Britz 发现，谷氨酸棒杆菌 AS019 在不同生长时期胞壁中霉菌酸成分发生改变，这可以作为对上述实验现象的一种可能的解释[11]。

2.3　细胞浓度和 DNA 使用量对转化效率的影响

谷氨酸棒杆菌 10147 培养至 OD 值 0.2 左右，经洗涤浓缩成不同浓度的细胞悬液，分别取相同体积(40μl)并加入相同量的 DNA 进行电击转化。结果见图 3，转化效率随细胞浓度的下降而下降。在菌浓度达 1×10^{10}/ml 时，转化效率可达到 5×10^6，而当细胞浓度降至 10^8/ml 时，转化率只有 1×10^4/μg DNA。所以在实验中，最终菌悬液体积仅为培养体积的 1/200～1/500。以不同量的质粒 pXZ10145 DNA 对谷氨酸棒杆菌 10147 进行转化实验，结果见图 4 质粒 DNA 在使用范围内(20～100ng)，转化子数量与所用 DNA 量呈线性关系。在细胞量 2×10^{10}，80ng DNA 时，转化效率达 3.2×10^6。

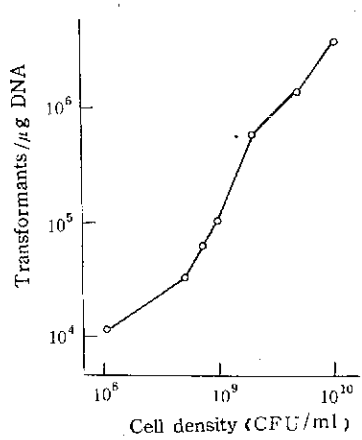

图 3　不同细胞浓度对转化效率的影响

Fig. 3　Effect of cell concentration on transformation efficency

2.4　电击电场强度对转化效率的影响

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

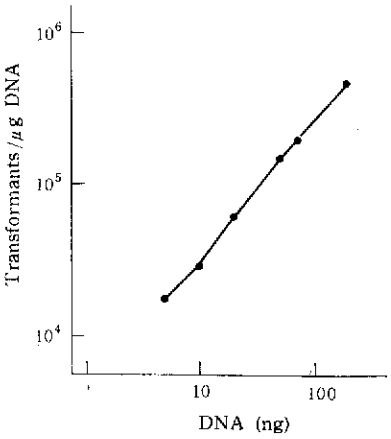

图 4 不同 DNA 浓度对转化效率的影响

Fig. 4 Effect of DNA concentration on transformation efficency

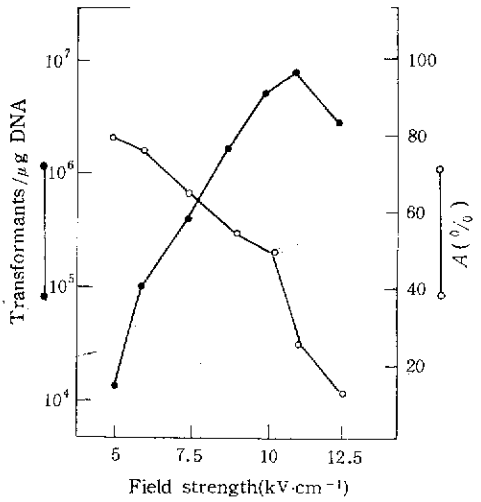

图 5 不同电场强度对转化效率的影响

Fig. 5 Effect of voltage on transformation efficency

A. Vital rate(%)

图 5 所示，转化效率是随电场强度的升高而提高的，但当电场强度达到 12.5kV/cm 时略有下降。另外，随电场强度的升高，细胞致死率大大提高，在 12.5kV/cm 时，细胞存活率只有 12%左右。需要指出，不同转化受体及不同培养条件都会对最适转化电场强度的选用值有影响。但棒状类细菌电击转化中一般都采用较高的电场强度(10～12.5kV/cm)。如果菌体洗涤不充分，或细胞长时间储放出现菌体部分破裂会造成细胞悬液的离子强度升高，若再以高电场强度电击，常出现激烈的放电现象。一旦出现这种情况，细胞损伤极大，转化效率也会大幅度下降。

2.5 不同转化受体菌对转化效率的影响

表 1 所列数据说明，质粒 pXZ10145 可在不同宿主中自我复制，但各宿主确实存在较强的限制修饰系统，从而导致异源 DNA 转化效率较同源 DNA 转化效率大为降低，Haynes 和 Britz 发现异源 DNA 转化效率一般要低 100 倍[6]。

表 1 不同宿主间限制修饰对转化效率的影响

Table 1 Effect of restriction and modification activity of different strains on transformation efficency

Plasmid	Source of DNA	Transformation recipient			
		C. gluta. 10147	*C. crena.* B9	*C. crena.* T6-13	*B. fla.* 075
pXZ10145	*C. glu.* 10147	5.6×10^5	3.1×10^4	1.9×10^4	1.3×10^4
pXZ10145	*C. cre.* B9	3.4×10^4	2.7×10^6	1.1×10^5	—
pXZ10145	*C. cre.* T6-13	2.3×10^4	—	8.4×10^5	—
pSWY902	*E. coli*	1.2×10^3	2.4×10^3	—	9.3×10^2
pSWY902	*C. cre.* B9	8.9×10^3	1.6×10^6	—	—

2.6 其它因素对转化效率的影响

细胞经高压电击之后，需要加 SOC 缓冲液并在 30℃保温一段时间，再涂布到含氯霉素的平板上。从表 2 可见，随保温时间的加长，转化效率有极为明显的提高。而这段时间内细胞总数并没有增加，这说明在实验所采用的保温时间中，细菌尚没有开始分裂增殖。Haynes

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

和 Britz 认为,受电击的细胞表现出渗透压敏感,在高渗缓冲液中保温一段时间后,细胞壁得以恢复[6]。在我们的工作中,一般电击后,细胞悬液要在 30℃下保温 2～2.5h。

表 2　不同保温时间对转化效率的影响

Table 2　Effect of incubation time on transformation efficency

Incubation time(h)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
Transformation efficency (transforments/μg)	$<10^4$	$<10^4$	2.0×10^5	8.1×10^5	1.7×10^6	3.2×10^6

筛选转化子用的平板中氯霉素浓度是另一个影响转化效率的因素,将电击后的细胞涂布在含 10μg/ml 氯霉素的平板时,长出的转化子个数比涂布在 20μg/ml 氯霉素平板上的要多近 10 倍。我们发现 pXZ10145 上的氯霉素抗性基因的表达似乎有一个诱导过程。当 1014～6T(含质粒 pXZ10145)由不含氯霉素平板上转接至含 50μg/ml 氯霉素的平板时,菌落生长得不好。但由含 10μg/ml 氯霉素平板上转接至 50μg/ml 氯霉素的平板时,菌落生长正常,进而能够在 100μg/ml 的平板上生长。联系这一实验现象,我们认为,经历高电场强度电击的细胞在再生时,筛选用的氯霉素浓度应当降低以保证氯霉素抗性基因有足够的表达,否则便会影响转化效率。

参 考 文 献

[1]Katsumata R,Ozaki A,Oka T *et al*. J Bacteriol. 1984,**159**:306～311.
[2] Santamaria R ,Gil J A, Martin J F. J Bacteriol. 1985,**162**:463～467.
[3]Thierbach G,Schwarzer A,Fühler A. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1988. **29**:356～362.
[4]Dower W J,Miller J F, Ragsdale C W. Nucleic Acid Res. 1988,**16**:6127～6145.
[5]Dunican L K & Shivan E. Bio/Technol. 1989,**7**:1067～1070.
[6]Haynes J A & Britz M L. J Gen Microbiol. 1990,**136**:255～263.
[7]Bonnassie S,Burini J F, Oreglia J *et al*. J Gen Microbiol. 1990,**136**:2107～2112.
[8]郑兆鑫,马楚平,严维耀等.生物工程学报.1987,**5**:183～188.
[9]沈天翔,贾盘兴,那淑敏等.生物工程学报.1993,**9**:216－222.
[10]Sambrood J,Fritsch E F,Maniatis T. Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 1989,Cold Spring Harbor Laboratory Press.
[11]Best G R & Britz M L. Appl Microbiol Biotechnol. 1986,**23**:288～293.

The Factors Affected Transformation Efficiency of Coryneform Bacteria by Electroporation

Shen Tianxiang　Na Shumin　Xiao Wenzhong　Jia Panxing

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

Abstract　High voltage electroporation was performed to transfer plasmid DNA of pXZ10145 into different kinds of corynebacteria strains. A number of factors that affected transformation efficiency were investigated. Cell grown in the presence of 4% glycine and harvested in the early exponential growth phase (OD_{600} was about 0.2)was much easier to be transform. Transformation efficiency of up to 8×10^6 transformants per μg plasmid DNA with homologously derived DNA was obtained. If nonhomologously derived DNA was used, transformation efficiency was 10^2 to 10^3 times lower than the former one.

Key words　Coryneform bacteria, electroporation, transformation efficiency

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn