

## 乳杆菌电转化条件的研究

贾士芳 王荫榆 郭兴华 还连栋

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘要** 用 pGK12、pMG36C 等质粒电转化不同的乳杆菌。研究了影响转化效率的多种因素。受体细胞经 20 $\mu$ g/ml 氨基青霉素处理 1h, 可以提高转化效率 200 倍。同时, 发现电击后的细胞必需在高渗培养基中才能存活, 电击后 2~3h 的复苏表达期和用亚抑制抗生素浓度选择转化子, 这些对电转化成功以及提高转化效率都是十分关键的。在改进电转化方法中, 各种参数为电场强度 8.75kV/cm, 电阻 100 $\Omega$  或 200 $\Omega$ , 电容 25 $\mu$ F 和 2 $\times$  磷酸缓冲液。

**关键词** 乳杆菌, 质粒, 电转化

学科分类号 Q789

乳杆菌在农业、食品工业中有重要的经济意义, 而且是医学上的重要菌种, 在人和动物体内也是非常重要的正常生理菌群之一。它们在肠道等部位粘膜表面栖居和繁殖, 起着维持体内微生态平衡和健康的作用<sup>[1]</sup>。各种乳杆菌已被用来作为益生菌 (Probiotics) 维持人和动物的健康<sup>[2~4]</sup>。由于乳杆菌广泛的工业用途和在医学上的重要意义, 人们对用现代遗传工程技术改造它, 产生了极大的兴趣<sup>[5]</sup>。我们对乳杆菌分子遗传学研究的最大兴趣是利用基因工程技术, 让其携带外源基因 (如疫苗, 抗原, 酶, 必需氨基酸等基因) 到人和动物体内直接产生外源基因产物。乳杆菌的遗传操作先决条件是建立方便和可靠的转化方法。目前乳杆菌的转化方法有: 原生质体转化法和电击转化法。原生质体转化法先于电击转化法出现, 由于电击转化法优于繁琐, 耗时和不稳定的原生质体转化法, 已被广泛采用。但乳杆菌的电转化还不十分完善, 尤其是重复性不好, 转化率低。本文研究了多种因素对乳杆菌电转化的影响, 建立了优化的转化条件, 不仅转化效率较高而且重复性好。

### 1 材料和方法

#### 1.1 菌株和质粒

嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) JL-1; 干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) JL-2; 发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermenti*) JL-3; 为本实验室分离的菌株, pMG36C-是乳酸乳球菌中含有的 3.3kb 质粒, 带有氯霉素抗性基因; pHPSOD 是含有 SOD 基因的重组质粒, 分子量为 7.1kb, 带有红霉素和氯霉素抗性。pGK12 是广泛宿主的质粒, 分子量为 4.4kb, 氯霉素和红霉素抗性基因作为选择标记。

#### 1.2 培养基和缓冲液

MRS 培养基<sup>[6]</sup>用于乳杆菌的培养, 含 1.5% 琼脂的固体 MRS 培养基用于转化子的

筛选和细胞计数;HEB 缓冲液:含有 272mmol/L 蔗糖,1mmol/L  $MgCl_2$ ,7mmol/L  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$ (pH7.4);PEB-1 缓冲液:含有 272mmol/L 蔗糖,0.5mmol/L  $MgCl_2$ ,0.5mmol/L  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$ (pH7.4)。甘油缓冲液:10%甘油,0.5mmol/L 蔗糖。以上缓冲液均用去离子水配制。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 质粒提取:**乳杆菌质粒提取采用 Anderson<sup>[7]</sup>方法;大肠杆菌质粒提取,采用碱裂解法<sup>[8]</sup>,纯化用聚乙二醇(PEG)沉淀法<sup>[8]</sup>,提取的质粒用紫外吸收定量。

**1.3.2 电击用细菌受体的制备:**未处理的乳杆菌受体的制备:将单菌落接入 MRS 培养液中,37℃ 静置培养过夜后,以 2% 接种量接入 20ml MRS 培养液中,37℃ 静置培养约 4h 左右,细胞生长到  $OD_{600}$  0.5~0.8,离心收集菌体,用等体积的冰冷电击缓冲液洗涤细胞 2 次。培养物悬浮于 200 $\mu$ l 电击缓冲液中。氨苄青霉素处理乳杆菌受体的制备:将过夜培养物以 2% 接种量接入 20ml MRS 培养液中,37℃ 静止培养 3h,加入一定浓度的氨苄青霉素处理一定时间,收集和洗细胞均按上述方法进行。甘氨酸处理乳杆菌受体的制备:将过夜培养物以 2% 接种量转移到含有 1% 甘氨酸的 MRS 培养液中,37℃ 静置培养到  $OD_{600}$  0.5 左右,收获和洗涤细胞均按上述方法进行。

**1.3.3 电击转化:**转化受体为嗜酸乳杆菌 JL-1,质粒 DNA 从大肠杆菌中提取 pMG36C。高压脉冲电击转化仪是 Bio-Rad 公司产品(Gene pulser)。电击转化过程如下:取 1 $\mu$ l 质粒 DNA 与 40 $\mu$ l 的冰冷细胞悬浮液混合后,移入电击杯中(间距 0.2cm)置冰上 5min,设置电压,电容,电阻,然后释放电脉冲,电击完毕向杯子中加入 400 $\mu$ l 的 MRS 培养液,再吸入微量离心管中,37℃ 静止培养 2~3h,取 100 $\mu$ l 涂在含氯霉素的 MRS 平板上,培养 24~36h,计数转化子并计算转化效率。

## 2 结果和讨论

### 2.1 细胞的生长时期对转化效率的影响

在电压 1.8kV,电阻 200 $\Omega$ ,电容 25 $\mu$ F 条件下,用 1% 甘氨酸处理处于不同生长时期的嗜酸乳杆菌 JL-1 细胞,见图 1。不论处理和不处理的细胞转化效率都与生长时期有关,最高转化效率的细胞均处于对数生长中期。未处理的细胞在 OD 为 0.9 时获得最高转化率。而 1% 甘氨酸处理细胞在 OD 为 0.28~0.88 时转化子产生,当 OD 为 0.78 时获最高转化率。

### 2.2 电击电场强度对转化效率的影响

固定电阻为 200 $\Omega$ ,电容 25 $\mu$ F,改变电场强度进行电击转化。电场强度对转化效率的影响结果见图 2。转化受体(不处理)和氨苄青霉素处理之后转化效率随电压的增加而增

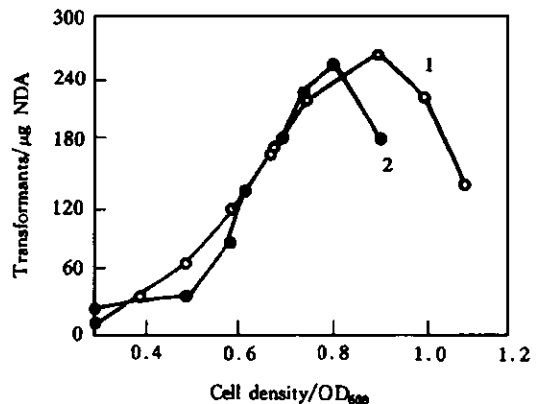


图 1 不同生长时期细胞对转化效率的影响

Fig.1 Effect of growth phase on transformation efficiency

○ Control cell; ● Cell-treated with glycine

加,在 1.75kV 即场强为 8.76kV/cm 时,获得最大转化效率,之后随电压增加转化效率下降。而 1% 甘氨酸处理后,转化效率随电压升高而下降。1% 甘氨酸处理对转化效率没有影响,而氨苄青霉素处理则可提高转化效率 200 倍。

### 2.3 电阻大小对转化效率的影响

在设置电压为 1.75kV,电容为 25 $\mu$ F 条件下,以未处理的 JL-1 为对照,和氨苄青霉素处理的 JL-1 同时电击转化,电阻变化由 100 $\Omega$ -600 $\Omega$  对转化效率的影响见图 3。转化效率随电阻增加而下降,从电阻 100 $\Omega$  开始时转化效率最高,电阻在 200~400 $\Omega$  时略有下降,但仍能保持较高的转化效率。当电阻达 600 $\Omega$ ,转化效率迅速下降 30~100 倍。未处理的 JL-1 在 200 $\Omega$  达最高转化效率,到 600 $\Omega$  时同样急剧下降。

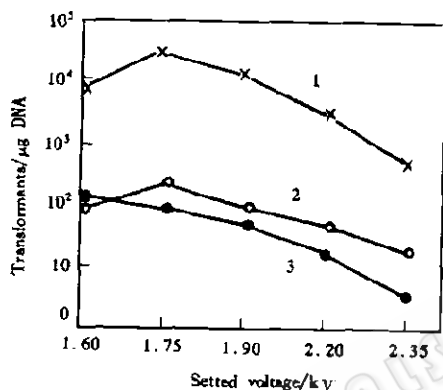


图 2 设置电压对转化效率的影响

Fig. 2 Effect of voltage on transformation efficiency

○ Control cell; ● Cell treated with glycine  
× Cell-treated with ampicillin

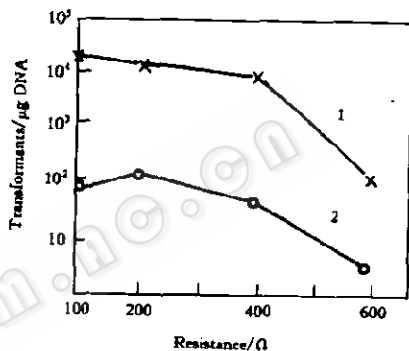


图 3 电阻对转化效率的影响

Fig. 3 Effect of resistance on transformation efficiency

○ Control cell; × cell-treated with ampicillin

### 2.4 氨苄青霉素浓度对转化效率的影响

嗜酸乳杆菌 JL-1 经过不同浓度的氨苄青霉素处理 1h,然后在电压为 1.75kV,电阻为 200 $\Omega$ ,电容 25 $\mu$ F 条件下进行电击转化,转化效率见图 4。凡是处理过的细胞,转化效率都有提高,在 20 $\mu$ g/ml 的浓度时,转化效率最高。

### 2.5 氨苄青霉素处理时间对转化效率的影响

用 20 $\mu$ g/ml 的氨苄青霉素分别处理不同时间,其它条件同 2.4 节进行电击,结果见图 5。处理 60min 时最好,再延长时间转化效率呈下降趋势。

### 2.6 电击缓冲液对转化效率的影响

比较了 HEB(2.5 $\times$ ),PEB(2 $\times$ ),PEB<sub>1</sub>(2 $\times$ )和甘油缓冲液对转化效率的影响。从表 1 可见 PEB<sub>1</sub>(2 $\times$ )缓冲液较好。

### 2.7 在优化条件下用不同质粒转化不同的受体

电转化条件为:电压 1.75kV,电阻 100 $\Omega$ ,电容 25 $\mu$ F,电击缓冲液 PEB<sub>1</sub>。用 pGK12, pMG36C 和 pHPSOD 质粒 DNA 转化干酪乳杆菌和发酵乳杆菌,结果如表 2:

表 1 不同电击缓冲液对转化效率的影响

Table 1 Effect of different buffer on electrotransformation efficiency

Buffer	Glycerol(10%)	PEB(2×)	HEB(2.5×)	PEBI(2×)
Efficiency (× 10 <sup>4</sup> )	1.7	2.3	1.1	3.9

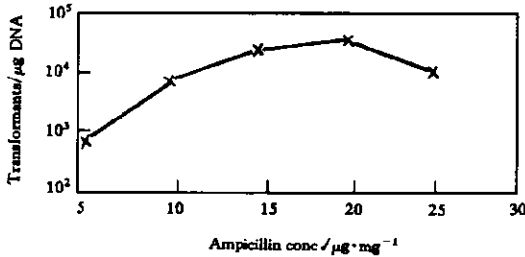


图 4 氨苄青霉素的浓度对转化效率的影响

Fig. 4 Effect of ampicillin on transformation efficiency

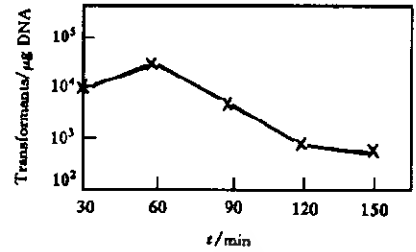


图 5 氨苄青霉素处理时间对转化效率的影响

Fig. 5 Effect of ampicillin-treated with various time on transformation efficiency

表 2 不同质粒和受体的转化效率

Table 2 Electrotransformation efficiency with different plasmid and recipient bacterial strains

Plasmid DNA	Transformation efficiency/transformants/μg		
	<i>Lactobacillus casei</i> (× 10 <sup>4</sup> )	<i>Lactobacillus fermenti</i> (× 10 <sup>4</sup> )	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (× 10 <sup>4</sup> )
pGK12	1.57	2.60	2.10
pMG36C	4.5	6.6	4.7
pHPSOD	0.900	0.174	0.860

## 2.8 其它因素对转化效率的影响

经过电击之后的细菌,在涂选择平板前,需要在补充了10%~20%蔗糖的MRS培养液中,37℃静置培养一段时间。这是电转化成功的关键,可能是由于电击使细胞产生瞬间小孔在非高渗的MRS培养液中容易破裂,致使转化失败<sup>[9]</sup>。复苏的时间长短与转化效率也有一定关系,试验发现一般电击后至少要在37℃保温2~3h。筛选转化不用抗生素平板,其抗生素浓度也影响转化效率。试验发现细胞涂在含氯霉素3μg/ml比在5μg/ml的氯霉素平板上长出的转化子数多10~20倍。氯霉素浓度的影响随菌种而异。嗜酸乳杆菌JL-1为3μg/ml,干酪乳杆菌和发酵乳杆菌则为5μg/ml。

在试验前应考查受体菌对抗生素的最低抑制浓度,在低抗生素浓度下选择转化子,再转到较高浓度的抗生素平板上,确保转化子的可靠性。

## 参 考 文 献

- 1 杨洁彬主编.《乳酸菌——生物学基础及应用》,北京:中国轻工业出版社,1996, pp. 139, 177, 187
- 2 Fernandes C F, Shahani K M, Amer M A. FEMS Microbiol Rev, 1987, **46**:343~356
- 3 Juven B J, Meinersmann R J, Stern N J. J Appl Bacteriol, 1991, **70**:95~103
- 4 McKay L L, Baldwin K A. FEMS Microbiol Rev, 1990, **87**:3~14
- 5 Gasson M J, De Vos W M. "Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria", 1994. Blackie Academic & Professional London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras
- 6 De Man J C, Rogosa M, Sharpe M E. J Appl Bacteriol, 1960, **23**:130~135
- 7 Anderson D G, McKay L L. Appl Environ Microbiol, 1983, **46**:549~552
- 8 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, New York, 1989
- 9 Holo H, Nes I F. Appl Environ Microbiol, 1989, **55**:3119~3123

### The Factors Affected Transformation Efficiency of *Lactobacillus* by Electroporation

Jia Shifang Wang Yinyu Guo Xinhua Huan Liandong

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

**Abstract** Plasmid pGK12, pHPSOD DNA were transformed into different kinds of *Lactobacillus* strains by electroporation. A number of factors that affected transformation efficiency were investigated. Treatment of the recipient *Lactobacilli* with ampicillin improved electrotransformation efficiencies up to 200-fold. A post-pulse recovery time of 2~3h and the use of sub-inhibitory concentrations of antibiotics in the selective plates were very critical for electrotransformation. Several parameters in improved protocol were voltage 8, 75kV·cm<sup>-1</sup>, resistance 100Ω, capacitance 25μF, buffer 2×PEB1.

**Key words** *Lactobacillus*, plasmid, electrotransformation