



生物实验室

## 响应面法优化嗜热链球菌 AR333 电转化条件

石俊康 贺紫瑾 连若琪 李晓凤 孔令慧 艾连中 熊智强\*

上海理工大学医疗器械与食品学院 上海食品微生物工程研究中心 上海 200093

**摘要:**【背景】嗜热链球菌 AR333 是本实验室从发酵乳中筛选出的一株高产活性胞外多糖乳酸菌。【目的】建立嗜热链球菌 AR333 高效电转化体系。【方法】通过单因素试验和 Box-Behnken 响应面法优化电转化条件。【结果】嗜热链球菌 AR333 最优电转化条件为甘氨酸浓度 8.3 g/L,  $OD_{600}$  为 0.8, 10%甘油(体积比)和 0.5 mol/L 蔗糖的电转缓冲液, pIB184 质粒 80 ng, 电场强度 14 kV/cm, 0.4 mol/L 山梨醇、2 mmol/L  $CaCl_2$  和 20 mmol/L  $MgCl_2$  的 LM17 复苏培养基, 复苏时间 5 h。【结论】在最优电转化条件下, 嗜热链球菌 AR333 电转化效率达到  $3.68 \times 10^5$  CFU/ $\mu$ g-DNA, 比优化前提高了 14 倍, 实现了嗜热链球菌 AR333 的高效遗传转化, 为其功能解析和基因工程改造奠定基础。

**关键词:** 响应面法, 嗜热链球菌, 电转化, 转化效率

## Optimization of electroporation method of *Streptococcus thermophilus* AR333 by response surface methodology

SHI Jun-Kang HE Zi-Jin LIAN Ruo-Qi LI Xiao-Feng KONG Ling-Hui  
AI Lian-Zhong XIONG Zhi-Qiang\*

Shanghai Engineering Research Center of Food Microbiology, School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China

**Abstract:** [Background] *Streptococcus thermophilus* AR333, isolated from fermented dairy products, could produce a high-yield active exopolysaccharide. [Objective] To establish a high-efficiency electroporation method of *S. thermophilus* AR333. [Methods] Electroporation conditions were optimized by single factor experiment and Box-Behnken response surface methodology. [Results] The optimum condition was glycine content 8.3 g/L, cell density of 0.8 ( $OD_{600}$ ), buffer composed of 10% glycerol (V/V) and 0.5 mol/L sucrose, 80 ng pIB184 plasmid, electric field strength 14 kV/cm, the recovery LM17 media composed of 0.4 mol/L sorbitol, 2 mmol/L  $CaCl_2$  and 20 mmol/L  $MgCl_2$  and recovery time of 5 h. [Conclusion] The transformants reached  $3.68 \times 10^5$  CFU/ $\mu$ g-DNA under the optimal condition, which was improved about 14-fold in comparison with that of initial condition. The optimized condition was used to achieve a high electro-transformation efficiency, which lays a foundation for genetic engineering of AR333.

**Keywords:** Response surface methodology, *Streptococcus thermophilus*, Electroporation, Transformation efficiency

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31871776, 31771956); Shanghai Natural Science Foundation (18ZR1426800)

\*Corresponding author: E-mail: xiongzq@hotmail.com

Received: 13-12-2019; Accepted: 27-02-2020; Published online: 20-03-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31871776, 31771956); 上海市自然科学基金(18ZR1426800)

\*通信作者: E-mail: xiongzq@hotmail.com

收稿日期: 2019-12-13; 接受日期: 2020-02-27; 网络首发日期: 2020-03-20

嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)是链球菌属中唯一公认安全的菌种<sup>[1]</sup>, 作为一种重要的商业发酵剂, 广泛应用于奶酪、酸奶和黄油等<sup>[2-3]</sup>乳制品生产。嗜热链球菌可以和保加利亚乳杆菌协同共生, 改善发酵乳的风味和货架期, 而且能够合成  $\gamma$ -氨基丁酸、谷胱甘肽和胞外多糖等代谢产物<sup>[4-5]</sup>。其中, 嗜热链球菌胞外多糖可显著改善乳制品的口感和流变特性, 还具有潜在的抗肿瘤、降胆固醇、调节免疫和抗氧化等活性功能<sup>[6]</sup>。鉴于其重要的功能活性和生理特性, 嗜热链球菌功能基因解析和遗传改造引起了广泛关注。

本实验室前期从发酵乳中筛选出一株高产活性胞外多糖乳酸菌嗜热链球菌 AR333, 其所产胞外多糖(命名为 EPS333)是由半乳糖、葡萄糖和半乳糖胺组成的杂多糖, 在水溶液中呈球形的刚性或半刚性结构, 其独特的结构和高粘度使 EPS333 具有替代目前发酵乳制品中商业稳定剂(如果胶、藻酸盐和卡拉胶)的潜力<sup>[7]</sup>。为进一步研究 EPS333 生物合成, 对嗜热链球菌 AR333 进行遗传操作, 因此建立其高效转化方法至关重要。电转化法是嗜热链球菌中最常用的遗传转化方法, 但目前报道的电转化方法在 AR333 中转化效率较低, 甚至不能成功转化<sup>[8-10]</sup>。因此, 本研究利用单因素试验和响应面法对 AR333 的电转化方法进行优化, 确定其最佳转化条件, 为进一步对 AR333 的遗传改造奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

嗜热链球菌 AR333 (革兰氏阳性、兼性厌氧、过氧化氢酶阴性)为本实验室筛选, 菌种保藏编号为 CGMCC 10262; 大肠杆菌(*Escherichia coli*) Top10、红霉素抗性(Em)的 pIB184 质粒, 本实验室保存。

#### 1.1.2 培养基和缓冲液

LM17 培养基(g/L): 大豆蛋白胨 5.0, 牛肉膏

5.0, 胰蛋白胨 5.0, 酵母浸出粉 2.5,  $\beta$ -磷酸甘油二钠五水化合物 19.0, 七水硫酸镁 0.58, 乳糖 20.0; LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, 氯化钠 10.0; 复苏培养基 I: 含有 0.4 mol/L 山梨醇 LM17 培养基; 复苏培养基 II: 含有 0.4 mol/L 山梨醇、2 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ 、20 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  LM17 培养基; 复苏培养基 III: 含有 0.4 mol/L 蔗糖 LM17 培养基; 复苏培养基 IV: 含有 0.4 mol/L 蔗糖、2 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ 、20 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  LM17 培养基。

电转缓冲液 I: 0.4 mol/L 山梨醇, 5 mmol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 4.5; 电转缓冲液 II: 0.5 mol/L 蔗糖, 10%甘油(体积比); 电转缓冲液 III: 10%甘油(体积比); 电转缓冲液 IV: 0.5 mol/L 蔗糖, 1 mmol/L 柠檬酸铵, pH 6.0<sup>[10]</sup>。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

红霉素, 生工生物工程(上海)股份有限公司; *rTaq* DNA 聚合酶, TaKaRa 公司。冷冻离心机, Sigma 公司; 厌氧培养箱, Ruskinn 公司; 超微量核酸蛋白测定仪, Thermo Fisher 公司; 凝胶成像仪, Bio-Rad 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 嗜热链球菌 AR333 感受态制备方法

将嗜热链球菌 AR333 单菌落接入 LM17 培养基, 37 °C 厌氧培养 10 h, 以 3%的接种比例接种至含甘氨酸(9 g/L)的 LM17 培养基, 37 °C 厌氧培养至指定  $OD_{600}$  值, 4 °C、5 000 $\times$ g 离心 12 min, 收集菌体<sup>[11]</sup>。用预冷的电转缓冲液洗涤菌体, 如前离心, 弃上清, 此过程重复 2-3 次, 然后用 10%甘油(体积比)的电转缓冲液重悬菌体并分装, 存放在 -80 °C, 电转化备用<sup>[12-13]</sup>。

### 1.2.2 嗜热链球菌 AR333 电转化和转化子验证

将 -80 °C 保藏的感受态细胞取出, 冰上融化后与质粒混匀, 冰浴 30 min 转入预冷无菌的电转化杯(间隙 2 mm)中, 电击完毕后向电转杯中加入 900  $\mu\text{L}$  复苏培养基, 37 °C 厌氧培养 4 h, 取 100  $\mu\text{L}$  涂布含红霉素抗性的 LM17 培养基平板, 37 °C 厌氧培养 48 h, 计数转化子<sup>[14]</sup>, 并按下式计算出电

转化效率:

$$\text{电转化效率(CFU/}\mu\text{g DNA)} = \frac{\text{菌落总数(CFU)}}{\mu\text{g DNA}}$$

随机挑取 8 个转化子进行菌落 PCR 鉴定, 采用 pIB184Em-F (5'-CGACTCATAGAATTATTCCTCCCG-3') 和 pIB184Em-R (5'-CGGAAACGTAAAA GAAGTTATGGAA-3') 为引物, 通过 PCR 扩增目的基因 Em。PCR 反应体系: 10×PCR Buffer 2.5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 1.5 μL, 引物 pIB184Em-F 和 pIB184Em-R (20 μmol/L) 各 0.5 μL, 模板(挑取单菌落于 10 μL ddH<sub>2</sub>O) 0.5 μL, *rTaq* DNA 聚合酶 (5 U/μL) 2.5 μL, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 25 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 98 °C 10 s, 55 °C 15 s, 72 °C 55 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

### 1.2.3 嗜热链球菌 AR333 红霉素耐受性实验

制备不同浓度红霉素 (1–30 μg/mL) 抗性的 LM17 培养基平板。将 -80 °C 冰箱保藏的嗜热链球菌 AR333 活化, 梯度稀释后涂布于提前制备好的抗性平板, 37 °C 厌氧培养 48 h, 记录平板细菌生长状况。

### 1.2.4 单因素试验优化嗜热链球菌 AR333 电转化条件

考察细胞生长状态、甘氨酸浓度、质粒浓度、电转缓冲液、复苏培养基、复苏时间和电场强度等因素对嗜热链球菌 AR333 电转化效率的影响。设计各因素水平, 细胞生长状态  $OD_{600}$ : 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0; 甘氨酸浓度: 3、6、9、12 和 15 g/L; 质粒浓度: 40、60、80、100、120 和 140 ng; 电转缓冲液: I、II、III 和 IV; 复苏培养基: I、II、III 和 IV; 复苏时间: 1、2、3、4、5、6 和 7 h; 电场强度: 7.5、10.0、12.5 和 15.0 kV/cm。

### 1.2.5 响应面法优化嗜热链球菌 AR333 电转化条件

在单因素试验结果的基础上, 选取电场强度、甘氨酸浓度、 $OD_{600}$  为考察因素, 电转化效率为响应值, 试验因素水平与编码见表 1。

表 1 响应面试验因素水平和编码

Table 1 Factors level and coding of response surface experiment

水平	因素 Factors		
Level	A 电场强度 Electric field strength (kV/cm)	B 甘氨酸浓度 Glycine content (g/L)	C $OD_{600}$
-1	10.0	6	0.6
0	12.5	9	0.8
1	15.0	12	10.0

## 2 结果与分析

### 2.1 嗜热链球菌 AR333 的红霉素耐受性评价

嗜热链球菌 AR333 是一株高产活性胞外多糖乳酸菌, 为解析其胞外多糖生物合成, 需建立高效的电转化方法, 以便后续的遗传操作。由于乳酸菌基因工程操作中最常用的抗生素为红霉素<sup>[14]</sup>, 因此首先考察 AR333 的红霉素耐受性。当红霉素浓度大于 1 μg/mL 时, 嗜热链球菌 AR333 不能生长, 说明其对红霉素有较高的敏感性; 而红霉素浓度降低至 0.5 μg/mL 时, 嗜热链球菌 AR333 能正常生长。因此, 后续实验选择的红霉素浓度为 1 μg/mL, 使用乳酸菌通用表达载体 pIB184 质粒(含红霉素抗性基因)进行电转化条件优化。

### 2.2 单因素试验优化嗜热链球菌 AR333 电转化条件

电转化是嗜热链球菌最有效的转化方法, 但电转化效率受细胞生长状态、甘氨酸浓度、质粒浓度、电转缓冲液、复苏培养基、复苏时间和电场强度等因素的影响。通过对不同影响因素进行优化分析, 结果表明不同生长状态的嗜热链球菌 AR333 转化效率存在明显差异。在细胞生长初期, 转化效率随着  $OD_{600}$  的增大而逐步升高。在初始条件  $OD_{600}$  为 0.4 时, 电转化效率为  $2.64 \times 10^4$  CFU/μg-DNA; 当培养细胞至  $OD_{600}$  为 0.8 时, 转化效率达到峰值, 为  $8.3 \times 10^4$  CFU/μg-DNA; 随着细胞进一步生长, 转化效率呈下降趋势(图 1A)。嗜热链球菌 AR333 生长速度与甘氨酸浓度呈负相关, 随着甘氨酸浓度升高, 细胞生长速率逐步降低; 当甘氨酸浓度为 15 g/L 时, 其生长受到明显抑制(图 1B), 因此该浓

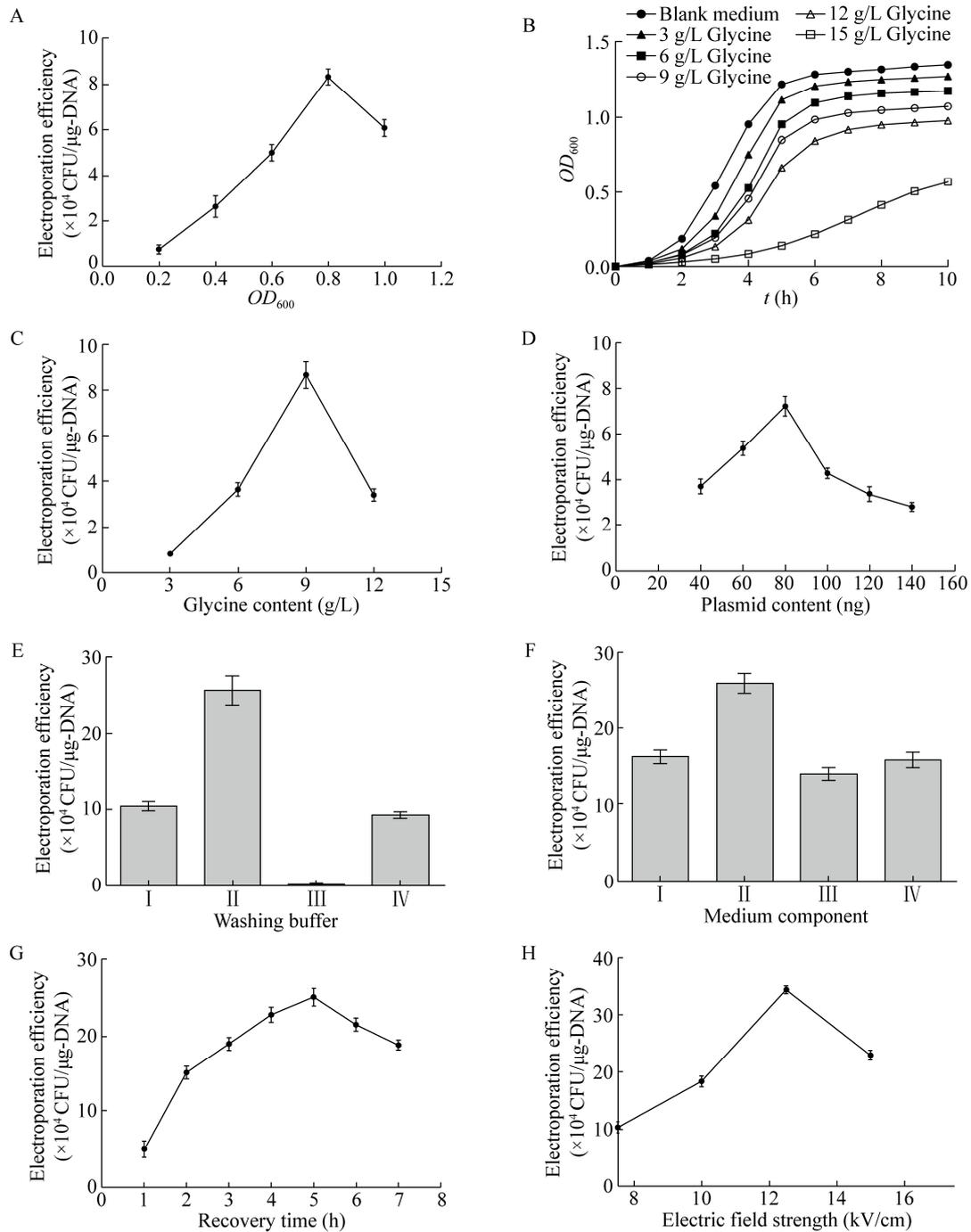


图 1 不同因素对嗜热链球菌 AR333 电转化效率和生长的影响

Figure 1 Effect of different factors on the electroporation efficiency and growth of *S. thermophilus* AR333

注: A: 生长时期; B: 甘氨酸浓度对 AR333 生长的影响; C: 甘氨酸浓度; D: 质粒浓度; E: 电转缓冲液(I、II、III、IV 为 4 种不同电转缓冲液); F: 复苏培养基(I、II、III、IV 为 4 种复苏培养基); G: 复苏时间; H: 电场强度。

Note: A: Growth period; B: Glycine concentration on cell growth of AR333; C: Glycine concentration; D: Plasmid concentration; E: Electroporation buffer; F: Resuscitation medium; G: Recovery time; H: Electric field strength.

度不适合嗜热链球菌 AR333 感受态的制备。嗜热链球菌 AR333 转化效率随甘氨酸浓度增加先上升后下降,当甘氨酸浓度为 9 g/L 时,转化效率最大,达到  $8.6 \times 10^4$  CFU/ $\mu\text{g}$ -DNA (图 1C),与对照相比提高了 18.6 倍,说明添加适当浓度甘氨酸有利于电转化效率提高。

加入不同浓度质粒的嗜热链球菌 AR333 感受态细胞转化效率存在明显差异,转化效率随添加质粒浓度的增加先升高后降低,质粒浓度增加到 80 ng 时,转化效率达到峰值  $1.15 \times 10^5$  CFU/ $\mu\text{g}$ -DNA (图 1D)。电转缓冲液中加入蔗糖或山梨醇等渗透保护剂时,嗜热链球菌 AR333 转化效率大幅度提高,说明加入渗透保护剂有助于增加其转化效率。利用蔗糖作为保护剂的电转缓冲液 II 获得了最高转化效率  $2.47 \times 10^5$  CFU/ $\mu\text{g}$ -DNA (图 1E);电击后加入 0.4 mol/L 山梨醇、2 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  和 20 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  的复苏培养基 II,获得了最高转化效率(图 1F);在一定范围内,复苏时间越长,转化效率越高,复苏 5 h 时转化效率达到最大  $2.58 \times 10^5$  CFU/ $\mu\text{g}$ -DNA,当复苏超过 5 h 时,转化效率逐步下降(图 1G)。在低电场强度条件下,嗜热链球菌 AR333 转化效率随电场强度的增加而提高,当电场强度达到 12.5 kV/cm 时,转化效率最高,为  $3.43 \times 10^5$  CFU/ $\mu\text{g}$ -DNA,但进一步增加电场强度时,转化效率有所下降(图 1H)。

### 2.3 响应面法优化嗜热链球菌 AR333 电转化条件

上述单因素试验结果发现电场强度、甘氨酸浓度和细胞生长状态对转化效率的影响较为显著,并确定了各因子的适宜选择范围,因此采用 Box-Behnken 响应面设计对其进行进一步优化。结果见表 2。

对表 2 数据进行多元回归拟合可得方程:  
 $Y=34.38+7.22A-4.37B+2.44C-2.09AB-0.54AC+2.79BC-5.67A^2-12.47B^2-8.54C^2$ 。回归方程的方差分析结果见表 3,方程的一次项、二次项以及交互项(除 AC 外)对响应值的影响显著( $P<0.01$ ),一次项影响因子的主次顺序为:电场强度>甘氨酸浓度> $OD_{600}$ 。回归模型极显著( $P<0.0001$ ),失拟项不

显著( $P=0.1940>0.05$ ), $R^2=0.9340$ , $R^2_{\text{adj}}=0.9863$ ,可知回归方程拟合度和可信度均很高,可以用此模型对嗜热链球菌 AR333 转化效率进行预测。

利用模型拟合出的三维响应面图可以直观看出各因素间交互作用对转化效率的影响(图 2),其

表 2 响应面试验设计和结果

Table 2 Results of Box-Behnken design

编号 No.	A 电场强度 Electric field strength	B 甘氨酸浓度 Glycine content	C 吸光值 $OD_{600}$	Y 电转化效率 Electroporation efficiency ( $\times 10^4$ )
1	12.50	12.00	0.60	2.72 $\pm$ 0.15
2	10.00	9.00	0.60	9.94 $\pm$ 0.18
3	12.50	6.00	0.60	17.95 $\pm$ 0.11
4	10.00	12.00	0.80	7.81 $\pm$ 0.20
5	12.50	12.00	1.00	14.35 $\pm$ 0.28
6	12.50	6.00	1.00	18.43 $\pm$ 0.26
7	15.00	6.00	0.80	28.85 $\pm$ 0.19
8	15.00	9.00	0.60	26.68 $\pm$ 0.11
9	12.50	9.00	0.80	33.91 $\pm$ 0.11
10	12.50	9.00	0.80	35.82 $\pm$ 0.07
11	10.00	9.00	1.00	14.73 $\pm$ 0.38
12	12.50	9.00	0.80	33.18 $\pm$ 0.25
13	15.00	12.00	0.80	16.84 $\pm$ 0.13
14	12.50	9.00	0.80	34.25 $\pm$ 0.21
15	12.50	9.00	0.80	34.74 $\pm$ 0.07
16	15.00	9.00	1.00	29.32 $\pm$ 0.21
17	10.00	6.00	0.80	11.46 $\pm$ 0.34

表 3 响应面试验结果方差分析

Table 3 Analysis results of regression and variance of response surface experiment

方差来源 Source	平方和 Sum of squares ( $\times 10^8$ )	自由度 df	均方 Mean square ( $\times 10^7$ )	F 值 F value	P 值 P value
Model	1 877.53	9	2 086.15	129.26	<0.000 1
A	416.88	1	4 168.83	258.30	<0.000 1
B	152.86	1	1 528.63	94.71	<0.000 1
C	47.73	1	477.26	29.57	0.000 5
AB	17.47	1	174.72	10.83	0.001 0
AC	1.16	1	11.56	0.72	0.425 4
BC	31.08	1	310.81	19.26	0.003 2
$A^2$	135.24	1	1 352.44	83.80	<0.000 1
$B^2$	655.00	1	6 550.03	405.84	<0.000 1
$C^2$	307.44	1	3 074.40	190.49	<0.000 1
残差	11.30	7	16.14		
Residual					
失拟项	7.42	3	24.72	2.55	0.194 0
Lack of fit					
净误差	3.88	4	9.70		
Pure error					
总离差	1 888.83	16			
Cor total					
$R^2=0.9340$					
$R^2_{\text{adj}}=0.9863$					

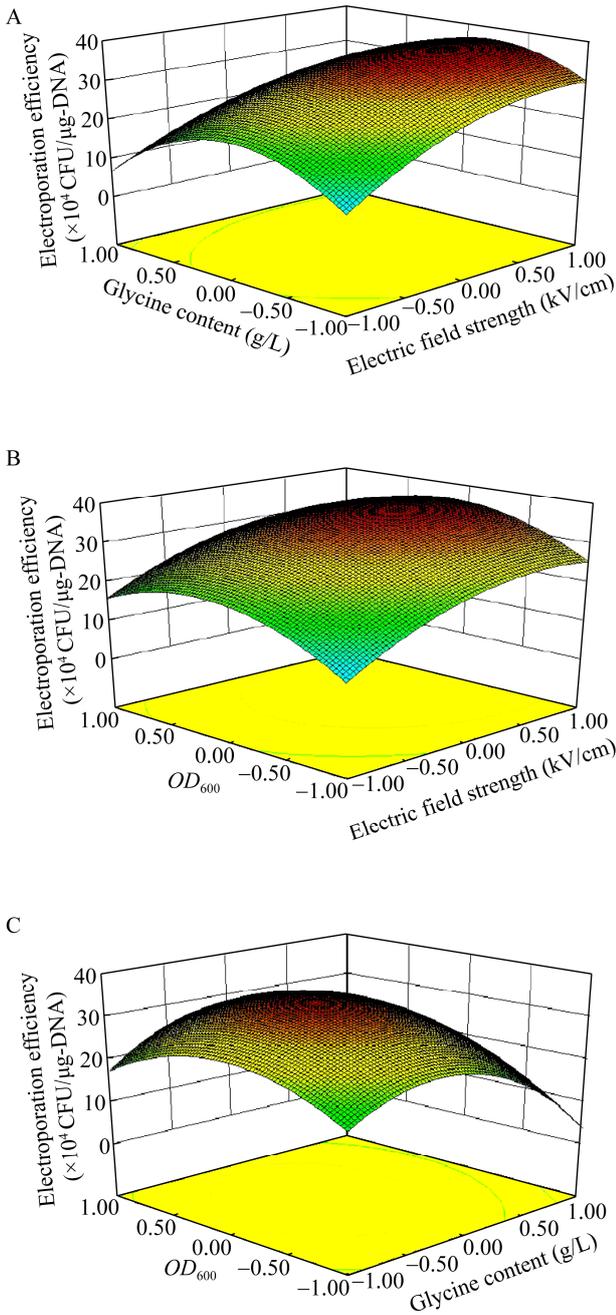


图 2 各因素交互作用对嗜热链球菌 AR333 电转化效率的影响

Figure 2 Effect of the factors on the electroporation efficiency of *S. thermophilus* AR333

注: A: 电场强度与甘氨酸浓度; B: 电场强度与  $OD_{600}$ ; C: 甘氨酸浓度与  $OD_{600}$ .

Note: A: Electric field strength and glycine concentration; B: Electric field strength and  $OD_{600}$ ; C: Glycine concentration and  $OD_{600}$ .

中电场强度和  $OD_{600}$  交互作用的曲面斜度较为平缓, 等高线图接近圆形, 说明交互作用不显著; 而其他交互项之间的曲面均较为陡斜, 其等高线图偏椭圆形, 表明交互作用显著, 与方差分析的结果一致。

通过对回归方程的求导和分析, 嗜热链球菌 AR333 最佳转化条件为: 电场强度 14.18 kV/cm、甘氨酸浓度 8.34 g/L、 $OD_{600}$  为 0.82, 此时转化效率最高, 预测值为  $3.74 \times 10^5$  CFU/ $\mu$ g-DNA。为方便实际操作调整为电场强度 14 kV/cm、甘氨酸浓度 8.3 g/L、 $OD_{600}$  为 0.8, 按此条件制备感受态细胞, 得到的嗜热链球菌 AR333 转化效率为  $(3.68 \pm 0.25) \times 10^5$  CFU/ $\mu$ g-DNA, 与预测值非常接近。说明模型能够较好地预测 AR333 转化效率。

为验证电转化后得到的转化子含有目的质粒, 随机挑取了 8 个转化子进行菌落 PCR 鉴定。与阳性对照相比, 转化子在 893 bp 附近都能扩增出红霉素抗性基因目的条带(图 3), 表明 pIB184 质粒 100%成功转入到嗜热链球菌 AR333 中。

### 3 讨论与结论

关于乳酸菌电转化效率优化已有较多报道, 但关于嗜热链球菌的研究较少。由于菌株之间的差异, 采用已有的电转化方法对嗜热链球菌 AR333

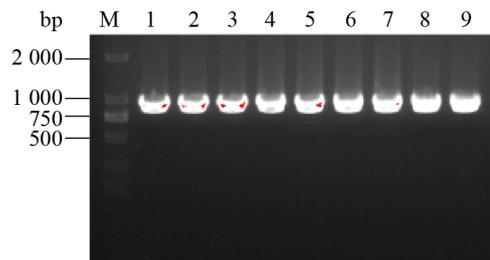


图 3 转化子菌落 PCR 验证

Figure 3 Colony PCR of the transformants of *S. thermophilus* AR333

注: M: DL2000 DNA Marker; 1: 阳性对照(pIB184); 2-9: 转化子。

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: Positive control (pIB184); 2-9: Transformants.

进行转化的效果不理想。因此,本研究首先通过单因素试验对嗜热链球菌 AR333 的电转化条件进行优化,发现其培养至对数生长期( $OD_{600}$  为 0.8)时电转化效率最高,研究表明该时期细胞生长最旺盛、活力最高,对电击造成的损伤修复能力强,且细胞壁结构相对疏松,有利于电击时孔洞的形成,从而使转化效率较高<sup>[15]</sup>。洛雪等<sup>[10]</sup>培养嗜热链球菌 sp1.1 至  $OD_{600}$  为 0.8 时电转化效率最高,与本研究结果一致。由于嗜热链球菌 AR333 是革兰氏阳性菌,细胞壁较厚,因此需在生长培养基中添加适当的化学物质来弱化其细胞壁合成,促使形成松散的细胞壁结构,有利于外源 DNA 导入。甘氨酸是乳酸菌中最常用的细胞壁弱化剂<sup>[16-18]</sup>,在本研究中甘氨酸浓度为 9 g/L 时转化效率最大。任婧等<sup>[18]</sup>在干酪乳杆菌 LC2W 中考察甘氨酸浓度对转化效率的影响,甘氨酸浓度与本研究结果相近。

在其他电转化条件相同的情况下,电转化效率会受到外源质粒浓度的影响<sup>[19]</sup>。本研究中转化效率随着质粒浓度的增加先升高后降低,原因可能是质粒浓度较低时,细胞未得到充分利用导致转化效率偏低;而质粒浓度较高时,细胞能吸收的质粒过饱和,反而不利于转化<sup>[20]</sup>。

细胞电击后受到电压的创伤易导致死亡,但在复苏培养基中添加高渗溶液能有效保护细胞,从而提高感受态细胞的存活率<sup>[21]</sup>。本研究发现复苏培养基 II 的转化效率高于复苏培养基 IV,复苏培养基 I 转化效率高于复苏培养基 III,说明山梨醇比蔗糖更有利于嗜热链球菌 AR333 细胞膜恢复;复苏培养基 I 的转化效率低于复苏培养基 II,可能是  $MgCl_2$  和  $CaCl_2$  的存在改变了细胞膜通透性,促进外源质粒吸收。另外,电击后复苏时间过长或过短都会对转化效率产生显著影响,其原因可能是复苏时间太短时,细胞未能完全修复电转化造成的细胞膜穿孔,导致转化效率偏低;而复苏时间太长,由于缺少相应抗生素的筛选压力,可能造成质粒丢失,同样导致转化子偏少,转化效率偏低<sup>[22]</sup>。此

外,在电击过程中,若电压过低,细胞膜不能被击穿产生孔洞,导致外源 DNA 分子无法有效进入细胞;若电压过高,感受态细胞的细胞膜损伤太大,造成细胞膜难以自我修复而死亡,从而降低电转化效率<sup>[23]</sup>。乳酸菌电转化的电场强度一般控制在 7.5–15 kV/cm 之间,但不同乳酸菌电转化的最佳电场强度差异很大。例如植物乳杆菌 G63 最佳电场强度为 7.5 kV/cm<sup>[24]</sup>,嗜热链球菌 sp1.1 最佳电场强度为 9 kV/cm<sup>[10]</sup>,乳酸乳球菌 MG1363 最佳电场强度为 10 kV/cm<sup>[25]</sup>,发酵乳杆菌 AR497 最佳电场强度为 15 kV/cm<sup>[14]</sup>。本研究中,嗜热链球菌 AR333 电场强度为 12.5 kV/cm 时,转化效率最高,这与洛雪等<sup>[10]</sup>研究的嗜热链球菌最佳电场强度结果不一致,可能是由于洗涤菌体的缓冲液不同所致,提高电转缓冲液的渗透压可以增加细菌电击耐受性,使电转化效率提高<sup>[26]</sup>。

响应面分析法作为一种常用的多因素试验设计方法,已广泛应用于工业配方和生产条件的优化,将其应用于益生菌电转化条件优化也取得了良好的效果。韦云莹等<sup>[27]</sup>利用 Box-Behnken 响应面法优化电场强度、甘氨酸浓度和细胞生长状态,使乳酸乳球菌 NZ9000 转化效率提高 250%。Zhang 等<sup>[28]</sup>利用 Box-Behnken 响应面法优化细胞壁弱化剂甘氨酸、苏氨酸和吐温-80 不同组合浓度,使枯草芽孢杆菌 ZK 的转化效率提高近 3 个数量级;夏子芳等<sup>[29]</sup>利用旋转中心组合响应面法优化甘氨酸浓度、蔗糖浓度和电场强度,使植物乳杆菌 B0080 转化效率提高 2 个数量级。本研究利用 Box-Behnken 响应面法对电场强度、甘氨酸浓度和细胞生长状态进行优化,使转化效率提高 1 个数量级,这与其他响应面法优化转化条件报道结果类似。

综上所述,本研究通过单因素试验和响应面法优化了嗜热链球菌 AR333 的电转化条件,实现了高效遗传转化,为进一步对其功能解析和基因工程改造奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] Blaiotta G, Sorrentino A, Ottobrino A, et al. Short communication: technological and genotypic comparison between *Streptococcus macedonicus* and *Streptococcus thermophilus* strains coming from the same dairy environment[J]. Journal of Dairy Science, 2011, 94(12): 5871-5877
- [2] Ortakci F, Broadbent JR, Oberg CJ, et al. Growth and gas formation by *Lactobacillus wasatchensis*, a novel obligatory heterofermentative nonstarter lactic acid bacterium, in Cheddar-style cheese made using a *Streptococcus thermophilus* starter[J]. Journal of Dairy Science, 2015, 98(11): 7473-7482
- [3] Iyer R, Tomar SK, Maheswari TU, et al. *Streptococcus thermophilus* strains: multifunctional lactic acid bacteria[J]. International Dairy Journal, 2010, 20(3): 133-141
- [4] Huang YN, You CP, Liu ZM. Progress in understanding of the interaction between *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2016, 39(6): 25-28 (in Chinese)  
黄艳娜, 游春萃, 刘振民. 保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌相互作用的研究进展[J]. 乳业科学与技术, 2016, 39(6): 25-28
- [5] Kong LH, Zhao LS, Xia YJ, et al. Research advance in the exopolysaccharide biosynthesis of *Streptococcus thermophilus*[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2019, 10(2): 248-290 (in Chinese)  
孔令慧, 赵林森, 夏永军, 等. 嗜热链球菌胞外多糖生物合成的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(2): 284-290
- [6] Li C, Wang CF, Yang GL. Progress in intestinal adhesion and immunoregulatory effect of extracellular polysaccharides of lactic acid bacteria[J]. Food Science, 2014, 35(11): 314-318 (in Chinese)  
李超, 王春风, 杨桂连. 乳酸菌胞外多糖肠道黏附及免疫调节作用研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(11): 314-318
- [7] Zhang H, Ren W, Guo QB, et al. Characterization of a yogurt-quality improving exopolysaccharide from *Streptococcus thermophilus* AR333[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 81: 220-228
- [8] Yang ZX. Research on electroporation processing of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei* with the vector pMG36e[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei Agricultural University, 2014 (in Chinese)  
杨子萱. 质粒 pMG36e 电转化保加利亚乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和干酪乳杆菌的研究[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2014
- [9] O'Sullivan TF, Fitzgerald GF. Electrotransformation of industrial strains of *Streptococcus thermophilus*[J]. Journal of Applied Microbiology, 1999, 86(2): 275-283
- [10] Luo X, Shi X, Shi HL, et al. Electroporation condition for genetic transformation of *Streptococcus thermophilus*[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(6): 65-69 (in Chinese)  
洛雪, 时旭, 史海粟, 等. 嗜热链球菌的电转化条件[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(6): 65-69
- [11] Zhang B. High level expression of the human's type III collagen peptide in *Streptococcus thermophilus* and optimization of fermentation[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin Institute of Technology, 2015 (in Chinese)  
张波. 人III型胶原蛋白肽在嗜热链球菌中的高效表达及发酵优化[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2015
- [12] Zhang X, Cui YH, Zhang LW, et al. Development of electrotransformation in lactic acid bacteria[J]. Journal of Lanzhou University (Natural Sciences), 2009, 45(S1): 26-33 (in Chinese)  
张旭, 崔艳华, 张兰威, 等. 乳酸菌电转化条件研究[J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 2009, 45(S1): 26-33
- [13] Blomqvist T, Steinmoen H, Håvarstein LS. Natural Genetic Transformation: a novel tool for efficient genetic engineering of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(10): 6751-6756
- [14] Wei YY, Zhao Y, Zhuang JW, et al. Optimization of electroporation method of *Lactobacillus fermentum* AR497 using response surface methodology[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(7): 52-58 (in Chinese)  
韦云莹, 赵燕, 庄金伟, 等. 利用响应面法优化发酵乳杆菌 AR497 电转化条件[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(7): 52-58
- [15] Bao QY, Sun YQ, Wang HF, et al. Discussion on some factors affecting electro-transformation efficiency[J]. Journal of Wenzhou Medical College, 2003, 33(1): 9-11 (in Chinese)  
包其郁, 孙永巧, 王慧峰, 等. 影响电转化效率的几个因素探讨[J]. 温州医学院学报, 2003, 33(1): 9-11
- [16] Kim YH, Han KS, Oh S, et al. Optimization of technical conditions for the transformation of *Lactobacillus acidophilus* strains by electroporation[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 99(1): 167-174
- [17] Löfblom J, Kronqvist N, Uhlén M, et al. Optimization of electroporation-mediated transformation: *Staphylococcus carnosus* as model organism[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 102(3): 736-747
- [18] Ren J, Li N, Chen C, et al. Establishment of genetic transformation system for *Lactobacillus casei* LC2W[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2014, 5(4): 1028-1032 (in Chinese)  
任婧, 李楠, 陈臣, 等. 干酪乳杆菌 LC2W 最优电转化条

- 件的建立[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(4): 1028-1032
- [19] Gao L, Deng Y, Lu ZX, et al. Optimization of electroporation conditions for *P. polymyxa* JSa-9[J]. Food Science, 2014, 35(11): 89-94 (in Chinese)  
高玲, 邓阳, 陆兆新, 等. 多黏类芽孢杆菌 JSa-9 电转化方法的优化[J]. 食品科学, 2014, 35(11): 89-94
- [20] Qin YJ, Jin JL, Bao XM, et al. Transformation of *S. cerevisiae* by electroporation[J]. Journal of Shandong University, 1999, 34(2): 236-240 (in Chinese)  
秦玉静, 金建玲, 鲍晓明, 等. 影响酿酒酵母电击转化率的条件的条件[J]. 山东大学学报: 自然科学版, 1999, 34(2): 236-240
- [21] Zhao CY, Yang S, Ouyang LM, et al. High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the gram-positive bacteria *Bacillus coagulans* P4-102B[J]. Microbiology China, 2016, 43(6): 1388-1394 (in Chinese)  
赵春云, 杨颂, 欧阳立明, 等. 高渗提高凝结芽孢杆菌 P4-102B 菌株的电击转化效率[J]. 微生物学通报, 2016, 43(6): 1388-1394
- [22] Cao XM, Zhang HC, Li M, et al. Progress in study on electroporation efficiency for *Lactobacillus*[J]. Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences, 2008, 32(6): 590-593 (in Chinese)  
曹晓梅, 张虎成, 李曼, 等. 乳杆菌电转化的研究进展[J]. 军事医学科学院院刊, 2008, 32(6): 590-593
- [23] Yu BQ, Shen W, Zhuge J. An improved method for integrative electrotransformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic DNA[J]. China Biotechnology, 2005, 25(2): 78-81(in Chinese)  
余秉琦, 沈微, 诸葛健. 适用于异源 DNA 高效整合转化的谷氨酸棒杆菌电转化法[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(2): 78-81
- [24] Fan J, Xi XD, Huang Y, et al. Optimization of electroporation conditions for *Lactobacillus plantarum* G63[J]. Food Science, 2016, 37(3): 180-185 (in Chinese)  
范璟, 席雪冬, 黄彦, 等. 植物乳杆菌 G63 电转化方法的优化[J]. 食品科学, 2016, 37(3): 180-185
- [25] Yu JN, Song XJ, Wang GJ, et al. Optimization of electroporation conditions for *Lactococcus Lactis*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2013, 41(8): 34-36 (in Chinese)  
于建宁, 宋小敬, 王公金, 等. 乳酸乳球菌电转化方法的优化[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(8): 34-36
- [26] Wang C, He TT, Song T, et al. The construction and application of a genetic manipulation system for *Bacillus pumilus*[J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 2017, 54(5): 1083-1088 (in Chinese)  
王超, 贺婷婷, 宋婷, 等. 短小芽孢杆菌遗传操作系统的建立及应用[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2017, 54(5): 1083-1088
- [27] Wei YY, Wang LF, Xiong ZQ, et al. Optimization of electroporation efficiency of *Lactococcus Lactis* using response surface methodology[J]. Journal of University of Shanghai for Science and Technology, 2018, 40(6): 566-571 (in Chinese)  
韦云莹, 王立峰, 熊智强, 等. 响应面法优化乳酸乳球菌电转化效率研究[J]. 上海理工大学学报, 2018, 40(6): 566-571
- [28] Zhang Z, Ding ZT, Shu D, et al. Development of an efficient electroporation method for iturin a-producing *Bacillus subtilis* ZK[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(4): 7334-7351
- [29] Xia ZF, Shi GY, Zhang L, et al. Optimization of electroporation processing of *Lactobacilli*[J]. Food Science, 2008, 29(2): 205-209 (in Chinese)  
夏子芳, 石贵阳, 张梁, 等. 乳杆菌电转化条件的优化[J]. 食品科学, 2008, 29(2): 205-209