

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.

乳酸乳球菌电转化方法的优化

于建宁¹,宋小敬²,王公金¹,潘伟芹¹,徐小波¹,于峰祥³,李 燕³

(1. 江苏省农业科学院畜牧研究所,江苏南京 210014; 2. 山东省荣成市畜牧兽医局,山东荣成 264300;

3. 南京师范大学医学分子生物学重点实验室,江苏南京 210097)

摘要:乳酸菌转化效率不高是制约其广泛应用的关键因素。为建立乳酸乳球菌的高效电转化方法,主要从电压、电阻、细菌生长时期及电击缓冲液等影响电转化的因素入手,根据每微克 DNA 获得的转化子的多少,评价乳酸乳球菌的电转化效率。结果显示:当电压为 2.0 kV、电阻为 400 Ω 、细菌处于对数生长期、电击缓冲液为磷酸缓冲液时,电击乳酸乳球菌 MG1363 的转化效率最高,为 1 300 个/ μ g。表明通过优化电转化参数,可以提高乳酸乳球菌的转化效率,为拓展乳酸乳球菌的应用范围奠定基础。

关键词:乳酸乳球菌;电转化;电压/电阻;生长时期;电击缓冲液

中图分类号:Q939.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)08-0034-03

乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)是一类广泛分布于自然界,在工业、农业和医学等领域与人类生活密切相关,微好氧,能够发酵碳水化合物、产生乳酸的革兰氏阳性菌。乳酸菌包括乳球菌和乳杆菌,其中乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)是乳球菌属(*Lactococcus*)中最重要的、最典型的一个种,乳酸乳球菌为兼性厌氧的革兰氏阳性球菌,细胞对称生长,因易于培养、生长迅速等优点而成为表达外源基因的理想菌株,因此常作为乳酸菌基因工程受体菌的标准菌株。与目前日益完善的大肠杆菌、酵母菌表达系统相比,乳酸菌的分子生物学研究起始较晚。但是近年来,随着乳酸菌各类表达调控元件的分离,相继发展了一批适用于乳酸菌的克隆载体与表达载体^[1]。pMG36e 是最常用于乳酸乳球菌的一种表达型质粒,1989 年由 Vander 等学者构建成功^[2],可在大肠杆菌(*E. coli*)与乳酸菌中进行复制,质粒大小为 3.61 kb,由强启动子 P32 及其下

游的部分开放阅读框、多克隆位点、来自乳酸乳球菌乳脂亚种蛋白酶基因的转录终止子及 PWV01 复制子、红霉素抗性基因 Emr 等组成。近来,科研工作者以 pMG36e 为基本质粒进行了很多改造,如加上 *lacZ* 基因、*Nsr* 基因、*Nisin* 基因等,替代原有的红霉素抗性,使该质粒得到了更深入的应用^[3-6]。

由于乳酸乳球菌属于革兰氏阳性菌,具有厚且致密的刚性细胞壁,常规的化学方法无法使外源 DNA 进入受体细胞。目前,乳酸菌转化外源 DNA 的方法主要有原生质体转化法和电转化法。原生质体转化法操作繁琐、耗时较长、转化效率低,而电转化法则具有省时、简便、受体范围广泛等优点,已成为目前乳酸菌转化的主导方法。然而影响电转化效率的因素较多,如乳酸菌是否经过前期处理(甘氨酸、溶菌酶、醋酸锂、DTT 等)^[7-9]、乳酸菌所处的生长周期及电转化的参数都会对转化效率产生重要影响^[10]。因此,本试验以乳酸乳球菌为研究对象,从影响电转化效率的几个因素入手,探讨常用乳酸菌质粒 pMG36e 转化到乳酸乳球菌中的效率,建立并优化乳酸乳球菌的电转化方法,为后期乳酸菌的深入研究和广泛应用奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 培养基的配制

GM17 液体培养基:分别称取大豆蛋白胨 5 g、胰蛋白胨 5 g、酵母浸提物 2.5 g、维生素 C 0.5 g、MgSO₄ 0.25 g、磷酸氢

收稿日期:2013-01-17

基金项目:农业部转基因生物新品种培育重大专项(编号:2011ZX08006-004);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(10)421]。

作者简介:于建宁(1980—),女,山东烟台人,博士,副研究员,主要从事动物发育生物学研究。Tel:(025)84390341;E-mail:jianningyu@yahoo.com.cn。

通信作者:王公金,博士,研究员,主要从事动物胚胎工程研究。E-mail:wgjphd@yahoo.cn。

[2] 庞有志. 家兔的实验动物学价值[J]. 中国养兔,2011(9):15-18.

[3] 张 志,杜若甫. 磷酸葡萄糖变位酶 1 的群体遗传学研究[J]. 国外医学:遗传学分册,1989(2):61-67.

[4] 伍新尧,郭云荣,陈丽娟,等. 精液/斑的 PGM-1 亚型分型研究[J]. 中山医科大学学报,1988,9(4):65-67.

[5] Douglas G R, McAlpine P J, Hamerton J L. Regional localization of loci for human PGM and 6PGD on human chromosome one by use of hybrids of Chinese hamster-human somatic cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1973,70(10):2737-2740.

[6] Whitehouse D B, Putt W, Lovegrove J U, et al. Phosphoglucosylase

1: complete human and rabbit mRNA sequences and direct mapping of this highly polymorphic marker on human chromosome 1[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992,89(1):411-415.

[7] 陈良忠,颜永杉. 我国几个民族中毛发根葡萄糖磷酸变位酶-1 的亚型分布[J]. 人类学学报,1984,3(3):285-289.

[8] Hu J, Du R. Polymorphism of phosphoglucosylase 1 (PGM1) in five Han subpopulations in China[J]. Gene Geography, 1995,9(1):1-4.

[9] 魏小文,韦石松,齐和平,等. 肿瘤患者血清 PGM 测定结果分析[J]. 海军医学,1994(1):49-51.

二钾 10 g、甘油 10 g、乳糖 5 g、葡萄糖 5 g,加入 800 mL ddH₂O,调节 pH 值至 6.2,定容至 1 L,高压灭菌 15~20 min。

GM17 固体培养基:量取 100 mL GM17 液体培养基,加入 1.5~2 g 琼脂粉,搅拌均匀后,121 ℃、高压灭菌 15~20 min。

SGM17 高渗培养基:称取 10 g 蔗糖置于烧杯中,加入 GM17 液体培养基溶解,定容至 100 mL,高压灭菌,4 ℃ 保存。

SGM17MC 恢复培养基:10 mL 无菌 SGM17 高渗培养基在临用前加入 2 mol/L MgCl₂ 100 μL、0.5 mol/L CaCl₂ 40 μL,混匀后 4 ℃ 保存。

洗涤液 I (EB):称取 10 g 蔗糖于烧杯中,加入 10 mL 甘油,加入一定量的水溶解,定容至 100 mL。

洗涤液 II:称取 10 g 蔗糖于烧杯中,加入 10 mL 甘油,加入一定量的水溶解,加入 2 mol/L MgCl₂ 1 mL,高压灭菌。

电击缓冲液(PEB):取 100 mL 的洗涤液,加入 20 μL 磷酸缓冲液,使磷酸缓冲液终浓度为 5 mmol/L。

1.2 大肠杆菌 DH5α 的感受态的制备

(1)挑取大肠杆菌单克隆至 4 mL LB 管中,37 ℃ 摇菌过夜。(2)将 4 mL 菌液转接至 100 mL 无抗生素 LB 培养基,37 ℃ 摇菌约 2~3 h,期间准备 TBS 溶液,按表 1 配方准备 10 mL TSB 液。(3)将 100 mL 菌液转移至 50 mL 离心管中,4 ℃ 下 3 000 g 离心 5 min,倒掉上清,在冰浴条件下吹打重悬于 10 mL TBS 液中,置冰上 10 min。(4)将细菌悬液快速地分装至若干个已灭菌、预冷的 0.5 mL 离心管中(每管装 55 μL),放于 -70 ℃ 低温冰箱保存。

表 1 大肠杆菌感受态 TBS 溶液配制

母液	体积	终浓度
LB	7.3 mL	—
50% PEG MW4000	2 mL	10%
DMSO	0.5 mL	5%
1 mol/L MgCl ₂	100 μL	10 mol/L
1 mol/L MgSO ₄	100 μL	10 mol/L

1.3 大肠杆菌的转化

取出质粒 pMG36e,取出冻存的 5 × KCM 贮存液 10 μL、水 30 μL、DNA (连接产物) 10 μL,共计 50 μL,吹打混匀后置 65 ℃ 水浴 10 min。将感受态菌液全部加至 1 × DNA 混合物中,轻轻旋转混匀,在冰中放置 20 min,取出后置室温 10 min,加入 400 μL 无抗生素的 LB 液体培养至上述的感受态细胞/DNA 混合物中,置 37 ℃ 摇床慢速摇菌 1 h,12 000 r/min 离心 30 s,弃上清。吹打残渣重悬沉淀,将菌液全部转移到 LB 平板,涂布均匀。倒置平板于 37 ℃ 过夜培养 12~16 h。

1.4 pMG36e 的大量提取

挑取状态良好的菌落在 LB 液体培养基中扩大培养,采用质粒提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)进行大量抽提备用。

1.5 乳酸乳球菌 MG1363 感受态的制备

接种 MG1363 于 GM17 培养基,30 ℃ 培养过夜,按 5% 接种量接种于含 1% 甘氨酸的高渗 GM17 培养基(SGM17)至吸光度为 0.2、0.4、0.6、0.8,培养结束后将细菌培养物冰浴 10 min,离心收集菌体,用冰冷的甘油磷酸缓冲液洗涤菌体 3 次,最后采用菌液体积 1/100 的电击缓冲液重悬菌体。

1.6 乳酸乳球菌的电转化

取 10 μL pMG36e 与感受态 MG1363 混合,冰浴 10 min,电击。

首先在电阻 200 Ω 下选择不同电压(1.0~2.5 kV)条件进行电转化;再在转化效率最高的电压下选择不同电阻(200~800 Ω)条件电击感受态细胞,在恢复培养基 SGM17MC 中培养 3 h 后,取 200 μL 涂于含有 10 μg/mL 红霉素的平板上,30 ℃ 静置培养 1~2 d 后,观察结果。根据质粒 DNA 浓度,计算单位质量 DNA 所得的转化子个数(个/μg),即转化效率,每项条件优化做 3 次重复试验。

将质粒转化处于不同对数期的乳酸乳球菌 MG1363 试验菌株的感受态在恒定电压和电阻条件下进行电击,同样在恢复培养后涂板,计算转化效率。

制备对数生长中期的乳酸乳球菌 MG1363,分别用 2 种电击缓冲液(PEB 和 EB)重悬菌体,在恒定电压和电阻条件下进行电击,同样在恢复培养后涂板,计算转化效率。

2 结果与分析

2.1 电压与电阻对乳酸乳球菌 MG1363 电转化的影响

选择乳酸乳球菌 MG1363 对数生长期制备感受态,在不同电压和不同电阻条件下进行转化。图 1 显示,当电压为 2.0 kV 时转化效率最高,达 360 个/μg。图 2 显示,当电阻为 400 Ω 时转化效率最大,达 1 200 个/μg。

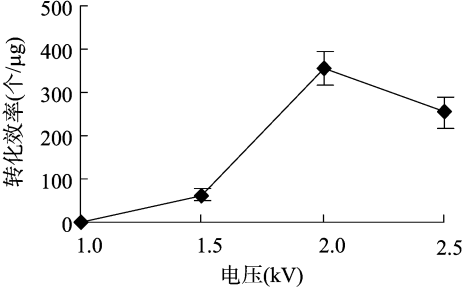


图1 电压对电转化效率的影响

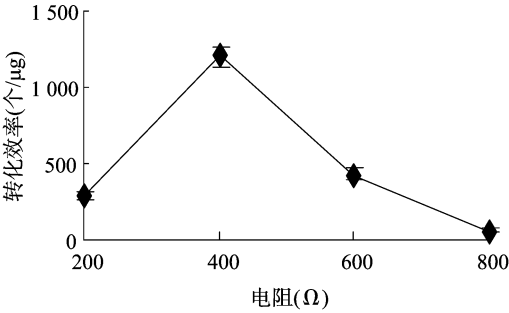


图2 电阻对电转化效率的影响

2.2 细菌对数生长期的选择

由图 3 可以看出,随着细菌培养时间的延长,转化效率增加,至对数期后期转化效率降低,细菌在培养至对数中期时转化效率最高,达 1 200 个/μg,这可能是因为对数生长中期细胞生长旺盛,细胞壁结构相对疏松,有利于电击时孔洞的形成,从而使电击时转化效率升高。

2.3 电击缓冲液对转化效率的影响

用 2 种电击缓冲液 PEB 和 EB 分别转化对数生长中期的

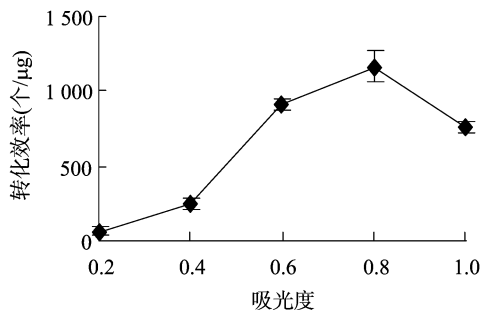


图3 不同生长时期细胞对转化率的影响

乳酸乳球菌,结果如图4所示。用PEB作电击缓冲液的转化效率显著高于EB缓冲液,前者的转化效率为1300个/μg,后者则为200个/μg,两者几乎差一个数量级。

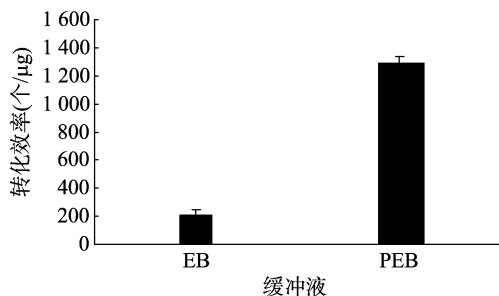


图4 不同电击缓冲液对转化率的影响

3 讨论

乳酸乳球菌属于革兰阳性菌,外源DNA很难直接进入细胞内,用氯化钙法、KCM法等化学方法转化均未得到阳性菌株,因此采用电转化法。由于乳酸菌电转化具重复性差、转化效率低等缺点,因此本试验利用质粒pMG36e转化乳酸乳球菌MG1363研究影响电转化效率的因素,为后续开展深入研究奠定基础。

电穿孔作用利用瞬间高压击打细胞膜,使之形成孔洞,使DNA分子得以进入细胞^[11]。在电击过程中,若电压过低,则细胞难以极化产生孔洞,DNA不能进入;若电压过高,则细胞会因细胞膜损伤过大而死亡,从而导致转化效率的降低,因此在电转化过程中电压条件的优化极为关键。在试验中,一般常用0.2 cm的电击杯,微生物电转化过程电压一般在1.2~2.4 kV之间,但不同的乳酸菌菌株的最适电压存在很大差异。例如,干酪乳杆菌的最高转化效率为电压2.4 kV^[10],而副干酪乳杆菌则须电压控制在1.8 kV^[12],而本试验中乳酸乳球菌MG1363的最佳电压是2.0 kV。电阻也是影响电转化效率的一个重要参数,但是影响较电压小。本试验结果表明,在400 Ω时转化乳酸乳球菌MG1363得到的转化效率最高,这与孙磊等转化乳酸乳球菌MG1614的试验结果^[13]是一致的。

不同生长时期的细菌对电击的敏感程度存在着显著差异。有研究表明,干酪乳杆菌、土壤杆菌、棒杆菌类、各种葡萄球菌以及一些芽孢杆菌培养到对数中期时电转化效率最高^[12,14],然而有些革兰阳性细菌,如乳链球菌、短芽孢杆菌和梭状芽孢杆菌等则培养到静止期或静止前期最适于电转化^[14]。乳酸乳球菌MG1363也是处于对数生长中期的电转化效率最高。之所以存在这种差异,可能是因为菌种之间的细胞壁结构不同。

在电转化中还涉及到电击缓冲液的问题,一般常用介质有甘油蔗糖溶液、磷酸盐缓冲液或蒸馏水,这些介质均能用于电转化,但不同细菌在不同介质中的转化效率显然是有差别的。10%甘油蔗糖溶液(EB)转化效率并不理想,加入适量浓度的磷酸缓冲液(PEB)能提高电转化效率;但在高电压的情况下,尽量选用离子浓度低甚至不含离子的电击液,这样在高电压下细菌不易被击穿,可提高转化效率^[14]。在本试验条件下,EB中的转化效率显著低于PEB,进一步证实了上述的一般规律。

除以上所述的影响因素之外,外源DNA进入乳酸菌的其他屏障还包括质粒本身的大小与浓度、抗生素筛选的浓度、乳酸菌菌株内部的限制系统,载体和受体菌本身固有质粒的不相容性等,因此在对某种乳酸菌进行电转化之前,必须优化这些条件,才能使后续试验达到理想的效果。

参考文献:

- [1] de Vos W M. Gene expression systems for lactic acid bacteria[J]. Current Opinion in Microbiology, 1999, 2(3): 289–295.
- [2] van de Guchte M, van der Vossen J M, Kok J, et al. Construction of a lactococcal expression vector; expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*[J]. Applied and Environment Microbiology, 1989, 55(1): 224–228.
- [3] 陈秀清, 胡海菁, 杨巍, 等. 乳链菌肽前体基因(*nisZ*)在乳酸乳球菌中的克隆和表达[J]. 遗传学报, 2001, 28(3): 285–290.
- [4] 丁寅寅, 马会勤, 左芳雷, 等. 乳酸菌载体pMG36e的应用现状[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(11): 106–111.
- [5] 贺松, 龚芳红, 张德纯, 等. 嗜酸乳杆菌β-半乳糖苷酶基因的克隆及其作为食品级筛选标记的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(5): 777–781.
- [6] 张莉, 秦泽荣, 崔尚金, 等. 柔嫩艾美耳球虫TA4抗原基因cDNA在乳酸乳球菌中的克隆与表达[J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(3): 271–274.
- [7] Buckley N D, Vadeboncoeur C, Leblanc D J, et al. An effective strategy, applicable to *Streptococcus salivarius* and related bacteria, to enhance or confer electroporation competence[J]. Applied and Environment Microbiology, 1999, 65(9): 3800–3804.
- [8] Ho P S, Kwang J, Lee Y K. Intragastric administration of *Lactobacillus casei* expressing transmissible gastroenteritis coronavirus spike glycoprotein induced specific antibody production[J]. Vaccine, 2005, 23(11): 1335–1342.
- [9] Papagianni M, Avramidis N, Filioussis G. High efficiency electrotransformation of *Lactococcus lactis* spp. *lactis* cells pretreated with Lithium acetate and dithiothreitol[J]. BMC Biotechnology, 2007, 7: 15.
- [10] 格日勒图, 王艳霞, 包秋华, 等. 电转化方法将外源性质粒导入干酪乳杆菌的研究[J]. 中国乳品工业, 2009, 37(2): 9–13.
- [11] Meilhoc E, Masson J M, Teissié J. High efficiency transformation of intact yeast cells by electric field pulses[J]. Biotechnology (Nature Publishing Company), 1990, 8(3): 223–227.
- [12] 葛菁萍, 高先军, 由田, 等. 副干酪乳杆菌HD1.7遗传转化体系的初步建立[J]. 中国农学通报, 2011, 27(23): 102–108.
- [13] 孙磊, 孔文涛, 孔健. 乳酸乳球菌电转化条件的研究[J]. 山东大学学报: 理学版, 2005, 40(3): 121–124.
- [14] 陈乃用. 电穿孔法在细菌质粒转化中的应用[J]. 微生物学通报, 1991, 18(2): 97–103.