

韩光杰,孙俊,李传明,等. 苏云金芽孢杆菌原生质体的制备及大质粒转化[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):37-40.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.010

苏云金芽孢杆菌原生质体的制备及大质粒转化

韩光杰,孙俊,李传明,刘琴,徐健

(江苏里下河地区农业科学研究所,江苏扬州 225007)

摘要:研究苏云金芽孢杆菌原生质体制备与再生的最佳条件,为进一步提高原生质体转化率打下基础。通过酶解法对苏云金芽孢杆菌库斯塔克亚种工业生产菌株(*Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki*) 2671 原生质体的制备及再生条件进行了研究,考察了菌体生长状态、溶菌酶浓度、处理时间等影响因素,采用 PEG 法对大质粒进行原生质转化。结果表明,对数生长前期的菌体(培养 3 h),以 SMML 作渗透压稳定剂,溶菌酶浓度 7 mg/mL,40 ℃ 下酶解 40 min,原生质体生成量可达 5.7×10^7 个/mL,再生率可达 14.1%。在此条件下,采用 PEG 法可将大质粒 pLTV1-ep 成功转化宿主菌,转化率为 0.3 CFU/μg。

关键词:苏云金芽孢杆菌;原生质体;制备;转化

中图分类号:S482.3⁺9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)11-0037-03

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*,简称 Bt)是使用最为广泛的生物农药^[1]。目前,已经从 Bt 的不同亚种中分离了超过 100 种杀虫晶体蛋白^[2-3],但每个亚种的致病力又极其有限。插入外源基因构建工程菌是提高其杀虫效果的有效方法之一。Bourgouin 等将球形芽孢杆菌的毒素基因成功转入 Bt 并表达^[4]。Barboza-Corona 等将几丁质酶基因导入 Bt 中,并分析了工程菌孢子及杀虫晶体的形成情况^[5]。

目前,工程菌的构建主要采用原生质体转化和电转化。Yu 等通过电转化将 cyt1Aa 和 cry11Aa 导入 Bt 中产生工程菌 TnX,并将 Bt 菌株 S184-Tet 与 TnX 进行原生质融合,形成了新的重组菌 TnY^[6]。Akamatsu 等利用原生质体转化将质粒 pC194、pUB110、pCB1、pAC32R2 成功导入枯草芽孢杆菌^[7]。然而在构建 Bt 工程菌时多采用电转化^[8-10],对原生质体转化的研究则相对较少,与电转化相比,原生质体转化相对温和,不需转化设备,获得阳性转化子的概率较大,在试验条件不足、感受态形成受阻或大质粒转化时,原生质转化显得尤其重要。

不同 Bt 菌株的理化性质、毒素基因的遗传定位都不尽相同^[11],这就决定了每个菌株的原生质形成条件是不同的。研究表明,菌龄、溶菌酶的浓度、处理时间等对原生质体的形成有很大影响^[12],原生质体的形成率与再生率也影响着原生质转化效率^[13]。本研究通过对苏云金芽孢杆菌库斯塔克亚种原生质体形成的影响因素、再生率及大质粒原生质转化的分析,建立起一套完整的原生质体转化方法,为基因工程改良奠

定了技术基础,也为不同菌株原生质转化提供了一种模式。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

苏云金芽孢杆菌库斯塔克亚种(*B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* 2671)为实验室野外分离菌株,具有高效杀虫活性,已工业化生产。质粒 pLTV1-ep 为笔者所在实验室构建含增效蛋白基因的 Tn917 转座子载体,其大小为 23.3 kb。

1.2 试剂及培养基

溶菌酶购于碧云天生物公司,PEG6000 购于上海生工。2×SMM:0.1 mol/L 顺丁烯二酸,0.5 mol/L 蔗糖,0.02 mol/L MgCl₂·6 H₂O。SMML:由 2×SMM 和 4×LB 等体积混合而成。

DM3 再生培养基:每 100 mL 含 1.6 g 琼脂粉,50 mL 1 mol/L 琥珀酸钠(pH 值 7.3),2 g 酪蛋白氨基酸水解物,1 g 酵母膏,0.7 g K₂HPO₄、0.3 g KH₂PO₄、0.234 g NaCl、3 mL 20% 葡萄糖、500 μL 2% 牛血清白蛋白。

1.3 原生质体的制备和再生

参考 Bianca 等的方法^[12,14],并进行优化。从新鲜平板上挑一单菌落,接种于 5 mL LB 培养基中,30 ℃、250 r/min 培养过夜后以 1% 接种量转接到新鲜的 25 mL LB 培养基中,振荡培养 3 h。离心收集菌体,用 4 mL SMML 重悬,加 200 mg/mL 溶菌酶至终浓度为 7 mg/mL,40 ℃、100 r/min 培养 50 min 至 85% 的细胞变为原生质体。将原生质体离心去掉酶液,悬于 SMML 中,经稀释后涂布于 DM3 再生培养基上,培养 2~3 d,计算原生质体的形成率及再生率。计算方法为:

$$\text{形成率} = (A - B) / A \times 100\%;$$

$$\text{再生率} = (C - B) / (A - B) \times 100\%。$$

式中:A、B 分别为溶菌酶处理前后在 LB 培养基上的菌落数;C 为溶菌酶处理后在高渗培养基上的菌落数。

1.4 原生质体的转化

根据 Chang 等的方法进行优化^[15]。培养 2 d 后,计算转化率。

1.5 转化子的检测

挑取抗性平板的单菌落,接种于红霉素(15 μg/mL)抗性 LB

收稿日期:2014-07-28

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(编号:201103021);国家自然科学基金(编号:301071740);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(13)5069];江苏省农业科技支撑计划(编号:BE2011358);江苏扬州市农业科技攻关(编号:2012095)。

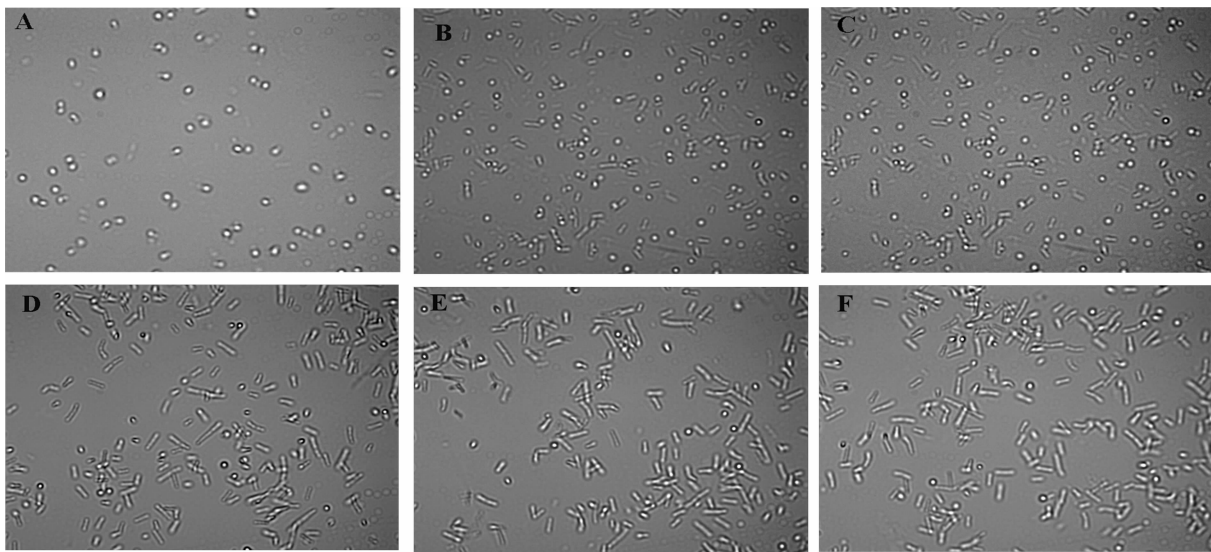
作者简介:韩光杰(1987—),男,安徽桐城人,硕士,研究实习员,主要从事农业害虫生物防治研究。E-mail:hanguangjie177@163.com。
通信作者:徐健,博士,研究员,主要从事农业害虫生物防治研究。
Tel:(0514)87302019;E-mail:bio-xj@163.com。

培养基中,30 ℃、250 r/min 培养过夜后,提取质粒,PCR 检测。

2 结果与分析

2.1 菌体生长状态对原生质体形成的影响

细胞的菌体生长状态是决定苏云金芽孢杆菌原生质体形成的重要因素。在转接培养时,分别取对数前、中、后、稳定期



A、B、C、D、E、F 分别是培养 3、4、5、6、8、10 h 后溶菌酶

图1 菌体培养时间对原生质体形成的影响 (10×40)

2.2 溶菌酶浓度对原生质体形成的影响

收集培养至对数前期 3 h 的菌体,用 SMML 重悬,分别以 1、2、3、4、5、6、7、8、9 mg/mL 9 个不同浓度的溶菌酶在 42 ℃、100 r/min 下酶解 1 h,结果见图 2。原生质体形成时酶浓度对其有极大影响。当溶菌酶浓度为 1 mg/mL 时,原生质体的形成率最小,为 53.1%;随着溶菌酶浓度的提高,原生质体形成率越来越大,当溶菌酶浓度为 9 mg/mL 时,原生质体的形成率达到 95%,但溶菌酶浓度越高,原生质体形成率就越低。原生质体形成率达到 85% 以上基本能满足试验要求,此时溶菌酶浓度为 7 mg/mL。

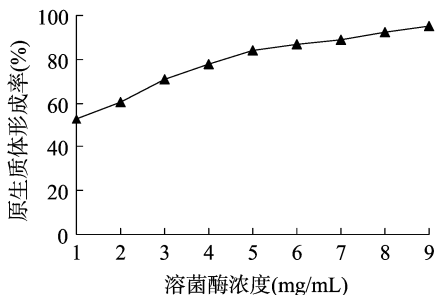


图2 溶菌酶浓度对原生质体形成的影响

2.3 酶解温度对原生质体形成的影响

温度对酶解作用有双重影响,温度升高,酶解作用加快,温度降低,酶解时间延长,原生质体被毒害作用增加。分别以 32、35、37、40、42 ℃ 5 个温度酶解 1 h 进行试验,结果见图 3。随着温度升高,原生质体的形成率变大,42 ℃ 酶解 1 h,原生质体形成率能达到 94.4%,但原生质体的形成量很低。在 40 ℃ 时,原生质体的生成量相对较高,形成率达到 87.9%。

的菌体制备原生质体,研究菌体生长状态对原生质体形成的影响,使用 5 mg/mL 的溶菌酶处理菌体,42 ℃ 水浴 1 h 后镜检。从图 1 中可以发现,对数早期,转接培养 3 h 的菌体能形成大量的原生质体,培养 4 h 后原生质体形成减少,且有很多杆状菌体存在。随着培养时间的延长,原生质体的形成量逐渐降低,对数后期和稳定期基本不形成原生质。

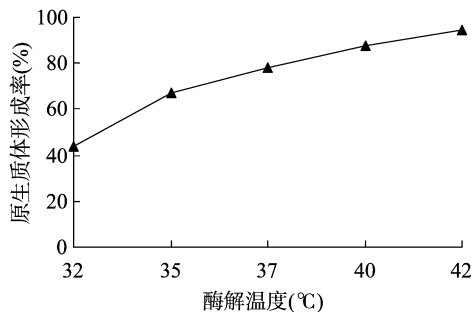


图3 酶解温度对原生质体形成的影响

2.4 酶解时间对原生质体形成的影响

溶菌酶对细菌的质膜会有一定的破坏,因此酶解时间的长短会严重影响原生质体的再生。将菌体分别酶解 30、40、50、55、60 min 后稀释涂布再生培养基,结果见表 1。酶解温度 40 ℃ 时,随着酶解时间的增长,原生质体的形成率逐渐增大,原生质体的形成量在酶解 50 min 时达到最大,为 7.4×10^7 CFU/mL,但原生质体再生率在酶解 40 min 达到最大值,为 14.1%,酶解 60 min 后,原生质体基本上不能再生。

2.5 原生质体的转化与检测

使用带有红霉素抗性的质粒 pLTV1-ep 转化 *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* 2671,转化率为 0.3 CFU/μg。挑取阳性转化子,经菌落 PCR 扩增,结果有 2.7 kb 左右大小的目的条带,与预期大小一致,表明得到的转化子为阳性(图 4)。

3 讨论

苏云金芽孢杆菌作为微生物杀虫剂,在中国被广泛应用,基因工程杀虫菌的研究为提高杀虫活性和杀虫谱提供了重要

表 1 酶作用时间对原生质体形成及再生的影响

| 酶解时间 (min) | 原生质体数 (CFU/mL) | 原生质体形成率 (%) | 原生质体再生率 (%) |
|---------------|-------------------|----------------|----------------|
| 30 | 1.9×10^7 | 61.3 | 10.7 |
| 40 | 5.7×10^7 | 87.6 | 14.1 |
| 50 | 7.4×10^7 | 93.7 | 6.2 |
| 55 | 7.2×10^7 | 94.1 | 0.7 |
| 60 | 5.4×10^7 | 97.3 | 0.05 |

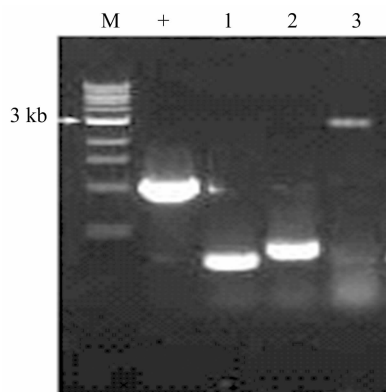
M为marker;+为 *cyt* 阳性基因对照;1、2、3为检测的转化子(其中3为阳性)

图4 苏云金芽孢杆菌转化子 PCR 分析结果

方向。前人在构建工程菌的时候多采用电转化。电转化理论上的转化效率较高,但质粒较大时就很难转化,且缓冲液配方的选择是形成感受态的关键因素。相关方面前人已有较多研究^[9-10,16-18],制作不同的电击缓冲液,并摸索了电击转化条件等影响因素,质粒 pLTV1-ep 均不能被转化。可能由于该质粒大于 15 kb,电击转化相对较难,且该菌株不易形成感受态。原生质体转化则从理论上讲,所有菌株都应该可以被成功转化的,除非有限制修饰系统。然而在形成原生质体的时候,会受到各个因素的影响,比如菌体培养时间、溶菌酶浓度、酶解温度、酶解时间等。本研究从上述因素分析了 *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* 2671 菌株原生质体的形成条件、再生率及转化。

苏云金芽孢杆菌为革兰氏阳性细菌,细胞壁较壁中肽聚糖层厚,原生质体较难制备。菌龄过大,细胞壁致密,对酶有抗性,原生质体形成较难;菌龄较小,制备的原生质体大小不均,量小且易破裂不易再生。本研究采用 1% 接种量培养 3 h 后,获得稳定性好、形成率高的原生质体。相关文献报道,在培养时添加甘氨酸,可以直接形成原生质体,本研究按此方法,在转接时添加 4% 的甘氨酸培养 4 h 后,形成了原生质体,但原生质体的形成量极低,且菌液黏稠,不适宜用于原生质转化。

不同的细菌还需要调整原生质体制备液各组分的含量和 pH 值。相关研究表明,增加马来酸的含量可以提高原生质体的形成率,本研究在使用含 0.02 mol/L 马来酸的制备液时,原生质体很难形成,但含量增加到 0.1 mol/L 时,原生质体形成就相当稳定。细胞酶解的 pH 值也随着酶和菌种的特性而定。韩璞等在 pH 值为 8.0 的溶液中制备了罗伊氏乳杆菌原生质体^[19];Boixet 等在 pH 值 7.0 的溶液中制备保加利亚乳杆菌的原生质体^[20];莫静燕等在 pH 值 6.5 的溶液中制备了

地衣芽孢杆菌的原生质体。本研究选用溶菌酶最适的 pH 值 6.5 的条件下制备了原生质体,研究结果表明,只有当菌龄很低的时候,才能形成原生质体,菌龄超过 3 h 后,原生质体形成率就很低,可能由于菌龄增大,细胞壁厚度增加,不利于溶菌酶的作用。在后期的研究中发现,提高 pH 值至 8.0 时,原生质的形成不受菌龄的影响,但再生率下降。

本研究对 *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* 2671 原生质体的研究主要集中在制备、再生方面,但原生质体最终目的是用于 DNA 转化。在质粒转化的研究中,主要参考 Chang 等的方法^[15],选用 40% PEG6000 介导,成功获得阳性转化子。在保证原生质体感受状态的条件下,原生质体的转化效率还与质粒的构型、选择标记相关。本研究在电转化无法进行的情况下,利用原生质体转化成功获得阳性转化子,但转化效率还很低,原生质体的形成和转化还有待继续优化。

参考文献:

- [1] Shao Z Z, Yu Z. Enhanced expression of insecticidal crystal proteins in wild *Bacillus thuringiensis* strains by a heterogeneous protein P20 [J]. *Current Microbiology*, 2004, 48 (5): 321-326.
- [2] Schnepf E, Crickmore N, Van R J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal proteins [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62: 775-806.
- [3] Crickmore N, Zeigler D R, Feitelson J, et al. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62 (3): 807-813.
- [4] Bourgouin C, Delécluse A, de la Torre F, et al. Transfer of the toxin protein genes of *Bacillus sphaericus* into *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and their expression [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56 (2): 340-344.
- [5] Barboza - Corona J E, Ortiz - Rodríguez T, de la Fuente - Salcido N, et al. Hyperproduction of chitinase influences crystal toxin synthesis and sporulation of *Bacillus thuringiensis* [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2009, 96 (1): 31-42.
- [6] Yu J, Pang Y, Tang M, et al. Highly toxic and broad - spectrum insecticidal *Bacillus thuringiensis* engineered by using the transposon Tn917 and protoplast fusion [J]. *Current Microbiology*, 2001, 43 (2): 112-119.
- [7] Akamatsu T, Taguchi H. Plasmid transformation of competent *Bacillus subtilis* by lysed protoplast DNA [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2012, 114 (2): 138-143.
- [8] Kalman S, Kiehne K L, Cooper N, et al. Enhanced production of insecticidal proteins in *Bacillus thuringiensis* strains carrying an additional crystal protein gene in their chromosomes [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61 (8): 3063-3068.
- [9] 李林, 邵宗泽, 喻子牛. 电脉冲法转化苏云金芽孢杆菌 BMB171 的研究 [J]. *微生物学通报*, 2000, 27 (5): 331-334.
- [10] 刘萍, 夏立秋, 胡胜标, 等. 外源基因在苏云金杆菌染色体上的定点整合及表达 [J]. *微生物学报*, 2008, 48 (5): 661-666.
- [11] Fischer H M, Lüthy P, Schweitzer S. Introduction of plasmid pC194 into *Bacillus thuringiensis* by protoplast transformation and plasmid transfer [J]. *Archives of Microbiology*, 1984, 139 (2/3): 213-217.
- [12] 莫静燕, 陈献忠, 王正祥. 地衣芽孢杆菌原生质体的制备、再生及转化研究 [J]. *生物技术*, 2009, 19 (5): 75-77.

张颖,李冰,朱健,等. 异育银鲫中科 3 号 *MSTN* 基因的克隆与序列分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):40-44.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.011

异育银鲫中科 3 号 *MSTN* 基因的克隆与序列分析

张颖^{1,2}, 李冰², 朱健^{1,2}, 蒋高中^{1,2}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院,江苏无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,江苏无锡 214081)

摘要:采用同源克隆和末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends,RACE)方法分离克隆了异育银鲫(*Allogygogenetics crucian carp*)中科 3 号肌肉生长抑制素(myostatin,MSTN)基因全长 DNA,得到 3 394 bp 全长的 DNA,包含 3 段外显子和 2 段内含子,其中 2 098 bp 的全长 cDNA 在 NCBI 数据库中进行序列比对后,确定为异育银鲫中科 3 号 *MSTN* 基因。对推测的 *MSTN* 基因氨基酸序列进行同源性比对和系统分析显示:*MSTN* 基因在异育银鲫与斑马鱼及其他鱼类间的氨基酸序列相似度为 73.5%~98.0%,与鲤鱼 *MSTN* 基因相似度最高(98.0%),不同物种间 *MSTN* 的氨基酸序列较为保守。用半定量 RT-PCR 检测 *MSTN* 基因在异育银鲫心、肠、肌、脑、鳃和肝的相对表达量结果表明,*MSTN* 基因在脑中含量最高,其次是肌、鳃、心、肠,在肝脏中含量最低。

关键词:异育银鲫;肌肉生长抑制素;同源法克隆;末端快速扩增法;序列分析;组织表达分析

中图分类号:S917.4;Q785 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)11-0040-05

鲫鱼是我国重要的淡水经济养殖鱼类,异育银鲫(*Allogygogenetics crucian carp*)中科 3 号是当前主要的鲫鱼养殖品种之一。该品种是中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室桂建芳研究员等技术人员利用银鲫的双重生殖方式,从高体型(D 系)异育银鲫(♀)与平背型(A 系)异育银鲫(♂)交配所产后代中选育出来,再经精雌核培育而来的异育银鲫第 3 代新品种^[1]。中科 3 号异育银鲫具有生长速度快、遗传性状稳定等优点^[2-4],作为经济鱼类,其肌肉的生长发育是重要的生长过程,受分子水平调控等多因素的影响^[5]。

肌肉生长抑制素(myostatin,MSTN)又称生长分化因子-8(growth differentiation factor-8,GDF-8),属于转化生长因子- β (transforming growth factor- β ,TGF- β)超家族,是肌肉

发育和生长的负调控因子^[6]。该基因是 McPherron 等于 1997 年在小鼠骨骼肌的 cDNA 文库中发现的,试验表明,*MSTN* 基因敲除后的小鼠会发生肌细胞的增生与肥大,从而导致骨骼肌大量增加的现象^[6];牛中 *MSTN* 基因的自然缺失与突变也已被发现,突变结果导致 *MSTN* 基因失活,肌肉增生^[7-8]。

目前,已有不少关于 *MSTN* 基因克隆及作用机制的研究,包括哺乳类^[9-11]、鸟类^[12-14]动物,在鱼类的研究中,也有不少物种的 *MSTN* 基因被报道,包括斑马鱼(*Danio rerio*)^[8,15]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[16]、大麻哈鱼(*Salmo salar*)^[17]、莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)^[18]、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)^[19]、石首鱼(*Umbrina cirrosa*)^[20]、奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*)^[21]、鳊鱼(*Elopichthys bambusa*)^[22]、军曹鱼(*Rachycentron canadum*)^[23]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[24]、勒氏笛鲷(*Lutjanus russellii*)^[25]、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)^[26]、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)^[27]、真鲷(*Chrysophrys major*)^[28]、鳙鱼(*Aristichthys nobilis*)^[29]等。鱼类 *MSTN* 基因除在骨骼肌中表达外,还可在其他组织如脑、心脏、肾、肠、精巢、鳃、脾、眼、肝等中表达^[22,30],不同于哺乳动物和鸟类的表达谱^[31-32]。试验表明,*MSTN* 基因功能缺失可以导致斑马鱼肌肉数量和体积的增加^[15]。*MSTN* 通过内分泌、自分泌和旁分泌 3 种不同的作用途径发

收稿日期:2013-12-13

资助项目:国家科技支撑计划(编号:2012BAD25B07);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项基金(编号:2013JBFC08)。

作者简介:张颖(1988—),女,江苏南通人,硕士研究生,研究方向为水产动物遗传育种及养殖生物学。E-mail:867451280@qq.com。

通信作者:蒋高中,博士,研究员,主要从事渔业文化与科技发展、渔业科技史等研究。Tel:(0510)85550702;E-mail:jianggz@ffrc.cn。

[13]张义正,刘白玲,何先祺. 影响枯草杆菌原生质体转化的因素[J]. 微生物学通报,1997,24(4):210-213.

[14]Waschkau B, Waldeck J, Wieland S, et al. Generation of readily transformable *Bacillus licheniformis* mutants[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78(1):181-188.

[15]Chang S, Cohen S N. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA[J]. Molecular & General Genetics, 1979, 168(1):111-115.

[16]唐雪明,邵蔚蓝,王正祥,等. 地衣芽孢杆菌感受态细胞的形成及高效电转化[J]. 生物技术, 2002, 12(4):13-15.

[17]Lu Y P, Zhang C, Lv F X, et al. Study on the electro-transformation conditions of improving transformation efficiency for *Bacillus subtilis*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2012, 55(1):9-14.

tion conditions of improving transformation efficiency for *Bacillus subtilis*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2012, 55(1):9-14.

[18]Yang M M, Zhang W W, Bai X T, et al. Electroporation is a feasible method to introduce circularized or linearized DNA into *B. subtilis* chromosome[J]. Molecular Biology Reports, 2010, 37(5):2207-2213.

[19]韩璞,田洪涛,苑社强,等. 罗伊氏乳杆菌原生质体的制备与再生条件的研究[J]. 中国食品学报, 2010, 10(1):10-18.

[20]Boizet B, Flickinger J L, Chassy B M. Transfection of *Lactobacillus bulgaricus* protoplasts by bacteriophage DNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(12):3014-3018.