

刘雪娇,贾田惠,高同国,等. 贝莱斯芽孢杆菌 3A3-15 电击转化条件优化[J]. 江苏农业科学,2019,47(5):46-49.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.05.012

贝莱斯芽孢杆菌 3A3-15 电击转化条件优化

刘雪娇, 贾田惠, 高同国, 郭晓军, 李术娜

(河北农业大学生命科学学院,河北保定 071000)

摘要:对贝莱斯芽孢杆菌电击转化条件进行优化,以期建立其高效转化体系。采用 pIC333 质粒电击转化贝莱斯芽孢杆菌 3A3-15 野生型菌株,考察细胞生长阶段、电压、电阻和质粒 DNA 加入量对转化效率的影响。当细胞培养物 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.9,电压为 1.75 kV,电阻为 400 Ω ,质粒 DNA 加入量为 50 ng 时,其转化率最高达 7.92×10^4 CFU/ μg 。该研究为贝莱斯芽孢杆菌 3A3-15 菌株的基因和分子水平操作奠定了基础。

关键词:贝莱斯芽孢杆菌;电击转化;pIC333;优化

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)05-0046-04

贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)是一类重要的生防细菌^[1],对大丽轮枝菌、灰葡萄孢菌、尖孢镰刀菌、疮痂链霉菌、立枯丝核菌等多种植物病原菌有明显抑菌作用^[2]。随着现代分子生物技术的进步,利用基因工程手段对生防细菌改造以提高其生防效果成为当前研究的热点问题,但由于芽孢杆菌属于革兰氏阳性菌,其细胞壁厚而致密^[3],其基因转化效率较低^[4]。因此,建立并优化贝莱斯芽孢杆菌基因转化体系是对其进行分子操作的重要前提。

在大量的分子遗传研究方法中,转座子随机诱变技术因操作简便而备受关注,转座子及其衍生物作为插入突变原或分子标签已广泛应用于基因的分离和克隆中^[5],特别是某些具有随机转化特性的转座子,已成为发现新基因、克隆功能基因、发掘已知基因的新功能以及研究蛋白功能的有效工具^[6]。Tn10 转座元件是目前在芽孢杆菌中应用广泛的转座子之一,已成功应用于芽孢杆菌突变文库的构建及基因功能的研究,mini-Tn10 是目前应用比较成熟、广泛的 Tn10 转座子衍生物之一^[7]。而转座质粒 pIC333 是针对芽孢杆菌构建出来的改良的 mini-Tn10 载体^[8-9]。

目前外源基因导入宿主菌的主要手段有感受态法、原生质体转化法和电击转化法。其中,电击转化法由于操作简单、转化率相对较高而被广泛使用。该方法已在枯草芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、短芽孢杆菌等不同种芽孢杆菌上得到应用^[10-12]。芽孢杆菌不同种属间,电转化条件对电转效率的影响较大,导致不同细菌电击转化效率不同。如细胞生长 $D_{600\text{ nm}}$ 值为 0.7、pHY-P43 质粒 DNA 加量为 80 ng、恢复培养基山梨醇浓度为 0.8 mol/L、电转缓冲液为 SGM 以及电场强度为 21 kV/cm 时枯草芽孢杆菌 WB600 转化率为 8.0×10^6 CFU/ μg ^[13],Tn5 转座子导入短小芽孢杆菌 DX01 菌株

时,当培养液 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.96 时,电压 2.4 kV/cm,采用 AEB 电转缓冲液时电转效率最高 587 CFU/ μg ^[14]。目前电转化方法在枯草芽孢杆菌中研究较多,但很少有关于贝莱斯芽孢杆菌转化体系的研究。

前期工作中筛选得到 1 株对尖孢镰刀菌具有较强拮抗作用的贝莱斯芽孢杆菌 3A3-15,为进一步开展其分子遗传学研究,对其影响电击效率的因素进行了摸索并对其电击转化体系进行了优化。

1 材料与方法

1.1 供试菌株、质粒及培养基

本试验于 2016 年 12 月在河北农业大学生命科学学院制药工程实验室进行。

贝莱斯芽孢杆菌 3A3-15 菌株为上述实验室分离、保存。

质粒 pIC333 由江苏师范大学刘伟杰老师提供,该质粒带有转座子 mini-Tn 10,含有壮观霉素抗性基因、红霉素抗性基因和 ColE1 复制起点。

LB 培养基(1 L):胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,NaCl 5 g,pH 值为 7.2~7.5。

生长培养基:LB+0.5 mol/L 山梨醇。

复苏培养基:LB+0.5 mol/L 山梨醇+0.38 mol/L 甘露醇。

电击缓冲液:0.5 mol/L 山梨醇+0.5 mol/L 甘露醇+10%甘油。

1.2 贝莱斯芽孢杆菌 3A3-15 生长曲线

用竹签挑取活化好的贝莱斯芽孢杆菌 3A3-15,接种到 LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 12 h,再按 1% 的接种量接种到新鲜的生长培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养,定时取样,测定样品在 600 nm 波长下的吸光度,并绘制生长曲线。

1.3 质粒提取与感受态细胞制备

采用生工生物工程(上海)股份有限公司生产的 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取质粒,采用 1% 琼脂糖凝胶电泳对提取结果进行检测,采用 Thermo Scientific 公司的

收稿日期:2017-12-15

基金项目:河北省自然科学基金(编号:C2015204031);河北省高等学校科学技术研究项目(编号:BJ2016029)。

作者简介:刘雪娇(1991—),女,河北廊坊人,硕士研究生,主要从事植物真菌病害及生物防治研究。E-mail:956760741@qq.com。

通信作者:高同国,博士,硕士生导师,主要从事植物真菌病害及生物防治研究。E-mail:gtgrxf@163.com。

Nanodrop 2000 分光光度计测定其浓度及纯度。贝莱斯芽孢杆菌 3A3-15 菌株感受态细胞的制备参考文献[15-16]中的制备方法。取出冰箱中保存的 3A3-15 菌株,采用 LB 固体培养基进行活化。挑取单菌落接种于 6 mL LB 液体培养基,置于 37 ℃、200 r/min 摇床,过夜培养。取 5.2 mL 接入 100 mL 含 0.5 mol/L 山梨醇的 LB 液体培养基中,37 ℃、200 r/min 培养。将菌液冰浴 10 min,然后 4 ℃、5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。用 100 mL 预冷的电转培养基重新悬浮菌体,4 ℃、5 000 r/min 离心 8 min 弃上清,如此漂洗至少 4 次。将洗涤后的菌体吹悬于 1 mL 电转培养基中,每预冷的 1.5 mL EP 管分装 100 μ L,置于 -70 ℃ 保存。

1.4 电击转化条件

在 100 μ L 感受态细胞中加入质粒 DNA,冰上孵育 30 min 后,加入预冷的电转杯(2 mm)中,电击 1 次。利用浙江宁波新芝生物科技股份有限公司生产的 SCIENTZ-2C 基因导入仪进行电击,电击完成后迅速取出杯子并立即加入 900 μ L RM,37 ℃、100 r/min 复苏 5 h 后,吸取 100 μ L 涂布在含有 100 μ g/mL 壮观霉素和 5 μ g/mL 红霉素的 LB 平板上。30 ℃ 培养 48 h。记录菌落数,计算转化效率(转化 1 μ g 质粒获得的菌落数)。试验重复 3 次。

1.5 细菌生长期对转化率的影响

为考察贝莱斯芽孢杆菌 3A3-15 不同的生长状态对感受态的制备和后期转化的影响,培养细胞 $D_{600\text{ nm}}$ 值分别为 0.3、0.5、0.7、0.9、1.1、1.3、1.5 时,按照“1.3”节方法制备成不同生长时期的电转感受态,并于电压 1.25 kV、电容 25 μ F、电阻 400 Ω 条件下,电击持续时间应在 4.5~5.0 ms 之间。电击转化方法参考“1.4”节,观察试验结果。

1.6 电压对转化率的影响

电场强度过高会造成细胞的大量死亡,电场强度过低则不能形成细胞穿孔^[17]。本试验在上述研究的基础上,选择转化率最高的细胞生长期,研究电压为 1.25、1.50、1.75、2.00、2.25、2.50 kV 时对转化率的影响。其他条件如电容 25 μ F、电阻 400 Ω 等保持不变,按照上述“1.4”节方法进行电击转化,观察试验结果。

1.7 电阻对转化率的影响

对芽孢杆菌的电击转化电阻大多采用 200 Ω 和 400 Ω ^[18-19]。在上述细胞生长期和转化电压确定后,比较了电阻为 200 Ω 和 400 Ω 对贝莱斯芽孢杆菌 3A3-15 菌株电击转化率的影响。按照上述“1.4”节方法进行电击转化,其中电容 25 μ F 保持不变,转化后观察试验结果。

1.8 质粒加入量对转化的影响

电转化效率与外源 DNA 量在一定范围内成正比;但当加入的外源 DNA 的量过多或体积过大时,则会使转化效率下降^[20]。试剂盒提取 pIC333 质粒后,根据前述已优化的其他电击条件,在电击转化中分别加入 5、10、50、100、500 ng 的质粒 DNA,按照“1.4”节方法进行电击转化,计算转化率。

1.9 转化子分子验证

随机挑取转化子,于含有 100 μ g/mL 壮观霉素的 LB 培养基中,37 ℃、180 r/min 培养 12 h 后,采用质粒提取试剂盒提取质粒,采用 Tn10F:5'-GCATTAATGAATCGGCCAACG-3' 和 Tn10R:5'-GTGGGTAAACCGTGAATATCG-3' 引物对含有

的壮观霉素基因进行扩增,采用红霉素引物 ermF:5'-ATG AACGAGAAAAATATAAACAC-3' 和 ermR:5'-TTACTTA TTAAATAATTTATAGCTATT-3' 对红霉素编码基因进行扩增,验证转化子。

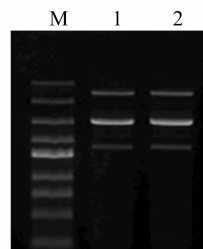
壮观霉素基因 PCR 扩增程序:95 ℃ 5 min;94 ℃ 45 s,55 ℃ 45 s,72 ℃ 2 min 30 s,25 个循环;72 ℃ 10 min;4 ℃ 保存。

红霉素基因 PCR 扩增程序:95 ℃ 5 min;94 ℃ 45 s,48 ℃ 45 s,72 ℃ 50 s,25 个循环;72 ℃ 10 min;4 ℃ 保存。

2 结果与分析

2.1 质粒提取结果

采用试剂盒提取质粒,1% 琼脂糖凝胶电泳对质粒进行检测(图 1)。质粒条带较清晰且无其他条带说明提取的质粒可直接用于后续的转化试验中。经 nanodrop 2000 分光光度计测定其浓度为 34.1 ng/ μ L,其 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}} = 2.1$, $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}} = 2.24$,表明提取的质粒浓度及纯度满足电转化的需要。



M—NormalRun™ 250 kb-III DNA ladder Marker(Genaray); 1、2—pIC333质粒

图1 质粒提取结果

2.2 细菌生长期对转化率的影响

采用分光光度计测定 3A3-15 菌株的生长曲线,结果见图 2。根据生长曲线,选取不同生长阶段的 3A3-15 培养物制备成电击感受态细胞,研究不同生长阶段的细胞制备的感受态对 3A3-15 转化效率的影响。如图 3 所示,在 $D_{600\text{ nm}} = 0.3 \sim 0.9$ 时,3A3-15 处于对数生长前期,转化率随细胞数量的增多逐渐增加。当 $D_{600\text{ nm}}$ 值为 0.9 时转化率最高,为 1.72×10^4 CFU/ μ g,随后其转化率随培养时间延长有所降低。

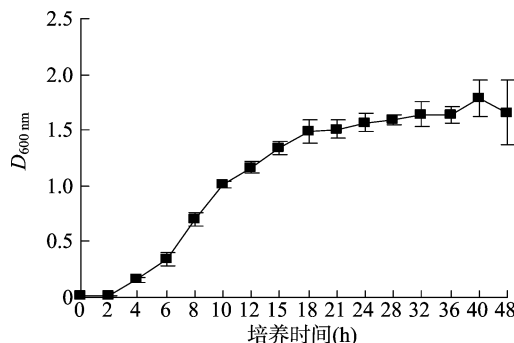


图2 3A3-15 菌株的生长曲线

2.3 电压对 3A3-15 菌株电转化效率的影响

电场强度是影响电击转化效率的重要参数^[21]。根据上述结果,用 $D_{600\text{ nm}} = 0.9$ 的 3A3-15 培养物做电击感受态,研

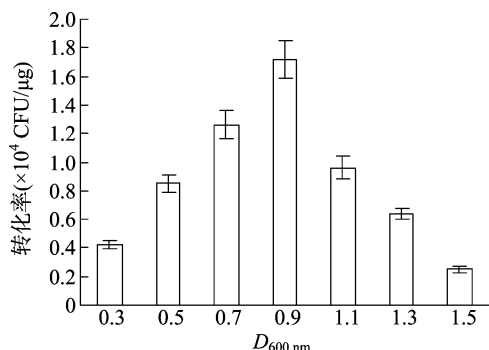


图3 生长阶段对 3A3-15 菌株转化率的影响

究不同电压下 3A3-15 菌株电击转化效率,结果见图 4。当电压为 1.25~1.75 kV 时,3A3-15 菌株的转化率有明显的上升,电压为 1.75 kV 时,转化效率最高达到了 5.33×10^4 CFU/ μg ;之后随着电压的增大,其转化率有所下降。

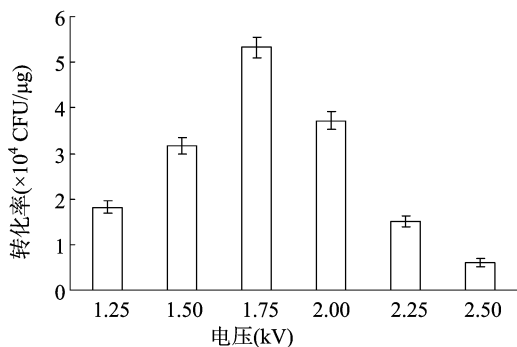


图4 电压对转化率的影响

2.4 电阻对 3A3-15 菌株电转化效率的影响

在电压为 1.75 kV 条件下,测试电阻值在 200 Ω 和 400 Ω 时 3A3-15 菌株的电击转化效率,结果见图 5,在电压为 1.75 kV、电阻值为 200 Ω 和 400 Ω 的条件下电击转化效率分别为 3.23×10^4 CFU/ μg 和 5.50×10^4 CFU/ μg 。故后续试验电击过程采用 400 Ω 电阻值。

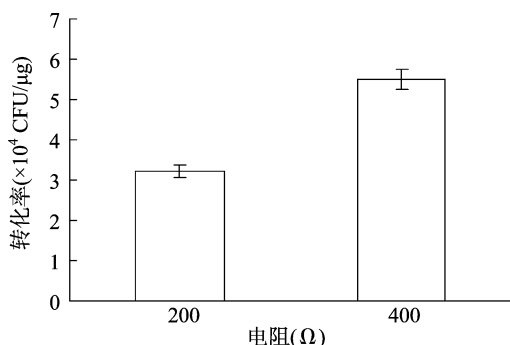


图5 电阻对 3A3-15 电击转化率的影响

2.5 质粒 DNA 加入量对 3A3-15 电转化效率的影响

在已优化的电击条件的基础上,研究 pIC333 质粒加入量对 3A3-15 菌株电击转化率的影响,结果(图 6)表明,在一定的浓度范围内随着加入质粒 DNA 量的增加,其电击转化效率有所增加,当加入量为 50 ng 时,其转化率最高,为 7.92×10^4 CFU/ μg 。当质粒 DNA 的加入量再增加时转化率反而降低。

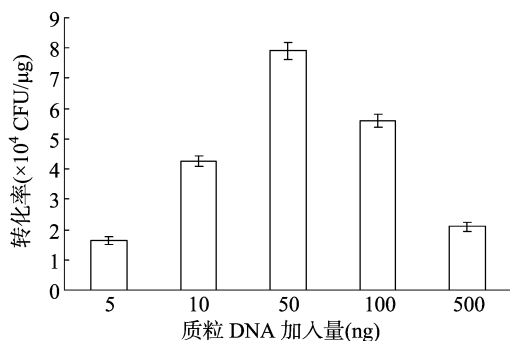
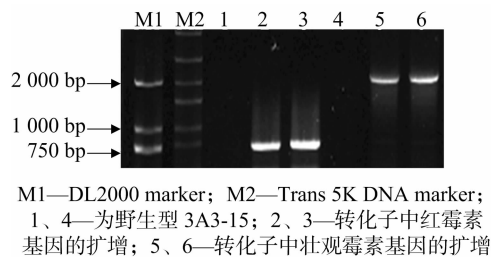


图6 质粒 DNA 加入量对 3A3-15 电击转化率的影响

2.6 贝莱斯芽孢杆菌 3A3-15 转化子检测

将 pIC333 质粒转化进入贝莱斯芽孢杆菌 3A3-15 的感受态细胞中后,筛选得到了转化子 3A3-15-PIC333,提取该转化子中的质粒,利用 PCR 扩增壮观霉素基因进行检测,结果如图 7 所示。利用 Tn10F 和 Tn10R 引物扩增其壮观霉素编码基因,没有转化的野生型 3A3-15 中没有目的条带,转化子中得到了大小约为 2.1 kb 的片段。上述 PCR 产物送华大基因进行测序,测序结果与壮观霉素基因序列一致。进一步利用引物 ermF 和 ermR 对其编码的红霉素基因进行扩增,野生型 3A3-15 中没有扩增到相关基因片段,在转化子中扩增得到大小约 750 bp 的片段,经测序、比对,其与红霉素基因序列一致。上述检测结果说明, PIC333 质粒已经通过电击转化的方法转化进入了贝莱斯芽孢杆菌 3A3-15 中。



M1—DL2000 marker; M2—Trans 5K DNA marker;
1、4—为野生型 3A3-15; 2、3—转化子中壮观霉素基因的扩增; 5、6—转化子中壮观霉素基因的扩增

图7 转化子验证 PCR 验证结果

3 讨论与结论

电转化是一种简便高效的外源 DNA 转化的方法,因菌种不同其转化效率差别较大,相对于革兰氏阴性菌,革兰氏阳性菌的细胞壁较厚且致密,电击转化率较低^[2]。而且芽孢杆菌不同的种属、质粒携带复制子不同来源,其电转化效率差别较大。王培培等比较了 5 个不同大小和携带不同复制子来源的质粒转化枯草芽孢杆菌 NCD-2 菌株的转化效率,发现其质粒大小与转化效率之间无线性关系,但不同复制子来源的质粒电转效率差别很大,质粒 pHV1249 的电转化效率为 1.40×10^2 CFU/ μg ,而 pNW33N 的电转化效率为 2.38×10^4 CFU/ μg ^[10]。质粒 pNW33N 电转化凝结芽孢杆菌 P4-102B 的最高转化率为 2.7×10^2 CFU/ μg ^[11]。质粒 pH43 电转化多黏类芽孢杆菌 JSa-9 感受态细胞和原生质体细胞,其转化率分别为 0.36×10^3 CFU/ μg 和 1.0×10^3 CFU/ μg ^[17]。本试验中质粒 pIC333 电转化贝莱斯芽孢杆菌 3A3-15 感受态细胞的转化率为 7.92×10^4 CFU/ μg ,满足基因操作的需要。

电场强度是影响电击效率的主要参数,提高电场强度可

以增强外源基因进入菌体的概率,但会增加细菌细胞的死亡率,使得转化效率下降,因此转化效率要兼顾这 2 个方面。不同的菌株所需最适的转化电场强度有所不同。如 Lu 等研究了质粒 pHT43 在 2 株枯草芽孢杆菌 WB800 和 DB104 中的转化率,发现在 20 ~ 25 kV/cm 的电场强度下,2 株芽孢杆菌最优转化强度有所不同,分别在 24 kV/cm 和 22 kV/cm 时电击转化率最高^[22],枯草芽孢杆菌 NCD - 2 最适转化场强为 14 kV/cm^[10]。迄今,除本研究外未发现有关贝莱斯芽孢杆菌优化电场强度的报道。

不同菌株电击转化的最佳生长阶段是不一致的。一般处于对数生长初期的菌株电击转化率高于中期和后期^[16]。本试验中转率最高时其 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.9,处于对数生长初期。外源质粒 DNA 加入量对转化也有一定影响,加入量不足和太多都会影响转化效率。本试验中 DNA 最佳加入量为 50ng,这与牛福星等发现 pHCMC04 质粒添加量为 140 ng 时其转化率最高的结果^[23]以及 Zhang 等发现当质粒 DNA 含量在 10 ng 时 pHT43 转化 *Bacillus subtilis* ZK 的效率最高的结果^[24]均有所不同,说明不同菌株间转化所需 DNA 浓度有所不同。

总之,本试验首次研究了 pIC333 电转化贝莱斯芽孢杆菌 3A3 - 15 的条件,发现当细胞培养物浓度 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.9、电压为 1.75 kV、电阻为 400 Ω 、质粒 DNA 加入量为 50 ng 时,其转化率最高,达 7.92×10^4 CFU/ μg ,本研究结果为贝莱斯芽孢杆菌的电击转化提供了方法,为其基因转移和分子生物学操作奠定了基础。

参考文献:

- [1] Gao Z F, Zhang B J, Liu H P, et al. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY - 1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea* [J]. *Biological Control*, 2017, 105: 27 - 39.
- [2] 刘莲娜, 孙伟明, 郭巍, 等. 一株新的拮抗细菌 SL19 及其抑菌活性物质[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(8): 1199 - 1206.
- [3] Turgeon N, Laflamme C, Ho J, et al. Elaboration of an electroporation protocol for *Bacillus cereus* ATCC 14579 [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 67(3): 543 - 548.
- [4] Roh J Y, Liu Q, Choi J Y, et al. Construction of a recombinant *Bacillus velezensis* strain as an integrated control agent against plant diseases and insect pests [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 19(10): 1223 - 1229.
- [5] 张卉, 王小珂, 马世俊. 转座元件 mariner[J]. *遗传*, 2004, 26(5): 756 - 762.
- [6] Rubin E J, Akerley B J, Novik V N, et al. *In vivo* transposition of mariner - based elements in enteric bacteria and mycobacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96(4): 1645 - 1650.
- [7] 马欣, 高学文. 转座子随机突变芽孢杆菌的研究进展[J]. *中国生物防治学报*, 2015, 31(3): 394 - 403.
- [8] Petit M A, Bruand C, Janniere L, et al. Tn10 - derived transposons active in *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(12): 6736 - 6740.
- [9] Steinmetz M, Richter R. Easy cloning of mini - Tn10 insertions from the *Bacillus subtilis* chromosome [J]. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(6): 1761 - 1763.
- [10] 王培培, 郭庆港, 李社增, 等. 枯草芽孢杆菌 NCD - 2 菌株的高效电击转化[J]. *中国生物防治学报*, 2011, 27(3): 368 - 372.
- [11] 赵春云, 杨颂, 欧阳立明, 等. 高渗透高凝结核芽孢杆菌 P4 - 102B 菌株的电击转化效率[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(6): 1388 - 1394.
- [12] 彭清忠, 彭清静, 张惟材, 等. 短芽孢杆菌的转化方法[J]. *吉首大学学报(自然科学版)*, 2004, 25(4): 35 - 38.
- [13] 张爽, 薛正莲, 陈环, 等. 一种电击转化枯草芽孢杆菌方法的优化[J]. *重庆理工大学学报(自然科学)*, 2014, 28(8): 60 - 63, 80.
- [14] 胡晓璐, 沈新迁, 傅科鹤, 等. 短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) DX01 转座突变株的构建及转化体系的优化[J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2011, 29(1): 68 - 74.
- [15] Matsuno Y, Ano T, Shoda M. High - efficiency transformation of *Bacillus subtilis* NB22, an antifungal antibiotic iturin producer, by electroporation [J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1992, 73(4): 261 - 264.
- [16] Xue G P, Johnson J S, Dalrymple B P. High osmolarity improves the electro - transformation efficiency of the gram - positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 34(3): 183 - 191.
- [17] 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.
- [18] Peng D, Luo Y, Guo S, et al. Elaboration of an electroporation protocol for large plasmids and wild - type strains of *Bacillus thuringiensis* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106(6): 1849 - 1858.
- [19] Romero D, Perez - Garcia A, Veening J W, et al. Transformation of undomesticated strains of *Bacillus subtilis* by protoplast electroporation [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 66(3): 556 - 559.
- [20] Rittich B, Španová A. Electrotransformation of bacteria by plasmid DNAs; statistical evaluation of a model quantitatively describing the relationship between the number of electrotransformants and DNA concentration [J]. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1996, 40(2): 233 - 238.
- [21] McDonald I R, Riley P W, Sharp R J, et al. Factors affecting the electroporation of *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1995, 79(2): 213 - 218.
- [22] 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.
- [23] 牛福星, 于晶晶, 汤宏赤, 等. 枯草芽孢杆菌突变株 IA857 高效转化方法的研究[J]. *广西科学*, 2014(2): 119 - 123.
- [24] Zhang Z, Ding Z T, 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.