

## 实验方法与amp;技术

## Experimental Method &amp; Technology

## 地衣芽胞杆菌 HS10 原生质电转化体系的研究

徐 龙, 黄文祥, 刘红霞\*

(南京农业大学植物保护学院, 南京 210095)

**摘要** 地衣芽胞杆菌 *Bacillus licheniformis* HS10 及其粗蛋白对多种病原真菌具有防治效果, 为挖掘其生防功能基因, 本研究通过对原生质体的制备、再生培养基、渗透压稳定剂、电击参数等试验条件进行优化, 建立了地衣芽胞杆菌 HS10 原生质体电转化法。结果表明最佳转化条件为: 转接培养 10 h 达到对数生长后期的菌体, 浓缩 4 倍后, 利用终浓度 1 mg/mL 的溶菌酶, 于 37℃、150 r/min 酶解 20 min, 酶解效率达到 99.34%, 1×SMM 洗涤 3 次, 调整菌浓度至  $1.0 \times 10^8$  cfu/mL, 并通过 1.6 kV、5 ms 的电击后, 迅速在 SMMP 溶液中 100 r/min、37℃ 恢复 6~10 h, 涂布于含 Kan 和 Erm 的再生培养基 DM3 平板。将该方法用于突变体库构建的质粒 pMarA(8 253 bp) 和基因敲除质粒 pMADΔCP(13 043 bp) 的大片段质粒转化, 分别获得了 37 cfu/μg DNA 和 10 cfu/μg DNA 阳性转化子。该遗传转化体系为地衣芽胞杆菌 HS10 中相关基因功能的研究提供了技术支撑。

**关键词** 地衣芽胞杆菌; 原生质体; 电转化; 质粒

**中图分类号:** Q 785 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017301

## Studies on the electroporation system for *Bacillus licheniformis* HS10 protoplast

XU Long, HUANG Wenxiang, LIU Hongxia

(College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract** *Bacillus licheniformis* HS10 and its crude protein have good effects on various pathogenic fungi. In order to identify the functional genes, genetic manipulation is needed. Though the optimization of the protoplast preparation, regeneration medium, osmotic stabilizer, shock conditions and other experimental conditions, the electroporation method of protoplast was set up in this paper. The experimental results showed that the optimum reaction conditions were as followed: The cells at logarithmic growth period after transferred for 10 h were concentrated by 4 times, and then subjected to enzymolysis for 20 min with a final concentration of 1 mg/mL lysozyme at 37℃ and 150 r/min. Enzymolysis rate reached 99.34%. The products of enzymolysis were washed for three times with 1×SMM and adjusting the concentration to  $1.0 \times 10^8$  cfu/mL. After electroporation at 1.6 kV and 5 ms, with 0.5 mol/L sucrose as osmotic stabilizer, the cells were quickly restored for 6–10 h in SMMP solution, then coated on DM3 resistant plate. In the large-fragment transformation using the plasmids pMarA (8 253 bp) and pMADΔCP(13 043 bp), we obtained 37 cfu/μg DNA and 10 cfu/μg DNA positive transformants. This study established a genetic transformation system for the genetic manipulation of *Bacillus licheniformis* HS10.

**Key words** *Bacillus licheniformis*; protoplast; electroporation; plasmid

地衣芽胞杆菌 *Bacillus licheniformis* 具有完善的蛋白表达系统、丰富的代谢产物以及对多种病原微生物具有拮抗能力的优势, 被广泛应用于病害生物防治、蛋白酶工业、工业发酵领域<sup>[1-2]</sup>。已有研

究表明: 地衣芽胞杆菌对农作物的真菌性病害, 如灰霉病<sup>[3]</sup>、油菜菌核病<sup>[4]</sup>、柑橘炭疽病及苹果轮纹病<sup>[5]</sup>等有较好的防治效果。因此, 地衣芽胞杆菌是最具应用开发潜力的芽胞杆菌之一。

收稿日期: 2017-08-10 修订日期: 2017-09-05

基金项目: 国家自然科学基金(31571992, 31371925)

\* 通信作者 E-mail: hxliu@njau.edu.cn

*Bacillus licheniformis* HS10 分离于黄瓜根际,对黄瓜霜霉病的田间防效达到 40%~60%,Wang 等发现该菌株及其蛋白粗提取物对小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum*、辣椒疫霉病菌 *Phytophthora capsici*、小麦根腐病菌 *Bipolaris sorokiniana* 等多种病原真菌均具有拮抗作用,通过对其粗蛋白进行纯化分析和 GC-MS 鉴定,发现起拮抗作用的是类羧肽酶蛋白<sup>[6]</sup>。为深入探究该菌株防病抑菌机理,挖掘功能基因,需要对菌株进行基因水平的遗传操作。

野生地衣芽胞杆菌转化技术多借鉴枯草芽胞杆菌,已报道的转化方法主要有原生质转化法<sup>[7]</sup>和电转化法<sup>[8]</sup>。但由于感受态形成缺陷、限制性修饰系统、菌株差异等特性,使得菌株转化较为困难<sup>[9-10]</sup>。我们前期试验中尝试了化学转化、电转化、原生质转化法,以及温赛等<sup>[11]</sup>提出的原生质电转化法,均未获得阳性转化子。

针对该问题,本研究利用正交试验优化了原生质体制备中各影响因素,分析确定了最适酶解条件,并针对原生质体的渗透压稳定剂、恢复条件、电击条件等因素进行了摸索,实现了用于突变体库构建的 pMarA(8 253 bp)质粒和用于基因敲除的 pMADΔCP(13 043 bp)大片段重组质粒的转化。建立了地衣芽胞杆菌 HS10 转化体系,为后续深入机理探究、工程菌株构建奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

*Bacillus licheniformis* HS10、DH5α 为本实验室保存。pMarA 质粒为高学文教授课题组馈赠。pMAD 载体<sup>[12]</sup>为本实验室保存,pMADΔCP 为本实验室构建的,用于 HS10 中类羧肽酶基因的敲除质粒。

#### 1.1.2 试剂

溶菌酶(lysozyme)购于 Sigma 公司。取 1 g 用菌体保护液 SMMP 溶解,定容至 10 mL,配制成 100 mg/mL,并使用 0.22 μm 滤器除菌,-20℃分装保存。卡那霉素(Kan)和红霉素(Erm)购于南京鼎思生物科技公司。卡那霉素用 ddH<sub>2</sub>O 溶解配制成 50 mg/mL,过 0.22 μm 滤器除菌;红霉素用无水乙醇溶解配制成 5 mg/mL,过 0.22 μm 滤器除菌。

LB:10 g/L 胰蛋白胍,5 g/L 酵母浸粉,10 g/L NaCl,pH 7.2,15 g/L 琼脂;SOB 培养基:20 g/L 胰蛋白胍,5 g/L 酵母浸粉,0.5 g/L NaCl,2.5 mmol/L

KCl,10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>;SOC 培养基:SOB 中添加 20 mmol/L 葡萄糖。

4×PAB:6 g/L 牛肉膏,6 g/L 酵母浸粉,20 g/L 胰蛋白胍,19.3 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O,5.3 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,14 g/L NaCl,120℃灭菌,加 50%葡萄糖 8 mL。

2×SMM:4.6 g/L 马来酸(顺丁烯二酸),8.1 g/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O,pH 6.5,灭菌后加入终浓度为 1 mol/L 蔗糖。1×SMM:2×SMM 与 dd H<sub>2</sub>O 等体积混匀。

菌体保护液 SMMP:4×PAB 与 2×SMM 等体积混合后加入 2%BSA(注:2×SMM 含有 1 mol/L 蔗糖,因此 SMMP 中蔗糖终浓度为 0.5 mol/L,即以 0.5 mol/L 蔗糖作为渗透压稳定剂);其他菌体保护液:分别用终浓度为 0.5 mol/L 甘露醇、0.5 mol/L 山梨醇、10%甘油、0.5 mol/L 海藻糖、1 mol/L 琥珀酸钠、0.5 mol/L 蔗糖+0.5 mol/L 海藻糖、0.5 mol/L 甘露醇+0.38 mol/L 山梨醇、0.5 mol/L 甘露醇+0.5 mol/L 海藻糖或 0.75 mol/L 甘露醇代替 0.5 mol/L 的蔗糖作为 SMMP 的渗透压稳定剂,其他组分不变,配制成含不同稳定剂的菌体保护液。

DM3 再生培养基:5 g/L 水解酪蛋白,1.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,4.6 g/L K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O,162.05 g/L 琥珀酸钠,10 g/L 淀粉,5 g/L 酵母浸粉,8 g/L 琼脂,5 g/L 葡萄糖,0.09 g/L BSA,0.02 mol/L MgCl<sub>2</sub>, (葡萄糖、MgCl<sub>2</sub> 单独灭菌后加入);RD 再生培养基:1 g/L (NH<sub>4</sub>)NO<sub>3</sub>,3.5 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,1.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,81 g/L 琥珀酸钠,5 g/L 明胶,4.07 g/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O,5 g/L 葡萄糖,8 g/L 琼脂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌体生长曲线的测定

使用 LB 平板活化超低温保存的地衣芽胞杆菌 HS10,于 37℃培养 1 d,挑取单菌落接种于含 LB 试管中,37℃、200 r/min 培养 12 h 后,按 1%接种量转接至 100 mL LB 中(250 mL 三角瓶)继续培养,每小时取样,检测培养物 OD<sub>600</sub>,记录分析。

#### 1.2.2 HS10 原生质体的制备

挑取转接培养 4、6、8、10 h 的菌体,离心收集菌体并用 1/4 体积 SMMP 重悬,使用终浓度 1 mg/mL 的溶菌酶于 37℃处理 20 min,获得原生质化的 HS10 菌体。酶解后直接稀释涂布 LB 平板计数,以未酶解处理的对照作总菌量。

原生质体形成率=[1-(酶解后菌量/总菌量)]×100%。

### 1.2.3 HS10 原生质体的再生与恢复

由上述方法制备的原生质体,使用含有 0.5 mol/L 蔗糖的 SMMP 恢复培养 4 h,涂布相应平板,检测各渗透压稳定剂下菌体恢复情况。

### 1.2.4 HS10 原生质体的电转化与恢复

将制备好的原生质体于 4℃,5 000 r/min 离心 10 min,使用预冷的 1×SMM 溶液反复漂洗 3 次,之后使用 1×SMM 重悬,调整菌浓度为  $1.0 \times 10^8$  cfu/mL。将原生质体以 100 μL 分装,电击前加入 4 μL 250 ng/μL pMarA 质粒混匀(即 1 μg 质粒),置于冰上 5 min 后,使用预冷的 2 mm 电击杯,设置 1.6~2.5 kV,5 ms,进行电击转化,电击后迅速加入 1 mL 预冷的 SMMP 恢复培养液,于 37℃,100 r/min 培养 6~10 h 后,涂布于含卡那霉素 Kan (10 mg/mL)和红霉素 Erm(5 mg/mL)的固体 DM3 培养基上。每个试验重复 3 次。(电击仪使用 Ep-

pendorf 的 Multiporator 多功能细胞电穿孔仪,电阻为系统设定值)。

### 1.2.5 质粒的提取和细菌基因组 DNA 提取

菌体质粒的提取参照 AxyPrep 小量质粒提取试剂盒 AP-MN-P-250 的使用说明。地衣芽胞杆菌基因组 DNA 提取参照 Tiangen 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 DP302-02 的使用说明。

### 1.2.6 阳性转化子的验证

利用 pMarA 构建地衣芽胞杆菌 HS10 随机突变体库的方法,以及阳性转化子的验证所使用的引物 oTNP1 和 oTNP2 参考 Le Breton 等<sup>[13]</sup>,引物 kan-F 和 kan-R 为本实验室设计。

转化子的 PCR 验证参考 TaKaRa 的 rTaq 酶产品说明,程序为 95℃ 3 min,95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,30 个循环,72℃ 10 min。酶切验证参考 TaKaRa 限制性内切酶产品说明。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Oligo DNA primers used in this study

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	片段大小/bp	用途 Use
oTNP1	ATGGAAAAAAGGAATTTCTGTGTTTTGA	1 500	扩增 <i>Himar1</i> 等位基因
oTNP2	GCAGATTCCGGTCTAACAAAGAAAAAC		
Kan-F	TCCCCAGTAAGTCAAAAAATAG	370	扩增卡那霉素基因
Kan-R	ATCAGGCTCTTTCACCTCCATCG		

### 1.2.7 试验统计分析

数据使用 DPS 7.05 软件进行单因素方差分析, LSD 法进行差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株生长曲线的测定

不同菌龄的菌体其生长状态、胞内外合成物质、对外界条件的敏感性均存在差异。对 HS10 进行生长曲线测定(图 1),可以看到:当按 1% 菌量,37℃、200 r/min 转接培养 4 h 后,菌体开始进入对数生长期,10 h 后达到对数生长后期,之后进入稳定期。

### 2.2 HS10 原生质体制备最佳条件正交试验

对不同试验条件下原生质体的形成情况进行分析,结果表明,地衣芽胞杆菌原生质体制备过程中最为重要的影响因素是溶菌酶浓度。在 0.1 mg/mL 的浓度下,原生质体的形成率,即酶解效率多为 80% 以下,而 1 mg/mL 浓度下能达到 95% 以上,但随着溶菌酶浓度的继续增加,原生质体的形成率并没有明显差异(表 2)。同时,原生质体的形成率随

着菌龄的增加而增加,表明随着菌体的成熟,其对溶菌酶也越来越敏感。为保证获得足够多的原生质体,又不至于由于使用过高的溶菌酶浓度和酶解时间导致菌体的再生恢复能力降低,并考虑到后续试验中菌量和渗透压稳定剂等因素,最终选择 HS10 最佳酶解条件为:转接培养 10 h,将菌体浓缩 4 倍后,使用 1 mg/mL 终浓度的溶菌酶于 37℃、150 r/min 酶解 20 min,以此获得最佳原生质体。

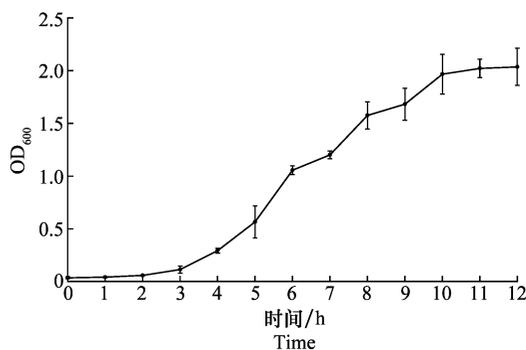


图 1 HS10 菌株的生长曲线测定

Fig. 1 Determination of the growth curve of HS10

表 2 各因素对原生质体形成的影响

Table 2 Effects of various factors on protoplast formation

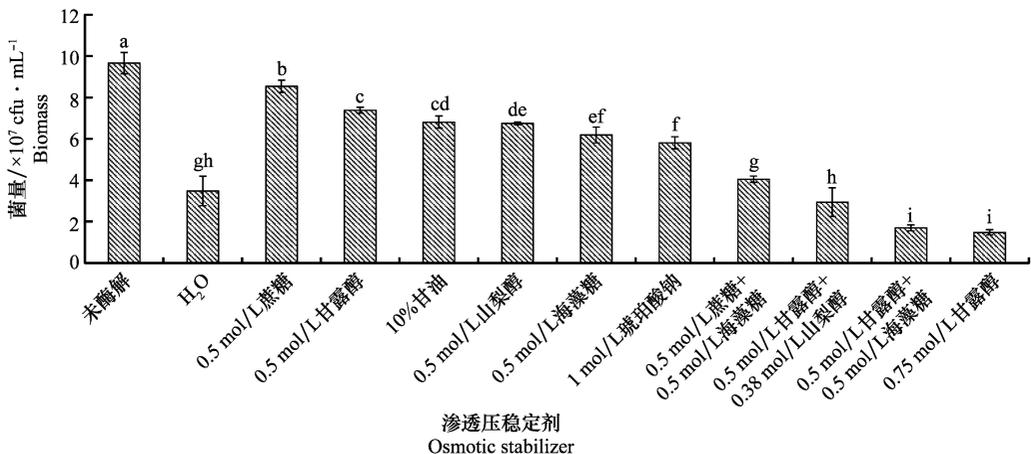
处理 Treatment	菌龄/h Cell age	溶菌酶终浓度/mg · mL <sup>-1</sup> Lysozyme concentration	酶解温度/°C Temperature for enzymolysis	酶解时间/min Enzymolysis time	酶解效率/% Enzymolysis efficiency
处理 1	4	0.1	25	20	74.87±0.767
处理 2	4	1	28	30	97.53±1.329
处理 3	4	10	37	40	97.65±1.292
处理 4	4	50	42	50	98.92±0.666
处理 5	6	0.1	28	40	79.82±0.199
处理 6	6	1	25	50	96.30±0.527
处理 7	6	10	42	20	98.00±0.527
处理 8	6	50	37	30	97.30±1.394
处理 9	8	0.1	37	50	95.92±0.146
处理 10	8	1	42	40	97.94±0.493
处理 11	8	10	25	30	96.57±2.626
处理 12	8	50	28	20	98.62±0.654
处理 13	10	0.1	42	30	79.61±1.333
处理 14	10	1	37	20	99.34±0.185
处理 15	10	10	28	50	99.44±0.286
处理 16	10	50	25	40	99.41±0.033

2.3 HS10 原生质体最佳恢复条件

进一步分析渗透压稳定剂对原生质体再生的影响可知,按上述优化的酶解条件,酶解并恢复 4 h 后,以 0.5 mol/L 蔗糖作为渗透压稳定剂,恢复的菌体量最大,能够达到 8.5 × 10<sup>7</sup> cfu/mL,随后依次是 0.5 mol/L 甘露醇(7.4 × 10<sup>7</sup> cfu/mL)、10%甘油(6.8 × 10<sup>7</sup> cfu/mL)、0.5 mol/L 山梨醇(6.7 × 10<sup>7</sup> cfu/mL)、0.5 mol/L 海藻糖(6.2 × 10<sup>7</sup> cfu/mL)、1 mol/L 琥珀酸钠(5.8 × 10<sup>7</sup> cfu/mL)、0.5 mol/L 蔗糖 + 0.5 mol/L 海藻糖(4.0 × 10<sup>7</sup> cfu/mL)、0.5 mol/L 甘露醇 + 0.38 mol/L 山梨醇(2.9 × 10<sup>7</sup> cfu/mL)、0.5 mol/L 甘露醇 + 0.5 mol/L 海藻糖(1.7 × 10<sup>7</sup> cfu/mL)、0.75 mol/L 甘露醇(1.5 × 10<sup>7</sup> cfu/mL)(图 2)。

由试验结果可以看出,过高浓度渗透压稳定剂并不有利于菌体的恢复再生,再生的菌量甚至低于 SMMP(H<sub>2</sub>O)条件,同时可以看出,在无渗透压稳定剂的条件下,依然有大量的菌体恢复扩增,甚至优于过高渗透压条件。故在后续的电击试验和菌体恢复中,采用 0.5 mol/L 蔗糖作为渗透压稳定剂。

将 SMMP 溶液中恢复的菌体稀释涂布于不同的培养基中,可以看出:DM3 由于其营养丰富,最有利于菌体细胞壁的再生和恢复,而 LB、SOB、SOC 培养基并不是最佳选择(图 3)。同时相较于 RD 培养基,DM3 中菌体的恢复量高于 RD 再生培养基,菌体在平板上生长也更加圆润和健康,因此选择 DM3 作为再生培养基。

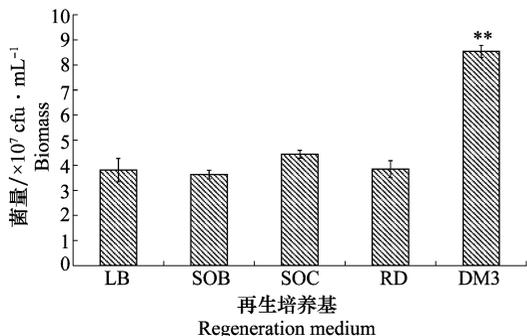


柱上不同字母表示处理间在P=0.05水平差异显著

The different letters on the bar indicate significant difference by the Duncan's test (P=0.05)

图 2 渗透压稳定剂对菌体恢复的影响

Fig. 2 Effects of osmotic pressure stabilizers on regeneration of bacteria



\*\*表示差异极显著( $P<0.01$ )。下同  
\*\* indicates highly significant difference ( $P<0.01$ ). The same below

图 3 再生培养基对原生质体恢复再生的影响

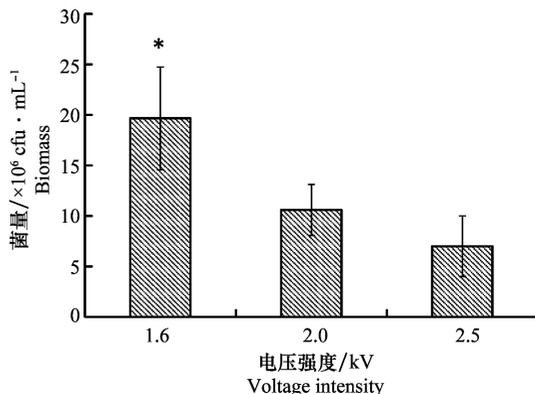
Fig. 3 Effects of regeneration medium on protoplast regeneration

## 2.4 电击强度对 HS10 原生质体转化的影响

本研究采用瞬间电击实现原生质体的转化,此过程对原生质体的伤害会影响原生质体的恢复再生,过低的电压无法产生合适的穿孔,而过高的电压又会导致菌体大量死亡。由图 4 可以看出,原生质体在电击并恢复 4 h 后,恢复的菌量随电击强度的增强而减少,菌量依次为:1.6 kV 时  $1.9 \times 10^7$  cfu/mL、2.0 kV 时  $1.0 \times 10^7$  cfu/mL、2.5 kV 时  $7.0 \times 10^6$  cfu/mL。原生质体对电击强度较敏感,原生质体受到的伤害随着电击强度增加而增加。因此选择较低的 1.6 kV 的电压更为合适。

电压优化试验显示,原生质体在不同电压条件下获得的转化子数分别为:0.8 kV 时 7 cfu/ $\mu$ g DNA、1.2 kV 时 21 cfu/ $\mu$ g DNA、1.6 kV 时 37 cfu/ $\mu$ g DNA、2.0 kV 时 18 cfu/ $\mu$ g DNA、2.5 kV 时 9 cfu/ $\mu$ g DNA (图 5)。原生质体在 1.6 kV 电压条件下获得转化子数最多。1.6 kV 以下,电压与转化效率呈正比,1.6 kV 以上呈反比。可能因为过强的电压条件会导致部分菌体受伤严重,无法进行菌体细胞壁再生恢复,或

菌体恢复较慢,导致在涂布抗生素平板后,菌体无法生长。由此可知最佳的电击条件为 1.6 kV, 5 ms。



\*表示差异显著( $P<0.05$ )。下同  
\* indicates significant difference at 0.05 level. The same below

图 4 电压强度对菌体恢复的影响

Fig. 4 Effects of voltage intensity on cell recovery

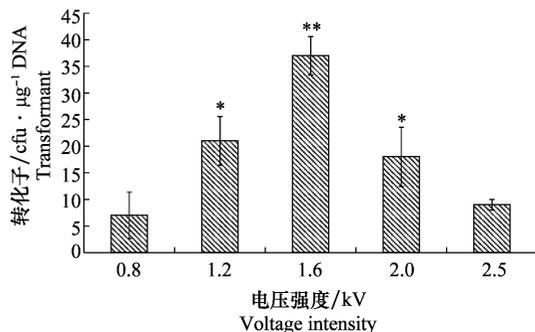


图 5 电压强度对转化的影响

Fig. 5 Effects of voltage intensity on transformation

## 2.5 质粒大小对 HS10 原生质体转化的影响

在此之后,又对该菌株进行了更大质粒的电击转化。转化质粒为 pMAD $\Delta$ CP,质粒大小为 13 043 bp。结果显示质粒大小对转化效率有一定影响,pMAD $\Delta$ CP 质粒转化子显著少于 pMarA 质粒(表 3)。

表 3 质粒大小对 HS10 原生质体转化的影响<sup>1)</sup>

Table 3 Effects of plasmid size on protoplast transformation of HS10

质粒 Plasmid	质粒大小/bp Plasmid size	用途 Application	转化子/cfu · μg <sup>-1</sup> Transformant
pMarA	8 253	构建随机突变文库	(37 ± 3.6)a
pMAD $\Delta$ CP	13 043	HS10 羧肽酶基因的敲除	(10 ± 2.6)b

1) 不同字母表示处理间在  $P=0.05$  的显著水平下差异显著。

Different letters within a column indicate significant difference by the Duncan's test ( $P<0.05$ ).

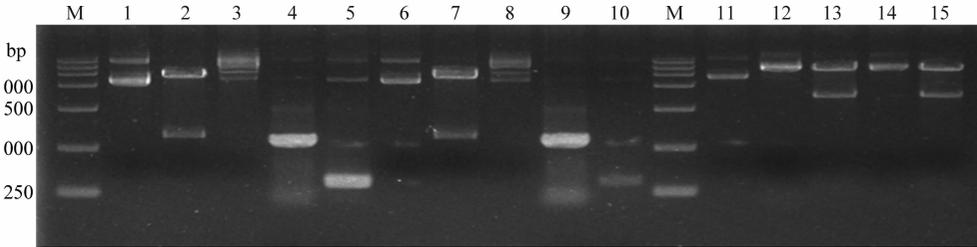
## 2.6 阳性转化子的验证

将穿梭载体 pMarA、pMAD $\Delta$ CP 转化入 HS10 中,挑取转化子提取质粒,对质粒进行 PCR 和酶切验证。结果如图 6 所示:用 *Kpn* I 分别对 pMarA 和

HS10-pMarA 质粒酶切后,都形成了 2 个大小为 1.5 kb 和 6.5 kb 的片段,PCR 扩增 pMarA 和 HS10-pMarA 质粒中的 *Himar* 1 转座酶基因,都得到长度为 1.5 kb 的片段,扩增 TnYLB-1 中的 *Kan* 基因,都形成了

370 bp 的片段。在对 pMAD $\Delta$ CP 质粒的检测中,使用 *Bgl* II/*Nco* I 双酶切,均能产生 3 600 bp 的片段。上述结果表明:pMarA、pMAD $\Delta$ CP 质粒已成功转入地衣芽胞杆菌 HS10 菌株中。

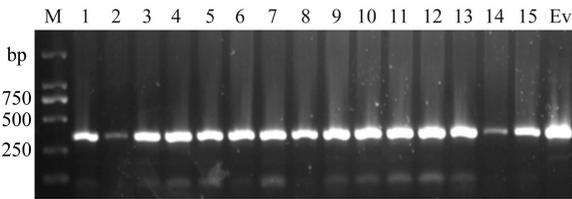
提取突变体菌株的基因组,扩增转座子 TnYLB-1 中的 *Kan* 片段,由图 7 可以看出,随机挑选的 15 个突变体基因组中均含有 370 bp 大小的片段,证实 TnYLB-1 成功插入到 HS10 基因组中。



M: 15 000 bp Marker; 1~5: pMarA质粒验证, 分别表示质粒、*Kpn* I 单酶切、*Pst* I 单酶切、*Himar*1的PCR片段、*Kan*的PCR片段; 6~10: HS10-pMarA验证, 分别为质粒、*Kpn* I 单酶切、*Pst* I 单酶切、*Himar*1的PCR片段、*Kan*的PCR片段; 11: pMAD原始质粒; 12~13: pMAD $\Delta$ CP质粒及其*Bgl* II/*Nco* I 双酶切产物; 14~15: HS10-pMAD $\Delta$ CP质粒及其*Bgl* II/*Nco* I 双酶切产物  
M: Marker (15 000 bp); 1-5: pMarA plasmid, *Kpn* I digestion, *Pst* I digestion, *Himar*1 PCR fragments, *Kan* PCR fragments, respectively; 6-10: HS10-pMarA plasmid, *Kpn* I digestion, *Pst* I digestion, *Himar*1 PCR fragments, *Kan* PCR fragments, respectively; 11: pMAD plasmid; 12-13: pMAD $\Delta$ CP plasmid and products digested by *Bgl* II/*Nco* I ; 14-15: HS10-pMAD $\Delta$ CP plasmid and products digested by *Bgl* II/*Nco* I

图 6 阳性转化子的验证

Fig. 6 The verification of positive transformants



M: Marker (2 000 bp). 1~15泳道为HS10突变体中TnYLB-1转座子的*Kan*片段; Ev为pMarA中的*Kan*片段  
M: Marker (2 000 bp). 1-15: *Kan* PCR fragment of TnYLB-1 transposon in HS10 mutants; Ev: *Kan* PCR fragment of pMarA

图 7 HS10 突变体中 TnYLB-1 转座子中 *Kan* 片段检测  
Fig. 7 Transposon TnYLB-1 *Kan* fragment detection of HS10 mutants

### 3 讨论

地衣芽胞杆菌已报道的转化方法主要有“原生质转化法”和“高渗透电转化法”<sup>[7-8]</sup>。聚乙二醇介导的原生质转化法的原理是聚乙二醇能够黏合细胞、扰乱细胞膜双分子层,并能够吸附溶液中的水分子使外源 DNA 和细胞膜形成分子桥,促进相互之间的接触连接,从而导入外源 DNA 实现转化<sup>[14-15]</sup>。高渗透电转化法则是利用瞬间电压实现电穿孔,从而利于外源质粒导入菌体。前者反应较为温和,后者存在细胞壁阻碍,在二者均无法成功转化时可选择原生质体电转化法,在打破细胞壁阻碍的同时,利用电穿孔增加外源 DNA 导入菌体的机会,使得转化更为高效可行。但该方法较为繁琐,需要对原生质体的制备、电击条件、原生质体的恢复再生等条件进行优化才能达到最佳的转化效率<sup>[10]</sup>。

在原生质体制备中,除菌体生长状态外,溶菌酶浓度、酶解时间、酶解温度也是重要影响因素<sup>[7]</sup>。溶菌酶浓度过高、时间太长均会导致脱壁太彻底,不利于菌体的再生恢复,而溶菌酶浓度过低、时间太短,又会因酶解不彻底而影响转化。温赛等对影响酶解的条件进行了单因素逐一分析<sup>[10]</sup>,本论文选用 4 因素 4 水平的正交试验进行原生质体制备的优化,并得出最佳条件为:取对数生长后期菌体,浓缩 4 倍后使用终浓度 1 mg/mL 的溶菌酶于 37℃、150 r/min 酶解 20 min,酶解率达到 99.34%。优化后的条件及研究方法对其他野生地衣芽胞杆菌原生质体的制备具有参考价值。

电击后的恢复培养是受伤的菌体恢复再生的重要时期,酶解液、电击缓冲液、恢复培养液均需使用合适的渗透压稳定剂,以维持受损细胞的形态,避免吸水胀破。Junichi 等报道称,无机盐作为渗透压更有利于原生质体的形成,但糖类物质更有利于原生质体的再生<sup>[16-17]</sup>。试验得出 0.5 mol/L 蔗糖最有利于 HS10 菌体的恢复,0.5 mol/L 甘露醇仅次于 0.5 mol/L 的蔗糖。需要指出的是:该结果不能等同于原生质在不同渗透压稳定剂下的恢复率,因为原生质体在 4 h 的恢复过程中,存在菌体的扩增,包括未原生质化菌体和再生菌体的扩增。在电压条件优化方面,选择 1.6 kV,5 ms 进行电转化能降低对菌体的伤害,又能保证较高的转化效率。优化的渗透压稳定剂和电转化条件对其他野生地衣芽胞杆菌的转化具有借鉴意义。不足之处在于,只对 pMarA 质粒的转化进行

了电压摸索和优化,未能在更大片段的 pMAD $\Delta$ CP (13 043 bp)质粒的转化中进一步优化电压。

在对不同野生菌株进行转化时,会因为各种原因导致转化失败,例如:原生质体制备不佳、渗透压稳定剂不合适、电转电压过高导致死亡、电压过低无法形成很好的穿孔、菌体恢复时间过短、菌体洗涤不干净导致击穿、菌浓度过高导致电击效率不佳,甚至操作时间过长等。因此,在实际操作中,应视情况做相应的调整。综上,本试验通过对野生地衣芽胞杆菌 HS10 原生质体制备、电转化、恢复等过程进行了优化,成功实现了高效率的转化,为后续地衣芽胞杆菌 HS10 基因改造、防病机理的探究等打下基础。

## 参考文献

- [1] 牛丹丹,石贵阳,王正祥. 分泌高效蛋白的地衣芽胞杆菌及其工业应用[J]. 生物技术通报, 2009(6):45-50.
- [2] 孙倩,陈复生,丁长河,等. 地衣芽胞杆菌产碱性蛋白酶发酵条件优化[J]. 食品工业科技, 2012,33(13):174-177.
- [3] 童蕴慧,郭桂萍,徐敬友,等. 拮抗细菌对番茄植株抗灰霉病的诱导[J]. 中国生物防治, 2004(3):187-189.
- [4] 孙启利,陈夕军,童蕴慧,等. 地衣芽胞杆菌 W10 抗菌蛋白对油菜菌核病菌的抑制作用及防病效果[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2007(3):82-86.
- [5] 纪兆林,童蕴慧,凌箐,等. 拮抗细菌对部分水果产后病原真菌的抑制及防腐作用[J]. 金陵科技学院学报, 2003(4):23-27.
- [6] WANG Z, WANG Y, ZHENG L, et al. Isolation and characterization of an antifungal protein from *Bacillus licheni formis* HS10 [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014,454(1):48-52.
- [7] 莫静燕,陈献忠,王正祥. 地衣芽胞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.
- [8] 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.
- [9] SUGA M, KUSANAGI I, HATAKEYAMA T. High osmotic stress improves electro-transformation efficiency of fission yeast [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003,225(2):235-239.
- [10] WASCHKAU B, WALDECK J, WIELAND S, et al. Generation of readily transformable *Bacillus licheni formis* mutants [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008,78(1):181-188.
- [11] 温赛,杨建国. 地衣芽胞杆菌原生质体电转化方法的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2015,35(7):76-82.
- [12] ARNAUD M, CHASTANET A, DEBARBOUILLE M. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004,70(11):6887-6891.
- [13] LE BRETON Y, MOHAPATRA N P, HALDENWANG W G. In vivo random mutagenesis of *Bacillus subtilis* by use of TnYLB-1, a mariner-based transposon [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006,72(1):327-333.
- [14] MAAS C, WERR W. Mechanism and optimized conditions for PEG mediated DNA transfection into plant protoplasts[J]. Plant Cell Reports, 1989,8(3):148-151.
- [15] ZHANG X Z, ZHANG Y. Simple, fast and high-efficiency transformation system for directed evolution of cellulase in *Bacillus subtilis* [J]. Microbial Biotechnology, 2011,4(1):98-105.
- [16] 陈乃用,印小明. 芽胞杆菌原生质体的形成和质粒转化的研究[J]. 微生物学报, 1986,26(2):134-142.
- [17] JUNICHI S, TAKASHI A. Studies on regeneration media for *Bacillus subtilis* protoplasts[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1981, 45(12):2887-2894.

(责任编辑:杨明丽)