

枯草芽孢杆菌在琼脂平板上进行的自然遗传转化*

陈向东 陈 琪 谢志雄 沈 萍**

(武汉大学生命科学学院 武汉 430072)

摘 要:本文对发生在琼脂平板上的枯草芽孢杆菌自然遗传转化进行了初步的研究。结果表明,在相同条件下,该菌在琼脂平板上的自然转化率明显高于传统液体转化,并且转化反应对 DNase 的抗性增强,通常被认为不能建立感受态的 LB 培养物当涂布到平板上后也很快具有了自然转化的能力,说明在固相物表面进行的转化过程与传统的液体法存在一定的差异。在琼脂平板上,也能观察到具不同遗传标记的菌株间进行的细胞间自然转化。

关键词:枯草芽孢杆菌,自然遗传转化,琼脂平板

中图分类号:Q939 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2000)01-0095-99

自然遗传转化通常是指同源或异源的“裸露”DNA 分子被感受态受体细胞主动摄取并得到表达的水平基因转移过程,人们对它已有五十多年的研究历史^[1]。自八十年代以来,随着基因重组技术的迅速发展及遗传工程微生物在工业、农业、医药、环保等方面日益广泛的应用,出于生态及安全上的考虑,人们开始关注在环境中发生的自然转化^[2,3],使自然遗传转化的研究迅速得到发展,并形成新的研究特点。现已有研究表明,在环境中发生的自然转化过程多在固形物(土壤、沙子等)表面进行^[3],但传统的实验室研究方法,则仍在液体培养条件下进行。为使实验室的研究方法更接近自然状态,我们进行了在琼脂平板上自然遗传转化的研究,获得了十分有意义的结果;这将不仅是一种方法学上的改进,而且对进一步揭示自然遗传转化的本质具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

1.1.1 菌种:枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)DB104($his^- \Delta apr A3 npr R2 npr E18, Km^s$);枯草杆菌 BG2036($\Delta apr684 \Delta nprE522, Km^s$);枯草杆菌 BR151($try^- met^- lys^-, Km^s$);枯草杆菌 168(tyr^-, Km^s)均为本实验室保存。

1.1.2 质粒:pPR8(Km^r)蛋白酶基因的重组质粒,本实验室构建。

1.2 培养基

1.2.1 液体培养基:LB 及 Spizizen 基本培养基(MM)^[4]。按需要加入不同的氨基酸(终浓度为 $50 \mu g/mL$);而在进行 DB104/pPR8 培养时在 LB 中加入终浓度为 $10 \mu g/mL$ 的

* 国家自然科学基金资助(39670397)

** 通讯作者

作者简介:陈向东(1963—),男,浙江衢州人,武汉大学生命科学学院副教授,硕士,1993 年参加 UNESCO 项目赴日本九州大学研修,主要从事微生物遗传学及应用微生物学研究

收稿日期:1998-03-30, **修回日期:**1998-07-30

Km, 在 MM 中加入终浓度为 $50\mu\text{g/mL}$ 的 Km。

1.2.2 固体培养基:MM 或加 Km 到终浓度为 $50\mu\text{g/mL}$ 的 MM 固体平板用于转化子的检测;含 1.5% 脱脂牛奶的 LB 固体平板用于检查菌株产蛋白酶情况。

1.3 方法

1.3.1 在平板上进行的游离 DNA 自然转化:将菌株在 LB 或 MM 中培养到对数生长期,按下列方法取 $300\mu\text{L}$ 菌液分别与提纯的 $100\mu\text{L}$ 转化 DNA ($\sim 0.4\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 混合,涂布于相应的选择培养基平板, 37°C 培养 $30\sim 40\text{h}$ 检测转化子。平板上的涂布量均为 $100\mu\text{L}$ 。

(a) 菌液与 DNA 溶液混匀后即涂布于选择平板;(b) 混匀后置室温 20min 后再涂布于选择平板;(c) 混匀后置室温 20min , 再涂布于选择平板,并在室温放置 20min 后在每个平板上涂布 $100\mu\text{L}$ 的 DNase 液(DNase 和 MgCl_2 的终浓度分别为 $50\mu\text{g/mL}$ 和 5mmol/L);(d) 混匀后在室温放置 20min 后加 DNase 液, 37°C 保温 10min 后涂布于选择平板;(e) 混匀前在反应系统中同 d 加 DNase 液, 37°C 保温 10min 后涂布于选择平板;

1.3.2 在平板上进行的细胞间自然转化:将具不同遗传标记的实验菌株分别在 LB 和 MM 中培养到对数生长期,按下列方法将菌液等量混合,涂布于相应的选择培养基平板, 37°C 培养 $30\sim 40\text{h}$ 检测转化子。每人平板上的涂布量均为 $100\mu\text{L}$ 。

(a) 菌液混匀后即涂布于选择平板;(b) 混匀后置室温 30min 后再涂布于选择平板,并在室温放置 30min 后在每个平板上涂布 $100\mu\text{L}$ 的 DNase 液;(c) 菌液混匀后置室温 30min 后再涂布于选择平板,并在室温放置 1.5h 后在每个平板上涂布 $100\mu\text{L}$ 的 DNase 液;(d) 混匀后在室温放置 30min 后涂布于选择平板;(e) 菌液混匀后在室温放置 30min 后加 DNase 液, 37°C 保温 10min 后涂布于选择平板;(f) 菌液混匀前在反应系统中同 e 加 DNase 液, 37°C 保温 10min 后涂布于选择平板;

1.3.3 总 DNA 及质粒 DNA 的提取和检测:参照文献[4]进行。

2 结果和分析

2.1 琼脂平板上发生的自然转化

传统的自然转化一般都在液体条件下进行,而琼脂平板除有时被用来对自然遗传转化缺陷型菌株进行初筛外,一般仅作为所形成转化子的检测手段^[4,5]。为了比较在相同的营养及细胞生理状态条件下,枯草芽孢杆菌在传统液体条件下和在琼脂平板上进行自然转化的过程有无差异,我们将 BG2036、DB104/pPR8 分别在 LB 或基本培养基中培养到对数生长期,按“材料和方法”中 1.3.1 所列的方法取 $300\mu\text{L}$ 菌液分别与提纯的 $100\mu\text{L}$ DB104/pPR8 及 BG2036 的总 DNA ($\sim 0.4\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 混合,涂布于加 Km 到终浓度为 $50\mu\text{g/mL}$ 的 MM 选择平板检测表型为 His^+ 、 Km^r 的转化子。

表 1 中的方法 d 是通常采用的常规液体转化方法^[4],即转化系统在涂布到选择平板前加 DNase 终止反应,方法 e 为所加 DNase 活性的对照。比较方法 a 与方法 d 所得结果可以看出,将受体细胞与转化 DNA 混匀后立即涂布到选择平板上,染色体转化的频率较传统的液体法明显提高,而且在液体条件下被认为不能建立感受态的 LB 培养物^[1]也能以较高的频率进行染色体 DNA 的转化。即使是同样的采用反应 20min 后加 DNase 终止转化的处理(方法 c),在平板上的染色体 DNA 转化频率也高得多,说明在液体和固体条

表 1 枯草杆菌在液体及固体条件下进行自然遗传转化的比较

Table 1 Comparison of *B. subtilis* undergoes natural genetic transformation under liquid and solid conditions

Methods*		a	b	c	d	e
		Averaged transformants/plate				
plasmid transformation	BG2036(MM) × DB104/pPR8 DNA	ND*	2	ND	1	0
	BG2036(LB) × DB104/pPR8 DNA	ND	0	ND	0	0
chromosome transformation	BG104/pPR8(MM) × BG2036 DNA	93	451	89	11	0
	BG104/pPR8(LB) × BG2036 DNA	60	150	6	0	0

* The methods were detaied in “Materials and Methods”1.3.1; * ND:Not detected

件下枯草杆菌自然感受态的建立具有一定差异,而后者与细菌在自然环境中吸附于沙粒、土壤等固型物表面的情况更接近,更能反映在环境中进行的自然转化过程。用方法 c 能得到相对 d 高得多的转化频率,很可能就是在平板上也存在类似沙粒等表面的空间位阻效应,使 DNase 的作用大大降低^[3]。

枯草杆菌能在固体平板上以较高频率进行染色体 DNA 自然转化的现象我们还通过以原养型的 BG2036 染色体 DNA 转化营养缺陷型的 BR151 菌株的实验得到了进一步的证实(结果未列出),相比之下,质粒 DNA 的转化频率无论是在液体还是在固体条件下都明显低于染色体 DNA(表 1),这符合已建立的转化模型对质粒自然转化过程的解释^[1]。

2.2 在琼脂平板上发生的细胞间自然转化

由于 DNA 提取方便,所以传统的自然转化通常都是采用游离 DNA,转化过程一般不涉及 DNA 供体细胞^[2]。但目前已有证据表明,不少细菌菌株在一定的培养条件下既可分泌或释放 DNA,也能建立自然感受态。因而,在不加外源 DNA 的条件下,自然转化有可能在具不同遗传标记的菌株间进行^[3,6]。对在各种条件下细菌细胞间自然转化现象的研究将是人们正确了解释放到环境中的重组基因通过自然转化进行不受控制的水平转移,并造成不利生态后果可能性的重要方面。迄今为止,对细菌细胞转化的研究多是在人工模拟生态系统中以类似游离 DNA 液体转化的条件下进行的^[7,8]。为了了解这种细胞间转化过程是否同样能在琼脂平板上进行,并与常用的液体进行比较,我们将 BG2036 和 DB104/pPR8 分别在 LB 或 MM 中培养到对数生长期,按“材料和方法”中 1.3.2 所列方法在加 Km 的 MM 选择平板上检测表型为 His⁺、Km^r 的转化子。

表 2 枯草杆菌在液体及固体条件下进行细胞间自然转化

Table 2 *B. subtilis* undergoes cell-to cell transformation under liquid and solid conditions

Methods*	a	b	c	d	e	f
	Averaged transformants/plate					
BG2036(MM) × DB104/pPR8(LB)	26	10	36	53	5	2
BG2036(LB) × DB104/pPR8(LB)	350	159	164	200	78	54
BG2036(MM) × DB104/pPR8(MM)	300	137	320	350	159	105
BG2046(LB) × DB104/pPR8(MM)	1255	1100	1300	1000	450	427

* The methods were detaied in “Materials and Methods”1.3.2.

与表 1 中的方法 d 一样,表 2 中的方法 e 也是通常采用的液体转化法,而方法 f 为所加 DNase 活性的对照。比较 e、f 的结果可以发现这两组实验所得到转化频率几乎完全相同,这似乎表明所加的 DNase 完全没有作用,但这显然是不可能的,除非这种基因转移的过程不是自然转化。进一步比较方法 d 所得转化子数量与方法 e 的差异,可以发现在同

样的处理程序下,加或不加 DNase 对最后形成的转化子数有十分明显的影响,这一方面可以证明该过程对 DNase 敏感,的确属于自然转化^[1],只是由于菌体本身对 DNA 的保护作用才使加入的 DNase 并不能完全终止转化反应的进行;另一方面则可推断这种细胞间的转化过程实际上主要是发生在平板上,而在液体条件下这种转化的频率很低或更本没有。此结论可通过进一步比较方法 a、d 的结果来说明。方法 a 是将菌体混合后立即涂布平板,而方法 c 是将菌液混合并保持 30min 后再涂布平板,但最后这两组转化实验所得到的转化频率也十分相似。

质粒 pPR8 是将 *Pseudomonas maltophilia* 的蛋白酶基因插入到质粒 pUB110 (Km^r)^[4]上构建的非接合型重组质粒(构建过程中去掉了 pUB110 上的 mob 区),所以表型为 His⁺、Km^r 的重组子只可能是染色体上的 His⁺ 基因或质粒 pPR8(Km^r)自然转化的结果。由于细菌自然转化的机制决定了染色体 DNA 的转化频率在一般情况下远远高于质粒 DNA 的转化频率^[1],所以在理论上上述转化系统中转化的主要方向为 BG2036 染色体上的 His 基因向 DB104/pPR8 的转移。这个结论我们根据质粒和染色体转化的不同特点^[1]通过对转化子产蛋白酶情况及质粒大小的检测得到了证实,在随机挑取的近 300 个转化子中,90% 以上都具有产蛋白酶能力。再随机选取 50 个菌株进行质粒检测,大部分质粒的分子量大小与 DB104/pPR8 的相比没有变化。

为了进一步证实在琼脂平板上发生的细胞间染色体 DNA 自然转

表 3 琼脂平板上发生的细胞间染色体 DNA 自然转化
Table 3 Cell-to-cell chromosome DNA natural transformation on agar plate

	DB104(LB) × 168(LB)	DB104(MM) × 168(LB)	DB104(LB) × 168(MM)	DB104(MM) × 168(MM)
	Averaged transformants/plate	103	312	331
				> 1000

化,我们将具不同营养标记且不携带质粒的 DB104 和 168 菌株分别在 LB 或 MM 中培养到对数生长期,将菌液等量混合后以 100μL 的涂布量涂布 MM 平板,37℃ 培养 30h 后发现形成了大量的表型为原养型的转化子,并且在琼脂平板上基本培养基培养物的自然转化能力要高于其 LB 培养物(表 3)。

3 讨论

Lorenz 等曾报道以沙子制备的人工生态模拟系统中, *B. subtilis* 在液、固两相交界面的自然转化能力要比单在液相中高 25~50 倍^[9]。本研究的结果也证明,在相同条件下, *B. subtilis* 在平板上的自然转化率明显高于液体转化,且通常被认为不能建立感受态的 LB 培养物^[1]当涂布到平板上后也很快具有了自然转化能力,这说明 *B. subtilis* 在固相物表面在包括感受态建立在内的整个自然转化过程都与传统的液体转化存在一定的差异。Pauline 等曾观察到吸附于固相物表面会引起细胞形态的改变,并促使细菌的代谢变得更加活跃,认为在固相物表面的吸附是细菌在自然环境中适应生存条件变化的一种策略^[10],而 *B. subtilis* 在固相物表面转化能力的提高也许正是这种生存策略的一个重要方面。但是,这种固相物表面对自然转化的促进作用在对革兰氏阴性菌 *P. stutzeri*^[8,11]及 *Acinetobacter calcoaceticus*^[12]的类似研究中并没有被观察到。

对包括 DNA 主动分泌及通过细胞间接触促进转化过程进行等在内的 DNA 给体功

能的研究是近来自然转化研究的一个新的研究方向^[2]。有文献表明, *B. subtilis* 在一些特定的生长阶段能向胞外主动分泌具有生物学活性的 DNA^[3,6], 而本研究的结果又证明, *B. subtilis* 的细胞间自然转化主要发生在固体平板上, 暗示固相物表面将是研究、揭示细菌自然转化过程中给体功能的一个重要途径。

参 考 文 献

- [1] Stewart G J. *Ann Rev Microbiol*, 1986, **40**:211~235.
- [2] 沈萍, 彭珍荣. 遗传, 1995, 17(增刊):89~91.
- [3] Lorenz M G, Wackernagel W. *Microbiol Rev*, 1994, **58**(3):563~602.
- [4] Hardwood C R, Cutting S M. *Molecular Biological Methods for Bacillus*. John Wiley & Sons Ltd. Baffins Lane, Chichester, West Sussex PO191UD, England, 1990.
- [5] Joenje H, Admiraal W, Venema G. *J Gen Microbiol*, 1973, **78**:67~77.
- [6] Hara T, Ueda S. *Agric Biol Chem*, 1981, **45**(11):2457~2461.
- [7] Paget E, Simonet P. *FEMS Microbiol Ecol*, 1994, **15**:109~118.
- [8] Stewart G J, Garko K A. *Microb Releases*, 1994, **2**:201~207.
- [9] Lorenz M G, Aardema B W, Wackernagel W. *J Gen Microbiol*, 1988, **134**:107~112.
- [10] Pauline M D, Bailey J E. *Biotechnol bioeng*, 1986, **28**:73~87.
- [11] Williams H G, Day M J, Fry J C. Natural Transformation on Agar and in River Epilithon. In: Gauthier M J ed. *Gene Transfers and Environment*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1992, 69~76.
- [12] Lorenz M G, Wackernagel W. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**:1246~1251.

BACILLUS SUBTILIS UNDERGOES NATURAL GENETIC TRANSFORMATION ON AGAR PLATES *

Chen Xiangdong Chen Qi Xie Zhixiong Shen Ping

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract: This paper conducted preliminary investigation on natural genetic transformation of *Bacillus subtilis* on agar plates. The results showed that, under same conditions, the natural transformation of the strain on agar plate was much more efficient than that of standard liquid method, and the transformation system could sustain higher DNase concentration. In addition, that the LB culture, which usually did not support the strain acquire competency, could undergo transformation as soon as it being spread on agar plate, suggested that the natural genetic transformation of *Bacillus subtilis* on solid plates may be different from the standard liquid transformation method. The cell-to-cell transformation between strains having different genetic makers could also be observed on agar plates.

Key words: *Bacillus subtilis*, Natural genetic transformation, Agar plate

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(39670397)