

芽孢杆菌原生质体作为质粒 DNA 转化的受体

郭兴华 贾士芳 陈乃用 郭三堆 门大鹏

(中国科学院微生物研究所, 北京)

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) BF 7658, 短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*) AS 1.940, 巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*) AS 1.941, 和多粘芽孢杆菌 (*B. polymyxa*) AS 1.878 等菌株, 既不能作为染色体 DNA 的转化受体, 也不能作为质粒 DNA 的转化受体。用不同量的溶菌酶处理这些菌株形成原生质体, 然后加 pUB110 质粒 DNA, 经聚乙二醇 6000 (PEG) 诱导, 在含新霉素 (400 $\mu\text{g/ml}$) 的 DM-3 再生培养基上恢复细胞壁, 培养 48 小时后, 转化子数为 1.0×10^3 — $4.6 \times 10^3/\mu\text{g}$ DNA。若同时用 PEG 和 Ca^{2+} 离子诱导, 转化子数可提高 2—3 倍。质粒 pUB110 用 E_{co} RI 酶切后, 转化子数大大下降 (2.0×10^2 转化子/ μg DNA)。Eco RI 酶切后, 用 T₄ 连接酶连成环状, 转化子数有所增加 (1.7×10^3 转化子/ μg DNA)。

自从 1958 年 Spizizen^[1] 发现枯草芽孢杆菌 168 菌株可作为遗传转化受体以来, 虽然在芽孢杆菌属内还有几个种也报道有转化系统^[2], 但并不是在所有可转化的种之中, 每个菌株都能进行转化^[3]。就是在可以转化的菌株中, 也只有在一一定的条件下才能出现生理感受态^[4,5]。这就大大限制了遗传分析和基因工程的受体范围。1979 年 Chang 和 Cohen^[6] 首次报道了枯草芽孢杆菌原生质体的质粒 DNA 高频转化, 但是他们所用的菌株都是 168 菌株的衍生菌。所以探讨利用其他种的芽孢杆菌原生质体的质粒转化, 对扩大受体菌范围是很有意义的。

本文研究了芽孢杆菌属中 5 个种 7 株菌株形成原生质体的条件, 并对其中大部分菌株进行了原生质体质粒转化的探讨。

材 料 和 方 法

菌株: 实验所用菌株都是需氧芽孢杆菌 (*Bacillus*), 如表 1。其中 BF 7658 是生产淀粉酶的菌株, AS 1.398 是生产蛋白酶的菌株。

培养基: 孢子的淡薄培养基, 根据战立克

等人^[7]报道的方法制备; 感受态细胞转化培养基, 参照 Anagnostopoulos 和 Spizizen^[4] 及 Dubnau 等^[8]的方法制备, 其中有些修改。GM I: 在 Spizizen 盐溶液中补加 0.02% 碱解酪素, 0.1% 酵母抽提液, 0.5% 葡萄糖, 另外补加必要的氨基酸各 50 $\mu\text{g/ml}$ 。GM II: 在 Spizizen 盐溶液中补加 0.004% 碱解酪素, 0.04% 酵母抽提液, 0.5% 葡萄糖, 2.5mM MgCl_2 , 0.5mM CaCl_2 , 另外补加必要的氨基酸各 5 $\mu\text{g/ml}$ 。原生质体转化用的培养基及溶液: PAB、SMM、SMMP、DM-3 的配方参照 Chang 和 Cohen^[6] 的方法制备。

DNA 的分离提纯: 染色体 DNA 的提取是根据 Marmur^[9] 的苯酚法和 Young 等^[10] 的修改方法进行的; 质粒 DNA 按 Zaslloff^[11] 的酸酚法提取。

转化方法:

1. 感受态细胞转化: 主要参照 Dubnau 等^[12] 方法进行。菌种在孢子斜面上培养二天, 孢子形成率接近 100%, 接一环孢子于 5ml GM I 溶液, 在 30℃ 慢摇床 (100rpm) 振荡培养过夜。次日以 10% 的接种量转到新鲜的 GM I 中, 37℃ 快摇床 (200rpm) 培养 3.5 小时, 再以 10% 的接种量接到 GM II 中, 37℃ 慢摇床培养 90 分钟,

本文于 1980 年 9 月 2 日收到。

表 1 菌株
Table 1 Bacterial Strains

菌株 Strains	基因型 Genotype	来源 Source
<i>B. subtilis</i> BR 151	<i>trp met lys amy</i>	J. Spizizen
<i>B. subtilis</i> 366	<i>trp thre Neo^r az^r</i>	J. Spizizen
<i>B. subtilis</i> 168	<i>trp amy str^r</i>	L'Université Paris VII, France
<i>B. subtilis</i> QB 3006	<i>thr5 leuA5 recE4</i>	G. Rapoport
<i>B. subtilis</i> BF 7658	野生型 wild type	白应林(中国科学院遗传研究所) Bai Yinglin (Institute of Genetics, Academia Sinica)
<i>B. subtilis</i> AS 1,398	野生型 wild type	中国科学院微生物研究所菌种保藏室 Laboratory of Culture Collection, Institute of Microbiology, Academia Sinica
<i>B. pumilus</i> AS 1,940	野生型 wild type	中国科学院微生物研究所菌种保藏室 Laboratory of Culture Collection, Institute of Microbiology, Academia Sinica
<i>B. megaterium</i> AS 1,941	野生型 wild type	中国科学院微生物研究所菌种保藏室 Laboratory of Culture Collection, Institute of Microbiology, Academia Sinica
<i>B. licheniformis</i> AS 1,520	野生型 wild type	中国科学院微生物研究所菌种保藏室 Laboratory of Culture Collection, Institute of Microbiology, Academia Sinica
<i>B. polymyxa</i> AS 1,878	野生型 wild type	中国科学院微生物研究所菌种保藏室 Laboratory of Culture Collection, Institute of Microbiology, Academia Sinica

离心收集菌体。用 1/10 体积的上清液悬浮菌体,并加灭菌甘油到 10%,混匀后分装到离心管中,随即放到液氮缸中保存。转化时取出离心管,放在 45℃ 水浴中融化,然后在 0.5ml 的菌液中加入适量 DNA。对照菌液不加 DNA,但要加相当于 DNA 量的 TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) 缓冲液;DNA 对照不加菌液,但要加 0.5ml GM II 溶液。放 37℃ 保温 30 分钟后涂培养皿,再在 37℃ 培养过夜,次日检查转化子数。

2. 原生质体形成及转化:受体菌在 PAB 液体培养基中,37℃ 摇床培养到对数后期。取 5ml 菌液在室温下离心 (4000rpm) 15 分钟。菌体悬浮于 0.5ml SMMP 液中,加不同量的溶菌酶,在 37℃ 水浴慢摇床保温并间隔抽样镜检,用相差显

显微镜观察原生质体的形成。待原生质体形成后,离心除去溶菌酶,再用 2ml SMMP 低速离心洗一次,原生质体重新悬浮于 0.5ml SMMP 溶液中。在 50μl TE 缓冲液中的质粒 DNA (1μg) 或染色体 DNA (1μg),与等体积的 2×SMM 液混合,然后加到 0.5ml 原生质体悬液中,混匀立即加入 40% 的 PEG (聚乙二醇 6000) 1.5ml (有的试验是加 40% 的 PEG 和 $1 \times 10^{-4}M$ 的 $CaCl_2$ 或者单加 $5 \times 10^{-4}M$ 的 $CaCl_2$),轻轻混匀,2 分钟后,用 5ml SMMP 稀释,低速离心吸去上清液,再用 1ml SMMP 重新悬浮,在 30℃ 水浴摇床慢摇 90 分钟。取 0.1ml 涂于含或不含抗生素的 DM-3 再生培养基上,另外在 BPY 培养基上涂菌作为对照。37℃ 培养 48 小时后,计算转化子数和原生质

体形成及存活数目。

结果与讨论

(一) 感受态细胞转化

为了比较感受态细胞转化与原生质体转化的性质，我们选择了染色体 DNA 和质粒 DNA 都能进行转化的菌株 BR151 和只能进行质粒 DNA 转化的菌株 QB3006 作为对照，以其他五株芽孢杆菌作为受体进行感受态细胞转化。结果如表 2。在进

行质粒 DNA 转化时，与 BR151 和 QB3006 比较，其他五株芽孢杆菌都只得到很少的转化子。用染色体 DNA 进行转化时，BR151 有很多转化子，QB3006 是重组缺陷型，不能作为染色体 DNA 转化的受体菌，而这五株芽孢杆菌都没有得到转化子。说明这五株芽孢杆菌既不能作为染色体 DNA 细胞转化受体，也不能作为质粒 DNA 感受态细胞转化受体。

(二) 原生质体的形成及细胞壁再生

表 2 感受态细胞的转化

Table 2 Transformation of Competent Cell

DNA 来源 DNA source	受体菌 Recipients	标记* Markers	形成菌落单位/ μg DNA CFU/ μg DNA**
枯草杆菌 366 pUB110 质粒 DNA pUB110 plasmid DNA of <i>B. subtilis</i> 366	BR 151	Neo ^r	3×10^4
	QB 3006	Neo ^r	1×10^4
	BF 7658	Neo ^r	50
	AS 1.940	Neo ^r	30
	AS 1.941	Neo ^r	30
	AS 1.398	Neo ^r	30
	AS 1.878	Neo ^r	30
枯草杆菌 168 染 色体 DNA Chromosomal DNA of <i>B. subtilis</i> 168	BR 151	Str ^r	1.2×10^4
	QB 3006	Str ^r	0
	BF 7658	Str ^r	0
	AS 1.940	Str ^r	0
	AS 1.941	Str ^r	0
	AS 1.398	Str ^r	0
	AS 1.878	Str ^r	0

* BPY 培养基中新霉素的含量为 $6\mu\text{g}/\text{ml}$

BPY medium containing neomycin $6\mu\text{g}/\text{ml}$

BPY 培养基中链霉素的含量为 $300\mu\text{g}/\text{ml}$

BPY medium containing streptomycin $300\mu\text{g}/\text{ml}$

** CFU/ μg DNA = Colony Formation Unit/ μg DNA

在我们所试的菌株中，在 37°C 1 小时内形成原生质体所需的溶菌酶量是不一致的。一般枯草芽孢杆菌 (AS 1.398 例外)，短小芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌用 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溶菌酶可在 1 小时内形成原生质体，这和 Fodor 等^[12]用巨大芽孢杆菌进行细胞融合所用的溶菌酶量一致。至于地衣状芽孢杆菌则需要 $400\mu\text{g}/\text{ml}$ 。而多粘芽孢杆菌需要量就高达 $800\mu\text{g}/\text{ml}$ 。图 1 是枯草

芽孢杆菌 BR151 及其原生质体的相差显微照片。

(三) 抗性表现

外源的抗生素抗性基因在细菌细胞内表达是需要一定过程的^[6]。抗新霉素的质粒 pUB110 转化后，经过 90 分钟至 120 分钟的培养，转化子出现的数目达到最大，并在一定的时间内是恒定的 (图 2)。因为原生质体在液体培养基中，短时间内不进行

表 3 形成原生质体所需溶菌酶量

Table 3 Amount of Lysozyme Required in Protoplast Formation

菌株 Strains	溶菌酶量 (μg/ml) Amount of lysozyme (μg/ml)
<i>B. subtilis</i> BR 151	200
<i>B. subtilis</i> BF 7658	200
<i>B. subtilis</i> AS 1.398	400
<i>B. megaterium</i> AS 1.941	200
<i>B. pumilus</i> AS 1.940	200
<i>B. licheniformis</i> AS 1.520	400
<i>B. polymyxa</i> AS 1.878	800

分裂,所以即使培养的时间长一些,也不会影响转化效率和频率。

(四) 质粒 DNA 浓度和原生质体转化频率的关系

和感受态细胞转化一样,质粒 DNA

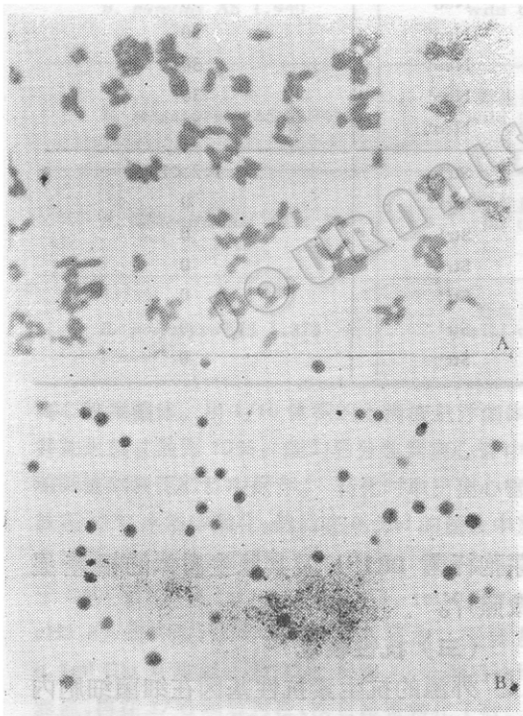


图 1 BR 151 细胞用溶菌酶处理前后的显微照片
Fig. 1 Micrograph of cells of *B. subtilis* BR 151 before and after lysozyme treatment

- A. 处理前正常细菌
- B. 处理后形成原生质体
- A. Normal cells before lysozyme treatment
- B. Protoplasts after lysozyme treatment

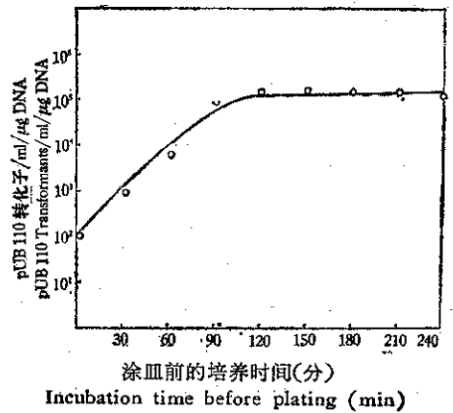


图 2 抗新霉素表现型出现的过程
Fig. 2 Time course of the appearance of Neomycin-resistant phenotype

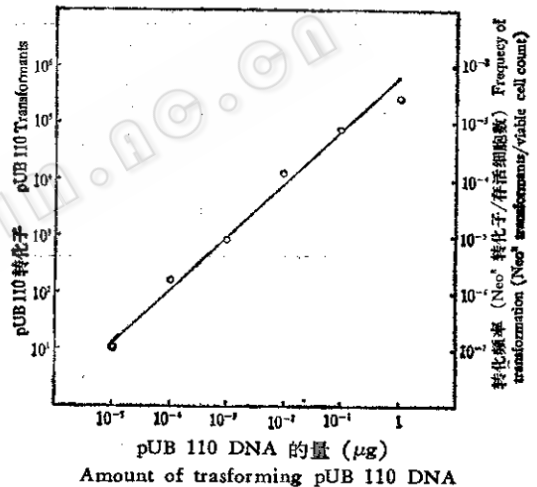


图 3 质粒 DNA 浓度和转化频率、转化效率的关系
Fig. 3 Frequency and efficiency of transformation as function of plasmid DNA concentration

浓度在一定范围内,转化子数与 DNA 浓度成线性关系^[6]。由图 3 看出,用 BR151 原生质体作转化受体时,质粒 DNA 在 10⁻⁵—10⁰μg 范围内,转化子数成线性关系。在 Chang 和 Cohen 的文章中转化效率很高,我们比他们少得多,其原因之一可能与制备质粒的方法有关。

(五) 不同种原生质体的转化效率

芽孢杆菌属中各个种间的遗传物质交换的范围是有一定限制的,在我们所试验

的 4 个种 5 株菌株中, 转化效率为 10^3 — 10^5 CFU/ μ g DNA, 如表 4。

表 4 不同菌株的转化效率

Table 4 Transformation Efficiency of Different Strains

菌株 Strains	菌落形成单位/ μ g DNA CFU/ μ g DNA
<i>B. subtilis</i> BR 151	4.6×10^3
<i>B. subtilis</i> BF 7658	1.5×10^3
<i>B. pumilus</i> AS 1.940	1.8×10^3
<i>B. megaterium</i> AS 1.941	3.0×10^3
<i>B. polymyxa</i> AS 1.878	1.0×10^3

(六) 原生质体转化系统的性质

感受态细胞转化要求一定的受体和感受态。在感受态阶段, 细胞中出现了与外源 DNA 重组所需要的生理功能和酶的功能, 因此不论是染色体 DNA 还是质粒 DNA 都可以转化(表 2)。原生质体可能不具备与重组有关的生理功能或酶功能, 因此染色体 DNA 较难转化(表 5)。质粒经限制性核酸内切酶切开, 再用连接酶连起来, 仍然能转到原生质体内, 这对今后 DNA 体外重组和扩大受体范围可能是有用的。

(七) 诱导剂

表 5 原生质体转化系统的一些性质*

Table 5 Some Properties of The Protoplast Transformation System*

DNA	Treatment	CFU/ μ g DNA
质粒 DNA plasmid pUB 110 DNA	不加酶 None	5.4×10^3
plasmid pUB 110 DNA	加 <i>Eco</i> RI 酶 + <i>Eco</i> RI	2.0×10^3
plasmid pUB 110 DNA	加 <i>Eco</i> RI 酶 + <i>Eco</i> RI before 后加连接酶 + ligase	1.7×10^3
染色体 DNA chromosomal DNA	不加酶 None	50

- * 1. BR151 作为受体菌。 BR151 as recipient.
2. 枯草杆菌 168 的染色体 DNA。 Chromosomal DNA of *B. subtilis* 168.
3. 链霉素作为选择标记。 Str as selecting marker.

Chang 和 Cohen^[6] 用 PEG 诱导转化, 获得了非常好的结果。在我们的试验中发现, PEG 加 CaCl_2 ($1 \times 10^{-5} \text{M}$) 可提高转化率 2—3 倍。如果单用 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ CaCl_2 处理, 效果接近于 PEG。

通过上述试验, 用原生质体转化的方法可使原来不能进行 DNA 转化的种或菌株, 能进行转化。这对于扩大 DNA 转化的受体范围和用于遗传工程的研究, 都是很有意义的。

参 考 文 献

[1] Spizizen, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*,

44: 1072—1078, 1958.

- [2] 中国科学院遗传研究所 204. 205组: 微生物育种学术讨论会文集 (国外资料评述), 科学出版社, 北京, p. 50, 1974.
[3] 汤懋斌等: 微生物学报, 10: 189—194, 1964.
[4] Anagnostopoulos, C. and J. Spizizen: *J. Bacteriol.*, 81: 741—746, 1961.
[5] Saito, H. et al.: *J. Gen. Appl. Microbiol.* 7: 243, 1961.
[6] Chang, S. and S. N.: Cohen: *Mol. Gen. Genet.*, 168: 111—115, 1979.
[7] 战立克、刘聿太: 微生物学报, 17: 343—347, 1977.
[8] Dubnau, D. and R. Davidoff-Abelson: *J. Mol. Biol.*, 55: 209—221, 1971.
[9] Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, 3: 207—218,

- 1961.
- [10] Young, F. E. and G. A. Wilson: *Handbook of Genetics*, Edited by R. C. King, Vol. 1, pp. 69—114, 1974.
- [11] Zasloff, M. et al.: *Nucl. Acid Res.*, 5: 1139—1152, 1978.
- [12] Fodor, K. and L. Alfodi: *Mol. Gen. Genet.*, 168: 55—59, 1979.

BACILLUS PROTOPLASTS AS RECIPIENTS FOR PLASMID DNA TRANSFORMATION

Guo Xinghua Jia Shifang Chen Naiyong
Guo Sandui Men Dapeng

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Bacillus subtilis BF 7658, *B. pumilus* AS 1.940, *B. megaterium* AS 1.941 and *B. polymyxa* AS 1.878 were unable to be recipients for transformation either by chromosomal DNA or plasmid DNA. Protoplasts of these strains were prepared by treating the cells with different amounts of lysozyme. Polyethylene glycol (PEG) was used to induce pUB110 plasmid DNA uptake by the protoplasts. Bacterial cell walls were regenerated on the regeneratoin me-

dium containing neomycin (400 μ g/ml). The transformants calculated after 48 h. incubation were 1.0×10^5 — $4.6 \times 10^5/\mu$ g DNA. If PEG plus calcium ion ($1 \times 10^{-5}M$) were used in induction, the transformation frequency increased 2—3 times. The transformation frequency decreased considerably when plasmid pUB110 DNA was digested with *Eco*RI, and increased if the linear plasmid DNA was ligated again in vitro prior to transformation.