

球形芽孢杆菌 Ts-1 原生质体电诱导质粒转化研究

王岳五 江波* 焦瑞身**

(南开大学生物系,天津)

本文探讨了球形芽孢杆菌 *Bacillus sphaericus* Ts-1 原生质体电诱导质粒 pHV 33 转化的最佳条件: 3个连续的间隔为1秒,时程为10 μ s,强度为21KV/cm的脉冲,使其转化频率为 2.44×10^7 转化子/ μ g DNA,转化效率为 3.16×10^{-6} ,质粒转化吸附的饱和浓度为 5μ g/10⁸ CFU。利用此条件,将重组杀蚊毒蛋白克隆 pJB417 转入 *Bacillus subtilis* 168M 和 *Bacillus sphaericus* Ts-1 中,使得 *B. subtilis* 有了杀蚊活性,但未能提高 Ts-1 的毒性。

关键词 球形芽孢杆菌 Ts-1; 原生质体; 电击转化

DNA 介导的转化,关键在于 DNA 分子如何透过质膜进入细胞中。常规的转化方法由于使用面窄而受到限制。Wang 和 Newmann^[1,2] 发现在一系列电脉冲作用下,原生质体的细胞膜被击穿,形成通透性的“洞”,DNA 分子进入而使细胞转化。这一技术,即电诱导下膜击穿 DNA 转化,被称为电击转化 (eletroporation)。此方法已广泛地应用于植物^[1,3]、动物^[4]和酵母细胞^[5],在细菌细胞转化中应用较少^[6-8]。本文采用这一技术,研究球形芽孢杆菌电击转化的可能性,为今后提高球形芽孢杆菌的杀蚊活性,增加其杀灭功能打下基础。

材 料 和 方 法

(一) 菌种、质粒及供试子

所用菌种、质粒见表1。

实验所用子为2龄淡色库蚊 (*Culex pipiens*), 由南开大学生物系昆虫教研室提供。

(二) 培养基及溶液

1. LB 培养基 (%): 蛋白胨 1, 酵母粉 0.5, NaCl 1; pH7.5。

2. MM₂ 培养基 (%): 酵母粉 0.1, 水解酪素 0.1, 柠檬酸钠(含两个结晶水) 0.1,

葡萄糖 0.5, K₂HPO₄ 1.4, KH₂PO₄ 0.6, (NH₄)SO₄ 0.2, MgSO₄ · 7H₂O 0.02。

3. DM₃ 培养基 (%): 水解酪素 0.5, 酵母粉 0.5, K₂HPO₄ 0.15, MgCl₂ 0.19, BSA 0.01, 葡萄糖 0.5, 琥珀酸钠 0.5 mol/L, 自然 pH。

4. SMM 稳定液: 蔗糖 0.5 mol/L, 顺丁烯二酸 20mmol/L, MgCl₂ 20mmol/L, pH6.5。

5. 转化液: 蔗糖 0.8mol/L, CaCl₂ 1mmol/L。

(三) 方法

1. 质粒提取及纯化: 以 Birnboim 法^[11] 及 Kado 法^[12] 制备质粒粗提液, 经 CsCl 密度梯度离心纯化, 紫外扫描测定浓度, 备用。

2. Ts-1 原生质体制备: 以 McDonald 方法^[13] 测定不同的溶菌酶量及酶解时间对 Ts-1 原生质体形成率及再生率的影响, 得出最佳条件。大量制备 Ts-1 原生质体, 作为电诱导转化受体。

3. 电诱导转化方法: 4×10^8 个 Ts-1

本文于1989年7月22日收到。

* 天津医药科学研究所。

** 中国科学院上海植物生理研究所。

表 1 菌种及质粒
Table 1 Strains and plasmids

菌 种 Bacterial strains	基 因 型 Genotype	参 考 Reference
<i>E. coli</i> C600	F ⁻ thi ⁻ thr ⁻ leu ⁻ lac ⁻ ton Sup λ ⁻	
<i>B. sphaericus</i> Ts-1	Str ^r	[10]
<i>B. thuringiensis</i> H ₄	Amp ^r	[10]
<i>B. subtilis</i> 168M	trp ⁻	
质粒 Plasmids		
pHV33 (7.3kb)	Amp ^r Cm ^r Tet ^r	[9]
pJB417 (11.66kb)	Amp Cm Toxicity to mosquito	Constructed by our lab

原生质体,悬于 0.4ml 电转化液中,加 5μg 质粒,混匀放置 5 分钟,注入融合小池,以 HD-401 脉冲细胞融合及基因转移仪加脉冲(见结果部分),再静置 5 分钟,吸出,收集细胞,悬于 SMM-DM₃ 培养液中,30℃ 培养 1 小时,涂布于含有链霉素 (Str, 100 μg/ml) 和氯霉素 (Cm, 10 μg/ml) 的 DM₃ 平板上,30℃ 培养 3 天,计数。计算转化效率和频率,并测定加脉冲前后原生质体的存活数,计算其存活率。

4. Ts-1 的限制作用^[13]: 4×10^8 个

原生质体,以 0.2 ml 100 mmol/L Tris-HCl(pH7.5), 50mmol/L NaCl, 5mmol/L MgCl₂ 悬浮破膜,取上清 30μl,加 2μg DNA, 37℃ 水浴保温 3 小时, 68℃ 保温 15 分钟,终止反应。以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析。

实 验 结 果

(一)原生质体的形成及再生

依方法 2, 探讨溶菌酶用量及酶解时间对 Ts-1 原生质体形成及再生的影响(表

表 2 Ts-1 原生质体的形成及再生
Table 2 The formation and regeneration of protoplast from Ts-1

溶菌酶量 ^(a) (mg/ml) Conc. of lysozyme	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
形成率 (%) Freq. of formation	87.5	91.5	94.6	96.3	98.8	99.1
再生率 (%) Freq. of regeneration	34.2	28.7	22.8	12.8	10.9	7.8
酶解时间 ^(b) (min) Time of lysis	0	30	45	60	75	90
形成率 (%) Freq. of formation	—	90.4	92.5	95.2	97.9	98.4
再生率 (%) Freq. of regeneration	—	24.8	23.5	21.8	14.5	10.3

菌浓度: 1×10^9 个/ml, 37℃: (a) 酶解时间为 60 分钟; (b) 溶菌酶量为 1.5mg/ml。
 1×10^9 cells/ml, 37℃: (a) 60min of lysis; (b) 1.5mg/ml of lysozyme.

2)。

由此发现,溶菌酶量为 1.5mg/ml, 37℃,酶解 45—60 分钟,Ts-1 原生质体形成率和再生率分别为 95.2% 和 21.8%。在此条件下,大量制备 Ts-1 原生质体,作为电击转化的受体。

(二) *B. sphaericus* Ts-1 的限制修饰作用

为了确定 Ts-1 是否对质粒 pHV33 有限制作用,将质粒 pHV33 与 Ts-1 细胞液混合保温后进行电泳分析(图 1)。

A B C D E F G H I J K L

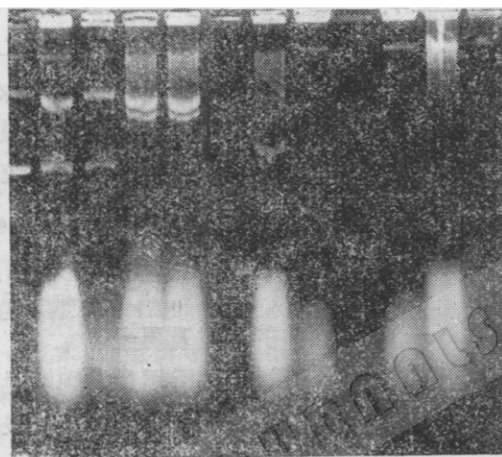


图 1 球形杆菌 Ts-1 及苏芸金杆菌 *H₄* 的限制作用
Fig. 1 Restriction in *B. sphaericus* Ts-1 and *B. thuringiensis* *H₄*

1.0% 琼脂糖凝胶电泳, TAE, 30 伏, 16 小时
1.0% agarose, TAE, 30V, 16h

- A: pHV33;
B: *B. sph.* + pHV33 (*E. coli*);
C: *B. sph.* + pHV33 (*B. sub.*);
D: *B. thr.* + pHV33 (*E. coli*);
E: *B. thr.* + pHV33 (*B. sub.*);
F: pBR322; G: *B. thr.* + pBR322;
H, J: *B. sph.* + pBR322; I: *B. sph.* supernate;
K: *B. sph.* + λ-DNA;
L: λ-DNA

(*sph.* = *sphaericus*; *thr.* = *thuringiensis*;
sub. = *subtilis*)

来源于 *Escherichia coli* 以及 *B. subtilis* 的质粒 pHV33、pBR 322 和 λ-DNA 与 Ts-1 上清保温后没有变化(如图 中 A, B, C, F, H, I, J, K, L), *Bacillus*

thuringiensis *H₄*, 则将 pHV 33 切成两条带, 将 pBR322 切成线状分子(图 1 中 D, E, G)。这就说明,苏芸金杆菌细胞中有限制修饰系统,球形芽孢杆菌是否有限制修饰系统尚不能确定,但它至少对两种来源的 pHV33 没有作用,即不限制此 DNA 分子。这就为我们将质粒 pHV 33 转入 Ts-1 细胞中提供了实验依据。

(三) 电击转化的影响因素

1. 脉冲强度对电转化的影响: 在其它条件不变时,改变脉冲电压,对质粒 DNA 与原生质体的混合液进行脉冲处理,涂于含链霉素和氯霉素的 DM, 选择再生平板上,检测转化子,结果如图 2。

当电压低于 12KV/cm 时,对原生质体

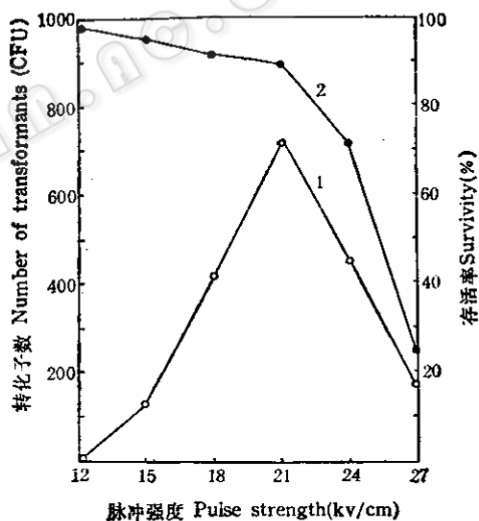


图 2 脉冲强度对电击转化的影响
Fig. 2 Effect of pulse strength on electroporation

脉冲条件: 脉冲个数: 1, 时程: 10μs, 其它条件见正文

Pulse conditions: Pulse number:

- 1, Duration: 10 us, Others in text.
1. 转化子数 Number of transformants;
2. 存活率 Survival

及质粒转化没有作用。高于 12KV/cm 时,转化子数随着电压的升高而增多,而高于 21KV/cm 时,转化子数急剧减少。根据存

活率的变化,进行推断,这是由于电压高于 21KV/cm 时,原生质体存活率急剧降低的缘故。故最适脉冲电压为 21KV/cm。

2. 脉冲个数对电转化的影响: 其它条件不变,脉冲电压为 21KV/cm 时,研究脉冲个数对电转化的影响,如图 3。

3 个电脉冲,有利于原生质体的转化。多于 3 个脉冲,原生质体存活率急剧降低,转化子数也随之减少。

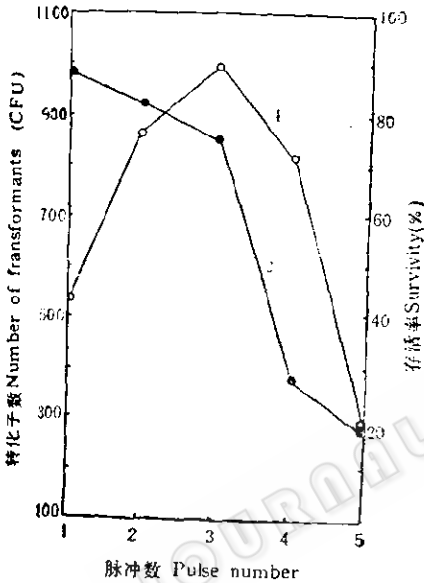


图3 脉冲个数对电击转化影响

Fig. 3 Effect of Pulse Number on Electroporation

脉冲条件: 脉冲强度: 21KV/cm, 时程: 10 μ s, 间隔: 1 秒

Pulse conditions: Strength: 21 KV/cm, Duration: 10 μ s, interval: 1 sec.

1. 转化子数 Number of transformants;
2. 存活率 Survivality

3. DNA 浓度对电转化的影响: 其它条件不变,改变 DNA 量,实验结果如图 4。

低浓度时,随着 DNA 浓度的增加,转化效率和转化频率不断增大,当大于 5 μ g/ml 时,转化效率增加减缓趋于饱和,但转化频率却由于 DNA 过量而降低。5 μ g pHV33 DNA 相当于 3.43×10^{10} 个分子,这时每个细胞达到最大转化频率的质粒分

子饱和吸附量为 34 个质粒分子。

综上所述,在所得的脉冲条件下,即脉冲强度 21KV/cm, 脉冲个数 3, 脉冲时程 10 μ s, 脉冲间隔 1 秒,可得到最佳转化效果: 转化频率 2.44×10^2 转化子/ μ g DNA, 转化效率为 3.16×10^{-6} 。

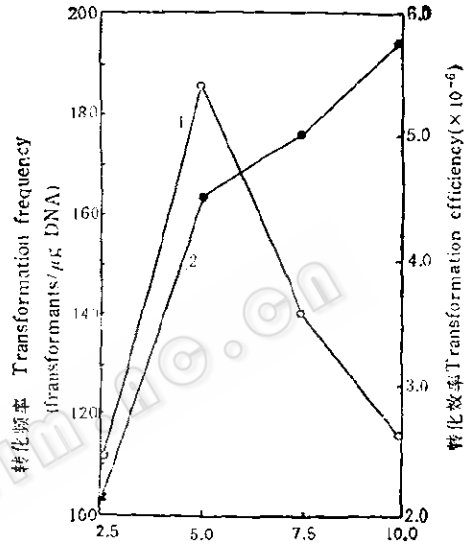


图 4 DNA 浓度对电击转化的影响

Fig. 4 Effect of DNA Concentration on Electroporation

脉冲条件: 脉冲强度: 18KV/cm, 个数: 1, 时程: 10 μ s, 其它条件见正文。

Pulse conditions: Pulse strength: 18KV/cm, Number: 1, Duration: 10 μ s, Others in text.

1. 转化频率 Transformation frequency;
2. 转化效率 Transformation efficiency

(四) 质粒 pJB417 的电击转化

pJB417 为本组构建的带有 4.3kb 杀蚊基因片段的重组克隆。为了探索构建高效多功能菌的可能性,将质粒 pJB417 电击转入 Ts-1、*Bacillus subtilis* 168M 和 *E. coli* C600 中,并测定各菌株对孑孓的半数致死量,如表 3。

pJB417 在 *E. coli* C600、*B. subtilis* 168M 中表达量非常低,*B. sphaericus* Ts-1 并未由于转入了带有毒蛋白基因的

表3 几种毒性转化子的半致死量和质粒稳定性的比较

Table 3 Comparison of LC_{50} and plasmid stability of different toxic transformants

菌株 Strains	<i>B. sphaericus</i> Ts-1	<i>B. sphaericus</i> Ts-1 (pJB417)	<i>B. subtilis</i> 168M (pJB417)	<i>E. coli</i> C600 (pJB417)
半致死量 (a) LC_{50} ($\mu\text{g protein/ml}$)	$2.6-3.1 \times 10^{-3}$	$2.4-3.5 \times 10^{-3}$	7.3-12.7	5.4-6.6
质粒丢失率 (b) Plasmid Spontaneous Curing (%)	—	41.4	16.7	26.7

(a): 生物测定依 Ganesan^[14] 方法。

Bioassay for testing larvicidal activity was carried by Ganesan's method^[14].

(b): 转化子的质粒丢失率依 McDonald^[13] 方法。

Spontaneous curing of plasmid in transformants were determined according to McDonald^[13].

质粒而使毒性增加。

讨 论

已见报道的关于 *B. sphaericus* 的限制修饰系统有 *B. sphaericus* IAM 286、*B. sphaericus* spp. 和 *B. sphaericus* 1593^[13]。Burke^[13] 在将 *B. subtilis* 质粒 pBC16 和 pUB110 转入 *B. sphaericus* 1593 时发现, *B. sphaericus* 可将 pUB110 切成两个片段,却不能切开 pBC16,因而 pBC16 易于转化 *B. sphaericus* 细胞,而且转化子稳定。本文亦证明 Ts-1 对 pHV33、pBR322、 λ -DNA 没有限制作用,为 pHV33 有可能转入 Ts-1 细胞中提供了必要前提。

在本实验中发现,来源于 *E. coli* 的 pHV33 质粒不能转化 Ts-1 细胞,产生于 *B. subtilis* 的 pHV33,仅在高浓度下转化 Ts-1 得到少量转化子,这与 Stephan^[15] 用 pHV33 转化一些芽孢杆菌时的结果相一致。而从这些转化子纯化的质粒则可使 Ts-1 原生质体高效转化。这就表明,只有通过 Ts-1 细胞修饰过的质粒才可能在 Ts-1 细胞中稳定存在复制和表达。

试图将 pJB417 转入 *B. thuringiensis*

H₄ 的工作,由于该菌株对质粒 pHV33 的限制作用而未获得成功。带有 pJB417 的 *B. subtilis* 168M 的毒性仅为 *E. coli* C600 (pJB 417) 的 50%,其原因可能是毒蛋白基因插入的部位是 *E. coli* 同源片段,而不与 *B. subtilis* 同源。pJB417 的 *B. sphaericus* Ts-1 的转化子并没有增加毒性,说明 pJB 417 的表达量还很低。

B. sphaericus Ts-1 转化子,既带有质粒 pHV33 的氯霉素抗性,又带有自身的链霉素抗性。McDonald^[16] 发现, *B. sphaericus* 1593 在 100 $\mu\text{g/ml}$ 的链霉素诱导下,可自发产生抗 5 $\mu\text{g/ml}$ 氯霉素的现象。在本实验中发现, Ts-1 氯霉素抗性的自发突变率低于 10^{-11} 。

细菌的电击转化需要较高的电压,同时高场强可使极性的 DNA 分子顺电场方向旋转^[17],并使 DNA 弯曲的构象变成直线构象^[18],更易于穿过质膜的“洞”,而进入细胞中。当电压在 12—21KV/cm 范围内,转化子数随电压增大而增加;当电压超过 21 KV/cm 时,细胞内大分子及细胞膜产生不可逆转的损伤^[19],因而转化子数量和存活率都很低。脉冲个数的影响同电压一致,3 个脉冲最适于 Ts-1 的原生质体转

化。pHV33 是一种松弛型质粒, 没有 par 序列, 同时与 Ts-1 不同源, 因而转化子的质粒稳定性极差, 丢失率高达 35%。

参 考 文 献

- [1] Wang, T., et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 107: 584—587, 1982.
- [2] Neumann, E. et al.: *EMBO J.*, 1: 841—845, 1982.
- [3] Potter, H., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 7161—7165, 1984.
- [4] Fromm, M. E., et al.: *Nature*, 319: 791—793, 1986.
- [5] Karube, I.: *FEBS, Lett.*, 182: 90—94, 1985.
- [6] Shivarova, N.: *Z. Allg. Microbiol.*, 23: 595—599, 1983.
- [7] MacNeil, J.: *FEMS. Microbiol. Lett.*, 42: 239—244, 1987.
- [8] Chassy, B. M.: *FEMS. Microbiol. Lett.*, 44: 173—177, 1987.
- [9] Promrose, S. B.: *Plasmid*, 6: 193—201, 1981.
- [10] 任改新等: *昆虫学报*, 25(3): 349—350, 1982.
- [11] Birnboim, H. C.: *Nucleic. Acid. Res.*, 7: 1513—1517, 1979.
- [12] Kado, C. I.: *J. Bacteriol.*, 145: 365—373, 1981.
- [13] McDonald, K. O. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 130: 203—206, 1984.
- [14] Ganesan, S. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 189: 181—183, 1983.
- [15] Stephan, D. et al.: *Current Microbiol.*, 13: 191—195, 1986.
- [16] Burke, W.: *Current Microbiol.*, 129: 1214—1221, 1983.
- [17] Fredering, E. et al.: *Electric Dichroism and Electric Birefringence*, Clarendon Press, p. 102—123, 1973.
- [18] Diekmann, S. et al.: *Biophys. Chem.*, 15: 157—167, 1982.
- [19] Sale, A. J. H.: *Biochim. Biophys. Acta*, 163: 37—43, 1968.

THE STUDY OF *BACILLUS SPHAERICUS* Ts-1 PROTOPLAST-PLASMID TRANSFORMATION OF ELECTROPORATION

Wang Yuewu Jiang Bo* Jiao Ruishen**

(Department of Biology, Nankai University, Tianjin)

This report gave the best conditions of *Bacillus sphaericus* Ts-1 protoplast-plasmid pHV33 electroporation. The highest transformation frequency and transformation efficiency induced by three pulse of 21 KV/cm and 10 μ s duration applied at an interval of one sec., was 2.44×10^3 transformants/ μ g DNA and 3.16×10^{-6} respectively. The saturated concentration of DNA absorbed by the protoplast was 5 μ g DNA/ 10^9 cells/ml. By means of this method, pJB417, a recombinant mosquito larvicide clone, was introduced into *B. subtilis* 168M and *B. sphaericus* Ts-1. The transformants of

B. subtilis 168M with biocide activity were obtained, but the toxicity of *B. sphaericus* Ts-1 was not increased.

Key words

Bacillus sphaericus Ts-1; Protoplast; Electroporation

* Institute of Pharmaceutical and Medical Science, Tianjin.

** Institute of Plant Physiology, Academic Sinica, Shanghai.