

一种改进的平板影印工具及其应用

徐民俊¹, 田小群², 周世宁^{1*}

(¹中山大学生命科学学院, 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广州 510275)

(²广州珠江啤酒股份有限公司, 广州 510308)

摘要:【目的】建立一种简便高效的平板影印工具, 克服传统影印工具的缺陷。【方法】将大量竹签按照一定方法捆扎成与平皿内盖直径相近的捆, 将单根牙签转移菌落的效果进行扩大, 从而实现菌落的大规模转移。【结果】本实验室使用上述工具成功地进行了平板影印和传代, 并进行转化子大规模筛选。【结论】与传统工具相比, 该影印工具更为经济简便, 而且效果清晰, 为微生物平板筛选提供新的方法和思路。国家发明专利申请号: 2007100291331。

关键词: 微生物; 平板影印; 高效筛选

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 05-0657-04

我国目前的纯生啤酒生产普遍存在泡沫稳定性低的问题, 主要原因是啤酒泡沫中残留活性蛋白酶 A 所致。通过基因工程手段敲除酿酒酵母蛋白酶 A 基因是改善啤酒泡沫稳定性的途径之一。但是基于食品安全性的要求, 对菌株进行遗传改良时无法使用常规的抗生素标记和营养缺陷型标记^[1], 转化子筛选成为最大的技术难题。本实验室在对生产用酿酒酵母进行遗传改良的过程中, 采用无抗药性标记转化方法, 转化子筛选采用羧肽酶 Y 活性验证方法进行筛选。该方法要求对转化后菌株进行传代培养, 以稀释蛋白酶 B 造成的影响。通过本论文提供的平板影印工具避免了传统平板复印方法的缺陷, 进行 3 轮平板复印进行传代, 顺利地实现了转化子大规模筛选。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: N-Acetyl-DL-phenylalanine β -naphthyl ester, 购自 Sigma 公司; Fast Garnet GBC, 购自 Sigma 公司; pRS403 质粒购自美国 ATCC; 凝胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司; 其他试剂均为国产

分析纯。微量核酸蛋白定量仪购自 Backman 公司。

1.1.2 菌种: 工业酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) NSLA112 为本实验室保存的啤酒生产菌种。

1.1.3 平板影印工具: 改进的平板影印工具为自制。

1.1.4 无效等位基因合成引物及检测引物: 由 Invitrogen 公司合成, 序列为: 5'-CTGGCTCCTCTC-GTGTCCACTGCACAATTCAACCCAGACGAGATT-TACTGAGAGTGCAC-3'; 5'-AGTCCAAAGCTGGG-GACTTGCCACCACCAAGCGACATATTCTGTGCG-GTATTTACACCG 3'。

1.2 无效等位基因制备

通过上述引物, 以 pRS403 质粒为模板, 结合 PCR 方法合成酿酒酵母蛋白酶 A 的无效等位基因, 参照文献[2]方法进行扩增。通过凝胶回收试剂盒将上述无效等位基因纯化和回收, 回收产物通过微量核酸蛋白定量仪确定浓度。

1.3 基因导入

通过电转化方法将该基因导入野生型酿酒酵母细胞中, 利用酵母自身的同源重组功能进行蛋白酶 A 基因的置换, 形成转化子, 参照文献[3]方法进行

基金项目: 国家“863 计划”(2007AA091904); 中国博士后基金(20070410854); 广东省自然科学基金 (7301731)

*通讯作者。Tel: +86-20-84110238; E-mail: lsszsl@mail.sysu.edu.cn

作者简介: 徐民俊(1974-), 男, 山东青岛人, 博士, 助理研究员, 主要从事食品微生物学。E-mail: xuminjun1974@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-11-12; 修回日期: 2008-02-19

1.4 羧肽酶 Y 活性验证方法进行转化子筛选

该方法是冷泉港实验室推荐的通过酵母细胞生理反应进行筛选和检测的方法^[1]。其原理是：在酵母细胞中羧肽酶 Y 和蛋白酶 B 均需要蛋白酶 A 激活，在野生型菌株中羧肽酶 Y 和蛋白酶 B 均具有正常活性，而在蛋白酶 A 基因缺失的转化子中，羧肽酶 Y 和蛋白酶 B 将保持在前体状态；因此虽然细胞中仍然存在少量有活性的蛋白酶 B 和羧肽酶，但数量有限，通过平板影印传代 2~3 次就可以消除残存的活性蛋白酶 B 和羧肽酶 Y 的影响。

对电转化方法完成外源基因导入的酿酒酵母细胞进行梯度稀释涂布 YPD 平板，30℃ 静置培养 2 d，然后利用平板影印方法传代 2 次，将溶解于二甲基甲酰胺中的 N-Acetyl-DL-phenylalanine β -naphthyl ester 倾倒在平板表面使之完全覆盖细胞，静置 10 min 待二甲基甲酰胺渗透到细胞中，用新鲜 Fast Garnet GBC 溶液冲刷表面，显色 5 min。野生型细胞中的羧肽酶将切割 N-Acetyl-DL-phenylalanine β -naphthyl ester 的酯键，游离的 β -萘酯与重氮盐 Fast Garnet GBC 反应产生一种不溶性的红色沉淀；而转化子则因为羧肽酶为前体状态将不产生显色反应，菌落呈现黄色或粉红色。倒出染色液，用无菌水冲洗平板表面 2 次以便更好的观察颜色变化。

2 结果和分析

2.1 传统影印方法的优缺点分析

1952 年 Lederberg 发明了平板影印 (Replica plating) 方法^[4]。1953 年 Lechevalier 等使用该方法进行了抗药菌株筛选^[5]。其基本原理是首先在完全培养基琼脂平板上制备密度适当的菌落。将灭菌丝绒绷在一个比培养皿稍小的圆柱上，然后将平板倒扣于其上并使压，原平板的菌落转移到丝绒上面。以此为蓝本，将含相应抗生素或处理因子的平板重复扣于绒布上同时使压，将菌落转移至该平板形成一系列子板。自产生以来由于前人在应用过程中不断尝试做了一些改进，平板影印法逐渐演变成为微生物研究的常规手段。但其原理基本上还是建立在最初的影印方法基础上。

传统影印方法的缺陷主要表现为：①只适合于菌落密度小的平板。在平板影印过程中，为了保证母板菌落转移至丝绒上，需要使压，菌落会被压平，造成面积扩大，从而在子板上形成接近扁平的菌苔样菌

落。细菌密度稍高一些或分布不均匀，就会造成边缘菌落间污染。②对于生长较快、体积较大的菌落和生长较慢、体积较小的菌落影印效果不同，照顾后者将使前者受压过大。③由于边缘部分比中央部分容易受力，所以边缘部分比中央部分易于影印；基于同样的原因，为了照顾平板中间菌落的影印效果，往往造成边缘菌落受压过大，而变成了扁平的菌苔。这种情况在影印第二版时尤甚。④另外，影印要求较高质量的丝绒。不仅价格较贵，而且每次都需要将绒布或其他影印介质取出并固定于圆柱面上，既增加了操作步骤又增加了污染的可能性。

2.2 本论文设计的影印平板工具

本实验室设计了一种经济简便的影印方法，与传统平板影印方法有着质的区别，不仅克服了上述缺点，使影印操作更为简便，无须任何中介材料，减少了污染的可能性。而且效果清晰，几乎达到与母板相同的生长状况。

该影印平板工具是将大量竹签捆扎成与平皿内盖直径相近的捆，将来接触菌落的面整平，背面涂胶粘于平皿内盖，60℃ 过夜烘干，灭菌后使用 (图 1)。将该工具与细菌接触的一面向上平放在超净台上，打开上盖，即可用于影印。如果有多个平板需要影印，可在第一次影印结束后，将牙签尖部在 75% 乙醇中浸泡 2 min，轻轻甩去过度的无水乙醇，在超净台上吹干 5 min 即可重复使用。也可以制备多套，统一灭菌。



图 1 本文讨论的影印工具

Fig. 1 the improved replica plating tool.

其复印的基本原理等同于单根牙签的接种原理；影印效果等同于单根牙签的接种效果 (图 2)。从图 2 可以看出，子板上的菌落形成与母板菌落类似的圆形，未见菌苔状扩散，由此也就避免了菌落间相互污染；母板上没有菌落的地方，在子板上不会形成菌落，而是一些小的凹坑 (参加图右上部)，表明影印是高

效和精确的。捆扎在一起的牙签尖端间距 1 mm 左右，对于生长 1~2 d 的菌落非常合适。我们用该工具取得的影印效果明显好于传统影印方法。



图 2 本文讨论的影印工具——影印效果
Fig. 2 replicating plate by the improved tool.

2.3 通过上述平板影印工具进行转化子大规模筛选

如果只有少数几个菌落需要检测，进行平板复制是比较简单的。如果需要检测大量菌落，提高每个平板的细菌数量不失为经济有效的检测策略。而当菌落密度较高时，传统的平板影印工具显然不能满足要求。因为细菌密度高间距很小时，菌落稍被压平就将导致菌落间的污染。此时，本文讨论的平板影印工具就比较符合要求，可以实现菌落转化子的高通量筛选。

在本实验室进行酵母菌检测的过程中，我们使用上述工具成功地进行了平板影印和传代，并进行转化子大规模筛选。对通过 PCR 方法合成的无效等位基因进行切胶回收，微量蛋白核酸定量仪定量后，取 3 μ L 电转化 25 μ L 预先经 LiAc 和 DTT 处理的野生型酿酒酵母细胞。转化液经 1 mL 液体 YPD 培养基回收，按 10^{-3} 稀释后涂布 YPD 平板，30 $^{\circ}$ C 倒置培养 2 d，然后利用该平板影印工具复印至新的 YPD 平板传代 3 次，每次均倒置于 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 2 d，最后一次进行羧肽酶 Y 活性验证（图 3）。

其中图 3-A 是利用该影印工具进行传代 3 次后进

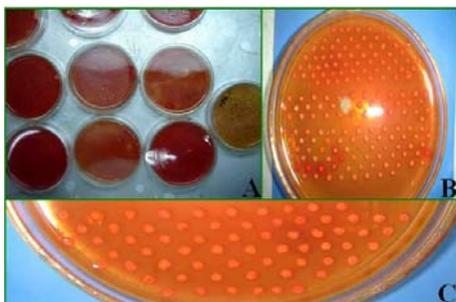


图 3 转化子大规模筛选
Fig. 3 mass selection of transformants. A: first mass selection; B: second selection; C: clones suitable for PCR test.

行大规模羧肽酶 Y 活性验证，一次筛选了近 10000 个菌落；图 3-B, C 是在显色反应完成后将潜在的转化子转移接种至新的 YPD 平板，二次显色反应进行确认。通过 PCR 方法对上述菌落进行基因扩增和测序，最终确定目标转化子（照片未附）。

2.4 该影印工具优缺点分析

2.4.1 优点分析：①材料经济，制作工艺简单；影印操作也很简单：打开培养皿上盖，即可影印。无需其他中介材料。减除了操作步骤，降低了污染可能性。②对平板边缘菌落和中央菌落影印效果相同，对于大菌落和小菌落影印效果相同（图 2）。例如，当将平板覆盖在该影印工具上时，就可以使牙签的尖部扎入所有菌落内，而无需考虑菌落大小。在影印时轻轻使压，就可以保证平板的任何部位（边缘或中央）与所有的带菌牙签尖部接触，由此完成影印。③影印效果好。不仅不会将原始菌落压平，而且在子板上形成的菌落是与母板菌落类似的圆形，不会形成菌苔状扩散，由此也就避免了菌落间相互污染；无论影印几版，皆不会使菌落扩散。生长完成的菌落跟母板几乎完全相同（图 2）。

2.4.2 缺点及解决方法：该工具存在的缺点包括：对于培养超过 2 天的菌落（如酵母菌），其菌落直径如果大于 2 mm，可能导致一个母板菌落形成 2 个子板菌落。但对于大肠杆菌而言，由于菌落体积通常在小于 2 mm 范围，所以在通常情况下这种影响不大；对于其他细菌，如酵母菌，或霉菌，适当控制其生长时间就可以避免上述情况的发生。

除此之外，由于材料是用竹签制作，灭菌多次之后竹签会变的较脆弱。根据本实验室前期操作实验发现，如果竹签质量较好，一套类似的复印工具可以连续灭菌 10 次左右，而不影响使用。另外，如果批量生产，材料换成钢铁类则可以大大简化操作及长期使用。

参 考 文 献

- [1] 陈俊红. 转基因食品的安全性及贸易争端. 中国食物及营养 (*Food and Nutrition in China*), 2003, 2(11): 14-17.
- [2] Burke D, Dawson D, Stearns T. *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.
- [3] Faber KN, Haima P, Harder W, *et al.* Highly-efficient electro-transformation of the yeast *Hansenula polymorpha*. *Curr Genet*,

- 1994, 25: 305–315.
- [4] Lederberg J, Lederberg EM. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J Bacteriol.* 1952, 63: 399–406.
- [5] Lechevalier HA, Corke CT. The replica plate method for screening antibiotic-producing organisms. *Appl Microbiol.* 1953, 1(2): 110–112.

An improved replica plating method and its application to the high-throughput selection of transformants

Minjun Xu¹, Xiaoqun Tian², Shining Zhou^{1*}

⁽¹⁾State Key Laboratory for Biohazard Control, College of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China

⁽²⁾The Technique Center of Zhujiang Beer Group Corporation, Guangzhou 510308, China

Abstract: [Objective] To make a simpler and highly efficient replica plating tool to avoid the limitations of the traditional method. [Methods] A number of bamboo-toothpicks was sheaved to form a bundle with diameter close to the plate diameter. The sheaved bamboo-toothpicks were used for replica-plating. [Results] This replica plating tool was successfully used for the screening of *Saccharomyces cerevisiae* transformants. [Conclusion] Compared with the traditional tool, this tool was simpler and highly efficient.

Keywords: microbiology; replica plating; highly efficient selection

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA091904), the China Postdoctoral Science Foundation (20070410854) and the Natural Science Foundation of Guangdong Province (7301731)

*Corresponding author. Tel: +86-20-84110238; E-mail: lsszsl@mail.sysu.edu.cn

Received: 12 November 2007/Revised: 19 February 2008

答 作 者 问

问: 我想发表一篇关于生物降解的文章, 菌株是自己筛选的, 现在只做了 16S rDNA 的鉴定(自己实验室), 请问必须要到相关部门(如北微所)做生理生化鉴定并具备有效国家证明才能在贵刊发表该菌株的相关文章?

答: 对于您提出的问题, 编辑部分 3 点回答您, 请您作参考。

- (1) 关于菌种鉴定的文章必须两个要点, 要么是新种, 要么是已知菌但是要有新的特殊的应用价值。
- (2) 如果您实验室筛选到了一株菌, 并发表文章, 不必到权威部门再做测试, 只是你们实验室的结果就行, 但是如果是新种必须满足以下两条: 一是作一下 16S rDNA 的鉴定, 二是要在两个国家以上的菌种保藏中心进行保藏。
- (3) 2004 年 11 月, 本刊主编建议: 为了使我国的研究成果得到国际公认, 建议作者将发现新种的研究报告尽快改投国外期刊“IJSEM”, 以取得公认。待发表后, 再告知本刊, 由《微生物学报》将此消息公布。

问: 如何构建系统发育树?

答: 构建系统树是为了鉴定菌株的分类学地位, 应使用正确的方法重新构树, 制作方法如下:

- (1) 将鉴定菌的 16S rRNA 序列递交 GenBank, 用 Blast 软件搜索相似的 16S rRNA, 然后一起构树。
- (2) 构建树时采用能反应分支长度的软件(如 NJ 法), 并用 Bootstrap 值分析分支聚类的稳定性。
- (3) 系统发育分析应该用国际上较为通用的一些建树方法, 如 Neighbour-Joining 等, 这样结果就更为可靠, 更直观。
- (4) 请严格按照下列具体要求写作[参见: 微生物学报, 2004, 44(2): 143.]
 - ①系统树中: 菌名应列出全称, 且属和种名应斜体; 名称后再加括号, 其内含序列号。
 - ②图注(本刊的图注全部采用英文写作): 应表明“树”上所有的内容, 包括: 括号中的序号、分支点上的数字涵义、0.01 代表的意义。
 - ③作图要求: 文件格式为*.Tif; 分辨率为 600 线; 字体为“Time New Roman”, 字号为 7 磅。