

文章编号: 1674-7054(2020)02-0245-06

乳酸乳球菌电击转化方法的优化

刘亚欣¹, 王 宇¹, 杨 诺¹, 郭桂英², 李 迁³, 曾纪锋⁴, 郑继平¹

(1. 海南大学 生命科学与药学院, 海口 570228; 2. 海南大学 教务处, 海口 570228; 3. 海南大学 网络与
技术中心, 海口 570228; 4. 海南大学 动物科技学院, 海口 570228)

摘要: 乳酸菌 NICE 系统是食品级表达系统, 本实验以该系统的表达载体 pNZ8148 和宿主菌 NZ9000 为研究对象, 对电击转化方法进行了优化。结果表明, 在培养基中加入 2.5% 甘氨酸, 收集 OD_{600} 值为 0.3 的细胞、用配方 I[(洗涤液 I: 蔗糖 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +甘油 10%; 洗涤液 II: 蔗糖 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +甘油 10%+EDTA $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)] 洗涤细胞, 再转入 $0.2 \mu\text{g}$ 质粒, 利用 2.5 kV 电压和 0.2 cm 电击杯进行电击转化, 恢复培养 1.5 h 后转化效率最高, 达 $1.6\times 10^8 \text{ CFU}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ 。本实验为乳酸乳球菌 NZ9000 的电击转化参数提供了数据参考, 为基于乳酸菌 NICE 系统的深入研究奠定了基础。

关键词: 乳酸乳球菌; 电击转化; 电击转化优化

中图分类号: S 129

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2020.02.016

乳酸菌是具有益生特性的革兰氏阳性菌, 广泛应用于食品工业、制药工业以及医药工业。乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 作为乳酸菌中一种重要的模式菌, 已被认为是生产同源或异源蛋白的良好宿主菌^[1]。由于其可在消化道中存活和定殖, 以活载体的形式来递送疫苗和 DNA 是乳酸乳球菌的主要功能。随着对乳酸菌表达系统的研究, Barbosa 等^[2] 开发了一套目前应用最广泛的 Nisin 控制的表达系统 (Nisin controlled gene expression system, NICE)。该系统通过 Nisin 的强启动子 Pnis 诱导外源基因的表达, 满足该系统的条件除了有表达载体和诱导剂 Nisin 外, 还必须含有含 nisR 和 nisK 双组份系统的宿主菌。乳酸乳球菌 NZ9000 是该表达系统最常用的宿主菌, 在基因工程中扮演重要角色, 因此具有广阔的应用前景。但目前关于外源 DNA 如何高效率导入至乳酸乳球菌中仍然是一个难题。尽管革兰氏阳性菌细胞壁化学组成单一, 但是因其具有高丰度的肽聚糖, 导致其细胞壁较厚且机械强度大, 利用常规的热激转化法无法将外源 DNA 导入至乳酸乳球菌中, 因此, 外源 DNA 如何高效率导入至乳酸乳球菌中仍是一个技术难题。目前, 原生质体转化和电击转化都是将外源片段导入阳性菌的方法。基于原生质体制备步骤繁琐、转化效率低; 而电击感受态细胞具有制备简便、省时的特点, 故研究人员把电击转化作为主要的外源 DNA 导入方法, 但是很多不确定因素会导致转化效率不稳定、重复性差等。因此, 笔者从影响乳酸乳球菌电击转化效率的各因素入手, 探究 NICE 表达系统中常用的表达体系 pNZ8148/NZ9000 的最优转化条件, 旨在为基于乳酸菌 NICE 系统的深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒载体与菌株 本实验使用的 pNZ8148(P3829) 载体和 NZ9000(P1770) 菌株均购自武汉淼灵质粒平台。

收稿日期: 2019-12-07

修回日期: 2019-12-18

基金项目: 国家自然科学基金(31460699); 海南自然科学基金创新研究团队项目(2017CXTD005); 海南自然科学基金面上项目(317071); 海南大学研究生教学经费(J100029019106004001)

第一作者: 刘亚欣(1994-), 女, 海南大学生命科学与药学院 2017 级硕士研究生. E-mail: 2990280029@qq.com

通信作者: 郑继平(1973-), 男, 教授. 研究方向: 病原微生物. E-mail: jiping.zheng@hainu.edu.cn

1.2 培养基 (1)GM17 液体培养基: M17 肉汤(胰酪蛋白胨、大豆蛋白胨、牛肉浸粉、酵母浸粉、抗坏血酸、硫酸镁、甘油磷酸钠、乳糖)中加 0.5% 葡萄糖。(2)GM17 固体培养基: M17 琼脂中加 0.5% 葡萄糖。(3)G/L-SGM17 培养基: M17 肉汤中加 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖、0.5% 葡萄糖和甘氨酸; 其中甘氨酸浓度按 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3% 分别加入至培养基中, 配制不同浓度甘氨酸的感受态细胞培养基。(4)复苏培养基: M17 肉汤中加入 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$ 和 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ 。

1.3 试剂及不同洗涤液配方 本实验质粒提取试剂盒(AP-MN-P-50)购自美国 Axygen 公司, 不同洗涤液配方见表 1。

表 1 不同洗涤液配方

Tab. 1 Different formulations of liquid detergent

	洗涤液I Liquid detergent I			洗涤液II Liquid detergent II		
	蔗糖/($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) Sucrose	甘油/% Glycerol	EDTA	蔗糖/($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) Sucrose	甘油/% Glycerol	EDTA/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
配方1	0.5	10	-	0.5	10	50
配方2	0.3	10	-	0.3	10	50
配方3	0.1	10	-	0.1	10	50
配方4	-	10	-	-	10	50
配方5	0.5	10	-	0.5	10	-

1.4 乳酸乳球菌感受态的制备 将乳酸乳球菌 NZ9000 单菌落培养至 G/L-SGM17 中, 次日按 1 : 10 比例接种到 50 mL 新鲜 G/L-SGM17 中, 分别取 OD_{600} 值为 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 时的菌液制备感受态。利用小批量方法制备感受态细胞: 先将菌液用 2 mL 离心管在 $6\ 000 \text{ g}$, $4\ ^\circ\text{C}$ 条件下离心 10 min。用 1 mL 洗涤液 I 重悬细胞, 相同条件离心 10 min, 用 1 mL 洗涤液 II 重悬细胞, 冰浴 15 min, 相同条件离心 10 min, 再用 1 mL 洗涤液 I 重悬细胞, 相同条件离心 10 min。弃废液后, 最后用 $40\ \mu\text{L}$ 洗涤液 I 重悬细胞, 立即用该感受态进行电转。

1.5 乳酸乳球菌感受态电击转化 将提取的质粒浓度调整到 $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 后, 分别在感受态细胞中加入 1, 2, 3, 4, 5 μL 质粒进行电转, 用不同的电击杯规格(0.1, 0.2 cm)在不同的电压条件下(1, 1.5, 2, 2.5, 3 kV)进行电击后, 立即加入复苏培养基。冰浴 5 min, 转至 1.5 mL 离心管中进行复苏培养, 同时在不同复苏时间(0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 h)下比较电击转化效率。每个单因素实验重复 3 次, 计算电击转化效率, 计算公式如下:

$$\text{电转化效率} = \text{稀释倍数} \times \text{菌落总数} / \text{质粒浓度}$$

1.5.1 不同洗涤液配方对电击转化效率的影响 在细胞洗涤液中加入蔗糖和甘油, 既可洗去培养基中各种离子, 又可给细胞提供高渗环境以保护细胞, 从而增加转化效率^[3]。本实验研究了细胞洗涤液的离子浓度和渗透压对电击转化效率的影响: 在甘氨酸浓度为 1% 的条件下, 用表 1 中的不同洗涤液配方制备 OD_{600} 值为 0.4 的感受态细胞, 加入 $0.1\ \mu\text{g}$ 质粒, 用 2 kV 电压进行电击转化, 再用 0.1 cm 的电击杯电击过后复苏 1 h。

1.5.2 不同甘氨酸浓度对电击转化效率影响 乳酸乳球菌属于革兰氏阳性菌, 其感受态细胞制备难度大于阴性菌, 因具有较厚的细胞壁使得外源 DNA 难以进入细胞。若在培养基中添加甘氨酸则可削弱细胞壁的合成, 但过低或过高的甘氨酸浓度又会影响电击转化效率^[4]。本实验研究了不同浓度甘氨酸对电击转化效率的影响: 用配方 1 制备感受态细胞, 除了甘氨酸浓度外, 其余条件如 1.5.1 中所述。

1.5.3 不同电压对电击转化效率的影响 外界给细胞施予瞬时电压会使细胞膜形成凹孔, 从而使质粒 DNA 进入感受态细胞内。过低的电压可能不足以让细胞膜形成凹孔, 但过高的电压又会让细胞大量死亡^[4]。因此, 合适的电压是决定电击转化效率高低的关键。鉴于电压是电击转化效率的主要因素, 本实验

探究了不同电压对乳酸乳球菌电击转化效率的影响: 当添加的甘氨酸浓度为 2.5% 时, 用配方 1 制备感受态, 其余条件如 1.5.1, 比较不同电压对电击转化效率的影响。

1.5.4 感受态细胞生长阶段对电击转化效率的影响 收集不同 OD_{600} 值(0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6)的感受态细胞, 确定甘氨酸、洗涤液配方、电压后, 其余条件按照 1.5.1 进行。

1.5.5 质粒浓度对电击转化效率的影响 控制甘氨酸浓度、洗涤液配方、电压、细胞生长阶段因素后, 转入不同浓度的质粒, 用 0.1 cm 电击杯电击细胞, 复苏 1 h, 转入不同质粒浓度, 研究质粒浓度对电击转化效率的影响。

1.5.6 不同电击杯规格对电击转化效率的影响 控制甘氨酸浓度、洗涤液配方、电压、细胞生长阶段、质粒浓度因素后, 用不同电击杯规格电击, 复苏 1 h。

1.5.7 复苏时间对电击转化效率的影响 控制以上所有条件, 研究不同复苏时间对电击转化效率的影响。

2 结果与分析

2.1 不同洗涤液配方对电击转化效率的影响 实验结果表明, 配方 1、配方 2、配方 3、配方 4、配方 5 转化效率(对数值)分别为 5.5×10^6 , 1.8×10^6 , 1.5×10^6 , 0.4×10^6 , 2.3×10^6 CFU $\cdot\mu\text{g}^{-1}$, 说明用配方 1 制备的感受态细胞转化效率最高。

2.2 不同甘氨酸浓度对电击转化效率的影响 结果(图 1)表明, 随着培养基中甘氨酸浓度的增加, 电转化效率也随之增大, 当甘氨酸为 2.5% 时, 电击转化效率最高, 之后随甘氨酸浓度的升高而降低。

2.3 不同电压对电击转化效率的影响 不同电压对电击转化效率的影响结果(图 2)表明, 在(1~2.5)kV 的范围内, 电击转化效率随电压的增大而增大, 超过 2.5 kV 后则减小。当电压为 2.5 kV 时, 转化效率最高。

2.4 感受态细胞生长阶段对电击转化效率的影响

结果(图 3)表明, 用生长对数前期的细胞(OD_{600} 值为 0.3)制备感受态, 其电击转化效率高于其他生长阶段的细胞, 之后随着细胞的生长, 转化效率反而降低。

2.5 质粒浓度对电击转化效率的影响 质粒浓度对电击转化效率的影响结果(图 4)表明, 随着质粒浓度的增加, 电击转化效率先升高后下降, 当加入 2 μL 浓度为 0.1 g $\cdot\text{L}^{-1}$ 的质粒时, 转化效率最高。

2.6 不同电击杯规格对电击转化效率的影响 不同电击杯规格对电击转化效率的影响结果(图 5)表明, 用 0.2 cm 电击杯电击后的转化效率高于 0.1 cm 电击杯的转化效率, 规格为 0.2 cm 的电击杯比 0.1 cm 电击杯电击效果好。

2.7 复苏时间对电击转化效率的影响 复苏时间对电击转化效率的影响结果(图 6)表明, 随着复苏时间的增加, 电击转化效率也在增加, 其中复苏时

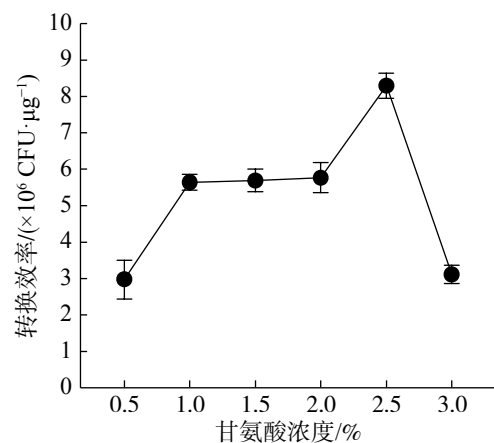


图 1 不同甘氨酸浓度对电击转化效率的影响

Fig. 1 Effect of glycine concentrations on the electrotransformation efficiency

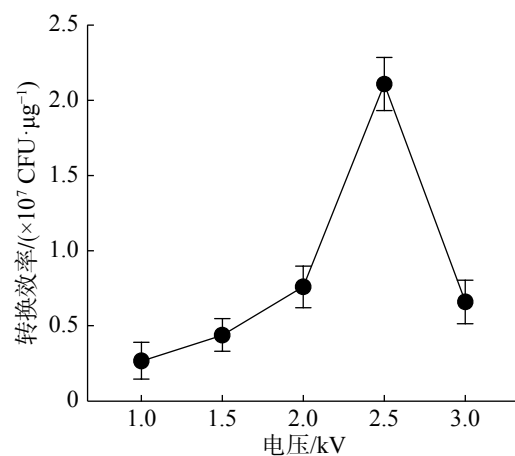


图 2 不同电压对电击转化效率的影响

Fig. 2 Effect of voltage on the electrotransformation efficiency

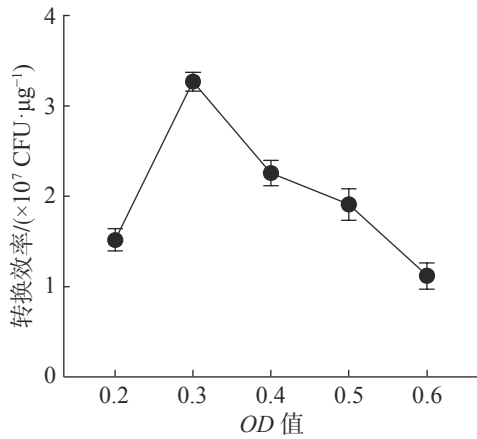


图3 不同生长阶段对电击转化效率的影响

Fig. 3 Effect of competent cells at different growth stages on the electrotransformation efficiency

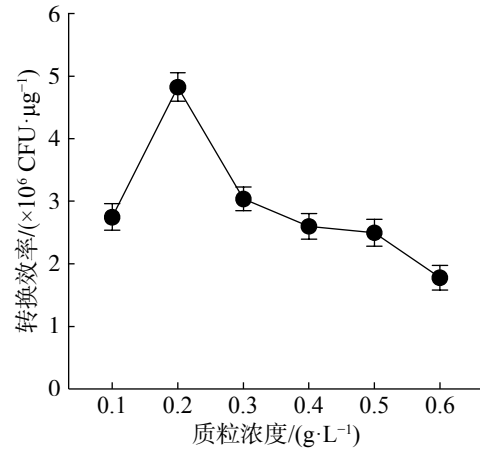


图4 不同质粒浓度对电击转化效率的影响

Fig. 4 Effect of plasmid concentrations on the electrotransformation efficiency

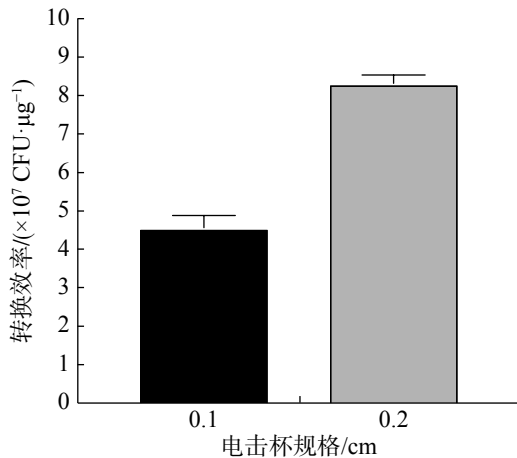


图5 不同电击杯规格对电击转化效率的影响

Fig. 5 Effect of electroploration cuvettes with different gap widths on the electrotransformation efficiency

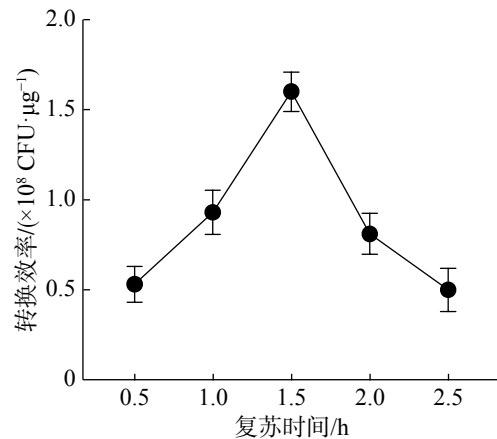


图6 不同复苏时间对电击转化效率的影响

Fig. 6 Effect of incubation time on the electrotransformation efficiency

间为 1.5 h 时,转化效率最高。感受态细胞的正常繁殖生长和质粒抗性基因的表达依赖于之后的复苏培养,合适的复苏培养时间是提高电击转化效率的必要条件。实验结果表明,电击转化效率最优条件为:在培养基中加入 2.5% 甘氨酸、收集 OD_{600} 值为 0.3 的细胞、用配方 I 洗涤细胞情况下,转入 0.2 μg 质粒,利用 2.5 kV 电压、0.2 cm 电击杯进行电击转化,恢复培养 1.5 h 后转化效率最高,达 1.6×10^8 CFU· μg^{-1} 。

3 讨论

本实验中的任何一个因素都对乳酸菌的电转化效率有影响,其中电压是一个较重要的因素,对于乳酸杆菌来说,任婧^[5]指出电击转化干酪乳杆菌的最适电压是 1 kV;白云等^[6]利用 2 kV 电压将重组质粒导入嗜酸乳杆菌中;乳双歧杆菌可用 2.5 kV 的电压进行电击转化^[7-8]。本实验得出乳酸乳球菌的最优电压条件是 2.5V,其次,在选择乳酸乳球菌感受态细胞生长状态时,生长对数中期细胞分裂旺盛,与稳定期相比,细胞壁结构较疏松。因此感受态制备一般选用对数中期细胞,但在本实验中,结果却显示在对数中前期时(OD_{600} 值约 0.3)收集细胞电击转化效率最高,可能是不同菌种间细胞壁结构存在差异。王洋等^[9]指出干酪乳杆菌感受态制备最适时期是中后期(OD_{600} 值约 0.3),与韦云莹^[10]结论一致,乳酸乳球菌感受态制备最佳时期是中前期。本研究结果表明,电击杯的型号也会影响转化效率,而任大勇等^[11]则是对电击杯

使用次数与电击转化的关系进行研究。有研究表明,电击转化效率的高低不受外源质粒的影响^[12],但本实验得到与之不同的结论:在其他条件不变的情况下,外源质粒浓度与电击转化效率呈线性关系。经过电击后的感受态细胞需要有合适的恢复培养时间,本实验经过 1.5 h 的恢复培养后有较高转化效率,有研究称感受态细胞需要培养 2 h 才能得到较高的转化效率,这可能是由于转入的质粒不同和表达的抗性基因不同造成的。

本实验首次以 pNZ8148/NZ9000 为研究对象来探究该组合最佳电击转化条件,通过使用最优化条件制备感受态以及电击转化,其转化效率为 1.6×10^8 CFU $\cdot\mu\text{g}^{-1}$ 。孙大庆^[13]得出质粒 pNZ8148 转入宿主乳酸乳球菌亚种 ATCC19435 中最优转化效率是 2.18×10^5 CFU $\cdot\mu\text{g}^{-1}$;任大勇等^[11]得出 pNZ8149/NZ3900 最高电击转化效率是 2.6×10^4 CFU $\cdot\mu\text{g}^{-1}$;张小娟^[14]得出 pNZ8110/NZ3900 最高电击转化效率是 1.2×10^4 CFU $\cdot\mu\text{g}^{-1}$;韦云莹等^[10]利用响应面法预测 pNZ44/NZ9000 的最佳转化效率达到 3.76×10^7 CFU $\cdot\mu\text{g}^{-1}$,尽管该转化效率较高,但仍然稍逊于本实验转化效果。本实验对 pNZ8148/NZ9000 转化条件的优化,为乳酸乳球菌后续的深入研究奠定了基础。

此外,感受态制备的环境温度控制、外源 DNA 的大小及来源、培养基成分、抗生素浓度等都会制约着电转化效率的高低。有研究认为,用乙酸锂和二硫苏糖醇在电击之前处理细胞 30 min,以及用多脉冲电击方法代替单脉冲电击方法,转化效率将会更高^[15],这将会促使学者们对乳酸乳球菌的感受态潜力进行更深入地挖掘。

参考文献:

- [1] SONG ADELENE AI-LIAN, IN LIONEL L A, LIM SWEE HUA ERIN, et al. Erratum to: A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory [J]. *Microb. Cell Fact*, 2017, 16: 139.
- [2] SIMÕES-BARBOSA A, ABREU H, SILVA NETO A, et al. A food-grade delivery system for *Lactococcus lactis* and evaluation of inducible gene expression [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, 65: 61 – 67.
- [3] GERBER SIMON D, SOLIOZ MARC. Efficient transformation of *Lactococcus lactis* IL1403 and generation of knock-out mutants by homologous recombination [J]. *J. Basic Microbiol.*, 2007, 47: 281 – 286.
- [4] HOLO H, NES I F. High-Frequency Transformation, by Electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris Grown with Glycine in Osmotically Stabilized Media [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, 55: 3119 – 3123.
- [5] 任婧, 李楠, 陈臣, 等. 干酪乳杆菌 LC2W 最优电击转化条件的建立 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(4): 1028 – 1032.
- [6] 白云, 韩博, 栗楠, 等. 表达鼠源 GLP-2 重组嗜酸乳杆菌的构建 [J]. *中国兽医学报*, 2015, 35(5): 727 – 730.
- [7] 张书献. GLP-1 类似肽转化双歧杆菌降糖作用及多肽通过肠黏膜机制 [D]. 广州: 南方医科大学, 2015.
- [8] 荀安营, 李娜, 邹兵, 等. 双歧杆菌感受态细胞的制备和电击转化条件的研究 [J]. *中国微生态学杂志*, 2013, 25(10): 1128 – 1130.
- [9] 王洋, 由田, 潘超, 等. 不同感受态细胞制备方法对副干酪乳杆菌转化效率的影响 [J]. *中国食品学报*, 2014, 14(9): 14 – 19.
- [10] 韦云莹, 王立峰, 熊智强, 等. 响应面法优化乳酸乳球菌电击转化效率研究 [J]. *上海理工大学学报*, 2018, 40(6): 566 – 571.
- [11] 任大勇, 李昌, 秦艳青, 等. 乳酸乳球菌高效电击转化方法的建立 [J]. *中国兽药杂志*, 2012, 15(1): 5 – 9.
- [12] POWELL I B, ACHEN M G, HILLIER A J, et al. A simple and rapid method for genetic transformation of Lactic Streptococci by electroporation [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, 54: 655 – 660.
- [13] 孙大庆, 姜毓君. 乳酸乳球菌高效电转化的方法 [J]. *中国乳品工业*, 2010, 38(7): 22 – 24.
- [14] 张小娟, 张荣光, 段广才, 等. 乳酸乳球菌 NZ3900 电转化条件的优化 [J]. *山东医药*, 2010, 50(11): 53 – 55.
- [15] WELKER DENNIS L, COBURN BRYAN M, MCCLATCHY JOHN H, et al. Multiple pulse electroporation of lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus casei* [J]. *J. Microbiol. Methods*, 2019, 166: 105741.

Optimization of Electrotransformation of *Lactococcus lactis*

LIU Yaxin¹, WANG Yu¹, YANG Nuo¹, GUO Guiying², LI Qian³, ZENG Jifeng⁴, ZHENG Jiping¹

(1. Institute of Life Sciences and Pharmacy, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 2. Academic Affairs Office, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 3. Network and Technology Center, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 4. Institute of Animal Science and Technology, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: The nisin-controlled gene expression system (NICE) is a food-grade system used for gene expression in *Lactococcus lactis*. Electrotransformation was optimized via the NICE, consisting of an expression vector pNZ8148 and a host strain *Lactococcus lactis* NZ9000. The results showed that the electrotransformation of *L. lactis* NZ9000 with the expression vector pHZ8148 gave the highest efficiency (1.6×10^8 CFU μg^{-1}) when *L. lactis* NZ9000 was cultured on the medium added with 2.5% of glycine, and its competent cells grown to 0.3 OD_{600} were prepared by washing with the liquid detergent formulation I (Sucrose $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + glycerol 10%), transferred into with 0.2 μg plasmid of pNA8148, electrotransformed at 2.5 kV on a 0.2 cm gap cuvette, and mixed gently for 1.5 h before plating. This study provides optimum conditions for electrotransformation of *L. lactis* NZ9000 which are favorable for further study of *L. lactis* based on the NICE.

Keywords: *Lactococcus lactis*; electroporation; optimization

(责任编辑:钟云芳)

(上接第 244 页)

Optimization of Genomic DNA Extraction for *Conus litteratus*

CHEN Wanyi, LI Xinjia, LUO Sulan, ZHANGSUN Dongting

(Ministry of Education Key Laboratory of Tropical Biological Resources/Haikou Key Laboratory for Marine Drugs/School of Life Science and Pharmacy, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, Hainan, China)

Abstract: The acquisition of high-quality genomic DNA is key to cloning of conotoxin genes and gene library construction. Four kits, Magnetic Bead Method Kit, Improved DNA Rapid Extraction Kit, FastPure DNA Isolation Kit, and TIANamp DNA Isolation Kit, were adopted to extract DNA from different tissues and organs of *Conus litteratus*, and the concentration, purity, size and integrity of the genomic DNA extracted from different tissues and organs by each kit were comprehensively compared. The results showed that the purity and concentration of the genomic DNA extracted with the Improved DNA Rapid Extraction Kit was better. Of the four different organs of *C. litteratus*, muscular foot had a higher purity in the genomic DNA extracted from its tissues and was the best organ used for extraction of the genomic DNA. The hepatopancreas and venom duct of *C. litteratus* gave the highest yield of the genomic DNA, but with poor fragment integrity and high contamination. Moreover, specific amplification products with the expected size were obtained through PCR. It is concluded that the best method to acquire the genomic DNA from *C. litteratus* is to extract the genomic DNA from the muscular foot with the Improved DNA Rapid Extraction Kit, with which high-quality genomic DNA can be produced and meet the requirements of subsequent research.

Keywords: *Conus litteratus*; genomic DNA; extraction method; optimization

(责任编辑:潘学峰)