

# 质粒pXZ10145DNA转化棒杆菌原生质体的研究

余红 杨能 应伟均 杜珠还

(浙江大学生物科学与技术系, 杭州)

用SDS处理谷氨酸棒杆菌1014 (*Corynebacterium glutamicum* 1014), 获得消除质粒的衍生株1014-6。通过质粒pXZ10145 (Cm<sup>r</sup>) 转化1014-6 菌株的原生质体, 研究了转化最佳条件。0.6μ/ml 青霉素处理对数期菌体可明显提高转化效率。转化促进剂 PEG 以分子量6000、浓度30%为最佳。转化在37℃水浴进行3min效果最好。转化效率最高可达2×10<sup>4</sup>转化子/μg DNA。质粒pXZ10145也已成功地转入钝齿棒杆菌B9 (*C. crenatum* B9)。并在新宿主中基本保持稳定。

**关键词** 棒杆菌属; 原生质体; 质粒pXZ10145转化

棒杆菌属中有许多菌是重要的工业生产菌株。在这类细菌中建立分子克隆系统有很大意义。利用重组DNA技术不仅可以进行定向改良菌种, 而且还可以阐明棒杆菌的遗传体系及其代谢调控机制。目前国外许多公司和实验室采用重组DNA技术对氨基酸生产菌株进行分子克隆研究, 以达到选育高产菌株的目的<sup>[1]</sup>。近几年国内也开展了这方面的研究<sup>[2,3]</sup>, 但由于缺乏合适的棒杆菌载体受体系统, 所做工作多以大肠杆菌为受体。

我们通过对谷氨酸棒杆菌1014消除质粒后, 再转化该菌获得了只含单一质粒pXZ10145的菌株1014-6T。从中提取质粒, 然后以消除质粒的1014-6菌株为受体, 进行质粒转化最佳条件的研究。同时成功地对钝齿棒杆菌 (*C. crenatum*) B9进行转化, 在棒杆菌中建立了转化系统。为进一步研究该类菌基因工程打下了基础。

## 材料和方法

### (一) 菌株和质粒

1. 谷氨酸棒杆菌1014 (*Corynebacterium glutamicum* 1014) 由上海工业微生物研究所提供。该菌带有二种质粒,

其中分子量较大的质粒pXZ10145<sup>[2]</sup>带有氯霉素抗性标记。

2. 谷氨酸棒杆菌1014-6 (*C. glutamicum* 1014-6) 是1014菌株经SDS处理获得的衍生株, 不含任何质粒, 对氯霉素敏感。

3. 谷氨酸棒杆菌1014-6T (*C. glutamicum* 1014-6T) 是1014-6菌株经转化获得的衍生株, 含单一质粒pXZ10145 (Cm<sup>r</sup>)。

4. 钝齿棒杆菌B9 (*C. crenatum* B9), 由浙江省钱江味精厂提供, 不含质粒, 对氯霉素敏感。

### (二) 培养基和溶液

1. 营养培养基组分(%) : 葡萄糖0.05, 蛋白胨1, 酵母浸出粉0.3, 牛肉膏0.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02, pH7.0, 10磅灭菌20min。

2. SB培养基: 二倍浓度营养培养基与1mol/L蔗糖等体积混合, 8磅灭菌15min后, 每100ml培养基加2ml 1mol/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O与1mol/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O的混合液。固体SB培养基加1%琼脂粉。

3. SEC培养基: 含7μ/ml氯霉素的SB培养基。

本文于1988年2月12日收到。

4. SMMC缓冲液: 参照文献〔4〕。

5. TEN缓冲液: 30m mol/L Tris, 50m mol/L  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ , 50m mol/L NaCl, pH8.0。

### (三) 质粒的消除

参照文献〔5〕。菌体在含50 $\mu\text{g/ml}$ 十二烷基磺酸钠(SDS)的营养培养基中振荡培养16h, 稀释后涂布于营养培养基平板, 待菌落长出后, 再影印到含氯霉素的平板上, 检出失去氯霉素抗性的菌株, 并检查质粒是否消除。

### (四) 质粒的提取

细菌接种于30ml营养培养液中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜, 离心收集菌体, 用1.2ml TEN缓冲液悬浮, 加入0.4ml溶菌酶(25mg/ml, 上海东风试剂厂出品), 35 $^{\circ}\text{C}$ 振荡1.5h, 加入0.1ml RNase(2mg/ml, 上海东风试剂厂出品), 继续保温1.5h, 加0.2ml 10%SDS, 室温静置10min, 用等体积TEN饱和酚、酸酚〔6〕、饱和酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)、氯仿/异戊醇(24:1)各抽提一次, 上清液加2.5mol/L NaAC至终浓度0.25mol/L, 再加二倍体积冷乙醇, -20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 离心沉淀, 用100 $\mu\text{l}$  TEN溶解, 电泳检测后用于转化。

### (五) 质粒DNA的电泳检测

琼脂糖凝胶0.8%, 电泳缓冲液89mmol/L Tris, 89mmol/L硼酸、2.0mmol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH8.3, 电泳电压4V/cm, 电泳时间3h。

### (六) 原生质体的制备和质粒DNA的转化

新鲜斜面菌种接种于营养培养液中, 培养过夜, 取0.3ml菌液接种到10ml新鲜营养培养液中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养1h后, 加青霉素母液至终浓度0.6u/ml。继续培养1.5h, 离心, 菌体用SMMC缓冲液洗二次, 悬于5ml SMMC中, 加2ml溶菌酶

(10mg/ml), 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温5h, 制成原生质体。原生质体计数参照乔宝义等〔7〕的方法。2500rpm离心5min, 沉淀用SMMC洗一次, 悬于0.1ml SMMC, 加入20 $\mu\text{l}$  (约0.3 $\mu\text{g}$ )质粒DNA, 混合后, 加1ml 30%分子量6000的聚乙二醇(PEG 6000), 37 $^{\circ}\text{C}$ 水溶保温3min, 加3ml SMMC稀释, 取0.1ml涂布于SBC平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养60h, 挑取氯霉素抗性菌落, 进行质粒检测, 并计算转化效率。

## 结果与讨论

### (一) 谷氨酸棒杆菌1014-6 (不含质粒) 的获得

为了获得合适的转化受体菌, 我们用SDS消除质粒的方法, 处理1014菌株, 挑取500个菌落, 其中58个失去氯霉素抗性, 其比率为12%。对此58株菌进行质粒检测, 发现有56株消除了一个带氯霉素抗性的质粒pXZ10145, 另2株消除了全部质粒(图版I-a)不含质粒的1014衍生株被命名为1014-6, 用作质粒转化的受体菌株。

### (二) 谷氨酸棒杆菌1014-6T (仅含单质粒pXZ10145) 的获得

谷氨酸棒杆菌1014含有二种质粒。从提取的双质粒DNA中分离单一质粒用于转化、酶切很不方便。为获得一株只含单一质粒pXZ10145的菌株, 我们先用从1014菌株提取的双质粒DNA转化1014-6菌株, 选出具有氯霉素抗性的转化子, 经检测证明转化子含单一质粒pXZ10145(图版I-a)此转化子被命名为1014-6T菌株, 再从1014-6T菌株提取质粒, 转化1014-6, 也得到相同转化子。以下工作所用质粒都来自1014-6T菌株。

### (三) 质粒pXZ10145转化谷氨酸棒杆菌1014-6

1. 青霉素和溶菌酶对原生质体形成、再生和转化效率的影响: 由谷氨酸棒杆菌1014-6制备原生质体时, 用3mg/ml的溶菌酶处理菌体, 不同处理时间转化效率不同(图1)。菌体经溶菌酶处理6h左右, 转化效率最高, 可达 $10^3$ 转化子/ $\mu\text{g}$  DNA。我们还比较了菌体培养时青霉素预处理与否对其原生质体的形成、再生及转化效率的影响(表1)。结果表明, 1014-6菌株经青霉素处理后, 原生质体形成率有所提高, 再生率下降, 转化效率却大有提高。

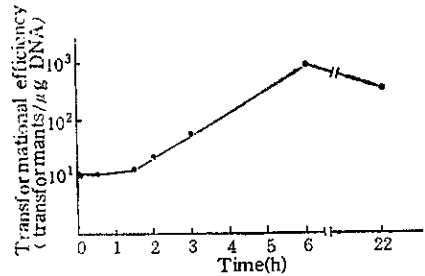


图 1 溶菌酶处理时间与转化效率的关系  
Fig. 1 Effect of the time of lysozyme treatment on transformational efficiency

## 2. 聚乙二醇分子量和浓度对转化效率的

表 1 青霉素和溶菌酶处理对转化效率的影响

Table 1 Effect of penicillin and lysozyme treatment on transformational efficiency

溶菌酶处理时间 (h) Lysozyme treatment	青霉素处理 Penicillin treatment	原生质体形成率 (%) Ratio of protoplast formation (%)	原生质体再生率 (%) Ratio of protoplast regeneration (%)	转化效率 (转化子/ $\mu\text{g}$ DNA) Transformational efficiency (Transformants/ $\mu\text{g}$ DNA)
2	+	99.7	5.4	$6.3 \times 10^2$
2	-	98.8	8.4	$1.6 \times 10^1$
5	+	99.98	2.6	$2.4 \times 10^3$
5	-	99.6	6.5	$1 \times 10^2$

影响: 在原生质体与质粒 DNA 的混合液中, 加入不同分子量和不同浓度的转化促进剂聚乙二醇 (PEG) 进行转化, 结果见图 2。在实验的分子量范围内, PEG 分子量越高, 转化效率也越高。PEG1000 只有在高浓度时才有转化促进效应。PEG6000 转化效率略高于 PEG4000。在 30% 浓度时二者均达到最高转化效率。

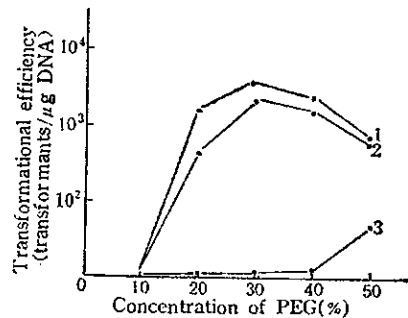


图 2 PEG 分子量和浓度对转化效率的影响  
Fig. 2 Effect of PEG molecular weight and concentration on transformational efficiency  
1. PEG 6000 2. PEG 4000 3. PEG 1000

3. PEG 处理时间对转化效率的影响: 以 30% PEG6000 作转化促进剂, PEG 处理时间对转化率的影响见图 3。结果表明 PEG 处理 3min 后, 转化效率最高。

4. 转化温度对转化效率的影响: 原生质体和质粒 DNA 混合液加 30% PEG 6000 后, 在不同的温度下保温 3min, 得到不同的转化效率(图 4)。37°C 时转化效

率最高。若将转化混合液先在水浴中放置 3min, 然后以 37°C 水浴保温 3min, 所得的转化效率与直接在 37°C 中保温者转化效率相同。

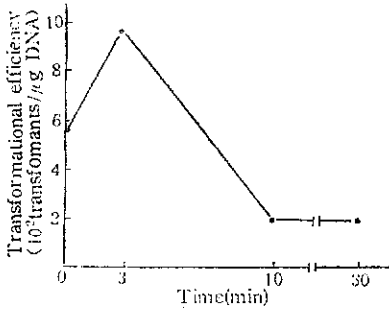


图3 PEG处理时间对转化效率的影响

Fig.3 Effect of the time of PEG treatment on transformational efficiency

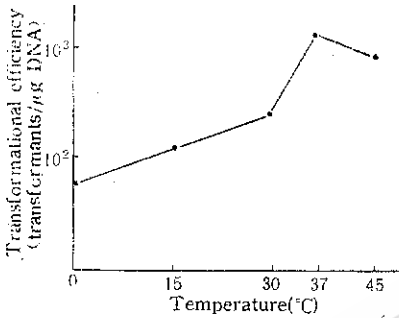


图4 转化温度对转化效率的影响

Fig.4 Effect of transformational temperature on transformational efficiency

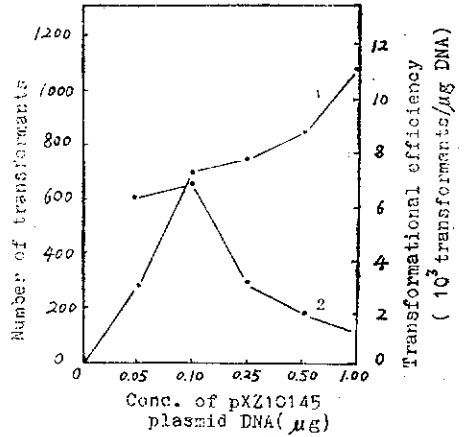


图5 质粒pXZ10145DNA量对转化效率的影响

Fig.5 Effect of amounts of plasmid pXZ10145 DNA on transformational efficiency

- 1. 转化子数 Number of transformants
- 2. 转化效率 Transformational efficiency

达培养, 分别检查其转化效率。结果表明, 表达时间对转化效率无显著影响。

5. 质粒DNA量对转化效率的影响: 转化时质粒DNA量与转化子总数及转化效率的关系见图6。在一定量的原生质体( $1 \times 10^8$ 个)中, 转化子总数随着质粒DNA用量的增加而增加, 但在质粒DNA用量超过0.1μg后转化效率随质粒DNA用量增加而逐渐下降。这表明, 在原生质体过量的情况下, 而质粒DNA量较低时, 单位量的质粒DNA分子能达到最有效的转化, 这时转化效率最高。在质粒DNA超过一定量后(本实验为0.1μg), 尽管转化子数随着质粒DNA量的增加而增加, 但转化效率却逐渐下降。

6. 表达时间与转化效率的关系: 谷氨酸棒杆菌1014-6原生质体用pXZ10145转化后, 悬浮于3ml SB液体培养基中, 在30°C水浴中经0、2、3、6、8、12h的表

7. 质粒pXZ10145转化1014-6菌株的最适条件: 综上所述, 质粒pXZ10145转化1014-6菌株的最适条件为: 菌体经青霉素预处理后, 以3mg/ml溶菌酶酶解5h制备原生质体,  $1 \times 10^8$ 个原生质体与0.1μg质粒DNA混合, 加入30%的PEG6000, 在37°C水浴中转化3min, 稀释后直接涂布再生培养基。在此条件下, 质粒pXZ10145对谷氨酸棒杆菌1014-6的最高转化效率可达 $2 \times 10^4$ 转化子/μg DNA。

#### (四) 质粒 pXZ10145 转化钝齿棒杆菌 B9

钝齿棒杆菌B9是常用的谷氨酸生产菌株, 它具有产品容易分离提取的优点。我们采用以上所建立的转化条件, 以质粒pXZ10145对其进行转化, 获得了成功。转化效率达 $3.3 \times 10^3$ 转化子/μgDNA。经电泳检测, 转化子含有质粒pXZ10145(图

版 I -b) 转化子在营养培养基平板上经 10 次连续传代后进行单菌分离, 随机挑取 50 个菌落, 进行氯霉素抗性检测, 结果仍有

84% 的菌落保持抗性, 证明质粒 pXZ10145 在钝齿棒杆菌 B<sub>9</sub> 中基本保持稳定 (表 2)。

本文研究了质粒 DNA 对棒杆菌原生

表 2 质粒 pXZ10145 在不同菌株转化子中的稳定性

Table 2 Stability of plasmid pXZ10145 in transformants from different host strains

菌株 Strains	总菌落数 Numbers of total colonies	氯霉素抗性菌落数 Numbers of Cm colonies	氯霉素抗性稳定株 Ratio of Cm holding (%)
谷氨酸棒杆菌 1014 <i>C. glutamicum</i> 1014	50	49	98
谷氨酸棒杆菌 1014-6 <sup>T</sup> <i>C. glutamicum</i> 1014-6 <sup>T</sup>	50	48	96
钝齿棒杆菌 B <sub>9</sub> 转化子 <i>C. crenatum</i> B <sub>9</sub> transformant	50	42	84
钝齿棒杆菌 B <sub>9</sub> <i>C. crenatum</i> B <sub>9</sub>	50	0	0

质体的转化。与其他报道<sup>[4,8,9]</sup>相比, 虽然转化效率还有些偏低, 但采用所建立的转化条件, 已对棒杆菌属不同工业生产

菌株进行转化。这为进一步在此类菌中应用重组 DNA 技术构建基因工程菌和开展基础理论的研究创造了有利条件。

### 参 考 文 献

- [1] 余 红等: 生物工程学报, 3 (3): 161—168, 1987.
- [2] 郑兆鑫等: 生物工程学报, 3 (3): 183—188, 1987.
- [3] 赵慕钧等: 工业微生物, 16 (6): 1—5, 1986.
- [4] Yoshihama, M. et al.: *J. Bacterial.*, 162 (2): 591—597, 1985.
- [5] 范云六等: 微生物学报, 14 (2): 209—215, 1974.
- [6] 李谱勋等: 遗传, 5 (2): 17, 1983.
- [7] 乔宝义等: 微生物学报, 23 (1): 33—43, 1983.
- [8] Katsumata, R. et al.: *J. Bacterial.*, 159 (1): 306—311, 1984.
- [9] Santamaría, R. et al.: *J. Bacterial.*, 162 (1): 463—467, 1985.

## TRANSFORMATION OF *CORYNEBACTERIUM* PROTOPLASTS WITH PLASMID pXZ10145 DNA

Yu Hong Yang Nen Ying Weijun Du Zhuhuan

(Department of Biological Sciences and Technology, Zhejiang University, Hangzhou)

A transformation system in *Corynebacterium* was developed. *C. glutamicum* 1014-6 containing no plasmid was derived from *C. glutamicum* 1014 which harbors two kind of plasmids after the treatment with SDS on *C. glutamicum* 1014. Optimal conditions of protoplast transformation of *C. glutamicum* 1014-6

with plasmid pXZ10145( $C_m^+$ ) were studied. Protoplast transformation efficiency is distinctly increased by the treatment of early logarithmic phase bacterial cells with penicillin G. Optimal transformation conditions are 30% PEG 6000 and 37°C water bath for 3 minutes, yielding  $2 \times 10^4$  transformants per  $\mu\text{g}$  of DNA. Plasmid pXZ10145 originally from *C. glutamicum* 1014, could transform *C. crenatum* B9 with an efficiency of  $3.3 \times 10^8$  transformants per  $\mu\text{g}$  of DNA. The plasmid was stably maintained in the new host.

### Key words

*Corynebacterium*; protoplast; plasmid pXZ10145; transformation

### 图版说明

#### Explanation of plate

#### a. 谷氨酸棒杆菌1014及其衍生株的质粒DNA电泳图

Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA from *C. glutamicum* and its derivatives

1. 无质粒, 1014-6菌株 No plasmid DNA from strain 1014-6

2. pXZ10145, 双质粒提取液转化获得的1014-6T菌株

Plasmid pXZ10145 DNA from strain 1014-6T which was derived by transforming 1014-6 with DNA from strain 1014 (containing two plasmids)

3. pXZ10145, 单质粒提取液转化获得的1014-6T菌株

Plasmid pXZ10145 DNA from strain 1014-6T which was derived by transforming 1014-6 with DNA from strain 1014-6T (containing one plasmid)

4. pXZ10145和pZM10141, 1014菌株

Plasmid pXZ10145 and pZM10141 DNA from strain 1014

#### b. 钝齿棒杆菌B9转化子质粒DNA电泳图

Agarose gel electrophoresis of plasmid pXZ10145 DNA from *C. crenatum* B9 transformants

1. 无质粒, 钝齿棒杆菌B9 No plasmid DNA from strain *C. crenatum* B9

2. 质粒DNA, 钝齿棒杆菌B9转化子 Plasmid DNA from strain *C. crenatum* B9 transformants

3. 质粒pXZ10145DNA Plasmid pXZ10145 DNA