

• 生物育种与工艺优化 •

热葡萄糖苷酶地芽胞杆菌 NCIMB 11955 高效电转感受态细胞电转体系的建立

卜瑞红¹, 杨志恒², 李子龙², 张国建^{1*}, 王为善^{2*}

1 中国海洋大学医药学院, 山东 青岛 266000

2 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

卜瑞红, 杨志恒, 李子龙, 张国建, 王为善. 热葡萄糖苷酶地芽胞杆菌 NCIMB 11955 高效电转感受态细胞电转体系的建立[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3508-3519.

BU Ruihong, YANG Zhiheng, LI Zilong, ZHANG Guojian, WANG Weishan. Development of highly efficient electrocompetent cells for electroporation of *Geobacillus thermoglucosidasius* NCIMB 11955[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3508-3519.

摘要: 热葡萄糖苷酶地芽胞杆菌(*Geobacillus thermoglucosidasius*)是一种革兰氏阳性兼性厌氧菌, 因其高温生长速度快、不易染菌的特性, 作为下一代工业生物技术的候选底盘, 已被广泛用于生产生物燃料和高附加值的化学品。然而, 相比于经典的模式菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*), 热葡萄糖苷酶地芽胞杆菌因其转化效率低, 限制了其作为底盘菌株的高效应用。本研究的目的是开发一种能够提高该菌株电转化效率的方法。本研究通过敲除该菌株中预测的限制性内切酶基因, 添加细胞壁弱化剂和细胞膜抑制剂, 优化目标菌株高效感受态细胞的制备, 从而提高转化效率。热葡萄糖苷酶地芽胞杆菌的4个限制性内切酶基因的敲除可以使感受态细胞电转化效率提高至 1.2×10^4 CFU/(μg DNA); 在敲除株的基础上, 分别通过添加吐温 80、DL-苏氨酸和甘氨酸进一步优化感受态细胞转化效率, 其中吐温 80 的添加使感受态细胞电转化效率提高 22.5 倍左右, DL-苏氨酸的添加可以使感受态细胞电转化效率增加 44 倍, 甘氨酸的添加可以使感受态细胞电转化效率进一步提高 334 倍左右, 优化整合添加各类试剂后感受态细胞电转化效率在限制性内切酶缺失菌株的基础上提高至 4.6×10^6 CFU/(μg DNA), 相对野生型菌株提高了 3 个数量级。这为热葡萄糖苷酶地芽胞杆菌的高效遗传操作和代谢工程奠定了基础。

关键词: 热葡萄糖苷酶地芽胞杆菌; 转化效率; 限制修饰系统; 电转感受态细胞

资助项目: 国家重点研发计划(2020YFA0906800)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2020YFA0906800).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Guojian, zhangguojian@ouc.edu.cn; WANG Weishan, wangws@im.ac.cn

Received: 2023-01-06; Accepted: 2023-03-21

Development of highly efficient electrocompetent cells for electroporation of *Geobacillus thermoglucosidasius* NCIMB 11955

BU Ruihong¹, YANG Zhiheng², LI Zilong², ZHANG Guojian^{1*}, WANG Weishan^{2*}

1 College of Medicine, Ocean University of China, Qingdao 266000, Shandong, China

2 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: *Geobacillus thermoglucosidasius* is a kind of Gram-positive facultative anaerobic bacteria. The fast growth rate under high temperature and less susceptibility to microbial contamination enable *G. thermoglucosidasius* to be a desirable producer of biofuels and high-value-added chemicals for the next-generation industrial biotechnology. However, compared with the classical model strain *Escherichia coli*, the applications of *G. thermoglucosidasius* are hampered by its low transformation efficiency. This study aimed at obtaining competent cells with high transformation efficiency through inactivating restriction enzymes, adding cell membrane inhibitors and cell wall weakening agents. The results showed that the electro-transformation efficiency achieved 1.2×10^4 CFU/(μg DNA) by knocking out four genes encoding restriction enzymes. Adding a certain amount of tween 80, DL-threonine and glycine further increased the competent efficiency about 22.5, 44, and 334 times, respectively. The electro-transformation efficiency was enhanced to 4.6×10^6 CFU/(μg DNA) under the optimized conditions, laying a foundation for genetic manipulation and metabolic engineering of *G. thermoglucosidasius*.

Keywords: *Geobacillus thermoglucosidasius*; transformation efficiency; restriction-modification systems; competent cells

热葡萄糖苷酶地芽胞杆菌 (*Geobacillus thermoglucosidasius*) 作为具有代表性的革兰氏阳性、兼性厌氧嗜热菌底盘细胞^[1-2], 与大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 等传统的底盘细胞相比具有显著优势。首先, 热葡萄糖苷酶地芽胞杆菌的生长速度快, 与大肠杆菌相当; 其次, 该菌的生长温度在 42–70 °C 之间, 最适生长温度为 60 °C, 与常温发酵相比, 高温发酵能够节省发酵过程中的冷却成本并大大降低被常温微生物污染的风险; 最后, 它能够产生耐高温的木质纤维素水解酶, 使其可以充分利用木质纤维素^[3-4]。热葡萄糖苷酶地芽胞杆菌由于具有上述发酵过程中的种种优点, 能够为企业节能降

耗、降低成本, 不仅被开发用于生产包括生物乙醇、异丁醇和氢气等生物燃料^[5-6], 而且被用来生产某些精细化学品, 如 2,3-丁二醇、核黄素和异戊二烯等^[7-9]。以上特性使得热葡萄糖苷酶地芽胞杆菌能够在工业化过程中具有显著成本优势和环境效益。然而, 该菌的遗传改造工具开发相对于其他底盘细胞依然滞后, 大幅提高其转化效率对该菌的遗传操作及工业化都有着重要作用。

目前芽胞杆菌常见的遗传转化方法包括原生质体转化和电转化^[10-11], 其中原生质体转化法复杂、耗时且转化效率相对较低, 这在很大程度上限制了该方法的广泛使用^[12], 而电转化法具有简单高效的优点, 广泛应用于以枯草芽胞杆菌为代

表的革兰氏阳性菌的质粒导入。首次报道的热葡萄糖苷酶地芽胞杆菌 NCIMB 11955 的电转化效率为 10^3 – 10^4 CFU/(μg DNA), 后有研究者认为转化效率低是因为其使用的质粒复制子在该菌株中无法快速起始复制, 进而影响质粒转化至细胞的效率, 因此对穿梭质粒的复制子进行改造, 成功将转化效率增加至 10^4 – 10^5 CFU/(μg DNA)^[13-14], 然而这一转化效率依然无法满足研究者对该菌株遗传改造的需要。

因此, 本研究主要针对热葡萄糖苷酶地芽胞杆菌 NCIMB 11955 菌株中的限制修饰系统、细胞壁弱化剂及细胞膜抑制剂等方面进行实验, 通过敲除若干限制性内切酶基因, 优化细胞培养和感受态制备方法, 使得该菌株的感受态细胞电转化效率从 2×10^3 CFU/(μg DNA) 提高至 4.6×10^6 CFU/(μg DNA), 这是目前该菌株已知的最高转化效率。本研究结果能够极大地促进后续对该菌株的遗传改造, 为嗜热菌工业化奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基

菌株及质粒见表 1。

LB (Luria Bertani, LB) 液体培养基(g/L): 氯化钠 10, 蛋白胨 10, 酵母浸粉 5; LB 固体培养基(g/L): 氯化钠 10, 蛋白胨 10, 酵母浸粉 5, 琼脂粉 20; LBS (Luria Bertani Sorbitol, LBS) 液体培养基(g/L): 氯化钠 10, 蛋白胨 10, 酵母浸粉 5, 山梨醇 91; mLb (modified Luria Bertani, mLb) 液体培养基(g/L): 氯化钠 10, 蛋白胨 10, 酵母浸粉 5, FeSO_4 0.06, CaSO_4 0.123 8, MgCl_2 0.056 1; TGP 培养基(g/L): 蛋白胨 17, 大豆蛋白胨 3, 葡萄糖 2.5, 氯化钠 5, K_2HPO_4 2.5, 甘油 4, 丙酮酸钠 4。

1.1.2 引物

用于菌株基因敲除及验证的引物见表 2。

1.1.3 主要试剂及溶液

本研究中使用的主要试剂有蛋白胨、酵母粉、氯化钠、甘露醇、海藻糖、山梨醇、甘油、质粒小提试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]、胶回收试剂盒(北京天漠科技开发有限公司)、 $2 \times \text{M5}$ HiPer plus *Taq* Hifi PCR (Polymerase Chain Reaction) mix (北京聚合美生物科技有限公司)、吐温 80、DL-苏氨酸、甘氨酸[生工生物工程(上海)股份有限公司]、TSA (tryptone soya agra, TSA) 固体培养基(OXOID)。

山梨醇甘露醇甘油海藻糖(sorbitol mannitol glycerol trehalose, SMGT)溶液(g/L): 山梨醇 91, 甘露醇 91, 海藻糖 169, 甘油 100。

1.2 敲除质粒构建

分别以质粒 pUB-sfGFP 为模板, 以 pUB-F 和 pUB-R 为引物, 用 KOD One 扩增骨架 DNA。以嗜热地芽胞杆菌 NCIMB 11955 基因组为模板, 用引物 pUB-9985-L-F、pUB-9985-L-R 及引物 pUB-9985-R-F、pUB-9985-R-R 扩增目的基因 *BCV53_09985* 的上、下游同源臂; 用引物 pUB-5690-L-F、pUB-5690-L-R 及引物 pUB-5690-R-F、pUB-5690-R-R 扩增目的基因 *BCV53_05690* 的上、下游同源臂; 用引物 pUB-12685-L-F、pUB-12685-L-R 及引物 pUB-12685-R-F、pUB-12685-R-R 扩增目的基因 *BCV53_12685* 的上、下游同源臂; 用引物 pUB-9960-L-F、pUB-9960-L-R 及引物 pUB-9960-R-F、pUB-9960-R-R 扩增目的基因 *BCV53_09960* 的上、下游同源臂; 用引物 pUB-8635-L-F、pUB-8635-L-R 及引物 pUB-8635-R-F、pUB-8635-R-R 扩增目的基因 *BCV53_08635* 的上、下游同源臂, 胶回收纯化 DNA 片段, 加入 VOC (NovoRec Plus) 重组酶, 于 PCR 仪中 50°C 反应 15 min 后转化至大肠杆

表 1 文中所用的菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains/Plasmids	Characteristics	Sources
<i>G. thermoglucosidasius</i> NCIMB 11955	Wild-type strain	Lab store
GBC1	<i>G. thermoglucosidasius</i> NCIMB 11955 with <i>BCV53_09985</i> gene knockout	This study
GBC2	<i>G. thermoglucosidasius</i> NCIMB 11955 with <i>BCV53_05690</i> gene knockout	This study
GBC3	<i>G. thermoglucosidasius</i> NCIMB 11955 with <i>BCV53_12685</i> gene knockout	This study
GBC4	<i>G. thermoglucosidasius</i> NCIMB 11955 with <i>BCV53_09960</i> gene knockout	This study
GBC5	<i>G. thermoglucosidasius</i> NCIMB 11955 with <i>BCV53_08635</i> gene knockout	This study
GBC1-2	<i>G. thermoglucosidasius</i> NCIMB 11955 with <i>BCV53_09985</i> and <i>BCV53_05690</i> genes knockout	This study
GBC1-3	<i>G. thermoglucosidasius</i> NCIMB 11955 with <i>BCV53_09985</i> , <i>BCV53_05690</i> and <i>BCV53_12685</i> genes knockout	This study
GBC6	<i>G. thermoglucosidasius</i> NCIMB 11955 with <i>BCV53_09985</i> , <i>BCV53_05690</i> , <i>BCV53_12685</i> and <i>BCV53_09960</i> genes knockout	This study
<i>E. coli</i> JM109	For plasmid construction	Lab store
pUB-sfGFP	pUB-sfGFP, KanR	Lab store
pUB-d- <i>BCV53_09985</i>	pUB-sfGFP containing <i>BCV53_09985</i> knockout cassette	This study
pUB-d- <i>BCV53_05690</i>	pUB-sfGFP containing <i>BCV53_05690</i> knockout cassette	This study
pUB-d- <i>BCV53_12685</i>	pUB-sfGFP containing <i>BCV53_12685</i> knockout cassette	This study
pUB-d- <i>BCV53_09960</i>	pUB-sfGFP containing <i>BCV53_09960</i> knockout cassette	This study
pUB-d- <i>BCV53_08635</i>	pUB-sfGFP containing <i>BCV53_08635</i> knockout cassette	This study
pUCG3.8	Shuttle plasmid for testing transformation efficiency	Lab store

菌 JM109 感受态细胞, 经菌落 PCR 及测序验证得到正确的敲除质粒。5 个限制性内切酶基因的敲除质粒均通过该方法构建。

1.3 同源重组敲除

本研究相关限制性内切酶基因的敲除采用同源重组的方式获得^[9]。

1.4 感受态细胞制备

1.4.1 限制修饰系统缺失菌株的感受态细胞制备

将敲除株在 TSA 固体平板上培养 3 代, 第 3 代应超过 24 h, 之后挑取 3–4 个具有生长优势的单克隆于 5 mL 液体 mLB 中培养过夜以确保菌株具有较好的活力, 10%接种量转接至预先配制好的 50 mL LBS 培养基中, 初始 OD_{600} 为

0.1 ± 0.01 , 置于 60 °C、220 r/min 培养箱培养至 OD_{600} 为 1.8, 置于冰上冰浴 10 min, 然后在预冷的 4 °C 低温离心机中 6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 弃掉上清并使用预冷的高渗溶液 SMGT 清洗 4–5 次, 最后使用 800 μ L SMGT 重悬, 以 80 μ L 每管均匀分装至预冷的 1.5 mL EP 管中, 然后将其于 -80 °C 冰箱冷冻保存。

1.4.2 添加细胞壁弱化剂及细胞膜抑制剂后电感受态细胞制备

目标菌株于 60 °C 培养箱静置培养 3 代, 挑取单克隆于 5 mL 液体 mLB 中过夜培养作为种子液, 过夜培养后转接至 LBS 液体培养基中培养至 OD_{600} 为 1.8, 然后按照相应比例添加细胞

壁弱化剂及细胞膜抑制剂——吐温 80 (0.06%)、DL-苏氨酸(200 g/L)和甘氨酸(200 g/L)。继续培养 1 h 后离心收集菌体，并用 SMGT 清洗数次，最后使用 800 μ L 高渗溶液 SMGT 重悬经过清洗的感受态细胞，以 80 μ L 每管均匀分装并保存至

-80 $^{\circ}$ C 冰箱。

1.5 热葡糖苷酶地芽胞杆菌 NCIMB 11955 细胞电转化

将电转感受态细胞与脱盐柱脱盐后的质粒 DNA (5 ng)轻轻混匀，并转移至预冷的 1 mm 电

表 2 本研究使用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Description
pUB-F	AGCTTGGCGTAATCATGGTCATAG	Amplified skeleton
pUB-R	GATCCGAGTCACTAAGGGCTAACT	plasmid
pUB-9985-L-F	AGTTAGCCCTTAGTGACTCGGATCACATTTTCACACAGATGGTAGCC	Amplified homologous
pUB-9985-L-R	CATCATTCTCCGGACCGACCACAACGGAATCAATCGCCC	arm of <i>BCV53_09985</i>
pUB-9985-R-F	GTCGGTCCGGAGAATGATGT	
pUB-9985-R-R	CTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGCTTTGTTGCACGCGTTTT	
pUB-5690-L-F	AGTTAGCCCTTAGTGACTCGGATCGGATATAACATTTTATTTCGTAATATCATT	Amplified homologous
	TG	arm of <i>BCV53_05690</i>
pUB-5690-L-R	CTGAAACTTTAGGGATCTCTTGTTCCTTTTCATTATTTTCATAC	
pUB-5690-R-F	GAAAAGGAACAAGAGATCCCTAAAGTTTCAGAAGAACAAG	
pUB-5690-R-R	ACCATGATTACGCCAAGCTTAGTACATTACAAAAGAAATGCG	
pUB-12685-L-F	GTTAGCCCTTAGTGACTCGGATCGTTTTTCTGTTGCACTTAAATTTG	Amplified homologous
pUB-12685-L-R	TTTATTGCGCAGTGTAATGTAAATTATCAAGTTAAAGATATTGAGTCTC	arm of <i>BCV53_12685</i>
pUB-12685-R-F	CATTACACTGCGCAATAAAGAG	
pUB-12685-R-R	CTATGACCATGATTACGCCAAGCTATTGATACAGAATGGCAGACA	
pUB-9960-L-F	AGTTAGCCCTTAGTGACTCGGATCAAAGGGTTTTATTATACGAAAGAAGAAG	Amplified homologous
pUB-9960-L-R	AATGCCAGCTTTCTAAAGCCATCGTCCACTAACC	arm of <i>BCV53_09960</i>
pUB-9960-R-F	CGATGGCTTTAGAAAGCTGGCATTCTTACCG	
pUB-9960-R-R	ACCATGATTACGCCAAGCTTTATAATTCAGTATATTTCTTTTCGACCCAAAC	
pUB-8635-L-F	AGTTAGCCCTTAGTGACTCGGATCACGGAAAGGAAATCGTGTCATC	Amplified homologous
pUB-8635-L-R	TTTCCTTTTTCCGCTCTTTCATTAGGACCGTCTATTTATGAT	arm of <i>BCV53_08635</i>
pUB-8635-R-F	GCGGAAAAAAGGAAAGTTTCTTC	
pUB-8635-R-R	GCTATGACCATGATTACGCCAAGCTGTTGCTTGCAAAAAACCTTGTTTC	
T-9985-F	TGAAAAGAAGATCCTGTGCCA	Identified the strain of
T-9985-R	ATATTGCCCTCCTCTTTGAC	GBC1
T-5690-F	AAAAGATGCTCAAACAGATTTAGATC	Identified the strain of
T-5690-R	TTTTTACTTTCGTAAAATTCAATCCACT	GBC2
T-12685-F	TTTAATTGAGCGAATTGCGTTTC	Identified the strain of
T-12685-R	AAAAACAGCTTAGAAATGAGAGAAG	GBC3
T-9960-F	ACATCGACCTTGGTGAAAG	Identified the strain of
T-9960-R	ACGCTGTAATTTAGACGCT	GBC4
T-8635-F	TGCCATTTCTGAAATTCATTACACAC	Identified the strain of
T-8635-R	TCAACAATCCAGCTAACATCCAT	GBC5

击杯间隙中,置于冰上短暂孵育后,细胞-DNA混合物经电转仪于 2.5 kV/cm 脉冲电击,其中电阻和电容分别为 200 Ω 和 20 μ F。电击结束后立即使用 TGP 培养基将细胞稀释至 1 mL,并于 52 $^{\circ}$ C 条件下孵育 2–4 h (转入质粒为温敏型复制子,为了维持质粒稳定性,转入质粒后用较低温度 52 $^{\circ}$ C 培养),然后取出 100 μ L 将其涂布于 12.5 μ g/mL 卡那霉素抗性的 TSA 固体平板上,52 $^{\circ}$ C 培养过夜待长出单克隆后对平板上的单克隆进行计数,并计算相应转化效率。挑取相应的单克隆进行菌落 PCR 验证确定目的质粒电转成功。

2 结果与分析

2.1 热葡萄糖苷酶地芽胞杆菌限制修饰系统生物信息学分析

生物信息学的不断发展使得越来越多的基因功能被预测,限制修饰系统作为细菌最原始的免疫系统,广泛存在于微生物体内,然而作为工业菌株而言,限制修饰系统阻碍外源 DNA 进入微生物体内的同时也限制了对菌株的遗传操作。限制性核酸内切酶也因为其具有保守的结构域而被鉴定和分析,因此,敲除基因组中限制性内切酶为外源质粒导入菌株提供了新的方法,进而使得模式菌株的质粒转化效率得到提升。经 REBASE^[15]数据库预测,热葡萄糖苷酶地芽胞杆菌具有 5 个限制性内切酶,如表 3 所示。研究表明,I型限制修饰系统为双功能酶,是由多亚基组成的活性复合物,该复合物主要由限制性亚基、特异性亚基和甲基转移酶 3 个亚基所组成。在对 NCIMB 11955 的生物信息学分析中,并未找到与之对应的 I 型限制性内切酶;大多数 II 型限制修饰系统主要包含了 RNA 酶和 DNA 甲基化酶,通过保守性分析,在热葡萄糖苷酶地芽胞杆菌中主

要有 3 个该类型限制性内切酶基因,分别为 *BCV53_05690*、*BCV53_12685* 和 *BCV53_09960*,并最终通过 BLASTp 以及 NCBI 数据库比对得以确定;III 型限制修饰系统主要由 Mod 和 Res 两个亚基所组成,Mod 主要用于识别 DNA 序列并对特定序列进行甲基化修饰,它们所组成的 Mod2Res1 复合体则用于切割 DNA,在热葡萄糖苷酶地芽胞杆菌中主要有 2 个该类型限制性内切酶基因,分别为 *BCV53_09985* 和 *BCV53_08635*。

2.2 热葡萄糖苷酶地芽胞杆菌限制修饰系统缺陷型菌株构建

为了获得限制修饰系统缺陷型菌株,将敲除质粒 pUB-d-*BCV53_09985*、pUB-d-*BCV53_05690*、pUB-d-*BCV53_12685*、pUB-d-*BCV53_09960*、pUB-d-*BCV53_08635* 分别电转至热葡萄糖苷酶地芽胞杆菌中,挑取 TSA 平板上质粒转化成功的单克隆 4 区划线转接至一块新的带有卡那霉素抗性的 TSA 平板上,置于 68 $^{\circ}$ C (编辑质粒的复制子是温敏型复制子,在 68 $^{\circ}$ C 条件下不会复制)培养箱恒温培养获得单交换菌株,挑取 TSA 平板上的单克隆于 5 mL mLB 无抗液体培养基中进行松弛培养让其发生双交换,然后稀释涂布至无抗 TSA 平板,挑取单克隆进行菌落 PCR 验证。如图 1 所示,成功获得 5 个限制性内切酶敲除的菌株。

表 3 限制修饰基因所属类型

Table 3 Type of the restriction endonuclease

Name	Gene	Type	Coordinates
<i>BCV53_05690</i>	RM	II	1 163 651–1 166 803
<i>BCV53_12685</i>	RM	II	2 592 734–2 596 216
<i>BCV53_09985</i>	R	III	2 007 820–2 010 774
<i>BCV53_09960</i>	R	II	1 998 571–2 001 081
<i>BCV53_08635</i>	R	III	1 728 661–1 729 392

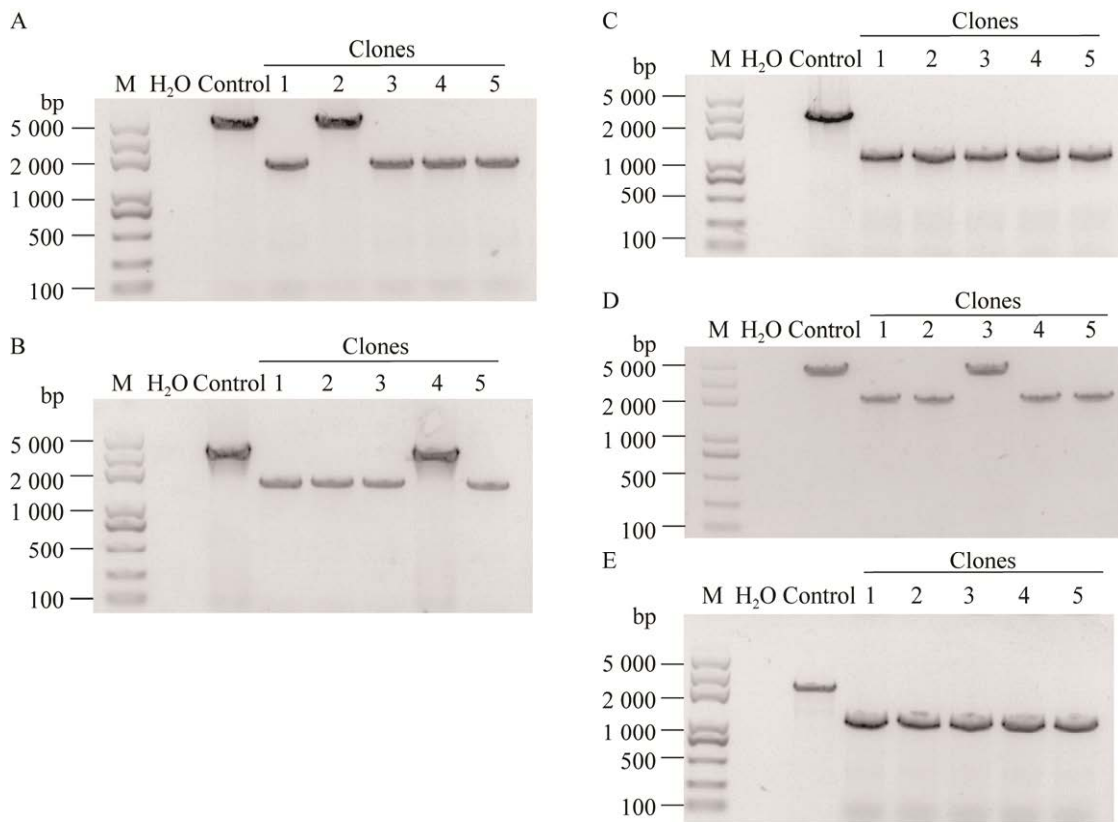


图1 菌落 PCR 验证琼脂糖凝胶电泳图 菌落 PCR 鉴定菌株 GBC1 (A)、菌株 GBC2 (B)、菌株 GBC3 (C)、菌株 GBC4 (D)、以及菌株 GBC5 (E)

Figure 1 Colony PCR of verify the genes of restriction endonuclease. Identification of strain GBC1 (A), strain GBC2 (B), strain GBC3 (C), strain GBC4 (D), and strain GBC5 (E).

2.3 限制修饰系统缺陷型菌株对生长及转化效率的影响

为了测试限制修饰系统缺陷型菌株对生长的影响,将敲除株进行生长测试,实验结果表明,5个敲除菌株与对照菌株相比其生长情况并未受到明显的影响(图2A),在初始 OD_{600} 为0.1的情况下,5个敲除菌株与对照菌株生长4h均可达到最快生长速率($OD_{600}=1.8$),在11h左右,达到生长平台期,最终 OD_{600} 为4.0,5个敲除菌株与对照菌株相比在误差允许范围内与野生型菌株的生长趋势一致(图2A),因此本研究中的基因缺陷型菌株并不会影响菌株生长。为了进一步确定该限制修饰系统的缺失是否能提高质粒

的转化效率,本研究将5ng的感受态细胞效率测试质粒pUCG3.8分别电转化至GBC1、GBC2、GBC3、GBC4、GBC5菌株中,待平板上长出清晰的单克隆后计数单克隆并计算其转化效率,如图2B所示,GBC5菌株与对照相比,转化效率无显著影响,其余4个缺陷型菌株均能在一定程度上提高转化效率,其中GBC3转化效率为 7.9×10^3 CFU/(μ g DNA),与对照相比转化效率提高了约3倍,GBC4转化效率为 6.3×10^3 CFU/(μ g DNA),与对照相比提高了2.1倍,GBC2转化效率为 5.2×10^3 CFU/(μ g DNA),与对照相比提高了1.6倍,GBC1转化效率为 3.4×10^3 CFU/(μ g DNA),较对照提高了约0.7倍,这4个限制修饰系统缺陷型

菌株的转化效率与野生型菌株相比均有显著提高。为了测试限制性内切酶基因叠加敲除对感受态细胞转化效率的影响,首先在 GBC1 敲除株的基础上进一步敲除基因 *BCV53_05690*, 获得限制修饰系统双缺陷的菌株 GBC1-2, 实验结果显示, GBC1-2 与只敲除单个基因的 GBC1 和 GBC2 相比, 电转效率进一步提高至 6.4×10^3 CFU/($\mu\text{g DNA}$); 然后在 GBC1-2 的基础上进一步敲除基因 *BCV53_12685*, 获得菌株 GBC1-3, 测试结果显示, GBC1-3 菌株感受态细胞的电转效率为 1.0×10^4 CFU/($\mu\text{g DNA}$); 最后在 GBC1-3 的基础上进一步敲除基因 *BCV53_9960*, 获得限制修饰系统缺陷型菌株 GBC6, 测试结果显示, GBC6 菌株感受态细胞的电转效率为 1.2×10^4 CFU/($\mu\text{g DNA}$)。同时敲除 4 个限制性内切酶基因的菌株 GBC6 与野生型菌株相比, 感受态效率提高了 5 倍, 达到 1.2×10^4 CFU/($\mu\text{g DNA}$) (图 2B)。

2.4 细胞壁弱化剂及细胞膜抑制剂对转化效率的影响

肽聚糖是细菌细胞壁必不可少的成分之一, 肽聚糖的短肽主要由丙氨酸、谷氨酸和赖氨酸 3 种氨基酸所组成。由于甘氨酸、苏氨酸的结构

与丙氨酸十分相似, 因此甘氨酸、苏氨酸的添加会导致肽聚糖的合成过程中肽桥无法交联, 进而破坏革兰氏阳性菌的细胞壁的紧密程度, 一定程度上提高革兰氏阳性菌的电转化效率^[16]。而吐温 80 的添加可以通过降低细胞膜的完整性从而提高革兰氏阳性菌的电转化效率。因此, 在敲除 4 个限制性内切酶基因的菌株 GBC6 的基础上, 对甘氨酸、DL-苏氨酸、吐温 80 添加至感受态细胞培养基中的浓度做了测试。吐温 80 的添加量分别做了浓度为 0.03%、0.045%、0.05% 的测试, 其中当吐温 80 的浓度为 0.03% 时, GBC6 感受态细胞电转化效率为 1.87×10^4 CFU/($\mu\text{g DNA}$); 当吐温 80 浓度为 0.045% 时, GBC6 感受态细胞电转化效率进一步提高至 4.7×10^4 CFU/($\mu\text{g DNA}$); 当吐温 80 浓度为 0.05% 时, 离心过程中菌体出现裂解, GBC6 感受态细胞效率下降至 2.5×10^4 CFU/($\mu\text{g DNA}$) (图 3A), 因此吐温 80 最适添加量为 0.045%, 最终转化效率与对照相比提高了约 22.5 倍。对 DL-苏氨酸的不同添加量(0.4%、0.8%、1.0%、1.2%)分别做了评估, 当 DL-苏氨酸浓度为 0.4% 时, GBC6 感受态细胞转化效率为 3.3×10^4 CFU/($\mu\text{g DNA}$), 随着

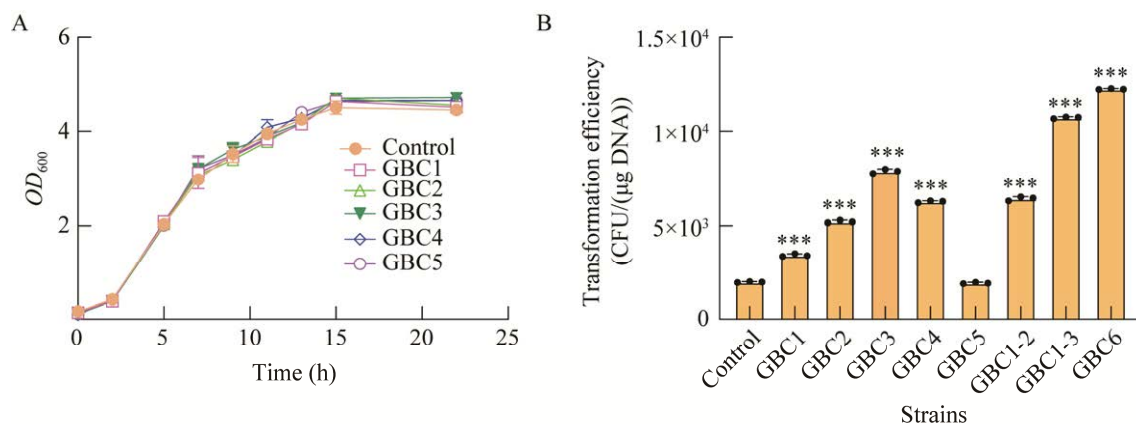


图 2 敲除株生长曲线(A)及转化效率(B)

Figure 2 Growth curve (A) and transformation efficiency (B) of knockout strains. Asterisk denotes statistically significant differences, ***: $P < 0.001$.

DL-苏氨酸浓度的增加,感受态细胞效率呈现上升趋势,当苏氨酸浓度为 1.0%时, GBC6 感受态细胞效率达到最大值 9.0×10^4 CFU/(μg DNA), 与野生型菌株相比感受态细胞效率提高了 44 倍(图 3B)。甘氨酸的添加量分别为 0.5%、1%、1.5%、2%和 3%,随着甘氨酸的浓度的增加, GBC6 感受态细胞效率逐渐升高,当甘氨酸添加量为 2%时, GBC6 感受态细胞效率提高至最高为 6.7×10^5 CFU/(μg DNA), 与野生型未添加试剂的对照相比感受态细胞效率提高了 334 倍,随着甘氨酸的继续添加感受态细胞电转化效率开始下降,当甘氨酸的添加量为 3%时, GBC6 感受态细胞电转化效率为 2.7×10^5 CFU/(μg DNA) (图 3C)。综合以上结果,吐温 80、DL-苏氨酸和甘氨酸的添加在一定范围内都可以提高热葡萄糖苷酶地芽胞杆菌的电转化效率。

2.5 正交实验对细胞壁弱化剂及膜抑制剂的组合优化

为了进一步优化吐温 80、DL-苏氨酸和甘氨酸添加量的最佳组合,本研究采用 $L_9(3^3)$ 3 因子 3 水平的正交实验, 3 因子分别为吐温 80 浓度、DL-苏氨酸浓度、甘氨酸浓度; 其中吐温 80 的 3 种浓度分别为: 0.037 5%、0.045 0%和 0.047 5%, DL-苏氨酸浓度分别为: 0.9%、1.0%和 1.1%, 甘氨酸浓度分别为: 1.5%、2.0%和 2.5%。正交实验结果如表 4 所示。结果表明,组合添加 3 种试剂后,某些组合的转化效率较 3 种试剂单独添加在一定程度上有所提高,其中最低转化效率为 1.1×10^5 CFU/(μg DNA), 该组合中吐温 80 添加量为 0.045%, DL-苏氨酸添加量为 1.1%, 甘氨酸添加量为 2.5%; 1、6、8 三组实验转化效率明显高于其余 6 组,这 3 组均为吐温 80 添加量为 0.037 5%, 分析结果表明吐温 80 的增加会使转化效率有所下降,因此组合优化吐温 80 的最适添加量为 0.037 5%; 当吐温 80、DL-苏氨酸、甘氨酸的添加量分别为 0.037 5%、1%、2.5%时转化效率达到最高为 4.6×10^6 CFU/(μg DNA)。

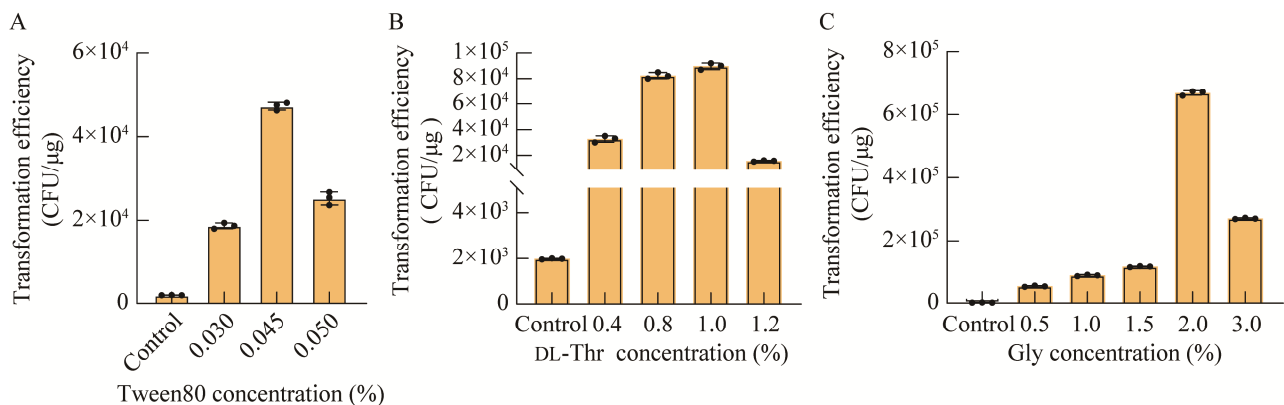


图 3 试剂添加转化效率 A: 添加不同浓度的吐温 80. B: 添加不同浓度的 DL-苏氨酸. C: 添加不同浓度的甘氨酸

Figure 3 Improving *Geobacillus thermoglucosidasius* transformation efficiency by adding different concentrations of Tween 80 (A), DL-threonine (B), and glycine (C).

表 4 三变量正交试验及转化效率实验结果

Table 4 Orthogonal tests of three variables and the corresponding transformation efficiency

Trail No.	Variable			Transformation efficiency (CFU/(μg DNA))
	Gly (%)	DL-Thr (%)	Tween 80 (%)	
1	1.500 0	0.900 0	0.037 5	3.80×10^6
2	1.500 0	1.000 0	0.045 0	1.07×10^6
3	1.500 0	1.100 0	0.047 5	4.20×10^5
4	2.000 0	0.900 0	0.045 0	1.20×10^6
5	2.000 0	1.000 0	0.047 5	5.26×10^5
6	2.000 0	1.100 0	0.037 5	4.10×10^6
7	2.500 0	0.900 0	0.047 5	5.40×10^5
8	2.500 0	1.000 0	0.037 5	4.60×10^6
9	2.500 0	1.100 0	0.045 0	1.10×10^5

3 讨论

本研究中热葡糖苷酶地芽胞杆菌 NCIMB 11955 的高效电转效率是通过限制性内切酶的敲除、细胞壁弱化剂和膜抑制剂的系统优化而实现的。电转感受态细胞效率最高可达到 4.6×10^6 CFU/(μg DNA), 是目前所报道的 NCIMB 11955 感受态细胞效率的最高水平。这为热葡糖苷酶地芽胞杆菌在基因编辑及工程化应用奠定了基础。

限制性内切酶是影响外源 DNA 转入效率的关键因素之一, 在本研究中通过预测相应的限制性内切酶基因并使用同源重组的方式进行敲除, 敲除后的菌株外源质粒转化效率提高 5 倍, 这与传统认知关于宿主的限制修饰系统会阻碍外源 DNA 入侵的认知一致, 如化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*) 中将 I 型限制性内切酶基因 *hsdM* 缺失可使其转化效率提高 5 倍^[17]。

为了进一步提高目标菌株 11955 的感受态细胞效率, 本研究采用了细胞壁弱化剂及细胞膜抑制剂。细胞壁弱化剂甘氨酸的添加能够显著提高感受态细胞的转化效率, 这可能是由于细胞壁合成过程中, 原本的丙氨酸被甘氨酸所替代整合到四肽中从而减少了肽桥交联^[18]。吐温 80 的

添加也能够显著提高目标菌株的感受态细胞转化效率, 可能是由于吐温 80 的添加影响了细胞膜的完整性, 进而提高目标菌株电转化效率^[19]。添加 DL-苏氨酸使感受态细胞效率提高可能原因与甘氨酸相似。由于这些因素实际上是交互的, 因此采用正交实验来优化其浓度, 结果证实了它们对提高感受态细胞转化效率的相互影响。

热葡糖苷酶地芽胞杆菌 NCIMB 11955 此前的电转感受态细胞效率主要通过改变质粒的复制子以及优化高渗溶液的组成及浓度来提高, 本文通过借鉴以枯草芽胞杆菌为模式菌株的革兰氏阳性菌, 以大肠杆菌为模式菌株的革兰氏阴性菌, 整合具有保守性的限制性内切酶基因的敲除、细胞壁弱化剂的添加及细胞膜抑制剂吐温 80 的添加, 进而提高了热葡糖苷酶地芽胞杆菌 11955 的电转效率。限制性内切酶基因的敲除效果较细胞壁弱化剂及细胞膜抑制剂略显逊色, 可能原因是本次测试质粒相对较小, 并未包含该内切酶的识别位点。同为细胞壁弱化剂的 DL-苏氨酸效果不及甘氨酸, 可能原因是细胞壁合成的过程中, UDP-N-乙酰葡糖胺烯醇丙酮转移酶(muropeptideA, murA) 的底物宽泛性使甘氨酸与 DL-苏氨酸均能被识别^[20-22], 而甘氨酸与丙氨酸结构更加相似, 能被识别的浓度更高, 因此出现这类现象。

本研究针对热葡萄糖苷酶地芽胞杆菌 NCIMB 11955, 开发了一套系统而详细的方法用于提高该菌株的电转效率。利用这种方法, NCIMB 11955 菌株的电转效率提高至 4.6×10^6 CFU/(μg DNA), 是其感受态细胞电转效率的最高水平, 这在一定程度上为该菌株的建库、遗传工具的开发提供了基础, 同时期望该方法能够促进这一具有重要经济意义菌株的工业化。

REFERENCES

- [1] BASHIR Z, SHENG LL, ANIL A, LALI A, MINTON NP, ZHANG Y. Engineering *Geobacillus thermoglucosidasius* for direct utilisation of holocellulose from wheat straw[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12(1): 1-16.
- [2] KARAGÜLER NG, SESSIONS RB, BINAY B, ORDU EB, CLARKE AR. Protein engineering applications of industrially exploitable enzymes: *Geobacillus stearothermophilus* LDH and *Candida methylca* FDH[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2007, 35(6): 1610-1615.
- [3] BHALLA A, BANSAL N, KUMAR S, BISCHOFF KM, SANI RK. Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 128: 751-759.
- [4] DAAS MJA, NIJSSE B, van de WEIJER AHP, GROENENDAAL BWAJ, JANSSEN F, van der OOST J, van KRANENBURG R. Engineering *Geobacillus thermodenitrificans* to introduce cellulolytic activity; expression of native and heterologous cellulase genes[J]. *BMC Biotechnology*, 2018, 18(1): 1-13.
- [5] CRIPPS RE, ELEY K, LEAK DJ, RUDD B, TAYLOR M, TODD M, BOAKES S, MARTIN S, ATKINSON T. Metabolic engineering of *Geobacillus thermoglucosidasius* for high yield ethanol production[J]. *Metabolic Engineering*, 2009, 11(6): 398-408.
- [6] LIN PP, RABE KS, TAKASUMI JL, KADISCH M, ARNOLD FH, LIAO JC. Isobutanol production at elevated temperatures in thermophilic *Geobacillus thermoglucosidasius*[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 24: 1-8.
- [7] KULYASHOV M, PELTEK SE, AKBERDIN IR. A genome-scale metabolic model of 2,3-butanediol production by thermophilic bacteria *Geobacillus icigianus*[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(7): 1002.
- [8] ZHOU JW, LIAN JZ, RAO CV. Metabolic engineering of *Parageobacillus thermoglucosidasius* for the efficient production of (2R,3R)-butanediol[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(10): 4303-4311.
- [9] YANG ZH, SUN QQ, TAN GY, ZHANG QW, WANG ZD, LI C, QI FX, WANG WS, ZHANG LX, LI ZL. Engineering thermophilic *Geobacillus thermoglucosidasius* for riboflavin production[J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14(2): 363-373.
- [10] ITO M, NAGANE M. Improvement of the electro-transformation efficiency of facultatively alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF₄ by high osmolarity and glycine treatment[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2001, 65(12): 2773-2775.
- [11] RILEY LA, GUSS AM. Approaches to genetic tool development for rapid domestication of non-model microorganisms[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14(1): 1-17.
- [12] RUAN YL, ZHU LJ, LI Q. Improving the electro-transformation efficiency of *Corynebacterium glutamicum* by weakening its cell wall and increasing the cytoplasmic membrane fluidity[J]. *Biotechnology Letters*, 2015, 37(12): 2445-2452.
- [13] ZHANG Z, DING ZT, SHU D, LUO D, TAN H. Development of an efficient electroporation method for iturin A-producing *Bacillus subtilis* ZK[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(12): 7334-7351.
- [14] BARTOSIAK-JENTYS J, HUSSEIN AH, LEWIS CJ, LEAK DJ. Modular system for assessment of glycosyl hydrolase secretion in *Geobacillus thermoglucosidasius*[J]. *Microbiology*, 2013, 159(Pt_7): 1267-1275.
- [15] ROBERTS RJ, VINCZE T, POSFAI J, MACELIS D. REBASE—a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(D1): D298-D299.
- [16] EGAN AJF, ERRINGTON J, VOLLMER W. Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(8): 446-460.
- [17] FINN MB, RAMSEY KM, TOLLIVER HJ, DOVE SL, WESSELS MR. Improved transformation efficiency of group A *Streptococcus* by inactivation of a type I

- restriction modification system[J]. PLoS One, 2021, 16(4): e0248201.
- [18] GONZALEZ-SANTANA A, DIAZ HEIJTZ R. Bacterial peptidoglycans from microbiota in neurodevelopment and behavior[J]. Trends in Molecular Medicine, 2020, 26(8): 729-743.
- [19] QI YL, LIU H, CHEN XL, LIU LM. Engineering microbial membranes to increase stress tolerance of industrial strains[J]. Metabolic Engineering, 2019, 53: 24-34.
- [20] LIN XF, LI NN, KUDO H, ZHANG Z, LI JY, WANG L, ZHANG WB, TAKECHI K, TAKANO H. Genes sufficient for synthesizing peptidoglycan are retained in gymnosperm genomes, and MurE from *Larix gmelinii* can rescue the albino phenotype of *Arabidopsis MurE* mutation[J]. Plant and Cell Physiology, 2017, 58(3): 587-597.
- [21] 袁雪, 孙欢, 丁超, 程水红, 傅立峰, 李学兵. 大肠杆菌细胞壁肽聚糖的化学修饰及荧光标记[J]. 微生物学报, 2020, 60(1): 49-59.
- YUAN X, SUN H, DING C, CHENG SH, FU LF, LI XB. Chemical modification and fluorescence labeling of *Escherichia coli* cell wall peptidoglycan[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(1): 49-59 (in Chinese).
- [22] 楼洁, 胡晓, 梁延群, 朱怡铃, 音建华. 肽聚糖的生物合成及其调控机制研究进展[J]. 微生物学报, 2023, 63(1): 106-123.
- LOU J, HU X, LIANG YQ, ZHU YL, YIN JH. Peptidoglycan biosynthesis and the regulatory mechanism[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(1): 106-123 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)