

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20170319

肉葡萄球菌电转化条件的优化

张变强¹, 唐巧巧¹, 柯灵超¹, 张健¹, 王德培¹, 朱燕², 高强¹

(1. 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457;

2. 天津科技大学后勤管理处, 天津 300457)

摘要: 肉葡萄球菌(*Staphylococcus carnosus*)作为革兰氏阳性菌,遗传转化难度大是限制其遗传操作的主要因素之一。通过优化菌体生长状态、电击缓冲液、复苏培养基组分等条件,分析了各因素对*S. carnosus* TM300电转化效率的影响。研究表明:*S. carnosus* TM300在B2生长培养基中生长到 $A_{578} = 0.6$ 时收集菌体,使用GS电击缓冲液洗涤菌体制备感受态细胞,在电压2450V、间距2mm电转杯条件下进行电转化,电击后立即加入LBM复苏培养基,37℃、180r/min摇床复苏培养4h,可以获得的最佳电转化效率为 $5.95 \times 10^3 \mu\text{g}^{-1}$ 。

关键词: 肉葡萄球菌; 电转化; 转化效率

中图分类号: Q93 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2019)03-0008-07

Optimization of Electroporation Conditions for *Staphylococcus carnosus*

ZHANG Bianqiang¹, TANG Qiaoqiao¹, KE Lingchao¹, ZHANG Jian¹,
WANG Depei¹, ZHU Yan², GAO Qiang¹

(1. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2. Logistics Management Department, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Lack of highly efficient and reproducible transformation method is one of the restriction factors for genetic manipulation of Gram-positive bacterium *Staphylococcus carnosus*. This study aimed to improve the transformation efficiency of *S. carnosus* TM300. To optimize the conditions for electroporation of *S. carnosus* TM300 cells, various electroporation factors were evaluated, including bacterial growth phase, voltage, plasmid DNA concentration, electroporation medium, recovery medium and incubation time. *S. carnosus* TM300 cells were harvested at the middle exponential growing phase ($A_{578} = 0.6$) and washed with GS electroporation buffer. Electroporation was performed at 2450 V in 2 mm gap cuvette. Then recovery medium LBM was added and followed by 4 h incubation at 180 r/min and 37 °C. The results indicated that the best transformation efficiency achieved $5.95 \times 10^3 \mu\text{g}^{-1}$ under the optimal conditions.

Key words: *Staphylococcus carnosus*; electroporation; transformation efficiency

肉葡萄球菌(*Staphylococcus carnosus*)是目前葡萄球菌属中被完全确认的一株食品级(generally recognized as safe, GRAS)菌株^[1]。肉葡萄球菌作为肉制品发酵行业中形成肉制产品独特风味的关键性菌种,很早就在欧洲尤其是德国,用于制造干火腿与干香肠的初始发酵剂^[2]。此外,与其他革兰氏阳性细菌如芽胞杆菌(*Bacillus*)和乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)

等相比,肉葡萄球菌具有生长迅速、营养要求简单、无外毒素、胞外蛋白酶水解活性低且能够将蛋白质分泌至培养基中^[2-3]的特点,使其不仅可以在代谢工程方面用来研究肉葡萄球菌及相关属种的代谢途径,而且还可以用于外源蛋白的表达和分泌研究。

然而,作为革兰氏阳性细菌,肉葡萄球菌的细胞壁较厚且致密,感受态细胞接收外源载体困难,常规

收稿日期: 2017-11-27; 修回日期: 2018-01-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31370075, 31471725); 山东省重点研发计划(领军人才项目)资助项目(2016GRC3201)

作者简介: 张变强(1991—),女,甘肃定西人,硕士研究生; 通信作者: 高强,教授, gaoqiang@tust.edu.cn

的热激转化法几乎无法使外源 DNA 进入宿主细胞. 目前,肉葡萄球菌的外源 DNA 转化方法主要有原生质体转化方法和电转化方法. 原生质体转化方法操作复杂、花费时间较长且转化效率较低,而电转化法操作简便、理论转化效率高,因而得到广泛的应用^[4]. 电转化法的原理是使用瞬时电压使得细胞膜被极化而产生瞬时孔洞,使 DNA 等外源物质快速进入到细胞内^[5]. 电场强度和脉冲持续时间在一定范围内时,细胞的瞬时通透性是可逆的. 随着电场强度的增加,细胞膜通透性越高,产生的疏水孔洞也越多,外源 DNA 越容易进入到细胞,但随着电场强度的不断增加,细胞的死亡率也会急剧增加^[6]. 所以,在电转化过程中需要平衡转化效率和死亡率的关系,既要提高电场强度,提高转化效率,又要尽可能降低细胞死亡率. 如果在电转化过程中添加合适的高渗溶液给予细胞一定的保护,可以提高细胞的存活率,进而提高细胞的电转化效率. Loefblom 等^[5]建立了 *S. carnosus* TM300 的电转化方法,但是操作繁琐,转化不够稳定,并且未做高渗溶液方面的研究. 因此,亟待建立一个更为稳定高效的适合 *S. carnosus* 的电转化方法.

增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)是在野生型 GFP 的基础上,采用定点突变技术将 Ser65 和 Phe64 分别用 Thr 和 Leu 替代而成,通过改造大大增强了荧光亮度和稳定性,因此比 GFP 更适用于生命科学各个领域的研究^[7].

本研究在前期研究^[8-9]的基础上,首先优化细菌生长状态、电压、质粒质量浓度,初步确定较优条件,继而对电击缓冲液、复苏培养基组分、复苏培养时间进行优化,以期提高肉葡萄球菌的转化效率,为后续的研究奠定电转化方法学的基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 由本实验室保存;肉葡萄球菌(*Staphylococcus carnosus*) TM300、pBT2 质粒(氯霉素抗性(Cm^r)与氨苄青霉素抗性(Amp^r),由德国图宾根大学微生物遗传学研究所 Friedrich Goetz 教授馈赠;*E. coli-Staphylococci* 穿梭质粒 pBT2-ET-4C-5R-EGFP,由 *S. carnosus* TM300 双精氨酸转运(Twin arginine translocation, Tat)信号肽与 EGFP 组成的融合蛋白,本实验室以 pBT2 质粒为

骨架构建,具体的构建过程参考中国发明专利申请:一种肉葡萄球菌的电转化方法及其应用(申请号:201710958394.5,中华人民共和国国家知识产权局).

1.1.2 培养基和缓冲液

LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10,酵母浸出粉 5, NaCl 10,去离子水配制,pH 7.5,1 \times 10⁵ Pa 灭菌 20 min;固体培养基需添加琼脂粉 20.

B2 培养基(g/L):水解酪蛋白 10,酵母提取物 25,葡萄糖 5,NaCl 25,K₂HPO₄ 1,去离子水配制,pH 7.5,0.67 \times 10⁵ Pa 灭菌 15 min.

LBC 复苏培养基(g/L):胰蛋白胨 10,酵母浸出粉 5,NaCl 10,0.5 mol/L 蔗糖,去离子水配制,pH 7.5,1 \times 10⁵ Pa 灭菌 20 min.

LBS 复苏培养基(g/L):胰蛋白胨 10,酵母浸出粉 5,NaCl 10,0.5 mol/L 山梨醇,去离子水配制,pH 7.5,1 \times 10⁵ Pa 灭菌 20 min.

LBM 复苏培养基(g/L):胰蛋白胨 10,酵母浸出粉 5,NaCl 10,0.3 mol/L 甘露醇,去离子水配制,pH 7.5,1 \times 10⁵ Pa 灭菌 20 min.

TSB 固体培养基(g/L):酪蛋白 17,大豆蛋白胨 3,葡萄糖 2.5,NaCl 5,K₂HPO₄ 2.5,pH 7.5,琼脂粉 20,去离子水配制,0.67 \times 10⁵ Pa 灭菌 15 min.

Glc 电击缓冲液:10%甘油,去离子水配制,pH 7.5,1 \times 10⁵ Pa 灭菌 20 min.

GM 电击缓冲液:10%甘油,0.5 mol/L 甘露醇,去离子水配制,pH 7.5,1 \times 10⁵ Pa 灭菌 20 min.

GS 电击缓冲液:10%甘油,0.5 mol/L 山梨醇,去离子水配制,pH 7.5,1 \times 10⁵ Pa 灭菌 20 min.

GSM 电击缓冲液:10%甘油,0.5 mol/L 甘露醇,0.5 mol/L 山梨醇,去离子水配制,pH 7.5,1 \times 10⁵ Pa 灭菌 20 min.

GC 电击缓冲液:10%甘油,0.5 mol/L 蔗糖,去离子水配制,pH 7.5,0.67 \times 10⁵ Pa 灭菌 20 min.

12% 分离胶(15 mL):ddH₂O 4.9 mL, Tris-HCl(1.5 mol/L, pH 8.8)3.8 mL, 30% 丙烯酰胺 6.0 mL, 10% SDS 0.15 mL, 10% 过硫酸铵 0.15 mL, TEMED 6 μ L.

5% 浓缩胶缓冲液(5 mL):ddH₂O 3.4 mL, Tris-HCl(1.0 mol/L, pH 6.8)0.63 mL, 30% 丙烯酰胺 0.83 mL, 10% SDS 0.05 mL, 10% 过硫酸铵 0.05 mL, TEMED 5 μ L.

1.1.3 主要仪器设备

BTX ECM399 型指数衰减波电穿孔系统电转化仪、BTX 610 型电转杯(间距 2 mm),美国 BTX 公

司;核酸定量仪,德国 IMPLLEN 公司;ZWYR-D2403 型恒温培养振荡摇床,上海智城分析仪器制造有限公司;DYY-4C 型稳压稳流电泳仪、DYCZ-40E 型半干转膜仪,北京六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 质粒的提取与定量检测

使用天根生化科技(北京)有限公司生产的 DP103 质粒小提试剂盒提取 *E. coli* DH5 α /pBT2-ET-4C-5R-EGFP 质粒,并在电转化 *S. carnosus* TM300 之前使用核酸定量仪测定质粒浓度。

1.2.2 *S. carnosus* TM300 感受态细胞的制备

挑取 *S. carnosus* TM300 单菌落接种到装有 5 mL LB 培养基的试管中,37 °C、180 r/min 培养 12 ~ 16 h。将过夜培养的 *S. carnosus* TM300 菌液按照 1% 的接种比例接种在装有 50 mL B2 培养基的 250 mL 三角瓶中,37 °C、180 r/min 培养至对数生长期($A_{578} = 0.6$)时停止培养。将含有菌液的三角瓶冰浴 15 min,分装于 50 mL 预冷过的离心管中,4 °C、5 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液。分别用 40 mL 与 20 mL 冰冷的 GS 电击缓冲液充分悬浮菌体,4 °C、5 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,接着用 10 mL 冰冷的 GS 电击缓冲液洗涤菌体 3 次。最后用 800 μ L 冰冷的 GS 电击缓冲液重悬,分装于 1.5 mL 灭菌离心管中,每管 100 μ L, -80 °C 保存。

1.2.3 电转化

将 *S. carnosus* TM300 感受态细胞从 -80 °C 取出,冰上解冻 5 min。在解冻后的感受态细胞中加入 500 ng 质粒充分混匀,将全部液体转移到 2 mm 电极间距的电转杯中,置于冰上作用 30 min 后,使用电转仪进行电转化,电击电压为 2 450 V,电击后显示的脉冲时间为 6 ms。电击后迅速将 1 mL LBM 复苏培养基加到电转杯中,将全部液体转到 1.5 mL 离心管中,37 °C、180 r/min 摇床复苏培养 4 h。吸取 100 μ L 培养液涂布于含终质量浓度为 10 μ g/mL Cm^r 的 TSB 培养基平板,37 °C 过夜培养,直至出现转化子,计数转化子并按照式(1)计算转化效率。

$$\text{转化效率} = \frac{\text{稀释倍数} \times \text{转化子的菌落总数}}{\text{质粒DNA的总质量}(\mu\text{g})} \quad (1)$$

1.2.4 引物合成

为了验证转化子,设计引物 egfp-F/egfp-R 扩增目的基因 *egfp*。引物序列为 egfp-F: 5'-ATTTGTCCT ACTCAGGAGAGCGTTC-3', egfp-R: 5'-GAGTTGCT AGTAACATCTGACCGA-3'。

1.2.5 转化子验证

为了验证电转化得到的转化子,随机选择 5 个转化子,用含有 10 μ g/mL Cm^r 的液体 LB 培养基过夜培养。收集菌体细胞,提取质粒,以转化子质粒为模板, egfp-F/egfp-R 为上、下游引物通过 PCR 反应扩增目的基因 *egfp*,并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测^[9]。

1.2.6 EGFP 的表达

分别接种阳性转化菌株 *S. carnosus* TM300/pBT2-ET-4C-5R-EGFP 和阴性对照菌株 *S. carnosus* TM300 于 5 mL LB 培养液中,37 °C、180 r/min 过夜培养,然后按 1% 的接种量将过夜培养物转接至 50 mL LB 培养液中,37 °C、180 r/min 继续培养 16 h,以表达 EGFP。

1.2.7 目的蛋白 EGFP 的检测

荧光显微镜观察:取 5 μ L 按 1.2.6 节方法培养的菌液,滴在载玻片表面并盖好盖玻片,置于荧光显微镜下观察菌液的荧光产生情况。

分别提取阳性转化菌株与阴性对照菌株发酵液中的蛋白质,使用 5% 的浓缩胶和 12% 的分离胶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测及免疫印迹(Western blot)测定。

2 结果与分析

2.1 细胞生长时期对转化效率的影响

为了研究 *S. carnosus* TM300 的不同生长时期对感受态细胞的制备和后续电转化的影响,在培养细胞的 A_{578} 值分别为 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.5 时停止培养并收集菌体,按照 1.2.2 节中的 *S. carnosus* TM300 感受态制备方法,获得不同生长时期的感受态细胞(图 1)。

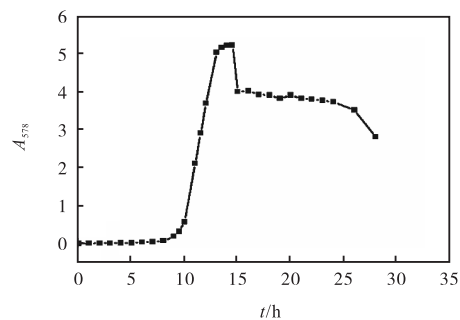


图 1 *S. carnosus* TM300 的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *S. carnosus* TM300

将穿梭载体 pBT2-ET-4C-5R-EGFP 用电转化方

法转化至感受态细胞中,复苏培养后涂布于含有 $10 \mu\text{g/mL}$ 氯霉素的 TSB 固体培养基平板,计数转化子菌落并计算转化效率(图 2),其中电击缓冲液为 GSM,复苏培养基为 LB 液体培养基. 当 $A_{578} = 0.6$ 时,转化效率达到最高,为 $0.53 \times 10^3 \mu\text{g}^{-1}$. 结合图 1 可知,此时菌体处于指数生长的中前期阶段,细胞生长比较旺盛,电转化效率最佳.

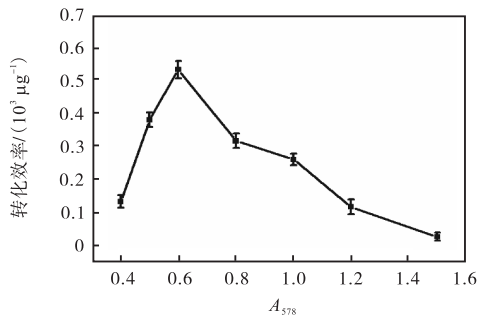


图 2 菌体生长 A_{578} 值对电转化效率的影响

Fig. 2 Effect of A_{578} density on the electroporation efficiency

2.2 不同电击电压对转化效率的影响

在 $A_{578} = 0.6$ 时收集 *S. carnosus* TM300 菌体用于制备感受态细胞. 在电转化步骤中,先将 300 ng 穿梭载体加入感受态细胞,充分混匀后,分别在 1 500、1 750、2 000、2 250、2 300、2 400、2 450、2 500 V 的电压条件下进行电转化. 电击完成后向电转杯中加入 1 mL LB 复苏培养基, 37°C 、180 r/min 复苏培养 3~4 h 后涂布于含有 $10 \mu\text{g/mL}$ 氯霉素的 TSB 固体培养基平板,计数转化子菌落,并计算不同电压对应的转化效率,结果如图 3 所示.

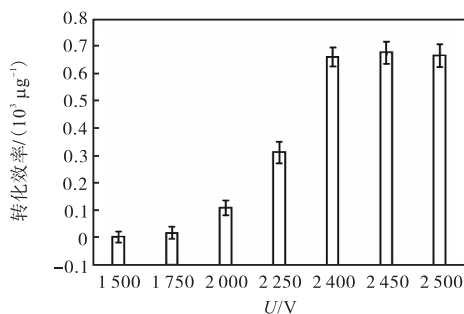


图 3 电压对电转化效率的影响

Fig. 3 Effect of voltage on the electroporation efficiency

由图 3 可知:电压在 2 450 V 时转化效率达到最高,为 $0.67 \times 10^3 \mu\text{g}^{-1}$; 2 500 V 时的转化效率略低于 2 450 V 时的转化效率;而电压为 1 500 V 与 1 750 V 时,转化效率偏低. 因此,*S. carnosus* TM300 最适电转化电压为 2 450 V 左右,且电压宜高不宜低.

2.3 质粒质量浓度对转化效率的影响

为了研究质粒质量浓度对 *S. carnosus* TM300 电转化效率的影响,本研究选用经过上述优化的感受态细胞,分别取 10、50、100、500、1 000、2 000 ng 穿梭质粒加入到 $100 \mu\text{L}$ 感受态细胞中,在 2 450 V 电压下进行电转化. 由图 4 可知:在 10~100 ng/ $100 \mu\text{L}$ 的质粒质量浓度范围内,转化效率较低;在 500 ng/ $100 \mu\text{L}$ 时达到最高,为 $1.01 \times 10^3 \mu\text{g}^{-1}$;但是在质粒质量浓度不断升高时,转化效率反而呈下降趋势;当加入 2 000 ng/ $100 \mu\text{L}$ 质粒时,转化效率下降至 $0.046 \times 10^3 \mu\text{g}^{-1}$.

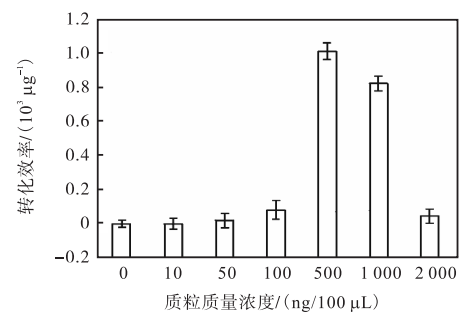


图 4 质粒质量浓度对电转化效率的影响

Fig. 4 Effect of plasmid DNA concentration on the electroporation efficiency

2.4 电击缓冲液对转化效率的影响

在 $A_{578} = 0.6$ 时收集 *S. carnosus* TM300 菌体制备感受态细胞. 制备感受态时用不同的电击缓冲液(Glc 电击缓冲液、GM 电击缓冲液、GS 电击缓冲液、GSM 电击缓冲液、GC 电击缓冲液)洗涤细胞,其余实验条件与优化前相同. 由图 5 可知,用 GS 电击缓冲液制备的感受态细胞进行电转化,转化效率最高,转化效率可达 $3.89 \times 10^3 \mu\text{g}^{-1}$.

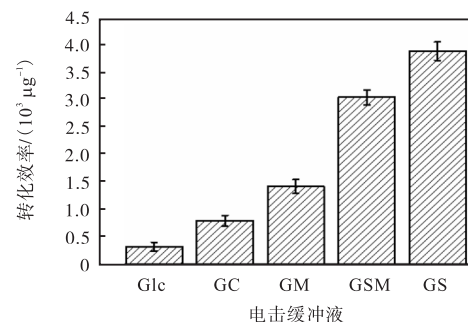


图 5 电击缓冲液对电转化效率的影响

Fig. 5 Effect of electroporation medium on the electroporation efficiency

由图 5 结果分析:将甘油作为电击缓冲液使用时,转化效率较低,当在电击缓冲液中加入 0.5 mol/L

的甘露醇或者山梨醇时,转化效率大幅度提高;当山梨醇、甘露醇以等物质的量加入时,转化效率反而下降,因此,确定电击缓冲液的最佳组成成分为 10% 甘油与 0.5 mol/L 山梨醇.

2.5 复苏培养基对转化效率的影响

夏子芳等^[11]对乳杆菌的电转化条件进行了优化,发现细胞在电击以后由于受到电压的创伤很容易死亡,如果此时在复苏培养基中加入合适的高渗溶液,可以有效保护细胞,从而提高细胞的存活率,最终提高电转化效率. 在 *S. carnosus* TM300 菌体生长到 $A_{578} = 0.6$ 时,收集菌体制备感受态,在电转化步骤加入 500 ng 穿梭载体进行电转化. 电击后立即加入 1 mL 含 0.5 mol/L 不同高渗溶液(蔗糖、甘露醇、山梨醇)的复苏培养基,复苏培养后涂布于含有 10 μg/mL 氯霉素的 TSB 固体培养基平板,37 °C 过夜培养后计数转化子菌落,计算转化效率. 由图 6 可知,电击后加入含 0.5 mol/L 甘露醇的复苏培养基,转化效率最高,达到 $4.84 \times 10^3 \mu\text{g}^{-1}$.

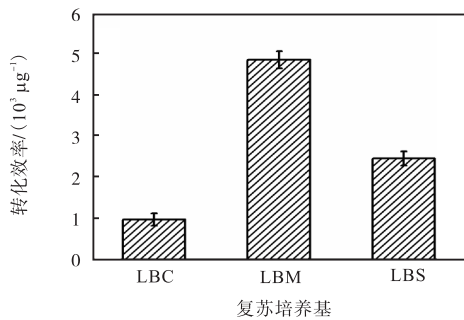


图 6 复苏培养基对电转化效率的影响

Fig. 6 Effect of different osmotic stabilizers in recovery media on the electroporation efficiency

随后为了研究不同浓度的甘露醇对转化效率的影响,在 LB 复苏培养基中分别加入 0.1、0.3、0.5 mol/L 甘露醇,涂板后观察结果(图 7).

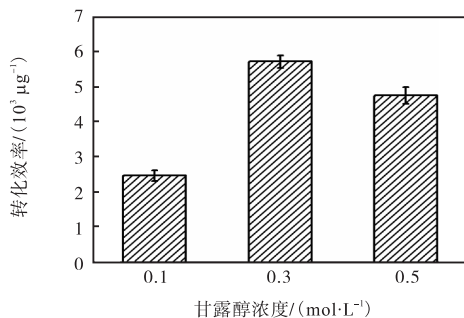


图 7 复苏培养基中甘露醇浓度对电转化效率的影响

Fig. 7 Effect of mannitol concentrations in recovery media on the electroporation efficiency

由图 7 可知,当复苏培养基中含有 0.3 mol/L 甘露醇时,转化效率最高,达到 $5.70 \times 10^3 \mu\text{g}^{-1}$. 由此得出,在复苏培养基中加入 0.3 mol/L 甘露醇时,转化效率最高;甘露醇的浓度过高时,转化效率呈下降趋势.

2.6 复苏时间对转化效率的影响

本研究选用经过上述优化的感受态细胞,加入 500 ng/100 μL 质粒电击后,分别孵育 1、2、3、4、5、6 h,然后涂布于含有 10 μg/mL Cm^r 的 TSB 固体培养基平板,转化效率结果如图 8 所示.

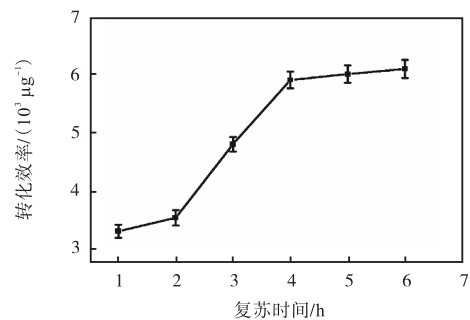


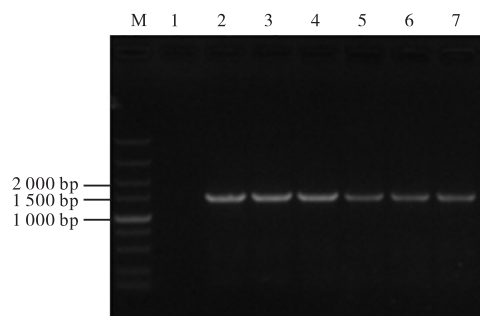
图 8 复苏时间对电转化效率的影响

Fig. 8 Effect of incubation time on the electroporation efficiency

由图 8 可知:细胞复苏时间达到 4 h 时,转化效率较好,达到 $5.95 \times 10^3 \mu\text{g}^{-1}$;4 h 以后转化效率增加不明显,所以综合考虑选择 4 h 为细胞复苏时间.

2.7 肉葡萄球菌转化子的验证

为了验证电转化后得到的转化子是否为阳性转化子,本研究随机挑取 5 个转化子,提取转化子质粒,以该质粒为模板,egfp-F/egfp-R 为上、下游引物,进行 PCR 验证. PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测分析,结果如图 9 所示.



M. marker DL5000; 1. *S. carnosus* TM300 阴性对照; 2. 阳性对照 pBT2-ET-4C-5R-EGFP 的 PCR 结果; 3—7. 5 个随机挑取的转化子提取质粒作为模板 PCR 后的凝胶电泳结果

图 9 转化子的 PCR 验证

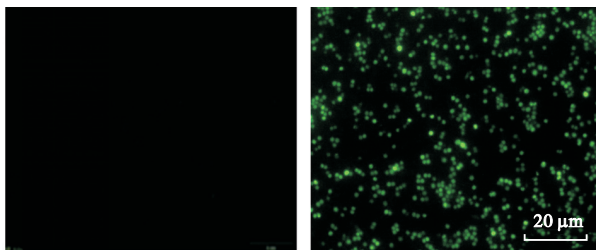
Fig. 9 Verification of transformants by PCR

pBT2-ET-4C-5R-EGFP 作为阳性对照,对各转化

子质粒的 PCR 验证均在 1 440 bp 左右出现目的条带, 且与阳性对照结果一致, 证明质粒 pBT2-ET-4C-5R-EGFP 成功地转化到 *S. carnosus* TM300 宿主中。

2.8 荧光显微镜观察

使用 NIKON ECLIPSE TE2000-U 型荧光显微镜观察转化子菌液, 结果如图 10 所示。与图 10(a) 的 *S. carnosus* TM300 阴性对照对比观察可知, 图 10(b) 中构建成功的 *S. carnosus* TM300 转化株发出绿色荧光, 说明载体 pBT2-ET-4C-5R-EGFP 编码的 EGFP 蛋白能够以活性形式得到表达。



(a) *S. carnosus* TM300

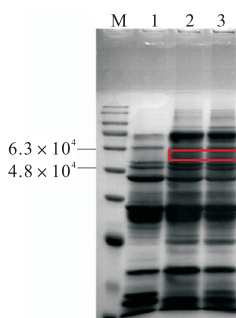
(b) *S. carnosus* TM300/pBT2-ET-4C-5R-EGFP

图 10 EGFP 荧光显微镜观察

Fig. 10 Fluorescence observation of EGFP expression

2.9 SDS-PAGE 与 Western blot 分析

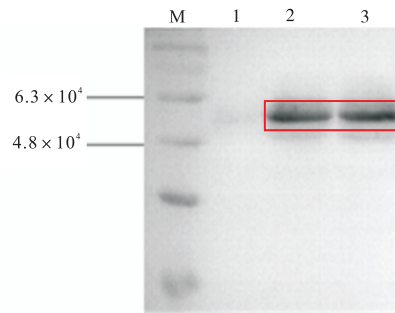
分别提取 *S. carnosus* TM300 及转化菌株发酵液中的蛋白, 进行 SDS-PAGE 蛋白电泳及 Western blot 蛋白免疫印迹。如图 11 和图 12 所示, 野生型菌株 *S. carnosus* TM300 作为阴性对照, 其发酵液中没有出现目的条带, 而转化菌株均在 5.4×10^4 左右处有目的条带。表明肉葡萄球菌转化株成功地将表达的 EGFP 以二聚体形式分泌至细胞外的发酵液环境中。



M. protein marker; 1. *S. carnosus* TM300 阴性对照; 2—3. *S. carnosus*/pBT2-ET-5R-4C-EGFP 发酵液

图 11 *S. carnosus* TM300 转化株发酵液中 EGFP 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 11 SDS-PAGE analysis of EGFP in the fermentation broth of *S. carnosus* TM300 transformants



M. protein marker; 1. *S. carnosus* TM300 阴性对照; 2—3. *S. carnosus*/pBT2-ET-5R-4C-EGFP 发酵液

图 12 *S. carnosus* TM300 转化株发酵液中 EGFP 的 Western blot 检测

Fig. 12 Western blot of EGFP in the fermentation broth of *S. carnosus* TM300 transformants

3 讨论

电转化法作为一种高效的转化方法, 目前广泛应用于外源基因转染等多个领域^[10]。但在实际操作过程中, 电转化的转化效率受到诸多因素的影响, 包括细菌生长状态、生长培养基组分、电击缓冲液组分、电击电压、脉冲时间、电场强度、电阻、质粒 DNA 浓度、复苏培养基组分^[11]、复苏时间^[12]等多个方面。为了提高电转化效率, 不同菌株和质粒的电转化都需要对电转化条件作出调整和优化。

本研究对影响 *S. carnosus* TM300 电转化效率的有关参数进行了优化, 研究发现, *S. carnosus* TM300 在 $A_{578} = 0.6$ 时有最高的转化效率, 达到 $0.53 \times 10^3 \mu\text{g}^{-1}$ 。另外, 对影响电转化的电压和质粒质量浓度因素进行了优化, 研究发现, 在电压为 2 450 V 时, 电转化效率最高, 达到 $0.67 \times 10^3 \mu\text{g}^{-1}$ 。电压过低或过高都会对电转化效率产生显著的影响, 其原因可能是电压过低时细胞表面的动作电位处于不应期的时间较长^[13], 细胞无法产生孔隙, 外源 DNA 从而无法进入细胞; 电压过高时, 细胞在瞬时高压下产生不可逆损伤, 导致细胞大量死亡。同时, 质粒质量浓度对电转化效率的影响也较大。在本研究中, 质粒质量浓度为 $500 \text{ ng}/100 \mu\text{L}$ 时, 电转化效率最高, 达到 $1.01 \times 10^3 \mu\text{g}^{-1}$ 。质粒质量浓度过高或过低都会导致电转化效率降低, 出现这种情况的原因可能是质粒 DNA 浓度过低时, DNA 分子数量太少, 细胞未得到充分利用, 转化效率偏低; 而当质粒质量浓度过高时, 细胞所能够吸收的 DNA 分子达到过饱和的状态, 反而不利于转化, 肖冲等^[14]在乳酸菌电转化条件的优化研究中也证实了这一点。研究还发现, 洗涤缓冲液对感受态细

胞的制备影响较大,用山梨醇、甘露醇、蔗糖等高渗剂配成高渗溶液洗涤菌体细胞,电转化效率有显著提高.其原因可能是一方面高渗溶液能够降低细胞表面的离子强度,另一方面能够给细胞提供一个高于细胞质渗透压的环境而促进细胞收缩,进而增强细胞膜的再密封能力,降低胞内物质的流出速度,最终提高细胞的存活率^[15].实验结果表明,使用10%甘油与0.3 mol/L甘露醇配成的高渗溶液洗涤菌体细胞的转化效果最好,转化效率提高至 $3.89 \times 10^3 \mu\text{g}^{-1}$.此外,电击后在复苏培养基中加入山梨醇、甘露醇等渗透压保护剂时,对*S. carnosus* TM300的转化效率也有显著的提高,当加入的甘露醇为0.3 mol/L时,转化效率可达 $5.70 \times 10^3 \mu\text{g}^{-1}$,这与Xue等^[16]对枯草芽胞杆菌电转化的研究结果相类似.另外,电击后的复苏时间对转化效率也具有显著的影响,当复苏时间为4 h时,电转化效率较好,达到 $5.95 \times 10^3 \mu\text{g}^{-1}$.复苏时间之所以对转化效率有影响,原因可能是电击后细胞表面会产生孔隙,而要闭合孔隙,需要将细胞置于含有特定高渗溶液的复苏培养基中培养一段时间,使细胞孔隙闭合复原,从而有助于提高细胞的存活率,进而提高转化效率^[17].对经过上述优化得到的转化株检测发现,EGFP蛋白在*S. carnosus* TM300中成功表达,并能够以二聚体形式转运至发酵液中.这可能是聚合界面的疏水性氨基酸残基较多^[18],导致EGFP蛋白聚合所致.

综上所述,通过优化以上电转化参数,*S. carnosus* TM300的电转化效率达到 $5.95 \times 10^3 \mu\text{g}^{-1}$,比高强等^[7]以前报道的转化效率提高了5倍,且目的蛋白EGFP成功分泌至发酵液中.优化后的电转化方法可以用于肉葡萄球菌的基因高效转化,为今后肉葡萄球菌的基因工程改造以及合成生物学等研究奠定了有力的电转化方法学基础.

参考文献:

- [1] Schleifer K H, Fischer U. Description of a new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus* [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1982, 32(2): 153-156.
- [2] Goetz F. *Staphylococcus carnosus*: A new host organism for gene cloning and protein production [J]. Journal of Applied Microbiology, 1990, 69(S19): 49S-53S.
- [3] Loeffblom J, Rosenstein R, Nguyen M, et al. *Staphylococcus carnosus*: From starter culture to protein engineering platform [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2017, 101(23/24): 8293-8307.
- [4] 樊菲, 成文玉, 金红星. 产利福霉素地中海拟无枝酸菌的电转化条件优化 [J]. 中国抗生素杂志, 2015, 40(8): 575-578.
- [5] Loeffblom J, Kronqvist N, Uhlén M, et al. Optimization of electroporation-mediated transformation: *Staphylococcus carnosus* as model organism [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 102(3): 736-747.
- [6] 徐敏, 马骏双, 王正祥. 高渗透压对细菌电转化率的影响 [J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(4): 98-100.
- [7] 高强, 许保银, 程逸冰, 等. 运用绿色荧光蛋白探讨肉葡萄球菌双精氨酸分泌途径 [J]. 天津科技大学学报, 2014, 29(5): 1-5.
- [8] Gao Q, Wang M, Yu C, et al. Optimization of the electroporation conditions for DNA transformation of *Staphylococcus carnosus* [J]. Lecture Notes in Electrical Engineering, 2014, 251: 1699-1707.
- [9] Zhou Q X, Zhang J, Wang M N, et al. Study on a staphylococcal Tat signal peptide guided EGFP translocation in *E. coli* [J]. Lecture Notes in Electrical Engineering, 2018, 444: 89-95.
- [10] 蒋华波, 夏梓元, 张琼阁, 等. 大肠埃希菌 TG₁ 电穿孔法转化条件优化研究 [J]. 生物技术进展, 2017, 7(1): 72-76.
- [11] 夏子芳, 石贵阳, 张梁, 等. 乳杆菌电转化条件的优化 [J]. 食品科学, 2008, 29(2): 205-209.
- [12] Ye X, Dong H, Huang Y P. Highly efficient transformation of *Stenotrophomonas maltophilia* S21, an environmental isolate from soil, by electroporation [J]. Journal of Microbiological Methods, 2014, 107: 92-97.
- [13] 唐雪明, 邵蔚蓝, 王正祥, 等. 地衣芽胞杆菌感受态细胞的诱导形成及其高效电转化方法 [J]. 食品与生物技术学报, 2002, 21(5): 460-463.
- [14] 肖冲, 王春风. 乳酸菌电转化的原理与转化条件的优化 [J]. 吉林畜牧兽医, 2010, 31(7): 17-18.
- [15] 赵春云, 杨颂, 欧阳立明, 等. 高渗提高凝结芽胞杆菌 P4-102B 菌株的电转化效率 [J]. 微生物学通报, 2016, 43(6): 1388-1394.
- [16] Xue G P, Johnson J S, Dalrymple B P. High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* [J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 34(3): 183-191.
- [17] 孙磊, 孔文涛, 孔健. 乳酸乳球菌电转化条件的研究 [J]. 山东大学学报: 理学版, 2005, 40(3): 121-124.
- [18] Zacharias D A, Violin J D, Newton A C, et al. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells [J]. Science, 2002, 296(5569): 913-916.