

干酪乳杆菌 LC2W 最优电转化条件的建立

任婧*, 李楠, 陈臣, 董懿樱, 刘振民

(光明乳业研究院 乳业生物技术国家重点实验室, 上海 200436)

摘要: **目的** 建立干酪乳杆菌 LC2W 电转化的最优条件。**方法** 研究了不同质粒、细胞壁弱化剂浓度、电场强度、复苏时间以及质粒浓度对电转效率的影响, 通过单因素轮换法进行了逐一优化。**结果** 经过对乳杆菌感受态制备及电转过程中各因素的考察, 得到最佳的参数条件为: 添加 1% 甘氨酸作为细胞壁弱化剂制成感受态细胞, 电场强度为 10 kV/cm 进行高压电击后, 复苏 3 h, 质粒浓度为 200 ng/μL 时, 能够达到最高的电转效率为 1.25×10^6 CFU/μg DNA。**结论** 经优化后, 获得了较高的转化水平, 可用于指导多种乳杆菌的高效电转, 并且为下一步的 LC2W 菌株改造和基因功能探究奠定了基础。

关键词: 干酪乳杆菌; 电转化; 遗传转化; 细胞壁弱化剂; 电场强度

Establishment of genetic transformation system for *Lactobacillus casei* LC2W

REN Jing*, LI Nan, CHEN Chen, DONG Yi-Ying, LIU Zhen-Min

(Dairy Research Institute, Bright Dairy & Food Co., Ltd., State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Shanghai 200436, China)

ABSTRACT: Objective To establish a genetic transformation system of *Lactobacillus casei* LC2W. **Methods** On the basis of single factor experiments, the effects of operating conditions, such as different plasmids, concentration of cell wall weakening agent, strength of electric field, recovery time, and plasmid concentration were investigated. **Results** The optimized parameters for electransformation were as follows: concentration of glycine used as cell wall weakening agent 1%, strength of electric field 10 kV/cm, recovery time 3 h, plasmid concentration 200 ng/μL. The high-efficient electransformation was reached at 1.25×10^6 CFU/μg DNA. **Conclusions** A high-efficient electransformation system was established, which could be used as a protocol for other *Lactobacilli* and the basis for genetic modification of *L. casei* LC2W.

KEY WORDS: *Lactobacillus casei*; electransformation; genetic transformation; cell wall weakening agent; strength of electric field

1 引言

乳杆菌是一类重要的革兰氏阳性菌, 也是公认

的具有较高经济价值的食品级微生物, 已广泛应用于食品、轻工业、医药、饲料等多个领域^[1-4]。作为人和动物体内重要的正常生理菌群, 乳杆菌定殖于

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划课题(2013BAD18B01)、国家“十二五”863 项目(2011AA100901)

Fund: Supported by the National "Twelfth Five-Year" Plan for Science & Technology Support Program of China (2013BAD18B01) and the National High Technology Research and Development Program of China (2011AA100901).

*通讯作者: 任婧, 博士, 高工, 现任光明乳业研究院乳品安全研究部部长, 主要研究方向为食品安全及乳酸菌分子生物学。E-mail: renjing@brightdairy.com

*Corresponding author: REN Jing, Ph.D, Senior Engineer, Senior Manager of Dairy Safety Research Department, Dairy Research Institute, Bright Dairy & Food Co., Ltd., E-mail: renjing@brightdairy.com

肠道等部位,起到维持体内微生态平衡和健康的作用^[5,6]。此外,作为一般认为安全(generally recognized as safe, GRAS)的微生物,乳杆菌还常常被作为疫苗的抗原递送载体,进行重组蛋白的表达^[7-9]。因此,利用现代遗传工程技术对乳杆菌进行分子改造和遗传操作正受到越来越多的关注^[10,11]。乳杆菌的遗传转化是限制其遗传操作的关键因素,制约着其外源基因表达、基因功能鉴定和代谢机制的研究。

干酪乳杆菌 LC2W 是本实验室前期分离得到的一株功能性益生菌,其发酵液中具有能够降低血压的胞外多糖成分^[12]。为了研究其胞外多糖合成途径中相关基因的功能,以及胞外多糖合成的调控机制,必须建立方便、快速、高效的遗传转化系统。目前乳杆菌的转化方法主要有原生质体转化法和电转化法两种。前者由于操作步骤复杂、耗时长、遗传稳定性差等缺点逐步被淘汰。自1987年,Chassy等^[13]首次报道对干酪乳杆菌的电转化以来,越来越多的研究者^[14-17]对不同种乳杆菌的电转条件进行了探索。利用高压脉冲电流可以使细胞膜发生瞬间的可逆性穿孔,外源DNA穿过细胞膜而转移到细胞中。经过一定条件复苏后,细胞膜上的孔径将重新封闭,防止胞内物质外流。然而由于乳杆菌属于革兰氏阳性菌,细胞壁厚,外源DNA很难进入细胞,导致电转效率低,重复性不高,严重限制了对其基因水平的研究。

本研究探讨影响乳杆菌电转化效率的诸多重要因素,如细胞壁弱化剂、电场强度、复苏时间、质粒DNA浓度,得到了较高的电转化效率,为今后的干酪乳杆菌 LC2W 遗传操作提供一定的依据。

2 材料与方法

2.1 菌株和质粒

干酪乳杆菌 LC2W(CGMCC NO. 0828)、大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保藏。pIB184 质粒由中国科学院上海生命科学研究院杨晟研究员惠赠。pSIP403 由 Dr. Lars Axelsson 惠赠。上述两种质粒均为红霉素抗性,在大肠杆菌 DH5 α 中工作浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$,在干酪乳杆菌 LC2W 中工作浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 主要仪器

Eporator 电转化仪(德国 Eppendorf 公司); Lab-conco 二级生物安全柜(美国 Labconco 公司); A35 厌氧工作站(英国 Don Whitley Scientific 公司); Bio-

Photometer plus 核酸蛋白测定仪(德国 Eppendorf 公司); NanoDrop 2000C 分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Eppendorf 5424R 冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

2.3 培养基和缓冲液

MRS 培养基(德国 Merck 公司)用于干酪乳杆菌 LC2W 的培养; MRS 平板培养基(含红霉素 10 $\mu\text{g/mL}$)用于转化子的筛选和计数; 电击缓冲液为 30%聚乙二醇(PEG, 分子量 1500); 复苏培养基组成为: MRS+500 mmol/L 蔗糖+20 mmol/L MgCl_2 +2 mmol/L CaCl_2 。

大肠杆菌的培养使用 LB 培养基(每升含有 10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母浸提物、10 g NaCl)。所用试剂均为分析纯或化学纯。

2.4 实验方法

2.4.1 质粒提取

大肠杆菌质粒用购自天根生化科技(北京)有限公司的质粒提取试剂盒抽提,用 NanoDrop 2000C 分光光度计测定质粒浓度。

2.4.2 干酪乳杆菌 LC2W 感受态制备

将 MRS 平板培养基上新鲜活化的单菌落挑至 5 mL MRS 液体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜(约 16 h); 按 2% 的接种量转接至 100 mL 含 1%甘氨酸的 MRS 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养至 OD_{600} 约为 0.8(约 4.5 h); 将菌液冰浴 15 min, 然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、5000 g 离心 10 min 收集菌体; 用 100 mL 冰冷的 30% PEG 洗涤 3 次; 用 1 mL 冰冷的 30% PEG 重悬菌体, 分装成每管 100 μL , -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

2.4.3 电转化

取 5 μL 质粒与 100 μL 感受态细胞混合, 转移到预冷的 0.1 cm 电击杯(美国 BioRad 公司)中, 冰浴 5 min, 使用电转化仪在 1 kV 电压下进行电击。电击完毕后迅速加入 1 mL 复苏培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 3 h; 取 100 μL 菌液稀释至适当浓度, 涂布筛选平板。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h, 记录转化子数目并计算转化效率。以不加质粒的感受态电转作为阴性对照, 其余操作均相同。同一条件做 3 个平行样, 取平均值作为结果。

3 结果与讨论

3.1 不同质粒转化 LC2W

pIB184 和 pSIP403 质粒分别为组成型和诱导型

过表达质粒,前者含有 P_{23} 启动子,能在菌体生长过程中过表达插入基因,而后者含有 P_{spp} 启动子,需要添加 sakacin P 进行诱导表达。这两种质粒均为能够在乳杆菌中自主复制的游离质粒,但是由于质粒大小、复制原点和拷贝数目的不同,可能导致转化效率的差异。经过电转干酪乳杆菌 LC2W,两者的转化效率分别如表 1 所示。由此可见, pIB184 在 LC2W 中的转化效率更高,此后电转均以 pIB184 进行。并且在本实验中,阴性对照平板均未长菌落,说明红霉素抗性平板筛选准确可靠。

表 1 不同质粒转化 LC2W 的比较
Table 1 Comparison of different plasmids on the transformation of LC2W

质粒名称	转化效率(CFU/ μ g DNA)
pIB184	1.25×10^6
pSIP403	1.48×10^5

3.2 不同甘氨酸浓度对电转效率的影响

革兰氏阳性菌的细胞壁结构中含有大量丙氨酸,而甘氨酸与丙氨酸结构相似,仅缺少一个甲基。有研究^[18]证明,培养基中的甘氨酸能够被细胞不加识别的摄入,用于构建细胞壁,然而由于缺少一个甲基,这种情况下形成的细胞壁呈松散结构,有利于外源大分子进入细胞内。正是基于这一原理,本实验在制备感受态的培养基中添加不同浓度的甘氨酸(0、0.3%、1.0%、3.0%),以期获得较高的电转效率。

在不添加甘氨酸的情况下,LC2W 电转效率较低。随着甘氨酸添加量的增加,电转效率呈先上升,后下降的趋势。原因可能是低浓度的甘氨酸在不影响菌体生长的情况下,有利于形成松散的细胞壁结构,而甘氨酸的过量添加,导致菌体无法正常生长,过低的菌体浓度影响了转化效率。因此,本实验中最佳甘氨酸添加量为 1%,详见图 1。

3.3 不同电场强度对电转效率的影响

电击转化时,瞬时的高压电场能够促使细胞膜可逆性的产生孔洞,短时间内增加通透性,使得外源分子能够渗透入细胞。电场强度过高时,胞内物质过度渗漏,导致细胞死亡。过低时,细胞膜迅速修复,外源物质来不及渗入^[14]。本研究考察了不同电场强度(7.5、10.0、12.5、15.0 kV/cm),对电转效率的影响。

在一定范围内,电转效率与电场强度呈正比;而超过一定限度,高压电场造成的损伤无法修复,导致转化效率的下降。因此,本实验中最佳电场强度为 10 kV/cm,详见图 2。

3.4 不同复苏时间对电转效率的影响

经过瞬时的高压电击后,细胞需要经历一段复苏修复的过程。复苏时间太短,细胞膜来不及修复,菌体无法正常生长。复苏时间太长,由于缺少相应抗生素的筛选压力,容易造成质粒的丢失^[14]。本研究选取了高压电击后,复苏 1、3、6 h,考察其对电转效率的影响。对于 LC2W 来说,最佳复苏时间为 3 h,详见图 3。

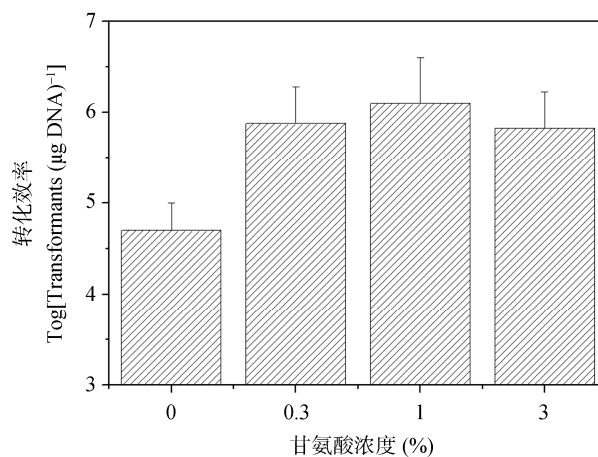


图 1 甘氨酸浓度对电转效率的影响

Fig. 1 Effect of glycine concentration on the transformation efficiency

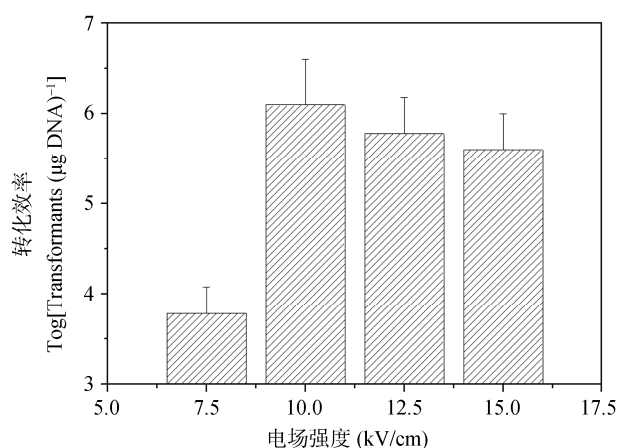


图 2 电场强度对电转效率的影响

Fig. 2 Effect of the strength of electric field on the transformation efficiency

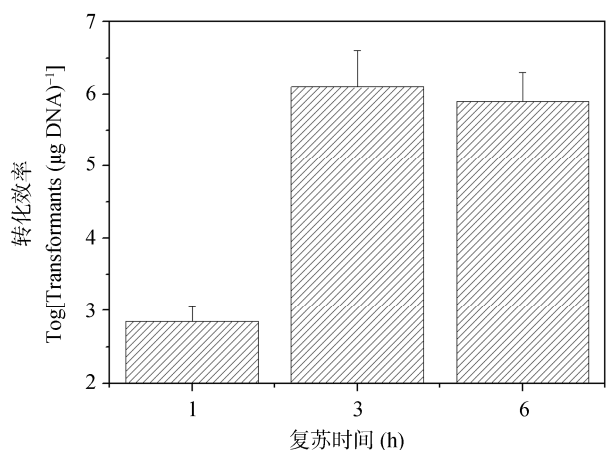


图 3 复苏时间对电转效率的影响
Fig. 3 Effect of recovery time on the transformation efficiency

3.5 不同质粒浓度对电转效率的影响

在转化条件和感受态细胞数目一定的情况下, DNA 的浓度对转化效率有一定影响^[16]。本研究比较了经试剂盒直接提取的质粒(200 ng/μL)与经乙醇沉淀浓缩后的质粒(1000 ng/μL)电转化时的效率, 发现两者几乎相同(表 2)。说明对于现有的转化条件来说, 1 μg/μL 的 DNA 添加浓度已经达到饱和。

表 2 不同浓度质粒对电转效率的影响
Table 2 Effect of plasmid concentrations on the transformation efficiency

质粒浓度(ng/μL)	转化效率(CFU/μg DNA)
200	1.25×10 ⁶
1000	1.14×10 ⁶

4 结 论

本研究对电转过程中的多个关键因素进行了考察, 获得了较高的转化水平。经优化后的方法可用于指导多种乳杆菌的高效电转, 并且为下一步的 LC2W 菌株改造和基因功能探究提供一定依据。

参考文献

[1] 曹瑞博, 汪建明. 干酪乳杆菌的功能性研究及其应用[J]. 中国食品添加剂, 2009, S1: 169–172.
Cao RB, Wang JM. Research on functional property of *Lactobacillus casei* and its application [J]. China Food Addit, 2009, S1: 169–172.

[2] 刘丛丛, 纪凤娣, 姜良萍, 等. 副干酪乳杆菌 H9 复合涂膜技术对草鱼的生物保鲜作用 [J]. 食品科技, 2013, (11): 146–152.
Liu CC, Ji FD, Jiang LP, et al. Bio-preservative effects of *Lactobacillus paracasei* H9 in sodium alginate coating on grass carp [J]. Food Sci Technol, 2013, (11): 146–152.

[3] 白卫东, 赵文红, 梁桂凤, 等. 保加利亚乳杆菌的特性及其应用[J]. 中国酿造, 2009, (8): 10–14.
Bai WD, Zhao WH, Liang GF, et al. Characteristics of *Lactobacillus bulgaricus* and its application [J]. China Brew, 2009, (8): 10–14.

[4] 马鹏飞, 陈有亮, 金鸟君. 鼠李糖乳杆菌功能特性的研究进展 [J]. 科技通报, 2009, (2): 202–206.
Ma PF, Chen YL, Jin NJ. Research and development on the functional properties of *Lactobacillus rhamnosus* [J]. Bull Sci Technol, 2009, (2): 202–206.

[5] Kailasapathy K. Commercial sources of probiotic strains and their validated and potential health benefits - a review [J]. Int J Ferment Food, 2013, (2): 1–17.

[6] del Rio B, Seegers JF, Gomes-Solecki M. Immune response to *Lactobacillus plantarum* expressing *Borrelia burgdorferi* OspA is modulated by the lipid modification of the antigen [J]. PLoS One, 2010, (5): e11199.

[7] Kajikawa A, Satoh E, Leer RJ, et al. Intragastric immunization with recombinant *Lactobacillus casei* expressing flagellar antigen confers antibody-independent protective immunity against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis [J]. Vaccine, 2007, (25): 3599–3605.

[8] Wu CM, Chung TC. Mice protected by oral immunization with *Lactobacillus reuteri* secreting fusion protein of *Escherichia coli* enterotoxin subunit protein [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2007, (50): 354–365.

[9] del Rio B, Dattwyler RJ, Aroso M, et al. Oral immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum* induces a protective immune response in mice with Lyme disease [J]. Clin Vaccine Immunol, 2008, (15): 1429–1435.

[10] Thompson K, Collins MA. Improvement in electroporation efficiency for *Lactobacillus plantarum* by the inclusion of high concentrations of glycine in the growth medium [J]. J Microbiol Method, 1996, (26): 73–79.

[11] 葛菁萍, 高先军, 由田, 等. 副干酪乳杆菌 HD1.7 遗传转化体系的初步建立[J]. 中国农学通报, 2011, (23): 102–108.
Ge JP, Gao XJ, You T, et al. Initial Establishment of Genetic Transformation System for *Lactobacillus paracasei* HD1.7 [J]. Chin Agr Sci Bull, 2011, (23): 102–108.

[12] Ai LZ, Zhang H, Guo BH, et al. Preparation, partial characterization and bioactivity of exopolysaccharides from *Lactobacillus*

- casei* LC2W [J]. Carbohydr Polym, 2008, (74): 353–357.
- [13] Chassy BM, Flickinger JL. Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation [J]. FEMS Microbiol Lett, 1987, (44): 173–177.
- [14] 曹晓梅, 张虎成, 李曼, 等. 乳杆菌电转化的研究进展[J]. 军事医学科学院院刊, 2008, (6): 590–593.
Cao XM, Zhang HC, Li M, *et al.* Progress in study on electroporation efficiency for *Lactobacillus* [J]. Bull Acad Mil Med Sci, 2008, (6): 590–593.
- [15] 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, (2): 205–209.
Xia ZF, Shi GY, Zhang L, *et al.* Optimization of electroporation processing of *Lactobacilli* [J]. Food Sci, 2008, (2): 205–209.
- [16] 张旭, 崔艳华, 张兰威, 等. 乳酸菌电转化条件研究[J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 2009, (z1): 26–33.
Zhang X, Cui YH, Zhang LW, *et al.* Development of electrotransformation in lactic acid bacteria [J]. J Lanzhou Univ: Nat Sci, 2009, (z1): 26–33.
- [17] 贾士芳, 王荫榆, 郭兴华, 等. 乳杆菌电转化条件的研究[J]. 生物工程学报, 1998, (4): 429–433.
Jia SF, Wang YY, Guo XH, *et al.* The Factors Affected Transformation Efficiency of *Lactobacillus* by Electroporation [J]. Chin J Biotechnol, 1998, (4): 429–433.
- [18] Holo H, Nes IF. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media [J]. Appl Environ Microbiol, 1989, (12): 3119–3123.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



任婧, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全及乳酸菌分子生物学。
E-mail: renjing@brightdairy.com