

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2017.05.033

短小芽孢杆菌遗传操作系统的建立及应用

王超, 贺婷婷, 宋婷, 张长斌, 王海燕

(四川大学生命科学学院四川省分子生物学与生物技术重点实验室, 四川成都 610064)

摘要: 短小芽孢杆菌 SCU11 产生的胞外碱性蛋白酶具有良好的生皮脱毛效果, 在生物制革领域有很大的应用前景. 但该菌株的遗传转化系统尚未建立起来, 限制了菌株的遗传改造和基因功能研究等方面的工作. 本研究采用高渗透压电转化法, 实现了对短小芽孢杆菌的电转化; 在 E-buffer 配方为甘露醇 1 M, 山梨醇 0.5 M, 甜菜碱 7.5%, 甘油 10%, 电场强度 24 KV/cm 条件下, 转化效率为 3.5×10^3 CFU/ μ g DNA. 构建了 *E. coli*-*Bacillus* 穿梭载体 pUCETs, 建立了短小芽孢杆菌基因敲除体系, 利用该系统成功敲除了基因组中的 *peptidase C40* 基因. 本研究所建立的电转化系统及基因导入/敲除体系, 为短小芽孢杆菌基因组编辑奠定了基础.

关键词: 短小芽孢杆菌; 高渗透压电转化法; 温度敏感性质粒; 基因敲除

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)05-1083-06

The construction and application of a genetic manipulation system for *Bacillus pumilus*

WANG Chao, HE Ting-Ting, SONG Ting, ZHANG Chang-Bin, WANG Hai-Yan

(Sichuan Key Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract: The fermentation supernatant of *Bacillus pumilus* SCU11 showed efficient dehairing capability, indicating its extracellular proteases has a good application future in leather industry. However, the efficient genetic manipulation system of *B. pumilus* SCU11 has not yet been established, which greatly hampered the genetic engineering and the gene function study of this strain. In this study, high osmolarity electroporation method was developed for the efficient transformation of *B. pumilus*, and the transformation efficiency was obtained up to 3.5×10^3 CFU/ μ g DNA. Moreover, a temperature sensitive *E. coli*-*Bacillus* shuttle vector pUCETs was constructed by making use of a temperature sensitive replication origin, and the *peptidase C40* gene of SCU11 was knocked-out based on the pUCETs. The electroporation method and gene manipulation system established in this study laid a solid foundation for further genome manipulation of *B. pumilus*.

Keywords: *Bacillus pumilus*; High osmolarity electroporation; Temperature sensitive plasmid; gene knockout

1 引言

本实验室前期从成都的生活垃圾中分离得到一株产碱性蛋白酶的短小芽孢杆菌 BA06, 该菌株的发酵上清液具有很好的生皮脱毛效果, 在生物制革领

域有很大的应用前景^[1-3]. 对 BA06 进行复合诱变后得到蛋白酶活力提高的菌株 SCU11^[4], 采用响应面法进行发酵条件优化使蛋白酶产量得到进一步提高^[5], 但和商业化的蛋白酶菌株的产酶水平(大于 20000~30000 U/mL)相比还有一定的差距.

收稿日期: 2016-05-23

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2012AA022204)

作者简介: 王超(1990-)男, 硕士研究生, 研究方向为分子遗传学与基因工程, E-mail: sirawang@foxmail.com

通讯作者: 王海燕, E-mail: hayawang@scu.edu.cn

采用遗传操作技术改造细菌基因组相关基因是提高菌株产酶水平的一个有效途径^[6],短小芽孢杆菌由于缺乏高效的转化方法和有效的载体系统,菌株的遗传操作体系还没有建立起来,极大的阻碍了对菌株进行各种遗传改造和基础理论方面的研究. 鉴于短小芽孢杆菌 SCU11 在制革脱毛等领域的应用前景^[4,7],不论是在实际应用还是基础理论研究方面都需要开展深入的研究,高效可行的基因操作系统是一个重要的技术基础.

本实验首先采用高渗透压电转化法,实现了短

小芽孢杆菌的电转化,进一步构建了温度敏感性 *E. coli*-*Bacillus* 穿梭载体,利用该载体实现了短小芽孢杆菌的基因敲除. 本研究所建立的短小芽孢杆菌遗传操作体系,为今后开展短小芽孢杆菌基因功能及表达调控机理的研究,以及进行菌株的基因改造等奠定了坚实基础.

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 菌种和质粒 本研究所用的菌株和质粒见表 1.

表 1 菌株和质粒性质

Tab. 1 Bacteria and plasmids used in this study

Strains or plasmid	Description	Resource
<i>B. pumilus</i> SCU11	<i>Bacillus pumilus</i> strains producing alkaline proteases	This laboratory
<i>E. coli</i> JM109	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 Δ(lac-proAB) F'(traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15)</i>	This laboratory
pSUGV4	<i>E. coli</i> / <i>Bacillus</i> shuttle vector; <i>Kan^R Amp^R, Ori_{E. coli}, Ori. B. subtilis, LacZ</i>	This laboratory ^[8]
pUC18	<i>amp^r lacZ ori</i>	This laboratory
pE007	pSKE194 derivative, pE194 released by XbaI restriction and ligated with MCS of pUCM20, <i>Em^R, Ori_{ts}</i>	Borgmeier ^[6]
pUCETs	<i>E. coli</i> / <i>Bacillus</i> shuttle vector; <i>ermC^R Amp^R, Ori_{E. coli}, Ori_{ts}, LacZ</i>	This study
pUCETsΔC40	pUCETs with deletion cassette for C40 gene	This study

2.1.2 培养基与试剂 LB 培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, NaCl 10 g/L;

GM 培养基: 在 LB 培养基中添加 0.5 M 山梨醇和 7.5 % (m/v) 的甜菜碱试剂;

RM 培养基: 在 LB 培养基中添加 0.5 M 山梨醇和 0.38 M 的甘露醇;

发酵培养基: 麸皮 25 g/L, 黄豆粉水解液 20 g/L, 酵母膏 3 g/L, K₂HPO₄ 4 g/L, NaH₂PO₄ 0.4 g/L, CaCO₃ 3 g/L, pH 8.3.

2.1.3 电击缓冲液 W-buffer: 山梨醇 0.5 M, 甘露醇 0.5 M, 甜菜碱 7.5 % (m/v), 甘油 10% (v/v); E-buffer: 山梨醇 0.5 M, 甘露醇 0.3~1.2 M, 甜菜碱 7.5 % (m/v), 甘油 10% (v/v);

2.1.4 主要试剂 山梨醇、甘露醇、甜菜碱等购自生工生物工程上海(股份)有限公司; Taq DNA 聚合酶、Prime Star MAX DNA 聚合酶、T4 DNA ligase 等酶购自 TaKaRa(大连)公司; 限制性内切酶购自 Fermentas(Thermo)公司; 胶回收和纯化试剂盒购自 OMEGA 公司; 酪素购自 Sigma 公司; 福林酚购自科伦公司; 其它试剂均为国产分析纯.

2.2 方法

2.2.1 基因组和质粒的提取、*E. coli* 的转化 参照《分子克隆实验指南第三版》^[9] 或产品说明书进行.

2.2.2 引物设计及 PCR 反应 根据 NCBI 公布

的 *Bacillus pumilus* BA06、pE194 和 pSUGV4 基因序列, 采用 Primer 5 软件进行引物设计, 表 2 列出了本研究所使用引物的信息. PCR 反应体系 (50 μL): Prime STAR MAX DNA 聚合酶 25 μL (2 ×), 上下游引物各 1.0 μL, 模板 DNA 1 μL, 加 ddH₂O 至 50 μL 体积; PCR 程序如下: 98℃ 预变性 3 min; 98℃ 变性 10 s, 55℃ 退火 20s, 72℃ 延伸 10s, 共 30 次循环; 充分延伸 5 min.

表 2 本研究所用引物及其信息

Tab. 2 Primers used for this study

引物名称	引物序列(5'-3')*
PE007-F	<u>G</u> CTCATATGATGGAAAGAGGGGTATCACG
PE007-R	<u>G</u> CTCATATGTGGACAGTCGCATACAGCAT
C40-1F	<u>G</u> CTCTGCAGCTTTCGTTCTCTCAATGTAGC
C40-1R	<u>CGTCATCATCTGTATGAATCAGGCGTTGTAA</u> GAAGAGTCGTT
C40-2F	<u>GAACGATGACCTCTAATAATTGTTTTCAC</u> GTATAGTTCCTCCTT
C40-2R	<u>G</u> CTGGTACCAACATTTGCCCTTGTTGGAG
Kan-F	<u>G</u> ATTCATACAGATGATGACG
Kan-R	<u>CAATTATTAGAGGTCATCGTTC</u>
M13-47	<u>C</u> GCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
RV-M	<u>G</u> AGCGGATAACAATTTACACAGG
C40screenF	<u>C</u> ACCCGTGTTACATTCCAGTTA
C40screenR	<u>CAATTATTAGAGGTCATCGTTC</u>

下划线是设计的限制酶位点和保护碱基; 加粗的序列为重叠 PCR 反应中的互补序列.

2.2.3 短小芽孢杆菌电转化 取保存于 -80°C 的短小芽孢杆菌 SCU11,在含1%牛奶的LB平板上划线活化;挑取平板上水解圈较大的单菌落,接种于5 mL液体LB, 37°C ,200 r/min,过夜培养;接种500 μL 过夜培养液于50 mL液体GM培养基, 37°C ,200 r/min培养至 $\text{OD}_{600}=0.9\sim 1.0$;将培养液转移至50 mL离心管中,冰浴10 min;然后 4°C ,4500 r/min,离心5 min,弃去上清,用预冷的W-buffer 50 mL洗涤三次;最后加入1 mL E-buffer (1:50, v/v),轻柔混匀,得到感受态细胞,冰浴备用。

取80 μL 感受态细胞与5 μL 质粒(约1 μg)于1.5 mL Ep管中混匀,将混合液加入电极间距1 mm的预冷电转杯,冰浴5 min;用Bio-Rad的电转化仪进行电击,参数设置为:2400 V,25 μF ,200 Ω ,1 mm;电击完后,立即向电转杯中加入1 mL RM培养基,混匀后转入试管中, 37°C ,200 r/min,培养3~4 h;最后离心5 min,倒掉约800 μL 上清,用枪头将上清与细胞混匀后涂布在含有相应抗生素的平板上,过夜培养,挑取转化子进行后续验证。

2.2.4 温度敏感性质粒 pUCETs 的构建 以质粒 pE007 (pSKE194 质粒的衍生载体)为模板,用 PE007-F/R 引物对扩增温度敏感性复制起点 *Ori-ts* 和红霉素抗性基因 *ermC*,得到片段 *Ori-ts-ermC*。将 *Ori-ts-ermC* 片段和 pUC18 分别经 NdeI 酶切,连接后转化 *E. coli* JM109,于100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素平板上筛选重组子,得到温度敏感性 *E. coli-Bacillus* 穿梭载体 pUCETs,载体中 *Ori-ts* 和 *ermC* 的方向与 *LacZ* 相同。

2.2.5 质粒 pUCETs 温度敏感性实验 将含有温度敏感性质粒 pUCETs 的短小芽孢杆菌转化子扩大培养,用无菌水稀释至 10^4 cell/mL,取100 μL 涂布于含有5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 红霉素的LB平板,然后放置在不同温度下(30°C , 34°C , 37°C , 42°C)培养12 h,通过平板上长出的菌落数检验温度对质粒的抑制作用。

2.2.6 短小芽孢杆菌 C40 基因敲除载体的构建

以温度敏感性质粒 pUCETs 为载体,构建短小芽孢杆菌 C40 基因的敲除质粒,构建策略如图1所示。以 SCU11 基因组为模板,用 C40-1F/1R 和 C40-2F/2R 引物对分别扩增 C40 基因上、下游同源臂得到 C40-flankA 和 flankB;以质粒 pSUGV4 为模板,用 Kan-F/R 引物对扩增卡那霉素基因

Kan;利用重叠 PCR 将三个片段连接起来得到 C40-flankA-Kan-C40-flankB;融合片段经 *Pst* I / *Kpn* I 双酶切后与载体 pUCETs 连接并转化 *E. coli* JM109,于100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素平板上筛选,得到用于基因敲除的质粒 pUCETs Δ C40。

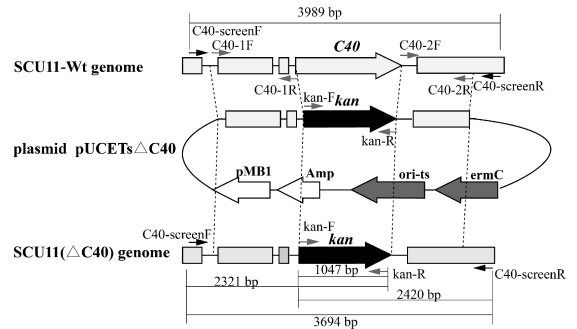


图1 pUCETs Δ C40 构建策略和 C40 基因敲除重组子 SCU11(Δ C40) 基因组示意图

图中的灰色箭头表示质粒 pUCETs Δ C40 构建过程所用引物及引物结合的位置示意图;黑色箭头(C40 screen F/R)表示筛选 C40 基因敲除重组子所用引物。

Fig. 1 The construction strategy of pUCETs Δ C40 and the genome of SCU11(Δ C40)

2.2.7 C40 基因敲除突变体的筛选及 PCR 验证

将构建的 pUCETs Δ C40 质粒采用高渗透压电转化法转化短小芽孢杆菌 SCU11,在含有5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 平板上筛选转入质粒的短小芽孢杆菌转化子。挑取1个经鉴定含有质粒 pUCETs Δ C40 的转化子,接种于5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基中,在许可温度 30°C 下,振荡培养36~48 h 至细胞浓度约为 10^9 cell/mL;然后将菌液用无菌水稀释至 10^4 cell/mL,涂布于含有5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 平板; 42°C 培养12 h 促进质粒丢失。为了排除仍然含有质粒的转化子,将上述 42°C 培养的卡那霉素平板上的转化子分别点种到含有5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 红霉素的平板和5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的平板,挑取只能在卡那霉素平板上生长而不在红霉素平板生长的转化子进行后续验证。

2.2.8 短小芽孢杆菌蛋白酶发酵 挑取活化后的单菌落接种于20 mL LB 培养基的锥形瓶中, 37°C 活化培养12 h,以4%的接种量转种至装有25 mL 发酵培养基的100 mL 锥形瓶中, 34°C 、200 r/min 培养48 h,收集发酵液,13 000 r/min, 4°C 离心10 min,取上清测定蛋白酶活力。每个样品做三个重复。

2.2.9 蛋白酶活力的测定 按照国标蛋白酶活力

测定法 SB/T 10317-1999^[10] 进行酶活力测定.

3 结 果

3.1 短小芽孢杆菌电转化方法的建立

参照枯草芽孢杆菌的高渗透压电转化方法^[11] 对短小芽孢杆菌 SCU11 进行转化(转化用 DNA 为质粒 pSUGV4),均未获成功. 多次试验发现 E-buffer 中甘露醇浓度和电击场强这两个因素对短小芽孢杆菌转化效率有显著性影响,因此对这两个

因素进行了优化.

3.1.1 甘露醇浓度对短小芽孢杆菌转化效率的影响 用含有不同浓度甘露醇(0.30~1.20 M)的 E-buffer 来优化甘露醇的最佳用量,电场强度均为 24 kV/cm,电转化时所用质粒为 pSUGV4. 结果如表 3 所示. 可以看出当甘露醇浓度为 1.00 M 时,转化效率最大可达 3.58×10^3 CFU/ μ g DNA,超过此浓度,甘露醇浓度继续增加会使转化率降低.

表 3 甘露醇浓度对短小芽孢杆菌转化效率的影响

Tab. 3 Effects of mannitol concentration on transformation efficiency of *B. pumilus*

E- buffer				Field strength kV/cm	Transformation efficiency CFU/ μ g DNA
Mannitol (M)	Sorbitol (M)	Betaine(% ,w/v)	Glycerol(% ,v/v)		
0.30	0.5	7.5	10	24	0×10^3
0.50	0.5	7.5	10	24	$(0.02 \pm 0.01) \times 10^3$
0.75	0.5	7.5	10	24	$(0.43 \pm 0.05) \times 10^3$
1.00	0.5	7.5	10	24	$(3.58 \pm 0.47) \times 10^3$
1.20	0.5	7.5	10	24	$(2.14 \pm 0.26) \times 10^3$

3.1.2 电场强度对转化效率的影响 为了优化电场强度,在最佳 E-buffer 配方条件下,设置了电场强度梯度(12~27 kV/cm) 来确定最合适的电场强度. 结果表明随着电击时电场强度的提高,短小芽孢杆菌的转化率也随之上升,在 24 kV/cm 时达到最大 3.6×10^3 CFU/ μ g DNA. 电场强度超过此阈值后,转化效率降低(图 2).

综合上述实验结果,短小芽孢杆菌电转化方法的 E-buffer 最优配方为:甘露醇 1 M,山梨醇 0.5 M,甜菜碱 7.5%,甘油 10%. 电转化时电击参数设置为:2400 V,25 μ F,200 Ω ,1 mm. 采用上述条件参数多次进行重复试验,转化所用 DNA 为 pSUGV4 质粒,转化效率稳定在 $(3 \sim 3.6) \times 10^3$ CFU/ μ g DNA,表明该方法稳定、可靠.

3.2 短小芽孢杆菌遗传操作载体的构建

3.2.1 *E. coli-Bacillus* 温度敏感性穿梭载体的构建 将 PCR 扩增质粒 pE007 得到的 DNA 片段 *Ori-ts-ermC* 和 pUC18 分别酶切,连接后转化 *E. coli* JM109(见材料与与方法). 挑取阳性转化子提取质粒进行酶切鉴定(NdeI),结果显示酶切片段大小与预期一致(图 3A),进一步经测序验证表明插入片段正确,*E. coli-Bacillus* 穿梭载体 pUCETs 构建成功.

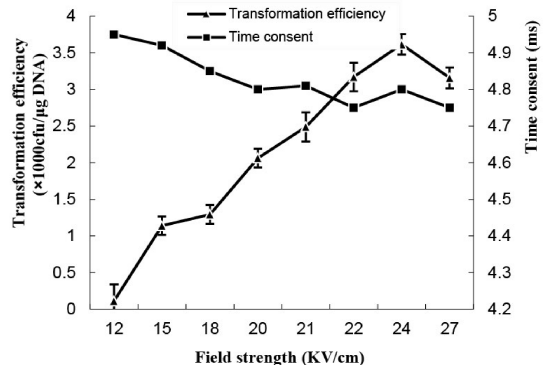


图 2 电场强度对 *B. pumilus* SCU11 转化率的影响
Fig. 2 Effects of field strength on transformation efficiency of *B. pumilus* SCU11

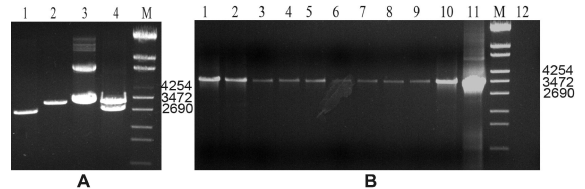


图 3 pUCETs 质粒酶切验证(A)及 SCU11-pUCETs 转化子的 PCR 验证(B)

(A) M: λ -EcoT14 I DNA marker; 1: pUC18 NdeI 酶切; 2: *ori-ts-ermC* PCR 产物; 3: plasmid pUCETs; 4: pUCETs NdeI 酶切 (B) M: λ -EcoT14 I DNA marker; 1-10: SCU11-pUCETs 转化子菌液 PCR; 11: 质粒 pUCETs PCR; 12: SCU11 菌液 PCR.

Fig. 3 Plasmid pUCETs enzyme digestion (A) and SCU11-pUCETs PCR verification (B)

3.2.2 pUCETs 转化短小芽孢杆菌及温度敏感性验证 利用高渗透压电转化法,将 pUCETs 转化短小芽孢杆菌 SCU11 后,得到红霉素抗性的转化子。挑取 10 个抗性转化子进行 PCR 验证,扩增条带大小与理论条带大小一致(图 3B),表明插入的来自于金黄色葡萄球菌内源质粒的复制起点和红霉素抗性基因均可以在短小芽孢杆菌 SCU11 中发挥作用,将得到的转化子命名为 SCU11-pUCETs。

为了进一步验证 pUCETs 质粒在短小芽孢杆菌 SCU11 内对温度的敏感性,进行了不同培养温度下(30℃,34℃,37℃,42℃)的温度敏感性测试。结果显示,不含质粒的野生型菌株(SCU11-Wt)在 30℃ 和 42℃ 条件下均可以正常生长;SCU11-pUCETs 菌株在 30℃ 和 34℃ 条件下生长状况良好;37℃ 时平板上菌落数目未明显减少,但菌落形态和大出现不均一性,表明生长受到部分抑制,质粒开始部分丢失;在 42℃ 时无菌落长出,即该温度下 pUCETs 不能自主复制,表明 pUCETs 在 SCU11 内是温度敏感的,可用作 SCU11 潜在的遗传操作载体,42℃ 可作为重组子的筛选温度。

3.3 pUCETs 载体系统的应用

本实验室前期研究表明 Peptidase C40 是短小芽孢杆菌胞外蛋白质组中分泌量最高的蛋白且功能未知^[12],因此本实验选取 *peptidase C40* 作为靶基因,一方面验证利用 pUCETs 载体系统对短小芽孢杆菌进行基因敲除的可行性,另一方面也考察敲除该基因是否会对菌株蛋白酶产量产生影响,探索短小芽孢杆菌基因组简化的可行性。

3.3.1 敲除载体 pUCETs Δ C40 的构建 PCR 扩增得到 C40-flankA 和 C40-flankB 以及 Kan 基因,通过重叠 PCR 构建融合 DNA 片段 C40-flankA-Kan-C40-flankB,双酶切后与载体 pUCETs 连接,转化 *E. coli* JM109(见材料与方法)。挑取阳性转化子提取质粒并进行酶切鉴定,结果显示酶切片段大小与预期一致(图 4A),进一步经测序验证表明插入的 DNA 序列正确,敲除载体 pUCETs Δ C40 构建成功。

3.3.2 pUCETs Δ C40 转化短小芽孢杆菌及基因敲除重组子筛选 将构建的重组质粒 pUCETs Δ C40 采用高渗透压电转化法转化 SCU11,转化后涂布于 5 μ g/mL 红霉素的 LB 平板上筛选转化子。挑取转化子菌落进行 PCR 验证。电泳结果与预期的 DNA 片段大小一致(图 4B),表明质粒

pUCETs Δ C40 成功转入 SCU11,将该菌株命名为 SCU11-pUCETs Δ C40。

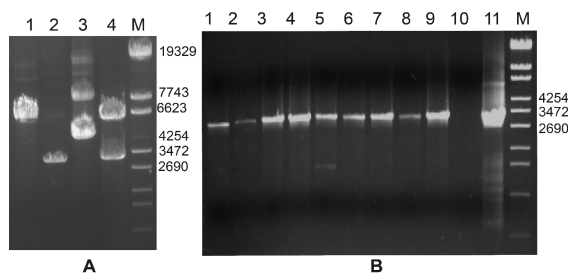


图 4 pUCETs Δ C40 质粒酶切验证(A)及 SCU11-pUCETs Δ C40 转化子的 PCR 验证(B)

Fig. 4 Plasmid pUCETs Δ C40 enzyme digestion (A) and SCU11-pUCETs Δ C40 PCR verification (B)

(A) M: λ -EcoT14 I DNA marker; 1: pUCETs 双酶切 *Pst* I / *Kpn* I; 2: C40-flankA-kan-C40-flankB 双酶切 (*Pst* I / *Kpn* I); 3: pUCETs Δ C40 质粒; 4: pUCETs Δ C40 质粒双酶切 (*Pst* I / *Kpn* I) (B) M: λ -EcoT14 I DNA marker; 1-9: SCU11-pUCETs Δ C40 转化子菌液 PCR; 10: SCU11 菌液 PCR; 11 质粒 pUCETs Δ C40 PCR.

进一步从 SCU11-pUCETs Δ C40 菌株中筛选染色体上 C40 基因被敲除的重组子。将 SCU11-pUCETs Δ C40 菌株分别进行卡那霉素和红霉素的平板筛选,挑选只在卡那霉素平板上生长而不在红霉素平板上生长的转化子,进行 PCR 验证。共选取 30 个转化子进行验证,其中 1 个菌落(命名为 SCU11(Δ C40))经 3 对 PCR 引物(C40-screenF/kan-R、kan-F/ C40-screenR、C40-screenF/ C40-screenR,图 1)进行扩增均得到 C40 基因敲除重组子预期大小的条带(图 5A,1-6 道),但用同源臂外侧引物对进行 PCR 扩增时,得到野生型和敲除型两种条带(图 5A,7 道),说明挑选的转化子可能不纯,含有野生型菌落。进一步将 SCU11(Δ C40)重新纯化筛选后进行 PCR 验证,使用同源臂外侧的引物 C40-screenF/ C40-screenR 进行扩增时,得到预期的条带(图 5B,1 道)。进一步将这个扩增片段进行全长测序,结果表明 SCU11 基因组中 C40 基因被 *kan* 基因取代,C40 基因敲除成功。

3.3.3 SCU11(Δ C40)表型初步验证 Peptidase C40 是短小芽孢杆菌 SCU11 在生长的后指数期分泌量最高的胞外蛋白^[12],为了检测该基因的敲除是否影响菌株的生长及碱性蛋白酶的产生,对基因敲除突变株的酶活进行了测定。结果表明突变菌株 SCU11(Δ C40)发酵液的蛋白酶酶活与野生型 SCU11-Wt 相比无明显差异(图 6),证明 *peptidase C40* 为短小芽孢杆菌生长及蛋白酶产生过程的非必需基因,其他表型效应还在进一步验证中。

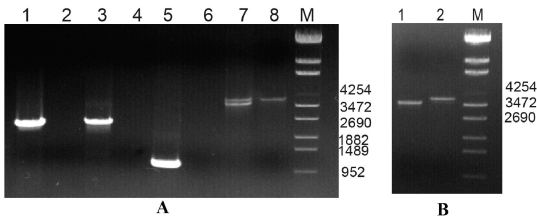


图 5 *B. pumilus* SCU11(Δ C40)PCR 验证

Fig. 5 PCR verification of *B. pumilus* SCU11(Δ C40) (A) M: λ -EcoT14 I DNA marker; 1, 3, 5, 7 PCR 模板为 SCU11(Δ C40)基因组; 2, 4, 6, 8 PCR 模板为对照 SCU11-Wt 基因组; 1, 2 引物为: C40-screenF/Kan-R; 3, 4 引物 Kan-F/C40-screenR; 5, 6 引物为 Kan-F/R; 7, 8 引物为 C40-screenF/R; (B) M: λ -EcoT14 I DNA marker; 1: PCR 模板为 SCU11(Δ C40)基因组; 2: PCR 模板为 SCU11-Wt 基因组; PCR primer C40-screenF/R.

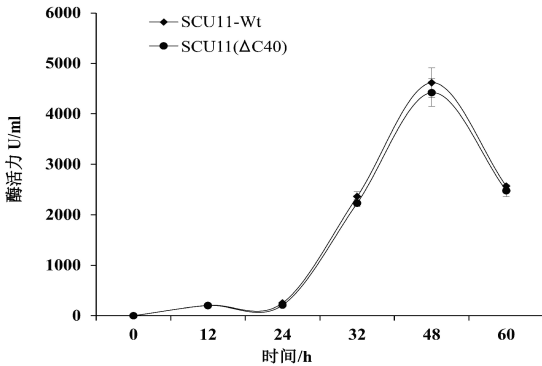


图 6 SCU11(Δ C40)蛋白酶活力测定

Fig. 6 The protease activity of SCU11(Δ C40)

4 讨论

使用传统的电转化法,革兰氏阳性菌电转化时电场强度一般低于 12.5 kV/cm ^[13]。如果提高电转缓冲液的渗透压,则可以采用较高的电击强度,使转化效率大幅提高。本实验优化的短小芽孢杆菌 SCU11 最佳电击场强为 24 kV/cm ,是目前已知芽孢杆菌中电击场强最高的。此外,短小芽孢杆菌电转化时所需的渗透压也较高,当甘露醇浓度为 1 M 时,转化效率最大,此浓度比枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌转化时 E-buffer 中甘露醇浓度高一倍^[13]。这可能是由短小芽孢杆菌菌株的特性决定的,主要是对高电压的耐受性所引起的。

温度敏感性质粒在基因操作方面具有其独特的优势,其中主要一点是该方法对转化效率的要求很低。只要能获得一个转化子,就可通过扩大培养得到大量的细胞,从而提高筛选到发生同源重组的转化子的机率。本实验利用温度敏感性复制起点构建了 *E. coli*-*Bacillus* 穿梭载体 pUCETs,以此载体为平台成功对短小芽孢杆菌 SCU11 的 C40 基因进行了敲除,证明 pUCETs 是一个高效的能对短小芽孢杆菌进行遗传操作的载体平台。

综上所述,本研究将高渗透压电转化法和基于 pUCETs 的基因操作系统相结合,建立了短小芽孢杆菌的基因操作体系,实现了对菌株的遗传改造,为后续开展短小芽孢杆菌基因功能及调控机理研究以及菌株基因工程改造等奠定了基础。

参考文献:

- [1] 于士强, 桂俊鸿, 王海燕. 短小芽孢杆菌胞外蛋白质组双向电泳分析及碱性胁迫下胞外差异蛋白鉴定[J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20: 217.
- [2] Huang Q, Peng Y, Li X, *et al.* Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*[J]. *Curr Microbiol*, 2003, 46: 0169.
- [3] 黄蓉, 冯红. 脱毛碱性蛋白酶 (DHAP) 的饱和突变[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2015, 52: 1177.
- [4] Wang H Y, Liu D M, Liu Y, *et al.* Screening and mutagenesis of a novel *Bacillus pumilus* strain producing alkaline protease for dehairing[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2007, 44: 1.
- [5] 尹萌萌, 贺婷婷, 王超, 等. 响应面法优化短小芽孢杆菌 SCU11 发酵产碱性蛋白酶及关键基因转录调控分析[J]. 应用与环境生物学报, 2016, 3: 371.
- [6] Borgmeier C, Bongaerts J, Meinhardt F. Genetic analysis of the *Bacillus licheniformis* degSU operon and the impact of regulatory mutations on protease production[J]. *J Biotechnol*, 2012, 159: 12.
- [7] 姬杨, 冯红. 短小芽孢杆菌 BA06 产表面活性素培养基组分的优化[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2016, 53: 037.
- [8] 刘成君, 黄庆. 大肠杆菌-枯草杆菌穿梭质粒载体 pSUGV4 的构建[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2001, 38: 243.
- [9] 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南: 上册[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [10] 须凤高. SB/T 10317-1999, 蛋白酶活力测定法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.
- [11] Meddeb-Mouelhi F, Dulcey C, Beaugard M. High transformation efficiency of *Bacillus subtilis* with integrative DNA using glycine betaine as osmoprotectant[J]. *Anal Biochem*, 2012, 424: 127.
- [12] Wang C, Yu S, Song T, *et al.* Extracellular Proteome Profiling of *Bacillus pumilus* SCU11 Producing Alkaline Protease for Dehairing s [J]. *J Microbiol Biotech*, 2016, 26: 1993.
- [13] 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]. *J Microbiol Methods*, 1999, 34: 183.