

海洋红酵母电转化条件的研究

刘秀莲, 王宇光*, 雷禄旺

(中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 中国海南 海口 571101)

摘要: 采用电穿孔的方法对海洋红酵母进行外源 DNA 的转化. 通过调整参数, 对影响电转化的主要因素进行探索, 初步建立了载体 pTEF1/Zeo-rDNA 对海洋红酵母的高效电转化方法. 结果表明, 当采用对数生长中期的菌体制备感受态细胞、电压为 900 V、质粒浓度为 20 mg/L 和 0.2 cm 电转化杯时, 转化率达到最大值, 为每微克质粒 DNA 52 个转化子. 经抽样鉴定所得到的转化子均为阳性克隆. 首次建立了以海洋红酵母为宿主的高效电转化体系, 为外源基因在海洋红酵母中的表达奠定了基础.

关键词: 海洋红酵母; 高效电转化; 转化率

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2008)02-0136-05

The Study of Conditions of Electroporation in *Rhodotorula benthica*

LIU Xiu-lian, WANG Yu-guang*, LEI Lu-wang

(The Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, 571101, Hainan, China)

Abstract: Electroporation, a highly efficient and easy-applying technique, is used to introduce vector pTEF1/Zeo-rDNA into *Rhodotorula benthica* in this work. The optimal electroporated stage for *Rhodotorula benthica* was at intermediate logarithmic phase. Under the conditions of voltage of 900 V and 20 mg/L plasmid DNA and 0.2 cm cuvettes, the transformation efficiency reach its maximum at 52 transformants/μg plasmid DNA. The results showed that all of the transformants were positive clones. The experiments provided a model for highly efficient electroporation of *Rhodotorula benthica* as host cells for the first time. The research established a basis of studying biological properties of *Rhodotorula benthica* and its further development of genetic engineering products.

Key words: *Rhodotorula benthica*; electroporation; transformation efficiency

(Life Science Research, 2008, 12(2) : 136~140)

海洋红酵母 *Rhodotorula benthica* 是海洋中自然存在的一种单细胞酵母品系, 富含氨基酸、维生素和以虾青素为主的类胡萝卜素等多种营养物质, 具有很大的应用潜力^[1]. 目前, 国内外关于海洋红酵母的研究工作还主要集中在对其培养条

件及发酵工艺的优化方面, 而对其遗传修饰方面的研究比较少. 建立海洋红酵母的高效转化系统对深入地研究其分子生物学具有重要意义.

转化是酵母基因操作技术的重要前提, 高效的酵母转化体系是实现外源基因表达的关键之

收稿日期: 2008-01-02; 修回日期: 2008-03-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30560117)

作者简介: 刘秀莲 (1983), 女, 福建龙岩人, 硕士研究生, 主要从事酵母基因工程研究, Tel: 0898-66892992, E-mail: lxl507@163.com; 王宇光 (1966), 男, 海南乐东人, 热带生物技术研究所研究员, 硕士生导师, 通讯作者, 主要从事生物工程的研究, Tel: 0898-66892992, E-mail: wygh28@263.net

China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

一,也是深入研究酵母遗传资源和进行途径工程改造的基础^[2].电击转化法以其高转化率,操作方便等优点越来越受到重视,已被广泛用于酵母细胞外源基因导入^[3-4].作者在构建能抑杀有害微生物的红酵母工程菌过程中,以海洋红酵母为宿主,通过摸索,建立了适用于海洋红酵母的电转化条件,得到了较好的结果.相关研究目前国内外尚未见报道.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

海洋红酵母菌为本实验室筛选并保存;酵母表达质粒 pTEF1/Zeo 为 Invitrogen 公司产品;含有 26S rDNA 基因(海洋红酵母同源重组序列)的重组质粒 pTEF1/Zeo-rDNA 为作者构建.

1.1.2 酶和试剂

限制性内切酶、TaqDNA 聚合酶购自 Fermentas 公司;DNA 凝胶回收试剂盒和 DL2000 DNA Marker 购自博大泰克公司;1 kb DNA Marker 和 100 bp DNA Marker 购自 NEB 公司;Zeocin 购自 Invitrogen 公司;其他化学试剂均为国产或进口分析纯.

1.1.3 培养基

YPD 培养基:1%酵母粉、2%蛋白胨、2%葡萄糖;YPDS 抗性筛选平板:1%酵母粉、2%蛋白胨、2%葡萄糖、1 mol/L 山梨醇、200 mg/L Zeocin、2%琼脂.

1.1.4 仪器

电转仪:BIORAD 公司生产的 MicroPulser.

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pTEF1/Zeo-rDNA 的线性化

将质粒 pTEF1/Zeo-rDNA 用 Apa I/Nar I 酶切线性化,并用 DNA 凝胶回收试剂盒回收含 pTEF1、EM7、Zeocin、CYC1 TT 等基因的 2 949 bp 片段.用紫外分光光度对回收的质粒 DNA 样品进行定量.然后,进行 1%琼脂糖凝胶电泳,以确定纯化回收片段的正确性,同时进一步确认样品质粒的含量,样品于-20℃ 贮存备用.

1.2.2 海洋红酵母对抗生素 Zeocin 的敏感性测验

挑取一个分纯后的海洋红酵母单菌落,接入装有 50 mL YPD 培养基的 250 mL 三角瓶,200 r/min,28℃ 培养过夜后,取 50 μL 过夜菌液分别涂布在不同 pH 值(6.0、7.0、8.0)和不同

Zeocin 浓度(100、200、300、400、500 mg/L)组合的 YPD 培养基平板上,即得到 15 个平板.平板在 28℃ 条件下培养 2 周,记录完全抑制海洋红酵母菌株生长的最低 Zeocin 浓度及 pH 值.

1.2.3 海洋红酵母生长曲线的测定

挑取两个分纯后的海洋红酵母单菌落,分别接入两瓶装有 50 mL YPD 培养基的 250 mL 三角瓶,200 r/min,28℃ 培养.每隔 1 h 或 2 h(生长前期间隔 2 h,中后期为 1 h)取样,测定菌液 OD₆₀₀ 值.取两 OD₆₀₀ 的平均值,绘制 OD₆₀₀ 值/时间曲线,即海洋红酵母的生长曲线.

1.2.4 感受态细胞的制备

按照 Invitrogen 公司 ZeoCassette Vectors 产品说明书的方法制备感受态细胞.

1.2.5 质粒 pTEF1/Zeo-rDNA 的电转化

将线性化的含 pTEF1、EM7、Zeocin、CYC1 TT 基因的 DNA 片段加入到 100 μL 感受态细胞中,轻柔混匀.冰浴 5 min 后移入冰冷的电转化杯中.电转化仪经预热后,设定参数,按照说明书进行电转化操作.电击结束后,迅速加入 1 mL 冰冷的 1 mol/L 山梨醇缓冲液,28℃ 静置复苏 1~2 h.取 100 μL 菌液涂布 YPDS 抗性筛选平板.平板在 28℃ 下培养 3~4 d 至有转化子出现.

电转化同时设立阴性对照,阴性对照除不加质粒 DNA 外,其余过程与其它处理完全相同.在筛选培养基上阴性对照没有菌落生长的情况下,统计转化子数,计算转化效率.

1.2.6 阳性转化子的验证

基因组 DNA 的提取参照文献^[5].根据 Zeocin 抗性基因 Sh ble 序列设计引物,ble5(5'-ATGGCCAAGTTGCCAGTGCCGTTTC-3')和 ble-3(5'-GTCAGTCTGCTCCTCGGCCACGAAG-3').分别以转化子和野生型(即未转化)菌株基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增.PCR 扩增条件为 95℃ 4 min;94℃ 30 s,52℃ 30 s,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 8 min.1.5% 质量分数)琼脂糖凝胶电泳检测 Zeocin 抗性基因是否插入海洋红酵母基因组中.引物由上海生工生物工程技术有限公司合成.

1.2.7 电转化效果的评价

本实验中采用转化效率作为转化效果的评价参数.转化效率(efficiency of transformants),即每微克外源 DNA 所能产生的转化子数,转化效率=转化子数/加入的质粒 DNA 量(μg)×稀释

倍数. 每个条件水平作 3 个平行.

2 结果

2.1 质粒 pTEF1/Zeo-rDNA 的线性化

本实验室所构建的载体 pTEF1/Zeo-rDNA 见图 1 所示.

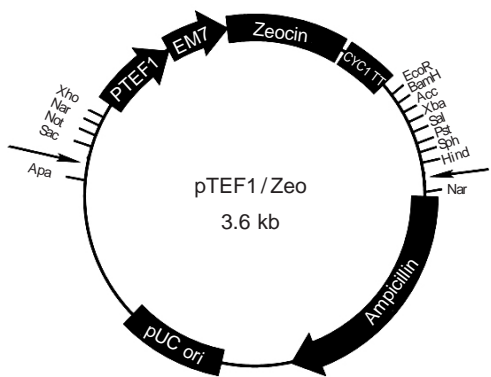


图 1 重组载体 pTEF1/Zeo-rDNA 结构示意图、 处分别以 Apa /Sac , Hind /Nar 把 26SrDNA (762 bp) 定向克隆到载体 PTEF1/Zeo 中.

Fig.1 Schematic map of pTEF1/Zeo-rDNA The 26SrDNA gene was separately cloned into the , site of vector pTEF1/Zeo-rDNA by Apa /Sac and Hind /Nar .

研究表明, 如果用来进行转化的外源 DNA 为能够自主复制的质粒, 采用超螺旋质粒进行实验有利于提高转化率. 反之, 如果转化的是整合型质粒, 则线性化处理有利于转化效率的提高^[6,7]. 实验中所构建的 pTEF1/Zeo-rDNA 为整合型质粒, 因此采用 Apa I/Nar I 双酶切对质粒进行线性化(图 2).

2.2 海洋红酵母对抗生素 Zeocin 的敏感性

在转化试验前应考查受体菌对抗生素的最低抑制浓度, 在低抗生素浓度下选择转化子, 再转到较高浓度的抗生素平板上, 确保转化子的可靠性.

据相关资料^[8]显示, 酵母菌对 Zeocin 的敏感性决定于培养基的 pH 值和离子浓度. 因此, 我们通过试验海洋红酵母在不同的 pH 值和 Zeocin 浓度下的敏感性, 定性的决定该菌对 Zeocin 的敏感性. 结果我们发现, 当 YPD 培养基的 pH 为 7.0, Zeocin 浓度为 200 mg/L 时可以完全抑制海洋红酵母菌株的生长. 当 pH 为 6.0 时则需要更高浓度的 Zeocin (300 mg/L) 才能完全抑制菌株的生长. 而当 pH 为 8.0 时 100 mg/L Zeocin 也能完全抑制海洋红酵母的生长. 这一结果与 Alex.JA 等人^[9]的实验结果有些不同.

在保持尽量低的抗生素浓度条件下我们采用中性环境即 pH 为 7.0、Zeocin 浓度为 200 mg/L 的培养基进行后续的转化子筛选实验.

2.3 海洋红酵母生长曲线的测定

进行海洋红酵母的电转化首先要严格控制菌体的生长状况. 测定宿主菌的生长曲线, 结果如图 3) 表明, 在 YPD 培养基、200 r/min、28 培养条件下, 海洋红酵母在 18~24 h 处于对数生长期, 其对应的 OD₆₀₀ 值为 0.7~2.7.

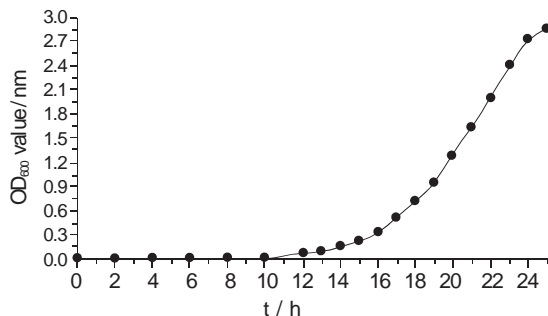


图 3 海洋红酵母的生长曲线 Fig.3 The curve of growth of Rhodotorula benthica

2.4 海洋红酵母细胞的不同生长状态对转化率的影响

在电压为 900 V、质粒 DNA 加入量 2 μg、电转杯 0.2 cm 条件下, 分别选用处于不同对数生长阶段 (OD₆₀₀ 值为 0.6~2.0) 的酵母细胞制备感受态进行电转化, 计算转化率. 结果表明(图 4), 用处于对数生长期的海洋红酵母进行电转化, 均有转化子出现, 但不同的生长阶段对转化率的影响

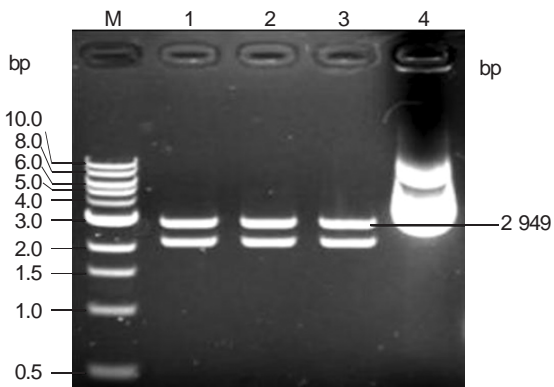


图 2 质粒 pTEF1/Zeo-rDNA 双酶切 M: 1 kb DNA Marker; 1~3: 酶切产物 (回收 2 949 bp 片段进行转化); 4: 未经酶切的质粒 pTEF1/Zeo-rDNA.

Fig.2 Double digestion of pTEF1/Zeo-rDNA M: 1 kb DNA Marker; 1~3: Apa I/Nar I digestion; 4: plasmid pTEF1/Zeo-rDNA of no digestion

响很大. 采用对数中期的酵母细胞 (OD_{600} 值为 1.2) 时转化效率最高, 达到每微克质粒 DNA 48 个转化子.

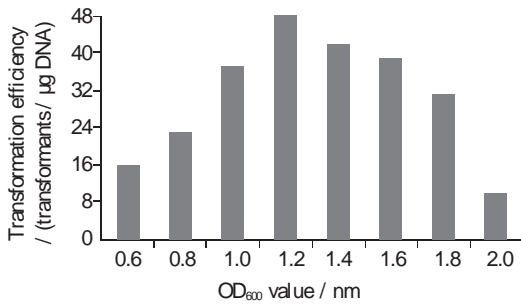


图 4 细胞生长时期对转化率的影响
Fig.4 The effect of cell stage on the Transformation efficiency

2.5 感受态细胞冻存时间对转化率的影响

用上述的电转化参数, 在最优 OD_{600} 值条件下制备感受态细胞, 分装后一部分放入 -70 保存. 采用新鲜制备和冻存时间分别为 1、2、3 周的感受态细胞进行实验. 结果显示, 感受态细胞 -70 冻存 1、2、3 周的转化效率分别为每微克质粒 DNA 16、11、7 个转化子, 都明显低于感受态细胞新鲜制备的转化效率, 为每微克质粒 DNA 45 个转化子.

2.6 质粒 DNA 浓度对转化率的影响

采用新鲜制备的感受态细胞, 在其他条件相同的情况下, 采用不同质粒 DNA 浓度 (1、5、10~50 mg/L) 对感受态细胞进行电转化, 结果如图 5 所示. 由实验结果可以看出, 当质粒 DNA 浓度不超过 20 mg/L 时, 电转化效率随着质粒 DNA 浓度的增加而提高, 当质粒 DNA 浓度超过 20 mg/L 时, 增加其浓度并不能有效地提高电转化效率. 此实验条件下电转化效率的最大值为每微克质粒 DNA 52 个转化子.

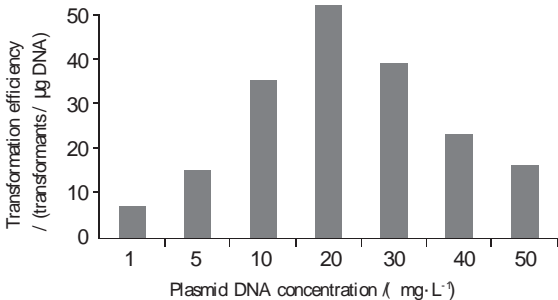


图 5 质粒 DNA 浓度对转化率的影响
Fig.5 The effect of concentration of plasmid DNA on the transformation efficiency

2.7 电场强度对转化率的影响

电场强度有 2 种控制方式: 1) 通过选择不同宽度的电转杯来改变电场强度. 本实验固定采用 0.2 cm 宽的电转杯; 2) 通过调节电转仪的作用电压, 同时保持其他作用条件不变. 实验中采用不同的电压 (300+800 V) 对感受态细胞进行电转化, 结果如图 6 所示. 在电转杯 0.2 cm 条件下, 电压为 900 V, 即电场强度为 4.5 kV/cm 时转化率达到最大值, 为每微克质粒 DNA 51 个转化子.

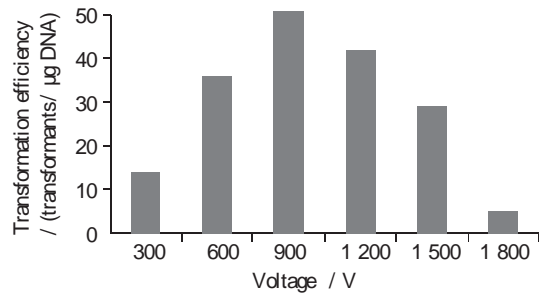


图 6 电压对转化率的影响
Fig.6 The effect of voltage on the transformation efficiency

2.8 转化子的鉴定

电转化后的平板培养 3~4 d 后, 除不加质粒 DNA 的阴性对照没有菌落出现外, 其余的抗性筛选平板上均长出了菌落.

从筛选平板上随机挑取 10 个转化子, 提取其基因组 DNA 用于 PCR 反应. 电泳鉴定结果见图 7. 阳性转化子基因组的 PCR 产物中有长为 375 bp 的 Zeocin 抗性基因中的 *Sh ble* 特异条带, 而对照野生型 (未转化的) 菌株的则无此带, 表明含有 Zeocin 抗性基因的外源 DNA 已成功整合到海洋红酵母基因组中.

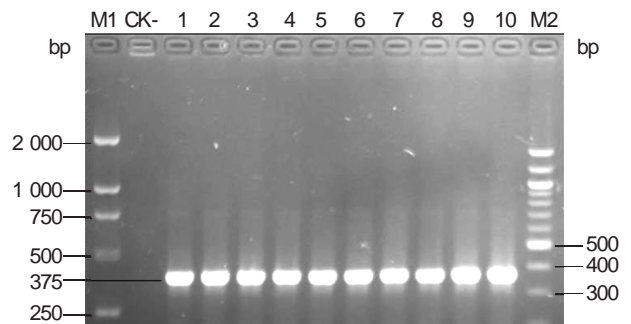


图 7 转化子基因组 DNA 的 PCR 鉴定
M1: DL2000 Marker; CK-: PCR 模板为野生型菌株基因组 DNA; 1~10: PCR 模板为转化子基因组 DNA; M2: 100 bp Marker.
Fig.7 The PCR result of transformation
M1: DL2000 Marker; CK-: Negative control; 1~10: Transformants PCR; M2: 100 bp Marker

PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶电泳中分离后,用胶回收试剂盒回收纯化 375 bp 片段,送至上海生工生物工程技术有限公司进行测序分析. 测序结果经过 clustalx1.81 比对显示序列与预定序列一致,说明外源 DNA 已成功地整合到海洋红酵母基因组中.

3 讨论

应用电穿孔技术对海洋红酵母进行外源 DNA 的转化受诸多因素的影响,主要是:

1) 细胞生长状态:处于对数生长中期的酵母细胞生长旺盛,细胞壁结构较稳定,细胞的细胞壁结构疏松,是最适于进行电转化的生长阶段^[9].因此,海洋红酵母的电转化以培养到对数中期(OD_{600} 值为 1.2~1.4)为宜.

2) 感受态细胞冻存时间:实验表明,感受态细胞经 -70℃ 冻存后的转化效率明显低于新鲜制备的转化效率,且冻存时间越长,转化效率越低,可能是冻存后细胞活性降低、死亡率增加而使其转化率降低.

3) 质粒 DNA 浓度:实验中质粒 DNA 浓度为 20 mg/L 时转化效率最高. DNA 浓度过低或过高时转化效率都有所下降.原因可能是当质粒 DNA 浓度过低时, DNA 分子太少不足以产生高转化效率^[10];而浓度过高也不利于转化的相关原因目前尚不清楚,是否高浓度的质粒 DNA 影响了细胞表面的电位变化或是封闭了 DNA 进入的通道还有待进一步研究.

4) 电压:实验中电压是实现电击转化的重要参数.从实验中我们发现,固定电转化杯宽度,转化率先随着电压的增加而提高,当电压为 900 V 时转化率最大,但电压继续增加转化率反而下降.据相关资料^[11]表明,电穿孔作用是通过触发细胞膜的电通透性增大,形成电致孔洞,从而使 DNA 等多种生物大分子进出细胞.在电击过程中,电压偏低,细胞不宜极化产生微孔通道,质粒 DNA 不能进入细胞,无法完成转化;而电压过高,会导致大部分细胞因孔洞形成较大,不易复原而死亡,从而降低了酵母细胞的存活率,也影响了转化率.

本研究是将初步构建的含 26S rDNA 同源重组序列的重组载体,通过电穿孔技术转入到海洋红酵母基因组内.外源基因在海洋红酵母中的转化在国内还未见报道.转化实验成功后,下一阶

段我们将在原载体基础上继续引进抗菌肽 CMIV 基因和酵母 α -Factor 信号肽基因,构建分泌型表达载体,转化海洋红酵母受体菌,构建能表达和分泌外源基因产物(如能抑杀病原菌微生物的抗菌肽 CMIV、乳菌肽和溶菌酶等)的海洋红酵母工程菌,从而作为一种益生菌应用于水产养殖,这对于解决当前水产养殖业面临的抗生素等药物残留超标问题具有重要的现实意义.

参考文献(References):

- [1] JOHN A B, TIMOTHY D L, RADHESHYAM K J. Isolation of Astaxanthin-overproducing mutants of *phaffiarhodoczyma*[J]. *Biotechnology Letters*, 1997, 19(2): 109-112.
- [2] 张永光,陈献忠,饶志明,等.产甘油假丝酵母两种转化方法的比较[J].食品与生物技术学报 ZHANG Yong-guang, CHEN Xian-zhong, RAO Zhi-ming, et al. Comparison of two transformation methods for *candida glycerinogenes*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007, 26(3): 70-74.
- [3] HASHIMOTO H, MORIJAWA H, YAMATA Y, et al. A novel method for transformation of intact yeast cells by electroinjection of plasmid DNA[J]. *Applied Microbiol Biotechnol*, 1985, 2: 336-339.
- [4] BECHER D M, GUARENTE L. High-efficiency transformation of yeast by electroporation[J]. *Methods Enzymol*, 1991, 194: 182-187.
- [5] BURKE D, DAWSON D, STEARNS T. *Methods in Yeast Genetics. A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.
- [6] 孙亚范,王海宽,杜连祥,等.黄孢原毛平革菌木质素过氧化物酶基因 cDNA 的克隆及在甲醇赤毕酵母中的表达[J].工业微生物 SUN Ya-fan, WANG Hai-kuan, DU Lian-xiang, et al. Overexpression of *phanerochaete chrysosporium* lignin peroxidase lipH 8 gene in *Pichia methanica*[J]. *Industrial Microbiology*, 2005, 35(1): 10-15.
- [7] 张学炜,王笑梅,李明春,等.以潮霉素 B 抗性为选择标记的深黄被孢霉原生质体转化[J].生物工程学报 ZHANG Xue-wei, WANG Xiao-mei, LI Ming-chun, et al. Protoplast transformation of *mortierella isabellina* with hygromycin B resistance plasmid PD4[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, 23(3): 462-466.
- [8] ALEX J A, LAN B, FRITZ A, et al. Zeocin resistance as a dominant selective marker for transformation and targeted gene deletions in *candida glabrata*[J]. *Mycoses*, 2006, 49: 445-451.
- [9] HICKS J B, HINNEN A, FINK G P. *Properties of Yeast Transformation*, Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1978.
- [10] 秦玉静,金建玲,鲍晓明,等.影响酿酒酵母电击转化率的条件[J].山东大学学报(理学版)(QIN Yu-jing, JIN Jian-ling, BAO Xiao-ming, et al. Transformation of *scerevisiae* by electroporation[J]. *Journal of Shandong University(Natural Sciences)*, 1999, 34(2): 236-240.
- [11] MEIHOC E, MASSON J M, TEISSIE J. High efficiency transformation of intact yeast cells by electric field pulses[J]. *Biotechnol*, 1990, 8: 223-227.