

适于德氏乳杆菌保加利亚亚种质粒抽提的混合培养基

邬婧媛¹ 许勇军¹ 刘水平²

1. 麓山国际实验学校, 湖南 长沙 410006 2. 中南大学基础医学院微生物学系

摘要: **目的** 探讨适合提取德氏乳杆菌保加利亚亚种质粒的细菌培养基。 **方法** 配制含不同比例 MRS 的营养肉汤混合培养基, 进行德氏乳杆菌保加利亚亚种的培养, 通过生长曲线测定、细菌形态观察, 菌体内天然质粒抽提质量等来确定适于该菌质粒抽提的最佳混合培养基。 **结果** 单纯营养肉汤培养基不适合德氏乳杆菌保加利亚亚种的增殖, 在含 20%、40%、60%及 80% MRS 的营养肉汤混合培养基中该菌的生长曲线与在 MRS 中的基本一致, 但细菌数略低; 形态学检测表明含 MRS 的营养肉汤培养基培养对德氏乳杆菌保加利亚亚种的形态无影响, 质粒抽提结果表明, 本研究所配制的几种含不同比例 MRS 的营养肉汤混合培养基中, 含 20% MRS 的营养肉汤混合培养基最适合该菌质粒的抽提, 提取的质粒浓度高, 质量好。 **结论** 本实验制备的混合培养基中, 含 20% MRS 的营养肉汤混合培养基能保证德氏乳杆菌保加利亚亚种的正常增殖, 而且可能由于产生较少的胞外多糖, 使溶菌酶更易水解该菌细胞壁肽聚糖, 最适于该菌质粒的抽提。

关键词: 德氏乳杆菌; 保加利亚乳杆菌; 质粒; 细菌培养

Mixed medium suitable for the extraction of plasmid from *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*

Wu Jing-yuan¹ Xu Yong-jun¹ Liu Shui-ping²

1: Lushan International Experimental School, Changsha, Hunan 410006, China

Abstract: Objective To investigate the optimal mixed medium for the extraction of plasmid from *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*. **Methods** Nutrient broth media containing different ratios of MRS were prepared, and optimal mixed medium for the extraction of plasmid from *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* was determined by means of bacterial growth curve determination, bacterial morphology, and the concentration and quality of the natural plasmid

邬婧媛 (1997-): 女, 麓山国际实验学校 G1207 班学生。

通讯作者: 刘水平, 湖南人, 副教授, 硕士生导师, E-mail: spliu@mail.csu.edu.cn

Corresponding author: Liu Shui-ping, E-mail: spliu@mail.csu.edu.cn

extracted from this bacterium. **Results** Nutrient broth alone is not suitable for the proliferation of *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, but the growth curves of this bacteria cultured in nutrient broth containing 20%, 40%, 60% and 80% MRS were consistent with the bacterial growth curve in MRS, the number of bacteria in nutrient broth containing MRS is slightly lower than that of in MRS alone, but the difference among them had no significance. Morphological analysis showed that the bacteria cultured in nutrient broth containing MRS had no effect on the morphous of *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, and the results of plasmid extraction showed that among the mixed medium prepared in this study, plasmid with high yield and purity can be extracted from bacteria cultured in nutrient broth containing 20% MRS. **Conclusions** *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* can proliferate normally in nutrient broth containing 20% MRS and peptidoglycan in cell wall of this bacteria cultured in this mixed medium can be easily hydrolyzed by lysozyme due to less production of extracellular polysaccharide, so this mixed medium is very suitable for the plasmid extraction from this bacteria.

Key words: *Lactobacillus delbrueckii*; *lacbobacillus bulgaricus*; plasmid; bacterial culture

德氏乳杆菌保加利亚亚种是一种广泛应用于发酵食品特别是发酵乳制品的益生菌，在食品发酵、工业乳酸发酵、饲料行业具有广泛的应用。由于德氏乳杆菌保加利亚亚种代谢过程中能产生非乳酸的具有抗菌活性的物质⁽¹⁾，该菌及其相关制剂已经在临床得到了应用^(2, 3)。对德氏乳杆菌保加利亚亚种经过定向诱变、基因改造或质粒修饰以制备针对不同疾病治疗的功能性益生菌制剂在临床上将具有极广泛的应用前景⁽⁴⁻⁶⁾，但在对乳酸菌进行基因改造、质粒修饰等分子操作过程中，对细菌质粒的质量和浓度具有较

高的要求。目前 MRS 培养基是培养德氏乳杆菌保加利亚亚种的理想培养基，但德氏乳杆菌保加利亚亚种在该培养基中产生大量的胞外多糖，导致质粒抽提困难，对后续操作具有较大的影响。本文将对德氏乳杆菌保加利亚亚种进行培养条件的探索，以期改变该菌生存或代谢状态，有利于抽提出高质量的质粒用于后续研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 德氏乳杆菌保加利亚亚种：由湖南农业食品微生物实验室提供，置-80℃超低温冰箱保存；

1.1.2 主要试剂及仪器 MRS 液体及 MRS 琼脂培养基（广东环凯微生物科技有限公司）；营养肉汤（杭州微生物试剂有限公司）；雷磁 PHSJ-5 型 pH 计（上海仪电科学仪器股份有限公司）；革兰染色液：杭州天和微生物试剂有限公司；溶菌酶：Amresco。其它化学试剂：进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 厌氧培养 采用焦性没食子酸法，将接种有德氏乳杆菌保加利亚亚种的平板或试管置直径为 30 cm 的干燥器中，并放入加有 1.5g 焦性没食子酸的 9 cm 平板盖，在焦性没食子酸中加入 10 ml 10% NaOH，迅速盖严干燥器盖，将干燥器连同待培养物一起置 37℃培养箱培养。

1.2.2 德氏乳杆菌保加利亚亚种的复苏 自-80℃冰箱中取出保存的菌种，划线接种于 MRS 平板，厌氧培养 24 小时后，挑取单个菌落接种于 MRS 液体培养基中，厌氧培养 24 小时，液体 MRS 中连续传代两次以使该菌达到最佳状态。

1.2.3 德氏乳杆菌保加利亚亚种的计数 德氏乳杆菌保加利亚亚种 MRS 液体培养物用 MRS 培养基进行适当稀释，取稀释菌液 100 μl 置于 MRS 平板上，迅速用三角涂布棒充分铺开，将平板正置于工作台上静置 10 分钟左右待菌液完全被平板吸收后再将平板倒置，于 37℃培养箱厌氧培养。培养 24 h 后取出平板，计数平板上的菌落数（记为 N），按下述公式计算培养物中德氏乳杆菌保加利亚亚种的细菌数。

细菌数（CFU/ml）=N/0.1×稀释倍数=10×N×稀释倍数

1.2.4 pH 值测定 配制含 20%、40%、60%、80% MRS 的 MRS 营养肉汤混合培养基，以 pH 电极法测定不同配比混合培养基的 pH 值。

1.2.5 不同配比 MRS/营养肉汤混合培养基中德氏乳杆菌保加利亚亚种生长曲线的测定 按上述 4 的方法配制不同配比的 MRS 营养肉汤混合培养基，混匀后，接种入德氏乳杆菌保加利亚亚种（接种菌量 10^3 CFU），并置厌氧培养，每隔 2 h 取出 100 μ L 培养基，适当稀释后铺 MRS 平板进行菌落计数，以培养时间为横坐标，细菌数的对数为纵坐标，绘制该菌在不同配比 MRS 营养肉汤混合培养基中的生长曲线。

1.2.6 不同配比 MRS/营养肉汤中培养的德氏乳杆菌保加利亚亚种形态观察 将德氏乳杆菌保加利亚亚种培养于含不同比例 MRS 营养肉汤混合培养基中，厌氧培养 24 h 后，于每管中取 100 μ L 培养物，以 0.1mol/L PBS(pH7.2)洗涤两次后涂片，并对涂片革兰染色后进行形态观察。

1.2.7 不同配比 MRS/营养肉汤中培养的德氏乳杆菌保加利亚亚种质粒抽提 按文献⁽⁷⁾方法进行该菌天然质粒抽提，最后加入 25 μ L 1 \times TE(pH 8.0)溶解 DNA 沉淀，取 5 μ L 质粒溶液进行 1%凝胶电泳检测，另外，所提取的质粒用 1 \times TE(pH 8.0)适当稀释后进行浓度及 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值测定。

1.2.8 统计学处理 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多个样本均数比较采用单因素方差分析， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。统计学处理使用简明统计软件 14.0 进行。

2 结 果

2.1 不同配比 MRS/营养肉汤混合培养基 pH 值测定 按方法中的描述配制不同比例的 MRS 营养肉汤混合培养基，以 pH 电极法测定混合培养基的 pH 值，结果如表 1。

表 1 不同配比 MRS/营养肉汤混合培养基的 pH 值 (n=4)

编号	1	2	3	4	5	6
MRS 比例 (%)	0	20	40	60	80	100
营养肉汤比例 (%)	100	80	60	40	20	0
pH 值	7.15 \pm 0.13	6.12 \pm 0.11	5.97 \pm 0.18	5.88 \pm 0.15	5.85 \pm 0.15	5.83 \pm 0.17

方差分析表明，不同配比的 MRS 营养肉汤培养基 pH 存在明显的差异 ($F=46.01$, $P<0.01$)，加入

MRS 后，混合培养基 pH 值均明显下降，使得混合培养基均呈酸性。

2.2 德氏乳杆菌保加利亚亚种在不同配比的 MRS/营养肉汤混合培养基中的生长曲线 将定量德氏乳杆菌保加利亚亚种接种于不同配比的 MRS/营养肉汤混合培养基中，置 37℃ 厌氧培养，每隔 2 小时取出 100 μL 培养物，适当稀释后铺 MRS 平板计数，以培养时间为横轴，细菌数的对数为纵轴绘制细菌的生长曲线，如图 1。

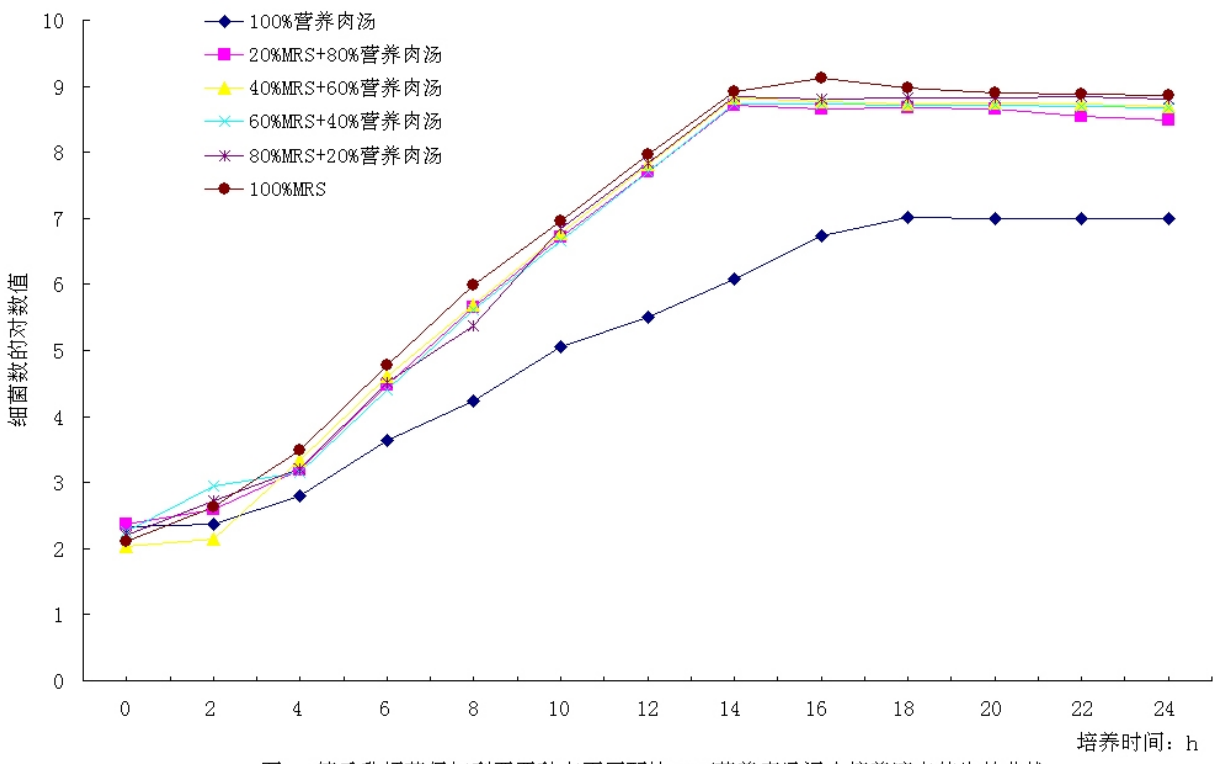


图1 德氏乳杆菌保加利亚亚种在不同配比MRS/营养肉汤混合培养液中的生长曲线

由图 1 可知，德氏乳杆菌保加利亚亚种在营养肉汤中增殖较在 MRS 中的增殖明显缓慢，达到平衡期的时间也略偏后于 MRS，培养 24h 后细菌数量较在 MRS 中培养低了约 2 个数量级，表明单纯营养肉汤培养基并不适合该菌的增殖；但在加了不同比例 MRS 的营养肉汤混合培养中，该菌的生长基本与在 MRS 中的一致，虽然细菌的数量略少，但差异很小。

2.3 不同配比 MRS/营养肉汤混合培养基中德氏乳杆菌保加利亚亚种形态观察 将德氏乳杆菌保加利亚亚种分别接种于营养肉汤培养基、含 20%-80% MRS 的营养肉汤混合培养基及 MRS 培养基中，厌氧培养 24 h 后，于各管取 100 μl 培养物，PBS 洗涤两次后涂片并对涂片进行革兰染色和显微镜观察，结果如图 3 所示。

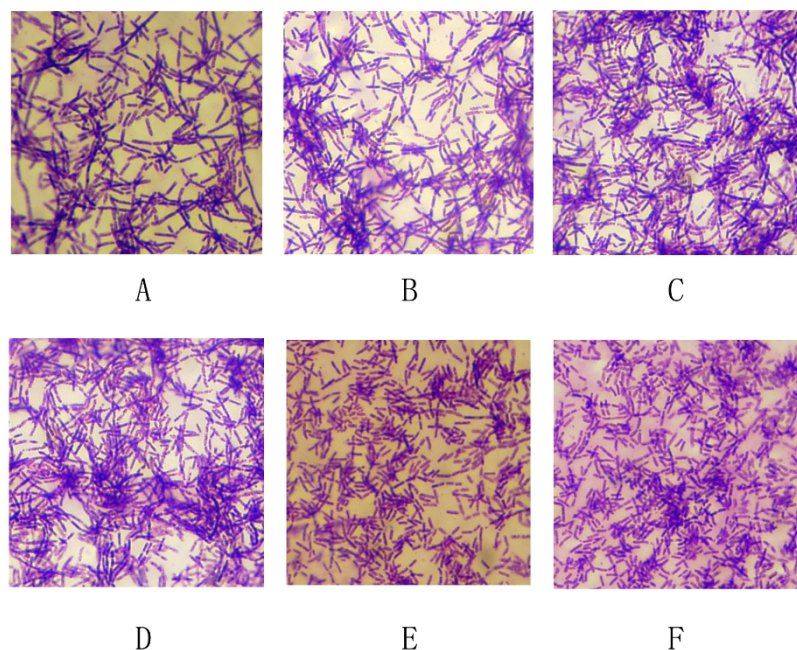


图 3 不同配比 MRS/营养肉汤混合培养基中德氏乳杆菌保加利亚亚种的革兰染色结果

注：A-F 分别为生长于营养肉汤、含 20%、40%、60%、80% MRS 的营养肉汤混合培养基及 MRS 培养基中德氏乳杆菌保加利亚亚种的形态。

结果表明在不同配比的 MRS/营养肉汤混合培养基中德氏乳杆菌保加利亚亚种均为革兰阳性杆菌，散在或短链状排列，表明混合培养基对该菌的形态无影响。

2.4 德氏乳杆菌保加利亚亚种天然质粒的抽提 将各管 24 h 培养物经 $10000\times g$ 离心后发现，培养于含 40%-80%MRS 的营养肉汤混合培养基及 MRS 培养基中的细菌虽能于管底形成沉淀，但沉淀物较松散，如果将经高速离心后的试管小心直立于试管架上，短时间后细菌沉淀即自行滑向管尖，表明即便经高速离心后，细菌之间及细菌与管壁之间的附着都并不紧密，这样将导致在去除上清液时很容易导致菌体的丢失；而在含 20% MRS 的营养肉汤培养基中，经高速离心后，细菌很好地沉淀于管壁，即使经过长时间的直立静置，细菌沉淀仍能较好地贴附于试管壁（图 2），可以十分方便地去除离心后的上清液而不损失菌体。

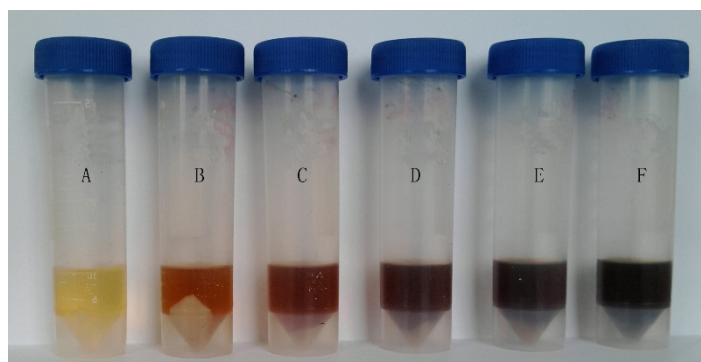


图2 混合培养基中德氏乳杆菌保加利亚亚种经高速离心后菌体的附着状态

注：A-F 分别为营养肉汤、含 20%、40%、60%、80% MRS 的营养肉汤混合培养基及 MRS

参照有关文献方法对培养在 MRS 及含 20% MRS 的营养肉汤混合培养基中的德氏乳杆菌保加利亚亚种进行了天然质粒的抽提，结果见图 4。

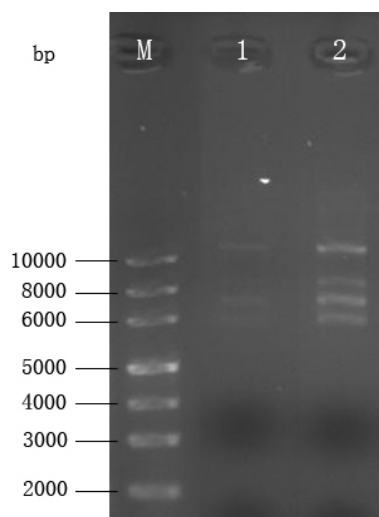


图4 德氏乳杆菌保加利亚亚种天然质粒的抽提

注：M: 1 kb DNA marker 1: MRS 培养基培养的德氏乳杆菌保加利亚亚种抽提的质粒

2: 20% MRS 与 80%营养肉汤混合培养基中培养的德氏乳杆菌保加利亚亚种抽提的质粒。

由图可见，培养在 MRS 培养基中的德氏乳杆菌保加利亚亚种虽然能抽提出质粒，但浓度很低，质粒纯度也不高 ($OD_{260}/OD_{280}=1.54$)，可能存在酚或蛋白质的污染，无法满足后续研究对质粒的要求，而培养在含 20% MRS 的营养肉汤混合培养基中的德氏乳杆菌保加利亚亚种抽提的质粒浓度明显要高，纯度也较高 ($OD_{260}/OD_{280}=1.82$)，适合进行进一步的分子操作。

3. 讨 论

随着细菌疗法的出现，以某些细菌作为治疗制剂用于相关疾病的治疗，近年来已成为相关学科的研究热点^(8, 9)。乳酸菌具有调节胃肠道健康、促进消化吸收、增加免疫功能、抗癌抗肿瘤等重要的生理功能，为最常用于乳制品及其他保健食品的益生菌之一，在食品发酵、饲料行业和医疗保健领域均有比较广泛的应用。作为广泛使用的益生菌，乳杆菌由于其代谢过程中产生大量乳酸及其它具抗菌活性的物质^(10, 11)，这些细菌中有的已经被开发成治疗制剂并应用于临床治疗，然而由于多方面的原因，这些细菌目前的临床应用开发仍较局限，相关制剂的临床应用范围也较窄，主要用于妇女阴道炎及腹泻特别是婴幼儿腹泻的治疗⁽¹²⁻¹⁴⁾。根据治疗对象的不同、疾病类型或发病机制的不一样，对益生菌进行基因改造，导入新的基因使之对相关疾病具有更好的或更特效的治疗效果，将是未来功能性治疗细菌发展的必然趋势^(5, 15, 16)，而通过对细菌质粒进行改造或修饰、插入新的功能基因而使目标菌表达新的性状是功能性治疗细菌制备最快捷的途径。由于德氏乳杆菌保加利亚亚种是目前应用最为广泛也是最古老的益生菌之一，对它的基因进行改造或修饰以使其适应不同疾病的治疗将会是今后开发的重点。然而，由于德氏乳杆菌保加利亚亚种的细胞壁较厚、质粒拷贝数少，导致其质粒抽提往往很难成功⁽¹⁷⁾。我们在工作中发现，将德氏乳杆菌保加利亚亚种培养在 MRS 培养基中，厌氧环境下培养 24 小时，经 $10000\times g$ 离心 15 分钟后菌体虽能形成沉淀，但沉淀物松散，在质粒抽提过程中轻微晃动试管都会造成细菌的重悬而导致上清液去除不干净，而且该菌生长在 MRS 培养基中往往呈现粘着状态，去除上清液的过程也容易导致菌体的丢失，而保留较多的菌体，则势必会残留多量的培养基，这会对质粒抽提的后续过程带来很大的影响。同时，在提取质粒的过程中，用溶菌酶处理细菌 30 分钟后，经革兰染色发现，培养于 MRS 培养基中的德氏乳杆菌保加利亚亚种大部分细菌仍然呈革兰阳性，表明细胞壁肽聚糖破坏不完全，而培养于含 20% MRS 的营养肉汤培养基中的德氏乳杆菌保加利亚亚种经 $10000\times g$ 离心 15 分钟后菌体紧紧贴附于试管底侧壁，几乎可以完全去除培养基上清而不损失菌体，而且经溶菌酶处理 30 min 后大部分菌体都呈革兰阴性，表明细菌细胞壁肽聚糖破坏较完全；而革兰阳性细菌质粒抽提的关键影响因素之一就是细菌细胞壁肽聚糖能否被破坏。造成这些现象的原因可能是该菌在 MRS 培养基生长过程中产生较多的胞外多糖，大量的胞外多糖覆盖在菌体表面阻止菌体紧密沉积，同时也阻止了溶菌酶对肽聚糖的水解作用，所以 MRS 培养基

虽然是培养德氏乳杆菌保加利亚亚种的理想培养基，但并不适合该菌质粒的抽提；而培养于含 20% MRS 的营养肉汤中的细菌可能由于产生较少的胞外多糖，所以离心时菌体易紧密粘附，同时由于缺少了胞外多糖的保护，溶菌酶能充分作用并水解细胞壁中的肽聚糖。本文利用在营养肉汤培养基中加入不同比例的 MRS，探讨该菌在混合培养基的生长特性，发现在营养肉汤培养基加入不同比例的 MRS 后，混合培养基的 pH 值均降至 6 左右。将德氏乳杆菌保加利亚亚种接种在此培养基中，通过对该菌在这些混合培养基的生长曲线的测定，表明该菌在 MRS 培养基中生长最好，在含 20%-80%MRS 的营养肉汤混合培养基中生长亦良好，虽然细菌数较培养于 MRS 中略低，但相差不大。迟缓期约为 2 小时左右，2 小时后进入对数生长期，16 小时左右进入稳定期，生长曲线基本相似；经革兰染色发现，用含不同配比 MRS 的营养肉汤混合培养基培养德氏乳杆菌保加利亚亚种对该菌的形态无影响。该菌在单纯营养肉汤培养基中也可以生长，但生长明显缓慢，细菌数也少，几乎只相当于 MRS 中的 1/100。而且我们在实验中发现，营养肉汤不适合该菌生长并不是因为该培养基呈弱碱性所致（ $\text{pH}=7.15\pm0.13$ ），因为我们用 HCL 调节营养肉汤 pH 值至 6.0，并测定目的菌在其中的生长曲线，发现即便培养基 pH 值达到该菌生长的合适范围，但细菌的增殖状态并无改善(结果未展示)，推测可能是由于营养肉汤培养基营养不丰富，达不到该菌的营养要求，而加入了一定比例的 MRS 后，不但混合培养基的 pH 值达到该菌生长的合适范围，加入的 MRS 也提供了该菌生长繁殖必须的营养物质。

本文研究表明，将德氏乳杆菌保加利亚亚种培养在含 20% MRS 的营养肉汤混合培养基中，可能由于细菌增殖过程中产生较少的胞外多糖，离心收集细菌时细菌容易沉淀下来，质粒抽提时菌体损失较少，且由于细胞壁肽聚糖外几无胞外多糖的覆盖，容易被溶菌酶消化水解，所以提取质粒时可以获得较高的产量，方便后续对该细菌的质粒进行修饰，以制备携带不同目的基因的功能细菌，达到对某些疾病具有更好治疗效果之目的。

参考文献

- [1] 栾兴社. 保加利亚乳杆菌产生的非乳酸抗菌物质的研究[J]. 食品研究与开发, 1988, 9 (1): 15-17
- [2] 王友芳, 郎景和, 袁杰利, 等. 德氏乳杆菌 DM8909 菌株对细菌性阴道病治疗的 II 期临床试验研究[J]. 中

- 国微生态学杂志, 2001, 13(4): 198-199, 201;
- [3] 姬媛媛。定君生治疗 160 例妇科阴道炎症疗效分析[J]. 中国医学工程, 2013, 21 (4) : 54-55
- [4] 白运焕, 蒋亚芬, 蒋云生。保加利亚乳酸杆菌分解多种尿毒素的定向诱变[J]. 中国血液净化, 2014, 13(3): 169-172, 179;
- [5] 李月, 张德纯。H. pylori 尿素酶 B 亚单位在保加利亚乳杆菌的表达与鉴定[J]. 中国微生态学杂志, 2008, 20 (1) : 7-9, 14;
- [6] 黄勇, 张德纯。锰超氧化物歧化酶基因的克隆和在保加利亚乳杆菌中的表达[J]. 食品科学, 2005; 26 (5) : 92-95
- [7] 格日勒图, 张延超, 王艳霞, 等。几种食用乳酸菌内源性质粒 DNA 的普查、消除及其稳定性试验 [J].中国乳品工业, 2008, 36(10): 4-7
- [8] 常洪美, 周川芬, 宿冬远, 等。双歧杆菌、保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌三联活菌去除肠道产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌的研究[J]. 华西医学, 2014, 29 (3) : 458-460;
- [9] 彭文岚, 刘文娜, 高静。癌症"细菌疗法"的研究进展[J]. 浙江化工, 2011, 42 (2) :4-7
- [10] 那淑敏, 贾士芳, 陈秀珠, 等。嗜酸乳杆菌产生的广谱抗菌肽 AP311 的分离和鉴定[J]. 微生物学报, 2001, 41 (4):494-498;
- [11] 赵娜, 萨如拉, 郭军, 等。瑞士乳杆菌 AJT 所产抗菌物质的初步研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34 (9) : 67-71
- [12] 李佳凤, 王福生。治疗细菌性阴道炎的药物-德氏乳杆菌 DM8909 活菌制剂[J]. 海峡药学, 2003; 15 (3) : 91-92;
- [13] 史红钗。定君生治疗外阴阴道假丝酵母菌病的临床疗效及复发率比较[J]. 中国微生态学杂志, 2012; 24 (3) : 278-280;
- [14] 尹 宁。思连康预防小儿肺炎继发腹泻的临床观察[J]. 实用预防医学, 2008, 15(3): 801-802
- [15] 程新, 张彦新, 周桂凤, 等。产肌酐水解酶基因工程菌的构建[J]. 生物医学工程研究, 2009, 28

(4): 299~302;

[16] 程新, 张彦新, 杨波, 等。产尿酸氧化酶基因工程菌的构建[J]. 中南药学, 2009, 7 (6) : 401-404

[17] 王艳霞、石泉、包秋华, 等, 三种提取乳酸菌内源性质粒 DNA 方法的比较[J]. 微生物学杂志, 2008, 28 (6) : 36-39