

## 部分酶解酵母高效电击转化研究\*

徐明良 杨金水 高 嵩 钱 旻 葛扣麟

(复旦大学遗传学研究所 上海 200433)

**摘 要** 以酵母质粒 YCp50 为外源 DNA, 电击转化部分酶解酵母宿主菌 AB1380, 转化效率稳定在  $10^6$  转化子 /  $\mu\text{g}$  质粒 DNA 左右, 比不酶解酵母或酵母原生质球作受体的电击转化效率高一个数量级以上, 也比 PEG 介导的酵母原生质球转化高 3~5 倍, 而且适合于大片段 DNA 如水稻 YAC 分子的转化。达最佳转化时的有关技术参数为: 新接菌种通气培养至细胞密度  $1 \times 10^8 \sim 1.5 \times 10^8$  个 / ml; 转化时细胞密度控制在  $1 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^9$  个 / ml; 每毫升酶解缓冲液加 15u 溶菌酶(lyticase), 30℃ 下处理酵母 5min 进行部分酶解; 电击时, 电场设置在 6.25kV / cm、电容 25 $\mu\text{F}$ , 电击后直接铺板。

**关键词** 部分酶解, 酵母, 电击, 转化

酵母遗传转化在构建生物基因组 YAC 库和分离酵母 DNA 代谢(如 DNA 复制、重组、修复等)缺陷突变体等方面是非常重要的一环<sup>[1]</sup>。目前酵母转化的主要方法为 PEG 介导的原生质球法<sup>[2]</sup>、醋酸锂法<sup>[3]</sup>和电击法<sup>[4,5]</sup>。PEG 法有较高的转化效率, 广泛应用于生物基因组 YAC 库的构建, 但此法操作较繁琐、耗时。醋酸锂法的转化效率极低, 已很少采用。电击法目前报道的转化率为  $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$  /  $\mu\text{gDNA}$ <sup>[2,4,6]</sup>, 其所采用的受体是未脱壁的酵母或是酵母原生质球, 能否用于 YAC 大分子转化尚无定论<sup>[1]</sup>。由于电击法本身的特点, 用于外源基因转化时的效率一般远远高出常规的转化方法, 如在大肠杆菌的转化中比  $\text{CaCl}_2$  沉淀法高 2~3 个数量级<sup>[6]</sup>, 用于真核生物转化时也颇理想<sup>[7]</sup>。鉴于此, 本项实验以部分酶解酵母细胞作受体进行电击转化, 试图建立一套高效、简便、用途更为广泛的酵母外源基因转化系统。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试酵母菌菌株及外源 DNA

转化用酵母宿主菌为 AB1380(MATa, ura3-52, trp1, lys2-1, ade2-1, can1-100, his5 $\psi^+$ ), 外源 DNA 为酵母质粒 YCp50<sup>[8]</sup>和水稻 YAC 大分子。

### 1.2 部分酶解酵母细胞的制备

挑取单菌落酵母, 接种于 10ml YPD 培养液(1%酵母浸出液、2%蛋白胨、2%葡萄糖、pH7.0)中, 通气培养过夜, 随后转接到 50ml YPD 培养液中培养至细胞密度  $1 \times 10^8 \sim 1.5 \times 10^8$  个 / ml。置冰上 30min, 1000r / min 离心 5min 收集酵母细胞, 经重蒸水、

\* 本项研究得到美国洛氏基金国际水稻生物技术计划及复旦大学科技基金资助。

本文于 1995 年 12 月 9 日收到。

1mol/L 山梨醇各洗一次后,溶于 20ml SCE 酶解缓冲液(1mol/L 山梨醇、0.1mol/L 柠檬酸钠、10mmol/L EDTA、30mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇、pH7.0)中,加 10u/ $\mu$ l 的 lyticase(u: 3ml 酵母反应缓冲液,25℃ 下每分钟内  $OD_{800}$  下降 0.001 即为 1 个单位(u),lyticase 溶于 50mmol/L Tris-HCl、1mmol/L EDTA、10%甘油, pH7.5)30 $\mu$ l,置 30℃ 水浴酶解 5min。500r/min 离心 3min,收集部分酶解酵母,以同样离心条件用 1mol/L 山梨醇洗涤二次,调整细胞浓度至  $1 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^9$  个/ml,用于电击转化。

### 1.3 部分酶解酵母的转化与培养

电击转化体积 200 $\mu$ l,加 5ng YCp50 质粒后,转移到预冷的电击杯中(Bio-Rad 公司, 0.2cm)。电击时设定电压 1.25kV、电容 25 $\mu$ F,电击结束即加预冷的 300 $\mu$ l 1mol/L 山梨醇,混合后立即铺于干燥的筛选培养基(1mol/L 山梨醇、0.7%无氨基酸氮碱、2%葡萄糖、1.4%水解酪蛋白、10mg/L 腺嘌呤、5.5mg/L 酪氨酸、0.02%色氨酸、2%琼脂, pH7.0)平板上,30℃ 培养过夜即可见针尖状亮点,3~4d 后长成红色酵母菌落。

## 2 结果和讨论

### 2.1 部分酶解与酵母转化频率

电击转化时发现,酵母细胞部分酶解可显著提高转化率。为确定最适部分酶解程度,分二步进行:首先参照酵母原生质球的 PEG 转化法酶解 15min,每 10ml SCE 缓冲液加 lyticase 100u、200u 和 400u,以不酶解的酵母作对照,根据转化率高可确定大概用酶量。然后缩短酶解时间到 5min,加 lyticase 100u、150u、200u 和 300u,再确定达最高转化率时的用酶量。进行上述电击转化时电压 1.25kV、电容 25 $\mu$ F。结果见图 1。

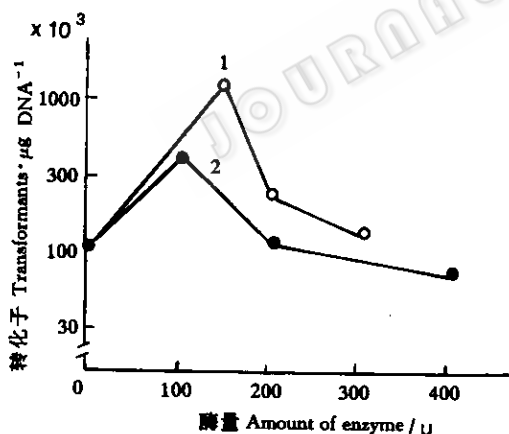


图 1 部分酶解程度与酵母转化率的关系

Fig.1 Dependence of transformation efficiency on the extent of partial digestion

1.Digestion for 5min; 2.Digestion for 15min.

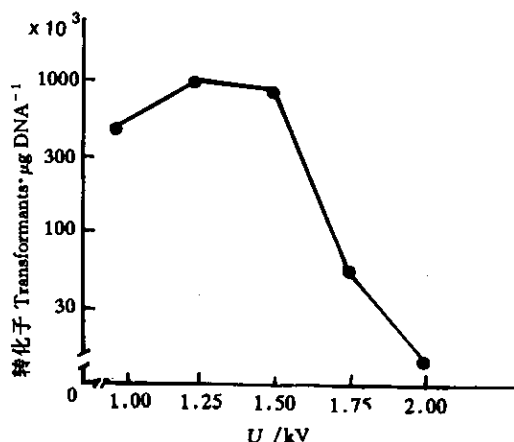


图 2 电击电压对酵母转化率的影响

Fig.2 Effect of electroporation voltage on the transformation efficiency

图 1 显示,酶解 15min 时,以 100u lyticase/10ml SCE 缓冲液的转化率最高,达  $4 \times 10^5$  转化子/ $\mu$ g 质粒 DNA,比不酶解转化的  $1 \times 10^5$  转化子/ $\mu$ gDNA 和原生质球转化(即 400u lyticase/10ml SCE 缓冲液,此时酵母已基本转化为原生质球)的  $6 \times 10^4$  转

化子/ $\mu\text{gDNA}$  高 4~7 倍。对于不酶解酵母及酵母原生质球,我们曾调整电压到 1.0kV、1.5kV、1.75kV 和 2.0kV 进行电击转化,结果仍未出现高的转化率(数据未列入)。当其它条件一致。酶解时间为 5min 时,150u lyticase/10ml SCE 缓冲液的转化率最高,达  $1.2 \times 10^6$  转化子/ $\mu\text{gDNA}$ ,这一转化效率比上面的不酶解转化或原生质球转化均高出一个数量级以上。上述结果说明,合适的部分酶解是获得高效转化的必要前提。另外,我们同步进行了 PEG 介导的酵母原生质球转化,转化率最高时为  $3 \times 10^5$  转化子/ $\mu\text{gDNA}$ ,显著低于电击转化。

## 2.2 电击参数与转化率

不加外源并联电阻进行电击转化,固定电容  $25\mu\text{F}$ ,设置电压 1.00kV、1.25kV、1.5kV、1.75kV 和 2.0kV。转化结果见图 2。

显然,电压在 1.25kV 左右时可获最高酵母转化效率,每微克质粒 DNA 转化子在  $1 \times 10^6$  上下,调高电压到 1.75kV 或 2.0kV 时转化率急剧下降。外加  $200\Omega$  并联电阻时也进行了电击转化,但均未获得高的转化率(数据未列入)。测定放电时间可知,外加  $200\Omega$  并联电阻时一般在 4.7ms 左右,不加时在 40ms~50ms 之间波动。可能放电时间的长短是影响转化率高度的一个重要因素。

## 2.3 培养的酵母细胞密度与转化率

PEG 介导的酵母原生质球转化要求细胞密度  $3 \times 10^7$  /ml,而电击转化要求较高的细胞密度,为此,培养酵母至一系列不同的密度再作转化。由图 3 可见,转化率高程度很大程度上依赖于培养的酵母细胞密度。密度在  $1 \times 10^7$  /ml 时,转化率仅有  $3 \times 10^4$  转化子/ $\mu\text{g}$  质粒 DNA,随密度的提高,转化率也随之增加,到度  $1 \times 10^8 \sim 1.5 \times 10^8$  /ml 时,转化率基本维持在  $1 \times 10^6$  转化子/ $\mu\text{gDNA}$  上下。如培养时间再延长,酵母趋于老化反而对转化不利。

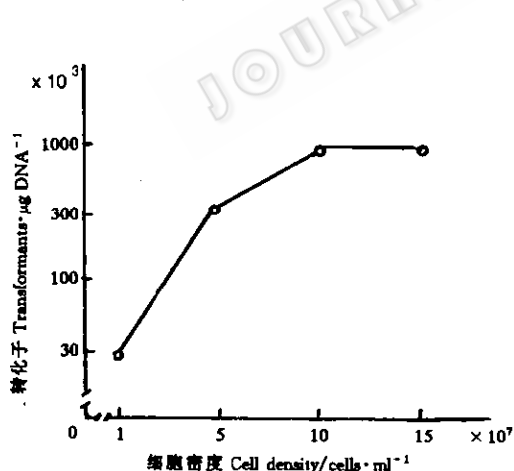


图 3 培养的酵母细胞密度与转化率的关系

Fig.3 The concentration of culture yeast and transformation efficiency

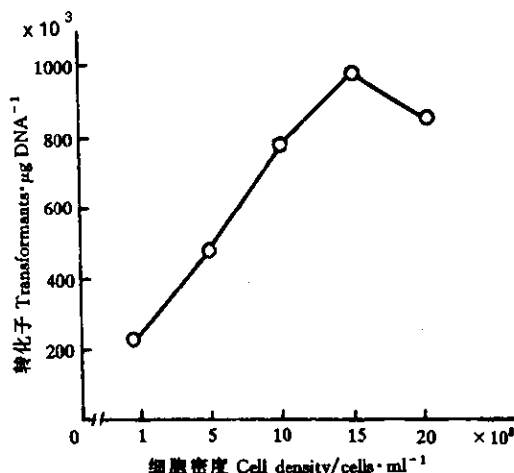


图 4 转化的酵母细胞密度与转化率的关系

Fig.4 The density of partial digested yeast at transformation and transformation efficiency

## 2.4 转化的酵母细胞密度与转化率

部分酶解酵母细胞用 1mol/L 山梨醇洗涤二次后可用于电击转化,共设置 4 种转化密

度:  $1 \times 10^8$  / ml,  $5 \times 10^8$  / ml,  $1 \times 10^9$  / ml,  $1.5 \times 10^9$  / ml 和  $2 \times 10^9$  / ml, 结果见图 4。显然, 在密度达到  $1.5 \times 10^9$  / ml 之前, 随密度的增加转化率也随之增加, 超过后, 转化率有所下降。

## 2.5 继代培养与转化率

从一个酵母单菌落培养到可用于转化的细胞密度, 即  $1 \times 10^8 \sim 1.5 \times 10^8$  / ml, 称为第一代, 从中取一部分再培养至转化密度时为第二代, 同理, 从第二代中取一部分可进一步培养到第三代。对这三代酵母的转化率进行了研究, 结果显示继代数增加导致转化率下降, 因此, 转化时最好用当代的培养酵母。

## 2.6 铺板方式与转化率

电击转化后酵母直接铺板的转化率高, 菌落生长快, 易挑出转化子; 如与选择培养基混合后再铺板结果则刚好相反, 克隆数少, 转化率约低一个数量级, 且生长速度极慢。这可能是电击后酵母细胞脆弱, 加选择培养基影响到酵母的生活力所致。

## 2.7 部分酶解酵母用于水稻 YAC 的转化

部分酶解酵母高频转化如果同样能适合于大分子 DNA 转移, 那么这一方法在基因组 YAC 库构建中将会有广阔的应用前景。鉴于此, 我们进行了水稻大分子 YAC 转化的研究, 结果在选择平板上获得了大量水稻核 DNA YAC 克隆, 且克隆数的多少与对照质粒 YCp50 的转化率成正比。从已经鉴定的约 50 个水稻 YAC 克隆来看, 大小约在 100kb~200kb 之间(结果另文发表)。

# 3 讨 论

## 3.1 酵母部分酶解与高频转化的关系

同一电击转化试验中, 部分酶解酵母的转化率比不酶解或完全酶解酵母的转化率高一个数量级以上, 这是始料不及的。按电击转化的原理, 高压电击后, 细胞壁产生瞬时通道, 外界溶液连同外源 DNA 随之进入细胞而引起转化。在大肠杆菌转化中, 进入细胞内的外界溶液可达细胞体积的 10%, 转化频率高达  $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$  转化子 /  $\mu\text{gDNA}^{[6]}$ 。在酵母电击转化时, 以往均是直接用酵母或是用酵母原生质球作受体, 转化频率不高, 一般小于  $5 \times 10^5$  转化子 /  $\mu\text{gDNA}$ , 低于大肠杆菌 3~4 个数量级。可能因为酵母是真核生物, 细胞大, 壁厚, 低压穿孔困难, 高压易致死, 如改用原生质球又会面临另外的问题, 即细胞膜刚性低、易变形, 电击后极易致死。部分酶解可能是解决这一矛盾的有效途径。酶解处理适当时, 可有两种结果: 一是部分区域完全脱壁, 与之相连的细胞膜裸露; 二是减少了细胞壁的厚度, 这两种结果均使酵母细胞易于电击穿孔, 存活力亦高, 最终提高了转化率。这一解释可从部分酶解程度不同导致转化率不同这一点上得到佐证。同时, 因酵母细胞的体积相对较大, 故进入细胞内的外界溶液较多, 有利于 DNA 大片段的转化。

## 3.2 电击条件与转化率的关系

前人报道的电击转化试验中一般都外加并联电阻 200 $\Omega$ , 对此我们进行了比较研究, 发现外加并联电阻 200 $\Omega$  后, 转化率反而下降。测定放电时间后可知, 不加并联电阻时在 40ms~50ms 之间, 加了并联电阻 200 $\Omega$  后低于 5ms。就大肠杆菌而言, 外加并联电阻 200 $\Omega$ , 放电时间在 5ms 时可获极高的转化率。而对于酵母或植物细胞, 短促的放电时间易伤害细胞, 导致转化率下降。另外, 达最高转化效率时电场为 6.25kV/cm, 升高或降低都对转化不

利。因此可以认为,低电场、长时间电击有利于酵母的存活从而提高转化率。

### 3.3 酵母的培养、转化密度与转化率的关系

当酵母培养到很高密度达  $1 \times 10^8 \sim 1.5 \times 10^8 / \text{ml}$  时,可获最高转化率,当培养密度只有  $1 \times 10^7 / \text{ml}$ ,转化率极低。说明细胞生长状态是决定转化率高低的一个极其重要的因素。而 PEG 介导的酵母原生质球转化要求的密度是  $3 \times 10^7 / \text{ml}$ ,两者差异较大。在电击转化时,酵母细胞密度低于  $1.5 \times 10^9 / \text{ml}$  时,密度与转化率基本成正比,超过  $1.5 \times 10^9 / \text{ml}$  以后,转化率下降。说明在同样的电击条件下,转化的细胞数与总细胞数成正比,只在总细胞数太多时才逆转。

## 参 考 文 献

- [1] David L N, Bernard H B. YAC Libraries: A User's Grde. New York: W H Freeman and Company, 1994.
- [2] Bruggers P M J, Percival V J. *Anal Biochem*, 1987, **163**: 391~197.
- [3] Ito H, Eukuda K M, Kimura A. *Bacteriol*, 1983, **153**: 163~168.
- [4] Becker D M, Grarente L. *Meth Enzymol*, 1991, **194**: 182~187.
- [5] Holly L P. *Nucleic Acids Research*, 1991, **20**: 621~622.
- [6] William J D, Jeff F M, Charles W R. *Nucleic Acids Research*, 1988, **16**: 6127~6145.
- [7] Shimamoto K, Terada R, Izawa J *et al*. *Nature*, 1989, **338**: 274~276.
- [8] Botsen. *Gene*, 1979, **8**: 17~24.

## HIGH-EFFICIENCY TRANSFORMATION OF PARTIAL DIGESTED YEAST BY ELECTROPORATION

Xu Mingliang Yang Jinshui Gao Song Qian Ming Ge Koulin

(Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433)

**Abstract** Partial digested yeast can be transformed in a very high frequency by electroporation, About  $1 \times 10^6$  transformants /  $\mu\text{g}$  DNA have been stably obtained with yeast strain AB1380 and plasmid YCp50. The efficiency is one order of magnitude higher than that obtained with intact yeast or spheroplast by electroporation, and also 3~5 fold over that of yeast spheroplast transformation mediated by PEG. Furthermore this procedure is suitable for macromolecule transformation such as rice YAC moleculars. The process is highly dependent on several aspects; culture yeast cells to a density of  $1 \times 10^8 \sim 1.5 \times 10^8$  cells / ml; add 300u of lyticase into 20ml of cell suspension and digest at  $30^\circ\text{C}$  for 5min to achieve partial digestion; adjust the cells density for electric pulse to  $1 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^9$  cells / ml; set the electric field strength and the capacitance to  $6.25\text{kV} / \text{cm}$  and  $25\mu\text{F}$  respectively; spread transformed cells on plates just after electroporation.

**Key words** Partial digestion, Yeast, Electroporation, Transformation