

应用电激法在大肠杆菌中导入外源性DNA

宋诗铎 张同海 祁伟 赵为诚

(天津医学院第二附属医院, 天津 300211)

徐宝强 刘建民

(天津理工学院, 天津 300191)

本文报道用国产基因导入脉冲仪(LN-101型), 采用高压脉冲电场, 将质粒DNA和噬菌体DNA成功地转化或转入大肠杆菌。该电场单次电压脉冲范围1.0kV—2.5kV(初电场强度2.8kV/cm—16kV/cm)、电容范围5—20 μ F, 用质粒pUC18和受体菌株DH5 α , 获得 10^9 — 10^{10} 转化子/ μ gDNA。电场强度、电容及脉冲时间等不同的因素影响转化效率。转化率与DNA的强度呈线性关系, 与受体细胞密度成正比。DNA和受体菌混合物在电激前、后的孵育时间, 对转化效率影响不明显。用噬菌体M13mp19 RF及受体菌株JM109, 同样可获得较高的转化效率。

关键词 电激法; 转化; 转导; 大肠杆菌

外源性DNA导入大肠杆菌是分子生物学技术中关键的一环, 传统应用钙离子-依赖性感受态细胞转化/转导方法可得到 10^7 — 10^8 转化子/ μ g DNA, 然而制备具有高度感受态细胞受多种因素影响, 且各批间感受态水平差异很大^[1,2]。近年来电激法(Electroporation)为外源DNA导入细胞提供了简便易行的新途径。本研究使用国产基因导入脉冲仪(LN-101型, 天津理工学院和南开大学研制), 采用高压脉冲电场, 将质粒DNA和噬菌体DNA成功地转化或转入大肠杆菌。获得 10^9 — 10^{10} 转化子/ μ g DNA。并研究了电激转化和转导的最佳条件。

材料和方 法

(一) 菌株和DNA

1. 培养基: 2YT为1L溶液含16g bacto-tryptone, 10g bacto-yeast ex-

tract和5g NaCl, pH7.0。SOC培养基为2% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 10mmol/L NaCl, 2.5mmol/L KCl, 10mmol/L MgCl₂·6H₂O, 20mmol/L glucose。

2. 菌株及其培养: 大肠杆菌DH5 α 和JM109分别在2YT培养基中37℃振荡培养, 直到光密度OD_{600nm}达到0.6—1.0(对数生长中期)。细菌在0℃短暂放置后, 离心(4000 \times g, 4℃)15min, 为了在电激中获得较低的电导, 受体菌DH5 α 需要强化洗涤, 步骤为1L的培养基用等体积冰冷的1mol/L HEPES洗涤, 离心, 然后用1/2体积冰冷的1mol/L HEPES再洗涤和离心一次, 继之用20ml 10%甘油洗涤和离心, 最后悬浮在20ml 10%甘油中(较原培养基浓缩50倍), 分装后在-20℃保存备用。用于转导的受体细菌JM109

本文于1992年5月25日收到。

离心沉淀物,用100ml冷BP缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl pH7.5, 10% Sucrose, 2mmol/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$)洗涤离心一次,最后悬浮在10ml冷BP液中(100倍浓缩),分装后 $-20^{\circ}C$ 保存。以上各标准菌株购自BRL公司。

3. DNA: 本试验所用DNA为质粒pUC18及噬菌体M13mp19(RF)均购自BRL公司。

(二) 电激条件

本研究使用国产基因导入仪(LN-101型)进行电激转化试验。电容调节范围5—20 μF ,电压调节范围1.0—2.5kV。采用三种电极间距即0.15cm,0.2cm和0.35cm。提供初电场强度从2.8kV/cm到16kV/cm。

(三) 电激转化方法

浓缩的DH5 α 在室温解冻后置于 $0^{\circ}C$,取200 μl 到试管(10mL)内,加入100 μl 水,然后再加1—2 μl DNA(溶于TE缓冲液或水中)混匀,置冰中30min。然后小心地吸出全部DNA-细菌混合液,加入到已预冷的电极间隙内。电激后,该混合液立即转移到内含2ml SOC培养基的试管中,室温下放置20—30min,再经SOC适当比例稀释,取100—200 μl 接种到含有氨苄西林(100 $\mu g/ml$)的SOC培养皿中。转化效率以转化子/ μg DNA表示。另取100—200 μl 接种到不含有氨苄西林(100 $\mu g/ml$)的SOC培养皿中。计算细菌的存活数,转化频率以转化子/存活数表示。

(四) 电激转导方法

浓缩的JM109在室温下解冻后,放置 $0^{\circ}C$,取200 μl 到试管(10ml)内,加入水100 μl ,然后再加1—2 μl M13mp19(RF)或重组噬菌体,混匀后置冰中30min。电激后,小心从电极间隙中吸出液体并放

至原试管内,迅速加入10 μl ,0.1 mol/L IPTG,40 μl 2% X-GEL和3ml 软琼脂(预热 $45^{\circ}C$),混匀后接种在YT培养皿中。

结果与讨论

(一) 电激条件对转化的影响

用大肠杆菌DH5 α 研究电激条件对转化的影响。当电容固定为20 μF ,获得的转化子数随电场强度的升高而增加(图1)。电阻-电容时间常数(简称时间常数)随电压升高而逐渐下降。电容明显影响转化效果。在适当的电场强度作用下,使用较大的电容(20 μF)比使用较小的电容(5 μF)可获得更高的转化效率。

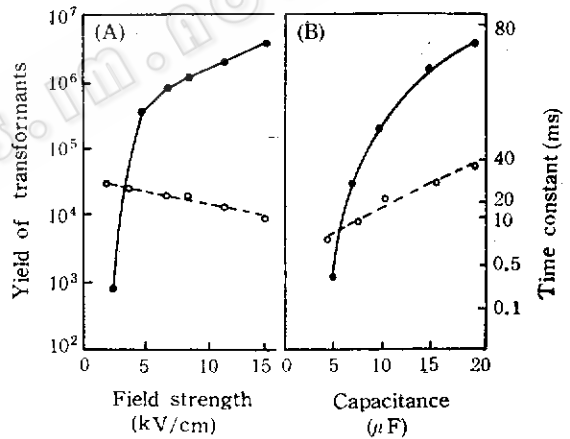


图1 电场强度、电容及时间常数对转化效率的影响

Fig.1 Effect of electric field strength, capacitance and time constant (m sec.) on the efficiency of transformation

DH5 α ($1.8 \times 10^9/ml$) were mixed with 100 $\mu g/ml$ pUC18 and to electroporation at the indicated electric field strength, at a constant capacitance of 20 μF (A) or at the indicated capacitance, at a constant electric field strength of 5.7 kV/cm (set voltage = 2.0 kV/cm) (B). (—) Yield of transformants, (---) time constant

(二) DNA浓度、细菌密度及混合物孵育时间对转化效率的影响

选择不同浓度(0.4 μg —1 μg) pUC19

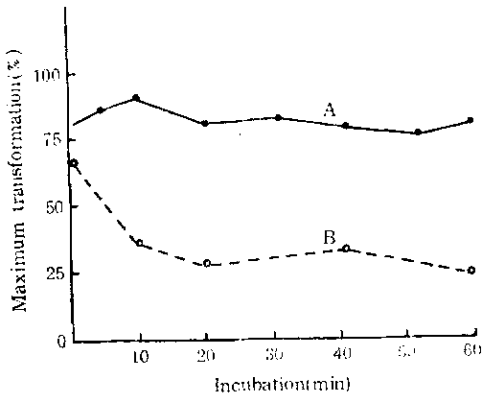


图 2 电激转化前、后混合物孵育时间对转化效果的影响

Fig. 2 Effect of pre-and post-pulse incubation

DH5 α (1.8×10^9 /ml) were mixed with 100 pg pUC18 and incubated on ice for 10 to 60 min before applying one pulse of 10 kV/cm 27 msec. (A), or cell were transferred to tubes with SOC on RT to incubate for up to 60 min after pulsed once at same electroporation condition (B). Transformants were selected on ampicillin, IPTG and X-gal

DNA 与 150 μ l DH5 α 混合, 电激转化后的结果表明 (表 1), 获得的转化子数与 DNA 浓度的增高呈线性关系。当 0.1 μ g 的 DNA 与不同密度的 DH5 α 混合, 获得的转化子数随受体菌密度增加而升高。图 2 表明 DNA 与受体菌混合物, 在电激前、后的孵育时间对转化的影响不明显。

(三) 电激法与传统的钙离子-依赖性方法对噬菌体转导进入大肠杆菌效果的比较

噬菌体 M13mp19 转导入 JM109, 分别使用相同浓度的 DNA 和受体细胞, 进行电激转导和钙离子-依赖性转导^[3]。电激条件为电容 20 μ F, 电场强度 5.74 kV/cm。表 2 显示两种方法获得的噬菌斑数, 电激转化效率 (10^9 — 10^{10}) 高于传统的钙离子-依赖性方法 (10^8 — 10^9)。与使用 Gene-Pulser TM (Bio-Rad, Richmond, CA) 所报道的结果相似^[4]。

近年来电激法已用于外源性 DNA 导

表 1 DNA 浓度及受体细胞密度对转化子的影响

Table 1 The effect of the addition of DNA and cells on the recovery of transformants

DNA (pg)	Vol (μ g)	[DNA] (pg/ml)	Transformants	Efficiency ($\times 10^{-9}$)	Frequency (trans/survivor)*
0.4	100	4	8.8×10^3	2.2	1.4×10^{-6}
4	100	40	4.4×10^4	1.1	5.6×10^{-5}
40	100	400	7.4×10^4	1.8	3.7×10^{-5}
10^2	100	10^3	1.0×10^5	1.0	2.5×10^{-4}
10^3	100	10^4	1.2×10^6	1.2	2.1×10^{-3}
100	300	3.3×10^2	1.8×10^5	1.8	3.1×10^{-4}
100	300	3.3×10^2	2.5×10^5	2.5	4.5×10^{-4}
100	300	3.3×10^2	7.6×10^5	7.6	2.3×10^{-4}
100	300	3.3×10^2	8.1×10^5	8.1	1.5×10^{-4}

* Survivor rate for all point was about 25—45%

入真核细胞 (动、植物) 和原核细胞 (细菌), 但机制仍不明确。Chang^[5] 等发现对于真核细胞, 高压电场在细胞膜上形成暂时性的孔道, 允许 DNA 通过, 高压电场后, 又可恢复细胞膜的固有特性。在细菌的转化和转导中, 转化效率与 DNA 的

浓度和受体菌的密度成正比, 与初电场强度等电激条件有关, 因此高压电场对细胞膜瞬时的物理作用是外源性 DNA 进出细菌的原因。可以推论在自然条件, 闪电等也可能引起生物体细胞膜通透的暂时变化, 导致 DNA 或遗传物质的流动。

表 2 电激法与钙离子-依赖性方法对噬菌体转导效果的比较

Tabel 2 Comparison of efficiencies of transfection by electroporation and by CaCl₂-method

	Yield of Transfectants		
	Electroporation(EP)	CaCl ₂ -method (ca)	EP/CP
M13mp19RF	5.0×10^6	3.2×10^5	1.5×10^1
OGHmp19	3.5×10^4	1.1×10^3	3.2×10^1

Electroporation and CaCl₂-dependent transfection were performed under standard conditions with JM109. The concentrations of DNA used were somewhat different for different preparations, but were the same for electroporation and the CaCl₂-method

参 考 文 献

- [1] Hanahan, D., *J.Mol.Biol.*, 166:557, 1983.
 [2] Li, S.J. and Landers, T.A., *Focus*, 12(3):72, 1990.
 [3] Hanahan, D., in *DNA cloning Techniques, A practical Approach*, ed.DM Glover(IREL Press, Oxford) Vol.1, p.109, 1985.
 [4] Dower, W.J. et al., *Nucl. Acids Res.*, 16:6127, 1988.
 [5] Chang, D.C. and Reese, T.S., *Biophys. J.*, 57, 1990.

Electroporation of Foreign DNA into *Escherichia coli*

Song Shiduo Zhang Tonghai Qi Wei Zhao Weicheng

(Department of Internal Medicine, The Second Teaching Hospital, Tianjin Medical college, Tianjin 300211)

Xu Baoqiang Liu Jianmin

(Department of Electronic Engineering, Tianjin Institute of Technology, Tianjin 300191)

In this study, successful transformation of plasmid DNA and transfection of phage DNA into *E. coli* were described by using intense electrical field of exponential decay waveform generated by a Gene Pulser LN-101. We have obtained 10^9 — 10^{10} transformants/ μ g DNA with strain DH 5 α , and plasmid pUC 18, by a single voltage pulse at 1.0—2.5 kV with 5—20 μ F capacitor. The efficiency of electroporation depends on various parameters: the electric field strength, capacitance, the pulse length etc. The frequency of transformation was a linear function of the DNA concentration, same as the density of recipient cell. The effect of time of preand post-shoke incubation of cell with DNA was insignificant. The high efficiency of transfection also was achieved with strain JM 109 and M 13 mp 19 RF by electroporation.

Key words Electroporation; transformation; transfection; *E.coli*