

经验交流

电激仪研制及高效快速电激转化大肠杆菌*

吴晓强

(首都师范大学生物系, 北京 100037)

李庚白

(首都师范大学物理系, 北京 100037)

关键词 电激仪, 电转化, 大肠杆菌

高效快速进行转化实验是基因重组的一个重要环节。而电转化已成为目前转化真核及原核细胞的一种通用方法^[1]。电转化又称电激, 指活细胞受快速变化的高强度电场作用的过程。电激使得 *E. coli* 细胞外膜产生瞬间穿孔, 该电激孔可以足够大并维持一定时间使外源质粒 DNA 分子、蛋白质分子或其它分子进入细胞。如果孔发生在相邻细胞周围, 则可促使细胞融合或原生质体融合^[2]。

根据放电波形的不同, 电激仪通常有二种类型, 一种是方型波形式, 如美国 Beackon 公司产品。另一种是电容放电形成的指数衰减波形^[3]。本文介绍的仪器是根据后一种原理而研制的。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒 用于电激转化的菌株有: *E. coli* HB101 和 JM103, pUC18, pAn503^[4] 和 pRL447^[5] 等。

1.2 培养基 *E. coli* 用 LB 培养基^[1], 按不同质粒的选择标记, 在培养基中加入一定种类和剂量的抗菌素。

1.3 *E. coli* 菌培养及感受态细胞制备 进行微量转化时, 取 1.5ml 隔夜培养的菌离心沉淀。再用灭菌双蒸水洗 2 次, 悬浮于 200 μ l 双蒸水中待用。大量制备时, 取 2ml 隔夜培养菌加入 250ml LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇 2h, 至对数中期 ($A_{600}=0.5$), 离心沉淀后, 用 200ml 无菌双蒸水洗 2 次, 最后用含 10% 甘油的双蒸水 20ml 洗 1 次, 再悬浮在 5ml 该液中, 按 200 μ l 分装, 存放 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。

1.4 仪器电路原理及样品室 仪器的电路原理如图 1 所示。

仪器工作时放电的实际波形通过记忆示波器 (Gould 1421, 英国 Gould 公司产品) 捕获后进行照相记

录下来。

放电样品室为自行设计的 0.1cm 电极距样槽, 体积 157 μ l。根据实验需要, 样槽体积和电极距可以随意变化。

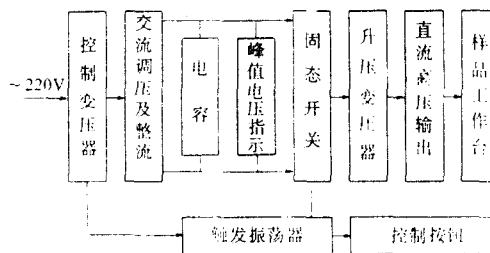


图 1 SD-92-1 型电激仪原理图

1.4 电转化 质粒 DNA 10 μ l (约 0.1 μ g DNA 稀释在双蒸水中) 与 150 μ l *E. coli* 混匀, 加入放电样槽内, 室温下进行一次放电。接着将 *E. coli* 转移入 1.5ml 管内, 加入 1ml LB 培养基混匀, 37 $^{\circ}$ C 水浴 1h。最后根据 DNA 加入量多少, 吸入不同浓度的转化菌液涂布在相应的含抗菌素平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 12—18h。

1.5 理论转化率的计算 理论转化率按以下公式计算^[2]:

理论转化率 (转化子/ μ g) = 转化子数 $\times$ 稀释倍数 $\times 10$ (菌体积与溶液体积比) $\times$ DNA 稀释倍数 $\div$ 存活率 (10%)。

2 结果和讨论

2.1 放电曲线特性及仪器简介 电激放电的主要参数有场强和时间常数 τ 。利用记忆示波器捕获的单脉冲显示呈典型的指数衰减放电波形。放电电压从

*国家自然科学基金和北京市自然科学基金资金。

收稿日期: 1992-10-12 修回日期: 1992-11-14

50V—1.5kV 连续可调,当使用 0.1cm 电极距的样品槽时,最大放电场强可达 15kV/cm. 每次放电脉冲持续时间通过改变与样品槽并联的放电电阻值来控制. 无样品时,实际时间常数会减少. 本机所用平行电阻系列为 1, 2.2, 4.7, 10, 20k Ω , 可供不同细胞电转化选择之用. 仪器其它参数请见表 1.

表 1 SD-92-I 型电激仪性能表

输入电压	220V/50Hz
输入电流	2A
最大输出电压	1.5kV
输出波形	RC 时间常数为可调的指数放电波形
电压输出调节	分四档, 50V—1.5kV 连续可调
RC 时间常数选择	电容 1, 25 μ F 电阻 1, 2.2, 4.7, 10, 20k Ω 并随样品介质的不同而变化
使用温度要求	室温 (0—35 $^{\circ}$ C)
仪器尺寸	27cm $\times$ 27cm $\times$ 11cm
重量	3.25kg

2.2 电转化 *E. coli* *E. coli* HB101 和 JM103 经电转化得到的理论转化率见表 2. 一般情况下场强、时间常数、菌株和菌生长期、菌密度、质粒种类、浓度、纯度及缓冲液性质等多种因素都会影响转化效率. 表 2 数据显示出高拷贝数质粒 pUC18 和 pRL447 转化率略高于 pBR322 衍生质粒 pAn503. 对照说明未经电激处理的 *E. coli* 仍有一定频率的转化发生.

表 2 *E. coli* 电转化的转化效率¹⁾

菌株	质粒	对照 ²⁾ / (转化子/ μ g)	转化效率/ (转化子/ μ g)
HB101	pUC18	5×10^2	2.8×10^9
	pAn503	2.7×10^2	1.7×10^9
	pRL447	4×10^2	5.4×10^9
JM103	pUC18	5.3×10^2	3×10^9
	pAn503	2×10^2	2.2×10^9
	pRL447	6×10^3	4.3×10^9

¹⁾质粒 DNA (约 0.1 μ g) 加入 150 μ l 菌液 (每毫升含 10^8 个细胞) 在场强 12kV/cm 下电激, 平行电阻 4.7k Ω . 转化子在 Amp (pUC18, pAn503) 或 Km (pRL447) 平板上选择生长. (Amp: 氨苄青霉素, Km 卡那霉素).

²⁾对照组实验条件与 1) 所述基本一致, 但未经电激处理.

2.3 场强对转化效率的影响 图 2 所示为不同场强对转化效率的影响, 从图中可见 *E. coli* K12 株系最佳电转化场强为 10—12kV/cm. 这与文献^[2]结果是一致的. 不加质粒经电激处理的菌在抗菌素平板上转化率是零 (即水平轴 B).

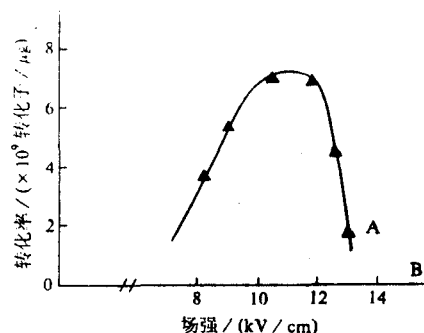


图 2 场强对电转化效率的影响

A: *E. coli* HB101 被 pRL447 电转化B: *E. coli* HB101 被电激处理对照平行电阻 4.7k Ω

以上结果表明电激转化快速、方便和高效. 经过改进, 我们研制的电激仪吸收了国外同类产品的主要特点, 性能达到或超过同类产品指标. 经过严格检验, 仪器工作稳定. 记忆示波器显示同一条件下的放电波形重复性好. 另一优点是该仪器造价低廉, 仅数千元人民币, 为国内大多数实验室易于接受. 从而使得该仪器不仅是科研的有力工具, 也成为有关教学实验的重要装备. 目前应用该电激仪已成功地将重组质粒 pRL6 通过电激转化导入蓝细菌 *Anabaena azollae*, 结果将另文报导.

参 考 文 献

- 1 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*. 2nd Edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989;1:75
- 2 Calvin N M, Hanawalt P C. High-Efficiency Transformation of Bacterial Cells by Electroporation. *J Bacteriol*, 1988;170:2796
- 3 Anon. *Bio-Rad Catalog R*. 1992;167
- 4 Fisher R, Turli R, Haselkorn R. A cloned cyanobacterial gene for glutamine synthetase functions in *Escherichia coli*, but the enzyme is not adenylated. *PNAS*, 1981; 78:3393
- 5 Elhai J, Wolk C P. A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing

plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene*, 1988;68:119

6 Wolk C P, Vonshalk A, Kehoe P *et al.* Construction of

shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:1561

简单、快速、敏感的化学合成寡核苷酸银染色

陈惠崔泓

(中国康复研究中心康复医学基础研究所, 北京 100077)

关键词 银染, 单链寡核苷酸, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 溴化乙锭荧光染色

随着分子生物学的研究进展, PCR 技术的广泛应用以及 DNA 合成仪的问世, 人们对 DNA 合成、改造、检定有着迫切的要求. 本室自 DNA 合成仪开机以来试用多种方法, 如放射自显影、溴化乙锭荧光染色及银染检定化学合成寡核苷酸的纯度、产量及寡核苷酸链长、短和相对移动位置. 放射自显影虽能检出 10^{-14} — 10^{-16} g 物质^[1], 但因其本身存在诸多缺点不宜常规应用, 而溴化乙锭荧光染色简单、快速、敏感 (200ng), 因其致诱变^[2]作用不利于化学合成寡核苷酸常规检测. 也有人用快速电泳仪检定, 但因仪器价格昂贵不宜推广. 因此, 我们采用普通电泳仪 PAGE 银染色, PAGE 是实验室常规技术, 改以银染能提高检出寡核苷酸的灵敏度^[3], 检出量 <4ng, 主带占 90% 以上, 且整个过程 1 d 内完成. 文献^[4]报导银染 da-DNA 而国内应用较少, 尤其是银染检定化学合成寡核苷酸单链片段尚未见报导.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 丙烯酰胺日本进口分装. 双丙烯酰胺德国进口.

1.1.2 银氨溶液: A, 20% AgNO_3 12ml. B, 0.36% (W/W) NaOH 66ml 与 14.8mol/L NH_4OH 4.36ml 混匀. C, 将 A 滴入 B, 搅拌 40—60r/min 补加双蒸水至 300ml, 用前现配.

1.1.3 甲醛-柠檬酸显影液: 1% 柠檬酸 1.5ml 与 38% 甲醛 0.15ml 补加双蒸水至 300ml.

1.1.4 化学合成寡核苷酸片段为本室合成.

1.2 方法

1.2.1 化学合成寡核苷酸经 NAP-10 柱初提后将

样品稀释为不同浓度, 走含 7mol/L 尿素, 20% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 胶板 15cm×15cm×2mm, 电压 200V, 电泳 2h, 电泳毕将凝胶板取下用双蒸水充分摇动冲洗.

1.2.2 固定 50% 乙醇固定凝胶 1h, 双蒸水充分洗涤轻摇 40—60r/min, 使尿素尽量自凝胶中洗涤去除.

1.2.3 染色 将胶板放入新鲜配制的银氨溶液内染色 15min, 搅拌 40—60r/min, 双蒸水充分洗涤.

1.2.4 显影 将染色好的凝胶板放入甲醛-柠檬酸显影液^[5]内至寡核苷酸带不再出现为止. 双蒸水充分洗涤.

1.2.5 定影 若背景太深用含 10% 甲醛快速定影剂脱色至背景清晰而核苷酸带不致丢失为止.

2 结果

结果见图 1 和图 2.

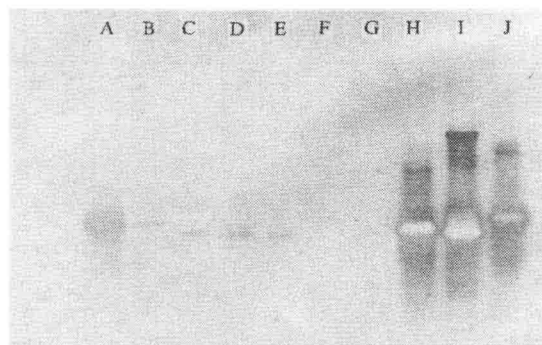


图 1 20%PAGE 银染

从 A—J 为 17 个碱基的寡核苷酸, 但其碱基组成不同, 从 A—J 上样量为 0.4928 μg , 19.7ng, 10.32ng, 14.6ng, 7.3ng, 3.9ng, 3.6ng, 1.032 μg , 1.17 μg , 1.23 μg

收稿日期: 1992-12-24

修回日期: 1993-04-29