

# 假结核耶氏菌质粒DNA电穿孔转化试验\*

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 徐建国 刘志奇 俞东征

**提要** 本文首次报道了假结核耶氏菌的电穿孔转化技术。将编码鼠疫菌素的9.5kb的质粒克隆入pBR328的Pst I位点,构建了质粒pJGX20。使用pJGX20,在电压为1300V、1400V,电容为25 $\mu$ F,电击时间为48~52微秒,使用10%甘油为电穿孔缓冲液,可获得每微克DNA  $10^8$ 的转化子。pJGX20的鼠疫菌素基因,在假结核耶氏菌中得到良好表达。

**关键词** 电穿孔技术 假结核耶氏菌 鼠疫菌素

将细胞在短时间内暴露于高强度的电场之下,可使细胞膜发生可逆性改变,允许DNA分子进入,这种技术称之为电穿孔(electroporation)或电转化(electro-transformation)。DNA电穿孔技术已被广泛用于哺乳动物细胞、植物原生质体、酵母菌等的DNA转化试验。Dower等人曾报道在大肠埃希氏菌中可达到DNA  $10^9 \sim 10^{10}/\mu\text{g}$ 转化子的高效转化<sup>[1]</sup>。对用化学转化法未获成功的空肠弯曲菌等革兰氏阳性和阴性细菌,用电穿孔技术也获得了成功<sup>[2,3]</sup>。

关于假结核耶氏菌、鼠疫耶氏菌的致病因子与质粒的关系已基本明确,也有关于质粒接合转移和噬菌体转导的成功报道。然而,由于质粒接合转移和噬菌体转导的频率很低,技术上存在着一定的困难,加之缺乏有效的DNA转化技术,为从分子水平上阐明耶氏菌的致病机理、假结核耶氏菌与鼠疫耶氏菌之间的关系带来了困难<sup>[4,5]</sup>。我们首次报道了假结核耶氏菌的质粒DNA电转化方法。

## 材料与方 法

一、菌株: *Yersinia pseudotuberculosis* PTB3为假结核血清Ⅱ型菌株, *Yersinia pestis* EV76 paris为鼠疫菌苗株,以上均为WHO提供的参考菌株,在试验室中用斜面长

期传代保存。

二、质粒: pJGX20是将编码鼠疫菌素的9.5kb的质粒克隆入pBR328的Pst I位点的克隆子<sup>[6]</sup>,分子量为14.4kb。四环素、氯霉素抗性,氨苄青霉素敏感。

三、电穿孔设备: 试验所用的基因穿孔仪(Gene Pulser)是Bio-Rad公司产品,最高设置电压可达2500V,最高电容为25 $\mu$ F,标本杯的电极间距离为0.4cm,电场强度可达6.25 kv/cm。

## 四、缓冲液:

1.培养基和电穿孔缓冲液: 假结核耶氏菌常规用肉汤为蛋白胨肉汤(蛋白胨10g、503胨10g、氯化钠5g、磷酸氢二钠4g和水1L)。常规用琼脂为营养琼脂(北京海淀区微生物培养基制品厂产品)。

2.电穿孔缓冲液: ①Hepes缓冲液: 包括蔗糖9.3g, Hepes 1.9g, 重蒸水100ml。将上述溶液配制后,用0.45 $\mu\text{m}$ 滤器过滤除菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。②10%甘油: 将甘油配制成10%后高压灭菌,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

五、质粒DNA提取: 将菌株活化后,在含有适宜抗生素的LB肉汤(酵母粉5g,蛋白胨10g,氯化钠5g,水1000ml, pH7.4) 200

ml中37℃过夜振荡培养。离心后弃上清，将菌体悬浮于5ml溶液I中(1M Tris pH8.0 0.125ml, 20%葡萄糖0.222ml, 0.5M EDTA pH8.0 0.1ml, 重蒸水4.55ml, 溶菌酶5mg)。置冰上30分钟后，缓慢加入10ml溶液II (10M NaOH 0.2ml, 20% SDS 0.5ml, 重蒸水9.3ml)，轻轻摇匀，置冰上20分钟。待溶液变清亮后，加入10ml溶液III (5M NH<sub>4</sub>OAc)。混匀后置冰上30分钟。离心，取上清与1~2倍体积的冷异丙醇混和后，置-10℃20分钟。离心后弃上清，将质粒DNA沉淀物用冷无水乙醇冲洗一次，用电扇将DNA沉淀物吹干后，溶于TE缓冲液中。

六、质粒DNA电穿孔步骤：将假结核耶氏菌在蛋白胨肉汤中传代一次，以1:20稀释种入100ml蛋白胨肉汤中，37℃过夜振荡培养。注意测定光密度值，尽可能使培养物的光密度值一样或基本相似。将培养物于4℃离心，弃上清，将菌体悬浮于原培养物量1/2体积的Hepes缓冲液中。离心后，弃上清，将菌体悬浮于1/20体积的10%甘油中，取部分待用，其余则置于-70℃冰箱保存。取0.8ml菌悬液注入0.4cm的标本杯中，加入1μg质粒DNA。将基因穿孔仪的电压设置后，进行电击。电击后，立即将0.1ml菌悬液加入5ml蛋白胨肉汤中，于37℃振荡培养4小时后，将培养物离心，将菌体悬浮于0.1ml肉汤中，用L型棒涂布于含氯霉素(10μg/ml)的营养琼脂上，37℃过夜培养。在对照组无菌生长的条件下，挑取转化子10个左右，传代后小量提取质粒DNA，将转化子进行鉴定。

### 结 果

一、电穿孔缓冲液对电击后菌细胞存活率的影响：一般而言，使用电穿孔技术要摸索适宜的电场强度，能将50%左右的菌细胞杀死，才可能获得较高的转化率。没有杀伤，就没有转化。对大肠埃希氏菌而言，在菌细胞杀伤率为50~75%时转化率最高<sup>[1]</sup>。然而对空肠弯

曲菌而言，上述作用就不太明显<sup>[2]</sup>。最初我们选用中等电阻的SE缓冲液(蔗糖272mM, 磷酸钠盐7mM, 氯化镁1mM)，使用大肠埃希氏菌O157:H7血清型菌株88-2364<sup>[7]</sup>，结果发现当电压为2500V、电容为25μF、电击时间为2.4微秒时，菌细胞存活率仍可高达95~100%。选用高电阻的Hepes缓冲液，在电压为1300V、1400V，电容为25μF，电击时间为48~54微秒时，假结核耶氏菌pTB3的菌细胞存活率为50%左右。使用10%甘油作为电穿孔缓冲液的结果，与Hepes缓冲液相似。

表1 电压和电击时间对菌细胞的杀伤作用\*

培养物 OD值	电压 (V)	电击时间 (Msec)	光密度值 (OD 540)
0.16	1300	48	0.0275
	1200	47	0.04
	1100	48	0.055
	1000	51	0.04
	对照		0.055
0.375	1500	48	0.03
	1400	50	0.0375
	1300	54	0.04
	1200	54	0.05
	对照		0.07

\* 电击后将菌悬液作10倍系列稀释，37℃振荡培养2小时后，测光密度值

二、电场强度对菌细胞存活率的影响：使用Hepes缓冲液，在电容为25μF，电压为1300V或1400V时，约有50%左右的假结核耶氏菌被杀死。同样条件下，当电压为1000V时，约有80%以上的菌细胞存活。菌细胞的数量或生长周期似乎对假结核耶氏菌的菌细胞存活率稍有影响，当所用培养物的光密度高时，在同样条件下，所需的电击时间稍长(表2)。在电穿孔试验中，应密切注意菌细胞的生长情况，定期测定光密度值。在不同的试验中，应尽量保持光密度一致或相似，以保证试验的重复性和可靠性。在我们的条件下，光密度值对大肠埃希氏菌电击后菌细胞存活率有显著影

表2 电压和电击时间对质粒转化率的影响

电压(V)	电击时间(Msec)	转化率
1400	44	$7.4 \times 10^8$
1300	42	$6.6 \times 10^8$

响。当电容为 $25\mu\text{F}$ 时,使用Hepes缓冲液,电压为1000V,光密度值为0.46,几乎100%的菌细胞存活。当光密度值为0.22时,几乎只有15%左右的菌细胞存活。

三、pJGX20的构建:大量提取鼠疫耶氏菌的质粒DNA,用0.7%琼脂糖凝胶电泳后,在长波紫外灯下切取含9.5kb质粒的凝胶,用电洗脱技术回收质粒DNA。将回收的9.5kb质粒DNA用Pst I酶切,与经碱性磷酸酶处理的pBR328的Pst I酶切片段在 $12^\circ\text{C}$ 过夜连接,用化学转化技术转化入大肠杆菌HB101菌株。将在含四环素( $\text{TC}20\mu\text{g}/\text{ml}$ )、氯霉素( $\text{CP}15\mu\text{g}/\text{ml}$ )的LB琼脂上生长的菌落,检查氨苄青霉素抗性。将 $\text{TC}^r \text{CP}^r \text{AM}^s$ 菌落传代,提取质粒DNA,用Pst I酶切发现,克隆子含有一个编码鼠疫菌素质粒的Pst I外源DNA片段。将其中一个克隆子命名为pJGX20。pJGX20的分子量为14.4kb(9.5+4.9)。pJGX20在大肠杆菌HB101中能表达鼠疫菌素。

四、pJGX20的转化和表达:由于使用1300V或1400V可使50%左右的假结核耶氏菌细胞被杀死,由于大肠埃希氏菌在50~75%的菌细胞被杀死时,才能获得高效转化,我们固定电容,使用10%甘油作为电穿孔缓冲液,在质粒DNA浓度为 $1.25\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,获得了 $10^8/\mu\text{g}$  DNA的转化率。电压为1300V或1400V时,质粒DNA转化率几乎相同。随机挑取在四环素琼脂上生长的菌落10个,转种培养,提取质粒DNA,均发现获得了pJGX20。将其中一个转化子命名为ZQL<sub>1</sub>,发现鼠疫菌素能在其中良好表达。

## 讨 论

DNA电穿孔方法方便、易行,重复性好,

容易获得较高的转化率,已经成功地用于革兰氏阳性和阴性细菌的某些种的研究中〔1~3〕,特别是对一些用DNA化学转化技术不能获得成功的某些种、属的细菌而言,不失为一种值得考虑的方法。

使用电穿孔技术在大肠埃希氏菌中,每微克质粒DNA可获得 $10^9 \sim 10^{10}$ 个转化子。使用pJGX20,我们在假结核耶氏菌中获得每微克DNA  $10^8$ 个转化子,转化率的差异可能与质粒的种类、分子量和菌株的不同有关。Dower等使用pBR329在大肠埃希氏菌LE392菌株中获得了 $10^9/\mu\text{g}$  DNA的转化率,而使用puc19仅获得 $10^6/\mu\text{g}$  DNA的转化率〔1〕。pBR328和puc19均为低分子量质粒。Miller等报道,使用pILL512质粒DNA,在空肠弯曲菌中获

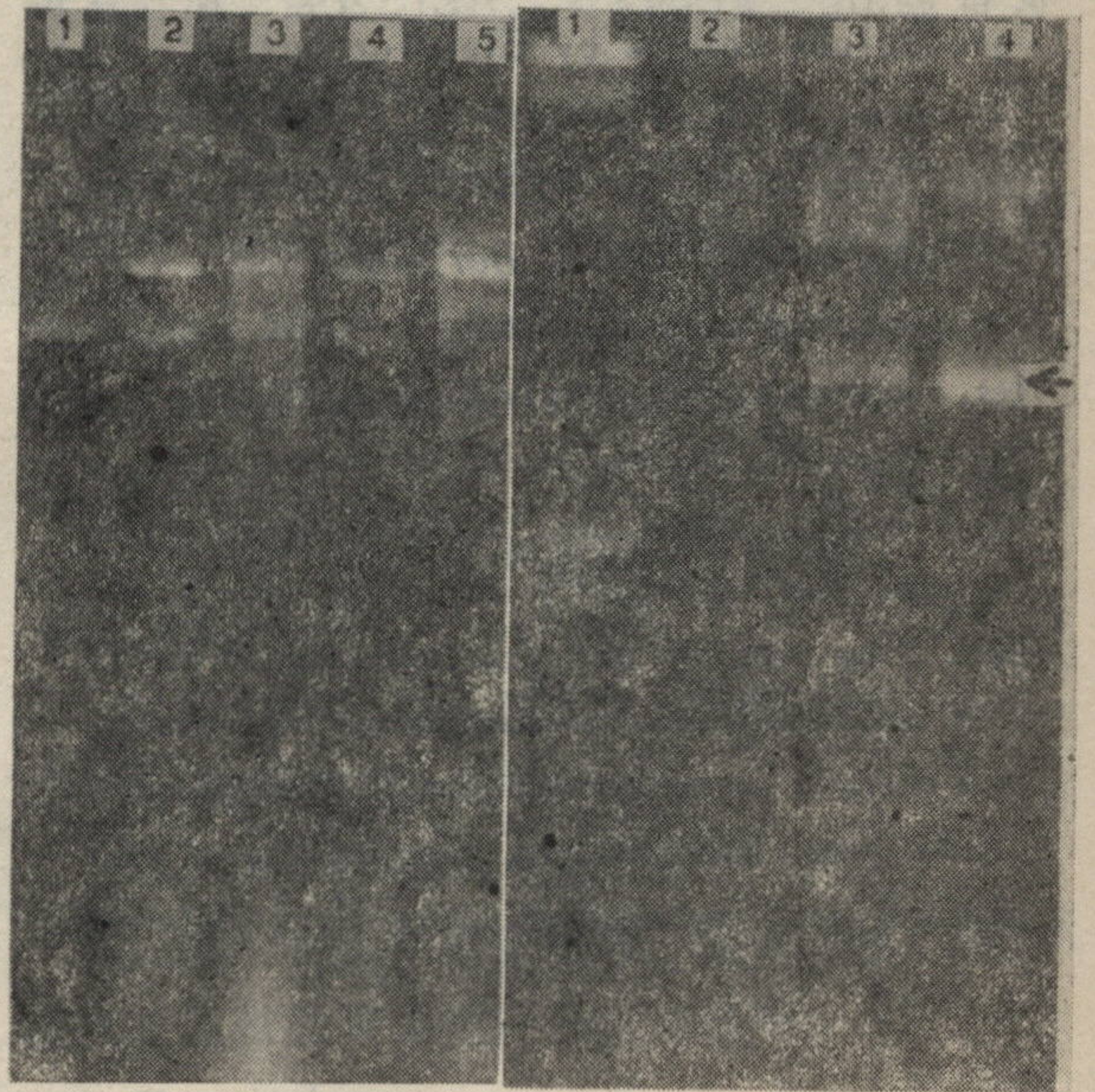


图1 pJGX20、pBR328、鼠疫耶氏菌EV质粒DNA的Pst I酶切图谱(琼脂糖浓度0.8%)

1: pBR328, 2~4: pJGX20, 5: 鼠疫耶氏菌EV

图2 假结核耶氏菌pTB3、鼠疫耶氏菌EV、转化子ZQL<sub>1</sub>和克隆子pJGX20的质粒DNA琼脂糖凝胶电泳(琼脂糖浓度0.8%)

1: 鼠疫耶氏菌EV76巴黎株, 2: 假结核耶氏菌pTB3, 3: 转化子ZQL<sub>1</sub>, 4: 克隆子pJGX20, 箭头为pJGX20

得了 $10^6/\mu\text{g}$  DNA 的转化率<sup>[2]</sup>。而 Leredus 等则报道了在 *Bacillus thuringiensis* 中, 使用分子量为 10.8kb 的 pHV1435, 只获得 $10^2/\mu\text{g}$  DNA 的转化率。当宿主细胞更换时, 则完全没有转化。当使用分子量为 3.7kb 的 pE194 时, 转化率也有 $10^2/\mu\text{g}$  DNA<sup>[2]</sup>。根据使用多种质粒多个菌株的研究说明, 电穿孔试验的成功与否、转化率的高低与质粒和菌株的不同有关。在化学转化试验中发现, DNA 的分子量愈大, 则转化率愈低。我们使用 pJGX20 获得了 $10^3/\mu\text{g}$  DNA 的转化率, 可能与质粒的分子量和细菌本身的特征有关。同时, 质粒 DNA 在标本中的浓度也与转化率有关。

**Plasmid DNA Transformation of *Yersinia pseudotuberculosis* by Electroporation\*** Xu Jianguo, et al., Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing

Rendering cells permeable to DNA molecules, electroporation involves the application of high intensity electric fields of short duration to reversibly change the biomembranes, which has been used successfully in some species of both gram negative and positive bacteria. We first reported the electro-transformation technics of *Yersinia pseudotuberculosis*. The plasmid pJGX20 was constructed by cloning the 9.5 kb plasmid encoding pesticin into Pst I site of

pBR328. Transformation efficiency of  $10^3$  transformants/ $\mu\text{g}$  DNA was obtained at voltage of 1300V or 1400V, capicite of 25  $\mu\text{F}$ , time constant of 48-52 msec, with 10% glycerol as electroporation buffer. The pesticin gene of pJGX20 was expressed well in *Y. pseudotuberculosis*.

**Key words** Electroporation Pesticin *Y. pseudotuberculosis*

\*The project supported by National Natural Science Foundation of China

**参 考 文 献**

1. Dower WJ, et al. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucl Acid Res 1988; 16(3): 6127.
2. Miller JF, et al. High voltage electroporation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 856.
3. Lereclus D, et al. Transformation and expression of a cloned-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiol Lett 1989; 60: 211.
4. Heesemann J and Laufs R. Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid. J Bacteriol 1983; 155(2): 761.
5. Tasukano H, et al. Plasmid-like properties of the four virulence associated factors of *Yersinia pestis*. Microbiol Immunol 1986; 30(9): 837.
6. Sodeinde O and Goguen JD. Genetic analysis of the 9.5 kilobases virulence plasmid of *Yersinia pestis*. Infect Immun 1988; 56(10): 2743.
7. 徐建国, 等. *E. coli* O157:H7 菌株的质粒 DNA 指纹图谱分析. 中华流行病学杂志 1988; 9(特刊4号): 133. (1989年12月27日收稿, 1990年1月20日修回)