

电穿孔法在细菌质粒转化中的应用

陈乃用

(中国科学院微生物研究所,北京)

许多细菌,包括工业上和医学上重要的细菌,由于没有合适的遗传转化系统,无法进行质粒转化工作,电穿孔法(电转化法)为解决这个难题提供了一条有效的新途径。

电穿孔法的基本原理是,当细胞放在电场中,细胞膜起着电容器的作用,电流不能通过(离子通道除外),随着电压升高,细胞膜组分被极化,并在细胞膜两边产生电位差。当电位差超过某一临界水平,细胞膜局部被击穿,形成一些瞬时的孔洞,孔径大小足以让大分子(和小分子如 ATP)进入或从细胞中排出^[1,2]。如果电场强度和脉冲持续时间不超过临界限度,这种通透性是可逆的,否则细胞可以遭到不可逆的损伤或死亡。

用高压电脉冲穿孔法把 DNA 引入真核细胞是 Wong 和 Neumann^[3,4] 1982 年首先在小鼠成纤维细胞中采用的。此后这项技术已广泛用于各类真核细胞^[5]。近年来电转化技术在细菌质粒转化研究中也取得很大进展^[6-8],它不仅操作简便、省时,而且适用范围广。从目前发展情况看,电转化法在原核细胞中的应用前景可能比在真核细胞中更具魅力。

细胞电穿孔法使用的脉冲主要有两种波形:指数衰减波和方波。方波(图 1b)是电压升到一定振幅,维持一定时间(脉冲宽度)然后回到零。指数脉冲(图 1a)是电压先升到峰值,然后按指数衰减,这两种波形的脉冲都能有效地击穿细胞^[9]。在细菌电转化研究中采用的多数是电容器放电的指数脉冲。方波发生器价格较贵,使用较少。本文主要介绍指数脉冲在细菌电

转化中的应用。

(一) 电学变数

指数脉冲(图 1a)由电容器放电产生^[10],电压随时间下降的关系是:

$$V_t = V_0 \cdot e^{-t/T}$$

其中 V_0 = 开始的峰电压; V_t = 时间 t (秒)时的电压; $T = RC$ 时间常数,即脉冲持续时间(秒);其中 R = 电路的电阻, C = 电路的电容。电路中电容较大或电阻较高,产生的脉冲也较长。实用上, T 是指电压从峰振幅 (V_0) 降到 $1/e$ (37%) 的时间。当 $t = T$, $V_t = V_0 \cdot e^{-1} = 0.37V_0$ 。

当穿过细胞的电压降达到一个临界值,细胞膜局部被击穿。这个电压降是电场强度(E)和细胞大小的函数。电场强度 E 和电极电位 V 的关系是: $E = V/d$; 其中 V = 电极间的电压; d = 电极间的距离。通常 d 固定在 0.05—0.4 cm。电极间隙愈窄, E 愈高。例如,当 $V = 2.5$ kV, $d = 0.2$ cm, $E = 2.5/0.2 = 12.5$ kV/cm。电场强度 E 和电容器放电电压一样随时间下降的关系是:

$$E_t = E_0 \cdot e^{-t/T}$$

由上可知,在电击中 E_0 和 T 是最重要的电学变数。 E 可以通过 V 或 d 来调节。脉冲持续时间 T 则随电路中的电容 (C) 和电阻 (R) 而改变。

指数脉冲电穿孔仪(图 2)实际上是将一组电容器充电到一定电压,然后向细胞悬液放电,放电的时间长度由电路中的电阻决定。市售的指数脉冲仪(如 Bio-

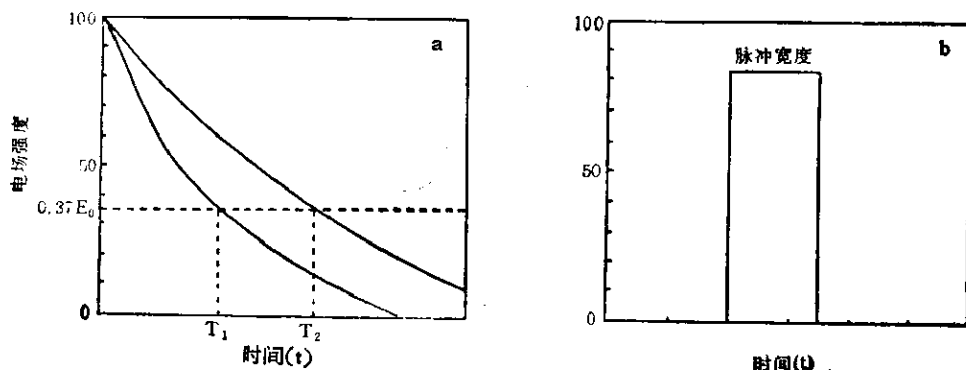


图 1 a. 指数衰减脉冲 b. 方波脉冲

T_1, T_2 = 电压降到 $1/e$ (~37%) 的 RC 时间常数

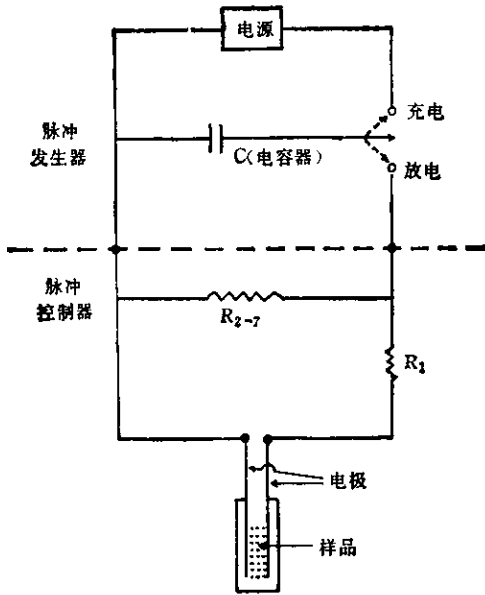


图2 指数脉冲电穿孔仪——电容器放电线路

Rad 生产的基因脉冲仪“Gene Pulsar”附带有脉冲控制器。电场强度可调至 12.5 kV/cm ($V = 2.5$ kV, $d = 0.2$ cm) 或更高,脉冲持续时间 T 从 0.1 ms 到 25 ms (毫秒)。脉冲控制器中有一组大小不同的电阻,每个电阻都和样品并联,另有一个固定电阻 (20 Ω) 和样品串联。并联的电阻可调节电容器两端的总电阻和控制电容器放电的时间常数,串联的电阻起限制电流保护电路的作用。

真核细胞电穿孔法常用的电场强度是 0.5—2kV/cm, 而细菌由于细胞体积小,需要较高的电场强度,通常为 6—12 kV/cm。例如,大肠杆菌^[6,10],当脉冲长度 T 定在 5 ms, 电场强度在 3 kV/cm 以下时,看不到质粒转化作用,以后随着电场强度提高,转化效率直线上升。电场强度每增加 1 kV/cm, 每微克质粒 DNA 的转化子数增加一倍,直到 12.5 kV/cm。同时,在电转化中,电场强度和脉冲长度是相互补充的。当电场强度分别固定在 7 kV/cm 和 12.5 kV/cm, 大肠杆菌达到最高转化效率 ($2-3 \times 10^9/\mu\text{g DNA}$) 的脉冲长度分别为 20 ms 和 5 ms, 电场强度较低,所需的脉冲较长。其他细菌的电转化,如弯曲杆菌^[11]、乳链球菌^[12,13] 等也都有类似的结果。

不过不同细菌对电穿孔的敏感性是很不相同的,有的细菌对电穿孔十分敏感,如保加利亚乳杆菌^[8]的最佳转化电场强度是 2 kV/cm, 当 $E = 2.5$ kV/cm 时, 50% 细胞死亡。又如蜡状芽孢杆菌 569 号^[14]细胞较大, 当 $E = 3.75$ kV/cm, $T = 2.7$ ms, 转化频率最高,细胞存活率 46.4%; 当 $E = 6.25$ kV/cm, $T = 2.4$ ms 时, 95% 细胞死亡。而有的细菌可耐极高电压,如

一种肠球菌(*Enterococcus hirae*)^[6,21] 的最高转化率是在 $E = 22$ kV/cm, E 低于 14 kV/cm 就看不到转化作用。这些性质可能和细胞壁、细胞膜组成以及细胞大小等因素有关。

细菌电转化通常只需电击一次,增加电击次数细胞死亡率增加,转化效率反而下降^[7,16,17]。

(二) DNA 和细胞

电转化时的质粒 DNA 用量在很大范围内和转化子数呈线性关系。大肠杆菌电转化中^[10], 质粒 DNA 用量在 10 $\mu\text{g/ml}$ 到 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 范围内, 转化子数和 DNA 用量呈线性关系, 转化效率均达到 10^9 转化子/ $\mu\text{g DNA}$ 以上。但在相同的转化体积中(细胞数相同) DNA 用量愈多, 转化子数也愈多, 即转化频率(转化子数/存活细胞数)和 DNA 浓度成正相关。当 DNA 浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$ 时, 转化频率为 1.6×10^{-6} 转化子/活细胞; DNA 浓度 1 ng/ml, 转化频率提高 100 倍; DNA 浓度 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 和 7.5 $\mu\text{g/ml}$, 转化频率分别达到 1.8×10^{-1} 和 7.8×10^{-1} 转化子/活细胞。在弯曲杆菌的类似实验中^[11]也证明, DNA 浓度在 20 ng 到 10 $\mu\text{g/ml}$ 范围内, 转化子数随 DNA 浓度上升的幅度至少为三个数量级, 甚至当 DNA 浓度达到 10 $\mu\text{g/ml}$, 这种上升趋势还没有停止迹象。革兰氏阳性的乳链球菌^[12,13]的情况稍有不同, DNA 浓度在 10 ng—1 $\mu\text{g/ml}$, 转化子数随 DNA 浓度直线上升, 以后上升趋势就平缓下来, 这种饱和现象可能和乳链球菌(静止期)培养中, 可透过 DNA 的细胞数较少有关。总的看来, 电转化中 DNA 用量达到饱和的浓度远比感受态细胞转化系统高, 说明这两个系统的转化机理是不同的。

质粒 DNA 大小从小于 3 kb 到 44 kb^[6] 的电转化效率都很高。线型 λ -DNA (48 kb) 对大肠杆菌的克分子转化效率为小质粒的 0.1%, 说明非常大的线型分子也能通过电转化进入细胞, 虽然转化效率要低一些。

大肠杆菌培养到不同密度都能用于电转化^[2,10], 但最好的结果是在对数期。电转化效率和细胞存活数均和转化前的细胞生长阶段有关。在对数生长期, 每个细胞对电击都非常敏感, 死亡率较高。但在存活的细胞中, 转化子的比例极高 (~80%)。当细胞进入对数后期, 细胞存活率上升, 转化效率也逐渐下降, 因此电转化的大肠杆菌以培养到对数中期较为合适。弯曲杆菌^[11], 干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)^[12], 土壤杆菌^[22,23], 棒杆菌类^[24,25] 各种葡萄球菌^[17] 以及一些芽孢杆菌^[16,22,30,49] 等都是培养到对数中期最好。然而, 有些革兰氏阳性细菌, 如乳链球菌^[12,13], 短芽孢杆菌^[10] 和梭状芽孢杆菌^[31,32] 等则培养到静止期或静止前期最适于电转化, 培养到对数期的细胞转化效率很低或不能电转化。

电转化中细胞浓度和微克 DNA 的转化子数关系很大。大肠杆菌每毫升细胞数从 0.8×10^8 提高到 8×10^9 细胞, 转化子数提高 10—20 倍。因此要得到较多的转化子, 细胞和 DNA 浓度均应提高。但在有些实验中要求转化效率高而转化频率低(例如在构建基因文库时^[10,11], 不希望有共转化), 则 DNA 用量应少于 10 ng/ml, 细胞浓度大于 3×10^{10} /ml。当然, 在要求转化频率高的实验中, DNA 最好用到 1—10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

在进行电转化时, 通常不需要把 DNA 提前加到细胞悬液中。据报道, DNA 在进入细胞前并不需要结合到细胞表面^[2,10]。反之, 预先加入 DNA 有时还会受到宿主细胞分泌的核酸酶的降解^[12]。但是, 一些葡萄球菌^[4,13], 在电击前把 DNA 和细胞在室温下共同保温 30 分钟, 让 DNA 结合到细胞表面, 可以得到最佳转化效率。

电击后 DNA 分子进入细胞也不需要很长时间, 电击后一分钟加入 DNase 也不会降低转化频率^[9]。梭状芽孢杆菌电击后立即用丰富培养液稀释培养 3 小时再涂皿, 可以大大提高转化效率^[12]。葡萄球菌^[12]电击后立即用 SMMP 50 [5.5 份 SMM (1mol/L 蔗糖, 40 mmol/L 马来酸, 40 mmol/L MgCl₂, pH6.5), 4 份 70% Panassay 培养液, 0.5 份 10% BSA] 预培养 90 分钟, 转化效果最好; 电击后放置一分钟再用 SMMP 50 稀释预培养物, 转化效率下降约 50%; 同时, 电击后用等渗培养液 SMMP 50 比用普通营养液预培养的转化效率提高约 80%。等渗培养液可能起着防止 DNA 从细胞中排出的作用。

(三) 电击介质

电击介质的组成对电穿孔和转化效率有很大影响。介质中最重要的是离子强度。离子强度决定介质的电导和脉冲持续时间。细菌电转化常用的脉冲时间常数 T 是 2.5—10 ms, 如果介质的离子强度太大, 电阻太小, 在强电场条件下, 往往会因为 T 太短而达不到电穿孔的目的。离子强度还决定电击时的电流和样品升温的速度, 加大电容量可以增加脉冲持续时间, 但同时也会使样品很快升温。由于细菌细胞很小, 通常需要用较高的电场强度 (6—12.5 kV/cm), 为了避免产热又达到一定的脉冲长度, 比较有效的方法是加大样品介质的电阻和限制电流。

细菌电转化常用的介质有磷酸盐缓冲液^[7,11,15,16,17], 或 HEPES (N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙烷磺酸) 缓冲液 (1—10mmol/L pH7—7.5)^[10,23,27,29,49,51], 以及在缓冲液中加入渗透剂蔗糖, 或直接以蒸馏水^[10,23,27] 或 10—15% 甘油^[10,28,32,37,38] 为介质等。这些介质均能用于电转化, 但不同细菌在不同介质中的转化效率显然是有差别的。例如, 大肠杆菌以蒸馏水为介质转化效率最高^[8,10], 介质中加防冻剂 10—15% 甘油对转

化效率没有明显影响。核状芽孢杆菌^[17]用 15% 甘油为介质比 SMP (270 mmol/L 蔗糖, 7 mmol/L K₂HPO₄, pH7.4, 1mmol/L MgCl₂, 15% 甘油) 的转化效率高 5—15 倍, 一些葡萄球菌^[17]则以 10% 甘油为介质转化效果最佳, 甘油过低 (5%) 或过高 (15—30%) 转化效率均下降。介质中加 CaCl₂ (10mmol/L), MgCl₂ (10mmol/L) 或 PEG (10—15%) 等, 转化效率也下降。但是, 蒸馏水和离子强度低的缓冲液, 如 1 mmol/L HEPES, 不能用于绿脓杆菌^[23]。因为用上述液体洗菌体时, 细胞会发生溶菌。加 15% 甘油可避免这种溶菌现象; 转化效率以 15% 甘油 1 mmol/L MOPS 缓冲液最高 (9.5×10^7 转化子/ μg DNA), 介质中加 1 mmol/L MgCl₂, 转化效率下降, McIntyre 和 Harlander^[17] 比较乳链球菌在不同电击介质中的电转化效率: EPB (0.5 mol/L 蔗糖, 7 mmol/L K₂HPO₄, pH 7.4, 1 mmol/L MgCl₂), EPM (0.3 mol/L 椰子糖, 5 mmol/L K₂HPO₄, pH7.4, 1mmol/L MgCl₂), HEB (272 mmol/L 蔗糖, 7 mmol/L HEPES, pH 7.4, 1 mmol/L MgCl₂) 和无离子水的电导值分别为 2.04, 1.43, 0.5, 0.07 mS/cm (毫西门子/cm), 在 $E = 17\text{kV}/\text{cm}$, $T = 5\text{ms}$ 电击条件下, 只有电导值最低的无离子水转化效率达到 4×10^7 转化子/ μg pGB301 DNA, 其他介质中的转化效率只有 10—20 转化子/ μg DNA。而嗜酸乳杆菌^[18]则以 HEB (1.5X) 和 EPB (2.5X) 为介质得到的转化子最多, MgCl₂ 有助于提高转化效率。从多数研究结果看, 离子强度低的介质对细菌电转化较为有利, 虽然 7mmol/L 磷酸盐缓冲液在一些文献中也是常见的。

电击介质中添加渗透剂蔗糖、椰子糖等对一些完整细菌的电转化似乎并无必要, 对转化效率影响也不大^[6,8]。对于冷冻保藏的绿脓杆菌^[23], 介质中加了蔗糖还会降低电转化效率。不过, 经过细胞壁减弱处理的细胞, 在电击介质中添加渗透剂则是必要的^[23]。详见第五节。

电脉冲产热 (焦耳) 问题在电转化中也是很重要的。电击时产热可能直接影响细胞的存活率。电转化时样品的开始温度对转化效率影响很大, 如弯曲杆菌^[11]和大肠杆菌^[10]在 0—4℃ 进行电击的转化效率比在室温下进行的至少提高 100 倍。但是, 一些葡萄球菌^[17]则在室温下电击的转化效率最高, 在 4℃ 电击, 转化效率下降到最佳值的 20%。

(四) 电转化法的基本操作步骤

大肠杆菌是电转化法中最成功的范例之一, 它的基本操作方法已成功地应用到许多其他细菌。现以大肠杆菌为例, 说明质粒 DNA 电转化的基本操作步骤^[10]:

1. 细胞的制备:

(1) 在 5 ml LB 培养基中接种大肠杆菌单菌落，在 37℃ 振荡培养 5 小时或过夜。

(2) 在 500 ml LB 培养基中接种上述菌种 2.5 ml, 在 37℃ 振荡培养到 $OD_{600} = 0.5-0.7$ (不同细菌应根据需要培养到最适转化的生长期)。

(3) 离心菌体并用冰冷 无菌 1 mmol/L HEPES (pH 7.0) 缓冲液洗菌体两次; 也可以用无菌冷蒸馏水洗菌体, 但水洗后的细菌沉淀较疏松, 离心后应立即倾除上清液以免菌体流失。

(4) 将菌体悬浮在无菌水或冰冷 1 mmol/L HEPES (pH 7.0) 中, 每毫升约 2×10^{11} 细胞。如果制备冷藏细胞, 可用冰冷 10% 甘油洗菌体一次再悬浮到 10% 甘油中, 菌悬液分装到无菌小离心管中, 放在 -80℃ 保藏备用。

2. 质粒 DNA 的电转化

(1) 将电脉冲仪(如 Gene Pulser) 调到 2.5 kV, 25 μF; 脉冲控制器调到 200 Ω 或 400 Ω 以控制脉冲长度。(不同细菌应分别找出最佳电场强度和脉冲时间常数)。

(2) 取 1 μl 质粒 DNA (5pg—0.5 μg) 加到新鲜或冻融细胞中在冰上混匀; 加到细胞中的 DNA 体积一定要小, 体积不应超过细胞总体积的 1/10, 否则转化效率会下降 2—3 倍。此外, DNA 中不应含有酚和其他有害杂质。

如果在 20 μl 细胞中加入的连接酶缓冲液超过 1 μl, 转化频率会下降至 1/10 以下。因此, 连接反应物在转化前最好用 0.25 μm 透析袋 (Millipore type VS) 对 10% 甘油 1 mmol/L EDTA (pH8) 透析 45 分钟, 转化效率可提高 10—700 倍^[44], 乙醇沉淀处理的效果则不理想。

(3) 将 DNA 和细胞转移到电转化专用的无菌小池中, 接上电极, 电极间距 0.2 cm, 或根据需要选用不同的电极间距。

(4) 按电钮施放指数电脉冲, 记录实际电压和脉冲时间常数。

(5) 取下小池立即加 1 ml SOC 培养液 (0.5% 酵母抽提物, 2% 胰酶解脲, 10 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L KCl, 10mmol/L MgCl₂, 10mmol/L MgSO₄, 20mmol/L 葡萄糖), 并用无菌移液管把菌悬液转移到无菌培养管中, 37℃ 振荡培养 30—60 分钟。

(6) 将适量转化培养物涂布到含抗生素的 LB 平板上选择转化子

(五) 实际应用和存在问题

据初步统计(表 1), 目前电转化成功的革兰氏阴性和阳性细菌已有 80 多种, 百余菌株, 其中大部分是野生型菌株。由于电转化方法的不断改进, 上述名单还在继续增加。当然并非所有的细菌都能顺利地进

电转化, 有些菌株的电转化目前仍有困难^[18, 22, 49]。一般地说, 革兰氏阴性细菌比细胞壁厚实的阳性细菌电转化容易些。下面讨论电转化法在实际应用中常见的一些问题。

首先, 不同受体菌存在的限制-修饰系统往往因质粒的来源不同而给转化带来困难。这在研究新的转化系统和利用穿梭质粒进行转化时是最常见的。例如从大肠杆菌制备的 DNA 转化其他宿主时经常会遇到限制性障碍^[11, 22, 55]。这个问题有时可以将 DNA 在受体菌中重复转化几次进行修饰或用修饰酶缺陷型 (*dcm⁻ dam⁻*) 大肠杆菌制备质粒 DNA^[61] 来克服, 但有的还必须对质粒 DNA 进行改造才能解决。此外, 质粒 DNA 能否在新宿主中复制和表达也是应该注意的。

其次, 有些细菌能分泌非专性核酸酶, Chassy 和 Flickinger^[13] 发现, 减少 DNA 和受体细胞接触时间, 可以提高干酪乳杆菌的电转化效率。他们认为这是减少核酸酶降解质粒 DNA 的缘故。霍乱弧菌能产生 DNase 酶的菌株是无法进行质粒转化的。Marcus 等^[49] 发现在电击介质中添加等渗蔗糖 (272mmol/L) 能影响宿主的限制性系统。介质中只要加了蔗糖, 质粒 DNA 和宿主细胞一起在 4℃ 放置 20 分钟也不影响转化效率, 介质中其他组分则关系不大。

细胞的物理屏障如细胞壁和荚膜等也可能会妨碍电击穿 Powell 等^[21] 用溶菌酶对一些链球菌的细胞壁稍稍进行消化, 有助于电转化时 DNA 进入细胞。这样的处理是非常缓和的, 因此细胞壁再生也不用很长时间。但用溶菌酶处理另一些革兰氏阳性细菌, 如嗜热链球菌^[43]、短芽孢杆菌^[18] 等并不能提高转化效率有时甚至更差。

McIntyre 和 Harlander^[12] 的试验表明, 在强电场下, $E = 17kV/cm, T = 5ms$, 在此条件下, 以蒸馏水或 10% 甘油为介质, 电击静止生长期的乳链球菌, 使转化效率提高到 10^3 转化子/μg DNA。以后他们^[12] 又改变乳链球菌的培养条件, 在化学合成培养基中补加 0.24% DL-苏氨酸, 又使电转化效率提高了将近 10 倍。

在细菌培养时添加 L-苏氨酸, L-赖氨酸或甘氨酸可改变细胞壁肽聚糖组成, 减弱细胞壁的结构, 有利于电转化。但培养基中的甘氨酸超过 2%, 乳链球菌不能生长。Holo 和 Nes^[22] 发现, 如果在培养基中同时加入 0.5 mol/L 蔗糖, 即使甘氨酸高达 3%, 乳链球菌乳脂亚种 BC101 仍能生长, 甘氨酸浓度愈高, 电转化效率也愈高 (2.7×10^7 转化子/μg DNA)。但另一些菌株对甘氨酸更敏感, 添加蔗糖也不增加其耐受力。

棒杆菌类有复杂的细胞表面结构, 在紧密交联的肽聚糖外面还有棒杆菌分枝酸 (Corynemycolic acid)

表1 电穿孔法转化的细菌名单

细菌学名	文献号	细菌学名	文献号
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	60	<i>Leuconostoc cremoris</i>	8
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	27,28	<i>L. dextranicum</i>	7
<i>A. tumefaciens</i>	15,22,27,28,45	<i>L. lactis</i>	7
<i>Azospirillum brasilense</i>	48	<i>L. paramesentoides</i>	59
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	49	<i>Listeria innocua</i>	7,52
<i>B. anthracis</i>	8	<i>L. ivanovii</i>	54
<i>B. brevis</i>	18	<i>L. monocytogenes</i>	7,52
<i>B. cereus</i>	7,8,14,24	<i>L. seeligeri</i>	54
<i>B. circulans</i>	47	<i>Mycobacterium bovis</i>	53
<i>B. licheniformis</i>	8	<i>M. leprae</i>	8
<i>B. sphaericus</i>	29	<i>M. smegmatis</i>	8
<i>B. subtilis</i>	7,8,16,49	<i>Myxococcus xanthus</i>	8
<i>B. thuringiensis</i>	8,24,30	<i>Pasteurella haemolytica</i>	40
<i>Bacteroides ruminicola</i>	50	<i>Pediococcus acidilactici</i>	7
<i>B. uniformis</i>	50	<i>Propionibacterium jensenii</i>	7
<i>Bordetella pertussis</i>	8,31	<i>Proteus mirabilis</i>	22,45
<i>Bredyriobium japonicum</i>	32,61	<i>P. vulgaris</i>	22,45
<i>Brevibacterium flavum</i>	34,51	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20,23
<i>Br. lactofermentum</i>	8,33,34,46,51,55	<i>Ps. chlororaphis</i>	22,45
<i>Br. stations</i>	51	<i>Ps. oxalaticus</i>	22,45
<i>Campylobacter coli</i>	11	<i>Ps. putida</i>	22,23,45
<i>C. jejuni</i>	11	<i>Rhizobium meliloti</i>	8
<i>Cellulomonas flavigena</i>	52	<i>Rhodospirillum molischianum</i>	22,45
<i>Citrobacter freundii</i>	22,45	<i>Salmonella typhimurium</i>	44
<i>Clostridium perfringens</i>	37,38	<i>Serratia marcescens</i>	22,45
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	8,33,34,35,36,51,55	<i>S. plymuthica</i>	22,45
<i>C. molassecola</i>	34	<i>Staphylococcus aureus</i>	7,8,17
<i>Enterobacter aerogenes</i>	22,45	<i>St. carnosus</i>	17
<i>Enterococcus faecalis</i>	7,20	<i>St. epidermidis</i>	17
<i>E. faecium</i>	8	<i>St. staphylolyticus</i>	17
<i>E. hirae</i>	62	<i>Streptococcus cremoris</i>	21,25,41
<i>Erwinia carotovora</i>	8,22,45	(现名 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>)	
<i>E. herbicola</i>	8	<i>Str. lactis</i>	7,12,13,21
<i>E. stewartii</i>	8	(现名 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>)	
<i>Escherichia coli</i>	2,10,20,22,44,45,56	<i>Str. faecalis</i>	43
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8,22,45	<i>Str. pneumoniae</i>	46
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	7	<i>Str. pyrogenes</i>	42
<i>L. bulgaricus</i>	8	<i>Str. sanguis</i>	42,43
<i>L. casei</i>	7,15	<i>Str. thermophilus</i>	8,43
<i>L. curvatus</i>	39	<i>Vibrio cholerae</i>	26
<i>L. fermentum</i>	7	<i>Xanthomonis campestris</i>	22,45
<i>L. plantarum</i>	7		
<i>L. reuteri</i>	7		

和脂质形成的防透层;对溶菌酶具有抗性。在细菌培养时加细胞壁形成抑制剂,如青霉素 G(1U/ml)可以阻止细胞壁合成和形成原生质体^[11],或加甘氨酸取代肽聚糖中的 D-丙氨酸,使交联结构变松,以及加异烟酸改变分枝酸和肽聚糖的合成等均能提高转化效

率。最近 Haynes 和 Britz 报道^[12],在培养基中加 0.1 或 0.5% Tween 80 代替甘氨酸和异烟酸,可以减少 DNA 进入的物理障碍,使转化效率大幅度提高。Tween 80 的作用尚不清楚,它可能和改变棒杆菌分枝酸的组成有关。

葡萄球菌有坚固的细胞壁,质粒转化比较困难。金黄色葡萄球菌虽然可以电转化,但效率极低(每微克质粒 DNA 仅得到一个转化子)^[1]。表皮葡萄球菌是抗溶葡萄球菌酶(lyso-staphan)的,转化更加困难。Augustin 和 Götz^[17]用改进电转化条件的方法,使四种葡萄球菌(见表1)的转化效率分别达到 $5 \times 10^1 - 10^3$ 转化子/ μg DNA。改进措施包括:用10%甘油为介质,电击前 DNA 和细胞在室温下共保温30分钟,让 DNA 结合到细胞表面,电击后立即用等渗培养基稀释预培养90分钟等。

此外,枯草芽孢杆菌^[16]在电击前反复冻融数次也有助于 DNA 进入细胞。

许多细菌表面的荚膜也可能妨碍 DNA 的进入,有些荚膜可以用改变培养条件或用化学法和加酶法除去之;但有些细菌的荚膜并不妨碍 DNA 进入细胞,如肺炎克氏杆菌无论有没有粘多糖荚膜都很容易用电穿孔法进行质粒转化^[6]。

细菌的种类繁多,代谢系统和细胞壁结构各不相同,因此在研究一个新的菌种时可能还会遇到各种不同的问题。不过电穿孔法所需设备简单,研究方法也比研究其他转化方法方便、省时,在发展新的转化系统时是值得首先尝试的。

最后,电穿孔法除了用于细菌质粒转化,还可以用来消除(curing)宿主细胞中的质粒 DNA,其效果比用干扰 DNA 复制的试剂吡啶橙、溴乙锭等效果好^[11];以及通过电穿孔(电转移)^[6,12]还能把细菌质粒 DNA 从一个菌株直接转移到另一菌株等。

参 考 文 献

- 1 Knight D E & M C Scrutton: *Biochem. J.*, 234: 497—506, 1986.
- 2 Calvin N M & P C Hanawalt: *J. Bacteriol.*, 170: 2796—2801, 1988.
- 3 Neumann E et al.: *EMBO J.*, 7: 841—845, 1982.
- 4 Wong T K & E Neumann: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 107: 584—587, 1982.
- 5 Andreason G L & G A Evans: *BioTechniques*, 5: 650—659, 1988.
- 6 Shige-kawa K & W J Dower: *BioTechniques*, 3: 742—751, 1988.
- 7 Luchansky J B et al.: *Mol. Microbiol.*, 2: 537—646, 1988.
- 8 Chassy B M et al.: *TIBTECH*, 6: 303—309, 1988.
- 9 Liang H et al.: *BioTechniques*, 6: 550—558, 1988.
- 10 Dower W J et al.: *Nucl. Acids Res.*, 15: 6127—6145, 1988.
- 11 Miller J G et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 856—860, 1988.
- 12 McIntyre D A & S K Harlander: *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 604—610, 1989.
- 13 McIntyre D A & S K Harlander: *Appl. Environ.*

- Microbiol.*, 55: 2621—2626, 1989.
- 14 Belliveau B H & J T Trevois: *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 1649—1652, 1989.
- 15 Chassy B M & J L Flickinger: *FEMS Microbiol. Lett.*, 44: 173—7, 1987.
- 16 Brigidi P et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 67: 135—3, 1990.
- 17 Augustin J & F Götz: *FEMS Microbiol. Lett.*, 66: 203—8, 1990.
- 18 Takagi H et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 53: 3099—3100, 1989.
- 19 Böttger E C: *Bio Techniques*, 6: 878, 1988.
- 20 Fieldler S & R Wirth: *Anal. Biochem.*, 170: 38—44, 1988.
- 21 Powell I B et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 655—660, 1988.
- 22 Wirth R & S Fieldler: *Mol. Gen. Genet.*, 216: 175—177, 1989.
- 23 Farinha M A & A M Kropinski: *FEMS Microbiol. Lett.*, 70: 221—226, 1990.
- 24 Schurter W et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 218: 177—181, 1989.
- 25 Holo H & I F Nes: *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 3119—3123, 1989.
- 26 Marcus H et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 68: 149—154, 1990.
- 27 Mattanovich D et al.: *Nucl. Acids Res.*, 17: 6747, 1989.
- 28 Nagel R et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 67: 325—328, 1990.
- 29 Taylor L D & W F Jr Burke: *FEMS Microbiol. Lett.*, 66: 125—128, 1990.
- 30 Bone E J & D J Ellar: *FEMS Microbiol. Lett.*, 58: 171—8, 1989.
- 31 Zealey G et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 56: 123—126, 1988.
- 32 Hattermann D R & G Stacey: *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 833—836, 1990.
- 33 Dunican L K & E Shivanan: *Bio/Tech.*, 7: 2067—70, 1989.
- 34 Bonamy C et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 66: 263—70, 1990.
- 35 Liebl W et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 65: 299—304, 1989.
- 36 Wolf H et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30: 283—289, 1989.
- 37 Kim, A Y & H P Blaschek: *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 360—365, 1989.
- 38 Phillip-Jone M K: *FEMS Microbiol. Lett.*, 66: 221—6, 1990.
- 39 Vogel R F et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 59: 289—292, 1990.
- 40 Craig F F et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 135: 2885—2890, 1989.
- 41 Van der Lelie D et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 865—871, 1988.
- 42 Suvorov A et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 58: 95—100, 1988.
- 43 Somkuti G A & D H Steinberg: *Currens Microbiol.*

- 19: 91—95, 1989.
44. Taketo A: *Biochim. Biophys. Acta*, 949: 313—324, 1988.
45. Fiedler S et al.: In "Genetic Transformation and Expression" (Butler L D et al. Eds.) Intercept, pp 65—69, 1989.
46. Bonnassie S et al.: *ibid*, pp 71—75, 1989.
47. Aubert E & J Davis: *ibid*, pp 77—83, 1989.
48. Vande Broek A et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 61: 177—181, 1989.
49. Vehmaanperä J: *FEMS Microbiol. Lett.*, 61: 165—169, 1989.
50. Thomson A M & H J Flint: *FEMS Microbiol. Lett.*, 61: 101—104, 1989.
51. Kurusu Y et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 54: 443—447, 1990.
52. Alemohammad S J & J T Pembroke: *Biotechnol. Tech.*, 4: 147—148, 1990.
53. Lugosil L et al.: *Tubercle*, 70: 159—170, 1989.
54. Alexander J E et al.: *Appl. Microbiol.*, 10: 179—181, 1990.
55. Haynes J A & M L Britz: *FEMS Microbiol. Lett.*, 61: 329—334, 1989.
56. Jacobs M et al.: *Nucl Acids Res.*, 18: 1653, 1990.
57. Heery D M et al.: *Nucl. Acids Res.*, 17: 10131, 1989.
58. Luchansky J B et al.: *BIO-RAD Bulletin*, 1350, 1988.
59. David S et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 1483—1489, 1989.
60. Lalonde G et al.: *Am. J. Vet. Res.*, 50: 1957—1960, 1989.
61. Guerinot M L et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 221: 287—290, 1990.
62. Soliz M & D Bienz: *TIBS*, 15: 175—177, 1990.
63. Summers D K & H L Withers: *Nucl. Acids Res.*, 18: 2192, 1990.