

DH10B 菌株高效电转化条件探究

The Study of Optimal Conditions of Electroporation in *Escherichia coli* DH10B Strain

张 洋^{1,3}, 王志强², 刘 斌^{1,2}, 张晓军¹, 姜 枫², 相建海^{1*}

ZHANG Yang^{1,3}, WANG Zhi-Qiang², LIU Bin^{1,2}, ZHANG Xiao-Jun¹, JIANG Feng² and XIANG Jian-Hai^{1*}

1 中国科学院海洋研究所, 青岛 266071

2 北京华大基因组研究中心, 北京 101300

3 中国科学院研究生院, 北京 100039

1 Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China

2 Beijing Genomics Institute, Beijing 101300, China

3 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

摘 要 以 pUC19、pECBAC1、pCLD04541 DNA 以及 3 个不同大小的 BAC DNA 为材料, 研究了 *E. coli* DH10B 菌株在 5 个不同脉冲电场下的转化效率。研究发现, 随着 DNA 片段大小的增加, 最高转化效率和最适场强迅速减小。利用 DH10B 细胞转化 pUC19 DNA 的最适场强是 21 kV/cm, 而 190 kb BAC DNA 仅为 13 kV/cm。在最适场强下, 40 kb BAC DNA 的转化效率约是 190 kb BAC DNA 的 50 倍。通过大量数据绘制了不同因素影响下转化效率的变化曲线, 优化了 *E. coli* DH10B 菌株电转化条件, 为质粒的重组转化以及大片段基因组文库的构建奠定了基础。

关键词 感受态细胞, 电转化, 转化效率, 脉冲电场强度, 质粒 DNA

中图分类号 Q939.9 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)02-0347-05

Abstract In order to optimize the conditions of construction BAC library, the transformation efficiency of *E. coli* DH10B was studied in this paper. Our data prove much higher competence of electroporation (reaches 2.19×10^{10} cfu/ μ g pUC19 DNA) when harvesting the cells between an OD_{550} of 0.7 ~ 0.8. Five different electric field strength (from 9 kV/cm to 25 kV/cm) and three different sized plasmid vector DNAs including pUC19 DNA, pECBAC1 DNA and pCLD04541 DNA, as well as three bacterial artificial chromosomes (BACs) ranging from 40 to 190 kb and their mixture were used to discover the transformation efficiency changes under various conditions. Our data show maximum transformation efficiency and optimal electric field strength of plasmid DNAs drop dramatically with increasing size of the DNA. Molecules of 190 kb transform more than 50-fold less well, on a molar basis, than molecules of 40 kb. And the optimal voltage gradient is strongly dependent on the different sized molecules, for instance, pUC19 reaches the highest transformation efficiency at 21 kV/cm, while the 180 kb BAC DNA gets its best efficiency at 13 kV/cm. This paper demonstrates that conditions may be selected which increase the average size of BAC clones generated

Received: August 28, 2006; Accepted: November 1, 2006.

This work was supported by the grants from the National Natural Sciences Foundation of China (No. 30230280, 30200213) and the National High Technology Research and Development Program of China (No. 2005AA626014).

* Corresponding author. Tel: +86-532-82898568; Fax: +86-532-82898578, E-mail: jhxiang@ms.qdio.ac.cn

国家自然科学基金资助(No. 30230280, 30200213), 国家高技术研究与发展项目基金资助(No. 2005AA626014).

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

by electroporation and could be widely applied in large-insert genome library construction.

Key words competent cell, electroporation, transformation efficiency, electric field strength, plasmid DNA

转化是分子克隆中将外源 DNA 导入受体细胞的关键技术。自 1970 年 Mandle 和 Higa 发现用 CaCl_2 处理的细胞可以被 λ 噬菌体 DNA 转染后^[1], 1972 年和 1973 年 Cohen 等人用同样的方法首次成功地将 R 因子和重组质粒 DNA 导入大肠杆菌细胞 (*Escherichia coli*) 从而奠定了遗传转化技术^[2,3]。转化的方法很多,如氯化钙法、Hanahan 法^[4]和 Inoue 法^[5]等都可以满足一般实验需求,但这些方法转化效率较低,最高可达到 $10^7 \sim 10^8$ cfu/ μg 质粒 DNA^[6,7],且操作复杂,可重复性不高。而建立大片段基因组文库,如 BAC 文库,则需要用转化率更高、结果更稳定的电转化方法^[8]。

电转化的基本原理是利用瞬时脉冲电场作用于受体细胞,使细胞膜组分被极化,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,形成一些可逆孔洞,孔径大小足以让大分子和小分子进入或从细胞中排出^[9-11]。随着脉冲场强的不断增强,虽然可增加 DNA 的导入,但也不可避免地造成细胞的大量死亡。当脉冲场强和脉冲长度以一定的方式组合而导致 50%~70% 的细胞死亡时,转化效率最高,可以达到 10^{10} cfu/ μg 质粒 DNA 以上^[12,13]。

影响电转化的因素很多,如细菌的属性^[14]、生长周期、转化时所加脉冲场强^[15]、质粒 DNA 的大小^[16]和浓度^[17]。目前系统研究不同大小的质粒 DNA 与转化效率之间关系的资料非常少。本实验以探索构建大片段基因组文库中的关键技术——电转化为目的,详细研究了影响感受态细胞高效转化的因素,并以 pUC19 DNA、pECBAC1 DNA、pCLD04541 DNA 以及 3 个不同大小的 BAC DNA 为材料研究了转化效率随脉冲场强变化的规律,得出了最优转化条件,同时也为其它基因转化技术提供了借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 感受态细胞与质粒:感受态细胞 DH10B 由本实验室保种,pUC19 标准品质粒(2.7kb,10pg/ μL)购自 Invitrogen 公司,pECBAC1 DNA(7.4kb)和 pCLD04541 DNA(27.6kb)由美国德州 A&M 大学张洪斌教授惠赠。大小分别为 40kb、80kb 和 190kb 的

BAC DNA 由北京华大基因组研究中心保存。

1.1.2 试剂:质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司,BAC DNA 提取试剂盒购自 Sigma 公司,酵母提取物和蛋白胨为 Oxoid 公司产品,Not I 限制性内切酶、标准分子量购自 NEB 公司,其它试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器 电脉冲仪:Bio-Rad 公司生产的 Micropulser;分光光度计:Nano Drop 1000 Spectrophotometer;脉冲场电泳仪:CHEF MAPPER,Bio-Rad 公司产品;纯水系统:Millipore 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 感受态细胞的制备:从超低温冰箱取出 DH10B 菌种在无抗性的培养基平板上划线,37℃ 倒置培养 14~18h。挑取个体圆润有光泽的单菌落接种 10mL 无抗性液体培养基,37℃ 200r/min 培养 12~14h。将培养物以 1:100 的比例接种无抗性液体培养基 YENB(Yeast Extract and Nutrient Broth),37℃ 200r/min 培养至 OD_{550} 达到 0.7~0.8 时,取出培养物,立即冰浴 20min,4℃ 4000r/min 离心 20min,再用等体积的预冷的超纯水重悬细胞,4℃ 4000r/min 离心 20min 弃上清。用等体积的预冷的 10% 甘油重悬细胞,4℃ 5000r/min 离心 20min 弃上清,每升培养物以 2mL 10% 预冷甘油重悬,每管 40 μL 分装后液氮或干冰-乙醇浴速冻 3min 放入低温冰箱保存。

1.2.2 质粒 DNA 提取、鉴定和定量:小量制备 BAC DNA 通过琼脂糖凝胶电泳检测所提取的质粒 98% 以上为超螺旋结构。Not I 酶切后脉冲场电泳,条件为 $0.5 \times \text{TBE}$,电压 6V/cm,初始时间 5s,结束时间 15s,泵值 80,14℃ 电泳 16h,与 Lowrange、Midrange 和 λ DNA 标准分子量比较,测定其大小分别为 40kb、80kb 和 190kb。采用以下 2 种方法对质粒 DNA 进行定量:(1)用已知确切浓度的若干标准品作为参照进行电泳,Quantity One 软件测定质粒 DNA 的浓度;(2)Nano Drop 1000 测定质粒 DNA 浓度。用 TE 稀释到 50ng/ μL ,存于 -20℃ 冰箱。

1.2.3 电转化方案:将 1 μL 质粒 DNA(根据质粒 DNA 片段的不同大小,采用 2~3 个不同浓度:2pg/ μL 、10pg/ μL 、100pg/ μL 、500pg/ μL 、1ng/ μL 、2ng/ μL 、10ng/ μL 、50ng/ μL)加入到 40 μL 感受态细胞中,混合均匀后转入预冷的 1mm 电极杯,避免产生气泡,调

节到适当脉冲场强度,电击后记录脉冲时间(一般为 4~6ms)并迅速加入 1mL 常温 SOC 培养基,37℃ 200r/min 培养 1h。优化转化条件时,每个试验条件下重复 6 次转化,每次重复分别在 3 个平板上利用点板的方法各点 9 个不同体积的转化菌液,即相当于每种质粒在特定的一个场强下有 $6 \times 3 \times 9$ 个重复,计算平均转化效率。

1.2.4 点板培养计算转化效率 根据所加质粒 DNA 的浓度不同,作不同稀释后,将平板分成 3 个区域,每个区域分别取 1 μ L、5 μ L、10 μ L 菌液点在平板上(每个区域点 3 次,即一个平板上有 9 个统计数据),37℃ 倒置培养 12~18h,计数并按照以下公式计算转化效率(以 pUC19 为例)。

$$\frac{\text{CFU on plate}}{\text{pg pUC19 DNA}} \times \frac{1 \times 10^6 \text{ pb}}{\mu\text{g}} \times \frac{\text{volume of transformants}}{\text{volume plated}} \times \text{dilution factor}$$

2 结果

2.1 脉冲场强对 pUC19 DNA 转化效率的影响

脉冲电场强度是影响转化效率的一个重要因素。在其它条件未改变的情况下,随着场强的增大,转化效率会相应增加,但当场强增加到一定程度时,细胞存活率下降,抵消了转化效率的增长,转化效率随之呈现下降趋势。实验中用 1 μ L pUC19 DNA(2 pg/ μ L)与 40 μ L 处于稳定期的冻存感受态细胞混合均匀,分别用 9~25kV/cm 的 5 个不同脉冲场强进行电转化。结果如图 1 所示,当外加脉冲场强在较低的 9kV/cm 时,转化效率仅有 4.09×10^9 cfu/ μ g pUC19 DNA。随着场强的升高转化效率显著增加,当场强升高到 21 kV/cm 时,平均转化效率最高,达到 1.22×10^{10} cfu/ μ g pUC19 DNA,场强继续升高到 25 kV/cm 时,转化效率急剧下降至 4.37×10^9 cfu/ μ g pUC19 DNA,说明细胞大量死亡。从图中还可以看出,场强在 13~21kV/cm 范围内转化效率没有发生剧烈变化,即转化效率对脉冲场强不十分敏感。而在低场强(9kV/cm)和高场强(25kV/cm)下,转化效率明显下降。说明小质粒对电压的耐受性较高,可以在很宽的脉冲场强中保持较高的转化效率。

2.2 质粒 DNA 的大小对转化效率的影响

在构建大片段基因组文库时,虽然进行了 2 次片段筛选以去除较小片段,但是片段大小仍不可避免地存在差异。为了使大分子量 DNA 片段能够尽可能多地得到转化,实验中以 pUC19 DNA 作为转化参照,利用构建 BAC 文库常用的 pECBAC1 和

pCLD04541 载体以及 3 个大小不同的 BAC DNA 在 5 个不同大小的脉冲场强下进行条件优化。每个试验条件下重复 6 次转化,每次重复中又分别在 3 个平板上利用点板的方法各点 9 个不同体积的转化菌液,即相当于每种质粒在特定的一个场强下有 $6 \times 3 \times 9$ 个重复,计算结果表明转化效率稳定。如表 1 所示,大小为 7.4kb 的载体 pECBAC1 在 17kV/cm 时达到最高转化效率。随着质粒 DNA 的增大,最高转化效率向低场强偏移,80kb 和 190kb 的 BAC DNA 的最高转化效率出现在 13kV/cm。总体上,转化效率从 2.7kb 的 1.22×10^{10} cfu/ μ g pUC19 DNA 降低到 190kb 的 5.61×10^6 cfu/ μ g BAC DNA,下降了近 2.2×10^3 倍。通过简单计算还可以看出,如果把质粒 DNA 的分子量作为一个衡量参数,那么当质粒从 2.7kb 增加到 27.6kb 时,转化效率下降了约 27 倍,当质粒分子量由 80kb 增大到原来的 2.4 倍(190kb)转化效率下降了近 19 倍。说明随着质粒分子量的增大,转化效率下降的速率也显著增加。

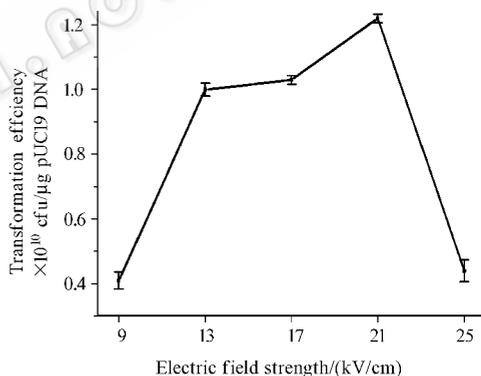


图 1 不同脉冲场强对转化效率的影响

Fig.1 Transformation efficiency affected by different electric field strength

将不同大小的质粒在各个场强下的转化效率以百分数的形式作图(图 2),可以直观地看出,大小为 7.4、27.6 和 40 kb 的质粒在场强为 17 kV/cm 时转化效率最高,此时 80 kb 和 190 kb 的 BAC DNA 转化效率仅为最高转化效率的 68% 和 20%。而随着质粒 DNA 的增大,最高转化效率向低场强偏移。在场强为 13 kV/cm 时,80 kb 和 190 kb 的 BAC DNA 转化效率达到最高,而此时 pECBAC1、pCLD04541 和 40 kb 的 BAC DNA 的转化效率分别只有最高转化效率的 49%、44% 和 64%。在大片段基因组文库的构建中,大分子和小分子 DNA 片段的相对转化效率是影响文库质量的重要因素。因此,采用片段选择和低电压转化的方法可以提高文库的平均插入片段的大

小。从图中还可以看出,随着质粒的增大,峰形愈窄,说明质粒越大,对场强的敏感性越高,只有找到

最适场强,才能得到比较满意的转化效果。

表 1 各电场强度下,不同分子量的质粒 DNA 对转化效率的影响

Table 1 Transformation efficiency (cfu/μg DNA) of different sized DNA by electroporation at different voltages

kV/cm	pUC19	pECBAC1	pCLD04541	40 kb BAC	80 kb BAC	190 kb BAC
9	$(4.09 \pm 1.22) \times 10^9$	$(1.57 \pm 0.23) \times 10^8$	$(2.90 \pm 0.29) \times 10^7$	$(1.95 \pm 0.50) \times 10^7$	$(1.02 \pm 0.16) \times 10^7$	$(8.54 \pm 0.12) \times 10^5$
13	$(1.00 \pm 0.07) \times 10^{10}$	$(8.03 \pm 0.35) \times 10^8$	$(1.94 \pm 0.16) \times 10^8$	$(1.93 \pm 0.25) \times 10^8$	$(1.05 \pm 0.15) \times 10^8$	$(5.61 \pm 0.21) \times 10^6$
17	$(1.03 \pm 0.10) \times 10^{10}$	$(1.63 \pm 0.12) \times 10^9$	$(4.43 \pm 0.15) \times 10^8$	$(3.02 \pm 0.33) \times 10^8$	$(7.19 \pm 0.13) \times 10^7$	$(1.11 \pm 0.19) \times 10^6$
21	$(1.22 \pm 0.04) \times 10^{10}$	$(1.55 \pm 0.11) \times 10^9$	$(3.26 \pm 0.13) \times 10^8$	$(1.71 \pm 0.25) \times 10^8$	$(4.80 \pm 0.15) \times 10^7$	$(1.92 \pm 0.26) \times 10^5$
25	$(4.37 \pm 0.84) \times 10^9$	$(1.16 \pm 0.57) \times 10^9$	$(1.80 \pm 0.21) \times 10^8$	$(2.90 \pm 0.23) \times 10^7$	$(1.04 \pm 0.11) \times 10^7$	$(1.50 \pm 0.34) \times 10^4$

* 通过转化不同浓度的质粒 DNA 得到的转化效率相同,来确保感受态细胞过饱和(在实验中保证感受态细胞过饱和)。

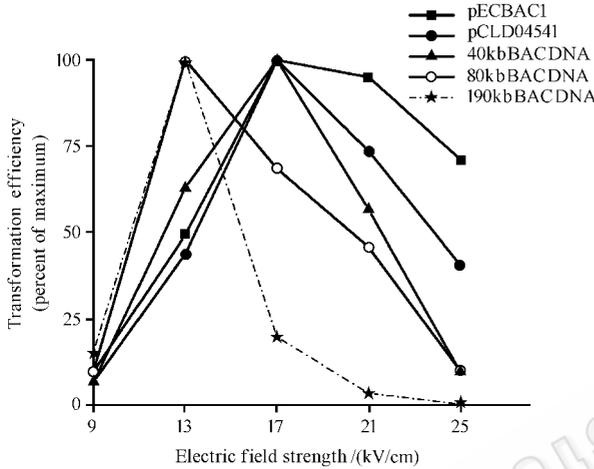


图 2 五种质粒 DNA 在不同脉冲场强下的转化效率

Fig. 2 Transformation efficiency of five different sized plasmid DNA (percent of maximum)

2.3 混合质粒 DNA 的转化效率

构建文库时,连接产物是不同大小 DNA 片段的混合物,为了更好地探索质粒大小、转化效率与脉冲场强之间的对应关系,我们采用等摩尔的质粒 DNA 混合物对电转化过程进行了优化。

将等摩尔的 pUC19 DNA、pCLD04541 和 190 kb 的 BAC DNA 混合均匀后,取 1μL 与 40μL 冻存感受态混合均匀(保证感受态细胞过饱和),按不同脉冲场强进行电转化。复苏后分别取相同体积的菌液点在氨苄青霉素、四环素和氯霉素抗性的培养基平板上,37℃倒置培养 12~18 h 后分别计算转化效率。结果发现,混合物中 3 种质粒 DNA 的转化效率随脉冲场强的变化趋势与 2.2 中得出的结果基本一致(图 3),即在感受态细胞过饱和的情况下,一种质粒的转化效率受其它质粒的影响很小。

3 讨论

文献中报道的感受态细胞的制备一般采用无

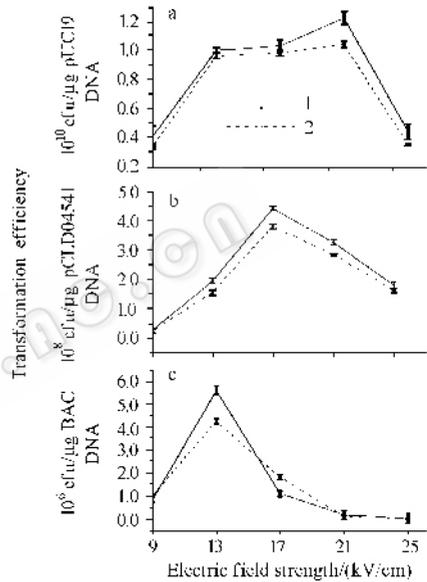


图 3 三种质粒单独转化和混合转化的效率比较

Fig. 3 Transformation efficiency of mixed different sized plasmid DNA

1 : individual plasmid DNA ; 2 : plasmid DNA mixture. a : pUC19 DNA ; b : pCLD04541 DNA ; c : 190 kb BAC DNA.

Mg²⁺ 的 SOB 培养基,但在实际实验中,发现其不但配制比较复杂而且制备的感受态细胞转化效率并不十分理想。为此,实验中采用营养丰富的无盐培养基 YENB 培养感受态细胞。YENB 培养基营养丰富,可以满足大部分细胞的生长需要,是一种应用很广泛的培养基。用它制备的感受态细胞不仅生长状态良好,而且由于没有盐离子的存在,对洗涤的要求不是很严格,感受态细胞的转化效率明显高于传统的 SOB 培养基。研究发现,转化效率随细胞生长时期的变化呈现一个很窄的峰形,采用对数中期(OD₅₅₀ = 0.7~0.8)的细胞制备的感受态转化效率最高,达到 2.19 × 10¹⁰ cfu/μg pUC19 DNA。经液氮或干冰-乙醇浴速冻后,转化效率也能够稳定在 1.0 × 10¹⁰ cfu/μg pUC19 DNA 以上,90d 无明显下降,基本达到

或超过了商品感受态细胞的质量。

实验中发现,由于复苏后的细菌很脆弱,涂板过程中会对细菌造成不同程度的损害,严重影响转化效率的精确计算。因此,在实验中用点板法替代了传统的涂板法,即将不同稀释度的菌液直接滴到培养基平板的一个区域,待菌液被完全吸收后,再放到 37 °C 温箱倒置培养。这样既把对细菌的伤害降低到最小程度,同时平板也得到了更充分利用,减少了工作强度和实验费用。

在对质粒 DNA 大小与转化效率关系的研究中发现,随着质粒 DNA 的增大,转化效率急剧减小,而且最高转化效率向低脉冲电场强度偏移。混合质粒转化的实验告诉我们,当感受态细胞过饱和时,质粒之间不存在明显的竞争转化,它们的转化效率与每种质粒 DNA 单独转化时的转化效率基本一致。这也暗示如果连接产物中存在微量小片段 DNA,由于它们的相对转化效率要比大片段 DNA 高得多,因此会影响大片段基因组文库的平均插入片段的大小,文库质量随之降低。

同时,本文还对转化前的冰浴时间对转化效率的影响做了研究,发现冰浴时间(0 min ~ 30 min)对转化效率几乎没有影响(数据未列出),也就是说 DNA 分子与细胞表面的结合(或充分靠近)并不是必需的,也可能混合完全后的质粒 DNA 和感受态细胞已经完成了结合过程(或距离已经充分接近)。

在优化转化条件时,必须保证所加入的不同浓度的质粒不能完全饱和感受态细胞,这样计算出的转化效率才是有意义的。同时也提示我们在构建文库的实际转化中,首先应对加入的连接产物的量进行优化,避免连接产物的浪费,达到最佳的转化效果。

REFERENCES(参考文献)

[1] Mandel M, Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*, 1970, **53**(1): 159-162.
 [2] Cohen SN, Chang ACY, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, **69**: 2110-2114.

[3] Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW, et al. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, **70**(11): 3240-3244.
 [4] Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 1983, **166**: 557-580.
 [5] Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 1990, **96**: 23-28.
 [6] Chung CT, Miller RH. A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res*, 1988, **16**(8): 3580.
 [7] Nishimura A, Morita M, Nishimura Y, et al. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18**(20): 6169.
 [8] Taketo A. DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation. *Biochim Biophys Acta*, 1988, **949**(3): 318-324.
 [9] Serror P, Sasaki T, Ehrlich SD, et al. Electroporation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis* with various plasmids. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**: 46-52.
 [10] Ackermann G, Tang YJ, Henderson JP, et al. Electroporation of DNA sequences from the pathogenicity locus (PaLoc) of toxinogenic *Clostridium difficile* into a non-toxinogenic strain. *Mol Cell Probes*, 2001, **15**: 301-306.
 [11] Wang TT, Choi YJ, Lee BH. Transformation systems of non-*Saccharomyces* yeasts. *Crit Rev Biotechnol*, 2001, **21**: 177-218.
 [12] Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Beijing Science Press, 2002, pp. 99-100.
 [13] Smith M, Jessee J, Landers T, et al. High efficiency bacterial electroporation: 1×10^{10} *E. coli* transformants/ μg . *Focus*, 1990, **12**: 38-40.
 [14] Fiedler S, Wirth R. Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. *Anal Biochem*, 1988, **170**(1): 38-44.
 [15] DeBruin KA, Krassowska W. Modeling electroporation in a single cell. I. Effects of field strength and rest potential. *Biophys J*, 1999, **77**: 1213-1223.
 [16] Sheng Y, Mancino V, Birren B. Transformation of *Escherichia coli* with large DNA molecules by electroporation. *Nucleic Acids Res*, 1995, **23**: 1990-1996.
 [17] Rittich B, Spanova A. Electrotransformation of bacteria by plasmid DNAs: statistical evaluation of a model quantitatively describing the relationship between the number of electrotransformants and DNA concentration. *Bioelectroch Bioener*, 1996, **40**: 233-238.