

研究报告

细胞电穿孔导入 DNA 的动态特征

汪和陆 李金慧

(南开大学物理系, 天津 300071)

摘要 本文以 *E. coli* HB101 为模型细胞, 研究了不同幅度和时间常数的 RC 放电脉冲条件下, 触发细胞穿孔, 导入长度分别为 422 和 1680nm 的超螺旋长丝形质粒 pUC-18 和 pCP10, 及精胺缩合后直径为 88nm 的复曲面体的质粒 pCP10, 测定了相应的细胞转化率。实验结果显示了细胞电穿孔导入 DNA 的动态特征。

关键词 细胞电穿孔, *E. coli*, 质粒 DNA 转化, DNA 缩合

大量实验证明几乎所有类型的细胞都可成功地利用电穿孔技术进行基因转移^[1-5]。近十多年来, 诸多学者对细胞电穿孔的机制进行了大量的实验研究, 提出了众多的电致孔洞理论模型; 但早期研究电致细胞膜通透性的增大, 主要以蔗糖、金属离子等小分子为实验研究对象^[6,7,12], 测定的电致孔洞直径为 1nm^[6,12]; 它不能解释 DNA 大分子是如何通过电致孔洞进入细胞的。1990 年 Chang 用快速冰冻电子显微术揭示了细胞电穿孔的动力学特性^[8], 表明电穿孔作用是触发细胞电通透性增大的原初作用, 在几毫秒内迅速形成直径为 20—40nm 的电致孔洞。接着由于胞内物质外喷的次级作用, 形成了火山口形的孔洞, 该过程在 20 毫秒内实现, 孔洞直径扩大至 20—100nm, 即扩大至细胞骨架网孔大小时便趋于稳定。上述以细胞骨架网孔为边界的孔洞在数秒内几乎保持不变; 最终由于类脂分子重新排列成有序结构, 膜孔洞自发地变小, 直至重新封闭复原。这一结果很好地解释了 DNA 大分子导入细胞需要有数十毫微米的孔洞直径和持续开放数秒钟的时间的事实, 这对实现基因转化的了解有着极大的意义。

设计实验直接证实 DNA 大分子是如何进入细胞的, 无疑是一件很有意义的工作。本文对此作出了初步尝试。本实验的结果基本上与

上述电致孔洞的动力学过程一致, 而且作出了有益的补充。

1 材料与方法

1.1 细菌菌株

E. coli HB101 为质粒宿主菌。

1.2 质粒

为带有 Amp^r 基因的 pUC-18 (2.96kb)、pCP10 (10.7kb)。

1.3 LB (Luria-Bertani) 培养基

用于 *E. coli* 的培养, 固体培养基琼脂粉浓度 1.5%。

1.4 质粒的制备

用碱裂解法, 利用 EB-Cs Cl 梯度平衡离心提纯闭环超螺旋 DNA^[9]。

1.5 细胞制备

取单菌落 *E. coli* HB101 接种于 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡过夜培养。以 1:100 比例再转接于 LB 液体培养基中, 待生长至 O.D.₆₀₀ = 0.4, 收集细胞并用等渗低电导液 (3mmol/L Tris Cl、1 mmol/L MgCl₂、10% 蔗糖、pH7.4) 洗两次, 重新悬浮于等渗低电导液中, 冰浴备用。

1.6 细胞电穿孔设备

利用本室自行研制的 BT300 型细胞电穿孔融合仪和不锈钢平行板电极系统, 上述设备已列为 1992 年国家级重点新产品。

1.7 电穿孔转化

将适量纯化的 DNA 加入细菌悬浮液中, 混匀 (细胞浓度约 2×10^5 /ml、DNA 浓度 6ng/ml), 冰浴 5min, 取 0.25ml 混合液加入电极小室 (电极间距为 2mm, 测量的表观电阻为 80Ω), 静置 2min, 加 RC 放电脉冲, 再静置 5min, 缓缓取出细胞, 转入 10 倍体积的 LB 液体培养基中, 37°C 培养 30min。取 $100\mu\text{l}$ 铺于含 Amp^r $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 LB 固体平皿上, 12 小时后观察菌落数, 计算转化率。每组数据重复 5 次, 并计算标准偏差。

2 结果与分析

2.1 脉冲幅度对导入 DNA 的作用

将脉冲时程固定为 3ms, 改变 RC 脉冲幅度, 导入 pUC-18 闭环超螺旋质粒 (长丝形),

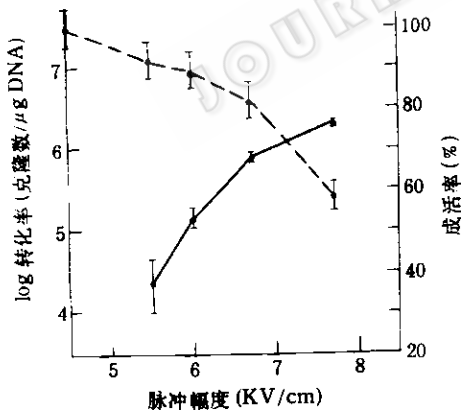


图 1 电场强度对转化率和细胞成活率的影响
实验所用质粒为 pUC-18, 脉冲时程为 3ms
“—” 转化率, “---” 存活率

其转化率和细胞存活率见图 1。结果表明, 当脉冲幅度低于 $5.5\text{KV}/\text{cm}$ 时, 导入 DNA 的转化细菌数接近于零, 可见导入 DNA 的电穿孔场强存在明显的阈值现象。理论上外电场 E_0 诱

导的膜电压 V_m 为:

$$V_m = 1.5 a E_0 \cos\theta$$

对于 *E. coli* 细胞, 其长为 $1.6\mu\text{m}$, 宽为 $0.6\mu\text{m}$, 计算可知, 对应于 $5.5\text{KV}/\text{cm}$ 的场强, 沿长轴方向的膜电压阈值为 0.66V 。实验表明当膜电压达到上述临界值时, 电致孔洞的原初作用就足以引发胞内物质外喷的次级作用, 实现 DNA 的转化。由于 $\cos\theta \propto 1/E_0$ (V_m 一定时), 随着外电场强度 E_0 的增高, 则达到临界值 V_m 的锥角 θ 增大, 即穿孔的膜面积增大。结果表明, 在电场阈值以上, 细胞转化率随脉冲幅度提高而迅速增高。但由于细胞存活率随场强增高而下降, 从而导致转化率上升变缓。

2.2 脉冲时程对导入 DNA 的作用

固定 RC 脉冲幅度为 $6.7\text{KV}/\text{cm}$, 在 $0.9-12.5\text{ms}$ 范围内改变脉冲时程, 对超螺旋丝形质粒 pUC-18 进行转化实验 (图 2)。当脉冲时程小于 0.9ms 时, 转化的细菌克隆数已趋近于零, 表明脉冲时程同幅度一样, 存在着明显的阈值现象。上述结果可解释为: 当脉冲时程低于阈值时, 电穿孔的原初作用不足以引发胞内物质外喷的次级作用, 致使 DNA 分子不能导入受体细胞。已经知道导入小分子的脉冲时程阈值为 $5\mu\text{s}$ ^[7], 这是由于电穿孔的原初作用即足以导入小分子; 而对于 DNA 大分子, 穿孔脉冲的时程必须足以引发次级作用才能导入细胞。

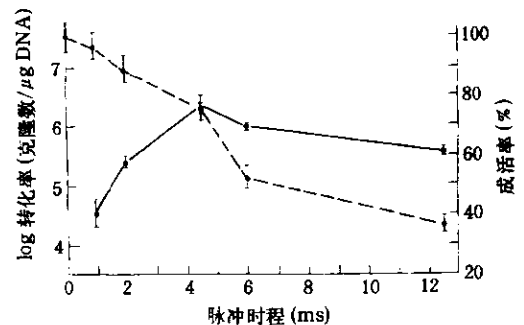


图 2 脉冲时程对转化率和细胞成活率的影响
实验用质粒为 pUC-18, 电场强度为 $6.7\text{KV}/\text{cm}$
“—” 为转化率, “---” 为细胞成活率

脉冲时程阈值现象目前还不能作出理论计算,但其合理的解释为:一方面因为膜电容的充电需要一定的时程(约 $5\mu\text{s}$),才能使膜电压达到稳定值,这一时程正好是电穿孔导入小分子的阈值。另一方面,只有外电场持续提供能量,足以保持局部穿孔膜的无序状态,电致孔洞才能扩大至细胞骨架网孔的大小,如果脉冲时程过短,则孔洞很快自发地复原为有序的结构。这正是电穿孔导入DNA大分子,脉冲时程存在阈值的原因。

图2结果还表明,当脉冲时程增大时,转化率迅速提高,这是由于较长脉冲时程的外电场延长了电致孔洞的寿命,有利于引发孔洞扩大的次级过程,致使DNA导入细胞的几率提高,从而转化率增大。当脉冲时程过长时,由于细胞成活率迅速下降,导致在脉冲时程大于 4.5ms 以后,转化率下降。

2.3 质粒DNA长度对转化率的影响

固定RC脉冲电场幅度为 $6.7\text{KV}/\text{cm}$,脉冲时程为 $0.9\text{--}12.5\text{ms}$,经电穿孔导入不同长度的超螺旋闭环质粒(宽度均为 6nm): 422nm 的pUC-18和 1680nm 的pCP10。实验转化率如图3所示。由于上述两种丝状质粒的长度远

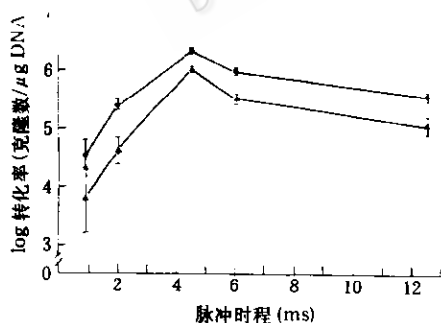


图3 转化率与质粒大小、脉冲时程之间的依赖关系
电场强度为 $5.7\text{KV}/\text{cm}$, “—○—”为pUC-18,
“—▲—”为pCP10

大于 $20\text{--}100\text{nm}$ 的细胞孔洞,因此质粒只能沿长轴方向通过扩散导入细胞。结果表明两种质粒的转化率与脉冲时程的关系具有相似的变化趋势:在时程为 0.9ms 时,同时达阈值;

而在 $6.7\text{KV}/\text{cm}$, 4.5ms 脉冲场条件下,两者转化率均达最大值;随脉冲时程加宽而呈现一致的下降趋势。这种一致的变化趋势,反映出电穿孔引发的细胞孔洞的数量、大小及分布仅与细胞类型相关,不随质粒不同而改变。在 $0.9\text{--}12.5\text{ms}$ 的整个时程范围内,短质粒pUC-18的转化率均比长质粒pCP10高1倍左右,这种差异可以解释为:在细胞孔洞重新封闭前的数秒内,已有较多数目的短质粒完全进入细胞,形成大量转化菌落;而长质粒有较多数目来不及完全进入细胞,从而转化菌落减少。

2.4 精胺缩合质粒对转化率的影响

实验用4价正离子精胺缩合pCP10质粒,DNA浓度为 $6\text{ng}/\mu\text{l}$,精胺终浓度为 $50\mu\text{mol}/\text{L}$,室温下缩合3小时。电镜观察(见下页图4)缩合后质粒为紧密包装的复曲面形状,典型直径为 88nm ,属单分子缩合。实验中固定脉冲幅度为 $6.7\text{KV}/\text{cm}$,改变脉冲时程,导入长丝形和复曲面形pCP10质粒,结果见下页图5。精胺缩合DNA的转化率与脉冲时程的关系曲线的变化趋势、阈值和最适时程与未缩合DNA的结果一致。再一次表明细胞孔洞情况仅与细胞类型相关。

精胺缩合的直径为 88nm 的复曲面形质粒转化成功,直接证明了细胞孔洞中有一部直径大于 88nm ,这是一个有意义的实验结果。缩合质粒pCP10的转化率比长丝形同一质粒提高近一倍,可以解释为缩合质粒的线度变短,更容易完全进入细胞,产生的转化克隆较多。再比较一下缩合质粒pCP10(线度为 88nm)与长丝形质粒pUC-18(线度为 422nm)的转化率,两者几乎相等,说明复曲面形质粒虽然完全进入细胞的几率大,但由于直径大于 88nm 的细胞孔洞数目较少。

3 讨论

以往细胞电穿孔机制的研究主要以蔗糖、金属离子等小分子为对象,得出的膜的临界击穿电压为 $0.6\text{--}1.0\text{V}$,可逆电穿孔的脉冲时程

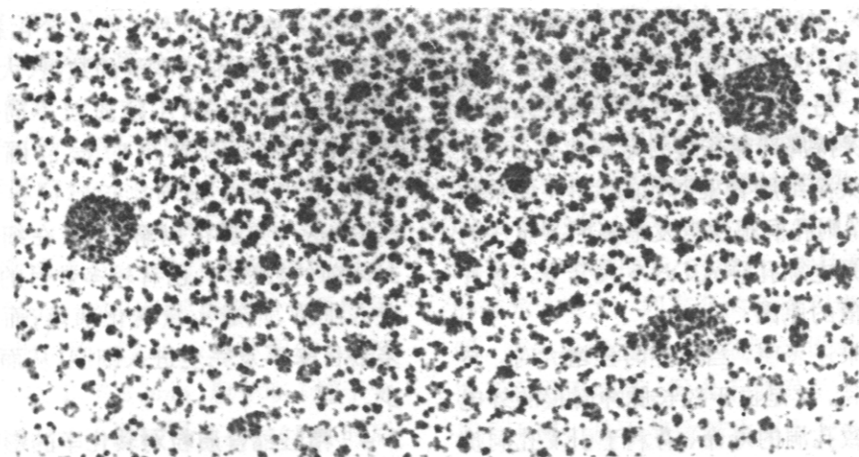


图4 用精胺缩合的pCP10质粒的电镜照片 (113000 \times , \bar{L} 885Å)

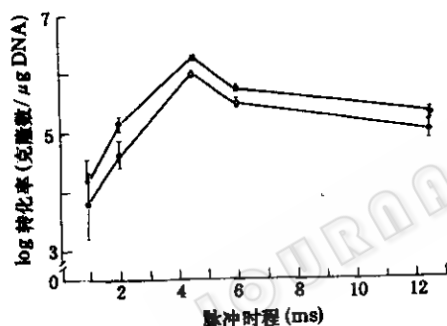


图5 转化率与质粒形状、脉冲时程之间依赖关系
电场强度为 6.7KV/cm, “—·—” 缩合后 DNA,
“——” 未缩合 DNA

为 5—40 μ s, 细胞孔洞直径约 1nm 等主要结论。它显然不能解释线度远大于 1nm 的 DNA 大分子是如何导入细胞的。本实验的结果为了解电穿孔导入 DNA 的机制提供了一些有益的启示。脉冲电场条件作为一种原初作用, 只有达到一定阈值(包括幅度和时程两个方面), 才足以引发扩大细胞孔洞的次级过程。

本实验得出的导入 DNA 的脉冲幅度阈值与导入小分子的临界电压值相同, 而且和理论计算值完全相同。但是脉冲时程的阈值 0.9ms, 远大于导入小分子的时程阈值 5 μ s; 按

照电致孔洞的动力学机制, 只有孔洞的寿命大于 ms 量级, 才足以引发胞内物质外喷的次级过程, 形成持续时间长, 能导入 DNA 的大孔洞。利用数毫秒宽的脉冲导入 DNA, 能够明显地提高转化率, 已为越来越多的实验结果所证实。

推断超螺旋丝状 DNA 是沿长轴通过孔洞进入细胞的, 在孔洞重新封闭的数秒时间内, 10kb 以上的大质粒已有许多来不及完全导入细胞, 而导致基因转化率显著下降。精胺缩合 DAN 不仅有力地证实了细胞孔洞直径大于 88nm 的存在, 而且为提高大质粒的转化率提供了有效途径。

进一步研究 DNA 单分子扩散或电泳迁移而导入细胞的详尽过程, 可望建立 DNA 电穿孔转化的定量理论。

致谢 本文得到南开大学分子生物学研究所高才昌教授、蔡宝立副教授在实验条件方面的支持, 在此致以诚挚的谢意。

参 考 文 献

- [1] Wong T K, Neumann E. *Biochem Biophys Res Commun*, 1982, **107**: 584—587.
- [2] Chu G, *et al.* *Nucleic Acid Res*, 1987, **15**: 1311—1326.

- [3] Fromm M E, *et al.* Nature, 1986, **319**: 791—793.
- [4] Hashimoto H, *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 1985, **21**: 336—339.
- [5] Fieldler S, *et al.* Anal Biochem, 1988, **170**: 38—44.
- [6] Kinoshita K, Tsong T Y. Biochem Biophys Acta, 1977, **471**: 227—242.
- [7] Schwister K, Deuticke B. Biochem. Biophys. Acta, 1985, **816**: 332—348.
- [8] Donald C Chang, *et al.* Biophysical J, 1990, **58**: 1—12.
- [9] Maniatis T, *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 1982.
- [10] Fricke H. J Appl Phys, 1953, **24**: 644—646.
- [11] 汪和睦等. 生物化学与生物物理进展, 1985, **3**: 52—58.
- [12] Kinoshita Jr K, *et al.* Biophys J, 1988, **53**: 1015.

THE DYNAMIC CHARACTER OF INTRODUCTION OF DNA INTO CELLS BY ELECTROPORATION

Wang Hemu Li Jinhui

(Department of Physics Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract In this study *E. coli* HB101 is used as the cell model. It has been investigated to cause cell electroporation with RC electric pulses of different strength and different width and introduce various kinds of plasmids into cells. These plasmids contain the long thready closed circular plasmids of pUC-18, pCP10, which are 422nm and 1680nm long respectively, and the plasmid of pCP10 condensed with spermine, which is a kind of toroidal particle with the diameter of 88nm. Their transformation efficiencies have been measured respectively. The experimental results manifest the dynamic character of introduction of DNA into cells by electroporation.

Key word: Cell electroporation, *E. coli*, Plasmid transformation, DNA condensation