

超声波介导的微生物细胞转化

王琨¹ 滕琳² 许成钢² 杨晓红^{1*} 徐健^{2*}

(1. 西南大学 园艺园林学院 南方山地园艺学教育部重点实验室 重庆 400716)

(2. 中国科学院青岛生物能源与过程研究所 中国科学院生物燃料重点实验室

山东省能源生物遗传资源重点实验室 山东 青岛 266101)

摘要: 随着分子生物学的发展, 微生物遗传改造越来越广泛地应用在微生物育种、临床医学、环境保护等方面。其中, DNA 转化技术经常是高效遗传改造的瓶颈之一。应用超声波将目的基因导入微生物细胞的技术具有原位、多尺度、活体、高通量、低成本等优点, 因此发展较为迅速。其原理是超声波可以通过声学气穴现象产生一系列的非热能效应, 而声学气穴微泡可产生短暂的细胞膜透化作用。本文综述了超声波转化的基本原理及其在微生物细胞转化中的发展现状, 并结合本实验室应用超声波转化法转化革兰氏阳性菌等研究进展, 分析了其特色、优势及现存挑战。

关键词: 超声波, 转化, 微生物

Ultrasonic-mediated DNA transformation of microbial cells

WANG Kun¹ TENG Lin² XU Cheng-Gang² YANG Xiao-Hong^{1*} XU Jian^{2*}

(1. College of Horticulture and Landscape Architecture, Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Region, Ministry of Education, Southwest University, Chongqing, 400716, China)

(2. Chinese Academy of Sciences Key Laboratory of Biofuels, Shandong Key Laboratory of Energy Genetics and Bioenergy Genome Center, Qingdao Institute of BioEnergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong 266101, China)

Abstract: With the development of molecular biology, genetic engineering of microorganisms

基金项目: 中国科学院知识创新工程重大项目(No. KSCX1-YW-11)

*通讯作者: 杨晓红: ✉ yangxh2@swu.edu.cn

徐健: Tel: 86-532-80662651; ✉ xujian@qibebt.ac.cn

收稿日期: 2012-11-06; 接受日期: 2013-02-05

has been increasingly applied in microbial breeding, clinical medicine and environmental bio-remediation. However delivery of DNA into the cell can be one bottleneck in efficient genetic engineering. Ultrasound-mediated DNA delivery into microbial cells, with a number of advantages that include *in situ* operation, spatial scalability, non-invasiveness, high-throughput and low consumable costs, has been under rapid development. Ultrasound can produce a variety of nonthermal effects via acoustic cavitation, and the cavitation bubbles generated during this process can cause transient cell membrane permeability. In this review the basic principles of the ultrasound-based DNA delivery were discussed and its current applications in prokaryotes were summarized. Furthermore, we discussed the advantages and challenges of the technique, using the transformation of Gram-positive bacteria in our laboratory as an example.

Keywords: Ultrasonic, Transformation, Microorganisms

因目标产物产率低、抗逆性差等缺点,许多有潜在应用价值的微生物,在工业发酵、临床医学、环境保护等方面的应用受到了极大限制,亟待对其进行有效的遗传改造。同时,微生物基因组序列为微生物遗传改造提供了海量的信息基础。但是相当多非模式微生物的遗传改造仍然面临的瓶颈之一是如何将外源 DNA 导入细胞内,即 DNA 转化技术。细菌的细胞壁结构是 DNA 转化的主要天然屏障,例如,革兰氏阳性菌的细胞壁上有特殊的多层肽聚糖结构达 20 nm–80 nm,其厚度是革兰氏阴性菌的 10 倍以上,从而使外源 DNA 难以进入细胞。

目前广泛应用在微生物细胞中的 DNA 转化和移植方法主要分为三类: (1) 化学诱导法^[1],例如磷酸钙和 DEAE-葡聚糖; (2) 载体介导法,例如脂质体融合^[2]、接合转移和逆转录病毒法^[3]; (3) 机械法,例如基因枪^[4]、微注射^[5]和电转化法^[6]等。此外,还有一种低频超声波介导的细胞转化方法,它能够将 DNA、右旋糖分子、化疗组分等导入细胞^[7–9]。本文将综述超声波转化原理和现状,并比较各种微生物转化方法,探讨超声波转化方法在微生物遗传改造中的特色及挑战。

1 超声波转化法的原理

超声波转化方法其基本原理是通过低频超声波(20–100 kHz)产生的能量在液体中产生声学气穴和微泡^[8,10](图 1)。超声波转化主要产生两种气穴现象,稳定的气穴和瞬间气穴。产生稳定的气穴时在液体中形成的微泡以一种物理平衡的状态存在,连续的声学循环不会改变微泡的物理平衡。而瞬间气穴产生时在液体中形成的微泡处在一个极其不稳定的物理状态,此微泡形成过程中可裹入溶液中的核酸、多糖等生物大分子;经过连续的声学循环,微泡不断胀大最终破裂,释放出能量,并在细胞膜上产生瞬间的纳米通道^[10],其包裹的生物大分子通过纳米通道和细胞膜在自我修复的同时嵌入细胞内部,完成“摄入”或者转化过程^[11]。

超声波能够在保证高转化效率的同时,还保持质粒的完整性。Song 等^[8]对超声波对质粒的完整性的影响做了研究,分别将质粒暴露在 40 kHz 的超声波中 0、5、10、30 和 60 s,结果表明,在 30 s 内质粒的完整性不会受到超声波的影响,并且超声波转化的效率在 5–30 s 时达到最高。与此同时,因为超声能打断氢键以及打破 DNA 超螺

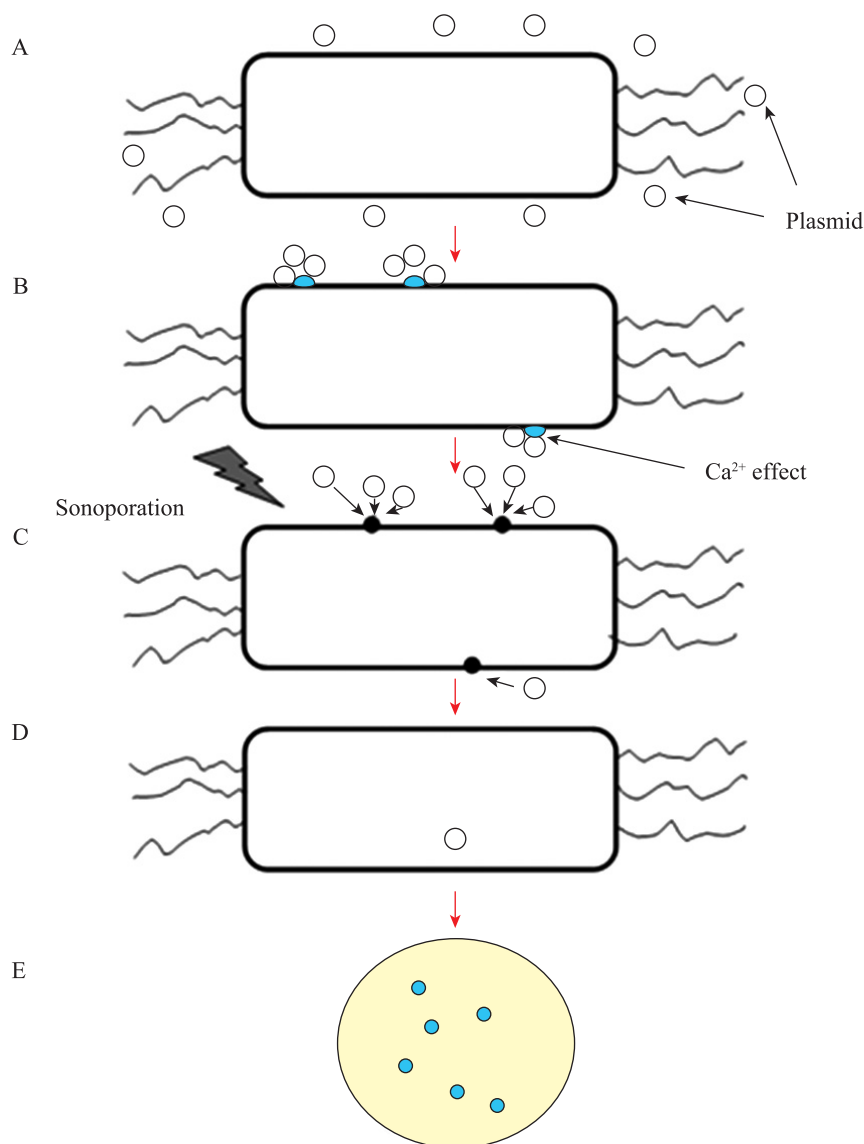


图1 超声波转化原理示意图(修改自文献[8])

Fig. 1 Illustration of proposed mechanism of ultrasound-mediated DNA transfer (adapted from reference [8])

注: A: 细菌细胞和质粒 DNA; B: CaCl_2 促进转化; C: 超声波刺激细胞表面产生声学气穴和微泡; D: 微泡破裂质粒进入细胞; E: 细菌摄取质粒后获得新性状。

Note: A: Bacterial and plasmid DNA; B: CaCl_2 promotes transformation; C: Ultrasound generates pores in cell membranes and plasmids enter the cell; D: Pores are closed and plasmids are retained in the cell; E: Bacteria acquire new functions after taking up the plasmid DNA.

旋中单链或者双链^[12], 较高强度(如 400–1 000 W)或者较长时间的超声波通常用于 DNA 的片段化。

2 超声波介导 DNA 转化的优势

基于超声波转化的原理, 该方法与化学转

化、电转化法、基因枪和病毒介导法等现有 DNA 转化和移植方法相比, 在实验操作性、空间尺度和通量、宿主细胞广谱性和通用性、仪器的可控性、以及成本等方面具备潜在的重要优势(表 1)。

表 1 不同的细胞转化方法比较					
Table 1 Comparison of different cell transformation methods					
转化方法 Transformation methods	超声波转化法 Ultrasound transformation	化学转化法 Chemical transformation	电转化法 Electrotransformation	基因枪&显微注射法 Gene-gun & microinjection	病毒介导法 Virus mediated
操作步骤 Operation steps	简便、快速	简便、成熟	操作较复杂	难度高、复杂	复杂费时
是否原位 In situ or not	是	否	否	是	是
细胞损伤 Cellular damage	小	小	有损伤	有损伤	不一定
转化效率 Transformation efficiency	约 10 ⁷ [13]	10 ⁵ –2×10 ⁹ [14]	0.5–5×10 ⁹ [15]	2×10 ² –8×10 ⁸ [16]	高效率[17]
系统毒性 System toxicity	否	不一定	不一定	不存在	存在
仪器要求 Instrument requirements	简单、便宜	简单、便宜	昂贵	昂贵	简单、便宜
通量 Throughput	易于高通量	难于高通量	难于高通量	难于高通量	难于高通量

3 超声波介导 DNA 转化的现状

超声波介导的 DNA 转化方法以往主要用于真核细胞的转化^[18]和基因疗法^[19–20]，甚至能够通过设计“微泡”在人体细胞中实现组织特异性基因转化^[21]。应用于细菌的超声波转化的报道近年才出现。在中温的革兰氏阴性菌首先有报道，如 *Escherichia coli* DH5 α 、具核梭杆菌 *Fusobacterium nucleatum*、荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* 和恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 等^[8,22]。Song 等^[8]首次利用超声波 DNA 转化方法应用在革兰氏阴性菌 *P. putida* UWC1、*E. coli* DH5 α 和 *P. fluorescens* SBW25。*P. putida* 在超声持续时间 10 s, 50 mmol/L CaCl₂, 22 °C 质粒浓度是 0.8 ng/ μ L 时，得到的转化效率是(3.08 \pm 0.73) \times 10⁵ 转化子/ μ g DNA，转化效率超出人们普遍认为高效率的电转化法 4 倍，并且是接合转化法的 9 倍。同时，对于 *E. coli* DH5 α 和 *P. fluorescens* 的转化效率分别是(2.9 \pm 0.33) \times 10³ 和(1.08 \pm 0.20) \times 10⁴ 转化

子/ μ g DNA。此工作初步证明了原核生物超声波 DNA 转化的可行性。最近 Hayer^[23]对 *E. coli* HB101 进行了超声波转化，发现其在 10 s, 50 mmol/L CaCl₂, 培养 24 h 时的转化效率最高，转化效率为 148.72 转化子/ μ g DNA，但是该工作报道的对 *E. coli* HB101 的超声波转化效率低于在 *E. coli* 中已非常成熟的化学转化和电转化。因此，超声波转化效率还需要优化。

革兰氏阳性菌由于其独特的细胞壁结构和固有较低的质膜渗透性，经常较难进行转化。Yang 等^[24]在申报的专利中，将 DNA 或 RNA、蛋白质(多肽，抗原，抗体等)、脂质、碳水化合物、病毒、小分子(有机或无机小分子，分子探针，基因治疗化合物或药物)转化到革兰氏阳性菌厚壁菌门的芽孢杆菌、链球菌、醋菌、梭菌中去，并且成功地转化两种或者多种革兰氏阳性菌混合菌群。其结论是化合物的直径最好是小于 75 nm，且越小越易转化；超声波的频率最好是在 30–50 Hz，最合适是 40 Hz；电能值最合适是

在 0.05–0.20 W/cm²; 超声波持续时间至少是 5 s, 最长不能超过 1 min。但是转化效率还待优化, 如通过调整细菌的类型和生长状态、化合物的特性(质粒大小, 合适的筛选标记)、用来转化的培养基的类型(固体、液体)、超声波的性质(频率、振幅)等。

同时, 本实验室也成功发展了革兰氏阳性菌嗜热厌氧菌的超声波转化方法^[9]。将 *Thermoanaerobacter* sp. X514 细胞在超声仪中超声 0–40 s, 复苏后转移到固体培养基中培养, 结果表明, 超声波时间在 40 s 以内超声不会影响细胞的存活率。同时, 对我们将质粒暴露在超声中 0–40 s, 结果表明, 在 40 s 以内质粒的完整性不会受到影响。我们结果也显示, 在转化过程中超声波对细胞的存活率及质粒的完整性没有损害。在 40 kHz 超声频率, 超声时间 20 s, 得克萨斯红标记的葡聚糖以 27% 的转化效率进入到嗜热厌氧乙醇杆菌 *Thermoanaerobacter* sp. X514 中。另外, 通过超声波转化, 穿梭质粒 pHL015 上的荧光蛋白基因和 pIKM2 上编码热纤梭菌 β -1,4 葡聚糖酶基因被转化到 X514 中, 转化效率是 600 转化子/ μ g 甲基化 DNA。我们正在对该方法进行优化, 以进一步提高 *Thermoanaerobacter* sp. X514 的转化效率。对 *Thermoanaerobacter* sp. X514 的成功转化对其他革兰氏阳性菌尤其是厌氧菌的超声波转化方法的建立具有一定的借鉴意义。但是, 目前对嗜热菌超声波转化的效率还较低, 主要是由于缺乏嗜热菌成熟遗传操作工具, 如嗜热菌的质粒复制子、耐高温的筛选标记或抗性基因等。这些因素限制了进一步对超声波转化条件的优化。

4 超声波介导 DNA 转化的挑战

如前所述, 原核细胞的超声波转化技术具备重要的特色和一定的优势, 但是目前超声波转化

方法也有一些局限性, 如受环境因素、遗传因素、预转化 DNA 的特性等影响。需要我们进一步从以下几个方面进行综合考虑优化。

首先, 影响原核细胞超声波转化效率的环境因素。影响超声波转化效率的环境因素主要包括超声波本身的参数设置如频率、时间等, 以及缓冲液的 pH、温度、成分及浓度。关于原核细胞在这方面的系统研究不多, 仅有一些在真核细胞中的研究^[25–26]。如对原核细胞的研究只是局限于缓冲液浓度、超声持续时间和强度^[23], 但是对于超声波本身的参数设置、缓冲液的特性、细胞浓度、质粒浓度等方面还没有在原核细胞中展开研究。

其次, 影响原核细胞超声波转化效率的宿主遗传因素(即不同状态、不同物种的宿主细胞对转化效率的影响)。这方面的研究目前仅在真核细胞中有初步研究, 例如, 细胞类型会影响纳米微孔的大小, 进而影响转化效率: 有文献报道, 超声波在人细胞膜上产生的微孔约 1 μ m–5 μ m^[26]; 但在非洲爪蟾卵母细胞中, 超声波产生的微孔约 0.1 μ m^[27], 但这并不足以证明超声波作用下各种细胞的细胞膜纳米微孔都是 0.1 μ m–5.0 μ m。同时, 有研究还表明微泡与细胞膜之间的距离可以影响到转化效率^[28]。此外, 细胞内部环境尤其是原核细胞对外来 DNA 侵入的防御机制也会影响到超声波转化的效率。如 *Clostridium thermocellum*^[29]、*Thermoanaerobacter* sp. X514^[9] 和 *Clostridium cellulolyticum* H10^[30] 进行转化前要甲基化修饰所要转化的 DNA, 防止被宿主细胞内的限制性酶切系统降解。但并不是所有的细菌在转化时都需要将转化的 DNA 进行甲基化修饰, 如 *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485 进行电转化时则无需将外源 DNA 进行甲基化^[31]。

再次, 欲转化与移植的 DNA 的特性(大小、

超螺旋等)对超声波转化效率的影响。采用超声波进行质粒转化时, 超声波不会改变质粒的状态(超螺旋、线性和开环)^[32]。关于质粒大小对于超声波转化效率影响的报道很少, 但无疑超声波在细胞膜上产生的空洞大小会限制导入 DNA 的大小。Karshafian 等^[33]在超声波介导动物细胞 HTC 的基因转化研究表明, 在微泡辅助剂的作用下, 大分子物质处于 10 kD–2 MD 都可以导入细胞内^[33]。

5 展望

综上所述, 超声波转化法在原核细胞中有较好的应用前景, 可向胞内递送与移植的底物也较广, DNA (基因、大片段 DNA 甚至完整基因组) 甚至包括纳米材料、颗粒和细胞内含物均可以是递送与移植对象。因此, 系统地研究影响超声波转化效率的环境因子和遗传因素, 探索设计针对不同宿主、空间尺度和目的转入物的超声波转化技术, 不仅对于以 DNA、纳米材料等功能元件的转化与移植为核心步骤之一的合成生物学等新兴学科, 而且对于微生物资源的挖掘和改造等应用领域具有重要的推动作用。

参 考 文 献

- [1] Yuan L, Wang HW, Yu QA, et al. “Nano-catalyst” for DNA transformation[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21(17): 6148–6151.
- [2] Park J, Oh H, Hong S, et al. Effective donor cell fusion conditions for production of cloned dogs by somatic cell nuclear transfer[J]. *Theriogenology*, 2011, 75(4): 777–782.
- [3] Joyner A, Keller G, Phillips RA, et al. Retrovirus transfer of a bacterial gene into mouse hematopoietic progenitor cells[J]. *Nature*, 1983, 305(5934): 556–558.
- [4] Maenpaa P, Gonzalez EB, Ahlandsberg S, et al. Transformation of nuclear and plastomic plant genomes by biolistic particle bombardment[J]. *Molecular Biotechnology*, 1999, 13(1): 67–72.
- [5] Neuhaus G, Spangenberg G. Plant transformation by microinjection techniques[J]. *Physiologia Plantarum*, 1990, 79(1): 213–217.
- [6] Zou SL, Zhang K, You L, et al. Enhanced electrotransformation of the ethanologen *Zymomonas mobilis* ZM4 with plasmids[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2012, 12(2): 155–164.
- [7] Delalande A, Bouakaz A, Renault G, et al. Ultrasound and microbubble-assisted gene delivery in Achilles tendons: long lasting gene expression and restoration of fibromodulin KO phenotype[J]. *Journal of Controlled Release*, 2011, 156(2): 223–230.
- [8] Song YZ, Hahn T, Thompson IP, et al. Ultrasound-mediated DNA transfer for bacteria[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(19): e129.
- [9] Lin L, Song HH, Ji YT, et al. Ultrasound-mediated DNA transformation in thermophilic Gram-positive anaerobes[J]. *PLoS One*, 2010, 5(9): e12582.
- [10] Tang H, Wang CCJ, Blankschtein D, et al. An investigation of the role of cavitation in low-frequency ultrasound-mediated transdermal drug transport[J]. *Pharmaceutical Research*, 2002, 19(8): 1160–1169.
- [11] Phillips LC, Klivanov AL, Wamhoff BR, et al. Targeted gene transfection from microbubbles into vascular smooth muscle cells using focused, ultrasound-mediated delivery[J]. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 2010, 36(9): 1470–1480.
- [12] Elsner HI, Lindblad EB. Ultrasonic degradation of DNA[J]. *DNA*, 1989, 8(10): 697–701.
- [13] Aune TEV, Achmann FL. Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(5): 1301–1313.
- [14] Hanahan D, Jessee J, Bloom FR. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria[J]. *Methods in Enzymology*, 1991, 204: 63–113.
- [15] Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW. High

- efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation[J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16(13): 6127–6145.
- [16] Shark KB, Smith FD, Harpending PR, et al. Biolistic transformation of a procaryote, *Bacillus megaterium*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(2): 480–485.
- [17] Gorman CM, Lane DP, Rigby PWJ. High-efficiency gene-transfer into mammalian-cells[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences, 1984, 307(1132): 343–346.
- [18] Qin P, Xu L, Zhong WJ, et al. Ultrasound-microbubble mediated cavitation of plant cells: effects on morphology and viability[J]. Ultrasound in Medicine and Biology, 2012, 38(6): 1085–1096.
- [19] Yang H, Liu ZH, Liu YY, et al. Vascular gene transfer and drug delivery *in vitro* using low-frequency ultrasound and microbubbles[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2010, 31(4): 515–522.
- [20] Newman CM, Bettinger T. Gene therapy progress and prospects: ultrasound for gene transfer[J]. Gene Therapy, 2007, 14(6): 465–475.
- [21] Tsutsui JM, Grayburn PA, Xie F, et al. Drug and gene delivery and enhancement of thrombolysis using ultrasound and microbubbles[J]. Cardiology Clinics, 2004, 22(2): 299–312.
- [22] Han YW, Ikegami A, Chung P, et al. Sonoporation is an efficient tool for intracellular fluorescent dextran delivery and one-step double-crossover mutant construction in *Fusobacterium nucleatum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(11): 3677–3683.
- [23] Hayer K. The effect of ultrasound exposure on the transformation efficiency of *Escherichia coli* HB101[J]. Bioscience Horizons, 2010, 3(2): 141–147.
- [24] Yang YF, Li YC. Transformation of gram positive bacteria by sonoporation: USA, US2010/0196983A1[P]. 2010–08–05.
- [25] Suzuki R, Takizawa T, Negishi Y, et al. Tumor specific ultrasound enhanced gene transfer *in vivo* with novel liposomal bubbles[J]. Journal of Controlled Release, 2008, 125(2): 137–144.
- [26] Wells DJ. Electroporation and ultrasound enhanced non-viral gene delivery *in vitro* and *in vivo*[J]. Cell Biology and Toxicology, 2010, 26(1): 21–28.
- [27] Myrset AH, Fjerdingsstad HB, Bendiksen R, et al. Design and characterization of targeted ultrasound microbubbles for diagnostic use[J]. Ultrasound in Medicine and Biology, 2011, 37(1): 136–150.
- [28] Deng CX, Sieling F, Pan H, et al. Ultrasound-induced cell membrane porosity[J]. Ultrasound in Medicine and Biology, 2004, 30(4): 519–526.
- [29] Guss AM, Olson DG, Caiazza NC, et al. Dcm methylation is detrimental to plasmid transformation in *Clostridium thermocellum*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2012, 5: 30.
- [30] Cui GZ, Hong W, Zhang J, et al. Targeted gene engineering in *Clostridium cellulolyticum* H10 without methylation[J]. Journal of Microbiological Methods, 2012, 89(3): 201–208.
- [31] Shaw AJ, Hogsett DA, Lynd LR. Natural competence in *Thermoanaerobacter* and *Thermoanaerobacterium* species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(14): 4713–4719.
- [32] Wyber JA, Andrews J, D'Emanuele A. The use of sonication for the efficient delivery of plasmid DNA into cells[J]. Pharmaceutical Research, 1997, 14(6): 750–756.
- [33] Karshafian R, Samac S, Bevan PD, et al. Microbubble mediated sonoporation of cells in suspension: clonogenic viability and influence of molecular size on uptake[J]. Ultrasonics, 2010, 50(7): 691–697.