

文章编号: 0490-6756(2000) 03-0459-04

弱电磁脉冲对完整酵母及原生质体的电转化研究

张弘¹, 刘长军¹, 王保义¹, 王子淑²

(1. 四川大学无线电系, 成都 610064; 2. 四川大学生物系, 成都 610064)

电转化法(electrotransformation)是利用电脉冲使细胞膜形成微孔,造成膜的通透性瞬时增强,使外源基因通过膜的穿孔进入细胞,并插入细胞的基因组,从而建立起合适的遗传转化系统的一种有效的物理方法.这种方法转化率高,操作简便省时,在生物、医学等领域应用广泛.由于酵母是真核生物的参考模型,具有其他生物所不具有的优点,成为表达外源基因的重要工具,而被国内外许多研究者广泛用于电转化的研究.许多研究者在电转化操作中,都是采用场强在(1~10) kV/cm,脉宽数10 μ s~ms量级的单个或数个强脉冲电场作用于细胞,从而提高转化率^[1~3].我们采用峰值场强为20V/cm,脉宽100ns,重复频率300Hz的弱瞬态电磁脉冲照射,通过戊二醛即时固定法,在扫描电镜下成功地观察到了鸡血红细胞的电致孔洞,并利用电穿孔促进了鸡-兔血细胞间的融合及抗癌药物进入癌细胞,从而提高药物疗效,并可减少药物剂量^[4,5].这些实验都是在弱电磁脉冲作用下,针对哺乳动物细胞进行的.而对真核与原核生物细胞则没有直接观察到电致孔洞.我们以酿酒酵母为材料,研究了弱电磁脉冲对完整酵母及其原生质体的电转化情况,证明低幅度瞬态电磁脉冲能明显促进大分子质粒向酵母完整细胞及原生质体转化,从而间接证明了弱电磁脉冲对酵母细胞的电穿孔作用.

1 实验系统

实验是在自行研制的一个超宽频带横电磁波传输室(BTEM室)中进行的.BTEM室能够很好地屏蔽外界电磁干扰,内传输的电磁波是各向同性的准平面波,其频率范围DC~17.0 GHz,传输系数大于0.9,驻波系数小于2.0.这样BTEM室即形成了对自由空间的模拟.

实验系统包括瞬态脉冲信号发生器、BTEM室、取样示波器和恒温装置.实验中信号发生器输出信号为准矩形脉冲,脉冲幅度187V(样品处峰值场强为20V/cm),脉宽100ns,脉冲上升时间1.2ns,重复频率300Hz,样品在BTEM室中接受照射,其内温度控制在37℃.

2 材料和方法

2.1 材料

E. coli HB101; 54. S. Cerevisiae DC5(a, leu2-3, leu2-112, his-39, can1-11); 质粒 YRP12-54

收稿日期: 1999-09-03

基金项目: 国家自然科学基金

2.2 试剂

LB 培养基(蛋白胨10g, 牛肉膏5g, 氯化钠10g, 加1000mL 蒸馏水, 灭菌) ;酵母 YPD 培养基(胰蛋白胨20g, 酵母粉10g, 葡萄糖20g) ;酵母合成培养基(其组成详见参考文献[6] 第81 页) ;预处理缓冲液(YPD, 25mmol/L DTT, 20mmol/L HEPES, pH8) ;电穿孔缓冲液(10mmol/L Tris-HCl, 270mmol/L 蔗糖, 1mmol/L LiAc, pH7. 5) ;0. 2mol/L PB 液(0. 2mol/L Na₂HPO₄, 0. 1mol/L 柠檬酸, 1mol/L 山梨醇, pH5. 8) ;等渗液(10mmol/L Tris-HCl, 10mmol/L CaCl₂, 1mol/L 山梨醇, pH7. 5) ;0. 1%的巯基乙醇-PB 液(含50mmol/L EDTA) ;1%的蜗牛酶-PB 液.

2.3 方法

(1) 酵母完整细胞的获取 取经斜面活化后的酵母菌接种到 YPD 液体培养基中, 在30℃ 振荡培养14~16h, 收取对数期细胞, 用无菌蒸馏水清洗, 离心收集细胞, 再用预处理缓冲液制成悬液, 30℃ 培养30min, 再离心, 用电穿孔缓冲液洗后, 再用电穿孔缓冲液制成细胞悬液, 细胞浓度约1×10⁸ /mL.

(2) 原生质体的获取 取经斜面活化后的酵母菌接种于 YPD 液体培养基中, 30℃ 振荡培养14~16h, 收取对数期细胞, 离心去上清, 用0. 2mol/L PB 液和0. 85%生理盐水各洗一次, 弃上清液, 再用 PB 液洗一次, 加1%的蜗牛酶-PB 液, 30℃ 水浴处理20min, 光镜检查, 90%以上细胞为原生质体后, 将其离心去上清, 用等渗液制成原生质体悬液.

(3) YRP12-54质粒的制备. 详见参考文献[6], 该质粒的碱基对为6. 9.

(4) 酵母完整细胞的电转化 取12个小瓶, 分别加入含有酵母细胞的电穿孔缓冲液及浓度为5 μg/mL 的质粒液, 将样品置于 BTEM 室中照射, 处理后, 样品转至加有1mL 冰冷的 YPD 培养基小试管中, 置于冰上12min, 然后30℃ 振荡培养1h, 离心, 用预热的30℃ 基本培养基清洗, 再加入0. 4mL 基本培养基稀释后, 取100 μL 涂版3个, 培养3天. 各瓶所加细胞悬液、质粒液的体积、以及照射时间见表1.

表1 电转化试验参数

编 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
细胞悬液(mL)	0. 4	0. 4	0. 4	0. 4	0. 4	0. 4	0. 4	0. 4	0. 4	0. 4	0. 4	0. 4
质 粒 (μL)	0	10	10	10	10	10	10	0	0	0	0	0
照射时间(min)	0	0	1	5	10	20	40	1	5	10	20	40

(5) 酵母原生质体的电转化 取酵母原生质体悬液、质粒液的体积、以及照射时间与表1 相同, 只需将细胞悬液换成原生质体悬液. 样品处理后静置20min, 取出后, 加在含等渗液的 EP 管中, 离心去上清, 加入0. 4mL 基本培养基, 30℃ 培养2h, 取100 μL 涂版3个, 培养3d.

3 结果与分析

(1) 质粒向完整酵母细胞的转化情况见表2.

照射前, 酵母细胞采用二硫苏糖醇(DTT) 预处理, 使细胞壁疏松. 从涂版培养的情况看, 对照组无菌落生成. 而加质粒的照射组均长出了菌落, 其中20min 照射组长出的菌落最多, 形

态最好,而40min照射组的菌落形态不好,可能是由于照射时间太长,脉冲电磁场对细胞的致死率提高所致.而不加质粒照射的8号和9号样品有极少的酵母菌生成,可能是电磁脉冲造成了细胞的突变所致.

表2 质粒向完整酵母细胞电转化情况

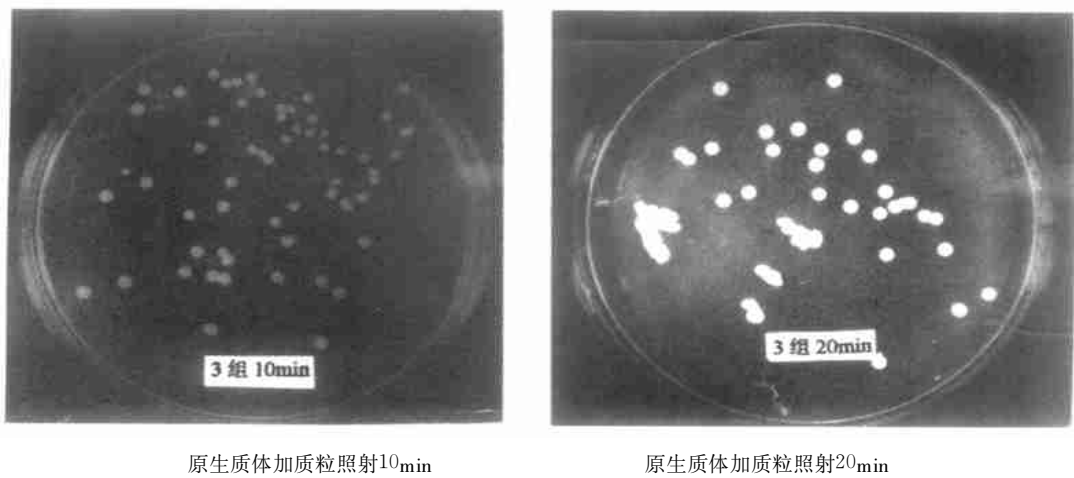
分组情况		对照组			加质粒照射组			不加质粒照射组					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
培养 情况	平板1	—	—	++	+	+++	++++	+++	+	+	—	—	—
	平板2	—	—	++	+	+++	++++	+++	—	—	—	—	—
	平板3	—	—	+	+	+++	+++	++	—	—	—	—	—

注 表中“++++”表示菌落数在31~60个,“+++”表示菌落数在15~30个,“++”表示菌落数在6~14个,“+”表示菌落数在5个以下,“—”表示没有菌落.

(2) 质粒向酵母原生质体的转化情况见表3. 菌落生长情况见附图.

表3 质粒向酵母原生质体电转化情况

分组情况		对照组		加质粒照射组				不加质粒照射组					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
培养 情况	平板1	—	+	+	++	++	++++	—	—	+	—	—	—
	平板2	—	+	++	++++	++++	++++	+	+	+	—	—	—
	平板3	—	—	++	++++	++++	++++	+	—	—	+	+	—



附图 菌落生长情况

由附表可见,加质粒照射组与对照组相比,转化率明显提高,其中20min的菌落数最多,长势最好,而40min仅有2个平板长出少量菌落,可能是照射时间太长,导致细胞致死率提高.不加质粒的照射组也有少量菌落生成,可能是电磁脉冲造成了细胞突变所致.

实验结果表明,弱瞬态电磁脉冲能够促进大分子质粒向完整酵母细胞及其原生质体转化,

照射20min 的转化效果最好. 照射时间低于20min 的效果次之, 这可能是由于照射时间较短, 电致孔洞不够大, 或者是孔洞开放时间较短, 质粒转入的机会相对较小所致. 而照射40min 的转化率很低, 可能是照射时间过长, 导致细胞及原生质体的致死率提高, 而使其转化率降低.

低幅度瞬态电磁脉冲有便于控制, 对细胞损伤小的优点. 通过本实验证明, 20V/cm 的低幅度周期性瞬态电磁脉冲可以明显提高酵母及其原生质体的转化率, 并且我们在对大肠杆菌的电转化实验中, 也获得了大量的转化子. 这表明, 低幅度瞬态电磁脉冲可以引起原核及真核生物细胞的电穿孔和电转化, 这为弱电磁脉冲在生物、医学、农业等方面的应用提供了更广阔的空间.

参考文献:

- [1] Shivarova N, *et al.* Stud. Biophys, 1983, 23:595.
- [2] Sanchez M, *et al.* Appl. Environ. Microbiol, 1993, 59:2087.
- [3] 汪和睦, 等. 酵母整细胞及原生质体的最佳电穿孔条件[J]. 生物物理学报, 1986, 2(4):364.
- [4] 刘长军, 等. 低强度快速电磁脉冲导致细胞电穿孔的研究[J]. 科学通报, 1999, 44(11):1157.
- [5] 张弘, 等. 利用弱电磁脉冲对细胞电穿孔提高抗癌药物疗效的研究[J]. 电波科学学报, 1999, 44(增刊):397.
- [6] 刘祖洞. 遗传学实验[M]. 北京:高等教育出版社, 1987, 127.

STUDY THE ELECTROTRANSFORMATION OF INTACT SACCHAROMYCES CEREVISIAE AND IT'S PROTOPLAST DUE TO WEAK ELECTROMAGNETIC PULSES

ZHANG Hong¹, LIU Chang-jun¹, WANG Bao-yi¹, WANG Zi-shu²

(¹. Department of Radio Electronics, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

². Department of Biology, Sichuan University, Chengdu 610064, China)