

文章编号:1673-1689(2005)04-0013-04

影响根癌农杆菌的电击转化条件

匡小婴, 饶志明*, 沈微, 方惠英, 诸葛健*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要:采用电击转化方法将二元载体质粒 pCAM3300 导入根癌农杆菌 LBA4404, 研究了不同实验条件对转化率的影响。结果表明:当电场强度为 11 kV/cm 时, 转化率最高, 每微克 DNA 得到 9.8×10^3 CFU; 在细胞 OD₆₀₀ 为 1.0 时进行电转化, 转化率最高, 每微克 DNA 得到 9.54×10^3 CFU; 在一定的细胞浓度范围内, 电击转化率与细菌浓度密切相关, 转化率随着细菌浓度的上升而上升; 质粒大小与电击转化率之间没有明确的关系。将含 pCambia3300 的根癌农杆菌与粗糙链丝菌共培养转化, 在含有腈化麦黄桐(PPT)(405 mg/L)的平板上筛选到转化子。PCR 扩增转化子的染色体, 初步证明 Bar 基因整合进粗糙链丝菌的染色体中。

关键词:根癌农杆菌; 电击转化法; PPT 抗性

中图分类号:Q 93

文献标识码:A

Studies on Electroporation Transformation of *Agrobacterium tumefaciens*

KUANG Xiao-ying, RAO Zhi-ming*, SHEN Wei, FANG Hui-ying, ZHUGE Jian*

(The Key Lab of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The binary vectors pCAM3300 was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. Effects of different electroporation conditions on transformation frequency were studied. The results suggested transformation frequency reached to 9.8×10^3 CFU/ μ g DNA, the highest level, when the electrical field strength was 11 kV/cm. Transformation frequency also reached a highest level of 9.54×10^3 CFU/ μ g DNA when OD₆₀₀ was at about 1.0. The transformation frequency was related to cell density, it increased with the increase of cell concentration. However, the size of plasmid had no specific relation with electroporation. The *A. tumefaciens* containing the binary vectors pCAM3300 co-cultured with *Neurospora crassa* and transformants were gained on plate containing 405 mg/L of PPT. PCR results demonstrated that Bar gene was integrated into chromosome of *Neurospora crassa*.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*; electroporation; PPT resistance

自从 1973 年 Mishra 等首次报道真菌的遗传转化以来, 丝状真菌遗传转化已经取得较大的进展,

最常用的转化方法有 CaCl₂-PEG 法、电激法和基因枪法等。但是这些方法的特点是以原生质体作为受

收稿日期:2004-09-20; 修回日期:2004-11-02.

基金项目:国家自然科学基金项目(30300027)资助课题.

作者简介:匡小婴(1975-),女,湖南祁东人,微生物专业硕士研究生,*通讯作者.

体的,而许多丝状真菌的原生质体制备困难,有的甚至无法制备。因此,采用这些转化方法时,其效果往往不稳定、重复率差、转化效率低,且原生质体的制备与再生的步骤比较繁琐,不利于转化子的快速制备。根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)可用于转化细菌、真菌、动物,并将其 Ti 质粒上的一段 DNA 整合进基因组,从而稳定地遗传给后代。国外学者已经成功转化酵母、构巢曲霉和镰刀霉等真菌,这一方法明显地提高了转化率,可以获得稳定的转化子,在应用领域中具有很大的潜能^[1]。

将双元载体质粒导入根癌农杆菌中常用的方法有三亲杂交法、冻融法、电击转化法等。三亲杂交法必须在诱动菌的参与下才能导入,而冻融法导入效率较低。作者采用电击转化法将双元载体质粒 pCAM3300 导入根癌农杆菌 LBA4404 中,从而构建共转化供体菌;并对质粒经电击转化法导入根癌农杆菌的影响因素、转化条件及效果进行了研究。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404;含利福霉素(Rif)及链霉素(Str)抗性;pCAM3300;含卡那霉素(Kn)抗性。

1.2 培养基

YM 培养基(g/L): KH_2PO_4 0.5, MgSO_4 0.2, 酵母提取物 0.3, 甘露醇 10, L-谷氨酸 2, NaCl 0.1, 琼脂 15。pH 7.0;

MM 培养基、IM 诱导培养基;参见文献[2,3]。

1.3 根癌农杆菌的电击转化

将根癌农杆菌 LBA4404 单菌落接入 5 mL YM 培养基中,28℃振荡培养过夜。以 10%的接种量转接至 50 mL YM 培养液中,28℃、150 r/min 振荡培养至对数生长期(OD_{600} 为 0.8~1.2)。4℃、8 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,用预冷的无菌双蒸水洗涤 4 次,用无菌预冷 10%的甘油洗涤,离心,再用 1 mL 无菌预冷的 10%甘油重悬菌体,取 200 μL 菌悬液于 1.5 mL 离心管,加 5 μL 质粒 DNA 于菌液中,混匀并转移至无菌预冷的电击杯中(电极间距为 0.1 cm),吸干电击杯表面的水。将电击杯放入电转化仪的电极之间,在不同电压下电击 5 ms,取出电击杯,迅速加入 1 mL YM 液体培养基,混匀并转移细胞至 1.5 mL 的离心管中,在 28℃振荡孵育 3 h,取适量菌液涂布选择培养基,28℃培养 3 d,观察转化子。取没有加质粒 DNA 的农杆菌在同样电击条件下筛选对照。

万方数据

1.4 根癌农杆菌 Ti 质粒介导转化

将含有 Bar 基因的中间载体通过电击法转入根癌农杆菌 LBA4404 中,将含有中间载体的根癌农杆菌 LBA4404 在 MM 培养基上培养 2 d,用 IM 培养基稀释至 OD_{600} 值为 0.15,再预培养 6 h 后,与等体积的粗糙脉胞菌的孢子悬浮液混合,在含有 200 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮(acetosyngone, AS)并铺有硝酸纤维素滤纸的 IM 平板上涂布适量的上述混合菌液,28℃培养 2 d,将混合菌转入含有 100 $\mu\text{g/mL}$ 头孢噻肟和 405 mg/L 磷化麦黄酮(L-phosphiothricin, PPT)的 MM 培养基上培养 5 d,筛选转化子。

1.5 粗糙脉胞菌染色体 DNA 提取与 Bar 基因 PCR 扩增

粗糙脉胞菌染色体 DNA 提取方法见文献[5],根据 Bar 基因的 5'和 3'端序列设计一对引物,引物分别为: Sense primer(5'-CGCGGATCCATGAGC-CCAGAACGACGC-3'), Antisense primer (5'-CGCGAGCTCCGCTTCAGATCTCGGTGA-3')。PCR 扩增条件:94℃预变性 5 min;94℃45 s,56℃90 s,72℃90 s,35 个循环,72℃延伸 10 s。PCR 扩增体系:取 DNA 模板 1 μL ,10 倍 PCR 缓冲液 2 μL ,引物 2 μL ,dNTPs 2 μL ,Taq DNA 聚合酶 0.5 μL ,总反应体积为 20 μL 。琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

2 结果与讨论

2.1 不同电压对转化率的影响

电击转化细胞时,细胞膜两端产生一个电位,一旦细胞膜上所产生的电位超过一定限度时,膜会局部破裂,而导致外源 DNA 进入细胞,细胞膜产生的电通透性是暂时的,只要电场大小不超过一定限度,否则细胞就会产生不可逆破裂^[6]。电场强度是电击转化的重要参数,因此研究电场强度对转化率的影响。由图 1 可知,随着电场强度的不断增加,转化率有先升后降的趋势。当电压为 11 kV/cm 时,转化率最高,达到每微克 DNA 9.8×10^3 CFU。

2.2 细胞生长时期对转化率的影响

处于对数生长期的菌株细胞壁结构致密性较差,外源 DNA 容易进入。按 10%的接种量将菌株培养至不同的生长时期,取样分别制成感受态细胞,在电场强度为 11 kV/cm 和脉冲时间为 4.5 ms 的条件下研究细胞生长状态对转化的影响,结果见图 2。处于对数生长中期的细胞生长旺盛,转化效果明显高于稳定期的细胞。在细胞的 OD_{600} 为 1.0 时进行电转化,转化率可达到最高,每微克 DNA 得到 9.

54×10^3 CFU.

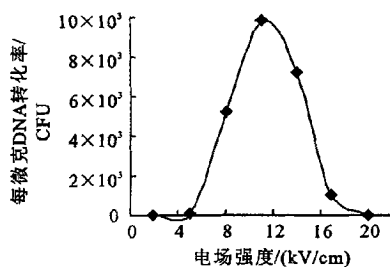


图1 电场强度对转化率的影响

Fig.1 Effects of field strength on the transformation efficiency

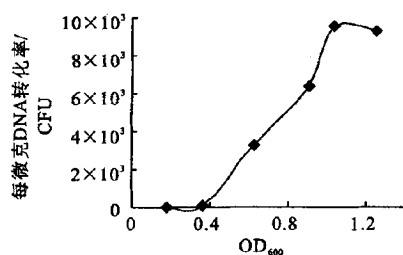


图2 细胞生长时期对转化率的影响

Fig.2 Effects of cell growth phase on the transformation efficiency

2.3 细胞浓度对转化率的影响

转化效率可以通过细菌悬浮液的浓度来调节。OD₆₀₀值为1.0时制作感受态细胞,并按不同的比例稀释感受态细胞,使细胞浓度分别为 4×10^8 , 4×10^7 , 4×10^6 , 4×10^5 , 4×10^4 CFU。在电压为 11 kV/cm 和电击时间为 4.8 ms 时研究细胞浓度对电击转化率的影响,结果发现电击转化率随着细菌浓度的上升而上升。

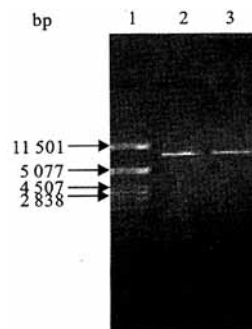
2.4 质粒的大小对转化效率的影响

一般认为质粒的大小可以影响转化效率,质粒

pCAM3300hyg (12 631 bp)、pCAM3300-013 (14.333 kb)是以 pCAM3300 为基础构建的重组质粒。将3种大小不同的质粒在电压为 11 kV/cm 和电击时间为 4.8 ms 的条件下,分别电击转化,结果表明质粒大小与转化效率之间没有明确的关系。

2.5 转化子质粒的提取和酶切验证

对电击转化后培养得到的根癌农杆菌 pCAM-BIA3300/LBA4404 转化子提取质粒 DNA^[7]。用限制性内切酶 *Hind* III、*Sac* I 分别进行单酶切,琼脂糖凝胶电泳检测,见图3。转化子的质粒大小在 8.4 kb 左右,大小正确。



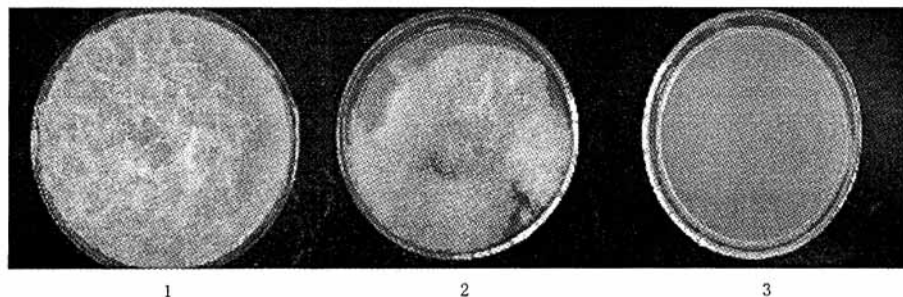
1. λ DNA/*Pst* I; 2. pCAMBIA3300/*Hind* III; 3. pCAM-BIA3300/*Sac* I

图3 质粒 pCAMBIA3300 酶切图

Fig.3 The electrophoresis map of pCAMBIA3300 with restriction endonuclease

2.6 含有 Bar 基因的粗糙脉孢菌的筛选

转化过的粗糙脉孢菌和未转化过的原始菌株分别涂布在含有 405 mg/L 的 PPT 的土豆培养基平板上,见图4。转化后的粗糙脉孢菌在平板上生长,而原始粗糙脉孢菌在平板上没有长出。转化子在 PPT 抗性平板转接4次,获得稳定转化子。



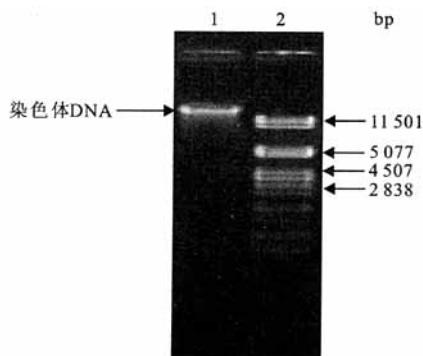
1. 原始粗糙脉孢菌在没有 PPT 抗性的土豆培养基平板上生长旺盛; 2. 转化后的粗糙脉孢菌在含 405 mg/L 的 PPT 平板上生长; 3. 原始粗糙脉孢菌在加有 405 mg/L PPT 平板上没有生长。

图4 粗糙脉孢菌各种平板中的生长情况

Fig.4 The growth condition of *Neurospora crassa* in different plate

2.7 PCR 鉴定

分别以未转化的粗糙脉孢菌的染色体基因组 DNA 及转化后的粗糙脉孢菌的染色体基因组 DNA 作为模板进行 PCR, 结果见图 5, 6。大多数转化子中均能扩增出与 *Bar* 基因大小相同的片段, 而未转化的粗糙脉孢菌中未能扩增出相应的片段, 因此初步认为转化成功。通过 PCR 扩增验证表明: *Bar* 基因经根癌农杆菌介导转化后, 已经成功转入粗糙脉孢菌中, 转化后的粗糙脉孢菌含有 PPT 抗性。



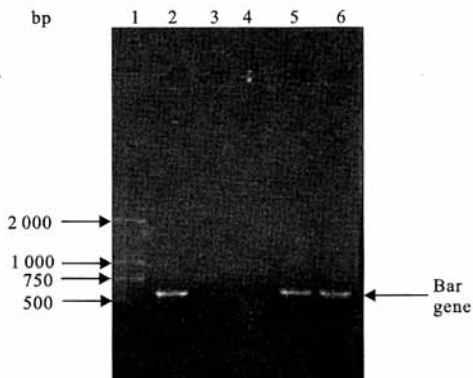
1. 提取的 *N. crassa* 染色体 DNA; 2. λ -DNA/*Pst* I

图 5 *N. crassa* 染色体 DNA 的提取

Fig. 5 Extraction of chromosome DNA from *N. crassa*

3 结 论

利用根癌农杆菌 LBA4404 的 Ti 质粒介导转化粗糙脉孢菌建立了一个高效、新型的转化体系。对质粒经电击转化根癌农杆菌条件的研究表明: 当



1. DL2000 mark; 2, 5, 6. 转化后的粗糙脉孢菌基因组 DNA 扩增 *Bar* 基因; 3, 4. 未转化的粗糙脉孢菌染色体基因组 DNA 扩增 *Bar* 基因。

图 6 PCR 扩增产物的凝胶电泳图

Fig. 6 The agarose electrophoresis of PCR production

电场强度为 11 kV/cm 时, 转化率达到最高值, 每微克 DNA 得到 9.8×10^3 CFU; 在细胞的 OD_{600} 约为 1.0 时进行电转化, 转化率可达到最高, 为每微克 DNA 9.54×10^3 CFU; 在一定细胞浓度范围内电击转化率与细菌浓度密切相关, 转化率随着细菌浓度的上升而上升; 质粒大小与电击转化效率之间没有明确的关系。然后将含有双元载体的根癌农杆菌与粗糙脉孢菌共培养后, 在含有 PPT 的抗性平板上进行筛选, 获得转化子。提取其染色体并进行 PCR 鉴定, 结果表明 *Bar* 基因已经成功转入粗糙脉孢菌中。

参考文献:

- [1] De Groot M J A, Bundock P, Hooykaas P J J, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi[J]. *Nature Biotechnol*, 1998, 16(9): 839.
- [2] Bundock P, Amkeden D R, Beijersbergen A G M, et al. Trans-kingdom T- DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *The EMBO Journal*, 1995, 14(3): 3206—3214.
- [3] Frank L W Takken, Ringo Van Wijk, Caroline B Michielse, et al. A one-step method to convert vectors into binary vectors suited for *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. *Curr Genet*, 2004, 45: 242—248.
- [4] Mark Mersereau, Gregory J Pazour, Anath Das. Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation [J]. *Gene*, 1990, 90: 149—151.
- [5] 周小玲, 沈微, 饶志明. 一种快速提取真菌染色体 DNA 的方法[J]. *微生物学通报*, 2004, 31(4): 89—92.
- [6] Dower W J F, Ragsdale C W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation[J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16: 6127—6145.
- [7] 单世华, 李春娟, 张君诚, 等. 农杆菌质粒 DNA 提取方法的改良与鉴定[J]. *生物技术*, 2003, 13(4): 19—20.

(责任编辑: 李春丽)