

采用激光微束将绿色荧光蛋白基因导入大肠杆菌

李泰明 赵炎生¹ 王 朱 曦 牛亚梅 胡 容

(中国药科大学生物制药学院; 分析计算中心, 南京 210009)

摘要 将 Nd: YAG 三倍频脉冲激光微束系统用于含有绿色荧光蛋白基因的质粒 pS65T 的转化, 利用激光微束技术在经高渗液处理过的大肠杆菌 DH5 α 上打孔, 将质粒成功导入 DH5 α 中, 通过筛选、检测, 证明该方法是一种新的, 快速有效的转化方法。

关键词 激光微束; 绿色荧光蛋白基因; 基因转移; 大肠杆菌

在基因工程技术中, 目前常用的基因转移方法有质粒的转化、DNA 转染、细胞融合、电穿孔、脂质体和“基因枪”等。而利用激光微束技术导入基因则是近年来发展起来的一种新颖而有效的基因转移技术。该技术利用激光方向性强, 单色性好和亮度高的特点进行细胞破壁, 导入质粒载体。激光微束技术较感受态细胞操作简便, 较电穿孔对细胞的损伤小, 因此是一种很有应用价值的基因导入方法。目前国内在这方面研究主要集中在植物细胞、真核生物间的细胞 DNA 转化以及 DNA 的显微切割^[1-3], 而对基因工程中常用的原核生物(大肠杆菌)间的 DNA 转化和传递的报道则较少。绿色荧光蛋白基因是一个极有潜力的新型报道基因^[4,5], 本文拟将含有突变型绿色荧光蛋白基因(GFP 基因)的质粒 pS65T 用激光微束技术转入大肠杆菌 DH5 α 中, 为该方法的可行性和绿色荧光蛋白基因的应用提供依据。

1 材 料

1.1 菌株

宿主菌: DH5 α , BL21 和质粒提供菌: *E. coli* DH5 α /pS65T(南京军事医学研究所)。

1.2 试剂

Tryptone(英国 Oxoid 公司); Yeast extract(英国 Oxoid 公司); Amp(氨苄青霉素, 山东鲁抗医药集团公司); Tris(B. M. 进口分装); EcoRI(上海华美公司); RNase(上海华美公司); IPTG

(南京生达生物工程公司); Marker(1543, 994, 695, 515, 377, 237, 上海华美公司)。

1.3 培养基

LB 液体培养基^[6]: Bacto-Tryptone 1.0%; bacto-yeast extract 0.5%; NaCl 1.0%; 10 mol/L NaOH 调至 pH 7.0

1.4 碱裂解法小量制备质粒 DNA 溶液和电泳用试剂的方法

见文献^[6]。

1.5 高渗液

10% 蔗糖溶液(灭菌)。

1.6 仪器

无菌操作台(苏州净化设备厂); 2K15型台式高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司); 72 可见分光光度计(上海第三分析仪器厂); DYYIII-型稳压稳流电泳仪(南京市六一仪器厂); MultiTemp II 型恒温水浴(瑞典 Pharmacia 公司); Nd: YAG 三倍频激光微束系统(中国药科大学研制); BHF-342 荧光显微镜(日本)

2 方 法

2.1 质粒的提取和检测

2.1.1 质粒的提取 大肠杆菌质粒的提取采用碱裂解法^[6]。

2.1.2 质粒的检测 琼脂糖凝胶电泳^[6] 电泳结束后, 将胶块放入溴化乙锭中染色 0.5 h 后置于紫外灯下观察结果。

2.2 激光微束法导入质粒

(1)接种 DH₅于3 ml LB培养液中, 37℃培养12~16 h, 再取30 μl接种于30 ml LB培养液中, 37℃摇床至OD值约为0.3

(2)取出20 ml培养物, 4℃, 4500 r/min离心4 min, 去上清。

(3)加入等体积高渗液分散菌体。冰浴30 min, 离心去上清, 用预冷的LB培养液重悬, 加入60 μl质粒。

(4)取部分置于生物倒置显微镜载物台上进行激光照射。激光波长为532 nm, 激光脉冲宽度为15 ns, 每个脉冲能量为24 mJ/cm², 脉冲频率1次/秒, 照射400次, 25倍显微物镜, 聚焦光斑约为2 μm 余下样品为空白对照。

(5)照射后在冰上放置20 min, 37℃摇床复苏1 h

(6)涂于含Amp(100 μg/ml)的平板上, 37℃培养箱放置16 h

2.3 CaCl₂转化法

见文献^[6]。

2.4 转入后目的基因检测

将一导入后的菌落接种于3 ml LB培养液中37℃16 h, 抽提质粒, Eco RI酶切后检测目的基因^[6]。

2.5 质粒转入后菌的遗传稳定性检测

取一质粒转入后的单菌落接种于含Amp(100 μg/ml)的平板上, 37℃培养12 h, 挑取长出的菌种再接种于含Amp(100 μg/ml)的平板上, 观察菌的生长状况。

2.6 激光对宿主菌的诱变作用

用平板稀释法检测宿主菌pS65T激光转化菌株及CaCl₂转化菌株的抗Amp敏感度。另取至OD值为0.3的宿主菌, 不加质粒, 同样用激光照射, 用平板稀释法检测抗Amp的敏感度。

2.7 绿色荧光蛋白的表达

将菌种BL2接种于3 ml LB液体培养基37℃摇床12 h活化, 按2%的接种量接种于4 ml含Amp(200 μg/ml)的LB液体培养基中, 37℃摇床培养约2 h, 使OD值为0.6~0.9, 加入IPTG使终浓度为1 mmol/L, 让其表达约6 h, 4℃放置10 h, 取样20 μl于载玻片上, 在荧光显微镜下观察。

3 结果

3.1 激光对质粒的导入

利用激光微束成功地将带有绿色荧光蛋白基因的质粒pS65T导入经过10%高渗液处理后置于培养液中的宿主菌DH₅中。

3.2 各菌的抗Amp敏感度

Tab 1. Anti-Amp sensitivities of bacteria

	DH ₅	DH ₅ /pS65T	DH ₅ introduced by CaCl ₂	DH ₅ introduced by laser microbeam	DH ₅ by laser microbeam
I: 1	-	+	+	+	-
I: 2	-	+	+	+	-
I: 4	-	+	+	+	-
I: 8	-	+	+	+	-
I: 16	+	+	+	+	+
I: 32	+	+	+	+	+
I: 64	+	+	+	+	+

Amp concentration 100 μg/ml; + growth; - no growth

表结果显示激光对宿主菌的Amp抗性没有影响。

3.3 导入后质粒的电泳检验

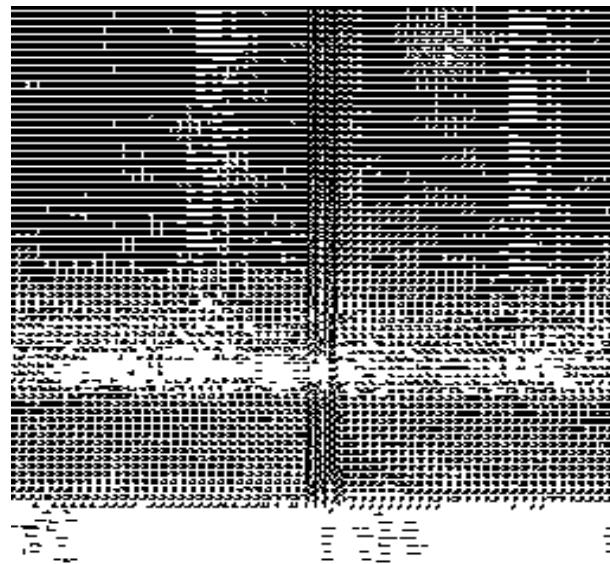


Fig 1. Agarose electrophoresis

A: DN A extract of DH₅ not including pS65T; B: DN A extract of DH₅ including standard pS65T; C: DN A extract of DH₅ including pS65T which was introduced by CaCl₂; D: DN A extract of DH₅ including pS65T which was introduced by laser microbeam; E: DN A extract of DH₅ not including pS65T by laser microbeam

由图知激光微束导入的质粒与原质粒和氯化钙转入的质粒电泳图谱相同,原始的宿主菌与激光诱变后的菌均不含质粒

3.4 酶切后绿色荧光蛋白基因的电泳图谱

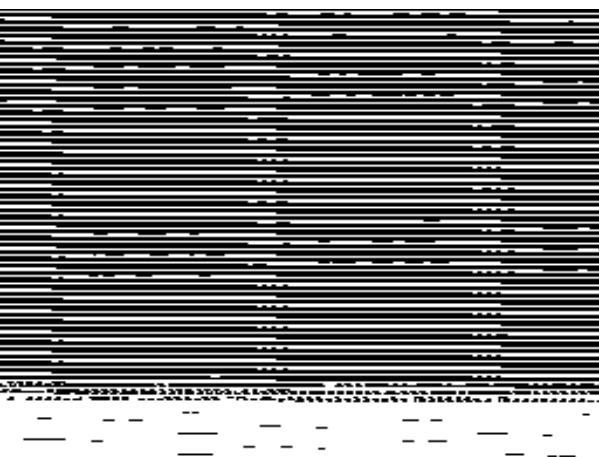


Fig 2. Agarose electrophoresis for detecting green fluorescent protein gene

A 绿色荧光蛋白基因的标本 pS65T

B 绿色荧光蛋白基因的标本 pS65T 由激光微束导入

C 标记

从图2结果可以看出,激光转入后的绿色荧光蛋白基因没有受到激光的破坏

3.5 导入质粒的遗传稳定性

质粒导入后,宿主菌传代三次,遗传性能稳定

3.6 绿色荧光蛋白基因表达结果

在荧光显微镜下可清楚看到菌体发出绿色荧光,表达成功。

4 结 论

本文将宿主菌 DH5 α 用高渗液处理后置于培养液中,用 Nd: YAG 三倍频调 Q 激光微束系统在宿主菌 DH5 α 打孔将含有 gfp 基因的质粒 pS65T 成功导入 Dh5 α 中,通过筛选、检测,证明该方法是一种新的,可行的转化方法,对菌、质粒和目的基因——绿色荧光蛋白基因没有任何损伤,遗传性能稳定。为激光微束技术实际应用和绿色荧光蛋白的应用提供了可行性依据。

激光微束法转化目的基因受很多因素影响,聚焦位置,宿主菌的处理方式及高渗液的浓度对质粒的转化都有较大的影响。其转化率尚不及 CaCl₂ 法,有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Wen T, Wilkinson J, Stanbridge E J, et al. Direct gene transfer into human cultured cells facilitated by laser micropuncture of the cell membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**: 4180
- 2 王兰岗,宋桂英,徐正平等.利用激光微束将外源基因导入高等植物细胞的研究.激光生物学,1996,5(1): 809
- 3 沈子威,张斌,张至诚等.激光微束诱导 pSV β 质粒导入 HeLa 的细胞研究.激光生物学,1995,4(3): 673
- 4 邓小昭,岳莉莉,刁振宇等.新型报道基因及绿色荧光蛋白发光特性的研究.药物生物技术,1998,5(1): 6
- 5 Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, **263**(11): 802
- 6 萨姆布鲁 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T 等. 分子克隆. 第 3 版, 北京: 科学出版社, 1995. 19, 304, 822

Study on Introduction of the Green Fluorescent Protein Gene into *E. coli* by Using Laser Microbeam

Li Taiming, Zhao Yansheng¹, Wang Min, Zhu Xi, Niu Yamei, Hu Rong

School of Biopharmaceutics; Centre of Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract A laser microbeam system was introduced to the study of green fluorescent protein (GFP) gene transfer. Laser microbeam was used to break up cell wall of *E. coli* (DH5 α). The plasmid pS65T of having GFP was successfully introduced into DH5 α and expressed. The strain was genetically stable. This method is proved to be quick and efficient in introducing, expressing, screening and detection.

Key words Laser microbeam, Gene transfer, Green fluorescent protein gene; *E. coli*