DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.014
第23卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 7
2001年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2001

文章编号:1000-5404(2001)07-0783-03

论著

奇异变形杆菌质粒转化方法的比较研究

黄春基[1],周来新[2],解晓珍[1],徐启旺[3] (第三军医大学:[1]附属新桥医院检验科,重庆 400037;[2]附属西南医院科研科;[3]生物波研究中心;重庆 400038)

提 要:目的 对非工程菌奇异变形杆菌的质粒转化方法及质粒载体的选择进行探讨。方法 采用了3种不同的转化方法:氯化钙法、硫酸镁法和高压电穿孔法;两种不同的质粒:pUC19和pMD101,对工程菌大肠杆菌HB101及非工程菌奇异变形杆菌进行质粒转化试验。结果 3种转化方法的比较试验说明,高压电穿孔法受菌株间差异的影响最小,可作为不同菌株间通用的转化方法;细菌传代及质粒丢失试验显示,广宿主质粒pMD101在大肠杆菌及奇异变形杆菌体内均可稳定复制。结论 选择高压电穿孔转化法及广宿主质粒是非工程菌参考菌株构建成功的关键。

关键词:奇异变形杆菌;质粒;转化
中图法分类号:R378.99;R394-33 文献标识码:A

Comparative study on methods of *Proteus mirabilis* plasmid transformation

HUANG Chun-ji, ZHOU Lai-xin, XIE Xiao-zhen, XU Qi-wang (Department of Clinical Laboratory, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the selection of transformation methods and plasmid vehicle during construction of a *Proteus mirabilis* conference strain. Methods Three different transformation methods ($CaCl_2$, $MgSO_4$, and electroporation), two plasmids (pUC19 and pMD101), and two bacteria strains (*E. coli* HB101 and *Proteus mirabilis*) were used to find a feasible way to transform a non-engineering bacterial strain. Results Result showed that electroporation method could be used as a universal modality because it was hardly affected by the divergence of different bacteria strains. Bacterial multiplicative growth and plasmid loss test revealed that pMD101 could be replicated both in *E. Coli* and in *Proteus mirabilis*. Conclusion In order to successfully transform a non-engineering bacteria strain such as *Proteus mirabilis*, it is the key point to select electroporation transformation method and broad-host range plasmids.

Key words: *P. mirabilis*; plasmid; transformation

在当今的分子生物学领域,向JM109、HB101等工程菌株中转入连接有目的基因的pBR、pUC系列质粒已成为一种常规操作,并且这些常用的菌株和质粒已经能够满足多数分子生物学研究工作的需要。但在细菌学研究领域,在研究某一特定种属的细菌时,常常要用到一些含特定生物学性状的参考菌株,这些参考菌株的获得,除了购买或自己筛选、鉴定外,通过转入含有目的基因的质粒来构建也是一条重要途径。我们在研究奇异变形杆菌耐药性变迁的过程中,由于产质粒介导的AmpC β-内酰胺酶的奇异变形杆菌既无现成商品菌株也不易从临床菌株中分离到,于是采用了人工构建的方法。在这个产酶菌株的构建过程中,我们发现非工程菌株的转化远比工程菌的转化复杂,本实验旨在对非工程菌标准耐药菌株构建过程中质粒载体及转化方法的选择作一探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 奇异变形杆菌临床分离株,由第三军医大学附属新桥医院检验科分离鉴定,对本实验中采用的抗生素均敏感,编号分别为105S,106S。大肠杆菌HB101,购自华美生物工程公司。

1.1.2 质粒 质粒pUC19,购自华美生物工程公司,含Amp^r抗性基因,可编码产生TEM-1β-内酰胺酶。质粒pMD101,德国达木士塔(Darmstadt)微生物研究所Martin教授惠赠,该质粒是由广宿主质粒pKT231(Km^r,Sm^r)连接了编码AmpCβ-内酰胺酶的AmpC基因构建而成[1]。

1.1.3 药品 氨苄西林(Ampicillin, Amp),上海第三制药厂生产。

1.2 方法

1.2.1 pUC19、pMD101转化奇异变形杆菌105S,106S及大肠杆菌HB101 分别采用氯化钙法[2]、硫酸镁法[3]和高压电穿孔法[4],将质粒pUC19及pMD101向奇异变形杆菌105S、106S及大肠杆菌HB101中转化。转化菌涂布于含Amp 60μg/ml的LB选择平板,过夜培养,次日观察LB选择平板上的转化菌落并计算转化效率。各转化组均设置空白对照。以上操作均重复4次。

1.2.2 转化菌的传代培养及质粒丢失试验 将大肠杆菌、奇异变形杆菌的pUC19、pMD101转化菌在不含抗生素的LB平板上进行传代培养。24 h后,用pH 7.2 Tris缓冲液将平板上的细菌洗脱制成菌悬液,分别取10μl菌悬液涂布于含60μg/ml Amp的LB平板及不含抗生素的LB平板上,待生长出菌落后分别进行菌落计数并计算耐药菌在总菌数中所占比例。对在不含抗生素平板上生长的细菌重复上述操作,共传代培养5次,每次都记录耐药菌在总菌数中所占比例,以观察各种转化菌中耐药质粒的丢失情况。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30000001)
作者简介:黄春基(1972-),男,广东省龙川市人,硕士,主治医师,主要从事微生物学方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68755000-74695
收稿日期:2000-08-18;修回日期:2001-02-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3 统计学处理

采用 t 检验。

2 结果

2.1 3种转化方法对奇异变形杆菌及大肠杆菌的转化效率

结果见表1。其中氯化钙法、硫酸镁法对奇异变形杆菌的转化效率均为零，高压电穿孔法对奇异变形杆菌可达到 10^7～10^8 的转化效率。而以上3种方法对大肠杆菌均可达到一定的转化效率，其中以高压电穿孔法转化效率最高。

2.2 各转化菌在传代培养过程中耐药菌比例的变化情况

结果如表2。奇异变形杆菌pUC19转化菌中耐药菌在传代培养过程中迅速减少，至第4代时耐药菌在总菌中的比例已下降为零。而奇异变形杆菌的pMD101转化菌及大肠杆菌HB101的所有转化菌在传代培养过程中，耐药菌没有减少的趋势。

表1 3种转化方法对奇异变形杆菌及大肠杆菌的转化效率(μg^{-1})

Tab 1 Efficiency of 3 transformation metheds to *P. mirabilis* and *E. coli*(μg^{-1})

Srain of bactera	Method					
	$CaCl_2$		$MgSO_4$		Electropoin	
	pUC19	pMD101	pUC19	pMD101	pUC19	pMD101
P. mirabilis 105S	0	0	0	0	$(7.32\pm0.47)\times10^8$	$(5.66\pm0.28)\times10^7$
P. mirabilis 106S	0	0	0	0	$(1.48\pm0.26)\times10^8$	$(8.14\pm0.48)\times10^7$
E. coli HB101	$(1.22\pm0.23)\times10^6$	$(7.65\pm0.32)\times10^5$	$(8.96\pm0.53)\times10^7$	$(8.27\pm0.44)\times10^7$	$(6.58\pm0.34)\times10^9$	$(9.62\pm0.56)\times10^8$

Note: $\bar{x}\pm s$ of 4 experiments

表2 传代培养过程中耐药菌/总菌比值(%)

Tab 2 Variation of drug resistance ratio in the course of propagation(%)

	Generation				
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ
P. mirabilis 105S					
PUC19	92	46	7	0	0
PMD101	84	98	92	85	93
P. mirabilis 106S					
PUC19	84.0	59.8	18.7	4.2	0
PMD101	96	84	90	94	87
E. coli HB101					
PUC19	96.4	89.3	94.0	88.6	91.0
PMD101	97.7	92.9	95.8	84.2	90.0

3 讨论

质粒转化方法目前主要有3类：氯化钙法[2]、硫酸镁法[3]和高压电穿孔法[4]。目前对氯化钙法及硫酸镁法的转化机制尚不清楚，这两种方法中转化效率的提高都是经验性的实验结果，是针对特定的大肠杆菌菌株而优化的，因此将这两种方法用于转化其他大肠杆菌菌株或其他菌种时，往往不能达到理想的转化效率甚至不能转化成功。本实验试图用氯化钙法及硫酸镁法向奇异变形杆菌转入质粒pUC19及pMD101，均未获成功，其原因可能是奇异变形杆菌细胞壁上缺乏 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的作用靶位或其他未知因素。本实验中运用高压电穿孔法转化奇异变形杆菌却获得了成功，这很可能是由于高压电穿孔法作为一种物理转化法，受细菌胞壁构造差异的影响较小[5]。对于大肠杆菌HB101，无论是氯化钙法、硫酸镁法还是高压电穿孔法，转化成功均不成问题，只是转化效率有所不同。由此可见，在向工程菌株如大肠杆菌HB101、JM109等转入质粒时，可根据实验室条件选用上述3种转化方法中的任意一种。在非工程菌菌株质粒转化时，转化方法的选择则至关重要，本实验结果提示，对于大多数非工程菌株而言，高压电穿孔法可能不仅是首选，而且还很可能是唯一的选择。

pUC系列质粒在大肠杆菌HB101、JM109等工程菌株中具有高拷贝、高表达的特点，是当前分子生物学领域中最为常用的质粒载体之一。但另一方面，由于这些质粒是窄宿主(Narrow host range)质粒，在许多非工程菌株中往往不能稳定复制和高效表达。在本实验中，大肠杆菌HB101的pUC19转化菌在多次传代后，耐药菌的比例始终比较恒定，没有质粒丢失的趋势。而奇异变形杆菌的pUC19转化菌在传代过程中耐药菌逐步减少，至第4代时，耐药菌完全消失，表明耐药质粒已丢失殆尽；但奇异变形杆菌的pMD101转化菌在传代过程中没有出现质粒丢失的倾向，由此可见，pUC19作为窄宿主范围质粒，可以在大肠杆菌HB101等工程菌株中稳定复制，但不能在奇异变形杆菌等非工程菌株中稳定传代；pMD101作为广宿主(Broad host range)质粒pKT231连接了ampr基因构建而成的重组质粒，则可以在较大范围的菌株中稳定复制、高效表达。

综上所述，关于非工程菌菌株的转化，本实验通过比较研究获得以下两点认识：一是在转化方法的选择上，应选用受细菌间构造差异影响较小的物理转化方法——电穿孔法；二是在质粒载体的选择上，应优先考虑选用广宿主范围质粒系列，如pKT系列、RP4/RK2系列[6]等。

参考文献：

[1] Tolg M, Schmidt H, Schierl R, *et al*. Depence of induction of enterobacterial AmpC β-lactamase on cell-wall peptidoglycan, as demonstrated in Proteus mirabilis and its wall-less[J]. J Gen Microbiol, 1993, 139(10): 2715—2720.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[2] Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992. 50－56.
[3] 曾际斌, 石肖原, 谷秀彬, 等. 一种简易的制备感受态大肠杆菌细胞的新技术[J]. 白求恩医科大学学报, 1993, 19(3): 306－307.
[4] Leopold R A, Hughes K J, DeVault J D. Using electroporation and a slot cuvette to deliver plasmid DNA to insect embryos[J]. Genet Anal, 1996, 12(5-6): 197－200.
[5] Lefrancois J, Sicard A M. Electrotransformation of Streptococcus pneumoniae: evidence for restriction of DNA on entry[J]. Microbiology, 1997, 143(Pt 2): 523－526.
[6] Doran K S, Helinski D R, Konieczny I. Host-dependent requirement for specific DnaA boxes for plasmid RK2 replication[J]. Mol Microbiol, 1999, 33(3): 490－498.

（编辑 王 红）

文章编号: 1000-5404(2001)07-0785-01

个案与短篇

光密度的有效测定及其影响因素的分析

Effective measurement of optical density and analysis on its influencing factors

张 钢[1], 夏志坚[2] （[1] 第三军医大学高原军事医学系病理生理学教研室, 重庆 400038; [2] 重庆大学 ICT 研究中心, 重庆 400044）

在细胞生物学中, 获取与细胞功能相关的定量信息尤为重要。以往对反应物的量常用灰度来表示, 这只是粗略地测量物体由白→黑的深浅程度, 因此, 目前定量研究中更多地用光密度来表示, 但如何准确有效地测量光密度？对此, 我们进行了有效的探讨。

1 原理与方法

1.1 测量原理

光密度测量中物体对光的吸收程度与其浓度的关系符合朗伯-比尔（Lamber-Beer）定律[1]:

$A = \mathrm{Log}(I_{in}/I_{out}) = KCb$

A: 光密度; I_{in}: 入射光强度; I_{out}: 出射光强度; K: 吸光系数; C: 被测物浓度; b: 被测物厚度。

对图像而言应表示为:

$A(x, y) = \mathrm{Log}[I_{in}(x, y)/I_{out}(x, y)] = \mathrm{Log}[L_{in}(x, y)/L_{out}(x, y)] = K(x, y)C(x, y)b(x, y)$

L 为灰度(x, y): 显微图像中测量像素点的空间位置

图像分析系统上直接测得的是灰度, 光密度是通过一定关系转换过来的, 但直接利用朗伯-比尔定律会带来严重的非线性误差。同时显微镜的光场不可能绝对均匀, 载、盖玻片对背景光强度的影响及切片染色的不一致都会对测量带来误差。

针对以上问题, 我们作了以下改进。

1.1.1 将图像传感器和图像采集卡作特殊设计, 将 Lamber－Beer 定律中的对数计算由传感器和采集卡共同完成, 使图像灰度与光强度之间呈准确的对数关系。这样灰度 L 与光强度 I 之间的关系为 L = C Log（I ）, Lamber-Beer 定律就成了简便的代数运算:

$A(x, y) = \mathrm{Log}[I_{in}(x, y)/I_{out}(x, y)] = \mathrm{Log}\,I_{in}(x, y) - \mathrm{Log}I_{out}(x, y) = C[L_{in}(x, y) - L_{out}(x, y)]$, C 为转换系数

1.1.2 透射图像与背景图像在同一空间位置进行点对点密度转换, 消除背景光强度分布的不均匀, 具体操作步骤如下: ① 确定系统设置; ②系统调零: 稳定显微镜亮度, 人眼聚焦图像, 然后移开载有目标的载片, 光源直射至显微镜物镜上, 启动系统“调零”; ③记录全透图: 将待测目标所在载体空白处（包括载玻片和盖玻片）置于视场中, 重新“调零”, 摄取灰度图像; ④灰度图像转换成密度图像; ⑤光密度计算。

1.2 免疫组化实验

选择 Anti-Actin、Anti-β-tubulin（Boehringer mannheim biochemica Co）两种鼠单抗, 用抗生物素-生物素法研究了正常肝细胞和肝癌细胞的微丝和微管结构, 具体操作参见文献[2]。

2 结果

癌细胞微丝、微管平均光密度（0.374±0.021, 0.401±0.065）明显小于正常肝细胞（0.923±0.071, 0.894±0.052）, 两者差异非常显著（$P<0.01$）。

3 讨论

光密度是客观、可重复、有可比性地度量物体吸收光强弱的标尺。我们认为准确测量光密度必须满足下列条件: ①灰度与光密度实现线性转换, 消除非线性误差; ②在恒定的光源种类和物镜倍率, 一定的亮度范围内进行测量; ③消除背景光强度分布的不均匀, 透射图像与背景图像在同一空间位置进行密度转换; ④根据目标细胞的大小和密度, 选择适当的物镜倍率; ⑤利用人眼灵敏度聚焦清晰图像。

关键词: 光密度; 计算机图像分析; 免疫细胞化学
中图法分类号: Q-331 文献标识码: B

参考文献:

[1] 汤耀法. 光密度的由来及其物理意义[J]. 中国医学物理学杂志, 1997, 14(3): 179.
[2] 蔡文琴, 王伯祥云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 121－123.

作者简介: 张 钢(1968－), 男, 湖南省湘潭市人, 博士研究生, 讲师, 主要从事细胞流变学方面的研究, 发表论文 5 篇. 电话: (023)68752339

收稿日期: 2000-01-10; 修回日期: 2000-11-03

（编辑 薛国文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net