

دانشور

پزشکی

دوماهنامه علمی -

پژوهشی

دانشگاه شاهد

سال شانزدهم - شماره ۸۰

اردیبهشت ۱۳۸۸

وصول: ۸۶/۲/۲۰

آخرین اصلاحات: ۸۷/۱۱/۱

پذیرش: ۸۷/۱۱/۸

روش سریع و مؤثر ترانسفورم سازی باکتری اشریشیاکلی

نویسندگان: محمدرضا نژادمقدم*^۱، رضا هادوی^۲، دکتر محمد باباشمی^۳ و دکتر محمد نیاکان^۴

۱. مربی پژوهشکده نانوبیوتکنولوژی، پژوهشگاه فن آوری های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی - ابن سینا
۲. کارشناس ارشد پژوهشکده آنتی بادی مونوکلونال، پژوهشگاه فن آوری های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی - ابن سینا
۳. استادیار پژوهشکده آنتی بادی مونوکلونال، پژوهشگاه فن آوری های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی - ابن سینا
۴. استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد

مسئول:

* نویسنده

Email: moghaddam@avicenna.ac.ir

چکیده

مقدمه و هدف: ترانسفورم سازی مولکولی سلول های باکتری، نقشی محوری را در روش های کلون سازی مولکولی ایفا می کند. در حال حاضر عمل ترانسفورم سازی به روش شیمیایی و یا به روش شوک الکتریکی (الکتروپوریشن) انجام می شود. درصد موفقیت این روش ها به میزان تجربه و دقت آزمایش کننده ارتباط دارد. بنابراین هر اندازه روش ترانسفورم سازی مولکولی کارایی و کیفیت بیش تری داشته باشد درصد میزان موفقیت آن روش افزایش خواهد یافت. هدف از تحقیق حاضر طراحی یک روش ساده و سریع برای ترانسفورم سازی مولکولی سلول های E.coli بود تا ضمن عدم نیاز به ابزارهای گران قیمت و اختصاصی واجد کارایی لازم نیز باشد.

مواد و روش ها: در روش ابدایی ما بعد از آماده سازی رسوب سلول باکتریایی، آن را با محلول جدیدی به نام ترانسفورم کننده سلول های مستعد (Competent Transformation Solution) (CTS) مخلوط، پس از اضافه کردن ۱ میکرولیتر DNA پلاسمیدی و انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰-۵ دقیقه به آن گلوکز اضافه شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید، سپس عمل کشت سلول ها در پلیت انتخابی LB آگار حاوی ۱۰۰ میلی مولار کلسیم کلراید انجام شد تا پس از انکوباسیون ۱۸ ساعته کلنی های مربوط به سلول های ترانسفورم شده بر روی پلیت رشد یابند.

نتایج: در این روش مرحله شوک گرمایی حذف شد ضمن این که کارایی آن بیش تر از انواع روش های معمول محاسبه گردید (۱۰^۷ سلول ترانسفورم شده در هر میکروگرم DNA پلاسمیدی). نتیجه گیری: روش حاضر به عنوان یک روش ساده و راحت برای تهیه همزمان سلول های مستعد و ترانسفورم سازی معرفی می گردد.

واژه های کلیدی: ترانسفورم سازی، سلول های مستعد، اشریشیاکلی

مقدمه

انتقال پلاسمید (Plasmid) به سلول‌های مستعد باکتریایی (Bacterial Competent cell) با استفاده از روش شوک گرمایی روش بنیادین در زیست‌شناسی مولکولی است [۱]. پایه و اساس اکثر روش‌های ترانسفورم‌سازی باکتری‌ها بر پایه مشاهدات مندل (Mandel) و هیگا (Higa) در سال ۱۹۷۰ طراحی شده است [۲]، یک روش ترانسفورماسیون دیگر هم توسط ریو (Ryu) و هارتین (Hartin) ارائه شده است که از شوک الکتریکی (Electroporation) استفاده می‌کند، کارایی بالای ترانسفورماسیون در این روش بیش از 10^9 – 10^{10} در هر میکروگرم DNA است [۳]. با این وجود، به دلیل نیازمندی روش شوک الکتریکی به ابزارهای اختصاصی و عدم فراهم بودن این ابزارها در بسیاری از آزمایشگاه‌ها، منطقی است از روش‌های ساده‌تر، کم هزینه‌تر و با کارایی بالا استفاده شود. در روش‌های مولکولی بهره‌گیری از نوعی روش آزمایشگاهی سریع و ارزان قیمت می‌تواند جایگزینی مناسب برای روش‌های پرهزینه باشد. محققین استفاده از روش‌های ارزان قیمت و سریع الوصول را همواره بر روش‌های وقت‌گیر ترجیح می‌دهند. برای این مقصود، جهت ساده‌سازی روش ترانسفورم‌سازی، مطالعات مختلفی صورت گرفته است. روش استاندارد ترانسفورم‌سازی اشریشیاکلی (E.coli) با اسید نوکلئیک (DNA) پلاسمیدی شامل دو مرحله است: در مرحله اول سلول‌ها در محلول کلسیم کلراید ($CaCl_2$) و دمای صفر درجه سانتی‌گراد با DNA مخلوط می‌شوند و در مرحله دوم به آن‌ها یک پالس حرارتی $42^\circ C$ وارد می‌گردد. مرحله اول باعث مستعد شدن سلول‌های باکتری نسبت به جذب DNA شده و اعتقاد بر این است که مرحله دوم نیز از طریق مکانیسم ناشناخته‌ای ورود DNA را به سلول تسهیل می‌سازد [۴و۵]. در راستای تلاش محققین برای دستیابی به روش‌های کارآمدتر همواره در اجزای تشکیل‌دهنده محلول‌ها، غلظت و pH بافرهای مورد استفاده در فرآیند

تهیه سلول‌های مستعد تغییرات و اصلاحات متنوعی صورت یافته است [۶–۱۷]. هدف از مطالعه حاضر نیز راه‌اندازی یک روش آسان و مؤثر جهت تهیه سلول‌های مستعد و ترانسفورم‌سازی آن‌ها با توجه به امکانات موجود در آزمایشگاه‌های معمول است.

روش بررسی

پلاسمید و سوش‌های باکتریایی

ما در آزمایش‌های خود از سویه‌های اشریشیاکلی DH5 α ، XL1 blue، TG1 و Top10F⁺ استفاده کردیم. پلاسمید pGEX با اندازه ۴۹۰۰ bp واجد ژن مقاومت به آمپی‌سیلین نیز DNA پلاسمیدی مورد استفاده در تحقیق حاضر بود. سویه‌های باکتری و DNA پلاسمیدی مذکور از پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی - ابن‌سینا تأمین گردید.

الکتروفورز DNA در ژل آگارز و تعیین غلظت DNA پلاسمیدی

ژل آگارز (با توجه به اندازه قطعه DNA مورد نظر) با غلظت ۱ درصد تهیه شد. پس از ریختن نمونه در چاهک، تانک الکتروفورز در حضور بافر TBE به جریان الکتریسیته DC به میزان ۵–۱۰ V/Cm وصل گردید و تا زمان رسیدن رنگ آبی بروموفنل بلو (Bromophenol blue) به نزدیک انتهای ژل، الکتروفورز انجام شد. مولکول‌های اسید نوکلئیک به واسطه حضور اتیدیوم برمایند و درخشش آن در برابر نور UV توسط دستگاه ترانس لومیناتور (UV) مورد بررسی قرار گرفتند. DNA پلاسمیدی بر اساس اندازه و داشتن شکل حلقوی (Supercoil) از سایر مولکول‌های اسید نوکلئیک قابل تمایز است [۱۸]. غلظت DNA پلاسمیدی با اندازه‌گیری میزان جذب نور غیر مرئی محلول واجد DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر و به وسیله دستگاه بیوفتومتر (BioPhotometer; Eppendorf) محاسبه شد.

کشت سویه‌های E.coli

به لوله‌های درب‌دار به نام Loosely Capped واجد ۳ ml محیط LB (Luria Bertani) و ۱۰۰ µg/ml آمپی‌سیلین (LB+Amp) ۱۰ میکرولیتر مایع تلقیح از تیوب‌های ذخیره شده E.coli در گلیسرول و دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و انکوباتور شیکردار (۲۵۰rpm) به مدت ۱۶ ساعت انکوبه گردید. کشت‌های حاصل همان کشت‌های شبانه (Overnight) به حساب می‌آیند.

روشن‌های شیمیایی تهیه سلول‌های مستعد E.coli و ترانسفورم‌سازی

الف) روشن تیمار با کلسیم کلراید

روشن کلسیم کلراید بر اساس روش کوهن (Cohen) و همکاری انجام شد [۱۰]. برای این کار سلول‌های اشریشیاکلی را با بافر کلسیم کلراید (۱۰۰ میلی‌مولار) و در دمای ۴°C به حالت سوسپانسیون درآوردیم. سپس جهت ترانسفورماسیون، DNA را به سوسپانسیون سلول‌های مستعد افزوده و مخلوط را پس از یک شوک حرارتی ۴۲°C و بلافاصله شوک سرد ۴°C پس از ۱ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C بر روی پلیت LB agar + Amp (100 mg/ml) کشت دادیم.

ب) روشن اصلاحی

۳۰ میکرولیتر از کشت شبانه باکتری را به ۳ میلی‌لیتر محیط L.B جدید منتقل کرده و با دور ۲۲۵ rpm انکوبه شد تا OD رشد در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۴ رسید. پس از تهیه رسوب سلولی نمونه کشت به دو قسمت تقسیم شد و به هر دوی آن‌ها ۱ میلی‌لیتر محلول جدید مستعد و ترانسفورم‌سازی CTS سرد (Competent Transformation Solution) واجد 2% yeast extract، 0.5%، 10mM MgCl₂، 10mM NaCl، 10% PEG، tryptone، 50 mM MnCl₂، 15mM CaCl₂، MgSO₄ با PH 6.7 اضافه شد. به یکی از نمونه‌ها، ۵ درصد DMSO و ۱۰ میلی‌مولار PIPES اضافه شد و به نمونه دیگر هیچ یک از این دو ماده اضافه نشد. به هر دو میکروتیوب که از قبل

سرد شده بودند ۱ میکرولیتر (۰/۱ نانوگرم) DNA پلاسمیدی اضافه کرده و برای ۵-۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس به آن ۱۰ میکرولیتر گلوکز ۱ مولار اضافه گردید و برای ۱ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۲۲۵ rpm انکوبه شدند. در این مرحله ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی هر دو میکروتیوب به‌طور جداگانه در پلیت از پیش گرم شده LB+Amp واجد ۱۰۰ میلی‌مولار CaCl₂ کشت داده شدند و با گوی‌های شیشه‌ای (glass spreader) در سطح پلیت پخش شدند. جهت مشاهده سلول‌های ترانسفورم شده، پلیت‌های مذکور به‌صورت کشت شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند.

محاسبه تعداد کارایی ترانسفورم‌سازی بر حسب واحد ایجاد کلونی (cfu)

کارایی ترانسفورم‌سازی بر اساس روش Tu و همکاری [۱۱] به‌وسیله دو معادله زیر محاسبه شد:

تعداد کلنی‌های ترانسفورم شده (cfu) = تعداد کلنی‌های باکتریایی × میزان رقت × میزان حجم مخلوط ترانسفورم‌سازی ÷ حجم پلیت.

کارایی ترانسفورم‌سازی = تعداد کلنی‌های ترانسفورم شده (cfu) ÷ غلظت پلاسمید مورد استفاده بر حسب میکروگرم (cfu/µg).

نتایج

در روشن‌های کشت و آماده‌سازی سوسپانسیون باکتریایی از شرایط مشترک استفاده گردید تا تعداد سلول‌های باکتری شرکت‌کننده در عملیات‌های مختلف مستعدسازی و ترانسفورماسیون برابر و قابل مقایسه باشد. پس از انجام فرآیند ترانسفورم‌سازی، تعدادی از کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط LB+Amp به‌طور تصادفی انتخاب شدند و پس از تخلیص پلاسمید از آن‌ها الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد به عمل آمد. در روشن ترانسفورم‌سازی ما به‌طور میانگین ۱۰۰ کلنی روی پلیت‌های کشت با قطر ۱۰ سانتی‌متر قابل

مشاهده گردید که بیش از ۱۰ برابر روش معمول کلسیم کلراید است (جدول ۱).

بحث

کارایی روش ترانسفورم‌سازی ارائه شده در تحقیق حاضر حدود $1/65 \times 10^6$ cfu/ μ g محاسبه گردید یعنی بیش از ۱۰ برابر روش معمول کلسیم کلراید برای ترانسفورم‌سازی، بیش‌ترین کارایی ترانسفورم‌سازی سلول‌های باکتریایی زمانی است که این سلول‌ها در مرحله ورود به فاز لگاریتمی رشد باشند، از آن‌جا که اپتیمم رنج OD باکتری‌ها هنگام ورود به فاز لگاریتمی رشد متفاوت است، بایستی هنگام کار با سویه جدید اپتیمم رنج آن به دست آید (نمودار ۱). فاکتور مهم دیگر در کارایی ترانسفورم‌سازی وجود و غلظت کاتیون‌های دو ظرفیتی است که با استفاده از نمک‌های این کاتیون‌ها قابل تأمین است. اینو (Inoue) و همکارانش [۱۹] از محلول TB، بریان (Brian) و هلر (Heler) [۷ و ۶] از TFB به جای محلول $CaCl_2$ استفاده کردند. ما نیز با الگوبرداری از مطالعات آن‌ها محلول مناسبی برای مستعدسازی سلول اشریشیاکلی نسبت به جذب DNA پلاسمیدی معرفی کردیم که کارایی ترانسفورم‌سازی را بیش از ۱۰ برابر افزایش داد. تعداد سلول‌های ترانسفورم شده در استفاده از روش $CaCl_2$ معمولی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در هر میکروگرم DNA پلاسمیدی $10^5 \sim 10^6$ گزارش شده است [۱۸]. استفاده از محلول CTS تحت شرایط سهل‌الوصول‌تر منجر شد که تعداد سلول‌های ترانسفورم شده در هر میکروگرم DNA پلاسمیدی به $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ افزایش یابد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند اضافه کردن DMSO به میزان زیادی کارایی ترانسفورم‌سازی را افزایش خواهد داد [۱۹ و ۱۵]. مشابه همین تحقیق، کورین (Kurien) و اسکوفیلد (Scofield) با انکوباسیون سلول‌های مستعد با DNA پلاسمیدی در یک محلول پلی‌اتیلن گلیکول/کلسیم کلراید ($PEG/CaCl_2$) و یک دوره انکوباسیون کوتاه و شوک گرمایی باعث شدند DNA به صورت مؤثرتری

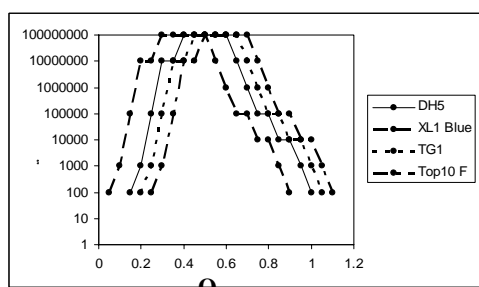
مشاهده بودند، بنابراین طبق معادله Tu تعداد کلنی‌های ترانسفورم شده این‌گونه محاسبه شدند:

$$\frac{165 \times 1 \times 1000 \mu l}{100 \mu l} = 1650 \text{ cfu}$$

از طرفی DNA پلاسمیدی اضافه شده به سلول‌های مستعد در این تحقیق ۱ میکرولیتر با غلظت ۰/۱ نانوگرم بود، بنابراین کارایی فرآیند ترانسفورم‌سازی برابر است با:

$$\frac{1650 \text{ cfu}}{10^{-2} \mu g} = 1/65 \times 10^6 \text{ cfu}/\mu g$$

آزمایش‌های ما نشان داد که سوش‌های متفاوت E.coli ویژگی‌های رشد متفاوتی دارند، همچون E.coli های DH5 α ، TG1، XL1blue، از اینرو اپتیمم رنج OD آن‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر برای ورود به فاز لگاریتمی رشد متفاوت است: به‌عنوان مثال دامنه مناسب OD برای ورود به فاز لگاریتمی رشد برای XL1blue برابر ۰/۱۵-۰/۴۵؛ برای TG1 برابر ۰/۲-۰/۵ و برای DH5 α بین ۰/۴۵ تا ۰/۱۴۵ است (نمودار ۱).



نمودار ۱. مقایسه اپتیمم رنج رشد سلول‌های DH5 α ، XL1 Blue، TG1 و Top10F برای ورود به فاز لگاریتمی رشد جهت تهیه سلول‌های مستعد.

برای اطمینان از کارا بودن روش معرفی شده، کارایی ترانسفورم‌سازی این روش بر روی سه سویه دیگر E.coli نیز محاسبه گردید. کم‌ترین میزان کارایی ترانسفورم‌سازی در TG1 و بیش‌ترین میزان در XL1blue

جذب سلول‌ها شود [۸ و ۶]. نتایج تحقیق حاضر نیز افزایش کارایی ترانسفورم‌سازی را در شرایط حضور DMSO و PIPES نشان می‌دهد (جدول ۱).

مطالعات گذشته محیط‌های غنی‌تر از محیط LB را برای بازآوری سلول‌ها و تکثیر سلول‌های دختری حاوی

جدول ۱. مقایسه کارایی ترانسفورم‌سازی DNA پلاسمیدی در سویه‌های متفاوت E.coli (میانگین)

کارایی ترانسفورم‌اسیون روش اصلاحی واجد DMSO و PIPES	کارایی ترانسفورم‌اسیون روش اصلاحی بدون DMSO و PIPES	کارایی ترانسفورم‌اسیون روش کلسیم کلراید	سویه‌ها E.coli
$1/65 \times 10^7$	$6/95 \times 10^6$	$6/51 \times 10^6$	XL1blue
$1/6 \times 10^7$	$1/65 \times 10^6$	$2/31 \times 10^6$	DH5a
$1/5 \times 10^7$	$1/8 \times 10^6$	$2/42 \times 10^6$	Top 10 F'
$1/4 \times 10^7$	$1/37 \times 10^6$	$2/01 \times 10^6$	TG1

گردند. بنابراین پیدا کردن روشی که به تعداد لازم و در زمان نیاز (هنگام مصرف) بتوان سلول مستعد ترانسفورم‌اسیون تهیه کرد روش جالب و قابل قبول‌تری خواهد بود. در تحقیق حاضر محلول کامل CTS پس از ۶ ماه نگهداری در یخچال (4°C) و دور از تابش نور مجدداً جهت تکرار آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفت و خوشبختانه تفاوت چشمگیری در تعداد باکتری‌های نو ترکیب ایجاد شده نسبت به قبل مشاهده نشد (داده‌ها نشان داده نشده است). این مطلب می‌تواند دلیلی بر پایداری این محلول در دمای 4°C و زمان یاد شده باشد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از پروژه تحقیقاتی جهاد دانشگاهی «ساخت کیت ترانسفورم‌اسیون باکتری اشریشیاکلی با کارایی بالا جهت تسریع در تولید پروتیین نو ترکیب» به شماره ثبت ۱۰-۱۲۳۳ مصوب معاونت پژوهش و فناوری جهاد دانشگاهی است. بدین وسیله از سازمان یاد شده بخاطر حمایت مالی قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Froger A, Hall J, Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method, J Vis Exp. 2007;(6):253.
2. Mandel M, Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J Mol Biol. 1970; 531: 159-162.

پلاسمید پیشنهاد کرده‌اند (همچون محیط‌های SOB و SOC) در این محیط‌ها رشد باکتری‌ها سریع‌تر انجام می‌شود؛ همچنین سلول‌های ترانسفورم شده می‌توانند خیلی زودتر یعنی بعد از ۱۲ ساعت در محیط جامد رشد یابند. بر همین اساس محلول ترانسفورم‌سازی معرفی شده ما در واقع یک محیط کشت غنی نیز است؛ چرا که می‌توان همانند محیط‌های SOB یا SOC برای مرحله بازآوری سلول‌ها و تکثیر سلول‌های حاوی پلاسمید نیز به کار رود.

درباره این که آیا مرحله شوک گرمایی برای جذب DNA حیاتی و ضروری است کمی بحث وجود دارد [۹]. در جدیدترین تحقیق انجام شده روش ترانسفورم‌سازی سلول‌های E.coli با استفاده از شوک گرمایی انجام شده است [۶ و ۵، ۴، ۱] در حالی که در روش ارائه شده مرحله شوک گرمایی حذف گردید ضمن این که به طور میانگین کارایی روش ترانسفورم‌سازی حدود ۱۰ برابر بیش‌تر از روش‌های معمول گزارش می‌شود [۶، ۷، ۱۶، ۱۷ و ۲۰]. در روش‌های معمول از قبیل تیمار با محلول کلسیم کلراید، تعداد زیادی سلول مستعد تهیه می‌شود که دوره مصرف آن‌ها نیز قابل پیش‌بینی نیست. بنابراین پس از مدتی بازده ترانسفورم‌اسیون سلول‌های مستعد شده باقی مانده برای پذیرش پلاسمید کاهش یافته و باید مجدداً با صرف زمان و هزینه‌ای دیگر، سلول‌های مستعد تازه تهیه

20. Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 1990; 96(1): 23-28.
3. Ryu J, Hartin RJ. Quick transformation in *Salmonella typhimurium* LT2. *Biotechniques*. 1990; 8(1): 43-45.
4. Panja S, Saha S, Jana B, Basu T. Role of membrane potential on artificial transformation of *E. coli* with plasmid DNA. *J Biotechnol*. 2006 Dec 15; 127(1):14-20
5. Sha Li, L. Meadow Anderson, Jui-Ming Yang and Liwei Lin, DNA transformation via local heat shock *Applied Biophysics*, 2007; 91(1). 342-346
6. Improvement of bacterial transformation efficiency using plasmid artificial modification, *Nucleic Acids Research*, 2009, Vol. 37, No. 1 e3
7. Brian P and Heler M.K. High efficiency 5 min transformation of *E. coli*. *Nucleic Acids Res*. 1996; 24(3): 536-537.
8. Kurien BT, Scofield RH. Polyethylene glycol mediated bacterial colony transformation. *Biotechniques*. 1995; 18(6): 1023-1026.
9. Chen X, Guo P, Xie Z, Ping S. A convenient and rapid method for genetic transformation of *E. coli* with plasmids, *Antonie van Leeuwenhoek*. 2001; 80: 297-300.
10. Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB. Construction of biologically functional bacterial plasmid in vitro. *National Academy of Sciences of the United States of America*. 1973; 70(11): 3240- 3244.
11. Tu Z, He G, Li KX, Chen M J, Chang J, Chen L, Yao Q, Liu DP, Ye H, Shi J, Wu X. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electronic Journal of Biotechnology* [serial online]. 2005[cited 2006 Aug 17]; 8(1): 113-120. Available from: URL:<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol8/issue1/full/8/>.
12. Takahashi R, Valeika SR, Glass KW. A simple method of plasmid transformation of *E. coli* by rapid freezing. *Biotechniques*. 1992; 13(5): 711-715.
14. Rojas-Chapana J, Troszczynska J, Firkowska I, Morszczek C, Giersig M. Multi-walled carbon nanotubes for plasmid delivery into *Escherichia coli* cells. *Lab Chip*. 2005; 5(5): 536-539.
14. Koga H, Kawano M, Katsuki S, Akiyama H, Abe K, Uchida I and Abe S, High efficiency transformation of *E. coli* by Intense Burst AC Electric Fields, *Papers of Technical Meeting on Pulsed Power Technology, IEE Japan*, 2007; 07(1-9): 67-70.
16. Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16(13): 6127-6145.
17. Okamoto A, Kosugi A, Koizumi Y, Yanagida F, Udaka S. High efficiency transformation of *Bacillus brevis* by electroporation. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1997; 61(1): 202-203.
18. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 1983; 166(4): 557-580.
19. Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning a laboratory manual*. 3rd Ed. New York: CSHL press; 2003.

محمد رضا نژاد مقدم و همکاران