دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی – پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال شانزدهم – شماره 80
اردیبهشت 1388

روش سریع و مؤثر ترانسفورم‌سازی باکتری اشریشیاکلی

نویسندگان: محمدرضا نژادمقدم*[1]، رضا هادوی[2]، دکتر محمد باباشمسی[3] و دکتر محمد نیاکان[4]

1. مربی پژوهشکده نانوبیوتکنولوژی، پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی – ابن‌سینا
2. کارشناس ارشد پژوهشکده آنتی‌بادی مونوکلونال، پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی – ابن‌سینا
3. استادیار پژوهشکده آنتی‌بادی مونوکلونال، پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی – ابن‌سینا
4. استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد

*** نویسنده مسئول:**
Email: moghaddam@avicenna.ac.ir

وصول: 86/2/20
آخرین اصلاحات: 87/11/1
پذیرش: 87/11/8

چکیده

مقدمه و هدف: ترانسفورم‌سازی مولکولی سلول‌های باکتری، نقشی محوری را در روش‌های کلون‌سازی مولکولی ایفا می‌کند. در حال حاضر عمل ترانسفورم‌سازی به روش شیمیایی و یا به روش شوک الکتریکی (الکتروپوریشن) انجام می‌شود. درصد موفقیت این روش‌ها به میزان تجربه و دقت آزمایش‌کننده ارتباط دارد. بنابراین هر اندازه روش ترانسفورم‌سازی مولکولی کارایی و کیفیت بیش‌تری داشته باشد درصد میزان موفقیت آن روش افزایش خواهد یافت، هدف از تحقیق حاضر طراحی یک روش ساده و سریع برای ترانسفورم‌سازی مولکولی سلول‌های E.coli بود تا ضمن عدم نیاز به ابزارهای گران‌قیمت و اختصاصی واجد کارایی لازم نیز باشد.

مواد و روش‌ها: در روش ابدایی ما بعد از آماده‌سازی رسوب سلول باکتریایی، آن را با محلول جدیدی به نام ترانسفورم‌کننده سلول‌های مستعد (Competent Transformation Solution) (CTS) مخلوط، پس از اضافه کردن 1 میکرولیتر DNA پلاسمیدی و انکوباسیون در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 30-5 دقیقه به آن گلوکز اضافه شده و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید، سپس عمل کشت سلول‌ها در پلیت انتخابی LB آگار حاوی 100 میلی‌مولار کلسیم کلراید انجام شد تا پس از انکوباسیون 18 ساعته کلنی‌های مربوط به سلول‌های ترانسفورم شده بر روی پلیت رشد یابند.

نتایج: در این روش مرحله شوک گرمایی حذف شد ضمن این‌که کارایی آن بیش‌تر از انواع روش‌های معمول محاسبه گردید (10^7 سلول ترانسفورم شده در هر میکروگرم DNA پلاسمیدی).

نتیجه‌گیری: روش حاضر به عنوان یک روش ساده و راحت برای تهیه همزمان سلول‌های مستعد و ترانسفورم‌سازی معرفی می‌گردد.

واژه های کلیدی: ترانسفورم‌سازی، سلول‌های مستعد، اشریشیاکلی

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

انتقال پلاسمید (Plasmid) به سلول‌های مستعد باکتریایی (Bacterial Competent cell) با استفاده از روش شوک گرمایی روش بنیادین در زیست‌شناسی مولکولی است [1]. پایه و اساس اکثر روش‌های ترانسفورم‌سازی باکتری‌ها بر پایه مشاهدات مندل (Mandel) و هیگا (Higa) در سال 1970 طراحی شده است[2]، 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[3]. 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 سریع‌الوصول 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 نوکلوئیک (DNA) پلاسمیدی شامل دو مرحله است: در مرحله اول سلول‌ها در محلول کلسیم کلراید ($CaCl_2$) و دمای صفردرجه سانتی‌گراد با DNA مخلوط می‌شوند و در مرحله دوم به آن‌ها یک پالس حرارتی 42°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[4و5]. 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 [6-17]. 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 DH5α، XL1 blue، TG1 و Top10F' استفاده کردیم. پلاسمید pGEX با اندازه bp 4900 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 1 درصد تهیه شد. پس از ریختن نمونه در چاهک، تانک الکتروفورز در حضور بافر TBE به جریان الکتریسیته DC به میزان V/Cm 5-10 وصل گردید و تا زمان رسیدن رنگ آبی بروموفنل بلو (Bromophenol blue) به نزدیک انتهای ژل، الکتروفورز انجام شد. مولکول‌های اسید نوکلوییک به‌واسطه حضور اتیدیوم برماید 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 نوکلوییک قابل تمایز است [18]. غلظت DNA پلاسمیدی با اندازه‌گیری میزان جذب نور غیرمرئی محلول واجد DNA در طول موج 260 نانومتر و به‌وسیله دستگاه بیوفتومتر (BioPhotometer; Eppendorf) محاسبه شد.

Archive of SID

www.SID.ir

کشت سویه‌های E.coli

به لوله‌های درب‌دار به نام Loosely Capped واجد 3 ml محیط LB (Luria Bertani) و 100 µg/ml آمپی‌سیلین (LB+Amp) 10 میکرولیتر مایع تلقیح از تیوب‌های ذخیره‌شده E.coli در گلیسرول و دمای 70- درجه‌سانتی گراد اضافه شد و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و انکوباتور شیکردار (250rpm) به مدت 16 ساعت انکوبه گردید. کشت‌های حاصل همان کشت‌های شبانه (Overnight) به حساب می‌آیند.

روش‌های شیمیایی تهیه سلول‌های مستعد E.coli و ترانسفورم‌سازی

الف) روش تیمار با کلسیم‌کلراید

روش کلسیم کلراید بر اساس روش کوهن (Cohen) و همکارانش انجام شد[10]. برای این کار سلول‌های اشریشیاکلی را با بافر کلسیم کلراید (100 میلی‌مولار) و در دمای 4°C به حالت سوسپانسیون درآوردیم. سپس جهت ترانسفورماسیون، DNA را به سوسپانسیون سلول‌های مستعد افزوده و مخلوط را پس از یک شوک حرارتی 42 °C و بلافاصله شوک سرد 4°C پس از 1 ساعت انکوباسیون در دمای 37°C بر روی پلیت LB agar +Amp (100 mg/ml) کشت دادیم.

ب) روش اصلاحی

30 میکرولیتر از کشت شبانه باکتری را به 3 میلی‌لیتر محیط L.B جدید منتقل کرده و با دور 225 rpm انکوبه شد تا OD رشد در طول موج 600 نانومتر به حدود 0/4 رسید. پس از تهیه رسوب سلولی نمونه کشت به دو قسمت تقسیم شد و به هر دوی آن‌ها 1 میلی‌لیتر محلول جدید مستعد و ترانسفورم‌سازی CTS سرد (Competent & Transformation Solution) واجد 0.5% yeast extract، 2% tryptone، 10% PEG، 10mM NaCl، 10mM $MgCl_2$، 10mM $MgSO_4$، 15mM $CaCl_2$، 50 mM MnCl2 با PH 6.7 اضافه شد. به یکی از نمونه‌ها، 5 درصد DMSO و 10 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 1 میکرولیتر (0/1 نانوگرم) DNA پلاسمیدی اضافه کرده و برای 5-30 دقیقه در 4 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس به آن 10 میکرولیتر گلوکز 1 مولار اضافه گردید و برای 1 ساعت دیگر در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و دور rpm 225 انکوبه شدند. در این مرحله 100 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی هر دو میکروتیوب به‌طور جداگانه در پلیت از پیش گرم شده LB+Amp واجد 100 میلی‌مولار $CaCl_2$ 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 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند.

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

کارایی ترانسفورم‌سازی بر اساس روش Tu و همکارانش [11] به‌وسیله دو معادله زیر محاسبه شد:

تعداد کلنی‌های ترانسفورم شده (cfu)= تعداد کلنی‌های باکتری‌یایی × 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 روش‌های 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 به طور تصادفی انتخاب شدند و پس از تخلیص پلاسمید از آن‌ها الکتروفورز بر روی ژل آگارز 1 درصد به عمل آمد. در روش ترانسفورم‌سازی ما به طور میانگین 100 کلنی روی پلیت‌های کشت با قطر 10 سانتی‌متر قابل

Archive of SID

www.SID.ir

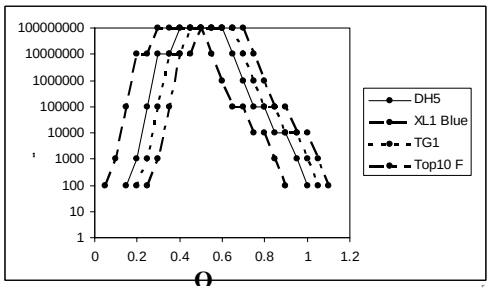
مشاهده بودند، بنابراین طبق معادله Tu تعداد کلنی‌های ترانسفورم شده این‌گونه محاسبه شدند:

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

از طرفی DNA پلاسمیدی اضافه شده به سلول‌های مستعد در این تحقیق 1 میکرولیتر با غلظت 0/1 نانوگرم بود، بنابراین کارایی فرآیند ترانسفورم‌سازی برابر است با:

$$\frac{1650\ \text{cfu}}{10^{-4}\ \mu g} = 1/65\times10^{7}\ \text{cfu}/\mu g$$

آزمایش‌های ما نشان داد که سوش‌های متفاوت E.coli ویژگی‌های رشد متفاوتی دارند، همچون E.coliهای XL1blue، TG1 و DH5α، از اینرو اپتیمم رنج OD آن‌ها در طول موج 600 نانومتر برای ورود به فاز لگاریتمی رشد متفاوت است: به‌عنوان مثال دامنه مناسب OD برای ورود به فاز لگاریتمی رشد برای XL1blue برابر 0/15-0/45؛ برای TG1 برابر 0/5-0/2 و برای DH5α بین 0/45تا 0/145 است (نمودار 1).



نمودار 1. مقایسه اپتیمم رنج رشد سلول‌های DH5α، 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 مشاهده گردید که بیش از 10 برابر روش معمول کلسیم کلراید است (جدول 1).

بحث

کارایی روش ترانسفورم‌سازی ارائه شده در تحقیق حاضر حدود $1/65\times10^{7}$cfu/µg محاسبه گردید یعنی بیش از 10 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 1). 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 [19] از محلول TB، بریان (Brian) و هلر (Heler) [6و7] 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 10 برابر افزایش داد. تعداد سلول‌های ترانسفورم شده در استفاده از روش $CaCl_2$ معمولی در 37 درجه سانتی‌گراد در هر میکروگرم DNA پلاسمیدی 5×10^{5} ~ 1×10^{5} گزارش شده است[18]. استفاده از محلول CTS تحت شرایط سهل‌الوصول‌تر منجر شد که تعداد سلول‌های ترانسفورم شده در هر میکروگرم DNA پلاسمیدی به 5×10^{8} ~ 1×10^{8} افزایش یابد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند اضافه کردن DMSO به میزان زیادی کارایی ترانسفورم‌سازی را افزایش خواهد داد [15و19]. 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

Archive of SID

www.SID.ir

جذب سلول‌ها شود[6و8]. نتایج تحقیق حاضر نیز افزایش کارایی ترانسفورم‌سازی را در شرایط حضور DMSO و PIPES نشان می‌دهد (جدول 1).

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

جدول 1. مقایسه کارایی ترانسفورم‌سازی DNA پلاسمیدی در سویه‌های متفاوت E.coli (میانگین)

سویه‌ها E.coli	کارایی ترانسفورماسیون روش کلسیم کلراید	کارایی ترانسفورماسیون روش اصلاحی بدون DMSO و PIPES	کارایی ترانسفورماسیون روش اصلاحی واجد DMSO و PIPES
XL1blue	$6/51\times 10^6$	$6/95\times 10^6$	$1/65\times 10^7$
DH5α	$2/31\times 10^6$	$1/65\times 10^6$	$1/6\times 10^7$
Top 10 F′	$2/42\times 10^6$	$1/8\times 10^6$	$1/5\times 10^7$
TG1	$2/01\times 10^6$	$1/37\times 10^6$	$1/4\times 10^7$

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 12 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 به‌کار رود.

دربارهٔ این‌که آیا مرحله شوک گرمایی برای جذب DNA حیاتی و ضروری است کمی بحث وجود دارد[9]. در جدیدترین تحقیق انجام شده روش ترانسفورم‌سازی سلول‌های E.coli با استفاده از شوک گرمایی انجام شده است[1،4،5و6] در حالی که در روش ارائه شده مرحله شوک گرمایی حذف گردید ضمن‌این‌که به طور میانگین کارایی روش ترانسفورم‌سازی حدود 10 برابر بیش‌تر از روش‌های معمول گزارش می‌شود [6،7،16،17و20]. 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 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 6 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 نوترکیب 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 نوترکیب» به شماره ثبت 10-1233 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.

Archive of SID
www.SID.ir

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 glycolmediated 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. Avilable from:

12. URL:http://www.ejbiotechnology.info/content/vol8/issue 1/full/8/.

13. 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, Morsczeck C, Giersig M. Multi-walled carbon nanotubes for plasmid delivery into Escherichia coli cells. Lab Chip. 2005; 5(5): 536-539.

15. 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. Mollecular Cloning a laboratory manual. 3rd Ed. New York: CSHL press; 2003.

20. Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. Gene. 1990; 96(1): 23-28.

Archive of SID

www.SID.ir