

基于矿石纳米材料的 DNA 转化的机理初探及方法改进

谭海东, 王磊, 林金涛, 赵宗保

中国科学院大连化学物理研究所生物技术部, 大连 116023

摘要: 一种价格便宜、资源丰富和对人体无害的矿石纳米材料——海泡石, 用于微生物 DNA 转化。该法简便、快速、对人体健康无害, 但对这种转化方法机制的理解还有很多问题。通过小片段 RNA 竞争试验, 发现了与先前报道不同的转化机制。同时, 对该法进行了优化, 结果可以实现对冷藏 1 个月的大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 单菌落直接转化, 无需感受态制备和处理后的温育过程, 可得到比钙转高的转化率。由于可优化的参数很多, 所以这种转化方法可以提升的空间很大。同时, 该方法可用于探索其他用钙转和电转未成功的微生物。

关键词: 矿石纳米纤维材料, 海泡石, DNA 转化, 转化机制

Mechanism of DNA transformation based on mineral nanofibers and method improvement

Haidong Tan, Lei Wang, Jintao Lin, and Zongbao (Kent) Zhao

Biotechnology Division, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China

Abstract: Sepiolite—an inexpensive, resourceful, fibrous yet inoffensive mineral—made DNA transformation rapid, simple and efficient but the mechanism for DNA transformation was still unclear. Through RNA competition test, we proposed the different transforming mechanisms from the previous report. Meanwhile, we optimized the transforming method and could transfer a colony stored at 4°C for a month with plasmid through sepiolite fibers. The cells could be transformed well without competent cells preparation or incubation process. In sum, this was a novel potential transforming method, which could be explored further if the chemical method and electroporation could not be used.

Keywords: mineral nanofibers, sepiolite, DNA transformation, mechanism for transforming

微生物的 DNA 转化方法是基因工程中的重要内容, 目前对微生物转化主要有化学法和电转化法^[1]。但这些转化方法, 仍然存在许多缺点, 比如感受态细胞准备时间长, 处理过程容易导致细胞活性降低, 处理后要有温育等过程。2001 年, Yoshida 等发表了一

系列关于使用温石棉 (Chrysotile asbestos) 实现质粒对原核生物转化的有趣方法^[2-5], 这种方法被命名为 Yoshida 效应。但是这种方法仍然有很多缺点: 操作繁琐、利用的介质对人体致癌等。对该法的可靠性有很多质疑, 限制了它的应用^[6], 所以这种新颖的 DNA 转

Received: May 20, 2010; Accepted: July 12, 2010

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2007CB707802).

Corresponding author: Zongbao (Kent) Zhao. Tel/Fax: +86-411-84379211; E-mail: zhaozb@dicp.ac.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2007CB707802) 资助。

化法很少被其他科学家引用。

最近,这种方法又进一步被 Wilharm 等改进^[6]。他们使用的一种价格便宜、资源丰富、对人类健康友好的矿石纳米材料海泡石 (Sepiolite) 作为介质,实现了对多种微生物的质粒转化。作者在本方法中使用的参数与 Yoshida 等报道的一致,并根据后者的报道,提出了借助海泡石进行 DNA 转化的相同机制。问题是海泡石和温石棉属于不同的介质:前者没有生物活性,后者有一定的生物活性;前者对人体友好,而后者可以致癌等。因此,我们认为这种新的转化方法,可能会存在不同的 DNA 转化机制。Wilharm 等虽然对方法进行了改进,但该工作是以非常短的通讯形式报道,很多参数未优化。我们认为对这种转化机制的充分理解和对该试验参数的优化,会促进这种方法的推广和实现对特殊物种的 DNA 转化。为此,我们进行了本研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌种

pET15b 质粒有本组保存。*E. coli* DH5 α 菌株购自北京鼎国生物技术有限公司。短乳酸杆菌 *Lactobacillus brevis* AS 1.579 购自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心。

1.1.2 试剂

蛋白酶 K、250 bp DNA marker 购自 TaKaRa 公司大连分公司。200~300 bp 的 RNA 从短乳酸杆菌 AS 1.579 提取,在本组保存。海泡石购自德国 Kremer Pigmente 有限公司 (Kremer Pigmente GmbH & Co. KG, Hauptstr. 41-47DE 88317 Aichstetten, Germany), 产品编号 58945。溶菌酶、盐酸胍、十六烷基三甲基溴化胺 (CTAB)、苯酚和琼脂糖购自北京鼎国生物技术有限公司。其他培养基及生化试剂牛肉膏、胰蛋白胨、酵母粉、氯仿和异戊醇等均为分析醇,购自大连博诺生物化学试剂厂。

1.2 方法

1.2.1 海泡石悬浮液和培养基的准备

海泡石悬浮液根据文献准备 4% 储存液^[6]: 海泡石 121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min; 用去离子水配含 200 mmol/L

KCl, 5 mmol/L HEPES 缓冲液, 用 NaOH 调 pH 到 7.4, 过膜除菌。最后配成 5% (W/V) 海泡石储存液。另外配 10 \times 海泡石缓冲液 (2 mol/L KCl, 50 mmol/L HEPES, 7.4) 备用。

LB 培养基: 在 950 mL 去离子水中加入胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 摇动容器直至溶解, 用 NaOH 调 pH 至 7.0, 用去离子水定容至 1 L。取 200 mL, 加入 3 g 琼脂粉。在 120 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min。待温度降到 50 $^{\circ}$ C 左右, 加入终浓度为 100 μ g/mL 的氨苄青霉素, 准备 40 个抗性平板。

MRS 培养基的配制: 1 L 蒸馏水中溶解下列组分: 胰蛋白胨 10 g, 牛肉膏 10 g, 酵母提取物 5 g, 葡萄糖 20 g, 磷酸氢二钾 2 g, 柠檬酸三铵 2 g, 乙酸钠 5 g, 吐温 80 1 mL, 硫酸镁 200 mg, 硫酸锰 50 mg, 用高压锅在 121 $^{\circ}$ C 灭菌 15 min, 调 pH 到 6.8。其中葡萄糖单独灭菌。

1.2.2 海泡石吸附 pET15b 试验及转化 *E. coli* DH5 α 的试验

从于 37 $^{\circ}$ C 培养 20 h 的新鲜平板中挑取一个 *E. coli* DH5 α 单菌落, 接种于 10 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 下振荡培养过夜。将该菌悬液以 1:100 的比例接种于 100 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 3 h 至 $OD_{600}=0.5$ 左右。将培养液转入离心管中, 冰上放置 10 min, 然后于 4 $^{\circ}$ C 下 4 000 r/min 离心 10 min。弃去上清, 用预冷的海泡石缓冲液 10 mL 轻轻悬浮细胞, 4 $^{\circ}$ C 下 4 000 r/min 离心 10 min。最后用 2 mL 的海泡石缓冲液悬浮, 置于冰上备用。

取 40 μ L pET15b 溶液 (100 ng/ μ L), 加入 10 μ L 的 5% (W/V) 海泡石储存液, 充分混合, 取 5 μ L 备用。剩余的溶液 12 000 r/min 离心 30 s, 用 1 mL 的海泡石缓冲液连续洗涤 2 次。吸附结果用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

取备用的细胞 50 μ L, 加入 5 μ L 质粒饱和的海泡石 (海泡石终浓度为 0.1%), 充分混合。取备用的细胞 50 μ L, 加入 1 μ L 洗涤后的海泡石 (海泡石终浓度为 0.1%), 充分混合。将 2 种悬浮液加到 2 个 LB 氨苄青霉素抗性平板 (100 μ g/mL)。立即用玻璃板均匀涂抹 30 s, 最后放在 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

1.2.3 利用海泡石对 pET15b 转化 *E. coli* DH5 α 的试验参数优化

海泡石缓冲液对 DNA 转化率的影响: 取备用的细胞 50 μ L 2 份, 1 份用 LB 洗涤细胞, 另外 1 份仍然保留海泡石缓冲液。分别加入 10 ng pET15b 和 1 μ L 5% (W/V) 海泡石储存液, 充分混合。将 2 种悬浮液加到 2 个 LB 氨苄青霉素抗性平板 (100 μ g/mL), 立即用玻璃板均匀涂平板 30 s, 最后放在 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

细胞浓度对 DNA 转化率的影响: 分别取备用的细胞 500 μ L、50 μ L 和 5 μ L, 前者通过离心后用 50 μ L 海泡石缓冲液悬浮, 后者加入 45 μ L 海泡石缓冲液悬浮, 这样 3 个样品的 OD_{600} 分别是 200、20 和 2。分别加入 10 ng pET15b 和 1 μ L 5% (W/V) 海泡石储存液, 充分混合。将 3 种悬浮液加到 2 个 LB 氨苄青霉素抗性平板 (100 μ g/mL), 立即用玻璃板均匀涂平板 30 s, 最后放在 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

海泡石的浓度对 DNA 转化率的影响: 分别取备用的细胞 50 μ L 3 份, 分别配成海泡石终浓度为 1%、0.1% 和 0.01% 的混合液。分别加入 10 ng pET15b 充分混合。将 3 种悬浮液加到 3 个 LB 氨苄青霉素抗性平板 (100 μ g/mL), 立即用玻璃板均匀涂平板 30 s, 最后放在 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

涂板次数和预干处理对 DNA 转化率的影响: 取备用的细胞 50 μ L 7 份, 分别加入 10 ng pET15b 和 1 μ L 5% (W/V) 海泡石储存液, 充分混合。将 4 份悬浮液加到 4 个 LB 氨苄青霉素抗性平板 (100 μ g/mL)。立即用玻璃板分别均匀涂抹 10 次、20 次、40 次和 100 次, 最后放在 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。另外 3 份细胞, 1 份立即用玻璃板均匀涂平板 30 s, 第 2 份 10 min 后用玻璃板均匀涂平板 30 s, 第 3 份 20 min 后用玻璃板均匀涂平板 30 s, 最后放在 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

1.2.4 利用海泡石对 pET15b 直接转化 *E. coli* DH5 α 单菌落

取 4 $^{\circ}$ C 存放 1 个月的 *E. coli* DH5 α 单菌落, 加入 20 μ L 海泡石缓冲液, 加入 100 ng pET15b 和 1 μ L 5% (W/V) 海泡石储存液, 充分混合。将细胞悬浮液加到 LB 氨苄青霉素抗性平板 (100 μ g/mL)。立即用玻璃板均匀涂平板 30 s, 最后放在 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

1.2.5 短乳酸杆菌 AS1.579 小片段 RNA 的提取

为了获得短乳酸杆菌 AS1.579 小片段 RNA, 该提取使用不加 RNAase 的基因组提取方法, 参考分子克隆实验指南^[7], 并对此方法进行优化。简述如下: 取单克隆短乳酸杆菌到 10 mL MRS 培养基中, 200 r/min、37 $^{\circ}$ C 培养过夜。将过夜培养物按 1:50 接入 100 mL MRS 中, 200 r/min、37 $^{\circ}$ C 培养至 $OD_{600}=0.5$ 。10 000 r/min 离心 30 s, 收集沉淀, 使用 500 mmol/L 的 EDTA 洗涤 3 次, 最后用 2 mL 的 500 mmol/L EDTA 悬浮, 200 W 微波处理 1 min^[8-9]。10 000 r/min 离心 30 s 收集沉淀, 取 50 mg 菌体用 400 μ L TE 重悬于 1.5 mL 离心管中, 加入终浓度为 10 mg/mL 溶菌酶, 10 mmol/L 的 DTT, 37 $^{\circ}$ C 保温 1 h。加入 50 μ L 蛋白酶 K (10 mg/mL), 混匀, 65 $^{\circ}$ C, 1 h。加入 100 μ L 5 mol/L NaCl 混匀, 再加入 80 μ L 的 CTAB/NaCl 混匀, 65 $^{\circ}$ C 10 min。加入固体的盐酸胍至终浓度 6 mol/L^[10], 待细胞彻底裂解后, 加入等体积酚/氯仿/异戊醇混合液 (25:24:1), 混匀, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 加 0.6 倍体积的异丙醇, 混匀, 室温放置 10 min。12 000 r/min 离心 10 min。沉淀用 75% 的乙醇洗涤, 晾干, 最后用 20 μ L TE 溶解, 取 3 μ L 电泳检测。

1.2.6 小片段 RNA 对 pET15b 转化 *E. coli* DH5 α 的影响

取 1 μ L 5% (W/V) 海泡石储存液, 加入 5 μ L 小片段的 RNA 提取液 (200 ng/ μ L), 充分混合, 让海泡石饱和和吸附 RNA。加入 10 ng pET15b 和备用的细胞 50 μ L, 充分混合。将细胞悬浮液加到 LB 氨苄青霉素抗性平板 (100 μ g/mL)。立即用玻璃板均匀涂平板 30 s, 最后放在 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。并与不加小片段 RNA 的作对照。

2 结果

2.1 海泡石吸附 pET15b 试验

从图 1 可以看出, 用 pET15b 饱和后的海泡石, 经过海泡石缓冲液充分洗涤后的海泡石几乎检测不到 DNA。此结果说明海泡石对质粒的 pET15b 吸附能力很弱, 几乎看不到 DNA 吸附。用 pET15b 饱和的海泡石转化细胞, 长出的克隆数远远高于洗涤后

的海泡石转化数 (图 2, 16-17)。这些结果说明, 利用海泡石实现质粒转化, 有可能不是海泡石将 DNA 带入宿主内的, 而是由海泡石在宿主表面产生的瞬间小孔, 导致 DNA 的随机进入。

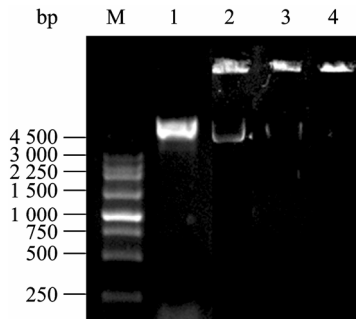


图 1 1%琼脂糖凝胶电泳检测海泡石吸附 pET15b 能力
Fig. 1 Analysis of 1% agarose electrophoresis for the ability of sepiolite absorbing pET15b. 1: pET15b; 2: the sepiolite absorbing pET15b saturatedly; 3: the sepiolite saturated with DNA was washed once; 4: the sepiolite saturated with DNA was washed two times.

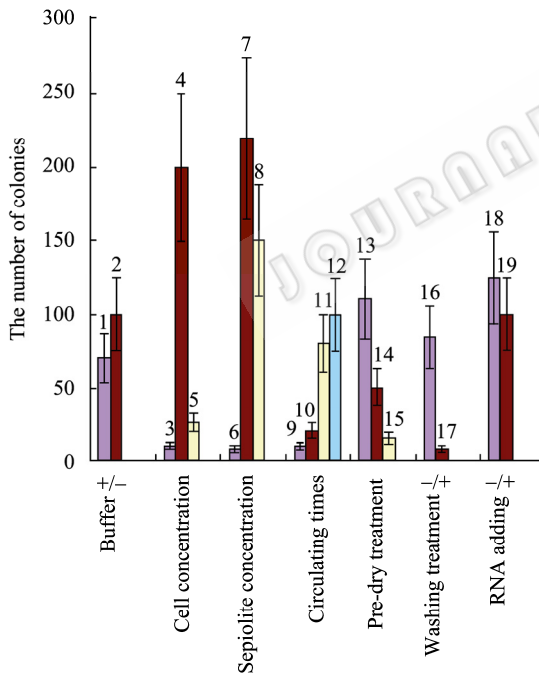


图 2 海泡石用于 *E. coli* DH5a DNA 转化的参数优化
Fig. 2 Optimization of DNA transformation for *E. coli* DH5a based on sepiolite. 1-2: the effect of sepiolite buffer for transformation. 3-5: the cell concentration is $OD_{600}=200$, 20 and 2 in sample 3, 4 and 5 respectively. 6-8: the percent content of sepiolite is 1%, 0.1% and 0.01% in sample 6, 7 and 8 respectively; 9-12: the circulating times are 10, 20, 40 and 100 in sample 9, 10, 11 and 12 respectively. 13-15: the pre-dry treatment is 0 min, 10 min and 20 min in sample 13, 14 and 15 respectively; 16-17: washing effect for transformation; 18-19: the effect of RNA treatment for transformation.

2.2 利用海泡石对 pET15b 转化 *E. coli* DH5a 的试验参数优化

2.2.1 缓冲液

试验结果表明, 使用培养基转化率略高于使用海泡石缓冲液 (图 2, 1~2)。另外海泡石缓冲液配制和过膜除菌的操作繁琐, 利用培养基悬浮细胞, 将使转化变得更加直接。

2.2.2 细胞浓度

细胞浓度是决定转化率高的重要参数, 我们研究表明当细胞浓度在 $OD_{600}=20$ 时转化率最高 (图 2, 3~5)。不同于电转, 细胞浓度越高转化率越高。这可能与海泡石物理运动空间需要有关, 细胞浓度太高, 海泡石纤维不能充分运动, 限制了质粒对细胞的有效转化。

2.2.3 海泡石浓度

试验结果表明使用海泡石的浓度比报道的高了近 10 倍, 而转化率有 5 倍以上增加 (图 2, 6~8)。我们认为使用 0.1% 的海泡石浓度, 而不是 0.01%, 转化率会更高些。具体原因不很清楚, 是否由于不同批次产品之间存在纳米纤维材料数量的差异。

2.2.4 涂平板次数和状态

菌液不经预干处理, 直接涂抹平板, 随着涂抹次数的增加, 转化率逐渐增加 (图 2, 9~12)。另外, 随着预干处理时间的延长, 转化率会逐渐降低 (图 2, 13~15)。

2.3 利用海泡石对 pET15b 直接转化 *E. coli* DH5a 单菌落

在 4℃ 储存 1 个月的单菌落, 利用海泡石仍然可以实现质粒的转化。取 4℃ 储存 1 个月的单菌落, 利用海泡石直接转化, 转化率低于 $100/\mu\text{g}$ pET15b。但是, 该操作大大节省了时间, 不需要转化前的再培养, 没有感受态制备或超低温冻存和转化后的温育等过程。同时单菌落的直接转化, 由于菌量过少, 通过钙转和电转难以实现。当然, 本操作不适用于对转化率要求非常高的实验, 但可以在条件非常落后的实验室中普及。该操作也可用于某些特殊的实验, 比如某些致病菌对抗性质粒的易感染性等。

2.4 短乳酸杆菌 AS1.579 小片段 RNA 的提取

为了得到理想化的 RNA 小片段, 采取基因组提取方法得到降解的 RNA 片段。经过该试验, 可以从短乳酸杆菌得到理想的小片段 RNA: 浓度较高, 大于 200 ng/ μ L; 分子量在 300 bp 左右 (图 3), 根据文献报道, 非常适合用于海泡石上 DNA 竞争结合试验。同时, 我们也尝试了其他微生物的 RNA 提取, 但是得到的 RNA 总是一条模糊的带, 分子量集中在 500 bp 和 2 kb 之间, 不符合本试验的需要。对这种结果的差异, 无法从试验过程中得知。

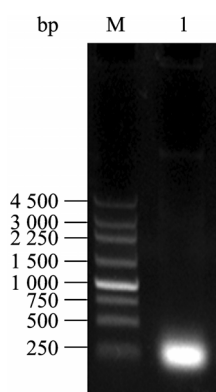


图 3 1%琼脂糖凝胶电泳检测短乳酸杆菌 AS1.579 小片段 RNA 的提取

Fig. 3 Analysis of 1% agarose for small RNA extraction from *Lactobacillus brevis* AS1.579. M: marker; 1: small RNA.

2.5 小片段 RNA 对 pET15b 转化 *E. coli* DH5 α 的影响

经小片段 RNA 饱和的海泡石转化 *E. coli* DH5 α , 与对照组相比, 几乎没有什么变化 (图 2, 18~19)。同样说明, 利用海泡石实现质粒转化, 有可能不是海泡石带 DNA 进入宿主内, 而是由海泡石在宿主表面产生的瞬间小孔, 导致外源 DNA 的随机进入。

3 讨论

利用海泡石转化有以下优点: 可以实现质粒对细胞的转化; 这种介质对人体健康友好, 无致癌物质; 本身无生物活性, 不会对宿主生长产生影响; 操作过程中不需特殊的设备; 不需要感受态的制备就可以得到较高的转化率; 另外, 资源丰富、价格便宜, 使这种转化方法容易推广。

但是, 关于基于矿石海泡石纳米材料的 DNA

转化机制仍然不很清楚。Yoshida 等利用温石棉进行 DNA 试验, 提出竞争机制, 即海泡石温石棉大量吸附 DNA, 借助涂平板的机械摩擦力, 纤维丝插入宿主内。宿主内的 RNA 与海泡石温石棉上的 DNA 竞争, 从而实现外源基因对原核生物的转化^[6,11]。Wilharm 等对此方法进行了改进, 采用无生物活性, 对人环境友好的海泡石进行了 DNA 转化。但他们提出的转化机制仍然与 Yoshida 等报道的相同。而我们试验表明海泡石吸附 DNA 的能力不是很强, 洗涤后, 转化率大大降低。而用 RNA 饱和后的海泡石, 转化率几乎没有降低, 这些结果说明, 海泡石的作用是借助一种瞬间机械力, 在细胞膜上击出孔, 借此外源 DNA 随即进入细胞。这种开孔现象是可逆的, 移开海泡石, 细胞膜会自动修复, 将开孔重新封闭。细胞的这一特性, 可使一些细胞外源 DNA 转入细胞内, 从而达到复制或表达的目的。另外, 由于对 DNA 转化机制理解的不同, 导致操作方法有差异。Wilharm 等根据他们提出的机制认为, 在涂平板前要经过预干处理^[6]。根据我们对该机制的理解, 预干处理对提高 DNA 转化率不利。不经预干过程, 用玻璃棒立即涂平板, 转化率较高。而对照组, 随着预干处理时间的延长, 转化率会逐渐降低 (图 2, 样品 13~15)。

在重新了解这种基于矿石纳米材料微生物转化机制基础上, 我们对该转化进行了优化: 使用对数生长初期的细胞为宿主, 细胞浓度 OD_{600} 在 10~20 之间, 海泡石的浓度为 0.1%, 不经预干过程, 不需要特定的缓冲液, 持续涂平板时间在 1 min 以上, 可以实现较高的转化率, 有时高于钙转。这些不同于最近的报道^[6], 但我们的转化方法变得更直接, 转化时间变得更短。由于我们使用转化率较低的 pET15b 作为实验对象, 说明这种方法可以用于多种质粒的转化。使用其他质粒如 pUC18 等可以得到大于 $1 \times 10^6/\mu$ g 质粒的转化率。这种转化方法适用于双链环状 DNA (质粒), 线型 DNA 和其他微生物的转化有待摸索。

当然这种转化方法与电转的转化率还有很大差距, 不同的人操作, 会有较大的差异。但该方法无需感受态的制备、不需要贵重的仪器、甚至单菌落

冷藏 1 个月都可以直接实现转化, 所以这种方法的简便性会得到很多研究者的青睐。海泡石用于微生物的 DNA 转化属于一种非常新的转化方法, 而且提升的空间很高。在我们的试验中发现将 DNA 与 *E. coli* DH5 α 在微型离心管内混合, 枪头的随机抽动就可以实现 DNA 的转化, 该现象预示可以通过海泡石、DNA 和微生物的共培养就可以实现 DNA 的转化, 这为研究特种微生物的 DNA 转化提供很新的方法。另外, 海泡石可以用于革兰氏阳性菌的转化^[1]。但该方法用于真核生物的 DNA 转化还没有报道, 根据现有的转化机制推理, 这种方法应该很快被用于真核生物的转化。

REFERENCES

- [1] Yoshida N, Sato M. Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, **83**(5): 791–798.
- [2] Yoshida N. Discovery and application of the Yoshida effect: nano-sized acicular materials enable penetration of bacterial cells by sliding friction force. *Recent Pat Biotechnol*, 2007, **1**(3): 194–201.
- [3] Yoshida N, Saeki Y. Chestnut bur-shaped aggregates of chrysotile particles enable inoculation of *Escherichia coli* cells with plasmid DNA. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **65**(5): 566–575.
- [4] Yoshida N, Kodama K, Nakata K, *et al.* *Escherichia coli* cells penetrated by chrysotile fibers are transformed to antibiotic resistance by incorporation of exogenous plasmid DNA. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **60**(4): 461–468.
- [5] Yoshida N, Nakajima-Kambe T, Matsuki K, *et al.* Novel plasmid transformation method mediated by chrysotile, sliding friction, and elastic body exposure. *Anal Chem Insights*, 2007, **2**: 9–15.
- [6] Wilharm G, Lepka D, Faber F, *et al.* A simple and rapid method of bacterial transformation. *J Microbiol Methods*, 2010, **80**(2): 215–216.
- [7] Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning*. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002.
萨姆布鲁克丁, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [8] Helander IM, Nurmiaho-Lassila EL, Ahvenainen R, *et al.* Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiol*, 2001, **71**(2): 235–244.
- [9] Goodwin DC, Lee SB. Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *Biotechniques*, 1993, **15**(3): 438–444.
- [10] Kamdar SJ, Evans R. Modifications of the guanidine hydrochloride procedure for the extraction of RNA: isolation from a variety of tissues and adherent/nonadherent cell types. *Biotechniques*, 1992, **12**(5): 632–638.
- [11] Yoshida N, Ide K. Plasmid DNA is released from nanosized acicular material surface by low molecular weight oligonucleotides: exogenous plasmid acquisition mechanism for penetration intermediates based on the Yoshida effect. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, **80**(5): 813–821.