

张丽霞,贾海燕.一种简便高效大肠杆菌感受态细胞制备方法[J].江苏农业科学,2013,41(12):41-42.

# 一种简便高效大肠杆菌感受态细胞制备方法

张丽霞,贾海燕

(南京农业大学应用植物基因组学实验室/作物遗传与种质创新国家重点实验室,江苏南京 210095)

**摘要:**对大肠杆菌感受态细胞制备和保存条件研究进行总结,在结合多年实际操作经验的基础上,把实际操作中需注意的事项进行详细归纳总结,可以为进行基因克隆的科研人员提供帮助。

**关键词:**大肠杆菌;感受态细胞;克隆

**中图分类号:** Q93-33 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)12-0041-01

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  和其他菌株是进行基因克隆和表达最重要的受体菌之一。目前,将目标 DNA 导入大肠杆菌感受态细胞常用的方法主要有 2 种:一种为电转化法,另一种为 CaCl<sub>2</sub> 法<sup>[1]</sup>。电转化法是在瞬间高压下使 DNA 导入受体细胞,转化效率很高,可达 10<sup>10</sup> CFU/ $\mu$ g,但由于试验设备较昂贵,普通实验室应用较少;CaCl<sub>2</sub> 法是利用化学离子 Ca<sup>2+</sup> 诱导大肠杆菌形成感受态,转化效率最高达到 10<sup>6</sup> ~ 10<sup>7</sup> CFU/ $\mu$ g<sup>[2]</sup>。普通分子生物学实验室常规的基因克隆不需要太高的转化率,使用 CaCl<sub>2</sub> 法就完全可以满足。有研究者认为, Ca<sup>2+</sup> 作为信号分子调节内源性代谢,有利于感受态的形成和 DNA 的吸收,能满足一般常规克隆的需求<sup>[3-4]</sup>。但是,感受态细胞的制备过程相当繁琐,对于经常从事转化工作的科研人员来说,重复制备感受态细胞很浪费时间,而将感受态细胞制备好分装后冷冻保存,再分次取用,可以大大节约人力和时间。本研究就 CaCl<sub>2</sub> 法感受态细胞的制备方法和冻存条件进行了总结,以期为从事相关工作的研究人员提供帮助。

## 1 大肠杆菌感受态细胞的制备方法

大肠杆菌感受态细胞的制备方法参考文献[5]:首先挑取新鲜平板上的单克隆并接入 10 mL 新鲜 LB 液体培养基上,37 ℃、180 r/min 生物摇床上振荡过夜;再接入大瓶摇,接菌量为 1%,每隔 30 min 测定 D<sub>600 nm</sub>;到大肠杆菌生长至对数生长期即 D<sub>600 nm</sub> 为 0.3 ~ 0.6 时,将菌液冰浴 30 min,4 ℃、4 000 r/min 离心 10 min,收集菌体;弃上清,加入预冷的 CaCl<sub>2</sub> 溶液悬浮菌体,冰浴 30 min;再加入预冷的 CaCl<sub>2</sub> 溶液重新悬浮菌体,加甘油至终浓度为 15%,分装并保存于 -70 ℃ 超低温冰箱备用。

梅运军等研究认为, Ca<sup>2+</sup> 浓度为 100 mmol/L 时,质粒的转化效率最高<sup>[6-8]</sup>。在利于 CaCl<sub>2</sub> 诱导大肠杆菌形成感受态过程中,细胞只有在 Ca<sup>2+</sup> 存在时才能摄取 DNA。Ca<sup>2+</sup> 不仅是改变细胞表面结构和细胞膜渗透性的重要因素,还是维持这种改变状态的必需条件。转化过程中热激等物理处理可以提高 DNA 进入细胞的效率。

## 2 大肠杆菌感受态细胞在不同储藏条件下对转化率的影响

谢翎等发现新鲜制备好的感受态细胞在 4 ℃ 条件下保存,转化率会逐渐提高,至 8 h 达到最高,3 d 以后就会失去感受态能力<sup>[9]</sup>。在 -20 ℃ 保存的感受态细胞转化率在 2 d 内会逐步提高,2 d 达到最大值,随后开始下降,到 20 d 转化率为 44%,30 d 就降为 0。在 -70 ℃ 储存的感受态细胞在 2 d 转化率达到最大值,之后有所下降,但是 20 d 时转化率超过 100%,放置 1 个月使用感受态细胞效率仍然很高。唐颜苹等研究结果也得出同样的结论<sup>[10]</sup>。因此,对于从事基因克隆研究的人来说,经常要使用到感受态细胞,制备好的感受态细胞放置在 -70 ℃ 超低温冰箱里可以长时间使用,避免经常制备试验的重复性,从而可以大量节约人力。

## 3 大肠杆菌感受态细胞不同冻存条件对转化率的影响

为使制备的感受态细胞能长期贮存备用,通常在 CaCl<sub>2</sub> 中添加甘油至 15% 或二甲基亚砜(DMSO)至 7%,有研究人员比较了这 2 种抗冻剂的抗冻效果,结果表明,在相同的保存温度和时间下,保存于甘油的大肠杆菌感受态细胞转化效率高于保存于 DMSO 的大肠杆菌感受态细胞<sup>[10]</sup>。以甘油作为抗冻剂并贮于 -70 ℃ 时,在前 20 d 细胞感受态能力迅速下降,下降幅度达 70%,然后趋于稳定;以 DMSO 为抗冻剂时,在冻存前 10 d 感受态能力下降 58.8%。在冻存 2 个月后,感受态细胞仍维持较理想的转化率。有研究表明,对于立即使用的感受态细胞而言,不加任何抗冻剂的效果更佳,添加 15% 甘油可使转化率下降 50.2%,而添加 7% DMSO 使转化率下降 92.3%,这说明抗冻剂对感受态细胞的转化有抑制作用,尤以 DMSO 的影响更大<sup>[8]</sup>。

## 4 感受态细胞制备过程中的注意事项

CaCl<sub>2</sub> 法以成本低、操作简便和转化效率高受到科研工作者的青睐。感受态细胞制备是一个很繁琐的过程,操作中需要注意的细节很多。笔者根据自己多年的实际操作经验,把在制作过程中的注意事项详细归纳如下:

(1) 器具必须洁净。这非常重要,所用的三角瓶和离心管都要清洗干净,禁用任何洗涤剂,可用 NaOH 浸泡清洗数次;相应的器皿都要做到专用。

(2) 培养基装量要适中。这一点也很重要,这关系到菌

收稿日期:2013-03-25

作者简介:张丽霞(1977—),女,山西汾阳人,硕士,助理研究员,主要从事实验室管理、作物遗传育种研究。E-mail: amyzlx@njau.edu.cn。

邹娜,喻苏琴,王春玲,等. 铁皮石斛组织培养及试管开花研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):42-44.

# 铁皮石斛组织培养及试管开花研究

邹娜<sup>1</sup>, 喻苏琴<sup>1</sup>, 王春玲<sup>2</sup>, 张露<sup>1</sup>

(1. 江西农业大学园林与艺术学院,江西南昌 330045; 2. 江西农业大学农学院,江西南昌 330045)

**摘要:**以铁皮石斛茎段为外植体,进行腋芽的诱导及增殖,并使获得的无菌苗在试管中开花。结果显示:外植体灭菌 8 min 或 6 min 污染率相当,污染率可控制在 50% 以下;茎段外植体接种于 MS + 6 - BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 培养基上,腋芽诱导率可达 95% 以上,接种于不同的开花诱导培养基上,铁皮石斛无菌苗均可在试管内开花,开花率在 17.18% ~ 35.37%。

**关键词:**铁皮石斛;组织培养;试管开花

**中图分类号:** S567.230.4<sup>+</sup>3; Q943.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002 - 1302(2013)12 - 0042 - 03

铁皮石斛(*Dendrobium candidum*)为兰科石斛属多年生附生草本植物,花期 3—6 月,花型奇特。铁皮石斛在我国主要分布于江西、广西、广东、贵州、云南、安徽、浙江、湖南、陕西、河南和福建等地<sup>[1]</sup>。铁皮石斛不仅可作为兰科观赏花卉,也是一种珍贵的中药材,民间有救命仙草、中华仙草的美称,以新鲜或干燥茎入药,具有滋阴清热、生津益胃、止咳润肺、免疫

调节、延缓衰老等功效<sup>[2]</sup>。由于市场供应紧缺,铁皮石斛国际市场干品价目前已达 1 000 美元/kg 以上<sup>[3]</sup>。

铁皮石斛种子极小、无胚乳,且生长条件十分苛刻,自然产量极低,再加上民间长期过度采挖,野生资源濒临绝种,探索行之有效的铁皮石斛快速繁殖技术并通过仿生栽培,可以实现对其野生资源的有效保护<sup>[4]</sup>,解决由于资源短缺而制约国内外市场发展和临床医学的需求。

由于试管内开花不受季节限制,对缩短育种周期、降低栽培设施的投入和生产管理费用都具有十分重要的意义,同时,生产铁皮石斛试管花也为人们日益增长的鲜花需求开辟了广阔的市场前景。因此,应用植物组织培养技术,对铁皮石斛进行离体快繁和种质保存,并通过试管开花调控种质繁育、研究其开花机理,具有重要的现实意义和应用价值<sup>[5]</sup>。目前关于铁皮石斛的组培快繁及栽培技术已有较多研究,而对于其开

收稿日期:2013 - 06 - 01

基金项目:江西省教育厅青年基金(编号:GJJ13253);江西农业大学青年科学基金(编号:QN201103)。

作者简介:邹娜(1982—),女,河南南阳人,博士,讲师,研究方向为园林植物生物技术、园林植物栽培及营养生理。Tel: (0791) 83813243; E-mail: nzouy@126.com。

通信作者:张露,教授,博导,研究方向为观赏植物繁育。Tel: (0791) 83813123; E-mail: zhlu@163.com。

体生长出来的能量代谢是有氧生长还是无氧生长。无氧状态生长出来的大肠杆菌是做不出效率高的感受态细胞。建议装量不要超过容器的 1/5 体积。

(3)培养基 pH 值要控制好。一般来说,接种前 pH 值为 6.8 ~ 7.2;摇菌结束后, pH 值为 6.5 以上,使细菌实现有氧生长。

(4)D 控制在 0.3 ~ 0.6。一般来说,制备感受态最适的 D 值为 0.3 ~ 0.6。D 值大时,菌体总量往往大,感受态细胞绝对数量要大一些,但是, D 值太高,细菌死亡数量增多,制备感受态效率下降。

(5)CaCl<sub>2</sub> 尽量不要高温高压灭菌,最好采用过滤灭菌。

(6)最好选用新鲜的平板挑取单克隆摇菌。

(7)使用不同的菌株制备感受态细胞时,最好使用另外一套器具,否则,制备的感受态细胞效率很低,或者制备不出感受态细胞。

(8)整个制备过程都需要在冰上进行,一定要保持 0℃。

## 参考文献:

- [1] Mandel M, Higa A. Calcium - dependent bacteriophage DNA infection[J]. Journal Molecular Biology, 1970, 53(1): 159 - 162.
- [2] 朱森康, 黄磊, 李燕飞, 等. 制备高效大肠杆菌电转化感受态细

胞和电转化条件的研究[J]. 生物技术通报, 2011(10): 206 - 209.

[3] Li W, Xie H, Xie Z, et al. Exploring the mechanism of competence development in *Escherichia coli* using quantum dots as fluorescent probes[J]. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2004, 58(1): 59 - 66.

[4] Theodorou M C, Tiligada E, Kyriakidis D A. Extracellular Ca<sup>2+</sup> transients affect poly - (R) - 3 - hydroxybutyrate regulation by the AtoS - AtoC system in *Escherichia coli* [J]. Biochemical Journal, 2009, 417(3): 667 - 672.

[5] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011.

[6] 梅运军, 陈向东, 谢志雄, 等. Ca<sup>2+</sup> 对诱导大肠杆菌摄取外源 DNA 的影响[J]. 武汉大学学报:理学版, 2012(4): 354 - 358.

[7] 王友如. CaCl<sub>2</sub> 浓度对感受态细胞转化效率的影响[J]. 湖北师范学院学报:自然科学版, 2006, 26(3): 30 - 32.

[8] 张岚岚, 徐春燕, 徐昌杰. 大肠杆菌感受态细胞转化能力的影响因素[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26(4): 429 - 432.

[9] 谢翎, 陈红梅, 尹翀, 等. 大肠杆菌 DH5α 菌株感受态制备即转化率变化研究[J]. 生物学杂志, 2011, 28(4): 4 - 6.

[10] 唐颜苹, 王小媚, 何薇, 等. 大肠杆菌感受态细胞保存条件的研究[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(6): 745 - 748.