

代 军. 大肠杆菌感受态细胞制备及转化条件优化[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(4): 53–54.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.017

大肠杆菌感受态细胞制备及转化条件优化

代 军

(辽宁民族师范高等专科学校, 辽宁阜新 123000)

摘要:针对大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α , 以 pGM-T、pMD-18T 为载体, 在传统 CaCl₂ 方法的基础上, 对制备及转化条件进行了改进和优化, 结果表明, 42 ℃ 热激的最佳时间为 100 s, 最适冷却时间为 6~8 min。本研究将常规的 50 mL 离心管改成了 1.5 mL EP 管, 有效降低了分装过程中可能产生的污染风险, 简化了试验程序, 提高了转化效率。

关键词:基因克隆; 大肠杆菌; 感受态细胞; 转化条件; 改进; 氯化钙法

中图分类号: Q-331 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)04-0053-02

大肠杆菌感受态细胞的制备与转化是分子生物学试验中一项重要的常规操作技术, 可用于基因克隆、文库构建等研究^[1]。携带目的基因的重组质粒能否导入受体细胞, 进而得以复制、增殖、表达, 感受态细胞质量及转化条件是关键因素^[2]。目前, 商业公司可为分子生物学试验提供各种感受态细胞, 但存在价格昂贵、运输途中容易导致感受态细胞解冻等问题^[3-4]。大部分实验室仍采用经典的氯化钙法自行制备感受态细胞^[5-6]。大肠杆菌菌株 DH5 α 是实验室常用的宿主菌, 常被用于基因克隆、原核表达研究。氯化钙转化方法具有操作简单、重复性好、转化率高等优点, 其原理是 Ca²⁺ 破坏细胞膜上的脂质阵列, 并与膜上多聚羟基丁酸化合物、多聚无机磷酸形成复合物以利于外源 DNA 渗入^[7-8]。不同菌株、不同实验室环境对于感受态细胞制备及转化条件影响不同, 因此有必要针对特定菌株对其感受态细胞制备、转化条件进行优化。本研究探讨该菌株感受态细胞制备以及转化的最优条件, 旨在为后续分子生物学研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5 α 由笔者所在实验室 -70 ℃ 保存。载体 pGM-T、pMD-18T Vector 购于天根生化科技(北京)有限公司、大连宝生物公司。0.1 mol/L CaCl₂ 溶液所用无水 CaCl₂ 为国产分析纯。氨苄青霉素(ampicillin)购于天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 仪器

HITACHI SCR20BA 高速冷冻离心机, HH-6 数显恒温水浴锅, MP 200A 分析天平, Eppendorf 移液器, 超净工作台。

1.3 方法

1.3.1 准备工作 EP 管、枪头、枪头盒、100 mL 三角瓶、培养皿等进行高压蒸汽灭菌, 100 ℃ 烘干, -20 ℃ 冷冻备用。

1.3.2 药品配制 0.1 mol/L CaCl₂ 溶液: 取 1.11 g 无水 CaCl₂, 用容量瓶定容至 100 mL, 分装置于 50 mL 三角瓶中, 高

压蒸汽灭菌, 4 ℃ 保存备用。100 mg/mL 氨苄青霉素(Amp): 取 1 g Amp 溶于 100 mL 无菌水中, 分装至 2 mL EP 管中, 滤膜过滤, -20 ℃ 保存备用。LB 培养基: 胰化蛋白胨 10.0 g, 酵母提取物 5.0 g, NaCl 10.0 g, 琼脂粉 14.0 g, 溶于 950 mL 无菌水中, 用 5 mol/L NaOH 调节 pH 值至 7.0, 定容至 1 L, 高压蒸汽灭菌, 分装至培养皿。

1.3.3 菌种活化 将 DH5 α 菌种在 LB 固体培养基平板上交错划线, 37 ℃ 过夜培养, 获得良好单斑。取无菌试管加入 2 mL LB(不含抗生素)培养基, 挑取良好单斑接种于试管中, 37 ℃ 摇床培养过夜。按 1:100 的比例, 取 0.5 mL 菌液转接至含有 50 mL LB 液体培养基的三角烧瓶中, 37 ℃ 摇床培养 2~3 h, 直至 $D_{600\text{ nm}}$ 值达 0.4 左右^[9]。

1.3.4 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞的制备 将菌液分装至预冷无菌的 1.5 mL EP 管中, 于冰上放置 10 min, 4 ℃ 4 000 r/min 离心 10 min。将离心管倒置以倒尽上清液, 用移液枪将倒不尽的上清液吸出, 加入 1 mL 0.1 mol/L 冰冷 CaCl₂ 溶液, 立即在漩涡混合器上混匀, 冰上放置 30 min。4 ℃ 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 倒置 1 min, 加入 1 mL 0.1 mol/L 冰冷 CaCl₂ 溶液, 移液枪轻轻吹打垂悬细胞, 冰上放置 30 min。4 ℃ 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 倒置 1 min, 每管中加入 60 μ L 冰冷 0.1 mol/L CaCl₂ 垂悬细胞, 冰上放置 2 h, 即可用于转化; 也可加入体积分数为 40% 的甘油, -70 ℃ 超低温保存备用^[10]。

1.3.5 质粒转化 将 5 μ L 质粒 DNA 直接加入 100 mL 感受态细胞中, 手指轻弹管底部混匀, 冰浴 30 min。42 ℃ 水浴热激, 设置 20、30、40、60、80、90、100、120 s 8 个时间梯度, 设置 2、4、6、8 min 4 个冰浴冷却时间。加入 900 μ L LB 液体培养基(不含抗生素), 37 ℃ 180 r/min 振荡培养 1.0~1.5 h。取上述转化混合液 100 μ L, 滴到固体 LB 平板培养皿(含抗生素 100 μ g/mL Amp)中, 用玻璃涂布棒涂布均匀。正面向上放置 30~60 min, 待表面菌液完全被培养基吸收, 倒置培养皿, 37 ℃ 过夜培养 12~16 h^[11]。

2 结果与分析

2.1 不同热激时间对转化效率的影响

菌种活化时, 每隔 30 min 测 1 次 $D_{600\text{ nm}}$ 值(表 1)。

收稿日期: 2014-11-13

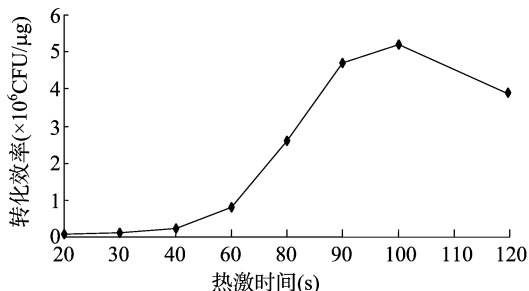
基金项目: 国家林业公益性行业科研专项(编号: 200904064)。

作者简介: 代 军(1965—), 女, 辽宁阜新人, 副教授, 研究方向为农业生物技术。E-mail: 40048601@qq.com。

表 1 大肠杆菌 DH5 α 活化后的 $D_{600\text{ nm}}$ 值

时间 (h)	$D_{600\text{ nm}}$	时间 (h)	$D_{600\text{ nm}}$
0	0	2.5	0.099
0.5	0.035	3.0	0.112
1.0	0.043	3.5	0.209
1.5	0.065	4.0	0.389
2.0	0.078		

以常用 CaCl_2 法为基础,在冷却时间相同的情况下,42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴热激,设置 20、30、40、60、80、90、100、120 s 8 个时间梯度,结果表明,热激 100 s 的转化效率最高,90 s 次之(图 1)。



注: 转化效率=每皿转化子平均数×菌悬液稀释倍数/质粒微克数。每皿转化子平均数指每管感受态细胞所涂的平板菌落平均值。

图1 不同热激时间对转化效率的影响

2.2 不同冷却时间对转化效率的影响

在热激 100 s 的前提下,对不同冷却时间进行比较,设置 2、4、6、8 min 4 个冰浴冷却时间,由图 2 可知,冷却时间对转化效率影响并不大,6~8 min 冷却时间的转化效率略高。

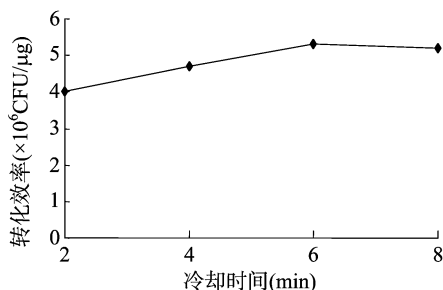


图2 不同冷却时间对转化效率的影响

2.3 离心管大小对转化效率的影响

本试验将常规 CaCl_2 法中 50 mL 离心管改成了 1.5 mL EP 管,降低了感受态细胞制备后分装时受到污染的风险,转化效率也相对较高。

3 结论与讨论

在分子生物学试验中,通常利用质粒的转移性及自我复制功能将重组质粒转化入大肠杆菌宿主细胞内,以达到目的基因复制、增殖及体外表达的目的^[12]。此过程中,受体细胞感受态质量的好坏以及转化过程的操作方法直接影响转化效率高低。很多研究人员在遇到不能获得良好的转化效率问题时,经常怀疑重组质粒构建时连接反应的影响,很容易忽略大肠杆菌感受态细胞制备及转化的环节,有些实验室过度信任商业公司提供的感受态细胞,导致试验陷于停滞状态却找不

到原因,试验效率受到很大影响^[13-18]。在具体操作过程中,感受态细胞制备及转化效率常因各种原因产生不稳定性,因此有必要针对特定菌株对其感受态制备与转化进行条件优化。本研究以常规 CaCl_2 法为基础,通过改变离心管大小、不同热激时间、不同冷却时间对感受态细胞制备及转化条件进行条件优化,结果表明,42 $^{\circ}\text{C}$ 热激的最佳时间为 100 s,最适冷却时间为 6~8 min。本研究将常规的 50 mL 离心管改成了 1.5 mL EP 管,有效降低了分装过程中可能产生的污染风险,简化了试验程序,提高了转化效率,为基因克隆试验成功提供了保障,同时节约了成本。

参考文献:

- [1] 司苏晋,刘田福,雷小春,等. 高转化效率甲基化酶缺陷大肠杆菌感受态细胞制备条件的优化[J]. 中国生物制品学杂志,2010,23(5):533-535,538.
- [2] 郭姣洁,薛永常,薛张伟,等. 热激后冰浴时间与复苏时间对化学转化法转化效率的影响[J]. 农业科学与技术,2010,11(9):198-200.
- [3] 梁建庆,叶志华,江秀梅,等. 转化条件对质粒 DNA 转化大肠杆菌的影响[J]. 微生物学杂志,2004,24(4):15-17.
- [4] 王友如. CaCl_2 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.
- [5] Castuma C E, Huang R, Kornberg A, et al. Inorganic polyphosphates in the acquisition of competence in *Escherichia coli* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(22):12980-12983.
- [6] Saito Y, Taguchi H, Akamatsu T. Fate of transforming bacterial genome following incorporation into competent cells of *Bacillus subtilis*: a continuous length of incorporated DNA [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, 101(3):257-262.
- [7] 萨姆布鲁克 J. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京:科学出版社, 2002.
- [8] 杜 祯,马海利,陈瑞芳. 工程菌 DH5 α 感受态细胞的制备及质粒 pGEM 的转化研究[J]. 中国畜牧兽医,2007,34(5):88-90.
- [9] 钟 鸣,马 慧,陈丽静,等. 生物技术试验指导[M]. 北京:中国农业大学出版社,2008.
- [10] 冯建成,牛 成,邢 旭,等. 大肠杆菌 HB101 感受态细胞制备条件的优化[J]. 热带生物学报,2010,1(3):224-227.
- [11] 薛明亮,司苏晋,雷小春,等. 大肠杆菌甲基化缺陷 DMI 菌株与普通 DH5 α 菌株的感受态转化率的比较[J]. 山西医科大学学报,2010,41(4):322-324.
- [12] 李 芳,墙克信,王玉炯. 大肠杆菌感受态细胞制备方法及应用的研究进展[J]. 宁夏医学院学报,2003,25(5):372-374.
- [13] 房功思. 浅谈大肠杆菌感受态细胞的几种制备方法[J]. 安徽卫生职业技术学院学报,2008,7(2):96-97.
- [14] 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.
- [15] 纠 敏,汪伦记,张 敏. 大肠杆菌感受态细胞转化能力影响因素的研究[J]. 安徽农学通报,2007,14(16):23-24,248.
- [16] 菌种保藏手册编著组. 菌种保藏手册[M]. 北京:科学出版社,1980.
- [17] 万 波,郑 莉,程书秋. 大肠杆菌感受态细胞培养与冻存条件的研究[J]. 微生物学通报,1997,24(4):234-236.
- [18] 王 威,杨 华. 大肠杆菌感受态制备与转化实验[J]. 毕节学院学报,2009,27(4):83-87.