

晏国洪, 姜 山. 长期保存活力低下的大肠杆菌制备感受态细胞条件的优化[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(5): 46–48, 134.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.013

长期保存活力低下的大肠杆菌制备感受态细胞条件的优化

晏国洪, 姜 山

(贵州师范大学生命科学学院, 贵州贵阳 550001)

摘要:研究了 CaCl_2 溶液处理方法、长期保存的原始菌种活化次数、离心条件对感受态细胞最终转化效率的影响, 并分析其最佳转化效率参数、优化感受态制备和转化方法。结果发现: 使用过滤处理的 CaCl_2 比灭菌处理的 CaCl_2 制备的感受态细胞转化效率高。在其他条件相同的情况下, 长期保存的大肠杆菌菌种活化 3 次以上的转化率最高; 制备感受态细胞第 1 次离心在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $4\,000\text{ g}$ 条件下离心 15 min, 第 2 次离心时在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $4\,000\text{ g}$ 条件下离心 5 min 得到的感受态细胞转化率最高。

关键词: 大肠杆菌; 感受态细胞; 转化率; 优化

中图分类号: Q813.1⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)05-0046-03

DH5 α 是一种常用于质粒克隆的菌种。感受态细胞的制备和转化是分子生物学实验室频繁使用的一项重要常规操作。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 在使用含 NPT II 质粒载体转化时, 可用卡那霉素鉴别重组菌株。重组 DNA 转化细菌技术的关键是通过物理或者化学的方法, 人工诱导细菌细胞成为敏感的感受态细胞, 这种细胞易接受外源 DNA, 但由于转化是一个很复杂的过程, 具体的作用机理尚不明确^[1-3]。一些优良的大肠杆菌菌种价格较贵或获得途径较难, 而实验室保存的大肠杆菌菌种一般时间较长(约 5~10 年), 导致菌种部分死亡和活力降低, 在实际操作中制得的感受态细胞转化效率常常不能满足试验的要求。

对于大肠杆菌而言, 外源 DNA 导入主要有电穿孔转化法、 MgCl_2 -DMSO 法、Inoue 法、 CaCl_2 法等多种。电穿孔转化法需要特殊的仪器设备, MgCl_2 -DMSO 法和 Inoue 法操作比较复杂。而 CaCl_2 转化法操作相对简单、方便, 而且成本非常低廉, 已成为实验室进行基因克隆操作常用方法^[4-9]。 CaCl_2 法制备感受态细胞的关键因素有 CaCl_2 溶液的质量、大肠杆菌 DH5 α 生理状况、制备过程中的离心条件。本试验用 CaCl_2 法对保存了 5.5 年的菌种按以上 3 个关键因素设计试验, 优化感受态细胞的制备条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒 大肠杆菌 DH5 α 由贵阳医学院寄生虫实验室赠送, pRI101-ON 质粒购置于 TaKaRa 公司(图 1)。

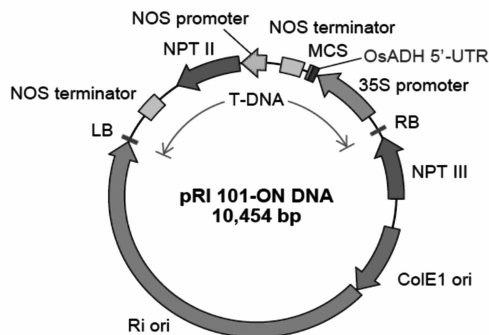


图1 pRI101-ON 图谱

1.1.2 试剂 LB 培养基, 卡那霉素溶液, CaCl_2 溶液, 均按文献[10]的要求配制。

1.1.3 仪器 凝胶成像系统、电泳仪、超净工作台、冷冻离心机、摇床、紫外分光光度计。

1.2 方法

1.2.1 提取 pRI101-ON 质粒 按照质粒提取试剂盒说明书操作。

1.2.2 活化菌种^[10-11] (1)从 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中取出长期保存的大肠杆菌, 用无菌牙签刮取固体(仔细操作不要让其融化), 然后在 LB 平板上划线。

(2)取 5 mL 新鲜 LB 液体培养基加入支无菌试管中。

(3)用接种环挑 1 个单菌落, 浸没于培养液中并轻轻摇动接种环, 使待接种的细菌分散于培养液中。

(4)盖好试管, 在摇床上以 60 r/min 、 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下振荡培养至饱和(新鲜培养至饱和期的培养细菌浓度约为 $10\text{ 亿} \sim 20\text{ 亿个/mL}$), 一般须过夜培养。

(5)取出(4)中 0.2 mL 培养物到含有 10 mL 新鲜 LB 培养基试管中, 在摇床上以 220 r/min 、 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 振荡培养, 每隔 20 min 取出 2 支试管, 一支放入 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱统一测定 $D_{600\text{ nm}}$ 值, 另一支制备感受态细胞。(活化 1 次)

(6)将活化过 1 次的大肠杆菌取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 加入 5 mL 新鲜 LB

收稿日期: 2014-10-22

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30860158, 31260426)。

作者简介: 晏国洪(1989—), 女, 贵州遵义人, 硕士研究生, 研究方向为植物生理生态学。E-mail: 18798093169@163.com。

通信作者: 姜 山, 教授, 博士, 研究方向为植物病理学。E-mail: kyosan200312@hotmail.com。

液体培养基在摇床上于 60 r/min、37 ℃ 条件下振荡培养至饱和。

(7) 取出(6)中 0.2 mL 培养物到含有 10 mL 新鲜 LB 培养基试管中,在摇床上于 220 r/min、37 ℃ 条件下振荡培养,每隔 20 min 取出 2 支试管,一支放入 4 ℃ 冰箱统一测定 $D_{600\text{ nm}}$ 值,另一支制备感受态细胞。(活化 2 次)

(8) 将活化过 2 次的大肠杆菌取 100 μL 加入 5 mL 新鲜 LB 液体培养基在摇床上于 60 r/min、37 ℃ 条件下振荡培养至饱和。

(9) 取出(8)中 0.2 mL 培养物到含有 10 mL 新鲜 LB 培养基试管中,在摇床上于 220 r/min、37 ℃ 条件下振荡培养,每隔 20 min 取出 2 支试管,一支放入 4 ℃ 冰箱统一测定 $D_{600\text{ nm}}$ 值,另一支制备感受态细胞。(活化 3 次)

(10) 将活化过 3 次的大肠杆菌取 100 μL 加入 5 mL 新鲜 LB 液体培养基在摇床上于 60 r/min、37 ℃ 条件下振荡培养至饱和。

(11) 取出(10)中 0.2 mL 培养物到含有 10 mL 新鲜 LB 培养基试管中,在摇床上于 220 r/min、37 ℃ 条件下振荡培养,每隔 20 min 取出 2 支试管,一支放入 4 ℃ 冰箱统一测定 $D_{600\text{ nm}}$ 值,另一支制备感受态细胞。(活化 4 次)

1.2.3 制备感受态细胞^[10-12] CaCl_2 法制备感受态细胞。摇好的菌液试管冰浴 30 min,分装成 2 mL,在 4 ℃、4 000 g 条件下离心 8 min,弃上清,加 800 μL 冰预冷的 0.1 mol/L CaCl_2 重悬浮,分别使用 0.22 μm 的滤菌器 and 高温灭菌。再在 4 ℃、4 000 g 条件下离心 8 min,弃上清,加 100 μL 冰预冷的 0.1 mol/L CaCl_2 重悬浮,4 ℃ 保存 12~24 h。

1.2.4 质粒转化^[10,13-14] 把 100 μL 的感受态细胞放置于冰上,加入转化的 10 ng DNA,于冰中放置 30 min。42 ℃ 热激 90 s,再在冰中放置 2~3 min,加入 37 ℃ 条件下预热好 900 μL 的 LB 培养基,37 ℃ 条件下振荡 1 h。取 10 μL 菌液稀释涂布平板(平板预热),37 ℃ 条件下正向培养 1 h,再过夜培养。

1.2.5 计算^[15] 转化子总数 = 该皿菌落数 \times 稀释倍数 \times (转化反应原液总体积/稀释倍数);

转化频率 = 转化子总数/质粒 DNA 加入量(μg)。

2 结果与分析

2.1 CaCl_2 溶液的处理方式对转化率的影响

CaCl_2 法制备感受态细胞的成本低、操作简单,而成为最常见的制备感受态细胞的方法。多种因素可以影响 CaCl_2 法感受态细胞的转化效率,如菌液 $D_{600\text{ nm}}$ 值、感受态细胞保存时间及 CaCl_2 浓度等^[15-17]。 CaCl_2 法制备感受态细胞的最佳浓度为 0.1 mol/L^[16],但 CaCl_2 溶液的处理方式是否对转化有影响。本研究利用高温和过滤 2 种方法对 CaCl_2 溶液进行灭菌处理,再进行感受态的制备、转化,用过滤处理的 CaCl_2 溶液制备感受态细胞的转化率显著高于高温灭菌处理($P < 0.05$) (图 2)。

2.2 不同活化次数对转化率的影响

大肠杆菌 DH5 α 的 $D_{600\text{ nm}}$ 值与 1 mL 中活细胞数间的关系变化很大,对大多数大肠杆菌来说,在 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.4 左右^[18] 制备感受态细胞最好,本研究选取 $D_{600\text{ nm}}$ 值在 0.1~0.7 之间的不同活化次数的大肠杆菌进行研究。因此,在制备感受态时,应每隔 20 min 取出相同的 2 支试管,一支放入 4 ℃ 冰箱统一测定特定培养大肠杆菌 DH5 α 的 $D_{600\text{ nm}}$ 值,绘制不同活化次

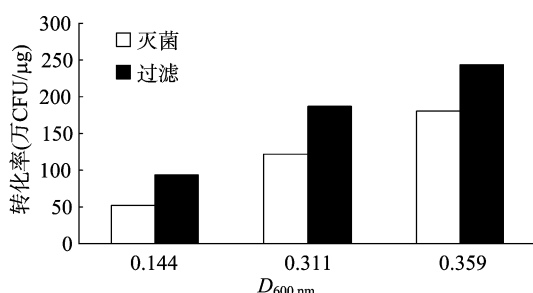


图2 不同 CaCl_2 处理方式对转化率的影响

数大肠杆菌 DH5 α 的生长曲线;另一支制备感受态细胞,绘制不同活化次数大肠杆菌 DH5 α 的转化率图。

在同样的间隔时间下,细菌生长速度与活化次数相关,活化次数越多,细菌单位时间生长越快。活化第 2 次比第 1 次生长快,第 3 次比第 2 次生长快,但在活化第 3 次和第 4 次生长速度差不多,这可能是因为第 3 次活化和第 4 次活化的细菌生长状态已达到最佳状态(图 3)。

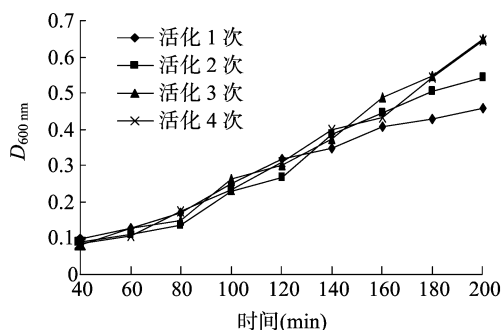


图3 活化不同次数大肠杆菌 DH5 α 的生长曲线

根据 CaCl_2 法制备的感受态细胞进行转化,最后取 10 μL 转化菌液稀释铺板,于 37 ℃ 条件下培养,计数并计算转化率。结果发现,感受态细胞的转化率与 $D_{600\text{ nm}}$ 值、活化次数显著相关。大肠杆菌 DH5 α 菌株在活化第 3 次 $D_{600\text{ nm}}$ 值为 0.372、活化第 4 次 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.397 转化率最高,转化率分别为 321 万、328 万 CFU/ μg (图 4)。

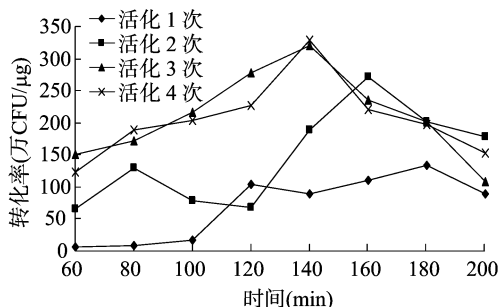


图4 不同活化次数对大肠杆菌 DH5 α 转化率的影响

2.3 不同离心时间对转化率的影响

制备感受态细胞时,细菌要被离心 2 次,离心时间对感受态细胞的活性有较大影响。将 CaCl_2 法中的 2 次离心时间进行梯度设置,制备不同离心时间的感受态细胞并转化。(1) 第 1 次离心,弃除 LB 培养基,条件设为:4 ℃、4 000 g 下分别离心 5、10、15、20、25、30 min;第 2 次离心, CaCl_2 洗涤细菌均为 4 ℃、4 000 g 条件下离心 8 min(图 5)。(2) 第 1 次离心,

弃除 LB 培养基,条件设为(1)中得到的最高转化率的时间;第 2 次离心, CaCl_2 洗涤细菌,条件设为:4 ℃、4 000 g 条件下分别离心 5、10、15、20、25、30 min(图 6)。

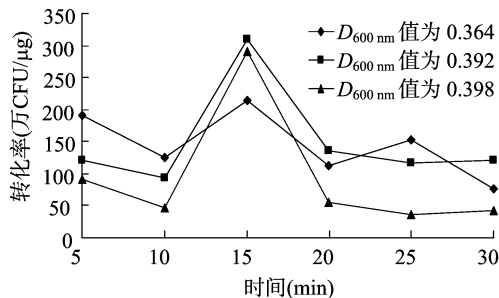


图5 第 1 次离心时间对转化率的影响

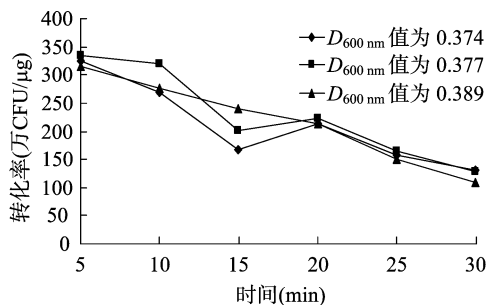
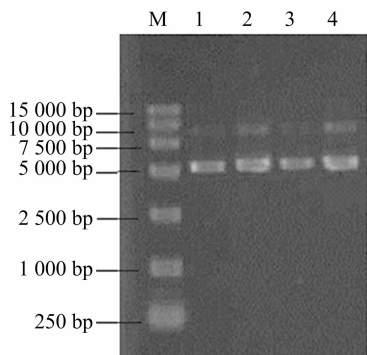


图6 第 2 次离心时间对转化率的影响

由图 5、图 6 可知,第 1 次离心条件为 4 ℃、4 000 g 离心 15 min,第 2 次离心条件为 4 ℃、4 000 g 离心 5 min 得到的感受态细胞转化率最高,为 335 万 CFU/μg。

2.4 原始质粒与转化后质粒比对

将转化了的大肠杆菌进行液体培养,当菌液饱和后使用试剂盒提取质粒,再进行琼脂糖凝胶电泳,结果发现,原始 pRI101-ON 质粒与转化后的 pRI101-ON 质粒的位置相同,说明成功转化了原始 pRI101-ON 质粒(图 7)。



1—原始质粒; 2—4—转化后的质粒

图7 原始 pRI101-ON 质粒和转化后的 pRI101-ON 质粒

3 结论与讨论

过滤处理的 CaCl_2 溶液制备的感受态细胞转化率比高温灭菌处理的高,可能是有些厂家生产的 CaCl_2 所含的杂质较多,高压灭菌时 Ca^{2+} 会与水中溶解的 CO_2 反应生成 CaCO_3 沉淀和其他杂质沉淀,且会影响溶液 pH 值变化;另外,在灭菌时溶剂会减少,降低溶液浓度,这些都可能成为制备感受态细胞的不利因素。

细菌转化率取决于细菌被质粒转化的能力以及细菌的数量,随着细菌生长,单位体积内的细菌数量增加,细菌被质粒转化的能力有所提高;但细菌数量到达一定量时,尤其当生长过度后转化率会明显下降^[18-19]。因此,合适的生长浓度应该能保证上述两方面的综合效应处于理想范围。结合所绘制的图可知,当活化 1 次时,由于长期保存导致大多数细菌死亡或生理状态不佳,转化率较低;活化 2 次时,转化率有所上升,可能是此时有活力的细菌较多;当活化 2 次及以上 $D_{600 \text{ nm}}$ 值为 0.37~0.40 时,细菌处于最理想的生长状态,被诱导处于感受态的细菌最多。本研究能获得转化率为 200 万~400 万 CFU/μg DNA 的感受态细胞,完全满足常规分子克隆操作对感受态细胞的要求。另外,当第 1 次活化 $D_{600 \text{ nm}}$ 值为 0.429,第 2 次活化 $D_{600 \text{ nm}}$ 值为 0.445 时转化率最高,比普遍认为的 $D_{600 \text{ nm}}$ 值为 0.4 略高。可能是因为这 2 个状态下的大肠杆菌活力还不够强,制备的感受态细胞摄取 DNA 的能力较差,此时细菌 $D_{600 \text{ nm}}$ 值较高的在数量上有优势,增加其转化率。但 $D_{600 \text{ nm}}$ 值过高会导致细菌大量老化,其活力显著减弱,因而转化率明显下降^[20]。

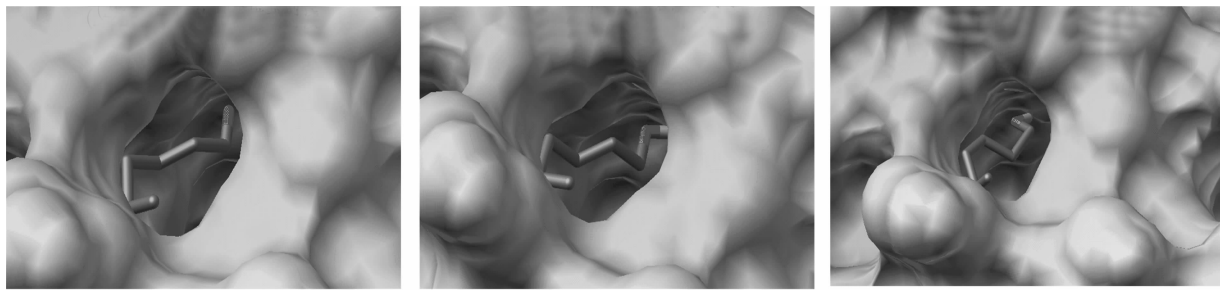
第 1 次离心时间在 15 min 能获得较高的转化率,可能是因为 4 ℃、4 000 g 条件下离心 15 min 下来的细菌比 5、10 min 的多,制备的感受态细胞数量较多,因而转化率高;然而在离心时间分别为 20、25、30 min 时,由于时间太长一部分细菌受到损伤,反而引起转化率下降。Mandel 等发现,将正在生长的大肠杆菌在 0 ℃以下加入到低渗的 CaCl_2 溶液中便会造成细胞的膨胀,形成原生质球,以利于吸收外源 DNA^[21]。第 2 次离心时间为 5 min 最好,可能是因为离心前细菌已经被 CaCl_2 处理过,细胞呈膨胀状态,离心速度太快、时间太长对细胞的损伤可能会加大。因此,第 1 次离心条件为 4 ℃、4 000 g、15 min;第 2 次离心的条件为 4 ℃、4 000 g、5 min 时制备的感受态细胞转化率最高。

综上所述,优化后的 CaCl_2 法能使经过长期保存后衰老、部分死亡、活力低下的菌种制备出高转化率的感受态细胞。

参考文献:

- [1] 夏鹤鸣,张波,乔磊,等. 感受态细胞制备技术的研究进展[J]. 中国甜菜糖业,2013(1):21-24.
- [2] 李代宗,赵晓瑜,倪志华,等. 少量制备大肠杆菌感受态细胞条件探索[J]. 生物技术,2006,16(6):55-57.
- [3] 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.
- [4] 曹际斌,石育原,谷秀彬,等. 一种简易的制备感受态大肠杆菌细胞的新技术[J]. 白求恩医科大学学报,1993,19(3):306-307.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 令利军,朱艳,王红梅,等. 保存时间及温度对大肠杆菌感受态转化效率的影响[J]. 生物技术通讯,2004(1):51-52.
- [8] 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.

(下转第 134 页)



(E)-2-己烯醛的口袋模式对接

(E)-2-己烯醇的口袋模式对接

(Z)-3-己烯醇的口袋模式对接

图4 3种绿叶挥发物与云南切梢小蠹 OBP 活性口袋的结合模式(局部)

梢小蠹影响最大^[10]。本研究结果表明,(E)-2-己烯醇与 TyunOBP2 结合能最低,更容易与 TyunOBP2 结合, TyunOBP2 与小分子物质的结合,可能通过占有该蛋白与寄主气味结合的空间或者通过改变 TyunOBP2 三维结构,导致 TyunOBP2 难以识别寄主松树散发的气味。从对接的结合模式图来看,小分子与受体分子表面的作用也是决定其活性的重要因素之一,(E)-2-己烯醇和 OBP 之间可能存在疏水作用力、范德华力,导致其结合能较低^[11];因此,加强小分子的疏水性或者形成氢键能力均有可能增强化合物的抑制活性^[12]。本研究选用云南切梢小蠹 1 个已知的气味结合蛋白作为对象,计算并模拟 TyunOBP2 与 3 个绿叶气味物质的分子对接,计算结果与前人试验结果一致,说明利用同源建模和分子对接方法模拟气味物质与气味结合蛋白结合有一定的可靠性。实际上,昆虫在进化过程中发展多个气味结合蛋白识别多种气味物质,云南切梢小蠹也有多个气味结合蛋白^[3],是否还存在比 TyunOBP2 更容易与小分子绿叶气味物质结合的其他气味结合蛋白还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 贾亚翔,崔古贞,张青叶,等. 肺炎链球菌 *HMGS* 基因克隆及同源建模[J]. 山东医药,2010,50(1):82-83.
- [2] 王建国,马 宁,王宝雷,等. *N*-[2-(4-甲基)嘧啶基]-*N'*-2-硝基苯磺酰脲的合成、晶体结构、生物活性及其与酵母 AHAS 的分子对接[J]. 有机化学,2006,26(5):648-652.
- [3] Jy Z, Zhao N, Yang B. Global transcriptome profiling of the pine shoot

beetle, *Tomicus yunnanensis* [J]. International Journal of Genomics, 2012,7(2):32291-32301.

- [4] Yue F, Yang B. Olfactory responses of *Tomicus yunnanensis* to different non-host plants [J]. Plant Diseases and Pests, 2011,2(3):27-30.
- [5] de Groot P, Macdonald L M. Green leaf volatiles inhibit response of red pine cone beetle *Conophthorus resinosae* (Coleoptera: Scolytidae) to a sex pheromone [J]. Naturwissenschaften, 1999,86(2):81-85.
- [6] 岳 锋,杨 斌. 不同非寄主植物对云南切梢小蠹嗅觉行为的影响[J]. 广东农业科学,2011,38(3):65-67.
- [7] 陈凯先,蒋华良,稽汝运. 计算机辅助药物设计——原理、方法及运用[M]. 上海:上海科学技术出版社,2000:259-281.
- [8] 李 琼,陈沛全,陈 兰,等. 酵母 AHAS 酶与磺酰脲类抑制剂作用模型的分子对接研究[J]. 高等学校化学学报,2007,28(8):1552-1555.
- [9] Dicke M, van Loon J J. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2000,97(3):237-249.
- [10] 王大伟,赵 宁,泽桑梓,等. 三种绿叶挥发性物质对云南切梢小蠹寄主定位行为的干扰作用[J]. 昆虫学报,2013,56(5):570-574.
- [11] 郁彩虹,张耀东,高裙裙,等. 分子对接和荧光光谱法研究槲皮素与 β -葡萄糖苷酶的相互作用[J]. 光谱学与光谱分析,2011,31(8):2151-2155.
- [12] 杜志云,汤志恺,卢宇靖,等. 姜黄素类似物与酪氨酸酶相互作用的分子对接研究及应用[J]. 计算机与应用化学,2011,28(5):531-534.

(上接第 48 页)

- [9] 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.
- [10] 奥斯伯,金斯顿,塞德曼,等. 精编分子生物学实验指南[M]. 马学军,跃 龙,译. 4 版. 北京:科学出版社,2005.
- [11] 杨 坤,巩振辉,李大伟,等. 大肠杆菌高效感受态细胞的制备及快捷转化体系的建立[J]. 北方园艺,2010(14):127-130.
- [12] 罗 婵,汤刚彬,谢体三,等. 感受态细胞制备与保存方法的比较研究[J]. 生物技术,2005,15(1):52-54.
- [13] 罗 锋,余 腾,范丽梅. 感受态细胞制备和质粒转化冰浴时间对大肠埃希菌转化效率的影响[J]. 江汉大学学报:自然科学版,2011,39(3):82-85.
- [14] 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.
- [15] 刘进元. 分子生物学实验指导[M]. 北京:清华大学出版社,

2002:22-29.

- [16] 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.
- [17] 梅运军,陈向东,谢志雄,等. Ca^{2+} 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.
- [18] 恒明辉,关艳丽,陈 飞. 大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞转化率变化的研究[J]. 微生物学杂志,2013,33(1):63-65.
- [19] 张岚岚,徐春燕,徐昌杰. 大肠杆菌感受态细胞转化功能的影响因素[J]. 细胞生物学杂志,2004,26(4):429-432.
- [20] 陈 飞,吴红艳,恒明辉,等. Tetramycin 抗性基因克隆及生物活性的测定[J]. 微生物学杂志,2012,32(1):17-22.
- [21] Mandel M, Higa A. Calcium-dependent bacteriophage dna infection[J]. Journal of Molecular Biology, 1970,53(1):159-162.