

张 迹,李 智,张 宇,等. 一步法制备大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株感受态细胞及转化条件优化[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):529-532.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.156

一步法制备大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株感受态细胞及转化条件优化

张 迹,李 智,张 宇,袁巧云

(淮阴师范学院生命科学学院/江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室,江苏淮安 223300)

摘要:大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株是大肠杆菌表达系统最常用的宿主菌株,因此人们需要 1 种便捷有效的感受态细胞制备和转化方法。一步法感受态细胞制备操作方便,只加 1 种试剂即可,更快捷稳定,转化也更方便,不需要热激。研究大肠杆菌感受态细胞一步法制备对 BL21 菌株的适用性,并对转化过程中的关键参数进行探索和优化。结果表明,该一步法制备的 BL21 菌株感受态细胞可获得 10^6 CFU/ μ g DNA 转化效率,完全能够满足常规转化要求。转化过程中相关参数的最佳条件为冰水浴 30 min,室温放置 10 min,37 ℃、150 r/min 振荡复苏 40 min。

关键词:感受态细胞制备;一步法;大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株;转化条件

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)12-0529-03

在分子生物学试验中,DNA 重组技术和外源基因的表达是最常用的研究手段之一,质粒转化进入大肠杆菌感受态细胞是其频繁使用的一项基本操作技术。这项技术分为 2 个部分,即大肠杆菌感受态细胞的制备和质粒 DNA 的转化。目前,制备感受态细胞最常用的方法是 CaCl_2 法^[1-2]和电穿孔法^[3]。电转化法转化效率高,但是需要一套特殊仪器,操作过程也很繁琐; CaCl_2 法不需要特殊仪器,操作简便,重复性好,但耗时较长^[4]。1989 年 Chung 等报道了一步法制备大肠杆菌感受态细胞,该法操作简便、快捷、重复性好,获得单位质量转化效率达到 $10^7 \sim 10^8$ 个/ μ g 单位质量的转化子,能够满足常规试验要求,并可在 -70 ℃ 下长期保存。一步法感受态细胞制备及其转化法适用于 DH5 α 、HB101、JM109 等多个大肠杆菌常用菌株^[5]。

大肠杆菌表达系统是目前最常用的外源蛋白表达系统^[6],而大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株是该表达系统最常用的宿主菌株^[7],需要便捷有效的感受态细胞制备和转化方法。本研究采用一步法制备大肠杆菌 BL21 菌株的感受态细胞,研究该方法对 BL21 菌株的适用性,并对转化过程中的关键参数进行探索和优化。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

供试菌株:大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株,由笔者所在实验室保存。

供试质粒: PUC19 (2 686 bp)、pET29a (5 371 bp)、

pET29a-gfp(5 948 bp)。

1.2 试剂

质粒抽提试剂盒,购自爱思进生物技术(杭州)有限公司;IPTG、X-Gal、PEG3350、相关抗生素,均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。其他常规试剂均为国产分析纯。

1.3 主要培养基和溶液配方

LB 培养基(1 L):蛋白胨(Tryptone,OXCID)10.0 g;酵母提取物(Yeast extract,OXCID)5.0 g;NaCl 5.0 g;用去离子水补足 1 000 mL,121 ℃ 高压蒸汽灭菌 30 min。配制固体培养基时加入 2% 琼脂。

转化与贮存溶液(TSS):液体 LB 培养基调 pH 值为 6.5,含 10% PEG3350,5% 二甲基亚砜(DMSO),10% 甘油, MgCl_2 10 mmol/L, MgSO_4 10 mmol/L,高压蒸汽灭菌。

5 × KCM 溶液:KCl 0.5 mol/L, CaCl_2 0.15 mol/L, MgCl_2 0.25 mol/L。该溶液仅需少量配制(以 mL 计),过滤除菌,分装成小份于 -20 ℃ 保存备用,可反复冻融。

1.4 大肠杆菌 BL21 菌株一步法感受态细胞的制备

制备方法参照文献[5]所介绍的一步法。活化大肠杆菌 BL21 菌株,从 37 ℃ 培养过夜的新鲜 LB 平板中挑取 BL21 单菌落,接种到 3 mL LB 液体培养基中,37 ℃、200 r/min 振荡培养过夜;取 1 mL 过夜培养菌液接种入 100 mL 液体 LB 培养基中,37 ℃、200 r/min 振荡培养至 $D_{600\text{nm}} = 0.3 \sim 0.5$ (约 3 h);将培养液转移到灭菌的 50 mL 离心管中,置冰上 10 min;4 ℃、6 000 r/min 离心 5 min,弃上清;用 10 mL 预冷的无菌 TSS 重悬菌体细胞;冰上放置 10 min,分装 120 μ L/管(在冰上操作),-70 ℃ 保存备用。

1.5 大肠杆菌一步法感受态细胞转化

取无菌的 1.5 mL 离心管,加入 1 μ L 待转化质粒,5 × KCM 10 μ L,ddH₂O 39 μ L,置冰上;从 -70 ℃ 冰箱中取出大肠杆菌 BL21 菌株感受态细胞,立即融化;吸取 50 μ L 感受态细胞加入上述离心管中,轻轻吹吸使之与上述试剂混匀,冰水浴 20 min,室温放置 10 min;加入 500 μ L 新鲜液体 LB 培养基,

收稿日期:2015-11-04

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(编号:31300099);江苏省高等学校大学生创新训练计划(编号:201310323046X)。

作者简介:张 迹(1982—),男,江苏宿迁人,博士,讲师,主要从事环境污染物微生物降解及污染环境微生物修复研究。E-mail: zhangjihnu@163.com。

于 37 ℃、150 r/min 摇床中,振荡复苏 40 ~ 50 min;室温、6 000 r/min 离心 3 min,弃部分上清,留取约 200 μ L,重悬后涂布抗生素平板,37 ℃ 过夜培养,观察平板,计数转化子数,并计算转化率。

转化率 = 感受态细胞转化后形成的菌落数 (CFU)/DNA 质量 (ecg)。

转化所用质粒均采用质粒提取试剂盒并按其说明书要求步骤操作,提取的质粒样品经适度稀释后,用琼脂糖凝胶电泳检测,根据其条带亮度与标准的 marker 条带比较并估算质粒浓度。

1.6 转化过程中的参数处理

在大肠杆菌 BL21 菌株感受态细胞转化过程中,分别设置冰水浴时间 (0、5、10、20、30、40、50 min)、室温放置时间 (0、5、10、20、30、40、50 min)、复苏过程中的摇床转速 (0、50、100、150、180、200 r/min) 及复苏时间 (0、5、10、20、30、40、50 min) 等一系列不同的参数,研究这些参数对转化效率的影响,探索大肠杆菌 BL21 菌株一步法感受态细胞的最优转化条件。此外,为研究感受态细胞转化后于 4 ℃ 放置对转化效率的影响,将感受态细胞在最佳条件下转化并复苏后,涂布抗生素平板,并于 4 ℃ 保存,定时取平板 (0、2、12、24 h),37 ℃ 过夜培养后分析计算转化效率。以上所有处理均设置 3 个重复,取平均值,用 Excel 作图,图中的误差线均表示标准差。

2 结果与分析

2.1 不同质粒对 BL21 菌株一步法感受态细胞的转化

本研究分别使用大小不同的 PUC19、pET29a、pET29a - gfp 质粒对 BL21 菌株一步法感受态细胞进行转化试验,以探讨大肠杆菌感受态细胞一步制备法对 BL21 菌株的适用性。转化结果表明,3 种不同大小的质粒均对大肠杆菌 BL21 菌株一步法制备的感受态细胞成功地实现了转化;其中分子量较小的质粒 pUC19 所获得的转化效率最高,超过 5×10^6 CFU/ μ g,分子量较大的质粒 pET29a 和 pET29a - gfp 获得的转化效率约为 3×10^6 CFU/ μ g,略低于 pUC19 (图 1)。

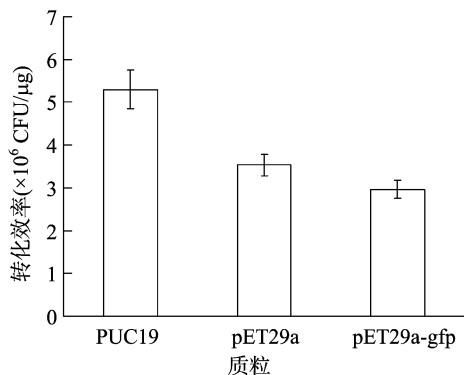


图1 不同质粒对大肠杆菌 BL21 菌株一步法感受态细胞的转化

pET 系列载体是常用的大肠杆菌表达载体,含有 T7 强启动子,广泛应用于在大肠杆菌 BL21 菌株中诱导表达目的蛋白^[8-9]。结果表明,pET29a 和 pET29a - gfp 成功地转化入 BL21 菌株的一步法感受态细胞,并在本研究的试验条件下能获得约 10^6 CFU/ μ g 的转化效率,表明一步法制备的大肠杆菌 BL21 菌株感受态细胞完全能够满足常规重组表达载体转

化的要求。

2.2 冰水浴时间对转化效率的影响

在对大肠杆菌 BL21 菌株一步法感受态细胞的转化过程中,设置不同的冰水浴时间。图 2 表明,前 30 min 随着冰水浴时间的延长,感受态细胞的转化效率越来越高,在冰水浴 30 min 时表现出最高转化效率,达到 5.4×10^6 CFU/ μ g,之后转化效率有所下降。因此,将转化过程中的冰水浴时间设置为 30 min 最好。

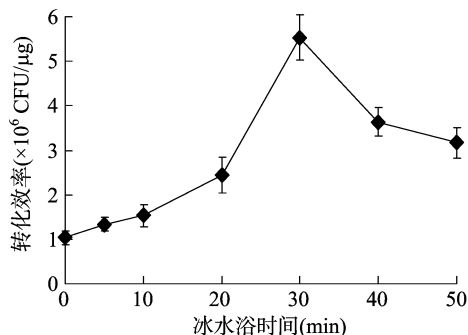


图2 不同冰水浴时间对转化效率的影响

2.3 室温放置时间对转化效率的影响

大肠杆菌一步法感受态细胞转化过程中,在冰水浴结束后将转化体系直接放置在室温中以替代传统 CaCl_2 法的热休克步骤。为研究室温放置时间对转化效率的影响,本研究设置一系列不同的室温放置时间。图 3 显示:本组试验中室温放置 10 min 时,获得最高的转化效率达到 7.5×10^6 CFU/ μ g;室温放置时间不足 10 min 时,转化效率随室温放置时间延长而逐渐提高;放置时间超过 10 min 时,转化效率则逐渐降低。因此,在室温中放置 10 min 是大肠杆菌 BL21 菌株一步法感受态细胞转化中该参数的最适条件。

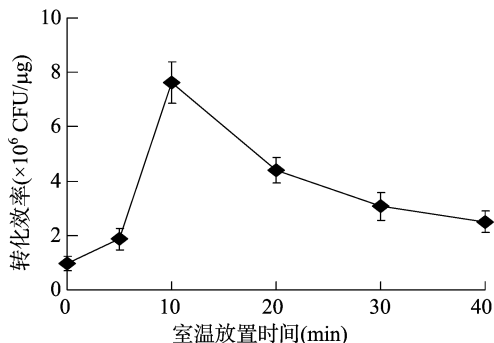


图3 不同室温放置时间对转化效率的影响

2.4 复苏时间对转化效率的影响

复苏是大肠杆菌转化过程中的重要步骤,大肠杆菌在此过程中将修复感受态细胞制备时留下的损伤,用于转化子筛选的抗生素抗性基因在此过程中也得到了初步表达。为了研究一步法感受态细胞转化的适宜复苏时间,本研究按照 10 min 的时间间隔设置了 6 个复苏时间。图 4 表明:随着复苏时间的延长,转化效率逐步提高,至复苏 40 min 时转化效率达到最高值;复苏时间为 50 min 时,转化效率较复苏 30、40 min 时有所降低。因此,40 min 是大肠杆菌 BL21 菌株一步法感受态细胞转化的最适复苏时间。

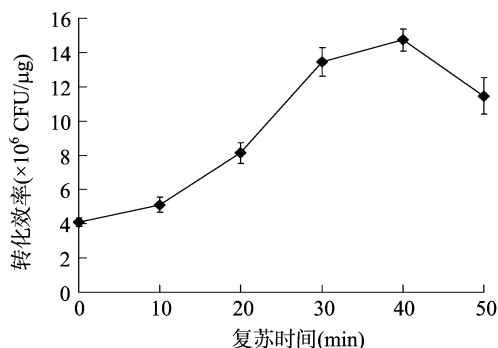


图4 复苏时间对转化效率的影响

2.5 复苏转速对转化效率的影响

复苏过程中摇床振荡的转速对大肠杆菌转化的效率有明显影响。为研究大肠杆菌 BL21 菌株一步法感受态细胞转化过程中最适的转速,本试验设置了 6 组不同的复苏转速,图 5 显示:复苏转速在 0 ~ 150 r/min 时,随着转速的增加,转化的效率逐渐增高;转速为 150 r/min 时转化效率最高,达到 4.5×10^6 CFU/ μ g;复苏转速超过 150 r/min 之后,转化效率开始逐渐下降。因此,150 r/min 是大肠杆菌 BL21 菌株一步法感受态细胞转化的最适复苏转速。

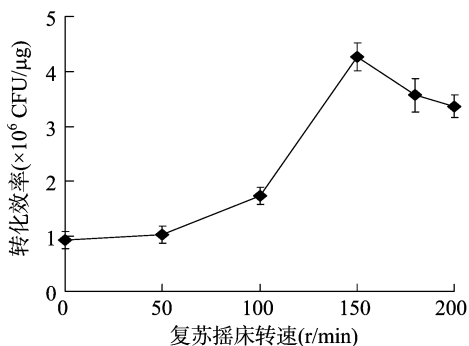


图5 不同复苏转速对转化效率的影响

在研究复苏转速对转化效率影响的试验过程中,由于使用同一台摇床设置不同转速,因此本试验不同处理的转化过程就存在先后。为保证所有的处理组同时培养,将先转化的菌体细胞涂布抗生素平板后于 4 ℃ 冰箱中放置,待本试验所有处理全部转化结束后一同放入 37 ℃ 培养箱培养。然而,在本试验过程中偶然发现相同的重复平板在 4 ℃ 放置后转化子数明显比未在冰箱中放置过的多,所以重新做了复苏转速的试验,以避免 4 ℃ 冰箱中放置对试验结果的影响,同时又对 4 ℃ 冰箱中放置时间对大肠杆菌转化效率的影响进行研究。

2.6 4 ℃ 冰箱中放置时间对转化效率的影响

之前的研究发现,转化后涂布的抗生素筛选平板在放入培养箱培养之前,于 4 ℃ 冰箱中放置一段时间对最终的转化效率会产生一定的影响。图 6 表明:抗生素筛选平板在 4 ℃ 冰箱中放置一段时间,长出的转化子数明显比未在冰箱中放置过的多,冰箱中放置 2 h 转化效率最高,在冰箱中放置 12、24 h 的转化效率明显下降,但仍比未在冰箱中放置过的高。

3 讨论

目前,生命科学研究领域的分子生物学试验技术高度发展,并被广泛应用。感受态细胞的制备和转化是其中的一项

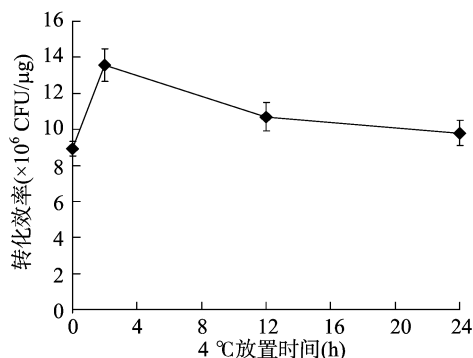


图6 筛选平板于 4 ℃ 冰箱中放置时间对转化效率的影响

基本操作,其主要方法有化学转化法^[1-2]和电转化法^[3]。最常用的化学法是 CaCl₂ 法,此外,大肠杆菌感受态化学制备方法还有甘油-聚乙二醇法^[10-11]、氯化铷法^[12]和一步制备法^[5,13]。大肠杆菌感受态细胞制备一步法操作便捷,其转化也较方便,适用于 DH5 α 、HB101、JM109 等多个大肠杆菌常用菌株。大肠杆菌感受态细胞的转化效率除了与其制备方法和菌株有关外,还与其冻存条件以及转化过程密切相关^[14-16]。

本研究采用一步法制备的大肠杆菌 BL21 菌株的感受态细胞可获得 $10^6 \sim 10^7$ CFU/ μ g 的转化效率,完全能够满足常规转化试验的要求。同时该结果也表明,一步法可用于大肠杆菌 BL21 菌株感受态细胞制备。为探讨和优化 BL21 菌株一步法感受态细胞转化过程中的关键参数条件,本研究在参照传统感受态细胞转化步骤的基础上分别设置冰水浴时间、室温放置时间、复苏过程中的摇床转速以及复苏时间等一系列不同的参数。

转化条件优化试验结果表明,大肠杆菌 BL21 菌株一步法感受态细胞的最优转化条件:转化体系先冰水浴 30 min,然后取出样品置于室温中放置 10 min,加入适量新鲜 LB 培养基后置于 37 ℃、150 r/min 摇床中振荡复苏 40 min,涂布抗生素平板,37 ℃ 过夜培养筛选转化子。

在转化试验中,笔者发现转化体系涂布抗生素平板后置置于 4 ℃ 冰箱中放置一段时间,长出的转化子数明显比未在 4 ℃ 冰箱中放置过而直接于 37 ℃ 培养箱中过夜培养的多,且重复几次试验均得到类似结果。为此,笔者做了一组转化试验,并设置了一系列不同的 4 ℃ 冰箱放置时间。结果显示,在 4 ℃ 冰箱中放置 2 h 转化效率最高,在冰箱中放置 12、24 h 的转化效率又有所下降,但仍比未在冰箱中放置过的高。笔者目前对于出现这一试验结果的原因尚未十分明了,还需要进一步研究和分析。

参考文献:

- [1] Mandel M, Higa A. Calcium - dependent bacteriophage DNA infection[J]. Journal of Molecular Biology, 1970, 53(1): 159 - 162.
- [2] 马向东, 成庆利, 康海霞. 微生物转化技术研究进展[J]. 河南农业大学学报, 2001, 35(4): 299 - 302, 323.
- [3] Dower W J, Miller J F, Ragsdale C W. High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation [J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16(13): 6127 - 6145.
- [4] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2007.

李兰芝,吴坤鑫,张家明. 紫萍休眠体的萌发诱导研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):532-536.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.157

紫萍休眠体的萌发诱导研究

李兰芝, 吴坤鑫, 张家明

(中国热带农业科学院热带生物技术研究所/农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室/
海南省生物质能源工程技术研究中心,海南海口 571101)

摘要:以紫萍 DW2501-4 和 HB0301 产生的休眠体为材料,利用单因子试验和正交试验研究不同蔗糖含量、不同的 GA_3 浓度、不同的温度和光照条件诱导紫萍休眠体萌发的最适条件。结果表明,在 1%~5% 质量浓度蔗糖范围内,高的蔗糖质量浓度会抑制休眠体的萌发,质量浓度为 1%、2% 的蔗糖对 DW2501-4 和 HB0301 休眠体萌发诱导效果最好。在 20~32 ℃,DW2501-4 休眠体在 32 ℃ 下萌发效果最佳,HB0301 休眠体在 28 ℃ 下萌发效果最佳。在 0~10 mg/L 范围内 GA_3 能促进 DW2501-4 和 HB0301 休眠体的萌发,最佳浓度为 0.1 mg/L。DW2501-4 和 HB0301 在光—暗周期为 24 h—0 h 和 16 h—8 h 下萌发势最高,叶状体数量最多。3 种日照时间下萌发率差异不显著,但长日照可缩短休眠体萌发时间,促进叶状体繁殖。DW2501-4 和 HB0301-4 休眠体的最佳萌发诱导条件是 0.5 倍 Hoagland's 培养基中添加 1% 蔗糖和 0.1 mg/L 的 GA_3 ,在 28 ℃,光—暗周期为 16 h—8 h 的条件下培养。

关键词:紫萍;休眠体;萌发;最佳条件

中图分类号: Q945.1;S555⁺.901 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)12-0532-05

紫萍 (*Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid.) 属于浮萍科 (Lemnaceae) 紫萍属 (*Spirodela*)。自然界中,夏末生长季节结束时紫萍会产生休眠体 (turion)^[1]。紫萍产生的休眠体直径大约为 2 mm,呈椭圆形,灰褐色。上表面平滑,下表面微微凸出。新形成的休眠体会沉入水底进行冬眠,经历一段时间的低温冬眠后,春天随着温度上升,光照时间延长,细胞内碳水化合物的代谢发生变化,冬眠才会被打破,休眠体开始萌发^[2-3]。休眠体萌发时会从 2 个分生侧囊中长出新的营养生殖叶片^[4]。通过消耗休眠体内积累的大量淀粉,新叶会快速

生长^[4]。寒冷处理对紫萍休眠体进行预催熟而更有利于休眠体的萌发,光照、充足的碳水化合物供应是促进休眠体萌发的必要条件^[5-7]。影响休眠体萌发的主要因子包括温度、光照、营养条件、 GA_3 等^[7-10]。在实验室内紫萍的种质资源也可利用休眠体进行保种,研究休眠体快速萌发的条件是实验室紫萍保种研究的重要部分。本试验通过研究不同蔗糖含量、不同的 GA_3 浓度、不同的温度和光照条件对紫萍休眠体萌发的影响,以期在实验室长期保存紫萍种质资源提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验材料选用本实验室保存的采自海南的紫萍 DW2501-4 和湖北的紫萍 HB0301。试验于 2015 年 1—12 月在中国热带农业科学院热带生物技术研究所试验基地温室内进行。利用其无菌无藻的叶状体,在含 0.005 mg/L ABA 的 0.5 倍缺氮的 Hoagland's 培养基,24 ℃,16 h—8 h 光—暗

收稿日期:2016-05-19

基金项目:国家国际科技合作专项(编号:2014DFA30680)。

作者简介:李兰芝(1990—),女,湖北广水人,硕士研究生,研究方向为植物分子遗传学,E-mail:317004873@qq.com;共同第一作者:吴坤鑫(1969—),男,福建永定人,博士,副研,研究方向作物遗传育种,E-mail:wukunxin@itbb.org.cn。

通信作者:张家明,博士,研究员。研究方向为生物质能源。
E-mail:jmzhang@vip.163.com。

- [5] Chung C T, Niemela S L, Miller R H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*; transformation and storage of bacterial cells in the same solution[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 2172-2175.
- [6] 唐建国, 茹炳根, 徐长法, 等. 蛋白质工程的研究[J]. 北京大学学报:自然科学版, 1998, 34(2): 342-348.
- [7] 陆海, 吴薇, 曾庆银, 等. 大肠杆菌 BL21(DE3)中表达重组蛋白的研究[J]. 北京林业大学学报, 2001, 23(6): 1-4.
- [8] 翟晓虎, 贺卫华, 沈晓鹏, 等. S100A16 蛋白多克隆抗体表达条件的优化[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(4): 39-41.
- [9] 王安平, 朱善元, 王永娟. 鸭甲型肝炎病毒 1 型 3C 基因的原核表达与多抗的制备[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8): 205-207.
- [10] 张卫东, 陈秀珠. 两种感受态细胞制备方法的比较[J]. 同济医科大学学报, 1997, 26(5): 43-50.

- [11] Shen P, Peng Z R. Progress in studies on natural transformation[J]. Nature, 1999, 398(6729): 641-650.
- [12] 李振宇, 徐开林, 潘秀英, 等. 氯化钡法制备感受态细胞[J]. 徐州医学院学报, 2004, 24(4): 315-316.
- [13] 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): 19280-19283.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.