

菌液浓度对 PCR 扩增的影响

郝爱平, 魏继承, 国会艳

(牡丹江师范学院 生命科学与技术学院, 黑龙江 牡丹江 157012)

摘要:以大肠杆菌和农杆菌(含几丁质酶基因)为试材,研究了菌液浓度对 PCR 扩增的影响。结果表明:当菌液 OD 值达到 0.006 后作为模板进行 PCR 扩增,经电泳检测即可出现条带,随着 OD 值的增加电泳条带逐渐变亮;OD 值在 0.200~0.700 的电泳条带比较清晰;LB 液体培养基中的成分对 DNA 模板没有影响,菌液 DNA 能正常扩增。

关键词:菌液浓度;模板;PCR

中图分类号:Q 949.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)03-0127-03

利用 PCR 技术进行重组体的筛选是分子克隆实验中常用的方法之一。但常规的 PCR 过程需要进行细菌培养、质粒制备等多步操作后才能进行基因扩增,操作繁琐,耗时较长,同时在反复的操作中 DNA 量损失也较大,产率较低^[1]。菌液作为模板进行 PCR 反应则大大节约了时间和成本,是一种经济、快速、准确的好方法。该实验探讨了能够进行 PCR 扩增的菌液浓度范围,并讨论

不同细菌菌液浓度与 PCR 扩增的关系,为今后的分子生物学实验提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 中间表达载体为大肠杆菌和农杆菌(含几丁质酶基因)。

1.1.2 主要试剂和酶 rTaq 酶、dNTPMixture、DL2000DNAMarker、10×PCRbuffer、Goldview,购于大连宝生物公司。PCR 引物合成于大连宝生物公司。CH-1: 5'-AGCATCTAGAATCAACCATGGCTCTCAAC-3'; CH-2: 5'-CGACGAGCTCATATAAATTAGCAAGAGAGG-3'。

1.1.3 仪器 T6 型紫外分光光度计,电子恒温水浴锅,

第一作者简介:郝爱平(1979-),女,硕士,讲师,现从事植物分子生物学的教学与科研工作。E-mail:swxhap@126.com。

基金项目:牡丹江师范学院青年专项基金资助项目(QF200902)。

收稿日期:2011-11-24

参考文献

- [1] 章宁,林清洪,曾新萍,等.西番莲生物技术研究进展[J].亚热带植物科学,2003,32(4):77-80.
- [2] 张兴旺.“百香果”与西番莲[J].柑桔与亚热带果树信息,2004,20(5):11.
- [3] 吴庆余.基础生命科学[M].北京:高等教育出版社,2006:56-84.
- [4] 谭文澄,戴策刚.观赏植物组织培养技术[M].北京:中国林业出版

社,1991:4-6.

- [5] 张丽珍,徐淑庆,杨冬业,等.青蒿组织培养及其快速繁殖研究[J].生物学通报,2010,45(3):48-50.
- [6] 张淑红.植物组织培养及其发展方向[J].垦殖与稻作,2003(6):44-46.
- [7] Otahola V. Plant regeneration of passion fruit (*Passiflora edulis* f. flavicarpa) through leaf disc *in vitro* culture[J]. Bioagri., 2000,12(3):71-74.

Tissue Culture and Plantlet Regeneration of *P. edulis*

YANG Dong-ye¹, ZHANG Li-zhen², XU Shu-qing³

(1. Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541004; 2. Guilin Normal College, Guilin, Guangxi 541004; 3. Qinzhou University, Qinzhou, Guangxi 535000)

Abstract: Taking stems with buds of passionfruit as explants, MS as basal medium, passionfruit tissue culture and plantlet regeneration of passionfruit were studied. The results showed that MS + 6-BA 2.0 mg/L was suitable for inducing adventitious buds, the induced rate reaches to 100%. The perfect medium for adventitious shoot proliferation was MS + 6-BA 1~1.5 mg/L + IBA 0.1~0.2 mg/L, 1/2MS + IBA 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L was the best suitable medium for inducing roots and the induced rate reached to 100%.

Key words: passionfruit; tissue culture; regeneration

PTC-100™型 PCR 仪,冰箱,琼脂糖凝胶电泳系统,离心机等。

1.2 实验方法

1.2.1 菌液 OD 值的测定 分别取不同培养时间大肠杆菌和农杆菌菌液 2 mL 放入比色皿中,在可见分光光度计下测菌液的 OD 值。将测完 OD 值的大肠杆菌样品和农杆菌样品编号,保存于-20℃冰箱中备用。

1.2.2 大肠杆菌菌液的稀释 对 OD 值为 0.020 的大肠杆菌菌液分别用 LB 液体培养基和去离子水进行 6 个梯度的稀释,稀释倍数分别为 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 和 4.0 倍,具体步骤见表 1、表 2。将 A、B 2 组稀释样品保存于-20℃冰箱中备用。

表 1 LB 液体培养基稀释大肠杆菌菌液

A 组	大肠杆菌菌液/ μL	LB 液体培养基/ μL	稀释倍数/倍
1 号	50	75	1.5
2 号	50	100	2.0
3 号	50	125	2.5
4 号	50	150	3.0
5 号	50	175	3.5
6 号	50	200	4.0

表 2 去离子水稀释大肠杆菌菌液

B 组	大肠杆菌菌液/ μL	去离子水/ μL	稀释倍数/倍
7 号	50	75	1.5
8 号	50	100	2.0
9 号	50	125	2.5
10 号	50	150	3.0
11 号	50	175	3.5
12 号	50	200	4.0

1.2.3 PCR 扩增 分别以保存的 1~13 号大肠杆菌样品、1~9 号农杆菌样品和 A、B 2 组稀释样品为模板,建立 PCR 反应体系(表 3)。PCR 反应条件为:95℃预变性 1 min;94℃变性 30 s;60℃退火 30 s;72℃延伸 1 min;30 个循环;72℃后保温 5 min。反应结束后配制 1%琼脂糖凝胶检测 PCR 产物。

表 3 PCR 反应体系

反应体系	加入量/ μL
模板	1.0
去离子水	13.7
10×PCR buffer	2.0
引物 1	0.5
引物 2	0.5
dNTP	2.0
Taq 酶	0.3

2 结果与分析

2.1 大肠杆菌菌液 PCR 扩增结果

分别取不同培养时间的大肠杆菌菌液 2 mL 放入比色皿中,在可见分光光度计下测定菌液的 OD 值(表 4)。以 1~13 号大肠杆菌菌液为 DNA 模板的 PCR 产物的电泳结果见图 1。

表 4 不同时间取样的大肠杆菌菌液的 OD 值

编号	培养时间/h	OD 值
1 号	1.0	0.003
2 号	2.0	0.006
3 号	2.7	0.011
4 号	3.7	0.031
5 号	4.7	0.088
6 号	5.7	0.237
7 号	6.7	0.452
8 号	7.7	0.721
9 号	8.7	1.124
10 号	9.2	1.211
11 号	9.3	1.352
12 号	10.7	1.505
13 号	11.7	1.608

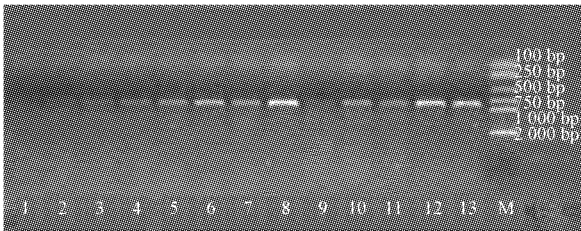


图 1 大肠杆菌菌液 PCR 扩增结果

由图 1 可知,1 号菌液没有电泳条带,2~13 号随着 OD 值的增加,其电泳条带亮度逐渐增强。1 号菌液 OD 值为 0.003,因为模板浓度太低含有的 DNA 太少没有电泳条带。2~13 号随着模板浓度的增加,其电泳条带亮度逐渐增强。因此,以大肠杆菌菌液为 DNA 模板进行 PCR 扩增时,菌液的 OD 值达到 0.006 就可以出带,为了节省时间和获得较好的电泳效果,选用 6~8 号的模板浓度即可。

2.2 农杆菌菌液 PCR 扩增结果

以表 5 中 1~9 号农杆菌菌液为 DNA 模板的 PCR 产物的电泳结果见图 2。

表 5 不同时间取样的农杆菌菌液的 OD 值

编号	培养时间/h	OD 值
1 号	8.0	0.004
2 号	8.5	0.006
3 号	10.0	0.011
4 号	12.5	0.022
5 号	16.0	0.107
6 号	17.0	0.125
7 号	18.0	0.201
8 号	19.5	0.443
9 号	20.0	0.568

由图 2 可知,1 号菌液没有电泳条带,2~9 号随着 OD 值的升高,其电泳条带亮度逐渐增强。1 号没有电泳条带是因为模板浓度太低,分子碰撞的几率降低,偶然性大,无扩增产物或不稳定。从 2 号 OD 值为 0.006 开始,随着模板浓度的增加 DNA 的量也增加,其电泳条带亮度逐渐增强。综上所述,用大肠杆菌或农杆菌菌液

模板进行 PCR 扩增时,当菌液 OD 值达到 0.006 后电泳即可出现条带,随着 OD 值的增加电泳条带逐渐变亮,菌液成分对 PCR 扩增没有影响。

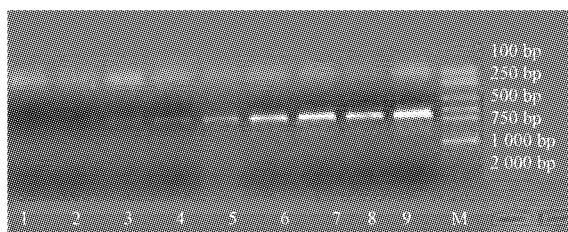


图2 农杆菌菌液 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification of *Agrobacterium* liquid

2.3 大肠杆菌菌液稀释液 PCR 扩增结果

以表1和表2中1~12号大肠杆菌菌液的稀释液为DNA模板进行PCR扩增,电泳结果见图3。

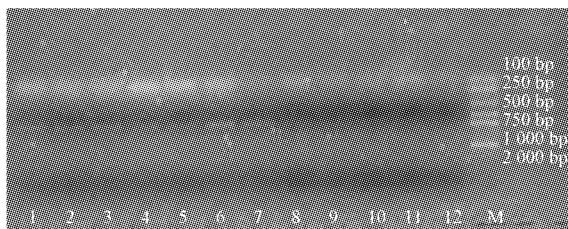


图3 大肠杆菌菌液稀释液 PCR 扩增结果

由图3可知,1~6号用LB液体培养基稀释的DNA模板可以看到条带,7~12号用去离子水稀释的DNA模板可以看到部分条带。这说明LB液体培养基中的成分对DNA模板没有影响,菌液DNA模板能正常扩增。

3 结论与讨论

1989年Gussow等^[2]首先提出用菌落PCR直接鉴定抗性平板上的重组克隆,即用无菌牙签挑取单个菌落到TE缓冲液中,煮沸5 min,涡旋振荡后短暂离心,用1~2 μ L裂解液作为DNA模板,省去抽提模板DNA这一步,大大节约了时间和成本。随后菌落PCR技术作为

基因克隆筛选和鉴定的方法被很多人采用^[3-6]。唐晔盛等还提出利用菌落直接PCR扩增DNA并用于测序的实验方法^[7-8]。但菌落PCR法的扩增结果不如质粒PCR扩增效果好^[9],有时还有不一致的情况发生,这对鉴定阳性克隆是十分不利的。已有研究证明,利用菌液PCR法用于定性筛选重组阳性克隆,与质粒扩增结果一致,是一种简便、快速、有效的方法^[10]。该研究用菌液模板进行PCR扩增,当菌液OD值达到0.006后电泳即可出现条带,OD值在0.200~0.700的电泳条带比较清晰,选用在这个范围内的菌液浓度可以缩短实验周期。LB液体培养基中的成分对DNA模板没有影响,菌液DNA模板能正常扩增,该结果对其它实验具有一定参考价值。

参考文献

- [1] 徐丽,蔡俊鹏. 菌落PCR方法的建立及其与常规PCR方法的比较[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2004(5): 103-104.
- [2] Gussow D, Glackson T. Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction[J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(10): 4000.
- [3] 李华,刘延琳,夏惠,等. 菌落PCR技术在重组质粒筛选与鉴定中的应用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004(9): 38-39.
- [4] 生秀杰,周伟强,姜莉,等. 应用以菌落为模板的聚合酶链反应技术筛选重组阳性克隆[J]. 中华检验医学杂志, 2002, 25(4): 139-140.
- [5] 李守新,刘尚勤,雷小妹. 菌落PCR差异筛选cDNA片段文库[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2005(5): 13-14.
- [6] 沈关心,朱慧芬,张悦,等. 菌落PCR和质粒PCR对转化菌的筛选[J]. 免疫学杂志, 2000, 16(2): 149-151.
- [7] 唐晔盛,李英. 菌落PCR在大规模基因组测序中的应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(2): 316-318.
- [8] 毛伟华. 菌落PCR产物直接测序方法的建立及在水稻基因测序中的应用[J]. 中国水稻科学, 2005, 19(5): 463-466.
- [9] 陈书霞,王晓武. 单菌落PCR法快速鉴定重组克隆[J]. 微生物学通报, 2006, 33(3): 52-56.
- [10] 崔亚东,刘生杰,聂传朋. PCR法快速鉴定阳性克隆实验的改进[J]. 阜阳师范学院学报(自然科学版), 2010, 27(2): 51-54.

Effect of Bacterial Concentration on PCR Amplification

HAO Ai-ping, WEI Ji-cheng, GUO Hui-yan

(College of Life Sciences and Technology, Mudanjiang Normal College, Mudanjiang, Heilongjiang 157012)

Abstract: Taking *Escherichia coli* and *Agrobacterium* were studied, in which included Chitinase gene as materials the effect of bacterial concentration on Polymerase chain reaction. The results showed that the band would appear when the bacterial OD value increased to 0.006 and then took it as the template for PCR by electrophoresis, meanwhile, the electrophoresis bands became more and more brighter with increasing of the OD value; When the OD value was between 0.200 to 0.700; The electrophoresis bands were quiet clear; The ingredients in the liquid of LB medium failed to effect on DNA template, and the bacterial DNA could be amplified as normal as usual.

Key words: bacterial concentration; template; Polymerase chain reaction