

大肠杆菌高效感受态细胞的制备及快捷转化体系的建立

杨 坤, 巩振辉, 李大伟

(西北农林科技大学 园艺学院 陕西 杨凌 712100)

摘要: 比较了不同方法制备的大肠杆菌感受态细胞的转化效率, 并优化了质粒 DNA 转化感受态细胞体系。结果表明: 高效法制备的感受态细胞转化效率极显著高于普通法制备感受态细胞的转化效率, 其效率提高了 966.1%, 而高效法感受态细胞转化效率与商品化的感受态细胞转化效率差异不显著。-80℃超低温长期保存时, 相比较于 15% 甘油, 以 7% DMSO 为冻存保护剂保存的感受态细胞其转化效率达到 1.1×10^7 , 较 15% 甘油冻存保护剂保存的转化效率提高了 69%。温浴 5 min, 冰浴 10 min 时, 其转化效率最高, 达到 4.95×10^7 。应用高效法制备的感受态细胞转化不同大小质粒的效率极显著高于普通大肠杆菌感受态细胞, 其转化效率较普通大肠杆菌感受态细胞的提高了 550%, 而转化时间缩短至普通大肠杆菌感受态细胞的 12.5%, 仅为 15 min。

关键词: 高效法; 感受态细胞制备; 质粒 DNA; 转化效率

中图分类号: Q 943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)14-0127-04

第一作者简介: 杨坤(1984), 男, 陕西咸阳人, 在读硕士, 现主要从事蔬菜育种及生物技术研究工作。

通讯作者: 巩振辉(1957), 男, 陕西礼泉人, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事蔬菜种质资源与生物技术研究工作。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30571262; 30771467); “13115”科技创新工程重大科技专项资助项目(2008ZDKG-03); 教育部高校博士点基金资助项目(200807120007)。

收稿日期: 2010-04-15

质粒转化大肠杆菌感受态细胞是分子克隆的关键步骤, 是基因克隆以及 DNA 文库构建等研究中频繁使用的一项基本操作技术。这项技术分为 2 个部分: 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氯化钙法^[1]。此方法廉价、便捷。但是在实际操作中, 其转化效率常常不能满足试验的要求, 转化效率不稳定。而市场中一些生物公

参考文献

- [1] 王向荣, 林箬. 西方现代景观设计的理论与实践[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2002.
- [2] 王晓俊. 西方现代园林设计[M]. 南京: 东南大学出版社, 2000.
- [3] 周向频. 欧洲现代景观规划设计的发展历程与当代特征[J]. 城市规划汇刊, 2003(4): 49-56.
- [4] 唐军. 从功能理性到公众参与—西方现代景观规划设计的社会脚印[J]. 规划师, 2001, 17(4): 59-63.
- [5] Robert Holden. 环境空间—国际景观建筑[M]. 蔡松坚, 译. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1999.
- [6] 刘晓明, 王朝忠. 美国风景园林大师彼得·沃克及其极简主义园林[J]. 中国园林, 2000(4): 35-41.
- [7] 费蓄. 极少主义绘画与雕塑[J]. 世界建筑, 1998(1): 63-67.
- [8] 罗枫, 王晓俊. 西方现代园林中的现代主义渊源[J]. 山西建筑, 2005, 31(2): 202-203.
- [9] Peter Jacobs, Elizaneth Meyer, Martha Schwartz. A Convergence of 'ISMS'[J]. Landscape Architecture, 1990.
- [10] Brian Wallis, Marcia Tucker. Art after Modernism[M]. Due/ Published, 1986.
- [11] 谢立中. “现代性”及其相关概念词义辨析[J]. 北京大学学报, 2001(5): 23-25.

Discussion of Main Trends in Western Modern Landscape Design

LIU Hong-xiu HUO Yar-hong

(College of Light Industry, Hebei of Polytechnic University, Tangshan, Hebei 063000)

Abstract: After nearly one century development, western modern landscape has formed its own style and form which is different from traditional landscape. Widely affected by their modern landscape thought and design style, modern landscape has gradually went out from tradition and formed some characteristics which are obviously different from the traditional form. This paper talked about the main trends of western modern landscape design from five aspects.

Key words: western modern landscape design; trend of design; modern and tradition; modern art

司提供商品化的大肠杆菌感受态细胞,其转化效率稳定,但是价格昂贵,不适合常规实验室的频繁使用。

质粒 DNA 转化大肠杆菌感受态细胞的体系虽然比较成熟,但是其步骤繁琐、耗时,整个过程需要 2~3 h,不适合常规实验室大量应用。针对大肠杆菌感受态细胞的制备方法和质粒 DNA 的转化体系中存在的不足,该研究旨在探索一套高效感受态细胞的制备方案并建立其相应快捷的转化体系,以简化试验,节省时间和精力。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌菌株 DH5 α 由课题组实验室保存,质粒 *pWR306*(13 600 bp Kan 抗性),*pBI121*(14 758 bp Amp 抗性),*pBI221-GFP*(5 396 bp Amp 抗性)均由课题组实验室保存,质粒 *pBI221-rd29A*(5 496 Amp 抗性)由课题组实验室构建。

1.2 试剂配制

0.1 mol/L CaCl₂ 转化缓冲液:将 1.11 g CaCl₂ 溶于纯水中,加纯水定容至 100 mL,用预先处理的 Nalgene 滤膜(0.45 μ m 孔径)过滤除菌备用;Inoue 转化缓冲液:将 10.88 g MnCl₂·4H₂O,1.66 g CaCl₂,18.65 g KCl 溶于 800 mL 纯水中,然后加 20 mL 0.5 mol/L 的 PIPES (pH 6.7),加纯水定容至 1 L,用预先处理的 Nalgene 滤膜(0.45 μ m 孔径)过滤除菌,分成小份-20℃保存。LB 液体及固体培养基,抗生素溶液均按照《分子克隆实验指南》^[2] 配制。

1.3 质粒 DNA 的提取

在 LB 液体培养基中培养含有上述质粒的大肠杆菌,用质粒提取试剂盒(购买于 Axygen 公司)提取其质粒 DNA,琼脂糖凝胶电泳检验质粒,然后通过核酸蛋白仪测定其浓度并统一稀释到 50 ng/ μ g,-20℃保存备用。

1.4 转化效率的计算

转化效率(cfu/ μ g)=(每皿转化子平均数×菌悬液稀释倍数)/质粒微克数。

1.5 不同方法制备大肠杆菌感受态细胞

1.5.1 常规方法(氯化钙法)制备大肠杆菌感受态细胞

挑取大肠杆菌单菌落,接种到含有 100 mL LB 培养液的烧瓶中,37℃振荡培养至菌液 OD₆₀₀=0.4。将菌液分装到无菌的 50 mL 离心管中,于 4℃ 5 000 r/min 离心 10 min 以收集大肠杆菌,除净培养液,每管用 30 mL 预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 溶液重悬细胞沉淀。再次以 4℃ 5 000 r/min 离心 10 min 回收大肠杆菌,除净缓冲液,每管用 2 mL 预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 溶液重悬细胞沉淀,

即为感受态细胞。

1.5.2 高效方法(Inoue 法)制备大肠杆菌感受态细胞

挑取大肠杆菌单菌落,接种到 LB 培养液中 37℃振荡活化 6~8 h,再将 2 mL 此培养物接种到含有 100 mL LB 培养液的烧瓶中,于 18~22℃中速振荡培养,待菌液 OD₆₀₀=0.5 时,将菌液分装到无菌的 50 mL 离心管中,于 4℃ 5 000 r/min 离心 10 min 以收集大肠杆菌,除净培养液,每管用 15 mL 预冷的 Inoue 转化液重悬细胞沉淀。再次以 4℃ 5 000 r/min 离心 10 min 回收大肠杆菌,除净缓冲液,每管用 4 mL 预冷的 Inoue 转化缓冲液重悬细胞沉淀,即为感受态细胞^[24]。

1.5.3 商品化大肠杆菌感受态细胞 商品化大肠杆菌感受态细胞(Trans5 α Chemically Competent Cell),购自北京 Transgen 公司。

1.6 质粒 DNA 转化大肠杆菌感受态细胞快捷体系建立

1.6.1 质粒 DNA 转化大肠杆菌感受态细胞标准步骤

将质粒 DNA 加入到装有感受态细胞的管中,轻轻旋转混匀,冰浴 30 min。将管放入预加温至 42℃的循环水浴中,热激 90 s,之后快速将管转移到冰浴中,使细胞冷却 1~2 min。向每管加入 200 μ L LB 培养基,于摇床 37℃温浴 60 min。将适当体积已转化的感受态细胞涂布在含相应抗生素的 LB 平板培养基上,待菌液被吸收后倒置于 37℃培养。

1.6.2 不同冰浴时间的比较 标准转化步骤中冰浴时间为 30 min,试验设置冰浴时间梯度进行比较^[5]。分别设置冰浴时间为:0、5、10、15、20、25、30、40、50、60 min。

1.6.3 不同温浴时间的比较 标准转化步骤中温浴时间为 60 min,试验设置温浴时间梯度进行比较^[78]。分别设置温浴时间为:0、5、10、15、20、25、30、40、50、60 min。

1.7 高效感受态细胞制备及转化体系的应用

利用课题组实验室保存及构建的质粒 DNA:*pWR306*(13 600 bp Kan 抗性),*pBI121*(14 758 bp Amp 抗性),*pBI221-GFP*(5 396 bp Amp 抗性),*pBI221-rd29A*(5 496 bp Amp 抗性),分别以快捷转化体系转化高效法制备的大肠杆菌感受态细胞,以标准步骤转化氯化钙法制备的大肠杆菌感受态细胞以及商品化大肠杆菌感受态细胞。

2 结果与分析

2.1 不同制备方法下大肠杆菌感受态细胞转化效率比较

取出不同方法制备的大肠杆菌感受态细胞,每种感受态各 3 管。按照标准转化步骤进行转化,计算 3 管感受态的转化率,并取其平均值代表该批感受态细胞的转化率。3 次重复,其平均值即为该方法制备的感受态细胞的转化率(表 1)。经方差分析可知,3 种不同方法得

到的感受态细胞转化效率差异极显著。其中高效法感受态细胞和商品化感受态细胞的转化效率明显高于常规法感受态细胞,而高效法感受态细胞和商品化感受态细胞的转化效率差异不显著。

2.2 不同冻存保护剂对高效法感受态细胞转化效率影响

在冻存感受态细胞时加入不同的冻存保护剂,之后进行转化并计算转化效率。图1显示,DMSO的保存效果要优于甘油,以DMSO为感受态细胞冻存保护剂,-80℃超低温保存60d时,其转化效率依然能够达到 1.1×10^7 ,而以甘油为冻存保护剂,60d时其转化效率仅有 0.65×10^7 。

2.3 冻存温度及时间对高效法感受态细胞转化效率影响

不同的冻存温度下,感受态细胞转化效率均在前期呈现上升的趋势,之后随着时间的推移逐渐下降。由图2可知在-80℃冻存的感受态细胞其转化效率最高时达到 6.3×10^7 ,之后随着冻存时间的延长,感受态细胞的转化效率有所下降,到60d时,高效法感受态细胞的转化效率为 0.95×10^7 。而在-20℃冻存的感受态细胞,到60d时,感受态细胞转化效率已经只有 0.38×10^7 。4℃保存的感受态细胞其感受状态持续时间更短,到30d时,其感受状态就完全丧失。这表明,低温对大肠杆菌感受态细胞的保存有利,温度越低保存时间越长,但是随着时间的推移其转化效率也在不断降低。

表1 不同方法制备大肠杆菌感受态细胞转化效率比较

制备方法	转化效率/ 1×10^6 cfu· μ g ⁻¹										均值	增加百分率/%
商品化感受态细胞	64.9	59.9	62.1	68.9	61.6	60.1	62.5	62.7	61.9	66.8746Aa	1 037.8	
高效制备法	61.3	58.4	63.1	60.5	55.2	52.1	59.5	61.6	57.3	59.4370Aa	966.1	
氯化钙制备法	6.51	4.35	5.67	4.62	7.01	5.51	6.35	4.25	5.35	5.5259Bb		

注:表中不同小写和大写字母分别表示差异达显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)水平。

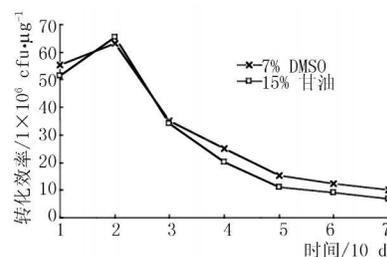


图1 不同冻存保护剂对高效法感受态细胞转化效率的影响

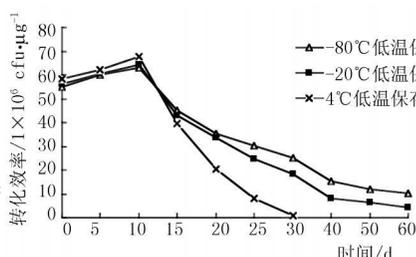


图2 不同冻存温度及时间对高效法感受态细胞转化效率的影响

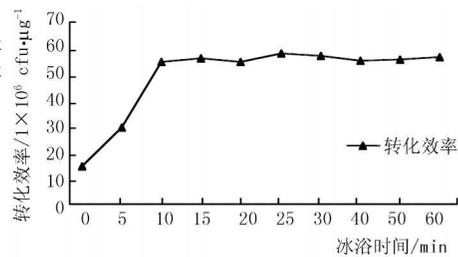


图3 不同冰浴时间对质粒DNA转化高效法感受态细胞效率的影响

2.4 不同冰浴时间对质粒DNA转化高效法感受态细胞效率的影响

质粒DNA转化高效法制备的感受态细胞,加入质粒后,分别冰浴0、5、10、15、20、25、30、40、50、60 min,随后按标准步骤进行转化,最后涂平板筛选转化子。图3显示,冰浴时间为零时转化效率很低,冰浴时间为10 min时转化效率达到峰值 4.95×10^7 并稳定下来,不再随冰浴时间的延长而提高。

2.5 不同温浴时间对质粒DNA转化高效法感受态细胞效率的影响

质粒DNA转化高效法制备的感受态细胞,加入质粒热激之后,感受态细胞会有不同程度的损伤,并且质粒DNA抗性基因的表达也需要一定时间,所以需要温浴。设置温浴时间0、5、10、15、20、25、30、40、50、60 min,随后按照标准步骤进行转化,最后涂平板筛选转化子。图4显示,对于含氨苄和卡那抗性的质粒DNA,不进行温浴直接涂板依然能够长出转化子,但是转化效率偏

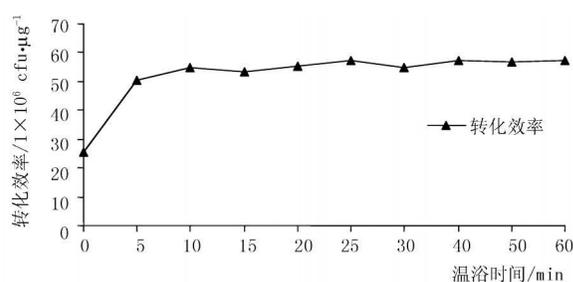


图4 不同温浴时间对质粒DNA转化高效法感受态细胞效率的影响

低,仅有 2.37×10^7 。温浴时间为5 min时转化效率达到峰值 4.95×10^7 并稳定下来,不再随温浴时间的延长而提高。

2.6 高效感受态细胞制备及转化体系的应用

试验用分子量介于5 000 ~ 15 000 bp之间的各种质粒分别以快捷转化体系转化高效感受态细胞。试验结

果表明,所有质粒均可转化进入大肠杆菌细胞。

利用课题组实验室保存及构建的质粒 DNA: *pWR306* (13 600 bp Kan 抗性), *pBI121* (14 758 bp Amp 抗性), *pBI221-GFP* (5 396 bp Amp 抗性), *pBI221-rd29A* (5 496 bp Amp 抗性), 分别以快捷转化体系转化高效法制备的大肠杆菌感受态细胞,以标准步骤转化氯化钙法制备的大肠杆菌感受态细胞。试验结果表明,相对于氯化钙法感受态细胞的转化效率,高效法获得的感受态细胞其转化效率平均提高了 550%。而转化时间缩短至普通大肠杆菌感受态细胞的 12.5%, 仅为 15 min。

3 讨论

常规的感受态细胞制备方法为氯化钙法,此法制备大肠杆菌感受态细胞成本低,操作简单。但是转化效率低下、不稳定,并且保存时间对其转化效率的影响很大。该试验采用 Inoue 高效感受态细胞制备方法,以商品化感受态细胞为对照与氯化钙法感受态细胞进行了对比,试验结果表明,高效感受态细胞转化效率显著高于氯化钙法感受态细胞,与商品化感受态细胞相比没有显著差异。

质粒 DNA 转化大肠杆菌感受态细胞的体系虽然比较成熟,但是其步骤繁琐耗时,整个过程需要 2~3 h,该试验通过优化冰浴和温浴时间,建立了转化高效感受态细胞的快捷转化体系,使转化过程缩短到 15 min,这对于具有氨苄和卡那抗性的质粒 DNA 证明是可行的。

质粒 DNA 转化大肠杆菌感受态细胞是分子生物学试验中非常重要的常规操作之一,其转化效率的高低不

仅与感受态细胞有关,还与被转化 DNA 质粒的大小有关。试验用分子量介于 5 000~15 000 bp 之间的各种质粒分别以快捷转化体系转化高效感受态细胞, (不同质粒分别由课题组实验室保存及构建: *pWR306* (13 600 bp Kan 抗性), *pBI121* (14 758 bp Amp 抗性), *pBI221-GFP* (5 396 bp Amp 抗性), *pBI221-rd29A* (5 496 bp Amp 抗性)。试验结果表明,对于不同大小的质粒 DNA,高效法感受态细胞都表现出稳定的转化效率。

参考文献

- [1] Pope B, Kent H M. High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli* [J]. *Nucleic Acids Res* 1996, 24(3): 536-537.
- [2] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆试验指南[M]. 3 版. 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2007.
- [3] 王世伟, 李旭业, 张伟伟. 优化感受态细胞制备方法提高转化效率的研究[J]. 齐齐哈尔大学学报, 2009(2): 86-90.
- [4] 罗婵, 汤刚彬, 谢体三. 感受态细胞制备与保存方法的比较研究[J]. 生物技术, 2005(1): 52-54.
- [5] 刘静华, 包英华, 陈燕飞. 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞转化率的改进[J]. 韶关学院学报, 2008(3): 87-90.
- [6] 唐颜苹, 王小媚, 何薇. 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(6): 745-748.
- [7] 潘云华, 周东霞, 陈元鼎. 一种制备高效感受态细胞的方法[J]. 大理学院学报, 2007(2): 27.
- [8] 代红星, 张庆桥, 樊宝良. 一种简捷有效的大肠杆菌感受态细胞制备方法[J]. 安徽农业科学, 2008, 29: 12627-12628.
- [9] 李代宗, 赵晓瑜, 倪志华. 少量制备大肠杆菌感受态细胞条件探索[J]. 生物技术, 2006(6): 55-57.
- [10] 王友如. CaCl₂ 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(3): 30-32.

The Preparation of Super *E. coli* Competent Cell and the Establishment of Fast Plasmid Transformation into *E. coli*

YANG Kun, GONG Zhen-hui, LI Da-wei

(College of Horticulture, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: The influence of different preparations on the transformation efficiency of *E. coli* competent cells was studied. The results showed that the efficiency of super *E. coli* competent cells was higher than common one. And the efficiency of super *E. coli* competent cells increased 966.1% over the common one. The efficiency of super *E. coli* competent cells was no significant differences compared with the kit. Storing in -80°C , it was better to store competent cells with 7% DMSO and the efficiency of competent cells stored with 7% DMSO was 1.1×10^7 , it increased 69% over the 15% glycerol. Meanwhile the influence of different transformation method was studied. A fast plasmid transformation system was established. Compared with common method, the efficiency of fast plasmid transformation system was 4.95×10^7 , and the transformation time was only 12.5% to the common method, it cost 15 min.

Key words: super competent cells; plasmid DNA; transformation