

冰冻保存感受态大肠杆菌及其使用方法*

顾懋治 忻纪厚

(中国科学院上海生物化学研究所)

Mandel 和 Higa 于 1970 年^[1]首先证明了氯化钙处理大肠杆菌 K_{12} , 可使大肠杆菌从外界渗入 DNA, 之后 Cohen 和 Lederberg 等人^[2,3]对这一方法又进一步研究, 提高了转化效率, 同时提出了低温保存感受态大肠杆菌的方法。随着分子生物学研究工作的深入, 转化作为一项常用的基本技术频繁使用, 每次转化实验中, 感受态大肠杆菌的制备要用很多时间。我们参考 Morrison^[4] 的方法, 采用深低温保存感受态大肠杆菌, 既节省时间和材料, 又使用方便, 还可获得较为稳定的转化效率。

材料和方法

(一) 材料

大肠杆菌 HB101 作转化受体菌。LB 培养基: 每升含蛋白胨 10g, 酵母粉 5g, 氯化钠 5g, 氢氧化钠调 pH 至 7.5; 氨基苄青霉素(第三制药厂生产); 质粒 pBR322DNA 按 Birnboim^[5] 方法制备。

(二) 方法

1. 感受态大肠杆菌 HB101 的制备: 大肠杆菌 HB101 单菌落接入 50ml LB 培养基中, 37℃, 振荡培养过夜。培养液以 0.5% 的接种量接入 200ml LB 培养基中, 37℃, 振荡培养至 650nm 消光值为 0.4—0.5。培养液在冰浴中冰冷, 然后, 6000g 离心 10 分钟, 弃去上清, 沉淀悬浮于 80ml 冰冷的 0.1M 氯化钙中, 微微摇动, 使菌体充分悬浮, 置于冰浴中 20 分钟后, 6000g 离心 10 分钟, 沉淀悬浮于 2ml 冰冷的 0.1M 氯化钙中, 即可用于转化。贮藏部分加入 1/10 无菌甘油, 摇匀, 以 0.25ml 为一份, 分装于塑料管

中, 插入干冰中速冻, -80℃ 冰箱保存。

2. 转化: 取氯化钙处理之感受态大肠杆菌或 -80℃ 保存之感受态大肠杆菌 HB101 置于冰浴中融化, 摇匀。吸取 0.1ml 于无菌试管中, 加入质粒 pBR 322 DNA, 混匀, 冰浴 40 分钟后, 再 37℃ 水浴 5 分钟, 加入 2ml LB 培养基, 在 37℃ 振荡培养一小时, 按不同稀释度铺平板, 计算抗氨基苄青霉素的菌落数。

结果和讨论

将未经冷冻和已经冷冻的感受态大肠杆菌 HB101 分别取样作转化试验。结果表明, 冷冻和未经冷冻处理的感受态大肠杆菌 HB101 总存活菌数(以每 0.1ml 贮存菌计算)基本一样, 转化效率亦无明显差异。贮存之感受态大肠杆

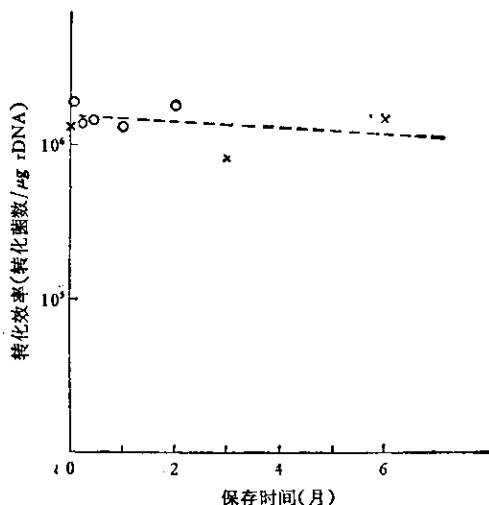


图1 在不同时间测定低温保存钙处理感受态大肠杆菌的转化效率(○、×示二批)

(下转第 26 页)

(上接第 27 页)

菌定期取出解冻后测定转化效率(图1)。 -80°C 保存感受态大肠杆菌 HB101 在 6 个月内转化效率基本不下降,总存活菌数也无明显下降。

以过量的质粒 pBR322 DNA 与 0.1ml 感受态大肠杆菌 HB101 进行的转化试验,证明在总的存活菌中有 1.7% 的细菌转化。

使用贮存的感受态大肠杆菌,需要注意,从 -80°C 取出后应立即投入冰浴(0°C)中,待解冻后(约 5—10 分钟)即进行转化试验,如在冰

浴中放置 2—3 小时,转化效率将会明显下降。

参 考 文 献

- [1] Mandel, M. and T. Higa, *J. Mol. Biol.* **53**: 159—162, 1970.
- [2] Cohen, S. N. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**: 2110—2114, 1972.
- [3] Lederberg, E. M. et al.: *J. Bacteriol.* **119**: 1072—1074, 1974.
- [4] Morrison, D. A.: *Methods in Enzymology*, Vol. 68, 326—331, 1979. Academic Press, New York.
- [5] Birnbeim, H. C. and Doly, J.: *Nucleic Acids. Res.* **7**: 1513—1523, 1979.