

大肠杆菌感受态细胞培养与冻存条件的研究

万 波

(华西医科大学钩端螺旋体病研究室 成都 610041)

郑 莉 程书秋

(四川联合大学生物工程研究所 成都 610064)

摘 要 测定大肠杆菌 JM107 在 37℃ 培养条件下的生长曲线, 制备其对数生长期不同阶段感受态冻存细胞, 并对冻存细胞的转化率进行研究。结果显示: 分离良好的单个新鲜菌落接种于 50ml SOB 培养基, 经 37℃, 170~180r/min 振荡培养 210min 左右, 所得冻存细胞转化率最高, -70℃ 保存时可达 5.2×10^7 转化子 / μg DNA, 且感受态保持时间长, 即使存放两个月仍能保持相当高的转化率。-20℃ 保存时也能在三周内保持较高转化率。

关键词 大肠杆菌, 感受态细胞, 冻存

DNA 转化是基因工程技术中一个极为重要的步骤。目前所采用的转化方法大多数源于 Mandel 和 Higa 等人^[1]的研究。他们当时发现大肠杆菌经冰浴的 Ca^{2+} 处理, 再经 37℃~42℃ 短暂加热可诱导产生感受态, 其吸收外源 DNA 的能力远远大于未经处理的细胞。有时甚至能增加约 1000 倍。但是感受态细胞的制备过程相当繁琐, 对于经常从事转化工作的人来说浪费的时间非常可观。将感受态细胞分装后冷冻保存, 再分次取用, 可以大大节约人力和时间。本文对培养时间与大肠杆菌感受态的关系以及感受态在不同冻存温度条件下的维持情况进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 菌株

大肠杆菌 JM107 为本室所有, -70℃ 保存。

1.2 质粒 DNA

pUC18 质粒经 RNase A 处理除去 RNA, 再经 Agarose Gel DNA Extraction Kit 回收纯化, 以岛津 UV2201 分光光度计测定纯度及浓度。

1.3 试剂、培养基及主要缓冲液

Agarose Gel DNA Extraction Kit 购自德

国 Boehringer Mannheim 公司, Bacto-Tryptone 及 Yeast extract 购自英国 Oxoid 公司, 氨苄青霉素购自四川长征制药厂, 其余化学试剂为分析纯产品; LB 培养基、SOB 培养基及 SOC 培养基参照 Maniatis 等的方法配制^[2]。FSB 缓冲液参照 Hanahan 的方法配制^[3]。

1.4 大肠杆菌生长曲线的测定

参照沈萍等的方法^[4], 将-70℃ 保存的大肠杆菌 JM107 原种划线接种于 LB 平板, 37℃ 培养 8~10h 活化, 挑取一个分离良好的单菌落接种于 50ml SOB 培养基, 37℃, 170~180r/min 振荡培养, 每隔 20~30min 取样测定培养液的 OD_{550} 值, 并绘制生长曲线。

1.5 冻存感受态细胞的制备

参照 Maniatis 等的方法^[2], 取对数生长不同时期培养液各 10ml, 测定 OD_{550} 值, 4000r/min 离心 5min, 菌体悬浮于 4ml FSB 缓冲液, 冰浴 10min, 离心收集菌体, 重新悬浮于 0.8ml FSB, 并加入 28 μl DMSO (二甲亚砜)。冰浴 15min 后再加 28 μl DMSO, 10min 后将菌液分装于无菌离心管, 于液氮中速冻 30s, 分别存放于 -20℃ 和

-70℃冰箱。

1.6 转化率测定及最适DNA量确定

取新鲜制备及冻存时间在24h以内的感受态细胞,每100 μ l分别与0.5、1、2、3、4、5、6、8、10及20ng pUC18 DNA混合,参照Maniatis等的方法进行转化^[2],涂布含有氨苄青霉素(10mg/ml)的LB平板,根据转化率确定最适DNA量。

1.7 最适培养时间的确定

对-20℃和-70℃下存放的感受态细胞,取不同培养时间培养物所制备的冻存感受态细胞各一管,按照最佳DNA量进行转化,以转化率最高者的培养时间为最适培养条件。该条件下所制备的冻存感受态细胞每周转化一次,以观察感受态在相应冻存条件下的变化。

2 结果及讨论

2.1 大肠杆菌生长曲线

接种后30min起每隔20~30min取样测定其OD₅₅₀值,以所得OD₅₅₀对时间作图得到大肠杆菌JM107生长曲线(图1)。由生长曲线可知,在该培养条件下接种后经过约65min的潜伏期细菌开始生长,到130min左右进入长约300min的对数生长期。

2.2 冻存感受态细胞制备与转化

制备好的感受态细胞液氮速冻30s以防细胞在冰冻过程中发生破裂,考虑到实验室的一般设备条件,选取-20℃和-70℃这两种条件进行研究。为确定DNA/感受态细胞的最适比例,将新制备的感受态细胞以及冻存细胞与不

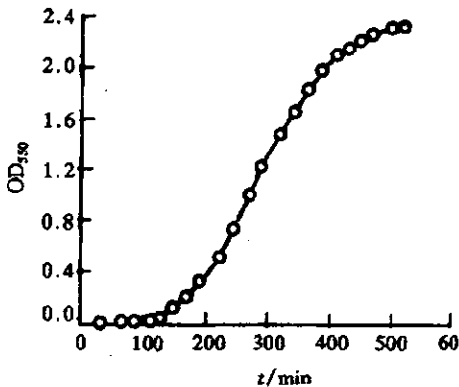


图1 大肠杆菌JM107生长曲线

同量pUC18 DNA进行转化,冻存细胞选用冷冻时间在24h以内的,以排除冻存时间对转化率的影响。结果表明,DNA量与转化率起初同步增加呈线性关系,DNA量在3ng时转化率均达到最高(图2),因而以每100 μ l感受态细胞转化3ng DNA为最佳。

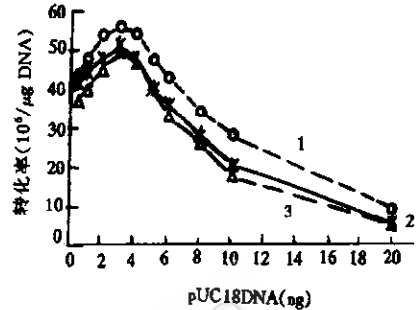


图2 转化率与DNA量的关系

1. 新制备, 2. -70℃冻存, 3. -20℃冻存

2.3 最适培养时间的确定

按照所确定最佳DNA量,分别转化对数期各阶段制备的冻存感受态细胞100 μ l(约5~7 \times 10⁷个菌体),计算转化率,得到转化率与OD₅₅₀值的关系曲线(图3),由图3知OD₅₅₀=0.55左右时可得最高转化率。

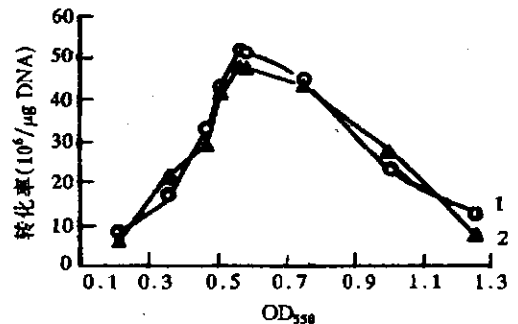


图3 冻存细胞转化率与OD₅₅₀值的关系

1. -70℃保存, 2. -20℃保存

2.4 冻存条件下感受态的变化

用OD₅₅₀=0.55时的培养液制备冻存感受态细胞,每周转化一次质粒pUC18 DNA。经两个月测试,-70℃保存条件下,转化率由最初的5.2 \times 10⁷/ μ g DNA降低为最终的4.7 \times 10⁷/ μ g

虽呈下降趋势,但仍保留了原有转化率的90%。而保存于-20℃的感受态细胞,冻存一周后转化率由最初5.0 \times 10⁷/ μ g DNA下降到2.1 \times

$10^7 / \mu\text{g DNA}$, 再经一周下降到 $5.2 \times 10^6 / \mu\text{g DNA}$, 到第三周末只有 $4.5 \times 10^5 / \mu\text{g DNA}$, 四周后就低于 $4 \times 10^4 / \mu\text{g DNA}$ 了, 可见在 -20°C 条件下感受态降低速度较快。

综合以上结果, 我们认为 37°C 振荡培养 ($170 \sim 180\text{rpm}$) 210min 左右 ($\text{OD}_{550} = 0.55$) 的大肠杆菌 JM107 制备感受态冻存细胞最佳, 冻存细胞以 -70°C 保存效果最好, 不仅转化率高而且转化率能较长时间保存, 在 -20°C 存放条件下, 感受态虽然迅速降低, 但在三周以内使用效果也较好。

参 考 文 献

- [1] Mandel, M. and A. Higa. *J. Mol. Biol.*, 1970, 53: 159~162.
- [2] Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)*, 2nd. Ed. Cold spring harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York, 1989.
- [3] Hanahan, D. *J. Mol. Biol.*, 1983, 166: 557~580.
- [4] 沈萍, 范秀蓉. *微生物学实验(第二版)*, 北京: 高等教育出版社, 1989.