

一种简单、快速制备与转化大肠杆菌受体细胞的方法

刘 振 盈

(山东大学生命科学院微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

张 华

(山东中医药大学 济南 250014)

摘要 用 TSB 溶液取代常规的 CaCl_2 溶液, 制备大肠杆菌受体细胞。在菌体处于对数早期时离心收集细胞, 用 TSB 缓冲液悬浮后, 即可用于质粒 DNA 的转化。转化效率可达 $10^7 \sim 10^8$ 转化子/ μg DNA。

关键词 质粒 DNA, 转化, 大肠杆菌

分类号 Q93-933

目前用于转化大肠杆菌受体细胞的主要方法有: CaCl_2 转化法^[1~4]和电穿孔 (electroporation) 转化法^[4,5]。 CaCl_2 转化法虽然重复性好、效率高; 但操作起来较为繁琐, 需要多次离心洗涤细胞、 CaCl_2 长时间处理受体细胞, 并且在转化过程中需要 1~2d 时间。电穿孔转化法虽然具有简单、快速、转化效率高等优点, 但它需要特

殊的电穿孔装置。我们通过近年来的实践, 建立了一种极为简便的制备及转化大肠杆菌受体细胞的方法。它简便、快速, 转化效率高达 $10^7 \sim 10^8$ 转化子/ μg DNA, 与 CaCl_2 法转化效率相当。但不需洗涤受体细胞, 即可用于转化。

1997-10-06收稿

在转化过程中也不需要 42℃ 热处理, 该方法最适于一般实验室常规质粒 DNA 转化法, 将此方法称为一步法。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

TG₁ [supE bsdΔ5 thiΔ (lac-proAB), F': traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔ M15] 和 MC1061 [hsdR2 hsdM⁺ hsdS⁺ araD139Δ (ara-leu) 7697 Δ (lac) χ 74 galE15 galK16 rpsL (Str^r) mcrA' mcrB₁] 作为质粒转化的受体细胞。pBR322 作为标准质粒, 购于 Promega 公司。

1.2 主要化学试剂

DMSO(二甲基亚砜)购于美国的 Sigma 公司。MgCl₂、MgSO₄、PEG(3350)、CaCl₂ 购于法国的 Prolabo 公司。

1.3 受体细胞的制备

根据 Chung 等人^[6]的方法略作改进。将大肠杆菌 TG₁ 和 MC1061 接种于 3ml LB 液中, 37℃ 培养至对数早期 (OD₆₀₀ = 0.3~0.4), 1000 × g, 4℃ 离心 5min, 细胞悬浮于 1/10 体积 (0.3ml) 的转化缓冲液 TSB 中 [TSB:LB 液中含 10% PEG(MW3350), 5% DMSO, 10mmol/L MgCl₂, 10mmol/L MgSO₄, pH6.1]。在 0℃ 放置 10min, 即可用于质粒 DNA 的转化。

1.4 转化

取上述 100μl 感受态细胞于 1.5ml Eppendorf 管中, 加入 100pg 的质粒 DNA pBR322, 冰上放置 5~10min, 加入 0.9ml TSB, 并加入终浓度为 20mM 的葡萄糖, 37℃ 振荡培养 1h, 按一定比例稀释涂于 LB 平板, 37℃ 培养过夜, 计算每微克 DNA 出现的转化子的数目。

2 结果与讨论

用上述一步法制备的受体细胞 TG₁、MC1061 和用 CaCl₂ 方法制备的受体细胞^[4], 分别用 100pg pBR322 质粒进行转化, 其结果见表 1。

通过一步法制备的受体细胞转化效率一般在 10⁶~10⁸ 转化子/μg DNA, 这与 CaCl₂ 法的转化效率相似。在通常的 CaCl₂ 转化方法中, 受体

表1 用一步法和CaCl₂法转化TG₁、MC1061的转移频率

菌株	TG ₁	MC1061
一步法	3×10 ⁷	1×10 ⁸
CaCl ₂ 法	2×10 ⁷	2×10 ⁸

细胞需在 CaCl₂ 溶液中, 4℃ 保存过夜, 方可用于转化, 在转化中尚需 42℃, 热激 90s, 制备与转化受体细胞需要 1~2d; 而一步法省去了 CaCl₂ 法这些繁琐的过程, 加入转化液后, 即可用于转化, 整个过程只需 2~3h 即可。另外, 用一步法制备的受体细胞, 转化效率非常稳定, 影响转化频率的因素少, 主要与菌体的生长状态有关。

二价离子如 Mg²⁺、Mn²⁺、Sr²⁺ 以及 PEG、DMSO 等^[6,7] 能够影响细胞的通透性, 诱导受体细胞进入感受态。在实验中发现, 在以 PEG 介导的受体细胞的制备和转化过程中, 加入 Mg²⁺ 或 Mn²⁺ 比加入 Ca²⁺ 转化效率高。通过综合各影响受体细胞转化效率的因素, 建立了适合大肠杆菌受体细胞的制备和转化的最适条件。

此外, 用一步法制备的感受态细胞可以在 TSB 液中冷冻保存, 而细胞活性和转化效率没有明显的降低。这个技术的建立, 为我们提供了一个简单而易于重复的制备大肠杆菌受体细胞的方法。

参 考 文 献

- [1] Cohen S N, Chang A C Y, Hsu L, Proc Natl Acad Sci U S A, 1973, 70:3240~3244.
- [2] Hanahan D. J Mol Biol, 1983, 166:557~580.
- [3] Kushner S R. An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE₁ derived plasmid. In: Genetic Engineering 1978 Elsevier / North Holland, Amsterdam.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.), New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [5] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E et al. Current Protocols in molecular biology, New York: Greene publishing, 1992.
- [6] Chung C T, Niemela S T, Miller R H. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86:217~2175.
- [7] Douglas H. J Mol Biol, 1983, 166:557~580.