

文章编号:1674-7054(2010)03-0224-04

大肠杆菌 HB101 感受态细胞制备条件的优化

冯建成,牛 成,邢 旭,王 超

(海南大学 材料与化工学院;海南优势资源化工材料应用技术教育部重点实验室;
热带生物多糖利用教育部工程中心,海南 海口 570228)

摘 要: 为探讨大肠杆菌 HB101 感受态细胞制备的最优条件,从菌种来源、感受态细胞的生长状态及其储存方式等 3 个方面进行了优化。结果表明:从 -70 ℃ 冰箱中保存的菌种活化大肠杆菌 HB101,当细胞的 OD_{600} 值为 0.3~0.4 时制备感受态,4 ℃ 冰箱放置 1 d, -70 ℃ 下放置 1 个月,均可获得较高的转化效率,每微克 DNA 最高可达 1.18×10^7 cfu。

关键词: 大肠杆菌 HB101; 感受态; 制备; 优化

中图分类号: Q 943.2 **文献标志码:** A

细胞处在易于接受外源 DNA 的状态叫感受态。重组 DNA 转化细菌技术的关键是通过物理或者化学的方法,人工诱导细菌细胞成为敏感的感受态细胞。对于大肠杆菌而言,外源 DNA 导入主要有氯化钙转化法和电穿孔转化法^[1]。电穿孔转化法需要特殊的仪器设备,而氯化钙转化法由于操作简单、方便而且成本低廉,已成为基因重组中常用的方法^[2]。目前,国内对氯化钙转化法中常用的大肠杆菌 JM109, XL₁-Blue 和 DH5 α 等感受态制备的研究较多^[3-6],而对于大肠杆菌 HB101 自制感受态条件的优化,还未见报道。笔者从菌种来源、感受态细胞的生长状态及其储存方式等 3 个方面,对大肠杆菌 HB101 感受态细胞制备条件进行了优化,以期为后续的基因重组实验打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 大肠杆菌 HB101 菌种本室保存,质粒载体 pUC-118($1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)购自宝生物(大连)有限公司。

1.2 试剂 胰蛋白胨、酵母粉购自 Sigma 公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.3 培养基 LB 培养基^[7]。

1.4 主要仪器 美国 SIM BIO-PRO 凝胶成像系统,NBS U410 型超低温冰箱,日立 CF16RX 高速冷冻离心机。

1.5 方法

1.5.1 感受态细胞 HB101 的制备 取 HB101 菌种 1 环,在新鲜的 LB 平板上划线,37 ℃ 培养过夜;挑单菌落到 10 mL LB 培养基中,37 ℃, $300\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 14~16 h。按 1:100 比例扩大培养,每 30 min 测定 OD_{600} 值。取培养物,冰浴 10 min, 4 ℃, $4\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min;用 10 mL 冰浴的 $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl₂ 溶液 10 mL 轻轻悬浮细胞,4 ℃, $4\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min。然后用 2 mL 冰浴 $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl₂ (含 $\varphi=10\%$ 甘油)重悬,每管 100 μL 分装后,分别保存于 4 ℃, -20 ℃ 和 -70 ℃ 冰箱中备用。

1.5.2 转化质粒载体到大肠杆菌 HB101 按照设定的时间,分别从 4 ℃, -20 ℃ 和 -70 ℃ 冰箱中取出保存的感受态各 3 管,在冰上放置,依次加入待转化的质粒载体 pUC-118 1 μL ,混匀,冰上放置 30 min

收稿日期: 2010-05-22
作者简介: 冯建成(1972-),男,湖北麻城人,海南大学材料与化工学院副研究员。

后,42 ℃水浴中热击 90 s,迅速置于冰上冷却 30 min。然后,向管中加入 900 μL LB 液体培养基,混匀后 37 ℃振荡培养 1 h。各取 50 μL 菌液涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板上,37 ℃过夜培养,计数菌落,计算不同温度下保存感受态的平均转化效率。

1.5.3 转化子质粒的提取及鉴定 按照碱裂解法^[7]提取转化子质粒,各取 1 μL 提取的转化子质粒及原始质粒载体,进行琼脂糖电泳检测。

2 结果与分析

2.1 感受态细胞菌种的来源对转化效率的影响 分别取保存于 4 ℃, -20 ℃和 -70 ℃冰箱中的菌种 *E. coli*. HB101 各一环,按照 1.5.1 中的方法制备好感受态细胞, -70℃冰箱中保存 1 周。按照 1.5.2 中的方法进行转化,分别计算平均转化效率,实验结果见图 1。

从图 1 可以看出,感受态细胞菌种的来源对转化效率的影响比较明显,取自保存于 -70 ℃的菌种,其平均转化效率最高,为 $7.51 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \mu\text{g}^{-1}$;保存于 -20 ℃的菌种次之;而保存于 4 ℃的菌种,其平均转化效率最低,仅为 $0.87 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ 。

2.2 感受态细胞生长状态对转化效率的影响 对大肠杆菌而言,感受态细胞不同的生长状态对转化效率高低影响显著。在制备感受态细胞时,分别取培养时间为 1.0 h,2.0 h,2.5 h,3.0 h,3.5 h 的菌液,测定其 OD_{600} 值。然后,分别制备感受态,将得到的感受态分别取 3 管,各 100 μL,加质粒载体 pUC - 118 各 1 μL,在 4 ℃的条件下进行转化,并计算各自的平均转化效率,结果如表 1。

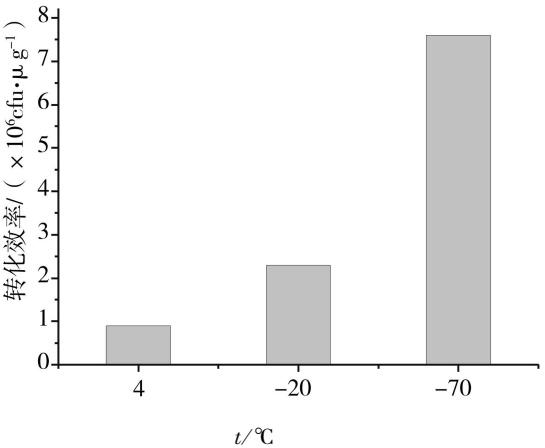


图 1 感受态细胞菌种的来源对转化效率的影响

表 1 感受态细胞生长状态对转化效率的影响

培养时间/ h	OD_{600}	平均转化效率/ (cfu · μg ⁻¹)
1.0	0.125	0.55×10^6
2.0	0.230	3.23×10^6
2.5	0.350	7.64×10^6
3.0	0.516	4.35×10^6
3.5	0.732	0.78×10^6

从表 1 可以看出,当细胞 OD_{600} 值小于 0.35 时,随着 OD 值的增加,其转化效率逐步增加,而当 OD_{600} 值大于 0.4 时,随着 OD 值的增加,其转化效率逐步下降,当 OD_{600} 值为 0.3 ~ 0.4 时,细胞的生长状态最适宜于制备感受态细胞,所制备的感受态转化效率也最高。

2.3 感受态细胞储存方式对转化效率的影响 取保存于 -70 ℃的菌种 1 环,按照 1.5.1 中的方法,将制备好的感受态细胞各 100 μL,分别在 4 ℃冰箱中保存 1 ~ 4 d; -20 ℃的冰箱中保存 1 ~ 4 周; -70 ℃超低温冰箱中保存 1 ~ 4 月后,各取 3 管,然后分别进行转化。以刚制备好的感受态不经保存,立即转化为对照组,计算各自平均转化效率,实验结果见图 2。

从图 2 - A 可以看出,4 ℃冰箱中保存的感受态细胞,随着保存天数的增加,转化效率逐渐递减,保存 1 d 时,转化效率最高,达 $8.16 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \mu\text{g}^{-1}$;从图 2 - B 可以看出,将感受态细胞保存于 -20 ℃的冰箱中 1 周时,其转化效率最高,为 $7.36 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \mu\text{g}^{-1}$,当储存超过 1 周,其转化效率明显下降;从图 2 - C 可以看出,将感受态细胞储存于 -70 ℃的冰箱中时,1 个月内,其转化效率最高,为 $1.18 \times 10^7 \text{ cfu} \cdot \mu\text{g}^{-1}$,在 3 个月内,其转化效率比较稳定,而当放置时间进一步延长时,其转化效率则显著下降;从图 2 - D 可以看出,不经低温保存直接转化,感受态转化效率最低,对于低温保存而言, -70 ℃保存 1 个月,4 ℃保存 1 d,均可获得较高的转化率,而 -70 ℃下保存 1 个月转化效率最高。

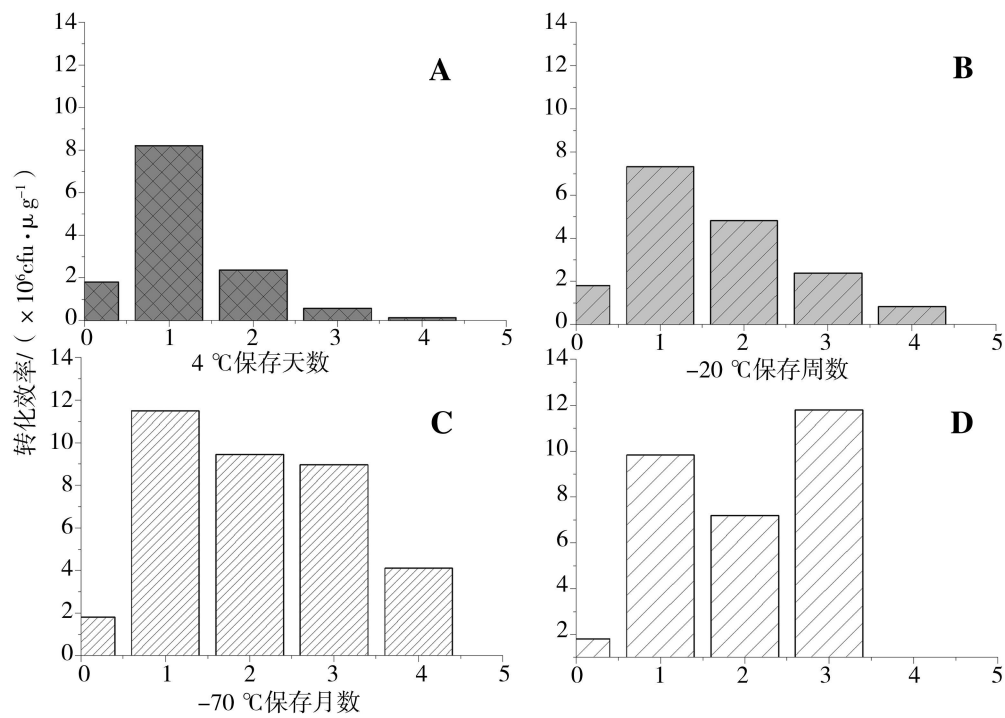


图2 感受态细胞储存方式对转化效率的影响

注:A~D 横坐标 0 均表示对照组(刚制备好的感受态不经冷藏直接转化);D 横坐标 1,2,3 分别表示取保存于 4 °C 1 d, -20 °C 1 周和 -70 °C 1 个月

3 讨 论

以质粒为载体构建的重组体导入宿主细胞的过程,叫做转化。目前,DNA 重组技术中应用最广泛的受体系统是大肠杆菌系统。影响转化效率的因素很多,其中感受态细胞的转化能力是关键。用于氯化钙转化法的大肠杆菌菌株主要有 JM109, HB101, XL₁-blue 和 DH5α 等,国内对于大肠杆菌 HB101 的感受态制备条件优化鲜有报道。

感受态细胞菌种的来源对转化效率的影响非常显著。实验结果表明,对于大肠杆菌 HB101,取自保存于 -70 °C 的原始菌种,其转化效率最高。因此,制备感受态时,要尽量选取超低温状态下保存的原始菌种,而经过多次继代的菌种,由于菌种的衰退,其转化效率明显下降。

感受态细胞收获时的生长时期对转化效率的影响显著。游雷鸣等人^[5]对大肠杆菌 JM109 制备感受态的研究表明,当 OD₆₀₀ 为 0.82 时,转化效率最高;温建新等人^[6]对常用的大肠杆菌 DH5α 和 JM109 的研究表明,OD 值与细胞数之间的关系随菌株的不同而异。笔者的实验结果表明,在大肠杆菌 HB101 生长处于对数期早期时,即 OD₆₀₀ 为 0.3~0.4 时,转化效率达到最高;随着细菌的老化,转化效率呈直线下降趋势。因此,对于不同的菌种,为获得高的转化效率,在制备感受态收获细胞时,要摸索适合于该菌的最佳生长时期,严格控制感受态细胞制备时的 OD₆₀₀ 值。

感受态细胞储存方式对转化效率也有着较大的影响。Dager 和 Ehrlich^[7]认为,感受态细胞能储存在 4 °C 的条件下,在最初的 12~24 h,其转化效率提高 3~5 倍,而后减低到平均水平。涂知明等人^[8]的研究表明,感受态细胞 XL₁-blue 在 -70 °C 保存 15 d,转化力没有明显的下降;在 -20 °C 保存,最高的转化效率出现在 2~7 d;在 4 °C 储存,它们会在 3 d 内失去转化能力。本实验研究表明,大肠杆菌 HB101,在 4 °C 冰箱放置 1 d, -70 °C 放置 1 个月,仍可获得较好的转化效率。因此,对于不同的大肠杆菌菌种,为获得高的转化效率,其储存方式和储存时间必须经过实验摸索。

总之,对大肠杆菌 HB101 而言,取自保存于 -70 °C 的原始菌种,当细胞 OD₆₀₀ 值为 0.3~0.4 时,环境温度为 4 °C 时,收获制备感受态细胞,4 °C 冰箱放置 1 d, -70 °C 下放置 1 个月,均可获得较好的转化效率,最高可达 1.18 × 10⁷ cfu · μg⁻¹。该菌种感受态制备条件的优化,为后续的基因重组实验打下了基础。

参考文献:

[1] 杨安钢,毛积芳,药立波.生物化学与分子生物学实验技术[M].北京:高等教育出版社,2001.

[2] 冯建成,崔贞华,罗素兰.大肠杆菌 JM109 菌株高效电转化条件的研究[J].湖北大学学报:自然科学版,2008,30(1):79-81.

[3] CHEN X D, GUO P Y, XIE Z X, et al. A convenient and rapid method for genetic transformation of *E. coli* with plasmids[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2001,80:297-300.

[4] 李代宗,赵晓瑜,倪志华,等.少量制备大肠杆菌感受态细胞条件探索[J].生物技术,2006,16(6):55-57.

[5] 游雷鸣,翁海波,韩绍印,等.大肠杆菌 JM109 感受态形成因素分析[J].生物技术,2007,17(2):37-40.

[6] 温建新,李志辉,宋明慧,等.影响大肠埃希菌感受态细胞因素的探讨[J].动物医学进展,2007,28(5):9-12.

[7] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T,等.分子克隆实验指南[M].第 2 版.北京:科学出版社,2002.

[8] 涂知明,陈明洁,何光源,等.三种大肠杆菌高效感受态的制备及转化[J].华中科技大学学报:自然科学版,2006,34(4):112-115.

Optimization on the Preparation of the Competent Cells
of *Escherichia coli* HB101

FENG Jian-cheng, NIU Cheng, XING Xu, WANG Chao

(College of Materials and Chemical Engineering, Hainan University Haikou 570228, China;
Key Laboratory of Hainan Natural Resources Chemical Materials Application Technology, MOE, Haikou 570228, China;
Tropical Bio-engineering Center for Polysaccharide Utilization, MOE, Haikou 570228, China)

Abstract: The strain source, the growth phrase of the cell and the storage condition were optimized for preparing the competent cells of *Escherichia coli* HB101. The results revealed that the highest transformation ability could be obtained when the source of the strain was streaked from strains stored under -70 ℃, cells were harvested when *OD*₆₀₀ were 0.3—0.4, the storage condition of competent cells was under 4 ℃ for 1 d and -70 ℃ for 1 month, and the highest transformation efficiency attained 1.18×10^7 cfu · g⁻¹ DNA.

Key words: *Escherichia coli* HB101; competent cells; preparation; optimization

(上接第 223 页)

Effects of Different Ecological Factors on the Growth of *Melosira* sp.

WANG Jun, XING Yu-xuan, CHEN Guo-hua, LIU Zhi-yuan, LI Hong-wu, Wang Ai-wen
(Ocean College, Hainan University, Hainan Key Laboratory of Tropical Hydrobiology Technology, Haikou 570228, China)

Abstract: The effects of temperature, illumination intensity, salinity and pH on the growth and reproduction of *Melosira* sp. were analyzed under the experimental conditions. The results indicated that the adaptive water temperature ranged from 5 ℃ to 30 ℃ with the optimal temperature at 25 ℃; the adaptive illumination intensity was 500—9 000 lx with optimal value at 3 000—7 000 lx; the range of adaptive salinity was 5—85 with the optimal salinity at 20; the range of adaptive pH was 4—10 with the optimal pH at 8.5.

Key words: *Melosira* sp. ; temperature; illumination intensity; salinity; pH