

• 技术与方法 •

一种简便、快速的大肠杆菌质粒转化方法^①

郭培懿, 陈向东, 谢志雄, 沈萍

(武汉大学生命科学院, 湖北 武汉 430072)

摘要: 将受体菌与质粒 DNA 混匀直接在 Ca^{2+} 离子选择平板上进行转化和筛选, 其转化过程仅需 2 min 左右, 并能得到 10^5 以上的转化效率, 可满足一般克隆工作的需要。

关键词: 转化; 大肠杆菌; Ca^{2+} 选择平板

中图分类号: Q933; Q93.039 **文献标识码:** B **文章编号:** 0253-9772(1999)04-0048-51

A Simple and Rapid Method for the Transformation of *Escherichia coli* by Plasmids

GUO Pei-yi, CHEN Xiang-dong, XIE Zhi-xiong, SHEN Ping

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: After mixing the recipient cells and plasmids DNA, directly spread the mixture on selective media containing Ca^{2+} . The whole process of transformation just needs 2 min or so, and could acquire the transformation efficiency of more than 10^5 , which is enough to common gene cloning.

Key words: Transformation; *Escherichia coli*; Ca^{2+} selective plate

转化是分子克隆中将外源 DNA 导入受体细胞的关键技术, 自 1970 年 Mandel 和 Higa 发现用 CaCl_2 处理的细菌细胞可被噬菌体 DNA 转染后^[1], 接着在 1972 年和 1973 年 Cohen 等人用同样的方法首次成功地将 R 因子和重组质粒 DNA 导入大肠杆菌细胞 (*Escherichia coli*)^[2,3], 而成为基因工程的创始人。此后在转化技术上虽有不断的改进, 但都旨在如何提高转化效率上^[4~6], 自 70 年代中期以来, 使“转化效率作为分子克隆中限制因素的时代已一去不复返了”^[7,8]。但就方法本身而言一直没有大的变化, 而是作为一种常规转化技术一直沿用至今^[8~10]。该转化技术主要由三部分组成^[8]: (1) 用 CaCl_2 诱导受体细胞使其成为“感受态”; (2) DNA 转化受体细胞; (3) 涂布平板筛选转化重组子。一般至少需要 2 h 完成。我们这里介绍一种十分简便迅速的质粒平板转化方法, 该方法删除了常规方法中十分费时、繁杂的 (1) 和 (2) 二部分的操作, 而是直接在 Ca^{2+} 选择平板上一次完成, 整个过程仅需 2 min 左右, 转化效率与常规方法相当, 足以满足一般克隆工作的需要。

1 材料和 方法

1.1 菌株

大肠杆菌 (*E. coli*) TG1、HB101、DH5 α , 本实验室保存。

1.2 质粒

①收稿日期: 1998-11-03; 修订日期: 1999-02-01

基金项目: 国家自然科学基金 (39670397) 资助项目。

作者简介: 郭培懿(1977. 1-), 女, 湖北武汉人, 1995 级本科生, 专业: 微生物遗传学。

pBR322 购自华美生物工程公司; 重组质粒 pJH 由本实验室构建⁽¹¹⁾; 枯草杆菌-大肠杆菌穿梭重组质粒 pBE2, 中科院微生物学研究所郭兴华先生馈赠⁽¹²⁾。

1.3 试剂、培养基及主要缓冲液

Bacto-Tryptone 及 Yeast extract 为英国 Oxoid 公司生产; 氨苄青霉素由华北制药厂生产; RNase, Protease K, BamHI, DNA Marker 等均购自华美生物工程公司; 其它化学试剂均为分析纯产品。

LB 培养基及用于质粒提取、检测的各种缓冲溶液均参照 Sambrook 等的方法配制⁽⁸⁾, 而用于平板转化的 Ca^{2+} 选择平板是在 LB 固体培养基加入单独灭菌的 CaCl_2 和氨苄青霉素 (终浓度分别为 100 mmol/L 和 100 mg/ml)。

1.4 实验方法

质粒的提取、纯化、酶切、琼脂糖凝胶电泳等均参照文献〔8〕。

传统的 CaCl_2 处理转化方法参见文献〔8〕略做修改: (1) CaCl_2 处理法制备感受态大肠杆菌: 挑取受体菌单菌落接种于 5ml LB 培养液, 37℃ 培养过夜, 以 1/100 量接种于 LB 培养基活化至 $\text{OD}_{600}=0.4\sim 0.6$ 。取菌液 1ml, 冰浴 10min, 4℃ 12 000 r/min 离心 20~30 s 收集菌体, 弃上清, 重悬于 1ml 经预冷的 100 mmol/L CaCl_2 中, 冰浴 20~40 min, 4℃ 12 000 r/min 离心 20~30 s 收集菌体, 弃上清, 重悬于 0.2ml 经预冷的 100 mmol/L CaCl_2 中, 冰浴 2~7 h; (2) 转化: 将 10 μl 质粒 DNA (1ng/ μl) 与 200 μl 感受态细胞溶液混匀, 经冰浴 20~40 min, 42℃ 水浴 3~4 min, 冰浴 1~2 min 处理后, 加等体积 2 倍 LB 培养液, 37℃ 水浴温育 1h; (3) 转化子的检测: 涂布 20 μl 转化混合物于加相关抗生素的 LB 选择平板, 37℃ 倒置培养约 20 h, 筛选转化子。

平板转化法: 挑取受体菌单菌落接种于 5ml LB 培养液, 37℃ 培养过夜, 以 1/100 量接种于 LB 培养基活化 2~3 h (OD_{600} 0.5~0.55), 取菌液 1ml, 12 000 r/min 离心 20~30 s 收集菌体, 重悬于 200 μl LB 培养液, 加入 10 μl 质粒 DNA (1ng/ μl), 混匀, 取 20 μl 转化混合物涂布于 4℃ 下预冷的含 Ca^{2+} 和相关抗生素的选择平板, 37℃ 倒置培养约 20 h, 筛选转化子。

2 结果与分析

2.1 平板法与传统的 CaCl_2 处理方法的转化效率

将质粒 pBR322 分别用二种方法转化经常用的三种大肠杆菌受体菌株 TG1, HB101 和 DH5 α , 结果 (表 1) 显示, 新方法所能达到的转化效率与传统方法相当, 可达 10^5 转化子/ μg DNA, 足以满足一般常规克隆的需要。为了进一步证实新方法的适用性, 我们又将不同的质粒分别转化同一受体菌。这些质粒包括松弛型质粒 pBR322, 带有古细菌启动子的重组质粒 pJH, 以及穿梭质粒 pBE2。表 2 显示用 TG1 为受体的转化效率比较, 其结果表明新方法对所用的三种质粒均显示出与传统方法相当的转化效率, 以其它菌株为受体也获得类似的结果, 说明该方法具有很好的适用性。表 1 及表 2 中的数据均为 3 次独立实验结果的平均值。

表 1 二种转化方法对不同受体菌株的转化效率比较

菌株	传统方法的转化效率 (平均转化子数/ μg DNA)	平板转化法的转化效率 (平均转化子数/ μg DNA)
TG1	5.1×10^5	1.84×10^5
HB101	4.3×10^5	2.1×10^5
DH5 α	1.8×10^5	0.89×10^5

表 2 二种转化方法对不同质粒 DNA 的转化效率比较

质粒	传统方法的转化效率 (平均转化子数/ μg DNA)	平板转化法的转化效率 (平均转化子数/ μg DNA)
pBR322	5.1×10^5	1.84×10^5
pJH	4.6×10^5	1.9×10^5
pBE2	0.94×10^5	1.0×10^5

2.2 转化子的检测

任意挑取 34 个用新方法转化所得到的转化子进行质粒检测, 均能检测到质粒, 而且酶切结果 (图 1) 也显示, 不同转化子所携带质粒的大小及酶切位点均完全与原转化质粒 DNA 相同, 说明所采用的平板转化方法具有与传统转化方法相同的质粒转化特点⁽¹³⁾。此外, 用从转化子中提取的质粒, 采用新方法重新转化受体菌, 仍可以获得相似的转化结果, 说明采用新方法对质粒的转化活性也无影响。

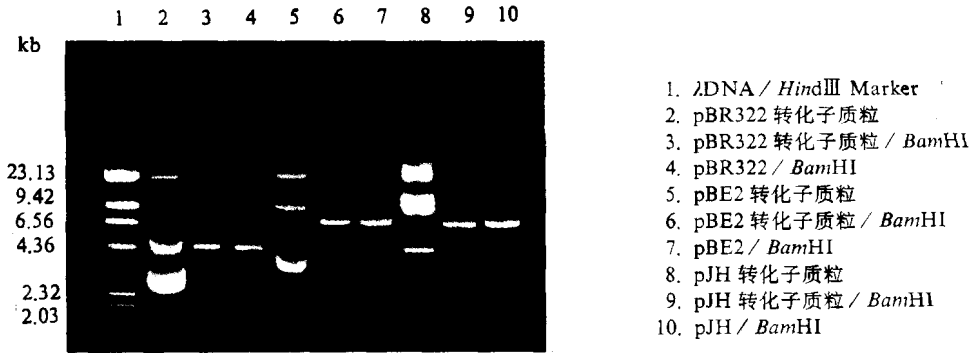


图 1 新方法转化子质粒及其酶切的凝胶电泳检测

2.3 Ca^{2+} 浓度对转化率的影响

Ca^{2+} 浓度是影响转化的重要因素⁽⁸⁾, 为了找到 Ca^{2+} 选择平板中最适的 Ca^{2+} 浓度, 我们以不同 Ca^{2+} 浓度的选择平板进行了 pBR322 转化大肠杆菌 TG1 的实验。结果 (图 2 和表 3) 表明, 平板转化和传统方法一样需要通过 Ca^{2+} 的处理促使细胞建立感受态才能进行有效的质粒 DNA 转化⁽⁸⁾, 并随着转化体系中 Ca^{2+} 浓度的增加, 转化效率逐渐升高, 在 Ca^{2+} 浓度达到 80~100 mmol/L 时, 可以获得最高的转化效率。而 Ca^{2+} 浓度进一步升高, 超过 120 mmol/L 后, 转化效率明显下降, 这可能与平板中的高离子浓度抑制了细胞的生长有关。

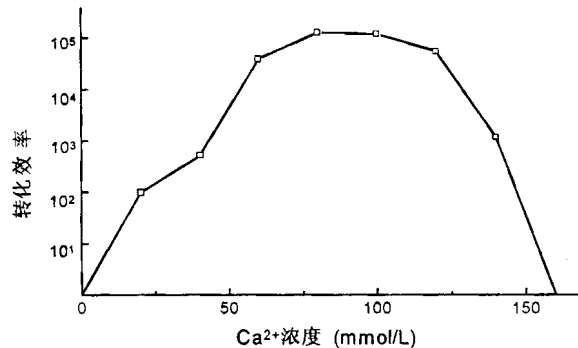


图 2 Ca^{2+} 浓度对转化效率的影响

表 3 Ca^{2+} 浓度对转化效率的影响

CaCl_2 (mmol/L)	0	20	40	60	80	100	120	140	160
转化效率(/ μg)	0	100	525	39 900	128 000	119 000	54 600	1 200	0

3 讨 论

(1) CaCl_2 处理对于诱导大肠杆菌受体细胞“感受态”的形成具有重要作用, 在传统的转化方法中, CaCl_2 处理及转化都是在液体条件下完成的⁽⁸⁾。而本实验的结果证明, 在一定的离子浓度范围内 CaCl_2 同样可以诱导涂布

到平板上的受体细胞建立感受态, 并进行质粒 DNA 的转化。采用这种平板转化方法所得到的转化子菌落较传统方法形成的转化子菌落略小, 说明培养基中的 CaCl_2 可能在一定程度上对细菌的生长有抑制作用。

(2) 在传统的转化方法中转化过程的变温处理被认为对转化率的提高具有重要意义⁽⁸⁾。我们在实验中也发现将受体菌和转化 DNA 混合后涂布到事先预冷的平板上比使用未经预冷的平板能得到更高的转化效率, 但两者间的差异不超过一个数量级 (分别为 1.8×10^5 和 3.0×10^4 转化子 / μg DNA), 该现象在 Baur 等最近的研究报道中也有反映⁽¹⁴⁾。

(3) 本文介绍的质粒转化大肠杆菌的新方法将受体细胞感受态的诱导建立、质粒 DNA 转化及转化子的筛选等步骤合并并在 Ca^{2+} 选择平板上一步完成, 与传统方法相比, 具有操作简便易行的优点, 整个转化过程仅需 2 min 左右, 无需其他特殊仪器及试剂, 且转化率与传统方法基本相当, 足以满足一般常规克隆的需要。同时, 用平板转化代替液体转化, 对进一步揭示大肠杆菌的 DNA 转化机理也有一定的方法学上的意义⁽¹⁴⁾。

参 考 文 献:

- (1) Mandel M, Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection[J]. *J. Mol. Biol.*, 1970, 53: 159~162.
- (2) Cohen S N, A C Y Chang, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1972, 69: 2110~2114.
- (3) Cohen S N, A C Y Chang, H W Boyer, et al. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1973, 70: 3240~3244.
- (4) Dagert M, Ehrlich S D. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells[J]. *Gene*, 1979, 6: 23~28.
- (5) Norgard M V, K Keam, Monahan J J. Factors affecting the transformation of *Escherichia coli* strain x1776 by pBR322 plasmid DNA[J]. *Gene*, 1978, 3: 279~292.
- (6) Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids[J]. *J. Mol. Biol.*, 1983, 166: 557~580.
- (7) Dower W J, Miller J F, Ragsdale C W. High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation[J]. *Nucleic Acids Res.*, 1988, 16: 6127~6145.
- (8) Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning—A laboratory manual* (second edition)[M]. Cold Spring, Harbour, New York 1989.
- (9) Gerhardt P, Murray R G E, Wood W A, et al. *Methods for general and molecular bacteriology*[M]. American Society for Microbiology, 1325 Massachusetts Ave., N. W. Washington, DC 20005, 1994.
- (10) Krajcikova D, Hartley R W, Sevcik J. Isolation and purification of two novel Streptomyces RNase inhibitors, Sa I 14 and Sa I 20, and cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for Sa I 14[J]. *J. Bacteriol.*, 1998, 180: 1582~1585.
- (11) 孙广秀, 江爱民, 沈 萍. 具有真细菌基因启动子活性的盐生盐杆菌质粒 DNA 片段[J]. *遗传学报*, 1997, 24: 380~384.
- (12) 郭兴华, 熊 占, 周 民, 等. 枯草杆菌-大肠杆菌多功能穿梭载体的构建[J]. *生物工程学报*, 1991, 7: 224~229.
- (13) Stewart G J. The Biology of Natural Transformation[J]. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1986, 40: 211~235.
- (14) Baur B, K Hanselmann, Schlimme W, et al. Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62: 3673~3678.

《中华微生物学和免疫学杂志》征订启事

《中华微生物学和免疫学杂志》为中华医学会主办, 1981 年创刊, 主要报道医学微生物学和免疫学方面的研究论文、简报、评论、综述、国内外学术动态、书评及消息等。辟有细菌学、病毒学、分子微生物学、临床微生物学、基础免疫学、临床免疫学、分子免疫学、免疫遗传学、肿瘤免疫学、中药与免疫、免疫学技术、检测技术等栏目。

本刊为双月刊, 大 16 开本, 每期 80 页, 每册定价 9.00 元, 国内外公开发行。邮发代号: 2-55, 国外刊号: BM 507。如错过邮局征订, 可直接向本编辑部汇款邮购: 100024 北京三间房南里 4 号: 《中华微生物学和免疫学杂志》编辑部收。