

# 大肠杆菌感受态细胞转化能力的影响因素

张岚岚 徐春燕 徐昌杰\*

(浙江大学园艺系, 农业部园艺植物生长发育与生物技术重点开放实验室, 杭州 310029)

**摘要** 探讨了大肠杆菌菌株、细菌生长状态、转化溶液、抗冻剂及保存时间、质粒长度和纯度对感受态细胞转化能力的影响。结果表明, 以 100 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  为缓冲液, 采用经活化培养的  $A_{600}$  为 0.55 的 TG1 制备的感受态细胞, 在冰上放置 6 h 后转化, 所得转化率最高, 可达  $2 \times 10^6 \sim 4 \times 10^7$  cfu/ $\mu\text{g}$  DNA(pUC19)。随着质粒长度增加和纯度降低, 转化率有所下降。若感受态细胞要保存备用, 以 15% 甘油为抗冻剂优于 7% DMSO, 但添加抗冻剂对转化率有抑制作用。贮于甘油的感受态细胞在  $-70^\circ\text{C}$  冻存两个月后仍有较理想的转化率。

**关键词** 大肠杆菌; 感受态细胞; 转化能力

感受态细胞的制备和转化是分子生物学实验室频繁使用的一项重要的常规操作, 可用于基因克隆以及文库构建等研究。通常文库构建需要相当高转化率的感受态细胞, 而基因克隆操作对感受态细胞的转化率要求相对较低。然而, 当用于转化的质粒 DNA(通常是连接产物)量比较少, 特别是同时质粒 DNA 长度较长以及连接产物中存在较高含量的杂质时, 还是对感受态细胞的转化率有比较高的要求, 应用感受态不佳的细胞通常导致没有转化菌斑的生长, 从而耽误实验进程。

制备感受态细胞最常用的方法是  $\text{CaCl}_2$  法, 最理想时转化率可达  $5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$  cfu/ $\mu\text{g}$  DNA<sup>[1]</sup>, 然而, 在实际操作中我们发现转化率常低于  $10^5$ , 甚至曾低达  $3 \times 10^4$ , 从而不能满足实验的要求。尽管  $\text{CaCl}_2$  法应用十分普遍, 但对影响感受态细胞转化能力的因素通常只有经验性的介绍, 缺乏系统比较研究和总结。也曾有不少研究<sup>[1-12]</sup>试图通过改变转化液等措施对感受态细胞制备方法进行改进, 虽然有的研究获得了相当高的转化率, 但实际应用并不普遍, 原因可能是方法不稳定, 重复性差。通过电击法<sup>[13]</sup>甚至可获得高达  $10^{10}$  的转化率, 但需要昂贵的设备, 且具有相当大的随机性; 试剂和 DNA 样品中的杂质对电击转化有严重影响<sup>[2]</sup>, 因而应用也不广泛。目前虽有不少公司提供高转化率的感受态细胞, 但由于价格昂贵, 所以也并不适合在普通基因克隆操作中频繁使用。

鉴于对大肠杆菌感受态细胞转化能力影响因素尚无系统报道, 本研究比较了不同菌株及其生长状态、不同转化液、不同质粒和不同放置时间等因素

对感受态细胞转化率的影响, 也对感受态细胞在不同的冻存条件下转化率的维持情况进行研究。旨在通过各方面因素的综合比较, 获得一个最佳应用方案。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株 *E. coli* TG1, *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* JM109 由本实验室保存。

1.1.2 质粒 DNA 纯 pUC19 质粒为 TaKaRa 公司产品。pUC19 质粒和 pBI121 质粒碱法<sup>[1]</sup>提取。

### 1.2 方法

1.2.1 感受态细胞制备与转化标准方案的步骤 ① 选用 TG1 菌株; ② 从 LB 平板上挑取新活化的单菌落,  $37^\circ\text{C}$  下振荡培养过夜。以 1:50 的比例接种到 LB 中培养 2~3 h 至  $A_{600}$  达 0.5 左右; ③ 取菌液 1.5 ml, 冰上放置 10 min, 于  $4^\circ\text{C}$  4000 r/min 离心 3 min, 加 1 ml 预冷的 100 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  重新悬浮细胞, 冰上放置 10 min, 于  $4^\circ\text{C}$  4000 r/min 离心 3 min; ④ 加 200  $\mu\text{l}$  预冷的 100 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  重新悬浮; ⑤ 冰上放置 6 h; ⑥ 加入 1 ng 纯 pUC19 质粒; ⑦ 冰上放置 30 min,  $42^\circ\text{C}$  水浴热激 90 s 迅速置于冰上冷却 2 min, 加 1 ml LB 液体培养基, 混匀后  $37^\circ\text{C}$

收稿日期: 2003-12-31 接受日期: 2004-02-18

国家自然科学基金(No.30100125)和浙江省自然科学基金(No.301291)资助项目

\* 通讯作者。Tel: 0571-85952426, Fax: 0571-86049815, E-mail: chjxu@zju.edu.cn.

水浴 1 h, 取 120  $\mu\text{l}$  涂布到含氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 37  $^{\circ}\text{C}$  倒置培养过夜。

**1.2.2 不同菌株的比较** 以 DH5 $\alpha$  和 JM109 代替标准方案步骤①中的 TG1 并与标准方案的结果作比较。

**1.2.3 TG1 不同浓度的比较** 在 TG1 过夜菌的稀释培养(标准方案中第②步)过程中, 在培养不同时间后取细菌测定  $A_{600}$  并用于感受态细胞制备和转化, 其余按标准方案操作。

**1.2.4 不同细菌培养方式的比较** 共比较了 3 种培养方式。(I)按标准方案第②步进行, 即甘油菌经 LB 平板培养, 然后挑取单菌落接种培养过夜, 最后稀释培养至  $A_{600}$  达 0.55 左右; (II)与标准方案相比, 略去了平板培养活化这一步骤, 甘油菌直接以 1:50 的比例接种到 LB 培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  下振荡培养过夜后, 再以 1:50 稀释接种到 LB 培养基中培养至  $A_{600}$  达 0.55 左右; (III)为 3 种培养方式中最简单的一种, 甘油菌直接以 1:50 的比例接种到 LB 培养基中培养至  $A_{600}$  达 0.55 左右。

**1.2.5 不同转化溶液的比较** 以 25 mmol/L、50 mmol/L、150 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ 、TB 缓冲液<sup>[2]</sup>、20 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  + 80 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  缓冲液<sup>[4]</sup>和 TFB 缓冲液<sup>[5]</sup>(不包括氯化六氨合高钴, 因为研究表明它会抑制转化<sup>[2]</sup>)代替标准方案步骤③和④中的 100 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  并与标准方案的结果作比较。

**1.2.6 不同放置时间的确立** 以 0、12 和 24 h 代替标准方案步骤⑤中的 6 h, 并与标准方案的结果作比较。

**1.2.7 不同纯度和不同长度质粒的比较** 以碱法<sup>[1]</sup>提取并经 SYBR Green 定量(按文献<sup>[14]</sup>进行, 用 SYBR Green 代替溴化乙锭)的 1 ng pUC19 和 1 ng pBI121 质粒样品代替标准方案步骤⑥中的 pUC19 质粒, 与标准方案的结果作比较。

**1.2.8 不同抗冻剂及其稳定性的比较** 先按标准方案步骤①至③进行, 然后用含 15% 甘油或 7% DMSO 的 100 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  代替标准方案步骤④的 100 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , 在 -70  $^{\circ}\text{C}$  冰冻 0(不经冰冻)、10、20、30、40、50 和 60 天, 取出后置冰上解冻, 然后按标准方案⑤至⑦进行。

以上实验均重复 3 次。

## 2 结果

### 2.1 TG1 是最适合的菌株

TG1、DH5 $\alpha$  和 JM109 是分子生物学实验室最常用于质粒转化的 3 种大肠杆菌菌株, 其中以 TG1 繁殖速度最快, JM109 次之, DH5 $\alpha$  最慢。通过

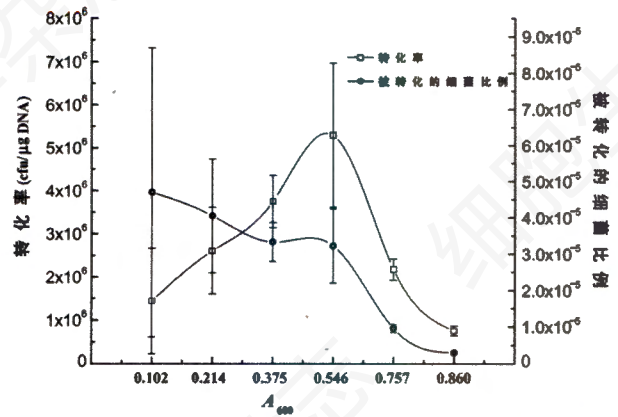


图1 TG1 生长浓度对转化率和被转化细菌比例的影响

监测培养过程中  $A_{600}$  变化, 我们获得了浓度相对比较一致的 3 种菌株菌液 ( $A_{600}$  均在 0.2~0.4) 用于感受态细胞制备及转化。为了消除细菌浓度不同对转化率带来的影响, 本研究采用被转化的细菌比例这个指标, 即被转化的细菌占细菌总数的比例。研究结果表明, 在所试验的 3 种菌株中, TG1 用于感受态细胞制备和转化最理想, 被转化的细菌比例高达  $(6.41 \pm 8.8) \times 10^{-5}$ , 分别为 DH5 $\alpha$  和 JM109 的 5.6 和 70.0 倍。由图 1 所知,  $A_{600}$  处于 0.2~0.4 之间时, 细菌浓度差异对被转化的细菌比例影响较小 (<20%), 因此被转化的细菌比例能较准确地反映 3 种菌株间的差异, 因此, TG1 最适合制备感受态细胞。

### 2.2 $A_{600}$ 达 0.55 左右的细菌最适合

细菌生长状态影响细胞感受态, 研究表明, 对于转化率而言, 生长不足和生长过度的细菌均只能获得较低的转化率, 尤其是生长过度的细菌转化率很低, 当  $A_{600}$  达 0.55 左右时达到了最高的转化率(图 1)。转化率既受细胞感受态能力的影响也受细胞数量的影响, 因此, 被转化的细菌比例这个指标可更为客观地反映细胞的感受态能力。由图 1 可知, 随着细菌培养时间的延长, 细菌的感受态能力下降, 尤其当  $A_{600} > 0.55$  时下降更为明显。当  $A_{600} < 0.55$  时, 虽然感受态能力有所下降, 但由于细胞总数的上升, 转化率仍呈上升趋势, 而当  $A_{600} > 0.55$  时, 由于感受态能力下降迅速, 细胞总数上升并未对细胞感受态能力下降起到有效的补偿作用。因此, 制备 TG1 感受态细胞, 以  $A_{600}$  达到 0.55 左右为宜。

### 2.3 不同培养方式对转化的影响

一般来说, 细菌经平板生长和稀释培养后可得到活化, 但活化对转化率的影响程度未见报道。因此, 我们比较了 3 种细菌培养方式对被转化细菌比例的影响。因通过不同培养方法得到的细菌初始浓度虽然接近, 但并不完全相同, 故以被转化的细菌

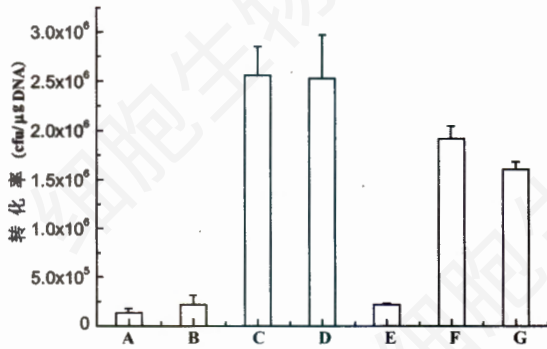


图2 不同转化溶液的转化率比较

A: 25 mmol/L CaCl<sub>2</sub>; B: 50 mmol/L CaCl<sub>2</sub>; C: 100 mmol/L CaCl<sub>2</sub>; D: 150 mmol/L CaCl<sub>2</sub>; E: 200 mmol/L CaCl<sub>2</sub>+80 mmol/L MgCl<sub>2</sub>; F: TB 缓冲液; G: TFB 缓冲液。

比例而不是转化率作为比较指标。结果表明,以标准方案中的培养方法,即平板活化-过夜培养-稀释培养至 A<sub>600</sub> 达 0.55 左右的细菌最佳,被转化的细菌比例达 1.49×10<sup>-5</sup>,若去掉平板活化这一步骤,被转化的细菌比例下降 20.8%,若同时去掉平板活化和过夜培养两个步骤,也就是取甘油菌直接培养,被转化的细菌比例下降 52.0%。

#### 2.4 不同转化溶液的比较

CaCl<sub>2</sub> 是最常用于感受态细胞制备和转化的转化溶液,其浓度影响转化率。研究表明,25~150 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 均适于感受态细胞制备,其中以 100 mmol/L 最佳,采用 150 mmol/L 时转化率轻微下降,而采用 25 mmol/L 和 50 mmol/L 时下降明显(图 2)。采用 TB、TFB 及 20 mmol/L CaCl<sub>2</sub>+80 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 作为转化溶液也未能获得优于 100 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 的效果(图 2)。

#### 2.5 最佳放置时间的确定

感受态细胞制备后通常并不立即用于转化,为了确定最佳放置时间,我们比较了放置不同时间对转化率的影响,结果表明,放置 6 h 取得了最高的转化率,为对照的 4.0 倍,继续放置至 12 h 和 24 h 时转化率又有所下降,但均高于初始值,分别为刚制备时转化率的 3.1 和 3.2 倍。

#### 2.6 质粒纯度和长度对转化率的影响

通过碱法制备的质粒通常在实验室中用于酶切,然后作为载体进行连接,因而连接产物中不可避免地带有质粒样品中所包含的杂质,为了解这些杂质对转化的影响,我们比较了纯 pUC19 质粒与碱法提取的 pUC19 质粒在转化率上的差异,结果表明,前者比后者转化率高出 1.7 倍,表明杂质对转化造成了较严重的影响。

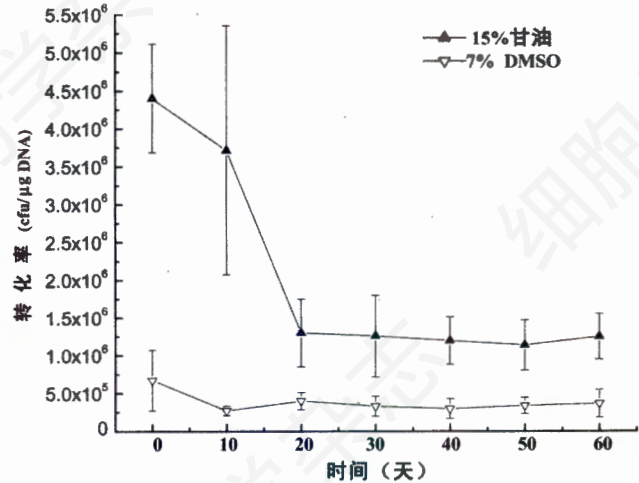


图3 抗冻剂(甘油和DMSO)以及冻存时间对转化率的影响

质粒长度对转化也有影响,随长度增长,转化率将有所下降,但下降的程度未见报道。我们比较了碱法提取的 pUC19 质粒(2686 bp)与 pBI121 质粒(14758 bp)的转化率差异,结果表明, pBI121 的转化率仅为 pUC19 的 24.0%。

#### 2.7 不同冻存条件对转化率的影响

为了使制备的感受态细胞能长期贮存备用,通常在 CaCl<sub>2</sub> 中添加甘油至 15% 或 DMSO 至 7%,本研究比较了这两种抗冻剂的抗冻效果。结果表明,两者均可作为抗冻剂,但就贮存后细胞的转化率而言,甘油明显优于 DMSO(图 3)。

以甘油作为抗冻剂并贮于 -70 °C 时,在前 20 天细胞感受态能力迅速下降,下降幅度达 70.0%,然后趋于稳定;以 DMSO 为抗冻剂时,在冻存前 10 天感受态能力下降 58.8%。在冻存 2 个月后,感受态细胞仍维持较理想的转化率(图 3)。

对于立即使用的感受态细胞,试验表明不加任何抗冻剂的效果更佳,添加甘油至 15% 可使转化率下降 50.2%,而添加 DMSO 至 7% 使转化率下降 92.3%,说明抗冻剂对感受态细胞的转化有抑制作用,尤以 DMSO 的影响更大。

### 3 讨论

细菌转化率决定于细菌被质粒转化的能力以及细菌的数量,随着细菌生长,单位体积内的细菌数目增加,但细菌被质粒转化的能力有所下降,尤其当生长过度后下降更为明显。因此,合适的生长浓度应该能保证上述两方面的综合效应处于理想范围,对于 TG1,最高转化率在 A<sub>600</sub> 为 0.55 时达到最高。多数大肠杆菌菌株最适于制备感受态细胞时 A<sub>600</sub> 在 0.3~0.4 之间<sup>[1,4,10]</sup>,但 JM107 为 0.55<sup>[9]</sup>,XL1-

Blue 为 0.8<sup>[10]</sup>。

感受态制备和转化时采用的转化液组成是众多研究中探讨最多的, 研究表明, CaCl<sub>2</sub> 的使用浓度以 100 mmol/L 为最佳, 这与肖庚富等<sup>[7]</sup>研究结果相一致。曾有报道以 TFB 溶液<sup>[5]</sup>和 TB 溶液<sup>[2]</sup>为转化液并与复杂的制备方法<sup>[5]</sup>或低温培养<sup>[2]</sup>相结合, 获得了高达 10<sup>8</sup> 的转化率, 但是复杂的操作以及低温培养时较慢的细菌生长速度往往不利实验操作。在本研究中, 这两种转化液的表现反而不及 100 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 表明原始文献的成功与转化液的改进关系较小, 而主要归功于操作方法的改进。

感受态细胞制备后在冰上放置一段时间后再进行转化可提高转化率, 研究表明, 以放置 6 h 最佳, 在 24 h 内均比刚制备时高出 2 倍。这一结果与 Dagert 等<sup>[15]</sup>的结果相似, 他们发现感受态细胞制备后放置 12~24 h 可提高转化率 4~6 倍, 而在 48 h 时恢复到初始水平。

出于冻存的需要, 可以在感受态细胞中添加甘油或 DMSO, 并以 15% 甘油为佳。研究表明, 如果立即使用, 以不添加抗冻剂为佳, 因为甘油和 DMSO 对转化产生抑制作用, 尤以 DMSO 更加明显。以 DMSO 为抗冻剂在 -70 °C 进行保存时, 万波等<sup>[9]</sup>研究表明在两个月内转化率没有明显下降, 而

在本研究中, 我们观察到转化率约下降 60%。另外, 我们研究表明, -20 °C 不适于感受态细胞的长期保存, 保存 2 周后转化率即下降 10 倍左右。

在综合考虑影响感受态细胞转化率的各种因素的基础上, 本文提出了制备感受态细胞的标准方案, 采用此方案, 我们获得了转化率为 2×10<sup>6</sup>~4×10<sup>7</sup> cfu/μg DNA 的感受态细胞, 可完全满足常规分子克隆操作对感受态细胞的要求。

### 参考文献 (References)

- [1] Sambrook J 等. 分子克隆实验指南(第二版), 北京: 科学出版社, 1995, 49
- [2] Inoue H *et al.* *Gene*, 1990, **96**: 23
- [3] Akhtar MK *et al.* *Anal Biochem*, 2000, **277**: 273
- [4] Sambrook J 等. 分子克隆实验指南(第三版), 北京: 科学出版社, 2002, 87
- [5] Hanahan D. *J Mol Biol*, 1983, **166**: 557
- [6] Nishimura A *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1990, **18**: 6169
- [7] 肖庚富等. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **27**: 96
- [8] 胡拥军等. *细胞生物学杂志*, 1994, **16**(2): 92
- [9] 万波等. *微生物学通报*, 1997, **24**: 234
- [10] 李路怡等. *生命科学研究*, 1998, **2**: 194
- [11] 王园园等. *军事医学科学院院刊*, 1991, **15**: 152
- [12] 柯涛等. *河南农业大学学报*, 2003, **37**: 57
- [13] Tung WL *et al.* *Trends Genet*, 1995, **11**: 128
- [14] 彭秀玲等. *基因工程实验技术(第二版)*, 长沙: 湖南科学技术出版社, 1997, 40
- [15] Dagert M *et al.* *Gene*, 1979, **6**: 23

## Factors Affecting Transformation Ability of Competent *Escherichia coli* Cells

Lan-Lan Zhang, Chun-Yan Xu, Chang-Jie Xu\*

(Department of Horticulture; The State Agriculture Ministry Laboratory of Horticultural Plant Growth, Development & Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract** A number of factors including strains, bacterium activation, growth status, transformation solutions, plasmid length and purity, freezing stabilizers and storage duration were evaluated for their effects on transformation ability of competent *Escherichia coli* cells. The results suggested that the highest transformation ability can be obtained when activated TG1 was cultured to an A<sub>600</sub> of 0.55, prepared with 100 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, and kept on ice for 6 h before transformation. When pUC19 was applied, the transformation efficiency for optimized protocol was found to be as high as between 2×10<sup>6</sup>~4×10<sup>7</sup> cfu/μg DNA. The efficiency decreased when a plasmid with increased length or a plasmid sample with impurities was applied. As a stabilizer for frozen competent cells, 15% glycerol was found to be better than 7% DMSO, however, both of them inhibited transformation. Competent cells stored in glycerol retained desirable transformation efficiency for 2 months at -70 °C.

**Key words** *Escherichia coli*; competent cells; transformation ability

Received: December 31, 2003 Accepted: February 18, 2004

The work was supported by the National Natural Science Foundations of China (No.30100125) and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.301291)

\*Corresponding author. Tel: 86-571-85952426, Fax: 86-571-86049815, E-mail: chjxu@zju.edu.cn