

经验交流

高效感受态菌制备方法比较探索

胡拥军 徐 钰 王 珮

(中国科学院上海细胞生物学研究所分子肿瘤学研究室 200031)

目前感受态菌的制备方法有许多种,但对于不同的菌株,各种方法效果相差很大。本实验室参照有关文献^[4],比较了FTB法和Ca⁺⁺-Mn⁺⁺法制备感受态菌的效果,得到了一些重复性较好的实验数据。现比较两种方法,介绍如下:

FTB溶液、2×L⁻培养液、SOB溶液、SOC溶液分别参照文献[2]、[4]、[3]配制。Ca⁺⁺-Mn⁺⁺溶液则分别配制成300 mmol/L CaCl₂、210 mmol/L MnCl₂、120 mmol/L NaOAc(pH5.5),过滤灭菌,临用时按等比例混合。菌株选用DH 5 α(BRL)、Sure (Stratagene)和HB 101。

从-30℃冰箱中取出大肠杆菌划线,过夜培养。挑取5—10个克隆接种在含200毫升SOB(FTB法)或2×L⁻培养液(Ca⁺⁺-Mn⁺⁺法)的1升三角培养瓶中,视方法需要加入1/200体积的2 mol/L葡萄糖或/和1/100体积的2 mol/L MgCl₂,于30℃摇床中培养。到一定OD₆₀₀值时,取出培养液,立即置于冰浴中,15分钟后在4℃,4500转/分离心10分钟;尽可能地洗净上清,加入100毫升的FTB溶液或Ca⁺⁺-Mn⁺⁺溶液,在冰水上轻轻打散菌块,冰浴10分钟,在4℃,4000转/分离心10分钟,尽可能洗净上清,加入含20%甘油的FTB溶液或15%甘油的Ca⁺⁺-Mn⁺⁺溶液,轻轻打散菌块,分装,冻存于液氮,

用标准质粒DNA pSPT 18来检测转化效率。在三个含刚刚化冻的100微升的感受态菌的Falcon-2059试管中分别加入1微升的三种不同稀释度质粒DNA,冰浴30分钟后,在43℃水浴中热休克90秒,立即置于冰浴中1—

2分钟,再加入900微升SOC培养液在37℃摇床中培养45分钟,涂氨苄青霉素/LB平板,过夜培养计数。结果如下:

表 不同方法获取感受态菌转化效率比较
*(单位:克隆数/微克DNA)

菌 株	DH 5 α	HB 101	Sure
最佳 OD ₆₀₀ 值	0.25	0.35	0.33
FTB 法	6—8 × 10 ⁷	2—3 × 10 ⁷	3—4 × 10 ⁶
Ca ⁺⁺ -Mn ⁺⁺ 法	3—7 × 10 ⁶	2—3 × 10 ⁶	1—2 × 10 ⁶

* 处理方法相同

我们注意到,对于不同的菌株,Ca⁺⁺-Mn⁺⁺溶液法总要比FTB溶液法所制备的感受态菌转化效率高出5—50倍,临用时混合的Ca⁺⁺-Mn⁺⁺离子溶液要比保存了一段时间的Ca⁺⁺-Mn⁺⁺混合溶液,其效率要高出5—10倍;同时,与CaCl₂法^[1]进行比较,其效率与Ca⁺⁺-Mn⁺⁺溶液法相差10²左右,说明溶液的离子种类、性质对感受态菌的效率有较大影响。同样重要的是,如果OD₆₀₀与最佳OD₆₀₀值相差0.02—0.03以上,其转化效率可降低10倍或更多;对于DH 5 α来说,在Ca⁺⁺-Mn⁺⁺溶液中处理1小时要比处理15分钟效率低5—10倍,用FTB法亦如此。另外,整个制备过程中,所用的玻璃器皿和溶液保持冰冷状态亦很重要,对感受态菌的转化效率有较大的影响。我们用自制的cDNA与质粒pBlue-scriptKS(+)连接,其转化效率可达到10⁷以上。由此可见,应用Ca⁺⁺-Mn⁺⁺溶液法制备感

(下转封三)

10. Tn 10 的末端倒转重复有_____bp长,但只有最靠外侧的_____bp为转座作用所必须。
11. λ DNA 的整合是一种_____重复过程,此过程为 λ 噬菌体_____酶所催化。
12. 真核生物的_____,_____,_____三种 rRNA 组成一个转录元,转录元产生_____的前体 RNA 分子。
13. Jacob 和 Monod 根据对_____的研究,于 1961 年提出了操纵元模型,其要点是_____。
14. 在原核生物的基因表达调控过程中,因为没有核膜,_____和_____是耦联的,这是原核生物中_____的基础。
15. 逆转录酶是一种非常复杂的酶,在其简单的一条肽链上有多酶活性,其主要酶活性是_____,_____,_____和_____等。

五、问答题(共 25 分)

1. 简述遗传物质在原核生物和真核生物的细胞内分布和结构的异同。(7 分)
2. 细胞内翻译后的蛋白质的共价键修饰主要包括哪些方面?(6 分)
3. 简述非病毒返座元的最大特点。(6 分)
4. 简述 DNA 的滚环式复制并作出一一般性模式图。(6 分)

《免疫学》

一、名词解释(每题 4 分,共 40 分)

1. 独特型(Idiotype)
2. 主要组织相容性复合物(Major histocompatibility complex)
3. 补体固定(Complement fixation)
4. 催化抗体(Catalytic antibody)
5. 滤泡树突细胞(Follicular dendritic cells)
6. FC 受体(Fc receptor)
7. 免疫耐受(Immunological tolerance)
8. 天然免疫(Innate immunity)
9. GVH 反应(GVH reaction)
10. CD 3

二、回答问题(每题 12 分,共 60 分)

1. 试述抗体应答产生的细胞学过程
2. 试比较产生 T.B. 淋巴细胞抗原受体多样性机理的异同点
3. 简述器官移植中会遇到的免疫学问题及对策
4. 列举和简介你所知道的在免疫应答起作用的细胞因子、淋巴因子或白细胞介素
5. 试述速发型过敏应答的机理并举例说明

(上接 92 页)

受态菌,其转化效率完全可以稳定在 10^8 以上,能满足基因库的构建、分子亚克隆等分子生物学的要求。

参 考 文 献

[1] Sambrook. J. E. et al., 1989, In "Mole-

- cular Cloning" pp 1.82, ColdSpring Harbor Laboratory Press.
- [2] Okayama. H. et al., 1987, In "Methods In Enzymology". 154:23.
- [3] Sambrook. J. E. et al., 1989, In "Molecular Cloning" Appendix A. 2, ColdSpring Harbor Laboratory Press.
- [4] Danny C. A., 1987, In "Methods In Enzymology". 154:41.