

大肠杆菌最佳感受态细胞制备的探讨*

李路怡 易建华 李敏

(湖南师范大学生物学系, 中国长沙, 410081)

摘要 本文对4种大肠杆菌菌株在不同生长时期的转化效率分别进行了测定. 结果表明, 在细菌的生长繁殖过程中, 其转化效率是有很大变化的. 对于不同的菌株, 它们获得高转化率时的活菌数不同. 同时, 得到了这4种大肠杆菌菌株制备最佳感受态细胞的条件.

关键词 大肠杆菌, 感受态细胞, 转化率

分类号 Q785

Study on Optinization of Preparation of Competent Cells from *Escherichia coli*

LI Luyi YI Jianhua LI Min

(Department of Biology, Hunan Normal University, Changsha, 410081, PRC)

Abstract The efficiency of transformation of the competent cells, which were prepared from four strains of *Escherichia coli*, was determined respectively. The results showed that the efficiency of transformation could be altered in the process of growth and reproduction of bacteria. As to the higher efficiency of transformation, there were obvious differences in the virable bacterial density for different strains. And we set up the optimum condition for preparing the competent cells of the four strains.

Key words *Escherichia coli*, competent cell, efficiency of transformation

外源DNA 导入适宜受体细胞主要有化学法、电穿孔法等^[1,2], 化学法中低温和 Ca^{++} 的作用主要是破坏细胞膜上的脂质阵列^[3], Ca^{++} 还能与膜上多聚羟基丁酸化合物、多聚无机磷酸形成复合物以利于外源DNA 的渗入^[4], 42 热休克能促使细胞吸收外源DNA. 在此基础上进行了方法改进如联合其它二价金属离子、DMSO 或还原剂等以提高转化率^[5], 但由于转化是一个很复杂的过程, 具体的作用机理仍在探究中. 对细菌而言, 普遍认为要提高转化率, 大肠杆菌(*E. coli*)的细胞密度不应超过 1×10^8 细胞/ml ($OD_{600nm} = 0.3 \sim 0.4$). 为此,

我们选择了4种不同的 *E. coli* 菌株, 以超螺旋 pBR322质粒 DNA 进行转化, 对其不同生长时期的转化率进行了测定, 观察到不同的菌株对最适感受态细胞的制备要求各有差别。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

E. coli 菌株 JM 109, DH 5 α , HB 101, XL 1-Blue 由本实验室保存; pBR322购自华美生物工程公司, 其余试剂为国产分析纯。LB 培养基, 1.5% 琼脂, 抗生素溶液, 0.1 mol/L CaCl₂溶液, 均按《分子克隆实验指南》^[6]的要求配制。

1.2 实验方法

1.2.1 大肠杆菌生长情况的测定

从平板上挑取单个菌落到含5 ml LB 培养基的锥形瓶中, 37 ℃ 下250 r/min 培养过夜。取0.1 ml 培养物到含5 ml LB 培养基的锥形瓶中, 继续振荡培养。从0时起每隔0.5~1 h, 测定菌液的 OD_{600nm}。绘制生长曲线, 选取几个不同时相的菌液倍比稀释从10⁻¹~10⁻⁶, 各取0.1 ml 稀释液到培养皿中, 倒入20 ml 融化后冷却至50 ℃ 左右的 LB 固体培养基, 冷却, 37 ℃ 倒置培养12~16 h, 每个稀释度铺2~3个平板。计数, 作 OD_{600nm}-活菌细胞浓度图。

1.2.2 大肠杆菌感受态细胞制备及转化

主要参照 Davis^[4]方法。37 ℃, 250 r/min 培养过夜的大肠杆菌培养物, 按1:100接种于30 ml LB 培养基共10瓶中, 继续振荡扩大培养。根据生长曲线, 每隔一定时间取一瓶菌液, 测定 OD_{600nm}后转入50 ml 无菌离心管, 冰浴中冷却10 min, 4 ℃, 5 000 r/min 离心10 min, 弃上清, 用1/2体积的预冷0.1 mol/L CaCl₂溶液悬浮细胞。冰浴中放置30 min, 4 ℃, 5 000 r/min 离心10 min。根据 OD_{600nm}-活菌细胞浓度图, 加入一定体积的0.1 mol/L CaCl₂溶液, 调整细胞浓度为2.5 × 10⁹细胞/ml。取200 μl 感受态细胞, 加入0.1 μgpBR322 DNA。冰浴30 min 后42 ℃ 热休克60~90 s, 冰浴中迅速冷却2~3 min。加入1 ml LB 培养基, 37 ℃ 低速振荡培养1 h, 取两个不同体积的转化混合物, 分别倒入含氨苄青霉素(50 μg/ml) 和四环素(12.5 μg/ml) 的融化后冷却至50 ℃ 左右的 LB 固体培养基约20 ml, 冷却, 37 ℃ 倒置培养14~18 h。计数, 并以未加 pBR 322 DNA 的转化液作对照。

2 结果

2.1 不同 *E. coli* 菌株的生长曲线

从0~10 h, 测定细菌不同生长时期的 OD_{600nm} 共13组数据, 绘生长曲线如图1所示。

2.2 不同 *E. coli* 菌株的 OD_{600nm}-活菌细胞浓度图

取10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ 稀释度的菌液分别铺板计数后, 选取一组数据绘图。细菌细胞浓度与菌液光密度值成正比, 数据经线性化处理, 结果如图2所示。

2.3 不同生长时期在 *E. coli* 菌株转化率的测定

细菌在不同生长时期的活细胞浓度不同(图2)。要进行不同生长时期转化率的比较, 必须调整细胞密度至相同情况。据文献报道^[7], 为得到有效转化, 活细胞应 < 1 × 10⁸ 细胞/ml。

根据 CaCl₂ 法, 第二次 CaCl₂ 处理时, 加入量为原菌液的 1/25 体积即浓缩 25 倍至 2.5 × 10⁸ 细胞/ml。http://

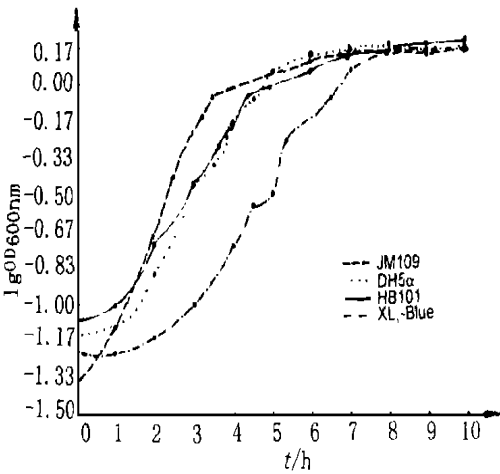


图1 4种菌株的生长曲线图

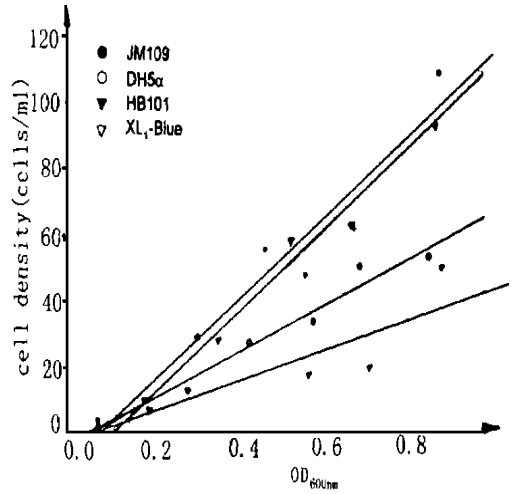


图2 4种菌株的 OD_{600nm}-活细胞浓度图

Fig. 1 The growth curves of the four strains Fig. 2 The density of live cells-OD_{600nm} of the four strains

细胞/ml. 这样得出在 OD_{600nm} 值对应细胞浓度后, 以此为标准, 加入不同体积 0.1 mol/L CaCl₂ 溶液至 2.5×10^9 细胞/ml. 转化菌平板培养后计数并求出转化率(菌落数/ μ gDNA). 结果如图3所示.

3 分析与讨论

1) 细菌群体生长包括4个阶段: 停滞期(lag phase)对数生长期(log phase), 平衡期(stationary phase)和衰亡期(death phase). 图1显示, 4种大肠杆菌菌株生长趋势基本一致, 其不同之处在于其停滞期和对数生长期的长短差异. JM 109, DH5 α , HB101的生长曲线基本相似, XL₁-Blue 的停滞期则明显长于其他菌株. 据文献报道^[6], rec⁻ 菌株一般较为羸弱, 其生长通常慢于 rec⁺ 菌株, 本实验采用的4个 *E. coli* 菌株中, JM 109, XL₁-Blue 为 rec⁻ 菌株, DH5 α , HB101为 rec⁺ 菌株, 从各菌株的生长情况看, 重组缺陷基因型对细菌的生长速度并没有多大影响.

2) 从图2可看出, 不同菌株间 OD_{600nm} 值与活菌细胞浓度的关系变化很大. 通过计算可得出当细胞浓度达到 1×10^8 细胞/ml 时, 各菌株的 OD_{600nm} 及 lg OD_{600nm} 值(表1). 此时, 各菌株均已进入对数生长期, 但各 OD_{600nm} 值不同, 这可能与菌株、菌体大小等差异有关.

表1 4种菌株活菌细胞浓度为 1×10^8 细胞/ml 时的 OD_{600nm} 及 lg OD_{600nm} 值

Table 1 The OD_{600nm} and lg OD_{600nm} of the four strains when the live cell density is 1×10^8 cells/ml

菌株(bacteria strains)	JM 109	DH5 α	HB101	XL ₁ -Blue
OD _{600nm}	0.12	0.18	0.19	0.33
lg OD _{600nm}	- 0.92	- 0.74	- 0.72	- 0.48

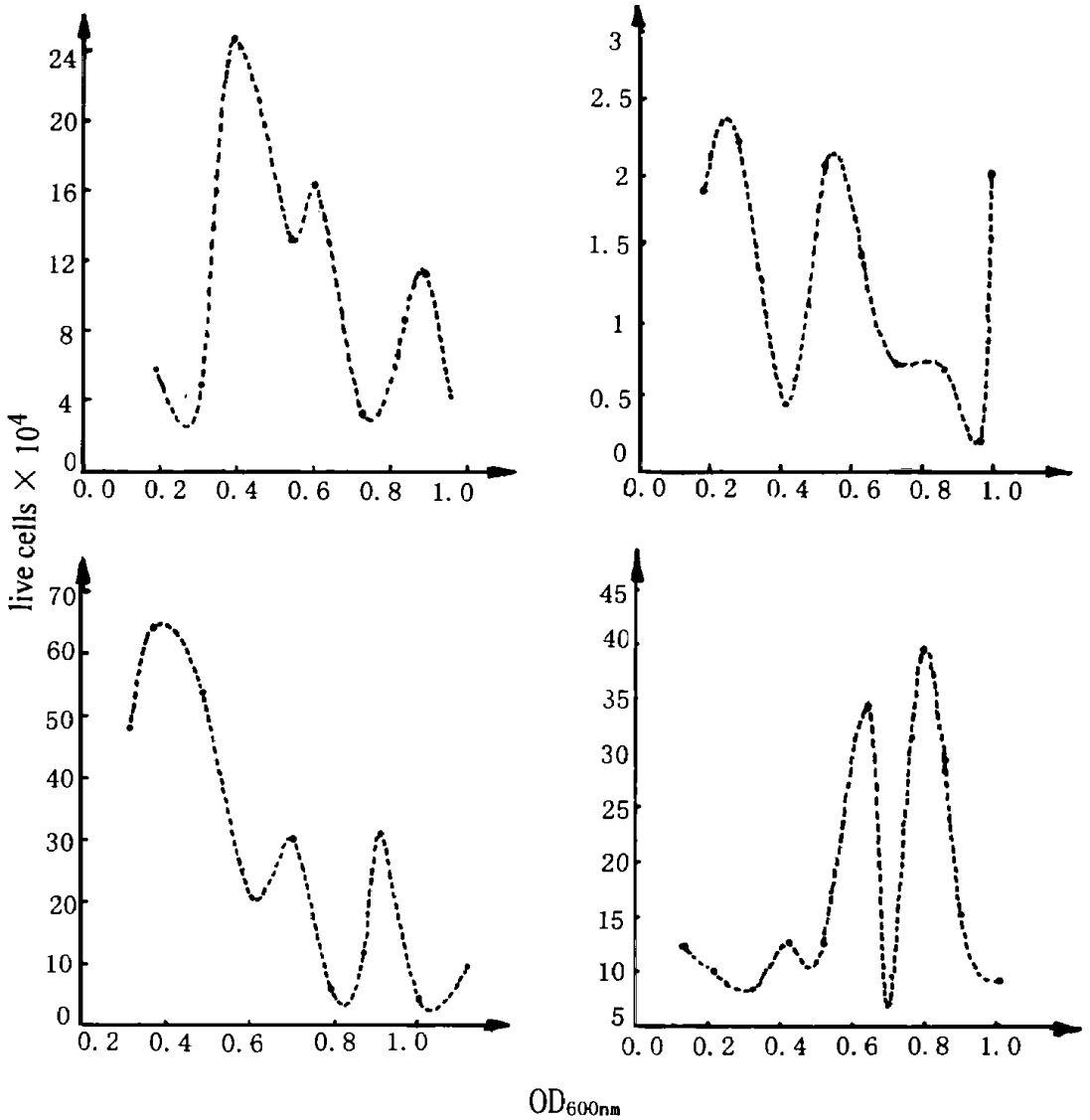


图3 4种菌株不同生长时期的转化率图

Fig. 3 The efficiency of transformation in different growth time of the four strains

3) 通过对 *E. coli*, JM109, DH5α, HB101 等菌株在不同生长时期转化率的测定, 发现各菌株的高转化率虽出现在对数生长期, 但有几个不同的峰期(图3). 它们的转化率最高峰期即最佳感受态细胞制备期均出现在 $OD_{600nm} = 0.30 \sim 0.40$ 之间的第一峰. 对于 JM109, 有文献报道在 $OD_{600nm} = 0.80 \sim 0.89$ 间是其转化高效期^[8]. 从图3看出, JM109 共有3个转化率峰期, 其中 OD_{600nm} 在 0.90 左右时确有个相对峰期, 但远不如在 0.40 时的转化率高; HB101 在 $OD_{600nm} = 0.40$ 时转化率最高; DH5α 则在 OD_{600nm} 为 0.30 左右为最宜. 而 XL1-Blue 的转化高峰期在 OD_{600nm} 为 0.65 和 0.80 左右, 尤以 OD_{600nm} 为 0.80 左右时转化率最高, 这已经进入对数生长的后期(图1), 与另3种菌株不相同. 同时以图1为参照, 发现各菌株的生长速度快, 则转化高峰期出现早, 说明细菌转化高峰期的出现与生长速度有关(图1).

根据图2, 可以得出各 *E. coli* 菌株在转化最高峰时的活菌细胞浓度(表2):

表2 4种菌株转化率最高峰期的活细胞浓度比较

Table 2 The live cell density of the four strains at the highest efficiency of transformation

菌 株 bacteria strains	JM 109	DH5 α	HB101	XL ₁ - Blue
转化最高峰期(OD _{600nm}) phase of highest transformation efficiency	0.4	0.3	0.4	0.8
细胞浓度(细胞/ml) cell density (cells/ml)	4 \times 10 ⁸	1.7 \times 10 ⁸	3.4 \times 10 ⁸	2.8 \times 10 ⁸

由此说明, 细菌的最佳感受态细胞制备期对于不同菌株是不同的, 并不一定都是在活菌细胞浓度为 1×10^8 细胞/ml (OD_{600nm} = (0.30 ~ 0.40) 的时候最适宜。

参 考 文 献

- 1 Manda M et al. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*, 1970, 53: 159 ~ 163
- 2 Cohen S N et al. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, 69: 2110 ~ 2118
- 3 Castuma S E et al. Inorganic polyphosphates in the acquisition of competence in *Escherichia coli*. *J B C*, 1995, 270(22): 19280 ~ 19283
- 4 Reusch R N et al. Putative structure and function of a poly-beta-hydroxybutyrate/calcium polyphosphate channel in bacteria plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 4176 ~ 4180
- 5 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1995
- 6 J. 萨姆布鲁克等著, 金冬雁等编译. 分子克隆操作指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1993
- 7 Davis L G et al. *Methods in Molecular Biology*. New York: Elsevier, 1986
- 8 Perron C Y et al. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13 mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 1985, 33: 103 ~ 109