维普资讯 http://www.cqvip.com

酿酒酵母细胞 转化方法 转化效率

第29卷第4期 上海师范大学学报(自然科学版) Vol. 29, No. 4
2000年12月 J. of Shanghai Teachers Univ. (Natural Sciences) Dec. 2000

97-98 (18)

酿酒酵母细胞四种转化方法的比较

TS261.11
Q785

宋 磊，娄玉霞，李新国

(上海师范大学 生物与化学工程学院，上海奉贤 201418)

1978年，Hinnen 等和 Begges 首先报道了酵母原生质体转化方法[1,2]. 该方法的优点是转化效率较高，但此方法容易形成多倍体细胞，且细胞再生困难. 后有人在此基础上进行改进[3]，虽提高了转化效率，减少了多倍体细胞的形成，但菌落再生时间较长(4～6 d). Ito 等提出了不完全破坏细胞膜的完整酵母细胞的转化方法，并对多种金属离子对转化效率的影响进行研究[4]. 进入90年代后，人们在 LiAc 的加入量、热冲击时间、PEG4000的浓度等方面进行了改进[5～7]、本文选取了四种不同的转化方法进行比较，以期找到最佳的转化方法.

1 材料、方法及实验结果

本次选用的质粒是 pYES2-hIL-6(实验室构建)，其宿主菌为酿酒酵母(*S. cerevisiae*) DBY747 MATa his3, leu2-3, leu2-113, trp1-289, ura3-52、由日本九州大学遗传学资源细胞制御研究室 Shirahada 教授惠赠、选用的方法分别为 Ito 方法[4]，KaTaKuRa 方法[5]、Ito 改进方法[6]，高速转化方法[7]. Ito 方法的细胞生长期为对数中期，洗涤用 TE，LiAc 预处理需要约1h，LiAc 浓度为0.2 mol/L，PEG4000浓度为70%，Vector DNA 加入量是10μg，不加 Carrier DNA，热冲击时间为5min. KaTaKuRa 方法的细胞生长期为对数前期，洗涤用 H_2O，LiAc 预处理需要约1h，LiAc 浓度为0.2 mol/L，PEG4000浓度为60%，Vector DNA 加入量是10μg，不加 Carrier DNA，热冲击时间为5min、Ito 改进方法的细胞生长期为对数前期，洗涤用 TE/LiAc，不需要 LiAc 预处理，LiAc 浓度为0.1 mol/L，PEG4000浓度为40%，Vector DNA 加入量是1μg，Carrier DNA 是鲑鱼精 DNA(50μg)，热冲击时间为15min. 高速转化方法的细胞生长期为对数前期，洗涤用 TE/LiAc，不需要 LiAc 预处理，LiAc 浓度为0.1 mol/L，PEG4000浓度为40%，Vector DNA 加入量是0.1～1μg，Carrier DNA 是小牛胸腺 DNA(15μg)，热冲击时间为25min.

按照前述的四种转化方法对质粒 pYES2-hIL-6转入酵母细胞 DBY747分别进行了实验，并对每种转化方法所得的活细胞数与转化子数进行了测定，从而计算出各自的转化效率(见表1)、由表1可以看出，无论是转化子/μg DNA 还是转化效率，Ito 改进方法[6]与高速转

收稿日期：2000-06-09

作者简介：宋磊(1972-)、女，上海师范大学生物与化学工程学院助教、

维普资讯 http://www.cqvip.com

化方法[7]明显优于 Ito 方法[4]与 KaTaKuRa 方法[5]，而前两者尤以高速转化方法[7]为最佳.

表 1 实验结果

方法	质粒(μg)	活细胞数(per mL)	转化子数	转化子数/μg DNA	转化效率[a]
Ito 方法	10	2×10^8	160[b]	16	0.08
KaTaKuRa 方法	10	6.55×10^7	346[b]	34.6	0.53
Ito 改进方法	1	1×10^7	9120[b]	9.12×10^3	91.2
高速转化方法	1	1.2×10^7	19500[b]	1.95×10^4	162.5

a：转化效率=转化子数/活细胞数×105　　b：平均实验3次

2 结 论

由此得到的结论是选用对数前期的细胞是优于对数中期的. 离心获得的菌体用 TE/LiAc 洗涤优于单独用 TE 或 H_2O 洗涤；LiAc 的处理浓度以0.1mol/L 为最好；加入 Carrier DNA 是非常有效的；PEG4000以40%的浓度效果最好，而且以40%PEG4000，0.1mol/L LiAc，0.01mol/L TE 试剂组对细胞进行处理为好；热冲击时间以延长到25min 效果最好.

LiAc 使得受体细胞中产生了一种短暂的"感受态"，在此期间它们能够摄取外源 DNA. 以较低浓度的 LiAc 作用可以减少锂离子对膜结构的损伤使转化后的酵母细胞容易在选择性培养基上生长. PEG4000可以促使膜负载的改变，从而达到协助转化的目的. 从四种转化方法比较中发现，40%的 PEG4000与 TE/LiAc 同时作用效果更好，说明 LiAc 与 PEG4000 具有协同作用. 从表1可以发现加入 Carrier DNA 后，质粒 DNA 的加入量可以由10μg 降低到1μg，说明 Carrier DNA 确实起到保护质粒 DNA 免受核酸酶的降解. 42℃热冲击是高效转化必不可少的一步，而且将5min 处理延长到25min 效果更好. 可以说明42℃热冲击时间的延长促进了质粒分子与细胞膜的结合及吸收，使转化效率提高.

参考文献：

[1] ALBERT Hinnen, JAMES B Hicks, GERALD R Fink. Transformation of yeast[J]. Pro Natl Acad Sci USA, 1978, 75(4): 1929-1933.

[2] JEAN D Beggs. Transformation of yeast by a replicating hybrid plamid[J]. Nature, 1978, 275(5676): 104-109.

[3] PETER M J Burgers, KIMBERLY J Perecival. Transformation of Yeast Spheroplasts without Cell Fusion[J]. Aanallytical Biochemistry, 1978, 163: 391-397.

[4] HISUO Ito, YASUKI Fukuda, KOUSAKU Murata, et al. Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations[J]. Journal of Bacteriology, 1983, 153(1): 163-168.

[5] H KaTaKuRa. 酵母におけるウシβラクトケロブリンの表达[D]. 日本：琉球大学，1993, 60.

[6] DANIEL Gietz, ANDREW ST Jean, ROBIN A Woods, et al. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast calls[J]. Nucleic Acid Research, 1992. 20(6): 1425.

[7] 毛小洪，蔡金科. 酵母完整细胞快速高效转化法[J]. 生物工程学报，1990, 6(2): 905-910.