

# 一种简捷有效的大肠杆菌感受态细胞制备方法

代红星<sup>1</sup>, 张庆桥<sup>2</sup>, 樊宝良<sup>1\*</sup> (1. 河北农业大学动物科技学院, 河北保定 071000; 2. 河北工程大学农学院, 河北邯郸 056038)

**摘要** [目的]探索建立简捷快速有效的大肠杆菌感受态细胞制备方法。[方法]在已有的 TSS 法基础上进行了进一步的改进, 建立了一个只需一步室温离心便能够获得与常规方法效价相近, 能够长期保存的大肠杆菌感受态细胞的制备方法。[结果]新方法制备的感受态细胞每微克转化菌落数达  $10^5 \sim 10^6$  个, 可以满足在质粒中进行的常规克隆需要。不同冻存时间对新方法制备的感受态细胞转化效率无显著影响。新方法制备的感受态细胞可以立即使用也可以于  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  下长期保存至少 9 个月不会影响其转化效价。这也与常规  $\text{CaCl}_2$  法制备的感受态细胞性能相当。[结论]该方法为一次大量制备并长期保存使用感受态细胞奠定了基础。

**关键词** 大肠杆菌; 感受态细胞;  $\text{CaCl}_2$  法; 制备

**中图分类号** S182 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)29-12627-02

## A Simple and Effective Method for Preparation of *Escherichia coli* Competent Cells

DAI Hong-xing et al (College of Animal Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071000)

**Abstract** [Objective] The aim was to explore the simple and effective method for preparation of *Escherichia coli* competent cells. [Method] A method for preparation of *E. coli* competent cells was constructed by the further improvement on the basis of the known TSS method, which needed only one step of centrifugation at room temperature to obtain the *E. coli* competent cells preserved in a long time and had the similar efficiency as the routine method. [Result] The number of per  $\mu\text{g}$  colony transformed by the competent cells prepared by the new method reached  $10^5 \sim 10^6$ , which could meet the demand of routine clone completed in the plasmid. Different cryopreservation time had no significant influence on the transformation efficiency of the competent cells prepared by the new method, and the cells could be used immediately and also could be preserved in a long time at  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ , whose transformation efficiency could not be influenced at least 9 months and its performance was equivalent to that prepared by the routine  $\text{CaCl}_2$  method. [Conclusion] The method laid the foundation for large scale preparation of competent cells in one time, and preservation and usage of competent cells in a long time.

**Key words** *Escherichia coli*; Competent cell;  $\text{CaCl}_2$  method; Preparation

分子生物学实验中, DNA 重组技术和外源基因的表达是最为常用的研究手段之一。而体外构建的 DNA 重组子必须导入合适的受体细胞, 才可以复制、增殖和表达。载体与外源目的基因构成的重组载体可以通过转化直接导入受体细胞, 从而实现基因在异源细胞的表达。

感受态细胞的制备是实现上述目标的一个重要环节, 其制备质量的好坏直接影响后续工作的进行。目前人们已经建立很多种感受态细胞的制备方法, 最早的大肠杆菌感受态细胞制备的方法是 Cohen<sup>[1]</sup>于 1972 年建立的, 该方法的主要原理是细菌通过冰冷的  $\text{CaCl}_2$  低渗溶液处理后, 加入待转化质粒 DNA, 经  $42\text{ }^\circ\text{C}$  短时间热冲击, 细菌细胞可增加对该质粒 DNA 的摄入。这一方法成为目前实验室制备感受态细胞的常规方法。电转化法<sup>[2-3]</sup>是另外一种常用的细胞转化方法, 其主要特征为速度快而且有很高的转化效率, 每微克质粒 DNA 转化菌落数可高达  $10^9 \sim 10^{10}$  个, 但这一方法要求昂贵的设备, 技术性较强。1990 年 Nishimura A<sup>[4]</sup>报道的一种镁盐法(Nishimura)制备感受态细胞的方法, 该方法制备的感受态细胞效价高可达到  $10^8$ , 但该方法操作仍显复杂。1989 年 Chung 等报道转化效率比  $\text{CaCl}_2$  法要高的 TSS 法<sup>[5]</sup>, 而且不需要热休克。同时还采用与 TSS 法操作完全相同, 仅用等摩尔浓度  $\text{MgSO}_4$  替换  $\text{MgCl}_2$  的 NewTSS 法。周国林等研究结果表明上述 4 种方法中 TSS 转化效率最高, 其次为  $\text{CaCl}_2$  法, 再次为 Nishimura 法, 最次为 NewTSS 法<sup>[6]</sup>。TSS 法对细胞的毒性较小, 无需加入其他成分, 转化方便, 效率高, 与其他方法相比便宜可靠, 并可在  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  下长期保存。笔者在已有的

TSS 法基础上进行了进一步的改进, 建立了一种更为简捷有效的大肠杆菌感受态细胞制备的方法, 即只需一步室温离心便能够获得与常规方法效价相近, 并能够长期保存的大肠杆菌感受态细胞。

## 1 材料与方法

**1.1 材料**  $\text{MgCl}_2$ 、蛋白胨、酵母提取物、 $\text{NaCl}$ 、PEG (MW = 3350)等均购自上海生工生物工程公司, 质粒 DNA 为 pGEM-5zf(+), 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为河北农业大学动物科技学院动物遗传育种研究室保存。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 缓冲液  $1 \times \text{TSSG}$  的配制。** 5 ml, 1 mol/L  $\text{MgCl}_2$ , 1 g 蛋白胨, 0.5 g 酵母提取物, 0.5 g  $\text{NaCl}$ , 10 g PEG (MW = 3350)溶解于适量蒸馏水中, 用  $\text{NaOH}$  调节 pH 至 6.5, 然后定容至 100 ml, 用 0.22  $\mu\text{m}$  滤器过滤灭菌。

**1.2.2 感受态细胞的制备。** 接种一个 *E. coli* DH5 $\alpha$  单菌落于配制的感受态细胞制备用 TSSG (30 ml) 缓冲液中, 200 r/min,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  振荡培养 10 h 左右, 待菌液达到对数生长后期, 将装有菌液的三角瓶放入冰中, 冰浴 30 min, 加入 1.5 ml 5% DMSO, 充分混匀。然后将培养物以 1 ml 分装到预冷的 1.5 ml 离心管中, 12 000 r/min 常温离心 1 min, 离心后, 迅速放到冰上, 去除 900  $\mu\text{l}$  上清液, 用残留的约 100  $\mu\text{l}$  上清重新悬浮细菌, 此细胞为感受态细胞, 可在  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  保存或直接转化, 此过程在冰上无菌操作。

**1.2.3 转化。** 转化时, 从  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中取出冻存的感受态细胞, 置于冰浴中使其溶化或取新鲜制备的感受态细胞 100  $\mu\text{l}$ , 然后加入 1 ng/ $\mu\text{l}$  标准浓度质粒 DNA (pGEM-5zf(+)) 1  $\mu\text{l}$ , 轻轻旋转混匀, 冰浴 10 min, 室温保温 10 min, 加入 900  $\mu\text{l}$  LB 培养基,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  振荡培养 1 h, 取 100  $\mu\text{l}$  均匀地铺在已制备好的含氨苄青霉素的 LB 平板上, 室温下待其吸收后, 倒置

**作者简介** 代红星(1982-), 男, 河北承德人, 硕士研究生, 研究方向: 胚胎工程和转基因动物。\* 通讯作者, E-mail: baoliangfan@hotmail.com.

**收稿日期** 2008-07-11

于 37 ℃ 孵箱中过夜,次日统计每个 LB 平板上的克隆数。

**1.2.4 感受态细胞效价分析。**试验以未经转化的感受态细胞做对照,试验组设置 3 个重复,计算转化效价时取 3 个重复菌落数的平均数。

转化体总数 = 菌落数 × (转化反应原液总体积/涂板菌液体积)

转化频(效)率 = 转化体总数/加入质粒 DNA 的量(计算出每微克的转化菌落数)

**1.2.5 冻存时间对新方法制备的感受态细胞转化效率影响的研究。**用相同的转化方法,设立即使用、冻存(-80 ℃)3 个月、冻存 6 个月及冻存 9 个月 4 个冻存时间,采用同一质粒 pGEM-5zf(+),以“1.2.3”中的转化方法进行细菌转化。克隆计数后进行统计学分析。

**1.2.6 统计学处理。**数据分析采用单因素试验资料的方差分析。

## 2 结果与分析

**2.1 新方法制备感受态细胞立即使用时的效价分析** 新方法制备的感受态细胞,未经低温保存立即按“1.2.3”中的方法进行转化,统计所长菌落数及效价。结果表明,3 个阴性对

照没有克隆生长,说明制备过程中没有污染;3 个试验重复组分别长出了 72、83 和 74 个克隆。不同重复间的方差分析表明,差异不显著;平均转化效率(效价)为  $7.63 \times 10^5/\mu\text{g}$  质粒 DNA,这一效率与常规氯化钙法制备的感受态细胞效价相当。

## 2.2 新方法制备的感受态细胞不同冻存时间对转化的影响

各种情况下, pGEM-5zf(+)质粒转化效果均良好(表 1)。依据统计学原理,当  $\alpha = 0.05$  时,  $F_{0.05}(3,8) = 4.07$ ; 当  $\alpha = 0.01$  时,  $F_{0.01}(3,8) = 7.59$ 。方差分析结果表明,计算所得  $F$  值小于  $F_{0.05}(3,8) = 4.07$ ,故可以推断各种冻存时间处理间无显著差异。因此认为不同冻存时间对新方法制备的感受态细胞转化效率无显著影响。同一处理的重复间差异也不显著。试验中所有阴性对照没有克隆生长,说明试验组中所获得的克隆为质粒转化的结果,而基于此计算得到的效价为感受态细胞的真实效价。该结果表明,新方法制备的感受态细胞可以立即使用也可以于 -80 ℃ 下长期保存至少 9 个月不会影响其转化效价。这也与常规氯化钙法制备的感受态细胞性能相当。

表 1 不同冻存时间对新方法制备的感受态细胞效价的影响

Table 1 Effects of different storage time on the efficiency of the competent cell prepared by the new method

冻存时间 Storage time	效价 Efficiency			平均值 Average value
	1	2	3	
立即使用 Immediate using	$7.2 \times 10^5$	$8.3 \times 10^5$	$7.4 \times 10^5$	$7.6 \times 10^5$
冻存 3 个月 Storage for 3 months	$7.0 \times 10^5$	$7.5 \times 10^5$	$8.0 \times 10^5$	$7.5 \times 10^5$
冻存 6 个月 Storage for 6 months	$8.2 \times 10^5$	$7.8 \times 10^5$	$7.6 \times 10^5$	$7.9 \times 10^5$
冻存 9 个月 Storage for 9 months	$8.0 \times 10^5$	$7.1 \times 10^5$	$7.5 \times 10^5$	$7.5 \times 10^5$

注:冻存温度为 -80 ℃。

Note: The storage temperature is -80 ℃.

## 3 结论与讨论

感受态细胞的制备是分子生物学实验中的一项基本操作, CaCl<sub>2</sub> 法制备过程中需要 2 次 4 ℃ 下 10 min 离心,离心时间较长,且要求实验室具备冷冻离心机。笔者建立的新方法在常温下离心即可,且离心只需 1 min,不仅离心时间短、简便易于操作,而且不具备冷冻离心机条件的实验室也可制备。制备过程中 DMSO 在菌液冰浴后加入,减少了对细胞的毒性并延长细菌细胞的感受状态。转化过程中无需在 42 ℃ 水浴中热击,没有水浴设备的实验室也可进行转化操作。结果显示,新方法制备的感受态细胞每微克转化菌落数达  $10^5 \sim 10^6$  个,可以满足在质粒中进行的常规克隆需要,达到了 CaCl<sub>2</sub> 法的效果。而且所制备的感受态细胞能较长时间(-80 ℃,至少可保存 9 个月)冷冻保存而转化效率不会下降,适于一次大量制备并长期保存使用,对于需要大量感受态细胞的实验室无疑是一种好的选择。

## 参考文献

- [1] COHEN S N, CHANG A C Y, HSU L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1972, 69: 2110-2114.
- [2] DOWER W J, MILLER J F, RAGSDALE C W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation[J]. Nucleic Acids Res, 1988, 16: 6127-6145.
- [3] POTTER H. Application of electroporation in recombinant DNA technology[J]. Methods Enzymol, 1993, 217: 461-483.
- [4] NISHIMURA A. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(26): 6169-6175.
- [5] CHUNG C T, SUZANN DL NIEMELA, MILLER R H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 2172-2175.
- [6] 周国林, 付士红, 梁国栋. 同一质粒转入感受态细胞的四种方法转化效率的比较研究[J]. 微生物学免疫学进展, 1998, 26(2): 20.
- [7] DETLEF GROTH, REGINA RESZKA, SCHENK J A. Polyethylene glycol-mediated transformation of *Escherichia coli* is increased by room temperature incubation[J]. Analytical Biochemistry, 1996, 240: 302-304.