

文章编号:1673-1689(2007)06-0048-04

电转化法制备高转化效率的 *E. coli* 感受态细胞研究

李欣^{1,2}, 杨坤宁^{1,2}, 刘志勇³, 陈红兵^{1,2}

(1. 南昌大学 食品科学教育部重点实验室, 江西 南昌 330047; 2. 南昌大学 中德联合研究院, 江西 南昌 330047; 3. 江西省劳动卫生职业病防治研究所, 江西 南昌 330006)

摘要: 为了制备高转化效率的 *E. coli* TG1 和 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 采用电转化方法探索 *E. coli* 生长对数期的不同生长阶段、质粒 DNA 含量、电场强度对 *E. coli* 转化效率的影响。研究结果表明: 40 μ L 菌液中加入 1.0 ng pUC19 DNA, 用间隙 0.2 cm 电击杯时转化效率最高, *E. coli* TG1 有 1 个电转化效率峰值, 即 A_{600} 为 0.665 时, 转化效率达 1.7×10^9 cfu / μ g pUC19 DNA; *E. coli* DH5 α 有 2 个转化效率峰值, 即 A_{600} 为 0.443 和 0.810 时, 转化效率均为 3.0×10^9 cfu / μ g pUC19 DNA。研究结果表明, 在相同情况下 *E. coli* DH5 α 的转化效率高于 *E. coli* TG1, 利用本实验确定的参数可制备出高转化效率的电转化感受态细胞。

关键词: 大肠杆菌; 电转化; 感受态细胞

中图分类号: Q 785

文献标识码: A

Study on Preparation of High Transformation Efficiency Electrocompetent *Escherichia coli*

LI Xin^{1,2}, YANG Kun-ning^{1,2}, LIU Zhi-yong³, CHEN Hong-bing^{1,2}

(1. Key Laboratory of Food Science, Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2. Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 3. Jiangxi Labor Sanitation and Occupational Disease Prevention and Treatment Institute, Nanchang 330006, China)

Abstract: To establish a high efficiency of electrotransformation, two different strains of *E. coli* DH5 α and *E. coli* TG1 were used to investigate the influence of growth period during log phase, the content of the plasmid pUC19 DNA and the electric field strength on electrotransformation efficiencies. A highest electrotransformation efficiency was achieved at when 1.0 ng of plasmid DNA was used with 40 μ L solution and packed in 0.2 cm cuvette. A peak of electrotransformation efficiency for *E. coli* TG1 was 1.7×10^9 transformants per μ g pUC19 DNA when the optical density (A_{600}) was 0.665. Two peaks of electrotransformation efficiencies for *E. coli* DH5 α were the same as 3.0×10^9 transformants per μ g pUC19 DNA when the optical density (A_{600}) were 0.443 and 0.810. The results suggested that the transformation efficiency of *E. coli* DH5 α was higher than *E. coli* TG1 with the identical condition and the parameters of the this experiment can be further applied to prepare the high efficient competent cell.

收稿日期: 2006-12-20.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30360081)

作者简介: 李欣(1980-), 女, 河北邯郸人, 食品生物技术博士研究生.

通讯作者: 陈红兵(1967-), 男, 江西樟树人, 教授, 博导, 主要从事食品生物技术研究. Email: chbgjy@hotmail.com

Key words: *Escherichia coli*; transformation; competent cell

可食性抗体的研究经历了多克隆抗体、单克隆抗体的研究发展阶段,现已进入了基因工程抗体的研究阶段。基因工程抗体研究的关键技术是噬菌体抗体库技术^[1]。为了筛选到抗体基因,必须构建一个有效的抗体库,而提高基因转化效率是实现构建有效抗体库的核心。早在20世纪70年代,Cohen首次成功地用CaCl₂法将质粒DNA转入大肠杆菌^[2]。之后人们又通过各种手段对其进行优化,可满足一般的克隆要求^[3]。但在构建大容量基因文库和抗体库时,必须提高转化效率,采用电转化方法是最佳的途径。电转化法利用瞬间高压电脉冲,使细胞表面产生暂时性的孔隙,可在细胞膜表面形成小孔,同时由于电击作用可促使细胞膜融合,最后在细胞膜上形成大的孔道,易于DNA进入^[4]。但影响电转化效率的因素较多,如电场强度、脉冲时间、DNA含量等等。作者旨在探讨影响电转化效率的几个因素,为制备高电转化效率的感受态细胞提供切实可行的操作参数。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 大肠杆菌(*Escherichia coli*) TG1和DH5 α ,作者所在实验室保存;质粒pUC19,购自TaKaRa公司。

1.1.2 化学试剂和培养基 甘油为分析纯;2 $\times$ YT培养基、2 $\times$ YT-G培养基、基本培养基、SOBAG培养基(含氨苄抗生素),均按常规配方配制。

1.1.3 仪器 紫外分光光度计(TV-1900/TV-1901);北京普析通用仪器有限公司产品;摇床:常州国华电器有限公司产品;冷冻离心机(Allergra™ 64R Centrifuge);BECKMAN公司产品;高压灭菌锅:上海医用核子仪器厂产品;恒温培养箱:日本三洋公司产品;Bio-Rad电转仪。

1.2 方法

1.2.1 细菌复苏 将在-70℃甘油保存的大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株接种于装有2 $\times$ YT液体培养基中,37℃,200 r/min振摇培养过夜;长菌后平板划线(*E. coli* TG1使用基本培养基, DH5 α 使用2 $\times$ YT固体培养基),于37℃培养16~17 h;挑取单菌落,接入2 $\times$ YT液体培养基中,37℃,200 r/min振摇培养过夜,用于感受态细胞制备的接种液。

1.2.2 感受态细胞的制备 主要参照Dower法^[5],大肠杆菌复苏后,按1:100的比例接种到2 $\times$ YT液体培养基中,37℃,200 r/min振摇培养,每隔20~30 min测定菌液的A₆₀₀值,之后取出培养瓶,冰浴冷却15~30 min,4℃,9 000 r/min离心20 min,倾去上清液;将沉淀重悬于100 mL冰预冷的体积分数10%甘油溶液中,置冰上15 min,4℃,9 000 r/min离心20 min,倾去上清液;将沉淀重悬于50 mL冰预冷的甘油溶液中,置冰上15 min,4℃,9 000 r/min离心20 min,倾去上清液;将沉淀重悬于10 mL冰预冷的体积分数10%甘油溶液中,置冰上15 min,4℃,9 000 r/min离心20 min,倾去上清液;最后用冰预冷的甘油溶液进行稀释,分装至离心管中,在-70℃下保存。

1.2.3 电转化及转化效率的计算 按实验的不同要求取40 μ L菌液与一定量浓度的质粒pUC19 DNA混匀,在冰上充分冷却,转入预冷的电击杯中,电击后,迅速加入1 mL预热至37℃新鲜的2 $\times$ YT-G液体培养基,置于37℃,振摇培养40 min,用生理盐水做数个稀释度,分别涂布于SOBAG平板上,37℃恒温培养过夜,菌落计数后即可计算电转化效率。

2 结果

2.1 不同 *E. coli* 菌株的对数期生长曲线

从0~4 h,测定 *E. coli* 的细菌浓度(A_{600nm}),绘制对数期生长曲线(A₆₀₀ ≤ 1),如图1、2所示。*E. coli* TG1和 *E. coli* DH5 α 的生长曲线均在100 min后开始成对数生长趋势,在100~150 min之间,*E. coli* TG1菌株的生长速度比 *E. coli* DH5 α 菌株快。

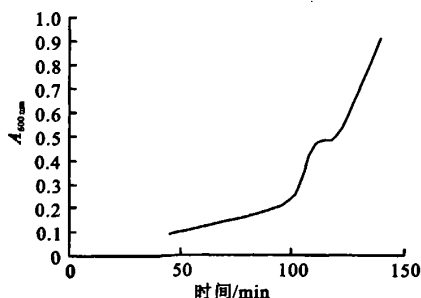


图1 *E. coli* TG1对数期生长曲线

Fig. 1 Growth curve during log phase of *E. coli* TG1

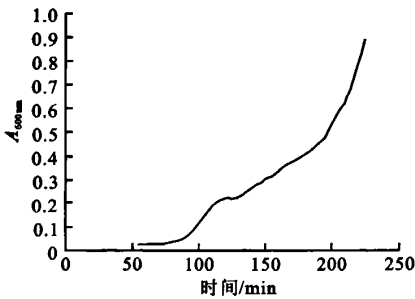


图 2 *E. coli* DH5α 对数期生长曲线

Fig. 2 Growth curve during log phase of *E. coli* DH5α

2.2 *E. coli* 菌株在不同生长时期的电转化效率

E. coli 在不同生长时期的电转化效率如表 1、2 以及图 3、4 所示(电击杯间隙为 0.2 cm)。

2.3 不同质粒 DNA 含量的电转化效率

采用了 4 种不同的质粒 DNA 用量,探讨质粒 DNA 含量对电转化率的影响,结果如表 3、4 所示。

表 1 *E. coli* TG1 在不同生长时期的转化效率

Tab.1 Electrotransformation efficiencies of the *E. coli* TG1 at different growth phase

$A_{600\text{ nm}}$	转化效率/(cfu $\times 10^8$ /μg pUC19 DNA)
0.093	5.0
0.235	6.0
0.464	6.0
0.501	4.0
0.665	17
0.698	4.0
0.872	6.0
0.912	4.0

表 2 *E. coli* DH5α 在不同生长时期的转化效率

Tab.2 Electrotransformation efficiencies of the *E. coli* DH5α during different growth phase

$A_{600\text{ nm}}$	转化效率/(cfu $\times 10^8$ /μg pUC19 DNA)
0.027	4.0~6.1
0.143	1.7~5.0
0.206	1.3~3.0
0.220	20
0.331	4.0~6.1
0.443	30
0.570	9.0
0.680	10
0.810	30
1.045	4.6~6.0

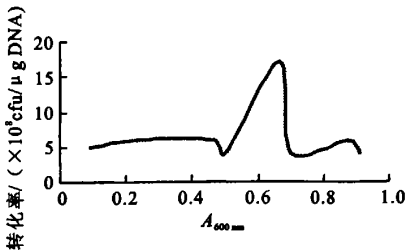


图 3 *E. coli* TG1 不同生长时期的转化效率

Fig. 3 Electrotransformation efficiencies of the *E. coli* TG1 during different growth phase

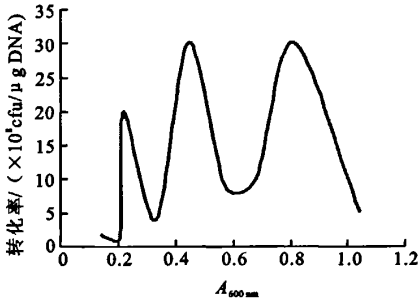


图 4 *E. coli* DH5α 不同生长时期的转化效率

Fig. 4 Electrotransformation efficiencies of the *E. coli* DH5α during different growth phase

表 3 质粒 DNA 不同用量时 *E. coli* TG1 ($A_{600}=0.665$) 的转化效率*

Tab.3 Electrotransformation efficiencies of *E. coli* TG1 with different content of the plasmid DNA

DNA 质量/ng	转化效率/(cfu $\times 10^8$ /μg pUC19 DNA)
0.25	2.8
0.5	4.4
1.0	17.0
1.5	2.6

* 电击杯间隙为 0.2 cm

表 4 质粒 DNA 不同用量时 *E. coli* DH5α($A_{600}=0.810$) 的转化效率*

Tab.4 Electrotransformation efficiencies of *E. coli* DH5α with different content of the plasmid DNA

DNA 质量/ng	转化效率/(cfu $\times 10^8$ /μg pUC19 DNA)
0.25	1.2
0.5	1.8
1.0	30
1.5	2.7

* 电击杯间隙为 0.2 cm

2.4 不同电场强度的电转化效率

选用 18 kV/cm 和 12.5 kV/cm 两种电场强度

对处于转化效率峰值时期的菌株进行转化效率比较。实验中所用的 Bio-Rad 公司电穿孔仪有预设程序,对于大肠杆菌,使用 0.1 cm 电击杯时,电压会达到 1.8 kV 左右,电场强度是 18 kV/cm,脉冲时间一般为 5.00 ms;而使用 0.2 cm 电击杯时,电压则达 2.5 kV 左右,电场强度是 12.5 kV/cm,脉冲时间一般为 6.00 ms。研究结果表明,电场强度减小,脉冲时间延长,转化效率提高。

3 讨论

3.1 对数生长期的不同阶段对电转化效率的影响

选用对数生长期的细胞的感受态细胞是提高电转化效率的一个重要的因素。如果选择没有达到对数生长期或超过对数生长期的细胞,转化效率很低^[6]。对对数生长期大肠杆菌菌株($A_{600\text{ nm}}$ 在 0.2~1.0 之间)的电转化效率作了比较,通过图 1、2,可以看出两种菌株的生长趋势基本一致,只是在前、中、后期的持续时间存在差异。结合图 3、4 可以看出,在相同条件下制备的感受态细胞,大肠杆菌(*Escherichia coli*) TG1 在 $A_{600\text{ nm}}$ 为 0.5~0.7 之间时,其转化率明显高于其它时期;而 *E. coli* DH5 α 则有两个峰值; $A_{600\text{ nm}}$ 在 0.3~0.5 之间和 0.7~0.9 之间,即处于对数生长早期和后期。并且 DH5 α 的最大转化率比 TG1 的要高。这是由于菌株大小、形状、细胞壁和细胞膜组成不同,导致对相同强度的电脉冲敏感程度不一样,而且各时期的活细胞数目也不

相同,所以不同菌株在不同时期的转化效率各异。

3.2 质粒含量对电转化效率的影响

质粒 DNA 的结构、大小、含量对电转化效率的影响也很大^[7]。作者选用 pUC19 作为质粒材料,就其含量对电转化效率的影响进行了探讨:在 40 μL 菌液加入了 4 种不同含量的质粒 DNA,分别为 0.25 ng、0.5 ng、1.0 ng、1.5 ng,结果表明用量为 1.0 ng 质粒 DNA 时,电转化效率最高,而且电转化效率与外源 DNA 的含量在一定范围内成正比;但当加入的外源 DNA 的量过多或体积过大时,则会使转化效率下降^[8]。该结果与文献报道基本一致,即 DNA 溶液的体积不应超过感受态细胞体积的 5%,1 ng 的质粒 DNA 即可使 50 μL 的感受态细胞达到饱和。

3.3 电脉冲强度对电转化效率的影响

电场强度的影响机制较为复杂,目前还不是十分清楚。Kimoto 的研究表明^[9]:电脉冲前,DNA 和细胞是随机分布的;电脉冲早期,DNA 和细胞向阳极运动;电脉冲的后期,DNA 插入细胞的外膜或者进一步进入细胞质间隙;随后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育期间 DNA 渗透通过内膜进入细胞浆。高场强下,可瞬间击穿细胞壁和质膜,形成能通过外源物质的跨膜孔道;而低场强的作用下,需累计电荷达到一定的强度,才可作用于质膜,形成孔道,这样易使已形成孔道的细胞因内含物外流而引起死亡。所以选择合适的脉冲强度对外源 DNA 的导入非常关键。

参考文献(References):

- [1] Paschke M. Phage display systems and their applications[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 70(1): 2-11.
- [2] Cohen S N, Chang A C, Boyer H W, et al. Construction of biologically functional bacterial plasmid in vitro, 1973 [J]. *Biotechnology*, 1992; 24: 188-192.
- [3] Hanahan D, Jessee J, Bloom F R. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria[J]. *Methods in Enzymol*, 1991, 20(4): 63-113.
- [4] Sabelnikov A G, Cymbalyuk E S, Gongadze G, et al. *Escherichia coli* membranes during electrotransformation: an electron microscopy study[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1066(1): 21-28.
- [5] 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(13): 6127-6145.
- [6] Tu Z M, He G Y, Li K X. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains[J]. *Electronic J Biotechnol*, 2005, 8(1): 113-120.
- [7] Saito Y, Taguchi H, Akamatsu T. Fate of transforming bacterial genome following incorporation into competent cells of *Bacillus subtilis*; a continuous length of incorporated DNA[J]. *J Biosci Bioeng*, 2006, 101(3): 257-262.
- [8] Kimoto H, Taketo A. Efficient electrotransformation system and gene targeting in pyogenic streptococci[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, 67(10): 2203-2209.
- [9] Kimoto H, Taketo A. Initial stage of DNA-electrotransfer into *E. coli* cells[J]. *J Biochem (Tokyo)*, 1997, 122(1): 237-242.

(责任编辑:朱明)