

氯化钙法 (Calcium Chloride) 大肠杆菌感受态细胞的制备

本方法适用于批量制备大肠杆菌感受态细胞，所得感受态细胞可以获得 5×10^6 到 2×10^7 转化克隆/微克超螺旋质粒 DNA

材料 (MATERIALS)

缓冲液和溶液 (Buffers and Solutions)

(冰冷的) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 M)

冰冷的 MgCl_2 - CaCl_2 溶液 (solution, ice cold)

培养基 (Media)

用于初始培养物培养的 LB 肉汤 (L-broth for initial growth of culture)

LB agar plates containing appropriate antibiotic

核酸 (Nucleic Acids)

质粒 DNA (Plasmid DNA)

或经过重组的质粒 (recombinant plasmid)

方法

1. 从 37°C 过夜 (16-20 hours) 培养皿内挑取一个直径约为 2 到 3 毫米的单菌落。把这样的单菌落接种于一只装有 5 毫升 LB 肉汤的 30 毫升灭菌试管中，于 37°C 下振荡培养过夜。
2. 转移 0.2 毫升过夜培养物于一只装有 15 或 20 毫升 LB 的 50 毫升灭菌三角瓶中。于 37°C 下振荡培养 2 到 2.5 小时 (此时细菌处于对数生长期)。
3. 室温下，4000 rpm 离心 5 分钟收集对数期细胞。弃培养基，保留细胞沉淀。
5. 加入 10 毫升冰冷的 MgCl_2 - CaCl_2 溶液，并轻微打匀。
6. 4°C 下，4000 rpm 离心 10 分钟收集细胞。
7. 弃 MgCl_2 - CaCl_2 溶液，保留细胞沉淀。
8. 加入 0.8 毫升 (每 25 毫升初始培养物加入 1 毫升) 冰冷的 0.1M 的 CaCl_2 溶液，并轻微打匀。冰浴放置若干小时为最好。

9. 此时的感受态细胞可以依照下面的步骤 10 到 16 直接进行转化操作，也可以分装,加入甘油后于-70℃冰冻保藏。
10. 向事先灭菌，并经冷处理的 1.5ml 聚丙烯管中转移 100 微升感受态细胞悬浮液。向每个转化管中加入 DNA(一般含量是 10 微升或更低的体积中所含量应不超过 50 纳克)。细心混匀管中成份。于冰浴放置 30 到 40 分钟。
11. 把转化管转移至放于 42℃ 循环水浴锅中预热的试管架上，准确计时 90 秒。
(此时不能摇动转化管)
12. 把试管迅速转移至冰浴 2 到 3 分钟。
13. 向每只试管中加入 500 微升 LB 肉汤。37℃ 放置 45 到 90 分钟，以使细菌复原，并容许质粒所编码的抗生素抗性的表达。
14. 转移适量体积（如果使用 90 毫米平板，一半涂布量不应超过 100 微升）的经转化处理的感受态细胞涂布于含有相应抗生素的 LB-琼脂平板上。
15. 室温放置平板直到其上液体被吸收。
16. 于 37℃ 倒置平板培养。转化克隆应该于 12-16 小时区间出现。

感受态原理:

在自然条件下,很多质粒都可通过细菌接合作用转移到新的宿主内,但在人工构建的质粒载体中,一般缺乏此种转移所必需的 **mob** 基因,因此不能自行完成从一个细胞到另一个细胞的接合转移。如需将质粒载体转移进受体细菌,需诱导受体细菌产生一种短暂的感受态以摄取外源 DNA。

转化(Transformation)是将外源 DNA 分子引入受体细胞,使之获得新的遗传性状的一种手段,它是微生物遗传、分子遗传、基因工程等研究领域的基本实验技术。

转化过程所用的受体细胞一般是限制修饰系统缺陷的变异株,即不含限制性内切酶和甲基化酶的突变体(R^- , M^-),它可以容忍外源 DNA 分子进入体内并稳定地遗传给后代。受体细胞经过一些特殊方法(如电击法, $CaCl_2$, $RbCl(KCl)$)

等化学试剂法)的处理后,细胞膜的通透性发生了暂时性的改变,成为能允许外源 DNA 分子进入的感受态细胞(Competent cells)。进入受体细胞的 DNA 分子通过复制,表达实现遗传信息的转移,使受体细胞出现新的遗传性状。将经过转化后的细胞在筛选培养基中培养,即可筛选出转化子(Transformant,即带有异源 DNA 分子的受体细胞)。目前常用的感受态细胞制备方法有 CaCl_2 和 $\text{RbCl}(\text{KCl})$ 法, $\text{RbCl}(\text{KCl})$ 法制备的感受态细胞转化效率较高,但 CaCl_2 法简便易行,且其转化效率完全可以满足一般实验的要求,制备出的感受态细胞暂时不用时,可加入占总体积 15% 的无菌甘油于 -70°C 保存(半年),因此 CaCl_2 法为使用更广泛。为了提高转化效率,实验中要考虑以下几个重要因素:

1. 细胞生长状态和密度: 不要用经过多次转接或储于 4°C 的培养菌,最好从 -70°C 或 -20°C 甘油保存的菌种中直接转接用于制备感受态细胞的菌液。细胞生长密度以刚进入对数生长期时为好,可通过监测培养液的 OD600 来控制。**DH5 α 菌株的 OD600 为 0.5 时,细胞密度在 5×10^7 个/ml 左右**(不同的菌株情况有所不同),这时比较合适。密度过高或不足均会影响转化效率。

2. 质粒的质量和浓度: 用于转化的质粒 DNA 应主要是超螺旋态 DNA(cccDNA)。转化效率与外源 DNA 的浓度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,转化效率就会降低。1ng 的 cccDNA 即可使 50 μl 的感受态细胞达到饱和。一般情况下,DNA 溶液的体积不应超过感受态细胞体积的 5%。

3. 试剂的质量: 所用的试剂,如 CaCl_2 等均需是最高纯度的(GR.或 AR.),并用超纯水配制,最好分装保存于干燥的冷暗处。

4. 防止杂菌和杂 DNA 的污染: 整个操作过程均应在无菌条件下进行,所用器皿,如离心管,tip 头等最好是新的,并经高压灭菌处理,所有的试剂都要灭菌,且注意防止被其它试剂、DNA 酶或杂 DNA 所污染,否则均会影响转化效率或杂 DNA 的转入,为以后的筛选、鉴定带来不必要的麻烦。

本实验以 E.coli DH5a 菌株为受体细胞,并用 CaCl_2 处理,使其处于感受态,然后与 pBS 质粒共保温,实现转化。由于 pBS 质粒带有氨苄青霉素抗性基因 (Amp^r), 可通过 Amp 抗性来筛选转化子。如受体细胞没有转入 pBS, 则在含 Amp 的培养基上不能生长。能在 Amp 培养基上生长的受体细胞 (转化子) 肯定已导入了 pBS。转化子扩增后, 可将转化的质粒提取出, 进行电泳、酶切等进一步鉴定。

本实验以 E.coli DH5a 菌株为受体细胞,并用 CaCl_2 处理,使其处于感受态,然后与 pBS 质粒共保温,实现转化。由于 pBS 质粒带有氨苄青霉素抗性基因 (Amp^r), 可通过 Amp 抗性来筛选转化子。如受体细胞没有转入 pBS, 则在含 Amp 的培养基上不能生长。能在 Amp 培养基上生长的受体细胞 (转化子) 肯定已导入了 pBS。转化子扩增后, 可将转化的质粒提取出, 进行电泳、酶切等进一步鉴定。

第二节 材料、设备及试剂

一. 材料

E. coli DH5 α 菌株: R⁻,M⁻,Amp^r; pBS 质粒 DNA: 购买或实验室自制, eppendorf 管。

二. 设备

恒温摇床,电热恒温培养箱,台式高速离心机,无菌工作台,低温冰箱, 恒温水浴锅, 制冰机, 分光光度计,微量移液枪。

三. 试剂

1.LB 固体和液体培养基: 配方见第一章。

2.Amp 母液：配方见第一章。

3.含 Amp 的 LB 固体培养基:将配好的 LB 固体培养基高压灭菌后冷却至 60℃左右,加入 Amp 储存液,使终浓度为 50ug/ml,摇匀后铺板。

4.麦康凯培养基(Macconkey Agar):取 52g 麦康凯琼脂,加蒸馏水 1000ml,微火煮沸至完全溶解,高压灭菌,待冷至 60℃左右加入 Amp 储存液使终浓度为 50ug/ml,然后摇匀后涂板。

5.0.05mol/L CaCl₂ 溶液:称取 0.28g CaCl₂(无水,分析纯),溶于 50ml 重蒸水中,定容至 100ml,高压灭菌。

6.含 15%甘油的 0.05mol/L CaCl₂: 称取 0.28g CaCl₂(无水,分析纯),溶于 50ml 重蒸水中,加入 15ml 甘油,定容至 100ml,高压灭菌。

第三节 操作步骤

一、受体菌的培养

从 LB 平板上挑取新活化的 E. coli DH5 α 单菌落,接种于 3-5ml LB 液体培养基中,37℃下振荡培养 12 小时左右,直至对数生长后期。将该菌悬液以 1:100-1:50 的比例接种于 100ml LB 液体培养基中,37℃振荡培养 2-3 小时至 OD₆₀₀ =0.5 左右。

二、感受态细胞的制备 (CaCl₂ 法)

1、将培养液转入离心管中,冰上放置 10 分钟,然后于 4℃下 3000g 离心 10 分钟。

2、弃去上清,用预冷的 0.05mol/L 的 CaCl₂ 溶液 10ml 轻轻悬浮细胞,冰上放置 15-30 分钟后,4℃下 3000g 离心 10 分钟。

3、弃去上清,加入 4ml 预冷含 15%甘油的 0.05mol/L 的 CaCl₂ 溶液,轻轻悬浮细胞,冰上放置几分钟,即成感受态细胞悬液。

4、感受态细胞分装成 200μl 的小份,贮存于-70℃可保存半年。

三、转化

1、从-70℃冰箱中取 200μl 感受态细胞悬液,室温下使其解冻,解冻后立即置冰上。

2、加入 pBS 质粒 DNA 溶液(含量不超过 50ng,体积不超过 10μl),轻轻摇匀,冰上放置 30 分钟后。

3、42℃水浴中热击 90 秒或 37℃水浴 5 分钟,热击后迅速置于冰上冷却 3-5 分钟。

4、向管中加入 1ml LB 液体培养基(不含 Amp),混匀后 37℃振荡培养 1 小时,使细菌恢复正常生长状态,并表达质粒编码的抗生素抗性基因(Amp^r)。

5、将上述菌液摇匀后取 100μl 涂布于含 Amp 的筛选平板上,正面向上放置半小时,待菌液完全被培养基吸收后倒置培养皿,37℃培养 16-24 小时。

同时做两个对照:

对照组 1: 以同体积的无菌双蒸水代替 DNA 溶液,其它操作与上面相同。此组正常情况下在含抗生素的 LB 平板上应没有菌落出现。

对照组 2: 以同体积的无菌双蒸水代替 DNA 溶液,但涂板时只取 5 μ l 菌液涂布于不含抗生素的 LB 平板上, 此组正常情况下应产生大量菌落。

四、 计算转化率

统计每个培养皿中的菌落数。

转化后在含抗生素的平板上长出的菌落即为转化子, 根据此皿中的菌落数可计算出转化子总数和转化频率, 公式如下:

转化子总数 = 菌落数 \times 稀释倍数 \times 转化反应原液总体积 / 涂板菌液体积

转化频率 (转化子数 / 每 mg 质粒 DNA) = 转化子总数 / 质粒 DNA 加入量(mg)

感受态细胞总数 = 对照组 2 菌落数 \times 稀释倍数 \times 菌液总体积 / 涂板菌液体积

感受态细胞转化效率 = 转化子总数 / 感受态细胞总数

[注意] 本实验方法也适用于其它 E.coli 受体菌株的不同的质粒 DNA 的转化。但它们的转化效率并不一定一样。有的转化效率高, 需将转化液进行多梯度稀释涂板才能得到单菌落平板, 而有的转化效率低, 涂板时必须将菌液浓缩(如离心), 才能较准确的计算转化率。