

大肠杆菌感受态细胞制备实验 (CaCl₂ 法)

细胞经过一些特殊方法 (电击法、CaCl₂ 法) 等处理后, 细胞膜的通透性发生了暂时性的改变, 成为能允许外源 DNA 分子进入的细胞, 即感受态细胞 (Competent cells)。

1 实验方法原理:

带有外源 DNA 的重组质粒, 在体外构建后, 导入宿主细胞, 随着细胞的大量复制、繁殖, 才能够有机会获得纯的重组质粒 DNA, 该过程称之为转化过程。受体细胞经过一些特殊方法 (如: CaCl₂, RuCl 等化学试剂) 的处理后, 细胞膜的通透性发生变化, 能容许外源 DNA 的载体分子通过。

2 实验材料、试剂、仪器耗材:

E. coli DH5 α 菌株

LB 固体培养基、LB 液体培养基、CaCl₂、硫酸镁、SOB、TFB 等

培养皿、恒温摇床、聚丙烯管、电热恒温培养箱、台式高速离心机、无菌工作台、烧瓶、恒温水浴锅、低温冰箱、制冰机、分光光度计、微量移液枪、锥形瓶、试管等

3 实验步骤:

1、从 37°C 培养 16-20 h 的平板中挑取一个单菌落 (直径 2-3 mm), 转到一个含有 100 ml LB 或 SOB 培养基的 1L 烧瓶中。于 37°C 剧烈振荡培养 3 h。一般经验, 1 OD₆₀₀ 约含有大肠杆菌 DH5 α 10⁹ 个/mL。

2、将细菌转移到一个无菌、一次性使用的、用冰预冷的 50 ml 聚丙烯管中, 在冰上放置 10 min, 使培养物冷却至 0°C。

3、于 4°C 用 Sorvall GS3 特头 (或与之相当的转头) 以 4 100 r/min 离心 10 min, 以回收细胞。

4、倒出培养液, 将管倒置 1 min 以使最后的痕量培养液流尽。

5、每 50 ml 初始培养液用 30 ml 预冷的 0.1 mol/L CaCl₂-MgCl₂ 溶液(80 mmol/L MgCl₂, 20 mmol/L CaCl₂)重悬每份细胞沉淀。

6、于 4 °C 用 Sorvall GS3 转头 (或与之相当的转头) 以 41 00 r/min 离心 10 min, 以回收细胞。

7、倒出培养液, 将管倒置 1 min 以使最后的痕量培养液流尽。

8、每 50 ml 初始培养物用 2 ml 用冰预冷的 0.1 mol/L CaCl₂(或 TFB)重悬每份细胞沉淀。

9、此时, 可以用新鲜制备的感受态细胞直接做转化实验, 也可以将细胞冻存于 -70°C。

4 注意事项:

1. 为达到高效转化, 活细胞数务必少于 10⁸ 个细胞/mL, 对于大多散大脑杆菌来说, 这相当于 OD 值为 0.4 左右。为保证细菌培养物的生长密度不致过高, 可每隔 15-20 min 测定 OD₆₀₀ 值来监测, 用监测的时间及 OD 值列一个图表, 以便预测培养物的 OD₆₀₀ 值到 0.4 的时间, 当 OD₆₀₀ 值达到 0.35 时, 收获细菌培养物。

2. 在菌株与菌株之间, OD 值与每毫升中活细胞散间的关系变化很大, 因此有必要通过测量特定脑杆菌的生长培养物在生长周期的不同时间相的 OD₆₀₀ 值, 并将各稀释维度的培养物铺于无抗生素的 LB 琼脂板以计算每一时间相的活细胞散, 从而使分光光度计读数得到标准化。

3. 对大多数大肠杆菌 (MC106 除外), 采用 TFB 代替 CaCl₂ 可得到相同或更好的结果。

Dagert 和 Ehrlich 的实验(1979)曾表明, 细胞可以于 4°C 在 CaCl₂ 溶液中保存 24-48 h, 在贮存的最初 12-24 h 内, 转化率增加 4-6 倍, 然后降低到初始水平。

4. 克隆的新鲜程度, 一定要选新鲜平板的单克隆, 即刚涂布生长过夜的平板。

5. 菌体的 OD₆₀₀ 值, JM109 或 BL21, OD 值为 0.35, DH5α 为 0.4, 要尽量保证 OD 值不要过高, 更不能超过 0.6。

6. 低温处理的时间, 做完后冰上保存 12-24 h 后分装, 并保存于 -80°C。

7. 试剂和用品, 所有的用品 (离心管、药瓶等) 用新的, 如果使用旧的, 要确保干净, CaCl_2 溶液。