

目 录

声 明:	1
大肠杆菌感受态细胞的制备	2
一、CaCl ₂ 感受态细胞的制备	3
二、电转感受态细胞的制备	4
枯草芽孢杆菌感受态细胞的制备及转化	14
农杆菌感受态细胞的制备及转化	17
酵母感受态细胞的制备及转化	18
关于载体连接的讨论	23

声 明:

本文所涉及的技术要点主要来源于相关文献、网络和书籍，此外，一些操作中的技巧及经验等来自于本人及同学、朋友的总结，仅供大家参考，同时也请下载者不要传播尤其是以商业为目的的复制、传播等等；如有转载、传播请注明来源于“螺旋网”。若本文侵犯了您的版权或有任何不妥，请Email: lofeel@126.com or helixnet@126.com 告知。

此外，由于学识、经验有限，本文难免会存在一些错误或缺陷，敬请不吝赐教，联系方式: lofeel@126.com or helixnet@126.com ；同时因存在环境、试剂、仪器以及人为等原因，不能保证实验 100%的成功，仅供参考。

大肠杆菌感受态细胞的制备

体外连接的 DNA 重组分子导入合适的受体细胞才能大量增殖。野生型 *E.coli* 并不容易转化，这是由于细菌产生一种酶能迅速降解进入的外源 DNA。为了提高受体菌摄取外源 DNA 的能力，提高转化效率以获得更多的转化子，人们摸索出不同的方法处理细菌，经过多年的努力，科学家们发现了可以增加细胞吸收外源 DNA 效率的方法，那就是用化学方法处理细胞，使其改变膜对 DNA 的通透性。这种经过理化方法诱导细胞，使其处于最适摄取和容纳外来 DNA 的生理状态，该细胞就称为感受态细胞，即细胞处于能摄入核酸分子时的生理状态。这种方法已经成为基因工程的常规技术，它对于我们利用体外 DNA 重组技术来了解真核和原核生物的基因功能特别重要。细菌的转化有两种类型：一种是自然转化（natural transformation），在自然转化中细菌可以自由地吸收 DNA，通过它来进行遗传转化；另一种是工程转化（engineered transformation），在这种转化中，细菌发生改变使得它们能摄入并转化外源 DNA。枯草杆菌中的转化属于自然转化，*E.coli* 转化就属于工程转化。

对于 *E.coli*，目前主要采用电转化法和 CaCl_2 法将外源 DNA 导入受体细胞中，并需要相应地制备电转化感受态细胞和 CaCl_2 感受态细胞。其中，电转化法是利用瞬间高压在细胞上打孔，因而需用冰冷的超纯水多次洗涤处于对数生长前期的细胞，以使细胞悬浮液中应含有尽量少的导电离子。其转化效率为 $10^9 \sim 10^{10}$ 转化子/ μg DNA。而对于热激法，是利用冰冷的 CaCl_2 处理对数生长期的细胞，可以诱导其产生短暂的“感受态”，易于摄取外源 DNA。转化效率为 $10^6 \sim 10^7$ 转化子/ μg DNA。

一、CaCl₂ 感受态细胞的制备

CaCl₂ 感受态细胞的制备实验步骤

1. 前夜接种受体菌 (DH5 α 或 DH10B), 挑取单菌落于 LB 培养基中 37℃ 摇床培养过夜 (约 16 小时);
 2. 取 1ml 过夜培养物转接于 100ml LB 培养基中, 在 37℃ 摇床上剧烈振荡培养约 2.5-3 小时 (250-300rpm);
 3. 将 0.1M CaCl₂ 溶液置于冰上预冷;
- 以下步骤需在超净工作台和冰上操作
4. 吸取 1.5ml 培养好的菌液至 1.5ml 离心管中, 在冰上冷却 10 分钟;
 5. 4℃ 下 3000 g 冷冻离心 5 分钟;
 6. 弃去上清, 加入 100 μ l 预冷 0.1M CaCl₂ 溶液, 用移液枪轻轻上下吸动打匀, 使细胞重新悬浮, 在冰放置 20 分钟;
 7. 4℃ 下 3000 g 冷冻离心 5 分钟;
 8. 弃去上清, 加入 100 μ l 预冷 0.1M CaCl₂ 溶液, 用移液枪轻轻上下吸动打匀, 使细胞重新悬浮;
 9. 细胞悬浮液可立即用于转化实验或添加冷冻保护剂 (15% - 20% 甘油) 后超低温冷冻贮存备用 (-70℃)。

以上是基本步骤, 基本同“分子克隆指南”, 具体的体积 (一次制作感受态细胞的量) 由个人根据实际情况掌握, 不一定要死守以上的体积, 但要保持试剂、菌体等量的平衡。提高感受态效率的关键如下述——

注意事项:

1. 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；
2. 菌体的OD₆₀₀值，JM109 或BL21，OD值为 0.35，DH5 α 为 0.4，要尽量保证OD值不要过高，更不能超过 0.6；
3. 低温处理的时间，做完后冰上保存 12 到 24h后分装，并保存于-80℃；
4. 试剂和用品，非如果有可能，所有的用品（离心管、摇瓶等等）用新的，如果使用旧的，要确保干净，CaCl₂ 溶液要过滤除菌，不要高压灭菌。

二、电转感受态细胞的制备

- 1、-80℃冰箱保存的菌种在 SOB 固体平板上划单菌落；
- 2、次晨，挑选单克隆感至内含 1ml SOB 液体培养基的试管中，37℃，300rpm，6 hr；
- 3、然后转接到含 400ml SOB 液体培养基的 2L 摇瓶中(按 1:500 的量转接)，300rpm，4hr，然后每隔 2 min 测一次 OD₆₀₀，至 OD₆₀₀=0.76；
- 4、立刻置冰水浴中骤冷，可以选择在一个大的装有冰水混合物的容器里快速旋转摇动内有培养物的三角瓶，尽快使培养物温度降下来；
- 5、随后在 250ml 预冷的离心杯中离心，4℃，2000 g，10 min；
- 6、弃上清后，用预冷的水（灭菌的重蒸水）洗：先加少量水悬浮菌体（具体办法：在一个大的装有冰水混合物的容器里旋转摇动离心杯使菌体悬浮），菌体悬浮后再把水加满，2200 g，10 min，弃上清；
- 7、再用 10%的甘油同样方法洗两次，2400 g，10 min；
- 8、最后一次倒尽甘油后（尽量去干净），用残存在管底的甘油悬浮细胞，每 120 μ l 分装到 1.5 mL Ep 管（EP 管要-70 度预冷），用-70℃的乙醇迅速冰冻；

9、保存在-80℃冰箱中备用。

以 DH10B 为例说明：

步骤 1：每次做感受态都要新鲜划菌，不要使用保存于 4℃或室温的平板；尽量使用原代菌，最好不要用多次传代的菌；LB 平板也可以，但效率可能会降低；SOB 使用 GIBCO 公司的试剂配制，效果最好；但若电转的连接子为一般性载体，使用普通的试剂配制培养基即可；

步骤 2：该步骤与步骤 3 中出现的数字存在相关性，条件允许的话尽量按照要求做，不允许的话则按照实验室实际情况稍做修改，确保菌体生长良好；

步骤 3：确保 OD 达到要求，宁可低一点，也不要高一点，建议在达到 0.5 后过 2-3 min 就测一次 OD 值；

步骤 4：一定要在冰水混合物中快速旋转摇动内有培养物的三角瓶，尽快使培养物温度降下来，不要静置于冰水混合物中，摇动大约 10 min；

步骤 5：建议使用离心杯，因为其底是平的，并且灭菌时里面要装上双蒸水,利于步骤 6, 7 与 8 中的悬浮操作；

步骤 6：悬浮菌体时不要使用移液枪，开始时加入的水量要少，避免过多，等菌体重悬起来以后再加满。用手摇动时保证培养基液面低于冰面，重悬过程中注意悬浮的菌团出现，需将其全部分散开；

步骤 7：同上

步骤 8：尽量倒尽甘油，使感受态更浓，每 400ml 培养物制备 1-1.5mL 感受态为宜；

关于 EP 管预冷与-70℃的乙醇迅速冰冻的具体办法：在菌种保藏盒内加入适量的乙醇，再把空的 EP 管盖上帽子后放入其中，置于-70 度冰箱（或-80℃冰箱）预冷，分装感受态的时候将其取出（**连带保藏盒**），在超净台分装，分装时使用灭菌并剪去尖头的枪头，尽量使用 1ml 蓝色大枪头。完成后置于- 80℃冰箱；

步骤 9：关于保存感受态的温度，- 70℃、- 80℃皆可，建议实验室现有的温度最低的冰箱；

以上方法适用于很多 *E.coli* 菌株，例如：XL1-Blue, DH10B, DH5 α , Top10,

JM109, BL21 等做电转感受态, 可能不同的菌株生长速度有差异, 方案中的培养时间与最佳 OD 值可能有变化, 不妨用此方案尝试一下, 如果效率不够高的话可以对所用的菌株进一步进行优化。

注意:

- 1.所用的摇瓶和离心管要洗的特别干净, 禁用任何洗涤剂, 用 NaOH 溶液洗数次;
- 2.重悬菌体用手振荡, 不用振荡器;
- 3.用枪吸打要轻, 枪头需要剪去尖头;
- 4.如果做的效果好, 效率可以达到 10^{10} 以上。

对于 *E.coli* 感受态制备, 以上实验方案都要特别注意: 所有的容器要用新的, 不用洗涤剂, 用手洗且保证彻底干净; 相应的器材要作为制备感受态细胞专用, 不做其他用途; 试剂要选用最好的, 尽量过滤除菌, 不用高压灭菌等等。因为电转化效率更高, 对要求转化率的实验, 建议采用电转化的方法。

附件 1. 晶美公司高效感受态细胞制作方法:

版权归晶美公司所有, 仅供大家参考!

方法一

A 液: 1M, $MnCl_2$:

B 液: 1M, HEPES, pH=6.2-6.8, 用无菌水配, 配后不需灭菌;

C 液 称取 $CaCl_2$ 0.10g, KCl 1.18g, 全部转入细口试剂瓶, 然后加入 46ml 三蒸水, 轻轻振荡使所有组分充分溶解。将瓶塞盖上并用牛皮纸、棉线包扎, 然后放入灭菌锅 121℃ 高压灭菌备用。

取 1 管 B 液(0.6ml), 全部加入 C 液(46ml)中, 混匀后, 再用 1ml 移液器加入 3.3ml A 液, 混匀冰浴即可使用。

划线得到单菌落, 37℃ 培养箱培养约 17 小时, 挑取 2-4 个形态饱满的单菌落接种于装有 100ml SOB 培养基的三角瓶, 37℃ 剧烈振荡 (300 rpm) 培养 3-4 小

时，将培养温度调至 18℃ 剧烈振荡 (3280 rpm) 培养，其余与普通感受态差不多，每管加入 4ml TB 缓冲液，轻轻振荡，使菌体重新悬浮，加入 280ml DMSO (可用国产分析纯)，混匀后分装入 1.5ml EP 管，冰上静置 15 分钟。用纱布将所有装有感受态的 EP 管包好，用棉线系好后放入液氮中速冻，在液氮中静置 12 小时以上。取出感受态放入 -70℃ 超低温冰箱备用。

效率非常高，一般可到 10^8 ，好时可到 10^9 ，特别适宜于大片段与文库构建及珍贵材料的连接转化。

洁净是最重要的。无菌都无所谓，在操作台上可正常操作。离心力要注意不要超过 2500g, 建议 1500-2000g 5min。涂板要注意，不要觉得不匀而多次反复，轻轻在平板上带一下感觉板上大部分地方走过即可，特别在冰箱中保存过或在温箱中温浴 2 小时以上的板。涂完后建议空气晾干 (20-30 分钟) 这样会减少卫星菌落出现。

预冷是必要的。整个过程的低温也并非特别重要，只要注意就行了，我在去残液时经常在室温倒置 1min，对感受态效率提高有帮助，第一次多加一点缓冲液，我经常加至 20ml，效果不错。

关于大肠杆菌的感受态制备及转化的方法很多，最复杂的莫过于电转化，而最简单的则是将 LB 平板上的菌落直接挑入装有缓冲液的 EP 管冰箱即开始转化。对于做克隆工作的人而言，高而稳定的感受态可减轻不少麻烦。

现在大肠杆菌转化效率最高的要数电转化，可达到 10^{10} ，但是操作起来比较麻烦。要想又简单，又能有较高的转化效率，最好的莫过于 1990 年《gene》上刊登的由 Inoue H. 等提出的高效感受态的制备与转化方法。

根据实验室的实际情况，我们将其稍作修改，做成了 GLP 文件，但其中仍有许多可改进或需要注意的地方，其中有一些对普通感受态效率的提高也有一定的帮助。

1、所用器具的洁净程度。这一点非常重要，是所有与感受态有关的方法与文章上必讲的，毋庸置疑。

2、培养基的装量：培养基的装量是很重要的，这关系到菌体生长过程中的能量代谢问题，是有氧还是无氧生长。厌氧生长出来的菌体是做不出效率高的感受态的。建议装量不要高于此值为：培养基体积/三角瓶容量=100ml/500ml，50ml/250ml。

3、培养基的 pH 值。这是讲的 pH 值并非单指配置或灭菌后的 pH 值，而且还包括整个摇瓶结束后的 pH 值。一般来说，接种前的 pH 值在 6.8-7.2，等菌摇好后，可以测一下 pH 值，不要低于 6.0，最好在 6.5 以上。这表示菌体的代谢为有氧代谢，生长状态良好，按要求做，肯定效率不低。

4、培养后的 OD 值。其实这并非一个非常重要的参数，只是当 OD 值大到一定的程度后，菌体要保持对数生长已经不太可能，因此很多指导方法上强调 OD 不得大于 0.6，0.8 等等。同时，OD 值大时菌体总量大，因而感受态绝对数量要大一点，因而需要在 OD 值的两方面影响中找一个平衡点。

5、培养基中的各种离子。经验证明，当培养基中存在一定量的 Mg^{2+} 离子时，该方法制得的感受态要相对较高。在制备普通感受态时，使用 20mM $MgCl_2$ 做为培养基的添加物，在感受态收获之前 20-30 分钟加入，会收到很好的效果。

6、培养温度。文献及经验告诉我们，较低的温度培养有利于感受态的形成，这样可以获得较高的感受态，但太低又不实用，因而产生了 Inoue 的高效感受态制备方法，它实际是利用了所有有利于感受态的文献而得出的一个非常理想方法。

7、此外文献报道，在保存感受态时，DMSO 要比甘油的效果要好，它会使感受态的效率增加。

8、液氮速冻也会使感受态的效率提高，因此推荐用液氮速冻感受态，然后保存于超低温冰箱内。至于在液氮中保存 12 小时以后再转入超低温冰箱，这点未做实验，只是一种感觉，第一次这样做了，没问题，以后就照此办理而已。

方法二

1.液氮或低温冰箱中取出的大肠杆菌*E.COLI DH5, JM109,HB101 等,在 LB 平板上划线,37 度过夜至长出单菌落.

2.挑直径 1-3 毫米的单菌落*可多个,接种到 250 毫升/3 升锥形瓶 或 80 毫升/1 升锥形瓶的 SOB 培养基.培养基量不可再多,会影响效率.

- 3.在 18 度 150-250RPM 培养 19-50 小时*没有冷却摇床的可在室温,但不可高于 37 度.
- 4.OD600 约 0.4-0.8 时停止培养,放在冰水中冷却 10 分钟
5. 4 度, 300RPM 离心 15 分钟,回收菌体
- 6.去掉上清后,用 1/3 体积的冰冷 TB 溶液悬浮,在冷 10 分钟
- 7.再次离心回收菌体
- 8.用 1/12.5 体积的 TB 悬浮,添加最终浓度为 7%的 DMSO,再冷却 10 分钟
- 9.0.1-1 毫升分装,直接在液氮中冻上.
- 10.在液氮或-80 度保存.

附件 2. 小木虫 发布的高效感受态细胞的制作

小木虫网站所有,供大家参考。 作者: noah

方法一

A 液: 1M, MnCl_2 :

B 液: 1M, HEPES, pH=6.2-6.8, 用无菌水配,配后不需灭菌;

C 液 称取 CaCl_2 0.10g, KCl 1.18g, 全部转入细口试剂瓶,然后加入 46ml 三蒸水,轻轻振荡使所有组分充分溶解。将瓶塞盖上并用牛皮纸、棉线包扎,然后放入灭菌锅 121℃ 高压灭菌备用。取 1 管 B 液 (0.6ml), 全部加入 C 液(46ml)中,混匀后,再用 1ml 移液器加入 3.3ml A 液,混匀冰浴即可使用。

划线得到单菌落,37℃培养箱培养约 17 小时, 挑取 2-4 个形态饱满的单菌落接种于装有 100ml SOB 培养基的三角瓶,37℃剧烈振荡 (300 rpms) 培养 3-4 小时,将培养温度调至 18℃剧烈振荡 (3280 rpms) 培养,其余与普通感受态差不多,每管加入 4ml TB 缓冲液,轻轻振荡,使菌体重新悬浮,加入 280ml DMSO (可用国产分析纯),混匀后分装入 1.5ml EP 管,冰上静置 15 分钟。用纱布将所有装有

感受态的 EP 管包好，用棉线系好后放入液氮中速冻，在液氮中静置 12 小时以上。取出感受态放入-70℃超低温冰箱备用。

效率非常高，一般可到 10^8 ，好时可到 10^9 ，特别适宜于大片段与文库构建及珍贵材料的连接转化。

洁净是最重要的。无菌都无所谓，在操作台上可正常操作。离心力要注意不要超过 2500g,建议 1500-2000g 5min。涂板要注意，不要觉得不匀而多次反复，轻轻在平板上带一下感觉板上大部分地方走过即可，特别在冰箱中保存过或在温箱中温浴 2 小时以上的板。涂完后建议空气晾干（20-30 分钟）这样会减少卫星菌落出现。

预冷是必要的。整个过程的低温也并非特别重要，只要注意就行了，我在去残液时经常在室温倒置 1min，对感受态效率提高有帮助，第一次多加一点缓冲液，我经常加至 20ml，效果不错。

关于大肠杆菌的感受态制备及转化的方法很多，最复杂的莫过于电转化，而最简单的则是将 LB 平板上的菌落直接挑入装有缓冲液的 EP 管冰箱即开始转化。对于做克隆工作的人而言，高而稳定的感受态可减轻不少麻烦。

现在大肠杆菌转化效率最高的要数电转化，可达到 10^{10} ，但是操作起来比较麻烦。要想又简单，又能有较高的转化效率，最好的莫过于 1990 年《gene》上刊登的由 Inoue H.等提出的高效感受态的制备与转化方法。

根据实验室的实际情况，我们将其稍作修改，做成了 GLP 文件，但其中仍有许多可改进或需要注意的地方，其中有一些对普通感受态效率的提高也有一定的帮助。

1、所用器具的洁净程度。这一点非常重要，是所有与感受态有关的方法与文章上必讲的，毋庸置疑。

2、培养基的装量：培养基的装量是很重要的，这关系到菌体生长过程中的能量代谢问题，是有氧还是无氧生长。厌氧生长出来的菌体是做不出效率高的感受态的。建议装量不要高于此值为：培养基体积/三角瓶容量=100ml/500ml，50ml/250ml。

3、培养基的 pH 值。这是讲的 pH 值并非单指配置或灭菌后的 pH 值，而且还包括整个摇瓶结束后的 pH 值。一般来说，接种前的 pH 值在 6.8-7.2，等菌摇好后，可以测一下 pH 值，不要低于 6.0，最好在 6.5 以上。这表示菌体的代谢为有氧代谢，生长状态良好，按要求做，肯定效率不低。

4、培养后的 OD 值。其实这并非一个非常重要的参数，只是当 OD 值大到一定的程度后，菌体要保持对数生长已经不太可能，因此很多指导方法上强调 OD 不得大于 0.6，0.8 等等。同时，OD 值大时菌体总量大，因而感受态绝对数量要大一点，因而需要在 OD 值的两方面影响中找一个平衡点。

5、培养基中的各种离子。经验证明，当培养基中存在一定量的 Mg^{2+} 离子时，该方法制得的感受态要相对较高。在制备普通感受态时，使用 20mM $MgCl_2$ 做为培养基的添加物，在感受态收获之前 20-30 分钟加入，会收到很好的效果。

6、培养温度。文献及经验告诉我们，较低的温度培养有利于感受态的形成，这样可以获得较高的感受态，但太低又不实用，因而产生了 Inoue 的高效感受态制备方法，它实际是利用了所有有利于感受态的文献而得出的一个非常理想方法。

7、此外文献报道，在保存感受态时，DMSO 要比甘油的效果要好，它会使感受态的效率增加。

8、液氮速冻也会使感受态的效率提高，因此推荐用液氮速冻感受态，然后保存于超低温冰箱内。至于在液氮中保存 12 小时以后再转入超低温冰箱，这点未做实验，只是一种感觉，第一次这样做了，没问题，以后就照此办理而已。

方法二

- 1.液氮或低温冰箱中取出的大肠杆菌*E.COLI DH5, JM109,HB101 等,在 LB 平板上划线,37 度过夜至长出单菌落.
- 2.挑直径 1-3 毫米的单菌落*可多个, 接种到 250 毫升/3 升锥形瓶 或 80 毫升/1 升锥形瓶的 SOB 培养基. 培养基量不可再多,会影响效率.
- 3.在 18 度 150-250RPM 培养 19-50 小时*没有冷却摇床的可在室温,但不可高于 37 度.
- 4.OD600 约 0.4-0.8 时停止培养, 放在冰水中冷却 10 分钟
5. 4 度, 300RPM 离心 15 分钟, 回收菌体
- 6.去掉上清后, 用 1/3 体积的冰冷 TB 溶液悬浮, 在冷 10 分钟
- 7.再次离心回收菌体
- 8.用 1/12.5 体积的 TB 悬浮, 添加最终浓度为 7%的 DMSO, 再冷却 10 分钟
- 9.0.1-1 毫升分装, 直接在液氮中冻上.
- 10.在液氮或-80 度保存.

方法三

- (1) 将置于液氮保存的大肠杆菌划线在 LB 平板上, 37℃培养活化。
- (2) 挑取经活化的大肠杆菌单菌落于 SOC 液体培养基, 18℃, 200-250rpm 培养。
- (3) 当 OD600=0.5-0.8 时, 用预冷的 40mL 离心管于 4℃, 8000rpm 离心 10min, 收集菌体。

(4) 用预冷的 TB Buffer 重悬菌体, 4℃, 8000rpm 离心 10min, 收集菌体。

(5) 重复第 4 步操作。

(6) 用 8mL 预冷的 TB Buffer 重悬菌体, 缓慢加入 DMSO 至终浓度 7% 。

(7) 冰浴 10min 后, 分装保存于液氮中。

本法效率极高,建议大家采纳

方法四

1. 单菌落-----2ml LB 37 度 120RPM 过夜-----1%转接-----37 度 200RPM2 小时(OD 到 0.4~0.5)

2. 2ml, 冰浴 15min, 4 度, 6000RPM 5min, 弃上清, 悬浮于 1ml 0.1M CaCl₂ 中, 冰浴 20min

3. 4 度, 6000RPM 10min, 重悬浮于 200ul 0.1M CaCl₂ 中, 冰浴 30min

建议用 TSS 法, 简单方便, 比氯化钙法的转化效率高. 别的菌可能不一定适用。

方法五

E.coli 感受态细胞制备方法:

单菌落平板至 2ml LB, 37℃ 250 r/m, 1ml 转至 50 ml LB, 37℃ 250 r/m 至 A₆₀₀=0.2-0.4

离心后用 10 毫升 TSS 重悬后, 分装 -70℃ 保存。尽量冰上操作。

转化: 加质粒(<5 ul/100ul cell) 后冰上 30 分钟, 42℃ 90 秒, 冰上 2 分钟, 加 LB 至 1ml, 37℃ 1 小时后铺抗生素平板。

TSS:

7.0ml pH6.1 LB

2.0ml 50% PEG6000

0.5ML dmsO

0.2ML Mg²⁺ (0.1ml 1mol/l MgCl₂ and 0.1ml 1mol/l MgSO₄)

0.3ml ddH₂O

枯草芽孢杆菌感受态细胞的制备及转化

以枯草芽孢杆菌 168 (*Bacillus subtilis* 168) 为例

枯草杆菌化学感受态制备及转化方法

1.准备新鲜的 168 单克隆平板,取一满环枯草芽孢杆菌甘油菌划 LB 平板,37℃ 培养箱培养 12 h;

2.转化前一天晚间挑单菌落至 3 ml LB 培养基中, 37℃, 250 r/min 培养过夜;

3.第二天上午取 160 μl 培养液转接至 8 ml SPI 培养基中, 37℃, 250 r/min 培养至对数生长末期(168 约 4-5 h);

4.取 0.2 ml 生长至对数期末的培养液至 2 ml SPII 培养基中,37 °C, 100 r/min 培养 90 分钟;

5.在上述 SPII 培养基的菌体中加入 20 μ l 10mmol/L EGTA, 再于 37°C, 100 r/min 培养 10 分钟;

6.将上述处理后的菌液分装成 0.5 ml 每管, 各加入 5 μ l DNA (DNA 量不能过高, 不超过 5 μ g), 再于 37 °C, 250 r/min 培养 90 分钟, 取菌液涂布筛选平板。

相关试剂配方如下:

SP 盐:

0.2%(NH₄)₂SO₄,

1.4% K₂HPO₄,

0.6% KH₂PO₄,

0.02% MgSO₄·7H₂O,

0.1% 柠檬酸钠;

CAYE (100×): 2 % Casamino acid, 10%酵母膏。

SPI 培养基: SP 盐溶液加入 1 %体积浓度为 50%葡萄糖溶液, 1 %体积 100×CAYE 溶液;

SPII 培养基: SPI 培养基加入 1 %体积 50 mmol/L CaCl₂ 溶液, 1 %体积 250 mmol/L MgCl₂ 溶液。

● 试剂

SP—A Salts Solution: (500 ml Solution)

0.4% (NH₄)₂SO₄ 2g

2.8% K₂HPO₄ · 3H₂O 14g

1.2% KH₂PO₄ 6g

0.2% Trisodium Citrate Dihydrate 1g

121°C 灭菌 20min

SP—B Salts Solution: (500 ml Solution)

0.04% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g

121℃灭菌 20min

100× CAYE Solution: (100 ml Solution)

2% Casamino acid 2g

10% Yeast Extract 10g

121℃灭菌 20min

SPI Medium: (20 mL)

9.8mL SP—A Salts Solution

9.8mL SP—B Salts Solution

200μL (1%V) Glucose (50%w/v, 115℃灭菌 20min)

200μL (1%V) 100× CAYE

SPII Medium: (6 mL)

5.88mL SPI Medium

60μL (1%V) 50mM CaCl_2

60μL (1%V) 250mM MgCl_2

100×EGTA Solution: 10mmol / L EGTA 溶液, 溶解时需加少量 NaOH 至 pH8.0

注意:

1. 注意仪器用品的干净和无菌;
2. 8ml SPI 培养基要放于 50ml 离心管中培养, 以保证菌体的生长状态, 不要使用玻璃试管;
3. 注意测定 OD 值, 一定要等菌体生长至对数期后期;
4. 保证菌体的浓度, 可以提高转化率。

农杆菌感受态细胞的制备及转化

参考帖子:

<http://www.helixnet.cn/viewthread.php?tid=72>

<http://www.helixnet.cn/redirect.php?tid=1056&goto=lastpost>

酵母感受态细胞的制备及转化

有关毕赤酵母的相关资料：

毕赤酵母表达操作手册（精译版）

<http://www.helixnet.cn/viewthread.php?tid=17&extra=page%3D1>

毕赤酵母表达实验手册(丁香园版)

<http://www.helixnet.cn/viewthread.php?tid=34&extra=page%3D1>

毕赤酵母表达手册英文原版

<http://www.helixnet.cn/viewthread.php?tid=19&extra=page%3D2>

Pichia pastoris 完整操作手册

<http://www.helixnet.cn/viewthread.php?tid=2136&extra=page%3D2>

更详细、全面的有关酵母的资料请去：

<http://www.helixnet.cn/forumdisplay.php?fid=26>

以毕赤酵母为例说明其感受态细胞制备及转化。

对于毕赤酵母的转化目前有 4 种方法：

1. 锂盐法；2. PEG 法；3. 原生质体法；4. 电穿孔法。

锂盐法和 PEG 法方法简便，但效率很低，每微克 DNA 只有几十个转化子或更低，一般不多用。原生质体法和电穿孔法转化率都较高，且一般可得到高拷贝重组，其转化率都可达到 $10^5/\mu\text{g}$ 。但因原生质体法操作繁琐费时，所以简便、快速、高效的电穿孔法是理想的转化方法。

对以上几种方法分述如下：

毕氏酵母氯化锂转化法

1. 试剂

1M LiCl (用去离子蒸馏水配制, 滤膜过滤除菌; 必要时用消毒去离子水稀释)

50% PEG3350 (Sigma P3640 用去离子蒸馏水配制, 滤膜过滤除菌, 用较紧的盖子的瓶子分装)

2mg/ml salmon sperm DNA / TE (10mM Tris-Cl, pH8.0, 1.0mM EDTA) -20℃保存

注: 醋酸锂对毕氏酵母无效, 仅氯化锂有效; PEG3350 可屏蔽高浓度 LiCl 的毒害作用;

2. 感受态毕氏酵母的制备

1. 接种 *Pachia pastoris* 到 50ml YPD 培养基中, 30℃摇菌过夜 (约 24~28h) 培养到 OD 值为 0.8~1.0 (约 10⁸ Cells/ml);

2. 收获细胞, 用 25ml 无菌水洗涤一次, 室温下 1500g 离心 10min;

3. 重悬细胞于 1ml 100mM LiCl 溶液中, 将悬液转入 1.5ml 离心管;

4. 离心机最大速度离心 15 秒沉淀菌体, 重悬菌体于 400ul 100mM LiCl 溶液中;

5. 按 50ul/管分装, 立即进行转化;

注: 不要将感受态酵母菌冰浴;

3. 毕氏酵母的转化

1. 煮沸 1ml 鲑鱼精 DNA 5min, 迅速冰浴以制备单链担体 DNA;

2. 将感受态酵母菌离心, 以 Tips 去除残余的 LiCl 溶液;

3. 对于每一个转化, 按以下顺序加入:

50% PEG3350	240ul
-------------	-------

1M LiCl	36ul
---------	------

2mg/ml 单链 Salmon sperm DNA	25ul
----------------------------	------

5~10ug/50ul H ₂ O 质粒 DNA	50ul
-------------------------------------	------

4. 剧烈旋涡混匀直至沉淀菌体完全分布均匀 (约 1min);

5. 30℃水浴孵育 30min;

6. 42℃水浴热休克 20~25min;@
7. 6000~8000rpm 离心收集酵母菌体;
8. 重悬酵母于 1ml YPD 培养基, 30℃摇床孵育;
9. 1~4h 后, 取 25~100ul 菌液铺选择性培养基平板, 于 30℃培养 2~3 天鉴定;

毕氏酵母 PEG1000 转化法

1.试剂

缓冲液 A: 1.0M Sorbitol, 10mM Bicine, pH8.35 (sigma), 3% (v/v) ethylene glycol

缓冲液 B: 40% (w/v) PEG1000 (sigma), 0.2M Bicine, pH8.35

缓冲液 C: 0.15M NaCl, 10mM Bicine, pH8.35

未污染的新鲜、试剂级 DMSO, -70℃保存!

注: 1. 缓冲液 A、B、C 均用滤膜过滤, -20℃保存;

2. 将 DNA 直接加在冻结的酵母细胞上是本实验的关键之处(即使在冰上解冻的待转化细胞, 其摄取外源 DNA 的能力也在解冻过程中迅速下降; 如进行多样品的转化, 建议按 6 样品/组进行)

2.待转化毕氏酵母的制备

1. 接种环接种 *Pachia pastoris* 于 YPD 平板, 30℃培养 2d;
2. 挑取单克隆酵母菌株于 10ml YPD 培养基中, 30℃振荡培养过夜;
3. 取步骤 2 中小量菌液接种到 100ml YPD 培养基中振荡培养, 待其 OD 值从 0.1 升到 0.5~0.8;
4. 室温下 3000g 离心收集酵母菌体, 50ml 缓冲液 A 洗涤一次;
5. 重悬菌体于 4ml 缓冲液 A 中, 按 0.2ml/管分装于 1.5ml 的离心管中, 每管加入 11ul DMSO, 混合后迅速于液氮中冷冻,
6. -70℃保存

3.毕氏酵母的转化

1. 将约 50ug 线性化质粒 DNA 溶于 20ul TE 或水中, 直接加于冻结的酵母细胞

中；加入担体 DNA（40ug 变性超声线性化鲑鱼精 DNA）以获得最大转化率；

2. 37℃ 水浴孵育 5min，中间混合样品 1~2 次；
3. 取出离心管，加入 1.5ml 缓冲液 B，彻底混匀；
4. 30℃ 水浴孵育 1h；
5. 室温下 2000g 离心 10min，去除上清液，菌体沉淀重悬于 1.5ml 缓冲液 C 中；
6. 离心样品，去除上清液，轻微操作将样品重悬于 0.2ml 缓冲液 C 中；
7. 将所有转化液铺于选择性平板，于 30℃ 孵育 3~4 天后，鉴定；

毕氏酵母电转化法

1. 感受态细胞的制备

- (1) 取 10ul TOP10F' 菌液，接种于 200ml LB 液体培养基中活化培养，37℃，200 rpm，16~18 小时。取 100ul 菌液接种于 200ml 液体 LB 培养基中。
- (2) 37℃，200 rpm，培养 16~18 小时。
- (3) 灭菌 500 ml 离心管，4℃，4000 rpm，20 min。得菌体沉淀。弃上清，菌体用 10% 甘油重悬并洗涤。重复洗涤 3 次。
- (4) 第三次离心后，弃绝大部分上清，留下约 1ml 液体用于重悬菌体。
- (5) 从制得得感受态细胞中，取 200ul 于灭菌 EP 管中，加入连接反应产物 5ul，混匀，不要产生气泡，在冰上放置 5min。
- (6) 将混匀后得 200ul 菌液移入电击杯中。
- (7) 使用电击穿孔仪进行转化，设置为 电压 2500 V，时间 5 ms。
- (8) 电击后，往电击杯中加入 800ul SOC 培养基，冲洗出菌体，转移至灭菌 1.5 ml EP 管中。37℃，150 rpm，轻摇 45~60 min。
- (9) 取全部均匀涂布于含 Zeocin 25 ug/ml 的 LLB-Zeocin 平板上，正放，待涂布液不在流动，37℃ 培养 12~16 小时。

2. 线性化质粒 DNA 对 *Pichia pastoris* GS115 的转化

取新鲜制备的（或 -70℃ 冻存的）感受态细胞置于冰浴中，使其完全解冻；

- 1) 将 100 μ l 菌体移出至一新的无菌 Eppendorf 管中，加入 5—20 μ g 线性化质粒 (5~10 μ l)，轻弹混匀，尽数吸出转移到 0.2cm 型的电穿孔转化杯中；
- 2) 转化杯置于冰浴中 5~10 分钟，保持低温。
- 3) 电穿孔转化电击条件：电压：1500V；电阻：400 Ω ；电容：25 μ F；脉冲时间：10mS；一次电击。
- 4) 电击后，马上在电击转化杯中加入 1ml 4℃预冷的 1M 的山梨醇溶液，用微量移液枪吹打均匀，置于冰浴中；
- 5) 取 30℃烘至表面半干的 MD 培养基平板，在超净工作台上无菌操作涂布平板，400 μ l/板；

感受态制备关键点

1.甘油的质量，水的质量，最好是 miniQ 的，如果要求完美，洗瓶不要有洗涤剂残留，先将瓶装满 miniQ 水高压，再弃去，再配置 10%甘油。收菌以半对数期合适，一般 OD 0.5 收菌，过则不佳，直接取 -80 度菌种摇，次日转种，从盘上菌落摇的要差，33-34℃摇菌结果更理想。在以冰冷 10%甘油等量，半量，1/4 量洗涤时一定低温，重悬时应轻震荡，弃洗涤液应倒干静，那怕损掉部分细菌。最后大概 500ml 能做 3-4ml 感受态，液氮中冻 10min 转 -80 度冰箱，快一点，免的 EP 管爆了，也可不冷冻，直接用来转化。感受态应以标准浓度质粒电转记算效率，一般大于 10^9 /mg，操做以 1ng/ μ l 质粒 1ul 加 40ul 感受态置 0.1 杯，电转后以最快的速度加入 1ml SOC 复活，100-150 转摇 1hl，取 1/1000 铺盘应大于 1000 个菌生长。这样用于建库工作才行。电转时质粒或连接物尽可能少，以减少离子，实际上离子高，电流直接通过，没有场强，质粒是进不去的。

注：

- 1.任和有关东西都要干净，保证没有离子，
- 2.从接触甘油开始就保持恒温，0℃，
- 3.电击后复活要快。

关于载体连接的讨论

相信凡是做过分子生物学的人应该都对载体构建有所了解，而载体构建中基因片段同载体的连接是一个关键所在，现就同载体连接相关内容讨论如下：

1.连接的反应温度：DNA 连接酶的最适反应温度为 37℃，但在此温度下，分子布朗运动速度过快，连接后末端的氢键结合变的很不稳定，致使刚连接后的片段又大量的解离，所以连接反应不能在过高的温度中进行；但是，随着温度的降低，连接酶的活性降低，故为保证连接的效率，采取折衷方法是 16℃过夜，这样能够保证获得最佳的连接效果。当然，也不是所有的连接反应都是在 16℃下最好，也可以采用 12℃过夜，或者 37℃下反应 30min 然后 4℃过夜等等，这需要根据实际情况调整；

2.限制性内切酶在反应中是不需要外部提供能量的，但是 T4 DNA 连接酶需要在外部提供能量的情况下才能完成连接反应，因此，能量 ATP 的充分供给将是连接反应成败的另一关键因素。对于商业化的 DNA 连接酶来说，一般 ATP 都是在提供缓冲 buffer 中的，而 ATP 是不稳定的，随着时间的延长，ATP 会大量的消耗，为了解决能量即 ATP 的问题，建议对于难以连接的片段，不妨采用下面的方法试试：先以正常的体系连接（10 μl 体系中含 1 μl 酶、1 μl buffer、片段、载体）（16℃）连接 4-6h，然后在该体系中再加入 1 μl buffer 以提供充足的 ATP，而此时可以不考虑反应体系中盐离子浓度等，因为此时能量是更为重要的问题。

当然，连接反应还有其他许多因素，比如载体和片段的比例、片段末端形态等等这些都在此暂不讨论，只提供以上两点供参考。

个人见解，仅供参考！请广大螺友斧正，并欢迎大家提出意见和见解！

联系方式：

Email: lofeel@126.com

helixnet@126.com

QQ: 546738635

Helixnet 官方 2 群: 40598077

Helixnet 官方 3 群: 17011788

lofeel 2008.3.25